

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 278**

51 Int. Cl.:

A23K 20/105	(2006.01) A23K 50/40	(2006.01)
A23K 20/111	(2006.01)	
A23K 20/142	(2006.01)	
A61K 36/185	(2006.01)	
A61K 31/198	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	
A61P 9/14	(2006.01)	
A23L 33/105	(2006.01)	
A23L 33/175	(2006.01)	
A23K 20/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/FR2012/000447**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072573**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12799241 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2779839**

54 Título: **Productos para administración oral que comprenden extractos de granada Punica granatum, pensados para un animal de compañía, y aplicaciones de los mismos**

30 Prioridad:

14.11.2011 FR 1103450

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2019

73 Titular/es:

**VIRBAC SA (100.0%)
1ère avenue 2065M-LID
06516 Carros, FR**

72 Inventor/es:

**MONGINOX, PATRICIA;
GATTO, HUGUES;
KARST, CHRISTIAN y
WALDENBERGER, FERDINAND RUDOLF**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 716 278 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

Productos para administración oral que comprenden extractos de granada *Punica granatum*, pensados para un animal de compañía, y aplicaciones de los mismos

[0001] La invención se refiere a un producto para administración oral pensado para un animal de compañía, que comprende extractos de granada *Punica granatum*, extractos de isoflavonas de soja, L-carnitina y taurina en el campo de los alimentos completos, alimentos complementarios (suplementos alimenticios) o dietéticos con fines sanitarios. Más especialmente, la invención se refiere a un producto para administración oral pensado para un animal de compañía, que comprende extractos de granada *Punica granatum*, extractos de isoflavonas de soja, L-carnitina y taurina para la prevención, el tratamiento o incluso la ayuda al control de las enfermedades cardiovasculares.

[0002] El incremento de la esperanza de vida de los animales de compañía como, por ejemplo, los perros y los gatos, es algo común hoy en día debido a los numerosos avances logrados durante el transcurso de las últimas décadas, sobre todo en los campos de la nutrición animal, la atención sanitaria preventiva, la medicina o incluso la cirugía.

[0003] En el caso de los perros, por ejemplo, las enfermedades cardíacas se consideran la cuarta causa de muerte más frecuente. Las patologías cardíacas se pueden clasificar en función de si son innatas, hereditarias (enfermedades congénitas) o adquiridas. Las enfermedades adquiridas son, principalmente, la insuficiencia valvular y la miocardiopatía dilatada. Estas últimas pueden afectar a cualquier raza de perro. No obstante, algunas razas tienen más predisposición que otras. Además, del mismo modo, estas enfermedades tienen una mayor incidencia en los perros de edad avanzada.

[0004] La insuficiencia valvular representa hasta un 75 % de las enfermedades cardíacas en los perros. Por lo tanto, se trata de la patología que se encuentra con más frecuencia en este animal.

[0005] Normalmente, la insuficiencia valvular es provocada por una degeneración mixomatosa progresiva de las válvulas auriculoventriculares, que contribuye a la patogenia de la enfermedad y a un aumento de la demanda de oxígeno celular. El riesgo de disfunción mitral aumenta con la edad. Se ha demostrado que un tercio de los perros de razas con predisposición son de pequeño tamaño y poseen un soplo cardíaco característico de una insuficiencia valvular desde los 7 años de edad. Tres cuartos de las insuficiencias cardíacas observadas en los perros son secundarias a esta enfermedad valvular primaria.

[0006] La miocardiopatía dilatada (DCM o MCD) es la segunda enfermedad adquirida más frecuente en los perros, después de la insuficiencia valvular. Afecta sobre todo a los perros grandes, y puede suponer también una consecuencia de la evolución de una insuficiencia valvular.

[0007] En los gatos, dichas patologías cardíacas también existen. La patología cardíaca más corriente es la miocardiopatía hipertrófica. Esta patología afecta principalmente a los machos, y puede aparecer en cualquier momento de la vida, con una mayor incidencia hacia la edad de 5-7 años. Otras patologías, tales como, por ejemplo, la miocardiopatía dilatada y la insuficiencia cardíaca por hipertiroidismo afectan igualmente a los gatos.

[0008] Ciertos estudios experimentales (Cesselli, D. *et al.* Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 89, 279-86 (2001)) han puesto de manifiesto una función importante del estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en perros. Más en concreto, se ha demostrado que el estrés oxidativo producía daños en diversos tipos de células cardiovasculares, y podía desencadenar el comienzo y la evolución de enfermedades cardiovasculares.

[0009] Así, algunos datos recientes sugieren que el estrés oxidativo interviene en la regulación de la apoptosis (muerte celular programada) de los cardiomiocitos. Estas desregulaciones se destinan a modificar la reactividad antioxidante de las células y, por consiguiente, a aumentar la gravedad de la insuficiencia cardíaca.

[0010] De hecho, la apoptosis acelerada de las células endoteliales vasculares perjudica la vascularización y se suma al desarrollo y a la evolución de las enfermedades vasculares. Ciertos datos recientes sugieren que el aumento de la tasa de renovación de las células endoteliales se produce como respuesta al aumento de las tasas de apoptosis. Parece que estos dos procesos perjudican a la integridad de la monocapa de células endoteliales y causan alteraciones funcionales que incluyen un incremento de la permeabilidad vascular y un cambio en el perfil de secreción que favorece actividades vasoconstrictoras, proadhesivas, protrombóticas y proinflamatorias que derivan en una fibrosis y en una pérdida progresiva de la elasticidad y de la estanqueidad de las válvulas.

[0011] Teniendo en cuenta la prevalencia de las patologías cardíacas en los animales (sobre todo las insuficiencias valvulares), y considerando que el estrés oxidativo desempeña una función importante en el desarrollo y la evolución de las enfermedades cardíacas, se ha examinado con detalle, por lo tanto, la posibilidad de regular este estrés oxidativo con compuestos exógenos. Se han demostrado las ventajas de la reducción del estrés oxidativo en relación con anomalías fisiopatológicas en los humanos, y se han llevado a cabo esfuerzos considerables para identificar y caracterizar sustancias que pudieran proteger las células endoteliales del estrés oxidativo.

[0012] Sin embargo, los efectos de los antioxidantes difieren según las especies. De hecho, como se indica en Ram, J.I. y Hiebert, L.M. (Vitamin E protects porcine but not bovine cultured aortic endothelial cells from oxygen-derived free radical injury due to hydrogen peroxide. *Cell Biol Toxicol* 20, 55-67 (2004)), parece que los efectos protectores conferidos por sustancias antioxidantes dependen de las especies. Por lo tanto, no es posible extrapolar los efectos protectores de las sustancias antioxidantes de una especie a otra.

[0013] Por lo tanto, resulta necesario desarrollar un producto para administración oral pensado para un animal de compañía, basado en la presencia de antioxidantes que poseen efectos protectores comprobados en los animales de compañía, preferiblemente en los cánidos o en los félidos. En concreto, resulta necesario que un producto permita proteger o atender a los perros con predisposición a enfermedades cardíacas, en concreto a insuficiencia valvular, como los perros pequeños. Del mismo modo, resulta necesario proteger o atender a los perros de edad avanzada, así como a los perros grandes que sufran otras patologías cardíacas.

[0014] Por otro lado, se ha mostrado además que una estrategia monodimensional de utilización de antioxidantes resultaba insuficiente para obtener cardioprotectores eficaces. Por lo tanto, resulta necesario desarrollar un producto para administración oral pensado para un animal de compañía, que comprende una combinación de sustancias que presentan antioxidantes y que poseen efectos complementarios o interdependientes.

[0015] Ya se ha demostrado que la L-carnitina y la taurina, conocidas por su actividad antioxidante, pueden proteger a las células endoteliales humanas frente al estrés oxidativo y, del mismo modo, pueden presentar efectos beneficiosos para algunas miocardiopatías de los perros (Sanderson, S.L. Taurine and carnitine in canine cardiomyopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 36, 1325-43, vii-viii (2006)). Estas sustancias se convierten en moléculas elegidas para formularse en complementos alimenticios pensados para los perros que padezcan problemas cardiovasculares.

[0016] Los compuestos polifenólicos, como las isoflavonas de soja provenientes de extractos de soja, y los taninos extraídos de la granada, se han estudiado también para determinar su actividad antioxidante y sus posibles efectos beneficiosos en las enfermedades cardiovasculares de los humanos (Nicholson, S.K., Tucker, G.A. y Brameld, J.M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc* 67, 42-7 (2008)).

[0017] En el documento WO2010/002525, se da a conocer un producto para administración oral que comprende punicalaginas que son elagitaninos. Se encuentran sobre todo en la piel de la granada y en el jugo de granada. El producto que se da a conocer en el documento WO2010/002525 comprende, además, L-carnitina y taurina, y se puede utilizar especialmente para mejorar la salud cardiovascular de sujetos pediátricos.

[0018] Los documentos EP2133080 y WO2010/012651 dan a conocer productos para administración oral que comprenden isoflavonas de soja, extractos de granada *Punica granatum*, y L-carnitina.

[0019] Por su parte, el documento KR20040010986 describe un producto que comprende extractos de granada *Punica granatum*, taurina y polvo de proteínas de soja.

[0020] Además, incluso aunque se haya evaluado la capacidad antioxidante de estas cuatro sustancias individualmente en varios ensayos *in vitro*, su capacidad para proteger las células endoteliales de los animales, especialmente las células endoteliales caninas, sigue siendo, actualmente, desconocida e incierta.

[0021] La solución al problema planteado tiene como objeto un producto para administración oral pensado para un animal de compañía, que comprende extractos de granada *Punica granatum*, caracterizado por que comprende, además, extractos de isoflavonas de soja, L-carnitina y taurina. Los compuestos antioxidantes adicionales se eligen de entre los bioflavonoides de limón, la vitamina C (ácido ascórbico) o uno de sus derivados/sales potenciales, como el ascorbato de calcio, la vitamina E, la coenzima Q10 (también conocida como ubiquinona), los polifenoles, en concreto el resveratrol, el extracto de corteza de pino marítimo, los extractos de té verde, el *Ginkgo Biloba*, los licopenos (por ejemplo, el licopeno de tomate).

[0022] La información que permite evaluar los efectos citoprotectores de las sustancias ha sido obtenida por la puesta en práctica de una prueba en células endoteliales aórticas caninas, como se describe en el ejemplo 1. Se han estudiado los efectos de la L-carnitina, la taurina, los extractos de granada y de isoflavonas de soja, utilizados solos o combinados, con el fin de determinar su potencial en el desarrollo de una estrategia de carácter multidimensional a fin de reducir la aparición y la evolución de las enfermedades caninas relacionadas con el estrés oxidativo.

