

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-512053

(P2004-512053A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl.⁷

A23K 1/00

A23K 1/16

A23K 1/18

F I

A23K 1/00

A23K 1/16

A23K 1/16

A23K 1/16

A23K 1/18

Z

301F

302B

303C

A

テーマコード (参考)

2B005

2B150

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2002-538766 (P2002-538766)
 (86) (22) 出願日 平成13年10月25日 (2001.10.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年4月30日 (2003.4.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/049654
 (87) 国際公開番号 W02002/035943
 (87) 国際公開日 平成14年5月10日 (2002.5.10)
 (31) 優先権主張番号 60/244, 504
 (32) 優先日 平成12年10月31日 (2000.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/253, 448
 (32) 優先日 平成12年11月28日 (2000.11.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/922, 660
 (32) 優先日 平成13年8月6日 (2001.8.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 590002611
 コルゲート・パーモリブ・カンパニー
 COLGATE-PALMOLIVE C
 OMPANY
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10022
 , ニューヨーク, パーク・アベニュー 3
 00
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペットフード組成物および方法

(57) 【要約】

コンパニオンペット用食餌であって、該ペットの通常の栄養所要量を満たし、前記コンパニオンペットの高齢期における精神能力の衰退開始を阻害するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる、前記食餌。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

成体ペットに関する通常の栄養所要量を満たすコンパニオンペット用食餌であって、前記コンパニオンペットの高齢期における精神能力の衰退開始を阻害するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる、前記食餌。

【請求項 2】

ペットがイヌである、請求項 1 に記載の食餌。

【請求項 3】

イヌが 1 ～ 6 歳である、請求項 2 に記載の食餌。

【請求項 4】

ペットがネコである、請求項 1 に記載の食餌。

【請求項 5】

ネコが 1 ～ 6 歳である、請求項 4 に記載の食餌。

【請求項 6】

ビタミン E が食餌の少なくとも約 100 ppm で存在する、請求項 1 に記載の食餌。

【請求項 7】

ビタミン C、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤が食餌中に存在する、請求項 6 に記載の食餌。

【請求項 8】

ビタミン C、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤が食餌中に存在する、請求項 1 に記載の食餌。 20

【請求項 9】

少なくとも約 50 ppm のビタミン C が食餌中にある、請求項 8 に記載の食餌。

【請求項 10】

少なくとも約 25 ppm の α -リポ酸が食餌中にある、請求項 8 に記載の食餌。

【請求項 11】

少なくとも約 50 ppm の L-カルニチンが食餌中に存在する、請求項 8 に記載の食餌。

【請求項 12】

高齢コンパニオンペットの精神能力の衰退開始の阻害方法であって、成体期にある前記ペットに、この阻害を達成するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる方法。 30

【請求項 13】

ペットがイヌである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

イヌが 1 ～ 6 歳である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ペットがネコである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

ネコが少なくとも 1 ～ 6 歳である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ビタミン E を、食餌で測定して少なくとも約 100 ppm でペットに与える、請求項 12 に記載の方法。 40

【請求項 18】

ビタミン C、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤をペットに与える、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

ビタミン C、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤をペットに与える、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも約 50 ppm のビタミン C が食餌中にある、請求項 19 に記載の方法。 50

【請求項 21】

少なくとも約 25 ppm の α -リポ酸が食餌中にある、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも約 50 ppm の L-カルニチンが食餌中に存在する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

成体ペットの通常の栄養所要量を満たすコンパニオンペット用食餌であって、該食餌中に少なくとも約 100 ppm のビタミン E、少なくとも約 50 ppm のビタミン C、少なくとも約 25 ppm の α -リポ酸および少なくとも約 50 ppm の L-カルニチンをさらに含んでなる、前記食餌。

10

【請求項 24】

成体ペットが 1～6 歳のイヌである、請求項 23 に記載の食餌。

【請求項 25】

成体ペットが 1～6 歳のネコである、請求項 23 に記載の食餌。

【請求項 26】

成体コンパニオンペットの精神能力の向上方法であって、該ペットに、前記ペットの精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる方法。

【請求項 27】

成体ペットの通常の栄養所要量を満たし、前記ペットの精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる、コンパニオンペット用食餌。

20

【請求項 28】

コンパニオンペットの高齢期における酸化的傷害に対する抵抗能の改善方法であって、成体期にある前記ペットに、栄養所要量を満たす食餌を与えることを含んでなり、前記食餌が少なくとも約 25 ppm のリポ酸を有し、そして前記食餌を少なくとも 1 カ月間与える、前記改善方法。

【請求項 29】

コンパニオンペットの高齢期における酸化的傷害に対する抵抗能の改善方法であって、高齢期にある前記ペットに、栄養所要量を満たす食餌を与えることを含んでなり、前記食餌が少なくとも約 25 ppm のリポ酸を有し、そして前記食餌を少なくとも 1 カ月間与える、前記改善方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

犬および猫などのコンパニオンアニマルは、高齢化により不具合を生じると考えられる。これら不具合のいくつかは、一般的な格言に示されている。これらの一つは、“老犬に新しい芸は教えられない”である。この格言は、犬は、高齢化するにつれ、精神能力および体力が低下すると考えられる、という観察に起因する。思考、学習および記憶に関連づけられる精神活動が減退すると考えられる (Cumming s B J, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW 1996: The canine as an animal model of aging and dementia; Neurobiology of aging 17: 259-268)。これに加えて、高齢動物では、精神能力の変化により行動変化が現れることがある。多くの原因として、この能力減退が特定されてきた。

40

【0002】

これらの能力損失は、高齢のイヌおよびネコで一般に観察されている。7 歳以上の犬および 7 歳以上のネコは高齢とみなされ、この不具合に直面している可能性がある。

【0003】

著しいレベルの少なくとも 1 種の酸化防止剤を、成体コンパニオンペットの食餌中に存在させるか、または食餌の他にペットに与えると、高齢コンパニオンペットの精神能力の衰

50

退開始を阻害し、および／または成体コンパニオンペットの精神能力を高齢期までさらに維持することができる。

発明の概要

本発明に従い、成体ペットの通常の栄養所要量を満たすコンパニオンペット用食餌であって、前記コンパニオンペットの高齢期における精神能力の衰退開始を阻害するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる食餌がある。

【0004】

本発明の他の観点は、高齢コンパニオンペットの精神能力の衰退の阻害方法であって、該方法は、成体期にある前記ペットに、この阻害を達成するのに足るレベルで酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる。

10

【0005】

さらに本発明に従い、成体コンパニオンペットの通常の栄養所要量を満たし、そしてビタミンE、ビタミンC、 α -リポ酸、L-カルニチンからなる群より選択される酸化防止剤およびその任意の混合物を、前記ペットの高齢期における精神能力の衰退を阻害するのに足る量でさらに含んでなる、コンパニオン成体ペット用食餌である。

【0006】

本発明のさらに他の観点は、高齢コンパニオンペットの精神能力の向上方法であって、該方法は、成体期にある該ペットに、精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる。

【0007】

本発明の他の観点は、成体コンパニオンペットの精神能力の向上方法であって、該ペットに、前記ペットの精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる方法である。

20

【0008】

これらの方法のすべてにおいて、酸化防止剤またはその混合物を、動物の食餌中に投与することが望ましい。

発明の詳細な説明

成体コンパニオンペット、例えばイヌおよびネコに与えられる食餌は、同年齢の動物に与えられる標準的普通食である。以下は、年齢1～6歳のイヌ用の典型的食餌である。

【0009】

30

【表1】

表1

成分	標的
タンパク質（乾燥物質の%）	23
脂肪（乾燥物質の%）	15
リン（乾燥物質の%）	0.6
ナトリウム（乾燥物質の%）	0.3

40

コンパニオン成体ペットの食餌に著しい量の酸化防止剤またはその混合物を加えると、高齢ペットにおいて、行動の明確な変化の開始、詳細には、問題解決能力によって具体的に示される精神能力の衰退の開始を遅らせることができる。成体という用語は、一般に少なくとも1～6歳のイヌおよび少なくとも1～6歳のネコを意味するものとする。高齢の犬または猫は、7歳以上である。

