

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 601**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7004** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

**A61K 36/48** (2006.01)

**A61K 36/54** (2006.01)

**A61K 36/60** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013** E 13168825 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** EP 2805721

54 Título: **Imitación de los efectos metabólicos de las restricciones calóricas por administración de antimetabolitos de glucosa para mejorar la respuesta positiva en mamíferos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2019**

73 Titular/es:

**IAMS EUROPE B.V. (100.0%)**  
**Vosmatenweg 4**  
**7742 PB Coevorden, NL**

72 Inventor/es:

**DAVENPORT, GARY MITCHELL;**  
**SHOVELLER, ANNA KATHARINE;**  
**GOODING, MARGARET ANN y**  
**INGRAM, DONALD KEITH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 698 601 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

Imitación de los efectos metabólicos de las restricciones calóricas por administración de antimetabolitos de glucosa para mejorar la respuesta positiva en mamíferos

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al uso de antimetabolitos de glucosa para alterar la utilización de glucosa o de otras fuentes de carbohidratos y para imitar los efectos metabólicos de la restricción calórica con el propósito de mejorar la respuesta positiva en un mamífero.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Una de las técnicas más vigorosas para promover perfiles óptimos de glucosa e insulina es la restricción de calorías (CR) o miméticas de la restricción de calorías (CRM). Los CRMs se han estudiado como alternativa a la CR y para evitar algunos de los efectos negativos de los regímenes de CR. Los objetivos de las estrategias de CRM son para producir los mismos efectos pro-longevidad que proporciona la CR sin reducir la ingesta calórica. Dado que las estrategias pro-longevidad de los sistemas de influencia de CR implicados en la sensación de energía, y la regulación del metabolismo, algunos objetivos de los CRMs se centraron en los metabolitos que modifican el metabolismo de la glucosa, uno de los caminos principales usados para la producción de energía vía almacenamiento o catabolismo.

- 15 Los antimetabolitos de glucosa tales como 2-desoxi-D-glucosa son compuestos relacionados con la glucosa. Sin embargo, debido a las diferencias estructurales de la glucosa tales compuestos bloquean o inhiben ciertos aspectos del metabolismo de carbohidratos y por lo tanto pueden imitar los efectos de la restricción calórica. Estos antimetabolitos de glucosa ejercen varios efectos fisiológicos; que incluyen la reducción de peso corporal, disminución de los niveles de insulina en plasma, reducción de la temperatura corporal, retardo de la formación y crecimiento de tumores, y la elevación de las concentraciones circulantes de hormona glucocorticoide. Estos efectos fisiológicos son el resultado de la inhibición del metabolismo de carbohidratos. La presente invención se refiere al efecto de la inhibición del metabolismo de carbohidratos para provocar afecto positivo y excitación positiva.

- 20 Los términos afecto y excitación tienen una larga historia de uso en psicología con muchas interpretaciones posibles. Ambos son construcciones hipotéticas utilizadas para describir aspectos específicos del comportamiento.

- 25 El efecto y el estado de ánimo están conectados y necesitan ser entendidos conjuntamente. Como una construcción hipotética, el estado de ánimo es un estado interno, subjetivo impulsado por sentimientos que se pueden expresar verbalmente en los seres humanos. En general, se describen dos tipos de estados de ánimo: el estado de ánimo positivo o el estado de ánimo negativo.

- 30 El estado de ánimo negativo se asocia con sentimientos de depresión, baja autoestima, agresividad, ansiedad, estrés e irritabilidad; mientras que, el estado de ánimo positivo se asocia con sentimientos de energía e incrementada motivación, estado de alerta, sensación de bienestar, amabilidad, y confianza. Sin embargo, el estado de ánimo se puede inferir de las respuestas de comportamiento observables en mamíferos humanos y no humanos.

- 35 Para abordar esta distinción, se aplica otra construcción hipotética, afecto, que se refiere a la descripción del estado de ánimo mostrado externamente por un individuo basada en respuestas de comportamiento. De este modo, aunque somos propensos a describir el estado de ánimo en los mamíferos no humanos, tales como animales de compañía; técnicamente estamos infiriendo su estado de ánimo en base a las respuestas afectivas. De este modo, el término afecto es una descripción más apropiada del estado psicológico según la presente invención. Además, la expresión, muestra de afecto, se puede aplicar ya que este es un término psicológico convencional que se refiere a la conducta facial, vocal, gestual o postural que indica afecto. Se considera que el afecto comprende dimensiones tanto positivas como negativas. La escala de afecto positivo refleja el nivel de participación placentera, que refleja el grado en que una persona o animal se siente entusiasta, excitado, activo y determinado; mientras que, la escala de afecto negativo refleja una dimensión general de participación no placentera y malestar subjetivo que subsume una amplia gama de afectos aversivos que incluyen el miedo, el nerviosismo, la culpa y la vergüenza. La presente invención se refiere a las indicaciones de comportamiento del afecto positivo.

- 40 En la bibliografía de psicología, la excitación es una construcción hipotética que se refiere a un estado fisiológico de estar despierto y reaccionar a los estímulos, un proceso que conduce a un estado de alerta sensorial incrementado, movilidad, y disposición para responder. En efecto, la excitación está implicada en la regulación de la conciencia, la atención y el tratamiento de la información. Basado en el contexto de los estímulos presentados e impulsos de participación motivacionales, los comportamientos resultantes en un estado de excitación pueden ser de movilización o inmovilización. Otro aspecto importante de la construcción hipotética de excitación es el de la relación curvilínea con el rendimiento. Conocida como la Ley de Yerkes-Dodson, este punto de vista hace hincapié en que hay un nivel óptimo de activación para el rendimiento de tal modo que demasiado poca o demasiada excitación puede afectar negativamente a la ejecución de tareas. A nivel neuronal, un estado de excitación es impulsado por el sistema reticular de activación en el cerebro y el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino en el cuerpo. El soliloquio fisiológico puede incluir la frecuencia cardíaca y la presión arterial incrementadas. Adicionalmente, las

respuestas hormonales, tales como los niveles de glucocorticoides en plasma y ácidos grasos libres se han sugerido como medidas de excitación. La excitación también se puede inferir fisiológicamente por la actividad cerebral medida por la electroencefalografía (EEG). De este modo, es importante entender que la presente invención se refiere a un aumento de la excitación que no afecta adversamente al rendimiento sino que mueve al mamífero tratado hacia un rendimiento optimizado. Además, considerando los efectos de la presente invención en el afecto y excitación, podemos definir el afecto positivo como una medida de la excitación energética; mientras que, el afecto negativo se refiere a sentimientos de excitación desagradable.

También se han publicado respuestas conductuales notables en animales y seres humanos sometidos a restricción de calorías que son indicativas de afecto positivo y excitación incrementada. Específicamente, cuando los roedores son alimentados con dietas restringidas en calorías, muestran una incrementada actividad locomotora en general y también en la exploración de nuevos objetos y áreas. Esto se puede interpretar como una respuesta natural diseñada para aumentar el comportamiento de búsqueda de comida. En las tareas de la barra de pulsar, los roedores alimentados con dietas restringidas en calorías a corto plazo muestran mayores cantidades de pulsado de barra espontáneas y también una disposición incrementada a pulsar la barra para recompensas de comida. Estas observaciones satisfarían las descripciones de afecto positivo que incluyen ser más activo, centrado, determinado, atento, inspirado, y despierto. Estos comportamientos también son indicativos de un incrementado estado de excitación energética. En cuanto a los indicadores fisiológicos de la excitación, los roedores en restricción de calorías a corto plazo muestran aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, pero los de la restricción calórica a largo plazo durante varias semanas muestran una reducción de la frecuencia cardíaca y la presión arterial. Sin embargo, los indicadores bioquímicos de la excitación, tales como los glucocorticoides y los ácidos grasos libres, son elevados en los roedores en restricción calórica a corto plazo y esta elevación persiste durante prolongados períodos.

El hipotálamo lateral, denominado el "centro de alimentación" es sensible a los niveles de glucosa en plasma. La incrementada oxidación de la glucosa y la actividad eléctrica del hipotálamo lateral y un breve descenso transitorio de la glucosa en plasma todos preceden a la alimentación en los seres humanos y ratas y se correlacionan con la sensación de hambre. La inducción de un estado diabético con el consumo de manoheptulosa (MH) u otro antimetabolito de glucosa puede reducir la capacidad de respuesta a la glucosa en el hipotálamo lateral, afectando de este modo a las señales de saciedad/hambre asociadas con el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, el hambre, que afecta al sistema motivacional que subyace al comportamiento del juego en el gato doméstico, también está influido por el metabolismo de la glucosa. Dado que el antimetabolito de glucosa tal como MH inhibe el metabolismo de la glucosa y reduce la respuesta a la glucosa entonces quizás el efecto metabólico de MH sería indicado por el incremento observado de actividad del gato mediante demostraciones aumentadas de juego.

Se sabe que los retos de comportamiento tanto en situaciones conocidas como desconocidas incrementan los niveles de estrés fisiológico y psicológico de los mamíferos y disminuyen la calidad de vida. Una situación desconocida puede ser inductora de miedo y/o de estrés y puede ser más pronunciada cuando los mamíferos experimentan un cambio de exposición a una situación nueva. Esto puede conducir al mamífero a ser negativo, no completamente participativo, menos activo, y no plenamente consciente del entorno. Cuando un mamífero tiene un afecto positivo, puede ayudar al mamífero de percibir esto como una oportunidad para aprender e investigar en lugar de responder como si estuviera en una situación de miedo, en la que el mamífero puede dejar de actuar. También un incremento de la excitación que no afecta negativamente al rendimiento, sino que en su lugar mueve al mamífero tratado hacia un rendimiento optimizado ayudará en estas situaciones conocidas y desconocidas.