[0023] Los datos derivados de este estudio sugieren sobre todo que las cuatro sustancias antioxidantes, que son la L-carnitina, la taurina, y los extractos de granada y de isoflavonas de soja, resultan extremadamente interesantes para el desarrollo de una estrategia de carácter multidimensional con el fin de reducir la aparición y la evolución de las enfermedades cardíacas inducidas por el estrés oxidativo en los animales de compañía, más especialmente, para reducir la degeneración de las células endoteliales implicadas en las insuficiencias valvulares progresivas.

[0024] Asimismo, la invención tiene por objeto un producto de acuerdo con la invención a modo de alimento completo. También tiene por objeto un producto de acuerdo con la invención a modo de alimento complementario o dietético con fines sanitarios (suplementos nutricionales).

[0025] Además, tiene por objeto un producto de acuerdo con la invención para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares. Tiene también por objeto un producto de acuerdo con la invención para ayudar a controlar enfermedades cardiovasculares.

5 **[0026]** Asimismo, la invención tiene por objeto proporcionar un producto que permita mejorar la salud o las condiciones de vida de un animal de compañía, administrando una cantidad efectiva del producto de acuerdo con la invención.

10 **[0027]** La presente invención ofrece, además, un método para reducir la proliferación y/o la apoptosis de las células endoteliales. La presente invención ofrece un nuevo método para proteger las células endoteliales contra el estrés oxidativo. Especialmente, para proteger las células endoteliales caninas. Así, la presente invención proporciona un producto para el apoyo de la función cardíaca en el caso de una insuficiencia cardíaca crónica; en concreto, en los perros.

[0028] La invención se podrá comprender mejor a través de la lectura de la siguiente descripción no limitativa, redactada con arreglo a las figuras adjuntas, en las cuales:

- 15 – las figuras 1 a 4 representan los resultados de estudios que tienen por objetivo evaluar los efectos de sustancias de referencia, incluidos antioxidantes (glutación, GSH, y N-acetilcisteína, NAC), factores de crecimiento vascular (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF; factor de crecimiento básico de fibroblastos, bFGF), agentes sensibilizadores de los receptores a la insulina (pioglitazona y rosiglitazona) en la proliferación y la apoptosis de células endoteliales aórticas caninas;
- 20 – las figuras 5 a 8 presentan los resultados de estudios de evaluación del efecto protector de sustancias naturales contra el estrés oxidativo con la ayuda de una nueva prueba desarrollada en células endoteliales caninas. En el caso de la figura 5, se evalúa el efecto en la proliferación celular. La figura 6 presenta el efecto dosis del extracto de granada en la proliferación celular. En la figura 7, se estudia el efecto en la apoptosis de las células endoteliales caninas. La figura 8 presenta el efecto dosis del extracto de granada en la apoptosis.
- 25 – las figuras 9 y 10 presentan los resultados de estudios que tienen por objetivo evaluar el efecto protector de sustancias naturales contra la mortalidad celular inducida por un estrés oxidativo. Este estudio ha sido realizado con la ayuda de una nueva prueba desarrollada en células endoteliales caninas y de pruebas de reducción de radicales libres; y
- la figura 11 presenta los resultados de un estudio que pretende evaluar el poder antioxidante de sustancias naturales mediante inhibición *in vitro* del radical ABTS.

30 **[0029]** El producto para administración oral pensado para un animal de compañía comprende:

- extractos de granada *Punica granatum*;
- extractos de isoflavonas de soja;
- L-carnitina; y
- taurina.

35 **[0030]** Según una forma de realización de la invención, el producto comprende:

- entre un 1 y un 90 %, entre un 1 y un 80 %, entre un 1 y un 50 %, entre un 5 y un 20 % en peso del peso total del producto de L-carnitina;
- entre un 1 y un 90 %, entre un 1 y un 80 %, entre un 1 y un 50 %, entre un 5 y un 30 % en peso del peso total del producto de taurina;
- 40 – entre un 0,1 y un 90 %, entre un 0,1 y un 50 %, entre un 0,1 y un 10 %, entre un 0,1 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de granada, *Punica granatum*; y
- entre un 0,1 y un 90 %, entre un 0,1 y un 50 %, entre un 0,1 y un 10 %, entre un 0,1 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de soja concentrados en isoflavonas.

[0031] Según una forma de realización preferida de la invención, el producto comprende:

- 45 – entre un 5 y un 15 % en peso del peso total del producto de L-carnitina;
- entre un 10 y un 20 % en peso del peso total del producto de taurina;
- entre un 0,1 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de granada, *Punica granatum*; y
- entre un 0,5 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de soja concentrados en isoflavonas.

[0032] Sin embargo, la elección y la cantidad precisa de cada ingrediente adicional se determina mediante la utilización final del producto de acuerdo con la invención. Esta elección depende especialmente de uno o varios parámetros, tales como el tipo de alimento en el que se vayan a añadir estos ingredientes (alimento completo, alimento complementario, alimento dietético), la forma farmacéutica del producto acabado (cápsula, comprimido, polvo, solución, etc.), la especie, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la tasa de consumo o el tipo de enfermedad o de afección tratada del animal al que se dirija el producto según la invención. Por consiguiente, las cantidades de los ingredientes adicionales pueden variar considerablemente.

[0033] El producto según la invención se puede encontrar en forma de alimento completo o de alimento complementario o dietético con fines sanitarios.

[0034] El producto de acuerdo con la invención resulta útil para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, para ayudar a controlar enfermedades cardiovasculares, o incluso para apoyar a la función cardíaca en el caso de una insuficiencia cardíaca crónica.

[0035] El producto según la invención está especialmente adaptado para la administración a un cánido o a un felido, en concreto a un cánido seleccionado de entre los perros de raza: Caniche, Chihuahua, Bichón, Yorkshire, Cavalier King Charles, Pekinés, Pinscher, Keeshond, Spaniel, Springer Spaniel inglés, Pomerania, Basset, Beagle, Westie, Whippet, Terrier, Fox Terrier, Yorkshire Terrier.

[0036] En otro aspecto, el producto según la invención se administra a diario durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En otro aspecto de la invención, el producto se administra en una dosis comprendida entre 0,0001 mg/kg y 350 mg/kg. En otro aspecto de la invención, el producto se encuentra en forma de un comprimido, una cápsula, una gragea, un polvo, un gránulo, un jarabe, una suspensión, una solución, una emulsión.

[0037] La granada es el fruto del granado (*Punica granatum*), de la familia de las litráceas. El extracto de granada posee fuertes capacidades antioxidantes y antiinflamatorias vinculadas a la presencia de antocianos, taninos elágicos y taninos hidrolizables. Del mismo modo, la granada presenta un efecto protector del endotelio, así como vasorrelajante. La granada *Punica granatum* puede tener una concentración mayor o menor de punicósidos y de antioxidantes según la fuente de granada empleada; según se ha indicado en el ejemplo 2, se preferirán las fuentes de granada que comprendan una importante proporción de punicósidos; en concreto, los extractos de granada que comprendan más de un 10, 20, 30 o 40 % de punicósidos.

[0038] Las isoflavonas de soja son moléculas de la familia de los flavonoides que poseen propiedades pseudoestrogénicas. La genisteína y la daidzeína son los principales flavonoides de la soja. Las isoflavonas de soja son antioxidantes que presentan un efecto protector y vasorrelajante para el endotelio. La genisteína es un antioxidante capaz de neutralizar los efectos negativos de los radicales libres en las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos.

[0039] La carnitina es un compuesto que comprende una función amonio cuaternario, y está biosintetizada a partir de lisina y metionina. Esta molécula interviene dentro de la célula en el transporte de los ácidos grasos del citosol hacia las mitocondrias durante el catabolismo de los lípidos en el metabolismo energético. La carnitina posee dos estereoisómeros, su forma biológica activa es la L-carnitina, mientras que la forma D es biológicamente inactiva. La L-carnitina es un antioxidante que además presenta propiedades antiarrítmicas.

[0040] La taurina deriva de un aminoácido azufrado: la cisteína. La taurina está presente de manera natural en el cuerpo, y se sintetiza en el mismo. Se trata de un antioxidante que interviene en el metabolismo energético, en las funciones cardíacas y musculares, reforzando sobre todo la contractilidad cardíaca, es decir, el inotropismo.

[0041] El producto según la invención se presenta en cualquier forma farmacéutica utilizada normalmente para una administración por vía oral, es decir, por boca. El producto de acuerdo con la invención se presenta ventajosamente en forma sólida o en forma líquida.

[0042] El producto de acuerdo con la invención se puede presentar en forma de un comprimido, una cápsula, una gragea, un polvo, un gránulo, o incluso en forma de jarabe, suspensión, solución, emulsión, preconcentrado o suspensión de microesferas o nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas que permitan una liberación controlada. Asimismo, se puede presentar en una forma incorporada en un producto acabado en forma de gel, pasta, alimento seco, lámina o un juguete para morder, como, por ejemplo, un hueso artificial. El producto de acuerdo con la invención se incorpora en una cantidad comprendida entre un 0,001 % y un 90 %, entre un 0,001 % y un 50 %, entre un 0,001 % y un 20 %, entre un 0,01 % y un 20 %, o entre un 0,01 % y un 10 % en peso total del producto acabado. La cantidad de producto de la invención en tales productos acabados puede ser determinada por el experto en la materia en función del destino del producto, del animal que se vaya a tratar o de la forma del producto.

[0043] Se puede presentar incluso en forma de mezcla fluida que se añadirá sobre una composición alimenticia o en una composición alimenticia. Según la forma de realización de la invención, el producto según la invención puede presentar un valor nutricional o no. Así, la invención se refiere también a un alimento que, por ejemplo, es un alimento completo o un alimento complementario (alimento complementario o dietético con fines sanitarios),

para animales de compañía, por ejemplo, para los cánidos, que comprenden los componentes del producto de la invención.

