

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 154**

51 Int. Cl.:
A61K 31/351 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 36/63 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04742843 .8**
96 Fecha de presentación: **09.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1617836**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Composición nutricional o terapéutica que contiene el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados**

30 Prioridad:
11.04.2003 FR 0304584

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)
147, RUE DE L'UNIVERSITE
75338 PARIS CEDEX 07, FR**

72 Inventor/es:
**COXAM, Véronique;
SKALTSOUNIS, Leandros;
PUEL, Caroline y
MAZUR, André**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 378 154 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

Composición nutricional o terapéutica que contiene el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del mantenimiento o del restablecimiento del equilibrio del metabolismo óseo del ser humano o del animal, en particular para la prevención o el tratamiento de trastornos relacionados con un desequilibrio del metabolismo óseo gracias a la aportación nutricional o a la administración terapéutica de una composición que estimula la formación del hueso y/o que inhibe la resorción ósea.

Estado de la técnica

El hueso no es un tejido estático. El hueso sufre una remodelación constante por la destrucción y síntesis *de novo* del tejido óseo en un proceso complejo que implica dos tipos principales de células, respectivamente los osteoblastos que producen un tejido óseo nuevo y los osteoclastos que destruyen el hueso.

Las actividades de estas células son reguladas por un gran número de citocinas y de factores de crecimiento, la mayoría de los cuales han sido identificados y clonados, tal como se describe en la revisión general de Mundy (Mundy, G.R., 1996, Clin. Orthop., vol. 324:24-28; Mundy, G.R., 1993, J. Bone Miner Res, vol. 8: S 505 - S 510).

Los osteoblastos, células responsables de la formación del hueso, se diferencian a partir de células precursoras y expresan y segregan proteínas estructurales tales como el colágeno de tipo I, así como enzimas (fosfatasa alcalina) y numerosos péptidos reguladores, y BMP (Bone Morphogenetic proteins) (Stein G. *et al.*, 1990, Curr. Opin Cell Biol. vol. 2: 1018-1027; Harris S *et al.*, 1994, J. Bone Miner Res Vol. 9:855-863).

Los osteoclastos son unas células multinucleadas que son responsables de la pérdida ósea, en un proceso denominado comúnmente resorción ósea.

En el periodo de crecimiento del ser humano o del animal, predomina la actividad de formación del hueso: es la adquisición del capital óseo.

En la edad adulta, en el ser humano o en el animal, la acción equilibrada de los osteoblastos y de los osteoclastos permite un mantenimiento en el tiempo de la masa ósea y asegura simultáneamente una remodelación del tejido óseo mediante resorción y síntesis *de novo* del hueso.

Sin embargo, con la edad, se produce un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea, que desemboca en una pérdida de hueso, que se denomina osteopenia.

La osteopenia relacionada con la edad es un fenómeno universal, no patológico en sí, pero que constituye la base de la osteoporosis, puesto que la reducción de la masa ósea es el factor etiológico esencial en la génesis de esta afección, lo cual no excluye sin embargo la influencia de otros parámetros tales como, por ejemplo, la arquitectura del esqueleto o la propensión a caer.

En efecto, exacerbada, esta osteopenia conduce al riesgo de fracturas (densidad mineral por debajo de la cual el mínimo choque es susceptible de provocar una fractura) que determina la aparición de la osteoporosis. Por lo tanto, se puede concebir la osteoporosis (post-menopáusica o senil) como una patología infantil cuya profilaxis se podría basar tanto (i) en una optimización del capital óseo (adquirido durante el crecimiento del individuo), como (ii) en una ralentización de la pérdida ósea relacionada con el envejecimiento.

Se observa una gran heterogeneidad en el valor del pico de masa ósea según los individuos, a consecuencia de variaciones en el proceso de crecimiento óseo desde la edad más joven. Así, la masa ósea máxima alcanzada antes de los 30 años, denominada asimismo pico de masa ósea, es muy variable de un individuo a otro. Con la edad, los individuos que poseen un valor bajo de pico de masa ósea están en desventaja.

Por consiguiente, se debe privilegiar el cuidado precoz del individuo, puesto que las dos fases críticas para el capital óseo son:

- el periodo de crecimiento, que permite la adquisición de la masa ósea máxima (pico de masa ósea);
- el envejecimiento, que condiciona la velocidad de pérdida de la masa ósea.

La prevención de la osteoporosis ya no se debe restringir por lo tanto al individuo mayor.

Entre los trastornos patológicos relacionados con un desequilibrio del metabolismo óseo, se pueden citar en particular la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la pérdida ósea o la osteólisis observada cerca de una prótesis, las enfermedades del hueso metastásico, la hipercalcemia debida a un cáncer, los mielomas múltiples, y las

enfermedades periodontales.

Algunos de los trastornos o patologías del metabolismo óseo pueden estar provocados después de una inmovilización de larga duración, por ejemplo una hospitalización, o también después de una estancia en ingravidez.

5 Existen otros factores susceptibles de aumentar la pérdida ósea conduciendo a la osteoporosis, tal como el consumo de tabaco, el abuso de alcohol, un modo de vida sedentaria, una baja aportación en calcio, una alimentación desequilibrada o también una carencia en vitamina D.

10 Entre los trastornos relacionados con una resorción ósea anormal, el más común es la osteoporosis, cuya manifestación más frecuente se observa en las mujeres, tras el principio de la menopausia. La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una reducción de la masa ósea y por un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, asociados a un aumento de la fragilidad del hueso y de su susceptibilidad a la fractura.

15 Según la clasificación química aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el estado de salud del hueso de un individuo se determina mediante el valor de la densidad mineral ósea (DMS), tal como se mide mediante osteodensitometría, comparada con un valor normal predeterminado.

20 Un individuo que posee un valor de DMO inferior en menos de 1 DS (DS = desviación estándar) con respecto al valor de DMO normal predeterminado para el adulto joven se considera como un individuo "normal" (T-puntuación > -1 DS, en el que "T-puntuación" es la diferencia expresada en número de desviaciones estándares DS entre la DMO del individuo y el valor medio de la DMO de una población adulta joven de referencia).

25 Un individuo que posee un valor de DMO comprendido entre -1 y -2,5 DS con respecto al del adulto joven se clasifica como un individuo afectado de una "osteopenia" (-1DS > T-puntuación > -2,5 DS).

Un individuo que posee un valor de DMO inferior al del adulto joven en más de 2,5 DS se clasifica como individuo afectado de osteoporosis (T-puntuación < -2,5 DS).

30 Un individuo que posee un valor de DMO inferior al del adulto joven en más de 2,5 DS y en el que se ha detectado la presencia de una o más fracturas se clasifica como un individuo afectado de una osteoporosis confirmada (T-puntuación < -2,5 DS + fracturas).

35 Se distinguen dos tipos de osteoporosis, respectivamente de tipo I y de tipo II.

La osteoporosis de tipo I es seis veces más frecuente en la mujer que en el hombre. La osteoporosis de tipo I aparece sobre todo en un subgrupo de mujeres menopáusicas de 51 a 75 años de edad, y se caracteriza por una pérdida ósea exagerada que predomina en el hueso trabecular. Las fracturas de los cuerpos vertebrales y del extremo inferior del antebrazo son sus complicaciones habituales. La osteoporosis de tipo I está relacionada principalmente con la carencia hormonal estrogénica de la menopausia, y en cierta medida igualmente de la andropausia.

45 La osteoporosis de tipo II afecta a una amplia población de hombres y mujeres de más de 70 años y está asociada a fracturas del cuello del fémur, del extremo superior del húmero y de la tibia, es decir de los sitios óseos que contienen al mismo tiempo hueso cortical y hueso trabecular. Los porcentajes circulantes de parathormona (PTH) son frecuentemente elevados. La osteoporosis de tipo II es dos veces más frecuente en la mujer.

50 En el ser humano o en el animal, existen numerosos estados caracterizados por la necesidad de incrementar la formación ósea. Por ejemplo, en el caso de fracturas óseas, es necesario estimular el crecimiento óseo con el fin de acelerar una reparación completa del hueso. Esta necesidad está presente asimismo en las enfermedades periodontales, las enfermedades metastásicas del hueso, las enfermedades osteolíticas y los estados en los que se busca una reparación del tejido conjuntivo, por ejemplo para la cicatrización o regeneración de los defectos o traumatismos del cartilago. Se busca asimismo la estimulación de un crecimiento óseo en el caso de

55 hiperparatiroidismo primario y secundario, así como en la osteoporosis asociada a la diabetes y en la osteoporosis asociada a los glucocorticoides, así como en la osteoporosis androgénica en el hombre.

