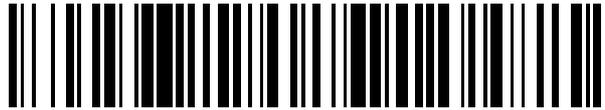


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 071**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7048** (2006.01)

**A61K 31/12** (2006.01)

**A61K 31/593** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2014 PCT/EP2014/071452**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2014 E 14781539 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3057597**

54 Título: **Fitonutrientes antiinflamatorios para su uso en el tratamiento o prevención de la sinovitis**

30 Prioridad:

**14.10.2013 US 201361890626 P**

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

**04.03.2020**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)  
Entre-deux-Villes  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**HORCAJADA, MARIE NOËLLE;  
MEMBREZ, FANNY y  
OFFORD CAVIN, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 746 071 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

Fitonutrientes antiinflamatorios para su uso en el tratamiento o prevención de la sinovitis

### 5 Antecedentes

La presente descripción generalmente se refiere a composiciones para el tratamiento o prevención de sinovitis. Más específicamente, la presente descripción se refiere a composiciones que comprenden uno o más fitonutrientes antiinflamatorios y además se refiere a métodos que comprenden administrar dichas composiciones.

10 Las articulaciones sinoviales se localizan donde los huesos articulados contactan entre sí. Las articulaciones sinoviales tienen una cavidad entre los huesos, y esta cavidad está revestida con una membrana conocida como membrana sinovial. La sinovitis es la inflamación de la membrana sinovial, y esta afección suele ser dolorosa, especialmente cuando se mueve la articulación. La articulación generalmente se hincha debido a la acumulación de líquido sinovial.

15 La osteoartritis (OA) se ha considerado durante mucho tiempo una enfermedad de "desgaste" que conduce a la pérdida de cartílago. Anteriormente, la OA se consideraba la única consecuencia de cualquier proceso que condujera a un aumento de la presión sobre una articulación particular o la fragilidad de la matriz del cartílago. Sin embargo, el descubrimiento de que muchos mediadores solubles, como las citoquinas o las prostaglandinas, pueden aumentar la producción de metaloproteinasas de la matriz por los condrocitos que conduce a los primeros pasos de una teoría "inflamatoria". Hasta la fecha, la sinovitis se acepta como una característica crítica de la OA, y algunos estudios ahora están abriendo el camino para considerar la sinovitis como un motor del proceso de OA.

20 Datos experimentales recientes han demostrado que el hueso subcondral puede tener un papel sustancial en el proceso de OA como amortiguador mecánico, así como una fuente de mediadores inflamatorios implicados en el proceso de dolor de OA y en la degradación de la capa profunda del cartílago. Por lo tanto, aunque inicialmente se consideraba que la OA estaba impulsada por el cartílago, esta es una enfermedad mucho más compleja, con mediadores inflamatorios liberados por el cartílago, los huesos y la sinovial. La inflamación de bajo grado inducida por el síndrome metabólico, la inmunidad innata y la inflamación son algunos de los argumentos más recientes a favor de la teoría inflamatoria de la OA.

25 Aunque hay un aumento de individuos que sufren de OA, todavía no hay cura. Las terapias médicas actuales siguen siendo solo paliativas, enfocadas en el alivio de síntomas como el dolor y la inflamación usando analgésicos (acetaminofeno) y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Además, los tratamientos con estos medicamentos a menudo se asocian con efectos secundarios como riesgos gastrointestinales o cardiovasculares y, como resultado, la investigación aún está en curso.

30 Se ha demostrado que la oleuropeína, rutina o la asociación de rutina/curcumina puede retrasar la progresión de las lesiones de cartílago y reducir la sinovitis en cobayas que desarrollan osteoartritis espontánea (Arthritis & Rheumatism, 65: S32; suplemento de resumen de la reunión anual 2013).

### Resumen

35 La solución ideal para la OA sería moléculas que modifiquen la progresión de la enfermedad en combinación con la eficacia y seguridad antiinflamatorias y analgésicas. En este contexto de falta de fármacos modificadores de la enfermedad OA (DMOAD), los tratamientos alternativos y la prevención de OA podrían provenir de la nutrición. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona soluciones nutricionales para disminuir la sinovitis y así limitar la progresión de la degradación del cartílago durante el envejecimiento.

40 Por consiguiente, en una realización general, la presente descripción proporciona una composición para usar en un método de tratamiento de sinovitis. El método incluye administrar a un individuo que tiene sinovitis una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, la composición comprende además vitamina D.

45 En una realización, la sinovitis está asociada con una afección seleccionada del grupo que consiste en lupus, gota, artritis y combinaciones de los mismos. La afección puede ser artritis que se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de osteocondritis, osteoartrosis y una combinación de las mismas.

50 De acuerdo con la invención, el fitonutriente comprende oleuropeína.

55 De acuerdo con la invención, la composición comprende además vitamina D. En una realización, la composición comprende además un compuesto bioactivo adicional seleccionado del grupo que consiste en quercetina, hidroxitirosol y combinaciones de los mismos.

60 En una realización, el fitonutriente se aísla de un extracto vegetal.

- 5 En otra realización de la invención, se proporciona una composición para usar en un método para prevenir la sinovitis. La composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína y vitamina D.
- 10 En una realización, el individuo se selecciona del grupo que consiste en un humano envejecido y un humano anciano.
- 15 En una realización, el fitonutriente se aísla de un extracto vegetal.
- 20 En una realización, la composición comprende además un compuesto bioactivo adicional seleccionado del grupo que consiste en quercetina, hidroxitirosol y combinaciones de los mismos.
- 25 En una realización, la composición se administra diariamente durante al menos un mes.
- 30 En otra realización, se proporciona una composición para tratar o prevenir la sinovitis. La composición incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, la composición además comprende vitamina D.
- 35 En una realización, la composición es una composición nutricional.
- 40 En una realización, la composición nutricional comprende un componente seleccionado del grupo que consiste en proteínas, carbohidratos, grasas y combinaciones de los mismos.
- 45 En otra realización, se proporciona una composición para tratar o prevenir la degradación del cartílago articular posterior a la sinovitis. La composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, comprende además vitamina D.
- 50 Una ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis.
- 55 Una ventaja adicional de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis usando nutrientes antiinflamatorios.
- 60 Otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis de manera más segura que los analgésicos y los AINE.
- 65 Aún otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis sin usar analgésicos o AINE.
- Una ventaja adicional de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis usando compuestos naturales y/o nutricionales.
- Otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis que está asociada con lupus, gota o artritis tal como artritis reumatoide u osteoartritis.
- Aún otra ventaja de la presente descripción es prevenir o tratar la sinovitis con efectos secundarios tolerables o sin efectos secundarios.
- Todavía otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis usando una composición nutricional a dosis fisiológicas.
- Una ventaja adicional de la presente descripción es limitar la progresión de la degradación del cartílago durante el envejecimiento.
- Otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la degradación del cartílago articular posterior a la sinovitis.
- Todavía otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis usando fitonutrientes antiinflamatorios que actúan sinérgicamente.
- Aún otra ventaja de la presente descripción es tratar o prevenir la sinovitis usando oleuropeína, mientras que también proporciona otros polifenoles, tales como flavonoides y minerales y vitaminas, a dosis fisiológicas.
- Se describen características y ventajas adicionales en este documento, y serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.
- Breve descripción de las figuras

- La Figura 1A muestra expresiones de ARNm de ADAMTS-5 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-.
- 5 La Figura 1B muestra expresiones de ARNm de ADAMTS-5 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).
- La FIG. 2A muestra expresiones de ARNm de COX-2 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-.
- 10 La Figura 2B muestra expresiones de ARNm de COX-2 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).
- 15 La Figura 3A muestra expresiones de ARNm de MMP-13 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-.
- La Figura 3B muestra expresiones de ARNm de MMP-13 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).
- 20 La Figura 4 muestra secciones histológicas de la rodilla de cobayas (tinción con hematoxilina, verde rápido y safranina-O).
- 25 Las Figura 4A y 4B muestran el Grupo A (oleuropeína); las Figuras 4C y 4D muestran el Grupo C (rutina); las Figuras 4E y 4F muestran el Grupo D (rutina y curcumina); y las Figuras 4G y 4H muestran el grupo B (Control).
- La Figura 5 muestra el puntaje total de OA en cada grupo. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en la dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- 30 La Figura 6A muestra la concentración de biomarcador inflamatorio PGE2 en plasma. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- 35 La Figura 6B muestra la correlación entre los niveles de PGE2 en plasma en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA correspondiente en el grupo de control.
- La Figura 7 muestra la concentración de biomarcador Coll2-1NO2 en plasma unido a la degradación de colágeno 2 con el tiempo. B = control de grupo; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- 40 La Figura 8A muestra la concentración del biomarcador Coll2-1NO2 en plasma vinculado a la degradación del colágeno 2. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- 45 La Figura 8B muestra la correlación entre la concentración del biomarcador Coll2-1NO2 en plasma en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA correspondiente en el grupo de control.
- 50 La Figura 9 muestra la concentración de biomarcador de fibulina 3-1 en plasma unido a la acción hipertrófica de los condrocitos en pacientes con OA. B = grupo control; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- La Figura 10A muestra la concentración de biomarcador de fibulina 3-1 en plasma unido a la acción hipertrófica de los condrocitos en pacientes con OA. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en la dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta).
- 55 La Figura 10B muestra la correlación entre la concentración de biomarcador de fibulina 3-1 en plasma en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA correspondiente en el grupo control.
- 60 La Figura 11A muestra la puntuación sinovial total en cada grupo. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en la dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta)
- 65 La Figura 11B muestra la correlación entre la puntuación sinovial total en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA

correspondiente en el grupo control.

5 La Figura 12A muestra hiperplasia de células del revestimiento sinovial en cada grupo. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en la dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta)

La Figura 12B muestra la correlación entre la hiperplasia de células del revestimiento sinovial en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA correspondiente en el grupo control.

10 La Figura 13A muestra el grado de infiltración celular sinovial por linfocitos perivasculares y células mononucleares en cada grupo. Grupo control en la semana 4 = línea de base; grupo control en la semana 35; A = grupo oleuropeína (0,025% en dieta); C = grupo rutina (0,5% en la dieta); D: rutina (0,5% en dieta) + curcumina (0,25% en dieta)

15 La Figura 13B muestra la correlación entre la infiltración celular sinovial en las semanas 4 y 35 y la puntuación de OA correspondiente en el grupo control.

20 La Figura 14 muestra la síntesis de colágeno por osteoblastos después de 9 días de cultivo, medida por microgramos de colágeno producido por miligramo de proteína total en respuesta a la estimulación con una combinación de 1,25(OH)2D3 OLP y HTy.

La Figura 15 muestra la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) después de 9 días de cultivo, indicada por ALP micromolar por miligramo de proteína por hora en respuesta a una combinación de 1,25(OH)2D3, OLP y HTy.

25 La Figura 16 muestra la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de 1,25(OH)2D3 después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

La Figura 17A muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de oleuropeína después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

30 La Figura 17B muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de 1,25(OH)2D3 y oleuropeína después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

La Figura 18A muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de hidroxitirosol después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

35 La Figura 18B muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de 1,25(OH)2D3 e hidroxitirosol después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

40 La Figura 19A muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de oleuropeína e hidroxitirosol después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

La Figura 19B muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de 1,25(OH)2D3, oleuropeína e hidroxitirosol después de 5, 9, 12 o 15 días de tratamiento.

45 La Figura 20 muestra la estructura química de la oleuropeína.

La Figura 21 muestra la estructura química de la rutina.

La Figura 22 muestra la estructura química de la curcumina.

