



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 291 074**

② Número de solicitud: 200501542

⑤ Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.06.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2008**

Fecha de la concesión: **12.12.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.01.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

⑲ Titular/es: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES
Universidad de Extremadura

⑳ Inventor/es: **Pozo Pérez, David;**
Guerrero Montávez, Juan Miguel;
Fernández Montesinos, Rafael;
Herrera Cabello, Juan Luis;
Regodón Mena, Sergio y
Martín Palomino, Pedro

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Uso de la melatonina como adyuvante.**

㉓ Resumen:

Uso de la melatonina como adyuvante.

La presente invención se refiere al uso de la melatonina como adyuvante en preparados vacunales para la prevención de enfermedades infecciosas en mamíferos ungulados. También se refiere al uso de la melatonina en combinación con otros inmunoestimuladores, entre ellos, el hidróxido de aluminio.

ES 2 291 074 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de la melatonina como adyuvante.

5 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere al uso de la melatonina como adyuvante en preparados vacunales para la prevención de enfermedades infecciosas en mamíferos ungulados. También se refiere al uso de la melatonina en combinación con otros inmunoestimuladores, entre ellos, el hidróxido de aluminio.

10 **Estado de la técnica**

En los animales domésticos originarios de las zonas templadas se observa una estacionalidad reproductiva que depende principalmente de las variaciones de la duración del día (fotoperíodo); éstas representan el factor del medio ambiente más recurrente de un año a otro, y por tanto el más ventajoso como herramienta evolutiva. Otros factores del medio ambiente, como son la temperatura, alimentación, relaciones interindividuales, condiciones de cría -son considerados como secundarios y capaces de modificar, en condiciones particulares, la actividad reproductiva de los animales domésticos (Thiery, J. C. and B. Malpaux (2003). "Seasonal regulation of reproductive activity in sheep: modulation of access of sex steroids to the brain". *Ann N Y Acad Sci* **1007**: 169-75).

Dentro de las especies de "días cortos", cuya actividad sexual se sitúa durante los días decrecientes del año, los ovinos y los caprinos son los más sensibles al fotoperíodo, mientras que los porcinos manifiestan respuestas más ligeras a los cambios de la duración del día. Entre las especies de "días largos", como los bovinos y los equinos, estos últimos son más fotosensibles en cuanto a su reproducción (Pevet, P. (2003). "Melatonin: from seasonal to circadian signal". *J Neuroendocrinol* **15**(4): 422-6.).

La melatonina es una hormona secretada durante períodos de oscuridad que informa al animal sobre el fotoperíodo [Simonneaux, V. and C. Ribelayga (2003). "Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters". *Pharmacol Rev* **55**(2): 325-395]. De esta forma, la única aplicación hasta la fecha de la melatonina en producción animal consiste en implantes subcutáneos de la misma para adelantar la estación sexual en las ovejas y cabras, y aumentar la fecundidad. Con este tratamiento las ovejas reaccionan como si percibieran un día corto y, por consiguiente, el inicio de la actividad ovárica se adelanta (Malpaux, B., H. Tricoire, *et al.* (2002). "Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model". *Reprod Suppl* **59**: 167-79).

Por otro lado, el desarrollo de estudios sobre las propiedades inmunomoduladoras de la melatonina, determinan su uso no sólo como un modulador del fotoperíodo sino como un adyuvante en protocolos de vacunación. Así pues, el objeto de la presente invención se refiere al uso de la melatonina como adyuvante en preparados vacunales, teniendo repercusiones de carácter económico ya que permite una reducción en el número de dosis en los protocolos de vacunación. El efecto quedaría maximizado al usar de forma simultánea los tratamientos de vacunación junto con el de regulación del fotoperíodo.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de la melatonina como adyuvante en preparados vacunales para la prevención de enfermedades infecciosas producidas por bacterias del género *Dichelobacter* (en concreto, *Dichelobacter nodosus*) en mamíferos ungulados.

En los preparados vacunales de estos mamíferos, al administrar una dosis adecuada de melatonina, se observa unos títulos de anticuerpos especialmente elevados, indicando que la melatonina es un eficiente adyuvante, al mejorar notablemente las tasas de anticuerpos específicos contra los antígenos a los que va dirigido la vacuna. La efectividad es máxima cuando la dosis de melatonina está comprendida en un rango entre 1,5 y 30 mg.

En la actualidad la melatonina se administra en forma de implantes subcutáneos.

El implante se coloca durante 15-90 días aproximadamente en la oreja del animal, tras la primera inyección del preparado vacunal liberando progresivamente melatonina durante 3 ó 4 meses con tasas equiparables a las observadas durante la fase de secreción nocturna endógena con fines reproductivos.

La melatonina en presencia de otros inmunoestimuladores, tiene un efecto potenciador como adyuvante, en combinación con el hidróxido de aluminio.

