

COMPOSICIÓN PARA ADMINISTRACIÓN ORAL DE AGENTES BIOACTIVOS

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIÓN RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de los EEUU No. 61/912,958, tramitada en Diciembre 6 de 2013, cuya totalidad hace parte integral del presente documento por referencia.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

La administración oral de medicamentos y vacunas ofrece varias ventajas. Las posologías pueden ser administradas a un gran número de animales por medio de agua o comida minimizando la restricción y el esfuerzo. La restricción puede estresar a los animales que reciben el medicamento o vacuna, reduciendo su efectividad e incrementando el riesgo de enfermedades infecciosas. Para animales destinados a la alimentación cárnica, la administración oral tiene otra ventaja ya que previene reacciones en el sitio de inyección. Las jeringas rotas, contaminación del sitio de inyección, o el uso de adyuvantes pueden inducir abscesos que dañen el esqueleto y la piel. Estas reacciones reducen el valor del animal al momento de la matanza. Esto también es un problema en programas de vacunación de pescados en donde los pescados deben ser cultivados en tanques o en jaulas al mar abierto e inyectados individualmente. La administración oral es rápida y eficiente y elimina la necesidad de la múltiple manipulación de animales para administrar inoculaciones adicionales subsecuentes. Las reacciones inmunes adversas después de la administración oral también son menos probables y por ende hacen que el método sea más seguro.

La vacuna oral es un modo particularmente rentable de vacunar o tratar un gran número de pescados de una vez en sistemas acuícolas, minimizando la tensión o el esfuerzo. Esto es especialmente cierto si la administración oral de la vacuna puede hacerse a través de la ingestión durante el curso de la alimentación/bebida. Además, las vacunas orales pueden ser fabricadas de manera más eficiente en términos de costos que las formulaciones inyectables de vacuna debido a los menores pasos de purificación necesarios para generar una vacuna oral. La vacuna oral también ofrece la ventaja de menores efectos secundarios tales como estrés u otras reacciones a la inyección.

A pesar de las ventajas de la administración oral de los medicamentos y particularmente de las vacunas, el desarrollo de la tecnología se ha visto retrasado por la falta de sistemas adecuados de administración de vacunas. En la ausencia de sistemas de administración apropiados, la mayoría de las vacunas orales se someten a degradación en el tracto gastrointestinal (GI), especialmente bajo condiciones estomacales de un bajo pH, lo que resulta en una absorción limitada, la cual a su vez resulta en respuestas inmunes insuficientes.

Históricamente, la inmunización se ha basado en la inducción de inmunidad humoral por la administración parenteral de vacunas. Los anticuerpos inducidos por administraciones parenterales sin embargo, no necesariamente alcanzan las superficies mucosas, que son los sitios de entrada de la

mayoría de los agentes infecciosos. La inmunidad mucosa se desarrolla en superficies mucosas incluyendo el intestino, pulmones, boca, ojo, glándulas normales y el tracto genitourinario, y también en la piel y las branquias en los peces, como resultado del contacto del antígeno con tejidos mucosos, es una primera línea de defensa importante contra los agentes infecciosos.

Se han desarrollado varios vehículos para administrar vacunas a los tejidos de mucosa intestinal. Los polímeros biodegradables, tales como poli-(DL-lactida) y poli-(DL-lactida -co-glicolida), han sido utilizados para producir composiciones para la administración oral de antígenos. Sin embargo, la producción de estas partículas de polímeros requiere el uso de solventes que pueden dañar los antígenos frágiles. Además, el uso de solventes previene la incorporación de organismos vivos atenuados, tales como virus o bacterias, dentro de aquellas composiciones.

Otros retos de desarrollar sistemas de administración oral adecuados incluyen la necesidad de seleccionar solamente el alimento o grado de alimentación y compuestos biodegradables y adyuvantes, y la necesidad de una respuesta inmune robusta y de largo plazo.

RESUMEN DEL INVENTO

En un aspecto, el invento suministra una composición para administración oral de un agente bioactivo a especies acuáticas o terrestres, incluyendo partículas que incluyen un agente bioactivo dispersado en gotas de aceite, y las gotas de aceite son dispersadas en una matriz que incluye un polímero de recubrimiento entérico, en donde las partículas además incluyen un polímero mucosoadhesivo.

Por otro lado, el invento suministra un método para la administración post-gástrica de un agente bioactivo a un animal, incluyendo una etapa de administración oral al animal de una composición de acuerdo con lo descrito anteriormente, en donde el agente bioactivo es un inmunógeno.

En otro aspecto, el invento suministra un método de vacunación de especies acuáticas o terrestres, incluyendo una etapa de administración oral a la especie de una composición de acuerdo con lo descrito anteriormente, en donde la composición es un vehículo de administración para una vacuna.

En otro aspecto, el invento suministra un método para preparar una composición. El método incluye, en secuencia:

- (a) Formar una mezcla acuosa incluyendo un agente bioactivo dispersado o disuelto;
- (b) Homogenizar la mezcla acuosa del paso (a) en aceite para producir una emulsión de la mezcla acuosa en el aceite;

(c) Formar una lechada del producto del paso (b) en una solución acuosa incluyendo un polímero de recubrimiento entérico, y ya sea

(d1) Rociar, derramar o inyectar la lechada del paso (c) en una solución acuosa que contenga un agente entrelazante para el polímero de recubrimiento entérico para formar las partículas, en donde la mezcla acuosa del paso (a) además incluye un polímero mucoadhesivo, o

(d2) Formar las partículas de la lechada del paso (c), en donde el paso (b) además incluye formar gotas de la emulsión del polímero mucoadhesivo y entrelazar el polímero mucoadhesivo para formar partículas intermedias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Salvo por definición contraria dentro del presente documento, la terminología científica y técnica utilizada en la presente exposición deberá tener los significados que son comúnmente entendidos y utilizados por alguien de habilidades básicas en el arte. También, en la medida en que sea utilizado dentro del presente documento y las pretensiones, los términos "al menos un" y "uno o más" tienen el mismo significado e incluyen uno, dos, tres o más unidades salvo por indicación sentido contrario; los porcentajes o parte de componentes en las composiciones están planteadas sobre una base de peso. El término "dispersado" significa suspendido y/o disuelto.

"Vacuna oral" se define como la administración oral a través de la dieta de material inmunogénico para estimular el sistema inmune sistémico de un animal para desarrollar una respuesta inmune específica a un patógeno.

"Entrecruzamiento" y variantes del mismo se refieren al entrelazado de dos o más materiales y/o sustancias, incluyendo cualquiera de aquellos expuestos dentro del presente documento, a través de una o más asociaciones covalentes y/o no covalentes (p.e., iónicas). El entrecruzamiento puede ser efectuado naturalmente (por ejemplo, enlaces de disulfuro de residuos de cistina) o a través de rutas sintéticas o semisintéticas. El entrelazado de polímeros cargados puede ser afectado por la asociación iónica con un contraión polivalente de carga opuesta. Las estructuras firmes y sólidas como por ejemplo los hidrogeles, pueden ser preparadas por medio de dicho entrecruzamiento.