Hasta ahora, las estrategias que prevén restablecer una impregnación estrogénica (y androgénica en el hombre) mediante hormonoterapia sustitutiva estaban muy fomentadas, en particular para atenuar la cohorte de las señales funcionales de la menopausia, y sobre todo reducir los riesgos vasculares y óseos generados por la carencia hormonal. Sin embargo, por diversas razones (contra-indicaciones, reticencia a prescribir hormonas, etc.), este tipo de tratamiento profiláctico se aplica a menos del 30% de las mujeres menopáusicas. Esta abstención terapéutica corre el riesgo también de verse agravada por el ambiente de suspicacia actual en torno al tratamiento hormonal, tras la publicación reciente de dos estudios americanos que ponen en evidencia un riesgo cardiovascular y cancerígeno (HERS, 1998, 2002; WHI, 2002).

- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E, 1998 Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group, JAMA 280(7): 605-13.
- 5 - Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D, 2002 Non-cardiovascular disease outcomes during 6-8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). Jama 288(1): 58-66.
- 10 - Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, 2002 Women's health initiative Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post menopausal women. JAMA 288:321-333.

15 Se recomiendan asimismo los moduladores selectivos del receptor estrogénico (o SERM, por "Selective Estrogenic Receptor Modulators"), tales como el raloxifeno. Sin embargo, siguen siendo ineficaces en la incidencia de los sofocos.

20 Se conocen asimismo esteroides sintéticos, tales como la tibolona, que posee una actividad estrogénica y progestacional, con una baja propiedad androgénica, pero que puede provocar leucorreas, vaginitis, mastodinia y que puede provocar un aumento de peso.

25 De hecho, existen en la actualidad numerosos compuestos activos sobre la estimulación de la formación del hueso o la inhibición de la resorción ósea, entre los cuales se puede citar la familia de los polifosfonatos, tales como el etidronato o el alendronato (patente europea EP 210 728, solicitud de patente US publicada con el nº 2001/0046977), las tioamidas de oxazolidinona (solicitud de patente US publicada con el nº 2002/0010341), o también los compuestos isoflavonas (solicitud de patente US publicada con el nº 2002/0035074). Se propuso asimismo la utilización del extracto de una planta del género *Lycopersicon* (solicitud de patente US publicada con el nº 2002/0009510).

30 A pesar de que existe hoy una gran diversidad de compuestos activos para estimular la formación ósea y/o inhibir la resorción ósea, existe una necesidad constante para nuevos compuestos activos, en particular debido al éxito limitado de los tratamientos actuales.

35 Además, teniendo en cuenta el carácter crónico de algunos estados provocados por un desequilibrio del metabolismo óseo, existe una necesidad de nuevos compuestos activos susceptibles de poder ser utilizados durante un largo periodo de tiempo en el ser humano o en el animal.

40 Por ello, los profesionales de la salud, así como las instancias oficiales de reglamentación (informe sobre la osteoporosis en la Comunidad Europea, 1998), recomiendan integrar unas terapias validadas complementarias, incluso alternativas. Un enfoque nutricional (por ejemplo en forma de una composición) responde totalmente a estos criterios.

Sumario de la invención

45 De manera sorprendente, el solicitante ha mostrado que la oleuropeína, que es un compuesto contenido en particular en las plantas de la familia de las *oleaceae*, es capaz de actuar sobre el metabolismo óseo frenando la desmineralización del hueso.

50 Por lo tanto, se describe una composición nutricional y una composición farmacéutica de uso humano o veterinario que comprende, a título de compuesto activo, la oleuropeína o uno de sus derivados.

55 Se describe asimismo la utilización del compuesto oleuropeína o de uno de sus derivados para la preparación de una composición destinada a estimular la mineralización del hueso, en particular la formación del hueso y/o la inhibición de la resorción ósea en el ser humano o en el animal. Según un primer aspecto, dicha utilización se caracteriza porque dicha composición es una composición nutricional adaptada para una administración oral.

Según un segundo aspecto, dicha utilización se caracteriza porque dicha composición es una composición farmacéutica para una administración oral, parenteral, intramuscular o intravenosa.

Descripción de las figuras

60 La figura 1 ilustra la evolución ponderal (i) de las ratas de control (SH), (ii) de las ratas ovariectomizadas y que han sufrido una inflamación (OVX inf) que han recibido un régimen alimenticio de control, (iii) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene un extracto de oleuropeína (OL) y (iv) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene aceite de oliva (HO). En ordenadas: el peso corporal medio de las ratas; en abscisas: la duración del tratamiento tras el momento de la ovariectomía.

65

La figura 2 ilustra el peso uterino (i) de las ratas de control (SH), (ii) de las ratas ovariectomizadas y que han sufrido una inflamación (OVX inf) que han recibido un régimen alimenticio de control, (iii) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene aceite de oliva (HO), y (iv) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene un extracto de oleuropeína (OL). En ordenadas: el peso uterino medio de las ratas +/- el error estándar con respecto a la media (SEM); en abscisas: cada grupo de ratas. Para los lotes OVX inf, HO y OL, * $p < 0,0001$ con respecto al grupo de control SH.

La figura 3 ilustra la densidad mineral ósea total (figura 3A), la densidad mineral ósea cortical (figura 3B) y la densidad mineral ósea trabecular (figura 3C), respectivamente (i) de las ratas de control (SH), (ii) de las ratas ovariectomizadas y que han sufrido una inflamación, (OVX inf) que han recibido un régimen alimenticio de control, (iii) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene aceite de oliva (HO) y (iv) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene un extracto de oleuropeína (OL). En ordenadas: la densidad mineral ósea (DMO), expresada en g/cm^2 +/- el error estándar con respecto a la media (SEM); en abscisas: cada grupo de ratas. "a": $p < 0,001$ con respecto al grupo de control SH. "a'": $p < 0,01$ con respecto al grupo de control SH. "b": $p < 0,005$ con respecto al grupo OVX inf. "b'": $p < 0,05$ con respecto al grupo OVX inf.

La figura 4 ilustra la concentración plasmática en orosomucoide (i) de las ratas de control (SH), (ii) de las ratas ovariectomizadas y que han sufrido una inflamación (OVX inf), que han recibido un régimen alimenticio de control, (iii) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene aceite de oliva (HO) y (iv) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene un extracto de oleuropeína (OL). En ordenadas; concentración de orosomucoide, expresada en $\mu\text{g/ml}$, +/- el error estándar con respecto a la media (SEM). En abscisas: cada grupo de ratas. "a": $p < 0,05$ con respecto al grupo de control SH. "b": $p < 0,01$ con respecto al grupo OVX inf.

La figura 5 ilustra el peso del bazo (i) de las ratas de control (SH), (ii) de las ratas ovariectomizadas y que han sufrido una inflamación (OVX inf), que han recibido un régimen alimenticio de control, (iii) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene aceite de oliva (HO) y (iv) de las ratas "OVX inf" que han recibido un régimen alimenticio que contiene un extracto de oleuropeína (OL). En ordenadas: peso medio de la rata +/- el error estándar con respecto a la media (SEM). "a": $p < 0,05$ con respecto al grupo de control SH. "b": $p < 0,01$ con respecto al grupo OVX inf.

Descripción detallada de la invención

Se describe una composición nutricional y una composición farmacéutica de uso humano o veterinario destinadas a estimular la mineralización ósea, en particular para estimular la formación del hueso y/o inhibir la resorción ósea, en el ser humano o en el animal y que comprende, a título de compuesto activo, el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados.

La oleuropeína es un glicósido amargo que se encuentra en particular en la fruta, las raíces, el tronco y, muy particularmente, en las hojas de plantas que pertenecen a la familia de las *oleaceae*, y más especialmente las *Olea europaea*.

La oleuropeína se conoce en particular por su actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como por sus propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales.

La actividad antiinflamatoria de la oleuropeína se puso en evidencia debido a su propiedad para bloquear la explosión respiratoria ("oxidative burst") de las células polinucleares neutrófilas, fenómeno origen de la sobreproducción de radicales libres durante reacciones inflamatorias del organismo.

La actividad antiviral de la oleuropeína, así como de ciertos derivados de la oleuropeína se describe en particular en la solicitud PCT WO 96/14064 y en las patentes americanas US nº 6.455.580 y US nº 6.117.844. La utilización de la oleuropeína para el tratamiento de afecciones relacionadas con el virus de la *influenza* se describe en la patente americana US nº 6.455.070.

La utilización de la oleuropeína para la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar la soriasis también se ha descrito, en particular en la patente americana US nº 6.440.465.

