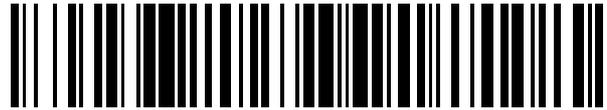


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 601**

21 Número de solicitud: 201600417

51 Int. Cl.:

A23K 20/153 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.11.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)
Otri-Ual Ctra. de Sacramento s/n Edf. Central
04120 Almería ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ MOYA , Tomás Francisco ;
ALARCÓN LÓPEZ , Francisco Javier y
SAÉZ CASADO , María Isabel**

54 Título: **Preparado alimenticio para animales que protege, vehicula oralmente y mantiene la funcionalidad de moléculas de ADN con interés en producción y sanidad animal, así como el procedimiento para su obtención**

57 Resumen:

Preparado alimenticio para animales que protege, vehicula oralmente y mantiene la funcionalidad de moléculas de ADN con interés en producción y sanidad animal, así como el procedimiento para su obtención. Las moléculas de ADN, en particular plásmidos de ADN, se incorporan a unas nano-micro-macro-cápsulas de quitosano, alginato y otros componentes, y posteriormente se incluyen en el interior de una masa de ingredientes alimenticios sometidos a extrusión, granulación o a una combinación de ambos procedimientos, bajo condiciones que garantizan la integridad del ADN dentro de los gránulos de pienso. La posterior administración oral del preparado permite una dosificación precisa de la cantidad de ADN, lo protege durante el tránsito por el tubo digestivo y mantiene su viabilidad hasta los tramos del intestino en los que ejerce su efecto fisiológico. Los plásmidos así vehiculados expresan en animales vivos los genes de interés que portan en su construcción al menos durante 60 días.

ES 2 641 601 A1

DESCRIPCIÓN

Preparado alimenticio para animales que protege, vehicula oralmente y mantiene la funcionalidad de moléculas de ADN con interés en producción y sanidad animal, así como el procedimiento para su obtención.

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca de manera general en el campo de la agricultura, concretamente en la producción animal y específicamente en el sector de la acuicultura.

Antecedentes de la invención

Existen diversas vacunas comerciales autorizadas para su uso en peces, la gran mayoría frente a enfermedades bacterianas, y muy pocas frente a enfermedades víricas. En situaciones reales de piscifactoría, los peces son inmunizados con el uso de vacunas mediante dos procedimientos habituales: la administración mediante inyección, bien intramuscular o intraperitoneal, o la administración por inmersión. En un plano todavía experimental, cabe mencionar otros procedimientos de los que se hablara más adelante, entre los cuáles la administración oral de vacunas es, a día de hoy, el más prometedor.

Cada método presenta sus ventajas e inconvenientes respecto a los niveles de protección, en función de sus efectos secundarios, y respecto a su aplicación práctica y rentabilidad (Gudding *et al.*, Recent developments in fish vaccinology. Vet Immunol Immunop., 1999, volumen 72, páginas 203-212; De las Heras *et al.*, Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. Fish Shellfish Immunol., 2010, volumen 28, páginas 562-570).

En los últimos años las vacunas de ADNp están en pleno auge, principalmente debido a que, a diferencia de las vacunas convencionales (basadas en subunidades proteicas o en microorganismos patógenos inactivados), son capaces de inducir respuestas inmunes muy efectivas tanto a nivel celular como humoral. Se basan en la expresión de los antígenos codificados por plásmidos recombinantes (ADNp) en células del animal inmunizado, siendo capaces de inducir una respuesta inmune de larga duración que disminuye enormemente la necesidad de reinmunizaciones (Tonheim *et al.*, What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. Fish Shellfish Immunol., 2008, volumen 25, páginas 1-18).

Además, y desde el punto de vista práctico, la vacuna de ADN es relativamente económica y fácil de producir. De hecho, existen diferentes preparados vacunales de ADNp autorizados para su uso veterinario tanto en Estados Unidos como en Canadá. Como limitación importante de las mismas, hay que citar que también obligan a su administración mediante inyección, dado que la administración oral implica que el ADN ingerido es hidrolizado en el intestino hasta pequeños fragmentos como consecuencia del proceso digestivo, que implica fenómenos mecánicos, químicos (principalmente acidez estomacal) y enzimáticos (actuación de nucleasas) en el tracto gastrointestinal. En estas circunstancias, ni los efectos inmunoestimulantes, ni de vehiculación de genes de interés en el ADNp son posibles, puesto que en particular el ADNp necesita llegar a las zonas de absorción intestinal con su secuencia completa, su estructura circular, e incluso, su estructura espacial tridimensional ("superenrollamiento") para conservar su capacidad de expresión en tejidos. Por tanto, el ADN es una molécula muy vulnerable en el tubo digestivo, y de ahí el escaso éxito de su administración por vía oral como molécula desnuda.

Limitaciones de los métodos de administración de vacunas en acuicultura

La administración de vacunas en animales acuáticos da lugar a problemas técnicos que no se presentan en los animales terrestres. Los peces pueden ser inmunizados de tres maneras, por inyección, por inmersión o por administración oral de la vacuna (Heppell y Davis, Application of DNA vaccine technology to aquaculture. Adv Drug Del Rev., 2000, volumen 43, páginas 29-43; Adelman *et al.*, Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicemia. Vaccine, 2008, volumen 26, páginas 837-844).

La vacunación por inyección puede realizarse intramuscularmente (i.m.), aunque la vía intraperitoneal (i.p.), a pesar de provocar mayor estrés en los animales que la i.m., se ha demostrado como más efectiva para inmunizar a los peces. Antes de inyectar la vacuna, el pez debe ser anestesiado, y tras la punción se devuelve al agua. Este procedimiento no es operativo para ser aplicado a peces de menos de 5 gramos y, por tanto, no sirve para inmunizar a los animales en estadios tempranos de desarrollo de los mismos, periodo que precisamente resulta del máximo interés para una prevención temprana frente a la aparición de enfermedades. En lotes de peces mayores de ese peso, la punción individual de cada animal no deja de ser un trabajo enormemente laborioso y de consecuencias estresantes para los animales.

Por otra parte, las vacunas inyectables suelen incluir adyuvantes para potenciar la respuesta inmunológica y prolongar el efecto de la misma, que en no pocas ocasiones provocan problemas relacionados con fenómenos inflamatorios tanto locales como sistémicos, capaces de provocar en último caso incluso considerable mortalidad. Otras desventajas de esta vía están relacionadas con la reducción de la ingesta posterior a la vacunación, así como con la posibilidad de producir una punción inadvertida del intestino. Además, la utilización de agujas incrementa el riesgo de transmisión de agentes patógenos del agua a los animales y entre los propios peces (Vinitnantharat *et al.*, Fish vaccines. Adv Vet Med., 1999, volumen 41, páginas 539-550).

Buena parte de los problemas mencionados asociados con la inyección intraperitoneal se solventan mediante la administración de las vacunas por inmersión. En este caso, los peces son rociados o sumergidos en una solución que contiene la vacuna concentrada, siendo, por tanto, fácil de aplicar y aunque no resulta tan efectiva como la inyección parenteral en términos de la inmunidad que genera, su facilidad de manejo la hace el método de elección para peces de pequeño tamaño, con pesos vivos inferiores a los 5 gramos. Entre sus limitantes cabe citar que su uso está restringido a la acuicultura intensiva, dados los riesgos ambientales derivados de la liberación de los preparados vacunales al agua de cultivo y, por consiguiente, al medioambiente en el cual se desarrolla la producción acuícola. Adicionalmente, se necesita una cantidad notable de la sustancia a administrar, algo que en ciertos casos, como las vacunas víricas, imposibilita su aplicación práctica. Por otra parte, no se tiene un control preciso de la vía de entrada de los antígenos vacunales, que habrá de producirse por absorción a través de la piel y/o de las branquias, de manera que cabe calificar este aspecto del control de la dosificación como enormemente errático e impreciso. Y por último, en el mejor de los casos, la respuesta inmune es de menor magnitud y duración que cuando se utiliza la vía parenteral por inyección (Vinitnantharat *et al.*, Fish vaccines. Adv Vet Med., 1999, volumen 41, páginas 539-550), motivo por el cual puede ser necesario revacunar con cierta frecuencia, algo que implica continuas manipulaciones de los peces.

Si nos circunscribimos al caso de las vacunas de ADNp, su administración mediante inmersión es una práctica impensable por su nula viabilidad, no sólo por el mencionado carácter errático del medio acuático, sino principalmente por la rápida degradación de la

molécula de ADNp en el propio medio acuático. Hasta la fecha, la aplicación de este tipo de vacunas se hace necesariamente mediante inyección intramuscular o intraperitoneal.

5 En cualquier caso, y a pesar de las limitaciones mencionadas, a fecha de hoy la eficacia de la vacunación mediante inmersión supera de largo a la obtenida mediante la vacunación por vía oral en peces. La razón estriba en la degradación de las vacunas orales que tiene lugar durante su tránsito por el tubo digestivo, merced a la existencia de barreras fisiológicas gastrointestinales, las más importantes de las cuáles son la acidez estomacal y las actividades enzimáticas digestivas tanto en el estómago como en el
10 intestino.

Desde el punto de vista práctico en condiciones de piscifactoría, la posibilidad de administrar vacunas orales en peces es considerada como la vía ideal, debido a sus numerosas ventajas, entre las que cabe citar: i) es el único método que podría utilizarse
15 en acuicultura extensiva, en la que el control individual de los animales no es posible, pero si reciben alimentación artificial mediante piensos; ii) no produce estrés en los animales, puesto que exime a éstos de manipulaciones dolorosas o molestas; iii) posibilita la administración en masa en animales de cualquier tamaño sin necesidad de costes adicionales; iv) permite por el motivo anterior inmunizar en etapas muy tempranas.
20 a condición de que los animales ingieran alimento inerte, y v) simula la vía natural de entrada oral de multitud de agentes ictiopatógenos y el consiguiente mecanismo natural de reconocimiento y desencadenamiento de la respuesta inmune. Como principales desventajas podríamos citar que: i) se necesitaría administrar cantidades grandes de estas sustancias para obtener una respuesta adecuada; ii) sólo es aplicable en peces que
25 ingieren alimentos inertes, y iii) en el estado actual de la tecnología, la respuesta obtenida no es equivalente a la producida por inyección o inmersión (Horne y Ellis, en "Fish Vaccination", ed. A. E. Ellis. Academic Press, Londres, 1988, páginas 55-66).

En cualquier caso, el problema último que dificulta su uso consiste en que las sustancias
30 exógenas se degradan o inactivan en el tracto digestivo del pez, y que por lo tanto no ejercen el efecto deseado (Ounn *et al.*, Vaccines in aquaculture: the search for an efficient delivery system. Aquacult Eng., 1990, volumen 9, páginas 23-32).

La encapsulación como vehículo oral de moléculas bioactivas

35 Entre las estrategias de vehiculación oral en peces, se han descrito distintos procedimientos de pulverización o adición por diversos sistemas de un amplio rango de soluciones acuosas y oleosas que contienen los plásmidos u otro tipo de preparados vacunales sobre los gránulos de pienso previamente elaborados. A pesar de existir
40 numerosas patentes en este sentido, entre las limitaciones de las mismas cabe citar la erraticidad de la dosificación, derivada de la falta de garantía de distribución uniforme sobre el pienso (normalmente son pequeños volúmenes de solución/emulsión vacunal aplicados sobre considerables cantidades de pienso, procedimientos, además, cuya
45 utilidad práctica está en entredicho, teniendo en cuenta que van a utilizarse en un medio tan difícil de controlar como el acuático asociado a las piscifactorías comerciales. Y sobre todo, la falta de demostración de su efectividad mediante pruebas *in vivo*.

La encapsulación ha ofrecido resultados más prometedores para la administración oral de moléculas bioactivas, células, fármacos y otras sustancias de interés (Chen *et al.*,
50 Genipin cross-linked polymeric alginate-chitosan microcapsules for oral delivery: *in vitro* analysis Int J Polymer Sci., 2009, article ID 617184, 16 pages, doi: 10.1155/2009/617184).

El principal requisito de dichas cápsulas es que estén constituidas por componentes biocompatibles, a ser posible, de grado alimentario, que originen cápsulas estables con una adecuada resistencia a las condiciones gastrointestinales, y que tengan cierta permeabilidad. La estructura de estas cápsulas está constituida por redes poliméricas tridimensionales de alto peso molecular y carácter hidrófilo, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Estas redes son insolubles debido a la presencia de entrecruzamientos químicos o entrecruzamientos físicos, los cuales proveen a la red de una estructura definida y de integridad física. Actualmente, las cápsulas tienen numerosas aplicaciones en la industria médica y farmacológica, ya que asemejan los tejidos vivos naturales más que ninguna otra clase de materiales. Dentro de los polímeros más usados en procedimientos de encapsulación, el alginato, un polisacárido aniónico aislado de algas pardas, cumple de forma satisfactoria con los requisitos mencionados anteriormente. El principal inconveniente es que forma estructuras poliméricas relativamente poco estables que pueden dar lugar a la desestabilización de las cápsulas (Wang et al., Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug. J Controlled Release, 2005, volumen 106, paginas 62-75).

No obstante, para evitar este problema las cápsulas de alginato se pueden estabilizar con otros polímeros naturales catiónicos (Anal et al., Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. Drug Dev Ind Pharm., 2003, volumen 29, paginas 713-724).

El más utilizado es el quitosano, que es un copolímero del tipo amino-polisacárido compuesto por D-glucosamina y N- acetil-D-glucosamina [poli(N-acetil-D-glucosamina)]. que es obtenido por la desacetilación alcalina de la quitina, principal material estructural en los exoesqueletos de crustáceos y otros animales artrópodos. Se trata del único polisacárido catiónico natural y es conocido por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, así como por su resistencia a las condiciones gástricas y su capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, característica esta última que incrementa el tiempo de contacto de las cápsulas con las mucosas y potencia la absorción de moléculas a través de las células epiteliales de la mucosa (Artursson et al., Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). Pharm Res., 1994, volumen 11, páginas 1358-1361).