"Protección gástrica" hace referencia a la protección del agente bioactivo de destrucción gástrica y pérdida de actividad.

Los compuestos de la invención incluyen materiales particulados que componen un agente bioactivo y un polímero mucoadhesivo, en donde el agente bioactivo se dispersa en un aceite. Las gotas de aceite se empotran en, o son recubiertas por una matriz externa de un polímero de recubrimiento entérico. La matriz externa rodea las gotas de aceite, protegiendo los contenidos de exposiciones a un bajo pH en el estómago de los animales, ya que el polímero se mantiene insoluble a un pH bajo y se mantiene intacto como un recubrimiento o capa protectora. Las partículas típicamente tienen un tamaño geométrico promedio (algunas veces conocido como diámetro) en un rango de 10 a 5000 μm y pueden ser formadas directamente en dicho rango de tamaño o reducidas a dicho tamaño por medio de la trituración, molienda o por otros medios. Usualmente, las partículas tienen un diámetro de menos de 100 μm , preferiblemente menos de 50

µm.

En algunos organismos, el polímero mucoadhesivo y el agente bioactivo están mezclados juntos y en contacto mutuo, asociados juntos con partículas que a su vez están dispersas en la gota de aceite. Una o más de estas partículas están presentes dentro de una única gota de aceite, y una o más gotas de aceite están presentes dentro de la matriz externa. El polímero mucoadhesivo y/o el polímero de recubrimiento entérico pueden estar entrecruzados o no.

En algunos organismos la invención suministra una composición para la administración oral de una vacuna para estimular una respuesta inmune en especies acuáticas y terrestres en contra de enfermedades específicas. La composición comprende una cantidad efectiva de antígeno como agente bioactivo. Las presentes composiciones son diseñadas para presentar el material bioactivo para que contacte con la mucosa intestinal del animal y así estimular la absorción y la inmunidad de la mucosa. Las composiciones de acuerdo con este invento son administradas oralmente, típicamente con un agente de alimentación o portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo por ejemplo, agua (agua para consumo animal), tabletas, cápsulas, formas de posología de bolo, pastillas de alimentación o como aditivos alimenticios para llevar el compuesto al intestino de las especies identificadas.

Los compuestos de la invención suministran varias ventajas en la administración de un agente bioactivo a un sujeto. Primero, el método de construcción del sistema de administración elimina el uso de solventes orgánicos o altas temperaturas y pH que son generalmente necesarios para la preparación de partículas por otros métodos. Al mantener un ambiente acuoso bajo condiciones de pH ligeras y bajas temperaturas a lo largo de la preparación de la presente composición, los bioactivos sensibles tales como bacterias vivas atenuadas o virus pueden ser administrados oralmente. Segundo, la capa adicional de polímero de recubrimiento entérico protege al agente bioactivo en contra de la degradación en el tracto gastrointestinal. En el caso de un inmunógeno, este permite la estimulación de la respuesta inmune con una menor cantidad de antígenos/vacuna. Tercero, la dispersión del aceite incluye al agente bioactivo, previniendo así que las pequeñas moléculas bioactivas tales como proteínas, péptidos y medicamentos se filtren a un ambiente acuoso durante la preparación, así como durante la exposición gástrica. Además, el polímero mucoadhesivo suministra un efecto adyuvante. Finalmente, el sistema de administración puede ser fácilmente formulado para una administración eficiente a especies acuáticas y terrestres.

Típicamente, todos los componentes utilizados en la preparación de compuestos innovadores son de grado alimenticio, no-tóxicos y biodegradables y ocurren naturalmente. A continuación se presenta una descripción de los materiales útiles para preparar la composición.

Agente Bioactivo

El agente bioactivo puede ser un material que ocurre naturalmente, sintético o semi-sintético (por ejemplo, compuestos, fermentados, extractos, estructuras celulares) capaces de provocar, directa o indirectamente, uno o más efectos físicos, químicos y/o biológicos. El agente bioactivo puede ser capaz de prevenir, aliviar, tratar y/o curar condiciones anormales y/o patológicas de un cuerpo

viviente, ya sea por medio de la destrucción de un organismo parásito, o limitando el efecto de una enfermedad o anormalidad. Dependiendo del efecto y/o su aplicación, el agente bioactivo puede ser un agente farmacéutico (tal como un agente profiláctico o un agente terapéutico), un agente de diagnóstico y/o un agente cosmético, e incluye, sin limitarse a, vacunas, medicamentos, profarmecéuticos, moléculas de afinidad, moléculas orgánicas sintéticas, hormonas, anticuerpos, polímeros, enzimas, moléculas de bajo peso molecular, compuestos proteínicos, péptidos, vitaminas, esteroides, esteroides análogos, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, precursores de los mismos y derivados de cualquiera de los anteriores. El agente bioactivo también puede ser un suplemento no nutritivo, los suplementos nutritivos incluyen, pero no están limitados a, proteínas, carbohidratos, vitaminas solubles en agua (por ejemplo, vitamina C, vitamina del complejo B y similares), vitaminas solubles en grasa (por ejemplo como vitaminas A, D, E, K y similares), minerales y extractos herbales. El agente bioactivo puede estar comercialmente disponible y/o ser preparado por medio de técnicas conocidas.

Los agentes bioactivos en el actual invento incluyen, sin limitarse a, vacunas (las vacunas también pueden ser administradas como parte de complejos inmunoestimulantes, conjugados de antígenos con toxina de cólera y sus subunidades B, lectinas y adyuvantes), antibióticos, moléculas de afinidad o moléculas orgánicas sintéticas, polímeros, compuestos proteínas con ácidos de bajo peso molecular, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, lípidos, Ácidos 30 nucleicos, carbohidratos, precursores de los mismos y derivados de cualquiera de los anteriores. El agente bioactivo también puede ser un pesticida por ejemplo, un rodenticida.

El agente bioactivo puede ser un inmunógeno, p.e., un material capaz de montar una respuesta inmune específica en un animal. Ejemplos de inmunógenos incluyen los antígenos y las vacunas. Por ejemplo, los inmunógenos pueden incluir péptidos inmunogénicos, proteínas o proteínas recombinantes, incluyendo mezclas que compongan péptidos inmunogénicos y/o proteínas y bacterias (p.e., bacterinas); partículas virales infecciosas, atenuadas, inactivas; procariotas infecciosas, atenuados, muertos e intactos; protozoarios infecciosos, atenuados, muertos e intactos, incluyendo cualquier etapa del ciclo de vida de los mismos, y patógenos multicelulares infecciosos, atenuados, muertos e intactos, vacunas de subunidad recombinante y cinco vectores recombinantes para administrar y expresar genes que codifican proteínas inmunogénicas (p.e., vacunas de ADN).

El o los agentes bioactivos típicamente constituyen al menos 0.1% del peso de los partículas, excluyendo el agua, o al menos 1%, o al menos 5%. Típicamente, constituyen máximo 40%, o máximo 20%, o máximo 10%.

