(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 387 634**

(51) Int. CI.:
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **09172445 .0**
(96) Fecha de presentación: **10.12.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2135517**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

(54) Título: **Composición para la estimulación del crecimiento óseo y el mantenimiento de la salud ósea**

(30) Prioridad:
11.12.2001 EP 01204838

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.09.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.09.2012

(73) Titular/es:
SOCIETE DES PRODUITS NESTLÉ S.A.
CASE POSTALE 353
1800 VEVEY, CH

(72) Inventor/es:
Offord- Cavin, Elizabeth;
Federici, Ermanno;
Lemaure, Bernard y
Courtois, Didier

(74) Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

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 para la estimulación del crecimiento óseo y el mantenimiento de la salud ósea

La presente invención se refiere a una composición para el mantenimiento de la salud ósea o la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos óseos.

Antecedentes de la invención

Los huesos sanos requieren un remodelado óseo efectivo, que implica un equilibrio entre la formación y la resorción óseas. La mayoría de enfermedades óseas se deben a una resorción ósea incrementada, convirtiendo su inhibición en un objetivo terapéutico primario; por lo tanto, la mayoría de agentes farmacéuticos desarrollados hasta hoy son antiresortivos. Por ejemplo, los estrógenos bloquean la producción de las citoquinas, que estimulan la generación y diferenciación de los osteoclastos. Se están desarrollando SERMs (moduladores selectivos de los receptores estrogénicos), que proporcionan beneficios de salud ósea, reduciendo simultáneamente el riesgo de efectos hormonales adversos en los tejidos mamarios o endometriales. Se supone que funcionan mediante un mecanismo similar al de los estrógenos en el hueso. Los bisfosfonatos (tales como el alendronato, el risedronato, etc.) se concentran en el hueso y son, hasta hoy, los inhibidores más efectivos de la resorción ósea. Inhiben una ruta enzimática crítica, necesaria para la actividad y supervivencia de los osteoclastos. La calcitonina es una hormona polipeptídica que inhibe la resorción ósea mediante el bloqueo de la actividad osteoclástica. Entre las nuevas dianas se incluyen los miembros de la familia de los receptores/ligandos del TNF y las rutas de señalización de los mismos, particularmente RANK/RANKL, la inhibición de las metaloproteinasas específicas del hueso, tales como la catepsina K, o la inhibición de quinasas específicas.

El desarrollo de agentes terapéuticos que estimulan la formación de hueso se ha retrasado con respecto a los de la resorción. Se conocen algunos agentes químicos o farmacéuticos que estimulan el crecimiento óseo en el ser humano. Por ejemplo, la patente WO nº 9619246 describe un método para estimular el crecimiento óseo en un paciente humano mediante la administración intermitente de hormona paratiroidea, proteína relacionada con la PTH o un agonista durante por lo menos un mes. En la patente WO nº 9619501, un factor derivado del páncreas inhibe la resorción ósea y estimula la proliferación de las células óseas e incrementa la formación de hueso.

Un avance reciente ha sido la demostración del papel de la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) como actor principal en la estimulación de la formación de hueso y de que las estatinas (fármacos efectivos para reducir el colesterol mediante la inhibición de la síntesis del mismo) mejoran la formación del hueso, en parte mediada por la inducción de la BMP-2. Se ha demostrado que la administración de BMP-2 recombinante induce la formación de hueso o cartílago. En la patente US nº 6.150.328, se describe un método para la inducción de la formación de hueso y cartílago comprende la administración de una proteína morfogénica ósea purificada que se produce mediante el cultivo de una célula transformada con ADN codificante de BMP. Además, la patente WO nº 9711095 se refiere a la utilización de composiciones de proteína morfogénica ósea para el tratamiento de los tumores neurales y el crecimiento óseo y la cicatrización de heridas. Además de las BMPs, se encuentran bajo investigación factores de crecimiento tales como el FG similar a la insulina (IGF-1), el GF-β transformante (TGF-β), los FG fibroblásticos (FGF), como terapias locales en la cicatrización de fracturas y defectos óseos. Sin embargo, la administración sistémica es problemática debido al metabolismo intestinal y también debido a posibles efectos sobre otros tejidos. Se propone la terapia génica como una opción. La alternativa es que la diana sea la regulación osteoblástica de su producción mediante reguladores dietéticos o farmacéuticos de su expresión génica o proteica.

Aunque estos compuestos químicos y farmacéuticos han sido probados para el tratamiento de trastornos óseos, resultaría interesante proporcionar una manera dietética segura y eficiente de estimular el crecimiento óseo y evitar, aliviar o tratar los trastornos óseos/articulares en los mamíferos.

