

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 573**

51 Int. Cl.:

A61K 36/53 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

A23L 1/00 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2008 E 08717085 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2252309**

54 Título: **Composiciones nutricionales para la promoción del crecimiento óseo y el mantenimiento de la salud ósea que contienen, por ejemplo, extractos de romero o comino**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2013

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**OFFORD CAVIN, ELIZABETH;
WILLIAMSON, GARY;
COURTOIS, DIDIER;
LEMAURE, BERNARD;
TOUCHE, ANDRÉ;
SOON, GRACE ING y
AMEYE, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 396 573 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

Composiciones nutricionales para la promoción del crecimiento óseo y el mantenimiento de la salud ósea que contienen, por ejemplo, extractos de romero o comino

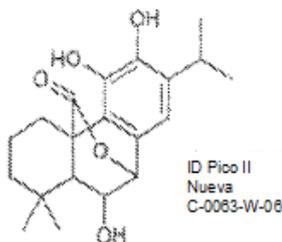
5 En general, la presente invención hace referencia a nuevos compuestos y a compuestos nutricionales que proporcionan beneficios sobre la salud. Más específicamente, la presente invención hace referencia a composiciones beneficiosas que pueden utilizarse, por ejemplo, para mejorar la densidad y la formación ósea y/o para inducir la expresión de proteínas morfogénicas óseas. Las realizaciones de la presente invención hacen referencia a los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1.

15 La masa ósea evoluciona a lo largo de la vida y está regulada por mecanismos genéticos, mecánicos y hormonales. La adquisición mineral ósea ocurre durante la infancia y el pico de masa ósea se alcanza alrededor de los 20 años. Durante este periodo, la formación de hueso excede la resorción ósea. Más adelante en la vida, y particularmente durante la menopausia, o en la población anciana, la masa y la calidad ósea se deterioran debido al mayor recambio óseo, con una resorción ósea excesiva que lleva a una pérdida gradual de la masa ósea, su microarquitectura, su estructura y su fuerza. Para el mantenimiento óseo es importante restablecer el balance entre la formación ósea y la resorción ósea. Este proceso de remodelado se regula a nivel celular óseo e incluye una estrecha interacción entre las células formadoras de hueso (osteoblastos) y las células resorptivas de hueso (osteoclastos).

25 Los fitonutrientes, especialmente los flavinoides, pueden influenciar de manera positiva en el proceso de remodelado óseo. Los datos más conocidos son los de las isoflavonas de la soja que, en algunos estudios, han mostrado prevención de la pérdida ósea y una mejora en la densidad mineral ósea (DMO) en mujeres posmenopáusicas a dosis de 50-90 mg/día. No obstante, no todos los estudios con isoflavonas tienen resultados positivos y aún existe controversia en torno a su eficacia. Además, existe cierta evidencia epidemiológica sobre los beneficios del té, dado que un estudio previo demostró que los bebedores de té tenían una DMO mayor que los no bebedores de té, en una población anciana. No obstante, no se han llevado a cabo estudios de intervención para comprobar este hallazgo.

30 Actualmente, existe un fuerte interés en identificar agentes que pueden estimular la formación ósea. La liberación de BMP-2 recombinante ha mostrado una inducción de la formación de hueso y cartílago. Por ejemplo, la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) es un miembro de la familia TGF β y es un regulador clave del crecimiento óseo durante el desarrollo embrionario, y del crecimiento y reparación óseas posteriores. La estatinas (fármacos efectivos en el descenso de los niveles de colesterol mediante la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa) mejoran la formación ósea, parcialmente mediada por la inducción de la BMP-2 (G. Mundy, et al., Science 286: 1946-1949 (1999); C.J. Edwards, et al., Lancet, 355: 2218-2219 (2000)). La estatinas también son capaces de reducir el riesgo de fractura de cadera en mujeres menopáusicas (P.S. Wang, et al., JAMA 283 :3211-3216 (2000)).

40 Generalmente, la presente invención hace referencia a composiciones para el mantenimiento de la salud de los huesos o la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos óseos. La presente invención también proporciona 6"- feruloilnepitrina, 6"-cumaroilnepitrina, y un compuesto con la siguiente fórmula



45 ácido deshidroxirrosmarínico, que puede utilizarse en las composiciones de la presente invención. En particular, la presente invención hace referencia a un compuesto para la utilización de acuerdo con la reivindicación 1. La 6"- feruloilnepitrina, la 6"-cumaroilnepitrina y el ácido deshidroxirrosmarínico pueden proporcionarse en forma de extracto de planta.

50 El producto puede ser un medicamento, un producto alimentario, un suplemento nutricional y/o un nutraceutico para humanos y/o mascotas. Preferiblemente, el producto incluye al menos un polifenol en una cantidad del 0,001-100 % del peso total seco de la composición. Puede ser necesario que el polifenol se administre en una cantidad de 0,01 μ g – 100 mg por kg de peso corporal y por día.

55 Adicionalmente, el producto puede incluir una fuente de proteínas, una fuente de grasas y/o una fuente de carbohidratos. La fuente de proteínas puede proporcionar aproximadamente el 1-55 % de la energía total del

producto; la fuente de grasas puede proporcionar aproximadamente el 5-55 % de la energía total del producto; y la fuente de carbohidratos puede proporcionar aproximadamente el 40-80 % de la energía total del producto.

5 El producto puede diseñarse para su administración oral y/o enteral.

Preferiblemente, el producto puede estar en una forma seleccionada del grupo que incluye una alimentación nutricionalmente equilibrada, una fórmula nutricionalmente equilibrada, un suplemento dietético, un producto lácteo, una bebida refrigerada o estable en almacenamiento, una sopa, una barrita nutricional, alimentación para mascotas, repostería, una composición farmacéutica y combinaciones de los mismos.

10 El producto preparado mediante la utilización de la presente invención puede utilizarse para tratar o prevenir la osteoporosis.

15 La presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la osteoporosis, y el método incluye la administración a un individuo con riesgo de osteoporosis de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que contiene un ingrediente activo que tiene una cantidad efectiva de, al menos, un nuevo compuesto y/o, al menos, un polifenol de la presente invención, que tiene la capacidad de inducir la expresión de la proteína morfogénica ósea en el individuo.

20 Las características y ventajas adicionales de la presente invención se describen aquí y serán evidentes a partir de la descripción detallada, las figuras y los ejemplos.

Breve descripción de las figuras

25 La FIG. 1 ilustra un protocolo de extracción.

La FIG. 2 ilustra un resumen del procedimiento de extracción y el primer fraccionamiento.

30 La FIG. 3A ilustra los resultados sobre BMP-2 de los extractos de comino y romero.

La FIG. 3B ilustra los resultados sobre la fosfatasa alcalina de los extractos de comino y romero.

La FIG. 3C ilustra la formación ósea en el cultivo orgánico para los extractos de comino y romero.

35 La FIG. 4 ilustra un procedimiento de extracción que utiliza un extracto inicial de metanol/agua, y la actividad BMP-2 de los extractos (a partir de 80 g de hojas secas (hexano = 6 g)).

La FIG. 5 ilustra la formación ósea *in vivo* con extracto de romero.

40 La FIG. 6A ilustra la demostración de fenólicos positivos en el ensayo de la BMP-2.

La FIG. 6B ilustra un ensayo de fosfatasa alcalina con fenólicos positivos para la BMP-2.

45 La FIG. 6C ilustra la formación ósea en cultivo de órganos: ejemplos con eupafolina y carnosol.

La FIG. 7 aporta detalles sobre los efectos del extracto de romero en la actividad de los osteoclastos humanos.

50 La FIG. 8 muestra la inducción del mRNA de la osteopontina (OPN) en las células osteoblásticas humanas (hPOBtert) mediante el extracto de romero o carnosol.

La FIG. 9 muestra que el carnosol induce la expresión de la enzima de fase II NQO1, un gen/proteína habitualmente regulado por Nrf-1.

55 Se ha observado que, en las plantas, varios isoprenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.) son moduladores tanto de la HMG-CoA reductasa como de la prenilación de proteínas, y probablemente estos mecanismos están asociados a la inhibición de la resorción ósea o a la potenciación de la formación ósea. Consecuentemente, ciertos compuestos de plantas pueden ser inhibidores potenciales de la resorción ósea y/o potenciadores de la formación ósea.

60 Los extractos que incluyen los polifenoles de la presente invención se prepararon a partir de especies de plantas comestibles y/o medicinales que tienen potencial para estimular la BMP-2 y la formación ósea. Tal y como se describe con más detalle más adelante, los extractos generalmente se prepararon mediante un proceso de 4 pasos que consta de (a) hexano, (b) metanol-agua, (c) extractos de metanol-agua hidrolizados con glucosidasas y reextraídos con acetato de etilo, y (d) sustracción de los polifenoles grandes con una columna de PVPP. Los extractos de metanol-agua y acetato de etilo se utilizaron en el cribaje *in vitro*. Los extractos se hidrolizaron

mediante α - y β -glucosidasas en vez de con ácido para asegurar la liberación de las agliconas flavinoides (la forma biológicamente activa) de sus glucósidos.

