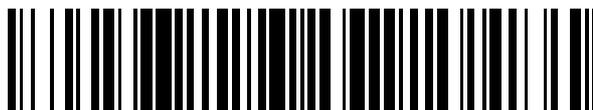


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 428**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 33/115 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014 PCT/FR2014/051108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014 E 14729418 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2999467**

54 Título: **Utilización de una asociación de dos compuestos para el tratamiento y/o la prevención de trastornos óseos**

30 Prioridad:

13.05.2013 FR 1354275

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

27.10.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (INRAE) (100.0%)
147 rue de l'Université
75338 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEOTOING, LAURENT;
COXAM, VÉRONIQUE y
WITTRANT, YOHANN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 790 428 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

Utilización de una asociación de dos compuestos para el tratamiento y/o la prevención de trastornos óseos

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de los trastornos asociados a una disminución de la síntesis ósea y/o a un aumento de la reabsorción ósea y, particularmente, a las patologías óseas y a su prevención y/o su tratamiento. Se refiere particularmente a asociaciones que presentan una actividad mejorada sobre estos fenómenos y su utilización, en particular, en forma de un aporte nutritivo o de composición farmacéutica.

Estado de la técnica

10 El hueso no es un tejido estático. Está sometido a una remodelación constante por la destrucción y nueva síntesis del tejido óseo en un procedimiento complejo que implica dos tipos principales de células, respectivamente, los osteoblastos, que producen tejido óseo nuevo y los osteoclastos que eliminan el hueso.

Las actividades de estas células están reguladas por un elevado número de citoquinas y factores de crecimiento, de los que la mayor parte han sido identificados y clonados como está descrito en la revista general de Mundy (Mundy, G.R., 1996, Clin. Orthop., vol. 324: 24-28; Mundy, G.R., 1993, J. Bone Miner Res, vol. 8: S 505 - S 510).

15 Los osteoblastos, células responsables de la formación del hueso, se diferencian a partir de células precursoras y experimentan y secretan numerosas enzimas y proteínas de la estructura de la matriz del hueso, comprendido el colágeno de tipo I, la osteocalcina, la osteopontina y la fosfatasa alcalina (Stein G. et al., 1990, Curr. Opin Cell Biol. vol. 2: 1018-1027; Harris S et al., 1994, J. Bone Miner Res Vol.9: 855-863).

20 Los osteoblastos sintetizan también numerosos péptidos reguladores del crecimiento, comprendidos los péptidos BMP ("Bone Morphogenetic Proteins"), que son almacenados en la matriz ósea y que son realmente responsables de la formación normal del hueso.

Como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la osteopontina, los péptidos BMP son expresados por osteoblastos en cultivo en el momento en que las células proliferan y se diferencian.

25 Los osteoclastos son células multinucleadas que son responsables de la pérdida ósea, en un procedimiento comúnmente denominado reabsorción ósea.

30 En el caso de un adulto con buena salud, hombre o animal, la acción conjunta de los osteoblastos y los osteoclastos asegura una remodelación del tejido óseo mediante la reabsorción y síntesis nueva de hueso que permite el mantenimiento de la masa ósea. En el caso de un adulto sano, la velocidad de formación de osteoclastos y de osteoblastos es tal que hay un equilibrio entre la formación del hueso y la reabsorción ósea. La masa ósea se constituye progresivamente entre el nacimiento a la edad de 18-20 años hasta una cantidad máxima que se denomina el pico de masa ósea.

35 En el caso de un hombre o un animal, existen numerosos estados caracterizados por la necesidad de aumentar la formación ósea. Por ejemplo, en el caso de fracturas óseas, es imperativo estimular el crecimiento óseo con el fin de acelerar una reparación completa del hueso. Esta necesidad se identifica también en enfermedades dentales y periodontales, enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseo primarios y secundarios (lesiones metastásicas del hueso) y enfermedades osteolíticas. Se investiga también la estimulación de un crecimiento óseo en el caso de hiperparatiroidismo primario o secundario, así como en la osteoporosis asociada a la diabetes o asociadas a la toma de glucocorticoides.

40 Además, se observa una heterogeneidad importante en el valor del pico de masa ósea según los individuos, debido a variaciones en el procedimiento de crecimiento óseo en la edad más temprana.

45 Además, la disminución de la masa ósea transcurre de forma diferente en el caso de la mujer y el hombre. En el caso del hombre, la aplicación de una osteopenia es regular, a razón de 0,5% por año. En el caso de una mujer, en el momento de la menopausia se produce una aceleración considerable de la pérdida ósea: de 3 a 5% durante 2 a 3 años aproximadamente, seguidamente de 1 a 2% durante los 5 a 10 años siguientes. Esta pérdida ósea denominada "post-menopáusica" es debida a un descontrol de los osteoclastos asociado a la baja impregnación estrogénica, consecuencia de la menopausia. Por tanto, al final, la mujer perderá de 30 a 50% de su masa ósea según el lugar esquelético) en el transcurso de su vida. En consecuencia, los individuos que poseen inicialmente un

valor bajo del pico de masa ósea tienen el riesgo de alcanzar más rápidamente el umbral de fractura. Además, el fenómeno de la osteopenia asociado a la edad puede verse agravado por factores ambientales como, particularmente, una alimentación con carencia de calcio y vitamina D.

5 En el caso del hombre y de otros mamíferos, hay también una gran diversidad de trastornos asociados a un metabolismo anormal de la reabsorción ósea o de la formación del hueso que implican un desequilibrio del metabolismo o remodelación óseos (desequilibrio de la relación entre la formación y la reabsorción ósea), o simplemente una disminución de la masa ósea asociada al envejecimiento.