Owen *et al.*, describen asimismo que la dieta mediterránea, rica en frutas, legumbres, fibras, pescados y aceite de oliva, tiene un efecto protector frente al cáncer, en particular frente al cáncer colorrectal y al cáncer de mama. Permite reducir de manera significativa la mortalidad relacionada con las enfermedades cardíacas. Owen *et al.* ilustran más específicamente que los polifenoles presentes en el aceite de oliva, entre los cuales la oleuropeína, el tirosol y el hidroxitirosol, son unos agentes antioxidantes capaces de inhibir las especies reactivas del oxígeno (Owen *et al.*, European Journal of Cancer, 2000, 36 1235-1247).

La solicitud Euro-PCT WO 03068171, que reivindica la prioridad de la solicitud US 60/356847 de fecha 13 de febrero de 2002, describe la utilización de la oleuropeína y del hidroxitirosol para el tratamiento de patologías neurológicas relacionadas, entre otros, con el SIDA, o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. La solicitud Euro-PCT WO03068171 cita como enfermedades inflamatorias, entre otras, la osteoartritis y la osteomielitis.

De manera sorprendente, se ha demostrado, según la invención, que la oleuropeína estimula la formación del hueso e inhibe la resorción ósea.

Tal como se ha ilustrado mediante los ejemplos, la oleuropeína induce un aumento de la densidad del tejido óseo metafisario (hueso trabecular) y de la densidad del tejido óseo diafisario (hueso cortical), que permite así una mejora de la mineralización ósea, en particular en modelos experimentales de osteoporosis post-menopáusica y senil.

Más específicamente, la oleuropeína inhibe la resorción ósea en ratas ovariectomizadas, que es el modelo experimental animal de referencia que imita la osteoporosis humana.

Se ha demostrado asimismo, según la invención, que el efecto de inducción de la mineralización del tejido óseo provocado por la oleuropeína estaba acompañado de una actividad antiinflamatoria, tal como lo demuestra una concentración reducida en orosomucoide plasmático, y una ausencia de aumento del peso del bazo, en los individuos ovariectomizados, tal como se muestra en los ejemplos.

Esta combinación de propiedades biológicas sorprendente de la oleuropeína la hace apta, en particular, para la prevención o tratamiento de la osteoporosis de tipo I, pero también de la osteoporosis de tipo II, que está frecuentemente acompañada de reacciones inflamatorias.

Además, tal como se muestra en los ejemplos, la oleuropeína no presenta de manera detectable ningún efecto que imite la actividad de un compuesto de estrógeno, denominado asimismo efecto "estrogen-like", tal como lo muestra la ausencia de aumento de peso de las ratas tratadas, así como la ausencia de efecto de la oleuropeína sobre el peso uterino. Estos resultados confirman el interés de la oleuropeína para la prevención o tratamiento de todos los trastornos del tejido óseo o para el mantenimiento de la salud del hueso, en el ser humano o en el animal, ya que la actividad biológica de inducción de la mineralización ósea de la oleuropeína no aparece restringida en las situaciones en las que se constata, o se prevé, un déficit hormonal.

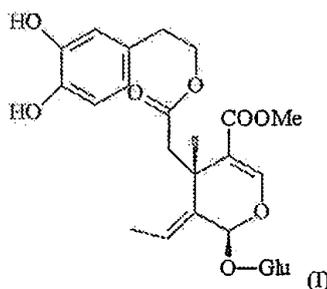
Esta actividad de mineralización del hueso inducida por la oleuropeína le confiere una gran utilidad como compuesto activo en el ser humano o en el animal para mantener o restablecer el equilibrio del metabolismo óseo, es decir:

- o bien mantener constante a lo largo del tiempo, con la edad, las actividades de las células osteoblásticas y osteocásticas y prevenir así trastornos del metabolismo óseo;
- o bien remediar un desequilibrio del metabolismo óseo, por ejemplo en trastornos tales como la osteoporosis, o también estimular la regeneración ósea, por ejemplo en caso de fisura o fractura del hueso.

Se describe por lo tanto la utilización del compuesto oleuropeína o uno de sus derivados para la preparación de una composición apta para mantener o restablecer el equilibrio del metabolismo óseo en el ser humano o en el animal, estimulando la formación del hueso y/o inhibiendo la resorción ósea.

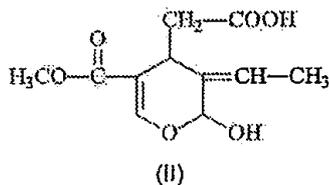
Se describe asimismo la utilización del compuesto oleuropeína o uno de sus derivados para la preparación de una composición apta para bloquear la desmineralización del tejido óseo, en el ser humano o en el animal.

Por "oleuropeína" se entiende el compuesto de fórmula (I) siguiente:

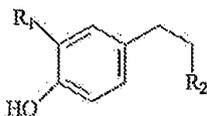


Por "derivado de la oleuropeína" se entienden respectivamente los compuestos siguientes:

(a) el ácido elenólico de fórmula (II) siguiente:



(b) la lactona de fórmula (III) siguiente:

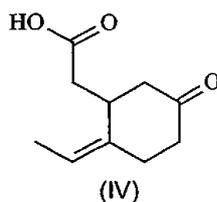


(III)

5

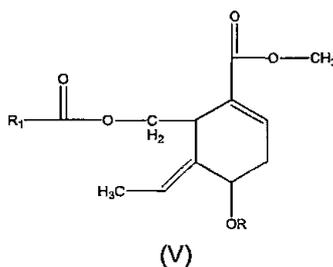
en la que R₂ representa un grupo hidroxilo y R₁ representa el hidrógeno (tirosol) o un grupo hidroxilo (hidroxitirosol);

10 (c) el compuesto lactona de fórmula (IV) siguiente:



15

(d) los compuestos de fórmula (V) siguiente:



en la que R representa un grupo glicosilo o un átomo de hidrógeno; R₁ representa el grupo 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo, el grupo 2-(4-hidroxifenil etilo), un átomo de hidrógeno o un grupo metilo;

20

(e) el ácido oleánico;

(f) los productos formados por hidrólisis de cada uno de los compuestos de fórmula (I) a (V) anteriores en el tubo digestivo.

25

El ácido elenólico y el hidroxitirosol son unos derivados de la oleuropeína que resultan de la metabolización de la oleuropeína en el organismo.

30

Los compuestos de fórmula (V) en los que R₁ representa el grupo 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo o el grupo 2-(4-hidroxifenil etilo) se encuentran naturalmente en las plantas de la familia *Olea europea*, por ejemplo en las variedades de *Olea europea* denominadas Manzanillo y Mission.

35

El derivado de oleuropeína de fórmula (V) en la que R₁ representa el grupo 2-(3,4-dihidroxifenil) etilo se puede aislar fácilmente a partir de hojas de olivo (*Olea europaea*) mediante extracción en una disolución acuosa o en una disolución agua/alcohol a temperatura de 20°C-25°C, y mejor a una temperatura comprendida entre 40°C y 100°C.

La oleuropeína puede ser purificada, por ejemplo mediante procedimientos de separación por cromatografía.

A título ilustrativo, la oleuropeína se puede preparar a partir de hojas de *Olea europaea* según las enseñanzas de la patente americana US nº 5.714.150, mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- a) sumergir las hojas de *Olea europaea* en una disolución de extracción que consiste esencialmente en una disolución alcohólica que contiene por lo menos 25% en peso de alcohol, por ejemplo etanol, durante un periodo de por lo menos 4 horas;
- b) recuperar la disolución de extracción obtenida al final de la etapa a);
- c) sumergir una segunda vez las hojas de *Olea europaea* de la etapa a) con una nueva disolución de extracción, de composición idéntica a la definida anteriormente, durante un periodo de por lo menos 4 horas;
- d) recuperar la disolución de extracción obtenida al final de la etapa c);
- e) reunir las disoluciones de extracción obtenidas respectivamente en la etapa b) y en la etapa c);
- f) destilar en vacío la disolución obtenida en la etapa e), por ejemplo a 70°C, con el fin de obtener un concentrado que contiene de 30% a 40% en peso de sólidos; y
- g) secar el concentrado obtenido al final de la etapa f), por ejemplo mediante atomización a 70°C, para obtener un extracto en forma de partículas que contiene de 30% a 40% en peso del compuesto oleuropeína.

La oleuropeína se puede preparar asimismo mediante extracción a partir de hojas de *Olea europaea* según la enseñanza de la solicitud de patente americana publicada con el nº UA 2003-0017217 el 23 de enero de 2003.