Los siguientes bioensayos se utilizaron para analizar la formación ósea

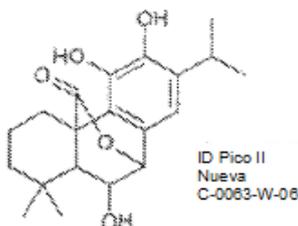
- Ensayo del gen marcador BMP-2 (evaluación de alto rendimiento)
- Fosfatasa alcalina en células osteoblásticas
- Cultivo orgánico en un cráneo *in vitro*, formación ósea
- Inyección en un cráneo *in vivo*, formación ósea.

Por ejemplo, se seleccionaron los extractos según la formación mediante un ensayo de gen marcador de alto rendimiento para la BMP-2 seguido de un ensayo con fosfatasa alcalina y un modelo de cultivo orgánico, y finalmente mediante la inyección en el cráneo de ratones *in vivo*. Adicionalmente, se evaluó la actividad de las subfracciones de los extractos positivos y/o de los compuestos puros. Se llevó a cabo el análisis de la composición química de un extracto activo para determinar sus compuestos activos.

Se observó de forma sorprendente, que por ejemplo, los compuestos extraídos de las plantas de romero podían utilizarse como compuestos activos para el desarrollo, crecimiento y /o mantenimiento óseo. Por ejemplo, se observó que los compuesto fenólicos siguientes tienen potencial anabólico: 6"-feruloilnepitrina, 6"-cumaroilnepitrina, y/o ácido deshdroxirrosmarínico. Los extractos de la planta del romero y los compuestos puros se analizaron en un sistema de cocultivo con osteoblastos/osteoclastos. El extracto de romero, así como por ejemplo la eupafolina, el carnosol y la escutelareína, mostró actividad para la regulación de las citoquinas clave para el control del remodelado óseo, es decir, OPG/RANKL. Además, se observó que el carnosol estimula la expresión de osteopontina (OPN) en las células osteoblásticas humanas, posiblemente mediante las rutas de señalización AP-1/Nrf-2.

Se identificaron tres polifenoles activos nuevos que, de acuerdo con el conocimiento de los inventores, no se habían descrito con anterioridad en la literatura.

Estos son la 6"-Feruloilnepitrina, la 6"-Cumaroilnepitrina y un compuesto con la siguiente fórmula



ácido deshdroxirrosmarínico.

En una realización de la presente invención, los nuevos compuestos y/o polifenoles de la presente invención se obtienen a partir de extractos de metanol/agua de la planta de romero (25% de la materia seca foliar inicial) obtenidos tras un paso de desgrasamiento con un hexano que contiene las moléculas responsables de la actividad, y que pueden utilizarse en un producto alimentario. Su actividad *in vitro* se observó tanto en el extracto inicial de metanol/agua como en los compuestos puros. En los ensayos de la BMP-2, se observa una actividad elevada tras la purificación/concentración mediante la extracción con acetato de etilo y/o la hidrólisis con glucosidasa y la posterior extracción con acetato de etilo. Debido a que la actividad de los compuestos puros es significativamente mayor a la actividad de los extractos iniciales de MeOH/agua, se prefiere que los extractos de plantas utilizados de acuerdo con la presente invención estén enriquecidos con los polifenoles de la presente invención. Es preferible que la concentración de los polifenoles de la presente invención en el extracto de planta enriquecido sea de, al menos el doble, aún más preferible si es al menos 50 veces mayor al contenido en los extractos de MeOH/agua descritos con anterioridad. En comparación con la planta natural, el contenido de polifenoles de la presente invención en el extracto enriquecido es preferiblemente al menos 10 veces mayor, preferiblemente al menos 100 veces mayor, aún más preferible al menos 500 veces mayor.

Los nuevos compuestos y polifenoles de la presente invención, o las plantas o los extractos de plantas que los incluyen, en particular las plantas del romero o los extractos de plantas, pueden utilizarse en la preparación de una composición alimentaria. La composición puede estar en forma de alimentos o alimentación para mascotas nutricionalmente equilibrados, un suplemento dietético, una chuchería o una composición farmacéutica.

Los nuevos compuestos y polifenoles pueden utilizarse solos o en asociación con otros compuestos, plantas o extractos de plantas como, por ejemplo, la achicoria, el té, el cacao, o con una o más moléculas bioactivas como

los antioxidantes, los ácidos grasos, las fibras prebióticas, la glucosamina, el condroitín sulfato.

5 En una realización de la presente invención se prepara una composición alimentaria o una fórmula nutricional para el consumo humano. Esta composición puede ser una fórmula nutricional completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o estable en almacenamiento, una sopa, un suplemento dietético, un sustituto de la carne, una barrita nutricional o repostería.

10 Una fórmula nutricional preparada mediante la utilización de la presente invención puede incluir una fuente de proteínas. Preferiblemente, se utilizan las proteínas dietéticas como fuente de proteínas. Las proteínas dietéticas pueden ser cualquier proteína dietética adecuada; por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas de la leche, proteínas cárnicas y proteínas del huevo); proteínas vegetales (tales como proteínas de la soja, proteínas de trigo, proteínas de arroz, y proteínas de guisantes); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de las mismas. Particularmente se prefieren las proteínas de la leche, tal como la caseína, las proteínas del suero de la leche y las proteínas de la soja. La composición también puede incluir una fuente de carbohidratos y una fuente de grasa.

20 Si la fórmula nutricional incluye una fuente de grasa, preferiblemente la fuente de grasa proporciona aproximadamente entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 55% de la energía de la fórmula nutricional; por ejemplo entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 50% de la energía. Los lípidos que constituyen la fuente de grasa pueden ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuadas. Las grasas vegetales son particularmente adecuadas; por ejemplo, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de colza, lecitinas, y similares. Si se desea, también se pueden añadir grasas animales tales como la grasa de la leche.

25 Se puede añadir una fuente de carbohidratos a la fórmula nutricional. Preferiblemente, ésta proporciona entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 80% de la energía de la composición nutricional. Puede utilizarse cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, y mezclas de los mismos. Si se desea, también puede añadirse fibra dietética. Si se utiliza, ésta aporta aproximadamente el 5% de la energía de la fórmula nutricional. La fibra dietética puede proceder de cualquier origen adecuado, incluyendo por ejemplo la soja, los guisantes, la avena, la pectina, la goma guar, la goma arábiga y los fructoligosacáridos. La fórmula nutricional puede incluir vitaminas y minerales adecuados en una cantidad de acuerdo con las guías apropiadas.

35 Si se desea, se pueden incorporar uno o más emulsionantes de calidad alimenticia a la fórmula nutricional; por ejemplo ésteres de ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos, lecitina y mono- y diglicéridos. De forma similar, se pueden incluir sales y estabilizantes adecuados. También se pueden combinar vitaminas y minerales con el extracto de plantas.

40 Preferiblemente, la composición nutricional es administrable por vía entérica; por ejemplo en forma de un polvo, un comprimido, una cápsula, un concentrado líquido, un producto sólido o una bebida lista para su consumo. Si se desea producir una fórmula nutricional en forma de polvo, se debe transferir la mezcla homogeneizada a un aparato de secado adecuado tal como un secador por pulverización o un secador por congelación, y luego convertirse en polvo.

45 En otra realización, una composición nutricional incluye un cereal a base de leche junto con una formulación prebiótica. Preferiblemente, el cereal a base de leche es un cereal infantil que actúa como transportador en la formulación prebiótica.

50 En otra realización, un producto alimentario puede enriquecerse con, al menos, un compuesto, planta o extracto de planta de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una cuajada de leche, un artículo de repostería, una bebida dulce o edulcorada, una barrita de repostería, copos o barritas de cereal de desayuno, bebidas, leche en polvo, productos a base de soja, productos fermentados no lácteos o suplementos nutricionales para la nutrición clínica.

55 La cantidad de los nuevos compuestos y/o polifenoles de la presente invención, y de las plantas o extractos de plantas en la composición (si los hay) puede variar en relación a su fuente de procedencia y a su utilización. En una realización preferible, una cantidad de dosis eficiente diaria es una cantidad de, al menos, 1 mg, y más preferiblemente de entre 1 mg y 200 mg de la molécula activa por día.

60 En una realización alternativa, se puede preparar una composición farmacéutica que incluye, al menos, un nuevo compuesto y/o un polifenol de la presente invención, tal y como se describe arriba, en una cantidad suficiente para alcanzar el efecto deseado en un individuo. Esta composición puede ser un comprimido, 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 puede contener transportadores y excipientes adecuados para la liberación de la molécula activa respectiva de naturaleza distinta al tejido diana. El tipo de

transportador/excipientes y la cantidad de los mismos dependerá de la naturaleza de la sustancia y el tipo de liberación del fármaco y/o la administración contemplada. Se apreciará que, un experto en la materia, en base a su propio conocimiento, seleccionará los componentes apropiados y la forma galénica.