Polímero Mucoadhesivo

El polímero mucoadhesivo es un polímero que específicamente se enlaza a los tejidos mucosos, ayuda a retener al agente bioactivo en una proximidad cercana a la mucosa, mejorando por ende la administración. Ejemplos apropiados incluyen polímeros sintéticos tales como el poli(ácido acrílico), hidroxipropil metilcelulosa y poli(metil-acrilato), los polímeros funcionalizados carboxílicos, los polímeros funcionalizados de sulfato, los polímeros funcionalizados de aminas y/o modificaciones de los mismos, así como polímeros que ocurren naturalmente tales como carragenano, ácido hialurónico, el chitosan, el guar catiónico y el alginato. Las versiones derivadas o modificadas de cualquier otra forma de

polímeros que ocurran naturalmente también pueden ser utilizadas, y muchos de esos polímeros son conocidos en el arte. Los ejemplos incluyen, sin limitarse a, el alginato de glicolpropileno y pectinas, el carboximetil chitosan, el carboximetilchitin, el metil glicol chitosan, el trimetritil chitosan y similares.

Un polímero mucoadhesivo preferido es el chitosan y el chitosan modificado o derivado, el cual puede ser obtenido a través de la deacetilación del chitin, el mayor compuesto del exosqueleto de los crustáceos. El chitosan [α -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxi-6-D-glucano], un mucopolisacárido estrechamente relacionado a la celulosa, muestra propiedades químicas que están determinadas por el peso molecular, grado de deacetilación y viscosidad. El Chitosan puede formar micropartículas y nanopartículas que pueden enlazar grandes cantidades de antígenos por reacción química con el entrecruzamiento de agentes tales como iones de sulfato, glutaraldehído o iones de fosfato.

Aunque el chitosan es utilizado en algunos organismos preferidos, otros polímeros pueden ser utilizados para lograr una función mucoadhesiva similar. Éstos incluyen pero no están limitados a la gelatina, el alginato, el dextran, el ácido hialurónico, el agar y la escarcha resistente.

El o los polímeros mucoadhesivos típicamente constituyen al menos 1% del peso de las partículas, al menos 10% o al menos 15%. Típicamente constituyen máximo 50%, máximo 30% o máximo 20%.

Aceite

En productos típicos tradicionales, una cantidad significativa del agente bioactivo se pierde en el ambiente acuoso por medio del escape de las partículas ante su preparación y a través del pasaje gástrico, particularmente esto sucede con agentes bioactivos de tamaño molecular pequeño tales como virus, proteínas, medicamentos, antibióticos, pesticidas y similares. Con el actual invento, el escape de los agentes bioactivos de las partículas es eliminado mayoritariamente por partículas discretas, dominios o fases que contienen al agente, el cual está disperso en, o se encuentra recubierto por, un aceite. Cualquier tipo de aceite, incluyendo el aceite vegetal, animal o sintético y las grasas en forma líquida o sólida, o las ceras, pueden ser utilizados para el recubrimiento del agente bioactivo. Los aceites de origen vegetal utilizados actualmente incluyen, sin limitación, el aceite de ricino, aceite de coco, mantequilla de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, escualeno de oliva, aceite de palma, aceite de maní, aceite de semilla de colza, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soya, aceite de girasol, estearato, cera de carnauba y mezclas de los mismos. Los aceites de origen animal utilizados en el actual invento incluyen, sin limitación, el aceite de pescado, el escualeno de tiburón, grasas lácteas, cera de abejas, lanolina, manteca de cerdo y similares. En algunos casos el aceite dispersante es una mezcla de escualenos de oliva o tiburón con cualquier otro tipo de aceite, grasa o cera. Típicamente, la masa de aceite es mayor que la masa recomendada del agente bioactivo y el polímero mucoadhesivo.

En un procedimiento típico, una solución acuosa que contenga el agente bioactivo y el polímero mucoadhesivo es homogeneizada con un aceite a una proporción de una parte de la solución a 1.1-5 partes de aceite por peso hasta que se produzca una emulsión uniforme. Para facilitar la formación de una emulsión uniforme y estable, un tensioactivo no-iónico puede ser añadido. Los tensioactivos no-iónicos apropiados, sin limitación, incluyen el alcohol alifático etoxilado, los tensioactivos de polioxietileno y los ésteres carboxílicos, etc. Una vez se forme una

emulsión estable, las gotas acuosas dispersadas en el aceite se solidifican por una reacción química o física del polímero mucoadhesivo. Por ejemplo, la gelatina y los polímeros de agar son solidificados al caer la temperatura o al cambiar el pH de la emulsión; mientras que el quitosano es solidificado por medio de un aumento de la temperatura del pH de la emulsión por encima de 6.5 y/o por medio de un aumento de contraiones tales como el tripolifosfato de sodio (TPP).

Uno o más aceites típicamente constituyen al menos 1.5% del peso de las partículas, excluyendo el agua, o al menos 10%, o al menos 20%. Típicamente, constituyen máximo 40%, o máximo 30%, o máximo 25%.

Polímero de Recubrimiento Entérico

Las gotas de dispersión de aceite, ya sea que contengan o estén recubiertas por el polímero mucoadhesivo, son dispersadas en una matriz de polímero de recubrimiento entérico que suministre protección gástrica y liberación intacta postgástrica o administración del agente bioactivo, es decir, la liberación en el intestino.

Los polímeros de recubrimiento entérico ejemplares incluyen polímeros solubles en agua a un pH suficientemente alto, pero insolubles a un pH bajo. Típicamente, son solubles a un pH mayor a 5.0 e insolubles a un pH menor a 4.0. Los polímeros adecuados son sustancialmente solubles o digeribles bajo condiciones de pH relativamente ligeras desde un intestino animal, en donde el material bioactivo debe ser liberado, pero insoluble e indigerible en el estómago, en donde la matriz externa del polímero de recubrimiento entérico protege al agente bioactivo sensible del deterioro. En algunos casos, el polímero de recubrimiento entérico está entrelazado, por ejemplo con cationes divalentes, para prevenir la disolución o digestión en el estómago.

Los polímeros de recubrimiento entérico adecuados pueden ser seleccionados de una variedad de polímeros hidrofílicos incluyendo, por ejemplo, el ácido poliacrílico, los poli(meta)acrilatos, la celulosa de carboximetilo, la metilcelulosa, el ftalato de acetato de celulosa y las gomas de polisacáridos sintéticas, naturales o solubles en agua. Un polímero de recubrimiento entérico sintético ejemplar es el EUDRAGIT® FS30D (Evonik Industries). El alginato de sodio y las pectinas son gomas solubles en el agua preferibles, debido a sus condiciones de ligero entrecruzamiento.

Los alginatos suministran una matriz portadora hidrofílica preferible para los agentes bioactivos sensibles gástricos, particularmente debido a su facilidad de uso al formar composiciones de gel sólidas. La solución de alginato forma geles sólidos cuando se combina o se mezcla con cationes divalentes. Sin embargo, en algunos organismos el alginato no se encuentra entrecruzado, pero se mantiene indigerible e insoluble en un ambiente gástrico y por ende protege los contenidos de las partículas mientras esté bajo condiciones de pH bajas del estómago de un animal.