[0044] Ventajosamente, el producto según la invención comprende, además, uno o varios ingredientes adicionales conocidos por el experto en la materia, tales como, especialmente, los agentes estimulantes del apetito, los agentes aglutinantes, los agentes de granulación, los lubricantes, los aromas, los colorantes, las cargas, los edulcorantes, los emulsionantes, los potenciadores del sabor, los minerales, los agentes de recubrimiento, las sales, los estabilizantes, los tampones o las vitaminas. Los estabilizantes comprenden las sustancias que tienden a aumentar la vida útil de la composición, como los conservantes, los emulsionantes, los espesantes, los gases de envasado, los gelificantes, los humectantes, los secuestrantes, los sinergistas o los estabilizantes. Como agente aglutinante, se mencionarán, por ejemplo, los polímeros de alcohol polivinílico, de polivinilpirrolidona, los copolímeros de vinilpirrolidona y de acetato de vinilo, el acetato de polivinilo, las celulosas y sus derivados, el ácido alginico y sus sales, la zeína, el ácido hialurónico, las pectinas, la goma arábica, la goma tragacanto, la goma karaya, la goma xantana, los carragenanos, los polímeros pululano o agar, el quitosano o sus derivados, los carbómeros, el ácido acrílico reticulado con éteres de polialquileño, los policarbófilos, los copolímeros de metil vinil y de anhídrido maleico, los copolímeros de bloques no iónicos de polioxietileno y polioxipropileno, los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, los polioles o sus mezclas. Por celulosas y sus derivados, se entiende especialmente la celulosa microcristalina, los éteres o ésteres de alquilcelulosa, como la metilcelulosa, la etilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, el acetato de celulosa, el acetato de celulosa. Como agente diluyente, se mencionarán, por ejemplo, los polímeros de alcohol polivinílico, de polivinilpirrolidona, los copolímeros de vinilpirrolidona y de acetato de vinilo, el acetato de polivinilo, las celulosas y sus derivados, el ácido alginico y sus sales, la zeína, el ácido hialurónico, las pectinas, la goma arábica, la goma tragacanto, la goma karaya, la goma xantana, los carragenanos, los polímeros pululano o agar, el quitosano o sus derivados, los carbómeros, el ácido acrílico reticulado con éteres de polialquileño, los policarbófilos, los copolímeros de metil vinil y de anhídrido maleico, los copolímeros de bloques no iónicos de polioxietileno y polioxipropileno, los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, los polioles o sus mezclas, los azúcares, como la glucosa, las maltodextrinas, el sorbitol, la sacarosa.

[0045] Se elegirá un agente estimulante del apetito adaptado a la especie diana; en concreto, para los carnívoros domésticos, tales como los perros y los gatos, se elegirá, por ejemplo, la levadura de cerveza, la harina de carne, la harina de pescado, los polvos de queso o derivados de la leche, el polvo de hígado y sus mezclas, los aminoácidos y sus mezclas, los aromas naturales o artificiales.

[0046] Como agente de granulación, se mencionarán, por ejemplo, los copolímeros de metacrilato, la etilcelulosa y sus derivados. En una forma concreta de la invención, se elegirá el copolímero catiónico de metacrilato de dimetilaminoetilo, metacrilato de butilo, y metacrilato de metilo (conocido por el nombre comercial Eudragit E100®) o uno de sus derivados, que podrá conferir a la composición propiedades mejoradas de resistencia a la humedad.

[0047] Como lubricante, se mencionará, por ejemplo, el ácido esteárico y sus derivados, el ácido cítrico y sus derivados, el ácido láctico y sus derivados, los propilenglicoles, la glicerina, los ftalatos y sus derivados, los adipatos y sus derivados, los sebacatos y sus derivados, los polietilenglicoles y sus derivados, el behenato de glicerilo.

[0048] Como potenciador del sabor, se mencionará, por ejemplo, la sacarosa y los derivados del azúcar, tales como la sucralosa.

[0049] En una forma de realización alternativa de la invención, se pueden añadir también otros agentes por sus propiedades beneficiosas para el sistema cardíaco y vascular (efecto inotrope, antiarrítmico, hipotensor, vasodilatador...), tales como: el ácido fólico o vitamina B9, los ácidos grasos omega 3, metales como el selenio o el magnesio, el extracto de *Crataegus oxyacantha*, la L-arginina.

[0050] El producto según la invención está pensado para un animal de compañía, es decir, un animal que ha sido objeto de una domesticación. Preferiblemente, el animal de compañía se elige de entre los mamíferos (félidos, cánidos, équidos, lagomorfos, roedores). Ventajosamente, el producto según la invención está pensado para perros y gatos; no obstante, el término animal de compañía incluye también los nuevos animales de compañía (NAC), tales como, por ejemplo, el hurón, los roedores (por ejemplo, el conejo, el hámster) o el cerdo enano.

[0051] En un aspecto de la invención, el producto según la invención está dirigido a los perros. El producto y los métodos según la invención se dirigen principalmente a los perros de pequeño tamaño o a los perros de raza que presenten una predisposición a los problemas cardíacos. Dichas razas de perro son, a modo de ejemplo y sin carácter limitativo: Caniche, Chihuahua, Bichón, Yorkshire, Cavalier King Charles, Pekinés, Pinscher, Keeshond, Spaniel, Springer Spaniel inglés, Pomerania, Basset, Beagle, Westie, Whippet, Terrier, Fox Terrier, Yorkshire Terrier. En el marco de la presente invención, se entiende por «perro pequeño» a los perros de menos de 15 o 10 kilos.

[0052] En otro aspecto de la invención, el perro es un perro grande. En el marco de la presente invención, se entiende por «perro pequeño» a los perros de más de 30 kilos. A modo de ejemplo y con carácter no limitativo, es un perro de raza elegido de entre: Terranova, Bobtail, Labrador, Pastor alemán, Collie, Dóberman, Bóxer.

[0053] Los perros que no sean de raza pura pero posean características cercanas a dichas razas se pueden tratar también utilizando el producto de acuerdo con la presente invención.

[0054] En una forma de realización de la invención, el producto según la invención se puede administrar en combinación con medicamentos prescritos normalmente a los animales que padecen patologías cardíacas, como, por ejemplo, los antagonistas de la aldosterona, los inodilatadores, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, que comprenden, entre otros: Benazepril, Captopril, Cilazapril, Enalapril, Fosinopril, Imidapril, Lisinopril, Moexipril, Perindopril, Quinapril, Ramipril, Espirapril, Trandolapril.

[0055] De acuerdo con otra forma de realización, el producto según la invención es un alimento completo, un alimento complementario o dietético con fines sanitarios, es decir, un producto que combina la noción de alimento y de medicamento en el marco de una alimentación funcional. Por lo tanto, por definición, permite reducir los riesgos o prevenir la aparición de ciertas enfermedades, con la ayuda de sustancias contenidas en un alimento de consumo habitual. El término alimento complementario o dietético se utiliza en este caso para designar un alimento que presenta un impacto positivo en la salud y/o en los rendimientos físicos de un animal, más allá de la simple función de aportar nutrientes. Según la invención, los beneficios observados en el producto se refieren especialmente a las enfermedades cardiovasculares.

[0056] De este modo, el alimento de acuerdo con la invención puede comprender sustancias distintas de los ingredientes adicionales detallados arriba, especialmente extractos de plantas, materias primas alimentarias (vegetales, animales, minerales), aminoácidos, proteínas, aceites esenciales, materias grasas (particularmente, ácidos grasos), minerales, vitaminas o sustancias activas medicamentosas.

[0057] Como se detalla en los ejemplos que se exponen más adelante, según la invención, el producto se utiliza, ventajosamente, para el tratamiento, la prevención o la ayuda para el control de enfermedades cardiovasculares. En el contexto de la presente invención, se entiende por «ayuda para el control de enfermedades cardiovasculares» a un medio para aportar un apoyo de la función cardíaca en los animales, especialmente aquellos predispuestos a desarrollar patologías cardiovasculares. Preferiblemente, el producto de acuerdo con la invención permite apoyar la función cardiovascular en los perros y, en concreto, en los afectados o predispuestos a desarrollar enfermedades valvulares, particularmente las enfermedades valvulares mitrales en los perros pequeños, estando pensado dicho producto para proporcionarse al perro, especialmente de edad avanzada, todos los días y a largo plazo.

[0058] En una variante de la invención, el producto se puede administrar a diario y a lo largo de la vida del animal. En otra variante, el producto se puede administrar también de forma regular 1, 2 o 3 veces al día o cada 2, 3 o 4 días, 1, 2 o 3 veces por semana o 1, 2, 3 o 4 veces al mes.

[0059] En otra variante, el producto se puede administrar también en forma de curas o ciclos de tratamiento. Es decir, la administración del producto, a diario o no, se realiza en un período de tiempo definido, comprendido entre 1 semana y un año, más especialmente durante 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses. En una variante de la invención, el producto de acuerdo con la invención se administra al animal al menos 2, 3, 4, 5, 6 o más veces. En una forma de realización, el producto se administra en forma de cura de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más meses, 1, 2, 3 veces al año. En una variante concreta de la invención, el producto se administra a diario, durante un período comprendido entre 1 y 6 meses, en forma de cura renovable de una a dos veces al año.

[0060] En otra variante concreta, el producto se administra a diario durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses.

[0061] El producto de acuerdo con la invención se administra en una dosis y con una frecuencia que puede elegir y ajustar un experto en la materia. Por lo general, el producto de la invención se administra en una dosis comprendida entre 0,0001 mg/kg y 350 mg/kg, entre 0,001 mg/kg y 350 mg/kg, entre 0,01 mg/kg y 350 mg/kg, entre 1 mg/kg y 350 mg/kg, entre 10 mg/kg y 350 mg/kg. La cantidad total de extracto de granada contenida en el producto de acuerdo con la invención varía preferiblemente entre 0,001 mg/kg y 350 mg/kg, preferiblemente de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente incluso de 0,1 mg/kg a 35 mg/kg.

[0062] De manera alternativa, cuando el producto según la invención se integre en un alimento completo, la dosis diaria puede expresarse en miligramos por unidad de caloría. El producto de la invención se administra en una cantidad comprendida entre 0,01 mg/500 kcal y 350 mg/500 kcal, entre 1 mg/500 kcal y 350 mg/500 kcal, entre 10 mg/500 kcal y 350 mg/500 kcal. Por consiguiente, la cantidad total de extracto de granada contenida en el producto de acuerdo con la invención puede variar entre 0,001 mg/500 kcal y 350 mg/500 kcal, preferiblemente de 0,01 mg/500 kcal a 50 mg/500 kcal, preferiblemente de 0,1 mg/500 kcal a 35 mg/500 kcal.

[0063] La invención propone también un método para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardíacas en los animales, comprendiendo la administración de una composición según la invención en una cantidad suficiente para tratar o prevenir las enfermedades cardíacas. La cantidad suficiente es de al menos 0,0001 mg/kg, al menos 0,001 mg/kg, al menos 0,01 mg/kg. El tratamiento se administra durante un período de al menos 1, 2, 3 semanas o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses.

[0064] En el contexto de la invención, las dosis mencionadas se entienden como dosis diarias en el caso de un tratamiento diario. Asimismo, estas dosis se pueden administrar a diario únicamente durante un período de tiempo determinado; por ejemplo, durante una cura.