El documento US 2002/035071 se refiere a un método para obtener resultados biológicos beneficiosos asociados con la restricción calórica que se pueden ganar por administración de una composición que contiene por lo menos un agente activo que bloquea el metabolismo de glucosa como una fuente de energía en las células en cantidades efectivas de bloqueo del metabolismo de glucosa a un animal que lo necesite.

En un artículo de Rowland et al., *Physiology and Behavior* 30, 5 (Mayo de 1983), se han investigado las respuestas fisiológicas y conductuales a la privación de glucosa en un hámster dorado, y se ha mostrado que los hámster dorados no incrementaron su ingesta de comida después de la privación de comida solo o en combinación con tratamiento de insulina o 2-deoxi-D-glucosa (2DG).

Es de este modo un objetivo de la presente invención proporcionar una composición apropiada para su uso por mamíferos en situaciones conocidas y/o desconocidas para mejorar el afecto positivo y/o la excitación energética.

Se ha encontrado que el objetivo anterior se puede cumplir mediante el uso del antimetabolito de glucosa en una composición según la presente invención.

Es una ventaja de las composiciones según la presente invención que se pueden usar para conseguir un mamífero participativo en tu vida diaria, porque es más feliz y está motivado para jugar.

Es otra ventaja de las composiciones según la presente invención que se pueden usar para conseguir un mamífero completamente participativo, activo, positivo y totalmente consciente del entorno.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un uso de una composición que comprende un antimetabolito de glucosa en un método para mejorar un afecto positivo y/o excitación energética en un mamífero como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La figura 1 es una presentación gráfica de los resultados relativos a la comodidad en situaciones nuevas, cuando el adiestrador, H, y el evaluador, E, son conocidos.  
La figura 2 es una representación gráfica de los resultados relativos a la comodidad en situaciones nuevas, cuando el adiestrador es conocido y el evaluador es desconocido.
- 10 La figura 3 es una presentación gráfica de los resultados relativos a la comodidad en situaciones nuevas, cuando el adiestrador y el evaluador son desconocidos.  
La Figura 4 es una presentación gráfica de los resultados relativos a las interacciones sociales, cuando el adiestrador y el evaluador son conocidos.  
La Figura 5 es una presentación gráfica de los resultados relativos a la interacción social, cuando el adiestrador es conocido y el evaluador es desconocido.
- 15 La Figura 6 es una presentación gráfica de los resultados relativos a las interacciones sociales, cuando el adiestrador y el evaluador son desconocidos.  
La Figura 7 es una presentación gráfica de cohortes viejas y jóvenes agrupadas conjuntamente, mostrando la interacción del momento de la dieta con Trp:LNAA en suero.
- 20 La Figura 8 es una presentación gráfica de cohortes viejas y jóvenes por separado, mostrando la interacción del momento de la dieta con Trp:LNAA en suero.

**Descripción detallada de la invención**

- 25 Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso a menos que se indique lo contrario. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basados en la composición total a menos que se indique lo contrario.  
Se hace referencia aquí a nombres comerciales para componentes que incluyen varios ingredientes utilizados en la presente invención. Los presentes inventores no pretenden estar limitados a materiales con un determinado nombre comercial. Materiales equivalentes (por ejemplo, los obtenidos de una fuente diferente con un nombre o número de referencia diferente) a los que se hace referencia por su nombre comercial pueden sustituir y ser utilizados en las presentes descripciones.
- 30 En la descripción de la invención se describen varias realizaciones o características individuales. Como será evidente para la persona profesional de experiencia media, son posibles todas las combinaciones de tales realizaciones y características y pueden dar como resultado ejecuciones preferidas de la presente invención.  
Las presentes composiciones pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en cualquiera de las características o realizaciones como se describe aquí.
- 35 Todas las dosis orales de la invención se calculan por kilogramo de peso corporal del mamífero a menos que se indique lo contrario.  
Los seres humanos y los animales de compañía se tratan ventajosamente aquí. Como se usa aquí, "animal de compañía" quiere decir un animal doméstico. Preferentemente, "animal de compañía" quiere decir un perro, gato, conejo, hurón, caballo, vaca, o similares. Más preferentemente, "animal de compañía" quiere decir un perro o un gato.
- 40 La presente invención se refiere al uso de composiciones que comprenden un antimetabolito de glucosa para su uso para mejorar un afecto positivo y/o excitación energética en un mamífero. Un afecto positivo y/o excitación energética en dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en mejorada interacción social, obediencia mejorada, modales mejorados, estado de alerta mejorado, conciencia mejorada, actividad mejorada y mezclas de los mismos.
- 45 El afecto positivo y/o la excitación positiva conducen al mamífero a ser completamente participativo, enfocado, activo, alerta y totalmente consciente del medio ambiente. Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que la disponibilidad de glucosa para las neuronas mejora/mantiene la función nerviosa, adicionalmente la glucosa sostiene los niveles de energía para el cerebro lo que conduce al mamífero a ser capaz de ser totalmente funcional durante períodos más prolongados. El cerebro utiliza principalmente glucosa como su fuente de energía principal para sintetizar ATP para energía celular. Existe evidencia de que los niveles de glucosa fluctúan. El antimetabolito de glucosa tal como manohéptulosa puede proporcionar un nivel más sostenido de glucosa y prevenir la fluctuación de
- 50

la glucosa, y por lo tanto, proporcionar niveles de energía sostenidos para los cerebros.

Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que la mejora del afecto positivo conduce a un incremento de la excitación energética. Por el incremento de la excitación se entiende que la excitación no afecta adversamente al rendimiento sino que en su lugar acerca al mamífero tratado a un rendimiento optimizado.

- 5 La presente invención se refiere al uso de componentes de antimetabolito de glucosa para alterar la utilización de glucosa o de otras fuentes de carbohidrato y para imitar los efectos metabólicos de la restricción calórica.

La antimetabolitos de glucosa que son útiles aquí incluyen 2-desoxi-D-glucosa, 5-tio-D-glucosa, 3-O-metilglucosa, anhidroazúcares que incluyen 1,5-anhidro-D-glucitol, 2,5-anhidro-D-glucitol, y 2,5-anhidro-D-manitol, y manoheptulosa (MH). La manoheptulosa es el antimetabolito de glucosa más preferido para uso aquí. No deseando estar limitados por la teoría, se acepta que estos compuestos son antimetabolitos de glucosa. También no deseando estar limitados por la teoría, se cree que la manoheptulosa es un antimetabolito de glucosa. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2002/0035701. Ventajosamente, la manoheptulosa puede estar presente en las composiciones citadas como un componente de materia vegetal tal como un extracto de aguacate, pulpa de aguacate u otra fuente enriquecida de manoheptulosa. Los ejemplos no limitantes de fuentes enriquecidas de manoheptulosa son alfalfa, higo o primula. La materia vegetal puede incluir el fruto, semilla (o hueso), ramas, hojas, o cualquier otra porción de la planta relevante o combinaciones de las mismas.

El aguacate (también comúnmente denominado alligator pear, aguacate, o palta) contiene niveles inusualmente enriquecidos de manoheptulosa, así como azúcares relacionados y otros carbohidratos. El aguacate es un fruto de árbol de hoja perenne subtropical, que crece lo más exitosamente en zonas de California, Florida, Hawaii, Guatemala, Méjico, las Indias Occidentales, Sudáfrica y Asia.

Las especies de aguacate incluyen, por ejemplo, Persea Americana y Persea Nubigena, que incluyen todas las variedades dentro de estas especies ilustrativas. Los ejemplos de variedades apropiadas pueden incluir Anaheim; Bacon; Creamhart; Duque; Fuerte; Ganter; Gwen; Hass; Jim; Lula; Lyon; Mexicola Grande; Murrieta Green; Nabal; Pinkerton; Queen; Puebla; Reed; Rincón; Ryan; Spinks; Topa Topa; Whitsell; Wurtz; y Zutano. El fruto del aguacate es particularmente preferido para uso aquí, que puede contener el hueso o en el que el hueso se retira o por lo menos se retira parcialmente. El fruto de Persea Americana es particularmente preferido para uso aquí, así como el fruto de variedades que producen frutos de mayor tamaño (por ejemplo, alrededor de 340,2 gramos (12 onzas) o más cuando el fruto está maduro), tales como Anaheim, Creamhart, Fuerte, Hass, Lula, Lyon, Murrieta Green, Nabal, Queen, Puebla, Reed, Ryan y Spinks.

30 Un aguacate particularmente preferido es un aguacate criollo. El criollo puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en aguacate criollo de las Indias Occidentales, aguacate criollo híbrido de las Indias Occidentales/Guatemala y mezclas de los mismos, especialmente el aguacate cultivado en la República Dominicana. De manera óptima, dijo aguacate criollo es un aguacate criollo de cosecha temprana.

También se publica que la materia vegetal de alfalfa, higo, o primula proporciona niveles relativamente altos de manoheptulosa. La alfalfa también se conoce como Medicago sativa. El higo, o Ficus carica (que incluye Cluster fig o Sycamore fig, por ejemplo) también se pueden usar, así como la primula o Primula officinalis.

