(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 949**

(21) Número de solicitud: 201130806

(51) Int. CI.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

19.05.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

09.12.2011

Fecha de la concesión:

01.08.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

13.08.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES

(72) Inventor/es:

LEIRO VIDAL, José Manuel;
LUZARDO ÁLVAREZ, Asteria;
LAMAS FERNÁNDEZ, Jesús;
LEÓN RODRÍGUEZ, Laura y
BLANCO MÉNDEZ, José

(74) Agente/Representante:

ACUÑA ÁLVAREZ, Laura

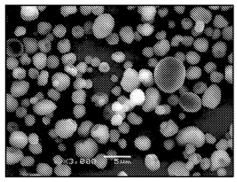
(54) Título: **Microesferas poliméricas como adyuvantes en la producción de vacunas frente a parásitos escuticociliados de peces.**

(57) Resumen:

Microesferas poliméricas como adyuvantes en la producción de vacunas frente a parásitos escuticociliados de peces.

La invención describe el uso de microesferas como adyuvantes en la obtención de una vacuna frente a la escuticociliatosis. La invención proporciona una vacuna que contiene microesferas esféricas de quitosano y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, que actúan como adyuvante, estando las microesferas recubiertas con antígeno de membrana de un parásito patógeno del rodaballo, el escuticociliado Philasterides dicentrarchi (sinónimo de Miamiensis avidus). La vacuna es capaz de inducir potentes respuestas inmunitarias y una protección elevada en el rodaballo frente a la escuticociliatosis, cuando es administrada por vía parenteral, mejorando la protección inducida por vacunas que utilizan adyuvantes oleosos conteniendo aceites metabolizables, pero sin producir efectos secundarios indeseables en los peces.

Figura 2



ES 2 369 949 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Microesferas poliméricas como adyuvantes en la producción de vacunas frente a parásitos escuticociliados de peces.

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo de desarrollo de vacunas para patógenos que afectan a especies producidas mediante acuicultura. Más concretamente, la invención describe el uso de microesferas como adyuvantes en la obtención de una vacuna frente a la escuticociliatosis. La invención proporciona una vacuna que contiene microesferas de quitosano y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, que actúan como adyuvante, estando las microesferas recubiertas con antígeno de membrana de un parásito patógeno del rodaballo, el escuticociliado *Philasterides dicentrarchi* (sinónimo de *Miamiensis avidus*). La vacuna induce la protección en los peces, por ejemplo, el rodaballo, frente a la escuticociliatosis y supera ventajosamente los inconvenientes existentes en la inmunización con otras vacunas que utilizan componentes oleosos como adyuvantes.

Estado de la técnica

El desarrollo de nuevas vacunas contra patologías emergentes de peces y la mejora de las formulaciones de vacunas convencionales, ha adquirido en los últimos años gran importancia, debida especialmente al gran impacto ocasionado en el ámbito económico y social de la acuicultura (Sommerset, I. *et al*., 2005. *Expert Review of Vaccines* 4(1):89-101).

Los preparados de vacunas convencionales incluyen normalmente un antígeno. Los principales inconvenientes que se encuentran son, por un lado, la gran cantidad de antígeno necesario para realizar la vacunación y por otro, que la protección obtenida es generalmente escasa y de corta duración.

Los adyuvantes son agentes farmacológicos o inmunológicos capaces de incrementar el efecto de otros agentes, tales como medicamentos o vacunas. Los adyuvantes son prácticamente inútiles si se administran solos, pero pueden servir para fabricar una vacuna mucho más eficaz. Cuando se administra junto con una vacuna, el adyuvante estimula el sistema inmunitario y aumenta su respuesta a la vacuna. Por todo ello, el desarrollo de nuevas formulaciones de adyuvantes que mejoren la inmunogenicidad de antígenos protectores y que potencien la respuesta inmunitaria del pez está cobrando en la actualidad un gran interés.

Muchas composiciones farmacéuticas de vacunas aplicadas en peces incluyen adyuvantes para aumentar la potencia antigénica, además de mejorar la estabilidad del antígeno o de la formulación. En estos casos, las composiciones de las vacunas disponibles suelen llevar incorporados adyuvantes "de efecto depot" por el que adyuvantes como las sales de aluminio o emulsiones de agua en aceite, mantienen al antígeno atrapado en el sitio de la administración, permitiendo un estímulo inmune prolongado. Este tipo de formulaciones, aunque mejoran la respuesta inmune del pez, acarrean ciertos efectos secundarios cuando se inyectan por vía intraperitoneal como: inflamación local, pérdida de peso, o formación de granulomas o abscesos, por lo que, debido a estos inconvenientes, su uso está a menudo desaconsejado.

Philasterides dicentrarchi es un parasito escuticociliado oportunista que provoca una infección sistémica muy grave en el rodaballo, conocida como escuticociliatosis, invadiendo sus órganos y tejidos (Iglesias R. *et al*. 2001 *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 47-55). El parásito entra a través de lesiones de la piel o a través de las branquias (Paramá A. *et al*. 2003 *Aquaculture* 217: 73-80) e invade diferentes órganos y tejidos del pez, provocando lesiones muy graves que acaban produciendo su muerte. La escuticociliatosis está directamente relacionada con problemas en la calidad del agua que favorecen la proliferación del parásito (Enfermedades emergentes en la piscicultura marina española. 2007. Servicio de patología de peces. Skretting. Universidad Autónoma de Barcelona).

La inmunoprofilaxis se presenta como una alternativa a la quimioterapia, ya que permitiría la prevención contra la infección puesto que, en la actualidad, no existen fármacos efectivos para tratarla (Iglesias R. *et al*. 2008 *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 417-424). Se han llevado a cabo intentos de obtención de una vacuna eficaz contra la escuticociliatosis en distintos peces planos, pero hasta la fecha ninguna de ellas es totalmente eficaz, sobretodo debido a la existencia de diferentes cepas de ciliados y a la incapacidad de generar protección cuando se inmuniza y se infecta con cepas heterólogas (Piazzón, C. *et al*. 2008 *Fish & Shellfish Immunology* 25: 417-424). Existen algunas formulaciones de vacunas inactivadas efectivas; sin embargo, utilizan una gran cantidad de ciliados completos (10^6 ciliados/ml) inactivados con formalina y emulsionados en adyuvantes oleosos tipo Montanide (Lamas, J., *et al*. 2008. *Aquaculture* 278: 22-26) y cuya seguridad aún no ha sido testada. Estas vacunas inactivadas presentan desventajas relacionadas sobretodo con la gran cantidad de antígeno usada, la necesidad de administrar varias dosis de recuerdo y, además, al no estar sometidas a ningún tipo de purificación, contienen todos los componentes bioquímicos, lo que hace que, por lo general, sean más reactógenas que las vacunas de subunidades, es decir, que provocan mayores efectos secundarios (Salieras, L. 2002. *Vacunas* 3: 78-84).

Por ejemplo, experiencias realizadas empleando adyuvante incompleto de Freund y 200 μg de antígeno de inmovilización de *Philasterides dicentrarchi* por individuo, indicaron que dichos antígenos no eran adecuados para inducir una respuesta inmune en platija, poniendo de manifiesto la dificultad en la selección de antígenos adecuados para la elaboración de vacunas para la escuticociliatosis (Lee, E.H. and Kim, K. H. 2008 *Fish & Shellfish Immunology* 24:

142e146). Ensayos de inmunización en rodaballo empleando 400 μg de antígeno de *Philasterides discentrarchi* por individuo con adyuvante de Freund sí demostraron ser eficaces para proteger a los peces de la infección, pero la toxicidad del adyuvante de Freund lo hace inadecuado para una aplicación comercial (Iglesias R. *et al*. 2003 *Parasitology* 126: 125-134). Por tanto, es deseable obtener una vacuna para prevenir la escuticociliatosis en peces que emplee un adyuvante de menor toxicidad que los empleados actualmente, pero que a su vez potencie la respuesta inmune, de modo que sea posible incorporar una cantidad de antígeno mínima pero suficiente para producir una respuesta inmune en peces.

A este respecto, es muy importante que una vacuna de subunidades como la que se propone (es decir, sin emplear el ciliado completo sino componentes del mismo), induzca elevados niveles de anticuerpos específicos puesto que, como se ha demostrado recientemente, el control efectivo de la escuticociliatosis inducida por ciliados parásitos, es dependiente, sobre todo, de la acción de los componentes humorales de la respuesta inmunitaria del pez sobre la activación de la vía clásica del complemento, en la que los anticuerpos juegan un papel clave (Leiro J. *et al*., 2008 *Parasite Immunology* 30: 535-543). En peces, se ha demostrado que la vía de administración peritoneal de vacunas es la que genera una mayor respuesta de anticuerpos (Estévez J. *et al*. 1994. *Aquaculture* 123: 197-204).

Se sabe que *P. dicentrarchi* presenta en su membrana antígenos inmunogénicos que el rodaballo es capaz de reconocer y producir anticuerpos contra ellos en respuesta a una infección natural o bajo distintos protocolos de inmunización ensayados (Piazzon C. *et al* 2008 *Fish and Shelfish Inmunology* 25: 417-424).

Las micropartículas, como sistemas de administración de vacunas, presentan la ventaja de poseer un tamaño similar al de los patógenos que el sistema inmunitario combate y, además, son fácilmente internalizadas por las células presentadoras de antígeno (O'Hagan DT, *et al*. 2006 *Methods* 40: 10-19). Por otro lado, se ha demostrado que las micropartículas con antígenos encapsulados presentan una inmunogenicidad similar a la del adyuvante de Freund (Regueiro González J.R., *et al*. 2002. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición. Editorial médica panamérica; capítulo 7).

La preparación de micropartículas con antígenos encapsulados por métodos o técnicas usados de manera convencional en el campo de la tecnología farmacéutica conlleva, en ocasiones, la degradación de la sustancia activa, debido principalmente a la desnaturalización por el uso de altas temperaturas, disolventes, o las altas fuerzas de cizalla que se emplean en la preparación de las partículas de tamaño micrométrico. Sería por tanto deseable obtener micropartículas capaces de retener al antígeno sin que éste se degrade, para que pueda ser reconocido por el sistema inmune.

La modificación de la superficie o funcionalización de las micropartículas con moléculas que puedan ser reconocidas por los macrófagos supondría una ventaja adicional a la de su capacidad adyuvante. De esta forma, se obtendría una vacuna con adyuvantes (micropartículas) que no generarían los inconvenientes producidos por los oleosos y que, además, induzcan una respuesta protectora eficaz. Ello posibilitaría una mayor seguridad en la inmunoprofilaxis y un mejor control de la escuticociliatosis en el cultivo de peces planos, particularmente en el rodaballo.

Para ello, la presente invención se centra en la preparación de una vacuna compuesta de microesferas obtenidas a partir de materiales biocompatibles y biodegradables que portan en su superficie un preparado de subunidades antigénicas procedentes de la membrana plasmática del escuticociliado *P. dicentrarchi* unido covalentemente. Este preparado farmacéutico es administrable por vía parenteral y se caracteriza por su especial capacidad inmunopotenciadora y sin generar reacciones inflamatorias adversas, proporcionando una protección adecuada en peces frente a enfermedades infecciosas parasitarias.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe la preparación de microesferas poliméricas, la composición de las microesferas poliméricas, la composición farmacéutica conteniendo dichas microesferas, y el uso de dicha composición en la preparación de una vacuna o de un medicamento para estimular la respuesta inmune en peces.