10 Entre los problemas patológicos, o los trastornos, asociados a un desequilibrio del metabolismos óseo, se citarán particularmente los trastornos o las patologías como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, La pérdida ósea o la osteolisis observada en las proximidades de una prótesis, las enfermedades dentales y periodontales, enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseo primarios y secundarios (lesiones metastáticas del hueso), enfermedades osteolíticas o hipercalcemia debida a un cáncer.

15 Entre los trastornos asociados a un aumento de la reabsorción ósea, el más común es la osteoporosis, cuya manifestación más frecuente se observa en el caso de mujeres, después del comienzo de la menopausia. La osteoporosis es una enfermedad sistémica crónica del esqueleto que resulta de alteración, principalmente asociada a la edad, de la arquitectura trabecular y a una reducción del contenido mineral del hueso, que generan una fragilización del esqueleto y un aumento del riesgo de fracturas. En el caso de individuos osteoporóticos, se produce un desequilibrio en el procedimiento de remodelación ósea que conduce a una pérdida de hueso que se hace a una velocidad más rápida que la velocidad de formación.

20 Algunos de estos trastornos o patologías del metabolismo óseo pueden aparecer también después de una inmovilización de duración prolongada, por ejemplo, una hospitalización prolongada, después de una parálisis o una hemiplejía o incluso un período de ingravidez.

25 Existen finalmente otros factores que pueden aumentar la pérdida ósea que conduce a la osteoporosis, como el consumo de cigarrillos, el abuso del alcohol, un tipo de vida sedentario, un bajo aporte de calcio, una alimentación desequilibrada o incluso una carencia de vitamina D.

30 Por tanto, cualquiera que sea el individuo, se propone un tratamiento preventivo precoz que estimule la formación ósea o que limite la pérdida ósea, de forma que se reduzcan lo más posible los desequilibrios de remodelación ósea, que se producen de forma espontánea con el envejecimiento, particularmente los riesgos de fracturas óseas precoces. Además, debido a que la osteoporosis, así como otros trastornos asociados a una pérdida ósea, constituye un trastorno crónico, su prevención y su tratamiento deben plantearse para una duración prolongada y, por tanto, no deben restringirse a un individuo de edad avanzada.

Por tanto, está generalmente admitido que se debe priorizar una aplicación precoz ya que las dos fases críticas para la reserva ósea son:

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

El predominio de las patologías asociadas al envejecimiento crece considerablemente con el aumento de la esperanza de vida. Entre las manifestaciones del envejecimiento humano, el mantenimiento del aparato locomotor es particularmente costoso, invalidante y acelera considerablemente el comienzo de la dependencia. Por tanto, las patologías óseas, como la osteoporosis, constituyen un problema principal de la salud pública.

40 Como ejemplo, los costes generados por la fractura de la extremidad superior de la cadera sobrepasan los 9.10⁹ euros en Europa (informe de la comunidad europea, 1999). Además, sólo un 25% de los pacientes mantienen una calidad de vida equivalente a la anterior a la intervención quirúrgica y aproximadamente un 30% fallecen en año posterior. En poblaciones caucásicas después de los 50 años, el riesgo acumulado de los años que les queda de vida después de desarrollar el síndrome osteoporótico alcanza un 40% en el caso de la mujer y un 13% en el caso del hombre. Más allá de los 80 años, un 70% de las personas son osteoporóticas.

45 Existe un cierto número de compuestos activos para la estimulación de la formación del hueso o la inhibición de la reabsorción ósea entre los cuales se pueden citar el grupo de los polifosfonatos (patente Europea EP n° 210728), las oxazolidonas-tioamidaz (solicitud de patente US 2002/0010341), los amino-bis-fosfonatos (solicitud de patente US 2001/0046977), las isoflavonas (Solicitud de patente US 2002/0035074. Se ha propuesto también la utilización del extracto de una planta del género Lycopersicon (Solicitud de patente US 2002/0009510) o la hesperidina, una

flavona glicosilada presente en los cítricos (documento WO 2004002496). La fisetina es conocida por su capacidad para inhibir la formación de osteoclastos inducidos por RANKL (SIK-WON CHOI ET AL: "Fisetin Inhibits Osteoclast Differentiation via Downregulation of p38 and c-Fos-NFATc1 Signaling Pathways", EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, vol. 273, n°. 5279,2012, páginas 1236-9).

5 La utilización de ácidos grasos poliinsaturados para mejorar la salud y prevenir la pérdida ósea ha sido propuesta particularmente por Sun D et al. (J. Bone Miner. Res., 2003), Rahman MM et al. (J. Cell Physiol., 2008), Wauquier et al. (J. Bone, 2011), Farina et al. (Am. J. of Clinical Nutrition, 2011). En la solicitud internacional WO 02074308, se ha propuesto un ácido graso poliinsaturado solo en asociación con un compuesto de isoflavona, en el contexto de la prevención de la osteoporosis.

10 Se han propuesto también composiciones enriquecidas en derivados de vitamina D₃ y en glicósidos de flavonoles o que comprenden una asociación de numerosos polifenoles para el tratamiento de patologías que implican una pérdida ósea como la osteopenia o la osteoporosis (documento WO 2009130005) o asociadas a una deficiencia estrogénica (documento WO 200982459).

15 La solicitud EP 1127572 describe también la utilización de flavonas en el tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de ciclooxigenasa 2, como la enfermedad de Alzheimer y la artritis.

Se han descrito formulaciones que comprenden una asociación de fisetina y DHA en el contexto de aplicaciones terapéuticas totalmente diferentes, como el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (documento WO 2012159092 y enfermedades cardiovasculares (documento US 20100021573).