50 Descripción detallada

55 Todos los porcentajes expresados aquí son en peso del peso total de la composición a menos que se expresen de otra manera. Cuando se hace referencia al pH, los valores corresponden al pH medido a 25 °C con equipo estándar. Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que "aproximadamente" se refiere a números en un rango de números. Además, todos los rangos numéricos en este documento deben entenderse que incluyen todos los enteros, enteros o fracciones, dentro del rango. La composición descrita en el presente documento puede carecer de cualquier elemento que no se describa específicamente en el presente documento. Por lo tanto, la descripción de una realización que utiliza el término "que comprende" incluye una descripción de una realización "que consiste principalmente de" y una realización "que consiste de" los componentes referenciados. Cualquier realización descrita en el presente documento puede combinarse con cualquier otra realización descrita en el presente documento.

65 La "prevención" incluye la reducción del riesgo y/o la gravedad de la sinovitis. Los términos "tratamiento", "tratar" y "aliviar" incluyen tanto el tratamiento profiláctico o preventivo (que previene y/o retrasa el desarrollo de una afección

o trastorno patológico específico) como el tratamiento curativo, terapéutico o modificador de la enfermedad, incluidas las medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado; y el tratamiento de pacientes con riesgo de contraer una enfermedad o de quienes se sospecha que han contraído una enfermedad, así como de pacientes que están enfermos o que han sido diagnosticados con una enfermedad o condición médica. El término no implica necesariamente que un sujeto sea tratado hasta la recuperación total. Los términos "tratamiento" y "tratar" también se refieren al mantenimiento y/o promoción de la salud en un individuo que no padece una enfermedad pero que puede ser susceptible al desarrollo de una condición no saludable. Los términos "tratamiento", "tratar" y "aliviar" también pretenden incluir la potenciación o mejora de otra manera de una o más medidas profilácticas o terapéuticas primarias. Los términos "tratamiento", "tratar" y "aliviar" pretenden además incluir el manejo dietético de una enfermedad o afección o el manejo dietético para la profilaxis o prevención de una enfermedad o afección. Un tratamiento puede estar relacionado con el paciente o el médico.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad que previene una deficiencia, trata una enfermedad o afección médica en un individuo o más generalmente, reduce los síntomas, maneja la progresión de las enfermedades o proporciona un efecto nutricional, fisiológico, o beneficio médico para el individuo. La cantidad terapéuticamente efectiva que se requiere para lograr un efecto terapéutico variará, por supuesto, con la composición particular, la vía de administración, la edad y la condición del receptor, y el trastorno o enfermedad particular que se está tratando.

Un animal "maduro" ha excedido el 50% de la vida media de su especie particular y/o se reproduce dentro de una especie. Un animal se considera "anciano" si ha superado los dos primeros tercios del promedio de vida esperado en su país de origen, preferiblemente si ha superado los primeros tres cuartos del promedio de vida esperado en su país de origen, más preferiblemente si ha superado los primeros cuatro quintos del promedio de vida esperado en su país de origen. Un "humano anciano" significa una persona con una edad cronológica de 65 años o más.

"Animal" incluye, pero no se limita a, mamíferos, que incluye, pero no se limita a, roedores, mamíferos acuáticos, animales domésticos como perros y gatos, animales de granja como ovejas, cerdos, vacas y caballos, y humanos. Cuando se usa "animal", "mamífero" o una pluralidad de los mismos, estos términos también se aplican a cualquier animal que sea capaz del efecto exhibido o destinado a ser exhibido por el contexto del pasaje. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "paciente" incluye un animal, especialmente un mamífero, y más especialmente un ser humano que está recibiendo o pretende recibir tratamiento, como se define el tratamiento en este documento. Si bien los términos "individuo" y "paciente" se usan a menudo en el presente documento para referirse a un humano, la presente descripción no es tan limitada. En consecuencia, los términos "individuo" y "paciente" se refieren a cualquier animal, mamífero o humano, que tenga o esté en riesgo de una afección médica que pueda beneficiarse del tratamiento.

Se entiende que "producto alimenticio" y "composición alimenticia", como se usa en el presente documento, incluyen cualquier número de ingredientes adicionales opcionales, que incluyen aditivos alimentarios convencionales, por ejemplo una o más proteínas, carbohidratos, grasas, acidulantes, espesantes, tampones o agentes para el ajuste del pH, agentes quelantes, colorantes, emulsionantes, excipientes, agentes aromatizantes, minerales, agentes osmóticos, un vehículo farmacéuticamente aceptable, conservantes, estabilizadores, azúcares, edulcorantes, texturizantes y/o vitaminas. Los ingredientes opcionales se pueden agregar en cualquier cantidad adecuada.

Un "kit" significa que los componentes del kit están físicamente asociados en uno o más contenedores y se consideran una unidad para su fabricación, distribución, venta o uso. Los contenedores incluyen, pero no se limitan a bolsas, cajas, cartones, botellas, paquetes de cualquier tipo o diseño o material, sobreenvoltura, envoltura retráctil, componentes fijados (por ejemplo, grapados, adheridos o similares), o combinaciones de los mismos.

Los "fitonutrientes" son compuestos no nutritivos que se encuentran en muchos alimentos. El término "fitonutriente" se refiere a cualquier compuesto producido por una planta que imparte uno o más beneficios para la salud del usuario.

Sin desear estar atados a la teoría, los inventores creen que los mediadores inflamatorios desempeñan un papel fundamental en el inicio y la perpetuación del proceso de OA. La fuente de tales mediadores sería local de las células articulares y sistémica de otros tejidos como el tejido adiposo liberado en el flujo sanguíneo y alcanzando después la articulación a través de la vasculatura ósea subcondral. Estos mediadores tienen un efecto nocivo sobre el cartílago, los huesos y la sinovial. Como ejemplo, la inflamación de las articulaciones es una característica clínica de la OA atribuida a la inflamación y que refleja la presencia de sinovitis debido al engrosamiento de la membrana sinovial o al derrame.

En este contexto, los inventores evaluaron la eficacia de los nutrientes antioxidantes y antiinflamatorios sobre la sinovitis y la integridad del cartílago en un modelo animal maduro para OA (cobaya). La curcumina, la rutina y la oleuropeína (y los metabolitos posteriores) tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Los inventores evaluaron el efecto de estos compuestos sobre la sinovitis y la posterior degradación del cartílago. La curcumina, la rutina y la oleuropeína mejoran significativamente la salud de las articulaciones al disminuir la degradación del

cartílago y la puntuación histológica de OA, y el grupo administrado con oleuropeína mostró una disminución significativa de la modificación sinovial (puntuación sinovial, hiperplasia de células de revestimiento e infiltración celular). Además, la oleuropeína redujo significativamente los niveles de PGE2 que se encuentran en el suero, y en paralelo los niveles de Coll2-1NO2, un biomarcador relacionado con el estrés oxidativo en el cartílago. Estos datos sugieren que la oleuropeína pudo disminuir la sinovitis (inflamación de la sinovial) a través de una vía antiinflamatoria (PGE2). En conclusión, la oleuropeína y la rutina ralentizan significativamente la progresión de las lesiones de OA en cobayas que desarrollan OA espontáneamente. Además, la oleuropeína disminuyó significativamente los niveles séricos de PGE2 y COLL2-1NO2 y redujo la sinovitis, lo que indica las potentes propiedades antiinflamatorias de la oleuropeína. Además, el efecto sinérgico de la curcumina (con rutina) se ha demostrado a través de los niveles séricos de fibulina-3.1 (marcador de hipertrofia de condrocitos).

Por consiguiente, la composición proporcionada por la presente descripción comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un fitonutriente antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, rutina, curcumina y una combinación de las mismas. En una realización preferida, la composición comprende al menos oleuropeína. Las estructuras químicas de oleuropeína, rutina y curcumina se muestran en las Figs. 20-22, respectivamente.

En una realización, la sinovitis se trata o previene administrando a un individuo que lo necesita la composición que comprende un fitonutriente antiinflamatorio seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, rutina, curcumina y una combinación de las mismas. Por ejemplo, la composición que comprende al menos uno de oleuropeína, rutina o curcumina se puede administrar a un individuo que tiene sinovitis para tratar la sinovitis. La sinovitis puede estar asociada con lupus, gota o artritis, como artritis reumatoide u osteoartritis. En una realización, la composición se administra al menos una vez al día, durante un período de tiempo de al menos 1 mes, preferiblemente al menos 2 meses, y más preferiblemente al menos 3 meses.

En una realización, la sinovitis se trata o previene administrando a un individuo maduro o anciano, tal como un humano anciano, la composición que comprende al menos una de oleuropeína, rutina o curcumina. Sin embargo, la presente descripción no se limita a una edad específica del receptor de la administración, y la composición puede administrarse a un individuo de cualquier edad.

La composición puede comprender un polifenol adicional, tal como hidroxitirosol (un metabolito de oleuropeína) y/o quercetina (un metabolito de rutina). La composición puede comprender una cantidad de cada una de oleuropeína, rutina, hidroxitirosol, curcumina y quercetina de 0,01 mg a aproximadamente 1 g, preferiblemente de 0,1 mg a 1 g, incluso más preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 1 g de cada componente por porción de la composición.

La oleuropeína, hidroxitirosol, rutina, curcumina y/o quercetina pueden ser de cualquier fuente adecuada y pueden aislarse y/o sintetizarse químicamente. En una realización preferida, se obtienen oleuropeína, hidroxitirosol, rutina, curcumina y/o quercetina de fuentes vegetales. Por ejemplo, la oleuropeína y el hidroxitirosol se pueden obtener de las plantas de olivo, la rutina se puede obtener de las cebollas y la curcumina se puede obtener de las plantas de cúrcuma de la familia del jengibre.

La composición también puede comprender uno o más compuestos bioactivos adicionales, tales como uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en antioxidantes, compuestos antiinflamatorios, glicosaminoglicanos, prebióticos, fibras, probióticos, ácidos grasos, minerales, oligoelementos y vitaminas. Un "compuesto bioactivo" es cualquier compuesto que contribuye a la salud de un individuo o tiene un efecto en el cuerpo humano, más allá de satisfacer las necesidades nutricionales básicas. El uno o más compuestos bioactivos adicionales pueden ser de una fuente natural. Por lo tanto, los compuestos pueden provenir de extractos de plantas, animales, peces, hongos, algas o fermentación microbiana. Se considera que los minerales provienen de una fuente natural.

En una realización, la composición incluye uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales. En una realización, el método para tratar o prevenir la sinovitis incluye administrar uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales secuencial o simultáneamente en relación con la composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de oleuropeína, rutina o curcumina. Por ejemplo, el uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales se pueden proporcionar en la misma composición que la composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de oleuropeína, rutina o curcumina. Alternativamente, el uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales se pueden proporcionar por separado de la cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de oleuropeína, rutina o curcumina, por ejemplo en un kit o una serie de productos que interactúan. Si la composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos uno de oleuropeína, rutina o curcumina y el uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales se presentan en composiciones separadas, estas composiciones pueden mezclarse antes de la administración o pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente.

El uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales puede ser cualquier compuesto con un efecto antiinflamatorio. Un ejemplo no limitante de compuestos antiinflamatorios adicionales adecuados son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, que pueden extraerse, por ejemplo, del pescado. Otro ejemplo no limitativo de

- 5 compuestos antiinflamatorios adicionales adecuados es un extracto de plantas que comprende flavonoides, polifenoles, proantocianinas y/o lípidos tales como ácidos grasos insaponificables de aguacate y soja y ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Los extractos de plantas pueden ser de una o más plantas seleccionadas del grupo que consiste en garra del diablo (*Harpagophytum procumbens*), *Rosmarinus officinalis*, hisopo, jengibre (*Zingiber officinale*), cúrcuma (*Curcuma longa*), *Arnica Montana*, corteza de sauce, granada (*Punica granatum*), té verde (*Camellia sinensis*), uña de gato (*Uncaria tometosa* y *Uncaria guianensis*), olibaum indio (*Boswellia serrata*) y bromelina de piña (*Ananas comosus*), semilla negra (*Nigella sativa*), hierba de San Juan, hiperforina, sello de oro, manzanilla alemana (*Matricaria recutita*) y combinaciones de las mismas.
- 10 En una realización, la composición incluye uno o más antioxidantes adicionales. En una realización, la composición incluye un compuesto adicional que puede caracterizarse como un compuesto antiinflamatorio y antioxidante. Ejemplos no limitantes de antioxidantes adecuados son astaxantina, carotenoides, coenzima Q10 (CoQ10), flavonoides, glutatión, bayas de goji, hesperidina, leche con bayas de goji, lignano, luteína, licopeno, polifenoles, selenio, vitamina A, vitamina C, vitamina E, y zeaxantina. En realizaciones preferidas, el antioxidante es de una
- 15 fuente natural, como por ejemplo un extracto de planta.
- En una realización, la composición incluye un glicosaminoglicano. Los glicosaminoglicanos son moléculas grandes y muy cargadas que están presentes en el cartílago sano. Ejemplos de glicosaminoglicanos son glucosamina y sulfato de condroitina. Por lo tanto, una realización de la composición comprende al menos uno de glucosamina o sulfato de
- 20 condroitina.
- En algunas realizaciones, la composición incluye uno o más prebióticos. Entre los ejemplos no limitantes de prebióticos adecuados se incluyen goma de acacia, alfa glucano, arabinogalactanos, beta glucano, dextranos, fructooligosacáridos, fucosilactosa, galactooligosacáridos, galactomananos, gentiooligosacáridos,
- 25 glucooligosacáridos, goma guar, inulina, isomaltoligosacáridos, lactoneotetraosa, lactosucrosa, lactulosa, levano, maltodextrinas, oligosacáridos de la leche, goma guar parcialmente hidrolizada, oligosacáridos pécticos, almidones resistentes, almidón retrogradado, sialooligosacáridos, sialilactosa, oligosacáridos de soja, alcoholes de azúcar, xilooligosacáridos, sus hidrolizados, o combinaciones de los mismos.
- 30 La composición puede incluir fibra. La fibra puede ser fibra soluble, fibra insoluble o una combinación de las mismas. Ejemplos no limitante de fibras solubles incluyen fructooligosacáridos, goma de acacia, inulina, agar-agar, un alginato, algarroba, carragenano, goma arábica, goma guar, goma karaya, pectina o goma xantana, y similares, y estas fibras solubles pueden estar en forma hidrolizada o no hidrolizada. Un ejemplo no limitante de una fibra insoluble es la fibra externa de guisante.
- 35 La composición puede incluir uno o más probióticos. Los ejemplos no limitantes de los probióticos adecuados incluyen *Aerococcus*, *Aspergillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Candida*, *Clostridium*, *Debaromyces*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Micrococcus*, *Mucor*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Penicillium*, *Peptostreptococcus*, *Pichia*, *Propionibacterium*, *Pseudocatenulatum*, *Rhizopus*,
- 40 *Saccharomyces*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Torulopsis*, *Weissella*, microorganismos no replicantes y combinaciones de los mismos.
- En algunas realizaciones, la composición incluye minerales y oligoelementos. Ejemplos no limitantes de minerales y oligoelementos adecuados incluyen calcio, magnesio, sodio, potasio, fósforo, cobre, zinc, hierro, selenio, cromo y molibdeno, y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la composición incluye calcio y/o magnesio. El calcio puede ser uno o más de, por ejemplo, compuestos orgánicos y/o inorgánicos fisiológicamente aceptables, como sales inorgánicas de calcio (cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de calcio y/o carbonato de calcio), sales orgánicas de calcio (citrato de calcio, maleato de calcio o mezclas de los mismos) y/o
- 45 componentes orgánicos que comprenden calcio, tales como leche desnatada en polvo o caseinato de calcio. El magnesio puede ser uno o más de, por ejemplo, compuestos orgánicos y/o inorgánicos fisiológicamente aceptables, como sales inorgánicas de magnesio (como cloruro de magnesio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio y/o carbonato de magnesio), sales orgánicas de magnesio (tales como citrato de magnesio, maleato de magnesio o mezclas de los mismos) y/o componentes orgánicos que comprenden
- 50 magnesio.
- 55 La composición puede incluir vitaminas, tales como, por ejemplo, una o más vitaminas seleccionadas de vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina C, ácido fólico, tiamina, riboflavina, vitamina B6, vitamina B12, niacina, biotina y ácido pantoténico. La vitamina D puede potenciar el efecto de los polifenoles como la oleuropeína y/o el hidroxitirosol al aumentar el efecto y/o provocar el efecto antes de tiempo que en ausencia de vitamina D. La
- 60 vitamina D puede estar presente en cualquier forma adecuada y preferiblemente en una cantidad de 800-1200 UI por porción de la composición. Ejemplos no limitantes de formas adecuadas de vitamina D incluyen colecalciferol (D3); ergocalciferol (D2); y sus metabolitos y precursores biológicamente activos, tales como 1-alfa-hidroxi vitamina D; 25-hidroxi vitamina D; 1,25-dihidroxi vitamina D; y similares.
- 65 La composición puede administrarse por cualquier medio adecuado para la administración humana, y en particular para la administración en cualquier parte del tracto gastrointestinal. La presente descripción cubre la administración

enteral, la administración oral y la administración a través de un tubo o catéter. La composición también puede administrarse por medios seleccionados de la administración oral, rectal, sublingual, sublabial, bucal, tópica y similares.

5 La composición puede administrarse en cualquier forma conocida que incluye, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, líquidos, masticables, geles suaves, bolsitas, polvos, jarabes, suspensiones líquidas, emulsiones y soluciones en formas de dosificación convenientes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos se disuelven o suspenden preferiblemente en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, aceite de parafina o polietilenglicoles líquidos. Opcionalmente, se pueden agregar estabilizadores. Si la composición se administra por alimentación por sonda, las composiciones nutricionales pueden usarse para alimentación por sonda a corto o largo plazo.

10 La composición puede ser una composición nutricional o una composición farmacéutica y puede ser para uso humano o veterinario. Una "composición nutricional" es cualquier composición que es una fuente de nutrición para un individuo. La composición nutricional puede ser una fuente de nutrición completa o puede ser una fuente de nutrición incompleta. Como se usa en el presente documento, "nutrición completa" incluye productos y composiciones nutricionales que contienen tipos y niveles suficientes de macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) y micronutrientes para ser suficientes para ser una fuente única de nutrición para el animal al que se administra la composición. Los pacientes pueden recibir el 100% de sus requerimientos nutricionales de tales composiciones nutricionales completas. Como se usa en el presente documento, "nutrición incompleta" incluye productos o composiciones nutricionales que no contienen niveles suficientes de macronutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos) o micronutrientes para que sean suficientes como fuente única de nutrición para el animal al que se administra la composición. Las composiciones nutricionales parciales o incompletas pueden usarse como un suplemento nutricional.

25 Las composiciones nutricionales proporcionadas por la presente descripción pueden ser un alimento médico. Un alimento médico es una clase especial de composición nutricional diseñada para proporcionar un control dietético de ciertas afecciones.

30 En una realización, la composición nutricional incluye una fuente de proteína. La fuente de proteína puede ser proteína dietética que incluye, pero no se limita a, proteína animal (como proteína de leche, proteína de carne o proteína de huevo), proteína vegetal (como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante), o combinaciones de las mismas. En una realización, la proteína se selecciona del grupo que consiste en suero, pollo, maíz, caseinato, trigo, lino, soja, algarroba, guisante y combinaciones de los mismos.

35 En una realización, la composición nutricional incluye una fuente de carbohidrato. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado en la composición que incluye, pero no se limita a, almidón, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrina, almidón modificado, almidón de amilosa, almidón de tapioca, almidón de maíz, xilitol, sorbitol o combinaciones de los mismos.

40 En una realización, la composición nutricional incluye una fuente de grasa. La fuente de grasa puede incluir cualquier grasa o mezcla de grasa adecuada. Por ejemplo, la fuente de grasa puede incluir, pero no se limita a, grasa vegetal (como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, girasol alto en oleico, aceite de colza, aceite de canola, aceite de avellana, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de semilla de grosella negra, aceite de borraja, lecitinas y similares), grasas animales (como la grasa de la leche) o combinaciones de los mismos. La fuente de grasa también puede ser versiones menos refinadas de las grasas enumeradas anteriormente (por ejemplo, aceite de oliva por el contenido de polifenoles).

50 La composición nutricional también puede comprender sabores naturales o artificiales, por ejemplo sabores de frutas como plátano, naranja, melocotón, piña o frambuesa u otros sabores de plantas como vainilla, cacao, café y similares.

55 Las composiciones nutricionales pueden incluir, además de los principales componentes bioactivos, cualquier otro componente bioactivo, y opcionalmente uno o más de una fuente de proteínas, carbohidratos y grasas, cualquier número de ingredientes alimentarios adicionales opcionales, incluidos aditivos alimentarios convencionales (sintéticos o naturales), por ejemplo, uno o más acidulantes, espesantes, tampones o agentes adicionales para el ajuste del pH, agentes quelantes, colorantes, emulsionantes, excipientes, agentes aromatizantes, minerales, agentes osmóticos, un vehículo farmacéuticamente aceptable, conservantes, estabilizadores, azúcar, edulcorantes, texturizantes y/o vitaminas. Los ingredientes opcionales se pueden agregar en cualquier cantidad adecuada.

60 La composición nutricional se puede proporcionar en cualquier forma adecuada. Los ejemplos no limitantes de formas de composición nutricional en las que se puede proporcionar la composición para usar de acuerdo con la invención incluyen soluciones, composiciones listas para el consumo (por ejemplo, composiciones listas para tomar o bebidas instantáneas), comestibles líquidos, refrescos, zumos, bebidas deportivas, bebidas lácteas, batidos de leche, bebidas de yogur, sopas y similares. En otras realizaciones, las composiciones nutricionales pueden proporcionarse en forma de un concentrado, un polvo o gránulos (por ejemplo, gránulos efervescentes), que se diluyen con agua u otro líquido, como leche o zumo de fruta, para obtener el preparado listo para tomar. Otras

formas de composición nutricional incluyen productos horneados, productos lácteos, postres, productos de confitería, barras de cereales y cereales para el desayuno. Ejemplos no limitativos de productos lácteos incluyen leche y bebidas lácteas, yogures y otros productos lácteos preparados, helados y quesos. Ejemplos no limitantes de productos horneados incluyen pan, galletas y pasteles.

5 En una realización, la composición nutricional puede proporcionarse en una forma diseñada como alimento para animales, en particular para un perro o un gato, en forma húmeda, en forma semihúmeda o en forma seca, en particular en forma de galletas.

10 En una realización, la composición es una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica es una composición, que no es una composición nutricional, utilizada sobre o en el cuerpo para prevenir, diagnosticar, aliviar, tratar o curar una enfermedad en humanos o animales. La composición farmacéutica puede ser utilizada por un ser humano o, alternativamente, puede ser una composición veterinaria, por ejemplo adecuada para un perro, un gato o un caballo, en particular un caballo purasangre.

15 La composición farmacéutica puede ser adecuada para administración oral, parenteral o intravenosa. Cuando la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéutica o fisiológicamente aceptable, el excipiente es preferiblemente apropiado para la administración de la composición por vía oral o adecuado para la administración de la composición por vía parenteral. La composición farmacéutica puede tener una forma sólida o líquida. Para la administración oral, se prefiere una composición farmacéutica sólida en forma de comprimidos, cápsulas o cápsulas de gelatina. En forma líquida, la composición farmacéutica puede ser una suspensión acuosa o no acuosa, o también una emulsión de agua en aceite o aceite en agua.

20 Las formas farmacéuticas sólidas pueden comprender como vehículos, adyuvantes o excipientes uno o más de un diluyente, un aroma, un agente solubilizante, un lubricante, un agente de suspensión, un aglutinante, un agente desintegrante o un agente encapsulante. Ejemplos no limitantes de tales compuestos incluyen carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, materiales celulósicos, manteca de cacao y similares. Las composiciones farmacéuticas en forma líquida pueden comprender agua, opcionalmente como una mezcla con propilenglicol o polietilenglicol, y también pueden comprender uno o más agentes colorantes, sabores, estabilizantes y agentes espesantes.