Además posee ciertas ventajas con respecto a otros polímeros cuando se utiliza como vehículo para administración oral de fármacos o sustancias sensibles al ambiente ácido del estómago (Li et al., Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. BMC Biotechnol., 2008, volumen 8, 11 páginas, doi: 10.1186/1472-6750-8-89).

Por todo lo anterior, si se quieren vehicular por vía oral moléculas de ADN lineal o de ADNp para aprovechar sus propiedades biológicas, resulta imprescindible desarrollar un preparado que cumpla con los siguientes requisitos:

1) que pueda administrarse de tal manera que se eviten tanto manejos estresantes de los animales, como alteraciones de las operaciones rutinarias del personal, o cambios en la pauta y composición de la alimentación de los animales; es decir, que se pueda administrar como el pienso habitual,

2) que el ADN exógeno, y en particular el ADNp, mantenga la viabilidad y funcionalidad dentro del pienso desde su elaboración hasta que sea administrado a los peces en el medio acuático,

3) que el preparado no se diluya o pierda propiedades durante el tiempo que transcurre entre que se añade al medio acuático y el animal lo ingiere, es decir, que se comporte como las propias partículas del pienso comercial habitual,

5 4) que durante su tránsito por el tubo digestivo, se asegure la llegada al intestino de un número suficiente de ADN lineal o de ADNp para garantizar, por una parte, un efecto local, y por otra, una absorción intestinal efectiva, y

10 5) que dicha absorción resulte, en el caso de los genes contenidos en una construcción plasmídica, en una posterior expresión efectiva en los tejidos animales.

El pienso así preparado debe incluir, además de los ingredientes alimenticios habituales, unas partículas (nano, micro o macrocápsulas) elaboradas a partir de sustancias no tóxicas, de grado alimentario, de fácil disponibilidad en el mercado y de bajo coste. Los ingredientes más ampliamente autorizados para la elaboración de las cápsulas inertes son el alginato y el quitosano. El alginato es un heteropolisacárido aniónico natural constituido por ácido D-manurónico y L-gulurónico y que en presencia de calcio puede producir geles. Los iones divalentes, como el Ca^{2+} , se unen preferentemente al polímero de ácido L-gulurónico. Como polímero para formar cápsulas, el alginato cálcico es muy apropiado debido a su simplicidad, ausencia de toxicidad, biocompatibilidad y bajo coste (Sheu y Marshall, Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J Food Sci., 1993, volumen 54, páginas 557-561).

La solubilización de la matriz de alginato cálcico cuando los iones calcio son secuestrados es otra ventaja de este ingrediente. Esta propiedad lo hace especialmente valioso para la administración oral, puesto que el pH alcalino del intestino solubiliza el polímero, y permite la liberación de su contenido. La segunda sustancia con interés para esta finalidad es el quitosano, un polímero natural catiónico, que puede utilizarse sólo o en combinación con el alginato, aumentando de esta forma su estabilidad (Anal *et al.*, Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. Drug Dev Ind Pharm., 2003, volumen 29, páginas 713-724).

El éxito de las combinaciones de alginato-quitosano para la vehiculación oral y protección de proteína exógena en peces ha sido demostrado recientemente (Sáez *et al.*, Effect of alginate and chitosan encapsulation on the fate of BSA protein delivered orally to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Anim Feed Sci Tech., 2015, volumen 210, páginas 114-124).

A la vista de lo anterior, la solución más adecuada consistiría en la inclusión del ADNp dentro distintos formatos de encapsulación, que su vez, se incorporen dentro de la masa de los piensos que se administran habitualmente a los animales, desde los puntos de vista del bienestar animal, así como de la comodidad de administración, y de la posibilidad de repetir la administración cuantas veces sea preciso.

Han sido numerosos los intentos en este sentido, pero no se conoce ningún procedimiento que sea capaz de incorporar a la masa del pienso plásmidos de ADN viables. La actuación de factores físicos como la temperatura y la presión durante los procedimientos de granulación y de extrusión acaban con la integridad del ADNp, y por este motivo, prácticamente todas las referencias consultadas incorporan la solución de ADNp sobre la superficie de los gránulos, una vez que éstos ya han sido elaborados. Algún estudio solventa estos problemas mediante la elaboración de pellets no alimenticios, como por ejemplo, de polietilenglicol (Adelmann *et al.*, Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. Vaccine. 2008, volumen 26, páginas 837-844), que si bien pueden servir para condiciones de experimentación en laboratorio para administraciones

puntuales, sin embargo presentan otros problemas, en piscifactoría, como la falta de garantía de que los animales los ingieran debido a su falta de palatabilidad, dado que no tienen nada que ver con el alimento habitual, o de los más que probables efectos secundarios relacionados con su uso (Schultze *et al.*, Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. Pharm Res. 2003, volumen 20, páginas 1984-1988).

En cualquier caso, la principal objeción a todos estos procedimientos consiste en la falta de evidencia tanto de la persistencia del ADNp, como de su efectividad *in vivo*.

Explicación de la invención

Preparado alimenticio para animales que protege, vehicula oralmente y mantiene la funcionalidad de moléculas de ADN con interés en producción y sanidad animal, así como el procedimiento para su obtención.

La invención consiste en un preparado alimenticio destinado a animales de producción en general, y a peces en particular, que sirve de vehículo para la administración oral de moléculas de ADN lineal o de plásmidos de ADN (ADNp) con capacidad de expresión en células eucariotas, así como el procedimiento para su obtención. El preparado se caracteriza por tener como características no excluyentes un formato de gránulo cilíndrico o esférico, de morfología uniforme y tamaño modificable, de migaja, lamina, cinta entre otras, para adaptarse a las distintas etapas vitales de los animales de destino. Los gránulos pueden ser fruto bien de un proceso de granulación, o de extrusión, o de una combinación de ambos, y se caracterizan por contener dentro de su masa, además de los componentes habituales en los piensos con fines alimenticios, unas nanopartículas de quitosano, o unas micro o macropartículas elaboradas con el mismo polímero sólo o en combinación con otros polímeros, principalmente alginato, así como otras moléculas con interés tecnológico, como las ciclodextrinas, gelatina, el ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), almidón, carragenatos, goma guar, etc., y a las que se les incorporan durante el proceso de su elaboración diferentes cantidades de ADN lineal o circular, en particular, uno o varios vectores de expresión para eucariotas, consistentes en plásmidos de ADN que incluyen uno o varios genes que codifican para proteínas de interés en el ámbito de la producción y/o la sanidad animal, y cuya principal aplicación es con fines de inmunización, inmunoestimulación, o de ejercer efectos de tipo hormonal o de otra naturaleza, mediados por factores proteicos. Dicho ADN permanece íntegro estructuralmente y plenamente funcional durante los procedimientos industriales mencionados para la elaboración de los gránulos del preparado, merced a la protección aportada por las nano, micro o macropartículas previamente elaboradas, y por las características del proceso de extrusión y granulación aplicado. Esta invención evita la destrucción del ADN debida a la presión y a las elevadas temperaturas que implica el proceso de fabricación del pienso. El preparado así formado permite una dosificación precisa del ADN, en particular del ADNp, en comparación con otras formas de administración orales o por inmersión, es estable en el medio acuático, y mantiene plenamente funcional al ADN, al que protege durante su paso por el tránsito digestivo de los animales, favoreciendo su posterior liberación intestinal y el subsecuente efecto fisiológico, bien en la luz intestinal, o tras su incorporación al medio interno del animal, permitiendo la expresión de los genes de interés en los tejidos animales durante al menos 60 días tras su ingestión. La administración del preparado es por vía oral, y dado que su formato es idéntico al alimento habitual de los animales, evita manejos estresantes de los mismos, así como alteraciones de las operaciones rutinarias de las granjas, y de las piscifactorías en particular.

Como resultado de todo lo anterior, el producto:

- 1) permite una dosificación oral precisa del ADN lineal o del ADNp en comparación con otras formas de administración orales o por inmersión, dado que este se distribuye homogéneamente en la masa del pienso,
- 5 2) evita el manejo estresante asociado con la aplicación mediante inyección intramuscular o intraperitoneal,
- 3) es estable en el medio acuático por tiempo similar a los piensos comerciales para la acuicultura,
- 10 4) mantiene la estructura del ADN y la función del ADNp, previamente encapsulados, protegiéndolos tanto durante las etapas industriales de fabricación del producto, como durante su posterior tránsito por el tubo digestivo de los animales.
- 15 5) una vez que alcanza el intestino, permite la liberación del ADN, pudiendo ejercer su acción fisiológica localmente, o ser absorbido a través de la mucosa intestinal,
- 6) el ADNp absorbido hacia el medio interno del animal migra y puede ser detectado en distintos tejidos, como hígado y músculo,
- 20 7) los genes que porta el ADNp incluido en el producto son expresados en los distintos tejidos animales durante al menos 60 días tras su ingestión.

En el caso particular del uso de plásmidos vectores de expresión en eucariotas se ha demostrado como una estrategia muy efectiva especialmente para la vacunación de peces por vía parenteral, dado que son capaces de desencadenar una potente respuesta inmune de tipo tanto humoral como celular. Pero la estructura y funcionalidad de la molécula de ADNp es muy sensible a las condiciones fisiológicas existentes en el tracto gastrointestinal de los animales, en particular a la acidez estomacal y a las enzimas nucleasas de las secreciones intestinales, de manera que su empleo directo por vía oral carece totalmente de efectividad, y como consecuencia, la administración queda limitada a la vía parenteral mediante inyección, bien intramuscular o bien intraperitoneal.

Sin duda es en peces donde esta administración oral es especialmente interesante, dado que la administración de preparados inyectables es relativamente sencilla en las especies terrestres, y entra a formar parte de las rutinas de vacunación habituales en las explotaciones ganaderas. Por el contrario, en la acuicultura no resulta factible la inyección individual de las formas juveniles de peces, por las razones anteriormente expuestas, y esto motiva la necesidad de desarrollar formas de administración oral efectivas, fiables, y factibles en condiciones de piscifactoría.

Entre los mecanismos que están probablemente implicados en la supervivencia del ADNp en el preparado que se presenta cabe citar, además de la encapsulación, que la protección otorgada por los propios gránulos del pienso se debe a que los componentes alimenticios hacen de barrera para el ácido estomacal y para las enzimas digestivas tanto gástricas como intestinales. Así, los componentes del pienso, ricos en proteína, poseen capacidad tamponadora por sí mismos, de manera que el pH estomacal ácido queda mitigado en buena medida por el alimento. De hecho, la capacidad acidificante del estómago de los peces acuicultivos depende claramente de que el estómago contenga o no alimento. Dicho de otro modo, para la supervivencia del ADNp exógeno en el tubo digestivo es muy importante que la administración de los plásmidos se haga vehiculado en el propio alimento, y no mediante procedimientos que difieran en el tiempo de las pautas de alimentación. Por tanto, la presente invención, conteniendo al ADNp en

partículas de pienso, parece tener efecto protector del ADNp precisamente por la combinación de estos fenómenos.

5 El pienso que se propone permite administrar por vía oral las cápsulas (nanocápsulas, microcápsulas o macrocápsulas) conteniendo ADNp, plásmidos que se mantienen viables y protegidos dentro del pienso sin condiciones especiales de conservación distintas a las propias del pienso, en tanto que su composición, más allá de la adición del ADNp protegido en cápsulas inertes, es la de cualquier pienso para la acuicultura, y por tanto, diseñado para ser estable en el medio acuático. Por su formulación, también resulta
10 atractivo para los animales, que lo ingieren de forma voluntaria, en las condiciones habituales de explotación, sin necesidad de manejo estresante de ningún tipo. La invención es compatible con el manejo habitual a gran escala en todo tipo de piscifactorías, tanto en tanques como en jaulas a mar abierto. Así vehiculado, el ADNp queda protegido durante su tránsito por el tubo digestivo de los peces.

15

El preparado se formula en dos etapas:

Etapas I. Elaboración de las nano, micro y macrocápsulas con ADNp.

20 Etapas II. Elaboración de los piensos conteniendo las cápsulas con ADNp

Etapas I. Elaboración de las nano, micro y macrocápsulas con ADNp.

25 En la primera de ellas, se mezclan los plásmidos de ADN previamente extraídos de acuerdo con el protocolo que se menciona en el apartado "Ejemplos de aplicación. Ejemplo 1" con un volumen adecuado de la sustancia o sustancias que van a originar las cápsulas (que comprende como componentes principales quitosano y/o alginato, pero que puede incluir también, gelatina, ácido poliláctico-co-poliglicólico (PLGA), u otros componentes o mezclas de los mismos, de forma no excluyente) en proporciones
30 variables (típicamente de 0,2 a 4% p/v para el alginato, y de 0,01 al 3% p/v para el quitosano), así como una cantidad variable de otros componentes, como mono-, di- u oligosacáridos, como las ciclodextrinas (típicamente entre 0,05 y 3% p/v), o de otras sustancias de uso alimentario con finalidad espesante o emulgente (como por ejemplo, agar, almidón, carragenatos, goma guar, etc.). Las partículas que se elaboran a partir de
35 estos ingredientes pueden diseñarse con un amplio rango de tamaños, y así, hablamos de nanocápsulas (identificables con microscopía electrónica de barrido, y diámetros entre 10 y 1000 nm), de microcápsulas (con diámetros entre 1 µm y 1 mm), y de macrocápsulas (entre 1 y 10 mm). La elección del tamaño de cápsula dependerá del formato de las partículas de pienso en el que se incluirán posteriormente, pero todos de
40 ellos permiten la introducción del ADNp en su interior, por su pequeño tamaño.