Los alginatos comprenden diferentes proporciones de 1,4-enlazado β -D-ácido manurónico (M), ácido α -L-gulurónico (G), y bloques (MG) alternos. La viscosidad de la solución se encuentra mayoritariamente determinada por la proporción molecular de los bloques M/G. Los alginatos de baja viscosidad típicamente contienen un mínimo de 50% de unidades de

mannuronato y su viscosidad varía entre 20-200 mPa. Los alginatos de media y alta viscosidad contienen mínimo el 50% de unidades de ácido gulurónico y su viscosidad es típicamente superior a los >200 mPas.

En algunos organismos la matriz que forma el polímero es un alginato, pectina o una mezcla de ambos. Los alginatos de un bajo grado viscosidad y las metoxipectinas bajas son preferibles. Las metoxipectinas bajas típicas tienen un grado de metilación por debajo del 50%, y están típicamente entrecruzadas con un catión divalente tales como Ba, Ca, Mg, Sr o Zn.

El o los polímeros de recubrimiento entérico típicamente constituyen al menos 10% del peso de las partículas, excluyendo el agua, o al menos 20%, o al menos 30%. Típicamente constituyen máximo el 70%, o máximo el 50%, o máximo el 40%.

Ingredientes Opcionales

En algunos organismos la composición opcionalmente incluye nutrientes, y nutraceuticos, atrayentes alimenticios y/o compuestos que esconden el sabor, además del agente bioactivo primario. Los potenciadores de penetración o adyuvantes también pueden ser incluidos, para provocar una respuesta inmune fuerte y mejorar el antígeno tomado por los linfocitos de la mucosa. Un adyuvante ejemplar es el beta glucano.

Haciendo la Composición

Un primer modo de crear las partículas es el siguiente. Se homogeniza una mezcla acuosa que comprenda un agente bioactivo dispersado y un polímero mucoadhesivo con un aceite para producir una emulsión de la mezcla acuosa en el aceite. Típicamente, una proporción de 1 parte de mezcla acuosa a 1.1-5 partes de aceite por peso es utilizada para hacer la emulsión. La emulsión se licúa en una solución acuosa que comprende un polímero de recubrimiento entérico, y la lechada es rociada, derramada o inyectada en una solución acuosa que contenga un entrelazante para el polímero de recubrimiento entérico, formando así las partículas. En un segundo método general, una mezcla acuosa que comprenda un agente bioactivo disperso es homogenizada con el aceite para producir una emulsión de la mezcla acuosa en el aceite. Típicamente, una proporción de 1 parte de mezcla acuosa a 1.1-5 partes de aceite por peso es utilizada para hacer la emulsión. Las gotas de la emulsión se dispersan entonces en el polímero mucoadhesivo acuoso, el cual se entrecruza para formar partículas intermedias que puedan opcionalmente ser separadas de la solución entrecruzada. Las partículas intermedias aisladas o no aisladas son después licuadas en una solución acuosa. Las partículas son formadas por medio del secado por rociado o secado por congelamiento y trituración.

En un método específico para hacer las composiciones, un aceite que contiene partículas dispersas del agente bioactivo asociadas con el polímero mucoadhesivo es licuado en una solución de 5-15% de alginato de bajo grado de viscosidad, opcionalmente incluyendo 1-3% de bajas metoxipectinas, y la lechada es inyectada, derramada o rociada de manera atomizada en una solución acuosa de cationes divalente tales como el cloruro de calcio. El tamaño de la masa de las partículas de la matriz resultante puede ser ajustado por la tasa y método de administración

de la dispersión de alginato en la solución de cloruro de calcio. En otro organismo, se seca la lechada sin entrecruzar el alginato, utilizando cualquier método de secado conocido en el arte, por ejemplo el secado por rocío o el secado por aspiración. Típicamente el rango de las partículas resultantes oscila en tamaño de cerca de 20 μm a cerca de 8 mm, más típicamente de alrededor de 50 μm a cerca de 1000 μm .

En un método específico alternativo, 0.5-2% de una fuente insoluble de 35 cationes divalentes tales como el CaCO_3 es añadida a la lechada del agente bioactivo-que contiene gotas de aceite en una solución de alginato de sodio, seguido por la añadidura de 0.5-1% de un ácido orgánico débil tal como la glucono-delta-lactona (GDL) como un acidificador para lentamente liberar los cationes, tales como los iones de calcio. Los cationes se entrecruzan con el alginato para formar un gel sólido de torta, el cual puede ser cortado o triturado en pequeños pedazos o partículas. Típicamente los pedazos o partículas resultantes varían en tamaño entre los 50 μm y los 10 mm, más típicamente entre los 100 a cerca de 5000 μm . Un practicante hábil reconocerá que otros polímeros naturales o sintéticos, preferiblemente los polímeros aniónicos, pueden ser usados utilizando una afinidad basada en la interacción iónica, formando la base de las actuales composiciones.

Utilizando las Composiciones

Las composiciones de este invento pueden ser almacenadas en suspensiones acuosas o secas por cualquier método de secado conocido en el arte, y almacenadas en un estado deshidratado por largos periodos de tiempo sin una pérdida significativa de actividad.

Las composiciones de acuerdo con este invento, pueden ser administradas oralmente con un componente de agua potable, como un aditivo alimenticio o como parte de una formulación de vacuna que contenga un portador farmacéuticamente aceptable y adyuvantes opcionales. Alternativamente, las actuales composiciones pueden ser incluidas en otras posologías orales aceptables. Aquellos que son hábiles en el arte apreciarán que hay una amplia variedad de alimentos, nutrientes, nutraceuticos o posologías farmacéuticas y portadores aceptables y reconocidos en el arte, apropiados para administrar la composición al animal determinado.

La administración de las composiciones de acuerdo con este invento puede ser afectada en uno o varios protocolos de dosis. En un organismo, las composiciones inmunogénicas son administradas en múltiples protocolos de dosis, sobre un periodo de cerca de 3 días hasta alrededor de 10 días o más, y pueden ser repetidas periódicamente en la medida en que la especie identificada muestre una pérdida de inmunidad.

Para aplicaciones en el agua potable para uso en porcinos, ganado, aves o animales acuáticos, se pueden incorporar partículas adicionales de aceite o de poliéster o polipropileno inertes en la composición para aumentar la flotabilidad (por ejemplo, reducir la densidad) de tal manera que los dispositivos de riego para la administración en cultivos de pescados puedan ser utilizados para administrar las actuales composiciones.

De esta forma, las composiciones pueden ser administradas a animales ya sea como un componente de su nutrición diaria o como un componente de su agua de bebida.