Los autores de la presente invención han llevado a cabo un proceso de optimización de la composición de microesferas formadas por dos polímeros biodegradables y biocompatibles, de modo que, cuando dichos polímeros están en unas proporciones determinadas, consiguen dotar a las microesferas de estabilidad, de modo que éstas se mantienen estables en forma de polvo seco (permitiendo su almacenamiento y conservación) y una vez reconstituidas en forma de suspensión acuosa, manteniendo todas sus propiedades hasta que se administran. Además, los polímeros que forman parte de las microesferas son biodegradables y biocompatibles, es decir, que una vez administradas, las microesferas de la invención se degradan en el organismo, dando lugar a metabolitos no tóxicos que pueden ser eliminados por las vías metabólicas normales. Asimismo, las microesferas tienen forma esférica y son de un rango de tamaños determinado, lo que permite su reconocimiento por los macrófagos que participan en la respuesta inmune. Además, los autores han demostrado que las microesferas de la invención a las que se une un antígeno en su superficie, son capaces de incrementar la respuesta inmune frente al antígeno unido a la microesfera, protegiendo al organismo receptor de una enfermedad concreta y sin reacciones adversas para el organismo receptor, en especial por la baja cantidad de antígeno que se emplea.

En concreto, los autores de la presente invención han sintetizado microesferas estables constituidas por polímeros biodegradables y biocompatibles (un polímero de quitosano y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico)

y que portan en su superficie un antígeno obtenido a partir de los componentes de la membrana del escuticociliado *Philasterides dicentrarchi*, donde el antígeno está unido a las microesferas covalentemente.

En un primer aspecto, la invención se refiere a microesferas, de aquí en adelante "microesferas de la invención", que comprenden (i) un polímero biodegradable de quitosano, o un derivado del mismo, (ii) un copolímero biodegradable de metil vinil éter y anhídrido maleico, o un derivado del mismo, (iii) un agente reticulante y (iv) uno o varios antígenos.

En la presente invención, se entiende por "polímero biodegradable" a un polímero que puede ser degradado *in vivo*, por vía enzimática o no (una vía no enzimática consistiría por ejemplo en que al penetrar el agua en las microesferas, éstas se erosionan y los restos son reabsorbidos por el organsimo), y que como resultado de su degradación en el organismo, da lugar a metabolitos no tóxicos que pueden ser eliminados por las vías metabólicas normales.

En la presente invención, se entiende por "polímero biocompatible" a aquel que no produce reacciones alérgicas, inmunitarias o reacciones adversas de otra índole al contacto con los tejidos del organismo, es decir, que al ser puesto en contacto con un organismo vivo, no resulta nocivo para el mismo.

En la presente invención se entiende por "microesfera" a una micropartícula de forma esférica y con una estructura matricial. Se entiende por micropartícula a aquella partícula con un diámetro inferior a 1 mm, preferiblemente inferior a 100 μm, preferiblemente inferior a 50 μm, y más preferiblemente con un diámetro entre 1 y 10 μm. Es importante tener en cuenta que, según su estructura interna y su morfología, las micropartículas se clasifican en microcápsulas y microesferas. La diferencia entre ambas es que mientras que las microcápsulas constan de un núcleo sólido o líquido recubierto por una membrana polimérica, en las microesferas la estructura del sistema es matricial, y la forma es siempre esférica. Por tanto, la presente invención hace referencia tan sólo al tipo concreto de micropartícula denominado "microesfera".

Las microesferas pueden presentar una carga eléctrica superficial (medida mediante el potencial Z), cuya magnitud puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de la proporción de los diferentes componentes en el sistema. Tanto el tamaño como el potencial zeta de las microesferas son parámetros importantes para la interacción con la superficie de las células. En una realización particular de la invención, las microesferas presentan carga positiva que puede variar entre 30 mV y 50 mV, más preferiblemente entre 35 y 45 mV. La carga es particularmente adecuada para garantizar la estabilidad de las microesferas tras la administración por vía parenteral. Al unir covalentemente un antígeno a la superficie de la microesfera, el potencial Z de la misma se incrementa, de forma que el aumento en este parámetro permite confirmar la modificación de la microesfera con el antígeno, como se demuestra en los ejemplos de la presente invención. El potencial zeta de las microesferas de la invención puede medirse utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental de la presente memoria descriptiva.

Una vez sintetizadas, las microesferas de la invención son estables, es decir, mantienen su estabilidad en forma de polvo seco liofilizado, y también tanto durante su reconstitución como una vez reconstituidas en forma de suspensión acuosa a temperatura ambiente, antes de ser administradas.

El primer polímero que forma parte de la microesfera de la invención es un polímero biodegradable de quitosano. El quitosano es un polisacárido natural que está compuesto de unidades de beta-(1-4)-D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) dispuestas al azar. Se trata de un derivado no tóxico y biodegradable de la quitina. El polímero de quitosano empleado para la preparación de las microesferas de la presente invención puede tener un peso molecular comprendido entre 15 y 300 kDa, preferentemente entre 25 y 200 kDa, más preferentemente entre 50 y 100 kDa.

En la presente invención, el quitosano comprendido en las microesferas puede ser también un derivado de quitosano. Se incluyen en la definición de derivado de quitosano las sales inorgánicas que puede formar el quitosano con ácidos como por ejemplo el ácido clorhídrico, el ácido acético, el ácido láctico, el ácido glutámico, o el ácido cítrico. Dichas sales son solubles en agua, y las mismas pueden ser una forma para incorporar el quitosano en una composición farmacéutica para su uso como vacuna o para estimular la respuesta inmune en un individuo. En los ejemplos de la presente invención, se emplea el clorhidrato de quitosano, y se dispersa en una solución de ácido acético. Ejemplos de derivados de quitosano son los siguientes: quitosanos O-acetilados, O-alquilados u O-sulfonatados, carboximetil quitosano, quitosano con distintos grados de acetilación, o derivados con ciclodextrinas, galactosa, manosa, ftalatos, ácidos grasos o metilpirrolidona, entre otros.

El segundo componente que forma parte de las microesferas de la invención es un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. Un ejemplo de copolímero sintético comercial de metil vinil éter y anhídrido maleico es Gantrez®AN, un excipiente ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y cosmética. El documento de patente ES2178961 B1 describe otros ejemplos de copolímeros de metil vinil éter y anhídrido maleico disponibles comercialmente. Las microesferas de la invención pueden prepararse con copolímeros de metil vinil éter y anhídrido maleico de distintos pesos moleculares, por ejemplo los comercializados bajo el nombre de Gantrez®AN. El peso molecular del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico que se emplea en las microesferas de la invención puede estar entre 100 y 2000 kDa, más preferiblemente entre 100 y 300 kDa, y aún más preferiblemente es de 200 kDa. Derivados del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico pueden ser Gantrez en su forma ácida (variedades del Gantrez S).

Las microesferas además comprenden uno o varios antígenos. Por tanto, la microesfera puede comprender un solo antígeno, derivado de un solo organismo, o bien varios antígenos, que pueden pertenecer tanto a distintos organismos, como a distintos componentes de un mismo organismo.

El término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia capaz de ser reconocida por el sistema inmune de un sujeto y/o capaz de inducir en un sujeto una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto; a modo ilustrativo, dicho término incluye cualquier producto inmunogénico, nativo o recombinante, obtenido de un organismo superior o de un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un protozoo o un hongo, que contiene uno o más determinantes antigénicos, por ejemplo, compuestos excretados por dichos organismos, tales como toxinas, o componentes estructurales de dichos organismos, por ejemplo componentes integrales de la membrana plasmática. Prácticamente cualquier antígeno puede ser utilizado en la elaboración de microesferas de la invención recubiertas con antígeno. Preferiblemente, el antígeno que se une a la superficie de las microesferas es un antígeno procedente de un parásito; aún más preferiblemente, es un antígeno procedente de un parásito que afecta a peces cultivados mediante acuicultura, tales como *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis avidus*, *Uronema nigricans*, *Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Ichthyophthirius multifiliis* o *Cryptocaryon irritans*.; más preferiblemente, es un antígeno procedente de al menos uno de los parásitos escuticociliados *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*; aún más preferiblemente, el antígeno es un componente de la membrana del parásito; aún más preferiblemente, es un antígeno de membrana de al menos uno de los parásitos escuticociliados *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*.

En una realización preferida, el/los antígeno/s está/n unido/s covalentemente a la superficie externa de la microesfera.

La unión covalente para ligar el antígeno a la microesfera se puede establecer entre el antígeno y el glutaraldehído remanente que existe en la superficie de las microesferas. Además, también se puede establecer entre el antígeno y los grupos aldehídos del copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico. En los ejemplos de la presente invención, la unión del antígeno a la superficie de las microesferas se realiza incorporando una solución de antígeno sobre una suspensión de microesferas, manteniendo ambos en agitación orbital constante durante 15 minutos a 22ºC.

En una realización preferida de la invención, el antígeno que se va a unir covalentemente a la superficie externa de la microesfera se añade en una proporción de entre 0.05 y 0.15% p/v. Más preferiblemente, la proporción de antígeno es de 0,1% p/v, entendiéndose % p/v o porcentaje peso/volumen como la proporción entre la cantidad de antígeno en peso y el volumen total de la suspensión en donde se suspenden las microesferas y se disuelve el antígeno, multiplicado por 100. En los ejemplos de la presente invención, el antígeno se incorpora a las microesferas incubando 1 mg de antígeno en una suspensión de 10 mg de microesferas, cuya concentración es 10 mg/ml; es decir, la concentración de antígeno es 1 mg/ml o 0,1% p/v en el volumen donde se encuentran las microesferas.

En otra realización preferida, las microesferas poseen una cantidad de antígeno unido covalentemente a su superficie externa de entre 2 y 7% p/p, preferiblemente de entre 3 y 6% p/p, más preferiblemente de entre 4 y 5% p/p, y aún más preferiblemente de 4,5% p/p, entendiéndose por % p/p como la proporción entre el peso del antígeno y el peso de la microesfera, multiplicado por 100.

En otra realización preferida de la invención, el antígeno unido covalentemente a la superficie externa de la microesfera es un componente de un parásito. Más preferiblemente, es un componente de uno de los parásitos *Philasterides dicentrarchi*, *Miamiensis avidus*, *Uronema nigricans*, *Uronema marinum*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Ichthyophthirius multifiliis* o *Cryptocaryon irritans*. Más preferiblemente, es un componente de al menos uno de los parásitos *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*; aún más preferiblemente, es un componente de la membrana de al menos uno de los parásitos escuticociliados *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*.

Philasterides dicentrarchi es el agente causal de la escuticociliatosis en peces, y afecta principalmente a rodaballo, platija, lenguado, lubina, parracho e hirami. Además, diferentes estudios indican que otros escuticociliados como *Miamiensis avidus* son especies muy próximas filogenéticamente a *Philasterides dicentrarchi*, habiéndose constatado hasta un 99% de similitud entre ambas especies a nivel de la secuencia de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (Paramá *et al*. 2006. *Parasitology* 132: 555-564).

Las microesferas también comprenden un agente reticulante para mejorar la estabilidad de las mismas, por ejemplo para mejorar su estabilidad en un medio acuoso. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes reticulantes que se pueden utilizar incluyen compuestos con grupos aldehído (tales como glutaraldehído o formaldehído), tripolifosfato sódico y otros polianiones, genipin, glioxal, etilenglicol diglicidil éter y, en general, cualquier molécula que presente grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes en los polímeros biodegradables.

