

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 246**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11720361 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2569639**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico, control y profilaxis de la inflamación y mitigación de condiciones inflamatorias en los caninos**

30 Prioridad:

**12.05.2010 US 334084 P**

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

**21.04.2015**

73 Titular/es:

**HILL'S PET NUTRITION, INC. (100.0%)  
400 Southwest 8th Street  
Topeka, KS 66603 , US**

72 Inventor/es:

**FRANTZ, NOLAN ZEBULON**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 534 246 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 para el diagnóstico, control y profilaxis de la inflamación y mitigación de condiciones inflamatorias en los caninos.

Campo de la invención

5 La descripción se refiere a métodos de diagnóstico, control y profilaxis de la inflamación y la mitigación de las condiciones inflamatorias, particularmente la artritis y el dolor en las articulaciones, en los caninos, que comprenden la medición de biomarcadores inflamatorios, en donde los niveles elevados de los biomarcadores en la sangre se correlacionan con la inflamación reducida y los niveles en sangre reducidos se correlacionan con un aumento de los niveles en los tejidos. La descripción provee además un método para tratar o controlar la inflamación que  
10 comprende, administrar una dieta que comprende un aumento de los niveles de uno o más de DHA, EPA, vitamina C, vitamina E, y/o L-carnitina. El alcance de la protección se define por las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad degenerativa de las articulaciones, más a menudo asociada con la osteoartritis, es una de las enfermedades musculoesqueléticas más comunes en los caninos. Bioquímicamente, la osteoartritis es la pérdida del equilibrio entre la síntesis y la degradación del cartílago articular que se encuentra en las articulaciones sinoviales. Esta puede incluir la inflamación que a menudo involucra la membrana sinovial. El ciclo de la inflamación conduce a una mayor degradación de la superficie articular que provoca dolor y cojera. La artritis es la causa más común de cojera en los caninos y se ha reportado que la incidencia afecta al 20% de los caninos mayores de 1 año. La artritis puede ocurrir como resultado de una carga anormal, trauma, infección/inflamación y rupturas del ligamento cruzado.  
20 Los factores de predisposición incluyen la edad, la raza, el tamaño, la obesidad y la genética. La comprensión de cómo la expresión de genes relacionados con el metabolismo del cartílago se altera en la artritis canina puede proveer información útil para el tratamiento y/o ayuda en el manejo de condiciones artríticas.

25 La osteoartritis es una enfermedad crónica degenerativa de las articulaciones, que es causada por la inflamación progresiva y el deterioro del cartílago, hueso y tejido blando de una o más articulaciones. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que causa inflamación y daño en las articulaciones. Ambas son condiciones inflamatorias crónicas. Debido a que el daño en las articulaciones es progresivo y principalmente irreversible, es deseable identificar y abordar el proceso inflamatorio de forma proactiva. Desafortunadamente, se ha demostrado que es difícil correlacionar la expresión de biomarcadores en la sangre con la expresión en el tejido, lo que hace difícil el diagnóstico antes de que la enfermedad conduzca a dolor severo y daño tisular irreversible.

30 Resumen de la invención

Sorprendentemente, en los caninos, vemos una correlación inversa entre la expresión de muchos biomarcadores inflamatorios en sangre en comparación con el tejido. Los niveles en sangre de los biomarcadores son mayores cuando se reducen los niveles de tejido y la inflamación asociada. Esta correlación inversa es inesperada y provee una forma novedosa para evaluar la presencia de inflamación en una etapa temprana.

35 Así, la descripción provee en un primer ejemplo un método de detección de una condición inflamatoria en un canino, que comprende medir los niveles sanguíneos de uno o más biomarcadores inflamatorios, en donde el aumento de expresión en sangre se correlaciona con la curación y la inflamación reducida en el tejido.

40 En un ejemplo adicional, la descripción provee un método de control y/o de profilaxis de la inflamación, o mitigación de las condiciones inflamatorias, particularmente la artritis y dolor en las articulaciones, en un canino, que comprende la identificación de la condición mediante la medición de niveles más bajos de los marcadores inflamatorios en la sangre, y la administración de una dieta que comprende aumento de los niveles de uno o más de DHA, EPA, vitamina C, vitamina e, y/o L-carnitina, por ejemplo, por un período de al menos dos semanas.

Descripción detallada de la invención

45 La dieta para uso en los métodos del presente documento incluye, por ejemplo, una dieta canina que comprende niveles incrementados de uno o más de DHA, EPA, vitamina C, vitamina E, y/o L-carnitina, por ejemplo, que comprende DHA + EPA 0.25-5% en una base de peso seco, por ejemplo una dieta que comprende, sobre una base de peso en seco:

DHA + EPA: 0.5 - 2.5%,

Vitamina C: 75-1000 mg/kg

Vitamina E: 250 -1000 mg/kg

L-carnitina: 100-1000 mg/kg

5 Por ejemplo, una dieta que tiene aproximadamente la composición nutricional de la dieta de ensayo del Ejemplo 1, que tiene los ingredientes en las cantidades aproximadas identificadas en la Tabla 1, +/- 10% sobre una base de peso seco.