La oleuropeína, o cualquiera de sus derivados, puede asimismo ser preparada según la enseñanza de la solicitud PCT nº WO 96/14064 publicada el 17 de mayo de 1996.

Por "estimulación de la formación del hueso" se entiende, según la invención, la capacidad de la oleuropeína o uno de sus derivados de estimular la actividad de los osteoblastos y favorecer así la síntesis de la trama proteica del hueso y el depósito de los minerales, sobre todo del calcio, sobre esta trama proteica, es decir para estimular la mineralización del hueso, también denominada acreción ósea.

Para verificar que la aportación de oleuropeína a un ser humano o a un animal, en particular un mamífero, que estimula la formación del hueso, el experto en la materia podrá recurrir en particular a mediciones convencionales de densitometría y verificar que la aportación de oleuropeína o de uno de sus derivados, a una dosis dada, induce un aumento de la densidad ósea.

Por "inhibición de la resorción ósea" se entiende, según la invención, una inhibición de la actividad de destrucción del tejido óseo por las células osteoclastos. Para verificar que la aportación de oleuropeína o de uno de sus derivados, en el ser humano o en el animal, inhibe la resorción ósea, el experto en la materia puede medir la excreción urinaria de desoxipiridinolina, siendo una disminución de la excreción de desoxipiridinolina el reflejo de una inhibición de la resorción ósea (*en*: Les marqueurs biologiques de remodelage osseux: variations pré-analytique et recommandations pour leur utilisation., P. GAR- NERO, F. BIANCHI, P.C. CARLIER, V. GENTY, N. JACOB, S. KAMEL, C. KINDERMANS, E. PLOUVIER, M. PRESSAC & J.C. SOUBERBIELLE. Annales de Biologie Clinique, 58 (6), 683-704 (2000)).

La aportación de oleuropeína o de uno de sus derivados a un organismo animal induce simultáneamente una estimulación de la formación del hueso y una inhibición de la resorción ósea, el aumento global de la mineralización ósea, y siendo, por lo tanto, la densidad del hueso el resultado de la inducción de estos dos mecanismos.

Para determinar si un sujeto presenta un estado de osteopenia (masa ósea reducida), y necesita por consiguiente una aportación de oleuropeína o de uno de sus derivados, el experto en la materia podrá referirse en particular al informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1994 titulado «Assessment of fracture risk and its application to screening for post-menopausal osteoporosis « WHO Technical Series-843».

Una composición nutricional o una composición terapéutica que contiene oleuropeína o uno de sus derivados como compuesto activo está destinada, en primer lugar, a la prevención de la pérdida ósea que se debe a un desequilibrio en la remodelación del tejido óseo, en el ser humano o en el animal, en particular en un mamífero no humano, particularmente un mamífero doméstico tal como el perro o el gato, o incluso el caballo.

Una composición tal como se ha definido anteriormente está destinada asimismo a favorecer el crecimiento óseo en los individuos jóvenes, con el fin de optimizar la adquisición del capital óseo. En particular, una composición es útil

durante la fase de crecimiento del ser humano, así como de otros mamíferos.

5 La composición que contiene oleuropeína, o uno de sus derivados, está destinada asimismo a los individuos que presentan síntomas de déficit óseo (osteopenia), o susceptibles de sufrir déficit óseo, es decir un desequilibrio de la relación entre la formación del hueso y la resorción ósea, el cual, si continúa, induce una disminución de la masa ósea. Una composición está destinada asimismo a los individuos que presentan una expresión clínica de la patología, a saber una fractura, o una enfermedad dental.

10 En particular, una composición nutricional o farmacéutica, para uso humano o veterinario, es útil en el tratamiento de patologías tales como la osteoporosis de tipo I o de tipo II, las osteoporosis secundarias, la enfermedad de Paget, la pérdida ósea o la osteólisis observada cerca de una prótesis, las enfermedades del hueso metastásico, la hipercalcemia debida a un cáncer, los mielomas múltiples, las enfermedades periodontales o también la osteoartritis.

15 El hecho de que la oleuropeína induzca un aumento no sólo de la densidad del hueso trabecular, sino también de la densidad del hueso cortical demuestra el alto nivel de actividad biológica de esta molécula.

20 En efecto, el hueso trabecular, que forma la cabeza del hueso y que está muy vascularizado, es el lugar privilegiado para los intercambios de calcio entre el hueso y la circulación sanguínea, mientras que el hueso cortical, que forma el cuerpo recto del hueso, está muy poco vascularizado y constituye, por lo tanto, una diana biológica poco accesible para los compuestos que estimulan la formación del hueso y/o que inhiben la resorción ósea. Sin embargo, la accesibilidad del hueso cortical para los compuestos activos es importante, debido a que este tejido óseo participa totalmente en el mantenimiento de la rigidez del esqueleto (propiedades biomecánicas).

25 La composición se puede presentar en forma de una composición nutricional o también en forma de una composición farmacéutica, tal como se describe a continuación.

Composiciones nutricionales que contienen oleuropeína o uno de sus derivados.

30 Tal como se ha mencionado ya anteriormente, numerosos trastornos relacionados con un desequilibrio del metabolismo óseo, tal como la osteoporosis, evolucionan progresivamente durante un largo periodo de tiempo y necesitan tratamientos crónicos. Su prevención o tratamiento se puede realizar, por lo tanto, gracias a una aportación regular de oleuropeína o de uno de sus derivados, preferentemente en forma de una composición nutricional.

35 Asimismo, una aportación nutricional regular de oleuropeína a individuos jóvenes en crecimiento, seres humanos o animales, está encaminada a permitir optimizar el pico de masa ósea y por consiguiente la densidad mineral ósea en la edad adulta.

40 Asimismo, una aportación nutricional regular de oleuropeína es útil para prevenir la pérdida ósea que se produce durante el envejecimiento.

45 Se describe así una composición nutricional para estimular la formación del hueso y/o inhibir la resorción ósea, caracterizada porque comprende, a título de compuesto nutricional activo, el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados.

Por "composición nutricional" se entiende una composición que contiene oleuropeína o uno de sus derivados y que constituye una composición alimenticia o también un suplemento alimenticio que no posee las características de un medicamento.

50 Las diferentes utilizaciones del compuesto oleuropeína o de uno de sus derivados para la preparación de una composición nutricional se definirán a continuación en relación con las características técnicas de dicha composición nutricional.

55 Una composición nutricional está adaptada preferentemente para una administración oral.

60 Según un primer aspecto, una composición nutricional es un alimento dietético utilizado para el mantenimiento de una buena salud del ser humano o del animal que lo ingiere. Dicha composición nutricional se denomina asimismo comúnmente "alimento funcional", que está destinado a ser consumido, o bien como parte integrante del régimen alimenticio, o bien como suplemento alimenticio, pero cuyo contenido en oleuropeína o en uno de sus derivados implica un papel fisiológico que va más allá del suministro de necesidades nutritivas básicas.

Según un primer aspecto, dicha composición nutricional se utiliza para estimular la formación del hueso en los individuos jóvenes en fase de crecimiento.

65 Según un segundo aspecto, dicha composición nutricional se utiliza para prevenir la pérdida ósea que se produce con el envejecimiento (osteopenia).

Según un tercer aspecto, dicha composición nutricional está destinada a prevenir o tratar unos trastornos relacionados con un desequilibrio de la relación entre la formación del hueso y la resorción ósea.

5 Según cuarto aspecto, dicha composición nutricional está destinada a tratar un déficit óseo resultante de una fractura.

10 Según todavía otro aspecto, dicha composición nutricional está destinada a prevenir patologías seleccionadas de entre la osteoporosis de tipo I o de tipo II, las osteopenias secundarias, la enfermedad de Paget, la pérdida ósea o la osteolisis observada cerca de una prótesis, las enfermedades del hueso metastásico, la hipercalcemia debida a un cáncer, los mielomas múltiples, las enfermedades periodontales o la osteoartritis.

15 Una composición nutricional caracterizada porque comprende el compuesto oleuropeína, o uno de sus derivados, como compuesto activo, se presenta en una gran diversidad de formas de compuestos alimenticios y de bebidas, incluyendo zumos (de frutas o de verduras), aceites, mantequillas, margarinas, materias grasas vegetales, conservas (por ejemplo atún en aceite), sopas, preparaciones a base de leche (yogures, queso blanco), helados, quesos (por ejemplo quesos conservados en aceite), productos cocidos (tales como el pan, los bizcochos y los pasteles), los postres, los productos de confitería, las barras de cereales, los cereales para el desayuno, los condimentos, los productos de aderezo de los alimentos (en particular especias y salsas).