Se ha descubierto que son útiles aquí niveles particulares de un antimetabolito de glucosa seleccionado de 2-desoxi-D-glucosa; 5-tio-D-glucosa; 3-O-metilglucosa; 1,5-anhidro-D-glucitol; 2,5-anhidro-D-glucitol; 2,5-anhidro-D-manitol; manoheptulosa; y mezclas de los mismos. En particular, se ha encontrado que los niveles relativamente bajos, así como las dosis relativamente altas de antimetabolito de glucosa, aunque útiles, pueden proporcionar menos de la eficacia óptima para los propósitos deseados. La dosificación dependerá del antimetabolito de glucosa usado y variará dependiendo del tamaño y del estado del mamífero al que se va a administrar el antimetabolito de glucosa. La dosificación de manoheptulosa, por ejemplo, en el intervalo de 0,0005 a 1 g/kg, o de 0,001 a 1 g/kg es beneficiosa, g/kg queriendo decir gramo por kilogramo de peso corporal del mamífero. La dosificación en el intervalo inferior sería apropiada cuando se usa 2-desoxi-D-glucosa en animales grandes. La dosificación más alta, en particular de compuestos tales como 5-tio-D-glucosa o manitol sería tolerada fácilmente. En una realización, la dosificación del antimetabolito de glucosa proporcionado a un mamífero diariamente puede ser de 0,5 a 200 mg/kg, preferentemente de 1 a 150 mg/kg, más preferentemente de 2 a 100 mg/kg, en la que "mg" se refiere al nivel del componente y 'kg' se refiere a kilogramos de peso corporal del mamífero. En una realización, la dosificación de la manoheptulosa proporcionada a un mamífero diariamente puede ser de 0,5 a 20 mg/kg, preferentemente de 1,0 a 10 mg/kg, y más preferentemente de 2 a 8 mg/kg. En ciertas realizaciones, esto se puede traducir en composiciones que comprenden menos de 10% en peso de la composición del antimetabolito de glucosa, o menos de 5%, o menos de 2%, o de 0,0001% a 0,5% en peso de la composición de antimetabolito de glucosa. El nivel de antimetabolito de glucosa se puede determinar por una persona de experiencia media en la técnica en base a varios factores, por ejemplo, la forma de la composición (por ejemplo, si es una composición seca, composición semihúmeda, composición húmeda, o suplemento, o cualquier otra forma o mezcla de las mismas). La persona de experiencia media en la técnica será capaz de utilizar la dosis preferida y determinar el nivel óptimo de antimetabolito de glucosa dentro de una composición dada.

5 Similarmente, donde se utiliza un extracto o comida de materia vegetal en las presentes composiciones, los niveles óptimos de extracto o comida pueden ser dependientes de nivel de componente eficaz dentro de dicho extracto o comida. Se han encontrado aquí extractos y/o comidas óptimas que comprenden de 0,5% a 99% en peso del extracto o comida del antimetabolito de glucosa, alternativamente de 0,5% a 75% de componente de antimetabolito de glucosa, alternativamente, de 0,5% a 25% de componente de antimetabolito de glucosa. Se han encontrado aquí extractos y/o comidas óptimas en las que el antimetabolito de glucosa puede ser de 0,5 a 99% en peso del extracto y/o comida, preferentemente de 1 a 75%, más preferentemente de 5 a 50% y lo más preferentemente de 10 a 25%.

10 La composición puede comprender pulpa de aguacate más un miembro seleccionado de hueso de aguacate, piel de aguacate, o tanto hueso como piel. La composición puede comprender un extracto acuoso de aguacate que comprende manoheptulosa u otro antimetabolito de glucosa.

15 La presente invención se refiere a una composición que se desea para la ingestión por un mamífero. Las composiciones incluyen comidas destinadas a suministrar los requisitos dietéticos necesarios, así como golosinas (por ejemplo, galletas) u otros complementos alimentarios. Opcionalmente, la presente composición puede ser una composición seca (por ejemplo, croquetas), composición semihúmeda, composición húmeda, o cualquier mezcla de las mismas. Alternativa o adicionalmente, la composición es un complemento, tal como salsa de carne, salsa, agua potable, yogur, polvo, bebidas, suspensión, material masticable, golosinas (por ejemplo, galletas), agua complementaria y combinación de los mismos.

20 La composición es una comida o comida para mascotas nutricionalmente equilibrada. Tal como se usa aquí, la expresión "nutricionalmente equilibrada", con referencia a la composición, quiere decir que la composición tiene conocidos nutrientes necesarios para mantener la vida en cantidades y proporciones apropiadas basadas en las recomendaciones de autoridades reconocidas en el campo de la nutrición. Lo más preferentemente, la composición es comida para perros o gatos.

25 Las composiciones usadas aquí pueden comprender opcionalmente uno o más componentes adicionales. Otros componentes son beneficiosos para su inclusión en las composiciones usadas aquí, pero son opcionales para los propósitos de la invención. En una realización, las composiciones pueden comprender, en base a materia seca, de 10% a 90% en peso de la composición de proteína en bruto, preferentemente de 20% a 50%, más preferentemente de 20% a 40%, y lo más preferentemente de 20% a 35% en peso de la composición de proteína en bruto. El material de proteína en bruto puede comprender proteínas de origen vegetal como la soja, cereales (maíz, trigo, etc.), semilla de algodón, y cacahuete, o proteínas de origen animal tales como caseína, albúmina y proteína de carne. Los ejemplos no limitantes de proteína de carne útiles en esta invención incluyen una fuente de proteína seleccionada del grupo que consiste en ternera, cerdo, cordero, aves de corral, pescado, y mezclas de los mismos.

30 Además, las composiciones pueden comprender, en base a materia seca, de 5% a 40% en peso de la composición de grasa, más preferentemente de 10% a 35%.

35 Las composiciones de la invención pueden comprender además una fuente de carbohidratos. En una realización, las composiciones pueden comprender de 35% a 50% en peso de la composición de la fuente de carbohidratos. En otras realizaciones, la composición puede comprender de 35% a 45%, en peso de la composición de fuente de carbohidratos, preferentemente de 40% a 50%. Los granos o cereales tales como arroz, maíz, mijo, sorgo, cebada, trigo, y similares son fuentes ilustrativas de carbohidratos.

40 Las composiciones también pueden contener otros materiales tales como, pero no limitados a, suero de leche seco y otros subproductos lácteos, pulpa de remolacha, celulosa, fibra, aceite de pescado, lino, vitaminas, minerales, sabores, y antioxidantes.

45 Las composiciones también pueden contener otros ingredientes opcionales. Los ingredientes opcionales pueden incluir componentes probióticos (*Bifidobacteria* y/o *Lactobacillus*) y componentes prebióticos (fructooligosacáridos). Los ejemplos y cantidades de componentes probióticos y componentes prebióticos que se pueden incluir se describen en la Publicación de EE.UU. No. 2005/0158294, por ejemplo. Otros ingredientes opcionales que se pueden incluir son los ácidos grasos omega-3 y omega-6, hexametáfosfato, glucosamina, sulfato de condroitina, carotenoides que incluyen betacaroteno, vitamina E, y luteína, y aquellos ingredientes como los mostrados en la Tabla 3 a continuación.

50 Las siguientes ilustraciones no limitantes ejemplifican los diferentes antimetabolitos de glucosa de la presente invención:

Utilización disminuida de glucosa como fuente de energía por 2-desoxi-D-Glucosa:

55 Para imitar los efectos de la restricción calórica, se proporcionan antimetabolitos de glucosa durante un periodo de tiempo prolongado. Los estudios anteriores muestran que la 2-desoxi-D-glucosa no se debe administrar en dosis altas, dado que se han observado efectos secundarios adversos significativos y toxicidad. Sin embargo, los estudios en roedores (Lane et al., *J. Anti-Aging Med* 1 (4): 327-337 (1998)) han mostrado que la interrupción a largo plazo del metabolismo de la glucosa usando una dosis más baja de 2-desoxi-D-glucosa puede imitar algunos de los

principales rasgos distintivos metabólicos de la restricción calórica y una mejorada longevidad, que incluyen la temperatura corporal reducida, pérdida de peso, y más bajos niveles de insulina en ayunas.

5 A la luz de los potenciales beneficios fisiológicos anteriores de la restricción calórica sopesados frente a los aspectos negativos de la inhibición metabólica por 2-desoxi-D-glucosa, se prefieren alternativas que actúan como antimetabolitos de glucosa sin los efectos secundarios potencialmente dañinos para los propósitos de la práctica de la invención.

Disminución de la disponibilidad de glucosa para las células por 5-tio-D-glucosa:

10 La 5-tioglucona, un análogo de la glucosa, tiene efectos más pronunciados (in vivo) que la 2-desoxi-D-glucosa. Se cree que el compuesto actúa principalmente mediante la inhibición de la captación de glucosa por las células. La mayoría de la 5-tioglucona (97%) inyectada en una rata se ha encontrado excretada sin cambios en la orina (Hoffman et al., *Biochemistry*, 7, pp 4479-4483 (1968)). La 5-tioglucona es notablemente no tóxica; se midió que la LD<sub>50</sub> era 14 g/kg, por inyección, en ratas (Chen et al., *Arch Biochem Biophys*, 169, pp 392 - 396 (1975)).

15 Dado que la 5-tio-D-glucosa, como la manoheptulosa y otros antimetabolitos de glucosa, parece que se excreta sin cambios en la orina, este compuesto y otros presentan ciertas ventajas para la administración crónica frente a la 2-desoxi-D-glucosa. Dado que la 5-tio-D-glucosa y otros antimetabolitos de glucosa inhiben la captación de glucosa, la dosificación apropiada puede dar lugar a beneficios asociados con la restricción calórica, que incluyen la salud, bienestar y longevidad mejorados.

Efectos de 3-O-metilglucosa:

20 Este análogo de la glucosa, en contraste con la 2-desoxi-D-glucosa, no se metaboliza (Jay et al., *J. Neurochem.* 55, pp 989 - 1000 (1990)) y, de este modo, puede proporcionar ciertas ventajas para su uso en la administración crónica. En el contexto de esta invención, la 3-O-metilglucosa puede prevenir la utilización de glucosa como fuente de energía como se demuestra por la respuesta a su administración en ratas. Las respuestas fueron alrededor de siete veces más débiles que aquellas a la 2-desoxiglucosa.