La patente US B1-6.274.176 describe una composición que comprende una mezcla de hierbas para la utilización como agente antiinflamatorio para el alivio de las artritis y la gota en mamíferos.

Descripción resumida de la invención

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición destinada a la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos o el mantenimiento de la salud ósea en mamíferos, que comprende a modo de ingrediente activo una cantidad efectiva de por lo menos una planta o extracto vegetal seleccionado por su capacidad de inducir la expresión de proteína morfogénica ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Thymus*.

Notablemente, ahora se ha encontrado que las plantas o extractos vegetales *Thymus* presentan la capacidad de

estimular el crecimiento óseo mediante la regulación de los factores de crecimiento endógenos en el tejido óseo o cartilaginoso. Presentan la capacidad de inducir la expresión de la proteína morfogénica ósea *in vivo* y en el ambiente óseo local, lo que presenta un efecto positivo sobre la formación y reparación óseas, sobre el mantenimiento de la salud ósea o sobre la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos óseos.

La composición según la invención puede utilizarse en la preparación de un producto dietético, un suplemento, una golosina o un medicamento destinado al ser humano o a animales de compañía.

La administración en un individuo de una composición alimentaria según la presente invención, resulta en una regeneración ósea mejorada durante la cicatrización de fracturas. Ayuda a incrementar la formación ósea y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y optimiza la masa ósea máxima. Ayuda a mantener la masa ósea con la edad y reduce el riesgo de osteoporosis.

Además, ayuda a construir cartílago en mamíferos, a prevenir la osteoartritis en animales de compañía o en seres humanos, resultando en una mejor actividad o movilidad del individuo.

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de una planta o de un extracto vegetal seleccionado por su capacidad de estimular las proteínas morfogénicas óseas, para la preparación de una composición para la utilización en el mantenimiento de la salud ósea en mamíferos y para la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos. La planta o extracto vegetal es *Thymus*.

Descripción detallada de la invención

Con respecto al primer objetivo de la presente invención, la planta o extracto vegetal *Thymus* según la invención contiene compuestos fitoquímicos que presentan un potencial anabólico mediante la inducción de la expresión de la proteína morfogénica ósea.

En una realización preferente, la planta o extracto vegetal procede de cualquiera parte de la fuente vegetal, por ejemplo de hojas, tubérculos, frutos, semillas, raíces, granos, embriones o cultivos celulares. La planta o extracto vegetal puede encontrarse en forma de un extracto liofilizado seco de hojas, raíces y/o frutos, dependiendo de la fuente de planta, o planta fresca, o fracción enriquecida obtenida mediante un procedimiento de extracción conocido de la técnica en solvente inorgánico u orgánico.

En una realización más preferente, pueden ser partes áereas de *Thymus* sp.

Los compuestos fitoquímicos pueden ser genisteína, daidzeína, lactucina, lactucopicrina, 3-desoxi-lactucina, geraniol o carvona.

La planta o extracto vegetal según la invención puede utilizarse en la preparación de una composición alimentaria. Dicha composición puede encontrarse en forma de un alimento, o alimento para animal de compañía, nutricionalmente equilibrado, un suplemento dietético, una golosina o una composición farmacéutica.

La planta o extracto vegetal puede utilizarse solo o asociado a otras plantas, tales como achicoria, té, cacao, o a otras moléculas bioactivas, tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras prebióticas, glucosamina y condroitín sulfato, por ejemplo.

En una realización, se prepara una composición alimentaria para el consumo humano. Dicha composición puede ser una fórmula nutricionalmente completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o de almacenamiento estable, una sopa, un suplemento dietético, un sustitutivo alimentario, una barra dietética o un producto de confitería.

Aparte del extracto vegetal según la invención, la fórmula nutricional puede comprender una fuente de proteínas. Como fuente de proteínas preferentemente se utilizan proteínas dietéticas. Las proteínas dietéticas pueden ser cualquier proteína dietética adecuada; por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas lácteas, proteínas cárnicas y proteínas del huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de la soja, proteína de suero, proteína del arroz y proteína del guisante); mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de los mismos. Las proteínas lácteas, tales como la caseína, las proteínas del suero y las proteínas de la soja resultan particularmente preferentes. La composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de grasas.

En el caso de que la fórmula nutricional incluya una fuente de grasas, la fuente de grasas preferentemente proporciona entre aproximadamente 5% y aproximadamente 55% de la energía de la fórmula nutricional; por ejemplo entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% de la energía. Los lípidos que forman la fuente de

grasas pueden ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuadas. Las grasas vegetales resultan particularmente adecuadas; por ejemplo, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de azafrán, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de canola, lecitinas y similares. Si se desea también pueden añadirse grasas animales, tales como grasas de la leche.