5 El nuevo compuesto y/o polifenol de acuerdo con la invención puede utilizarse en la preparación de una composición alimentaria para mascotas. Dicha composición puede administrarse a una mascota como suplemento en su dieta normal o como componente de una alimentación para mascotas nutricionalmente completa, y más preferiblemente, en una alimentación para mascotas hipocalórica. También puede ser una composición farmacéutica para mascotas.

10 El nuevo compuesto y/o polifenol de acuerdo a la invención puede utilizarse sólo o en asociación con otras plantas tales como la achicoria, el té, el cacao, o con otras moléculas bioactivas tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras prebióticas, glucosamina, condroitín sulfato, por ejemplo.

15 Preferiblemente, una composición alimentaria para mascotas de acuerdo con la presente invención contiene aproximadamente entre 0,01 y 100 mg de los compuestos y/o polifenoles por gramo de la comida seca para mascotas. La composición alimentaria para mascotas nutricionalmente completa, de acuerdo con la invención puede estar en forma de polvo, en forma seca, una chuchería o un producto alimentario para mascotas estable en almacenamiento o refrigerado y húmedo. Puede estar refrigerado o proporcionado en forma de producto estable en almacenamiento. Estos alimentos para mascotas pueden producirse mediante las formas conocidas en la materia.

25 Opcionalmente, la alimentación para mascotas puede contener un prebiótico, un microorganismo probiótico u otro agente activo, por ejemplo un ácido graso de cadena larga. Preferiblemente, la cantidad de prebiótico en la alimentación para mascotas es menor al 10% del peso. Por ejemplo, el prebiótico puede representar entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5% del peso de la alimentación para mascotas. En las alimentaciones para mascotas que contienen achicoria como fuente de prebiótico, la achicoria que representa aproximadamente entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 10% del peso de la mezcla alimentaria; más preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5% del peso.

30 Si se utiliza un microorganismo probiótico, la alimentación para mascotas preferiblemente contiene entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} células del microorganismo probiótico por cada gramo de la alimentación para mascotas; más preferiblemente entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^6 células del microorganismo probiótico por cada gramo. La alimentación para mascotas puede incluir entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 20% del peso de la mezcla del microorganismo probiótico; preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 6% del peso; por ejemplo, aproximadamente entre el 3% y aproximadamente el 6% del peso.

40 Si es necesario, la alimentación para mascotas puede complementarse con minerales y vitaminas para que sea nutricionalmente completa. Además, si se desea, a la alimentación para mascotas se pueden incorporar varios ingredientes, por ejemplo, azúcar, sal, especies, sazónadores, agentes aromatizantes, y similares.

45 En otra realización, los complementos dietéticos pueden prepararse para mejorar la calidad de la alimentación para mascotas. Los complementos dietéticos pueden estar encapsulados o pueden proporcionarse en forma de polvo; pueden estar empaquetados junto al alimento principal o estar separados, y pueden estar en forma húmeda o seca. A modo de ejemplo, un polvo que incluye los extractos de acuerdo con la invención puede estar empaquetado en bolsitas en forma de polvo, o en un gel, lípido u otro transportador adecuado. Estas unidades de empaquetamiento separadas pueden proporcionarse junto al alimento principal o en paquetes de múltiples unidades para su utilización con un alimento principal o chuchería, de acuerdo con las instrucciones de uso.

50 La administración del alimento o la composición alimentaria para mascotas a un humano o a un animal, tal y como se describe con anterioridad, da como resultado una reducción en el riesgo de desarrollar osteoporosis.

55 Los expertos en la materia verán claro que se pueden combinar libremente todos los elementos descritos aquí sin alejarse del ámbito de la invención descrito.

Las ventajas y características adicionales de la presente invención se pueden extraer a partir de los ejemplos y las figuras.

60 Ejemplos

A modo de ejemplo y sin ser limitante, los siguientes ejemplos ilustran varias realizaciones de la presente invención o comparan e ilustran adicionalmente los ensayos experimentales llevados a cabo de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

65

Ejemplo 1

(Fuente) de extractos de especias ricos en polifenoles

5 : Algunos polifenoles se encuentran en los extractos de romero o comino

Tabla 1: Fuente de extractos de especias ricas en polifenoles

NOMBRE	GÉNERO	ESPECIE	ÓRGANO
Romero	<i>Rosmarinus</i>	<i>officinalis</i>	Hojas
Comino	<i>Carum</i>	<i>carvi</i>	Semillas
Tomillo	<i>Thymus</i>	<i>vulgaris</i>	Hojas
Menta verde	<i>Mentha</i>	<i>spicata</i>	Hojas

10 Procedimiento de extracción desde las plantas

En relación a la FIG. 1, el proceso de extracción habitualmente incluyó los siguientes pasos:

- Hexano, desgrasamiento (extractos no seleccionados)
- MeOH/H₂O (1a)
- MeOH/H₂O, hidrolizados con α , β -glucosidasas, extraídos con acetato de etilo (1b)
- 1a purificado en una columna de PVPP para sustraer los polifenoles de alto peso molecular (2a)
- 1b purificado en una columna de PVPP para sustraer los polifenoles de alto peso molecular (2b)

20 Los extractos 2a y 2b dieron resultados similares a los extractos 1a y 1b. El procedimiento de extracción incluyó el tratamiento con una glucosidasa (en vez de la hidrólisis ácida) para asegurar la conversión de los glucósidos flavinoides en agliconas.

25 Subfraccionamiento – se prepararon cuatro subfracciones mediante el fraccionamiento de cartucho de gel de sílice con elución mediante disolventes de polaridad variable: acetato de etilo, luego acetato de etilo/metanol (95/5) seguido de acetato de etilo/metanol (50/50) y finalmente metanol (FIG. 2).

Pasos de selección y bioensayos

30 La selección de la formación ósea se llevó a cabo en varias fases:

- (i) Ensayo con el gen marcador de alto rendimiento BMP-2 con extractos no hidrolizados de MeOH/H₂O (1a) y los extractos hidrolizados con glucosidasa correspondientes en acetato de etilo (1b). Se analizaron los extractos dos veces, a concentraciones de 1 a 100 μ g/ml, diluidos en un medio de cultivo de soluciones de extracto de plantas preparados a 50 mg/ml en DMSO.
- (ii) Los extractos positivos en el ensayo con BMP-2 se prepararon *de novo* y se seleccionaron de nuevo en relación a su dosis-respuesta para confirmar los “éxitos”.
- (iii) Análisis con BMP-2 del subfraccionamiento de los positivos/éxitos y los compuestos puros candidatos.
- (iv) Los compuestos que resultaron positivos en el ensayo con BMP-2 se analizaron adicionalmente en relación a la diferenciación osteoblástica, utilizando el ensayo con fosfatasa alcalina y un modelo organotípico de formación ósea mediante un cultivo de huesos craneales e histomorfometría para la demostración de la formación ósea, tal y como describe Traianedes *et al*, (1998).
- (v) Inyección final *in vivo* de los compuestos “éxito” en los huesos craneales de ratones y monitorización del área y grosor óseos. Los extractos se evaluaron en un ensayo con cráneos murinos neonatales de 4 días. Los huesos se incubaron con los extractos durante 4 días completos.
- (vi) La actividad de resorción se monitorizó mediante la medición de la cantidad de colágeno de tipo I liberado en el medio mientras los osteoclastos digieren el hueso.

55 Resultados: selección de los extractos de plantas en cultivo orgánico con el gen marcador BMP-2

Los extractos de las especies *Rosmarinus officinalis*, *Carum carvi*, *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* fueron

positivos en 2 rondas de selección con BMP-2. Se confirmó adicionalmente que estos extractos o subfracciones activas estimulan la formación ósea en el modelo de cultivo orgánico con cráneo:

5 Tabla 2: Resumen de extractos de especias positivas en la selección con BMP-2 y confirmadas en cultivo orgánico

Nombre en latín, nombre en español	Parte	Extracto	Extracto positivos con BMP-2	Cultivo orgánico
<i>Rosmarinus officinalis</i> , romero	Hojas	MeOH/H ₂ O acetato de etilo	2004, 2127 2005, 20898	2004 2005
<i>Carum carvi</i> , comino	Semillas	Acetato de etilo	2074	2074
<i>Thymus vulgaris</i> , tomillo	Hojas	Acetato de etilo	2067	2067
<i>Mentha spicata</i> , menta verde	Hojas	Acetato de etilo	2072	2072

Conclusiones de la selección del extracto de planta

10 Los éxitos en relación a la BMP-2 confirmados mediante el ensayo de formación ósea en cultivo orgánico fueron, por ejemplo, extractos de hojas de romero, hojas de tomillo, hojas de menta verde y semillas de comino.