Efectos de anhidroazúcares: 1,5-anhidro-D-glucitol (Polygalitrol):

25 Este compuesto es un análogo no reductor de glucosa y se convierte enzimáticamente en 1,5-anhidro-D-glucitol-6-fosfato, no obstante la conversión es menos eficiente que la de 2-desoxi-glucosa (Sols et al., *J. Biol. Chem.*, 210, pp. 581-595 (1954)). El 1,5-anhidro-D-glucitol-6-fosfato es un inhibidor alostérico (no competitivo) de hexoquinasa, que cataliza la primera etapa reguladora de glicólisis (Crane et al., *J. Biol. Chem.*, 210, pp. 597-696 (1954)). Además, el 1,5-anhidro-D-glucitol-6-fosfato es un análogo no reductor y no puede ser un sustrato para la siguiente etapa de glicólisis catalizada por glucosa-6-fosfato isomerasa. Consecuentemente, este análogo se podría acumular en las células y actuar como un bloqueo metabólico muy efectivo para la utilización de glucosa. Otra ventaja relativa a su carácter no reductor es que este compuesto no se puede incorporar en glicolípidos, glicoproteínas, y glucógeno. Por lo tanto, sus efectos son específicos de la glucólisis y no se debería esperar que afectase a otros procesos metabólicos o ejercer la toxicidad de algunos antimetabolitos de glucosa previamente discutidos.

35 Curiosamente, este compuesto (o su fosfato) se ha encontrado en el cuerpo humano. Se encontró que estaba presente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que tenían glucosa en sangre alta ocasional (de diabetes y enfermedades del riñón) en concentraciones suficientemente grandes para ser detectadas en análisis realizados en entornos clínicos normales.

Uso de 2,5-anhidro-D-manitol y 2,5-anhidro-D-glucitol:

40 Estos compuestos son análogos no reductores de la fructosa. La fructosa es un componente importante de la comida y los fosfatos de fructosa y el difosfato son productos intermedios de la glucólisis. Sin embargo, la inhibición de eventos metabólicos que implican fructosa y sus fosfatos por análogos de anhidroazúcar es difícil. Los alfa- y beta-anómeros de fructosa, que se interconvierten espontáneamente, corresponden a diferentes anhidroazúcares, a 2,5-anhidro-D-glucitol y 2,5-anhidro-D-manitol, respectivamente. De este modo, sólo unas pocas conversiones enzimáticas se pueden inhibir por un solo compuesto. El 2,5-anhidro-D-manitol se ha investigado con algún detalle. Ese compuesto es captado por las células y convertido en 2,5-anhidro-D-manitol-1-fosfato. Ese fosfato es un análogo de la fructosa-1-fosfato, pero no se puede escindir por la aldolasa y, de este modo, la utilización tanto de glucosa como de fructosa por las células está bloqueada. Se había encontrado que el 2,5-anhidro-D-manitol interfería en la formación y utilización de glucosa en hepatocitos de rata aislados (Riquelme et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80, pp. 431-435 (1983)).

Disminución de la utilización de glucosa como fuente de energía por cetosas:

55 La manoheptulosa (MH) está presente en cantidades razonables en algunas comidas (por ejemplo, los aguacates pueden contener hasta 5% de manoheptulosa, en peso húmedo) y se pueden clasificar como una sustancia "generalmente reconocida como segura" para el consumo humano. En estudios de metabolismo, dosis de 10 gramos de manoheptulosa se administraron de forma segura a seres humanos por vía oral. Se publicó que

alrededor del 5% de la manoheptulosa ingerida aparece en la orina después de la administración oral. El destino de la manoheptulosa inyectada se ha investigado previamente en ratas: el 66% se excretó sin cambios, el 29% se metabolizó y, un día después de la inyección, el 5% permanecía en el cuerpo (Simon et al., Arch Biochem Biophys, 69, pp. 592-601 (1957)). La manoheptulosa es el antimetabolito de glucosa preferido debido a su alta abundancia en fuentes naturales y debido a su perfil de seguridad.

La disponibilidad de glucosa para las células también se puede disminuir usando otros complementos dietéticos distintos de los específicamente identificados aquí que tienen un efecto similar sobre el metabolismo de la glucosa que puede dar como resultado una inhibición del procesamiento de la glucosa.

Los métodos de la invención se pueden poner en práctica mediante la administración de un componente descrito aquí por vía oral o parenteral, aunque sería preferida la administración oral. Cuando se desea una disminución del metabolismo del tejido, como un adjunto al tratamiento de trauma, el componente se puede administrar por vía intravenosa.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención y no se pretende que limiten el alcance de la misma de ninguna manera.

**Ejemplo 1**

Efecto mimético de la restricción de calorías (MH) sobre el comportamiento afectivo

Se han efectuado evaluaciones anuales de la perrera (período de 5 años) de perros alimentados con una dieta de control o una dieta de control + MH. Esta evaluación incluía dos cohortes de Labrador Retriever. La cohorte 1 incluía 39 Labrador Retriever castrados, 12 machos y 27 hembras, con edades comprendidas entre 5,1 a 8,2 años de edad al inicio del período de alimentación del ensayo (media de edad al inicio del estudio de 6,7 años). La cohorte 2 incluía 41 Labrador Retriever castrados, 12 machos y 29 hembras con edades comprendidas entre 2,0 y 6,1 años de edad al inicio del período de alimentación del ensayo (media de edad al inicio del estudio 4,0 años). Cada cohorte fue alimentada con una dieta de control o una dieta de ensayo en la que la única diferencia era la inclusión de extracto de aguacate enriquecido en mHep dirigida a suministrar 2 mg/kg de peso corporal de MH. Todos los investigadores, asistentes de laboratorio, y evaluadores desconocían la composición de los grupos de alimentación.

Los perros fueron evaluados durante agosto y septiembre de cada año. Cada calificador fue instruido para funcionar de forma independiente. Los evaluadores entrenados se clasificaron como conocidos o desconocidos por los perros. Los evaluadores conocidos eran personas que trabajaban con los perros con regularidad. Los evaluadores desconocidos no interactuaban con los perros con regularidad. Cada grupo de evaluación se componía de un adiestrador y dos calificadores. Todos los perros fueron evaluados con tres personas en la sala con por lo menos un calificador conocido en cada grupo. Esto creó un total de tres condiciones posibles: adiestrador conocido, dos calificadores conocidos (Fam/Fam); adiestrador conocido, un calificador desconocido, un calificador conocido (Fam/Unfam); adiestrador desconocido, un calificador desconocido, un calificador conocido (Unfam/Unfam). Los comportamientos se exponen en la Tabla 1.

Cálculo de la puntuación: Se pidió a los evaluadores que calificaran a los perros en una escala de 1 - 5, incluyendo las calificaciones medias. Para los elementos de comportamiento, una calificación de 1 significaba "No lo hace", mientras que 5 significaba "excelente". Para los elementos de conducta, una calificación de 1 quería decir "Totalmente", mientras que una calificación de 5 significaba "Nada en absoluto". Todos los elementos necesarios se calificaron a la inversa para permitir que las calificaciones más altas indicaran una calificación más favorable y las menores calificaciones indicaran una calificación menos favorable.

Las sumas de los correspondientes elementos de conducta y comportamiento se usaron para calcular la calificación para cada uno de los dos componentes de comportamiento. Estas calificaciones se usaron para comparar los cambios entre años y entre grupos.

Tabla 1 – Definición de componentes de comportamiento con los elementos de evaluación correspondientes

Interacción social	Comodidad en nuevas áreas
Permite caricias del adiestrador de pie dentro de la perrera	Camina por salas y cruza umbrales con vacilación mínima
Permite deslizar la correa alrededor del cuello	Entra en la sala de ensayo con mínima vacilación
Se aproxima al adiestrador en la sala de ensayo	Se aproxima al adiestrador de pie en la sala de ensayo
Acepta caricias en la sala de ensayo	Acepta recompensas en la sala de ensayo

Responde a la estimulación al juego	Reacción a un coche (u objeto rodante) lejano
Reacción a un perro desconocido-perro amigo	Muestra agresión hacia el adiestrador (gruñe, ruge, o ladra agresivamente)
Se rebaja ante el adiestrador	Posturas de sumisión/cola escondida
Rehúsa o rechaza golosinas	Rehúsa o rechaza golosinas
Reacio a interactuar/participar	Reacio a interactuar/participar
Media máxima posible =5	Media máxima posible =5

- 5 Se planteó la hipótesis de que se producirían diferencias debido a la presencia de una persona desconocida y que la 'comodidad en nuevas áreas' mostraría una diferencia en los últimos años y con los evaluadores y calificadores desconocidos. Los resultados se presentan en las figuras 1 - 6. La mayoría de las diferencias para comodidad en nuevas áreas se producen en la condición esperada (en la presencia de una persona desconocida) y en edades más avanzadas. Específicamente, los perros en la condición conocido / conocido solo comenzaron a mostrar diferencias significativas en los últimos años. Además, las diferencias en la respuesta se volvieron significativas entre los dos grupos mucho antes en la condición desconocido / desconocido con +MH, mostrando los perros una respuesta significativamente mejor cuando se les desafiaba con la introducción de un nuevo entorno.
- 10 Cuando se evaluó la "interacción social" planteamos la hipótesis de que los perros interactuarían de manera más positiva con las personas que les son conocidas. La capacidad de reconocer individuos y retener esa información es una tarea cognitiva compleja. Las diferencias en este área de la evaluación se produjeron en el entorno conocido / desconocido en los últimos años lo que indica que los perros estaban respondiendo de manera diferente con la persona desconocida adicional en la sala. Además, los dos grupos no fueron diferentes en el grupo conocido / conocido o el grupo desconocido / desconocido. Esto puede indicar que entre las dos dietas, el grupo alimentado con el suplemento era capaz de concentrarse en la persona conocida presente en la sala. Sin la diferencia de la familiaridad, la presencia de la única persona desconocida era suficiente para distraer a los perros de control frente al grupo +MH. Los perros +MH eran capaces de mantener la atención en la presencia conocida y continuar respondiendo.
- 15
- 20 Conclusión: Los perros alimentados con comida que comprende manoheptulosa tenían las puntuaciones más altas de capacidad para manejar nuevas áreas y de interacción social. Estos dos resultados sugieren que la manoheptulosa tiene un efecto directo o indirecto en la excitación.