【0010】

イヌおよびネコに関する精神能力の損失は、何年もの間観察されてきた。この精神能力の

50

損失は、非常に多くの様式で発現する。例えばイヌの場合、見当識障害、屋内での粗相（house soiling）、変容した睡眠-覚醒パターン、ヒトおよび他のペットとの低下または変容した相互関係、ならびに学習および集中不能として発現することができる。これらの状態は、ネコでも同様に発現することができる。人で示されるようなアルツハイマー病は、イヌおよびネコではみられない。

【0011】

この精神能力の損失について、多くの理論が唱えられてきた。今までのところ、本発明者らは、この精神能力の損失を阻害するか、または客観的パラメーターにより測定される精神能力の肯定的変化を犬および猫に実際にもたらしることができる、食餌の作用経路を認識していない。

10

【0012】

本発明者らは、この衰退開始の遅延を達成することに成功している。本発明者らの発明の食餌を成体コンパニオンペットに用いることにより、高齢ペットの精神能力をより長期間維持できることを示すことができる。実質的に、精神能力の衰退は、停止または遅延させることができる。記憶および学習能を改善することができる。全体的な精神的敏捷性を高めることができる。年齢に関連する認知的衰弱を遅らせる。認知的機能不全症候群に関しては、その進行を高齢犬において遅らせることができ、この症候群による臨床徴候を制御することができる。適切な場合の予防と、これらの成分を必要とするペットが、標的グループ（target group）である。

【0013】

20

これを達成する食餌中成分は、酸化防止剤またはその混合物である。酸化防止剤は、フリーラジカルを失活させる材料である。そのような材料の例には、イチョウ、シトラスパルプ、ブドウの搾りかす、トマトの搾りかす、ニンジンおよびハウレンソウなどの食物（好ましくはすべて乾燥させたもの）、ならびに、β-カロテン、セレン、補酵素Q10（ユビキノン）、ルテイン、トコトリエノール、大豆イソフラボン、S-アデノシルメチオニン、グルタチオン、タウリン、N-アセチルシステイン、ビタミンE、ビタミンC、α-リポ酸、L-カルニチンなどのようなさまざまな他の材料が含まれる。ビタミンEは、トコフェロールまたはトコフェロールの混合物およびそのさまざまな誘導体、例えばビタミンEの酢酸エステル、コハク酸エステル、パルミチン酸エステルなどのようなエステルとして、投与することができる。α体が好ましいが、β、γおよびδ体が含まれてもよい。d体が好ましいが、ラセミ混合物は許容しうる。それらの形および誘導体は、ペットによって摂取された後、ビタミンE様の活動において作用することになる。ビタミンCは、この食餌中に、アスコルビン酸およびそのさまざまな誘導体として投与することができる、その誘導体は、例えばカルシウムリン酸塩、コレステリル（cholesterol）塩、2-モノホスフェートなどであり、ペットによって摂取された後、ビタミンC様の活動において作用することになる。それらは、液体、半固体、固体および熱安定形のような任意の形であることができる。α-リポ酸は、食餌中に、α-リポ酸またはそのリポエート（lipidate）誘導体（米国特許第5621117号にあるようなもの）、ラセミ混合物、塩、エステルもしくはアミドとして、投与することができる。L-カルニチンは、食餌中に投与することができ、カルニチンのさまざまな誘導体、例えば塩酸塩、フマル酸塩およびコハク酸塩のような塩ならびにアセチル化カルニチンなどを用いることができる。

30

40

【0014】

食餌中に投与する量を、すべて食餌の重量%（乾燥物質基準）で、遊離材料として測定される活性材料自体として算出する。使用する最大量により、毒性がもたらされるべきでない。少なくとも約100ppmまたは少なくとも約150ppmのビタミンEを用いることができる。約500~約1000ppmの好ましい範囲を使用することができる。必須ではないが、約2000ppmまたは約1500ppmの最大値を通常は超えない。ビタミンCについては、少なくとも約50ppm、望ましくは少なくとも約75ppmおよびより望ましくは少なくとも約100ppmを用いる。非毒性の最大値を使用することができる。α-リポ酸の量は、少なくとも約25、望ましくは少なくとも約50ppm、より

50

望ましくは約100ppmから変動させることができる。最大量は、約100ppm～600ppmから、ペットに対する非毒性が維持される量まで、変動させることができる。好ましい範囲は、約100ppm～約200ppmである。L-カルニチンの場合、イヌに関しては約50ppm、望ましくは約200ppm、より望ましくは約300ppmが有用な最小値である。ネコに関しては、約100ppm、200ppmおよび500ppmなど、わずかに高い最小値のL-カルニチンを使用することができる。非毒性最大量、例えば約5000ppm未満を使用することができる。イヌでは、より少ない量、例えば約5000ppm未満を使用することができる。イヌの場合、好ましい範囲は約200ppm～約400ppmである。ネコの場合、好ましい範囲は約400ppm～約600ppmである。

10

【0015】

約1～15ppmのβ-カロテンを使用することができる。
 約0.1～最高約5ppmのセレンを使用することができる。
 少なくとも約5ppmのルテインを使用することができる。

【0016】

少なくとも約25ppmのトコトリエノールを使用することができる。
 少なくとも約25ppmの補酵素Q10を使用することができる。
 少なくとも約50ppmのS-アデノシルメチオニンを使用することができる。

【0017】

少なくとも約1000ppmのタウリンを使用することができる。
 少なくとも約25ppmの大豆イソフラボンを用いることができる。
 少なくとも約50ppmのN-アセチルシステインを用いることができる。

20

【0018】

少なくとも約50ppmのグルタチオンを用いることができる。
 少なくとも50ppmのイチョウの抽出物を用いることができる。
 以下は、ORAC（酸素ラジカル吸収能力）含量の高い原料成分である。1%混在物として食餌に加えると（トウモロコシなどの低ORAC成分を合計5%置換するため）、食餌全体のORAC含量が増加し、これらの成分を含有する食餌を摂食した動物の血漿のORAC含量が増加した。好ましくは、1%で加えて他の4種の1%成分と組合わせて食餌への添加を合計5%にする場合、Trolox等価物の乾燥物質1gあたりのORAC含量が>25umolであるあらゆる成分を用いることができる。

30

ハウレンソウの搾りかす

トマトの搾りかす

シトラスパルプ

ブドウの搾りかす

ニンジンの顆粒

ブロッコリ

緑茶

イチョウ

トウモロコシグルテン穀粉

40

実施例1

2～4歳の成体ビーグル犬17匹（対照n=8、酸化防止剤強化n=9）を、無作為に対照群または強化食餌群においた。対照食餌は、59ppmのビタミンEおよび<32ppmのビタミンCを含有していた。試験食餌は、900ppmのビタミンEおよび121ppmのビタミンC、260ppmのL-カルニチンおよび135ppmのαリポ酸を有していた。その食餌を開始して約1カ月後、犬に与えた最初の問題解決課題はランドマーク識別学習課題（landmark discrimination learning task）であり、これは空間的注意の試験であった（Milgram et al., 1999 Milgram, N. W., Adams, B., Callahan, H., Head, E., Mackay, B., Thirlwell, C., & Cotman (1

50

999), C. W. Landmark Discrimination Learning in the Dog. Learning & Memory, 6: 54-61)。

【0019】

ランドマーク識別学習では、被験体が、ある目的物への接近度に基づき特定の目的物を選択することが求められる。しかしながら、初期学習は、犬の目的物識別課題の学習能に基づいている。われわれはこれまでに、識別学習に対する年齢の影響は、課題の難易度に依存することを見いだしている。

【0020】

ランドマーク0試験を学習させたとき、強化食餌の成犬は、対照食物の成犬より誤りが少なかった（対照群の平均＝31.1、強化群の平均＝15.1）。それらの成犬を、ランドマークがポジティブウェル（positive well）からさらに離れているランドマーク1および2の試験に進ませた。強化食餌の成犬は、対照の成犬に比べて、少ない誤りでランドマーク0～2を学習した（対照でのランドマーク0+1+2の平均誤り数＝132.9；強化食餌の犬でのランドマーク0+1+2の平均誤り数＝87.1）。 10