En una realización preferida, el agente reticulante es glutaraldehído, formaldehído, tripolifosfato sódico, genipin, glioxal, etilenglicol diglicidil éter, preferiblemente glutaraldehído. Preferiblemente, las microesferas se preparan añadiendo el agente reticulante en una proporción de entre el 0,01 y 0,1% p/v, más preferiblemente entre el 0,015 y 0,025%, y aún más preferiblemente, en una proporción de 0,02%, entendiéndose por % p/v o porcentaje peso/volumen a la proporción entre el peso del agente reticulante y el volumen total de la dispersión de los dos polímeros, multiplicado por 100.

En los ejemplos de la presente invención, las microesferas se preparan dispersando, en primer lugar, una cantidad determinada de copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en acetona, lo cual se incorpora sobre una dispersión de clorhidrato de quitosano en ácido acético, y a lo cual se añade un agente reticulante. Seguidamente se incorpora una solución de antígeno sobre una suspensión de microesferas y se recogen las microesferas con antígeno unido por centrifugación.

En una realización preferida de la invención, las microesferas de la invención se preparan añadiendo el polímero de quitosano en una proporción de entre 0,12 y 0,5% p/v, preferiblemente a una concentración del 0,25% p/v, y el copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en una proporción de entre el 0,15 y 0,5% p/v, preferiblemente a una concentración del 0,24% p/v, entendiéndose % p/v o porcentaje peso/volumen como la proporción entre el peso del polímero o copolímero y el volumen final total de la dispersión de los dos polímeros (100 ml en los ejemplos de la presente invención), multiplicado por 100. Estos rangos de porcentajes p/v del polímero y del copolímero, así como el orden en que se añaden los distintos componentes, la cantidad de reticulante empleado, tiempo de reticulación, disolventes y condiciones de preparación (temperatura de atomización, caudal de la dispersión de polímeros, y presión de aire) son importantes para que las microesferas mantengan su estabilidad. Ensayos llevados a cabo por los autores de la presente invención demostraron que cuando el polímero y el copolímero se unen en proporciones fuera de estos rangos, por ejemplo, dan lugar a microesferas menos estables que las optimizadas dentro de los mismos, por lo que los porcentajes peso/volumen de cada uno de ellos han de tenerse en cuenta para obtener microesferas aptas para ser almacenadas en forma de polvo y posteriormente reconstituidas manteniendo todas sus propiedades hasta que son finalmente administradas.

En una realización preferida de la invención, las microesferas tienen un diámetro de entre 1-10 μm, más preferiblemente de entre 3,88 y 4,68 μm.

La forma esférica y el tamaño de las microesferas es un rasgo importante para la elaboración de una composición farmacéutica que sea apta para su uso como vacuna o para estimular la respuesta inmune en un individuo, dado que esta forma de microesfera es más adecuada para ser detectada por los macrófagos, de modo que se incrementa la potencia de la respuesta inmune que se produce en el individuo, y también la más adecuada para ser inyectada formando parte de una composición farmacéutica.

En la presente invención se entiende por "individuo" o "sujeto" a un miembro de una especie de animal, preferentemente un vertebrado, más preferiblemente un pez, más preferiblemente un pez plano, e incluye, pero no se limita, a peces de cultivo marinos como por ejemplo: rodaballo, platija, lenguado, dorada, lubina, parracho e hirami.

En una realización preferida, las microesferas sólidas comprenden:

i. Polímero de quitosano, preferiblemente de peso molecular entre 50-100 kDa: en una proporción de entre 25 y 75%, preferiblemente entre 35 y 60%, más preferiblemente de 47% en peso.

ii. Copolímero de metil vinil éter-anhídrido maleico, preferiblemente Gantrez AN119: en una proporción de entre 25 y 75%, preferiblemente entre 35 y 60%, más preferiblemente de 45% en peso.

iii. Agente reticulante, preferiblemente glutaraldehído: en una proporción de entre 2,4 y 5%, preferiblemente entre 2,9 y 4,5%, más preferiblemente de 3,7% en peso.

iv. Antígeno, preferiblemente un antígeno de un parásito que afecta a peces: en una proporción de entre 2 y 7%, preferiblemente entre 2 y 6%, más preferiblemente de 4,5% en peso.

Se entiende el porcentaje en peso de cada componente como la proporción entre el peso de cada componente y el peso total de la microesfera sólida multiplicado por 100.

En los ejemplos de la presente invención, se consiguen microesferas portando una cantidad de antígeno unido covalentemente a la superficie externa de la microesfera de 46 μg de antígeno/mg de micropartícula (4,6% en peso o 4,6% p/p) que son capaces de inducir una respuesta inmune eficaz en el rodaballo. Teniendo en cuenta que la dosis que se emplea para la vacunación son 5 mg de microesferas, se administran 230 μg de antígeno por pez, lo que constituye una cantidad de antígeno especialmente reducida en comparación con otros intentos de inmunización llevados a cabo en el estado de la técnica para la escuticociliatosis en peces.

En otra realización preferida de la invención, las microesferas están liofilizadas. Las microesferas de la invención pueden ser liofilizadas por métodos convencionales. Desde un punto de vista farmacológico, es importante poder disponer de microesferas en forma liofilizada, dado que ello mejora su estabilidad durante el almacenamiento y conservación a largo plazo, además de reducir el volumen del producto que va a ser manipulado. Las microesferas de la invención pueden ser liofilizadas en presencia de un agente crioprotector habitual tal como glucosa, sacarosa, manitol, trehalosa, glicerol, lactosa, sorbitol o polivinilpilorridona, entre otros, a una concentración comprendida dentro de un amplio intervalo, preferentemente, entre 0,1% y 20% en peso. Las microesferas también pueden ser liofilizadas sin necesidad de dicho agente crioprotector, como en los ejemplos de la presente invención.

Las microesferas de la invención pueden administrarse al individuo en forma de suspensión acuosa o formando parte de composiciones farmacéuticas más complejas, por ejemplo junto con un vehículo adecuado a la vía de administración.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, de aquí en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende las microesferas de la invención junto con un medio de dispersión. Dichos medios de dispersión incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, tampón fosfato salino (PBS), o cualquier solución adecuada para contener a las microesferas para su posterior administración. En una realización preferida, dicho medio de dispersión comprende un vehículo suspensor o agente dispersante adecuado y aceptado para la vía de administración parenteral.

Medios de dispersión apropiados para la administración parenteral son, por ejemplo, soluciones acuosas de carboximentilcelulosa o polisorbato. Otros medios de dispersión adecuados también pueden ser soluciones oleosas de lecitina, parafina, aceites naturales o bien otro tipo de medios como son las microemulsiones (emulsiones con tamaño de gota nanométrico compuestas por fase acuosa, fase oleosa, tensoactivo y co-tensoactivo). Una vez añadido el agente dispersante, la dispersión de las microesferas en el medio de suspensión puede realizarse mediante sacudidas enérgicas del vial que contiene la preparación, formándose así una suspensión homogénea inyectable.

En una realización preferida, el medio de dispersión comprende carboximetilcelulosa, polisorbato, lecitina, parafina o un aceite natural; preferiblemente, el medio de dispersión comprende carboximetilcelulosa.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende entre 0,1-2% p/v de microesferas, preferiblemente entre 0,5-1,5% p/v, más preferiblemente entre 0,75 y 1,25% p/v, y aún más preferiblemente comprende un 1% p/v de microesferas, entendiéndose como porcentaje p/v a la proporción entre el peso de las microesferas y el volumen total donde se resuspenden las mismas (por ejemplo en un medio de dispersión adecuado para la vía de administración que se pretende) antes de ser administradas, multiplicado por 100.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender también otros adyuvantes incorporados en la suspensión de microesferas con la finalidad de mejorar la actividad inmunopotenciadora, pudiendo ser dichos adyuvantes solubles o no en fluidos biológicos.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende:

i. Polímero de quitosano, preferiblemente de peso molecular entre 50-100 kDa: 0,25-0,75% (p/v).

ii. Copolímero de metil vinil éter-anhídrido maleico, preferiblemente Gantrez AN119: 0,25-0,75% (p/v).

iii. Agente reticulante, preferiblemente glutaraldehído: 0,024-0,05% (p/v).

iv. Antígeno, preferiblemente un antígeno procedente de un parásito que afecta a peces: 0,02-0,07% (p/v).

v. medio de dispersión, preferiblemente una solución de carboximetilcelulosa.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmunitaria en un pez.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de una vacuna para peces. En una realización preferida, los peces se seleccionan del grupo que comprende a los peces planos y a la lubina. Entre los peces planos, se incluyen rodaballo (familia Scophthalmidae, por ejemplo *Psetta maxima*, *Scophtalmus maximus*, *Scophtalmus aquosus*), platija (familia Pleuronectidae, por ejemplo *Platichthys flesus*), solla (*Pleuronectes platessa*), limanda (*Zeugopterus regius*, *Phrynorhombus norvegicus*) tapadera (*Zeugopterus punctatus*), rémol (*Scophtalmus rhombus*), gallo (por ejemplo *Lepidorhombus boscii* o *Lepidorhombus whiffiagonis*), lenguado (familia Soleidae, por ejemplo *Solea vulgaris*), parracho (*Bothus podas*), peluda (*Arnoglossus laterna*) e hirame (*Paralichthys olivaceus*); se entiende por lubina o robaliza a la familia de los Serránidos, por ejemplo *Dicentrarchus labrax*; preferiblemente, los peces son peces planos, tales como rodaballo, platija, limanda, solía, tapadera, rémol, gallo, lenguado, parracho, peluda e hirame; más preferiblemente, el pez es rodaballo o platija.

En la composición farmacéutica de la invención, las microesferas actuarían como adyuvante para el antígeno. Un adyuvante es toda aquella sustancia que incorporada a una vacuna, acelera, prolonga o potencia la respuesta inmunogénica frente a la misma.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada para la administración parenteral. Una forma de adaptar la composición farmacéutica que comprende a las microesferas a la administración parenteral, es incorporar las microesferas a un medio de dispersión adecuado para su administración parenteral, como por ejemplo una solución de carboximetilcelulosa.

La administración parenteral es aquella que se realiza a través de una inyección o infusión. Algunos ejemplos de administración parenteral son la inyección subcutánea, intravenosa, intraarticular o intramuscular.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el propósito pretendido. La dosis de microesferas de la invención a administrar a un individuo puede variar de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y 0,5, preferiblemente entre 0,1 y 0,3, más preferiblemente es de 0,2 g/kg de peso corporal.

En otro aspecto, la invención se refiere al procedimiento de preparación de las microesferas de la invención, que comprende las etapas de:

i. Preparar una dispersión de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en un disolvente orgánico.

ii. Preparar una dispersión de un polímero de quitosano en un disolvente acuoso.

iii. Incorporar la dispersión de la etapa i) con la dispersión de la etapa ii).

iv. Adición de un agente reticulante.

v. Obtención de las microesferas por uno de los procedimientos seleccionados del grupo que comprende: atomización, emulsión/evaporación del disolvente o coacervación.

vi. Unión del antígeno a la superficie externa de las microesferas.

En una realización preferida de la invención, en la etapa v), la obtención de las microesferas es por atomización. Preferiblemente, el procedimiento de atomización tiene lugar bajo las siguientes condiciones: temperatura de atomización: 72ºC, caudal de alimentación: 3-4 ml/min y presión de aire, 500 l/h.

En otra realización preferida, en la etapa i), el disolvente orgánico es acetona, y el copolímero de metil vinil éter se incorpora a una concentración inicial de entre 0,15 y 0,5% p/v, preferiblemente de 0,24% p/v con respecto al volumen de dispersión de los dos polímeros.