#### Ejemplo 2

- 25 Recientemente, el solicitante ha investigado si la alimentación con MH incrementaría la motivación de un gato para jugar, lo que podría mejorar adicionalmente el vínculo animal-ser humano. Los objetivos del estudio eran medir la influencia de la complementación con MH en gatos y para medir los efectos del tratamiento dietético con manoheptulosa (MH) sobre la fisiología y la psicología de gatos adultos jóvenes, delgados, y con sobrepeso moderado.

#### Diseño del estudio

- 30 Veinte gatos (N = 20) de edad similar (~ 2,5 años) y divididos en 10 hembras (5 delgadas y 5 con sobrepeso moderado) y 10 machos (5 delgados y 5 con sobrepeso moderado). Para ensayar de manera efectiva los efectos de MH en las necesidades de energía de la dieta del metabolismo de energía, destinados a mantener el peso, se proporcionaron por igual entre los animales en base al peso corporal; por lo tanto, cada gato recibió 45 kcal ME/kg de peso corporal/d (hembras) y 50 kcal ME/kg de peso corporal/d (machos).
- 35 Durante dos semanas antes de la iniciación del estudio a los gatos se les alimentó con lams® Original Chicken. Las dietas se presentan en forma de croquetas y a los gatos se les alimentó individualmente a las 7:00 am cada día y se les permitirán 60 minutos para comer durante el ofrecimiento de comida. Este protocolo de alimentación se mantuvo durante todo el estudio, excepto en los días en los que se obtienen las muestras de sangre / calorimetría en ayunas cuando lo gatos se alimentaron después del período de toma de muestras que era no más tarde de las 9:00 a.m.. Al final de primer período de aclaramiento los gatos fueron asignados al azar a un grupo de control o un grupo de control + MH. En el primer día del estudio (día 0) la mitad de los gatos continuaron recibiendo la dieta de control sin tratamiento con MH (0 mg/kg de peso corporal) y la mitad de los gatos fueron alimentados con la dieta de control con tratamiento con MH. Cada gato se alimentó con su respectiva dieta durante un total de 37d. Durante seis días, después de los primeros 37d de tratamiento dietético, todos los gatos volvieron a la dieta de control sin tratamiento con MH que se usó como la dieta de aclaramiento inicial durante la primera parte del estudio para un segundo período de suspensión. Tras el período de suspensión los gatos fueron alimentados con la dieta alternativa durante un período adicional de 37d. Por lo tanto, este era un estudio cruzado, en el que todos los gatos recibieron ambas
- 40
- 45

dietas lo que permite que cada gato actué como su propio control.

Evaluaciones de comportamiento para medir la motivación al juego:

5 Dos recintos vallados (que mide cada uno: 100 cm W x 100 cm L x 75 cm H; Quenn City polymers, Dayton, Ohio), uno clasificado como la caja de partida y el otro la caja de meta, cada uno con un techo de plexiglás que contiene un agujero de 1 cm diámetro en el centro, se colocan uno junto al otro y se conectan por medio de una puerta abatible (23 cm W x 18 cm H). La puerta abatible es de plexiglás de 1/16" y está unida a la parte superior del marco de la puerta. La puerta es similar a las del tipo de las que gatos están aclimatados a usar en sus salas de grupo. Para evaluar la motivación al juego, la puerta abatible se hizo progresivamente más difícil de abrir por medio de la adición de pesos que se colocan en una cubeta en la parte inferior de la puerta. Cuando el gato empuja la puerta con peso con fuerza suficiente se balancea fuera de la estructura, permitiendo que el gato pase por debajo de la puerta para entrar en el área de meta, donde se le permitió interactuar con el juguete. Los gatos se evaluaron dos veces por tratamiento dietético el día 14 y de nuevo el día 37 aproximadamente 5 horas después de la comida. A los gatos no se les permitió interactuar con juguetes de peluche durante cuatro días antes del inicio del estudio. Todos los procedimientos y medidas están adaptados de Widowski and Duncan, 2000.

15 Procedimiento de ensayo: cada gato fue retirado de forma individual de la sala de estar del grupo y se colocó en el recinto de partida. Un juguete parecido a un ratón de peluche estaba unido a una cadena y colgado del orificio cortado en el centro del techo de plexiglás sólo del recinto de meta. Después de ser liberado en el recinto de partida, al gato se le permitieron 10 minutos para abrir la puerta para obtener acceso al juguete. Cada serie de ensayos se inició con cero peso añadido a la puerta. Si el gato abrió con éxito la puerta y entró en el recinto de meta, al gato se le permitieron 30 s en contacto con el juguete. Después de 30 s, el gato fue devuelto a la caja de salida, y se añadieron pesos adicionales a la puerta. El procedimiento se repitió hasta tres veces en un solo día del ensayo. En el tercer ensayo del día, a los gatos se les permitió permanecer en el recinto de meta durante 2 min para proporcionar suficiente tiempo para jugar con el juguete antes de regresar a su sala de estar del grupo. Si un gato no trató de abrir la puerta (después de 10 minutos en el recinto de inicio), se terminó el ensayo por ese día. En el segundo día del ensayo (d 37), el peso anterior al que el gato había abierto por último con éxito la puerta se usó para el ensayo 1 y a continuación el peso se incrementó progresivamente con cada ensayo. Cuando un gato intentó abrir la puerta un total de 5 veces, pero sin éxito, se retiraron los pesos, y el gato fue devuelto a la caja de salida para ensayar de nuevo con unos pesos reducidos para definir el umbral de trabajo para obtener un juguete. Además de obtener los pesos máximos de la puerta que cada gato empujaría para entrar en la caja de meta, se midieron otros patrones de comportamiento para evaluar la motivación. Se midieron la latencia para abrir la puerta, el número de intentos sin éxito para abrir la puerta, y las latencias de apertura de la puerta al primer contacto intencional con el juguete.

35 Resultados: Los gatos alimentados con la dieta de ensayo que contiene la MH pasaron menos tiempo en la caja de salida, tenían más ensayos con éxito, tenían menos ensayos sin éxito, y empujaron más peso para obtener el juguete de lo que lo hicieron los gatos alimentados con la dieta de control (Tabla 2).

Tabla 2: medidas motivacionales de juego en gatos

Comportamiento	Ensayo	Control	Vapor de P
Duración (es) media (s) en la caja de salida con peso máximo	100,8 ± 25*	185,39 ± 26**	0,02
Número medio de ensayos con éxito	5,15 ± 0,5**	2,90 ± 0,6*	0,006
Número medio de ensayos sin éxito	0,25 ± 0,1*	0,68 ± 0,1**	0,007
Peso máximo medio (g)	407,5 ± 46,1**	227,8 ± 47,4	0,003

5 Conclusiones: Estos datos sugieren fuertemente que los gatos alimentados con MH tienen significativamente mayor motivación para jugar que los gatos alimentados con las mismas dietas, pero sin MH.

#### Ejemplo 4

10 La serotonina cerebral se sabe que influyen en el estado de ánimo. La serotonina se sintetiza en el cerebro a partir de triptófano, cuya captación en el cerebro depende de la relación en plasma de triptófano a la suma de otros aminoácidos neutros grandes (Trp/LNAA). Otros aminoácidos grandes incluyen leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y tirosina. Es bien aceptado que las dietas ricas en carbohidratos incrementan esta relación y las dietas ricas en proteína disminuyen la relación, en otras palabras, cuando hay una disminución de la sensibilidad a la insulina y una mayor respuesta glucémica, se esperan mayores relaciones Trp/LNAA.

15 Se recogieron muestras de sangre para análisis de aminoácidos de un total de 51 perros alimentados con una dieta de control o una dieta de control + MH. Las muestras de sangre se recogieron de dos cohortes de Labrador Retrievers. La cohorte 1 incluía 19 Labrador Retrievers castrados, 5 machos y 14 hembras, con edades comprendidas entre 12,6 a 15,7 años de edad en el momento del muestreo. La cohorte 2 incluía 32 Labrador Retrievers castrados, 9 machos y 23 hembras que variaban en edades de 8,3 y 12,5 años de edad en el momento del muestreo. Cada cohorte se alimentó de forma similar con una dieta de control o una dieta de ensayo en la que las únicas diferencias fueron la inclusión de concentrado de zumo de aguacate enriquecido con mHep dirigida a suministrar 200 ppm de MH en la dieta. El concentrado de zumo de aguacate se derivó de aguacates enteros (carne, piel y hueso). Los perros de la cohorte 1 habían estado consumiendo las dietas de control o de ensayo de forma continua durante 90 meses en el momento de la toma de muestras. Los perros de la cohorte 2 habían estado consumiendo las dietas de control o de ensayo de forma continua durante 77 meses en el momento de la toma de muestras. Todos los investigadores, asistentes de laboratorio, y evaluadores desconocían la identidad de los grupos de alimentación.