20 A pesar de estos conocimientos, el arsenal terapéutico a disposición de los médicos continúa siendo poco comprendido. En particular, los poderes públicos recomiendan actualmente que la homoterapia sustitutiva que era hasta ahora el tratamiento de referencia de la osteoporosis, no sea prescrito como primera medida, generando así un vacío terapéutico consecuente. Las estrategias actuales de prevención nutritiva de la osteoporosis se basan exclusivamente en un complemento de calcio/vitamina D.

25 Por tanto, es deseable disponer de alternativas terapéuticas, desprovistas de efectos secundarios, cuya eficacia esté verificada, y una aplicación sencilla. Este tratamiento podrá ser también fácilmente integrado en el contexto de una propuesta profiláctica osteoprotectora o de un tratamiento crónico.

Sería también ventajoso disponer de un tratamiento proco costoso, para el que la fabricación o el almacenamiento sean simples y que impliquen materias primas poco caras y disponibles en cantidades suficientes.

Compendio de la invención

30 Estos objetivos y otros se alcanzan mediante la presente invención. En efecto, se ha demostrado, en el contexto de la presente invención, que la asociación de fisetina y DHA presenta una acción sinérgica (significativamente superior a la simple adición de los efectos individuales) sobre la inhibición de la pérdida ósea. Estos resultados demuestran por primera vez una sinergia de acción de estas dos moléculas sobre los mecanismos de la pérdida ósea, planteando así nuevas perspectivas de tratamiento y/o de prevención nutritiva de los trastornos asociados a un desequilibrio de relación entre la formación y la reabsorción ósea. Estas asociaciones o composiciones son útiles para el tratamiento y/o la prevención de patologías óseas.

35 La invención está definida por las reivindicaciones. Todo objeto no relevante del campo de aplicación de las reivindicaciones se menciona únicamente con carácter de información.

40 Por tanto, la invención se refiere a una asociación que comprende al menos (i) fisetina y (ii) DHA, o uno de sus derivados escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido, como principios activos o una composición que la contiene, para su utilización para el tratamiento y/o la prevención de trastornos asociados a una pérdida ósea y/o a un desequilibrio de la relación entre la formación y la reabsorción ósea.

En particular, esta asociación, o la composición que la comprende, puede ser utilizada para inhibir la pérdida ósea.

45 Se ha descubierto también en el contexto de la invención que la fisetina presenta una acción estimuladora sobre la diferenciación de osteoblastos, contribuyendo así activamente a la formación ósea. La fisetina puede ser utilizada para estimular la formación ósea.

En ciertos modos de realización de la invención, la asociación de fisetina y DHA y/o uno de sus derivados de DHA escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido, como se describió anteriormente, es por tanto utilizada también

- para estimular la formación ósea, en particular durante el crecimiento o en el tratamiento y/o la prevención de patologías que necesitan una estimulación de la formación ósea. Los trastornos asociados a una pérdida ósea y/o a un desequilibrio de la relación entre la formación y la reabsorción ósea comprenden en particular la pérdida ósea asociada al envejecimiento y/o a la menopausia, la pérdida ósea consecuencia de enfermedades metabólicas como la diabetes o la obesidad excesiva y/o la toma de ciertos medicamentos como corticoides, la osteolisis observada en las proximidades de una prótesis, la pérdida ósea después de una intervención quirúrgica o incluso una enfermedad de patología dental, la enfermedad de Paget, enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseo primarios y secundarios (en particular las lesiones metastásicas del hueso), enfermedades osteolíticas e hipercalcemia debida a un cáncer o incluso después de una fractura.
- 5
- De forma también general, la asociación según la invención, o una composición que la comprende está adaptada para la prevención y/o el tratamiento de la osteopenia, la escasez ósea, la fragilización del tejido óseo o la osteoporosis.
- 10
- La fisetina y/o el DHA y/o uno al menos de los derivados de DHA escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido pueden estar en una forma más o menos purificada y, particularmente, en forma de extractos naturales que los contienen. La utilización de estos extractos permite la realización de tratamientos completamente naturales, sanos y desprovistos de efectos secundarios nocivos.
- 15
- Según un aspecto particular, en una asociación según la invención o en una composición que la contiene, la fisetina y el DHA (o uno de sus derivados) están presentes según las relaciones (peso/peso) de fisetina/DHA de 100/1 a 1/100. Este intervalo de relaciones comprende particularmente las relaciones 100/1, 50/1, 20/1, 10/1, 4/1, 2/1, 1/1, 1/10, 1/20 1/50 y 1/100.
- 20
- En algunos modos de realización de la invención, la fisetina se administra a una dosis habitual de 0,01 a 1 g/día y el DHA o uno de sus derivados, se administra a una dosis habitual de 0,01 a 3 g/día.
- La asociación de fisetina y DHA y/o de los derivados de DHA escogidos en forma de un glicérido o de un fosfolípido, según la invención, puede estar en forma de un producto de combinación que comprende al menos:
- 25
- i) una cantidad eficaz de fisetina y
 - ii) una cantidad eficaz de DHA o uno de sus derivados;
- para una utilización secuencial, separada o simultánea de uno con otro en el tiempo.
- En un modo de realización de la invención, la asociación está en forma de al menos una composición que comprende al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 30
- Más particularmente, la asociación puede estar en forma de una composición única que comprende además al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
- Alternativamente, la asociación puede estar en forma de al menos dos composiciones a) y b) que comprenden, respectivamente, al menos (i) fisetina y (ii) DHA o uno de sus derivados; comprendiendo al menos una de estas composiciones al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 35
- Normalmente, una composición según la invención está adaptada para una administración por vía oral.
- La asociación, o la composición que la contiene, según la invención, puede estar según ciertos modos de realización en forma de complemento nutritivo o alimenticio. La o las composición(es) de la invención puede(n) presentarse particularmente en forma(s) de pastilla(s), polvo(s), liofilizado(s), gránulo(s), comprimido(s), cápsula(s), tableta(s), píldora(s), goma(s) de mascar, ampolla(s), jarabe(s), infusión(es), jugo, macerado(s), extracto seco, extracto blando o extracto hidroalcohólico.
- 40
- En un modo de realización particular, la asociación de la invención, o la composición que la contiene, se presenta en forma de productos lácteos, derivados de leche vegetales, productos derivados de frutas o legumbres, productos de cereales, materias grasas, derivados procedentes de productos del mar, particularmente derivados de pescado, bebidas o de platos cocinados.
- 45
- En un modo de realización particular, la asociación de la invención, o la composición que la contiene, además de los ingredientes activos (i) y (ii) anteriormente descritos, contiene al menos otro compuesto escogido entre el grupo constituido por sales de calcio inorgánicas, compuestos que contienen calcio, vitaminas, elementos minerales, fibras,

