

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 909**

51 Int. Cl.:

A23K 20/105 (2006.01)

A23K 20/179 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A23K 50/40 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010 PCT/CA2010/000671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10124391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10769196 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 2424512**

54 Título: **Métodos y composiciones para mejorar la salud de los animales**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174259 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.03.2021

73 Titular/es:

AVIVAGEN INC. (100.0%)

100 Sussex Drive

Ottawa ON K1A 0R6, CA

72 Inventor/es:

DAROSZEWSKI, JANUSZ;

DICK, CLAYTON PAUL y

VERZBERGER-EPSTEIN, ISABELLA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 813 909 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para mejorar la salud de los animales

5 Antecedentes

La divulgación se refiere al uso de productos de oxidación de carotenoides para mejorar la salud de un animal.

10 Según la encuesta nacional de propietarios de mascotas (NPOS; del inglés, National Pet Owners Survey) de la asociación americana de fabricantes de productos para mascotas, en 2006, las mascotas habitaron en 69 millones de hogares de los Estados Unidos. Esto se corresponde con 73 millones de perros y con 90 millones de gatos. Esta cifra se ha incrementado desde 2002, cuando 64 millones de hogares tenían mascotas. Asimismo, la encuesta sobre el estado de las mascotas americanas reveló que el 75 % de los propietarios de mascotas declararon que su mascota es un miembro de la familia y que mantenerla con una salud óptima es su prioridad principal cuando cuidan de su mascota.

15 Las mascotas de edad avanzada a menudo se vuelven frágiles en sus últimos años de vida, a menudo teniendo un mal estado del pelaje, problemas del sistema digestivo, rigidez de las articulaciones, pérdida de energía y/o niveles de actividad reducidos.

20 Por ejemplo, los tejidos conectivos de los animales están sometidos a estrés constantemente y a tensiones de fuerzas mecánicas que pueden dar como resultado afecciones, tales como artritis (tanto reumatoide como osteoartritis), inflamación de las articulaciones y rigidez. Esto es particularmente cierto según envejecen los animales. Las causas subyacentes de la artritis reumatoide y/o artrosis son distintas de manera que la artritis reumatoide se caracteriza por ser una enfermedad autoinmunitaria que afecta tanto a las articulaciones como a las funciones del sistema inmunitario, mientras que la artrosis da como resultado el deterioro del cartílago articular que puede dar como resultado una inflamación local de las articulaciones. Mientras que una mayor parte de los seres humanos con artritis tienen artritis reumatoide, la mayoría de las artritis que se dan en animales de compañía es osteoartritis. En perros, la artrosis es un trastorno de las articulaciones sinoviales que se caracteriza por la degeneración del cartílago articular y por la formación de hueso nuevo en los márgenes de la articulación. El endurecimiento del hueso subcondral subyacente puede ser una característica de la artrosis y en algunos casos, puede estar presente una inflamación sinovial de grado variable en algún momento durante la progresión de la enfermedad. La cría selectiva de animales de compañía y domésticos ha conducido de forma involuntaria a la propagación de muchas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias de manera que se señala que el veinte por ciento de la población canina mayor de un año de edad tiene algún grado de artritis.

35 El documento WO 2005/099478 (NESTEC SA) desvela composiciones que contienen carotenoides oxidados (Astaxanthan) y que se usan en la producción de piensos para perros, que tienen los efectos de mejorar la recuperación del ejercicio. El documento no desvela un carotenoide transformado oxidativamente.

40 El documento WO 2004/016214 (MED COLLEGE GEORGIA RES INST) desvela el uso de una composición que comprende carotenoides oxidados tales como la luteína, xantofila y zeaxantina en el tratamiento de trastornos oculares que dan lugar a la decoloración ocular. El documento no desvela un carotenoide transformado oxidativamente.

45 Existe una necesidad de nuevos métodos y composiciones para mejorar la salud y el bienestar de los animales, tal como incrementar la movilidad de las articulaciones, incrementar la actividad y mejorar la calidad del pelaje.

Sumario

50 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas, en las que el carotenoide transformado oxidativamente es una mezcla formada por la reacción de un carotenoide con 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno y que contiene un material oligomérico.

55 Cualquier realización que no quede bajo el alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

La divulgación proporciona composiciones y métodos para la administración de un carotenoide transformado oxidativamente. Las composiciones pueden ser útiles para mejorar la salud de un animal.

60 En un primer aspecto, la divulgación presenta un método para incrementar la movilidad articular de un animal que lo necesite, mediante la administración al animal de una composición que incluye un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para incrementar la movilidad articular.

65 La divulgación presenta también un método para aumentar el nivel de actividad de un animal, mediante la administración al animal de una composición que incluye un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para incrementar el nivel de actividad.

La divulgación presenta adicionalmente un método para mejorar la calidad del pelaje de un animal, mediante la administración al animal de una composición que incluye un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para mejorar la calidad del pelaje.

5 La divulgación presenta un método para mantener la calidad del pelaje de un animal, mediante la administración de una composición al animal que incluye un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para mantener o mejorar la calidad del pelaje.

10 La divulgación presenta también un método para reducir la decoloración en un ojo de un animal, mediante la administración de una composición al animal que incluye un carotenoide transformado oxidativamente en una cantidad suficiente para reducir dicha decoloración.

15 En una realización de los métodos desvelados, la composición se administra diariamente. Por ejemplo, se puede administrar al animal diariamente de 0,1 mg/kg de peso corporal a 2 mg/kg de peso corporal de carotenoide transformado oxidativamente. En ciertas realizaciones de la divulgación, se administran diariamente de 0,05 mg/kg a 1 mg/kg; de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg; de 0,2 mg/kg a 1,5 mg/kg; de 0,3 mg/kg a 2 mg/kg; de 0,3 mg/kg a 1 mg/kg; de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg; de 0,1 mg/kg a 0,8 mg/kg; de 0,2 mg/kg a 1,2 mg/kg; o de 0,25 mg/kg a 0,75 mg/kg de carotenoide transformado oxidativamente. El carotenoide transformado oxidativamente se puede mezclar con comida y administrarse a dicho animal por vía oral. La comida puede ser, sin limitación, una comida animal húmeda, una comida animal semihúmeda, una comida animal seca, una croqueta, un masticable, un comprimido o una golosina blanda comestible. Como alternativa, se puede administrar el carotenoide transformado oxidativamente a dicho animal como un suplemento oral (por ejemplo, formulado como una pasta o gel apetitoso).

25 En ciertas realizaciones de la divulgación anterior, el animal es un animal de compañía (por ejemplo, un perro, un gato, un caballo o cualquier otro animal de compañía descrito en el presente documento).

30 En otra realización de la divulgación anterior, el animal es un animal maduro, un animal que es mayor o un animal que muestra señales de envejecimiento (es decir, apatía, inmovilidad o un pelaje poco saludable que tiene el pelo seco, quebradizo y/o pérdida de pelo en el pelaje).

35 En un aspecto relacionado, la divulgación presenta una composición sólida comestible en forma farmacéutica unitaria que incluye de 2 mg a 130 mg de carotenoide transformado oxidativamente y formulado para resultar apetitoso para los canes. En ciertas realizaciones de la divulgación, la forma farmacéutica unitaria incluye de 1 mg a 200 mg; de 1 mg a 100 mg; de 1 mg a 75 mg; de 5 mg a 150 mg; de 5 mg a 75 mg; de 10 mg a 200 mg; de 10 mg a 100 mg; de 10 mg a 75 mg; de 20 mg a 200 mg; de 20 mg a 100 mg; o de 30 mg a 150 mg de carotenoide transformado oxidativamente.

40 La divulgación presenta también una composición sólida comestible en forma farmacéutica unitaria que incluye de 0,25 mg a 14 mg de carotenoide transformado oxidativamente y formulado para resultar apetitoso para los felinos. En ciertas realizaciones de la divulgación, la forma farmacéutica unitaria incluye de 0,25 mg a 14 mg; de 0,1 mg a 20 mg; de 0,1 mg a 10 mg; de 0,25 mg a 10 mg; de 0,5 mg a 14 mg; de 0,5 mg a 10 mg; de 0,75 mg a 14 mg; de 0,75 mg a 10 mg; de 1 mg a 14 mg; de 1 mg a 10 mg; de 2 mg a 14 mg de carotenoide transformado oxidativamente.

45 La divulgación presenta también una composición sólida comestible en forma farmacéutica unitaria que incluye de 39 mg a 1.500 mg de carotenoide transformado oxidativamente y apetitoso para los équidos. En ciertas realizaciones de la divulgación, la forma farmacéutica unitaria incluye de 20 mg a 2.000 mg; de 20 mg a 1.500 mg; de 20 mg a 1.000 mg; de 50 mg a 2.000 mg; de 50 mg a 1.500 mg; de 50 mg a 1.000 mg; de 100 mg a 2.000 mg; de 100 mg a 1.500 mg; de 100 mg a 1.000 mg; de 250 mg a 2.000 mg; de 250 mg a 1.500 mg; o de 250 mg a 1.000 mg de carotenoide transformado oxidativamente.

