

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
21 de Diciembre de 2006 (21.12.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/134196 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000356

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de Junio de 2006 (16.06.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200501542 17 de Junio de 2005 (17.06.2005) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI-Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n, E-41012 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA** [ES/ES]; Edificio de Rectorado, Plaza de Caldereros s/n, E-10071 Cáceres (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **POZO PÉREZ, David** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani, s/n, E-41009 Sevilla (ES). **GUERRERO MONTÁVEZ, Juan, Miguel** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani, s/n, E-41009 Sevilla (ES). **FERNÁNDEZ MONTESINOS, Rafael** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani s/n, E-41009 Sevilla (ES). **HERRERA CABELLO, Juan, Luis** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica Médica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani s/n, E-41009 Sevilla (ES). **REGODÓN MENA, Sergio** [ES/ES]; Dpto. Medicina y Salud Animal, Facultad de Veterinaria, E-10071 Cáceres (ES). **MARTÍN PALOMINO, Pedro** [ES/ES]; Dpto.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF MELATONIN AS AN ADJUVANT

(54) Título: USO DE LA MELATONINA COMO ADYUVANTE

Grupo 2	Composición 3	Dosis 4	Administración 5
I	Mock control	2 mL	subcutanea
II	(A1+C)+AH ¹⁸ +MLT	2 mL	subcutanea
III	(A1+C)+AH	2 mL	subcutanea 6
IV	(A1+C)+MLT	2 mL	subcutanea
V	(A1+C)	2 mL	subcutanea

8 Día	D.0	D.1	D.2	D.3	D.4	D.21	D.22	D.23	D.24	D.25	D.42-150
9 Extrac. Sangre	+					+					+
10 Serología	+					+					+
11 Vacunación	+					+					
12 Tª Rectal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
13 Reacción local	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
14 Reacción general	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
15 Cojeras	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
16 Diagnóstico Footrot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Grupo	D.0	D.1	D.2	D.3	D.4	D.21	D.22	D.23	D.24	D.25
17 Tª 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

¹⁸ Hidróxido de aluminio

2 GROUP	11 VACCINATION
3 COMPOSITION	12 RECTAL TEMPERATURE
4 DOSE	13 LOCAL REACTION
5 ADMINISTRATION	14 GENERAL REACTION
6 SUBCUTANEOUS	15 LAMENESS
8 DAY	16 FOOTROT DIAGNOSIS
9 BLOOD EXTRACTION	17 AVERAGE RECTAL TEMPERATURE
10 SEROLOGY	18 ALUMINIUM HYDROXIDE

(57) Abstract: The invention relates to the use of melatonin as an adjuvant in vaccine preparations for the prevention of infectious diseases in ungulate mammals. The invention also relates to the use of melatonin together with other immunostimulators including aluminium hydroxide.

(57) Resumen: 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.

WO 2006/134196 A2



Microbiología, Facultad de Veterinaria, E-10071 Cáceres (ES).

(81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO

(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

Título

Uso de la melatonina como adyuvante

Objeto de la invención

5

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 (Thiery et al., 2002). 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 (Simonneaux and Ribelayga, 2003; Thiery and Malpaux, 2003).

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, 2003).

La melatonina es una hormona secretada durante períodos de oscuridad que informa al animal sobre el fotoperíodo (Simonneaux and Ribelayga, 2003). 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 (Malpaux et al., 2002). Con este tratamiento las ovejas reaccionan como si percibieran un día corto y, por consiguiente, el inicio de la actividad ovárica se adelanta (Malpaux et al., 2002; Thiery et al., 2002).

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.

10 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 o 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

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

10

A más anticuerpo, más reacción de coloración y por tanto más OD.

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 (Abbott and Lewis, 2005). En nuestro modo de
20 realización usamos la vacuna desarrollada por la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (Jiménez et al., 2003; Martín-Palomino et al., 2004).

Cuando administramos los preparados vacunales en presencia de melatonina observamos unos títulos de anticuerpos especialmente elevados (Figura 1),
25 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.

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
35 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 (Viguie et al., 1995).

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

5

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.