25 En una realización, la presente descripción proporciona un método para fabricar una composición nutricional para tratar o prevenir la sinovitis, y el método comprende mezclar oleuropeína y/o hidroxitirosol con uno o más ingredientes para formar la composición nutricional. El uno o más ingredientes adicionales pueden comprender curcumina y/o quercetina.

### Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos presentan datos científicos que desarrollan y apoyan el concepto de tratamiento o prevención de sinovitis usando un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, rutina, curcumina y combinaciones de los mismos.

#### Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

45 Se realizó un estudio in vitro de condrocitos primarios bovinos en perlas de alginato. Se adquirió oleuropeína sustancialmente purificada (> 98%) de Extrasynthese (Genay, Francia). Se adquirió hidroxitirosol sustancialmente purificado (> 98%) de Extrasynthese (Genay, Francia). Se adquirió quercetina sustancialmente purificada (> 97%) de HWI Analytik GmbH (Ruelzheim, Alemania). La curcumina sustancialmente purificada (> 94%) se adquirió de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza).

50 El pie de una vaca joven se lavó para eliminar la tierra. La piel fue removida de la pata. La articulación se abrió transversalmente. Se cortaron los ligamentos intraarticulares. La articulación abierta se lavó con solución salina tamponada con fosfato. Con una cuchilla de bisturí, se cortaron rebanadas de cartílago de grosor completo y se recogieron en DMEM con alto contenido de glucosa con Hepes 10 mM y penicilina-estreptomicina al 1%. Se lavaron rodajas de cartílago en DMEM con alto contenido de glucosa con Hepes 10 mM y penicilina-estreptomicina al 1%.

55 El cartílago se digirió sucesivamente por 0,5 mg/ml de hialuronidasa durante 30 minutos, 1,0 mg/ml de Pronasa E durante 60 minutos y 1,0 mg/ml de colagenasa durante la noche bajo agitación lenta. Después de la incubación enzimática, la suspensión celular se filtró a través de un filtro celular de 70  $\mu$ m para separar el grupo celular y eliminar los restos de tejido. La suspensión celular se centrifugó para sedimentar las células. Los medios se descartaron y el sedimento celular se lavó por centrifugación y se volvió a suspender en una solución de cloruro de sodio al 0,9% que contenía HEPES 10 mM.

60 Se suspendieron las células en una solución de NaCl al 0,9%, HEPES 10 mM que contenía alginato al 1,2% para obtener una densidad de  $4,3 \times 10^6$  células por ml. La suspensión se pasó a través de una aguja gota a gota en una solución de  $\text{CaCl}_2$   $10^2$  mM. Después de 10 minutos, las perlas se polimerizaron y se lavaron con NaCl al 0,9%,

HEPES 10 mM. Se depositaron 10 perlas en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos con 1 ml de medio completo (DMEM alta glucosa con L-glutamina 2 mM, ácido ascórbico 0,5 mg/ml, L-prolina 0,2 mg/ml y suero fetal bovino al 10%) . Las células se mantuvieron en el medio durante 2 días y luego tratamientos de 1,5 µM de oleuropeína, 1,5 µM de hidroxitirosol, 1,5 µM de quercetina, 1,5 µM de curcumina, 1,5 µM de oleuropeína + 1,5 µM de quercetina, 1,5 µM de oleuropeína + 1,5 µM de curcumina, 1,5 µM de hidroxitirosol + 1,5 µM de quercetina, 1,5 µM de hidroxitirosol + 1,5 µM de curcumina, 1,5 µM de quercetina + 1,5 µM de curcumina, 1,5 µM de oleuropeína + 1,5 µM de quercetina + 1,5 µM de curcumina, 1,5 µM de hidroxitirosol + 1,5 µM de quercetina + 1,5 µM de curcumina en presencia o en ausencia de interleuquina-1 alfa (10 ng/ml). Los tratamientos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración final de DMSO fue del 0,1%. Las células fueron expuestas a tratamientos durante 3 días.

Al final de los tratamientos, las perlas se lavaron y se volvieron a suspender en citrato de sodio 0,1 M + solución de cloruro de sodio 0,15 M. La suspensión se centrifugó y las células que contenían el sedimento se recogieron para extracción de ARN total.

El ARN total se aisló de un grupo de 40 perlas y se aisló usando el kit RNeasy de Qiagen. El ADNc se obtuvo por transcripción inversa de ARN con el kit de síntesis Primescript 1st strand cDNA de Takara. La expresión de ARNm de ADAMTS-5, COX-2, MMP-13 y GAPDH se cuantificó en PCR en tiempo real (SYBR Green). Los cebadores (de Bos Taurus) se enumeran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Cebadores

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
GAPDH	AAG GGC ATT CTA GGC TAC ACT GA (Id. de Sec.Nº 1)	AGA GTG AGT GTC GCT GTT GAA GTC (Id. de Sec.Nº 2)
ADAMTS-5	CAC CTC AGC CAC CAT CAC AG (Id. de Sec.Nº 3)	AGT ACT CTG GCC CGA AGG TC (Id. de Sec.Nº 4)
COX-2	CCA CCC CAT GGT TCT TTC C (Id. de Sec.Nº 5)	CCA CCC CAT GGT TCT TTC C (Id. de Sec.Nº 6)
MMP-13	GCA GAG AGC TAC CTG AAA TCA TAC TAC T (Id. de Sec.Nº 7)	AAT CAC AGA GCT TGC TGC AGT TT (Id. de Sec.Nº 5)

En condiciones de enfermedad, las adiciones de OLP, HTY, QRC o CUR pueden contrarrestar los condrocitos estimulados con IL-1 alfa y disminuir la expresión de MMP-13. Las combinaciones de tres de OLP, HTY, QRC o CUR tienen un efecto sinérgico.

Los resultados fueron los siguientes. Las figs. 1-3 muestran la expresión de ARNm de ADAMTS-5, COX-2 y MMP-13 normalizada por la expresión de ARNm de GAPDH después de 3 días de cultivo. Los datos se expresaron como el cambio en el número de veces sobre la expresión génica en comparación con el control negativo (células cultivadas en medio completo). Los resultados se calcularon de acuerdo con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

CTL-: control negativo

OLP: oleuropeína

HTY: hidroxitirosol

QRC: quercetina

CUR: curcumina

IL1a: interleuquina-1 alfa 10 ng/ml

Los datos se expresaron como mediana ± media de la DE (2 experimentos de 3 réplicas cada uno). Las estadísticas se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann Whitney (2 colas) \*p <0.05; \*\*<0.01; \*\*\*p <0.001 vs control negativo (CTL-) o interleuquina-1 alfa (IL1a).

La FIG. 1A muestra expresiones de ARNm de ADAMTS-5 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-. La Fig. 1B muestra expresiones de ARNm de ADAMTS-5 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).

En condiciones normales, las adiciones de OLP, HTY, QRC o CUR disminuyen la expresión de ADAMTS-5 (marcador de destrucción del cartílago). Las combinaciones de estos diferentes polifenoles tienen un efecto sinérgico.

En condiciones de enfermedad, las adiciones de OLP, HTY, QRC o CUR pueden contrarrestar los condrocitos estimulados con IL-1 alfa y disminuir la expresión de ADAMTS-5. Las combinaciones de estos diferentes polifenoles tienen un efecto sinérgico.

La FIG. 2A muestra expresiones de ARNm de COX-2 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-.

La FIG. 2B muestra expresiones de ARNm de COX-2 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).

En condiciones normales, la adición de QRC puede reducir la expresión de COX-2 (marcador de estado inflamatorio). Las combinaciones de dos o tres de OLP, HTY, QRC o CUR tienen un efecto sinérgico. En condiciones de enfermedad, las adiciones QRC o CUR pueden contrarrestar las células estimuladas con IL-1 alfa y disminuir la expresión de COX-2. Las combinaciones de dos o tres de OLP, HTY, QRC o CUR tienen un efecto sinérgico.

La FIG. 3A muestra expresiones de ARNm de MMP-13 en relación con GAPDH en ausencia de IL1a que imita un estado normal de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con CTL-.

La FIG. 3B muestra expresiones de ARNm de MMP-13 en relación con GAPDH en presencia de IL1a que imita un estado de enfermedad de las células. Las condiciones se compararon estadísticamente con IL1a excepto IL1a que se comparó con CTL- (validación del experimento).

En condiciones normales, las adiciones de OLP, HTY, QRC o CUR solas o en combinación disminuyen la expresión de MMP-13 (implicado en la descomposición de la matriz extracelular, vinculada al recambio del cartílago articular en la OA).

#### Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

Se realizó un estudio in vivo del desarrollo espontáneo de la osteoartritis en cobayas Dunkin-Hartley. Se obtuvieron 65 cobayas Dunkin-Hartley macho de 3 semanas de edad de Charles River Laboratories (París). Se alojaron 5 animales por jaula en jaulas de fondo sólido y alimentados con dieta estándar de cobaya y agua a voluntad. Todos los animales se les dejó una semana para aclimatarse a las condiciones de alojamiento antes de la administración de fitonutrientes. Se agregaron tuberías de PVC a las jaulas para mejorar las condiciones de la jaula y minimizar el estrés.

Después de una semana, las 65 cobayas Dunkin-Hartley machos de 4 semanas de edad se aleatorizaron en 3 grupos tratados, recibiendo una dieta que contenía 0,025% de oleuropeína, o 0,5% de rutina o 0,5% de rutina con 0,25% de curcumina durante 31 semanas y un grupo de control que recibió una dieta de comida estándar. Se adquirió oleuropeína sustancialmente purificada (> 90%) de Extrasynthese (Genay, Francia). Se adquirió rutina sustancialmente purificada (> 94%) de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza). Se adquirió curcumina sustancialmente purificada (> 70%) de Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza).

El grupo A (n = 15) recibió una dosis diaria de oleuropeína durante 31 semanas.

El grupo B (n = 15) recibió una dieta estándar durante 31 semanas (control).

El grupo C (n = 15) recibió una dosis diaria de rutina durante 31 semanas.

El grupo D (n = 15) recibió una dosis diaria de rutina y curcumina durante 31 semanas.

El grupo E (n = 5, grupo de referencia) se sacrificó en el momento de la inclusión y no recibió ninguna intervención.

Se integraron oleuropeína, rutina y curcumina en la dieta. Los animales se pesaron cada semana y la identificación se realizó mediante microchip. La ingesta de alimentos se controló en W9, W15, W21, W26 y W34 al pesar las cantidades diarias de alimentos añadidos y restantes.

Se obtuvieron muestras de sangre de 6 horas en ayunas por la mañana, bajo tranquilización con ketamina/xilazina, en las venas superficiales en las orejas, cada 6 semanas: W4 (= T0), W10, W16, W22, W28. En W35, se recogió sangre por punción intracardíaca justo antes de la eutanasia, bajo anestesia general.

Después de pesar, se realizó la eutanasia animal después de la punción sanguínea intracardíaca con pentobarbital sódico 100 mg/kg. Se observaron los principales órganos vitales para detectar anomalías (corazón, vías digestivas y urinarias, glándulas suprarrenales). Se pesaron el hígado y las glándulas suprarrenales. La articulación de la rodilla derecha de cada animal se fijó durante 24 h en paraformaldehído tamponado al 4%, seguido de descalcificación en ácido HCl (DC2, Labonord, Bélgica) durante 4 ha 4 ° C antes de la inclusión en parafina.

Las rodillas derechas incrustadas en parafina se cortaron con un microtomo (Leica) en secciones de 6 µm. complementos, en el área central no cubierta por menisco, siguiendo el plano de Cushin, según lo recomendado por OARSI. Tres secciones a 200 µm de intervalo se tiñeron con hematoxilina, verde rápido y safranina-O, y una sección central suplementaria se tiñó con azul de toluidina. Dos expertos cegados, entrenados, calificaron cada compartimento de la sección (mediana tibial, lateral tibial, mediana femoral y lateral femoral) siguiendo la recomendación de OARSI y para evaluar la puntuación global del cartílago, se agregó cada puntuación de compartimento. Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5. Dos expertos entrenados cegados calificaron las membranas sinoviales laterales y mediales siguiendo la recomendación de OARSI y se calculó la media de la membrana sinovial lateral para evaluar la puntuación sinovial global. Los resultados se muestran en las Figuras 11 a

13.