Las microcápsulas y macrocápsulas pueden elaborarse de manera sencilla obligando a pasar la mezcla anterior de polímeros y ADNp gota a gota a través de una aguja de diámetro variable en función del tamaño deseado, sobre una solución de CaCl₂
45 (típicamente de 0,5 a 5% p/v) de tal modo que, cuando las gotas o microgotas caen en el fluido en agitación continua, tiene lugar la gelificación de las mismas, formándose cápsulas esféricas y sólidas. El proceso puede automatizarse mediante el uso de un aparato encapsulador, que por medio de unas bombas peristálticas toma la solución a gelificar, conteniendo las nano o micropartículas con el plásmido en su interior, de un
50 recipiente, y la obliga a pasar por unas boquillas de diferentes tamaños en función del diámetro deseado, y las gotas o microgotas así formadas habrán de caer sobre la solución de CaCl₂ antes mencionada para su gelificación. Por otra parte, las nanocápsulas se elaboran siguiendo el procedimiento descrito por Kumar *et al.*, Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (Lates

cacarifer) te protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. Fish Shellfish Immunol., 2008, volumen 25, páginas 47-56) con algunas modificaciones, partiendo de volúmenes iguales (por ejemplo, 1 mL) de sulfato sódico al 0,5% y de quitosano al 0,5% (p/v), a los que se les añade la décima parte (por ejemplo, 200 µL) de una solución de plásmido pCMVβ de 0.2 mg de ADNp/mL. La mezcla se homogeniza en un vórtex en agitación intensa durante 30 segundos, y se deja reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agita nuevamente la suspensión del mismo modo descrito. Finalmente, las nanopartículas se recuperan por centrifugación durante 3 min a 12.000 g.

10 Todos los formatos de partícula conteniendo ADNp descritos pueden utilizarse directamente tras su obtención para elaborar el pienso, o bien pueden conservarse en refrigeración durante periodos más allá de dos semanas sin que exista merma en su funcionalidad. Sin embargo, su principal ventaja consiste en la posibilidad de liofilizar las cápsulas, obteniendo un polvo o un granulado fino capaz de mantener en su interior al ADNp totalmente viable por periodos ilimitados, que y que podrá reservarse hasta el momento en que sea necesario adicionarlo a la masa a partir de la que se elaborarán los piensos.

Etapa II. Elaboración de los piensos conteniendo las cápsulas con ADNp

20 La segunda etapa que culminara la obtención del pienso consistirá en la elaboración en sí de una mezcla de harinas finamente molidas con los ingredientes alimenticios habituales, junto con los aditivos autorizados y los complementos vitamínicos y minerales que precisa cada especie a la que se destina. Esta mezcla se someterá a continuación bien a un proceso de granulación, o bien a un proceso en dos fases, una de extrusión seguida de otra de granulación. En cualquier caso, a la mezcla de ingredientes alimenticios se le añadirán las nanocápsulas o las micro/macrocápsulas que previamente contienen el ADNp de interés y que se habrán elaborado según el protocolo anteriormente descrito.

30 En el caso de la granulación, el procedimiento se llevará a cabo sin necesidad de precauciones especiales, dado que la temperatura a la salida de la matriz que determina el tamaño de los gránulos de pienso no es probable que se eleve por encima de los 90-95°C, y teniendo en cuenta que la protección que aporta el proceso de encapsulación permite al ADN conservar su estructura, y en el caso del ADNp en particular, no perder su estructura superenrollada a esas temperaturas. De hecho, la imposibilidad de elevar la temperatura es una de las limitaciones de la granulación a la hora de elaborar piensos para peces, que precisan unas características físico-químicas y una transformación de los ingredientes especiales a causa de su fisiología digestiva y de las características del medio acuático. Estos problemas se solventan en la industria de los piensos comerciales con el proceso de extrusión, mucho más agresivo en términos de efectos físicos sobre los componentes. Por tanto, si se necesita que el pienso sea extrusionado, algo habitual en los piensos para la acuicultura, se ha de tener en cuenta que pueden alcanzarse temperaturas mucho más elevadas (hasta 120-140°C). En este caso, es posible seguir incluyendo las nano o micro/macrocápsulas en la masa del pienso, pero habrán de incorporarse una vez terminado el proceso de extrusión, y a continuación, someter a la mezcla a una etapa posterior de granulación. Para ello, es necesario que la mezcla de ingredientes acondicionada y obligada a transitar por el tornillo extrusor, antes de incorporar el ADN:

50 a) no se haga pasar por la matriz ni por la cortadora al final del tornillo extrusor, evitando así que adquiera el formato final del gránulo, pellet o lámina, sino que se deje salir libremente para obtener una masa amorfa de ingredientes extrusionados,

b) para ello, se debe adicionar vapor de agua durante el paso por el tornillo en cantidad suficiente para que la masa de ingredientes mantenga a la salida del extrusor una elevada humedad (por encima del 50%),

5 c) esta masa extrusionada se introducirá a continuación en una mezcladora que garantice el amasado homogéneo, durante el cual se comprobará la temperatura de la masa, debiendo dejarse enfriar por debajo de unos 90-95°C, pero evitando que la temperatura baje de unos 45-50°C. Dentro de este rango de temperatura, se podrán añadir la
10 suspensión de las cápsulas con plásmidos sin riesgo alguno de alteración del ADN, pero se mantendrá una fluidez suficiente para que la mezcla de las cápsulas con los ingredientes del pienso sea homogénea, y así permita el posterior paso de la masa por la máquina granuladora con la necesaria fluidez. Para ello la humedad debería mantenerse por encima del 50%, añadiendo agua caliente a la temperatura deseada en caso necesario.

15 d) la mezcla descrita, previamente extrusionada y conteniendo ya el ADN encapsulado y homogéneamente distribuido, se someterá a continuación a un proceso de granulación igual al descrito anteriormente, como segunda etapa tras la extrusión de los componentes alimenticios.

20 El preparado final obtenido mediante este procedimiento permite vehicular oralmente el ADN exógeno, que continuará conservando su estructura y funcionalidad, algo que representa un especial interés para su uso en peces de acuicultura y presenta las siguientes ventajas respecto a su administración inyectada o por inmersión, así como
25 frente a otros preparados propuestos para administración oral:

1) la doble protección aportada por la combinación de técnicas de encapsulación, junto con las condiciones de elaboración del pienso que se han utilizado, bien la granulación, o bien la extrusión/granulación, permiten la incorporación a la masa del pienso de
30 moléculas de ADN, y en particular de ADNp, sin que éstas resulten destruidas o inactivadas durante el proceso de fabricación, algo que si ocurre cuando el ADN se añade desnudo.

2) el pienso así formado garantiza la dosificación precisa del ADN a los animales que lo consumen, puesto que puede incorporarse a la masa del mismo y homogeneizarse
35 convenientemente cuanta cantidad de ADN sea necesaria durante la elaboración de la mezcla, distribuyéndose éste por toda la masa del gránulo de alimento, y no solamente como una capa externa añadida *a posteriori* sobre los gránulos del pienso, algo habitual en las invenciones con esta finalidad propuestas hasta ahora.

40 3) una vez fabricado, el pienso mantiene la viabilidad del ADN durante largos periodos de almacenamiento, puesto que esta molécula una vez encapsulada es estable en las condiciones de baja humedad de los piensos, por debajo del 10%.

45 4) los procedimientos de extrusión/granulación utilizados para la preparación de la invención están ajustados específicamente para las necesidades de los peces acuicultivos, de manera que garantizan no solamente la persistencia del ADN en el interior de los gránulos de pienso en el medio acuático durante tiempo suficiente para que los peces puedan ingerirlo, sino también las propiedades de un pienso extrusionado
50 comercial.

5) cuando los gránulos aquí descritos son lanzados al medio acuático no tienen lugar pérdidas por "enjuague" del ADN, a diferencia de lo que ocurre cuando éste es incorporado con posterioridad sobre la superficie de los gránulos del pienso, normalmente

como una película oleosa que se adhiere a los mismos. La invención propuesta solventa el grave problema de la incertidumbre sobre la cantidad de ADN que ingiere realmente el pez cuando éste se aplica como una capa de cobertura sobre el pienso. Dicha cantidad podrá calcularse multiplicando la ingesta diaria promedio de pienso por la concentración conocida de ADN por unidad de peso del pienso.

5

6) el pienso conteniendo las cápsulas cargadas con ADN, durante su tránsito por el tubo digestivo, es capaz de vehicular hasta los tramos posteriores del intestino dicho ADN, superando las barreras fisiológicas de los peces capaces de destruirlo si éste se administra desnudo.

10

7) el ADNp administrado oralmente protegido en el interior de los gránulos de pienso aquí descrito es absorbido en el intestino, y distribuido por los distintos tejidos de los peces, de manera que es posible detectar e identificar sus secuencias en tejido intestinal, hepático y muscular.

15

8) el ADNp protegido y vehiculado oralmente con el pienso que aquí se describe, y que posteriormente es absorbido a través del intestino y distribuido por los tejidos animales permanece viable y plenamente funcional tras este tránsito, y por ese motivo es posible detectar y cuantificar la actividad de los genes de interés insertados en los plásmidos en los tejidos de los animales que los ingirieron al menos durante 60 días post-ingestión.

20

La invención que se propone cumple el requisito de novedad, puesto que no ha sido difundida por descripción escrita u oral, ni ha sido utilizada más allá del ámbito experimental en el laboratorio, antes de solicitar la patente.

25

La actividad inventiva supone una aportación nueva sobre el estado de la técnica desde un doble punto de vista:

30

1. Las vacunas de ADN han mostrado su potencial en la inmunización no sólo a escala experimental, sino también en algunos preparados comerciales. Representan una línea de investigación a medio plazo de enorme interés, si bien en el caso de los peces su limitante principal es la necesidad de administración inyectada. A pesar del interés por la administración por vía oral, no hay hasta la fecha ningún preparado capaz de lograr la vehiculación eficiente en un preparado alimenticio que permita su utilización a escala comercial en condiciones reales de piscifactoría.

35

2. La inclusión en el vehículo polimérico cuyas características se han descrito en los apartados correspondientes resuelve el doble problema tecnológico que limita la utilización práctica de los plásmidos de ADN por vía oral en piensos: i) la destrucción de los mismos debida a las elevadas temperaturas y presiones que tienen lugar durante la fabricación de los piensos, y ii) la hidrólisis ácida y enzimática que sufren los plásmidos desnudos durante su tránsito por el tubo digestivo de los animales, que impide que llegue suficiente cantidad del mismo para su absorción intestinal. Estas debilidades impiden por completo la utilización de plásmidos de ADN por vía oral a escala comercial si no se vehiculan y protegen con la invención que se propone.

40

45

Entendemos que la invención que se propone es susceptible de explotación industrial, estimando que la relación coste/beneficio de su explotación es favorable por las siguientes razones:

50

1. La inclusión de secuencias génicas que codifican proteínas de interés inmunológico, hormonal o de otro tipo en zonas específicas dentro de los plásmidos para garantizar

su posterior expresión en las células animales es un procedimiento relativamente sencillo, al alcance de cualquier laboratorio con un dominio básico de las técnicas de biología molecular. Por otra parte, la clonación y posterior multiplicación de estos plásmidos de interés dentro de bacterias es un procedimiento rutinario y barato, que permite obtener cantidades industriales del mismo. Desde este punto de vista, este proceso se puede desarrollar a escala industrial sin especial dificultad.

2. La fabricación de las cápsulas no necesita de un aparataje excesivamente costoso, dado que existe disponible en el mercado una amplia variedad de maquinaria a precios razonables para todas las escalas industriales que se precisen. La razón estriba en la multitud de aplicaciones, sobre todo farmacológicas, que utilizan diversas formas de encapsulación, y por eso la producción industrial de la invención que se propone es perfectamente factible, y de hecho es una realidad en muchos campos de investigación y el desarrollo de productos comerciales.
3. Las sustancias utilizadas en la fabricación de las cápsulas son ingredientes autorizados para uso alimentario, fácilmente accesibles y baratos.
4. Los rendimientos de encapsulación del ADN son excelentes (por encima del 95%), y el mantenimiento de su integridad dentro de las cápsulas es también muy elevado, de tal manera que la práctica totalidad del ADNp obtenido tras la purificación puede acabar en las cápsulas, sin apenas pérdidas.
5. La facilidad para regular tanto el diámetro (desde nanocápsulas de fracciones de micrómetro, hasta macrocápsulas de varios milímetros) como el contenido de ADN de las cápsulas hace al procedimiento enormemente versátil. Así, la fabricación puede adaptarse a necesidades específicas relacionadas con el tamaño y con la especie de pez que interese, pudiendo incorporarse a partículas de pienso de formatos muy diversos (tamaños desde 0,2 mm hasta varios cm), utilizando siempre la misma maquinaria, sin necesidad de líneas industriales paralelas o multiplicadas.
6. La posterior elaboración de los piensos en los que se incluirán las cápsulas con el ADN no requiere de una maquinaria diferente de la habitual en las fábricas de piensos, puesto que los formulados, al margen de incluir el ADN, pueden ser los habituales de los piensos comerciales, incluyendo como macroingredientes a materias de origen animal y vegetal autorizadas para alimentación animal, en proporciones adecuadas para garantizar el contenido en proteína y energía necesario para cada especie y etapa productiva, convenientemente molturados y tamizados, y sometidos a las elevadas presiones y temperaturas que garantizan una elevada digestibilidad, una inactivación de factores antinutritivos, así como una adecuada persistencia en el medio acuático.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de figuras en las que, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Detalle de los productos de PCR obtenidos que confirmaron la presencia del plásmido pCMV β en las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas. Se indica el tamaño (pares de bases) de los fragmentos amplificados. M: marcador 1 kb (100 - 12.000 pb).