Por tanto, la presente invención tiene por objeto el uso de la melatonina como coadyuvante en preparados vacunales en presencia de hidróxido de aluminio -no descartado su uso en presencia de otros inmunoestimuladores- debido al mecanismo de acción de la melatonina sobre el sistema inmune sin reacciones adversas. La ventaja es doble ya que podemos llegar a reducir las dosis de vacunas que los animales reciben -con el ahorro de costes que supone- y a la vez optimizar las funciones reproductivas de los mismos.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Composición de los grupos, cronograma de tareas por animal y temperatura rectal.

5 Figura 2.- Ensayo de microaglutinación y Ensayo ELISA.

10 Se representa A1 y C, que son los antígenos que se usan para determinar los anticuerpos específicos contra ellos frente a OD (Unidades de Absorbancia), que en definitiva miden la cantidad de anticuerpo específico frente al antígeno ensayado. A más anticuerpo, más reacción de coloración y por tanto más OD. Cada barra del histograma se corresponde con la composición de los grupos, descrita en la Figura 1, siendo AH: Hidróxido de Aluminio y MLT: Melatonina.

Modo de realización de la invención

15 En el presente modo de realización, se ha realizado un protocolo de vacunación contra la enfermedad del pedero (footrot) en ovejas merino. Se trata de una enfermedad de amplia distribución mundial con importantes repercusiones económicas en el rendimiento de las cabañas ovinas. Para dicha enfermedad existen vacunas comercializadas. En nuestro modo de realización usamos la vacuna desarrollada por la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura [Jimenez, R., S. Piriz, *et al.* (2003). "Aetiology of ovine footrot in the Portuguese region of Alto Alentejo". *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**(3): 118-20; Martin-Palomino, P., S. Piriz, *et al.* (2004). "Effectiveness of different adjuvants in stimulating *Dichelobacter nodosus* antibody in sheep vaccinated against ovine footrot". *Acta Vet Hung* **52**(3): 275-85].

20 Cuando administramos los preparados vacunales en presencia de melatonina observamos unos títulos de anticuerpos especialmente elevados (Figura 1), indicando que la melatonina es un eficiente adyuvante. Las medidas fueron realizadas tanto por la técnica de microaglutinación como por ELISA. Se tratan de dos técnicas rutinarias y se basan en la especificidad del anticuerpo por el antígeno. Sobre un soporte fijo se coloca una cantidad fija de antígeno que fija a la cantidad de anticuerpo que se añade y que procede del suero de los animales.

30 Las "parejas" antígeno:anticuerpo se ponen después de manifiesto mediante un ensayo colorimétrico (de aquí que a mayor cantidad de anticuerpo, mayor "color" y más OD.

35 Las mediciones de melatonina mediante ELISA en suero extraído de muestra de sangre a las 10 AM demuestran que los implantes de melatonina elevan las tasas de melatonina a los niveles nocturnos (185-300 pg/mL). Los animales no implantados con melatonina tienen unos niveles de 10-20 pg/mL, lo que en ambos casos es coherente con los estudios realizados hasta la fecha.

Se demuestra, por tanto, que la subida de anticuerpos se correlaciona con una subida de los niveles de melatonina.

40 Los estudios se llevaron a cabo entre febrero y junio de 2004 sobre un total de 60 animales distribuidos según la figura 1, siendo A1 y C los antígenos procedentes de la bacteria *Dichelobacter nodosus* que produce la enfermedad. MLT representa los grupos a los que se les implantó la melatonina. AH es el hidróxido de aluminio, un adyuvante ampliamente utilizado sobre el que la melatonina tiene efectos potenciadores.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de la melatonina como adyuvante, sola o en combinación con otros inmunoestimuladores, para la formulación de vacunas en la prevención de enfermedades infecciosas de mamíferos ungulados.

2. Uso de la melatonina como adyuvante, según reivindicación 1, **caracterizado** porque las enfermedades infecciosas son todas producidas por bacterias del género *Dichelobacter nodosus*.

10 3. Uso de la melatonina como adyuvante según reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque otros inmunoestimuladores, aunque no exclusivamente, son el hidróxido de aluminio.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 291 074 B1

Grupo	Composición					Dosis					Administración
I	Mock control					2 mL					subcutanea
II	(A1+C)+AH ^a +MLT					2 mL					subcutanea
III	(A1+C)+AH					2 mL					subcutanea
IV	(A1+C)+MLT					2 mL					subcutanea
V	(A1+C)					2 mL					subcutanea

Día	D.0	D.1	D.2	D.3	D.4	D.21	D.22	D.23	D.24	D.25	D.42-150
Extrac. Sangre	+					+					+
Serología	+					+					+
Vacunación	+					+					
T ^a Rectal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Reacción local	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Reacción general	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cojeras	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Diagnóstico Footrot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Grupo	D.0	D.1	D.2	D.3	D.4	D.21	D.22	D.23	D.24	D.25
T ^a rectal media										
I	39.3	39.4	39.5	39.5	39.3	39.2	39.2	39.2	39.2	39.2
II	39.4	39.6	39.8	39.6	39.5	39.3	39.3	39.5	39.3	39.2
III	39.4	39.7	39.8	39.6	39.4	39.2	39.3	39.4	39.3	39.2
IV	39.4	39.6	39.6	39.5	39.4	39.2	39.2	39.4	39.2	30.2
V	39.4	39.7	39.8	39.6	39.4	39.3	39.2	39.4	39.3	39.3