En otra realización preferida, en la etapa ii), el disolvente es una solución de ácido acético, preferiblemente a una concentración de 0,1 M, y el quitosano se emplea en forma de clorhidrato de quitosano, a una concentración inicial de entre 0,12 y 0,5% p/v, preferiblemente de 0,25% p/v con respecto al volumen de dispersión de los dos polímeros.

En otra realización preferida, en la etapa iii), la mezcla se realiza con agitación magnética.

En otra realización preferida, en la etapa iv), el agente reticulante es glutaraldehído a una proporción de entre 0,01 y 0,1% p/v, preferiblemente de entre 0,015 y 0,025% p/v, más preferiblemente de 0,02% p/v con respecto al volumen total de la dispersión de los dos polímeros.

En otra realización preferida, en la etapa vi) la unión del antígeno a la superficie externa de la microesfera es de tipo covalente. Preferiblemente, la unión del antígeno en la etapa vi) se realiza incorporando una solución de antígeno en una proporción de entre 0,05-0,15% p/v sobre una suspensión de microesferas. Preferiblemente, la unión del antígeno en la etapa vi) se realiza incorporando una solución de antígeno al 0.1% p/v sobre una suspensión de microesferas obtenidas en la etapa v), manteniendo en agitación durante un período de tiempo determinado, a 22ºC y centrifugando después para aislar las microesferas.

El sorprendente hallazgo de que las microesferas poliméricas pueden inducir respuestas inmunitarias en rodaballo, es esencial para la invención, ya que proporciona una nueva estrategia para el control de enfermedades parasitarias en piscifactorías comerciales. Además, se pueden usar estas composiciones de vacunas que comprenden microesferas con medios de dispersión biocompatibles adecuados para su aplicación parenteral. Asimismo, con la finalidad de mejorar la actividad inmunopotenciadora, se pueden usar estas formulaciones de la invención con otros adyuvantes incorporados en la suspensión de microesferas, pudiendo ser éstos solubles o no en fluidos biológicos, es decir, las formulaciones con microesferas pueden ser administradas tanto en forma de suspensión acuosa como en forma de suspensión oleosa.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: protocolo experimental de vacunación y determinación de protección.

Figura 2: microesferas de Chitosan Seacure 210 HCl - Gantrez® AN119 (3000 X).

Figura 3: Espectro infrarrojo de las microesferas de Chitosan Seacure HCl 210 y Gantrez® AN119 (a) y con la proteína unida covalentemente a su superficie (b).

Figura 4: Producción de anticuerpos determinados mediante un ensayo ELISA. Se inmunizaron ratones vía intraperitoneal con una dosis de 0,5 ml conteniendo 1, 2, 3 y 5 mg de microesferas a las que se les unió covalentemente antígeno de membrana de *P. dicentrarchi*. La concentración de antígeno que poseen unido a las microesferas sigue la relación de 46 μg de antígeno/mg de micropartícula. Para el grupo que se inmunizó con adyuvante completo de Freund (FCA), cada vacuna contiene la máxima concentración de antígeno que se inoculó junto con las microesferas (230 μg). Las barras indican los niveles medios de anticuerpos ± error estándar (n = 5).

Figura 5. Cinética de la producción de anticuerpos en rodaballos inmunizados con 5 mg de microesferas conteniendo 230 μg de antígeno unido covalentemente a su superficie, e inmunizados sólo con antígeno. Los niveles de anticuerpos fueron cuantificados semanalmente mediante un ensayo ELISA doble indirecto, y cada punto representa los niveles de anticuerpos medios de un conjunto de sueros procedente de 5 peces. Las flechas indican los días en los que se realizaron las vacunaciones.

Figura 6: Cinética de mortalidad en peces infectados experimentalmente con *P. dicentrarchi*, vacunados en el día 0 y 30 con diferentes formulaciones de vacunas incluyendo antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* y como adyuvantes microesferas y formulaciones oleosas (Montanide ISA 763A). Los valores se expresan como porcentaje de la mortalidad acumulada durante 20 días.

Figura 7: Nivel de anticuerpos producidos por rodaballos vacunados con varias formulaciones conteniendo antígeno de membrana (230 μg) de *P. dicentrarchi* acoplado covalentemente a microesferas (5 mg/pez) o emulsionado (1:1; v/v) en adyuvante oleoso Montanide. La determinación de los anticuerpos se realizó mediante un ensayo ELISA sobre sueros obtenidos en el día 0 antes de inmunizar los peces (suero preinmune) y a los 30 y 60 días postinmunización. Los peces fueron sangrados individualmente y los sueros obtenidos se juntaron en un "pool". Los resultados indican los valores medios ± desviación estándar (n = 3).

Figura 8. Diferencia en los pesos entre los peces vacunados con 5 mg de microesferas portando el antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* sobre su superficie y los vacunados con la misma cantidad de antígeno administrado en una emulsión oleosa de Montanide. * valor de *P* de dos colas es <0,0001, considerado extremadamente significativo cuando se comparan las dos medias mediante el test t de student desapareado (n = 20).

Ejemplos

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Materiales y Métodos

Procedimiento de formación de microesferas

Para la preparación de microesferas es esencial la selección de biopolímeros con propiedades biodegradables y, por consiguiente, de las microesferas. Son un ejemplo de este tipo de biopolímeros el quitosano y el Gantrez en forma de anhídrido. Las microesferas a base de Chitosan clorhidrato y Gantrez AN 119 se preparan dispersando, en primer lugar, 240 mg de Gantrez AN 119 en 50 ml de acetona, lo cual se incorpora sobre una disolución de 250 mg de Chitosan Seacure 210 HCl en 50 ml de ácido acético 0,1 M. Como agente reticulante se usa 1 ml de glutaraldehído al 2%. La preparación de las microesferas se puede llevar a cabo por distintos procedimientos como: secado por atomización, emulsión/evaporación del disolvente o coacervación. El procedimiento de obtención de las microesferas tiene lugar bajo las siguientes condiciones de atomización: temperatura de entrada del aire (72ºC), caudal de alimentación. 3-4 ml/min y presión del aire. 500 l/h. Las microesferas así preparadas presentan un tamaño medio de de entre 1-10 μm de diámetro.

Obtención y purificación del antígeno

La obtención del antígeno se lleva a cabo como sigue. Brevemente, los ciliados (*P. dicentrarchi*, cepa 11) fueron lavados 3 veces con tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4) por centrifugación a 700 x g. Se resuspendieron en tampón PBS con 250 mM de sacarosa y 3 mM de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF, inhibidor de proteasas) y se lisaron ultrasónicamente en un sonicador Branson W-250 (Branson Ultrasonic Corporation, EE.UU.) sobre hielo (8 ciclos de sonicación de 10 pulsos cada uno empleando un 50% de *duty cycle* e intensidad de salida 4-entre cada ciclo se dejó reposar un minuto en hielo). A continuación el pellet obtenido se centrifugó a 8000 x g durante 5 minutos y se resuspendió en 3 ml de tampón HEPES (30 mM HEPES, 20 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 0,5 mM EDTA, pH 7,6) que se aplicaron cuidadosamente en la parte superior de un gradiente de sacarosa con 3 concentraciones distintas (en un tubo de centrifuga de 15 ml): Parte A: 3 ml de 1,5 M (núcleos y ciliados); Parte B: 3 ml de 1,0 M (fracción membranal); Parte C: 3 ml de 0,5 M (citoplasma y microsomas). Este gradiente de sacarosa se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos, retirándose muy cuidadosamente el antígeno de membrana acumulado en la Parte B con una pipeta. El antígeno obtenido se lavó 2 veces con PBS (11000 x g durante 10 minutos). A continuación, se extrajeron las proteínas integrales del antígeno de membrana obtenido con Tritón X-114. Para ello, el pellet obtenido se incubó con 0,5% de Tritón X-114 durante 1 hora a 0ºC. Finalmente se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos y se almacenó a -20ºC.

Procedimiento de unión de los componentes antigénicos a las microesferas

De acuerdo con la invención, en una segunda etapa, la unión del antígeno a la superficie de las microesferas se lleva a cabo de la siguiente manera: las microesferas, a base de Chitosan clorhidrato y Gantrez AN119, se preparan dispersando, en primer lugar, 240 mg de Gantrez AN119 en 50 ml de acetona, lo cual se incorpora sobre una disolución de 250 mg de Chitosan Seacure 210 HCl en 50 ml de ácido acético 0,1 M. Como agente reticulante se usa 1 ml de glutaraldehído al 2%. Seguidamente, se obtienen las microesferas mediante algunas de las técnicas mencionadas (atomización, emulsión-evaporación del disolvente o coacervación). A continuación, se incorpora una solución de 1 mg de antígeno sobre 10 mg de una suspensión de microesferas y se mantiene esta suspensión en agitación constante a 500 rpm durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las microesferas se recogen por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos y se lavan dos veces con PBS y una última vez con agua para posteriormente ser liofilizadas y conservadas a 4ºC.

Suspensión en el medio de dispersión

Las microesferas portando el antígeno en su superficie externa se incorporaron a un medio de dispersión adecuado para su administración parenteral. Medios de dispersión apropiados para este tipo de administración son, por ejemplo, soluciones acuosas de carboximentilcelulosa o polisorbato. Otros medios de dispersión adecuados también pueden ser soluciones oleosas de lecitina, parafina, aceites naturales o bien otro tipo de medios como son las microemulsiones (emulsiones con tamaño de gota nanométrico compuestas por fase acuosa, fase oleosa, tensoactivo y co-tensoactivo). En los ejemplos de la presente invención, se añadió como agente dispersante carboximetilcelulosa al 1%. Una vez añadido el agente dispersante, la dispersión de las microesferas en el medio de suspensión puede realizarse mediante sacudidas enérgicas del vial que contiene la preparación, formándose así una suspensión homogénea inyectable.

Protocolo de vacunación y obtención de suero inmune

La administración de las microesferas con antígeno en su superficie y, una vez resuspendidas en el medio de dispersión, se realiza por vía parenteral. La administración se efectuó siguiendo el protocolo que se presenta en la figura 1. Se realizaron dos vacunaciones separadas cada una de ellas por 30 días. Así, cada pez o ratón de 25 g de peso, se vacunaron con una suspensión de 5 mg de microesferas que portaban 230 μg de antígeno de membrana acoplado a su superficie y en un volumen total de 500 μl de tampón fosfato salino (PBS) conteniendo un 1% de carboximetilcelulosa (agente dispersante). También se vacunaron los peces con vacunas que contenían adyuvantes oleosos (Montanide Isa 763 A; Seppic, Paris, Francia) o ratones con adyuvante de Freund y la misma concentración de antígeno (230 μg). En todos los casos, se incluyeron controles vacunados únicamente con los adyuvantes y con el tampón conteniendo el agente dispersante. Para determinar específicamente la capacidad protectora de la vacuna, se infectaron experimentalmente los peces en el día 60 después de la vacunación administrando, a cada pez, 500 μl de medio L-15 que contenía 7,5 x 10^5 ciliados. El índice de mortalidad acumulado de los peces vacunados y control se monitorizó a lo largo de 20 días postinfección.

Las muestras de sangre se recogieron de la vena caudal de los peces los mismos días de las inmunizaciones y de la infección experimental (0, 30 y 60 días; ver figura 1). Para la determinación de la cinética de anticuerpos se sangraron los peces semanalmente durante 8 semanas. Estas muestras de sangre se mantuvieron dos horas a temperatura ambiente y, para la obtención del suero, se centrifugaron a 3.000 x g, durante 10 minutos. El suero obtenido se diluyó 1:1 en glicerol y se almacenó a -20ºC hasta su posterior análisis.