prebióticos, compuestos que aportan energía como, en particular, hidratos de carbono, proteínas o aminoácidos.

Salvo que se disponga explícitamente otra cosa, los diferentes modos de realización de la invención descritos en la presente solicitud, podrán ser considerados individualmente o en combinación de unos con otros.

Descripción de las figuras

5 Figura 1: Efecto sinérgico de la asociación de fisetina (5 μM) u DHA (50 μM) sobre la inhibición *in vitro* de la diferenciación de osteoclastos.

Figura 2: Efecto de la fisetina sobre la diferenciación de osteoblastos *in vitro*.

Figura 3: Efecto de la fisetina *in vivo* sobre la pérdida ósea.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a una asociación que comprende al menos fisetina y DHA o uno de sus derivados escogidos en forma de glicérido o fosfolípido, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de patologías o trastornos óseos.

15 En efecto, el solicitante ha demostrado que la asociación de fisetina y DHA tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición de la diferenciación de los osteoclastos. Particularmente, y como se ilustra en los ejemplos de la presente solicitud, la asociación fisetina/DHA tiene un efecto significativamente superior sobre la inhibición de la diferenciación de osteoclastos, al resultante de la adición de los efectos de la fisetina o DHA administrados individualmente. Esta asociación por tanto será particularmente útil para inhibir la reabsorción ósea en un hombre o un animal.

20 El solicitante ha descubierto también que la fisetina estimula la diferenciación y la actividad de los osteoblastos, a través de la activación del factor de transcripción Runx2 y favorece así directamente la formación ósea. La fisetina, y en particular la asociación que comprende al menos fisetina y DHA, o uno de sus derivados, puede por tanto ser utilizada también en ciertos modos de realización para estimular la formación ósea.

Ventajosamente, esta asociación está destinada por tanto a tratar o prevenir trastornos asociados a una pérdida ósea patológica y/o a un desequilibrio del metabolismo óseo.

25 En ciertos modos de realización la fisetina y el DHA, o uno de sus derivados, están presentes en la asociación de la invención (o en la composición que la contiene) según una relación (peso/peso) de fisetina/DHA que varía de 100/1 a 1/100, en particular de 50/1 a 1/50, de 20/1 a 1/50, de 10/1 a 1/50, de 10/1 a 1/10, de 1/1 a 1/50, o de 1/1 a 1/10.

Según ciertos modos de realización, la fisetina asociada a DHA o uno de sus derivados, como se describe con anterioridad, es utilizada como complemento nutritivo y, particularmente, está presente en una composición de uso nutritivo para un hombre o animal, particularmente un complemento alimenticio o un alimento.

30 Según otros modos de realización de la invención, la fisetina asociada con DHA o uno de sus derivados, como se describe con anterioridad, está en la forma de una composición farmacéutica para uso humano o veterinario. Normalmente, las composiciones según la invención comprenden además al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

35 En un modo de realización particular, la asociación según la invención, o la composición que la contiene, comprenderá únicamente como principios activos fisetina y DHA y/o uno de sus derivados escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido. Incluso más particularmente, los principios activos (i) y (ii) consistirán, respectivamente, en fisetina y DHA.

40 La fisetina, o fisetol, o 3,3',4',7-tetrahidroxiflavona nes un compuesto orgánico de la familia de los flavonoles, o una subfamilia de los flavonoides. Los flavonoles forman un subgrupo de flavonoides derivados de la 3-hidroxiflavona (3-hidroxi-2-fenilcromen-4-ona según la nomenclatura IUPAC) o flavonol, es decir, flavonoides que poseen un grupo hidroxilo fenólico en C3 y una función carbonilo en C=O en C4 en el heterociclo central de la cadena principal de base de los flavonoides. Estos son pigmentos vegetales de color amarillo, más o menos claros. Difieren en el nombre y en la posición del grupo hidroxilo fenólico-OH, a veces metilos (grupos metoxi).

45 Entre los flavonoles se pueden citar de forma no limitativa el quercetol, kaempferol, myricetol, azaleatina, galangina, gosipetina, herbecatina, isoramnetina, morina, miricetina, natsudaidaina, pachipodol, ramnazina, ramnetina, o

El ácido docosahexanoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado omega-3 con 22 átomos de carbono y que contiene 6 enlaces doble "carbono-carbono" correspondiente al ácido todo-cis- Δ -4,7,10,13,16,19-hexanoico o de referencia 22:6n-3.