55 En una realización de cualquiera de las composiciones de dosificación sólida comestible de la divulgación, la forma farmacéutica unitaria es una croqueta, un masticable, un comprimido o una golosina blanda comestible.

60 La divulgación presenta adicionalmente un gel o pasta comestible apetitoso que incluye de 2 mg/cucharada a 750 mg/cucharada de carotenoide transformado oxidativamente. En ciertas realizaciones de la divulgación, el gel o pasta comestible incluye de 1 mg/cucharada a 750 mg/cucharada; de 5 mg/cucharada a 750 mg/cucharada; de 5 mg/cucharada a 500 mg/cucharada; de 1 mg/cucharada a 250 mg/cucharada; de 5 mg/cucharada a 250 mg/cucharada; de 10 mg/cucharada a 500 mg/cucharada; de 10 mg/cucharada a 100 mg/cucharada; de 5 mg/cucharada a 100 mg/cucharada; o de 25 mg/cucharada a 250 mg/cucharada de carotenoide transformado oxidativamente.

65 La divulgación presenta un kit que incluye (i) comida para perros, (ii) un carotenoide transformado oxidativamente e (iii) instrucciones para dar de comer a un perro una cantidad de la composición que contiene de 2 mg a 130 mg del carotenoide transformado oxidativamente. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para alimentar al perro

diariamente. La comida para perros puede ser, por ejemplo, una comida para perros seca, una comida para perros húmeda o una comida para perros semihúmeda.

5 La divulgación presenta también un kit que incluye (i) comida para gato, (ii) un carotenoide transformado oxidativamente e (iii) instrucciones para dar de comer a un gato una cantidad de la composición que contiene de 0,25 mg a 14 mg del carotenoide transformado oxidativamente. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para alimentar al gato diariamente. La comida para gato puede ser, por ejemplo, una comida para gato seca, una comida para gato húmeda o una comida para gato semihúmeda.

10 En una realización de cualquiera de los kits anteriores de la divulgación, el kit se proporciona en un envase de una sola ración (por ejemplo, una bolsa, un paquete o una lata).

En cualquiera de los métodos anteriores, composiciones comestibles y kits, la composición incluye un carotenoide transformado oxidativamente.

15 Por "animal" se entiende cualquier animal incluyendo, sin limitación, seres humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, ganado porcino, ganado bovino, aves de corral y pescado.

20 Por una "cantidad suficiente" se entiende la cantidad de carotenoide transformado oxidativamente necesario para incrementar la movilidad articular, incrementar el nivel de actividad o mejorar la calidad del pelaje. La cantidad eficaz de una composición de la divulgación utilizada para practicar los métodos de la divulgación varía dependiendo del modo de administración, el tipo de animal, peso corporal y estado de salud general del animal. Finalmente, el médico o veterinario responsable decidirá la cantidad apropiada y el régimen de dosificación. Tal cantidad es la referida como una "cantidad suficiente".

25 Como se utiliza en el presente documento, "carotenoide" se refiere a pigmentos presentes en la naturaleza del grupo de los terpenoides que pueden encontrarse en plantas, algas, bacterias y ciertos animales, tales como aves y mariscos. Los carotenoides incluyen carotenos, que son hidrocarburos (es decir, sin oxígeno) y sus derivados oxigenados (es decir, xantofilas). Entre los ejemplos de carotenoides se incluye el licopeno; β -caroteno; zeaxantina; equinenona; isozeaxantina; astaxantina; cantaxantina; luteína; citranaxantina; éster etílico del ácido β -apo-8'-caroténico; hidroxicarotenoides, tales como aloxantina, apocarotenol, astaceno, astaxantina, capsantina, capsorrubina, carotenodiolos, carotenetriolos, carotenoles, criptoxantina, decaprenoxantina, epiluteína, fucoxantina, hidroxicarotenonas, hidroxiequinenonas, hidroxilicopeno, luteína, licoxantina, neurosporina, fitoeno, fitoflueno, rodopina, esferoideno, toruleno, violaxantina y zeaxantina; y carotenoides carboxílicos, tales como ácido apocarotenico, ácido β -apo-8'-carotenico, azafrina, bixina, carboxilcarotenos, crocetina, ácido diapocarotenico, neurosporaxantina, norbixina y ácido licopenico.

35 Por "animal de compañía" se entiende cualquier animal doméstico, incluyendo, sin limitación, perros, gatos, caballos, cerdos, ovejas y vacas domesticados.

40 Como se utiliza en el presente documento, "fraccionado" se refiere a una composición que contiene el material oligomérico formado en la producción de la mezcla de carotenoides transformados oxidativamente. Los métodos de fraccionamiento de mezclas de carotenoides transformados oxidativamente en componentes se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.475.006 y el documento de n.º de serie de Estados Unidos 08/527.039.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, "carotenoide transformado oxidativamente" se refiere a un carotenoide que se ha hecho reaccionar con hasta 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno, o una cantidad equivalente de oxígeno de otro agente oxidante, dando como resultado una mezcla de productos de escisión oxidativa de pesos moleculares muy bajos y una gran proporción de material oligomérico (es decir, que el componente del carotenoide transformado oxidativamente tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 900 Daltons). La reacción resultante produce una mezcla que incluye especies moleculares que tienen pesos moleculares que van de aproximadamente 100 a 8.000 Daltons. Se cree que el material oligomérico se forma mediante las numerosas recombinaciones químicas posibles de los diversos fragmentos oxidativos que se forman. Los métodos de producción de mezclas de carotenoides transformados oxidativamente se describen en la patente de Estados Unidos n.º. 5.475.006 y el documento de n.º. de serie de Estados Unidos 08/527.039. Como se utiliza en el presente documento, el término "OxBC" se refiere específicamente a un carotenoide derivado de β -caroteno transformado oxidativamente.

50 El término "apetitoso" se refiere a al menos un 60 % de aceptación o ingestión voluntaria (libre elección) de una composición de la divulgación por un tipo de animal, como se mide mediante una prueba de palatabilidad estándar, tal como una prueba de aceptación, prueba de preferencia o prueba de consumo. El término "apetitoso para canes" se refiere a al menos un 60 % de aceptación o ingestión voluntaria (libre elección) de una composición de la divulgación por canes en una prueba de palatabilidad estándar. El término "apetitoso para felinos" se refiere a al menos un 60 % de aceptación o ingestión voluntaria (libre elección) de una composición de la divulgación por felinos en una prueba de palatabilidad estándar. El término "apetitoso para équidos" se refiere a al menos un 60 % de aceptación o ingestión voluntaria (libre elección) de una composición de la divulgación por équidos en una prueba de

palatabilidad estándar.

Como se utiliza en el presente documento, el término "someter a tratamiento" se refiere a la administración de una composición farmacéutica con fines profilácticos y/o terapéuticos. "Prevenir la enfermedad" se refiere al tratamiento profiláctico de un animal que todavía no está enfermo, pero que es susceptible o tiene riesgo de contraer, una enfermedad en particular. "Tratar una enfermedad" o el uso para un "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar un tratamiento a un animal que ya padece una enfermedad para mejorar o estabilizar la afección del animal. Por tanto, en las realizaciones y realizaciones de la divulgación, someter a tratamiento es la administración a un animal con fines terapéuticos o profilácticos. Como se utiliza en el presente documento, "estar en riesgo" se refiere a animales susceptibles de mala movilidad articular, niveles de actividad reducidos y/o mala calidad del pelaje.

Por "mantener o mejorar la calidad del pelaje" se entiende mantener o mejorar la calidad de un pelaje de animal utilizando los métodos de la divulgación, en comparación con un animal de una condición y edad similar que se deja sin tratar. Los criterios para calcular la calidad del pelaje pueden incluir (a) medir el índice de muda de un sujeto a prueba mediante la recogida de pelo producido durante una sesión de cepillado estandarizada (es decir, el pelo se recoge y se pesa y se comparan los sujetos de control y de prueba); y (b) evaluaciones de pelaje subjetivas utilizando expertos entrenados para evaluar subjetivamente la condición del pelaje mediante el cálculo de la muda, caspa, brillo, uniformidad, suavidad y densidad.

Por "incrementar la movilidad articular" se entiende incrementar la movilidad articular de un animal utilizando los métodos de la divulgación, en comparación con un animal de movilidad y edad similar que se deja sin tratar. Los criterios para calcular la movilidad articular pueden incluir una evaluación ortopédica del grado de cojera, soportar peso, resistencia a soportar peso provocado, extensión de las patas traseras e inspección visual de la capacidad de un animal para caminar y/o trotar. Los ángulos articulares y el intervalo de movimiento se pueden determinar también mediante mediciones goniométricas manuales. Adicionalmente, se podrían utilizar para determinar la salud articular los análisis de placa de fuerza.