実施例2

この試験では、無作為な発生源の成犬を30匹使用した。犬は、試験開始前に、少なくとも10カ月齢であり、妊娠しておらず、授乳しておらず、適度な体重を有していた。動物を、食餌で処置するために、各群雄3匹および雌3匹で無作為に5群に分けた。

【0021】

すべての犬に、2週間の予備給餌期間中、American Association of Feed Control Officials (AAFCO 2000)により提唱されているすべての栄養勧告量を満たすかそれを超える対照食物（0ppmのdl-α-リポ酸を加えたもの）を与えた（表1）。予備給餌期間に続き、犬を、以下のdl-α-リポ酸標的混在率（乾燥物質基準）の一つを有する5処置群に無作為に分けた：0ppm、150ppm、1500ppm、3000ppm、4500ppm。すべての食餌、対照およびα-リポ酸において、ビタミンEを加えて600～1000国際単位のレベルで存在させ、ビタミンCを100～200ppmのレベルで加えた。 20

【0022】

試験食物は、水を除き唯一の栄養源であった。新鮮な水を適宜提供した。犬を選択して初期体重を測定した後、食物の予想MEに基づき、各犬について食物投与量を算出した。初期食物投与量の算出は、以下の式により算出されるような、標準活動度をもたらし因子により修正されている犬に関する維持エネルギー必要量（MER）に基づいていた： 30

$MER(kcal/日) = 1.6 \times RER(静止エネルギー必要量)$

式中、 $RER(kcal/日) = 70 \times 体重(kg)^{0.75}$

犬の体重を毎週測定し、最適体重を維持するのに十分な食物を与えるために、必要に応じて食物投与量を調整した。最適体重を、5点目盛りの3に決定した。犬の体重が初期体重の-10%以内に維持されなかった場合、食物投与量の調整後、その犬を試験から除外した。体重および食物摂取量の測定値をすべて記録した。

【0023】

試料を粉碎し、0.100±0.001gの試料を5.0mLのリン酸緩衝液（10mM Na_2HPO_4 、2mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.9% NaCl、pH 7.4）⁴中に2回抽出した。250μLの抽出物を、Teflonライニングを施した蓋付きの5mLのガラス製遠心分離管内に入れた。15μLのEDTA溶液（100mM EDTA、約1MのNaOHでpHを7.8に調整したもの）および50μLの新たに調製した5mM ジチオエリトリートル（DTE）を加えた。それらの溶液をボルテックスし、室温で5分間インキュベートした。その後、10μLの1M H_3PO_4 および2.0mLのジエチルエーテルを加えた。管の蓋を閉め、ボルテックスし、室温において1500×gで3分間遠心分離した。エーテル層を別個の5mLのガラス製遠心分離管に移し、水層を1.5mLのエーテルでさらに2回抽出した。同一試料からの抽出物 40 50

をすべて合わせた。その後、抽出物を、室温において水浴中の窒素蒸発器中で乾燥する。この時点で試料の蓋を閉め、一晚凍結させた。

【0024】

その後、乾燥した抽出物を解凍し、70 μ LのSDS/EDTA溶液(0.11%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、15mM EDTA、0.9% NaCl)および5 μ Lの新たに調製した1mM DTEで再構成した。その後、各管に、新たに調製したNaBH₄を50 μ L加えた。それらの管をボルテックスし、室温で10分間インキュベートした。10分後、試料を-70℃で凍結させた。溶液を解凍する前に、20 μ Lの2M HClを加えた。溶液を解凍した後、800 μ Lの100mM NH₄HCO₃を加えた。それらの溶液をボルテックスし、アセトニトリル中の100mM モノブロモビマン(momobromobimane)溶液(mBBR)を5 μ L加えた。その後、溶液を室温の遮光下で90分間インキュベートした。

【0025】

1. 5mLのジクロロメタンでの抽出によりインキュベートした後、過剰のmBBRおよびDTE誘導体を試料から除去した。水層をHPLCに付した。30%アセトニトリルと1%酢酸からなり約2MのNH₄OHでpH 3.95に調整した移動相を用い、これを流速1.0mL/分でポンプで送って1回の注入につき15分間のアイソクラチック溶出を行い、リポ酸を分離した。この調製では、押出された食物の密度が1g/mLに等しいと仮定している。

【0026】

全血球計算および血液生化学分析のために、試験の開始2週間前と、さらに試験の0、28、56、84、112、140および168日目に、血液を無菌で採取した。これに加えて、リンパ球を分離するために、食餌療法(dietary intervention)の0、28および84日目に15mLの全血を採取した。

【0027】

ヘパリン添加(heparinized)全血を50mLのAccuspin円錐形遠心分離管(Sigma Chemical)上に層状に入れ、等容量のリン酸緩衝食塩液(PBS)を加えた。試料を、700gで30分間、ブレーキを使用せずに遠心分離した。単球層を回収し、15mLの円錐形遠心分離管に移し、1~3mLのPB中に再懸濁させ、前記のように遠心分離した(第1の洗浄)。第2の洗浄を、第1の洗浄のように実施した。最後に、細胞を回収し、過塩素酸(10% w/v)中に懸濁させ、分析まで-70℃で凍結させた。

【0028】

試料を、-70℃の冷凍庫から、ドライアイスを入れた冷却器に移した。バイアルを、冷却遠心器中、1200rpmで5分間遠心分離した。グルタチオン(GSH)を分析するための上澄みの一部を、円錐形試験管に移した。

【0029】

酸可溶性抽出物の誘導体化は、Jones(Jones et al)により修正された、Reedおよび共同研究者(Fariss et al)の方法によっていた。

【0030】

簡潔にいうと、150 μ Lの抽出物または外部標準を1.5mLのエッペンドルフチューブ内に加え、続いて20 μ Lの γ -glu-glu内部標準を加え、50 μ LのIAAを加えた後、混合した。その溶液を、KOH-KHCO₃希釈標準溶液を用いて約10のpH(紫色)に調整した。溶液を、遮光下の室温で1時間インキュベートした。サンガー試薬を総容量と同容量で加え、その溶液を室温の遮光下で一晩(20時間)インキュベートした。

【0031】

インキュベートした後、溶液を12000rpmで5分間遠心分離し、上澄みを別の1.5mLのエッペンドルフチューブ内に移した。200 μ Lの上澄みを、300 μ Lの入口部を有する褐色オートバイアル内に加え、その上端にHPLC分析用クリンパーを取りつ

けた。

【0032】

溶媒および分離条件は、記載されているとおりであった (Fariss, Jones)。GSHおよびGSSGのレベルを、標準試料に関して定量した。γ-グルタミル-グルタメートを内部標準として用いて、誘導体化効率を評価した。

【0033】

ベースラインに対する臨床化学、血液学および体重の値の比較を、ウィンドウズ (登録商標) 版 SAS 上で有意性を $P < 0.05$ に設定して、対応のある t 検定 (paired t-test) として解析した。各測定時間の値の平均を、有意性を $P < 0.05$ に設定した一元配置 ANOVA により分離した。84日目とベースラインの GSH : GSSG の差を、有意性を $P < 0.05$ に設定したウィンドウズ (登録商標) 版 SAS での一元配置 ANOVA により、群間解析した。

結果

7回にわたる逐次アッセイ (0、28、56、84、112、140、168日目) で決定した食物中のリポ酸濃度 (ppm) は、期待されるアッセイ感度と、われわれの設備で典型的に生じる生成パラメーターの範囲内であった (表1)。

【0034】

食物摂取データに目立つ点はなかった。すべての群において大半の動物は、平均して、6カ月目に試験開始時より多くの食物を摂取した。4500 ppm 混在群で初期に若干の体重減少が起こったが、その変化は6カ月目の時点までに反転したと思われる点を除き、体重データに目立つ点はなかった。体調の評点は、この軽度の体重減少による影響を受けなかったと思われる。