[0065] En un aspecto de la invención, el producto se utiliza con fines no terapéuticos; por ejemplo, para mejorar el estado general del animal. De hecho, el producto según la invención puede presentar un efecto energizante, un efecto en la disminución del envejecimiento celular y, en consecuencia, puede reducir la incidencia de enfermedades y favorecer la recuperación del animal tras una enfermedad o un accidente, o incluso para el aumento de la vitalidad. Estos beneficios se podrán observar a través de una mejora del aspecto estético del animal (pelaje brillante, mejor postura), de su tono, a través de la mejora de su comportamiento (interacción con su amo, sueño, apetito, gusto por el juego), la mejora del estado general evitará también el establecimiento de enfermedades oportunistas.

Ejemplo 1: Efectos *in vitro* de agentes vasoprotectores en células endoteliales aórticas caninas

[0066] Al utilizar las células CnAOEC provenientes de Cell Applications, Inc, se ha podido establecer un modelo de cultivo celular, que permite probar funciones celulares esenciales, como la proliferación y la apoptosis, en respuesta a diferentes estímulos. El sistema implementado permite identificar los estímulos proproliferativos y antiproliferativos, así como los estímulos proapoptóticos y antiapoptóticos.

[0067] En caso de que los antioxidantes sean las sustancias de ensayo de la fase 2 del estudio, es importante que los ensayos implementados permitan detectar el potencial antiproliferativo, así como los efectos antiapoptóticos ya observados en las células endoteliales expuestas a los siguientes antioxidantes: el glutatión (GSH) y la N-acetilcisteína (NAC). Las actividades antiproliferativas y antiapoptóticas de referencia de estas sustancias han mostrado una reproducibilidad considerable a lo largo de todo el estudio.

A. Fase 1 de establecimiento de pruebas de evaluación de los posibles efectos de pro/antiproliferación y pro/antiapoptóticos:

[0068] Las células CnAOEC se cultivaron en placas de cultivos cubiertas con un medio de cultivo específico. Las células CnAOEC se marcaron con ³H-timidina y se expusieron a agentes de referencia conocidos para adaptar la apoptosis y la proliferación en distintos tipos de células endoteliales vasculares humanas. Estas sustancias de referencia incluyen antioxidantes (glutatión y N-acetilcisteína), ácidos grasos libres (ácido linoleico (ALenS) y γ -linoleico (Lols)), factores de crecimiento vascular (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF, siglas de «Vascular Endothelial Growth Factor», y factor de crecimiento básico de fibroblastos, bFGF, siglas de «basic Fibroblast Growth Factor») y sensibilizadores a la insulina (pioglitazona y rosiglitazona). Tras la incubación de las células con las sustancias de prueba y de referencia, las pruebas de proliferación y de apoptosis se han efectuado conforme a lo descrito con más detalle más adelante.

[0069] Con el fin de establecer pruebas con la ³H-timidina que analicen la proliferación y la apoptosis en células CnAOEC, se han evaluado distintos aspectos.

a. Caracterización de las células endoteliales aórticas caninas y del proceso para su cultivo: condiciones experimentales para la siembra (número necesario de células, condiciones de desprendimiento y fijación de las células, tasas de crecimiento, etc.)

[0070] Las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene el factor de crecimiento CECGM (*Canine Endothelial Cell Growth Medium*, Medio de crecimiento de células endoteliales caninas) y, previamente, se recubren con el agente AFS (Attachment Factor Solution, Solución del factor de fijación) para facilitar su adherencia. Para el desarrollo del ensayo, se sembraron las células con una densidad de 5 000 a 10 000 células/cm² en placas de cultivo pretratadas con fibronectina (0,0025 % en tampón PBS).

b. Pruebas de proliferación:

[0071] Los cultivos celulares confluentes de CnAOEC se volvieron a sembrar en placas de cultivo de 96 pocillos (10 000 células por pocillo). 6 horas después de su siembra, las células se expusieron a la ³H-timidina (concentración final: 1 μ Ci/ml) y a los respectivos agentes de ensayo durante 48 h, y después experimentaron dos etapas de lavado con PBS. Tras un tratamiento con tripsina y un ciclo de congelación-descongelación, el ADN que incorpora la ³H-timidina se atrapó con un filtro de fibra de vidrio utilizando una «*Cell harvester* de Betaplate™ de 96 pocillos» (Wallac, Turku).

[0072] Las cantidades de ³H-timidina incorporadas en las células de control (sin añadir agente de ensayo) se definieron como el 100 %, y los resultados se expresaron en función de estas células de control.

[0073] Según muestra la figura 1, que ilustra los efectos de las distintas sustancias de referencia en la proliferación de las células CnAOEC (media de tres experimentos independientes, efectuados en cuatro pocillos), el antioxidante glutatión (GSH), los sensibilizadores a la insulina pioglitazona (Pio) y rosiglitazona (Rosi), así como los ácidos grasos libres (ácido linoleico (ALenS) y γ -linoleico (Lols)) que reducen considerablemente la proliferación de las células CnAOEC. En cambio, y de manera sorprendente, los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y

de los fibroblastos (bFGF), conocidos por aumentar la proliferación de las células endoteliales humanas, no provocaron esta misma respuesta en las células CnAOEC.

[0074] Como se muestra en la figura 2, que representa la proliferación de las células CnAOEC en un medio de cultivo con CECG reducidos, aunque la proliferación esté casi completamente bloqueada (<2 %) por los dos ácidos grasos libres, los efectos antiproliferativos se mantienen en un intervalo similar para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), el glutatión (GSH), la rosiglitazona (Rosi) y la pioglitazona (Pio). Por lo tanto, a raíz de estos experimentos, se deduce que el bFGF y el VEGF, al contrario que los modelos de cultivos de células endoteliales humanas, no influyen en la proliferación de las células CnAOEC. Las mismas proporciones de DMSO (1 %) y de etanol (1,5 %) se utilizan como disolventes para los ácidos grasos libres o para las futuras sustancias de ensayo.

c. Ensayos de las sustancias de referencia en la apoptosis en las células CnAOEC:

[0075] Las placas de 60 mm que contenían células CnAOEC semiconfluentes se marcaron con ^3H -timidina (1 $\mu\text{Ci/ml}$) durante 36 h. A continuación, se sembraron estas células en placas de cultivo de 24 pocillos (50 000 células/pocillo). Tras su exposición a los agentes de ensayo (24 horas), las células se trataron con un tampón de lisis (20 mmol/l de TrisHCl, pH 7,5, y 0,4 % de Triton X-100 en PBS). El ADN fragmentado (apoptótico) radiomarcado presente en el sobrenadante se contó con la ayuda de un analizador de centelleo líquido (Liquid Scintillation Analyser). Posteriormente, los resultados se correlacionaron con la radiactividad total incorporada en las células (cuantificada tras la digestión de la suspensión restante con 180 $\mu\text{g/ml}$ de ADNasa). Los valores calculados para las células de control (sin añadir agente de ensayo) se fijaron como el 100 %, y los resultados se expresaron en función de estas células de control. Siempre que las sustancias de referencia se disolvieron en etanol (concentración final de 1,5 %), se añadió una cantidad idéntica de etanol en todos los demás pocillos, incluidos los pocillos de control.

d. Ensayos de apoptosis

[0076] Los ensayos de apoptosis se llevaron a cabo con células CnAOEC radiomarcadas, con una confluencia del 60 % y en placas de cultivo previamente tratadas con fibronectina. En esta confluencia, la apoptosis de las células se inhibe tras su exposición a los antioxidantes glutatión y N-acetilcisteína. De manera contraria, la exposición de las células a ácidos grasos libres (ácido linoleico y ácido γ -linoleico) provocó una reacción proapoptótica muy fuerte.

[0077] 25 μM de ácidos grasos libres inducen débilmente la apoptosis en las células CnAOEC; por lo tanto, las concentraciones que se deben utilizar para los ácidos grasos libres se fijaron en 50, 100 y 200 μM para los experimentos posteriores. Además, como muestran las figuras 3 y 4, que representan la apoptosis de las células CnAOEC, los efectos proapoptóticos de los ácidos grasos no están completamente bloqueados por los antioxidantes glutatión (GSH) y N-acetilcisteína (NAC), ni por el ácido linoleico (ALenS), ni por el ácido γ -linoleico (LoIS).

Conclusión en relación con la fase 1:

[0078] En la primera fase del estudio, se establecieron protocolos para el cultivo de las células CnAOEC (en placas de cultivos recubiertas de fibronectina y en medio de cultivo para células endoteliales caninas), así como para la aplicación de las pruebas de proliferación y de apoptosis.

[0079] Los antioxidantes glutatión y N-acetilcisteína, así como los sensibilizadores a la insulina, que son la pioglitazona y la rosiglitazona, reducen la proliferación celular de un 30 a un 70 %, mientras que los ácidos grasos libres (ácido linoleico y γ -linoleico) bloquean completamente la proliferación endotelial. Al contrario que su efecto en las células endoteliales vasculares humanas, el bFGF y el VEGF no presentan efecto proproliferativo en las células CnAOEC.

[0080] Los antioxidantes glutatión y N-acetilcisteína inhiben significativamente la apoptosis en las células CnAOEC, mientras que los ácidos grasos libres provocan una fuerte reacción proapoptótica. Estos datos muestran que el diseño del experimento establecido está adaptado correctamente para determinar a la vez los efectos proapoptóticos y antiapoptóticos de las sustancias.

B. Fase 2 de evaluación de las sustancias de ensayo

a. Evaluación de las sustancias de ensayo en la proliferación de las células CnAOEC:

[0081] Antes de cada experimento, se preparó una nueva solución madre de cada una de las sustancias de ensayo (taurina, carnitina, extractos de granada e isoflavonas de soja). La solubilización de las isoflavonas de soja se realizó en DMSO. Las muestras experimentales, así como las de los respectivos controles (DMSO sin sustancia de ensayo) contenían una concentración final de DMSO del 1 %. Las sustancias: taurina, L-carnitina, concentrado de isoflavonas de soja y extracto de granada se analizaron por sí solas o asociadas con una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos para los pocillos de control (sin sustancias de ensayo, pero con la misma concentración de disolvente, por ejemplo, DMSO).

[0082] Para la mezcla de las 4 sustancias de ensayo, la concentración es de 250 $\mu\text{g/ml}$, esto es, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de cada sustancia de ensayo.

[0083] La concentración final de DMSO en el control, así como las muestras experimentales expuestas a la mezcla, se ajustó al 1 %.

[0084] Como se representa en la figura 5, las sustancias taurina (Tau), extracto de granada 40 % (Pom, por «pomegranate»), L-carnitina tartrato (Car), isoflavonas de soja (Soy) (40 % de isoflavonas) y una mezcla de estas sustancias (Mezcla) se sometieron a ensayo empleando las concentraciones de 50 µg/ml para las sustancias solas y 62,5 µg/ml por sustancia para la mezcla (es decir, 250 µg/ml), en comparación con concentraciones de 10 mmol/l para el control glutatión (GSH) para determinar su eficacia en la modulación de la proliferación de las células CnAOEC.