Por "incrementar el nivel de actividad" se entiende incrementar el nivel de actividad de un animal utilizando los métodos de la divulgación, en comparación con un animal de movilidad y edad similar que se deja sin tratar.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada, los Dibujos y las Reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la distribución de resultados basados en los comentarios de los propietarios, en perros de control y en perros tratados con OxBC (0,5 mg/kg de peso corporal), después de un tratamiento de 6 meses (véase el Ejemplo 2).

La Figura 2 es una serie de gráficos que muestran el efecto del OxBC sobre la expresión de receptores inmunitarios en células dendríticas plasmáticas primarias caninas. Las células dendríticas se incubaron con las concentraciones indicadas de OxBC o de vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. La expresión de membrana plasmática del subtipo-2 del receptor de tipo toll (TLR-2; Figura 2A), subtipo-4 del receptor de tipo toll (TLR-4; Figura 2B) y CD-14 (Figura 2C) se determinó mediante análisis FACS. Los efectos del OxBC se muestran con respecto a las células de control no tratadas. Estos resultados muestran que OxBC es capaz de regular al alza la abundancia de los receptores TLR-2, TLR-4 y CD-14 sensibles a patógenos sobre la membrana plasmática de células dendríticas, un tipo de células efectoras primarias del sistema inmunitario.

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran el efecto del OxBC sobre la expresión de receptores inmunitarios en osteoblastos primarios caninos. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de OxBC o de vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. La expresión de membrana plasmática del subtipo-2 del receptor de tipo toll (TLR-2; Figura 3A), subtipo-4 del receptor de tipo toll (TLR-4; Figura 3B) y CD-14 (Figura 3C) se determinó mediante análisis FACS. Los efectos del OxBC se muestran con respecto a las células de control no tratadas. Estos resultados muestran que OxBC es capaz de regular al alza la abundancia de los receptores TLR-2, TLR-4 y CD-14 sensibles a patógenos sobre la membrana plasmática de osteoblastos caninos. Los osteoblastos no son efectores primarios del sistema inmunitario, sin embargo, pueden jugar un papel secundario en la inmunidad innata detectando patógenos invasores.

La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran el efecto del OxBC sobre la expresión de receptores inmunitarios en condrocitos primarios caninos. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de OxBC o de vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. La expresión de membrana plasmática del subtipo-2 del receptor de tipo toll (TLR-2; Figura 4 A) y del subtipo-4 del receptor de tipo toll (TLR-4; Figura 4B) se determinó mediante análisis FACS. Los efectos del OxBC se muestran con respecto a las células de control no tratadas. Estos resultados muestran que OxBC es capaz de regular al alza la abundancia de los receptores TLR-2, TLR-4 y CD-14 sensibles a patógenos sobre la membrana plasmática de condrocitos caninos. Los condrocitos, como los osteoblastos, no son efectores primarios del sistema inmunitario, sin embargo, pueden jugar un papel secundario en la inmunidad innata

detectando patógenos invasores.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto del OxBC sobre la actividad fagocítica de monocitos primarios caninos. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de OxBC o de vehículo de control (DMSO) durante 24 horas y a continuación, se dejó que se recuperaran en ausencia de compuesto durante unas 24 horas adicionales. La actividad fagocítica se determinó midiendo el consumo de microesferas marcadas de forma fluorescente utilizando un instrumento de FACS Array. Los efectos del tratamiento se expresan con respecto a las células de control no tratadas. Se utilizó acetato de miristato de forbol (PMA; del inglés, Phorbol myristate acetate) como un control positivo. Los resultados indican que el OxBC es capaz de potenciar la actividad fagocítica de los monocitos caninos que conducen a reacciones más rápidas y más eficientes hacia los patógenos invasores bacterianos.

La Figura 6 es una serie de gráficos que muestran el efecto del OxBC sobre la expresión de quimiocinas en fibroblastos primarios caninos vírgenes y provocados.

Los fibroblastos se pretrataron con OxBC o vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. Tras el pretratamiento, se provocó a las células mediante la exposición a lipopolisacárido (LPS) bacteriano durante 4 horas. La expresión de quimiocinas se midió utilizando PCR cuantitativa en tiempo real con ARN total. Los resultados muestran que en el contexto de un LPS provocado (barras oscuras) OxBC tiene un efecto supresor significativo sobre el nivel de expresión génica de MCP-1 (Figura 3A) y RANTES (Figura 3B). El vehículo de control (DMSO) no mostró un efecto significativo sobre la expresión de quimiocinas. Para los experimentos de LPS provocado (barras oscuras) el efecto supresor del OxBC se evaluó con respecto a las células tratadas solamente con LPS, utilizando la prueba t de Student. El tratamiento de OxBC de fibroblastos vírgenes (barras claras) dio como resultado una tendencia a la disminución de la expresión de MCP-1 y RANTES. Los efectos de OxBC sobre la expresión de quimiocinas en células vírgenes se evaluaron con respecto a las células de control no tratadas.

Descripción detallada

La divulgación proporciona composiciones y métodos para la administración de un carotenoide transformado oxidativamente. Las composiciones pueden ser útiles para mejorar la salud y el bienestar de un animal. Específicamente, las composiciones pueden resultar útiles para incrementar la movilidad articular, incrementar la actividad y mejorar la calidad del pelaje en un animal. Se pueden formular las composiciones en una forma farmacéutica unitaria comestible o formularse en un gel o pasta comestible.

Las composiciones de la divulgación pueden incluir uno o más agentes de mejora de la palatabilidad, que incluyen, sin limitación, agentes saborizantes a base de lácteos, una mezcla de hierbas y especias naturales, sabor artificial a huevo, sabor artificial a carne, sabor artificial a pollo, sabor artificial a pescado, sabor a levadura o combinaciones de los mismos. Dichos agentes de mejora de la palatabilidad son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los agentes de mejora de la palatabilidad pueden incluir proteína vegetal hidrolizada, mezclas de saborizantes y especias naturales (vendidas como Sirius Stuff™ y adobo Dog Bone, fabricado por Dirigo Corp.); carne vegetariana, beicon vegetariano o ajo asado (fabricado por Geneva Ingredients, Inc.); mezclas de leche desnatada seca, leche malteada, suero y otros productos (vendidos como All diary Blend™); saborizantes de levadura (vendido como levadura de cerveza seca de Brewtech™); mezclas de proteínas animales y grasa formulada para reemplazar el huevo entero (vendido como Eggsact™); mezclas de polvos de producto de queso blanco y amarillo y corteza de queso (vendidas como Cheese Plus Cheese™, fabricadas por International Ingredients Corp.); mantequilla de cacahuete y pollo artificial (fabricados por Bush Bake Allan Americas); y/o carne artificial (fabricada por Pharmachemie en Syracuse, Nebraska).

Comida para mascotas

La formulación de comidas para mascotas con un carotenoide transformado oxidativamente según la divulgación puede ser en cualquier forma adecuada, por ejemplo un polvo, una croqueta seca o gránulo u otra fórmula seca, forma extruida, forma semihúmeda o húmeda, tal como una tajada o rodaja o pudín. Puede ser refrigerado o proporcionarse como un producto estable.

Mientras se contemplan composiciones de cualquier consistencia o contenido de humedad, preferentemente las composiciones alimentarias de la presente divulgación pueden ser, por ejemplo, una composición alimentaria para animales húmeda, semihúmeda o seca. La comida "húmeda" se refiere a comida que tiene un contenido de humedad de aproximadamente 70 a 90 %. La comida "semihúmeda" se refiere a comida que tiene un contenido de humedad de aproximadamente 15 % a 40 %. La comida "seca" se refiere a composiciones de aproximadamente 5 % al 15 % de contenido de humedad y a menudo se fabrica en forma de trocitos o croquetas pequeños. También se contemplan en el presente documento composiciones que pueden comprender componentes de diversa consistencia, así como componentes que pueden incluir más de una consistencia, por ejemplo, partículas similares a carne blandas, masticables, así como croquetas que tienen un componente de cereales exterior y un componente cremoso interior como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.517.877. La croqueta puede, a continuación, secarse y revestirse opcionalmente con uno o más revestimientos tópicos conocidos por los expertos

en la materia, por ejemplo, saborizantes, grasas, aceites, polvos y similares. Las composiciones de la presente divulgación se pueden preparar utilizando métodos de fabricación convencionales.

Formas farmacéuticas unitarias comestibles

5 Un carotenoide transformado oxidativamente se puede incorporar en una composición sólida comestible en forma farmacéutica unitaria (es decir, un masticable, una croqueta, un comprimido masticable o una golosina blanda comestible).

10 Productos masticables

Uno de los principales atributos de los productos masticables es una dureza y flexibilidad hasta el punto en el que le lleva al animal (es decir, un perro) un tiempo largo (por ejemplo, más de 30 segundos o 1 minuto) consumir el producto. Se han utilizado numerosas partes del cuerpo de cerdos y ganado tales como huesos, orejas, pezuñas y piel para producir golosinas para perros apetitosas con tiempos de masticación prolongados. Una gran mayoría de los productos de estilo masticable están hechos a partir de cuero sin curtir, un material de partida económico e incluye saborizantes y/o fragancias para hacer el masticable apetitoso para los animales.