Para determinar el efecto de la vacunación sobre el crecimiento de los peces, se pesaron todos los rodaballos vacunados con las microesferas y el adyuvante oleoso en el día 0 y en el día 60.

Determinación de la respuesta inmunológica específica

La determinación de los anticuerpos específicos frente a los antígenos de *P. dicentrarchi* presentes en el suero de los rodaballos vacunados se realizó mediante un inmunoenzimoensayo ELISA. Se incorporó una solución 1 μg de antígeno en 100 μl de tampón de acoplamiento $NaHCO_3$ 0,1 M/NaCl 0,5 M a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, y se dejó incubando una noche a 4ºC. A continuación, se lavó con agua destilada, y los pocillos fueron bloqueados con TBS-tween 0,2% y leche descremada al 5% durante 2 horas a 37ºC en cámara húmeda. Posteriormente, se añadieron diluciones de los sueros inmunes de rodaballo diluidos en una solución de TBS-Tween 0,2% y 1% de leche descremada y se incubaron durante 2 horas a 37ºC. Tras la incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con tampón TBS, y se añadió un anticuerpo monoclonal anti-Ig de rodaballo (UR3) a una concentración 1:1000 en una solución de TBS-Tween 0,2% y 1% de leche descremada, incubándose durante 2 horas a 37ºC en cámara húmeda. Una vez incubado, los pocillos se lavaron 5 veces con TBS y, seguidamente, se añadió un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:2000 en tampón TBS-Tween 0,2%, y se incubó durante 2 h a 37ºC. Pasado este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con TBS. El revelado de la reacción se llevó a cabo añadiendo a cada pocillo una solución de ortofenilendiamina (ODP) preparada en tampón citrato pH 5,1, conteniendo un 0,001% de H_2O_2 y se incubó durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró por la adición de 25 μl/pocillo de H_2SO_4 3N, y la lectura se realizó en un espectrofotómetro lector de placas a una longitud de onda de 492 nm.

Ejemplo 1

Caracterización de las microesferas con antígeno

Características físico-químicas de las microesferas con antígeno de membrana de P. dicentrarchi

Tamaño, morfología, potencial z. Cuantificación de grupos ácidos

El tamaño de las microesferas se determinó mediante difracción de luz láser empleando para ello un Mastersizer Micro (Malvern Instruments, UK). Las microesferas se resuspendieron en agua destilada y las medidas se hicieron a temperatura ambiente con una agitación constante. La distribución del tamaño se hizo considerando el volumen que ocupaban las partículas y se consideró como media del tamaño de partícula al valor de tamaño que poseía el 50% de ellas. Los valores de tamaño que estuvieron por encima del 90% y por debajo del 10% se emplearon para calcular el alcance de la distribución de tamaño.

Las medidas de la carga superficial de las microesferas se hicieron con el equipo Zeta Plus Potential Analizer (Brookhaven Instruments Corporation, Nueva York, EE.UU). El Potencial Zeta se determinó a través diez medidas de cada muestra y se obtuvo como resultado una media y una desviación estándar. Del mismo modo, cada medida se llevó a cabo por triplicado.

La forma y superficie de las microesferas se examinó mediante fotografías de microscopía electrónica de barrido (LEO 435 vp; LEO Electron Microscopy Ltd, Cambridge, UK). Para ello, muestras secas de cada formulación se depositaron sobre una lámina de doble cara adhesiva pegada a un soporte y se recubrió cada muestra con oro empleando un metalizador Biorad E5000. Queda perfectamente constatado que la superficie de las partículas es lisa, no porosa y que son mayoritariamente esféricas (Figura 2).

Los estudios de infrarrojos se llevaron a cabo con el objeto de confirmar la unión covalente entre los grupos ácidos de la superficie de las microesferas y la proteína. Las muestras se prepararon en discos de KBr y se midió la transmitancia entre 400 y 4000 cm^{-1} en un espectrofotómetro Bruker, modelo IFS-66 V.

La determinación del antígeno unido se determinó mediante el método del ácido bicincónico. Para ello se disuelven 10 mg de microesferas en 3 ml de ácido acético 0,1 M durante toda la noche. Pasado ese tiempo, la muestra se centrifuga a 20000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se valora espectrofotométricamente a 562 nm por el método colorimétrico del ácido bicincónico para proteínas.

La tabla 1 recoge las características físico-químicas de las microesferas obtenidas. Las microesferas se caracterizan en tamaño y potencial zeta por ser parámetros importantes para la interacción con la superficie de las células. Las microesferas presentan un tamaño medio de 4,28±0,4 μm, lo que le confiere una capacidad para ser internalizadas por las células presentadoras de antígeno, y un potencial zeta que se incrementa cuando las microesferas llevan unida en su superficie el antígeno pasando de 38,11±0,22 mV a 42,98±0,87 mV, confirmando la modificación de las microesferas.

TABLA 1

Características físico-químicas de las microesferas

	Media	Desviación estándar
Tamaño	4,28 µm	0,4
Potencial Zeta de microesferas de quitosano y Gantrez	38,11 mV	0,22
Potencial Zeta de microesferas de quitosano y Gantrez con antígeno en superficie	42,98 mV	0,87
Cantidad de proteína unida en la superficie	45,7 µg/mg de micropartícula	0,9

La figura 3 muestra el espectro infrarrojo de las microesferas de Chitosan Seacure 210 HCl y Gantrez® AN119 con proteína en la superficie. Comparando los espectros, se puede observar una disminución de la banda de absorción a 3400 cm^{-1} correspondiente a los grupos aldehído del glutaraldehído que contienen las microesferas. Cuando el antígeno está unido en la superficie (Figura 3b), este pico desaparece debido a que los grupos amino del antígeno reaccionan con los grupos aldehído, dando lugar a la formación de amidas.

La disminución del pico de absorbancia a 1700 cm^{-1} se debe a la unión de la proteína con los grupos carbonilos libres del Gantrez® AN119. La variación en el pico a 2940 cm^{-1} se debe a la metilación de los grupos amino del quitosano al pasar a formar una base de Schiff para la unión covalente con la proteína. En el espectro infrarrojo de las microesferas que llevan unido el antígeno desaparece el pico a 1516,7 cm^{-1} característico de los grupos amino libres del quitosano, mientras que el pico a 1630 cm^{-1}, se encuentra desviado, debido a la aparición de enlaces amida entre el glutaraldehído y el quitosano y la proteína.

En todos los espectros aparece un pico a 1180 cm^{-1}, característico de los enlaces aldehído del Gantrez® AN119.

Ejemplo 2

Optimización de la concentración de antígeno y microesferas que generan mayor respuesta inmune

Para la optimizar inicialmente la concentración de antígeno y microesferas necesarias que generen una mayor respuesta inmunitaria, se vacunaron ratones con diferentes cantidades de antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* acoplado covalentemente a la superficie de las microesferas. En este caso se vacunaron ratones en el día 0 y se revacunaron en el día 30 con 1, 2, 3 y 5 mg de partículas portando antígeno unido covalentemente sobre su superficie y se utilizaron, como controles, ratones vacunados con antígenos emulsionados en un adyuvante oleoso (adyuvante de Freund-FCA) y ratones inmunizados únicamente con partículas sin adyuvante (blanco). Como se puede observar en la figura 4, los ratones inmunizados exclusivamente con las microesferas no generan respuesta de anticuerpos anti-*P. dicentrarchi*; mientras que los ratones que fueron inmunizados con microesferas con antígeno, producen una respuesta de anticuerpos que es dependiente de la dosis, siendo máxima dicha respuesta a la mayor dosis de microesferas portando antígeno utilizada. También se puede observar que, en este caso, la vacunación de los ratones con el antígeno emulsionado en FCA, genera la máxima respuesta. Aunque el FCA ha sido empleado durante más de 50 años para la producción de antisueros en animales (Freund J. 1956 *Advances in Tuberculosis Research* 7:130-48), en la actualidad, debido a la gravedad y toxicidad de su utilización, su uso está restringido exclusivamente a los estudios experimentales y no se puede utilizar en la clínica médica ni veterinaria.

Formulación final con microesferas para su administración

La fórmula o composición final que comprende a las microesferas antes de ser administradas, es decir, la composición final de la formulación para cada dosis (se administran 5 mg de microesferas en suspensión a cada pez) es la siguiente:

i. Quitosano: 0,472% (p/v).

ii. Gantrez AN119: 0,452% (p/v).

iii. Glutaraldehído: 0,037% (p/v).

iv. Antígeno: 0,045% (p/v).

v. Agua ultrapura milli Q, solución salina o medio de dispersión: c.s.p. (cantidad necesaria para) 500 μl.

Se entiende el porcentaje p/v como la proporción entre el peso de cada componente y el volumen donde se suspenden las microesferas para ser administradas, multiplicado por 100.

Ejemplo 3

Comprobación de la inmunogenicidad de microesferas con antígeno en rodaballo

Para comprobar la inmunogenicidad de las microesferas portando antígeno de membrana en su superficie en el rodaballo, se inmunizaron los peces siguiendo el protocolo expuesto en la figura 1, con 5 mg de microesferas conteniendo 230 μg de antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* y con 230 μg de antígeno sin adyuvante. Se utilizó como control el suero de los peces obtenidos antes de la inmunización. Semanalmente, se cuantificaron los niveles de anticuerpos en el suero mediante un ensayo ELISA y los resultados obtenidos se presentan en la figura 5. Como se puede observar, los peces vacunados con microesferas + antígeno presentaron una cinética con una elevación significativa en los niveles de anticuerpos tras la inmunización primaria y secundaria. Por el contrario, en los peces inmunizados sólo con antígenos, los niveles de anticuerpos fueron muy discretos, obteniéndose sólo pequeños incrementos tras las

inmunizaciones. Estos resultados indican que las microesferas actúan como adyuvantes de la respuesta inmunitaria, incrementando significativamente los niveles de anticuerpos cuando el antígeno es administrado conjuntamente con las microesferas.

Ejemplo 4

Comparación de la vacuna con microesferas frente a una vacuna con adyuvante oleoso

En este ejemplo se ilustra la capacidad protectora de las vacunas desarrolladas en la presente invención comparativamente con una vacuna utilizando un adyuvante oleoso: en este caso, se empleó Montanide ISA 763 A (Seppic, Paris, Francia). Los adyuvantes de Montanide ISA son un grupo de soluciones surfactante/aceite que se basan en la combinación de surfactantes con aceites no minerales metabolizables. Se preparan para su uso como una emulsión con la solución acuosa del antígeno. Parece que el efecto de estos adyuvantes en la producción de anticuerpos es semejante al adyuvante de Freund; sin embargo, la respuesta irritante generalmente es mucho menor, y están aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA; USA) para su uso veterinario, demostrando también su seguridad en vacunas de peces.