Figura 2. Separación electroforética en geles de agarosa al 0,8% del ADNp purificado a partir de los cultivos transformados de *E. coli* DH5 α . Nótese en ambos casos la mayor migración electroforética de la banda correspondiente al plásmido en estado superenrollado. M, marcador 1 kb (100 - 2.000 pb).

5

Figura 3. Separación electroforética en geles de agarosa de los sobrenadantes y del ADNp contenido en las nanocápsulas tras su disgregación con bicarbonato sódico. No se detecta la presencia de ADNp fuera de las cápsulas (sobrenadante). La encapsulación mantuvo la forma funcional del ADNp (estado superenrollado). M, marcador 1 kb (100 - 12.000 pb).

10

Figura 4. Separación electroforética en geles de agarosa del ADNp desnudo sometido a diferentes valores de pH (2, 4, 7 y 9) y a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 minutos) en un sistema *in vitro*. 1 Kb: marcador de tamaños moleculares (100 - 12.000 pb).

15

Figura 5. Separación electroforética en geles de agarosa del ADNp encapsulado en alginato cálcico y sometido a diferentes valores de pH (2, 4, 7 y 9) y a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 minutos) en un sistema *in vitro*.

20

Figura 6. Separación electroforética en geles de agarosa del ADNp encapsulado en nanoesferas de quitosano sometido a diferentes valores de pH (2, 4, 7 y 9) y a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 60, 90 minutos) en un sistema *in vitro*.

25

Figura 7. (1): Gránulos de pienso con nanocápsulas de ADNp incorporadas en la masa antes de la granulación (lote A) y con las mismas nanocápsulas incorporadas en su superficie tras inmersión (lote B) observados bajo luz natural, sin que se aprecie diferencia alguna. (2): Los mismos gránulos de (1) observados con luz ultravioleta (A 312 nm). Obsérvese la emisión de fluorescencia procedente del ADN encapsulado teñido con SYBR Green® en toda la masa de los gránulos A, pero únicamente en superficie en los gránulos B. (3): Láminas procedentes de la sección transversal de los gránulos anteriores observadas bajo luz ultravioleta (λ 312 nm). Obsérvese la emisión de fluorescencia procedente del ADN encapsulado teñido con SYBR Green® en la lámina procedente del gránulo A. pero únicamente en la superficie exterior de la lámina procedente del gránulo B.

30

35

Figura 8. Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de los extractos de tejidos (músculo, intestino e hígado) de los peces control (sin administración de ADNp) para la pareja de cebadores especificados tras 7, 15, 30 y 60 días post-administración.

40

Figura 9. Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de los extractos de tejidos (músculo, intestino e hígado) de los peces a los que se les administró pienso con nanocápsulas de ADNp para la pareja de cebadores especificados tras 7, 15, 30 y 60 días post-administración.

45

Figura 10. Separación electroforética en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de los extractos de tejidos (músculo, intestino e hígado) de los peces a los que se les administró el ADNp desnudo mediante inyección intramuscular para la pareja de cebadores especificados tras 7, 15, 30 y 60 días post-administración.

50

Figura 11. Actividad 13-galactosidasa (UA/mL) medida en los extractos de músculo, hígado e intestino de dorada a lo largo de 60 días. (A) administración del preparado oral (PIENSO) conteniendo el plásmido pCMV β . (B) administración del mismo plásmido

mediante inyección intramuscular (IM). No se detectó actividad β -galactosidasa en ninguno de los controles".

Realización preferente de la invención

5

La realización de la invención se describe con más detalle mediante los ejemplos que se acompañan a continuación. Los ejemplos de realización preferida están orientados exclusivamente a proporcionar una descripción más completa de las realizaciones de la invención seleccionadas y no deberían ser consideradas como limitantes del alcance de la misma.

10

Cuando se describe la realización preferida de la presente invención, las especificaciones indicadas pueden describirla como una secuencia de pasos a seguir en un orden muy concreto. Sin embargo, considerando que la obtención del preparado no está limitado al orden particular de los pasos a seguir establecidos en este documento, su obtención debería de no limitarse a la secuencia particular que se describe. Es evidente que cualquier experto en la técnica apreciaría que es posible obtener un producto similar variando la secuencia de pasos, y por ello, el orden particular de los pasos a seguir descritos en la realización preferida de la invención no debe de interpretarse como una limitación de las reivindicaciones. Por lo tanto, la secuencia de pasos a seguir para la realización de la invención puede ser variada en el orden, pero aún así seguiría estando dentro del alcance de la presente invención.

15

20

Ejemplo 1: Protocolo de multiplicación de plásmidos y procedimiento para su encapsulación

25

El trabajo experimental se ha realizado con una construcción plasmídica que ha sido diseñada para expresar genes testigo en células de organismos eucariotas. Se ha utilizado el vector de expresión pCMV β (nº de acceso en GenBank: U02451). Esta construcción plasmídica es comercializada por Clontech Laboratories Inc (Clontech. 2013a), y es una versión modificada del plásmido precedente pCMV (MacGregor y Caskey, Construction of plasmids that express *E. coli* β -galactosidase in mammalian cells. Nucleic Acids Res., 1989, volumen 17, páginas 2365-2365).

30

El plásmido contiene el promotor del citomegalovirus humano (CMV), la señal de poliadenilación del virus SV40 de simios, un gen de resistencia a la ampicilina como marcador para la selección de las colonias transformadas con el plásmido, y un gen testigo *lac-Z* que se expresa utilizando la maquinaria molecular de las células de eucariotas y que codifica para la enzima β -galactosidasa.

35

40

1. Transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido modelo

El plásmido se utilizó para transformar por separado a la bacteria *E. coli* DH5 α , seleccionándose sólo las colonias transformadas mediante un medio de cultivo LB (Luria Bertani) que incluía ampicilina. A partir de una de las colonias transformadas se obtuvo un cultivo bacteriano en masa del que se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit comercial Qiagen Plamid Maxi (Sigma-Aldrich, Madrid, España), según las instrucciones propuestas por el fabricante. Una vez purificado se analizó la calidad e integridad del ADNp mediante la realización de electroforesis en gel de agarosa al 1%, comprobándose que la proporción de ADN en estado circular superenrollado (migración mayor en el gel) fuese más alta que la del resto de especies plasmídicas (circular o abierto, menor movilidad en el gel). La identificación de los ADNp en las bacterias transformadas y en los ADNp purificados se confirmó por PCR convencional. A continuación se describe con más detalle el procedimiento seguido en cada una de estas etapas.

45

50

Para la obtención de células competentes fue necesario preparar 6 mL de cultivo de *Escherichia coli* (*E. coli* DH5a) en un tubo inclinado con medio LB, que se mantuvo en agitación a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se inocularon 2 mL del cultivo en 50 mL de medio LB con MgSO₄ 10 mM (45 mL de medio LB y 5 mL MgSO₄), y se mantuvo el conjunto en agitación suave a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica (λ 600 nm) de 0,5, utilizando como blanco el propio medio de cultivo. El cultivo inicial se repartió a razón de 10 mL en tubos Falcon estériles de 15 mL que se mantuvieron en baño de hielo durante 10-15 min. Posteriormente, éstos se centrifugaron a 2.000 rpm y 4°C durante 10 min, descartándose el sobrenadante. Seguidamente se resuspendió el pellet celular en 3,2 mL de reactivo RF1 (6 g RbCl, 4,95 g MnCl₂*4H₂O, 1,47 g CH₃CO₂K, 0,75 g CaCl₂*2H₂O y 59,5 mL de glicerol en agua destilada hasta 500 mL), y se ajustó el conjunto con ácido acético 0,2 M hasta pH 5,8. A continuación se incubó la suspensión celular durante 15 min en baño de hielo. Posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, y se resuspendió el precipitado en 2 mL reactivo RF2 (mezcla 2 mL MOPS 0,5 M (ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico- ácido 4-morfolinopropanosulfónico), 0,12 g RbCl, 1,1 g CaCl₂*H₂O, 11,9 mL glicerol y 100 mL de agua destilada, que se ajustó con NaOH hasta alcanzar un pH de 6.8). La suspensión celular se enfrió en hielo durante 15 min. Los reactivos RF1 y RF2 fueron esterilizados por filtración (0,45 µm, Millipore, Madrid, España). Finalmente la suspensión de bacterias competentes fue distribuida en alícuotas de 100-200 µL, manteniendo las condiciones de frío, y éstas fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

La transformación de las células de *E. coli* competentes con los plásmidos se realizó en baño de hielo. Para ello se suspendieron 50 µL de la muestra de plásmido en 50 µL de tampón TE estéril (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5 M a pH 8), y se mantuvo la mezcla en baño de hielo. Seguidamente se añadieron 100 µL de la suspensión de células competentes previamente descongeladas. La mezcla se sometió a choque térmico manteniéndola 15 min en hielo, seguido de 3 min a 37°C y, finalmente de otros 5 min en hielo.

A continuación se añadieron a la mezcla 900 µL de LB, agitándose suavemente durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, se realizó una siembra de las células de *E. coli* DH5a en medio LB sólido con ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas con el plásmido. A las 24 horas se seleccionaron 12 colonias resistentes de cada uno de los cultivos de células transformadas con cada ADNp.

35

2. Confirmación de colonias transformadas mediante PCR

Las 12 colonias seleccionadas para cada plásmido fueron resembradas en placa de petri con medio LB suplementado con antibiótico dividiendo la placa en 12 cuadrículas iguales. La placa se incubó durante 24 h a 37°C para permitir el crecimiento de las bacterias. A partir de la colonia de cada cuadrícula se tomó una muestra con una punta de pipeta de 1 µL estéril, y se introdujo ésta en un tubo de PCR junto a 10 µL de agua ultrapura.

Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante PCR (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) siguiendo el protocolo estándar utilizado en el laboratorio. Las condiciones de los ciclos de PCR incluyeron una etapa de activación de 5 min, seguido de 36 ciclos de 1 min a 95°C, seguidos de 2 min 50°C y de 1 min a 72°C, con un paso de extensión final a 72°C durante 10 min. El proceso de amplificación finalizó a 4°C.

Para confirmar la presencia del plásmido pCMVβ (número de acceso en GenBank: U02451) en la colonias seleccionadas se utilizaron tres parejas de cebadores que amplifican mediante PCR tres regiones específicas del mismo de distinta longitud, cuyas secuencias se indican en el apartado SEQUENCE LISTING, y cuya denominación ha sido la siguiente:

Pareja 1, formada por el cebador F3237, cebador sentido, con el número SEQ ID NO 1 en el listado de secuencias adjunto, y por el cebador R3918, cebador antisentido, con el número SEQ ID NO 2 en el listado de secuencias. Esta pareja genera un producto de PCR de 682 pares de bases.

5

Pareja 2, formada por el cebador F5714, cebador sentido, con el número SEQ ID NO 3 en el listado de secuencias, y por el cebador R6959, cebador antisentido, con el número SEQ ID NO 4 en el listado de secuencias. Esta pareja genera un producto de PCR de 1346 pares de bases.

10

Pareja 3, formada por el cebador F729, cebador sentido, con el número SEQ ID NO 5 en el listado de secuencias, y por el cebador R2089, cebador antisentido, con el número SEQ ID NO 6 en el listado de secuencias. Esta pareja genera un producto de PCR de 1361 pares de bases.

15

La reacción PCR se realizó en tres lotes de 12 tubos para cada pareja de cebadores, correspondiendo cada uno de ellos a una de las colonias de bacterias seleccionadas después de la transformación con los ADNp. En el tubo se añadió 1 μ L de la suspensión bacteriana (muestra de la colonia bacteriana suspendida y agua ultrapura) y 14 μ L del premix para PCR. La concentración final para todos los componentes de la PCR en el volumen de reacción (25 μ L) fue de 10 nmol de cada dNTPs, 4 nmol de cada primer específico del plásmido, 20 ng/ μ L de extracto de ADN genómico, 0,5 unidades de *Taq* polimerasa Amplitaq Go *Taq* (GoTaqFiexi DNA polymerase, PROMEGA) y 5 μ L de tampón *Taq* pH 8,5 (5X Green GoTaqFiexi Buffer, Biomol, Madrid, España) y 2 mM de $MgCl_2$.

20

25

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1% [2 g de agarosa en 200 mL de tampón TBE (1X) y 5 μ L de SYBR GREEN (Biomol., Madrid, España)], y visualizados en un transiluminador ETXF (Vilber-Lourmat, Madrid, España) utilizando un filtro que proporciona una longitud de onda de 312 nm. En general, se aplicaron 7 μ L de los productos de PCR por pocillo.

30

3. Cultivo en masa de *E. coli* y purificación de ADN plasmídico

35

El medio de cultivo líquido utilizado para el cultivo en masa de las colonias de *E. coli* transformadas fue 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl (pH 7,2). Este medio se esterilizó a 121°C durante 20 min.

40

45

50

El primer día se introdujeron en un matraz 5 mL de medio de cultivo LB (estéril), 50 μ L de la suspensión de *E. coli* (en la que previamente se confirmó la presencia del ADNp mediante PCR) y 5 μ L de ampicilina (0,1 g/mL). El cultivo se mantuvo en agitación durante 24 h a 37°C. En el segundo día, se tomaron 5 mL del medio del cultivo del día anterior, y se pasaron a 45 ml de medio cultivo LB (estéril) con 45 μ L de ampicilina. El conjunto se mantuvo en agitación constante durante 24 h a 37°C. Al tercer día, se escaló el cultivo a un matraz Erlenmeyer de 1 L, incorporando los 50 ml de medio de cultivo con las bacterias activadas, en 750 ml de LB (estéril) con 750 μ L de ampicilina. Tras mantener el cultivo en agitación durante 24-48 h a 37°C, éste se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 min en frascos de 250 mL, eliminándose el sobrenadante, y recuperándose el pellet celular que fue congelado a 80°C hasta su uso. El cultivo se continuó hasta obtener una biomasa bacteriana fresca de aproximadamente unos 15-18 g, cantidad recomendada para la posterior purificación de ADNp.