15 En la técnica se conocen métodos para producir masticables. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 2.988.045 describe el procesamiento de cuero sin curtir en capas a las que se puede dar forma y deshidratar para producir un masticable; la patente de Estados Unidos n.º 4.702.929 describe un método para extruir la fracción de subproductos de cuero sin curtir, llamados retales (en inglés, spetches), con almidón para formar un masticable con forma de palo; la patente de Estados Unidos n.º 5.047.231 describe la inclusión de una sal pirofosfato inorgánica en el cuero sin tratar para formar un masticable capaz de reducir la acumulación de tártaro; la patente de Estados Unidos n.º 6.223.693 describe un método para macerar cuero sin curtir en un humectante y un aglutinante comestible blando para producir un masticable flexible; la patente de Estados Unidos n.º 6.840.196 describe un masticable multicapa en el que las capas interiores están impregnadas con un saborizante; la patente de Estados Unidos n.º 6.895.900 describe un producto masticable hecho a partir de la combinación de cuero sin curtir y cuero de cerdo; la patente de Estados Unidos n.º 6.886.497 describe un producto masticable hecho a partir de cuero sin curtir o cuero de cerdo e infundido con un saborizante; y la patente de Estados Unidos n.º 5.635.237 describe la fusión de desechos de cuero sin curtir dentro de un extrusor de tornillo doble para producir cordones que se pueden cortar y atar para producir un hueso de cuero sin curtir anudado formulado. En la técnica también se conocen productos masticables basados en vegetales y en resina de polímero (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.821.538; 6.159.516; 6.110.521; 6.093.427; y 5.941.197). Muchos productos masticables exitosos comercialmente incorporan una fracción de carne en el producto para incrementar la palatabilidad del masticable (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.673.653; 6.277.420; 6.886.496). El carotenoide transformado oxidativamente se puede incorporar en cualquiera de los productos masticables descritos anteriormente.

40 Productos de croquetas

Las croquetas son un producto comestible semihúmedo hecho utilizando un proceso de extrusión por horneado o cocción que forma la croqueta a temperatura elevada en cualquier forma deseada. Los aditivos, tales como antioxidantes, nutrientes, vitaminas, minerales y similares, frecuentemente se mezclan con los ingredientes de las croquetas antes de la cocción/formación o envuelven la croqueta tras el procesamiento.

45 En la técnica se conocen bien métodos para producir croquetas. Por ejemplo, los ingredientes secos, incluyendo, fuentes de proteínas animales, fuentes de proteínas de plantas, granos, etc., se muelen y mezclan juntos. Los ingredientes húmedos o líquidos, incluyendo las grasas, aceites, fuentes de proteínas animales, agua, etc., se añaden a continuación y se mezclan con los ingredientes secos. A continuación, la mezcla se procesa en croquetas. Las croquetas se pueden formar utilizando un proceso de extrusión en el que la mezcla de ingredientes secos y húmedos se somete a trabajo mecánico a presión y temperatura elevadas y se fuerza a través de pequeñas aperturas y se corta en croquetas mediante una cuchilla rotatoria. La croqueta húmeda, a continuación, se seca y se reviste opcionalmente con uno o más revestimientos tópicos, que puede(n) incluir, por ejemplo, saborizantes, grasas, aceites y/o polvos. La croqueta también se puede hacer a partir de masa utilizando un proceso de cocción, más que por extrusión, en el que la masa se coloca en un molde antes del procesamiento por calor seco.

El carotenoide transformado oxidativamente se puede incorporar en un producto de croquetas antes del procesamiento o por revestimiento del producto de croquetas después de que se forme la croqueta.

60 Comprimidos masticables

El carotenoide transformado oxidativamente se puede incorporar a un comprimido masticable. Por ejemplo, el carotenoide transformado oxidativamente se puede mezclar con un agente aglutinante y un potenciador de la palatabilidad y transferir la mezcla a una prensa de comprimidos y comprimirla en un comprimido a una presión de compresión adecuada. En la técnica se conocen métodos para producir comprimidos masticables apetitosos para la administración de agentes terapéuticos a animales de compañía (véanse, por ejemplo, la publicación de patente de

Estados Unidos n.º 20030190343 y la patente de Estados Unidos n.º 4.234.575).

Golosinas comestibles blandas

- 5 Las golosinas comestibles blandas son productos comestibles sólidos y semisólidos que son flexibles (es decir, con la consistencia similar a la de un perrito caliente).

10 Las golosinas comestibles blandas incluyen formas farmacéuticas con textura gomosa hechas a partir de pectina, almidón o gelatina (es decir, una formulación similar a un 'osito de goma'). Normalmente, el almidón produce una textura más reducida (mordisco más limpio, menos masticable) que la gelatina. Los ingredientes de la composición se pueden combinar, preferentemente mezclando en agua, que se calienta suficientemente para formar el gel y a continuación, que se pueda extraer, moldear o cortar en las formas deseadas por medios que son bien conocidos en este campo. La composición gelificada resultante será normalmente semisólida. Tales formas farmacéuticas, incluyendo saborizantes y fragancias para potenciar la palatabilidad de la golosina comestible blanda, son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las golosinas para perros con vitaminas masticables de Gummy Bear BQ).

15 Se puede incorporar un carotenoide transformado oxidativamente en cualquiera de las golosinas comestibles blandas descritas anteriormente.

20 **Pastas y geles comestibles**

Se puede incorporar un carotenoide transformado oxidativamente a un gel o pasta comestible.

25 Por ejemplo, un carotenoide transformado oxidativamente se puede incorporar a un gel o pasta comestible. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, sin limitación, goma arábiga, gati, tragacanto, goma guar, goma garrofín, agar, algina, carragenina, pectina, quitina, gelatina, amilosa y amilopectina.

30 Se puede preparar una pasta comestible de la divulgación a partir de diversos ingredientes que incluyen, sin limitación, una preparación molida de carne, pescado, aves de corral, queso, fruta, frutos secos, vegetales o combinaciones de los mismos. Entre los ingredientes adicionales se pueden incluir aceite, emulsionantes, antioxidantes (por ejemplo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butil hidroquinona terciaria), conservantes naturales, agua, caldo, zumo, edulcorante y colores y saborizantes naturales o artificiales y goma arábiga (acacia).

35 En la técnica se conocen métodos para producir geles y pastas comestibles (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes PCT (Tratado de Cooperación de Patentes) n.º WO2007/011330; WO 98/47392; WO2004/039171; y WO9945792). La patente de Estados Unidos n.º 7.001.889 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20070298077 describen métodos para preparar una pasta para administrar una sustancia terapéutica en de una pasta comestible.

40 Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos expertos en la materia una divulgación y una descripción completas sobre la manera en la que los métodos y compuestos reivindicados en el presente documento se realizan, hacen y evalúan y están destinados a ser puramente ejemplares y no están destinados a limitar el ámbito de la invención.

45 **Ejemplo 1. Carotenoide transformado oxidativamente (OxBC) en perros mayores.**

Recibieron OxBC (0,5 mg/kg/día) siete perros mayores de propiedad privada, de edad 8-15, como un suplemento oral mezclado con un vehículo de queso cremoso.

50 Al comienzo del estudio, la mayoría de los propietarios de los perros caracterizaron a sus animales como apáticos con un menor deseo de realizar actividades al aire libre. Tras la suplementación con OxBC durante cuatro meses, estos propietarios informaron de que sus perros mostraron un comportamiento mejorado y estuvieron más dispuestos a salir al exterior y jugar. La calidad del pelaje mejorada, como se indica por una muda reducida y una apariencia más brillante, fue un beneficio adicional del OxBC del que informaron algunos propietarios.

55 Tras cinco meses recibiendo OxBC los perros dejaron de recibir el suplemento durante siete semanas. Durante este período de siete semanas, los propietarios informaron de que el deseo de actividad de sus perros pareció volver a los niveles anteriores al estudio. Tras reiniciar el suplemento de OxBC, estos mismos propietarios informaron de que sus perros una vez más respondieron positivamente, mostrando niveles de actividad incrementada y movilidad mejorada.

60 **Ejemplo 2. Estudio clínico del carotenoide transformado oxidativamente (OxBC) en perros.**

65 Se llevó a cabo un ensayo clínico para evaluar la eficacia de los productos de oxidación de carotenoides en perros utilizando OxBC como un suplemento. Hubo mejoras significativas en la calidad del pelaje y la muda, así como una tendencia hacia la mejora del disfrute del paseo, en perros tratados en comparación con controles.