20 Cuando la oleuropeína, o un derivado de la oleuropeína, se extrae a partir de la hoja, una composición nutricional se utiliza ventajosamente en forma de una disolución acuosa.

25 Cuando la oleuropeína, o un derivado de la oleuropeína, se extrae a partir de la aceituna, una composición nutricional se utiliza ventajosamente en forma de una disolución oleosa.

30 Una composición nutricional caracterizada porque comprende el compuesto oleuropeína, o uno de sus derivados, como compuesto activo, se puede presentar asimismo en forma de una gran diversidad de productos destinados a la alimentación animal, ya sean en forma húmeda, en forma semi-húmeda o en forma seca, en particular en forma de croquetas.

35 Tal como se ha mencionado ya anteriormente, la oleuropeína es un compuesto mayoritario encontrado en las diferentes partes, incluyendo las hojas, de las plantas de la familia de las *Oleaceae*, y más especialmente en las hojas de plantas del género *Olea europaea* (olivo).

40 Así, según un primer aspecto preferido, el compuesto oleuropeína, o uno de sus derivados, se presenta en forma de un producto de extracción obtenido a partir de una planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae*. De manera preferida, el producto de extracción consiste en un producto extraído a partir de los tallos, de las hojas, de los frutos o de los huesos de una planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae*.

45 Preferentemente, la planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae* se selecciona de entre *Olea europaea* (olivo), una planta del género *Ligustrum*, una planta del género *Syringa*, una planta del género *Fraxinus*, una planta del género *Jasminum* y una planta del género *Osmanthus*.

Según un aspecto preferido, el producto de extracción consiste en aceite de oliva o un extracto rico en oleuropeína obtenido a partir del aceite de oliva.

50 Según un tercer aspecto preferido, el producto de extracción consiste en un extracto obtenido a partir de las hojas de *Olea europaea*, que se presenta en forma de un líquido o en forma de un polvo.

Según un cuarto aspecto, una composición nutricional puede consistir en una composición alimenticia enriquecida en aceite de oliva con extracto de aceite de oliva o de hojas de olivo.

55 Según un quinto aspecto, una composición nutricional se presenta en forma de cualquier producto, en particular cualquier bebida, por ejemplo una bebida aromatizada.

60 Así, una composición nutricional que se presenta en forma líquida o en forma sólida, en particular en forma de un polvo, puede consistir en un producto de extracción obtenido a partir del aceite de oliva o de las hojas de olivo, o también comprender un producto de extracción obtenido a partir del aceite de oliva o de las hojas de olivo.

En particular, una composición nutricional se presenta en forma de una bebida.

65 De manera general, una composición nutricional se presenta en cualquiera de las formas descritas en la presente descripción, en particular los alimentos a base de materia grasa (mantequilla, aceite, margarinas), pan, pasteles, o también productos alimenticios conservados en aceite, tales como quesos, pescados, carnes, verduras, ensaladas, o también en forma de producto para el aderezo de los alimentos, tales como los condimentos.

Según otro aspecto, en una composición nutricional, la oleuropeína o uno de sus derivados se produce por extracción o por síntesis química.

- 5 Preferentemente, una composición nutricional comprende una cantidad de compuesto de oleuropeína, o de uno de sus derivados, adaptada para una administración oral diaria comprendida entre 0,01 mg y 200 mg.

10 Para el consumo del ser humano, una composición nutricional comprende una cantidad de compuesto activo adaptada para una aportación diaria en oleuropeína, o en uno de sus derivados, suministrado por dicha composición, comprendida entre 0,01 mg y 200 mg, preferentemente entre 0,1 mg y 200 mg, y de manera muy preferida, entre 1 mg y 200 mg.

15 Para el consumo por el animal, específicamente un mamífero no humano, una composición nutricional está adaptada para una administración diaria de compuesto activo, suministrada por dicha composición, comprendida entre 1 mg y 200 mg, preferentemente entre 10 mg y 200 mg de oleuropeína o de uno de sus derivados.

Según aún otro aspecto, la composición nutricional anterior puede comprender otros compuestos nutricionales, en combinación con la oleuropeína o uno de sus derivados.

20 Así, la composición nutricional puede comprender asimismo una fuente de calcio, por ejemplo en forma de compuesto orgánico o inorgánico fisiológicamente aceptable, tales como unas sales de calcio inorgánico (cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de calcio o carbonato de calcio) o unos componentes orgánicos que contienen calcio tal como el polvo de leche desnatada, el caseinato de calcio o también unas sales orgánicas de calcio (citrato de calcio, maleato de calcio o sus mezclas).

25 La cantidad de calcio contenida en una composición nutricional según la invención está adaptada para una administración diaria, suministrada por dicha composición, comprendida entre 100 mg y 1.000 mg, preferentemente entre 200 mg y 700 mg y de manera muy preferida entre 300 mg y 600 mg de calcio.

30 Una composición nutricional según la invención puede comprender asimismo vitaminas, tal como la vitamina A, la vitamina D, la vitamina E, la vitamina K, la vitamina C, el ácido fólico, la tiamina, la riboflavina, la vitamina B₆, la vitamina B₁₂, la niacina, la biotina o también el ácido pantoténico.

35 Una composición nutricional puede comprender asimismo unos elementos minerales y unos elementos traza tales como el sodio, el potasio, el fósforo, el magnesio, el cobre, el zinc, el hierro, el selenio, el cromo y el molibdeno.

40 Puede comprender asimismo unas fibras solubles tales como agar-agar, un alginato, algarroba, carragenano, goma arábiga, goma guar, goma de karaya, pectina o goma xantana, estando estas fibras solubles en una forma hidrolizada o no hidrolizada.

Puede comprender asimismo unos compuestos fuente de energía, en particular una o varias fuentes de hidratos de carbono seleccionadas de entre las maltodextrinas, el almidón, la lactosa, la glucosa, la sacarosa, la fructosa, el xilitol y el sorbitol, y eventualmente los ácidos grasos tales como los omega-3.

45 Además, la composición nutricional puede comprender asimismo especias o también hierbas aromáticas.

Puede comprender asimismo unos compuestos de tipo polifenol, distintos de la oleuropeína o de uno de sus derivados.

50 Como ya se ha mencionado anteriormente, una composición destinada a estimular la formación del hueso o a inhibir la resorción ósea, según la invención, se puede presentar asimismo en forma de una composición farmacéutica, tal como se describe a continuación.

Composiciones farmacéuticas humanas o veterinarias según la invención.

55 Se describe asimismo una composición farmacéutica humana o veterinaria para estimular la formación del hueso y/o inhibir la resorción ósea, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados.

60 En particular, la invención se refiere a la utilización de la oleuropeína o de uno de sus derivados para la preparación de una composición farmacéutica de uso humano o veterinario, para la prevención o el tratamiento de una patología relacionada con un desequilibrio del metabolismo óseo, es decir una composición farmacéutica apta para estimular la formación del hueso y/o inhibir la resorción ósea.

65 Las utilidades de la oleuropeína para la preparación de una composición farmacéutica se describirán a continuación en relación con las características técnicas de dicha composición farmacéutica.