[0085] La evaluación estadística se basa en tres o cuatro experimentos distintos, y cada uno de ellos se realiza con entre 2 y 4 pocillos independientes.

[0086] La carnitina (Car) y la taurina (Tau) no modularon considerablemente la proliferación de las células CnAOEC. Para estas dos sustancias, se observa únicamente una ligera, aunque significativa, reducción de la proliferación, con una disminución del 3,75 % en el caso de la carnitina (Car; tasa de renovación del 96,25 %) y de un 4 % en caso de la taurina (Tau; tasa de renovación del 96 %).

[0087] Por lo que respecta a la granada y a las isoflavonas de soja, se observa una importante inhibición de la proliferación de las células, con tasas de renovación que no son superiores a alrededor de un 10,5 % en el caso del extracto de granada y de un 75 % en el caso del concentrado de isoflavonas de soja en comparación con el control (fijado en un 100 %). Resulta interesante el hecho de que el control positivo utilizado, el glutatión, redujo la proliferación a únicamente un 54,75 % del control.

[0088] La figura 5 muestra también que la utilización de una mezcla de las 4 sustancias (Mezcla) reduce considerablemente la proliferación de las células a un 2,75 % del control (fijado en un 100 %). Este efecto inhibitor significativo se debe posiblemente a la acción antiproliferativa de la granada (Pom) y de las isoflavonas de soja (Soy), incluso aunque la mezcla presente únicamente un 25 % de cada una de las cuatro sustancias. Por lo tanto, se observa un efecto sinérgico de al menos dos compuestos de la mezcla de las 4 sustancias (Mezcla), que produce una acción antiproliferativa considerable en las células CnAOEC.

[0089] La figura 6 presenta, en las mismas condiciones experimentales, los resultados del efecto dosis (1, 50 y 250 µg/ml) en el caso de la granada sola. Esta figura 6 muestra que el efecto en la proliferación celular se obtiene de un modo dependiente a la dosis con la granada sola.

b. Evaluación de las sustancias de ensayo en la apoptosis de las células CnAOEC:

[0090] Según se representa en la figura 7, se sometió a ensayo el extracto de granada al 40 % y una mezcla de las sustancias taurina, extracto de granada, L-carnitina tartrato, isoflavonas de soja (mezcla de las 4) utilizando las concentraciones 1 y 50 µg/ml en comparación con 10 mmol/l del antioxidante glutatión (GSH). La figura 8 presenta una respuesta a la dosis del efecto del extracto de granada por sí solo con dosis de 1, 50 y 250 µg/ml.

[0091] La evaluación estadística se basa en tres experimentos distintos, y cada uno de ellos se realiza con entre 2 y 4 pocillos independientes.

[0092] La modulación de la apoptosis de las células CnAOEC (variación medida en % con respecto al control fijado en el 100 %) se realiza en comparación con la sustancia de referencia, que es el glutatión (GSH).

[0093] El extracto de granada (en concreto, con un contenido de un 40 % de punicósidos) reduce significativamente la apoptosis en todas las concentraciones analizadas y de manera dependiente a la dosis. Así, en una concentración de 250 µg/ml, se observa una reducción de un 74 % en comparación con las células control (fijada en el 100 %).

[0094] La mezcla de las 4 sustancias (Mezcla), según se ilustra en la figura 7, provoca una reducción significativa de la apoptosis en comparación con las células control (disolvente sin sustancias de ensayo). No obstante, estas reducciones no son lo suficientemente importantes como para ser significativas desde el punto de vista estadístico.

Conclusión en relación con la fase 2:

[0095] Según se ha indicado anteriormente, los extractos de granada y de isoflavonas de soja reducen la proliferación y la apoptosis de manera dependiente a la dosis, donde el extracto de granada presenta los efectos más importantes.

[0096] Resulta interesante destacar que, con las concentraciones analizadas, el extracto de granada presenta efectos antiproliferativos y antiapoptóticos superiores al antioxidante glutatión. En cuanto a la mezcla, esta parece reducir considerablemente la proliferación a una concentración de 250 µg/ml, mientras que, para la apoptosis, los valores medios son inferiores a los de sus respectivos controles.

Ejemplo 2: Evaluación del efecto protector de sustancias naturales contra el estrés oxidativo con la ayuda de una nueva prueba desarrollada en células endoteliales caninas y de ensayos de captura de radicales libres («ensayos de oxidación por radicales»)

[0097] El objetivo de este ejemplo es evaluar la protección contra el estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 en células endoteliales caninas y el potencial de reducción de los radicales libres mediante sustancias naturales antioxidantes. Antes de estos estudios, no se había descrito ningún compuesto para un efecto contra el estrés oxidativo *in vitro* en células endoteliales caninas. Además, según Ram y Hiebert (*cf.* arriba), el efecto protector observado en las células endoteliales aórticas con las moléculas antioxidantes naturales podría ser dependiente de la especie.

[0098] En los experimentos llevados a cabo más adelante, se obtuvieron los distintos productos químicos y reactivos de cultivo celular, como se indica a continuación:

- las células aórticas endoteliales caninas (CnAOEC) y el medio de cultivo de las células endoteliales caninas (CECGM, siglas de «Canine Endothelial Cell Growth Medium», Medio de crecimiento de células endoteliales caninas) provienen de la compañía Tebu-Bio™;
- los productos Trolox™, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), H_2O_2 , MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) provienen de la compañía Sigma-Aldrich™;
- el concentrado de isoflavonas de soja es un concentrado al 40 % de isoflavonas y proviene de la compañía ADM™;
- el extracto de granada concentrado al 40 % de punicósidos proviene de Polynat; y, por último,
- la L-carnitina-L-tartrato y la taurina provienen de la compañía Arnaud SAS™.

[0099] Hay disponibles datos acerca de la biodisponibilidad en los perros de la taurina, la carnitina y la genisteína (una de las principales isoflavonas de soja agliconas). Estos datos muestran que las concentraciones plasmáticas tras la administración oral de suplementos pueden alcanzar 50 µg/ml en el caso de la taurina y la carnitina y 5 µg/ml en el caso de la genisteína.

[0100] Con respecto al extracto de granada, únicamente hay datos disponibles en el caso de los humanos. En estos estudios, se ha mostrado que el ácido elágico, uno de los principales polifenoles alimentarios de la granada, se puede encontrar en el plasma con una concentración de aproximadamente 10 µg/ml tras una administración de suplemento alimenticio de extracto de granada.

[0101] Las células CnAOEC se descongelaron y se cultivaron en un medio de crecimiento para células endoteliales caninas conforme a las instrucciones del proveedor.

[0102] Las células se sembraron con distintas densidades de $2 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^4$ células/cm² en placas de 96 pocillos para realizar un seguimiento de su comportamiento en cultivo. Con $5 \cdot 10^4$ células/cm², las células presentan su aspecto típico, y alcanzaron un 100 % de confluencia tras 7 días de cultivo. El comportamiento y la apariencia de las células CnAOEC permanecen sin cambios entre los pasos 1 a 14, y estas células se utilizaron, como máximo, hasta el paso 14.

[0103] En este ejemplo, los datos experimentales de los sistemas acelulares se expresan en media $\pm$ SD (siglas de «standard deviation», es decir, la desviación típica) y se analizan con la ayuda de la prueba *t* de Student mediante programas informáticos comerciales (SYSTAT, SPSS Inc, Chicago, Ill).

[0104] Los datos obtenidos con las sustancias naturales en la prueba a base de células CnAOEC se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA simple (ANOVA de un factor). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

a. Medición de la viabilidad celular con la ayuda de un ensayo MTT:

[0105] El ensayo MTT se utilizó para evaluar la viabilidad de las células CnAOEC expuestas a tratamientos citotóxicos (60 µM de digitonina o adición de entre un 0,1 y un 20 % de DMSO o en concentraciones crecientes (de 0,5 a 16 mM) de H_2O_2 durante 24 horas con el fin de inducir un estrés oxidativo.

[0106] En esta prueba, los daños celulares se evaluaron 24 h después del tratamiento con la sustancia citotóxica a través de una incubación de 4 horas con MTT a 0,5 mg/ml, 37 °C y un 5 % de CO_2 . A continuación, se centrifugaron las placas, y el formazán resultante de la reacción con MTT se solubilizó en el DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm, con una corrección a 690 nm.

[0107] Se eligió el ensayo MTT para medir la viabilidad celular en función de los datos obtenidos tras el tratamiento de la célula con digitonina a 60 µM (73 % de reducción $\pm$ 10 %) y con DMSO a un 10 y 20 %.

[0108] Los daños en las células CnAOEC provocados por los radicales libres provienen de un tratamiento con H_2O_2 en un rango de concentración comprendido entre 0,5 y 16 mM.

[0109] Los resultados del análisis MTT indican que la viabilidad celular disminuye significativamente tras 24 h de exposición.

[0110] Se escogieron estas condiciones con el fin de efectuar el examen analítico de las sustancias naturales seleccionadas.

b. Evaluación del potencial de las sustancias naturales para la protección de las células CnAOEC contra el daño oxidativo:

5 [0111] Se evaluó en las células CnAOEC la capacidad de las sustancias naturales para proteger a las células contra los efectos perjudiciales del estrés oxidativo. Las diferentes muestras se diluyeron en el medio de cultivo, y no se observó ningún problema de solubilización con cada una de las sustancias de ensayo. A continuación, las células se pretrataron durante 8 h con concentraciones crecientes (1, 50, 250 µg/ml) de extracto de isoflavonas de soja (Soy), de extracto de granada (Pom), de L-carnitina (Car), de taurina (Tau) y de la mezcla SPCT (Mezcla), es
10 decir, la mezcla de las 4 sustancias en la que está presente cada una de las sustancias, respectivamente, con 0,25, 12,5, y 62,5 µg/ml con el fin de obtener las mismas concentraciones en la muestra final, esto es, 1, 50, 250 µg/ml. Tras el período de pretratamiento, las células se sometieron a un estrés oxidativo (H₂O₂ a 2 mM) durante 24 horas, y la viabilidad celular se evaluó por medio del ensayo MTT, según se ha descrito anteriormente.

15 [0112] Para este ensayo, los datos son promedios obtenidos a partir de ocho experimentos distintos $\pm$ la desviación típica («standard deviation», SD). Se analizaron estadísticamente mediante una prueba de ANOVA simple (ANOVA de un factor y prueba *t* de Student). Las diferencias se consideraron significativas con un *p* < 0,05.