La purificación del plásmido se realizó a partir de la biomasa bacteriana utilizando el Kit Gigaprep Gen Elute HP SelectPlasmid (Sigma-Aldrich, Madrid, España) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Así se partió de unos 15-18 g de biomasa bacteriana y se obtuvieron 50 ml de una solución acuosa que contenía el ADN plasmídico. Finalmente, la solución se repartió en alícuotas de 5 ml, y una vez congeladas a -80°C fueron liofilizadas.

5

4. Cuantificación e integridad del ADN plasmídico

Cada alícuota de material liofilizado fue resuspendido en 1 ml de agua ultrapura para proceder a la cuantificación del ADNp mediante el kit comercial DNA Quantitation Kit Fluorescence Assay (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ADN comercial (Sigma-Aldrich) en el rango de 3 a 1.000 µg/mL preparada en tampón Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM a pH 7,4. En los pocillos de una placa de 96 celdillas para lecturas de fluorimetría se aplicaron 200 µL de una solución de bis-benzamidina (2 µg/ml) preparada en tampón de fluorescencia (tampón Tris-HCl 100mM, EDTA 10 mM, NaCl 2M a pH 7,4) y 2 µL de las correspondientes diluciones seriadas del stock de ADN comercial. Las lecturas se realizaron en un fluorímetro (Fluoroskanascent, Thermo, Madrid, España) utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión 355 y 460 nm, respectivamente. A partir de los valores obtenidos se estableció la ecuación lineal que relaciona los valores de unidades de fluorescencia relativa con la concentración de ADN en las muestras problema.

Por otra parte, además de la confirmación y de la cuantificación, también la integridad del ADN purificado se evaluó mediante la separación electroforética en gel de agarosa al 1%. La proporción de ADNp en estado superenrollado (conservando su funcionalidad, es decir, su capacidad de transferir y expresar su información en células eucariotas), frente al plásmido abierto o lineal (inactivos), se evaluó basándose en sus diferencias de migración electroforética en geles de agarosa, de acuerdo con lo descrito en Tian *et al.* (Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int Immunopharm., 2008, volumen 8, páginas 900-908).

5. Métodos de encapsulación del ADN plasmídico

Se utilizaron dos procedimientos de encapsulación para obtener partículas con tamaños diferentes; nanopartículas y micro y macrocápsulas.

5.1. Encapsulación de ADNp en micro y macrocápsulas

Para la formación de las micro y macrocápsulas, se introdujeron en tubos Falcon estériles de 15 ml: 2 ml de H₂O estéril, 3 ml de alginato sódico al 3% (previamente calentado a 40°C para reducir su viscosidad) y 500 µL de la solución acuosa con el plásmido pCMVβ (450 mg ADN). A continuación, se homogenizó bien la mezcla y se mantuvo en un baño a 40°C hasta su uso. Esta solución se hizo pasar por un equipo encapsulador STARTUP (Encapbiosystem INC, Suiza), acoplado a una serie de boquillas las cuales permiten la extrusión de la solución gelificante a través de un orificio con un diámetro de 200 µm - 5 mm. Las gotas formadas se dispensaron en una solución gelificadora (CaCl₂ al 3% disuelto en H₂O destilada), en la cual se mantuvieron durante 30 min en agitación (220 rpm) con el fin de completar el proceso de gelificación.

50

La elaboración de cápsulas con cubierta de quitosano se realizó como se ha descrito anteriormente, salvo que en este caso la solución gelificadora contenía, además del cloruro cálcico, 1 mL de quitosano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 1%.

5.2. Encapsulación de ADNp en nanopartículas

El método se basa en la formación de nanocomplejos entre las moléculas de ADN y el quitosano debido a atracciones electrostáticas causadas por las diferencias de cargas entre ambas moléculas. Se elaboraron siguiendo el procedimiento descrito por Kumar *et al.*, Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates cacarifer*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. Fish Shellfish Immunol., 2008, volumen 25, páginas 47-56) con algunas modificaciones, partiendo de 500 μ L de sulfato sódico al 0,5% más 500 μ L de quitosano al 0,5% (p/v) y 100 μ L de la solución de plásmido pCMV β conteniendo 0,2 g ADNp/mL. La mezcla se homogenizó en un vórtex en agitación intensa durante 30 segundos, y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agitó nuevamente la suspensión en el vórtex. Finalmente, las nanopartículas se recuperaron por centrifugación durante 3 min a 12.000 g.

Una muestra de las nanopartículas fue metalizada y visualizada mediante microscopía electrónica de transmisión (SEM; Hitachi SV-3500N, Hitachi High-Tech, Japón) en el servicio de Microscopía Electrónica de los Servicios Centrales de Investigación de la UAL.

Resultados

1. Cuantificación e integridad del ADNp.

Inicialmente, se confirmó la presencia del plásmido pCMV β en una de las colonias de *E. coli* DH5 α mediante la aparición de los fragmentos amplificados utilizando las parejas de cebadores, especificadas anteriormente, en los productos de PCR (Fig. 1). La concentración de ADNp purificado se estimó realizando lecturas en el fluorímetro tras resuspender un vial liofilizado en 1 mL de agua purificada. A partir de la curva patrón realizada con ADN comercial se estimó la concentración de ADNp en los viales, situándose ésta entre 0,8-0,9 mg ADNp/vial. La integridad estructural del plásmido, determinada por la presencia de su forma superenrollada fue confirmada electroforéticamente (Fig. 2).

2. Encapsulación de las secuencias de ADN plasmídico

Los dos procedimientos de encapsulación permitieron obtener partículas capaces de retener eficientemente el ADNp (Fig. 3). El rendimiento de encapsulación fue muy alto (superior al 98%), y no se detectó ADNp en los medios líquidos en los que se prepararon ambos tipos de cápsulas (sobrenadantes). En particular, las nanocápsulas se mostraron muy estables, y sólo pudo recuperarse el ADNp de su interior cuando éstas fueron disgregadas con NaHCO₃. Además se comprobó que el proceso de encapsulación no redujo la proporción de ADNp en estado superenrollado.

Ejemplo 2: Evaluación de la estabilidad de las cápsulas y de los plásmidos de ADN en condiciones de hidrólisis gastrointestinal in vitro

1. Análisis de la estabilidad del ADNp desnudo frente al encapsulado a distintos valores de pH

La estabilidad del ADNp se analizó a pH ácido (2 y 4), neutro (7) y alcalino (9), con objeto de abarcar todo el rango de posibles valores de pH que los plásmidos podrían encontrar durante su tránsito por el tubo digestivo de peces con estómago.

- En el caso de las microcápsulas se utilizaron vasos de precipitados en los que se dispensaron 2,5 mL de tampón (glicina-HCl 0,1 M para pH 2 y 4; y Tris-HCl para pH 7 y 9). Se utilizaron en el estudio una muestra de ADNp desnudo, otra de material encapsulado en alginato cálcico y, una tercera de ADNp encapsulado en alginato cálcico y con cubierta de quitosano. En el caso del ADNp desnudo se adicionaron 180 μ L de la solución del plásmido pCMV β en cada vaso de precipitados, mientras que en el caso del material encapsulado, se sumergieron 50 cápsulas en cada una de las soluciones tamponadas a cada uno de los valores de pH ensayados, manteniéndose en agitación continua. A diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 min) se tomó una muestra 50 μ L de la solución que contenía el ADNp desnudo, o, en su caso, tres cápsulas que se dispusieron en tubos eppendorf. Las cápsulas fueron disgregadas con 300 μ L citrato sódico (0,1 M) y con la ayuda de un pistilo. La estabilidad del ADNp se analizó visualizando las muestras tras su separación electroforética en geles de agarosa.
- En el caso de las nanopartículas, el método fue similar al descrito para la obtención de cápsulas. En breve, la suspensión de nanopartículas se repartió en 12 tubos eppendorf a razón de 150 μ L/tubo, y éstos fueron centrifugados durante 3 min a 12.000 g. A continuación se retiró el sobrenadante, y se dispensaron 150 μ L de las distintas soluciones amortiguadoras ajustadas a valores de pH 2, 4, 7 y 9, siendo el conjunto agitado inicialmente con un vórtex, y mantenido posteriormente en agitación continua durante 90 min. A distintos tiempos de incubación (0, 10, 20, 30, 60 y 90 min) se tomaron muestras de cada tubo. Las muestras fueron centrifugadas y se retiró el sobrenadante. Al precipitado se le adicionaron 150 μ L de bicarbonato sódico 0,4 M, y se disgregaron las partículas con la ayuda de un pistilo. Las muestras se mantuvieron durante 24 horas a 4°C para completar el proceso de disgregación. Finalmente, se visualizó la integridad del ADNp en electroforesis en gel de agarosa.

2. Análisis de la integridad del ADNp mediante electroforesis.

- La integridad del ADNp se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Este porcentaje de agarosa permite una visualización de las distintas especies que conforman el ADNp (superenrollado, circular o lineal), sobre todo en las muestras de ADN encapsulado. En breve, se prepararon 0,4 g de agarosa en 50 mL de TBE mas 1,6 μ L de SYBR GREEN® (sustancia fluorescente que se une específicamente a la molécula de AON). En el primer pocillo se introdujo un marcador (3 μ L de agua milliQ y 5 μ L del marcador 1 kb), y en el resto de pocillos se aplicaron 5 μ L de muestra. Todas las muestras fueron mezcladas con 2 μ L de tampón de carga antes de ser aplicadas al gel de agarosa. Las electroforesis se desarrollaron a voltaje continuo de 90 V por el gel durante 45 min en una cubeta Labolan Max (Labolan, Madrid, España). La visualización de los geles se llevó a cabo en un transiluminador ETXF (Vilber-Lourmat, Madrid, España) utilizando un filtro de una longitud de onda de 312 nm.

Resultados

1. Análisis de la estabilidad del ADNp desnudo frente al encapsulado a distintos valores de pH.
- 1.1. Análisis de la estabilidad al pH del ADNp desnudo.
- La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos tras la incubación del plásmido en soluciones con distinto pH. El plásmido pCMV β se mostró sumamente inestable a pH 2, ya que a los 10 min desapareció todo el ADNp (plásmido superenrollado, circular y lineal). A pH 4 se evidenció una disminución progresiva de la banda correspondiente a la forma superenrollada a medida que avanzaba el tiempo de permanencia en ambiente ácido,

hecho que anula su funcionalidad. Los valores de pH neutro (7) y alcalino (9) no afectaron la movilidad electroforética del ADNp, como se comprueba al observar la fracción correspondiente al plásmido superenrollado, indicando una marcada estabilidad de la forma funcional del plásmido.

5

1.2. Análisis de la estabilidad al pH del ADNp en cápsulas de alginato cálcico

La Fig. 5 muestra que la encapsulación en alginato cálcico previene la degradación del ADNp en condiciones ácidas que tiene lugar cuando se utilizan plásmidos desnudos (Fig. 4). No obstante, la incubación de las cápsulas a pH 2 origina una reducción progresiva de la intensidad de la banda de plásmido en estado superenrollado, a la par que se observa un incremento en la de menor movilidad eléctrica (forma circular no funcional). Por el contrario, cuando las cápsulas se incubaron a pH 4, el plásmido no fue afectado tras 90 min de incubación. La incubación de las cápsulas a pH 7 y 9 no modificó la estructura superenrollada del ADNp.

10

15

1.3. Análisis de la estabilidad al pH del ADNp en nanopartículas de quitosano

Los resultados indicaron que las nanoesferas protegen a los plásmidos de los valores extremos de pH (Fig. 6). A pH 2 el efecto protector fue menor, sin embargo se pudieron recuperar las dos bandas del ADNp después 90 min. En las nanopartículas sometidas a pH 4 se recuperaron las dos bandas, aunque se redujo considerablemente la intensidad de las mismas. De igual forma, se apreció que parte del ADNp añadido a los pocillos no migró en el gel de agarosa, hecho que pone de manifiesto la enorme estabilidad de la interacción quitosano-ADNp en este tipo de nanopartículas.

20

25

Ejemplo 3: Elaboración del pienso que contiene ADNp y evaluación in vivo del mismo en ejemplares juveniles de dorada (*Sparus aurata*)

3.1. Elaboración del pienso y evaluación de la distribución del ADNp en los gránulos Con objeto de comprobar si la cantidad de ADNp incorporado a la masa de los gránulos de pienso mediante el procedimiento propuesto (descrito detalladamente en el apartado correspondiente), es superior a la cantidad incorporada mediante los procedimientos basados en la aplicación sobre la superficie de los gránulos de la solución de ADNp, se elaboraron gránulos de idéntica composición, pero siguiendo ambas estrategias.

30

35

Se preparó una masa de pienso compuesta por harina de pescado (60%), harina de soja desengrasada (20%), y harina de trigo (10%) como componentes principales, además de pequeñas cantidades de aceite de pescado, lecitina de soja, harina de calamar y complejo vitamínico y mineral. A la masa de pienso se le adicionaron volúmenes de una solución de nanocápsulas de quitosano conteniendo 1 mg/mL de ADNp (el mismo plásmido pCMV β utilizado en los anteriores ejemplos). La mezcla se homogeneizó en una amasadora semiindustrial, y a continuación, la masa se introdujo en una prensa granuladora (modelo 14-175, Amandus Kahl Ibérica, S.L., Madrid) para obtener unos gránulos de pienso de un diámetro de 0,8 cm. La concentración final de ADNp fue de 10 μ g de ADNp por g de pienso.