Los grupos de oleuropeína, rutina y rutina + curcumina mostraron una disminución significativa de la puntuación de OA ( $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo de control como se muestra en la figura 5.

Significativamente, el grupo de oleuropeína mostró una disminución significativa de la puntuación sinovial ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo de control, como se muestra en las Figs. 11A, 12A y 13A. La puntuación sinovial se correlacionó positivamente con la puntuación de OA en el grupo de control (Figuras 11B, 12B y 13B)

La PGE2 se midió en suero de cobaya usando un kit ELISA competitivo (Arbor Assays, EE. UU.). Los resultados se muestran en la fig. 6. El tratamiento con oleuropeína puede disminuir los niveles de PGE2 en plasma después de 35 semanas de tratamiento. Sin embargo, la rutina y la curcumina solo tuvieron un efecto no significativo en los niveles de PGE2, lo que indica que su efecto fue principalmente en la descomposición del cartílago.

El nivel de PGE2 en plasma puede correlacionarse positivamente con la puntuación de OA. Esto confirma que PGE2 es un biomarcador relevante para el inicio y la progresión de OA en el modelo de cobaya y para evaluar la eficacia de los tratamientos.

El epítipo nitrosilado, Coll2-1NO2, localizado en el dominio helicoidal del colágeno tipo II se cuantificó en suero de cobaya mediante ELISA competitivo por triplicado con antisueros policlonales de conejo (D37, Artialis, Bélgica). El inmunoensayo Coll2-1NO2 cuantificó con una alta especificidad y afinidad la secuencia de aminoácidos nitrados. Los resultados son visibles en las figuras 7 y 8.

Los tratamientos con oleuropeína, rutina y rutina + curcumina pueden disminuir la descomposición del colágeno medida por los niveles de Coll2-1NO2 en plasma. La cantidad de Coll2-1NO2 se correlaciona positivamente con la puntuación de OA. Esto confirma que Coll2-1NO2 es un biomarcador relevante para aumentar la aparición y progresión de OA en el modelo de cobaya y para evaluar la eficacia de los tratamientos.

Fib3-1 son fragmentos de Fibulina-3 aumentados en sueros de pacientes con OA. Fib3-1 se cuantificó en suero de cobaya por ELISA competitivo por triplicado con antisueros policlonales de conejo (AS88, Artialis, Bélgica). Los resultados son visibles en las figuras 9 y 10.

El tratamiento de rutina y el tratamiento de rutina + curcumina pueden disminuir los niveles de Fibulina 3-1 en plasma. El nivel de fibulina 3-1 en plasma puede correlacionarse positivamente con la puntuación de OA. Esto confirma que Fib 3-1 es un biomarcador relevante para el inicio y la progresión de OA en el modelo de cobaya y para evaluar la eficacia de los tratamientos.

Los CV intra e inter-ensayos fueron inferiores al 10% y las curvas de dilución fueron paralelas a la curva estándar para todos los ensayos de biomarcadores.

Los resultados (media  $\pm$  DE) se calcularon para cada parámetro. Después de una prueba de normalidad, se realizó un ANOVA paramétrico con la correlación posterior a la prueba de Dunnett o de Pearson en todos los experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Los tratamientos con oleuropeína, rutina y rutina + curcumina pueden disminuir la puntuación de OA en cobayas por diferentes mecanismos, pero solo la oleuropeína puede disminuir los síntomas en comparación con el grupo control.

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia)

Se investigó la síntesis de colágeno por osteoblastos y la potenciación del efecto por la vitamina D. Los osteoblastos primarios se aislaron de la calvaria de las ratas Wistar recién nacidas por digestión enzimática como se describe por Declercq et al. en 2004. Durante todos los experimentos, las células se mantuvieron en medio esencial  $\alpha$ -mínimo con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con Coll-1 a una densidad de 3500 células/pocillo o en placas de 24 pocillos a una densidad de  $33 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron durante 2 días en  $\alpha$ -MEM para alcanzar la confluencia. Luego, las células se expusieron a diferentes condiciones: medio mínimo (C-), medio mínimo que contenía ácido ascórbico 50  $\mu$ g/ml,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM (C +; medio optimizado) y medio mínimo suplementado con oleuropeína 1  $\mu$ M (OLP) y/o hidroxitirosol (HTy) 1  $\mu$ M y/o 1,25 dihidroxivitamina D3  $10^{-9}$  M (1,25(OH)2D3). OLP y HTy se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,25(OH)2D3 se disolvió en etanol. Las concentraciones finales de DMSO y etanol en el medio fueron 0,1% cada una. El medio se cambió cada 2 días.

Después de 9 días, se midió el contenido de colágeno celular usando el ensayo Sircol de Biocolor. Este ensayo de colágeno Sircol es un método cuantitativo de unión a colorantes diseñado para el análisis de colágenos extraídos de tejidos y células de mamíferos durante el cultivo in vitro. El reactivo de tinción se une específicamente al [Gly-X-Y] n estructura helicoidal encontrada en colágenos de mamíferos (Tipos I-V).

La FIG. 14 muestra la síntesis de colágeno por osteoblastos después de 9 días de cultivo, medida por microgramos

de colágeno producido por miligramo de proteína total en respuesta a la estimulación con una combinación de 1,25(OH)2D3 OLP y HTy. 1,25(OH)2D3 =  $10^{-9}$  M 1,25 dihidroxivitamina D3

OLP = oleuropeína 1  $\mu$ M

HTy = hidroxitirosol 1  $\mu$ M

5 C + = medio optimizado utilizado como control positivo

Los datos se expresaron como media  $\pm$  media de la DE (3 repeticiones). Estadísticas: prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann Whitney (2 colas) \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 vs control negativo (C-).

10 Como se muestra en la FIG. 14, la adición de una combinación de 1,25(OH)2D3, OLP y HTy estimula significativamente la síntesis de colágeno celular de los osteoblastos después de 9 días de cultivo.

Ejemplo 4

15 Se investigó la actividad de fosfatasa alcalina de los osteoblastos y la potenciación del efecto por la vitamina D. Los osteoblastos primarios se aislaron de la calvaria de las ratas Wistar recién nacidas por digestión enzimática como se describe por Declercq et al. en 2004. Durante todos los experimentos, las células se mantuvieron en medio esencial  $\alpha$ -mínimo con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con Coll-1- a una densidad de 3500 células/pocillo o en placas de 24 pocillos a una densidad de  $33 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron durante 2 20 días en  $\alpha$ -MEM para alcanzar la confluencia. Luego, las células se expusieron a diferentes condiciones: medio mínimo (C-), medio mínimo que contenía ácido ascórbico 50  $\mu$ g/ml,  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM (C +; medio optimizado) y medio mínimo suplementado con oleuropeína 1  $\mu$ M (OLP) y/o hidroxitirosol (HTy) 1  $\mu$ M y/o 1,25 dihidroxivitamina D3  $10^{-9}$  M (1,25(OH)2D3). OLP y HTy se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y 1,25(OH)2D3 se disolvió en etanol. 25 Las concentraciones finales de DMSO y etanol en el medio fueron 0,1% cada una. El medio se cambió cada 2 días.

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) se midió cinéticamente en los días de tratamiento 0, 5, 9, 12 y 15. Los osteoblastos se enjuagaron dos veces con PBS antes de congelarse en hielo seco. Las células se lisaron luego por ciclo de congelación-descongelación y homogeneización en 200  $\mu$ l de dietanolamina 1 M y tampón de 30 cloruro de magnesio 0,24 mM pH 9,8 (tampón ALP). Se añadieron lisados celulares (10  $\mu$ l) a 200  $\mu$ l de solución de 6 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP) en tampón ALP. La absorbancia se midió a 405 nm y 30 °C, y cada 2 min 30 s durante 30 min utilizando un lector de microplacas VarioSkalan Flash. La actividad de ALP se expresó como micromoles de p-NPP por hora por miligramo de proteína. La medición de proteínas se realizó de acuerdo con el método de Bradford utilizando el ensayo de proteína Quick Start BioRad.

35 La FIG. 15 muestra actividad de fosfatasa alcalina (ALP) después de 9 días de cultivo, indicada por ALP micromolar por miligramo de proteína por hora en respuesta a una combinación de 1,25(OH)2D3, OLP y HTy. C- = uso mínimo de medio como control negativo

1,25(OH)2D3 =  $10^{-9}$  M 1,25 dihidroxivitamina D3

40 OLP = oleuropeína 1  $\mu$ M

HTy = hidroxitirosol 1  $\mu$ M

C + = medio optimizado utilizado como control positivo

45 Los datos se expresaron como media  $\pm$  media de la DE. Estadísticas: prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann Whitney (2 colas) \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 vs control negativo (C-).

La FIG. 15 demuestra además que la adición de una combinación de 1,25(OH)2D3, OLP y HTy estimula significativamente la síntesis de colágeno celular de los osteoblastos después de 9 días de cultivo. Las figs. 16-19 muestran actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de osteoblastos cultivados en presencia de 1,25(OH)2D3, 50 oleuropeína (OLP), hidroxitirosol (Hyt); por separado o en combinaciones en un modelo de curso de tiempo. C- = uso mínimo de medio como control negativo 1,25(OH)2D3 =  $10^{-9}$  M 1,25 dihidroxivitamina D3 OLP = oleuropeína 1  $\mu$ M HTy = hidroxitirosol 1  $\mu$ M C + = medio optimizado utilizado como control positivo.

55 Los datos se expresaron como media  $\pm$  media de la DE. Estadísticas: prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann Whitney (2 colas) \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001 vs control negativo (C-).

Como puede verse a partir de los datos mostrados en la FIG. 16, la adición de vitamina D3 en sí misma induce un aumento pequeño pero estadísticamente significativo en la actividad AP en el día 15, indicativo de actividad de 60 osteoblastos y formación de hueso y/o anabolismo del cartílago. De la misma manera, la adición de HTy por sí solo o de OLP por sí solo también produce un pequeño aumento en el día 15, comparable con el efecto de la vitamina D3 (ver figuras correspondientes).

La combinación de HTy y OLP también aumenta la actividad de los osteoblastos (nuevamente, observando el día 65 15), pero no tanto como la combinación de vitamina D con HTy u OLP. Aún así, los únicos puntos con una diferencia estadísticamente significativa del control son el día 12 y el día 15. Mediciones anteriores, en el día 5 y el día 9, no

difieren estadísticamente del control negativo.

5 Por lo tanto, los datos presentados ilustran dos efectos de la adición de vitamina D. En primer lugar, la adición de vitamina D junto con uno o ambos HTy y OLP aumenta la respuesta a los osteoblastos. Esto se observa en comparación con, por ejemplo, los niveles en el día 15. En segundo lugar, la adición de vitamina D junto con uno o ambos HTy y OLP provoca actividad de osteoblastos antes que en el control. La conclusión es que la adición de vitamina D conduce a una respuesta más temprana y una respuesta más fuerte. Se concluye que la adición de vitamina D potencia la formación de hueso y/o la respuesta al anabolismo del cartilago provocada por OLP y/o HTy.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, para usar en el tratamiento de la sinovitis en un individuo que tiene sinovitis, la composición comprende además vitamina D.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la sinovitis está asociada con una afección seleccionada del grupo que consiste en lupus, gota, artritis y combinaciones de los mismos.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la afección es artritis que se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, enfermedad de osteocondritis, osteoartritis y una combinación de las mismas.
- 15 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un compuesto bioactivo adicional seleccionado del grupo que consiste en curcumina, quercetina, hidroxitirosol y combinaciones de los mismos.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fitonutriente se aísla de un extracto vegetal.
6. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína para su uso en la prevención de la sinovitis en un individuo en riesgo de padecerla, en donde la composición comprende además vitamina D.
- 25 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el individuo se selecciona del grupo que consiste en un humano maduro y un humano anciano.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el fitonutriente se aísla de un extracto vegetal.
- 30 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende además un compuesto bioactivo adicional seleccionado del grupo que consiste en curcumina, quercetina, hidroxitirosol y combinaciones de los mismos.
- 35 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición se administra diariamente durante al menos un mes.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 6, en la que la composición es una composición nutricional.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la composición nutricional comprende un componente seleccionado del grupo que consiste en proteína, carbohidrato, grasa y combinaciones de los mismos.
- 45 13. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un fitonutriente seleccionado del grupo que consiste en oleuropeína, para usar en el tratamiento do en la prevención de la degradación de cartílago articular posterior a la sinovitis en un individuo que lo necesita, en la que la composición comprende además vitamina D.