Ejemplos de éxitos de romero y comino para la actividad de la BMP-2, confirmados mediante ensayo con fosfatasa alcalina y cultivo orgánico

15 Las FIGS. 3A-C ilustran los resultados del ensayo de formación ósea para los extractos de romero y comino.

Efecto del procedimiento de extracción sobre la actividad de la BMP-2

20 Tras una primera extracción de romero con metanol/agua en hojas previamente desgrasadas (ext. 2127), la inducción de la expresión génica de la BMP-2 fue de 1,5X a 10mg/ml (FIG. 4). Una extracción específica de este extracto, con acetato de etilo (2188), condujo a un aumento de la expresión de la BMP-2 (inducción de 8X). Esto sugiere que el proceso de extracción con EtOAc resultó en la concentración de los compuestos activos a partir del extracto original de MeOH/agua. Tras la hidrólisis con glucosidasas, el extracto de acetato de etilo resultante
25 (2189) también es activo y muestra que se han extraído moléculas activas adicionales. El extracto 2189 aún es ligeramente más activo que el no hidrolizado.

30 Estos resultados muestran, sin ambigüedades, actividad en ambos extractos (no hidrolizado: 2188 e hidrolizado: 2189) sugiriendo la existencia de moléculas activas en dos formas distintas: libres y/o unidas (glicosiladas) en el extracto original.

Formación ósea en un cráneo tras la inyección *in vivo*

35 El *Rosmarinus officinalis* (extracto de romero) muestra actividad para la formación ósea en 3 ensayos *in vitro* independientes de formación ósea (BMP-2, fosfatasa alcalina, cultivo orgánico óseo) así como en el ensayo *in vivo* con un cráneo (véase la FIG. 5).

40 El extracto de romero (aquí primero se extrajeron las hojas con agua y entonces los extractos de agua se hidrolizaron con acetato de etilo) se inyecta en un cráneo murino, seguido del análisis de formación ósea *ex vivo* ÷.

Selección de compuestos puros

45 Los fenólicos se analizaron a concentraciones de 1 - 10 µM

Los fenólicos activos en el ensayo con la BMP-2 se enumeran en la tabla 4. Las FIGS. 6A-C muestran algunos fenólicos positivos en los ensayos de formación ósea.

50 Tabla 4: fenólicos activos en los ensayos con BMP-2, FA y cultivo orgánico (comparativa)

Flavinoide	Inducción de la BMP-2	Inducción de la actividad FA	Formación ósea en cultivo orgánico
Eupafolina	3 - 8X 2,5 - 10 µM	2X, 4X 5, 10 µM	Sí

Carnosol	4,5 - 7X 2,5 – 10 µM	2X 2,5 – 10 µM	Sí
Escutelareína	3 - 4X 5, 10 µM	2X 10 µM	Sí
Canferol	2,5X 1 – 10 µM	2-4X 2,5 – 10 µM	Sí
Acacetina	5,5X 5 – 10 µM	2X 5 – 10 µM	Leve
Genkwanina	4X 5 µM	1,5X 10 µM	Leve

Análisis de los extractos de romero activos en relación a la BMP-2

5 El extracto a analizar se escogió siguiendo los resultados previos que muestran que la actividad sobre la formación ósea se concentró en los extractos de acetato de etilo preparados a partir de un extracto de metanol/agua con (2189) o sin hidrólisis enzimática (2188), (véase la FIG. 4).

10 El extracto de acetato de etilo 2188 se seleccionó para el estudio fitoquímico de sus componentes principales, e incluyó la identificación y la purificación de los compuestos mediante HPLC/ELSD/UV/MS.. Se completó una evaluación fitoquímica a fondo del extracto de romero, activo en el ensayo con la BMP-2. Los resultados preliminares llevaron al aislamiento de los compuestos activos identificados arriba. Se identificaron nueve moléculas puras y se prepararon para llevar a cabo la evaluación de su actividad biológica sobre la salud ósea. Se cree que tres de ellas son compuestos nuevos. Estos compuestos se muestran en la tabla 6.

15 Tabla 6: 3 nuevos compuestos aislados en el extracto de romero 2188

NOMBRE	CANTIDAD (mg)	PUREZA (%)
Ácido deshidroxirrosmarínico	8,7	38
6"-feruloilnepitrina	19,9	99,9
6"-cumaroilnepitrina	13	94

Extracto de romero y su actividad anti-resortiva ósea

20 La osteoporosis es una enfermedad crónica caracterizada por una pérdida ósea lenta. El hueso no es un tejido muerto. Al contrario, se remodela constantemente y el hueso viejo se sustituye por hueso nuevo. Este remodelado se controla mediante los osteoblastos, las células responsables de la formación ósea, y los osteoclastos, las células responsables de la resorción ósea. Habitualmente, hay un equilibrio estrecho entre la formación ósea y la resorción ósea, con lo que no aparece pérdida ósea alguna. En la osteoporosis, este equilibrio no es perfecto, dado que la pérdida ósea es más prominente que la formación ósea. El tratamiento de la osteoporosis se puede dirigir hacia el aumento de la formación ósea, la disminución de la pérdida ósea o ambas cosas. En este ejemplo, se muestra que los extractos de romero pueden disminuir la pérdida ósea.

30 Los osteoclastos, diferenciados a partir de células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMC), se cultivaron en cortes de huesos bovinos. Su actividad resortiva se monitorizó mediante la medición de la cantidad de colágeno de tipo I liberado en el medio mientras digerían el hueso.

35 El colágeno de tipo I es la molécula orgánica principal del hueso. Mientras se digiere el hueso, la fase mineral del hueso se disuelve y las fibras de colágeno se exponen a la actividad proteolítica de las metaloproteasas de la matriz. Una vez que se digieren, las fibras de colágeno se hacen solubles y se liberan al medio de cultivo, donde se puede cuantificar su presencia mediante ensayos ELISA – ensayos CTXI.

40 La figura 7 aporta detalles sobre los efectos del extracto de romero en la actividad de los osteoclastos humanos, tal y como sigue: el extracto de romero 1 (extracto P31 disponible comercialmente, de Robertet) a una concentración de 10 µg/ml, disminuyó la cantidad de colágeno de tipo I liberado a partir de los cortes óseos, en comparación con el medio de cultivo sólo (control (CTL)) (figura 8A).

Inducción del mRNA de la osteopontina (OPN):

45 Cultivo celular - Los osteoblastos HPOBTert se sembraron en placas cubiertas con colágeno y crecieron en el medio de modificación MEM Eagle α complementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina y

penicilina/estreptomicina al 1%, 1 mM de β -glicerolfosfato y 50 mg/ml de ácido ascórbico en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% y aire al 95%, a 37°C. Cuando se añadieron el carnosol y los inhibidores, se utilizó una cantidad equivalente de Me₂SO como control.

5 Análisis de los niveles de mRNA mediante PCR a tiempo real – El RNA celular total se extrajo mediante la utilización del kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Suiza). Se transcribieron inversamente cantidades iguales (1 μ g) de RNA de los diferentes tratamientos utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR (Roche, Mannheim, Alemania). Para cada muestra, se añadió del kit 2 μ l de tampón de reacción 10x, 4 μ l de MgCl₂ 25 mM, 2 μ l de la mezcla de nucleótidos, 2 μ l de cebadores aleatorios, 1 μ l de inhibidor de la RNAasa y 0,4 μ l de la transcriptasa inversa AMV. La transcripción inversa se llevó a cabo siguiendo las siguientes condiciones de ciclado térmico (25°C durante 10 min., 42°C durante 60 min., y 75°C durante 5 min.) utilizando la PTC-100TM Concept, Suiza.

15 PCR cuantitativa a tiempo real – La PCR cuantitativa se realizó en triplicados de 25 μ l. Estos consistían en 12,5 μ l de la mezcla maestra para PCR universal Taqman 2x, 1,25 μ l de sondas y cebadores Assay-on-Demand (Applied Biosystems, EE.UU.) y 6,25 μ l de agua sin RNAasa. La amplificación se llevó a cabo en una máquina ABI 7000 (Applied Biosystems) con el siguiente perfil térmico: 50°C durante 2 min., 10 min. a 95°C, seguidos de 40 ciclos a 95°C durante 15 s. y 60°C durante 1 min. Los niveles de expresión génica se normalizaron hasta los niveles de expresión de la β -actina.

20 La FIG. 8 muestra que el extracto de romero o carnosol inducen la expresión de OPN en dependencia de la dosis mediante la determinación con PCR a tiempo real de los niveles de mRNA de la OPN. Las células HPOBtert se mantuvieron durante 48 h. en extracto de romero o carnosol a las dosis indicadas.