20 [0113] El efecto protector del pretratamiento con sustancias naturales en la viabilidad celular de las células tratadas con H₂O₂ se evaluó empleando el ensayo MTT. Según se representa en la figura 9, los datos muestran que, con la dosis de 50 µg/ml, la taurina, la L-carnitina y el extracto de isoflavonas de soja no son capaces de mantener la viabilidad de las células CnAOEC durante la aplicación de un estrés oxidativo con 2 mM de H₂O₂.

25 [0114] Sin embargo, como se representa en la figura 9 con la dosis de 50 µg/ml y en la figura 10, para las concentraciones de 1 a 250 µg/ml, el extracto de granada muestra un efecto protector fuerte y significativo respecto a la viabilidad de las células CnAOEC contra el daño celular inducido por el H₂O₂ de manera dependiente a la dosis. De hecho, con 50 y 250 µg/ml, el extracto de granada mejora la viabilidad de las células como consecuencia de un estrés oxidativo del 35 % y del 82 %, respectivamente. Además, este efecto protector se observa incluso cuando el extracto de granada se mezcla con las otras sustancias. De hecho, como se representa en la figura 9, la combinación de las 4 sustancias a 250 µg/ml (correspondiente respectivamente a una concentración de 62,5 µg/ml para cada ingrediente) mejora la viabilidad de las células CnAOEC en un 51 %.

30 [0115] El nivel de protección celular inducido por la mezcla de las cuatro sustancias es comparable a la protección inducida únicamente por el extracto de granada.

c. Dosificación de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC):

[0116] Este método se basa en la capacidad de las moléculas antioxidantes para desactivar el radical ABTS^{•+} con una larga vida útil, en comparación con el Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua, utilizado como control positivo. El radical ABTS^{•+} es un cromóforo azul-verde con una absorción característica a 734 nm.

35 [0117] Las muestras de las sustancias de ensayo y de Trolox se diluyen en el tampón PBS con el fin de obtener las concentraciones elegidas. Posteriormente, se añaden 200 µl de ABTS^{•+} con una concentración de 7 mM a 50 µl de muestra o de solución Trolox en placas de 96 pocillos.

40 [0118] La absorbancia de las distintas muestras se lee cada 2 minutos durante 6 minutos (tiempo de incubación) a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en porcentaje de inhibición del radical ABTS y en equivalente de Trolox (µM).

[0119] Los resultados del ensayo TEAC se plasman en la tabla A que se presenta a continuación:

Tabla A:

		Ensayo TEAC	
		Inhibición ABTS ^{•+}	
Muestra		%	Desviación típica
Control		0,00	4,09
Isoflavonas de soja (µg/ml)	1	9,04	1,94
	50	83,44	5,42
	250	91,62	2,99

		Ensayo TEAC	
		Inhibición ABTS°+	
Muestra		%	Desviación típica
Granada (µg/ml)	1	27,84	4,12
	50	97,37	2,75
	250	97,38	2,61
L-carnitina (µg/ml)	1	0,45	4,95
	50	0,37	4,59
	250	0,92	4,19
Taurina (µg/ml)	1	-0,50	4,02
	50	-0,69	4,42
	250	-0,62	4,66
Mezcla SPLT (µg/ml)	1	8,91	3,57
	50	97,16	2,66
	250	96,79	2,82

[0120] Como se indica en la tabla A anterior, los extractos de isoflavonas de soja y de granada mostraron una fuerte actividad antioxidante. De hecho, el extracto de granada extinguió casi por completo, es decir, debilitó, el radical ABTS a 50 y 250 µg/ml. El radical ABTS se debilita también, de un modo dependiente a la dosis, por 50 y 250 µg/ml de isoflavonas de soja (83 y 91 %, respectivamente, de desactivación). Por otra parte, la taurina y la L-carnitina no mostraron ningún efecto en la inhibición del radical ABTS. El radical ABTS se inhibe también casi completamente por 50 y 250 µg/ml de la mezcla SPLT (que contiene, respectivamente, 12,5 y 62,5 µg/ml de cada ingrediente). Este porcentaje de inhibición equivale al que se obtiene únicamente con 50 µg/ml de extracto de granada.

d. Ensayo antioxidante DPPH:

[0121] Este ensayo de actividad antirradicalar se basa en la capacidad de las moléculas antioxidantes para reducir el radical estable púrpura DPPH (por 1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

[0122] La prueba se realizó en placas de 96 pocillos, donde se mezclaron 190 µl de solución de DPPH (150 µM) en etanol con 10 µl de solución de muestra preparada en un tampón PBS con las concentraciones elegidas.

[0123] La absorbancia de la mezcla se lee a 540 nm cada 5 minutos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la reducción, el color de la solución desaparece (paso de un color violeta a un color amarillo pálido).

[0124] El porcentaje de reducción (denominado en este caso «inhibición» o «extinción») refleja la capacidad de barrido de los radicales libres de la muestra de ensayo.

[0125] El Trolox se utiliza, asimismo, como control positivo.

[0126] Los resultados se presentan en porcentaje de inhibición del radical DPPH. Cabe destacar que, con el extracto de granada en una concentración de 250 µg/ml, se observó un precipitado tras la incubación con el DPPH, que impidió una lectura adecuada de la absorbancia.

[0127] Los resultados del ensayo DPPH se plasman en la tabla B que se presenta a continuación:

Tabla B:

		ENSAYO DPPH	
Muestra		% de DPPH	Desviación típica
Control		0,00	3,74
Isoflavonas de soja ($\mu\text{g/ml}$)	1	1,65	4,93
	50	2,35	4,62
	250	10,98	4,56
Granada ($\mu\text{g/ml}$)	1	11,53	7,02
	50	55,26	3,39
	250	NC	NC
L-carnitina ($\mu\text{g/ml}$)	1	6,74	5,45
	50	4,97	5,8
	250	14,94	5,09
Taurina ($\mu\text{g/ml}$)	1	4,95	6,03
	50	10,84	5,12
	250	25,09	4,8
Mezcla SPCT ($\mu\text{g/ml}$)	1	5,26	5,29
	50	44,49	1,88
	250	50,98	5,01
Trolox (μM)	5	4,21	3,62
	10	9,91	2,75
	15	17,00	2,83
	20	23,49	3,79
	25	28,6	2,75
	30	33,06	2,37
	40	41,18	1,48

[0128] Como se indica en la tabla B anterior, tanto el extracto de granada como la mezcla SPCT a 50 $\mu\text{g/ml}$ muestran un efecto de barrido significativo en los radicales libres DPPH (en torno al 50 %), similar a la actividad obtenida con el control Trolox a 40 μM .

- 5 **[0129]** Por su parte, el extracto de isoflavonas de soja, la L-carnitina y la taurina presentan un efecto inhibitor en la extinción del radical DPPH de un 11 %, 15 % y 24 %, respectivamente, en 250 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusión:

[0130] Se ha demostrado que el H₂O₂ es capaz de generar daño oxidativo que derive en la muerte de las células CnAOEC por concentraciones superiores a 2 mM. Con concentraciones inferiores a 2 mM, se observó un ligero aumento de la actividad metabólica. Ya se ha señalado que, en ciertos casos, las células supervivientes al estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ desarrollan una hipertrofia asociada a la activación de distintas rutas metabólicas.

[0131] Tras desarrollar el ensayo en las células, se estudió el potencial antioxidante de las cuatro sustancias (a saber, la L-carnitina, la taurina, los extractos de granada y de isoflavonas de soja) en células endoteliales caninas.

[0132] El extracto de granada solo o combinado pudo mostrar un efecto citoprotector. Este efecto de la granada observado en las células CnAOEC «oxidadas» se ajusta a los resultados anteriores establecidos con células endoteliales humanas y con los macrófagos sometidos a H₂O₂, lo cual demuestra que el extracto de granada ejerce un efecto citoprotector, además de actividad antioxidante. El extracto de isoflavonas de soja, la L-carnitina y la taurina utilizadas solas no mostraron efecto protector en las células CnAOEC bajo los efectos de un estrés oxidativo en este modelo. La ausencia de efecto citoprotector de la L-carnitina y de la taurina sugiere que la actividad de protección de estos compuestos con respecto a la esfera cardiovascular podría estar asociada a mecanismos de acción diferentes.

[0133] La combinación de sustancias naturales (cada una a dosis equivalente) mostró un efecto protector significativo en las células CnAOEC que habían sufrido un estrés oxidativo, aumentando la viabilidad celular. Este efecto parece deberse principalmente a las propiedades antioxidantes de la granada y/o a un posible efecto sinérgico de las sustancias. Resulta importante señalar que la presencia de otras sustancias en la mezcla no parece antagonizar la actividad de la granada.

[0134] Considerando que la taurina y la carnitina se utilizan normalmente en los perros afectados por enfermedades cardíacas, resulta importante establecer que no se produce un efecto inhibitor de otras acciones antioxidantes cuando estas se combinan. De hecho, según se muestra en este estudio, parece que la combinación de las diferentes sustancias implica una mejora del efecto, como, por ejemplo, en la mezcla SPCT (Mezcla) de 50 µg/ml, es decir, la mezcla de las 4 sustancias. En esta mezcla de 50 µg/ml de SPCT, la granada se encuentra únicamente a 12,5 µg/ml, y esta mezcla produce un aumento del 41 % de la viabilidad comparable al valor (esto es, 35 %) de la granada sola a 50 µg/ml.

[0135] En el ensayo de barrido de los radicales libres, el extracto de granada fue la única sustancia que mostró una actividad de barrido elevada tanto en el radical ABTS como en el radical DPPH. Estos resultados se ajustan a los resultados de estudios anteriores acerca del extracto de granada. Las preparaciones (extractos o jugo) a partir de las diferentes partes (arilos, cáscaras o frutos enteros) de extracto de granada ofrecen diversos poderes antioxidantes, evaluados mediante varios métodos de barrido de radicales.

[0136] Parece que la actividad antioxidante del extracto de granada se asocia a un elevado contenido de punicósidos (≥ 40 %). Las isoflavonas de soja solo mostraron una actividad de barrido de radicales directa con el ensayo TEAC, y un leve efecto en los ensayos DPPH.

[0137] Por último, la L-carnitina y la taurina no presentan ninguna actividad de barrido con el ABTS, pero sí una actividad de débil (carnitina) a moderada (taurina) con el ensayo DPPH.

[0138] En resumen, los resultados proporcionados por sistemas acelulares y celulares muestran que la taurina, la L-carnitina, los extractos de granada y las isoflavonas de soja ejercen actividades antioxidantes y citoprotectoras mediante mecanismos de acción distintos.

[0139] Un tratamiento con múltiples compuestos parece ser el mejor enfoque para reducir la aparición y la evolución de las enfermedades cardíacas caninas ligadas al estrés oxidativo, tales como la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia mitral crónica (CMVI) y distintas formas de miocardiopatías.