^aHidróxido de aluminio

Figura 1

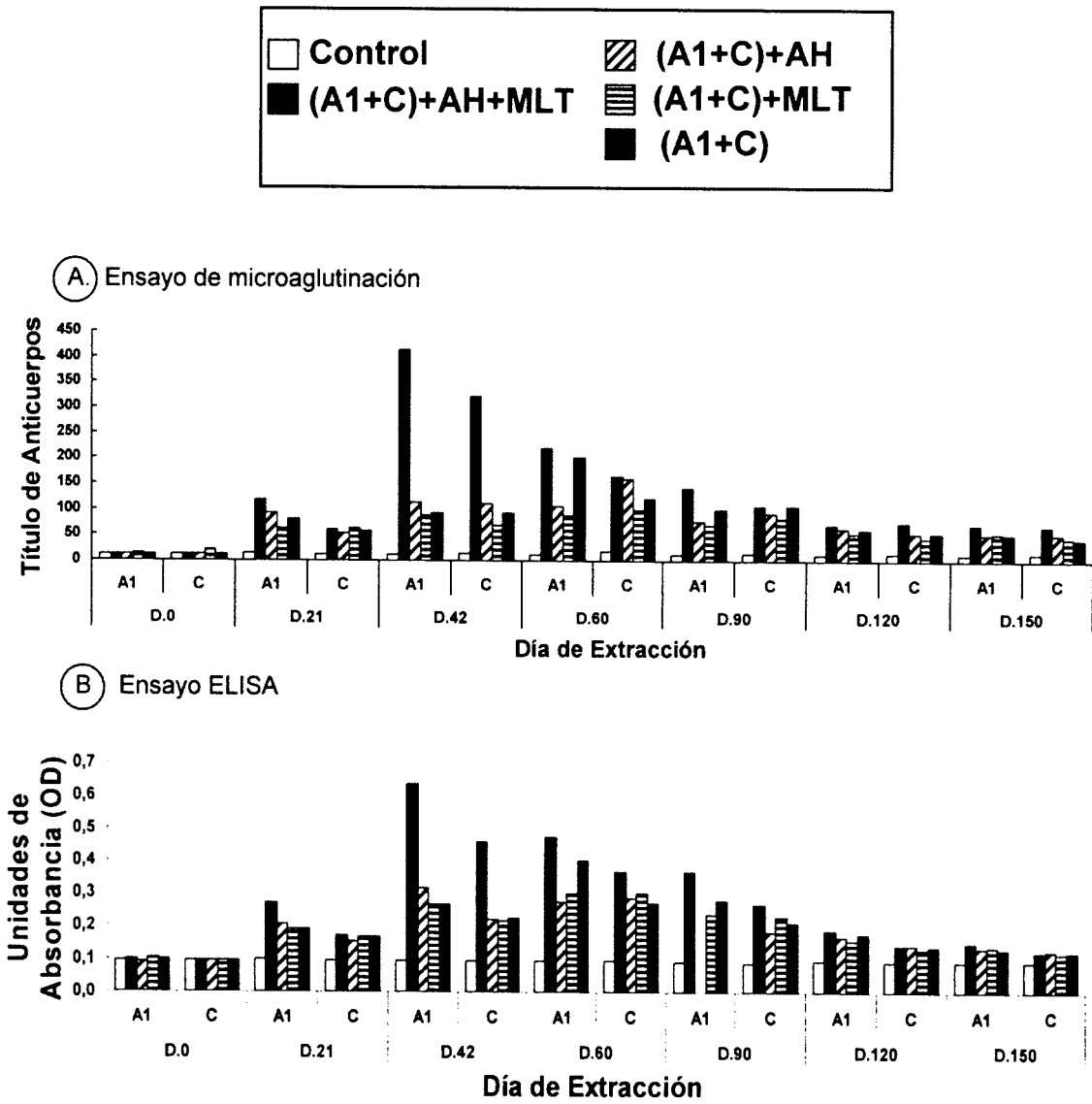


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 291 074

② Nº de solicitud: 200501542

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 39/39** (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PIERPAOLI, W., MAESTRONI, G. J. M. Melatonin: a principal neuroimmunoregulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. Immunology Letters. Diciembre 1987, Vol. 16, Nº 3-4, páginas 355-362. ISSN 0165-2478.	1-3
X	NELSON, R. J. Seasonal immune function and sickness responses. TRENDS in Immunology. Abril 2004, Vol. 25, Nº 4, páginas 187-192. ISSN 1471-4906.	1-3
A	MARTÍN-PALOMINO, P., PÍRIZ, S., JIMÉNEZ, R., SERRANO, F. J., VADILLO, S. Effectiveness of different adjuvants in stimulating Dichelobacter nodosus antibody in sheep vaccinated against ovine footrot. Acta Veterinaria Hungarica. 2004, Vol. 52, Nº 3, páginas 275-285. ISSN 0236-6290.	2,3

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 31.01.2008	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/1
---	--------------------------------------	----------------------