40

45

Con objeto de visualizar la homogeneidad de la distribución del ADNp incorporado mediante nanocápsulas a la masa del pienso, se preparó una pequeña cantidad de la misma (lote A) siguiendo el mismo procedimiento descrito, pero en este caso, el ADNp nanoencapsulado se tiñó previamente con SY8R Green®, un compuesto fluorescente que interacciona específicamente con la molécula de ADN, y que emite coloración verde cuando incide sobre él luz UV de λ 312 nm. A continuación, se elaboraron los gránulos de pienso según se ha indicado previamente.

50

A otra parte de la masa de ingredientes no se le adicionó ADNp durante la mezcla (lote B), sino que una vez formados los gránulos de pienso, éstos fueron sumergidos durante 5 min en una solución de ADNp (1 mg/mL) nanoencapsulado y previamente teñido con SYBR Green®. A continuación, se extrajeron los gránulos y se procedió a su secado en estufa a 37°C en oscuridad.

A continuación, se hizo incidir sobre ambos lotes (A y B) luz ultravioleta de λ 312 nm, con objeto de observar la posible emisión de fluorescencia.

3.2. Detección de la expresión de genes vehiculados en vectores de ADNp administrados por vía oral frente a intramuscular en ejemplares de dorada (*Sparus aurata*). Ensayo *in vivo*.

3.2.1. Animales e instalaciones

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones del acuario de investigación de la Universidad de Almería, centro de experimentación animal autorizado por la Consejería de Agricultura de la Junta de Andalucía. Se utilizaron 60 ejemplares de dorada (*Sparus aurata*), con un peso medio de 20 gramos. Los animales se adquirieron de una piscifactoría comercial de preengorde, y tras el correspondiente periodo de cuarentena se introdujeron en los tanques experimentales. Los peces se alimentaron 2 veces al día, con una ración de mantenimiento habitual basada en un pienso comercial, en una cantidad diaria equivalente al 2% de su peso vivo (0,4 g por pez y día). Tras un periodo de aclimatación de 15 días, se procedió al inicio de los ensayos.

3.1.2. Detección de la transferencia de ADN plasmídico a los tejidos animales mediante PCR.

Administración de los plásmidos a los peces

Un requisito imprescindible fue asegurar que cada pez recibía la misma cantidad de ADN plasmídico tanto por vía oral como parenteral. Se dispusieron tres grupos de peces: i) control, a los que no se les administró ADN exógeno; ii) administración intramuscular (i.m.) de ADNp desnudo, iii) administración oral de pienso conteniendo ADNp nanoencapsulado.

Para este estudio se tomaron 5 peces por cada uno de los lotes experimentales y tiempos de muestreo, para un total de 60 animales: 3 lotes experimentales x 4 tiempos (7, 15, 30 y 60 días) x 5 réplicas.

Se tuvo especial precaución en relación con la dosificación, de manera que a cada pez se le administró la misma cantidad de plásmido pCMV β en concreto 40 μ g de ADNp. Para la administración intramuscular se inyectaron 100 μ L de solución de NaCl 0,85% conteniendo 40 μ g de ADNp en una sola administración. En el caso de la vía oral, se ofreció a los peces el pienso experimental (conteniendo 100 μ g de ADNp por gramo) en una cantidad equivalente al 2% de la biomasa (0,4 g), de modo que cada pez ingirió 40 μ g de ADNp.

A partir de esta administración experimental, los animales recibieron pienso con la misma composición, pero sin ADNp incorporado, durante un periodo de 60 días, tomándose 5 peces de cada uno de los lotes experimentales a los 7, 15, 30 y 60 días de la administración de ADNp.

Toma de muestras

Tras el sacrificio de los peces se llevó a cabo un manejo extremadamente escrupuloso evitando la contaminación cruzada entre animales que recibieron plásmidos y los que no (controles). Se trabajó siempre empezando primero con los animales control. Se extrajeron muestras de músculo dorsal, intestino e hígado de todos los peces, y se introdujeron en nitrógeno líquido inmediatamente.

Extracción de ADN de los tejidos de los peces

El procedimiento de extracción se basó en la homogeneización de las muestras de tejidos previamente pulverizados en N líquido, y en el posterior uso del kit comercial *DNeasy Tissue Kit* (Quiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN extraído se determinó mediante separación electroforética en geles de agarosa del 0,8%, y su cuantificación se llevó a cabo espectrofotométricamente (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) midiendo la relación de absorbancias a 260 y 280 nm.

Amplificación de fragmentos de ADN plasmídico mediante PCR

El ADN extraído de los distintos tejidos se utilizó en reacciones de PCR con cebadores específicos para distintas zonas del plásmido pCMV β bajo las condiciones descritas en el Ejemplo de aplicación 1.

Para la identificación del plásmido pCMV β se resolvieron los productos de PCR mediante electroforesis de agarosa al 1% utilizando las parejas de cebadores indicadas en el apartado SEQUENCE LISTING, con los números SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 6. Simultáneamente se utilizó como control positivo de la PCR la amplificación de un fragmento del gen constitutivo de la 13-actina de dorada, utilizando una pareja de cebadores diseñados por nuestro laboratorio, cuyas secuencias se indican en el apartado SEQUENCE LISTING, y cuya denominación ha sido la siguiente:

Pareja actina, formada por el cebador β -actinF, cebador sentido, con el número SEQ ID NO 7 en el listado de secuencias adjunto, y por el cebador β -actinR, cebador antisentido, con el número SEQ ID NO 8 en el listado de secuencias. Esta pareja genera un producto de PCR de 1325 pares de bases.

Detección y cuantificación de la expresión del gen lacZ en tejido muscular

La posible expresión del gen testigo *lacZ* contenido en el plásmido pCMV β , supone la síntesis intracelular de la enzima bacteriana β -galactosidasa, cuya expresión puede medirse mediante un ensayo enzimático. Por tanto, la presencia de actividad β -galactosidasa en tejidos, de existir, tendría como única procedencia la expresión del gen *lacZ* bacteriano contenido en el vector de expresión pCMV β en las células de los peces. Es decir, su procedencia sería exógena, puesto que es una enzima bacteriana que no está presente constitucionalmente en los peces.

Esta actividad β -galactosidasa puede cuantificarse en los homogenados de los distintos tejidos estudiados de acuerdo con el procedimiento descrito por An *et al.* (Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells. Mol Cell Biol., 1982, volumen 2, páginas 1628-1632), utilizando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato, y midiendo espectrofotométricamente a λ 420 nm en microplacas la cantidad de *o*-nitrofenol liberado a partir del sustrato por acción de la enzima β -galactosidasa.

Resultados

Evaluación de la incorporación de ADNp a los gránulos de pienso

5 En la Figura 7 se pueden observar dos tipos de gránulos de pienso, uno de ellos con nanocápsulas de ADNp incorporadas en la masa antes de la granulación (A) y el otro tipo, con las mismas nanocápsulas incorporadas en su superficie tras inmersión del gránulo previamente fabricado en una solución de dichas nanocápsulas (B). Bajo luz natural (1) no es posible apreciar diferencia alguna. Sin embargo, una vez sometidos a
10 luz ultravioleta (2), puede observarse la emisión de fluorescencia procedente del ADNp encapsulado teñido con SYBR Green® en toda la masa de los gránulos A, pero únicamente en superficie en los gránulos B.

15 Cuando se obtienen unas láminas finas a partir de dichos gránulos (3), mediante cortes transversales, y se observan bajo luz ultravioleta (λ 312 nm), puede comprobarse la emisión de fluorescencia procedente del ADNp encapsulado teñido con SYBR Green® en la lámina A, pero únicamente en la superficie exterior de la lámina B.

20 Amplificación mediante PCR de fragmentos de ADNp presentes en los tejidos de los peces

Los resultados de la Fig. 8 muestran que en los peces control, que no recibieron ADNp por ninguna vía, no se detectaron fragmentos del plásmido pCMV β , en ninguno de los tejidos estudiados a la vista de la ausencia de productos de PCR cuando se emplearon
25 cebadores específicos. Por el contrario, sí se obtuvieron productos de PCR a partir de la amplificación del ADN de los homogenados de músculo, hígado e intestino cuando se empleó la primera pareja de cebadores (F3237/R3918, 682 pb, SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2) en todos los tiempos de muestreo (7, 15, 30 y 60 días) post-ingestión, cuando el ADNp se administró de forma oral a través del pienso con nanocápsulas (Fig. 9).

30 Estos resultados demuestran que ha existido una transferencia del ADN del plásmido pCMV β cuando se le administra a los peces de forma encapsulada en nanopartículas de quitosano y dentro de la masa del pienso a los diferentes tejidos de los peces. Otro hecho importante es que esta transferencia se ha prolongado en el tiempo hasta como mínimo
35 60 días. Esta persistencia de los plásmidos en el tiempo está dentro del rango observado en estudios anteriores, como el de Tian *et al.* (The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int Immunopharm., 2008, volumen 8, páginas 900-908) con microcapsulas de alginato y Tian
40 *et al.* (Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vet Immunol Immunopat., 2008, volumen 126, paginas 220-229) con microcapsulas de quitosano, dónde se verificó mediante RT-PCR una transferencia de ADNp hacia diferentes tejidos (agallas, intestino, bazo y riñón) de lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) a los 10 y 90 días después de su
45 administración oral.

50 Cuando el ADNp se administró sin encapsular y por vía parenteral (IM, Fig. 10), sólo se aprecian productos de PCR (682 pb) para la pareja de cebadores F3237/R3918 (SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, respectivamente) en el músculo en todos los tiempos de muestreo (7, 15, 30 y 60 días). Por el contrario no se observaron fragmentos de ADNp ni en el intestino ni en el hígado.

Este resultado parece en consonancia con el posible recorrido por la anatomía del pez del ADNp durante el proceso de migración de los plásmidos desde el punto de inyección

hasta el resto de tejidos. Así, parece razonable que en el tejido más próximo al punto de inyección la cantidad de ADNp residual sea mayor que en tejidos tan distantes como la mucosa intestinal e hígado.

- 5 Cuantificación en tejido muscular de la actividad β -galactosidasa resultado de la expresión del gen *lacZ* contenido en el plásmido pCMV β administrado por vía oral y parenteral.

10 En la Fig. 11 se muestra la actividad β -galactosidasa medida de los homogenados de músculo, intestino e hígado tanto de las doradas control como de los dos grupos a los que se les administró ADNp (pienso e IM), a diferentes tiempos de muestreo (7, 15, 30 y 60 días).

15 Los resultados indican que existió una mayor actividad β -galactosidasa en los extractos de músculo, intestino e hígado cuando el ADNp se administró de forma oral mediante pienso. Los valores de actividad fueron mayores en intestino e hígado respecto a músculo. Con respecto a la administración del ADNp en forma libre y mediante vía parenteral (IM), ésta fue menor respecto a la observada usando la vía oral, y se detectaron los mayores niveles de actividad en el músculo. La actividad β -galactosidasa
20 en los peces controles fue nula. Este resultado está en consonancia con la detección de fragmentos específicos de ADNp en los diferentes tejidos mediante PCR en los peces a las que se les administró el plásmido por cualquiera de las vías, mientras que estas secuencias no se detectaron en los peces control.

25 En estos ejemplos de aplicación se ha podido detectar la expresión de la enzima exógena β -galactosidasa después de la administración oral o intramuscular del gen testigo que codifica para esta enzima. Esta expresión es a largo plazo, hasta 60 días después de su administración. Estos resultados de persistencia en el músculo coinciden con los de Verri
30 *et al.* (Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene. Fish Shellfish Immunol., 2003, volumen 15, paginas 283-295), quienes también se observaron fenómenos de transferencia de hasta 60 días cuando este mismo vector de expresión fue inyectado intramuscularmente también en dorada. En otros trabajos en peces, se ha encontrado que la duración total de
35 expresión de proteínas exógenas codificadas por genes vehiculados en ADNp en tejidos varía desde menos de 1 semana (Rahman y Maclean, Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. Mol Mar Biol Biotechnol., 1992, volumen 1, páginas 286-289) a mas de 115 días (Anderson *et al.*, Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA Mol Mar Biol Biotechnol.,
40 1996, volumen 5, páginas 1 05-113) en función de la especie y del gen considerado, siempre usando la vía intramuscular.

Por consiguiente, se ha demostrado la expresión del gen testigo contenido en pCMV β para la actividad β -galactosidasa después de la administración tanto por vía oral como
45 parenteral en dorada. Por otro lado, estos resultados proponen la vehiculación y protección de ADNp encapsulado e incluido dentro de la masa del pienso para su administración oral, pudiendo ser una herramienta adecuada para la protección del mismo frente a las barreras gastrointestinales, asegurando su posterior liberación en los órganos diana. Por consiguiente, estos resultados indican la viabilidad de esta protección como vehículo para las vacunas de ADN en peces.