5 La utilización del DHA ha sido descrita en el contexto del tratamiento o la prevención de la depresión (Kang JX, Gleason ED., CNS Neurol Disord Drug Targets. 4 de abril de 2013), del cáncer (Zhang G, Panigrahy D, Mahakian LM, Yang J, Liu JY, Stephen Lee KS, Wettersten HI, Ulu A, Hu X, Tam S, Hwang SH, Ingham ES, Kieran MW, Weiss RH, Ferrara KW, Hammock BD., Proc Natl Acad Sci U S A. 16 de abril de 2013; 110 (16): 6530-5. Epub 13 de abril de 2013), de resistencia a la insulina y de los trastornos asociados como trastornos de la atención y para el favorecimiento del desarrollo cerebral y cognitivo (Transler C, Eilander A, Mitchell S, van de Meer N., J Atten Disord. 14 de Noviembre de 2010; 14 (3): 232-46. Epub 24 de abril de 2010. Review; Schuchardt JP, Huss M, Stauss-Grabo M, Hahn A, Eur J Pediatr. 2010 Feb; 169 (2): 149-64. Epub 12 de Agosto de 2009), de patologías inflamatorias como artritis reumatoide (Calder PC., Br J Clin Pharmacol. Marzo de 2013; 75(3): 645-62.), de enfermedades autoinmunes como el lupus (Halade GV, Rahman MM, Bhattacharya A, Barnes JL, Chandrasekar B, Fernandes G., J Immunol. 1 de mayo de 2010; 184(9): 5280-6. Epub 5 de abril de 2010).

15 Según la invención, el DHA puede estar en forma libre y/o en forma de al menos de uno de sus derivados escogidos en forma de glicérido o de un fosfolípido, con la condición de que estos derivados estén en una forma fisiológicamente aceptables y posean la misma actividad biológica.

20 Entre los derivados de DHA se mencionan también los metabolitos y los precursores de DHA, lo análogos sintéticos o naturales de DHA así como sus sales fisiológicamente aceptables y/o sus formas esterificadas y/o oxigenadas (oxilipinas, mono-, di- y tri-hidroxi-DHA). Los derivados de DHA según la invención, es decir, los derivados de DHA escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido, son todos fisiológicamente aceptables y poseen una actividad biológica similar a la del DHA. Normalmente a la actividad biológica de un derivado de DHA según la invención puede ser evaluada como se ilustra en los resultados de la presente solicitud. En particular, un derivado de DHA presenta en asociación con fisetina, una actividad sinérgica que limita la diferenciación de los osteoclastos en cultivo (véase la figura 1).

Según la invención, el DHA podrá estar en forma de un glicérido o un fosfolípido, en el que podrá constituir también uno o varios residuos de ácidos grasos.

30 El término glicérido significa una molécula de glicerol (es decir, OHCH₂CHOHCH₂OH) en la que al menos uno de los tres grupos hidroxilos ha sido esterificado con ácido docosahexanoico. La invención comprende dDHA y sus derivados en forma de mono-, di- o tri-glicéridos, en los cuales, respectivamente, uno coma dos o los tres grupos hidroxilos han sido esterificados con ácido docosahexanoico. Para los di- o tri-glicéridos, los grupos hidroxilos son esterificados con un ácido graso omega-3 poliinsaturado (igual o no), de los que al menos uno es ácido docosahexanoico (DHA).

35 Como ejemplo se pueden utilizar en la invención los siguientes compuestos: fosfatidilcolina-DHA, lisofosfatidilcolina-DHA, fosfatidilserina-DHA, etc. (y de forma general cualquier derivado de DHA en forma de fosfolípido o glicérido). Se menciona también cualquier metabolito más o menos oxidado como RvD1 (ácido 7S,8R,17S-trihidroxidocosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico), PD1 (ácido 10R,17S-dihidroxidocosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoico), 17-HpDHA (ácido 17-hidroperoxidocosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico), 17-HDHA (ácido 17-hidroxidocosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico).

40 Los DHA y sus derivados según la invención pueden ser obtenidos mediante síntesis química o purificados a partir de productos naturales. Según los modos de realización de la invención, el DHA y/o sus derivados pueden estar en una forma más o menos purificada, particularmente en forma de uno o varios extractos o uno o varios productos naturales que los contienen.

45 De forma no limitativa, el DHA puede ser obtenido a partir de pescados grasos como salmón, trucha, atún, sardina, arenque, la caballa, la anchoa o el fletán; harinas de pescado, moluscos, frutos del mar, camarón, vieira, aceite de pescado y particularmente aceite de sábalo de hígado de bacalao, de arenque, de caballa, de sardina o de salmón, de tofu; de algas; de huevos; de despojos o de placenta; de gallina, calabaza, brócoli, de hojas de legumbres como lechuga, canónigos o espinacas; de germen de trigo, de legumbres secas como lentejas, guisantes o habas; de aceites vegetales como aceite de colza de maíz, de cáñamo, de girasol, de canola, de semilla de lino, de lino o de gérmenes de trigo; de granos como pipas de calabaza, de lino o de cáñamo; de soja, de chía de perilla, de arbusto elefante, de arándanos, de microalgas, de algas marrones, de fruto de acai, de espino amarillo o de nuez.

50 En ciertos modos de realización el DHA está en forma de un extracto de al menos uno de los productos naturales anteriormente citados.

La expresión “sal fisiológicamente aceptable” incluye las sales de compuestos de interés de la invención preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos, en función del sustituyente seleccionado para el compuesto de interés.

5 Ejemplos de ácidos de adición fisiológicamente aceptables comprenden ácido clorhídrico, ácido metano sulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Ejemplos de sales de adición fisiológicamente aceptables comprenden acetato, bencenosulfonato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, calcilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edicilato, estolato, lecilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarlanilato, exilresorcinato, hidrabamina, hidrobromuro, hidrocioruro, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mecilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, naxilato, mitrato, pamoato, pentotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tatrato, teoclato y tritiodita.