10

15

20

25

30

35

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.
- 10 2. Uso de la melatonina como adyuvante, según reivindicación 1,
 caracterizado porque las enfermedades infecciosas son todas producidas
 por bacterias del género *Dichelobacter nodosus*.
- 15 3. Uso de la melatonina como adyuvante, según reivindicaciones 1 a 2,
 caracterizado porque la dosis total de melatonina, está en un rango entre
 1,5 y 30 mg.
- 20 4. Uso de la melatonina como adyuvante, según reivindicaciones 1 a 3,
 caracterizado porque la dosis es administrada por implante subcutáneo
 durante un período que oscila entre 15 y 90 días.
5. Uso de la melatonina como adyuvante según reivindicaciones 1 a 4,
 caracterizado porque otros inmunoestimuladores, aunque no
 exclusivamente, son el hidróxido de aluminio.

25

30

35

Figuras

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

^a Hidróxido de aluminio

Figura 1

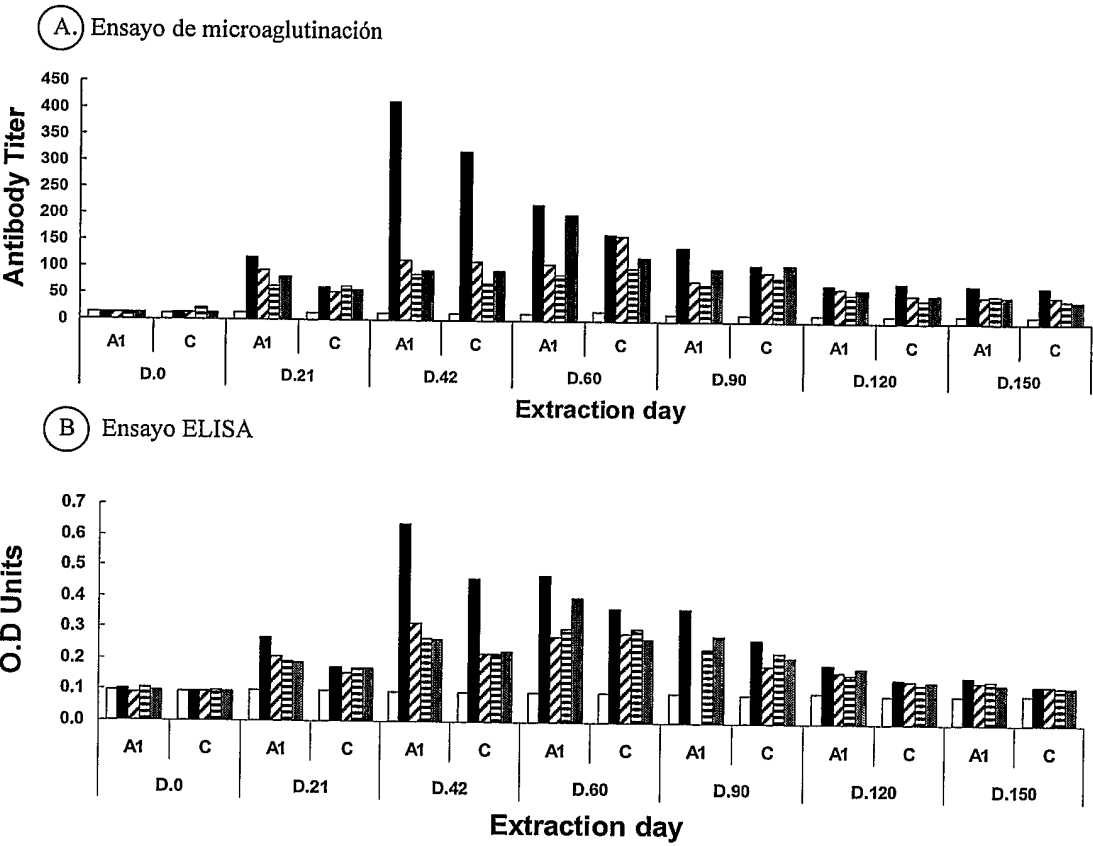


Figura 2