【0035】

日常的な身体検査は、栄養に関連する異常または dl-α-リポ酸の毒性の証拠を示さなかった。試験母集団のすべての動物が、試験の経過全体の期間中、正常を維持した。試験の経過中に、一部の動物で嘔吐が時折観察されたが、嘔吐がリポ酸に帰因するという結論が導かれるような傾向は観察されなかった。最高混在群の動物1匹を、体重減少および白血球増加症のため、21日目に試験から除外した。この動物の白血球増加症は、試験終了時まで消退しなかった。これは、他のいくつかの疾患過程に帰因すると推測される。

【0036】

28、56、84、112、140および168日目の血清の生化学的値を同一群の犬に関する初期値と比較すると、いくつかの統計的な差が認められた。しかしながら、これらの値は実験室での参照範囲 (laboratory reference range) 内にあるかそれに非常に近く、数カ月にわたり一貫した傾向が認められたので、これらの差はすべて生物学的に重要でないと判断した。各期間における対照群と他の処置群との比較もいくつかの統計的差を示したが、これらの値は臨床検査室での参照範囲内にあるかそれに非常に近く、傾向が存在しなかったので、これらの差はすべて生物学的に重要でないと判断した。

【0037】

28、56、84、112、140および168日目の血液学的値を同一群の犬に関する初期値と比較すると、いくつかの統計的な差が認められた；しかしながら、これらの値は実験室での参照範囲内にあるかそれに非常に近く、傾向が存在しなかったので、これらの差はすべて生物学的に重要でないと判断した。各期間における対照群と他の処置群との比較は、いくつかの統計的差を示したが；しかしながら、これらの値は臨床検査室での参照範囲内にあるかそれに非常に近く、傾向が存在しなかったので、これらの差はすべて生物学的に重要でないと判断した。

GSH : GSSG 比

84日間にわたる給餌での GSH : GSSG 比の変化は、すべての補強群で比が増大し、食餌による著しい全体的作用を示していた ($P = 0.024$) (表2)。ANOVA では、最低および最高混在群に関し基礎食物群と比較しての有意差が示されたが、もっとも大

10

20

30

40

50

きな数値的増加は、最低混在レベルにおいてであった。すなわち、最高および最低混在群に関するG S H : G S S G比の変化は、この同一期間中に基礎食物群で観察された変化と有意に異なっていた。84日目の4点に関する比は、これらの試料のすべて（対照群で1匹、処置群で3匹）でG S S Gが検出されなかったため、決定することができなかった。したがって、補強群に関する値は、アッセイの感度が十分に高く、84日目の低レベルのG S S Gを検出できていたならば、さらに高いG S H : G S S G比を示していた可能性がある。

【0038】

【表2】

表 1

10

混在率 (ppm)	平均	標準偏差	標的 パーセンテージ
0	24	17	NA
150	151	13	101
1500	1471	113	98
3000	2869	250	96
4500	4176	642	93

20

【0039】

【表3】

表 2

押出された食物中の dl- α -リポ酸を消費する犬における
0 日～84 日目の平均 GSH:GSSG 比の変化

混在率	ベースライン食物と比較しての 0 日～84 日目の GSH:GSSG 比の 差	N	P 値
0ppm	-9.2 $\pm$ 26	5*	NA
150ppm	70 $\pm$ 20	6	0.003
1500ppm	24 $\pm$ 7	6	0.16
3000ppm	10 $\pm$ 4	4*	0.46
4500ppm	50 $\pm$ 36	4*	0.03

*対照群および 4500ppm 群では、犬 1 匹が 84 日目に検出可能な GSSG を有しておらず、
3000ppm 群では、犬 2 匹が 84 日目に検出可能な GSSG を有していなかった。

α リポ酸に関し、さらに観察を適用することができる。食餌中の α リポ酸の長期給餌は、安全かつ有効である。還元型グルタチオン (GSH) 対酸化型グルタチオン (GSSG) の比が向上する。食餌中の α リポ酸の長期投与は、最低 1、2、3、4、5 または 6 カ月間から、1、2、3、4、5 年間または動物の一生涯を含むさらに長期間までであることができる。 α リポ酸は、食餌中でカプセル化など特別な保護をしなくても機能し、医薬に用いられるような単位剤形、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤などの状態で食餌中に存在する必要はない。リポ酸は、食餌中に、食餌の最低約 25、50、75 または 100 ppm で提供される。最高範囲はその毒性レベルをほんの少し下回り、食餌の約 400、300 または 200 ppm と幅広い。一般に、1 日あたり約 6 または 7 mg / 動物の体重 1 kg を超えることはなく、より一般には約 5 mg / kg を超えない。 α リポ酸は、酸化的傷害に対する動物の抵抗能を改善するほか、酸化防止剤の防御能力を改善する。このすべては、適量存在する他の酸化防止剤、例えばビタミン E およびビタミン C と共にもたらされる。このことは、 α リポ酸の作用が、ビタミン C および / またはビタミン E の作用を超えることを実証している。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/35943 A2

(51) International Patent Classification: A23K 1/16, 1/18

(74) Agents: RARANCJK, Martin, R., Colgate-Palmolive
Company, 909 River Road, P.O. Box 1343, Piscataway, NJ
08855-1343 (US).

(21) International Application Number: PCT/US91/09654

(22) International Filing Date: 25 October 2001 (25.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/244,501 31 October 2000 (31.10.2000) US
60/252,448 28 November 2000 (28.11.2000) US
09/072,660 6 August 2001 (06.08.2001) US
09/078,132 16 October 2001 (16.10.2001) US(81) Designated States (traditional): AE, AG, AI, AM, AU, AT,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KH, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).(71) Applicant (for all designated States except US): COL-
GATE-PALMOLIVE COMPANY [US/US], 300 Park
Avenue, New York, NY 10022 (US).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ZICKER, Steven,
Curtis J., 214 Tanglewood Drive, Lawrence, KS 66049
(US); WEDEKIND, Karen, J. J., 197 N. Palmberg, Meri-
den, KS 66512 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/35943 A2

(54) Title: COMPOSITION AND METHOD

(57) Abstract: A companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements of the pet and further comprising a sufficient amount of an antioxidant or mixture thereof to inhibit the onset of deterioration of the mental capacity of said companion pet in its aged years.

WO 02/35943

PCT/US01/49654

COMPOSITION AND METHOD**Background of the Invention**

5

Companion animals such as dogs and cats seem to suffer from aging problems. Some of these are manifested in commonplace sayings. One of these is "You can't teach an old dog new tricks". This saying arises from the observation that as dogs age, their mental capacity seems to diminish as well as physical abilities. Mental activities associated with thinking learning and memory seem to be lessened (Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW 1996: The canine as an animal model of aging and dementia; Neurobiology of aging 17:259-268). Additionally, behavioral change can be manifested in the aging animals in association with the changing mental capacity. Many causes have been assigned to this lessening of capacity.

10

15

These losses in capacity are generally observed in aged canines and felines. Dogs of seven years or older and felines of seven years or older are considered aged and can experience this problem.

20

The presence of significant levels of at least one antioxidant in the diet of an adult companion pet or fed to a pet outside his diet can inhibit the onset of deterioration of the mental capacity of the aged companion pet and/or maintain the mental capacity of the adult companion pet further into the aged years.

25

Summary of the Invention

30

WO 02/35943

PCT/US01/49654

In accordance with the invention, there is a companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements of an adult pet and further comprising a sufficient amount of an antioxidant or mixture thereof to inhibit the onset of deterioration of the mental capacity of said companion pet in its aged years.

A further aspect of the invention is a method for inhibiting the deterioration of the mental capacity of an aged companion pet, which comprises feeding said pet in his adult years an antioxidant or mixture thereof at sufficient levels to accomplish this inhibition.