- Una composición farmacéutica comprende, como principio activo, la oleuropeína o uno de sus derivados, en una cantidad adaptada para estimular la formación del hueso o inhibir la resorción ósea en individuos que necesitan dicho tratamiento.
- 5 Según un primer aspecto, una composición farmacéutica es útil para estimular la formación del hueso en los individuos jóvenes, hombres o animales, en fase de crecimiento, con el fin de aumentar la densidad ósea alcanzada al principio de la edad adulta.
- 10 Según un segundo aspecto, una composición farmacéutica humana o veterinaria es útil para prevenir la pérdida ósea que se produce durante el envejecimiento.
- Según un tercer aspecto, una composición farmacéutica humana o veterinaria es útil para prevenir o tratar unos trastornos o patologías relacionados con un desequilibrio de la relación entre la formación del hueso y la resorción ósea.
- 15 Según un cuarto aspecto, una composición farmacéutica humana o veterinaria es útil para tratar un déficit óseo que resulta de una fractura.
- 20 Según un quinto aspecto, una composición farmacéutica para uso humano o veterinario es útil en el tratamiento de patologías relacionadas con un desequilibrio de la remodelación ósea, tales como, la osteoporosis de tipo I o de tipo II, las osteoporosis secundarias, la enfermedad de Paget, la pérdida ósea o la osteólisis observada cerca de una prótesis, las enfermedades del hueso metastásico, la hipercalcemia debida a un cáncer, los mielomas múltiples, las enfermedades periodontales o también la osteoartritis.
- 25 Puede tratarse de una composición farmacéutica humana o veterinaria, en particular para el perro o el gato, o incluso para el caballo.
- 30 La composición farmacéutica se presenta en una forma para la administración oral, parenteral, intramuscular o intravenosa.
- En su forma destinada a la administración humana, una composición farmacéutica comprende ventajosamente una cantidad de oleuropeína, o de uno de sus derivados, adaptada para una administración diaria del compuesto activo, suministrado por dicha composición, comprendida entre 0,01 mg y 200 mg.
- 35 En su forma destinada a una administración en el animal, una composición farmacéutica comprende una cantidad de oleuropeína, o de uno de sus derivados, adaptada para una administración diaria del compuesto activo, suministrado por dicha composición, comprendida entre 1 mg y 200 mg.
- 40 Una composición farmacéutica comprende la oleuropeína, o uno de sus derivados, en asociación con por lo menos un excipiente seleccionado de entre el grupo constituido por los excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 45 Unas técnicas de preparación de composiciones farmacéuticas pueden ser fácilmente encontradas por el experto en la materia, por ejemplo, en la obra Remington's Pharmaceutical Sciences, Mid. Publishing Co, Easton, PA, USA.
- Se describen asimismo unos adyuvantes, unos vehículos y unos excipientes fisiológicamente aceptables en la obra titulada "Handbook of Pharmaceutical Excipients, segunda edición, American Pharmaceutical Association, 1994.
- 50 Para formular una composición farmacéutica, el experto en la materia podrá referirse ventajosamente a la última edición de la Farmacopea Europea o de la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP).
- La invención se refiere asimismo a la utilización de un extracto oleoso de oleuropeína como excipiente para la preparación de una composición farmacéutica (combinación con otros principios activos, por ejemplo).
- 55 El experto en la materia podrá ventajosamente referirse en particular a la cuarta edición "2002" de la Farmacopea Europea, o también a la edición USP 25-NF 20 de la Farmacopea Americana (U.S. Pharmacopeia).
- Una composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente está adaptada para una administración oral, parenteral, intramuscular o intravenosa.
- 60 Cuando la composición farmacéutica comprende por lo menos un excipiente farmacéutico o fisiológicamente aceptable, se trata en particular de un excipiente apropiado para una administración de la composición por vía oral o de un excipiente apropiado para una administración de la composición por vía parenteral.
- 65 Se describe asimismo un método para prevenir o tratar un trastorno relacionado con un desequilibrio del metabolismo óseo, en particular un trastorno asociado a una pérdida de la masa ósea, comprendiendo dicho método

una etapa durante la cual se administra a los pacientes una cantidad terapéuticamente eficaz de oleuropeína, o de uno de sus derivados, o también de una composición farmacéutica que contiene la oleuropeína o uno de sus derivados.

- 5 Una composición farmacéutica que comprende oleuropeína, o uno de sus derivados, se presenta indiferentemente en forma sólida o en forma líquida.

Para una administración oral, se prefiere una composición farmacéutica sólida, en forma de comprimidos, de cápsulas o de cápsulas blandas.

- 10 En forma líquida, se prefiere una composición farmacéutica en forma de una suspensión acuosa o de una suspensión lipídica, o también en forma de una emulsión agua en aceite o aceite en agua.

- 15 Unas formas farmacéuticas sólidas pueden comprender, como vehículos, adyuvantes o excipientes, por lo menos un agente diluyente, un aroma, un agente solubilizante, un agente lubricante, un agente de suspensión, un agente ligante, un agente desintegrante y un agente de encapsulación, estando la identidad y la función de estos diferentes excipientes clásicos documentadas completamente en la Farmacopea Europea o en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP).

- 20 Dichos compuestos son, por ejemplo, el carbonato de magnesio, el estearato de magnesio, el talco, la lactosa, la pectina, la dextrina, el almidón, la gelatina, materiales celulósicos, manteca de cacao, etc.

- 25 Las composiciones en forma líquida pueden comprender asimismo agua, llegado el caso en mezcla con propilenglicol o con polietilenglicol, y eventualmente también unos agentes de coloración, unos aromas, unos estabilizantes, y unos agentes espesantes.

Para la preparación de una composición farmacéutica, la oleuropeína, o uno de sus derivados, se puede preparar según la enseñanza de los diferentes documentos de patente citados anteriormente en la descripción.

- 30 La invención se ilustra además, sin estar limitada, por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

- 35 Los resultados de los ejemplos muestran los efectos osteoprotectores de la oleuropeína o del aceite de oliva, sobre un modelo animal de pérdida ósea representativa de la osteoporosis senil mediante inducción de una inflamación crónica (envejecimiento) acoplada con una ablación de los ovarios (caso de la menopausia).

A. MATERIAL Y MÉTODOS

- 40 El experimento se llevo a cabo sobre 40 ratas Wistar de 6 meses de edad: treinta ovariectomizadas (OVX) y 10 pseudo-operadas (SH). Los animales se han alojado en jaulas metabólicas que permiten la recogida separada de las orinas a una temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, según un ciclo nictemeral de 12h - 12h. Después de la intervención quirúrgica el D0, los animales han sido acostumbrados durante siete días a un régimen semi-sintético de base (INRA Jouy en Josas), adicionado con 2,5% de aceite de cacahuete y con 2,5% de aceite de colza, y humidificado a razón de 1 ml de agua por gramo de polvo. Al final de este periodo de adaptación, los roedores se repartieron sobre la base de parámetros ponderales en 4 lotes homogéneos y recibieron diariamente durante 72 días 22 g de los regímenes siguientes:

- 50 * Lote SH/10 ratas pseudo-operadas alimentadas con el régimen control (régimen de base adicionado con 2,5% de aceite de cacahuete y con 2,5% de aceite de colza),

* Lote OVXinf: 10 ratas ovariectomizadas que han recibido el régimen control,

- 55 * Lote OL: 10 ratas ovariectomizadas que han consumido el régimen control adicionado con 0,015% de oleuropeína,

* Lote HO: 10 ratas ovariectomizadas a las que se distribuye el régimen de base adicionado con 5% de aceite de oliva virgen extra.

- 60 Los aceites se almacenaron protegidos de la luz. Los alimentos se prepararon semanalmente y se almacenaron a $+4^\circ\text{C}$.

- 65 El D55, es decir 3 semanas antes del final del experimento, se ha provocado una inflamación en cada lote, salvo en los de control (SH). Se administraron cuatro inyecciones subcutáneas de talco (2,3 g de silicato de magnesio (Sigma) en suspensión en 0,71 g/ml de suero fisiológico) en 4 puntos distintos del lomo del animal.

En el sacrificio (D80), los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de cloral (Fluka/disolución al 8%: 0,4 ml/100 g de peso vivo). Se practicaron unas extracciones sanguíneas al nivel de la aorta abdominal para la determinación de la orosomucoide (marcador de la inflamación, en particular de la fase aguda en el ser humano y en la rata (Fournier *et al.*, 2000), producido por el hígado y otros sitios extra-hepáticos bajo el control de las citoquinas II¹, TNF α y II₆).

Se pesaron el bazo y el útero.

Los fémures fueron extraídos y liberados de los tejidos blandos adyacentes, y después conservados en etanol al 80% para la determinación de la densidad ósea.

B. RESULTADOS

Ejemplo 1. Peso corporal y uterino (figuras 1 y 2).

El perfil ponderal de los animales demuestra una evolución similar, a saber un aumento entre el principio y el final del periodo experimental, sea cual sea el grupo considerado. Sin embargo, a partir de la 2ª semana, el peso (g) de los animales castrados es superior al de los SH (OVXinf: 294 \pm 6; SH/275 \pm 6. p = 0,001). Este fenómeno no es corregido por los dos regímenes alimenticios

El peso uterino (g útero/100g peso corporal) disminuye en los OVXinf (modelo experimental de la osteoporosis) (SH/0,221 \pm 0,017; OVX/0,060 \pm 0,003; p< 0,001). No es restaurado por los regímenes con oleuropeína (0,034 \pm 0,001) o con aceite de oliva (0,039 \pm 0,002) que están por lo tanto desprovistos de efecto uterotrófico.

Ejemplo 2: Densidad mineral ósea (figura 3).

La castración asociada a la inflamación se traduce por una desmineralización del fémur, puesto en evidencia por una densidad mineral ósea total (g/cm²) reducida (SH: 0,2378 \pm 0,0050; OVXinf: 0,2109 \pm 0,0018 p< 0,001). Este proceso se evita (por lo menos parcialmente) mediante el consumo de aceite de oliva (0,2249 \pm 0,0038) o de oleuropeína (0,2258 \pm 0,0028).