Los biomarcadores de inflamación que se incrementan en la sangre cuando se reduce en el tejido incluyen, por ejemplo, uno o más biomarcadores seleccionados a partir de: IL-6, ADAMTS-4, IFNG, HAS2, BGN, SOX-9, ADAMTS-5, MMP3, ACP5, IL1A, TNC, HAS3, COMP, IGF-1, GHR, Xaa-Pro peptidasa, RANKL, SMAD7, PGE2, TLR9, PLOD1 y SCL2A9.

10 **Ejemplo 1 - Efecto de la dieta sobre los biomarcadores inflamatorios en caninos artríticos**

15 Se realizó un estudio para evaluar el efecto de una dieta de ensayo sobre los seleccionados genes relacionados con la artritis en sangre total, cuando se alimenta a los caninos con osteoartritis (OA). Se incluyeron en el estudio treinta y un beagles (peso inicial, 13.5 ± 1.27 kg, edad, 11.0 ± 2.23 años) con cojera y cambios radiográficos compatibles con OA en al menos una articulación. Todos los caninos fueron alimentados con un alimento de mantenimiento de control durante 28 días, seguido de una dieta de ensayo que contiene mayores niveles de EPA y DHA, Vitaminas C y E, y L-carnitina. Se recogieron muestras de sangre total en el último día del alimento de control y después de 14 días de dieta de ensayo. Se observó mejoría en las puntuaciones del examen ortopédico en estos caninos después de 14 días en la dieta de ensayo. Después de consumir la formulación de ensayo, durante 14 días, los caninos con OA tuvieron una mayor expresión de 22 genes (IL-6, ADAMTS-4, IFNG, HAS2, BGN, SOX-9, ADAMTS-5, MMP3, 20 ACP5, IL1A, TNC, HAS3, COMP, IGF-1, GHR, Xaa-Pro peptidasa, RANKL, SMAD7, PGE2, TLR9, PLOD1 y SCL2A9) que se demostró previamente que presentaban expresión inhibida en caninos con OA frente a geriátricos sanos y disminuyó la expresión de ANXA1 que anteriormente se demostró que presentaban expresión inducida. En resumen, la formulación del ensayo de alimentación para caninos con osteoartritis dio lugar a la reversión de los patrones de expresión de genes previamente observados en la sangre de caninos artríticos frente a geriátricos 25 sanos después de 14 días.

Tabla 1: Componentes nutricionales de la dieta de ensayo

Nutriente	Materia Seca
Proteína (%)	20
Grasa (%)	16
Carbohidratos (%)	51
Fibra cruda (%)	9
Carnitina (mg/kg)	351
Vitamina C (ppm)	225
Vitamina E (ppm)	585
DHA (%)	0.3
EPA (%)	0.5

El estudio utiliza el análisis genómico para sangre total Nanostring, para identificar los cambios en los genes seleccionados basándose en la literatura anterior, después de que los caninos con osteoartritis consumieron la dieta de ensayo.

30 Para este estudio, se identificaron treinta y un beagles castrados/estériles (peso inicial, 13.5 ± 1.27 kg, edad, 11.0 ± 2.23 años), con distintos grados de evidencia radiográfica de osteoartritis y una historia de la cojera. Todos los caninos fueron considerados por lo demás sanos por examen físico y perfil químico del suero. Todos los caninos

5 fueron vacunados contra el moquillo canino, adenovirus, parvovirus, bordetella, y la rabia, y ninguno tenía enfermedades sistémicas crónicas sobre la base de los resultados del examen físico, la determinación del hemograma completo, análisis bioquímicos séricos, análisis de orina y examen fecal para parásitos. Los caninos experimentaron enriquecimiento del comportamiento a través de interacciones con los demás, mediante la interacción diaria y tiempo de juego con los cuidadores, oportunidades diarias para correr y hacer ejercicio al aire y el acceso a los juguetes. Antes de la toma de muestra, todos los caninos fueron alimentados con una comida de control de mantenimiento basal durante 28 días. Se extrajo sangre y se recogió en tubos PAXgene y se almacenó a -80 °C, hasta su evaluación. Los genes para el análisis se seleccionaron basándose en la literatura publicada y los que tenían de las secuencias disponibles para el canino. Se utilizó tecnología Nanostring (Análisis de Expresión) para generar los datos de los 89 genes seleccionados.