In further accordance with the invention is a companion adult pet diet meeting ordinary nutritional requirements of an adult companion pet and further comprising an antioxidant selected from the group consisting of Vitamin E, vitamin C, alpha-lipoic acid, L-carnitine and any mixtures thereof in quantities sufficient to inhibit the deterioration of the mental capacity of said pet in its aged years.

A still further aspect of the invention is a method for increasing the mental capacity of an aged companion pet, which comprises feeding the pet in its adult years an amount of an antioxidant or mixture thereof sufficient to increase the mental capacity.

Another aspect of the invention is a method for increasing the mental capacity of an adult companion pet which comprises feeding the pet an amount of an antioxidant or mixture thereof sufficient to increase the mental capacity of said pet.

In all of these methods, it is desirable to administer the antioxidant or mixture thereof in the diet of the animal.

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Detailed Description of the Invention

The diet fed to the adult companion pet, for example canine and feline is the standard normal diet fed to an animal of that age. Below is a typical diet for a canine of 1 to 6 years of age.

Table 1

Component	Target
Protein (% of dry matter)	23
Fat (% of dry matter)	15
Phosphorous (% of dry matter)	0.6
Sodium (% of dry matter)	0.3

Adding significant quantities of an antioxidant or mixture thereof to the companion adult pet diet can bring about delay of the onset of demonstrative changes in the behavior, particularly the deterioration of mental capacity, as specifically shown by problem-solving capacity, in an aged pet. The term, adult, is intended to mean, in general, a canine of at least 1 to 6 years and a feline of at least 1 to 6 years. An aged dog or cat is 7 years and above.

The loss of mental capacity for canines and felines has been observed for a number of years. This loss of mental capacity is manifested in numerous ways. For a canine, for example, it can be manifested as disorientation, house soiling, altered sleep-wake patterns, decreased or altered interaction with humans and other pets, and inability to learn and concentrate. These conditions can be manifested in felines as well. Alzheimer's, as exhibited in man, is not found in canines and felines.

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Many theories have been advanced for this loss in mental capacity. To date, the inventors are unaware of any dietary course of action, which inhibits this loss of mental capacity or can actually bring about a positive change in mental capacity as measured by an objective parameter in dogs and cats.

The inventors have succeeded in accomplishing delaying the onset of this deterioration. By using the diet of their invention in adult companion pets it can be shown that aged pets mental capacity can be maintained for a longer period of time. Essentially the deterioration of mental capacity can be stopped or delayed. Memory and learning ability can be improved. Overall mental alertness can be enhanced. Age related cognitive decline could be slowed. With respect to Cognitive Dysfunction Syndrome its progress can be slowed in aged dogs and clinical signs associated with this Syndrome can be controlled. Prophylaxis where appropriate and pets in need of these components are the target group.

The component in the diet, which accomplishes this is an antioxidant or mixture thereof. An antioxidant is a material that quenches a free radical. Examples of such materials include foods such as Ginkgo Biloba, citrus pulp, grape pomace, tomato pomace, carrot and spinach, all preferably dried as well as various other materials such as beta-carotene, selenium, coenzyme Q10 (ubiquinone), lutein, tocotrienols, soy isoflavones, S-adenosylmethionine, glutathione, taurine, N-acetylcysteine, Vitamin E, Vitamin C, alpha-lipoic acid, l-carnitine and the like. Vitamin E can be administered as a tocopherol or a mixture of tocopherols and various derivatives thereof such as esters like vitamin E acetate, succinate, palmitate, and the like. The alpha form is preferable but beta, gamma and delta forms can be included. The d form is

WO 02/35943

PCT/US01/49654

preferable but racemic mixtures are acceptable. The forms and derivatives will function in a Vitamin E like activity after ingestion by the pet. Vitamin C can be administered in this diet as ascorbic acid and its various derivatives thereof such as calcium phosphate salts, cholesteryl salt, 2-monophosphate, and the like which will function in a vitamin C like activity after ingesting by the pet. They can be in any form such as liquid, semisolid, solid and heat stable form. Alpha-lipoic acid can be administered into the diet as alpha lipoic acid or as a lipote derivative as in US Patent 5,621,117, racemic mixtures, salts, esters or amides thereof. L-carnitine can be administered in the diet and various derivatives of carnitine such as the salts such as the hydrochloride, fumarate and succinates, as well as acetylated carnitine, and the like can be used.

The quantities administered in the diet, all as wt% (dry matter basis) of the diet, are calculated as the active material, per se, that is measured as free material. The maximum amounts employed should not bring about toxicity. At least about 100 ppm or at least about 150 ppm of Vitamin E can be used. A preferred range of about 500 to about 1,000 ppm can be employed. Although not necessary a maximum of about 2000 ppm or about 1500 ppm is generally not exceeded. With respect to Vitamin C at least about 50 ppm is used, desirably at least about 75 ppm and more desirably at least about 100 ppm. A nontoxic maximum can be employed. The quantity of alpha-lipoic acid can vary from at least about 25, desirably at least about 50 ppm, more desirably about 100 ppm. Maximum quantities can vary from about 100 ppm to 600 ppm or to an amount which remains non toxic to the pet. A preferred range is from about 100 ppm to about 200 ppm. For l-carnitine about 50 ppm, desirably about 200 ppm, more desirably about 300 ppm for canines are a useful minimum. For felines, slightly higher minimums of l-carnitine can be employed

WO 02/35943

PCT/US01/49654

such as about 100 ppm, 200 ppm, and 500 ppm. A nontoxic maximum quantity can be employed, for example, less than about 5,000 ppm. For canines, lower quantities can be employed, for example, less than about 5,000 ppm. For canines a preferred range is about 200 ppm to about 400 ppm. For felines a preferred range is about 400 ppm to about 600 ppm.

Beta-carotene at about 1-15 ppm can be employed.

Selenium at about 0.1 up to about 5 ppm can be employed.

Lutein at least about 5 ppm can be employed.

Tocotrienols at least about 25 ppm can be employed.

Coenzyme Q10 at least about 25 ppm can be employed.

S-adenosylmethionine at least about 50 ppm can be employed.

Taurine at least about 1000 ppm can be employed.

Soy isoflavones at least about 25 ppm can be used.

N-acetylcysteine at least about 50 ppm can be used.

Glutathione at least about 50 ppm can be used.

Ginkgo Biloba at least 50 ppm of extract can be used.

The following are raw ingredients that are high in ORAC (Oxygen radical absorbing capacity) content. When added to the diet as 1% inclusions (for a total of 5% substitution for a low ORAC ingredient such as corn) they increased the ORAC content of the overall diet and increased the ORAC content of the plasma of the animals which ate the diet containing these components. Preferably, any ingredient with an ORAC content >25 umole of Trolox equivalents per gram of dry matter could be used if added at 1% combination with four other 1% ingredients for a total of 5% addition to the diet.

Spinach pomace

Tomato pomace

Citrus Pulp

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Grape Pomace

Carrot granules

Broccoli

Green tea

5 Ginkgo Biloba

Corn gluten meal

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Example 1

Seventeen adult beagle dogs 2-4 years of age (control n=8, antioxidant-enriched n=9) were randomly placed into a control or enriched diet group. The control diet contained 59 ppm Vitamin E and < 32 ppm Vitamin C. The test diet had 900 ppm Vitamin E and 121 ppm Vitamin C, 260 ppm l-carnitine and 135 ppm alpha lipoic acid. Approximately 1 month after starting the diet, the first problem-solving task given to dogs was a landmark discrimination learning task, which is a test of spatial attention (Milgram et al., 1999 Milgram, N.W., Adams, B., Callahan, H., Head, E., Mackay, B., Thirlwell, C., & Cotman (1999), C.W. Landmark Discrimination Learning in the Dog. Learning & Memory, 6:54-61).

Landmark discrimination learning requires subjects to select a particular object based on proximity to an object. The initial learning, however, is based on the dogs' ability to learn an object discrimination task. We have previously found that the effects of age on discrimination learning depends on task difficulty.