Se demuestra un perfil similar al nivel trabecular, así como en el hueso cortical (tejido ordinariamente poco sensible a los factores medioambientales).

Ejemplo 3: Marcadores de la inflamación (figuras 4 y 5).

La concentración en orosomucoide (μ g/ml) es superior en los OVXinf: 35,9 \pm 7,5; SH: 17,8 \pm 2,4). Este parámetro se restaura en las ratas que han recibido el régimen con aceite de oliva (22,8 \pm 1,7 p< 0,005). Una tendencia similar (pero no significativa) se observa con el régimen con oleuropeína.

El peso del bazo (g bazo/100g de peso corporal) aumenta en los OVXINF (OVXinf: 0,254 \pm 0,009; SH: 0,219 \pm 0,018). Esta esplenomegalia se evita mediante la ingesta de aceite de oliva (0,215 \pm 0,009, p< 0,01) o de oleuropeína (0,201 \pm 0,011 p<0,02).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una composición nutricional adaptada para una administración oral que comprende el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados, para prevenir la pérdida ósea que se produce con el envejecimiento (osteopenia).
- 10 2. Utilización de una composición nutricional adaptada para una administración oral que comprende el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados, para estimular la formación del hueso en los individuos jóvenes en fase de crecimiento.
- 15 3. Utilización del compuesto oleuropeína o de uno de sus derivados para la preparación de una composición destinada a tratar o prevenir los trastornos relacionados con un desequilibrio de la relación entre la formación del hueso y la resorción ósea en el ser humano o en el animal, no siendo dichos trastornos la osteoartritis y la osteomielitis en el caso en el que la composición comprende el compuesto oleuropeína o el hidroxitiroso.
- 20 4. Utilización del compuesto oleuropeína o de uno de sus derivados, para la preparación de una composición destinada a tratar en el ser humano o en el animal un déficit óseo que resulta de una fractura.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada porque dicho trastorno es una patología seleccionada de entre el grupo constituido por la osteoporosis de tipo I o de tipo II, las osteoporosis secundarias, la enfermedad de Paget, la pérdida ósea o la osteólisis observada cerca de una prótesis, las enfermedades del hueso metastásico, la hipercalcemia debida a un cáncer, los mielomas múltiples y las enfermedades periodontales.
- 30 6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dicha composición está adaptada para una administración oral de una cantidad diaria comprendida entre 0,001 y 200 mg del compuesto oleuropeína o de uno de sus derivados.
- 35 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque dicha composición es un suplemento alimenticio.
- 40 8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque dicha composición se presenta en forma de composiciones alimenticias, de bebidas, aceites, mantequillas, margarinas, materias grasas vegetales, conservas, sopas, preparaciones a base de leche, helados, quesos, productos cocidos, postres, productos de confitería, barras de cereales, cereales para el desayuno, condimentos, y productos de aderezo de los alimentos.
- 45 9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque dicha composición se presenta en forma de un producto destinado a la alimentación animal, en forma húmeda, semi-húmeda o seca.
- 50 10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque la composición es una composición farmacéutica que se presenta en una forma para la administración oral, parenteral, intramuscular o intravenosa.
- 55 11. Utilización según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque el compuesto oleuropeína o uno de sus derivados se presenta en forma de un producto de extracción obtenido a partir de una planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae*.
12. Utilización según la reivindicación 11, caracterizada porque el producto de extracción consiste en un producto extraído a partir de los tallos, de las hojas, de los frutos o de los huesos de una planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae*.
13. Utilización según una de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizada porque la planta que pertenece a la familia de las *Oleaceae* se selecciona de entre *Olea europaea*, una planta del género *Ligustrum*, una planta del género *Syringa*, una planta del género *Fraxinus*, una planta del género *Jasminum* y una planta del género *Osmanthus*.
14. Utilización según una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada porque el producto de extracción consiste en aceite de oliva o en un extracto rico en oleuropeína obtenido a partir del aceite de oliva, o de las hojas.