15 Mediante excipiente fisiológicamente aceptable se entiende cualquier sustancia, distinta de los principios activos, en una composición farmacéutica o nutritiva de la invención y no tóxica para el organismo al que es administrada. Los excipientes como se definen en la presente solicitud podrán tener en particular las características siguientes: Estabilizar el o los principios activos (los aglutinantes, diluyentes o conservantes) solubilizar el o los principios activos, permitir una disolución correcta y específica del o de los principios activos (los disgregantes), proporcionar una forma (pastilla, gel, gotas, líquido, etc.) o suministrar un soporte (por ejemplo, sólido o líquido) en relación con el modo de administración oral, inyectable (SC, IV, IM), transcutánea, etc.), proporcionar un sabor necesario (por ejemplo, edulcorantes), modificar la biodisponibilidad, la semivida, etc.

20 Como ejemplo se pueden citar los excipientes siguientes: aditivos, polvos, colorantes, agentes de carga, conservantes, enmascaradores del sabor, reguladores del pH, antioxidantes, agentes de textura, agentes de revestimiento, soportes, etc.).

25 De forma general, los excipientes según la invención están adaptados a una administración por vía oral. En ciertos modos de realización el o los principios activos (i) o (i) y (ii) de la invención están en uno o varios soporte(s) adaptado(s) para la administración por vía oral. Preferentemente, dicho soporte es un soporte alimenticio como se describe por posterioridad, en el contexto de las composiciones nutritivas.

El término “hidrato” se refiere a los compuestos formados mediante la adición de agua o sus elementos a una molécula dada (por ejemplo: la forma libre del compuesto) que incluye monohidratos, dihidratos, etc.

30 El término “solvato” se refiere a los solvatos fisiológicamente aceptables, siendo comprendida la solvatación como la interacción de un soluto con un disolvente que permite la estabilización de dicho soluto en la solución y en la que el estado solvatado corresponde a una dispersión en la solución de los átomos, iones o moléculas del soluto y su interacción con las moléculas de disolvente.

Por metabolitos, los compuestos estables procedentes de la transformación bioquímica de la molécula de interés por el metabolismo.

35 Por precursor se entienden los compuestos farmacológicamente inertes, que se convierten rápidamente de forma química o enzimática en una forma bioactiva del compuesto de interés en un medio fisiológico. Normalmente, los precursores son compuestos inactivos que pueden proporcionar el compuesto activo de interés una vez en el organismo específico.

40 La expresión “producto natural” se entiende en la presente invención que se refiere a los productos que existen o que derivan de vegetales, algas, animales, microorganismos, a diferencia de los productos o compuestos artificiales (o sintéticos) obtenidos mediante síntesis química en particular.

45 Según la invención, la fisetina, así como el DHA y/o uno de sus derivados, pueden estar en forma de un extracto de producto natural que contiene en particular productos de origen vegetal o animal. Cuando se trata de un extracto vegetal (y/o un alga), este extracto vegetal se obtiene normalmente mediante extracción sólido/líquido, ocasionalmente seguida de etapas de purificación. La extracción sólido-líquido se define como una operación de separación de los constituyentes contenidos en un cuerpo sólido mediante solubilización con un disolvente, por ejemplo, acuoso, o alcohólico. Mediante extracto vegetal se entiende también que están comprendidos según la invención las plantas (en totalidad o en partes) secas o deshidratadas y triturada o reducidas a polvo. Estos extractos pueden ser obtenidos mediante compresión, con o sin extracción mediante disolvente, expresión, hidrodestilación, extracción acuosa o alcohólica, filtración, fermentación o maceración. Esta lista no es en ningún caso limitativa. Los extractos según la invención pueden estar en forma de jugo, concentrado aromático, aceite, infusión de hierbas, infusión, macerado, extracto seco, material blando, extracto hidroalcohólico o liofilizado. Del

mismo modo, esta lista no es tampoco en ningún caso limitativa.

La expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad que es suficiente para ejercer la actividad nutritiva y/o terapéutica asociada, cuando es administrada a un sujeto. Esta cantidad depende del sujeto, del trastorno o de la patología que va a ser tratada y/o que se va a prevenir y del modo de administración. Puede ser determinada mediante operaciones rutinarias por un experto en la técnica.

Mediante tratamiento de una enfermedad, una patología o un trastorno se entiende la inhibición, es decir, la detención del desarrollo, la regresión, la desaparición de los síntomas, de las consecuencias y/o incluso de las causas de dicha patología o enfermedad o de dicho trastorno.

Mediante prevención de una enfermedad, una patología o un trastorno, se entiende la prevención de la aparición de dicha patología o enfermedad o de dicho trastorno, en un sujeto humano o animal en el que la enfermedad todavía no se ha manifestado.

La invención está destinada a una utilización humana o veterinaria, es decir, está destinada a ser administrada al hombre o a cualquier otro mamífero entre los cuales se pueden citar, por ejemplo, un mamífero doméstico como un perro o un gato, particularmente de raza pura o pedigrí, o incluso animales de crianza como caballos, en particular un purasangre y/o un caballo de carreras o bovinos, ovinos, caprinos o porcinos. Las especies aviares que desarrollan ciertos estados de alteraciones del esqueleto también pueden beneficiarse. Mediante individuo se entiende un hombre o un animal, en particular un hombre.

Mediante “estimulación de la formación del hueso, se entiende según la invención, la capacidad de, o de uno de sus derivados, para estimular la actividad de los osteoblastos y favorecer así la síntesis de la trama proteica del hueso y el depósito de minerales, sobre todo de calcio, sobre esta trama proteica, es decir estimular la mineralización del hueso, incluso denominada crecimiento óseo.