EJEMPLOS

Ejemplo 1a

Preparación de la composición del invento

Una composición innovadora fue preparada de la siguiente manera. Se disolvieron 3 g de polímero mucoadhesivo (Chitosan, FMC Biopolymers Inc.) en 100 ml de una solución de ácido acético glacial de 0.5N a 50 °C. El pH de la solución fue ajustado a 5.8 con hidróxido de sodio y la solución permitió el enfriamiento a temperatura ambiente. Se añadió Tween 80 (0.2%, Sigma, St Louis, MO) y Antiespuma (0.5%, Sigma, St Louis, MO) y la solución de Chitosan se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Una solución de 30 ml que contenía 300 mg de ovalbumina ("OVA ", una vacuna modelo) fue añadida a la solución de chitosan para producir una mezcla. La solución resultante fue añadida a 195 g de aceite de oliva que contenía 5% de Span-80 (Sigma) y homogenizada a 10,000 rpm por 30 minutos en un baño de hielo para formar una emulsión de agua en aceite. Un tripolifosfato de sodio acuoso de 20 ml (5%) y 0.5N NaOH fueron añadidos lentamente, mezclando a la emulsión de agente bioactivo que contenía la ovalbumina y entrecruzando las micropartículas de chitosan en una fase de aceite continua. Se permitió el endurecimiento de las partículas por al menos dos horas pero no fueron removidas de la fase de aceite.

La dispersión de las partículas de aceite fue revuelta en 330 ml de una solución acuosa de bajo grado de viscosidad de alginato de sodio de 9% (FMC Biopolymers Inc.), la cual también contenía 66 g de oligosacáridos (instant inulin, Cargill, Minneapolis, MN), 10 g de lecitina y 3 g de Tween- 80. La dispersión acuosa resultante fue inyectada en una solución entrecruzada que contenía 5% CaCl₂ para formar burbujas de matriz de alginato, cada una conteniendo múltiples gotas de aceite que a su vez contenían micropartículas de ovalbumina y chitosan entrecruzado. Las burbujas fueron secadas en congelado y trituradas a partículas por debajo del tamaño de 150 µm para tener una composición en seco del actual invento.

Ejemplo 1b

Un método alternativo de formar composiciones de la invención utiliza una emulsión de una solución acuosa de bioactivo en un aceite. Se combinaron 10 ml de una solución acuosa que contenía 100 mg de ovalbumina con 15 g de aceite de canola que contenían 5% de Span-80 y se homogenizó para formar un agua fina en una emulsión de aceite. La emulsión fue mezclada con 100 ml de una solución de chitosan acuoso del 3%, y la dispersión fue inyectada en una solución entrecruzada que contenía 5% de solución de tripolifosfato (5% TPP). Se les permitió las partículas endurecer por al menos dos horas. Las partículas sólidas de chitosan entrecruzadas resultantes contenían gotas de aceite incrustadas, y cada una de estas gotas de aceite a su vez contenía gotas más pequeñas de 10 µm dispersas de ovalbumina acuosa. Las partículas sólidas fueron aisladas por filtración y fueron finamente dispersadas en 400 ml de una solución acuosa de alginato de bajo grado de viscosidad de 9%. La dispersión acuosa resultante fue inyectada en una solución entrecruzada que contenía 5% CaCl₂ para formar burbujas de matriz de alginato. Fueron secadas en congelado y trituradas a partículas de un tamaño por debajo de 150 µm para tener una composición seca del actual invento.

Ejemplo 2

Preparación de una composición inmunogénica

Se disolvió el chitosan (3 g, FMC Biopolymer) en una solución de 100 ml de ácido acético glacial de 0.5N a 50 °C. El pH de la solución fue ajustado a 5.8 con hidróxido de sodio y la solución fue enfriada a temperatura ambiente. Se mezcló una solución de 10 ml que contenía 100 mg de Ovalbumina (OVA) como una vacuna modelo, con 50 mg de un agente inmuno-estimulante (beta glucan, AHD International, Atlanta, GA) y añadida en la solución de chitosan. La mezcla resultante fue emulsificada en 150 g de aceite de escalo de tiburón (Jedwards International) que contenía 5% de w/w Span-80 a 10,000 RPM por 30 minutos para formar una emulsión de gotas acuosas de OVA, chitosan y beta glucano en una fase de aceite continua. Se añadieron 400 ml de una solución acuosa de alginato de sodio de bajo grado de viscosidad de 9% en 0.5N NaOH, la cual también contenía oligosacáridos (40 g, insulina instantánea), por medio de agitación. La emulsión resultante fue inyectada en una solución de 5% de CaCl_2 para entrecruzar el alginato, resultando en una composición inmunogénica del actual invento. La composición fue secada en congelado y triturada a partículas menores de 250 μm de tamaño.

Ejemplo 3

Preparación de una composición para tratamiento/prevención de una infección parasítica de pescado

También se puede preparar una composición que contenga un antígeno de proteína o compuesto antiparasitario para tratamiento de plagas parasitarias en pescados. Se disuelven 10 mg del agente bioactivo en 10 ml de una solución de chitosan acuosa de 3% de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 2 anterior, y se emulsifica en 15 g de mezcla de aceite que contiene 75% de aceite de oliva, 20% de aceite de escalo y 5% de Span-80.

Se emulsifica 1 ml de solución de tripolifosfato acuoso de sodio al 5%, 0.5N NaOH en 1 g de aceite de oliva y se mezclan en la emulsión del agente bioactivo, resultando en una dispersión en el aceite de partículas que contienen el agente bioactivo y el chitosan entrecruzado. Se permite que la dispersión se asiente por dos horas para endurecer el chitosan entrecruzado. La dispersión resultante de las partículas en aceite es añadida por medio de la agitación a una solución de 20 ml que contenga alginato de sodio de bajo grado viscosidad de 9%, metoxipectina baja de 1%, 30% de w/w inulina instantánea y 1% de Tween-80. La mezcla resultante es inyectada a una solución entrecruzada que contenga 3% de CaCl_2 para formar burbujas de una matriz de pectina-alginato que contenga gotas de aceite dispersas e incrustadas y cada una a su vez conteniendo líquido para micropartículas del agente bioactivo y chitosan entrecruzado. Las burbujas son secadas en congelado y trituradas a un tamaño por debajo de 150 μm para obtener una composición seca del actual invento.

Ejemplo 4

Preparación de una composición que contenga un medicamento farmacéutico

Se preparó una composición que contenga un medicamento farmacéutico (un

glucocorticoides como la dexametasona o la metilprednisolona) para enfermedades del colon. El medicamento fue añadido a la solución de chitosan de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 2 anterior, y fue emulsificado en una mezcla de 95% de aceite de escualeno y 5% de Span-80. Una emulsión alcalina que contenía 5% de tripolifosfato de sodio 0.5N NaOH en aceite de escualeno es preparada y mezclada lentamente (20% w/w) en la emulsión bioactiva para entrecruzar el chitosan, y la mezcla puede asentarse por al menos dos horas para endurecer las partículas entrecruzadas. La dispersión de aceite de las micropartículas de chitosan es mezclada en un líquido que contengan el polímero de recubrimiento entérico (30% w/w EUDRAGIT® FS30D, Evonik Industries) en una proporción de 1:3 de emulsión/líquido Eudragit y secado por rocío para formar una composición particulada seca del actual invento.