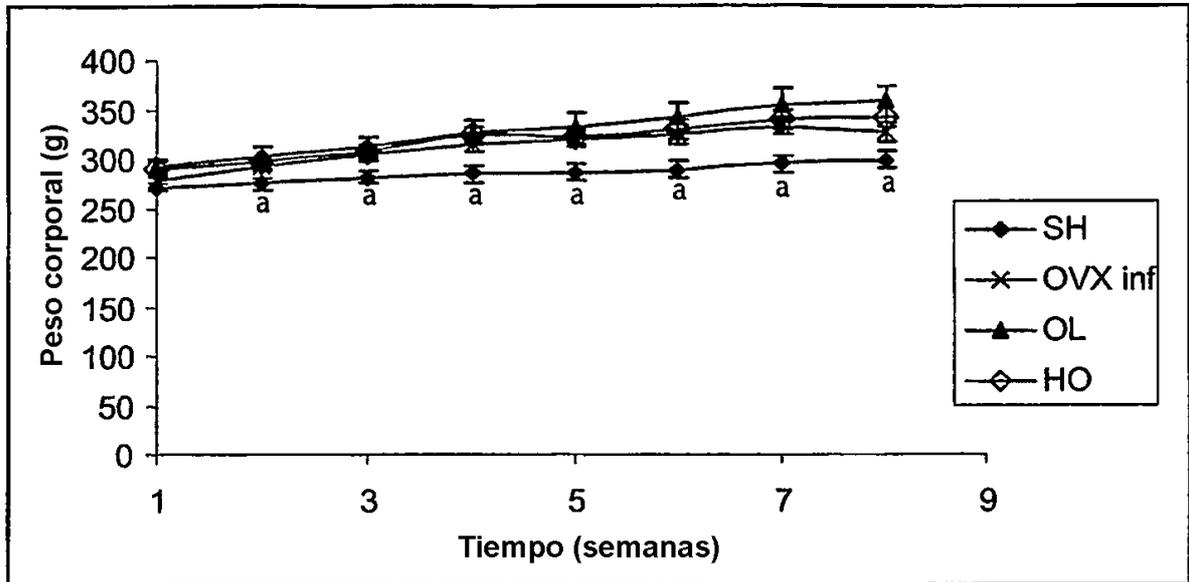


FIGURA 1

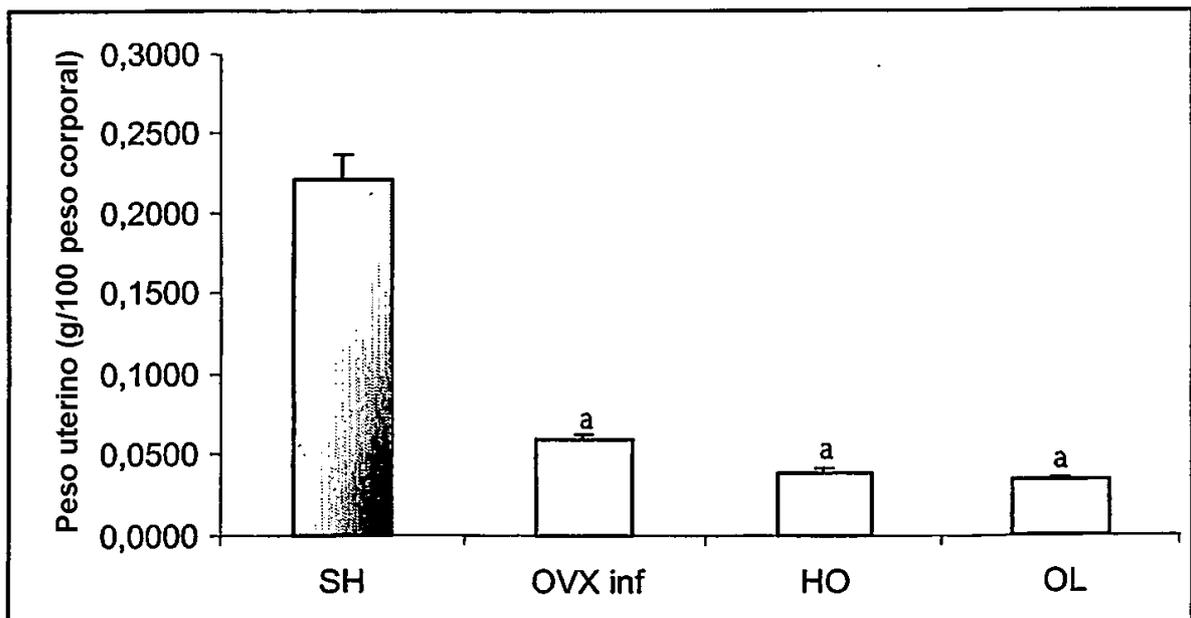


FIGURA 2

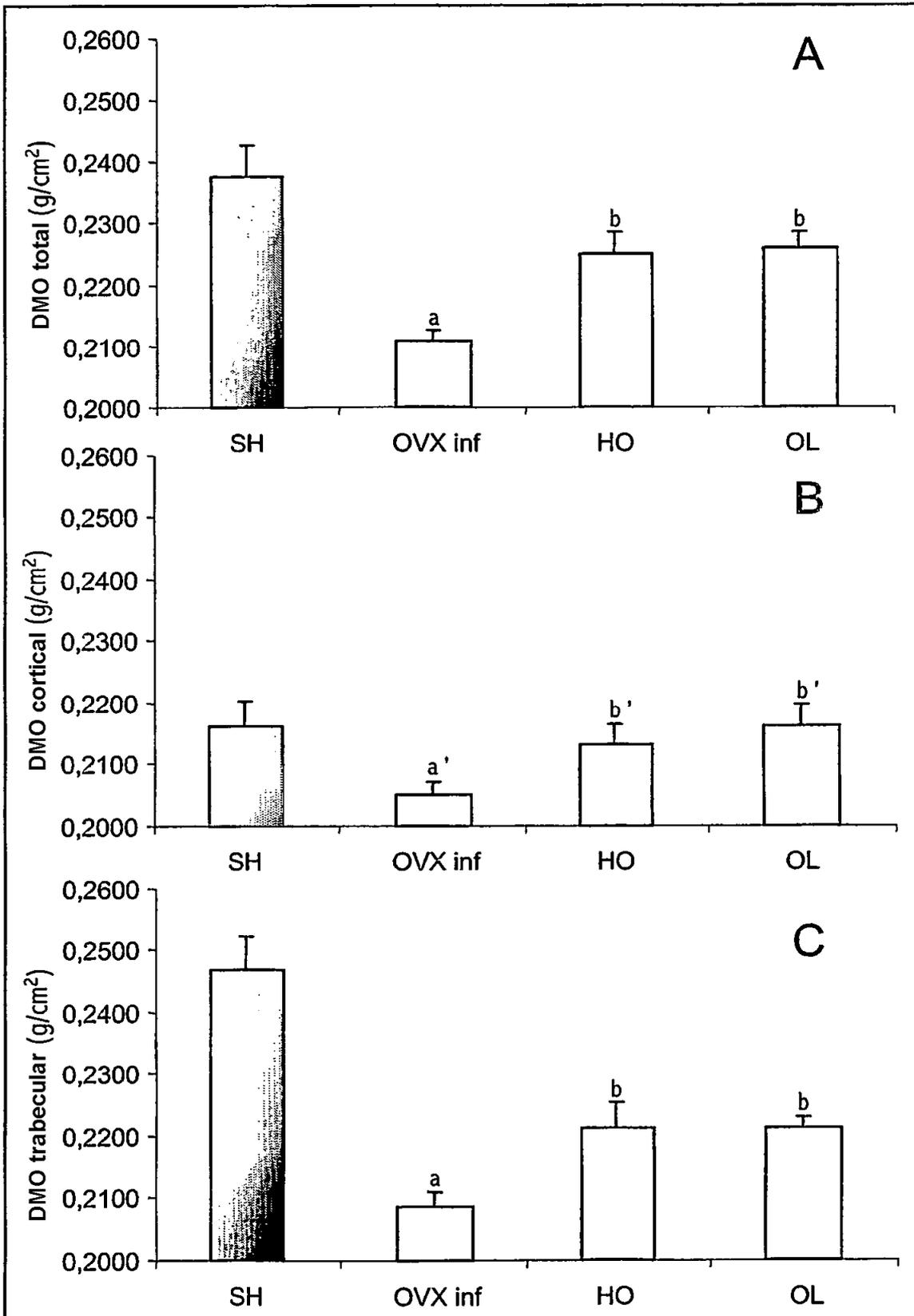


FIGURA 3

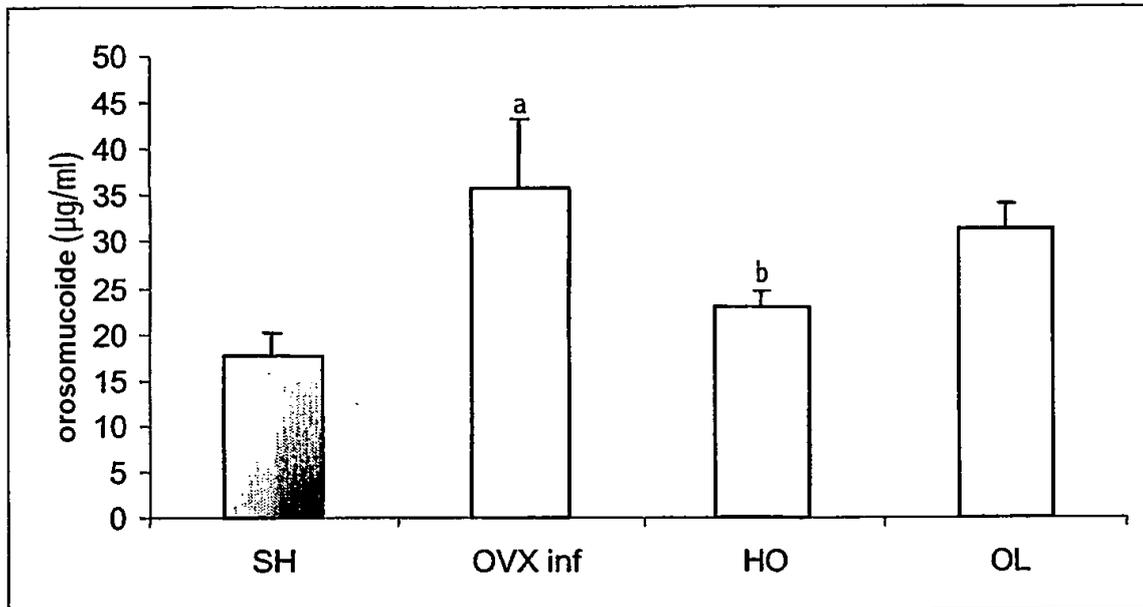


FIGURA 4

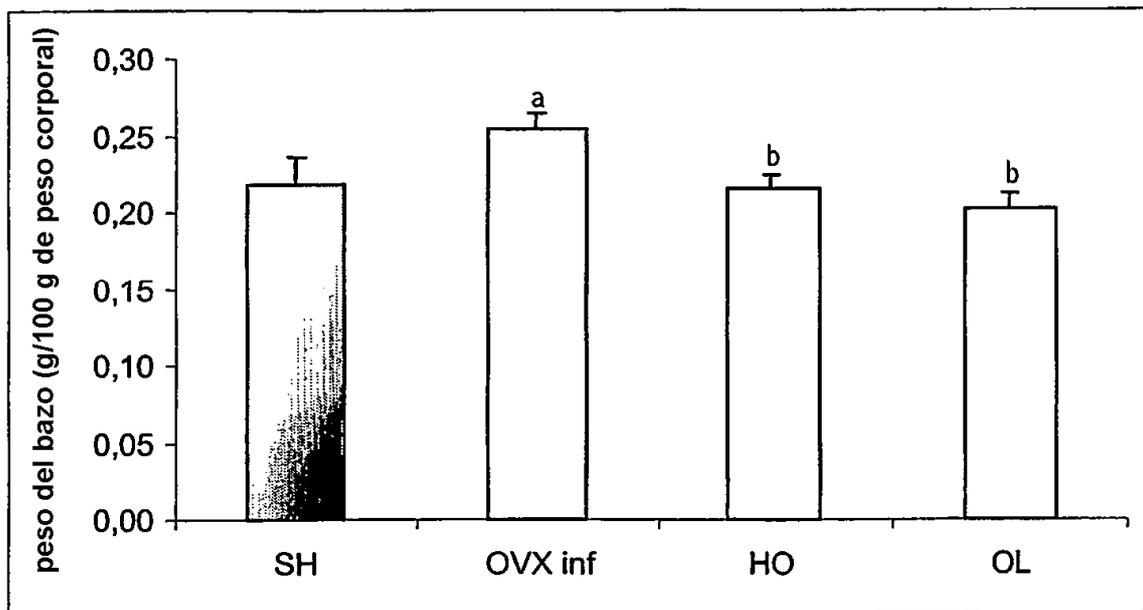


FIGURA 5