El estudio clínico consistió en un estudio ciego, aleatorizado con dos grupos de tratamiento. Se reclutaron cuarenta y seis perros del público. Los perros se asignaron aleatoriamente al tratamiento (0,5 mg de OxBC/kg de peso corporal en queso cremoso) o al placebo (queso cremoso únicamente) según se incorporaron, independientemente de la

5 raza, edad, sexo y condición de castración y si el animal tenía algunas afecciones médicas, recibía alguna medicación o estaba recibiendo cualquier suplementación nutricional adicional. El propietario administró el tratamiento o el placebo una vez diariamente durante un periodo de seis meses. Este estudio se realizó con la supervisión y aprobación del comité de cuidado animal de la University of Prince Edward Island.

10 Al inicio de la prueba, los propietarios de los perros participantes rellenaron un formulario de inscripción, que detallaba la información general sobre el perro (es decir, raza, edad, estado de salud). A continuación, antes de la prueba, se pidió a los propietarios que rellenaran un cuestionario (Cuestionario 1). Al final del período de seis meses, se pidió a los propietarios que rellenaran un segundo cuestionario (Cuestionario 2). En los cuestionarios se pedía a los propietarios calificar el comportamiento de su perro, utilizando medidas numéricas, con respecto al nivel y

15 disfrute de la actividad física (paseos), así como el apetito de su perro y la calidad de su pelaje. Para el Cuestionario 2, además de la clasificación numérica, se pidió a los propietarios que anotaran cualquier cambio en los comportamientos específicos, apetito y calidad del pelaje durante los seis meses de participación en el estudio. Para cada cuestión, se les dio a los participantes múltiples opciones de respuesta, así como una opción para proporcionar detalles adicionales.

20 Resultados iniciales de medio estudio a los tres meses:

Además de completar cuestionarios al inicio y al final del estudio, se contactó con los propietarios del estudio por teléfono o por correo electrónico en el punto intermedio (3 meses) para evaluar el progreso del estudio y recoger

25 impresiones iniciales del suplemento con OxBC. Durante estas evaluaciones trimestrales, los propietarios de varios perros que recibían tratamiento con OxBC, informaron de mejoras en sus animales, incluyendo el incremento de la movilidad y de los niveles de energía, mejora de la calidad del pelaje (es decir, pelaje mejorado de áspero a brillante y sedoso), disposición a salir de paseo incrementada y reducción de las manchas de pigmentación en los ojos (manchas de edad marrones). Cabe destacar que, algunos perros con mejoría observada de la movilidad y los

30 niveles de energía, habían sido caracterizados anteriormente como apáticos por sus propietarios debido a la artritis, la cojera debido a la cirugía del ligamento cruzado y otras condiciones que causaban inmovilidad.

Resultados finales del ensayo clínico a los seis meses:

35 Los resultados en el análisis final de este estudio se obtuvieron de dos fuentes. La primera fue categórica en su naturaleza y se basó en la clasificación o en la puntuación de comportamientos específicos de los propietarios, apetito y apariencia del pelaje, antes y después del periodo de tratamiento. El segundo conjunto de resultados consistió en los resultados modificados de acuerdo con los comentarios específicos de los propietarios. Por ejemplo, el resultado "muda" se derivó de respuestas al resultado "calidad del pelaje".

40 Se crearon siete variables para el primer conjunto de resultados, que consisten en las diferencias en las respuestas entre el Cuestionario I y el Cuestionario II. A continuación, se utilizó el procedimiento de modelos generales lineales (Proc GLM) del paquete de software SAS (Statistical Analysis System para ordenadores personales, Versión 9, SAS Institute, Cary, Carolina del Norte) para probar la asociación simple entre el tratamiento y cada una de estas

45 variables de diferencia. Se investigaron las variables resultado con un P -valor $< 0,35$ adicionalmente en modelos multivariantes. Se probó primero la significación de las covariantes potenciales (edad, sexo, categoría peso, adherencia al régimen de tratamiento, salud y condición de castración) en un modelo univariante con cada una de las variables dependientes. Se utilizó un P -valor arbitrario de $< 0,20$ para la inclusión inicial de covariables en el modelo completo. A continuación, se utilizó un proceso de eliminación manual escalonado hacia atrás para eliminar las variables de los modelos con un P -valor $> 0,05$. El tratamiento se manejó como un efecto fijo. Se probó la significación de todos los términos de interacción relevantes. Se obtuvo un modelo final donde todos los términos de interacción y variables en el modelo, con la excepción del tratamiento, fueron significativos al nivel del 5 %. Se consideró el efecto del tratamiento estadísticamente significativo en el modelo final para cada uno de estos resultados si el P -valor asociado fue inferior o igual a 0,10.

55 Para cada uno del segundo conjunto de resultados, se graficaron las proporciones de perros tratados y control que tienen una respuesta potenciada o reducida tras el periodo de tratamiento (Figura 1). Las variables específicas se seleccionaron para un análisis de Chi cuadrado basado en las diferencias entre la proporción de perros Tratados frente a Control y el conocimiento presente del modo de acción del OxBC. Se aplicó una transformación de raíz cuadrada a la variable "calidad del pelaje potenciada" y se sometió esta variable al análisis usando el procedimiento GLM. El peso, edad, sexo, condición de castración, adherencia al régimen de tratamiento, suplementos proporcionados y estado de salud, se probaron como covariables a continuación. Las covariables se consideraron significativas en el modelo final si $P \leq 0,10$.

65 El análisis de la varianza para el primer conjunto de resultados para las diferencias entre los Cuestionarios 1 y 2 indicó una asociación potencial entre el tratamiento OxBC y el resultado "disfrute del paseo" ($P < 0,35$). Por lo tanto,

este resultado se seleccionó para análisis adicionales utilizando Proc GLM para calcular el posible efecto de las covariables (sexo, edad, condición de castración, categoría peso, adherencia al régimen de tratamiento y salud) sobre la asociación observada.

5 En modelos univariantes, se encontró que el estado de salud resultó un indicador significativo de las puntuaciones de "disfrute del paseo" ($P < 0,05$), sin embargo, esta variable no fue significativa ($P = 0,30$) cuando se incluyó en el modelo completo y por tanto se eliminó. En el modelo final (que contuvo solo el tratamiento), los perros Tratados tuvieron una puntuación promedio más elevada para el disfrute del paseo que el grupo Placebo (dos colas $P = 0,15$; una cola $P = 0,08$).

10 Se seleccionaron del segundo conjunto de resultados para análisis adicionales la "calidad del pelaje potenciada", "apetito disminuido", "nivel de actividad incrementado" y "muda disminuida". Los resultados de las pruebas de Chi cuadrado para las diferencias en las proporciones de perros Tratados y Placebo para cada uno de estos resultados se muestran en la Tabla 1. Hubo un incremento significativo ($P = 0,05$, pruebas de una cola) en la proporción de perros tratados que tenían la calidad del pelaje potenciada y la muda disminuida ($P = 0,04$, pruebas de una cola), en comparación con los controles. Los análisis adicionales del resultado de la calidad del pelaje potenciada utilizando el procedimiento GLM y la transformación de raíz cuadrada, indicaron que los perros tratados tuvieron puntuaciones de calidad del pelaje potenciada promedio más elevadas significativamente cuando se controlan por el peso ($P < 0,037$).

20 Tabla 1

Variable	Tratamiento	Proporción afectada	P-valor	
			Dos colas	Una cola
Calidad del pelaje potenciada	OxBC	0,37	0,10	0,05
	Placebo	0,16		
Apetito disminuido	OxBC	0,18	0,45	0,23
	Placebo	0,11		
Nivel de actividad incrementado	OxBC	0,30	0,51	0,25
	Placebo	0,21		
Muda disminuida	OxBC	0,11	0,07	0,04
	Placebo	0,00		

Además de recoger datos de los cuestionarios formales, los propietarios también pudieron mantener una entrevista con el coordinador del estudio para conversar sobre el estado de salud de sus animales. Estas conversaciones se mantuvieron al trimestre y al final del estudio. Las conversaciones trimestrales revelaron tres tendencias generales para los perros que recibían OxBC con respecto al grupo que recibía placebo, en concreto: 1) niveles de actividad incrementados, 2) disposición al paseo incrementada y 3) aspecto del pelaje más brillante. Asimismo, las conversaciones finales mantenidas al final del estudio, confirmaron que los efectos positivos informados al trimestre, se mantuvieron durante la segunda mitad de la prueba.

30 Un caso de estudio realizado con OxBC con un solo perro produjo resultados positivos que reflejaron considerablemente los hallazgos del ensayo clínico. Se hizo un seguimiento de un terrier tibetano (14 años) durante un periodo de 18 meses. El perro recibió OxBC (0,5 mg/kg de peso corporal) además de su rutina nutricional diaria regular (que incluyó glucosamina y vitaminas) durante los primeros ocho meses del estudio, punto en el que se retiró el OxBC durante dos meses.

35 La administración de OxBC se retomó durante ocho meses adicionales. La información del estado de salud del perro se obtuvo mediante la examinación personal del perro por el veterinario coordinador, comunicación personal entre el propietario y el veterinario y de las respuestas del dueño a una serie de cuestiones estandarizadas respecto a la salud del animal.