25 Inducción de NQO1

Preparación de los extractos citoplasmáticos – Las células hPOBtert se lavaron dos veces con suero frío tamponado con fosfato y se cultivaron con el tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, Tris/HCL 20 mM a pH 8, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, EDTA 2 mM a pH 8, e inhibidores de la proteasa añadidos recientemente: fenilmetilsulfonilfluoruro 1mM, aprotinina 0,15 U/ml, leupéptido 10 μ g/ml y pepstatina 10 μ g/ml). Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm, a 4°C durante 5 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo fresco. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo proteico. Aproximadamente, se mezclaron 50 μ g de cada mezcla con un volumen adecuado de un tampón de muestra, se desnaturalizaron durante 5 min. a 95 °C junto a 5 μ l de proteínas estándar, se refrigeraron con hielo, se cargaron en un gel preparado al 10%, y se sometieron a un análisis por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-NQO1.

40 Inmunotransferencia - 50 μ g del lisado proteico celular se redisolvió mediante SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La membrana con sondas para OPN y NQO1 se bloqueó y se sondeó en leche al 5% en suero tamponado Tris/Tween (Tris base 20 mM, pH 7,6, 137 mM, Tween 20 al 0,1%). Las transferencias se visualizaron mediante el desarrollo de quimioluminiscencia, con el sistema de detección de Western Blot (Amersham Biosciences).

45 Anticuerpos – Los anticuerpos específicos contra NQO1 (sc-16464) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnologies Inc (Santa Cruz, CA). El anticuerpo contra la β -actina (A-5441) se obtuvo de Sigma. Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Sigma.

50 La FIG. 9 muestra que el carnosol induce la expresión de la enzima de fase II NQO1, un gen/proteína habitualmente regulado por Nrf-1.

Ensayo de tolerancia: se llevó a cabo un ensayo de tolerancia en ratas macho Sprague-Dawley jóvenes. Las ratas se alimentaron por vía oral mediante sonda durante 5 días con una administración diaria de 1g (extracto 2127, MeOH/agua) por kg del peso corporal animal. No se observaron comportamientos anormales, mortalidad o signos de toxicidad durante el tratamiento o el periodo subsiguiente de 10 días de observación. Se consideró que el *Rosmarinus officinalis* es seguro bajo estas condiciones.

Conclusiones

60 Se observó que varios extractos de especias ricos en polifenoles eran positivos en el ensayo de evaluación con la BMP-2, incluyendo el *Rosmarinus officinalis*, el *Thymus vulgaris* (tomillo), el *Carum carvi* (el comino), y la *Mentha spicata* (menta verde). Se confirmaron los extractos activos en el ensayo con la BMP-2 en los ensayos funcionales con fosfatasa alcalina y cultivo orgánico para la formación ósea *in vitro*. Se identificaron varios compuestos polifenólicos como los responsables de los efectos observados.

El *Rosmarinus officinalis* (extracto de romero) y el *Carum carvi* (comino), fueron los extractos más prometedores y mostraron actividad de formación ósea en 3 ensayos independientes de formación ósea *in vitro* (BMP-2, fosfatasa alcalina y cultivo orgánico con hueso) así como en el ensayo con cráneos *in vivo*. Por ejemplo, los extractos de romero estimularon la formación ósea tras la inyección en cráneos murinos *in vivo*.

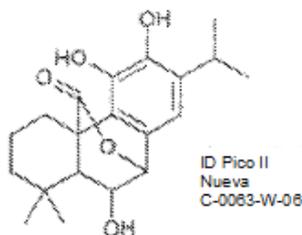
5

Los datos presentados muestran que los compuestos polifenólicos identificados a partir del extracto de romero son capaces de aumentar la formación ósea así como de disminuir la resorción ósea. No es común encontrar un único compuesto/extracto que muestre ambas propiedades. Esto convierte a estos compuestos en candidatos muy interesantes para la prevención de la osteoporosis o la reducción de su progresión en humanos o mascotas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado a partir del grupo que incluye,
6"-feruloilnepitrina,
5 6"-cumaroilnepitrina, y un compuesto con la siguiente fórmula



- 10 ácido deshidroxirrosmarínico, para su utilización en la inducción de la expresión de la proteína morfogénica ósea en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis.
2. Un compuesto para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se proporciona como un medicamento para humanos y/o mascotas.
- 15 3. Un compuesto para su utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se proporciona como un producto alimentario, un suplemento nutricional y/o un nutracéutico para humanos y/o mascotas.
4. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 para su utilización en la modulación de la proporción entre la formación ósea y/o la resorción ósea.
- 20 5. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 para su utilización en la inhibición de la resorción ósea.
6. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 para su utilización en el soporte de la regeneración ósea durante la curación de fracturas, el aumento de la formación ósea y la densidad mineral ósea durante el crecimiento, y la optimización del pico de masa ósea o en la disminución de la pérdida ósea, en particular, la pérdida ósea asociada con la edad en humanos o mascotas.
- 25 7. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-6 para su utilización en la mejora de la densidad ósea.
- 30 8. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-7 para su administración en una cantidad de entre 0,01 μg - 100 mg por kg de peso corporal y por día.
- 35 9. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 diseñado para la administración oral y/o enteral.
- 40 10. Un compuesto para su utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-9 para su administración en forma de un producto seleccionado a partir del grupo que incluye una alimentación nutricionalmente equilibrada, una fórmula nutricionalmente completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o estable en almacenamiento, una sopa, una barrita nutricional, alimentación para mascotas, repostería, una composición farmacéutica y combinaciones de los mismos.