Ejemplo 3: Ejemplo de una composición oral de acuerdo con la invención

[0140]

	Contenido en % (masa/masa total)
Ingredientes activos	
L-carnitina-L-tartrato	21,8
Taurina	14,7
Extracto de granada	0,9

Extractos de soja concentrados en isoflavonas	1,5
Excipientes	
Aglutinante	32,2
Agente de granulación	2,8
Lubricante	6,0
Estimulante del apetito	20,1

Conclusión:

[0141] El extracto de granada y la mezcla de las cuatro sustancias mostró una fuerte acción antirradicalar, antioxidante, antiproliferativa y antiapoptótica en las células CnAOEC.

5 **[0142]** Siendo comparables las acciones antirradicales en los extractos de granada y en la mezcla de las cuatro sustancias, como se muestra en la figura 11, parece, por tanto, que la carnitina, la taurina y las isoflavonas de soja no poseen efecto antagonista en la acción del extracto de granada.

10 **[0143]** Según muestran los resultados de los presentes ejemplos, el hecho de que las actividades antioxidantes y antiproliferativas de la mezcla de las cuatro sustancias en las células CnAOEC sean considerablemente más fuertes que las de únicamente el extracto de granada o las de cada una de las otras sustancias de ensayo tomadas por separado sugiere que existe un efecto sinérgico asociado a esta mezcla.

REIVINDICACIONES

1. Producto para administración oral pensado para un animal de compañía, comprendiendo extractos de granada *Punica granatum*, **caracterizado por que**, además, comprende:
 - extractos de isoflavonas de soja;
 - 5 - L-carnitina; y
 - taurina.
2. Producto según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende:
 - entre un 5 y un 15 % en peso del peso total del producto de L-carnitina;
 - entre un 10 y un 20 % en peso del peso total del producto de taurina;
 - 10 - entre un 0,1 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de granada, *Punica granatum*; y
 - entre un 0,5 y un 5 % en peso del peso total del producto de extractos de soja concentrados en isoflavonas.
3. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 a modo de alimento completo.
4. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 a modo de alimento complementario o dietético con fines sanitarios.
- 15 5. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares.
6. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como ayuda para el control de enfermedades cardiovasculares.
7. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el apoyo de la función cardíaca en el caso de una insuficiencia cardíaca crónica.
- 20 8. Producto para administración oral pensado para un animal de compañía, comprendiendo extractos de granada *Punica granatum*, **caracterizado por que** comprende:
 - extractos de isoflavonas de soja;
 - L-carnitina; y
 - 25 - taurina, para su utilización en el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, e igualmente **caracterizado por que** el animal de compañía es un cánido o un félido.
9. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** el animal de compañía es un cánido o un félido.
10. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado por que** el animal es un cánido seleccionado de entre los perros de raza: Caniche, Chihuahua, Bichón, Yorkshire, Cavalier King Charles, Pekinés, Pinscher, Keeshond, Spaniel, Springer Spaniel inglés, Pomerania, Basset, Beagle, Westie, Whippet, Terrier, Fox Terrier, Yorkshire Terrier.
- 30 11. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, **caracterizado por que** el producto se administra a diario durante un período de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses.
- 35 12. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, **caracterizado por que** el producto se administra en una dosis comprendida entre 0,0001 mg/kg y 350 mg/kg.
13. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en forma de un comprimido, una cápsula, una gragea, un polvo, un gránulo, un jarabe, una suspensión, una solución, una emulsión.