40 El propietario informó que antes de recibir el suplemento de OxBC, el perro estaba apático, desanimado y reacio a salir a pasear. Sin embargo, después de los primeros tres meses de suplementación con OxBC, el nivel de actividad del perro se elevó y estuvo más dispuesto a salir de paseo. Tras seis meses de suplemento, el perro mostró niveles de actividad mucho mayores, corría durante los paseos de forma rutinaria y tenía una apariencia más saludable en conjunto. Cuando el suplemento se retiró durante dos meses, el propietario informó de que el perro volvió a su estado apático anterior. Tras retomar el suplemento de OxBC, el perro de nuevo mostró niveles de actividad incrementados y disposición de salir al exterior. El propietario también informó de que la calidad del pelaje del perro se había incrementado durante el transcurso del estudio, tornándose más grueso y brillante.

50 Los hallazgos clave de la investigación clínica de la prueba de concepto son que la suplementación de OxBC conduce a una calidad de pelaje y a niveles de actividad mejorados en perros y estos hallazgos se apoyan en los resultados de un caso de estudio con un único perro. Además, no se ha informado de efectos adversos en perros que reciben OxBC, confirmando la seguridad de este producto para su uso en perros. Estos resultados subrayan el potencial del OxBC como un suplemento de salud dietético para perros y otros animales de compañía.

55

Se informo de que todos los perros que participan en los estudios de los Ejemplos 1 y 2 recibieron suplementos adicionales durante periodos prolongados de hasta varios años antes de que los estudios de OxBC empezaran. Estos suplementos adicionales incluyeron aceite de pescado, glucosamina y otros productos varios antiinflamatorios.

- 5 Es notable el hecho de que OxBC es capaz de mejorar la salud general del animal al nivel de actividad, movilidad articular y calidad del pelaje en perros que ya estaban recibiendo suplementos conocidos para dirigirse a estos parámetros. Estas observaciones sugieren que la capacidad aparente del OxBC para mejorar la salud general de los animales sucede mediante un modo de acción que es diferente al de otros suplementos utilizados comúnmente.

10 **Ejemplo 3. Estudios *in vitro*.**

Se utilizaron cultivos establecidos de osteoblastos caninos, condrocitos y fibroblastos así como células dendríticas y monocitos primarios aislados, como sistemas modelo para evaluar los efectos del OxBC sobre la inmunidad canina. Se utilizó citometría de flujo para evaluar la capacidad del OxBC para regular al alza la expresión de receptores inmunitarios innatos y para potenciar la actividad de células efectoras inmunitarias innatas. Se utilizó un enfoque de PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) para evaluar los cambios en la expresión de reguladores de respuesta inflamatoria/inmunitaria, que se han identificado previamente como contribuyentes potenciales o dianas terapéuticas en la patología de la artritis.

20 **Métodos experimentales**

Citometría de flujo: Se sembraron osteoblastos, condrocitos o células dendríticas ($0,5 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^5$) en placas de 6 pocillos durante 24 horas antes del tratamiento con OxBC. Las células se trataron a continuación con las concentraciones indicadas de OxBC o DMSO equivalente (vehículo de control) en medios completos durante 24 horas y a continuación, se procesaron para el análisis de la expresión de receptores, utilizando citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos primarios marcados con ficoeritrina (PE) que reconocen los CD-14, TLR-2 y TLR-4 caninos para evaluar la expresión de receptores utilizando un marcaje de inmunofluorescencia directo y un análisis de citometría de flujo. En resumen, se incubaron alícuotas de células por triplicado en tampón frío (PBS que contiene FBS al 10 % y azida sódica al 1%) con anticuerpo primario (10-20 μ l) durante 45 min a temperatura ambiente en condiciones de poca luz. Las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en 100 μ l de tampón para el análisis utilizando un instrumento FACS Array. Las células sin marcar y las células marcadas solo con anticuerpo sirvieron como controles.

Fagocitosis: Se sembraron monocitos primarios caninos (1×10^6 células/pocillo) en placas de 6 pocillos y se dejó que se recuperaran durante 24 horas. Las células se trataron con las concentraciones indicadas de OxBC o de vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. Las células tratadas con miristato de forbol (PMA, 25 ng/ml) se utilizaron como controles positivos y las células no tratadas se utilizaron como controles negativos. Después del tratamiento, se eliminaron los medios de cultivo, las células se lavaron con tampón y se añadieron medios de cultivo nuevos que contenían perlas de látex marcadas fluorescentemente. Para las células de control negativo los medios nuevos contenían 5 μ l de solución de perlas de látex, para los grupos OxBC y vehículo de control los medios nuevos contenían la concentración indicada de OxBC o de DMSO junto con 5 μ l de solución de perlas de látex, los medios para el grupo de control positivo contenían PMA junto con 5 μ l de solución de perlas de látex. A continuación, se permitió a las células fagocitar las perlas de látex durante una incubación de 2 horas. Tras la incubación, se eliminaron las perlas sin envolver mediante lavados múltiples y se prepararon las células para el análisis mediante citometría de flujo. La capacidad del OxBC para potenciar la actividad fagocítica de los monocitos se evaluó mediante la determinación de la cantidad de perlas envueltas utilizando detección fluorescente mediante análisis FACS.

Evaluación por QRT-PCR de reguladores inflamatorios: Se sembraron fibroblastos caninos (CF52.Tr) (1×10^6 células/pocillo) en placas de 6 pocillos y se pretrataron con OxBC (5 μ M) o vehículo de control (DMSO) durante 24 horas. Tras el pretratamiento se eliminaron los medios de cultivo y se reemplazaron con medios nuevos.

Con el modelo de tratamiento virgen, los medios nuevos contenían OxBC (5 μ M) o concentración equivalente de DMSO. Con el modelo de tratamiento provocado, los medios nuevos contenían OxBC (5 μ M) o concentración equivalente de DMSO junto con LPS (30 μ g). Las células se incubaron durante 4 horas adicionales y a continuación, se procesaron para el aislamiento de ARN total. El ARN (0,5 μ g) se transcribió de forma inversa en ADNc en un volumen de reacción de 20 μ l y se utilizó 1 μ M de ADNc como molde para el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) utilizando la química de SYBR-green. Los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando β -actina como un control interno con corrección para diferentes eficacias de PCR. Los efectos del tratamiento sobre la expresión génica se muestran con respecto a células de control sin tratar y se evaluó la capacidad del OxBC para reducir la expresión de quimiocinas proinflamatorias mediante la comparación con células tratadas con LPS solamente.

Resultados: Los resultados mostrados en las Figuras 2-4 demuestran la capacidad del OxBC para incrementar la abundancia de los receptores inmunitarios innatos sensibles a patógenos en múltiples tipos de células caninas. El tratamiento de OxBC indujo incrementos en la expresión superficial de los subtipos-2 y 4 del receptor de tipo toll así

como del CD-14. Estos receptores son responsables de alertar al sistema inmunitario de la presencia de patógenos bacterianos invasores. La capacidad del OxBC para regular al alza la expresión de estos receptores inmunitarios en tipos celulares tales como los osteoblastos y condrocitos, que no son efectores primarios del sistema inmunitario pero que juegan un papel secundario en la inmunidad, subraya el potencial del OxBC para potenciar significativamente la inmunidad a nivel tisular. A un nivel funcional, el tratamiento de OxBC de monocitos primarios caninos indujo un incremento en la actividad fagocítica (Figura 5). La fagocitosis es un mecanismo fundamental utilizado por efectores inmunitarios innatos para eliminar patógenos invasores. Estos resultados, tomados juntos, sugieren que el OxBC actúa para preparar el sistema inmunitario innato canino para detectar más eficazmente y responder a infecciones bacterianas incipientes.