Puede añadirse una fuente de carbohidratos a la fórmula nutricional. Preferentemente proporciona entre aproximadamente 40% y aproximadamente 80% de la energía de la composición nutricional. Puede utilizarse cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz y maltodextrinas, y mezclas de los mismos. Si se desea también puede añadirse fibra dietética. En caso de utilizarse, preferentemente comprende hasta aproximadamente 5% de la energía de la fórmula nutricional. La fibra dietética puede proceder de cualquier origen adecuado, incluyendo, por ejemplo, soja, guisantes, avena, pectina, goma guar, goma arábiga y fructooligosacáridos. Pueden incluirse vitaminas y minerales adecuados en la fórmula nutricional en una cantidad que satisfaga las directrices pertinentes.

Puede incorporarse uno o más emulsionantes de grado alimentario en la fórmula nutricional si se desea; por ejemplo, ésteres de ácido diacetil-tartárico de monoglicéridos y diglicéridos, lecitina y monoglicéridos y diglicéridos. De manera similar, pueden incluirse sales y estabilizadores adecuados. También pueden combinarse con el extracto vegetal vitaminas y minerales.

La composición nutricional preferentemente es administrable por vía entérica; por ejemplo en forma de unos polvos, una tableta, una cápsula, un concentrado líquido, un producto sólido o una bebida lista para beber. Si se desea producir una fórmula nutricional en polvo, la mezcla homogenizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, tal como un secador por pulverización o un secador por congelación y se convierte en polvos.

En otra realización, una composición nutricional comprende un producto de cereal a base de leche conjuntamente con una formulación prebiótica. Preferentemente, el producto de cereal a base de leche es un producto de cereal infantil que actúa como portador para la formulación prebiótica.

En otra realización, puede enriquecerse un producto alimentario habitual con por lo menos una planta o extracto vegetal según la presente invención. Por ejemplo, una leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una leche cuajada, un producto de confitería, por ejemplo un dulce o una bebida edulcorada, una barra de confitería, copos o barras de cereal para el desayuno, bebidas, leche en polvo, productos a base de soja, productos fermentados no lácteos o suplementos dietéticos para la nutrición clínica.

La cantidad de la planta o extracto vegetal en la composición puede variar según la fuente vegetal y la utilización de la misma. En una realización preferente, una dosis diaria eficiente es de, como mínimo, aproximadamente 1 mg, y más preferentemente de entre 1 y 200 mg de la molécula activa al día.

En una realización, puede prepararse una composición farmacéutica que contiene por lo menos un extracto o compuesto fitoquímico tal como se ha indicado anteriormente, en una cantidad suficiente para alcanzar el efecto deseado en un individuo. Dicha composición puede ser una tableta, un líquido, cápsulas, cápsulas blandas, pastas o pastillas, gomas o soluciones o emulsiones bebibles, un suplemento oral seco, o un suplemento oral húmedo. La composición farmacéutica contiene además portadores y excipientes que resultan adecuados para administrar la respectiva molécula activa que es de naturaleza diferente a la del tejido diana. El tipo de portador/excipiente y la cantidad del mismo dependerá de la naturaleza de la sustancia y del modo de liberación y/o administración del fármaco contemplado. Se apreciará que el experto podrá, basándose en sus conocimientos, seleccionar los componentes y forma galénica apropiados.

La planta o extracto vegetal según la invención puede utilizarse en la preparación de una composición alimentaria para animales de compañía. Dicha composición puede administrarse en el animal de compañía en forma de un suplemento de su dieta normal o en forma de un componente de un alimento para animales de compañía nutricionalmente completo, y más preferentemente en un alimento para animales de compañía hipocalórico. También puede ser una composición farmacéutica.

La planta o extracto vegetal puede utilizarse solo o asociado a otras plantas, tales como achicoria, té, cacao, o a otras moléculas bioactivas, tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras prebióticas, glucosamina y condroitín sulfato, por ejemplo.

Preferentemente, la composición alimentaria para animales de compañía contiene entre aproximadamente 0,01 y 0,5 gramos de planta seca por gramo de alimento para animales de compañía para un perro de 15 kg, y entre 0,001 y 0,1 gramos de planta seca por gramo de alimento húmedo para animales de compañía para un perro de 15 kg.