Ejemplo 5

Eficiencia de encapsulación de un agente bioactivo en la composición del actual invento

El efecto de la dispersión de la dispersión de aceite adicional y la matriz del polímero de recubrimiento entérico en la composición del actual invento fue evaluada utilizando ovalbumina (OVA) para simular un típico medicamento de proteína o vacuna. Se prepararon tres OVAS (Sigma) que contenían composiciones. La composición 1 consistía de un OVA enlazado a partículas de chitosan, preparado al disolverse 100 mg de OVA en 10 ml de una solución de chitosan de 3% e inyectando la solución en un TPP acuoso de 10% para formar burbujas entrecruzadas, seguido por una espera de dos horas para endurecer las burbujas y subsecuentemente secar al congelado y triturar. La composición 2 fue elaborada al emulsificar 10 ml de solución acuosa que contenían 100 mg de OVA en 15 g de aceite de escualeno que contenía 3% de Span-80, y mezclando la emulsión resultante en 20 ml de solución de chitosan del 3%. La lechada resultante fue inyectada en una solución TPP del 10% para formar burbujas, seguido por el endurecimiento, secado al congelado y trituración como ha sido descrito anteriormente. La composición 3 consistió de micropartículas de chitosan enlazadas a un OVA, de acuerdo con el invento, y siguiendo las instrucciones del Ejemplo 2.

La eficiencia de encapsulación de la OVA en los tres tipos de composición fue determinada de la siguiente manera. Se dispersaron 500 mg de cada composición en 10 ml de amortiguador RIPA e incubado a una temperatura ambiente por 30 minutos. Las suspensiones fueron agitadas en vórtex por cinco minutos y después centrifugadas a 3000 RPN por 15 minutos. El líquido flotante fue probado para contenido Ova utilizando el análisis de Western Blot, de la siguiente manera.

Western Blot: las composiciones fueron desagregadas con un amortiguador RIPA de acuerdo con lo descrito anteriormente, y una cantidad calculada equivalente a 12µg de proteína por muestra fue cargada en un gel de gradiente de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE, Bio-Rad, Hercules, CA). Se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF (Bio-Rad) y fueron bloqueadas por una hora con leche desnatada en 5% en PBS conteniendo 0.5% de Tween-20 (PBS-T). Se incubaron unas manchas con un anticuerpo primario apropiado a diluciones de 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS-T (3 × 10 ml, 5 minutos cada uno), las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado de HRP (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) a una dilución de 1:5000 por 1 hora. Después de lavar con PBS-T (3 por 10 ml, cinco minutos cada uno), se desarrollaron películas de quimio

luminiscencia con un sustrato de ECL (Amsheram Biosciences). La eficiencia de encapsulación de la OVA (porcentaje de retención de la cantidad original de OVA) se presenta en la tabla 1.

Tabla 1

Composición	Eficiencia de Encapsulación (%)
1	70
2	95
3	95

Los resultados demuestran el efecto protector de la dispersión de aceite en las composiciones 2 y 3 para prevenir el escape (perdida) del agente bioactivo a un ambiente acuoso simple. Sin embargo, se encontraron diferencias comparativas significativas entre la composición 2 y la innovadora composición 3 cuando fueron probadas bajo condiciones gástricas, de acuerdo con lo descrito a continuación en el Ejemplo 7.

Ejemplo 6

Degradación de actividad de antígeno de proteína no protegida en jugo gástrico simulado

Para evaluar la pérdida de actividad de un antígeno de proteína después de una exposición gástrica típica, se incubó un OVA no encapsulado (10 mg) en 10 ml de fluido gástrico simulado que contenían 0.08% de pepsina a un pH -2 por 2 horas a 37 °C en un agitador. El medio fue retirado los 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos del tiempo de incubación, y la cantidad de OVA residual fue analizada utilizando el análisis de Western Blot de acuerdo con lo descrito anteriormente. La tabla 2 muestra la degradación de la OVA después de dos horas de exposición en un jugo gástrico simulado, indicado como porcentaje de actividad restante relacionada con la actividad de la preexposición.

Tabla 2

Tiempo (min)	Actividad restante (%)
15	61
30	55
60	38
120	2

Éstos resultados demuestran que la actividad del antígeno basado en una proteína no protegida o un agente bioactivo será completamente degradada en el tracto digestivo animal.

Ejemplo 7

Protección gástrica de un agente bioactivo en la composición del actual invento 10

Para evaluar la actividad restante de un antígeno de proteína después de exposición gástrica, se prepararon tres composiciones de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 5. Se incubaron 500 mg de cada una de los tres composiciones en 10 ml de fluido gástrico simulado que contenían 0.08% de pepsina a un pH -2 por 2 horas a 37 °C en un agitador. Al final de las dos horas de exposición, las soluciones gástricas fueron retiradas y la actividad restante de la OVA en las composiciones fue medida de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 5. La tabla 3 muestra la actividad restante de la OVA en cada una de las composiciones después de dos horas de exposición a jugo gástrico simulado.

Tabla 3

Composición	Actividad restante (%)
1	10
2	20
3	90

Éstos resultados claramente muestran el efecto protector gástrico superior de la innovadora composición 3 con relación a las composiciones 1 y 2 anteriores del arte.

Ejemplo 8

El efecto del grado de viscosidad del alginato en la composición en la protección gástrica 5

Tres composiciones que contienen alginato de bajo grado de viscosidad 9% (50 cP), alginato de grado medio de viscosidad 6% (300 cP) y alginato de alto grado de viscosidad 1% (800 cP) fueron preparados de acuerdo con el ejemplo 2 anterior. Las tres composiciones fueron expuestas al jugo gástrico simulado de acuerdo con lo descrito en ejemplo 7 y la actividad restante de la OVA 10 en las composiciones medidas de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 5. La tabla 4 muestra la actividad restante de la OVA en cada una de las composiciones después de una exposición de dos horas al jugo gástrico simulado.

Tabla 4

Grado viscosidad del alginato	Actividad restante (%)
Alto (800 cp)	25
Medio (300 cp)	40
Bajo (50 cp)	90

Éstos resultados demuestran que las composiciones que contienen un alginato de bajo grado de viscosidad suministran una protección más alta de un antígeno basado en proteína o bioactivo en el tracto digestivo animal simulado.

Ejemplo 9

Tamaño óptimo de partícula de la composición innovadora

En este ejemplo, se evaluó el efecto protector del tamaño de la partícula de una composición innovadoras secada y triturada en un ambiente gástrico simulado. Se preparó una composición de OVA de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 5, seguido por una separación del material pulverizado seco en dos tamaños de partículas: partículas pequeñas que pasaban a través de una pantalla de 50 µm, y partículas grandes que fueron capturadas en la pantalla de 50 µm pero pasaban a través de una pantalla de 100 pm. La tabla 5 muestra la actividad restante de OVA en cada tamaño de partícula de la composición después de dos horas de exposición en jugo gástrico simulado.

Tabla 5

Tamaño de partícula	Actividad restante (%)
50-100 pm	90
<50 pm	40

Éstos resultados muestran que se genera una protección gástrica óptima cuando la composición seca es triturada a un tamaño de partícula por encima de los 50 µm.

Ejemplo 10

Administración Oral de la Composición OVA a Ratones

La ovalbumina es administrada oralmente a ratones para probar la eficacia de las composiciones innovadoras para inducir una respuesta inmune.