Los resultados mostrados en la Figura 6 demuestran la capacidad del OxBC para reducir el nivel de expresión de ciertos reguladores de quimiocinas de inflamación en el contexto de una provocación proinflamatoria con lipopolisacárido bacteriano (LPS). El MCP-1 y RANTES juegan un papel importante en la dirección de la respuesta inflamatoria, sirviendo como quimioatrayentes para reclutar diversas células inmunitarias que incluyen macrófagos y linfocitos, para sitios de lesión o infección. Aunque una respuesta inflamatoria apropiada es un componente vital de la defensa inmunitaria, la desregulación de la respuesta inflamatoria, conducente a la sobreactivación, se asocia con varias enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide. Varios estudios informan de que la sobreexpresión de quimiocinas, tales como MCP-1 y RANTES, se asocia con enfermedades inflamatorias de las articulaciones, incluyendo la artritis. La capacidad del OxBC para reducir la expresión de estas quimiocinas proinflamatorias puede representar un mecanismo subyacente para explicar la mejoría en los niveles de movilidad y actividad observados en algunos de los perros en el ensayo clínico con OxBC.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un carotenoide transformado oxidativamente para su uso en:
 5 (i) un método para mejorar o mantener la calidad del pelaje de un animal, que comprende la administración de la composición al animal en una cantidad suficiente para mejorar o mantener la calidad del pelaje, (ii) un método para incrementar la movilidad articular de un animal, que comprende la administración de la composición al animal en una cantidad suficiente para incrementar la movilidad articular, (iii) un método para incrementar el nivel de actividad de un animal, que comprende administrar la composición al animal en una cantidad suficiente para incrementar el nivel de actividad, o (iv) un método para reducir la decoloración en un ojo de un animal que lo necesite, que comprende la
 10 administración de la composición al animal en una cantidad suficiente para reducir la decoloración, en el que el carotenoide transformado oxidativamente es una mezcla formada por la reacción de un carotenoide con 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno y que contiene un material oligomérico.
2. La composición de la reivindicación 1, para su uso en un método para incrementar la movilidad articular de un
 15 animal, que comprende la administración de la composición al animal en una cantidad suficiente para incrementar la movilidad articular.
3. La composición de la reivindicación 1, para su uso en un método para mejorar o mantener la calidad del pelaje de
 20 un animal, que comprende la administración de la composición al animal en una cantidad suficiente para mejorar o mantener la calidad del pelaje.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho animal es un gato o un perro.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición se administra diariamente.
 25
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que a dicho animal se le administra diariamente de
 0,1 mg/kg de peso corporal a 3 mg/kg de peso corporal de carotenoide transformado oxidativamente.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha composición se mezcla con comida y se
 30 administra por vía oral a dicho animal y en la que dicha comida opcionalmente es una comida animal húmeda o una comida animal seca o dicha comida opcionalmente está en la forma de una croqueta, un masticable, un comprimido o una golosina blanda comestible.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha composición se administra a dicho
 35 animal como un suplemento oral.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho suplemento oral es una pasta o gel apetitoso.
10. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición se proporciona en una composición sólida
 40 comestible en una forma farmacéutica unitaria que comprende:
- (a) de 2 mg a 130 mg de carotenoide transformado oxidativamente y se formula para ser apetitoso para los
 canes; o
 45 (b) de 0,25 mg a 14 mg de carotenoide transformado oxidativamente y se formula para ser apetitoso para los felinos; o
 (c) de 39 mg a 1.500 mg de carotenoide transformado oxidativamente y apetitoso para los équidos,
- en la que dicha forma farmacéutica unitaria opcionalmente es una croqueta, un masticable, un comprimido o una
 50 golosina blanda comestible.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha composición sólida comestible en forma farmacéutica
 unitaria se formula para ser apetitosa para canes, en la que dicha forma farmacéutica unitaria es un comprimido
 masticable y en la que dicha forma farmacéutica unitaria comprende de 1 mg a 75 mg de carotenoide transformado
 55 oxidativamente.
12. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición se presenta en un gel o pasta comestible
 apetitoso que comprende de 2 mg/cucharada a 750 mg/cucharada de carotenoide transformado oxidativamente.
13. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha administración comprende administrar a
 60 dicho animal, una dosificación de 0,05 mg/kg de peso corporal/día a 3 mg/kg de peso corporal/día; o en la que dicha administración comprende administrar a dicho animal, una dosificación de 0,25 mg a 130 mg; o en la que dicha administración comprende administrar a dicho animal, una dosificación de 20 mg a 2.000 mg.
14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el carotenoide se selecciona de
 65 licopeno, β -caroteno o cantaxantina.

15. Un kit que comprende:

- 5 (i) la composición como se define en la reivindicación 1 que comprende un carotenoide transformado oxidativamente, en el que el carotenoide transformado oxidativamente es una mezcla formada por la reacción de un carotenoide con 6 a 8 equivalentes molares de oxígeno y que contiene un material oligomérico,
- (ii) comida para perros, en la que dicha comida para perros opcionalmente es una comida para perros seca o una comida para perros húmeda, o comida para gatos, en la que dicha comida para gatos opcionalmente es una comida para gatos seca o una comida para gatos húmeda, e
- 10 (iii) instrucciones para dar de comer a un perro una cantidad de la composición que contiene de 2 mg a 130 mg de dicho carotenoide transformado oxidativamente, o

instrucciones para dar de comer a un gato una cantidad de la composición que contiene de 0,25 mg a 14 mg de dicho carotenoide transformado oxidativamente,

15 en el que dicho kit opcionalmente se proporciona en un envase de una sola.