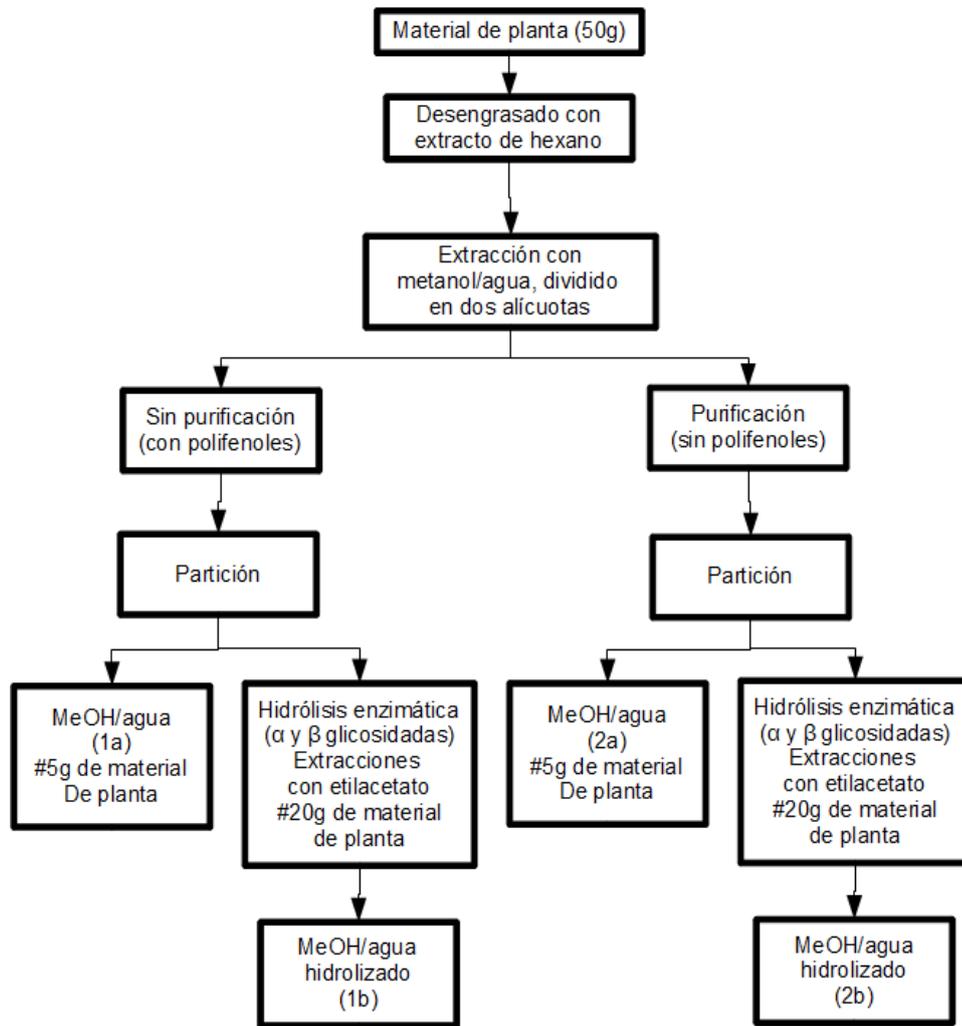


FIG. 1

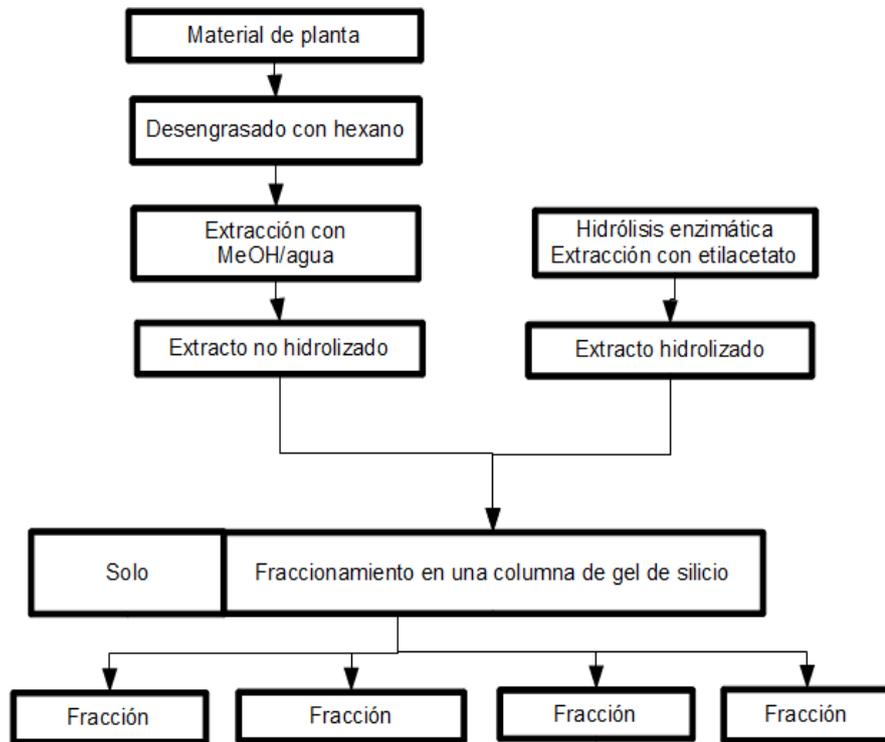


FIG. 2

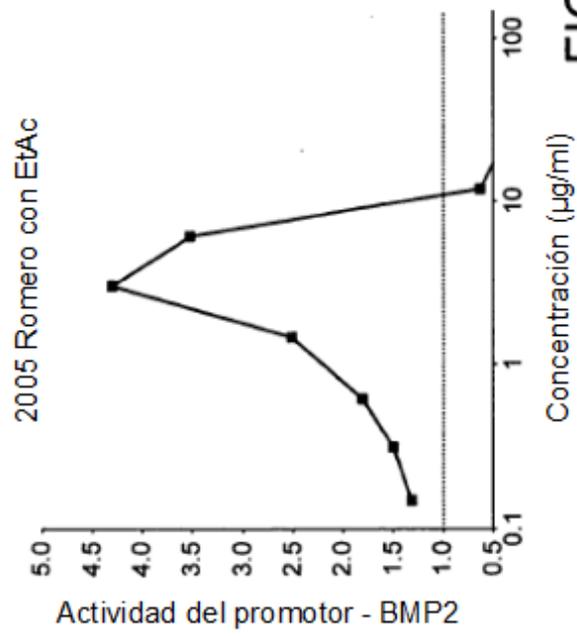
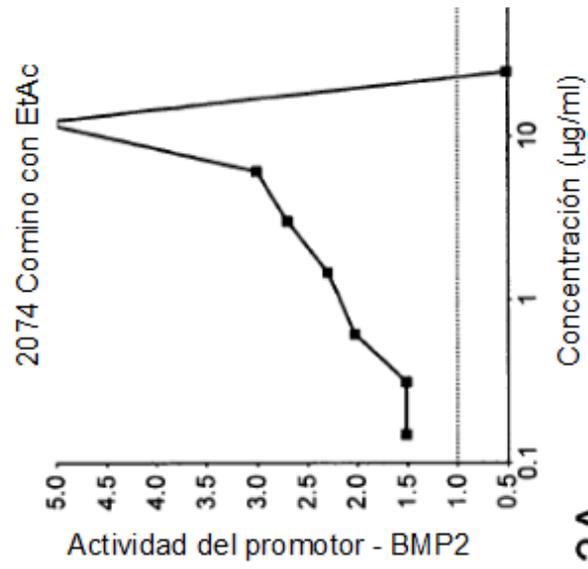


FIG. 3A

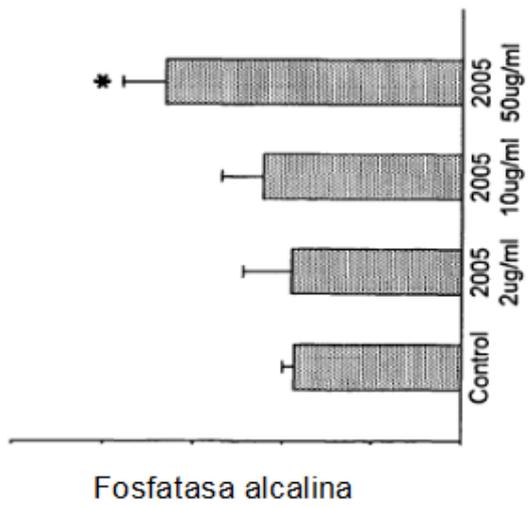
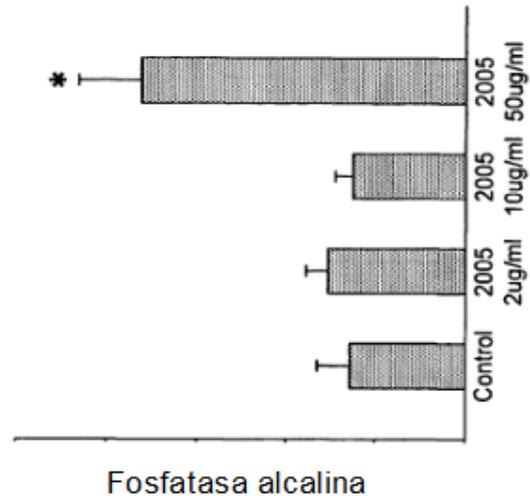