La composición alimentaria para animales de compañía nutricionalmente completa según la invención puede

encontrarse en una forma seca, de polvos, de una golosina o de un producto alimentario para animales de compañía húmedo, refrigerado o de almacenamiento estable. Puede encontrarse refrigerado o proporcionarse en forma de un producto de almacenamiento estable. Dichos alimentos para animales de compañía pueden producirse mediante métodos conocidos de la técnica.

El alimento para animales de compañía opcionalmente también puede contener un prebiótico, un microorganismo probiótico u otro agente activo, por ejemplo un ácido graso de cadena larga. La cantidad de prebiótico en el alimento para animales de compañía preferentemente es inferior a 10% en peso. Por ejemplo, el prebiótico puede comprender entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% en peso de alimento para animales de compañía. Para los alimentos para animales de compañía que utilizan achicoria como fuente del prebiótico, la achicoria puede incluirse para que comprenda entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10% en peso de la mezcla de alimentación; más preferentemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso.

En el caso de que se utilice un microorganismo probiótico, el alimento para animales de compañía preferentemente contiene entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} células del microorganismo probiótico por cada gramo del alimento para animales de compañía; más preferentemente entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^8 células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para animales de compañía puede contener entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 20% en peso de la mezcla del microorganismo probiótico; preferentemente entre aproximadamente 1% y aproximadamente 6% en peso; por ejemplo entre aproximadamente 3% y aproximadamente 6% en peso.

En caso necesario, el alimento para animales de compañía se suplementa con minerales y vitaminas de manera que sea nutricionalmente completo. Además, también pueden incorporarse en el alimento para animales de compañía diversos otros ingredientes, por ejemplo azúcar, sal, especias, condimentos, agentes saborizantes y similares, según se desee.

En otra realización, pueden prepararse suplementos dietéticos para mejorar la calidad del alimento para animales de compañía. A modo de suplementos dietéticos pueden encapsularse o pueden proporcionarse en forma de polvos y empaquetarse conjuntamente o separadamente de la harina principal, sea húmeda o seca. A título de ejemplo, pueden empaquetarse unos polvos que contienen extractos según la invención, en sobres, en forma de polvos o en un gel o lípido u otro portador adecuado. Dichas unidades empaquetadas separadamente pueden proporcionarse conjuntamente con una harina principal o en paquetes multiunidad para la utilización con una harina principal o golosina, siguiendo las instrucciones del usuario.

La cantidad de alimento para animales de compañía que debe ser consumida por el animal de compañía para obtener un efecto beneficioso dependerá del tamaño, tipo y edad del mismo. Sin embargo, una cantidad del alimento para animales de compañía para proporcionar una cantidad diaria de entre aproximadamente 0,5 y 5 gramos de planta seca por kg de peso corporal habitualmente resultaría adecuada para perros y gatos.

La administración en un ser humano o animal de la composición alimentaria o composición alimentaria para animales de compañía tal como se ha descrito anteriormente, resulta en una regeneración ósea mejorada durante la cicatrización de fracturas.

Ayuda a estimular la formación ósea y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y optimiza la masa ósea máxima. En particular, puede proporcionar un crecimiento óseo óptimo durante la infancia.

Reduce el riesgo de osteoporosis y mejora la recuperación después de una fractura.

Además, ayuda a construir cartílago en mamíferos, a prevenir la osteoartritis en animales de compañía o en seres humanos, resultando en una mejor actividad o movilidad del individuo.

Los ejemplos siguientes se proporcionan únicamente a título ilustrativo y en modo alguno deben interpretarse como limitativos de la materia objeto de la presente solicitud. Todos los porcentajes se proporcionan en peso, a menos que se indique lo contrario. Antes de los ejemplos se proporciona una breve descripción de la figura.

Figura 1: Medición de la expresión de ARNm de BMP-2 endógeno en células hPOB-tert mediante RT-PCR tras el tratamiento con extractos de *Lindera benzoin* (P.E. 740, 50 µg/ml) o de *Cyperus rotundus* (P.E. 205, 10 µg/ml) durante 48 horas y que muestra la estimulación de BMP-2 en 3,8 y 2,8 veces el control, respectivamente. La validación de dicho ensayo se llevó a cabo con lovastatina (0,5 µg/ml) como control positivo, mostrando la inducción de BMP-2 en un factor de 2,5.

Figura 2: Comparación de los valores de inhibición medidos para el ensayo de huesos calvarios (A) y de fosas (B) para los extractos de *Ocimum gratissimum* (738), *Amelanchier alnifolia* (734), *Glycine max* (768), *Cyperus rotundus*

(205) y *Carthamus tinctorius* (746).

Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran la invención reivindicada, en los que la planta o extracto vegetal es *Thymus*. Se ejemplifican otras plantas y extractos vegetales a título comparativo.

Ejemplo 1: Ensayos sobre formación ósea y resorción ósea

1. formación ósea

Se cribaron 91 extractos para la formación de hueso mediante el ensayo de informador génico de BMP-2 (proteína morfogénica ósea) y para la resorción ósea mediante el ensayo de huesos calvarios. Estos 91 extractos correspondían a 30 plantas diferentes.

Materiales y métodos

• Preparación de extractos para los ensayos de cribado:

El material vegetal molido se desgrasó con hexano, después se extrajo con una mezcla de alcohol y agua, con diferentes porcentajes de agua, de 10% a 90%, preferentemente de 50%. Los alcoholes pueden ser alcoholes metílicos o etílicos, proporcionando el extracto 1a.

En una alícuota del residuo de dicho primer extracto, se llevó a cabo una hidrolisis enzimática con α-glucosidasas y β-glucosidasas. Los enzimas pueden sustituirse en condiciones ácidas.La operación puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves (temperatura ambiente) o bajo reflujo con diferentes concentraciones de ácido. La fase hidrolizada acuosa se extrae con un solvente no miscible, preferentemente acetato de etilo, proporcionando el extracto 2a.

El extracto puede secarse, secarse por congelación o suministrarse en forma líquida.

En algunos casos, los polifenoles pueden descartarse mediante un tratamiento con polivinilpolipirrolidona (PVPP), evitando artefactos en los ensayos de cribado.

Tras la preparación de extractos, cada extracto se pesó, se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 20 mg/ml y se almacenó en alícuotas a -20ºC. Estos se utilizaron como solución madre y posteriormente se diluyeron en medio para cada ensayo. Se sometió a ensayo un abanico de dosis en los sistemas de ensayo.

• Ensayo de formación ósea

Ensayo de luciferasa de BMP-2 – Se determinó la actividad de los extractos utilizando células 2T3 que contenía el promotor BMP-2 operablemente ligado al gen luciferasa. Un incremento de la actividad de luciferasa en los lisados celulares refleja un incremento de la actividad de promotor BMP-2. Los extractos se sometieron a ensayo a una dilución inicial de 100 µg/ml con diluciones hasta 0,2 µg/ml. Se midió la actividad de promotor BMP-2 mediante la medición de la actividad de luciferasa en los extractos celulares.

13 plantas proporcionaron un resultado positivo significativo en la estimulación de la expresión de BMP-2 (Tabla 1).

Tabla 1

Binomio latino	Nombre vulgar	parte	conc µg/ml	Extracto activo/nº
Acorus calamus	cálamo aromático	rizoma	5	MeOH/agua/731
Amelanchier ovalis	guillomo	fruto	10	MeOH/agua/219
Artemisia vulgaris	artemisa/ajenjo	partes aéreas	10	acetato de etilo/225

Cyperus rotundus	castañuela	rizoma	10	acetato de etilo/205
Taraxacum officinalis	diente de león	hojas	50	acetato de etilo/750
Lindera benzoin	calicanto	partes aéreas	50	acetato de etilo/740
Prunus persica	melocotonero	semillas	25	acetato de etilo/772
Glycine max	soja	cultivos celulares	50	acetato de etilo 768
Iris pallida	lirio pálido	tubérculos	100	MeOH/agua/239
Rosmarinus officinalis	romero	hojas	50	MeOH/agua/2004 aretato de etilo/2005
Carvi	alcaravea	semillas	25	acetato de etilo/2074
Thyme	tomillo	hojas	25	acetato de etilo/2067
Mentha spicata	menta verde	hojas	100	acetato de etilo/2072
Vitis vinifera	vid	fruto	100	acetato de etilo/2069

Son ejemplos de nuevas preparaciones de dichas plantas y subfracciones de las mismas que estimulan BMP-2: *Lindera benzoin*, extracto activo/n°acetato de etilo/740/2059; Subfracción activa/n° 2060 *Taraxacum officinalis*. extracto activo/n° acetato de etilo/750/2034; Subfracción activa/n° 2035 *Cyperus rotundus*, extracto activo/n° acetato de etilo/205/2011; Subfracción activa/n° 2012,2013 *Iris pallida*, extracto activo/n° MeOH/agua/239; Subfracción activa/n° 760/762/2021, 2022

Se prepararon subfracciones mediante fraccionamiento en un cartucho de gel de sílice en fase inversa con elución utilizando solventes de diferente polaridad. Las isoflavonas de soja pura genisteína y daidzeína (10^{-6} M) estimularon la BMP-2 pero no el estradiol.