En este experimento se utilizaron 6 grupos de peces (cada grupo contenía a 20 peces) que fueron vacunados individualmente siguiendo la estrategia indicada en la figura 1 con: a) 230 μg de antígeno de membrana de *P. dicentrarchi* acoplado covalentemente a la superficie de las microesferas (5 mg microesferas/pez), b) 230 μg de antígeno emulsionado 1:1 con adyuvante oleoso Montanide ISA 763A, c) únicamente con 230 μg de antígeno, d) con microesferas (5 mg/pez), d) con adyuvante Montanide y, e) con tampón fisiológico (PBS). En este experimento se determinó: a) el nivel de protección obtenido por las diferentes formulaciones vacunales, b) el nivel de anticuerpos inducido por las mismas, y c) el grado de influencia de la vacunación sobre el crecimiento de los peces inmunizados con los dos tipos de adyuvantes.

a) *Nivel de protección*: Con respecto a la mortalidad obtenida tras la infección experimental con *P. dicentrarchi*, en la figura 6 se observa que los peces que presentaron una mayor protección fueron los vacunados con las microesferas acopladas superficialmente con el antígeno de membrana del parásito, seguidos de los peces vacunados con la vacuna que contenía el antígeno emulsionado con el adyuvante oleoso Montanide ISA 763A. Tanto los peces inmunizados únicamente con microesferas, con el antígeno del parásito o con PBS no mostraron ninguna protección; sin embargo, los peces inmunizados sólo con el adyuvante oleoso Montanide presentaron una cierta protección inespecífica. Esta protección podría ser explicada por la elevada inducción de inflamación que generan los adyuvantes oleosos en la cavidad peritoneal del pez. Por otra parte, la no inducción de protección inespecífica por las microesferas podría estar indicando que no inducen inflamación peritoneal. Este último aspecto fue corroborado tras la necropsia de los peces, constatándose la falta de evidencia a simple vista de lesiones, irritaciones o adherencias en el peritoneo en los peces vacunados con las microesferas.

b) *Nivel de anticuerpos*: En este experimento se evaluó al mismo tiempo también la producción de anticuerpos inducida por las diferentes vacunas que se indican en la figura 6. Como se puede observar en la figura 7, las vacunas que contienen antígeno y los dos adyuvantes (microesferas y adyuvante Montanide), indujeron altos niveles de anticuerpos ya a la primera semana postinmunización; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, tras la segunda inmunización, los niveles de anticuerpos inducidos en los peces tras la vacunación con las microesferas y antígeno fueron superiores a los obtenidos tras la inmunización con antígeno emulsionado en adyuvante oleoso Montanide. De esta forma, parece existir una clara correlación entre los niveles de anticuerpos generados por las vacunas y el grado de protección obtenido. Con respecto a las otras inmunizaciones utilizadas en el experimento, se puede observar que las inmunizaciones con los adyuvantes exclusivamente no generan anticuerpos específicos anti-*P. dicentrarchi* y la inmunización sólo con antígeno genera una muy baja respuesta de anticuerpos.

c) *Efectos sobre el crecimiento*: Finalmente se analizó la influencia de la vacunación con los adyuvantes sobre el crecimiento de los peces. En este caso, se pesaron todos los peces pertenecientes al grupo de rodaballos vacunados con las microesferas con el antígeno acoplado covalentemente y al grupo de rodaballos inmunizados con el antígeno emulsionado en el adyuvante Montanide. Como se puede observar en la figura 8, existe una diferencia significativa entre el peso de los peces vacunados con los dos adyuvantes, siendo los que lo fueron con las microesferas los que presentaron un crecimiento mayor, mientras que los peces vacunados con el adyuvante oleoso presentaron un menor crecimiento.

REIVINDICACIONES

1. Microesferas que comprenden (i) un primer polímero biodegradable de quitosano, o un derivado del mismo, (ii) un segundo copolímero biodegradable de metil vinil éter y anhídrido maleico, o un derivado del mismo, (iii) un agente reticulante y (iv) uno o varios antígenos.

2. Microesferas según la reivindicación 1 donde el antígeno está unido covalentemente a la superficie externa de la microesfera.

3. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que se preparan añadiendo antígeno en una proporción de entre 0,05 y 0,15% p/v, donde p/v es la proporción entre la cantidad de antígeno en peso y el volumen total de la suspensión en donde se suspenden las microesferas y se disuelve el antígeno.

4. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la cantidad de antígeno unido a la microesfera es de entre 2 y 7% en peso con respecto al peso de la microesfera.

5. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el antígeno es un componente de un parásito que afecta a peces.

6. Microesferas según la reivindicación 5, donde el antígeno es un componente de al menos uno de los parásitos escuticociliados *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*.

7. Microesferas según la reivindicación 6, donde el antígeno es un componente de la membrana de al menos uno de los parásitos escuticociliados *Philasterides dicentrarchi* o *Miamiensis avidus*.

8. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el agente reticulante se selecciona del grupo que comprende: glutaraldehído, formaldehído, tripolifosfato sódico, genipin, glioxal y etilenglicol diglicidil éter.

9. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se preparan añadiendo un agente reticulante en una proporción de entre 0,01 y 0,1% p/v, donde p/v es la proporción entre el peso del agente reticulante y el volumen total de la dispersión de los dos polímeros que forman parte de la microesfera.

10. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se preparan añadiendo el primer polímero en una proporción de entre 0,12 y 0,5% (p/v), y el copolímero en una proporción de entre el 0,15 y 0,5% (p/v), entendiéndose p/v como la proporción entre el peso del polímero o copolímero y el volumen final total de la dispersión de los dos polímeros que forman parte de la microesfera.

11. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el diámetro de la microesfera está entre 1-10 μm.

12. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprenden:

i. Polímero de quitosano: 25-75% (p/p).

ii. Copolímero de metil vinil éter-anhídrido maleico: 25-75% (p/p).

iii. Agente reticulante: 2,4-5% (p/p).

iv. Antígeno: 2-7% (p/p),

donde p/p es la proporción entre el peso de cada componente y el peso total de la microesfera.

13. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde dichas microesferas están liofilizadas.

14. Composición farmacéutica que comprende a las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 junto con un medio de dispersión.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación anterior donde el medio de dispersión comprende: carboximetilcelulosa, polisorbato, lecitina, parafina o un aceite natural.

16. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15 donde las microesferas están en una proporción de entre el 0,1-2% p/v.

17. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15 que comprende:

i. Polímero de quitosano: 0,25-0,75% (p/v).

ii. Copolímero de metil vinil éter-anhídrido maleico: 0,25-0,75%. (p/v)

iii. Agente reticulante: 0,024-0,05% (p/v).

iv. Antígeno: 0,02-0,07% (p/v).

v. medio de dispersión.

18. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 para la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmunitaria en un pez.

19. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 para la elaboración de una vacuna para un pez.

20. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior donde el pez se selecciona del grupo que comprende a los peces planos y a la lubina.

21. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior donde el pez es rodaballo o platija.

22. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde la composición se presenta en forma adaptada a la administración parenteral.

23. Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde la composición farmacéutica se administra en una dosis de entre 0,1 y 0,5 g por kilogramo de peso del sujeto.

24. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas de:

i. Preparación de una dispersión de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico en un disolvente orgánico

ii. Preparación de una dispersión de un polímero de quitosano en un disolvente acuoso.

iii. Incorporar la dispersión de la etapa i) con la dispersión de la etapa ii).

iv. Adición de un agente reticulante.

v. Obtención de las microesferas mediante uno de los procedimientos seleccionados del grupo que comprende: atomización, emulsión/evaporación del disolvente y coacervación.

vi. Unión de un antígeno a la superficie externa de la microesfera.

25. Procedimiento de preparación de las microesferas según la reivindicación 24, donde en la etapa v) la obtención de las microesferas se realiza por atomización.

26. Procedimiento de preparación de las microesferas según la reivindicación 25, donde el procedimiento de atomización tiene lugar bajo las siguientes condiciones: temperatura de atomización: 72ºC, caudal de alimentación: 3-4 ml/min y presión de aire, 500l/h.

27. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde en la etapa i), el disolvente orgánico es acetona, y el copolímero de metil vinil éter se incorpora a una concentración inicial de entre 0,15 y 0,5% p/v en relación al volumen total de la dispersión de los dos polímeros.

28. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde en la etapa ii), el disolvente es una solución de ácido acético y el polímero de quitosano se emplea en forma de clorhidrato de quitosano, a una concentración inicial de entre 0,12 y 0,5% p/v en relación al volumen total de la dispersión de los dos polímeros.

29. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, donde en la etapa iii), la mezcla se realiza con agitación magnética.

30. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, donde en la etapa iv), el agente reticulante es glutaraldehído en una proporción de entre 0,01 y 0,1% p/v en relación al volumen total de la dispersión de los dos polímeros.

31. Procedimiento de preparación de las microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, donde en la etapa vi), la unión del antígeno a la superficie externa de la microesfera es de tipo covalente.

32. Procedimiento de preparación de las microesferas según la reivindicación 31, donde la unión del antígeno se realiza incorporando una solución de antígeno sobre una suspensión de microesferas obtenidas en la etapa v), y donde dicha solución de antígeno está en una proporción de entre el 0,05 y 0,15% p/v con respecto al volumen total de la suspensión en donde se suspenden las microesferas y se disuelve el antígeno.

33. Procedimiento de preparación de las microesferas según la reivindicación 32, donde la unión del antígeno se realiza incorporando una solución de antígeno al 0,1% p/v sobre una suspensión de microesferas obtenidas en la etapa v), manteniendo en agitación y centrifugando para aislar las microesferas.

Figura 1

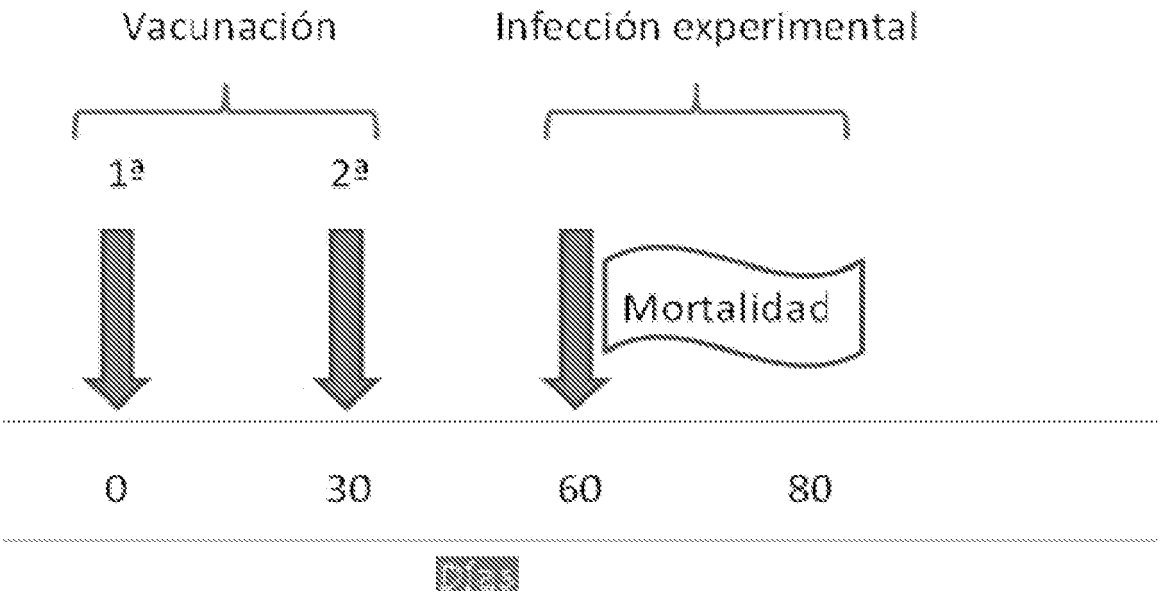


Figura 2

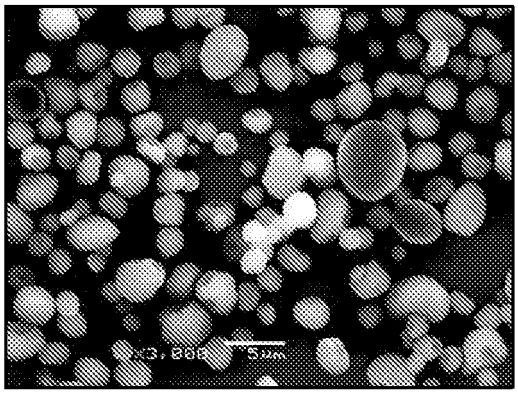
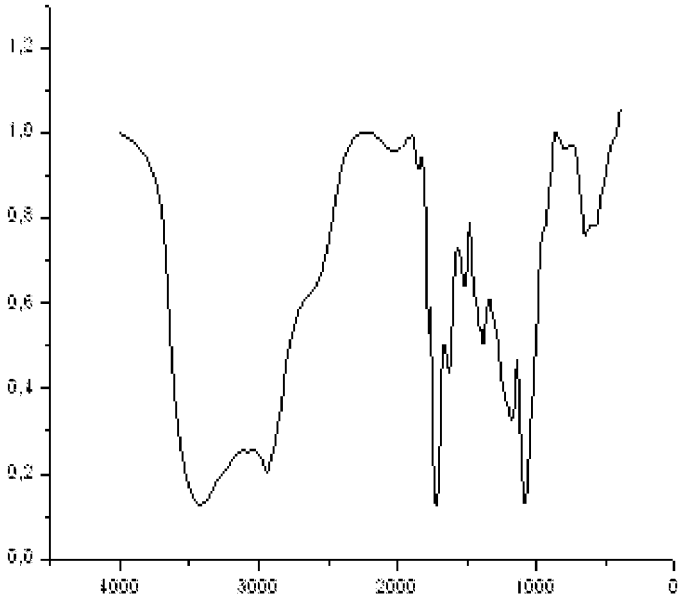