The adult dogs on the enriched diet made fewer errors than the adult dogs on the control food when learning the landmark 0 test (control mean = 31.1, enriched mean = 15.1). The adult dogs proceeded on to landmark 1 and 2 testing, where the landmark is moved further away from the positive well. Adult dogs on enriched diet learned landmark 0-2 with less errors than those on the control (number of mean errors landmark 0+1+2 control = 132.9; number of mean errors of dogs on enriched diet landmark 0+1+2=87.1).

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Example 2

30 adult, random source, dogs were utilized for this study. Dogs were at least 10 months of age, not pregnant, not lactating and of reasonable body weight prior to start of test. Animals were randomized into 5 groups for dietary treatment with 3 males and 3 females per each group.

All dogs were fed a control food (0 ppm dl-alpha-lipoic acid added) that met or exceeded all recommendations for nutrients as proposed by the American Association of Feed Control Officials (AAFCO 2000) during a 2 week prefeeding period (Table 1). Following the prefeeding period dogs were randomized into 5 treatment groups with one of the following dl-alpha lipoic acid target-inclusions (dry matter basis): 0 ppm, 150 ppm, 1500 ppm, 3000 ppm, 4500 ppm. In all diets, control and alpha lipoic acid, Vitamin E was added and was present at a level of 600-1000 International Units and Vitamin C was added at levels of 100-200 ppm.

Test foods were the sole source of nutrients except for water. Fresh water was provided ad libitum. After dogs were selected and initial body weights taken, a food dose was calculated for each dog based on the expected ME of the food. Initial food dose calculations were based on the maintenance energy requirement (MER) for the dog modified by a factor to account for normal activity as calculated by the following formula:

$$\text{MER (kcal/day)} = 1.6 \times \text{RER (Resting Energy Requirement)}$$

$$\text{Where: RER (kcal/day)} = 70 \times \text{body weight (kg)}^{0.75}$$

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Dogs were weighed weekly and had food doses adjusted as needed in order to feed enough food to maintain their optimal body weight. Optimal body weight was determined to be 3 on a 5 point scale. If a dog did not maintain body weight within -10% of initial body weight, after adjustment of food dose, it was removed from the study. All measures of body weight and food intake were recorded.

Samples were ground and 0.100±0.001g of sample was extracted twice into 5.0 mL phosphate buffer (10mM Na₂HPO₄, 2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.9% NaCl, pH 7.4)*. 250 µL of extract was placed into a 5 mL glass centrifuge tube with a Teflon lined cap. 15 µL EDTA solution (100mM EDTA, adjusted to pH 7.8 with ~1M NaOH) and 50 µL freshly prepared 5mM dithioerythritol (DTE) were added. The solutions were vortexed and incubated at room temperature for 5 minutes. Then 10 µL of 1M H₃PO₄ and 2.0 mL diethyl ether were added. The tubes were capped, vortexed, and centrifuged at 1500 x g for 3 minutes at room temperature. The ether layer was transferred to a separate 5 mL glass centrifuge tube, while the aqueous layer was extracted twice more with 1.5 mL ether. All extractions from the same sample were combined. The extracts are then dried in a nitrogen evaporator in a water bath at room temperature. At this point, the samples were capped and frozen overnight.

The dried extracts were then thawed and reconstituted with 70 µL SDS/EDTA solution (0.11% sodium dodecyl sulfate (SDS), 15mM EDTA, 0.9% NaCl) and 5 µL freshly prepared 1mM DTE. 50 µL of freshly prepared NaBH₄ was then added to each tube. The tubes were vortexed and incubated at room temperature for 10 minutes. After 10 minutes, the samples were frozen at -70° C. Before the solutions were thawed, 20 µL 2M HCl was added. After the solutions were thawed,

WO 02/35943

PCT/US01/49654

800 μ L 100mM NH_4HCO_3 was added. The solutions are vortexed and 5 μ L of 100mM monobromobimane in acetonitrile solution (mBBBr) was added. The solutions were then incubated in the dark for 90 minutes at room temperature.

5

Excess mBBBr and the DTE derivative were removed from the samples after incubation by extraction with 1.5 mL dichloromethane. The aqueous layer was placed on the HPLC. The lipoic acid was separated using a mobile phase that consisted of 30% acetonitrile, 1% acetic acid, adjusted to pH 3.95 with ~2M NH_4OH and was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min with an isocratic elution for 15 minutes per injection. This preparation assumes that the density of the extruded food is equal to 1g/mL.

10

Blood was collected aseptically for complete blood count, and blood biochemistry analysis 2 weeks prior to start and again at 0, 28, 56, 84, 112, 140 and 168 days of the study. In addition, 15 ml of whole blood was collected for isolation of lymphocytes at day 0, 28 and 84 of the dietary intervention.

15

20

Heparinized whole blood was layered onto a 50 ml Accuspin conical centrifuge tube (Sigma Chemical) and an equal volume of Phosphate buffered saline (PBS) was added. Samples were centrifuged at 700g for 30 minutes without brake. The monocyte layer was harvested, transferred to a 15 ml conical centrifuge tube, resuspended in 1-3 ml of PB, and centrifuged as before (First wash). A second wash was performed as the first wash. Finally, cells were harvested and suspended in perchloric acid (10%w/v) and frozen at -70C until analysis.

25

30

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Samples were transferred from -70°C freezer into a cooler with dry ice in it. Vials were centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes in a refrigerated centrifuge. An aliquot of supernatant for glutathione (GSH) analysis was transferred to a conical test tube.

5

Derivatization of the acid soluble extracts was by the method of Reed and coworkers (Fariss et al) as modified by Jones (Jones et al)

10 Briefly, 150 µl extract or external standards were added into a 1.5 ml eppendorf tube followed by addition of 20 µl γ-glu-glu internal standard and 50 µl IAA added followed by mixing. The solution was adjusted to pH ~10 (purple color) by using KOH-KHCO₃ working solution. Solutions were incubated 1 hr. under room temperature in the dark. Sanger's reagent was added at the same volume as of the
15 total volume and the solution was incubated overnight (20hrs) in the dark at room temperature.

After incubation, the solution was centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes with the supernatant transferred into another 1.5 ml
20 eppendorf tube. 200 µl supernatant was added into an amber autovial which had a 300 µl inlet, fix the top with a crimper for HPLC analysis.

25 Solvents and separation conditions were as described (Fariss, Jones). Levels of GSH and GSSG were quantified relative to authentic standards. Gamma-glutamyl-glutamate was used as an internal standard to assess derivatization efficiency.

30 Comparison of values for clinical chemistry, hematology and body weights vs baseline were analyzed by way of paired t-test on SAS for windows with significance set at P<0.05. Means of values at

WO 02/35943

PCT/US01/49654

each measured time point were separated by a one-way ANOVA with significance set at $P < 0.05$. The difference in GSH:GSSG between day 84 and baseline were analyzed between groups by way of SAS for windows in a one-way ANOVA with significance set at $P < 0.05$.

5

Results

Concentrations of lipoic acid (ppm) in food as determined over 7 successive assays (0, 28, 56, 84, 112, 140, 168 days) were within the range of expected assay sensitivity and production parameters typically encountered at our facility (Table 1).

10

The food intake data were unremarkable. Most animals in all groups ingested more food at 6 months, on average, than at the beginning of the study. Body weight data were unremarkable except that some weight loss occurred initially in the 4500 ppm inclusion group but that change appeared to reversed by 6 months time. Body condition scores did not appear to be affected by this minor loss of weight.

15

20

The routine physical examinations did not reveal any evidence of nutrition related abnormalities or dl-alpha-lipoic acid toxicity. All animals in the study population remained normal during the entire course of the study. Occasional vomiting was observed in several animals during the course of the study; however, a trend was not observed that would lead one to the conclusion that the vomiting may be attributable to lipoic acid. One animal, in the highest inclusion group, was dropped from the study at day 21 for weight loss and leukocytosis. The leukocytosis in this animal had not resolved by the end of the study and is suspected to be attributable to some other disease process.