Figura 1

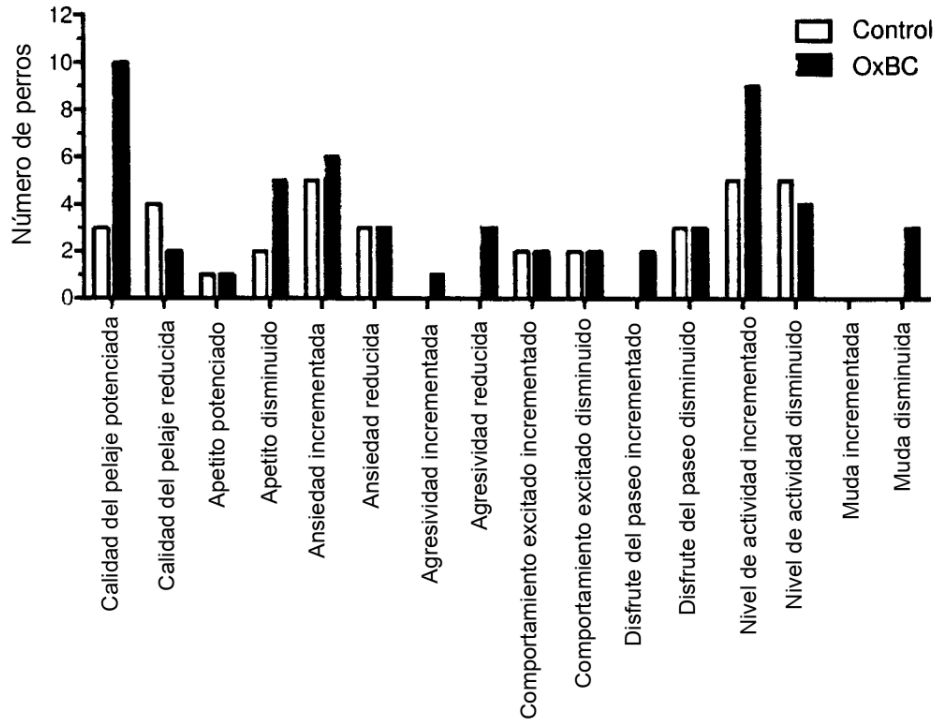


Figura 2

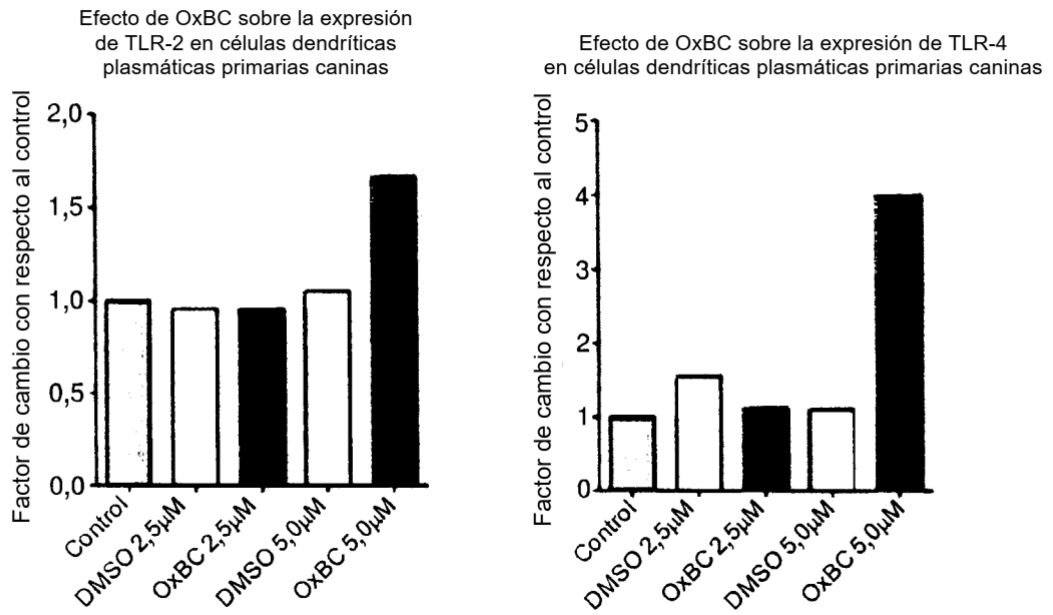


Fig. 2A

Fig. 2B

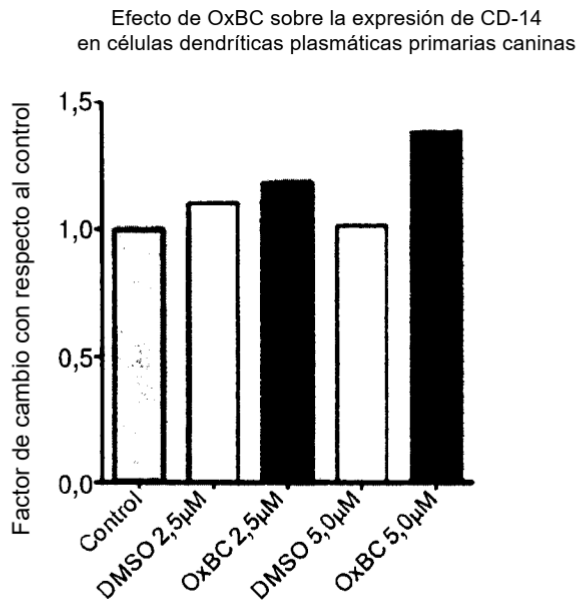


Fig. 2C

Figura 3

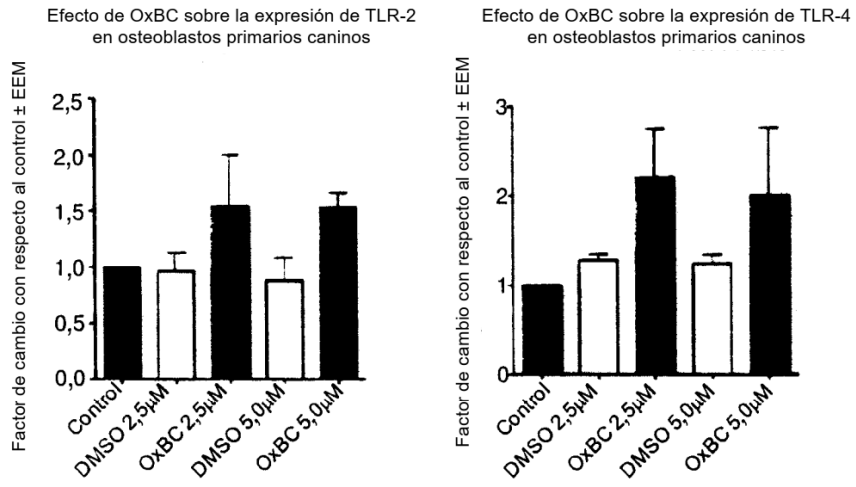


Fig. 3A

Fig. 3B

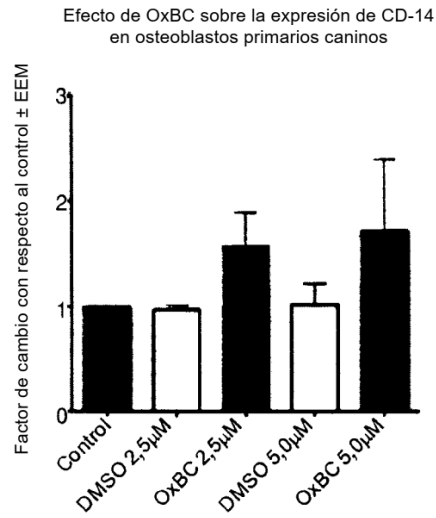


Fig. 3C

Figura 4

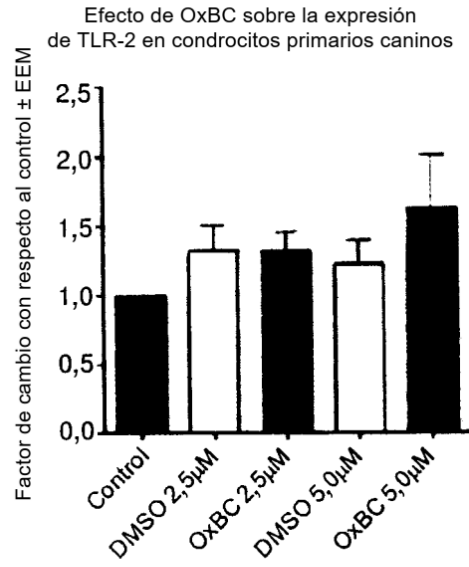


Fig. 4A

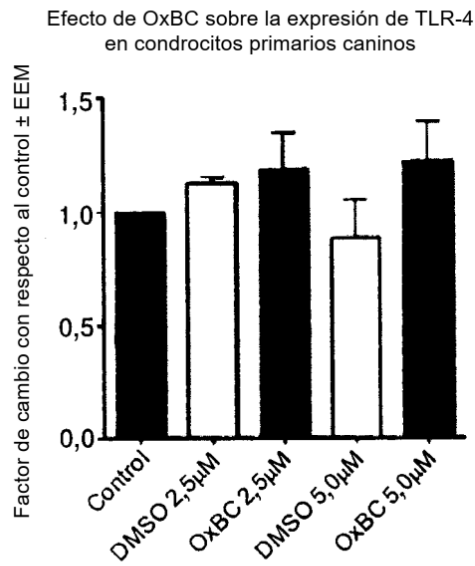


Fig. 4B

Figura 5

Fagocitosis en monocitos primarios caninos
tratados con OxBC

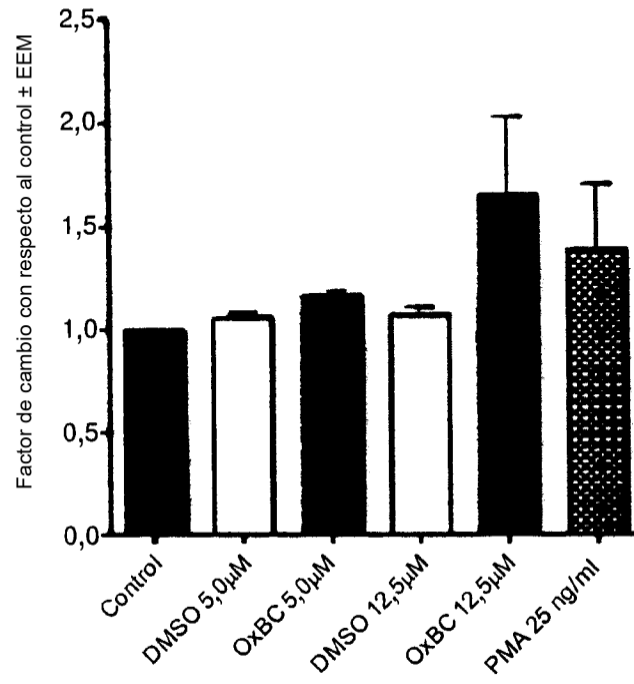


Figura 6

Expresión de MCP-1 en fibroblastos primarios caninos tras el tratamiento con OxBC + provocación con LPS

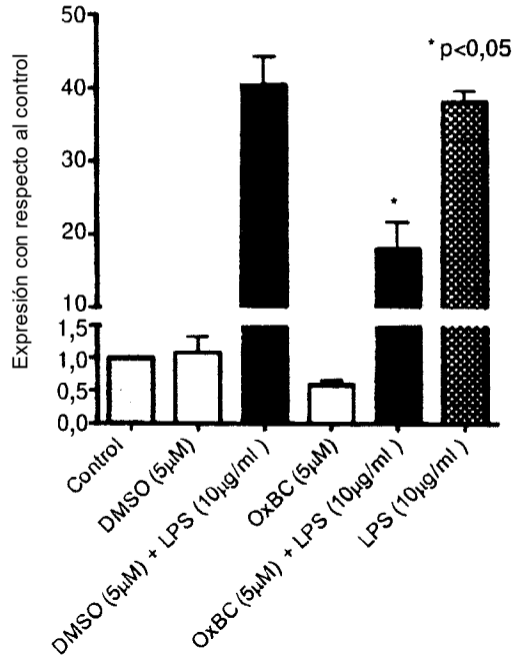


Fig. 6A

Expresión de RANTES en fibroblastos primarios caninos tras el tratamiento con OxBC + provocación con LPS

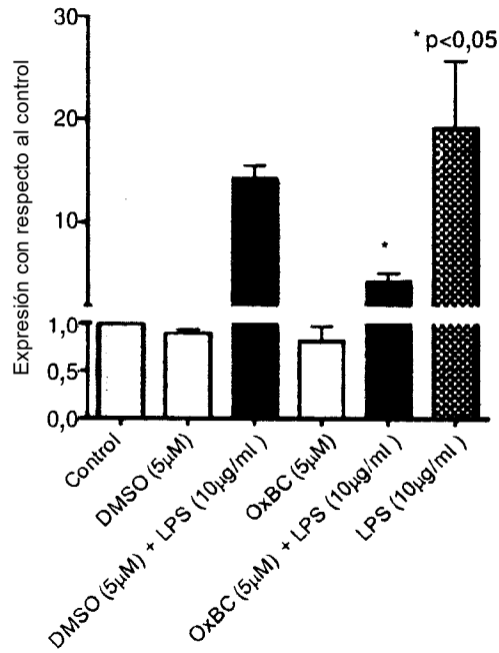


Fig. 6B