FIG. 1A

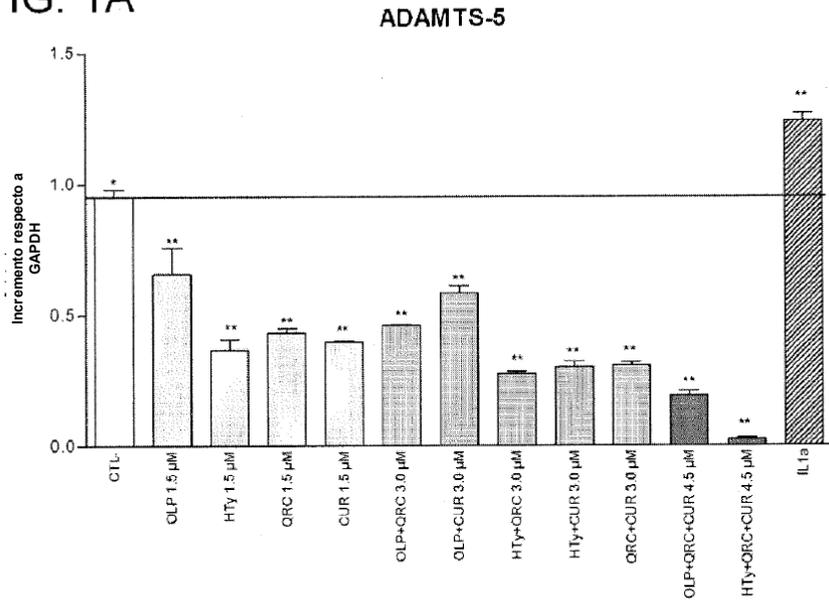


FIG. 1B

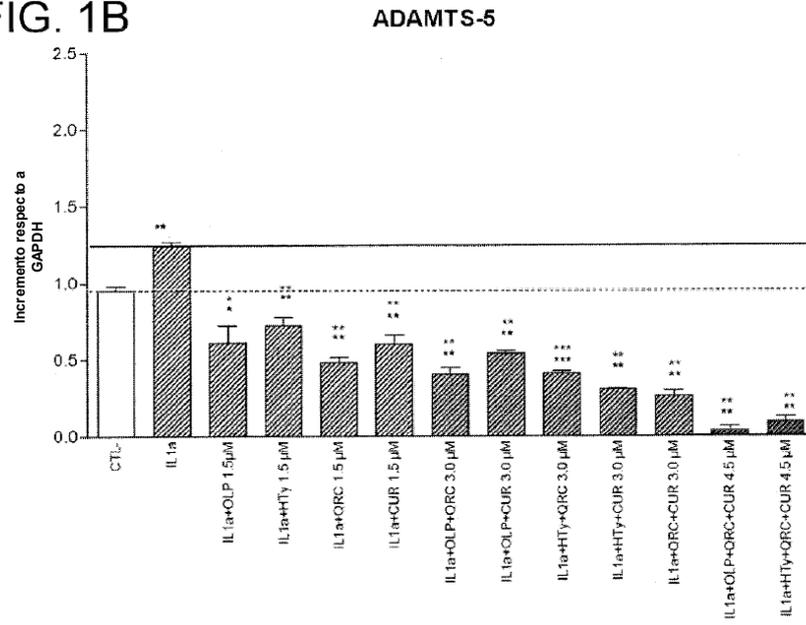


FIG. 2A

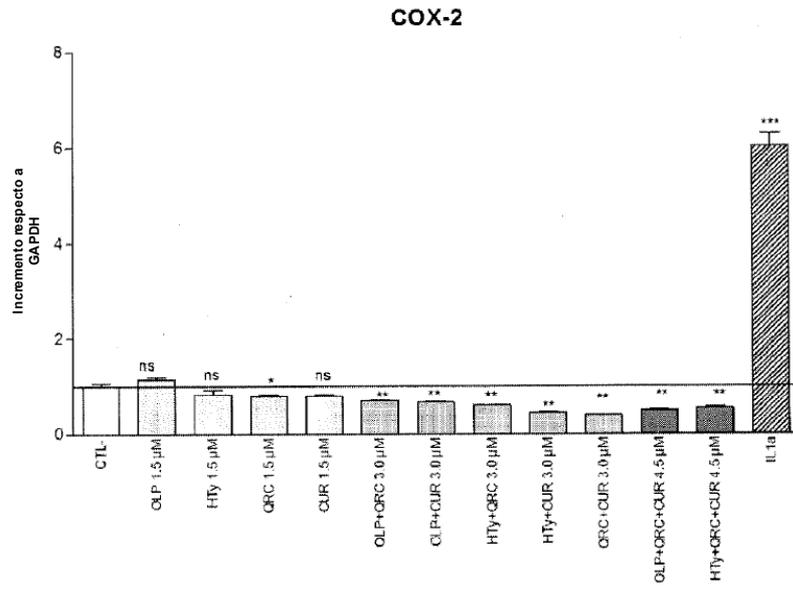


FIG. 2B

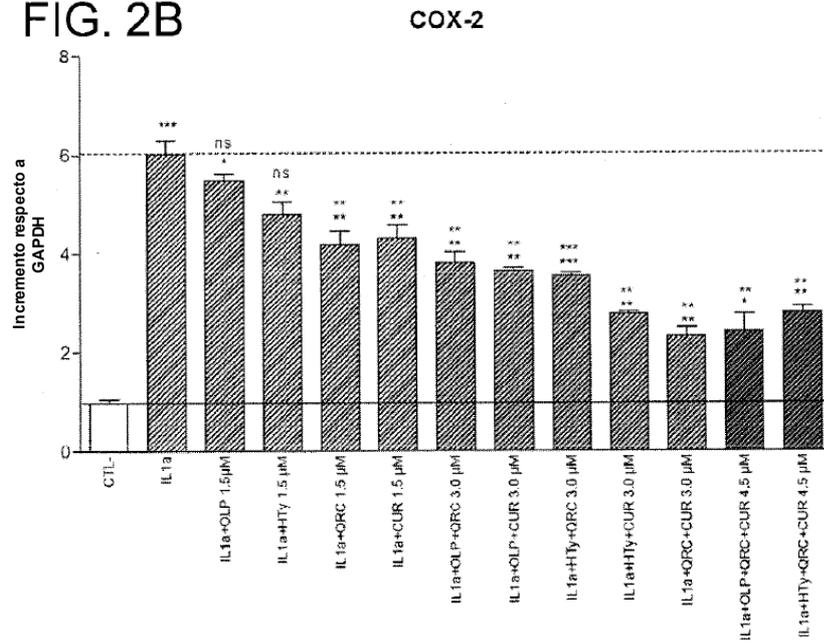


FIG. 3A

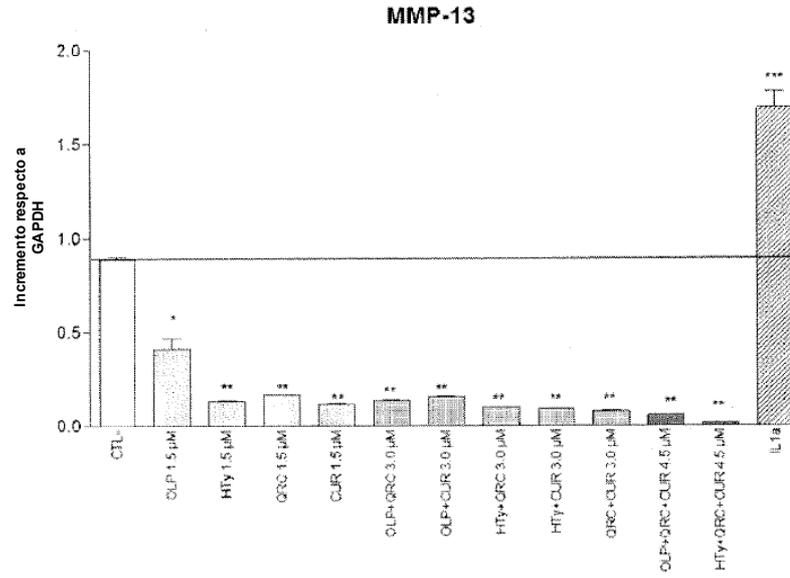


FIG. 3B

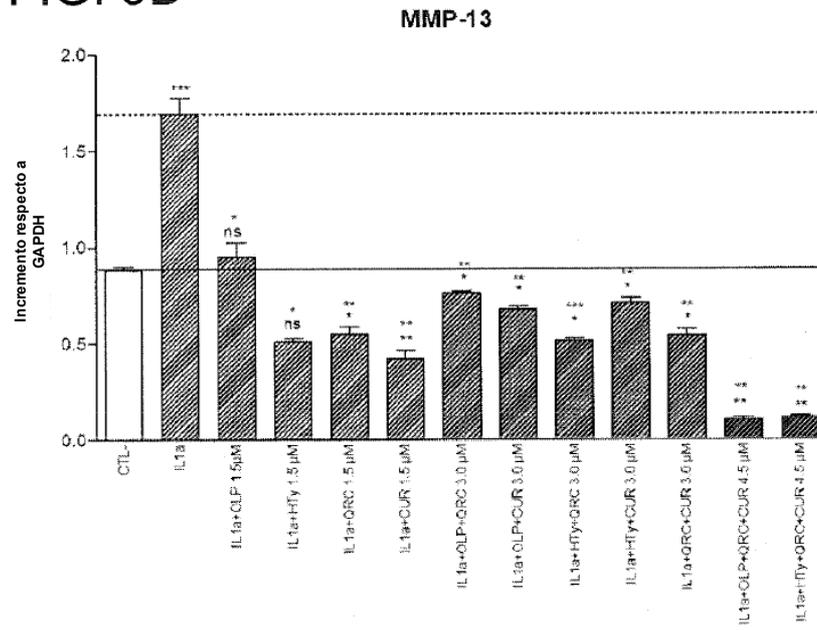
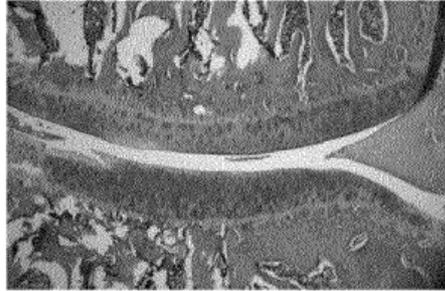
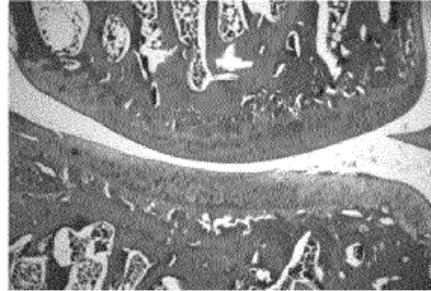