25

30

WO 02/35943

PCT/US01/49654

When serum biochemistry values for days 28, 56, 84, 112, 140, and 168 were compared with the initial values for the same group of dogs, several statistical differences were noted, however, none of these were considered biologically significant because these values were within or very near the laboratory reference range and consistent trends over months were noted. Comparisons between the controls and the other treatment groups at each time period also revealed several statistical differences, however, none of these were considered biologically significant because these values were within or very near the clinical laboratory reference ranges and no trends were present.

When the hematology values for days 28, 56, 84, 112, 140 and 168 were compared with the initial values for the same group of dogs, several statistical differences were noted; however, none of these were considered biologically significant because these values were within or very near the laboratory reference range and no trends were present. Comparison between the controls and the other treatment groups at each time period revealed several statistical differences; however, none of these were considered biologically significant because these values were within or very near the clinical laboratory reference ranges and no trends were present.

GSH:GSSG ratio

The change in GSH:GSSG ratio over 84 days of feeding displayed a significant overall effect of diet ($P=.024$) with all supplemented groups having an increase in the ratio (Table 2). ANOVA revealed a significant difference, compared to the basal food, for the lowest and highest inclusions, however, the largest numerical increase was in the lowest inclusion level. That is to say, the changes in the GSH:GSSG ratio for the highest and lowest inclusion were

WO 02/35943

PCT/US01/49654

significantly different from the change observed over this same time period in the basal food. Ratios for 4 points could not be determined at day 84 as no GSSG was detectable in any of these samples (1 control, 3 treatment groups). As such, the values for supplemented groups may have displayed even higher ratios of GSH:GSSG if the assay had been sensitive enough to detect the low levels of GSSG at day 84.

Table 1

Inclusion Rate (ppm)	Average	Standard Deviation	Percent Target
0	24	17	NA
150	151	13	101
1500	1471	113	98
3000	2869	250	96
4500	4176	642	93

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Table 2

Change in mean ratio of GSH:GSSG from day 0 to day 84 in dogs
consuming dl-alpha lipoic acid in an extruded food.

Inclusion	Difference in GSH:GSSG ratio-d 0 to d 84 compared to baseline food	N	P value
0 ppm	-9.2 ± 26	5*	NA
150 ppm	70 ± 20	6	.003
1500 ppm	24 ± 7	6	.16
3000 ppm	10 ± 4	4*	.46
4500 ppm	50 ± 36	4*	.03

*1 dog in the control and 4500 ppm group had no detectable GSSG at
day 84 while 2 dogs in the 3000 ppm group had no detectable GSSG
at day 84.

Further observations with respect to alpha lipoic acid are
applicable. Chronic feeding of alpha lipoic acid in diet is safe and
effective. It improves the reduced glutathione (GSH) to oxidized
glutathione (GSSG) ratio. The chronic administration of alpha lipoic
acid in the diet can be for periods of one, two, three, four, five, or six
months minimum up through a period of one, two, three, four, five
years or even more including the lifetime of the animal. The alpha
lipoic acid functions without any special protection in the diet such as
encapsulation and need not be present in the diet in a unit dosage
form such as those used in pharmaceuticals for example, tablet, pill,
capsule and the like. The lipoic acid is provided in the diet in a
minimum of about 25, 50, 75, or 100 ppm of diet. The uppermost
range is just below its toxic level, all the way down to about 400, 300,

WO 02/35943

PCT/US01/49654

or 200 ppm of diet. Generally, one does not go beyond about 6 or 7
mg/kg body weight of animal per day, more generally not above about
5. The alpha lipoic acid improves antioxidant defense capabilities as
well as improves the animal's ability to resist oxidative damage. All
s this is done with the proper quantities of other antioxidants present
such as Vitamin E and Vitamin C. This demonstrates that the action
of alpha lipoic acid is beyond that of Vitamin C and/or Vitamin E.

WO 02/35943

PCT/US01/49654

Claims*What is claimed is:*

5

1. A companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements for an adult pet and further comprising a sufficient amount of an antioxidant or mixture thereof, to inhibit the onset of deterioration of the mental capacity of said companion pet in aged years.

10

2. The diet in accordance with claim 1 wherein the pet is a canine.

3. The diet in accordance with claim 2 wherein the canine is 1 to 6 years.

15

4. The diet in accordance with claim 1 wherein the pet is a feline.

5. The diet in accordance with claim 4 wherein the feline is 1 to 6 years.

20

6. The diet in accordance with claim 1 wherein Vitamin E is present in at least about 100 ppm of the diet.

7. The diet in accordance with claim 6 wherein an antioxidant selected from the group consisting of Vitamin C, l-carnitine, alpha-lipoic acid or mixture thereof is present in the diet.

25

8. The diet of claim 1 wherein an antioxidant selected from the group consisting of Vitamin C, l-carnitine, alpha-lipoic acid or mixtures thereof is present in the diet.

30

WO 02/35943

PCT/US01/49654

9. The diet of claim 8 wherein at least about 50 ppm of Vitamin C are in the diet.
10. The diet of claim 8 wherein at least about 25 ppm of alpha-lipoic acid are in the diet.
11. The diet of claim 8 wherein at least about 50 ppm of l-carnitine are present in the diet.
12. A method for inhibiting the onset of deterioration of the mental capacity of an aged companion pet which comprises feeding said pet in its adult years a sufficient amount of an antioxidant or mixture thereof, to accomplish this inhibition.
13. The method in accordance with claim 12 wherein the pet is a canine.
14. The method in accordance with claim 13 wherein the canine is 1 to 6 years.
15. The method in accordance with claim 12 wherein the pet is a feline.
16. The method in accordance with claim 15 wherein the feline is at least 1 to 6 years.
17. The method in accordance with claim 12 wherein Vitamin E is fed to the pet in at least about 100 ppm as measured by the diet.

WO 02/35943

PCT/US01/49654

18. The method in accordance with claim 17 wherein an antioxidant selected from the group consisting of Vitamin C, l-carnitine, alpha-lipoic acid or mixture thereof is fed to the pet.
- 5 19. The method of claim 12 wherein an antioxidant selected from the group consisting of Vitamin C, l-carnitine, alpha-lipoic acid or mixtures thereof is fed to the pet.
- 10 20. The method of claim 19 wherein at least about 50 ppm of Vitamin C are in the diet.
21. The method of claim 19 wherein at least about 25 ppm of alpha-lipoic acid are in the diet.
- 15 22. The method of claim 19 wherein at least about 50 ppm of l-carnitine are present in the diet.
23. A companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements of an adult pet and further comprising at least about 100 ppm of Vitamin E, at least about 50 ppm of Vitamin C, at least about 25 ppm of alpha-lipoic acid and at least about 50 ppm of l-carnitine in the diet.
- 20 24. The diet in accordance with claim 23 wherein the adult pet is a canine of 1 to 6 years.
- 25 25. The diet in accordance with claim 23 wherein the adult pet is a feline of 1 to 6 years.
- 30 26. A method for increasing the mental capacity of an adult companion pet, which comprises feeding the pet an amount of

WO 02/35943

PCT/US01/49654

an antioxidant or mixture thereof sufficient to increase the mental capacity of said pet.

27. A companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements
5 of an adult pet and further comprising an amount of an antioxidant or mixture thereof sufficient to increase the mental capacity of said pet.
28. A method for improving a companion pet's ability in its aged
10 years to resist oxidative damage which comprises feeding said pet in its adult years a diet meeting nutritional requirement, said diet having at least about 25 ppm lipoic acid and said diet being fed for at least one month.
29. A method for improving a companion pet's ability in its aged
15 year to resist oxidative damage which comprises feeding said pet in its aged year a diet meeting nutritional requirement, said diet having at least about 25 ppm lipoic acid and said diet being fed for at least one month.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/035943 A3

(51) International Patent Classification: A23K 1/16, 1/18

(21) International Application Number: PCT/US01/49654

(22) International Filing Date: 25 October 2001 (25.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/244,501 31 October 2000 (31.10.2000) US
60/253,448 28 November 2000 (28.11.2000) US
09/022,650 6 August 2001 (06.08.2001) US
09/078,133 16 October 2001 (16.10.2001) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, ND, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
19 September 2002(71) Applicant: COLGATE-PALMOLIVE COMPANY
[US/US], 300 Park Avenue, New York, NY 10022 (US).(72) Inventors: ZICKER, Steven, Curtis, 714 Timblewood
Drive, Lawrence, KS 66049 (US); WEDEKIND, Karen,
J., 197 N. Palmberg, Meriden, KS 66512 (US).(74) Agent: BARANCIK, Martin, R., Colgate-Palmolive
Company, 909 River Road, P.O. Box 1343, Piscataway, NJ
08855-1343 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 02/035943 A3

(54) Title: PET FOOD COMPOSITION AND METHOD

(57) Abstract: A companion pet diet meeting ordinary nutritional requirements of the pet and further comprising a sufficient amount of an antioxidant or mixture thereof to inhibit the onset of deterioration of the mental capacity of said companion pet in its aged years.