Mediante “inhibición de la reabsorción ósea” se entiende, según la invención, una inhibición de la actividad de destrucción del tejido óseo por los osteoclastos. Para comprobar que el aporte de fisetina asociado al DHA (y/o a uno de sus derivados) inhibe la respuesta ósea, el experto en la técnica puede medir la actividad inhibidora de la fisetina (y/o de uno de sus derivados) o de su asociación con el DHA (y/o a uno de sus derivados) sobre la inhibición *in vitro* de la diferenciación inducida por RANKL, las células precursoras de los osteoclastos (Raw264.7) en células multinucleares. Este ensayo es ampliamente utilizado por la comunidad científica (Kawaida R et al., J. Exp. Med., 2003, 197(8): 1029-35; Li J et al., PNAS, 2000, 97(4): 1566-71) y es un buen indicador de la actividad *in vivo* de un compuesto sobre la reabsorción ósea, como se ilustra en la parte experimental.

El aporte de fisetina, asociado al DHA y/o a al menos uno de sus derivados, a un organismo animal, induce simultáneamente una estimulación de la formación del hueso y una inhibición de la reabsorción ósea (principalmente a través de la acción sinérgica de la asociación fisetina/DHA), permitiendo estos dos mecanismos finalmente el crecimiento global de la mineralización ósea y, por tanto, de la densidad del hueso.

Para determinar si un sujeto presenta un estado de masa ósea reducida, es necesario en consecuencia un aporte de fisetina, asociado a DHA y/o al menos de uno de sus derivados, el experto en la técnica podrá consultar particularmente el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 1994 titulado “Assessment of fracture risk and its application to screening for post-menopausal osteoporosis” WHO Technical Series-843).

La festina asociada a DHA (y/o al menos a uno de sus derivados) o la composición que la (o que los) contiene está destinada a la prevención de la pérdida ósea y/o de un desequilibrio en la remodelación del tejido óseo en un hombre o animal.

La fisetina asociada al DHA (y/o al menos a uno de sus derivados) o la composición que la (o que los) contiene está destinada también a favorecer el crecimiento óseo en individuos jóvenes con el fin de obtener individuos que posean una elevada densidad ósea y, por tanto, un pico de masa ósea elevado. En particular, la fisetina (y/o al menos uno de sus derivados), ocasionalmente asociada al DHA (y/o al menos a uno de sus derivados) o la composición que la (o que los) contiene es útil durante la fase de crecimiento del hombre, así como de otros mamíferos.

La fisetina asociada al DHA (y/o al menos a uno de sus derivados), o la composición que la o que los contiene está destinada también a individuos que poseen síntomas de déficit óseo (es decir pérdida ósea) o que son susceptibles de padecer déficit óseo y/o un desequilibrio de relación entre la formación del hueso y la reabsorción ósea el cual si continúa induce una disminución de la masa ósea.

Una composición según la invención está destinada también a individuos que presentan síntomas de déficit óseo

resultante de una fractura, de una intervención quirúrgica o incluso una patología dental (particularmente en niños por defecto de mineralización de la dentina o del esmalte y en un adulto con posterioridad a un tratamiento con bisfosfonatos) (véase la publicación de Tripathi A et al., J Prosthodont. 2011, 20(7): 601-3 et Wittrant Y. et al., Biochim Biophys Acta. 2004, 1704(2): 49-57).

5 La fisetina asociada al DHA (y/o al menos a uno de sus derivados) o la combinación que la (o que los contiene) para un destino humano o veterinario según la invención es útil, en efecto, en el tratamiento y/o la prevención de patologías o de trastornos, asociados a una pérdida ósea y/o un desequilibrio entre la formación de hueso y la reabsorción ósea, como la pérdida ósea asociada al envejecimiento y/o la menopausia, la pérdida ósea como consecuencia de una patología como diabetes o la gran obesidad o debida a la toma de ciertos medicamentos como, en particular, corticoides, o la osteolisis observado en las proximidades de una prótesis, la enfermedad de Paget, enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseo primarios y secundarios (lesiones metastáticas del hueso), enfermedades osteolíticas hipercalcemia debida a un cáncer, patológicas dentales y periodontales y fracturas.

15 Normalmente la fisetina asociada a DHA (y/o a uno de sus derivados o a la composición que la (o que los contiene) está indicada para la prevención y/o el tratamiento de la osteopenia, la escasez ósea, la fragilización del tejido óseo y/o la osteoporosis.

20 Se ha mostrado también según la invención que la asociación de la fisetina y el DHA según la invención, induce una inhibición casi total de la formación de osteoclastos, sin que sea necesario añadir agentes auxiliares, contrariamente a numerosos compuestos anti-osteoporosis descritos en el estado de la técnica. Esta observación experimental subraya el interés de la asociación fisetina/DHA para inhibir la reabsorción ósea, ya que estos compuestos son biológicamente activos utilizados solos y no necesitan un cofactor de actividad.

Finalmente, de forma general, la fisetina, asociada a DHA, o a uno de sus derivados, puede ser utilizada en la prevención de patologías óseas para su efecto osteoprotector.

Modo de administración de una composición según la invención

25 Según la invención, la asociación que comprende al menos, como principios activos, (i) fisetina y (ii) DHA y/o uno de sus derivados escogidos en forma de un glicérido o un fosfolípido, puede estar en forma de al menos una composición que comprende además al menos un excipiente fisiológicamente aceptable. Esta composición puede adoptar diversas formas. De forma general está previsto:

30 (1) una composición que comprende al menos como principios activos (i) una cantidad eficaz de fisetina (ii) una cantidad eficaz de DHA y/o al menos uno de sus derivados.