FIG. 4

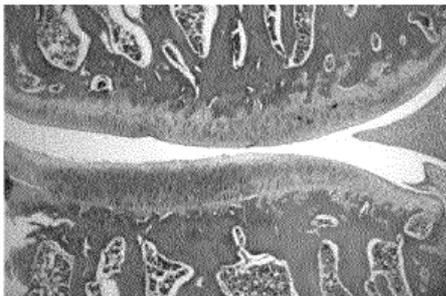
4A



4B



4C

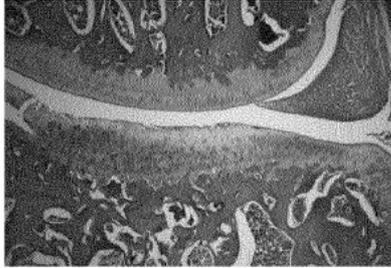


4D

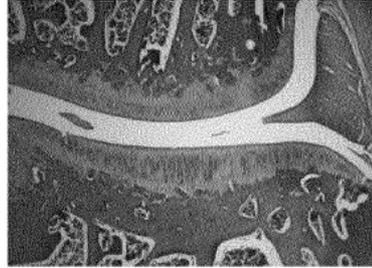


FIG. 4

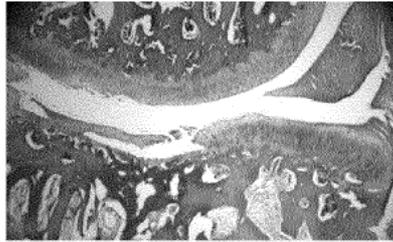
4E



4F



4G



4H

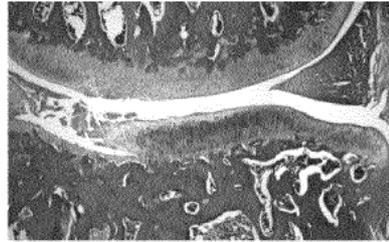


FIG. 5

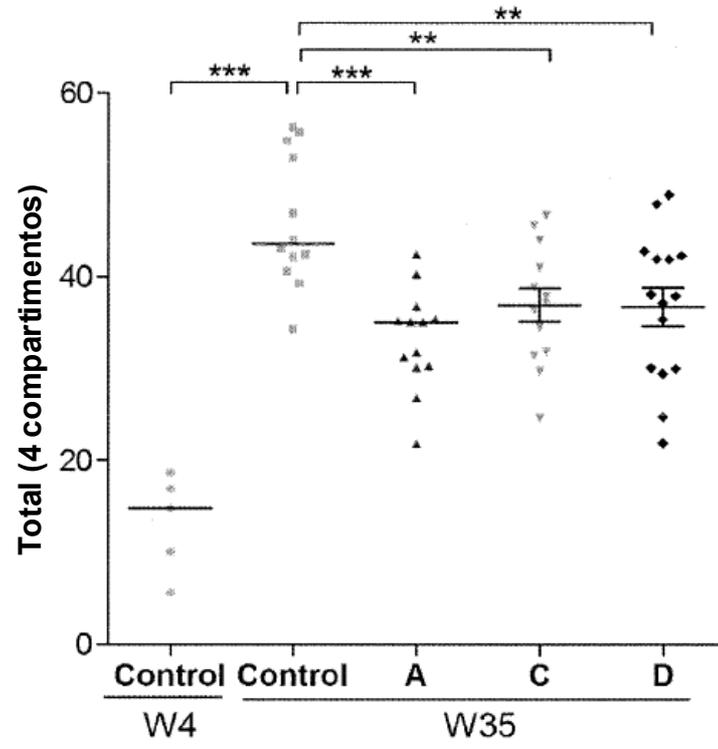


FIG. 6A

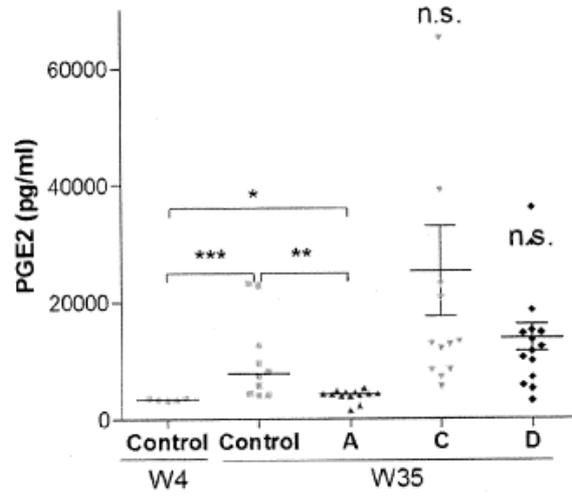


FIG. 6B

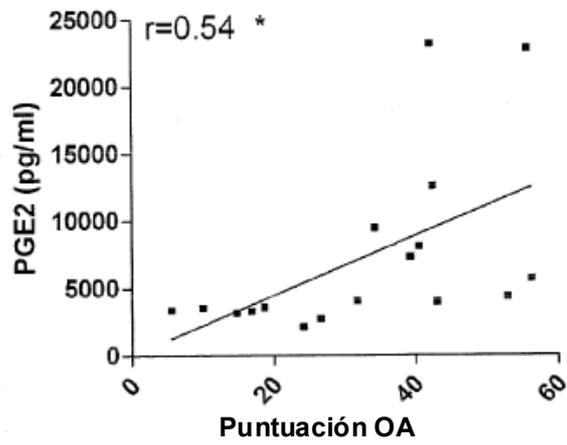


FIG. 7

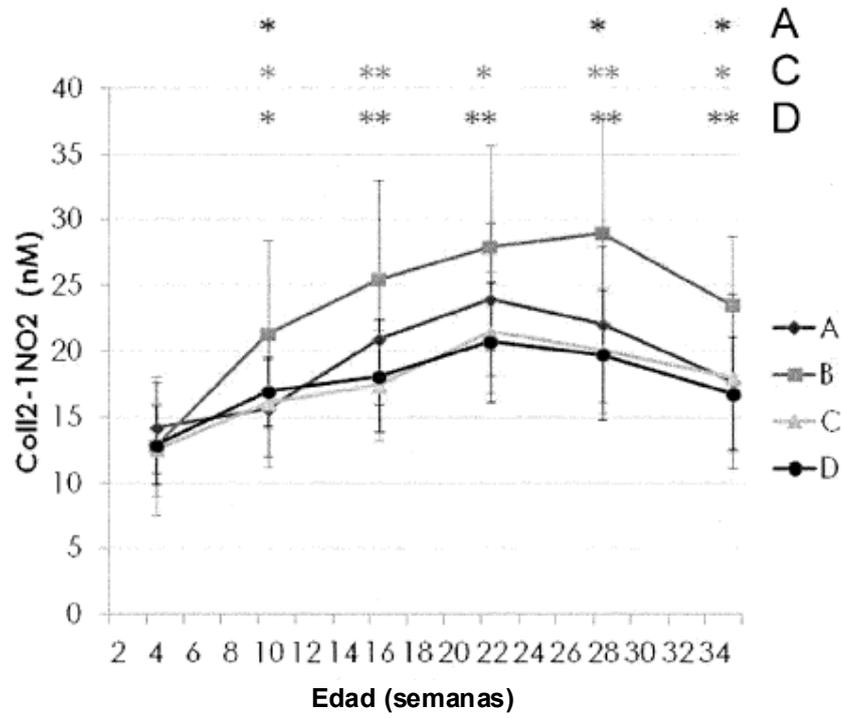


FIG. 8A

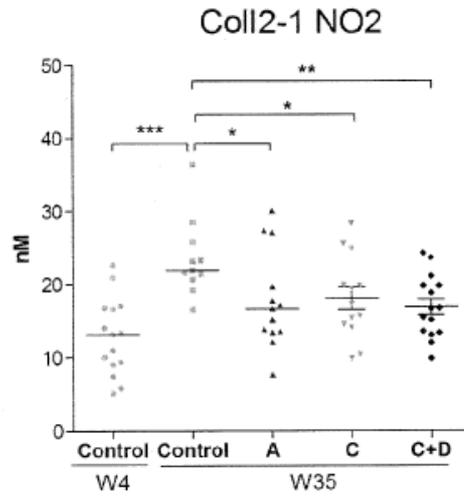


FIG. 8B

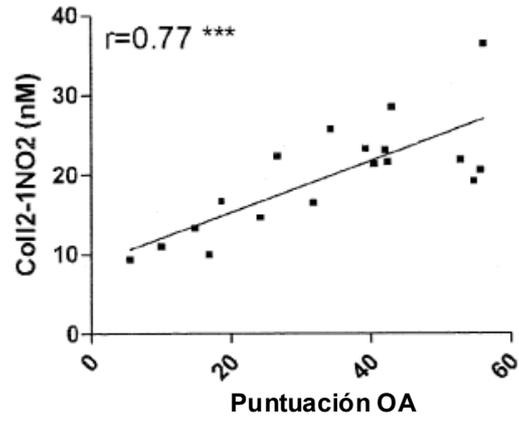


FIG. 9

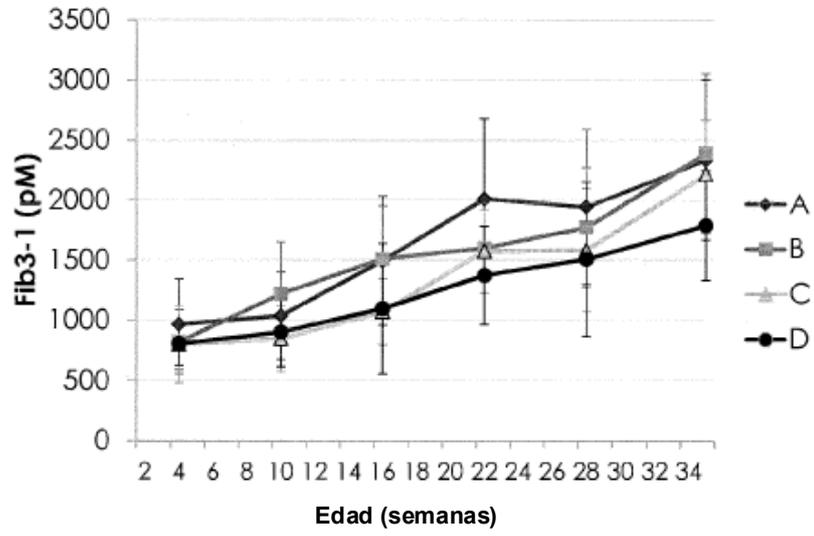


FIG. 10A

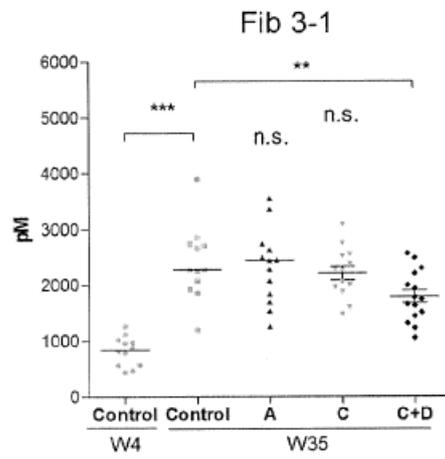


FIG. 10B

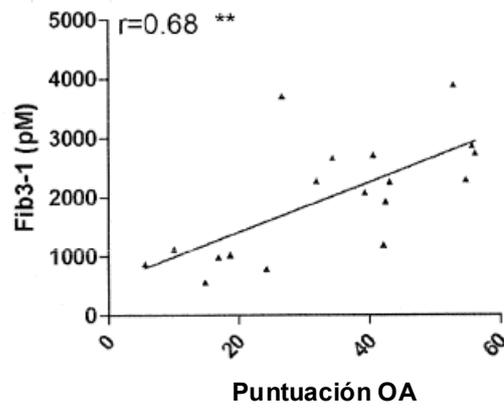


FIG. 11A

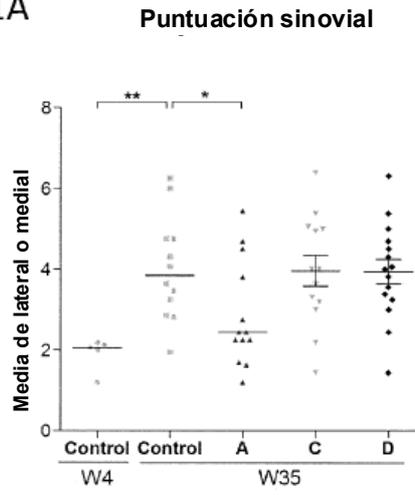


FIG. 11B

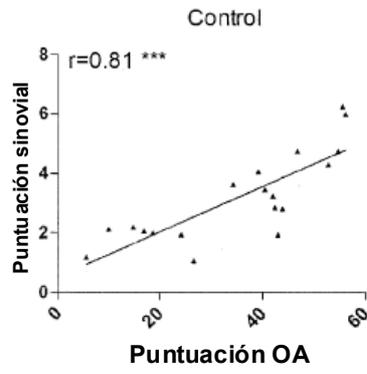


FIG. 12A **Puntuación sinovial**