Animales: Se utilizaron ratones BALB/C hembras de 10 a 12 semanas de edad. Los ratones fueron alimentados *ad libitum*. Cada grupo experimental está ubicado en una celda

separada.

Composición de la ovalbumina: Ovalbumina (1 mg/gramo de ovalbumina, Sigma, St. Louis, Mo.,) es incorporada la composición innovadora de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 5. Se inoculan 3 grupos de cuatro ratones cada uno de la siguiente manera: 1) ovalbúmina (OVA) en la composición, administrada oralmente; 2) solución de OVA, administrada subcutáneamente (SC); 3) composición libre de antígenos administrada oralmente. Se inocula a los ratones a las semanas 0 y 3. Cada dosis administra un total de 100 mg de composición seca mezclada con aceite de maíz a una proporción de 1:2 w/w de composición seca/aceite, colocados sobre bolitas de comida. En la semana 4 cada ratón es eutanizado y se cultiva el suero y las células de bazo.

Pruebas inmunológicas: se prueba el suero para IgG e IgA por ELISA. El ELISA es llevado a cabo utilizando OVA absorbida a placas de poliestireno. Las muestras son colocadas en pozos en triplicado a una dilución de 1:25 por suero. Se utilizó una cápsula de anticuerpos antiroedor conjugada con peroxidasa de rábano picante, seguido por un sustrato de ortofenilenediamina (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.). La densidad óptica de cada pozo es determinada colocando la placa en un espectrofotometro de placa microtitulado y leyendo la placa a 490 nm. Las células del bazo son probadas por células de secreción de anticuerpos (ASC) específicas para la OVA, utilizando las técnicas descritas anteriormente.

Los anticuerpos específicos del IgG e IgA de la OVA son cuantificados al determinar el aumento en la densidad óptica con el tiempo. Se espera que el suero específico de la OVA y las células de secreción de IgG, IgA y ASC para cada ratón inoculado con OVA aumenten por igual en aquellos ratones inyectados con OVA y aquellos que han sido oralmente alimentados con la composición del presente invento. No se espera detectar ningún anticuerpo específico de IgG o IgA de la OVA en los ratones que recibieron como alimento la composición libre de antígenos. De esta manera, se espera que la composición sea efectiva para inducir una respuesta inmune ante la administración oral.

Ejemplo 11

Administración Oral de una Composición que contenga Antígenos a Pollos

El *Salmonella Enteritidis* es una causa mayor de enfermedades en las gallinas. La infección reduce la producción y aumenta la mortalidad en manada. Incluso, el *Salmonella Enteritidis* puede ser transferido a través del huevo a los pollos bebés, infectando generaciones subsecuentes o a los humanos de consuman huevos infectados. En vista de que la infección inicia con esta bacteria que se adjunta e invade la mucosa intestinal, y la infección de largo plazo incluye una infección de los tejidos linfoides intestinales, la estimulación de la inmunidad mucosa es necesaria para controlar esta enfermedad

Para evaluar la eficacia de vacunar a los pollos con composiciones de la vacuna del presente invento, se incorpora la flagelina del *Salmonella Enteritidis*, un inmunogeno clave, dentro de la composición de acuerdo con el Ejemplo 2, salvo que la emulsión de la vacuna es mezclada en la fase de alginato de sodio alcalino a una proporción de 1:2 w/w y la lechada es

20

secada por rocío. La composición seca se mezcla en los alimentos y es administrada oralmente a los pollos. Los pollos de 10 semanas de edad reciben tres dosis orales a intervalos de dos semanas de la composición cargada con ya sea 300 μ m de flagelina de antígeno del *Salmonella Enteritidis* o con albúmina de suero bovino. Una semana después de la última dosis oral del antígeno, el suero y el jugo intestinal son recolectados y probados para anticuerpos específicos de flagelina por ELISA. Se espera que los resultados muestren que los pájaros vacunados oralmente hayan incrementado significativamente los anticuerpos específicos de la flagelina en el suero.

Ejemplo 12

Administración Oral de una Composición que Contenga Antígenos a Becerros

La eficacia de la ovalbúmina administrada oralmente que contenga una composición preparada de acuerdo con el presente invento para estimular una respuesta inmune en los pulmones de los becerros ha sido demostrada.

Se incorpora la ovalbúmina en la composición de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 1a. Para la administración oral a los becerros, una composición que contenga una dosis de 40 μ m de ovalbumina por miligramos es administrada en la alimentación. Se utilizaron 4 becerros por grupo experimental y cada becerro recibió 5 mg de ovalbúmina por dosis por cinco días consecutivos.

Dos grupo de becerros son utilizados para evaluar la eficacia de la ovalbúmina administrada oralmente para inducir una respuesta inmune específica. El grupo 1 recibe 2 dosis de ovalbúmina en un adyuvante de Freund incompleto por inyección subcutánea (SC) con tres semanas de diferencia. Éste grupo sirve para control parenteral, el método de vacunación rutinariamente utilizado para cualquier vacuna. El grupo 2 recibe dos regímenes orales de una composición que contenga ovalbúmina con tres semanas de diferencia. Los sueros son evaluados para respuesta de anticuerpos isotípicos a la ovalbúmina.

Se espera que los resultados demuestren que una cantidad significativa de IgG e IgA específicos de OVA sea producida en los becerros que reciben alimentación oral con composición que contenga OVA. El nivel alto de suero esperado en IgA predice la actividad de simulación de una respuesta inmune sistémica en el ganado.

Ejemplo 13

Administración de una Composición que Contenga Vibrio Antígenos a pescados

El *Vibrio alginolyticus* es una infección bacterial seria en la acuicultura, particularmente se verá en la trucha arco iris. Ahora es endémica en todos los países que producen trucha, en donde puede causar severas pérdidas económicas. También se está volviendo un patógeno significativo del salmón cultivado, principalmente en la fase de crecimiento de agua dulce, pero se ha reportado que causa pérdidas en el mar también. La vacunación puede prevenir que el *V. Alginolyticus* tenga un impacto significativo en cualquier etapa del ciclo de cultivo de los salmónidos. Un programa de vacunación típica involucra una vacuna primaria del alevín de 2-5 g y una dosis adicional oral de 4-6 meses después de la primera vacuna. Sin embargo, un

programa ideal de vacunación debería incluir solamente un tipo de vacuna suministrada periódicamente al pescado para mantener una concentración efectiva de anticuerpos en el suero del pescado a lo largo de todo el periodo de cultivo.

Diseño experimental: La eficacia de la vacuna ERM administrada oralmente que contenga la composición preparada de acuerdo con el presente invento para estimular una respuesta inmune en el suero de la trucha ha sido demostrada.

El *V. Algynolyticus* atenuado es incorporado dentro de la composición de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 1b. Para la administración oral a pescados, se administra una composición que contenga una dosis de 2µg de *V. alginolyticus* por mg en la alimentación. Se utilizaron 20 pescados a un tamaño promedio de 5 g para el grupo experimental y cada pescado recibió una dosis de vacuna de *V. Algynolyticus* en una porción de alimentación por cinco días consecutivos.