FIG. 3B

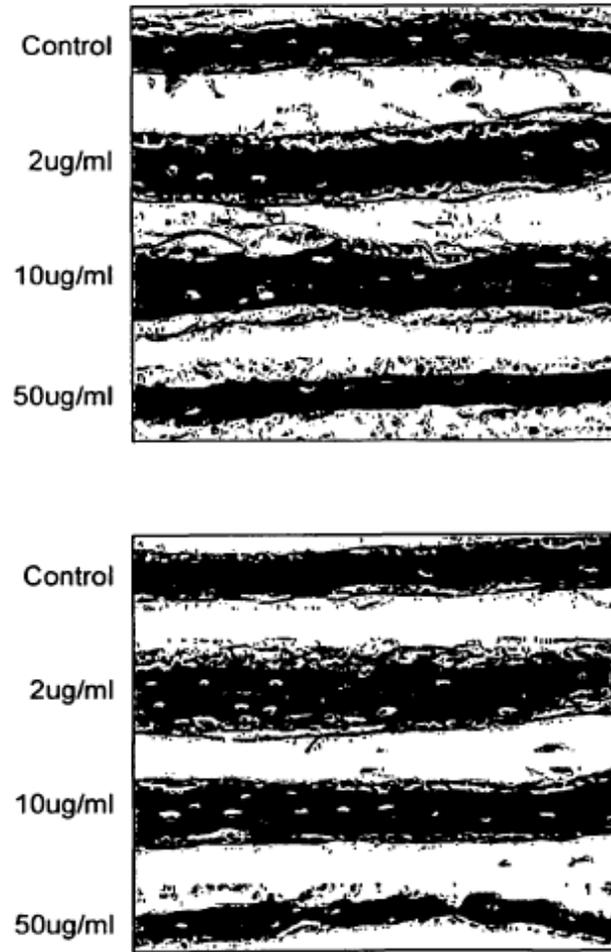


FIG. 3C

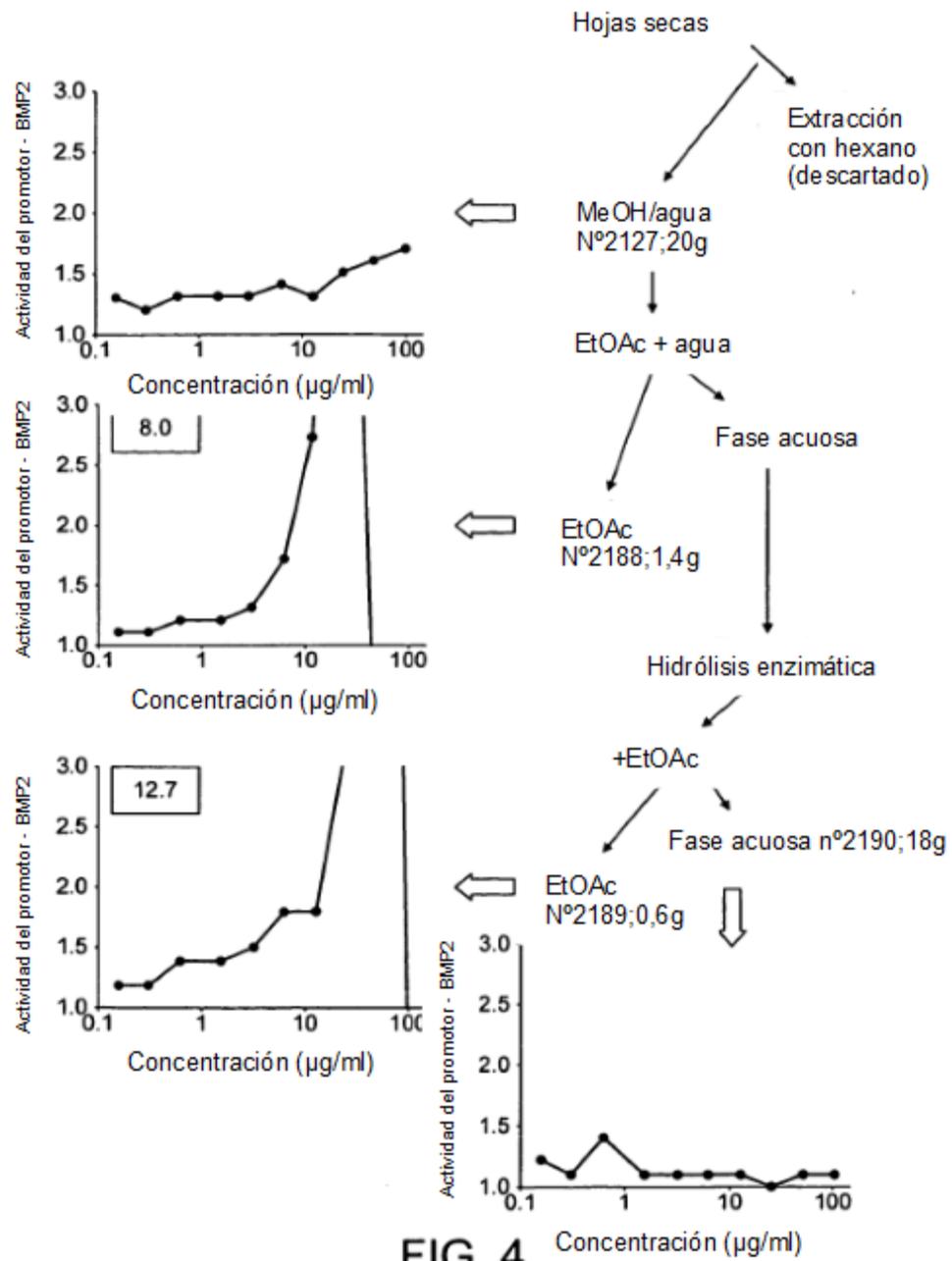


FIG. 4

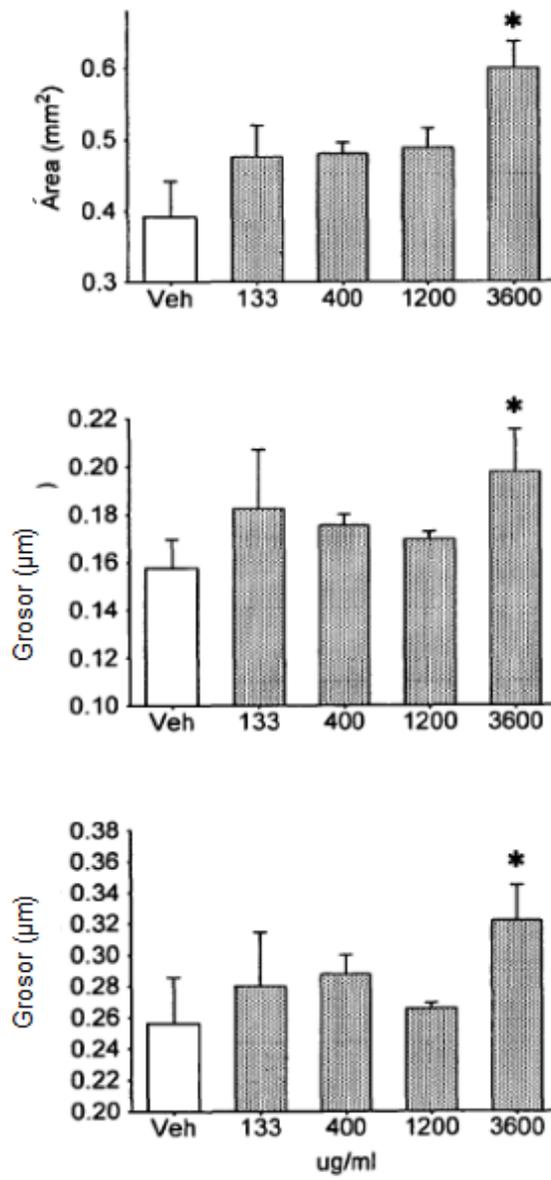


FIG. 5

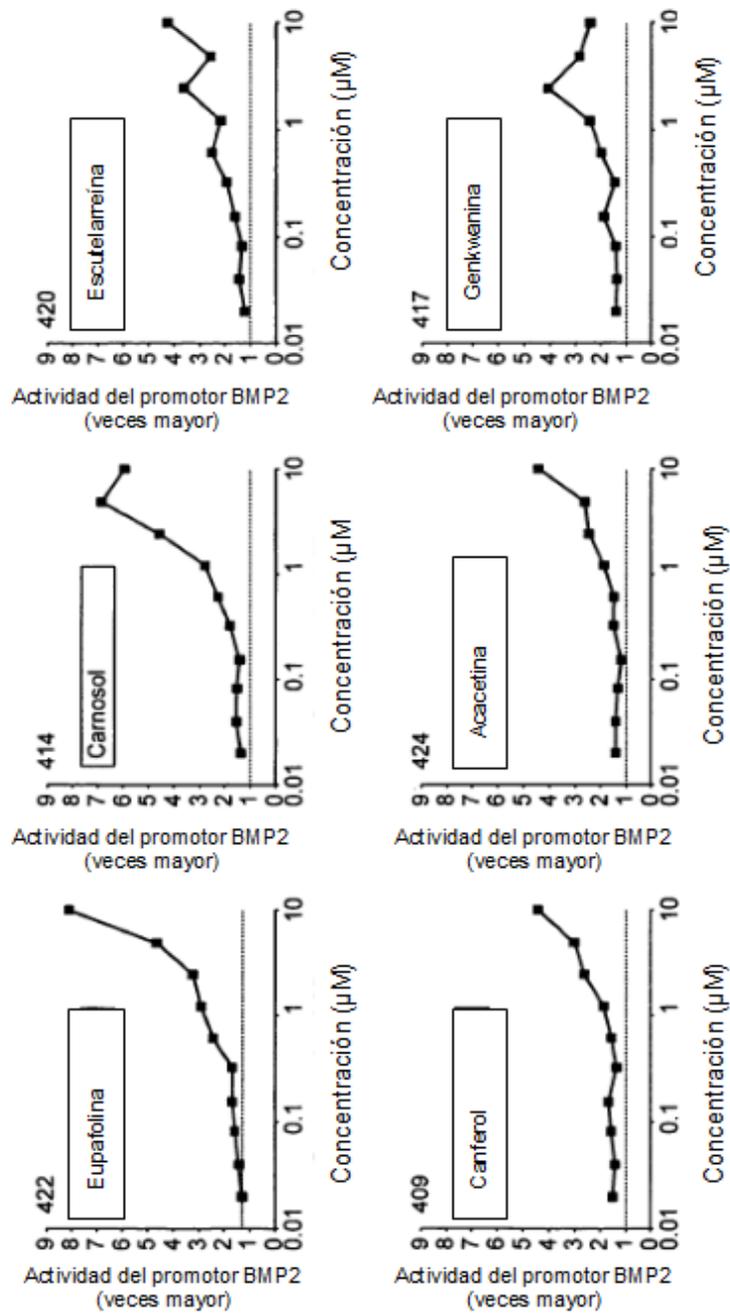


FIG. 6A

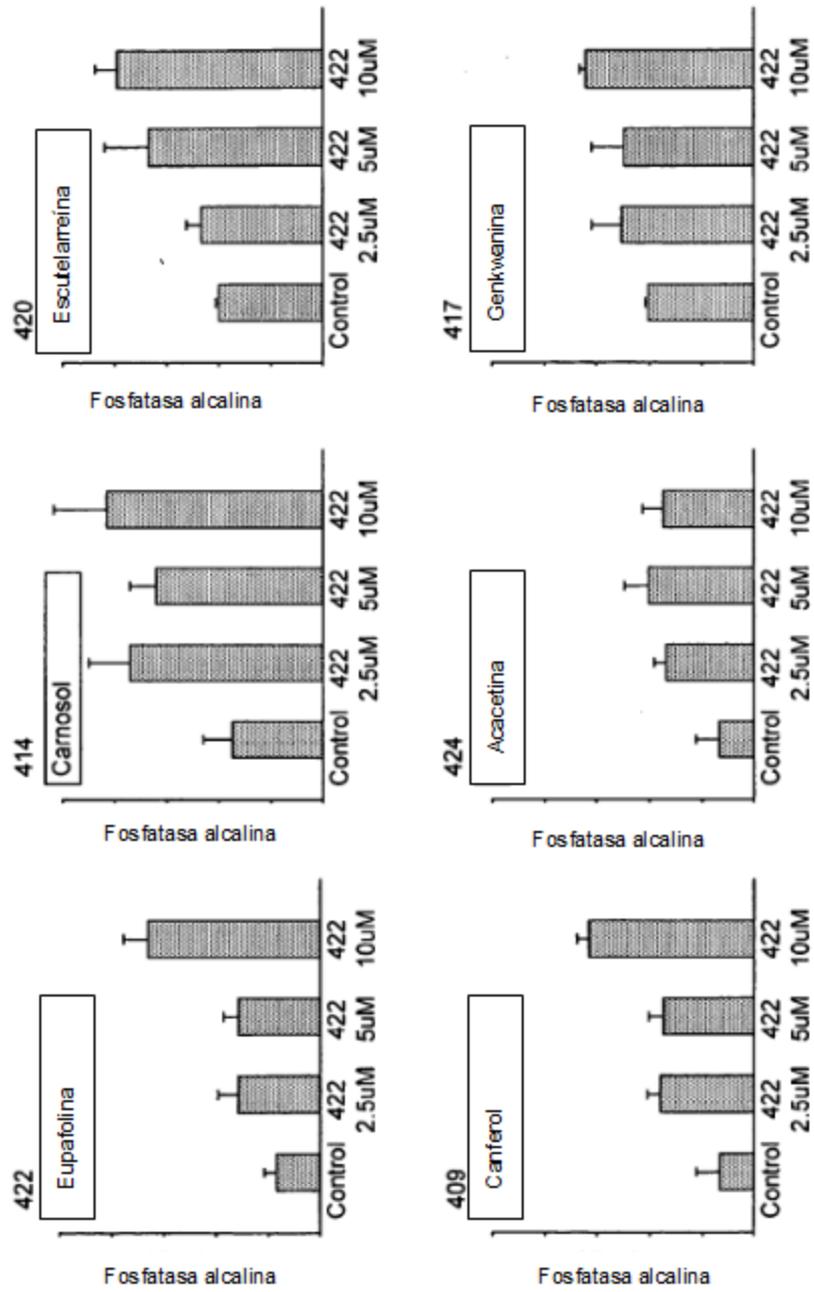