Figura 3

a)


1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
4000
3000
2000
1000
0
Frecuencia (cm-1)

b)

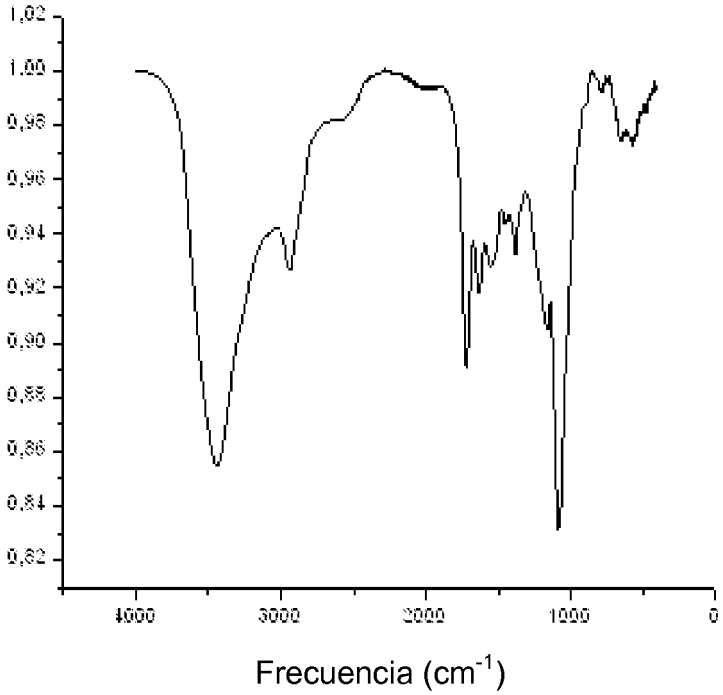

1,02
1,00
0,98
0,96
0,94
0,92
0,90
0,88
0,86
0,84
0,82
4000
3000
2000
1000
0
Frecuencia (cm-1)

Figura 4

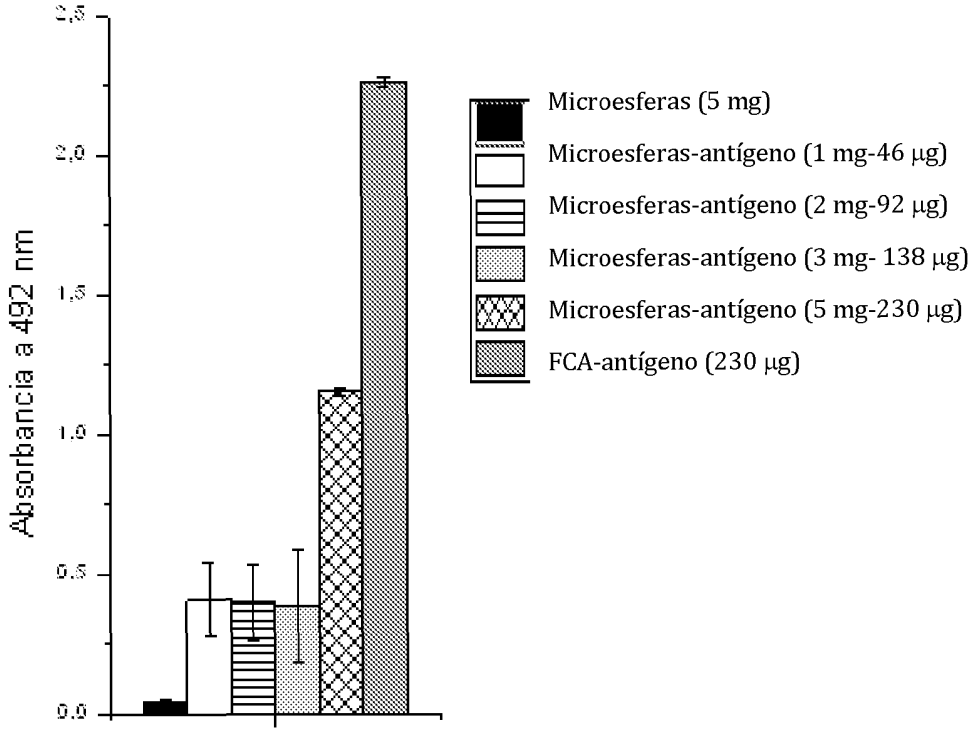


Figura 5

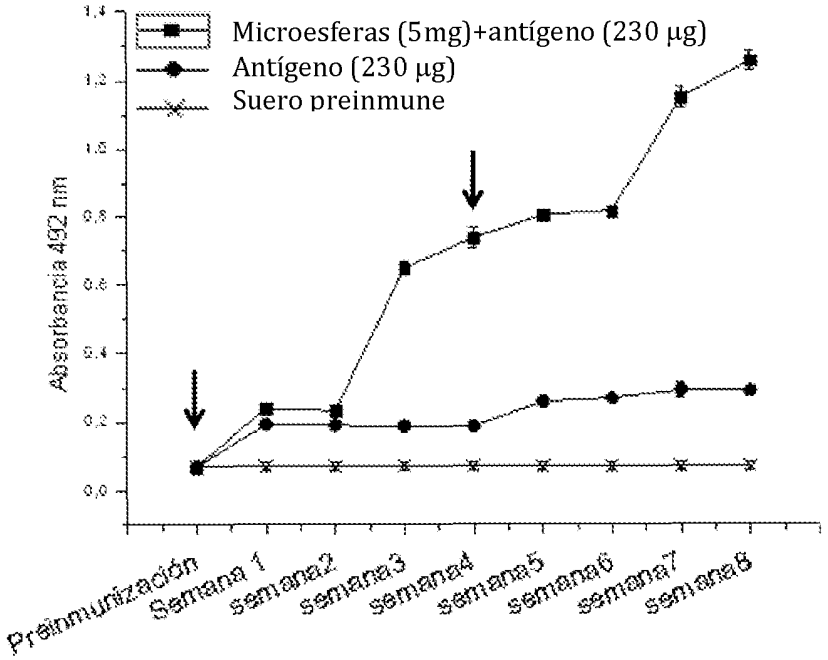


Figura 6

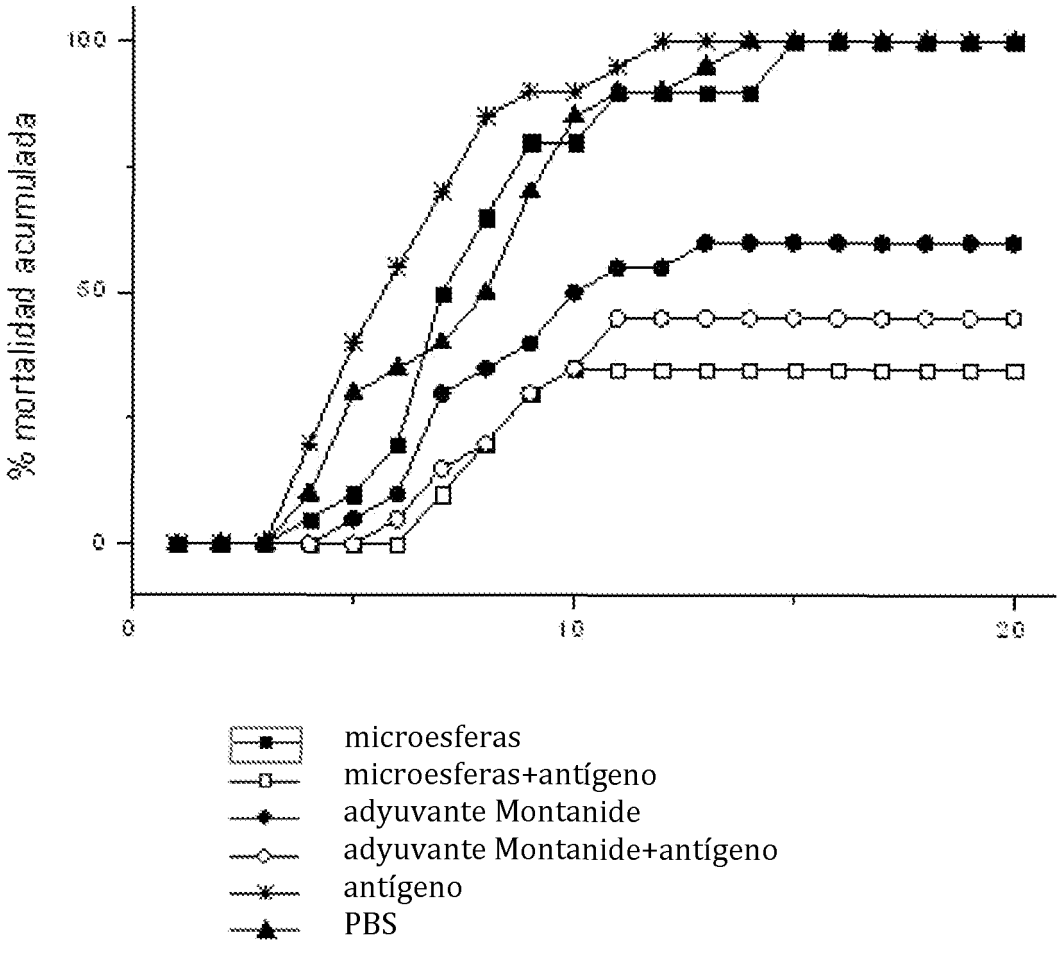

% mortalidad acumulada
100
50
0
0
10
20
microesferas
microesferas+antígeno
adyuvante Montanide
adyuvante Montanide+antígeno
antígeno
PBS