Se utilizaron tres grupos de pescados para evaluar la eficacia del *V. Algynolyticus* administrado oralmente para inducir una respuesta inmune relacionada con una vacuna estándar por inyección. El grupo uno es vacunado utilizando una vacuna por protocolo de inyección. Éste grupo sirve como control parenteral, el método de vacunación rutinariamente utilizado para cualquier vacuna. El Grupo 2 recibe un régimen oral de una composición que contenga la vacuna de *V. Algynolyticus*. El Grupo 3 recibe un régimen oral de vacuna de composición libre. Los sueros son evaluados para respuesta de anticuerpos isotípica al *V. Algynolyticus* a las 6 semanas después de la vacunación. Se espera que los resultados muestren que una cantidad significativa de IgA específico de *V. Algynolyticus* es producida en los peces alimentados oralmente con la composición que contenga el *V. Algynolyticus*. Se espera que sea compatible la respuesta inmune en el suero de ambos peces alimentados oralmente e inyectados con vacunas. El alto nivel esperado de suero IgA predice una alta efectividad en la simulación de una respuesta inmune sistémica en los pescados.

Ejemplo 14

Composición que Contenga un Rodenticida

La Warfarina es el rodenticida más común utilizado para controlar plagas de ratas y ratones. Los roedores que ingieran carnadas que contengan warfarina exhiben síntomas de envenenamiento en 15/30 minutos y después pierden conciencia en 1-2 horas. Sin embargo, debido a su rápido efecto, el roedor típicamente ingiere una cantidad subletal de warfarina y la recuperación ocurre dentro de ocho horas. Encapsular la warfarina puede retrasar el inicio de los síntomas, permitiendo el consumo de una dosis letal completa.

Métodos experimentales: Se utilizaron ratones BALB/C hembras de 10 a 12 semanas de edad. Los ratones fueron alimentados *ad libitum*. Cada grupo experimental fue colocado en una celda separada.

Composición innovadora de Warfarina: la Warfarina (400 mg/g de composición Sigma, St. Louis, Mo.) está incorporada en una composición de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 3.

Se alimentaron tres grupos de cuatro ratones cada uno de la siguiente manera: 1) composición innovadora de Warfarina, mezclada en carnadas a una actividad de Warfarina del

4%; 2) Warfarina encapsulada, mezclada en carnadas de alimento a una actividad del 4%; 3) carnada que contenga una composición de acuerdo con lo estipulado en el Ejemplo 3, que no contenga warfarina o ningún otro bioactivo. Se monitorean la ingesta de alimentos y los efectos letales en los ratones.

Los resultados demuestran que la ingesta de alimentos en los grupos 1 y 3 es similar, mientras que la ingesta de alimentos en el grupo 2 (Warfarina no encapsulada) es cerca de 25% menos. Se espera que todos los ratones en el grupo 1 estén muertos después de 8 horas de la alimentación mientras que todos los ratones del grupo 2 se mantengan vivos después de 8 horas de haberse alimentado.

REIVINDICACIONES:

1. Una composición para administración oral de un agente bioactivo a especies acuáticas o terrestres, que comprenda partículas, cada una de las cuales comprenda un agente bioactivo dispersado en gotas de aceite, dichas gotas de aceite están incrustadas o son recubiertas por un polímero de recubrimiento entérico que componga una matriz, en donde las partículas además cada una conforme un polímero mucoadhesivo.
2. La composición de la pretensión 1, en donde en el polímero de recubrimiento entérico sea entrecruzado.
3. La composición de la pretensión 2, en donde el agente entrecruzado para el polímero de recubrimiento entérico comprenda cationes de metal divalentes.
4. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde el polímero mucoadhesivo sea entrecruzado.
5. La composición de la pretensión 4, en donde los entrecruzamientos en el polímero mucoadhesivo sean formados por sucesión con tripolifosfato.
6. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde el polímero mucoadhesivo sea dispersado en gotas de aceite.
7. La composición de la pretensión 6, en donde el polímero mucoadhesivo y el agente bioactivo estén asociados.
8. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde las partículas sean mayores a 50 μm de diámetro.
9. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde el polímero mucoadhesivo sean uno o más polímeros seleccionados del grupo que consista en el carragenano, chitosan, ácido hialurónico, alginato, derivados o modificaciones de cualquiera los anteriores, los polímeros funcionalizados carboxílicos, los polímeros funcionalizados de sulfato y los polímeros funcionalizado de aminos.
10. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde el polímero de recubrimiento entérico sean uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste de poli (meta)acrilatos, alginatos, pectinas, carboximetil celulosa, metilcelulosa y ftalato de de acetato de celulosa.

11. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde la matriz de polímero de recubrimiento entérico comprenda un bajo grado de viscosidad, una baja metoxipectina o una combinación de los mismos.
12. La composición de cualquier pretensión anterior, en donde el aceite es uno o más de los aceites elegidos del grupo que consiste en grasas, aceites y ceras.
13. La composición de la pretensión 13, en donde el aceite es un aceite animal o vegetal.
14. Un método para preparar la composición y la pretensión 1, que comprenda la siguiente secuencia:
- (a) Formar una mezcla acuosa que comprenda un agente bioactivo dispersado o disuelto;
 - (b) Homogenizar la mezcla acuosa del paso anterior en el aceite para producir una emulsión de la mezcla acuosa en el aceite;
 - (c) Formar una lechada del producto del paso anterior en una solución acuosa que comprenda un polímero de recubrimiento entérico, y ya sea
 - (d) (d1) Rocíar, derramar o inyectar la lechada del paso (c) en una solución acuosa que contenga un entrelazante para el polímero de recubrimiento entérico para formar las partículas, en donde la mezcla acuosa del paso (a) además comprende un polímero mucoadhesivo, o (d2) formar las partículas a partir de la lechada descrita en el paso (c), en donde el paso (b) además incluya formar gotas de la emulsión en un polímero mucoadhesivo acuoso y entrecruzar el polímero mucoadhesivo para formar partículas intermedias.
15. El método de la pretensión 15, en donde se llevó a cabo el paso (d1).
16. El método de la pretensión 15, en donde se llevó a cabo el paso (d2).
17. Los métodos de la pretensión 17, en donde el paso de formación de las partículas comprenda un secado en congelado y una trituración del producto del paso (c).
18. El método de la pretensión 17, en donde el paso para formación de las partículas comprenda un secado por rocío del producto del paso (c).
19. Un método de entrega post-gástrica del agente bioactivo a un animal, que comprenda un paso de administración oral de la composición de la pretensión 9 a un animal.
20. Un método de vacuna para especies terrestres o acuáticas, que comprenda un paso de administración oral a dichas especies de la composición de cada una de las pretensiones 1-14, en donde la composición sea un vehículo de administración para una vacuna.

RESUMEN

Una composición para administración oral de un agente bioactivo a especies acuáticas o terrestres que incluya partículas y que cada una de las cuales incluya un agente bioactivo dispersado en gotas de aceite, las gotas de aceite son dispersadas en una matriz que incluye un polímero de recubrimiento entérico, en donde las partículas cada una además incluye un polímero mucoadhesivo. También se suministran los métodos para elaborar y usar la composición.