La inducción de BMP-2 aparentemente no restringe a la actividad de tipo estrogénico, ya que resulta estimulada por fitoestrógenos pero no por los estrógenos mismos. Implica que la actividad de los fitoestrógenos (tales como la genisteína y la daidzeína) puede encontrarse mediada por un mecanismo no estrogénico. La actividad del promotor BMP-2 no resulta estimulada por el estradiol; de esta manera, no resulta necesario que la estrogenicidad de los compuestos vegetales se encuentre activada en el presente ensayo.

Planta	Extracto activo nº	concentración (µg/ml)
Glycine max	acetato de etilo/2001	10, 50
Rosmarinus officinalis	MeOH/agua/2004	10, 50
Rosmarinus officinalis	acetato de etilo/2005	10
Cyperus rotundus	subfracción/2012	10, 50
Iris pallida	subfracción/2022	10
Thymus	acetato de etilo/2067	10
Carvi	acetato de etilo/2074	10

Ejemplo de la formación ósea en el cultivo de huesos calvarios

El método utilizado se describe en Science 286: 1946-1949, 1999. Los extractos se evaluaron en un ensayo in vitro de huesos calvarios murinos neonatales. Los huesos se incubaron con los extractos durante la totalidad del periodo de 4 días. Se evaluó la formación ósea mediante histología.

2. Resorción ósea, ensayo de huesos calvarios

La capacidad de los extractos de inhibir la resorción ósea estimulada por IL-1 (10^{-10} M) se evaluó en un ensayo de resorción ósea neonatal. Se evaluó cada extracto para su capacidad de inhibir la resorción ósea a una concentración

de 10 µg/ml.

La capacidad de los extractos preparados tal como en el Ejemplo 1, de inhibir la resorción ósea estimulada por IL-1 (10^{-10} M) se evaluó en el ensayo de resorción ósea neonatal. Se evaluó cada extracto para su capacidad de inhibir la resorción ósea a una concentración de 10 µg/ml. Se listan en la Tabla 2 los extractos vegetales que se encontró que eran positivos:

Tabla 2.

Binomio latino	Nombre vulgar	parte	Extracto activo/nº
Amelanchier alnifolia	guillomo	fruto	acetato de etilo/734
Ocimum gratissimum	especie de albahaca	hojas	MeOH/H_2O/737
Ocimum gratissimum	especie de albahaca	hojas	acetato de etilo/738
Carthamus tinctorius	cártamo	semillas	acetato de etilo/746
Cyperus rotundus	castañuela	rizoma	aretato de etilo/205
Glycine max	soja	cultivos celulares	768

Las plantas siguientes eran activas en el ensayo de resorción ósea: *Amelanchier alnifolia*, *Ocimum gratissimum*, *Carthamus tinctorius* y *Glycine max*. *Cyperus rotundus* inhibió la resorción ósea e indujo la BMP-2.

Ejemplo 2: Efectos de los extractos vegetales sobre la expresión endógena de BMP-2 en células osteoblásticas humanas

Las plantas que se había encontrado que eran positivas para la inducción de BMP-2 en el Ejemplo 1 se sometieron a ensayo adicional en una línea celular periostial/preosteoblástica humana, hPOB-tert, para su capacidad de inducir la expresión endógena de BMP-2. Este ensayo en células osteoblásticas confirmó los resultados mostrados en el Ejemplo 1.

Por ejemplo, el tratamiento de las células hPOB-tert con extractos de *Lindera benzoin* (extracto 740, 50 µg/ml) y de *Cyperus rotundus* (extracto 205, 10 µg/ml) durante 48 horas estimuló la expresión de BMP-2 en un factor de 3,8 y 2,8 del control, respectivamente (ver la figura 1). La validación de dicho ensayo se llevó a cabo con lovastatina (0,5 µg/ml) como control positivo, mostrando la inducción de BMP-2 en un factor de 2,5 veces.

Al alcanzar la confluencia, las células se incubaron con 0,05 µg/ml de lovastatina o con los extractos vegetales. Se extrajo el ARN total con reactivo TRIzol (Gibco). Se llevó a cabo la transcripción inversa de 10 µg de ARN utilizando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc (Boehringer). Se amplificaron las secuencias de ADNc de BMP-2 en 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C utilizando cebadores oligonucleótidos específicos (5':TTGCGGCTGCTCAGCATGTT; 3':CATCTTGCATCTGTTGTCGGAA). Se separaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. La cuantificación se llevó a cabo utilizando software de imágenes del NIH y normalizando los resultados con actina como el gen de mantenimiento.