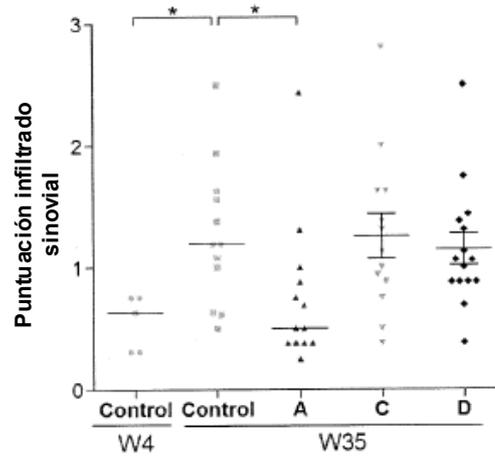


FIG. 12B **Control**

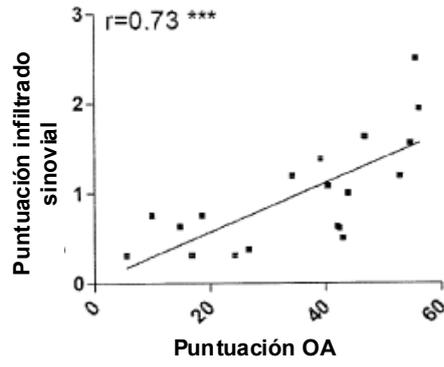


FIG. 13A

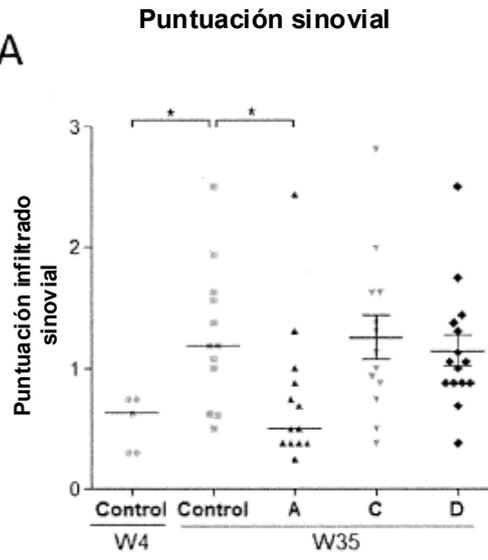


FIG. 13B

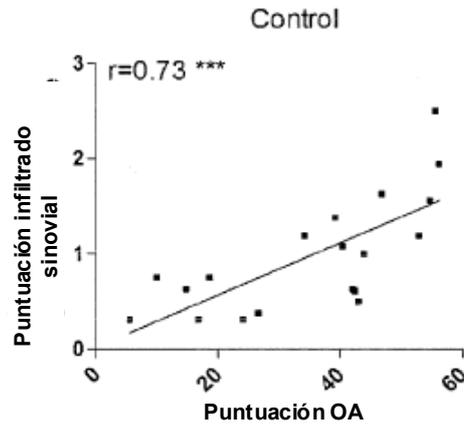


FIG. 14

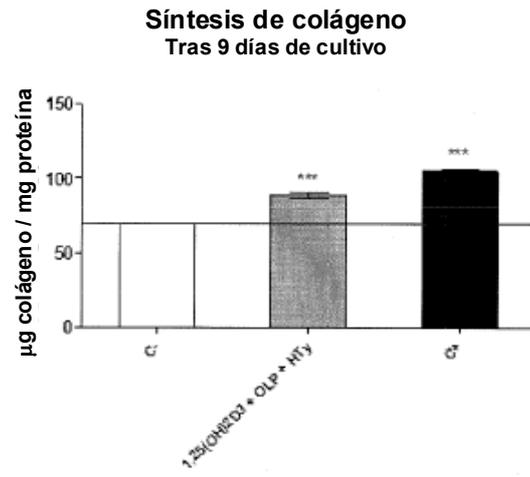


FIG. 15

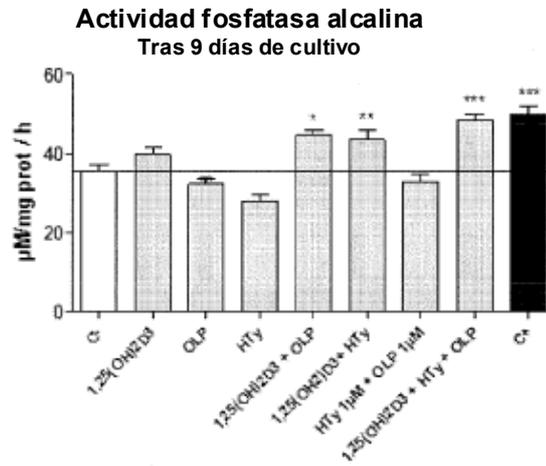


FIG. 16

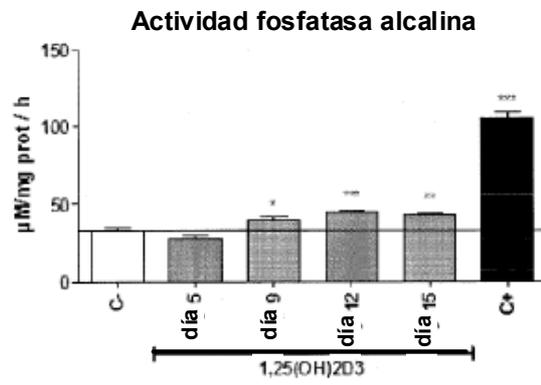


FIG. 17A

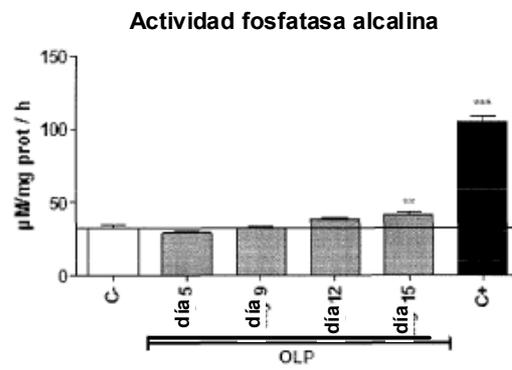


FIG. 17B

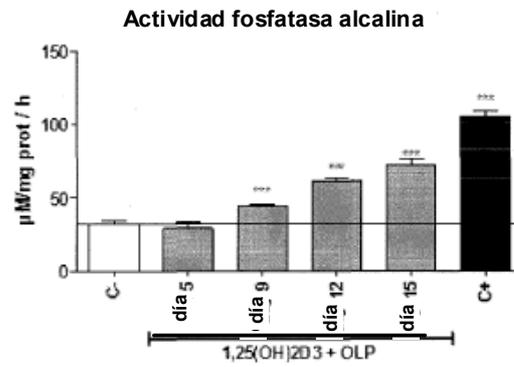


FIG. 18A

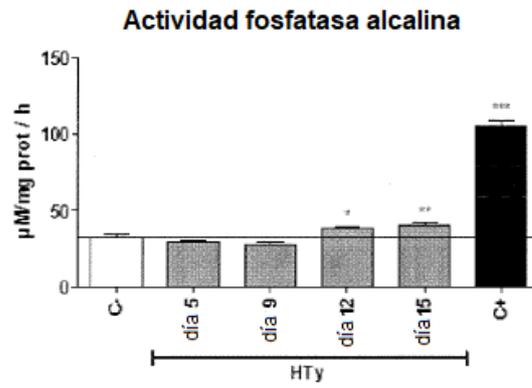


FIG. 18B

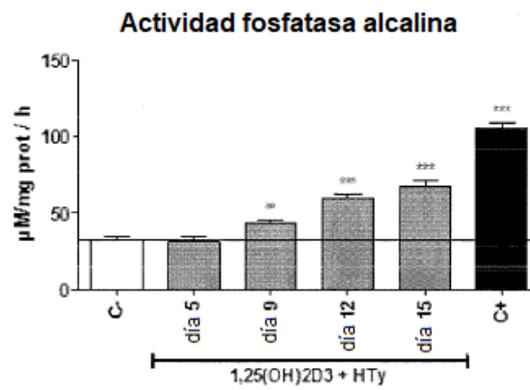


FIG. 19A

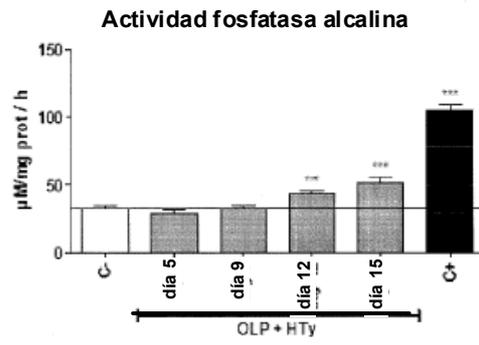
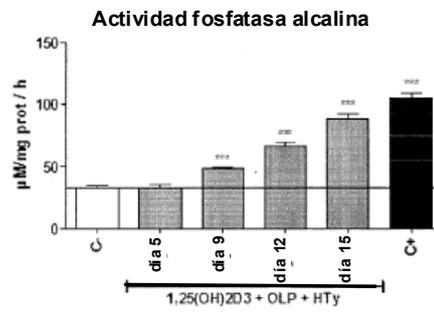


FIG. 19B



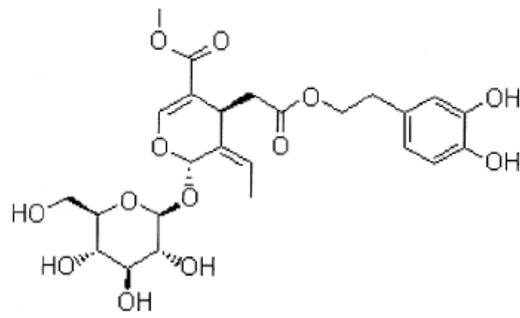


Fig. 20 Oleuropeina

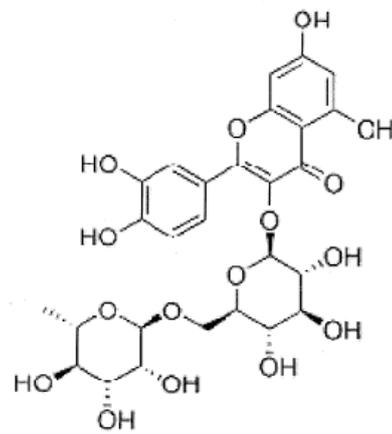


Fig. 21 Rutina

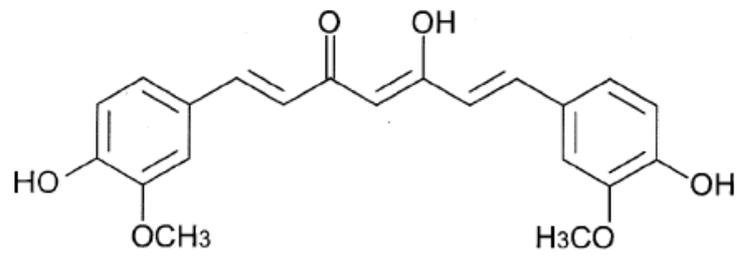


Fig. 22 Curcumina