#### Preparación de muestra de plasma/suero para análisis por HPLC

##### Desproteización de la muestra de plasma/suero

1. Mezclar 100 µl de plasma o suero descongelado con 100 µl de disolución de norleucina 0,4 mM en un tubo de centrífuga de filtro de centrífuga de 10K etiquetado
- 30 2. Centrifugar a 15.000 x g durante 30 minutos a 4°C.
3. Retirar de la centrífuga, desechar el adaptador de inserción y volver a cerrar el tubo de centrífuga que contiene el filtrado (muestra desproteizada). En este punto, la muestra desproteizada se puede almacenar a -20°C hasta su posterior procesado, o se puede seguir a la etapa siguiente.
- 35 4. Tomar una alícuota de 50 µl de la muestra desproteizada y transferirla a un tubo de vidrio Kimble etiquetado y colocar en un matraz de liofilizador en el liofilizador hasta que se seque.
5. Cubrir los tubos Kimble secos con Parafilm y almacenar a -20°C hasta el momento del procesado.

##### Etapas de re-secado

1. Retirar las muestras del congelador y retirar el parafilm. Al mismo tiempo, retirar 2 tubos kimble pre-secados "estándar AA completo" (véase "preparar estándares de aminoácidos" para instrucciones).
- 40 2. Para el "estándar AA completo" añadir 25 µl de glutamina 0,2 mM.
3. A cada vial de muestra/estándar añadir 10 µl de disolución de re-secada y agitar con vórtice los tubos. Preparar la disolución re-seca en la campana de humos (la TEA huele mal !)

## ES 2 698 601 T3

Compuesto	Partes	10 viales	20 viales	30 viales	40 viales	50 viales	60 viales
Acetato de Na 1 M	2	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µ	360 µl
Trietilamina (TEA)	1	30 µl	60 µl	90 µl	120 µl	150 µl	180 µl
Metanol	2	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µ	360 µl

4. Secar las muestras en el liofilizador durante por lo menos 30 minutos.

Etapa de derivatización

1. Retirar las muestras del liofilizador.

- 5 2. A cada vial, añadir 20 µl de disolución de derivatización y agitar con vórtice los tubos. Preparar la disolución de derivatización en la campana de humos.

Compuesto	Partes	10 viales	20 viales	30 viales	40 viales	50 viales	60 viales
H <sub>2</sub> O dd	1	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µ	150 µl
Trietilamina	1	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl
PITC	1	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µ	150 µl
Metanol	7	175 µl	350 µl	525 µl	700 µl	875 µl	1050 µl

3. Poner las muestras en el matraz del liofilizador para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos

4. Colocar el matraz en el liofilizador hasta secar (por lo menos 45 minutos).

10 Rediluir las muestras para HPLC

1. Añadir 100 µl de tampón Physiol A para cada estándar y muestra, agitar con vórtice bien.

- 15 2. Usando una pipeta Pasteur de vidrio, transferir todo el contenido en el tubo Kimble a un tubo de inserción de vidrio pequeño que quepa dentro de los viales más grandes del automuestreador - prestar mucha atención a en que número de vial se está poniendo cada muestra y asegúrese de que el número de vial corresponde a lo que se especifica en la alineación de muestras en el ordenador. Los tapones rojos van en los viales del estándar y los tapones blancos van en los viales de muestra.

3. Colocar el carrusel de viales del automuestreador en el sistema de HPLC.

Medir las muestras con HPLC.

### Preparación de tampón

20 Physiol A

\*\* En general, 2 o 4 l de Physiol A se preparan a la vez.

1. Medir 2 (o 4) l de agua nanopura y poner en un gran vaso de precipitados de plástico
2. Retirar 700µl/2l (1400µl/4l) de agua del vaso de precipitados y desechar
3. Añadir 700 µl/2l (1400 µl/4l) de 10 mg/ml de EDTA de disodio dihidrato al vaso de precipitados
- 25 4. Pesar 19,05 g/2l (38,10 g/2l) de acetato de sodio y añadir al vaso de precipitados
5. Mezclar la disolución en una placa de agitación hasta que se disuelve todo el acetato de sodio.
6. Medir el pH de la disolución y añadir gota a gota ácido acético glacial para disminuir el pH hasta 6,45 (± 0,01)
7. Filtrar la disolución para retirar cualquier aire
- 30 8. Medir 1.950 ml/2l (3.900 ml/4l) de la disolución filtrada y a continuación añadir 50 ml/2l (100 ml/4l) de acetonitrilo (nota: medir éstos por separado, no sólo añadir el acetonitrilo en la parte superior del cilindro graduado ya que esto

no funcionará).

9. Verter cuidadosamente esta nueva disolución en la botella de vidrio apropiada unida al HPLC (etiquetada Physiol A) y evitar la introducción de burbujas.

Physiol B:

5 \*\* Normalmente se preparaba 1 l de esta a la vez

1. Mezclar lo siguiente conjuntamente en un vaso de precipitados:

- a. 450 ml de acetonitrilo
- b. 400 ml de agua nanopura
- c. 150 ml de metanol

10 2. Filtrar la disolución para retirar cualquier aire.

3. Verter cuidadosamente esta disolución en la botella de vidrio apropiada unida al HPLC (etiquetada Physiol B) y evitar la introducción de burbujas.

### Preparar estándares de aminoácidos

Disoluciones patrón para aminoácidos extra:

15 1. Preparar disoluciones patrón ( $\sim 100 \mu\text{mol/ml} = 0,100 \text{ mmol/ml} = 100 \text{ mmol/l}$ ) para cada uno de:

- L-asparagina (PM = 132,12 mg/mmol) - pesar  $\sim 26 \text{ mg}$
- L-citrulina (PM = 175,19 mg/mmol) - pesar  $\sim 36 \text{ mg}$
- hidrocloreuro de L-cisteína (PM = 175,16 mg/mmol) - pesar  $\sim 36 \text{ mg}$
- L-glutamina (PM = 146,15 mg/mmol) - pesar  $\sim 30 \text{ mg}$

20 - L-norleucina (PM = 131,17 mg/mmol) - pesar  $\sim 26 \text{ mg}$

- hidrocloreuro de L-ornitina (PM = 165,62 mg/mmol) - pesar  $\sim 34 \text{ mg}$

2. Para cada aminoácido, pesar el aminoácido directamente en un tubo de centrifuga de 2 ml y registrar el peso exacto (hasta 0,1 mg). A continuación, añadir exactamente 2 ml de agua nanopura al tubo de centrifuga, cerrar el tubo y agitar para disolver todo el polvo.

25 3. Calcular la concentración exacta de cada aminoácido y registrarlo en el tubo de centrifuga:

$$\text{Concentración (en mmol/ml)} = [(\text{peso en mg})/(\text{PM en mg/mmol})]/2 \text{ ml}$$

4. Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso

disolución de norleucina 0,4 mM (estándar interno):

1. Preparar 50 ml (= 50.000  $\mu\text{l}$ ) de disolución a la vez en un matraz aforado de 50 ml

30 2. A partir de la concentración de la disolución patrón de norleucina, calcular la cantidad necesaria usando:

$$\text{Cantidad (en } \mu\text{l)} = [(50.000 \mu\text{l}) * (0,4 \text{ mmol/l})]/(\text{concentración de la disolución patrón}).$$

3. Agitar con vórtice la disolución patrón y pipetear la cantidad deseada de la disolución patrón en el matraz volumétrico

4. Llevar el volumen en el matraz aforado hasta (exactamente) 50 ml usando HCl 0,1 N.

35 \* el HCl 0,1 N se prepara mediante la adición de 4,1 ml de HCl  $\sim 12,2 \text{ N}$  patrón [el patrón es  $\sim 37,5\%$  de HCl (v/v), con un PM de 36,46 g/mol y una densidad de 1,19 g/ml] a  $\sim 250 \text{ ml}$  de agua nanopura en un matraz aforado y a continuación llevar el volumen hasta 500 ml con agua nanopura.

5. Transferir a un recipiente de almacenamiento apropiado

6. Almacenar a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso

40 disolución de glutamina 0,2 mM (añadida al estándar AA completo durante la etapa de re-secado):

1. Preparar 50 ml de disolución a la vez en un matraz aforado de 50 ml
2. A partir de la concentración de la disolución patrón de glutamina, calcular la cantidad necesaria usando:

$$\text{Cantidad (en } \mu\text{l)} = [(50.000 \mu\text{l}) * (0,2 \text{ mmol/l})]/(\text{concentración de disolución patrón}).$$

3. Agitar con vórtice la disolución patrón y pipetear la cantidad deseada de la disolución patrón en el matraz aforado
- 5 4. Llevar el volumen en el matraz aforado hasta (exactamente) 50 ml usando agua nanopura.
5. Transferir a un recipiente de almacenamiento apropiado
6. Almacenar a 4°C hasta su uso

disolución estándar AA extra 0,5 mM:

1. Preparar 50 ml de disolución a la vez en un matraz aforado de 50 ml
- 10 2. Para cada una de asparagina, hidrocloreuro de cisteína, hidrocloreuro de ornitina y citrulina, calcular la cantidad de cada disolución patrón necesaria usando:

$$\text{Cantidad (en } \mu\text{l)} = [(50.000 \mu\text{l}) * (0,5 \text{ mmol/l})]/(\text{concentración de disolución patrón})$$

3. Agitar con vórtice cada tubo de disolución patrón y pipetear la cantidad deseada de la disolución patrón en el matraz aforado.
- 15 4. Una vez que se han añadido todas las disoluciones patrón de aminoácido, llevar el volumen en el matraz aforado hasta (exactamente) 50 ml usando agua nanopura
5. Transferir a un recipiente de almacenamiento apropiado
6. Almacenar a 4°C hasta su uso

Preparar el estándar AA completo (0,2 mM = 200 nmol/ml de cada AA):

- 20 1. Mezclar 500  $\mu\text{l}$  del estándar pre-preparado (A2908 producto Sigma; 0,5 mM) y 500  $\mu\text{l}$  del estándar AA extra (0,5 mM) y 250  $\mu\text{l}$  de agua nanopura en un tubo de centrifuga.
2. Agitar con vórtice para mezclar
3. Poner alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  (5 nmol) en tubos de vidrio Kimble etiquetados individuales. Colocar en un matraz de liofilizador y en el liofilizador hasta que se secan.