15 Los genes se normalizaron basados en genes que fueron más estables a través de todas las muestras. Se consideraron diferentes entre los dos grupos de genes los que tienen una  $P < 0.05$  (tras el ajuste de la tasa de descubrimiento falso de  $Q = 0.1$ ) y una relación de cambio de al menos 1.25. Los genes de expresión inducida se muestran como relación de cambio positivos. Los genes de expresión inhibida se muestran como relación de cambio negativos.

Tabla 2: Efecto de la dieta de ensayo en la regulación de genes después de 14 días

Nombre del Gen	Símbolo del Gen	Día 14/Día 0	
		Relación de Cambio	valor-P
Interleucina 6	IL-6	3.2	0.01
ADAM metalopeptidasa con trombospondin tipo 1 motivo 4	ADAMTS-4	2.9	0.01
Interferón gamma	IFN-gamma	3.0	0.01
Ácido hialurónico sintasa 2	HAS2	2.7	0.01
Biglycan	BGN	2.8	0.01
Región determinante de sexo Y-box 9	SOX-9	2.8	0.01
ADAM metalopeptidasa con trombospondin tipo 1 motivo 5	ADAMTS-5	2.6	0.01
Interleucina 1A	IL-1A	1.7	0.01
Óxido nítrico sintasa 2A	NOS2A	2.1	0.01
Tenasin C	TNC	2.1	0.01
Ácido hialurónico sintasa 3	HAS3	1.9	0.01
Proteína de matriz oligomérica del cartílago	COMP	1.4	0.01
Factor de crecimiento insulínico tipo 1	IGF-1	1.4	0.01
Grelina	GHR	1.8	0.01
Osteonectina	SPARC	1.8	0.01
Peptidasa D	PEPD	1.3	0.01
Activador del receptor del ligando NF-kappa B	RANKL	1.4	0.01
Miembro de la familia SMAD 7	SMAD7	1.3	0.01

Nombre del Gen	Símbolo del Gen	Día 14/Día 0	
		Relación de Cambio	valor-P
Prostaglandina E2	PGE2	1.5	0.01
Receptor tipo Toll 9	TLR9	1.4	0.01
Plasminógeno	PLOD1	1.4	0.01
Transportador de glucosa SCL2A9	SCL2A9	1.3	0.01
Anexina A1	ANXA1	-1.3	0.01
Fibromodulin	FMOD	2.5	0.01
Proteína tipo proteoglicanos e hialuronano 1	HAPLN1	2.0	0.01
Factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago	GM-CSF	2.3	0.01
Factor de crecimiento inducido por c-fos (factor de crecimiento endotelial vascular D)	FIGF	2.0	0.01
Aggrecan 1	AGC1	2.1	0.01
Osteoadherina	OSAD	1.9	0.01
Metaloproteinasas de matriz 13	MMP-13	2.1	0.01
Factor de necrosis tumoral-alfa	TNF-a	1.3	0.01

5 El análisis de los perfiles de expresión génica de sangre total que utiliza la tecnología Nanostring encontró diferencias en 23 de los genes seleccionados entre caninos con osteoartritis y geriátricos normales. La mayoría de estos genes se expresan en la dirección opuesta de la que se informó anteriormente en el tejido del cartílago osteoartítico en los caninos. Sin embargo, después de que los caninos osteoartíticos consumieron la formulación de ensayo, el patrón de expresión génica se invirtió más bien como los caninos geriátricos sanos. Estos datos corroboran las respuestas clínicas medidas incluyendo la mejora de las puntuaciones ortopédicas y los biomarcadores del cartílago.

10 Los resultados del presente estudio mostraron reversión completa de los genes seleccionados que se encuentran al ser diferentes en caninos osteoartíticos frente a los geriátricos normales después de consumir la formulación de ensayo. Además de los cambios en la expresión génica, se observaron mejoras en las puntuaciones ortopédicas y biomarcadores del cartílago. Estos pueden ser marcadores útiles para demostrar la eficacia de los alimentos terapéuticos en caninos con OA.

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación de DHA, EPA, Vitamina C, Vitamina E y L-carnitina para su uso en el tratamiento o control de una condición inflamatoria en un canino, en donde la combinación para ser administrada a un canino es una dieta que consta de una base de peso seco:

5 proteína: 18 - 22%;

grasa: 14.4 -17.6%;

hidratos de carbono: 45.9 -56.1%;

fibra cruda: 8.1 - 9.9%;

L-carnitina: 315.9 - 386.1 mg/kg;

10 vitamina C: 202.5 - 247.5 mg/kg;

vitamina E: 526.5 - 643.5 mg/kg;

DHA: 0.27 - 0.33%; y

EPA: 0,45 - 0,55%.

15 2. La combinación de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en donde la condición para ser controlada o tratada es la osteoartritis.

3. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la dieta es para ser administrada durante un período de al menos dos semanas.