50

REIVINDICACIONES

1. Pienso vacunal o inmunoestimulante que comprende moléculas de ADN circular o no circular, bien de origen natural o recombinante.
- 5
2. Producto según la reivindicación 1 donde la molécula de ADN es un plásmido de ADN encapsulado en partículas de tamaño entre 10 nm y 10 μ m.
3. Producto según las reivindicaciones 1 y 2 en el que las partículas pueden ser nanopartículas de 10 a 1000 nm, micropartículas de 1 μ m a 1 mm, o macropartículas de 1 a 10 mm, de consistencia semisólida, de contenido homogéneo, y estables en soluciones acuosas.
- 10
4. Producto según las reivindicaciones 2 y 3 en el que las partículas están compuestas por moléculas de ADN copolimerizadas con alginato en concentraciones entre 0.2 y 4%, quitosano en concentraciones entre 0,01 y 3%, además de los siguientes compuestos: gelatina o ácido poliláctico-co-poliglicólico, ciclodextrinas, agar, carragenatos, almidón, goma guar y combinaciones de los mismos.
- 15
5. Pienso según las reivindicaciones anteriores, que incluye además del ADN atrapado en partículas, otros ingredientes alimenticios autorizados para su uso en animales.
- 20
6. Producto según la reivindicación anterior donde el pienso tiene forma de harina, de pellet o de partícula esférica, cilíndrica, de migaja, lamina o cinta.
- 25
7. Procedimiento para la elaboración de las partículas semisólidas descritas en las reivindicaciones 2 a 4 que comprende las siguientes etapas:
- a) mezcla de una solución de ADN con las soluciones de polímeros de uso alimentario descritas en la reivindicación 4 en una proporción de 1:5 a 1:10 en volumen,
- 30
- b) formación de las partículas esféricas a partir de la mezcla obtenida en la etapa a).
8. Procedimiento según la reivindicación 7 donde la etapa b) consiste en una agitación intensa, de la que se obtienen nanopartículas.
- 35
9. Procedimiento según la reivindicación 7 donde la etapa b) consiste en una pulverización sobre una solución gelificante de CaCl_2 en agitación constante a una concentración entre 0,5 y 5%, de la que se obtienen micropartículas.
- 40
10. Procedimiento según la reivindicación 7 donde la etapa b) consiste en un goteo sobre una solución gelificante de CaCl_2 en agitación constante a una concentración entre 0,5 y 5%, de la que se obtienen macropartículas.
- 45
11. Procedimiento para obtener el pienso de la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
- a) la mezcla homogénea de los ingredientes autorizados para alimentación animal.
- 50
- b) el acondicionamiento de la mezcla mediante la adición de agua caliente o vapor de agua.
- c) la agitación mecánica de la masa acondicionada,

d) la adición a la masa acondicionada de las partículas que contienen el ADN según las reivindicaciones 2 a 4.

5 e) la granulación simple de la mezcla obteniendo un pienso granulado de diámetro entre 0,2 y 10 mm que contiene una carga entre 10 y 100 µg ADN por g de pienso.

12. Procedimiento según la reivindicación 11 en el cual entre las etapas c) y d) se puede añadir una etapa de extrusión de la mezcla acondicionada que consiste en:

10 a) el paso de la mezcla a través de un tornillo extrusor a alta presión y temperatura, de la que se obtiene una masa húmeda de ingredientes alimenticios extrusionados.

15 b) la adición de agua caliente o vapor de agua a dicha mezcla extrusionada para mantener una humedad por encima del 50%, y una temperatura comprendida entre 45 y 95°C.

20 13. Procedimiento para obtener el producto según la reivindicación 1 por el cual al final de la etapa e) de la reivindicación 11 se añade una etapa para obtener los formatos finales del pienso descritos en la reivindicación 6 y que puede ir seguida o no de etapas adicionales de esferonización, secado o liofilizado.