FIG. 6B

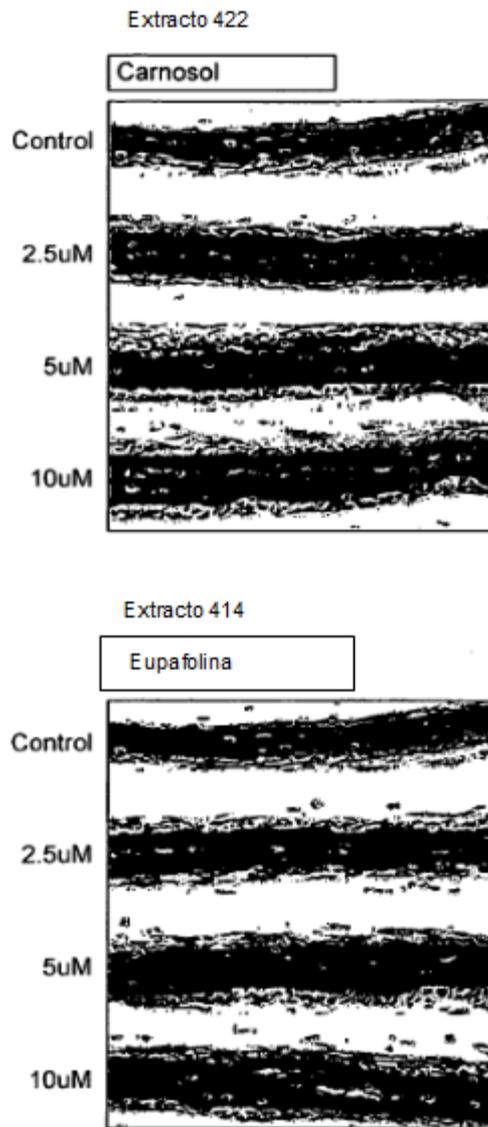


FIG. 6C

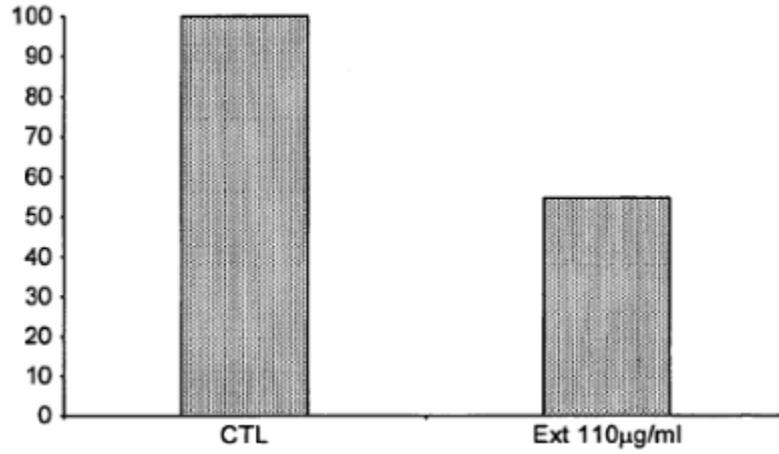


FIG. 7

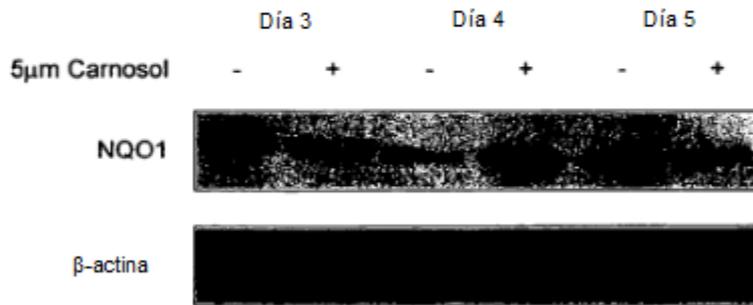


FIG. 9

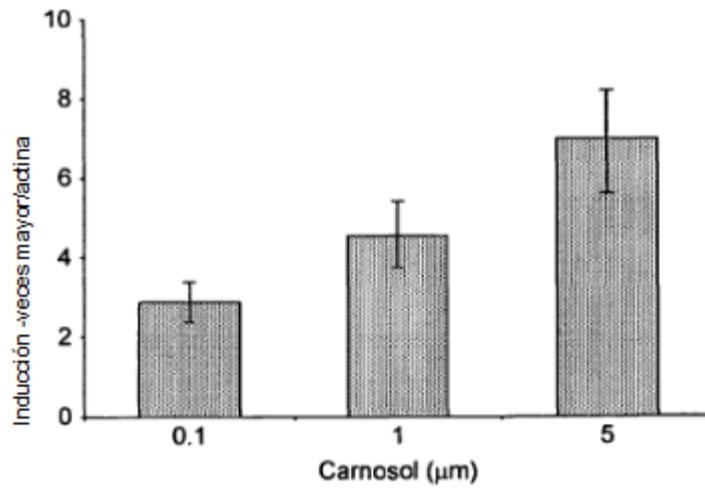
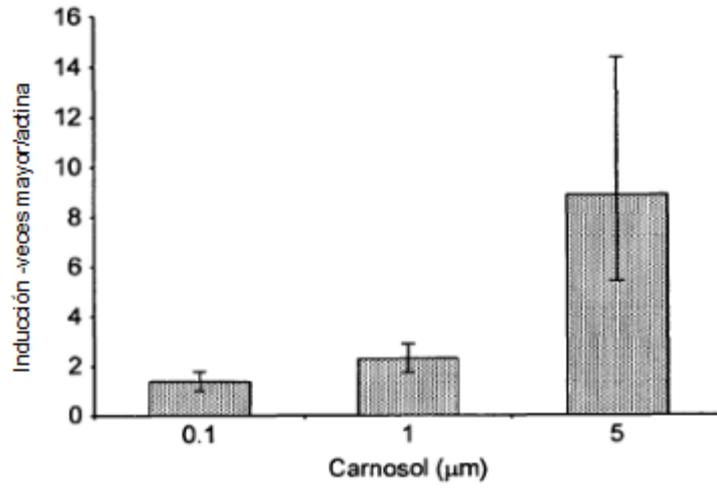


FIG. 8