Se muestran los resultados en la figura 1.

Resorción ósea

Los extractos vegetales que se encontró que eran positivos en el ensayo de huesos calvarios se sometieron nuevamente a ensayo en un segundo ensayo de resorción ósea, en el ensayo de fosas con células mixtas de hueso de conejo cultivadas sobre secciones de hueso bovino (Tezuka K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186(2):911-7, 1992, y Lorget F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 268(3):899-903, 2000). Las fosas con resorción se visualizaron mediante tinción para TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato). Se realizó un recuento de las células positivas.

En la figura 2 se muestra una comparación entre la actividad de los extractos a una concentración de 10 µg/ml en los dos sistemas de ensayo.

Ejemplo 3: Alimento para animales de compañía seco

Se preparó una mezcla de alimento a partir de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 5,5% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 22% en peso de harina de pollo, 2,5% de achicoria seca, aproximadamente 10% de tubérculos de *Cyperus rotundus*, siendo el resto sales, vitaminas y minerales.

Se alimentó la mezcla de alimento a un preacondicionador y se humectó. A continuación, se alimentó la mezcla de alimento humectada a un extrusor de cocción y se gelatinizó. La matriz gelatinizada que salía del extrusor se forzó a través de una matriz y se extruyó. El extruido se cortó en trozos adecuados para alimentar a perros, se secó a aproximadamente 110ºC durante aproximadamente 20 minutos y se enfrió, formando pellets.

Este alimento seco para perros presentó un efecto positivo sobre la salud del hueso y el cartílago e incrementó su movilidad.

Ejemplo 4: Alimento para animales de compañía húmedo enlatado con suplemento

Se preparó una mezcla de 73% de canales de ave, hmg de cerdo e hígado de buey (molido), 16% de harina de trigo, 2% de pigmentos, vitaminas y sales inorgánicas. Esta mezcla se emulsionó a 12ºC y se extruyó en forma de un pudin, que después se sometió a cocción a una temperatura de 90ºC. Se enfrió a 30ºC y se cortó en dados. 45% de dichos dados se mezclaron con 55% de una salsa preparada a partir de 98% de agua, 1% de pigmento y 1% de goma guar. Se rellenaron latas de hojalata y se esterilizaron a 125ºC durante 40 minutos.

A modo de suplemento para mezclar con el alimento para animales de compañía antes de servir, un paquete adicional (por ejemplo un sobre) contiene 25 gramos de partes aéreas de *Cyperus rotundus* en polvo para añadir al alimento diario. La cantidad correspondiente para el animal de compañía es de aproximadamente 25 g/día y puede suministrarse en forma de suplemento conjuntamente con la lata (por ejemplo en la parte superior de la misma).

REIVINDICACIONES

1. Composición que contiene una planta o extracto vegetal que contiene compuestos fitoquímicos que presentan la capacidad de estimular la proteína morfogénica ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Thymus*, para la utilización en la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos óseos y el mantenimiento de la salud ósea en seres humanos o en animales de compañía.

2. Utilización de una planta o un extracto vegetal que contiene compuestos fitoquímicos que presentan la capacidad de estimular la proteína morfogénica ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Thymus*, para la preparación de una composición para la utilización en la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos y el mantenimiento de la salud ósea en seres humanos o animales de compañía.

3. Composición según la reivindicación 1 ó utilización según la reivindicación 2, en la que la planta procede de cualquier parte de la fuente vegetal, hojas, tubérculos, frutos, semillas, raíces, granos, embriones o cultivos celulares.

4. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la planta o extracto vegetal son partes aéreas de *Thymus* sp.

5. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la planta o extracto vegetal se utiliza solo o asociado con otras plantas, tales como achicoria, té, cacao o con otra molécula bioactiva, tal como antioxidantes, ácidos grasos, fibras prebióticas, glucosamina o condroitín sulfato, por ejemplo.

6. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se encuentra en forma de un alimento o alimento para animales de compañía nutricionalmente equilibrado, un suplemento dietético, una golosina o una composición farmacéutica.

7. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición ayuda a la regeneración ósea durante la cicatrización de fracturas, ayuda a incrementar la formación de hueso y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y optimiza la masa ósea máxima.

8. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición ayuda a construir cartílago en seres humanos o animales de compañía.

9. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición ayuda a prevenir la osteoartritis en seres humanos o animales de compañía, resultando en una mejor actividad o movilidad del individuo.

10. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición está destinada al tratamiento, alivio y/o profilaxis de la osteoartritis en animales de compañía y seres humanos.

11. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición está destinada al tratamiento o prevención de la osteoporosis.

FIGURA 1

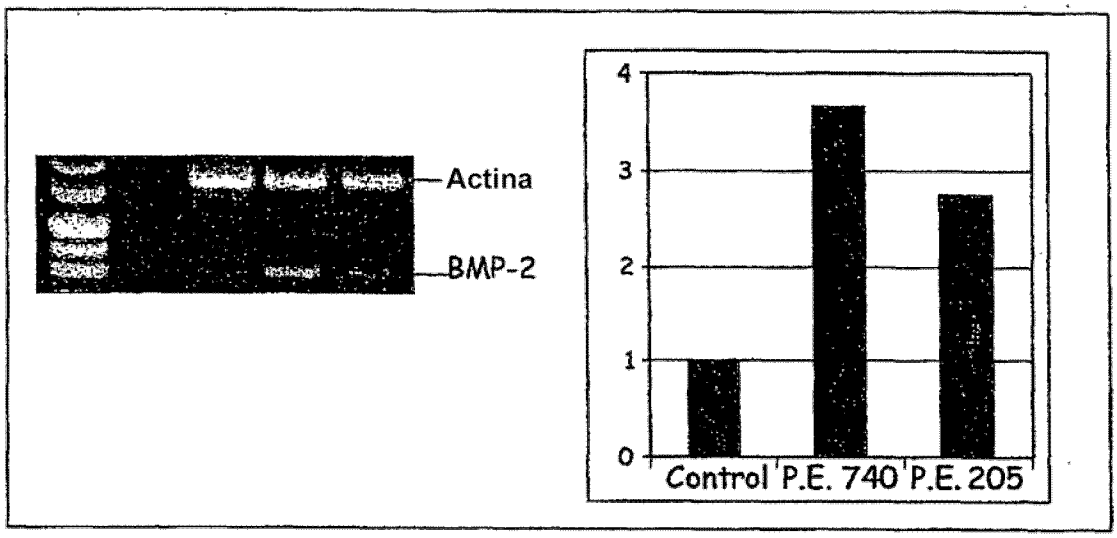
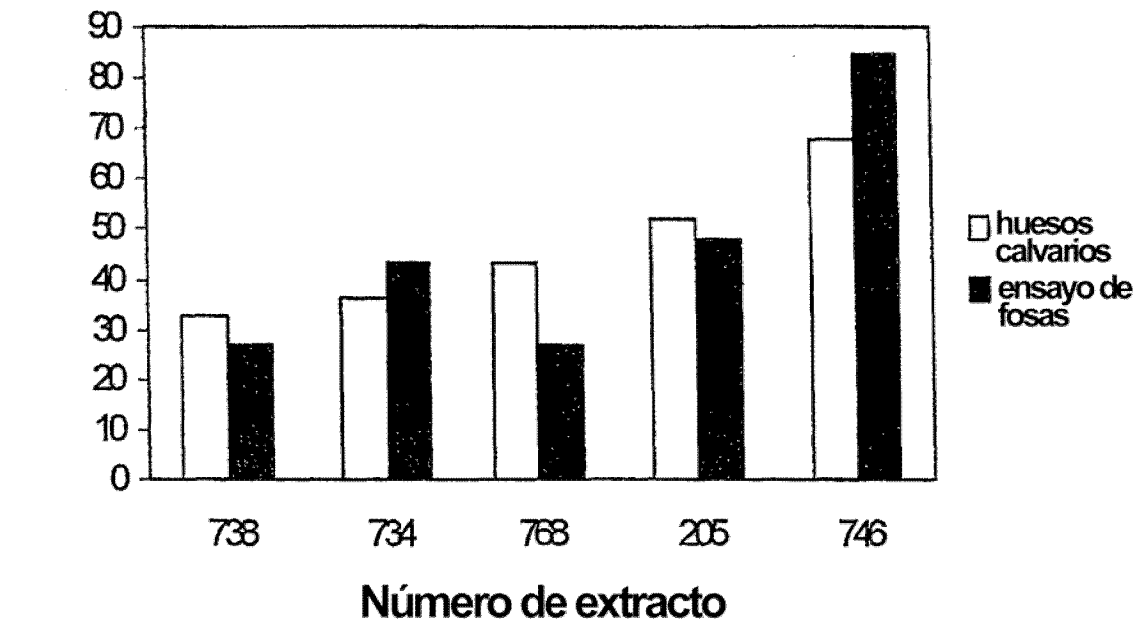


FIGURA 2


% de inhibición
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
738
734
768
205
746
Número de extracto
huesos calvarios
ensayo de fosas