25 La Figura 7 es una ilustración de cohortes viejas y jóvenes mezcladas conjuntamente, la interacción del tiempo con la dieta mostró una tendencia estadística ( $p = 0,15$ ). Los perros alimentados con manoheptulosa no tenían diferencias en ayuno y 4 horas después de la alimentación con concentraciones de Trp:LNAA, mientras que había una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en las concentraciones de Trp:LNAA en los perros alimentados con la dieta de control.

30 La Figura 8 es una ilustración de la situación cuando las cohortes se examinaron por separado, la interacción del tiempo con la dieta ( $P = 0,0006$ ) y el tiempo ( $P = 0,0008$ ) era altamente significativa para la cohorte 1 en la que los perros son más viejos en comparación con la cohorte 2. Los perros alimentados con dietas que contienen MH no tenían diferencias ( $P > 0,05$ ) en ayuno y 4 horas después de la alimentación con concentraciones de Trp:LNAA, mientras que había una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en las concentraciones de Trp:LNAA en perros más viejos alimentados con dieta de control. Las diferencias en la relación no se debieron a diferencias en triptófano o la LNAA solo, como se evidencia por la falta de diferencia estadística entre los tratamientos dietéticos o ayuno frente a la alimentación.

35 No había diferencias en la relación Trp:LNAA ( $P > 0,05$ ) en perros más jóvenes alimentados con las dietas de ensayo o de control (cohorte 2) o entre el ayuno y la alimentación, aunque había un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) en la concentración de LNAA (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y tirosina) de ayuno a alimentación.

40 La Tabla 3 ilustra dos composiciones de croquetas que tienen los siguientes componentes con las cantidades indicadas aproximadas que se preparan usando métodos que son estándar en la técnica, incluyendo extrusión, y se alimentan a perros y/o gatos como comida diariamente:

Tabla 3

Componente	Ejemplo 4A (cantidad de	Ejemplo 4B (cantidad de	Ejemplo 4C (cantidad de
------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

ES 2 698 601 T3

	componente indicada como % en peso)	componente indicada como % en peso)	componente indicada como % en peso)
Extracto de aguacate*	0,02	0,01	0,08
Pollo, comida de subproducto de pollo, comida de pescado y huevos	44	47	44
Grasa de pollo	8	6	6,5
Pulpa de zanahoria	2	3	3
Sales	2,5	2	0,8
Vitaminas y minerales**	1	1	1,2
Cantidades minoritarias***	3,5	4	2
Cereales	el resto	el resto	el resto

\* El aguacate criollo se puede sustituir por otro material vegetal que tiene un contenido de manoheptulosa mejorado. La incorporación de una fuente de manoheptulosa probablemente reemplaza una cantidad similar de una fuente de cereales en la composición. El extracto comprende alrededor de 10% de manoheptulosa.

5 \*\* Las vitaminas y minerales pueden incluir: vitamina E, betacaroteno, vitamina A, ácido ascórbico, pantotenato de calcio, biotina, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>1</sub>, niacina, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina D<sub>3</sub>, vitamina D<sub>2</sub>, ácido fólico, cloruro de colina, inositol, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, óxido de cinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, óxido manganoso, sulfato ferroso, yoduro de potasio, carbonato de cobalto.

10 \*\*\* Las cantidades minoritarias pueden incluir: aceite de pescado, semilla de lino, harina de lino, celulosa, sabores, antioxidantes, taurina, levadura, carnitina, sulfato de condroitina, glucosamina, luteína, extracto de romero.

Ejemplo 5

La Tabla 4 ilustra la composición de salsa de carne con sabor a vacuno que se prepara combinando los siguientes componentes de una manera convencional:

Tabla 4

Componente	% en peso
Manoheptulosa*	0,14
Grasa de pollo	3,0
Partículas de vacuno secado por pulverización y caldo	3,0
Goma de xantano	0,5
Semilla de lino	0,2
Vegetales	0,2
Vitaminas**	0,06
Minerales**	0,04
Ácido fosfórico	0,95
Sabor de vacuno	0,1
Agua	el resto

\* La manoheptulosa puede estar sustituida por otro antimetabolito de glucosa.

5 \*\* Las vitaminas y minerales pueden incluir: vitamina E, betacaroteno, vitamina A, ácido ascórbico, pantotenato de calcio, biotina, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>1</sub>, niacina, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, vitamina D<sub>3</sub>, vitamina D<sub>2</sub>, ácido fólico, cloruro de colina, inositol, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, óxido de cinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobre, óxido manganoso, sulfato ferroso, yoduro de potasio, carbonato de cobalto

10 0,029 l (una onza líquida) de la composición de salsa de carne se mezcla con media taza de una composición alimenticia diariamente antes de alimentar a un mamífero. Las cantidades de la composición de salsa de carne se determinan como se desee por el guardián del mamífero.

15 Se debe entender que las dimensiones y los valores descritos aquí no están estrictamente limitados a los valores numéricos exactos mencionados. En lugar de ello, a menos que se especifique lo contrario, cada una de tales dimensiones se entiende que significa tanto el valor mencionado como un intervalo de valores funcionalmente equivalente alrededor de ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como "40 mm" se entiende que significa "alrededor de 40 mm".

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de comida nutricionalmente equilibrada o de composición de comida para mascotas que comprende un antimetabolito de glucosa y/o una fuente de antimetabolito de glucosa en un método para mejorar un afecto positivo y/o excitación energética en un mamífero, en el que dicho antimetabolito de glucosa se selecciona del grupo que consiste de 2-desoxi-D-glucosa; 5-tio-D-glucosa; 3-O-metilglucosa; 1,5-anhidro-D-glucitol; 2,5-anhidro-D-manitol; manoheptulosa; y mezclas de los mismos, y en el que dicha mejora de un afecto positivo y/o excitación energética en dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en interacción social mejorada, obediencia mejorada, maneras mejoradas, estado de alerta mejorado, actividad mejorada y mezclas de los mismos.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho antimetabolito de glucosa es manoheptulosa.
3. El uso según la reivindicación 2, en el que dicha manoheptulosa es del material vegetal seleccionado del grupo que consiste en extracto de aguacate, pulpa de aguacate, alfalfa, higo y prímula y mezclas de los mismos
- 15 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende de 0,0001 a 10% en peso de la composición de dicho antimetabolito de glucosa, preferentemente de 0,001 a 5%, más preferentemente de 0,001 a 1,5 y lo más preferentemente de 0,01 a 0,5%.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis de dicho antimetabolito de glucosa al mamífero diariamente es de 0,5 a 200 mg/kg, en el que mg es el nivel de antimetabolito de glucosa y kg es kilogramos de peso corporal del mamífero, preferentemente de 1 a 150 mg/kg, más preferentemente de 2 a 100 mg/kg y lo más preferentemente de 2 a 50 mg/kg.
- 20 6. El uso según la reivindicación 5, en el que dicho antimetabolito de glucosa es manoheptulosa, la dosis al mamífero diariamente es de 0,5 a 20 mg/kg, en el que mg es el nivel de antimetabolito de glucosa y kg es kilogramos de peso corporal del mamífero, preferentemente de 1 a 10 mg/kg, más preferentemente de 2 a 8 mg/kg.
- 25 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición se selecciona del grupo que consiste en comida para perros nutricionalmente equilibrada y comida para gatos nutricionalmente equilibrada.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición es un complemento alimentario seleccionado del grupo que consiste en, golosinas, material masticable, galletas, salsa de carne, salsa, bebida, agua complementaria, yogur, polvo y combinaciones de los mismos.
- 30 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha composición comprende además proteína animal, proteína vegetal, materia farinácea, verduras, frutas, materiales basados en huevo, proteínas no desnaturalizadas, adhesivos poliméricos de grado alimentario, geles, polialcoholes, almidones, gomas, saborizantes, condimentos, sales, colorantes, compuestos de liberación controlada, minerales, vitaminas, antioxidantes, prebióticos, probióticos, modificadores del aroma, lípidos y combinaciones de los mismos.