Figura 7

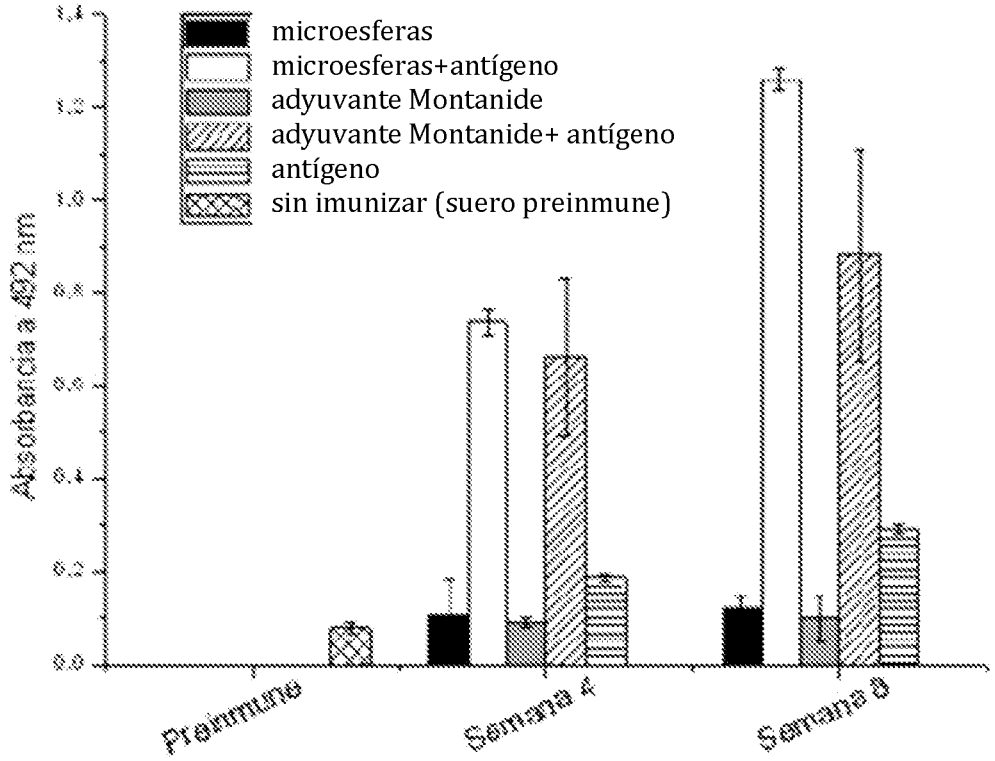
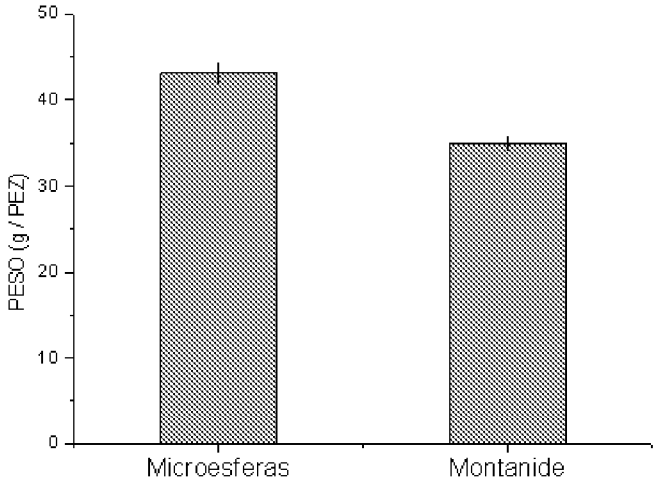


Figura 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130806

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 19.05.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61K39/39*** (2006.01)
A61P33/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CERCHIARA, T., LUPPI, B., CHIDICHIMO, G. et al. Chitosan and poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) microparticles as nasal sustained delivery systems. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005. Vol 61, páginas 196-198.	1-33
A	LEÓN-RODRÍGUEZ, L., LEIRO-VIDAL, J., BLANCO-MENDEZ, J., et al. Incorporation of PVMMA to PLGA MS enhances lectin grafting and their in vitro activity in macrophages. International Journals of Pharmaceutics. 8 de Octubre de 2010. Vol 402, páginas 165-174.	1-33
A	PARAMÁ, A., LUZARDO, A., BLANCO-MENDEZ, J. et al. In vitro efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against fish-phatogenic ciliate Philasterides dicentrarchi. Disease of aquatic organisms. 18 de abril de 2005. Vol 64, páginas 151-158.	1-33
A	OLIVEIRA, B.F., SANTANA, M.H.A., RÉ, M.I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Septiembre de 2005. Vol 22, Nº 3. Páginas 353-360. ISNN 0104-6632.	1-33
A	FISCHER, S., FOERG, C., MERKLE, H.P. et al. Chitosan Coated Plga-Microspheres-A modular System for Targeted Drug Delivery. European Cells and materials. 2004. Vol 7, páginas 11-12. ISSN 1473-2262.	1-33
A	EP1752141 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A) 14.02.2007, ejemplos.	1-33
A	LAMAS, J., SANMARTÍN, M.L, PARAMÁ, A.I., et al. Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. Aquaculture. 10 de Marzo de 2008. Vol 278, Nº 1-4, páginas 22-26.	1-33

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	**Examinador**	**Página**
07.11.2011	A. Barrios de la Fuente	1/5

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,TXT,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,NPL, GOOGLE ACADEMICO

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-33	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-33	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CERCHIARA, T., LUPPI, B., CHIDICHIMO, G. et al. Chitosan and poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) microparticles as nasal sustained delivery systems. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005. Vol 61, páginas 196-198.	2005
D02	LEON-RODRIGUEZ, L., LEIRO-VIDAL, J., BLANCO-MENDEZ, J., et al. Incorporation of PVMMA to PLGA MS enhances lectin grafting and their in vitro activity in macrophages. International Journals of Pharmaceutics. 8 de Octubre de 2010. Vol 402, páginas 165-174.	8-Oct-2010
D03	PARAMÁ, A., LUZARDO, A., BLANCO-MENDEZ, J. et al. In vitro efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against fish-phatogenic ciliate Philasterides dicentrarchi. Disease of aquatic organisms. 18 de abril de 2005. Vol 64, páginas 151-158.	18-Abril-2005
D04	OLIVEIRA, B.F., SANTANA, M.H.A., RÉ, M.I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Septiembre de 2005. Vol 22, Nº 3. Páginas 353-360. ISNN 0104-6632.	Sept-2005
D05	FISCHER, S., FOERG, C., MERKLE, H.P. et al. Chitosan Coated Plga-micorspheres-A modular System for Targeted Drug Delivery. European Cells and materials. 2004. Vol 7, páginas 11-12. ISSN 1473-2262.	2004
D06	EP1752141 (INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A) 14.02.2007, ejemplos.	14-Feb-2007
D07	LAMAS, J., SANMARTÍN, M.L, PARAMÁ, A.I, et al. Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: Effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. Aquaculture. 10 de Marzo de 2008. Vol 278, Nº 1-4, páginas 22-26.	10-Mar-2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto microesferas que comprenden un polímero biodegradable de quitosano o derivado del mismo, un copolímero biodegradable de metil vinil éter y anhídrido maleíco o un derivado del mismo, un agente reticulante y uno o varios antígenos (Reivindicaciones 1-13). Así mismo, es objeto de la presente solicitud la composición farmacéutica que comprende dichas microesferas (Reivindicaciones 14-17), el uso de dicha composición farmacéutica para la elaboración de un medicamento para estimular y/o inducir la respuesta inmunitaria en un pez (Reivindicaciones 18-23) y por último, el procedimiento de preparación de las mismas (Reivindicaciones 24-33).

El documento D01 divulga micropartículas poliméricas (1-10 µm) como sistemas de liberación de un fármaco (propranolol) para su administración por vía nasal, que comprenden un polímero de quitosano y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maléico (PVMMA). Para su síntesis, se disuelve el polímero de quitosano en cloruro de hidrogeno y se añade sobre esta disolución el copolímero de PVMMA. Posteriormente se procede a un proceso de atomización.

El documento D02 divulga microesferas (<10 µm) biodegradables que comprenden un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleíco (PVMMA), un copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA), un agente reticulante y antígenos (Concavalina A) unidos covalentemente a la superficie de la microesfera. Se divulga también el procedimiento de preparación de dichas microesferas, que comprende las etapas de prerarar una dispersión de PVMMA en acetona, preparar una dispersión de PLGA en etilformiato y añadir trietanolamina como agente reticulante. Posteriormente se obtienen las microesferas por un proceso de atomización y se procede a la unión del antígeno a la superficie externa.

El documento D03 tiene por objeto un estudio en el que se analiza el eficacia in vitro de microesferas que comprenden quitosano, un agente reticulante y ciclodextrinas, frente al parasito causante de la escuticociliatosis, *Philasterides dicentrarchi.* Dichas microesferas se obtienen por medio de un procedimiento en el que primero se prepara una dispersión del polímero en un disolvente acuoso, después se añade glutaraldehído como agente reticulante y posteriormente se atomiza.

El documento D04 divulga microesferas biodegradables que comprenden quitosano y glutaraldehído como agente reticulante. Para su síntesis se prepara una dispersión de quitosano en una solución de ácido acético, se atomiza y se añade posteriormente el agente reticulante.

El documento D05 divulga microesferas (1-10 µm) que comprenden un polímero de quitosano y un copolímero de PLGA, así como antígenos unidos covalentemente a la superficie. Las micropartículas se obtienen por un procedimiento de extracción del solvente.

El documento D06 divulga nanopartículas para su uso como vacunas, que comprenden un copolímero de metil vinil éter y ánhídrido maleico, antígenos y opcionalmente un agente reticulante.

El documento D07 tiene por objeto un estudio sobre una vacuna inactivada contra la escuticociliatosis que comprende antígenos del parásito, *Philasterides dicentrarchi*, formalina y un adyuvante.

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art 6 y 8 de la Ley de patentes 11/86)

El documento D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la presente solicitud. En él se divulgan micropartículas que comprenden quitosano y un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleíco.

Las diferencias entre las microesferas objeto de la presente solicitud y las divulgadas en D01 son que las microesferas divulgadas en D01 no comprenden antígenos ni agentes reticulantes, y que además no presentan forma esférica.

El uso de los agentes reticulantes como estabilizadores de micropartículas está muy extendido en el estado de la técnica (D02, D03, D04, D06), de la misma forma el uso de micropartículas como portadores de antígenos también es ampliamente conocido (D02, D05, D06).

Por tanto, se considera que la diferencia principal entre la micropartícula reivindicada y la divulgada en D01, sería que esta última no presenta forma esférica, condición que parece ser ventajosa para el uso de la micropartícula como vacuna
.
Se explica en D01 que previamente a la síntesis de la micropartícula de quitosano y el copolímero, se sintetiza en las mismas condiciones una micropartícula que comprende solamente quitosano y que presenta forma esférica. Se señala que la adición del copolímero afecta significativamente a la morfología de la partícula, obteniéndose así micropartículas de formas irregulares, lo que podría deberse a la diferente capacidad de precipitación de los polímeros durante el proceso de eliminación del disolvente (ver apartado 3.3).

Se considera, que no hay información en D01 ni en el resto de los documentos citados que pueda dirigir al experto en la materia a llevar a cabo un procedimiento determinado para sintetizar micropartículas que permita asegurar a priori que al combinar estos dos polímeros se vaya a obtener una forma esférica.

Por tanto, sobre la base de lo divulgado en D01 y en el resto de los documentos citados, se considera que la microesfera objeto de la presente solicitud, al igual que la composición farmacéutica, el uso de dicha composición farmacéutica y su procedimiento de preparación, son nuevos e implican actividad inventiva para un experto en la materia.

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-33 es nuevo e implica actividad inventiva para un experto en la materia, en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de patentes 11/86.