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月16日(2003.1.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

成体ペットに関する通常の栄養所要量を満たすコンパニオンペット用食餌であって、前記コンパニオンペットの高齢期における精神能力の衰退開始を阻害するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる、前記食餌。

【請求項2】

ペットがイヌである、請求項1に記載の食餌。

【請求項3】

イヌが1～6歳である、請求項2に記載の食餌。

【請求項4】

ペットがネコである、請求項1に記載の食餌。

【請求項5】

ネコが1～6歳である、請求項4に記載の食餌。

【請求項6】

ビタミンEが食餌の少なくとも約100ppmで存在する、請求項1に記載の食餌。

【請求項7】

ビタミンC、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤が食餌中に存在する、請求項6に記載の食餌。

【請求項8】

ビタミンC、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤が食餌中に存在する、請求項1に記載の食餌。

【請求項9】

少なくとも約50ppmのビタミンCが食餌中にある、請求項8に記載の食餌。

【請求項10】

少なくとも約25ppmの α -リポ酸が食餌中にある、請求項8に記載の食餌。

【請求項11】

少なくとも約50ppmのL-カルニチンが食餌中に存在する、請求項8に記載の食餌。

【請求項12】

高齢コンパニオンペットの精神能力の衰退開始の阻害方法であって、成体期にある前記ペットに、この阻害を達成するのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる方法。

【請求項13】

ペットがイヌである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

イヌが1～6歳である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

ペットがネコである、請求項12に記載の方法。

【請求項16】

ネコが少なくとも1～6歳である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

ビタミンEを、食餌で測定して少なくとも約100ppmでペットに与える、請求項12に記載の方法。

【請求項18】

ビタミンC、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤をペットに与える、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

ビタミンC、L-カルニチン、 α -リポ酸又はその混合物からなる群より選択される酸化防止剤をペットに与える、請求項12に記載の方法。

【請求項20】

少なくとも約50ppmのビタミンCが食餌中にある、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

少なくとも約25ppmの α -リポ酸が食餌中にある、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

少なくとも約50ppmのL-カルニチンが食餌中に存在する、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

成体ペットの通常の栄養所要量を満たすコンパニオンペット用食餌であって、該食餌中に少なくとも約100ppmのビタミンE、少なくとも約50ppmのビタミンC、少なくとも約25ppmの α -リポ酸および少なくとも約50ppmのL-カルニチンをさらに含んでなる、前記食餌。

【請求項24】

成体ペットが1～6歳のイヌである、請求項23に記載の食餌。

【請求項25】

成体ペットが1～6歳のネコである、請求項23に記載の食餌。

【請求項26】

成体コンパニオンペットの精神能力の向上方法であって、該ペットに、前記ペットの精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物を与えることを含んでなる方法。

【請求項27】

成体ペットの通常の栄養所要量を満たし、前記ペットの精神能力を向上させるのに足る量の酸化防止剤またはその混合物をさらに含んでなる、コンパニオンペット用食餌。

【請求項28】

コンパニオンペットの高齢期における酸化的傷害に対する抵抗能の改善方法であって、成体期にある前記ペットに、栄養所要量を満たす食餌を与えることを含んでなり、前記食餌が少なくとも約25ppmのリポ酸を有し、そして前記食餌を少なくとも1カ月間与える、前記改善方法。

【請求項29】

コンパニオンペットの高齢期における酸化的傷害に対する抵抗能の改善方法であって、高齢期にある前記ペットに、栄養所要量を満たす食餌を与えることを含んでなり、前記食餌が少なくとも約25ppmのリポ酸を有し、そして前記食餌を少なくとも1カ月間与える、前記改善方法。

【請求項30】

高齢ペットの学習能力を向上させるための食物の製造における、高齢ペットの学習能を向上させるのに足る量の、ビタミンE、ビタミンC、リポ酸およびカルニチンからなる群より選択される酸化防止剤ならびにその混合物を有する組成物の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A23K 1/16 A23K 1/18		International Application No. PCT/US 01/49654
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A23K		
Documentation restricted other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Databases consulted during the international search (name of data bases and, where practical, search terms used) EPO-internal, BIOSIS, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 44375 A (HARPER E JEAN ; MARS UK LTD (GB)) 3 August 2000 (2000-08-03) claims 1, 2, 8, 9, 14, 15, 25, 27, 30, 32	1-9, 12-19
X	US 5 883 083 A (HARLESS STANLEY JAMES) 16 March 1999 (1999-03-16) column 1, line 34 - line 45; claims; examples	1-5, 12-16
P, X	WO 01 58271 A (JUVENON INC) 16 August 2001 (2001-08-16) page 6, line 12 - line 27; claims; example 2	1-8, 10, 11, 23-25
P, X	CA 2 285 490 A (JEEJEEBHOY) 7 April 2001 (2001-04-07) claims	1-6, 8, 12-16, 19
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but after the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance, the claimed invention can only be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, the combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2002		Date of mailing of the international search report 30/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5011, 6000 Luxembourg Tel: (+352-70) 540-5040, Tx: 81 651 600 nL Fax: (+352-70) 540-5016		Authorized officer Grittern, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/49654

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZA 9 605 149 A (DAVIS HENRY J. ET AL) 26 March 1997 (1997-03-26) claims	1-12
A	BRANAM J E: "DIETARY MANAGEMENT OF GERIATRIC DOGS AND CATS" VETERINARY TECHNICIAN, VETERINARY LEARNING SYSTEMS, PRINCETON JUSTICE, NJ., US, vol. 8, no. 10, 1987, pages 501-503, XP000978775 ISSN: 8750-8990 the whole document	1-3
A	KOLB E ET AL: "ZUM BEDARF AN VITAMINEN UND AN ASCORBINSÄURE BEIM HUND MIT BEMERKUNGEN ZUR PUBLIKATION VON M. TOREL TU51 785-490 1996" TIERÄRZTLICHE UMSCHAU, KONSTANZ, DE, vol. 52, no. 12, 1997, pages 728-733, XP000978781 ISSN: 0049-3864 the whole document	1-3

Form PCT/ISA/210 (Continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/49654

Patent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
WO 0044375	A	03-08-2000	AU 2304200 A 18-08-2000 BR 0007862 A 23-10-2001 CN 1342073 T 27-03-2002 EP 1146870 A1 24-10-2001 WO 0044375 A1 03-08-2000 GB 2366179 A 06-03-2002
US 5883083	A	16-03-1999	NONE
WO 0158271	A	16-08-2001	WO 0158271 A1 16-08-2001 US 2001043983 A1 22-11-2001
CA 2285490	A		NONE
ZA 9605149	A	23-01-1997	NONE

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 09/978,132

(32)優先日 平成13年10月16日(2001.10.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100077506

弁理士 戸水 辰男

(72)発明者 ズィッカー, スティーヴン・カーティス

アメリカ合衆国カンザス州66049, ローレンス, タンブルウィード・ドライブ 214

(72)発明者 ウェデキンド, カレン・ジェイ

アメリカ合衆国カンザス州66512, メリデン, ノース・パームバーク 197

Fターム(参考) 2B005 AA05

2B150 AA06 AB20 DA41 DB07 DE13 DE15