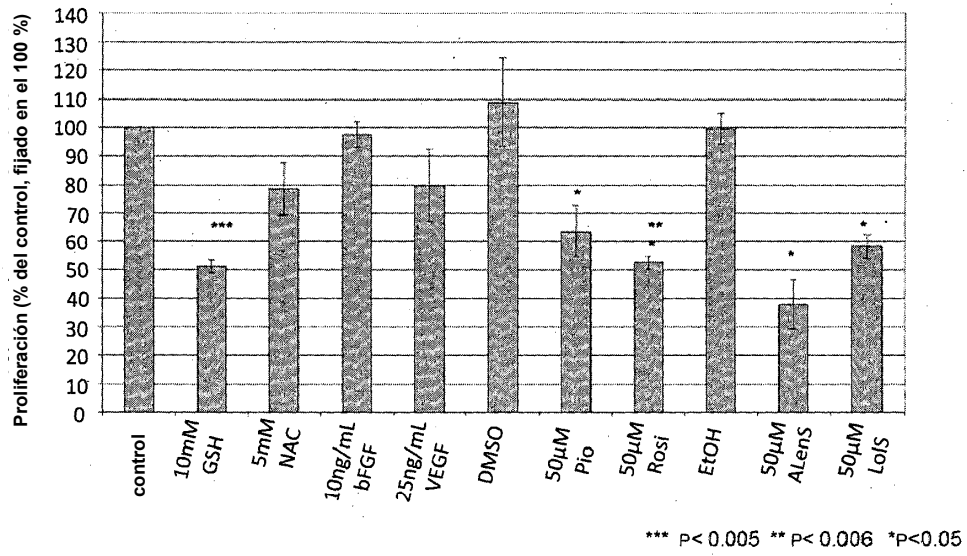


Fig. 1

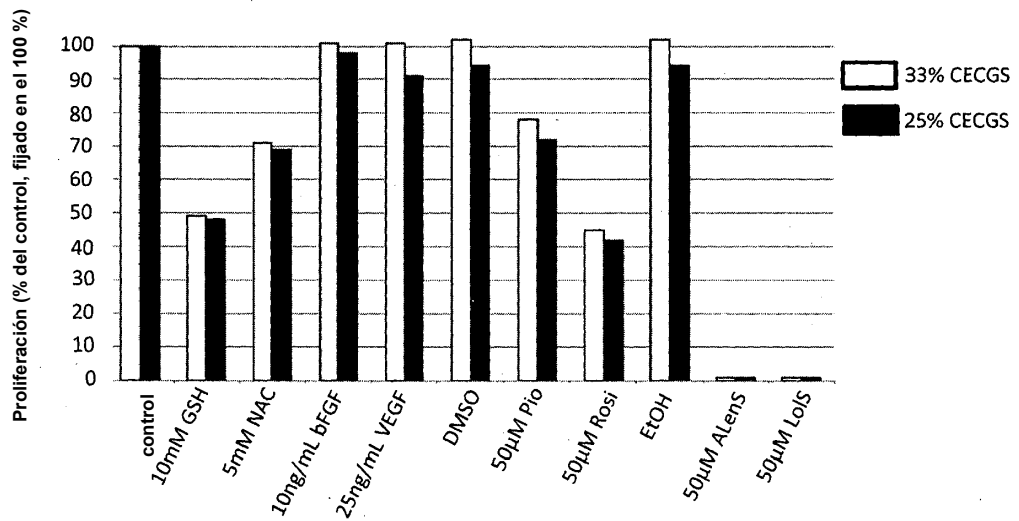


Fig. 2

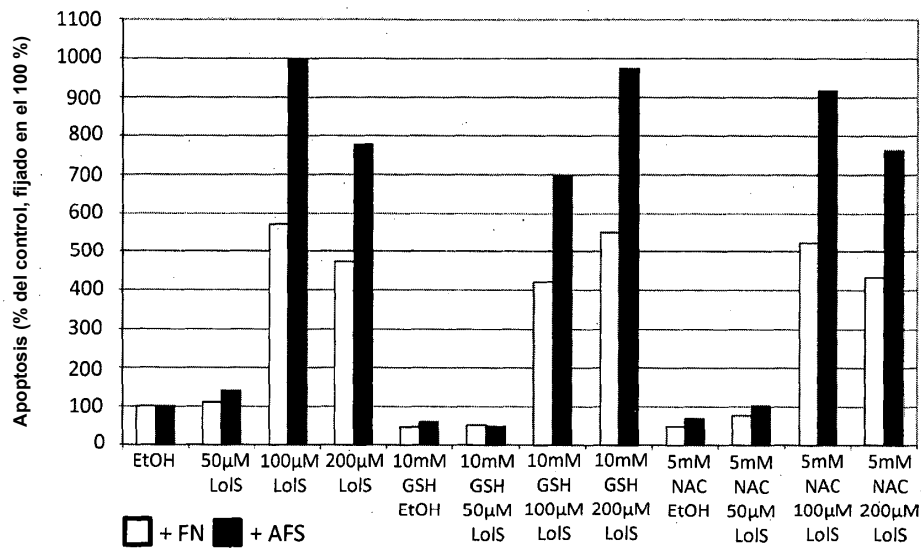


Fig. 3

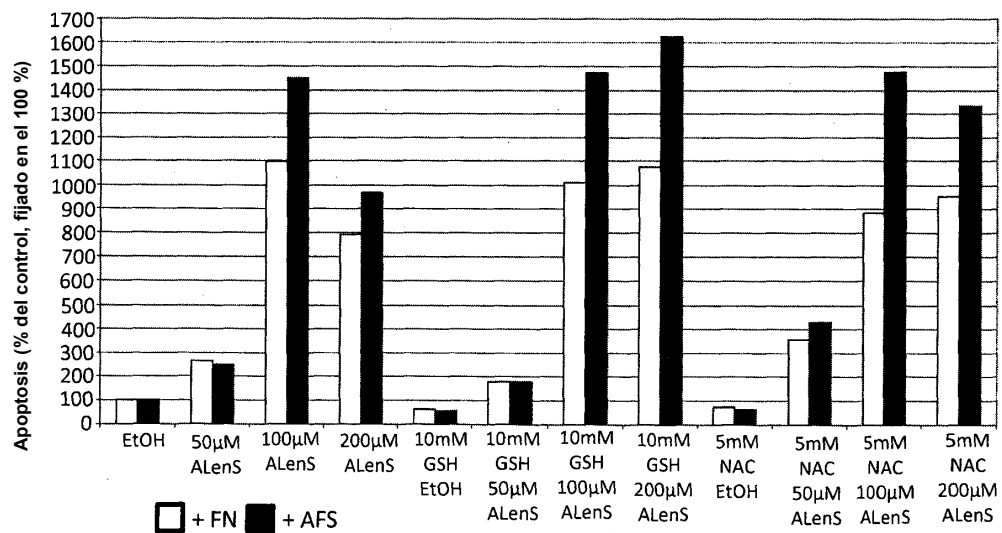


Fig. 4

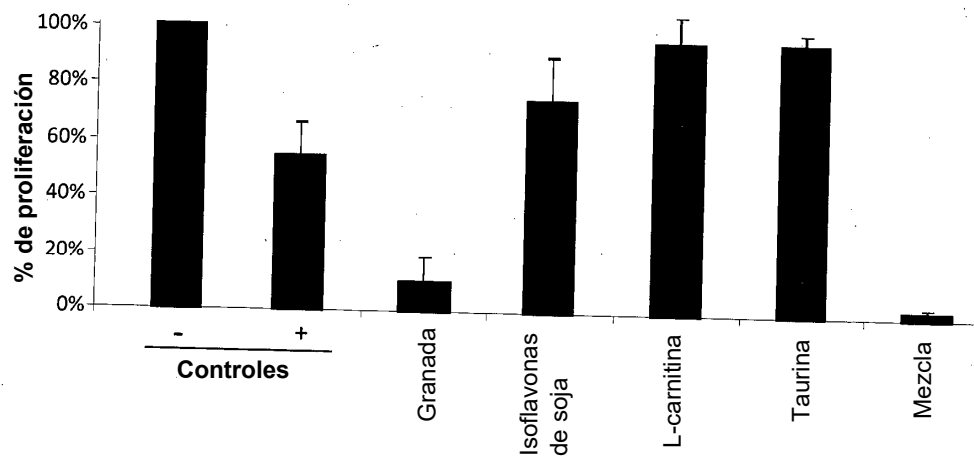


Fig. 5

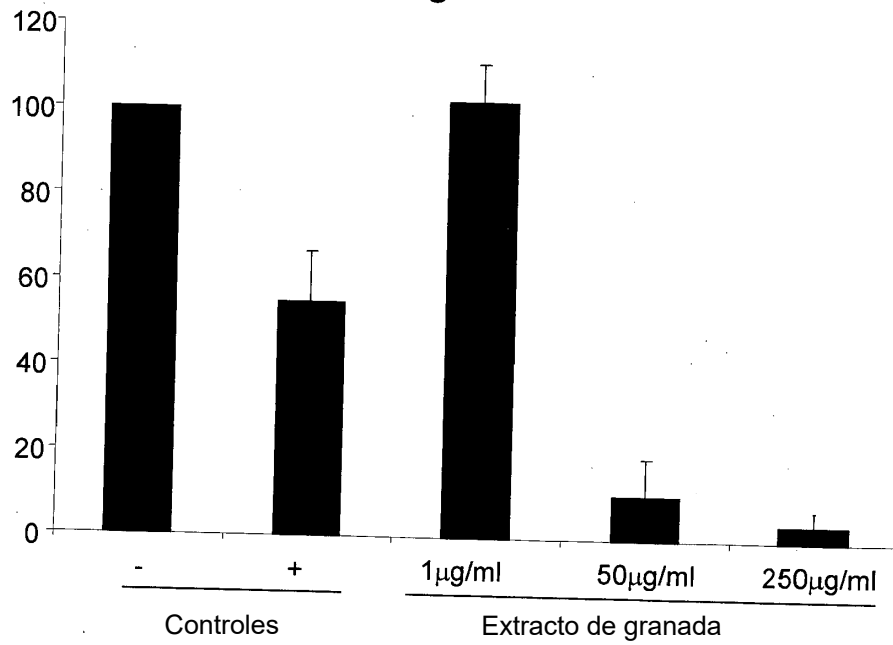


Fig. 6

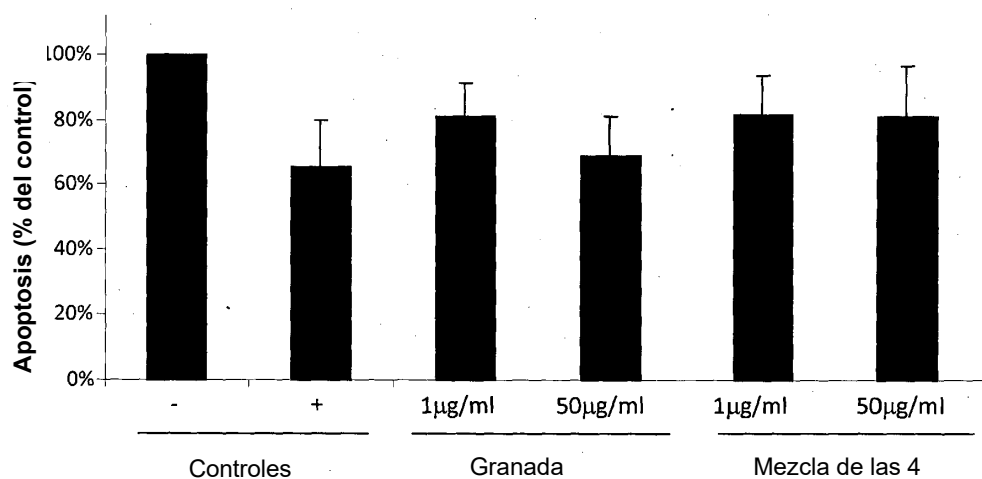


Fig. 7

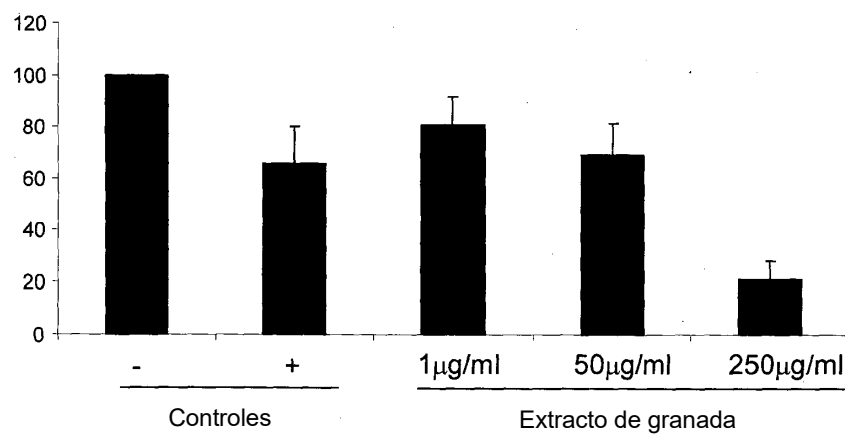


Fig. 8

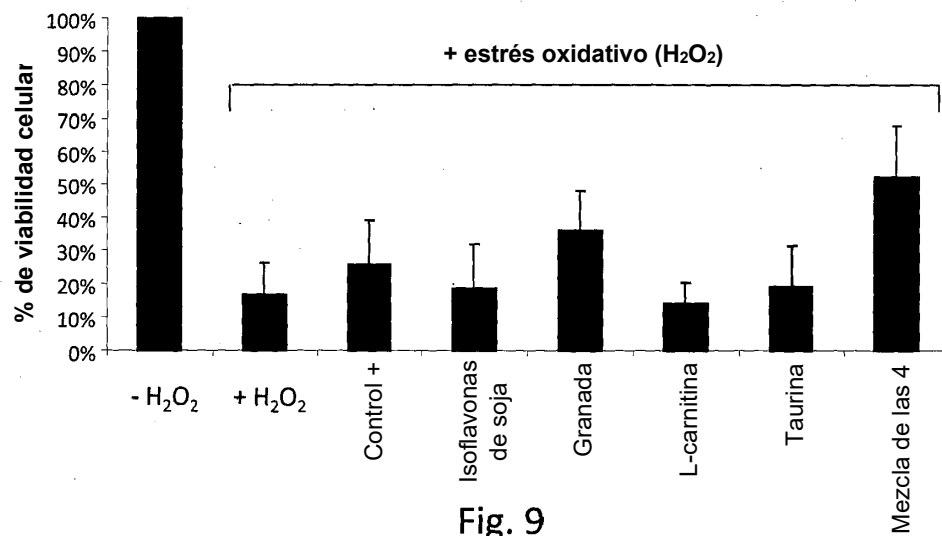


Fig. 9

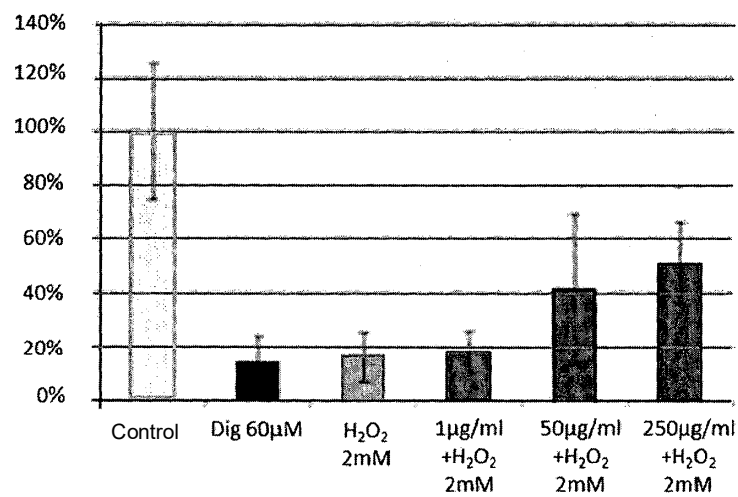


Fig. 10

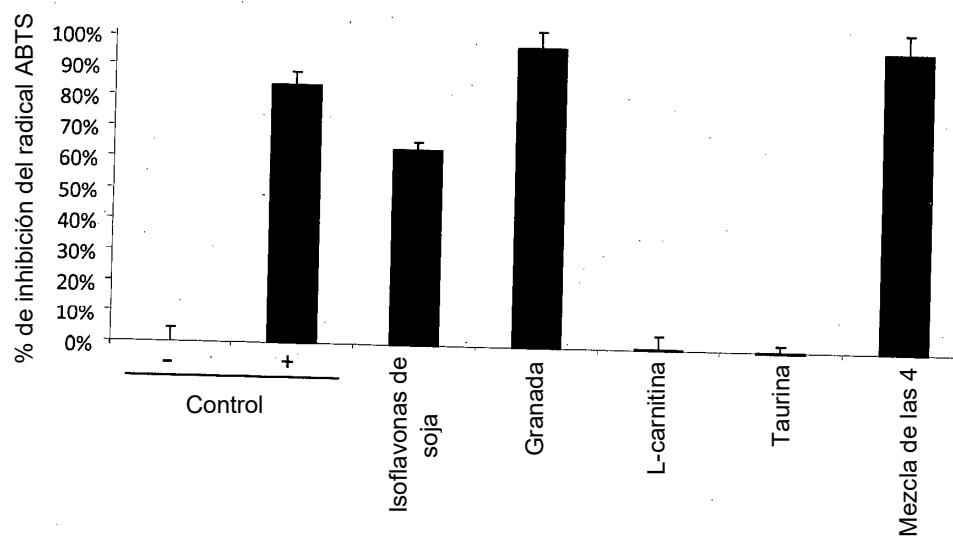


Fig. 11