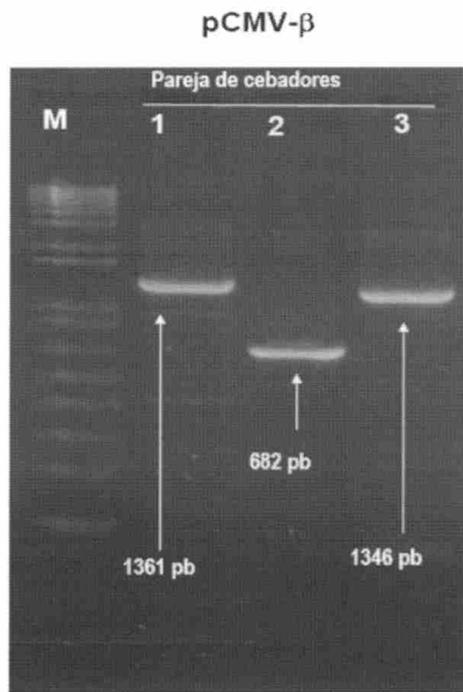


Figura 1



Figura 2

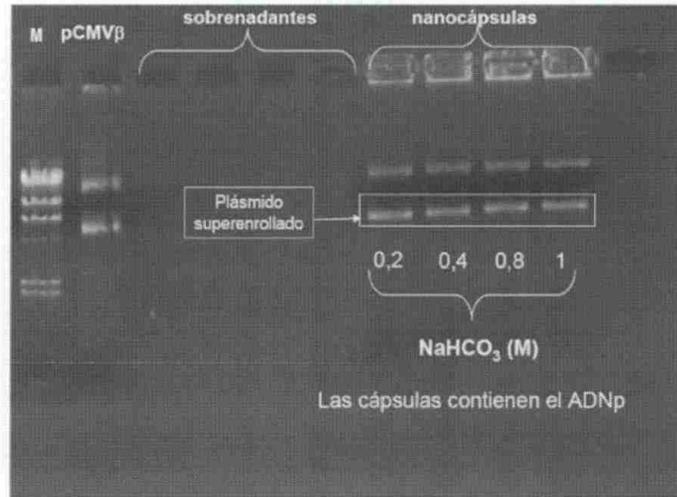


Figura 3

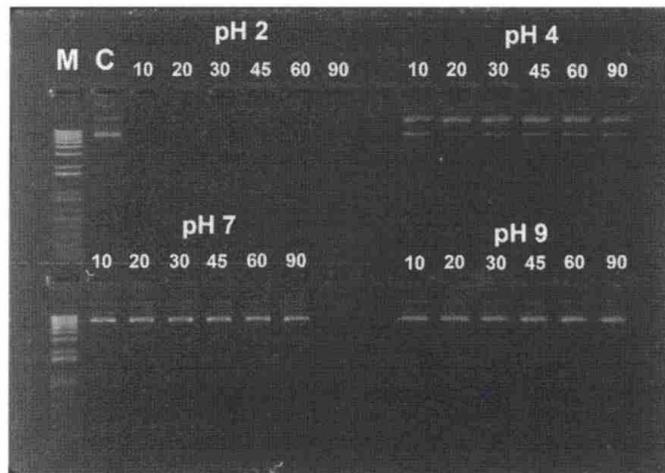


Figura 4

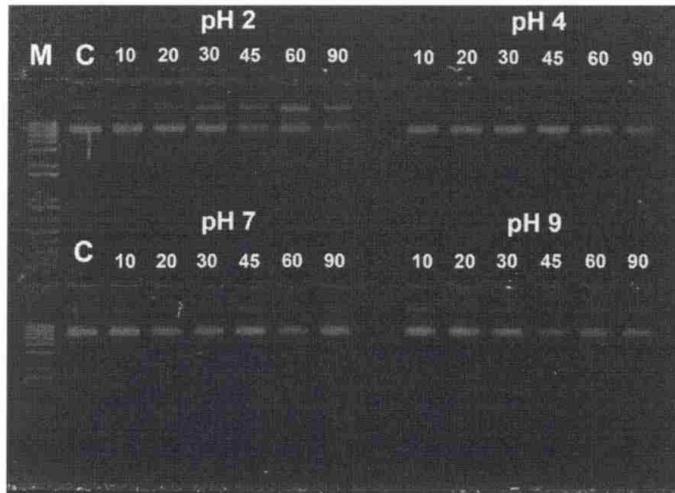


Figura 5

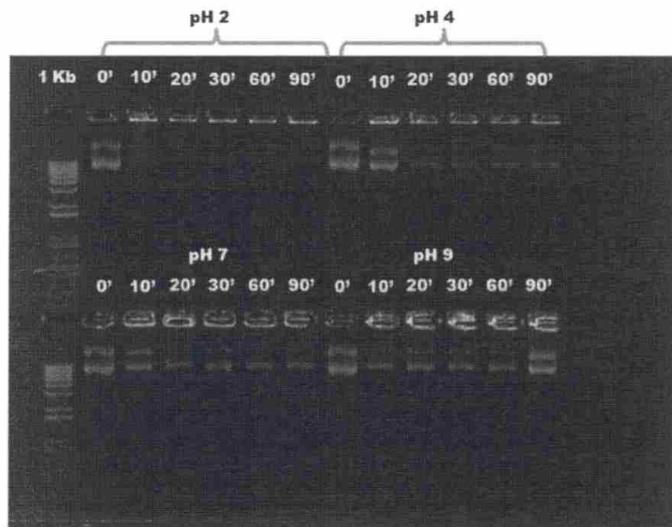


Figura 6

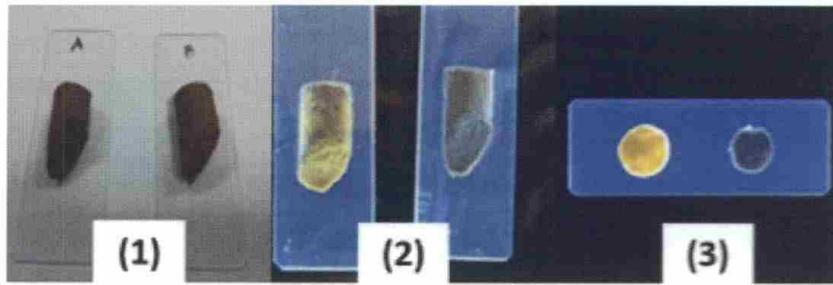


Figura 7

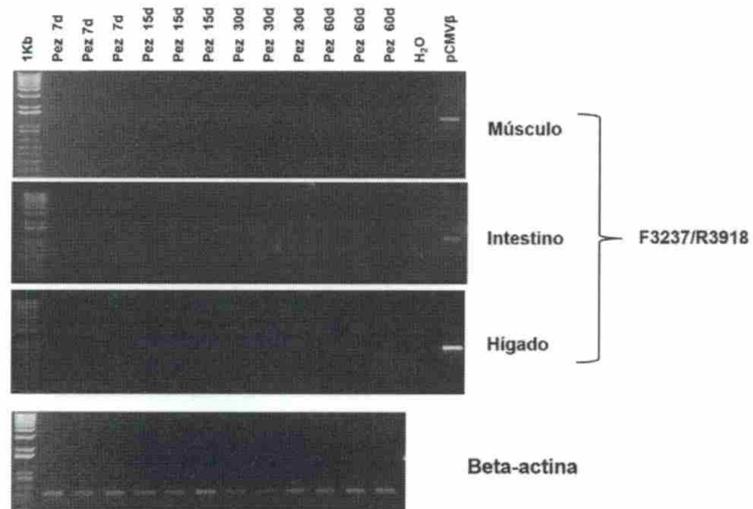


Figura 8

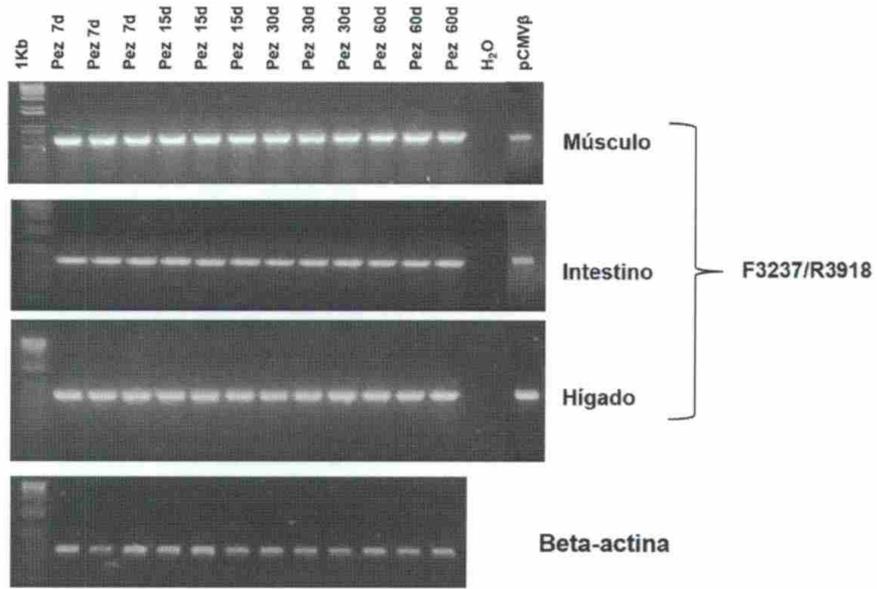


Figura 9

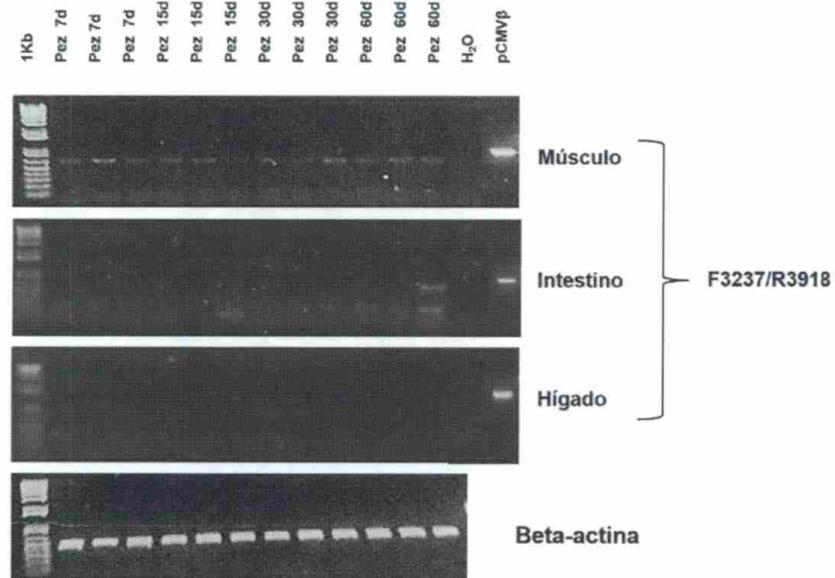


Figura 10

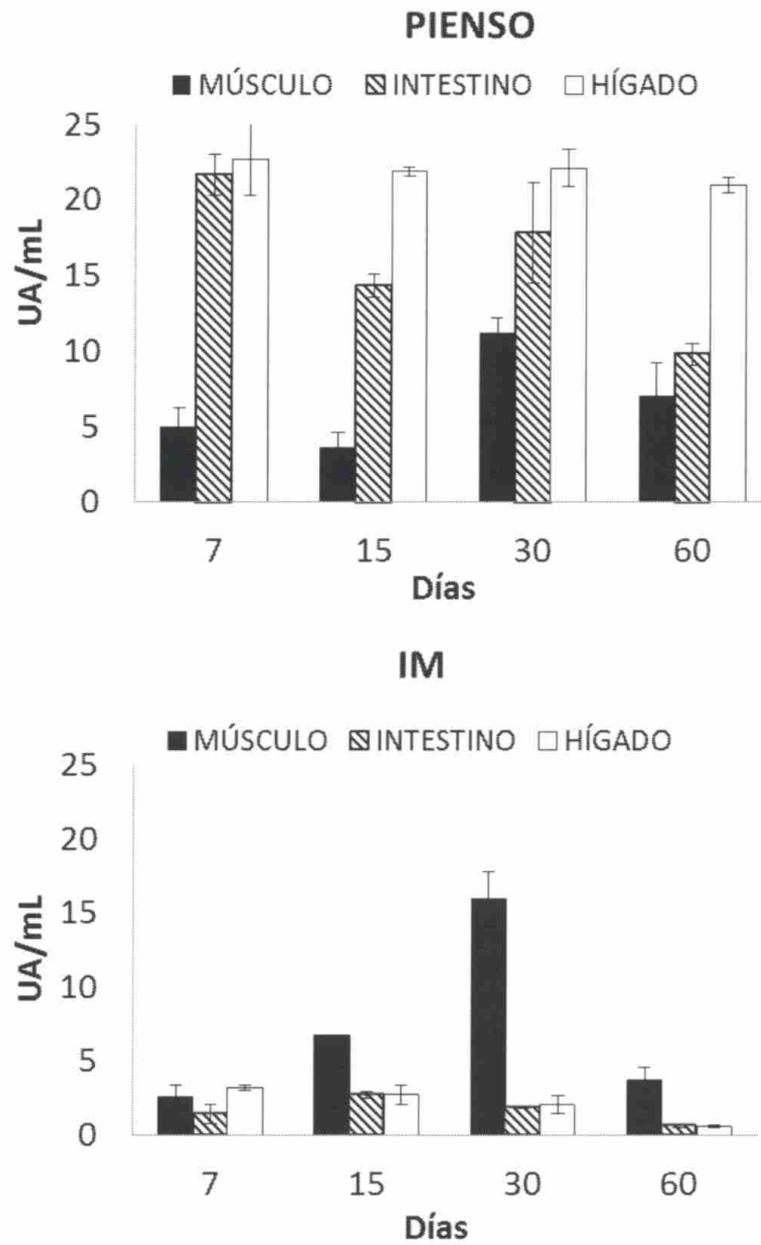


Figura 11

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad de Almería

<120> Preparado alimenticio para animales que protege, vehicula oralmente y mantiene la funcionalidad de moléculas de ADN con interés en producción y sanidad animal, así como el procedimiento para su obtención.

10 <140> 201600417
<141> 2016-05-30

<160> 8

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22

20 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> sense primer
<221> misc_feature

25 <222> (1)..(22)
<223> binds to pCMVB plasmid sense DNA strand (GenBank U02451)

<400> 1
aatgcttaat cagtgaggca cc 22

30

<210> 2
<211> 20
<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220> antisense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)

40 <223> binds to pCMVB plasmid antisense DNA strand (GenBank U02451)

<400> 2
cgcatatggt gcactctcag 20

45

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220> sense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)

ES 2 641 601 A1

<223> binds to pCMVB plasmid sense DNA strand (GenBank U02451)

<400> 3
ctttcacaga tgtggattgg 20

5

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
10 <213> Artificial Sequence

<220> antisense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
15 <223> binds to pCMVB plasmid antisense DNA strand (GenBank U02451)

<400> 4
ccatatggaa accgtcgata 20

20

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25

<220> sense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
30 <223> binds to pCMVB plasmid sense DNA strand (GenBank U02451)

<400> 5
caaagaactg ctctcagtg g 21

35

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40

<220> antisense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> binds to pCMVB plasmid antisense DNA strand (GenBank U02451)

45

<400> 6
ttctgcttca tcagcaggat a 21

50

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 641 601 A1

<220> sense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> binds to Sparus aurata beta actin sense DNA strand
5
<400> 7
acgacgcccc tcgtg 15

10 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220> antisense primer
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> binds to Sparus aurata beta actin antisense DNA strand

20 <400> 8
tcattcttc cctgttgca 20



21 N.º solicitud: 201600417

22 Fecha de presentación de la solicitud: 09.05.2016

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A23K20/153** (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Rajesh Kumar S et al. "POTENTIAL USE OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR ORAL DELIVERY OF DNA VACCINE IN ASIAN SEA BASS (LATES CALCARIFER) TO PROTECT FROM VIBRIO (LISTONELLA) ANGUILLARUM". FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, 20080701 ACADEMIC PRESS, LONDON, GB. Langston Anne; Bowden Timothy, 01/07/2008, Vol. 25, Nº 1-2, Páginas 47 - 56, ISSN 1050-4648, <DOI: doi:10.1016/j.fsi.2007.12.004>. apartados "preparation of chitosan-DNA (pVAOMP38) nanoparticles" y "preparation of fish feeds" apartados "preparation of chitosan-DNA (pVAOMP38) nanoparticles" y "preparation of fish feeds"	1-13
X	Ballesteros Natalia A et al. "FOOD PELLETS AS AN EFFECTIVE DELIVERY METHOD FOR A DNA VACCINE AGAINST INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS, WALBAUM)". Fish & Shellfish Immunology APR 2014. 31/03/2014, Vol. 37, Nº 2, Páginas 220-228, ISSN 1050-4648(print) ISSN 1095-9947(electronic). apartados "2.4.1. Vaccine and preparation of fish feed" y "2.4.2. Fish vaccination" apartados "2.4.1. Vaccine and preparation of fish feed" y "2.4.2. Fish vaccination"	1-6

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
30.10.2017

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/6



21 N.º solicitud: 201600417

22 Fecha de presentación de la solicitud: 09.05.2016

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: **A23K20/153** (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	de las Heras Ana I et al.. "IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE EFFECTS OF AN ORAL DNA VACCINE AGAINST INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN FISH". Fish & Shellfish Immunology APR 2010. 31/03/2010, Vol. 28, Nº 4, Páginas 562-570, ISSN 1050-4648, <DOI: doi:10.1016/j.fsi.2009.12.006>. apartado "2.2. Preparation of microspheres and the oral vaccine" apartado "2.2. Preparation of microspheres and the oral vaccine"	7-10
A	Siğirci M I et al. "EFFECT OF ALGINATE AND CHITOSAN ENCAPSULATION ON THE FATE OF BSA PROTEIN DELIVERED ORALLY TO GILTHEAD SEA BREAM (SPARUS AURATA)". Animal Feed Science and Technology, 20150916 Elsevier, AMSTERDAM, NL. 16/09/2015, Vol. 210, Páginas 114 - 124, ISSN 0377-8401, <DOI: doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.008>. "2.2. Optimization of encapsulation parameters. Encapsulation efficiency" "2.2. Optimization of encapsulation parameters. Encapsulation efficiency"	7-10
A	ES 2390428 A1 (UNIV ALMERIA et al.) 13/11/2012, ejemplo 1 y reivindicaciones 5-14	7-10
A	ES 550597 A0 (VALDERAS ARCONADA JULIO) 16/05/1987, todo el documento	11-13

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
30.10.2017

Examinador
M. d. García Coca

Página
2/6

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

A23K

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, ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE, XPESP y bases de datos de texto completo

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.10.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 7-13	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	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	Rajesh Kumar S et al. "POTENTIAL USE OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR ORAL DELIVERY OF DNA VACCINE IN ASIAN SEA BASS (LATES CALCARIFER) TO PROTECT FROM VIBRIO (LISTONELLA) ANGUILLARUM". FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, 20080701 ACADEMIC PRESS, LONDON, GB. Langston Anne; Bowden Timothy, Vol. 25, Nº 1-2, Páginas 47 - 56, ISSN 1050-4648, <DOI: doi:10.1016/j.fsi.2007.12.004>	01.07.2008
D02	Ballesteros Natalia A et al. "FOOD PELLETS AS AN EFFECTIVE DELIVERY METHOD FOR A DNA VACCINE AGAINST INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS, WALBAUM)". Fish & Shellfish Immunology APR 2014. Vol. 37, Nº 2, Páginas 220-228, ISSN 1050-4648(print) ISSN 1095-9947(electronic)	31.03.2014
D03	de las Heras Ana I et al.. "IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE EFFECTS OF AN ORAL DNA VACCINE AGAINST INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS IN FISH". Fish & Shellfish Immunology APR 2010. Vol. 28, Nº 4, Páginas 562-570, ISSN 1050-4648, <DOI: doi:10.1016/j.fsi.2009.12.006>	31.03.2010
D04	Sijez M I et al. "EFFECT OF ALGINATE AND CHITOSAN ENCAPSULATION ON THE FATE OF BSA PROTEIN DELIVERED ORALLY TO GILTHEAD SEA BREAM (SPARUS AURATA)". Animal Feed Science and Technology, 20150916 Elsevier, AMSTERDAM, NL. Vol. 210, Páginas 114 - 124, ISSN 0377-8401, <DOI: doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.008>	16.09.2015
D05	ES 2390428 A1 (UNIV ALMERIA et al.)	13.11.2012
D06	ES 550597 A0 (VALDERAS ARCONADA JULIO)	16.05.1987

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

El presente informe se ha realizado sobre la base de las reivindicaciones de la solicitud y teniendo en cuenta la descripción y los dibujos.

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)

El documento D01 divulga nanopartículas de quitosano que encapsulan plásmidos de DNA para la vacunación oral de peces. Las nanopartículas se utilizan para la elaboración de alimento para peces en forma de lámina o copo. En este documento también se divulga la preparación de las nanopartículas de quitosano y la preparación del alimento con dichas nanopartículas (ver apartados "Preparation of chitosan-DNA (pVAOMP38) nanoparticles" y "Preparation of fish feeds").

El documento D02 divulga vacunas de DNA incorporadas en el alimento de los animales (en concreto de peces). El DNA se encapsula en alginato y las cápsulas son incorporadas al pienso (ver apartados "2.4.1. Vaccine and preparation of fish feed" y "2.4.2. fish vaccination").

Dado que las características de las reivindicaciones 1-6 ya son conocidas de los documentos D01 y D02, dichas reivindicaciones no son nuevas a la vista del estado de la técnica conocido. En consecuencia, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-6 no es nuevo según el art. 6.1 LP, y no implica actividad inventiva según el art. 8.1 LP.

Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la invención.

Reivindicaciones 7-10

Como se ha comentado anteriormente, el documento D01 divulga la preparación de las nanopartículas de quitosano, que encapsulan plásmidos de DNA para la vacunación oral de animales, y la preparación del alimento conteniendo dichas nanopartículas. Para la preparación de las nanopartículas se prepara una solución de quitosano al 0.02%, una solución con el plásmido de DNA y una solución de sulfato sódico, que posteriormente se mezclan, y la mezcla resultante se somete a una agitación constante para la obtención de las nanopartículas (ver apartado "preparation of chitosan-DNA (pVAOMP38) nanoparticles").

La diferencia de lo divulgado en el documento D01 y el objeto de las reivindicaciones 7 y 8, son las proporciones de los distintos componentes, que aunque son similares, no son idénticas. A falta de un efecto técnico sorprendente asociado a las proporciones reivindicadas, se considera que son meras alternativas o modificaciones que un experto en la materia podría tener en cuenta a la hora de la elaboración de las nanopartículas. Por lo tanto, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 7 y 8 aunque se considera nuevo según el art. 6.1 LP, no implica actividad inventiva según el art. 8.1 LP.

Las reivindicaciones 9 y 10 se refieren al hecho de añadir CaCl_2 a una solución de polímeros alimentarios. El añadir CaCl_2 a un polímero como el alginato para la gelificación, es ampliamente conocido en la elaboración de micropartículas que encapsulen distintos tipos de moléculas, como DNA (ver documento D03, apartado "2.2. Preparation of microspheres and the oral vaccine"), proteínas (ver documento D04, apartado "2.2. Optimization of encapsulation parameters. Encapsulation efficiency") o incluso bacterias (ver documento D05, ejemplo 1 y reivindicaciones 5-14). Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 9 y 10 carecen de actividad inventiva a la vista de lo divulgado en el documento D01 y del conocimiento general común ilustrado por los documentos D03-D05.

Reivindicaciones 11-13

Como ya se ha comentado anteriormente, el documento D01 también divulga la preparación del alimento conteniendo nanopartículas. Para la elaboración del pienso vacunal, se mezclan los ingredientes alimentarios con agua hasta que se obtiene una masa a la que se añaden las nanopartículas ya preparadas. Una vez incorporadas a la masa, esta se calienta y se seca, y se somete a una o varias etapas para darle la forma de lámina o copo (ver apartado "Preparation of fish feeds").

La diferencia de lo divulgado en el documento D01 y el objeto de la invención son simples variaciones de los procedimientos ya conocidos en el estado de la técnica (ver documento D06), que un experto en la materia podría tener en cuenta a la hora de la elaboración de un pienso vacunal. Por lo tanto, el objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 11-13 aunque se considera nuevo según el art. 6.1 LP, no implica actividad inventiva según el art. 8.1 LP.

En consecuencia, se considera que la invención según se define en las reivindicaciones 1-13 no cumple los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.