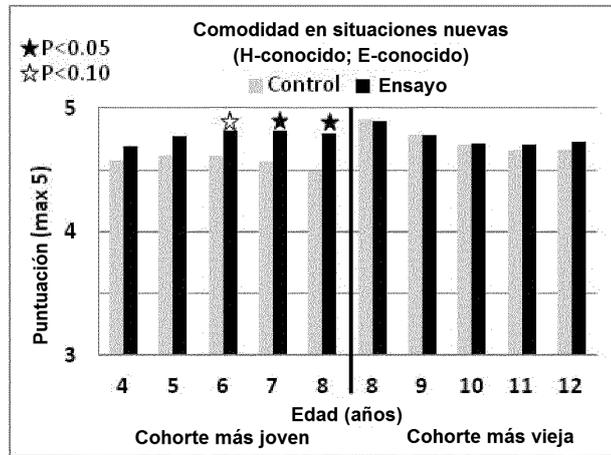


Fig. 1

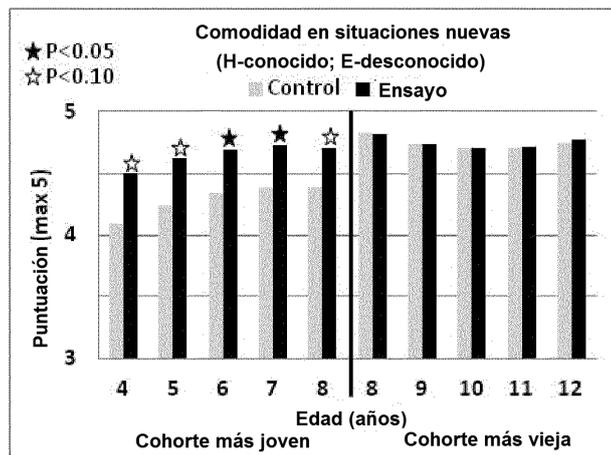


Fig. 2

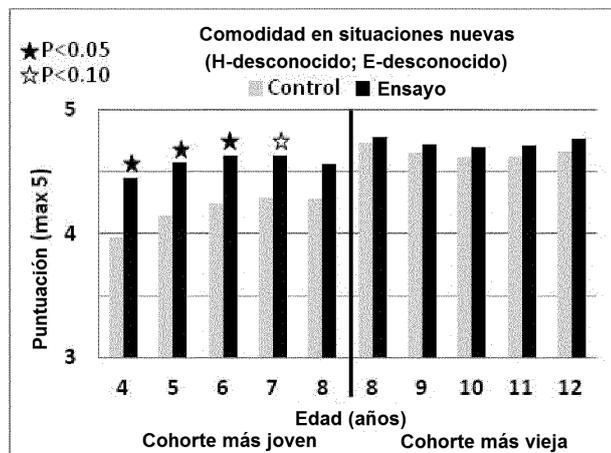


Fig. 3

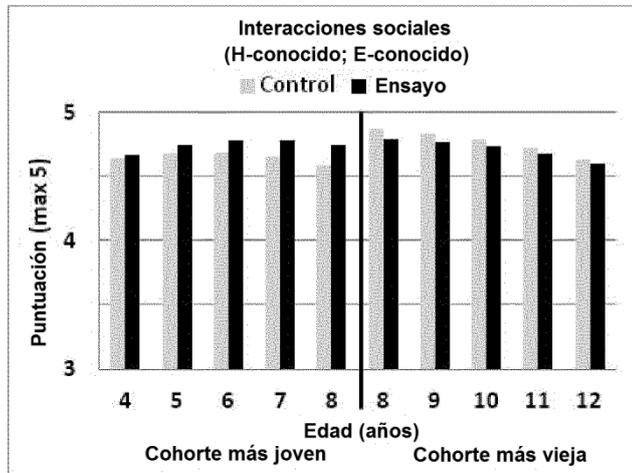


Fig. 4

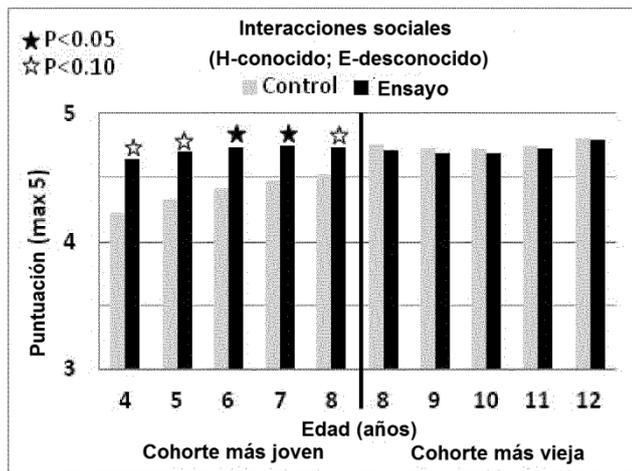


Fig. 5

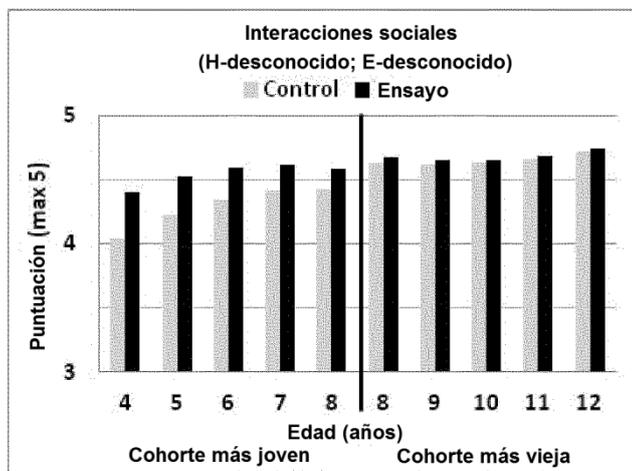


Fig. 6

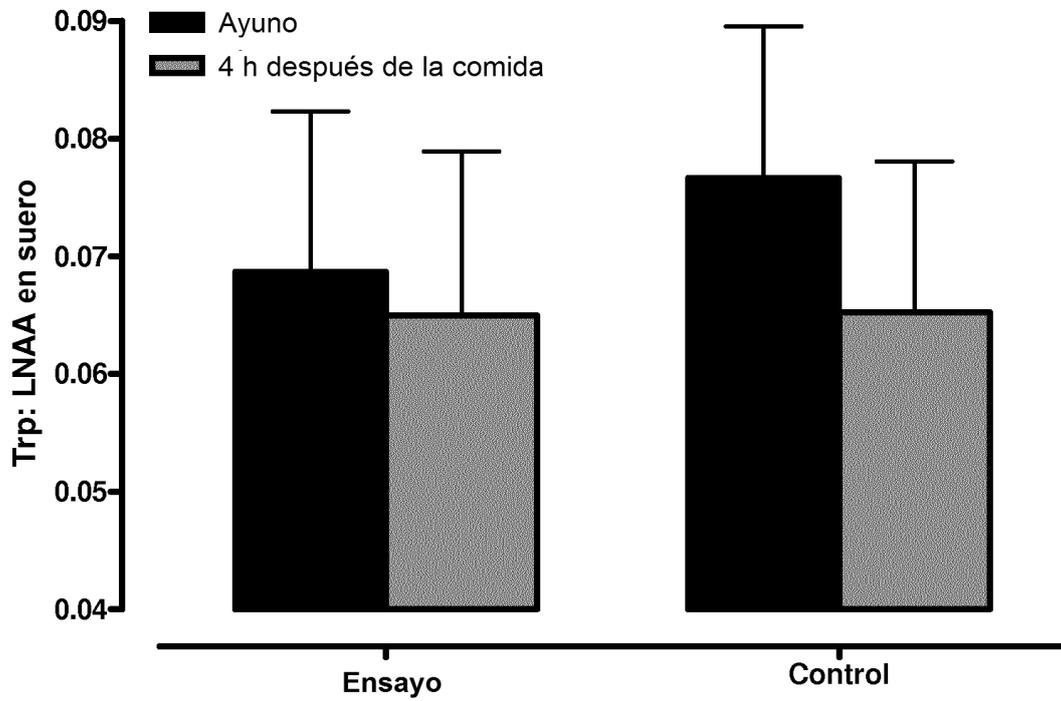


Fig. 7

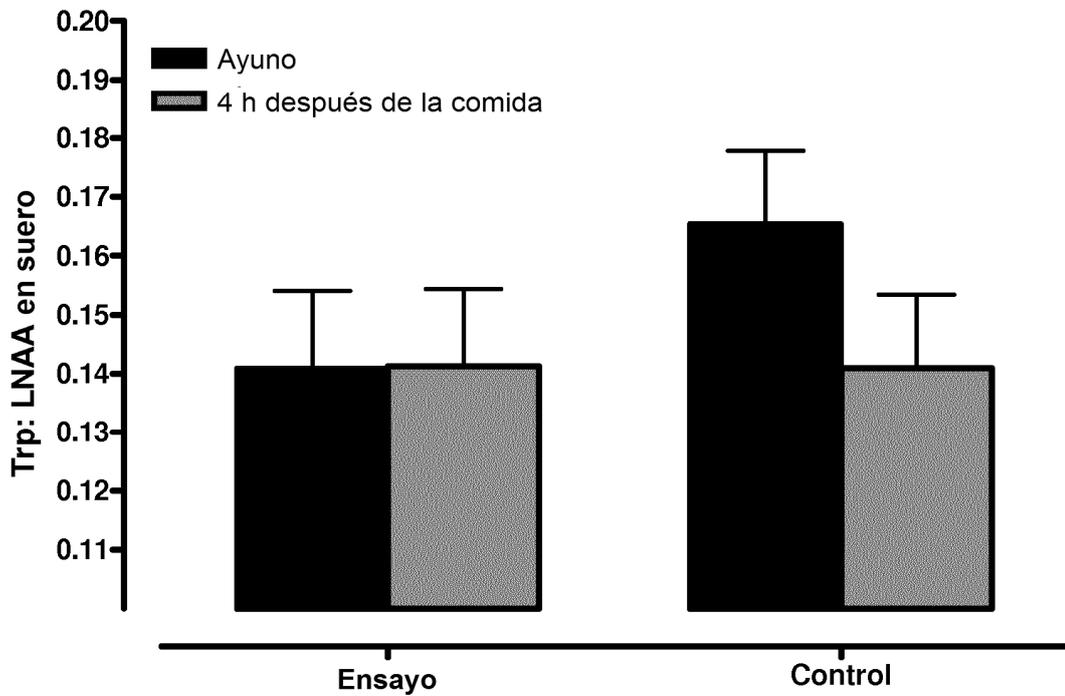


Fig. 8