35 Esta composición se denomina generalmente composición (o preparación) única y comprende generalmente al menos un excipiente fisiológicamente aceptable. En ciertos modos de realización, una composición única según la invención comprende únicamente como ingredientes activos (i) una cantidad eficaz de fisetina (ii) una cantidad eficaz de DHA y/o al menos uno de sus derivados. De forma preferida, dichos ingredientes activos son fisetina y DHA.

(2) la asociación o la composición que la contiene puede estar también en forma de un estuche o un producto de combinación que comprende al menos:

(i) al menos una cantidad eficaz de fisetina; y

(ii) al menos una cantidad eficaz de DHA y/o uno de sus derivados;

40 para una utilización secuencial, separada o simultánea en el tiempo.

Los ingredientes activos (i) y (ii) se suministran cada uno en una forma conveniente para una administración conjunta de uno con otro.

La expresión estuche, o producto de combinación, se utiliza en la presente memoria descriptiva como sinónimo de término cajita o kit y corresponde a un conjunto de productos presentados de forma conjunta.

45 De forma preferida, los ingredientes activos (i) y (ii) están, respectivamente, en forma de composiciones (a) y (b) que contienen al menos una al menos de las composiciones (a) o (b) que comprenden, además, al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

En un modo de realización particular de un producto de combinación según la invención, los ingredientes (i) y (ii) como se definen con anterioridad son los únicos principios activos de los productos de combinación. Incluso más particularmente, los ingredientes (i) y (ii) consisten en fisetina y DHA, respectivamente.

5 Según otro aspecto de la invención, está previsto un método de fabricación de una cajita, como se define con anterioridad, comprendiendo dicho método una etapa de acondicionamiento del ingrediente activo (i) y el ingrediente activo (ii) proporcionando así los dos ingredientes activos adaptados a una administración conjunta de uno con otro.

Las composiciones (a) y (b) como se definen con anterioridad pueden estar:

(i) en forma de composiciones separadas (es decir, independientes una de otra), posteriormente asociadas para una utilización en asociación de una con otra, en un contexto de un tratamiento de combinación;

10 (ii) presentadas conjuntamente en un mismo continente en forma de composiciones separadas en un acondicionamiento combinado para una utilización de una con otra en un contexto de tratamiento de combinación.

Una cajita según la invención podrá contener también instrucciones para la utilización de los componentes que contiene.

15 En el contexto de los productos de combinación en forma de cajita, la expresión "administración conjunta" según la presente invención incluye que los ingredientes activos (i) y (ii) de las composiciones (a) y (b) que comprenden, respectivamente, al menos (i) fisetina y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable; y (ii) al menos DHA o uno de sus derivados y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, son administrados de forma secuencial (es decir, sucesivamente de forma escalonada en el tiempo), separadamente y/o simultáneamente durante el período de tratamiento.

20 De acuerdo con el producto de combinación según la invención, la expresión "administración conjunta" incluye que los ingredientes activos (i) y (ii) del producto de combinación son administrados (ocasionalmente de forma repetida) ya sea de forma conjunta, ya sea separadamente, de forma suficientemente próxima en el tiempo, para permitir un efecto beneficioso sinérgico entre los dos componentes, como se define con anterioridad. La determinación de este efecto sinérgico dependerá en particular del efecto buscado y/o del paciente y/o de la formulación de los componentes.

25 Las composiciones según la invención pueden ser administradas por tanto de forma simultánea, en forma de una composición única o bien en forma de composiciones distintas. Cuando las composiciones son distintas, pueden ser administradas también de forma secuencial, por ejemplo, en momentos diferentes del día (así una composición que comprende al menos uno de los ingredientes activo (i) o (ii) podría ser administrada por la mañana y la otra podría ser administrada a medio día) y/o a frecuencias habituales.

30 La expresión "en asociación uno con el otro" incluye que uno u otro de las dos composiciones (a) o (b) puede ser administrada (ocasionalmente de forma repetida, incluso continua), antes, después y/o al mismo tiempo que la administración de la otra composición.

35 Por ejemplo, se puede prever que cada una de las composiciones (a) y (b) se administren en momentos diferentes del día o que una de las dos composiciones (a) o (b) se tome a una frecuencia diferente de la otra. Las dos composiciones pueden ser administradas por vía enteral, en particular por vía oral y/o por vía parenteral (intramuscular, intravenosa, intradérmica o subcutánea) según frecuencias diferentes o iguales. Una composición puede ser tomada mediante bolos habitualmente, por ejemplo, por la mañana o por la tarde y la otra composición de forma fraccionada en varias tomas habituales, por ejemplo, por la mañana y por la tarde e incluso por la mañana, mediodía.

40 Cuando los ingredientes activos (i) y (ii) están presentes en dos composiciones separadas (a) y (b), es posible también tomar dichos ingredientes según períodos diferentes o incluso tomarlos de forma secuencial (un tratamiento después de otro o simplemente en momentos diferentes del día). Como ejemplo, una composición (a) que comprende al menos (i) fisetina podría ser administrada de forma habitual a razón de tres veces al día y una composición (b) que comprende al menos DHA o uno de sus derivados, podría ser tomada habitualmente una vez al día.

45 La administración de un producto de combinación como se describe en la presente invención por tanto se podrá realizar de forma repetida, en forma de tratamiento, durante varios días o varias semanas (por ejemplo, 4 semanas). De forma ocasional, varios tratamientos sucesivos pueden ser realizados, por ejemplo, de 1 a 4, ocasionalmente interrumpidos por una pausa de una semana a tres meses.

50

En el contexto de un tratamiento preventivo, la administración de un producto de combinación según la invención se realiza normalmente de forma crónica.

5 Cuando el producto de combinación se presenta en forma de una cajita que comprende al menos una composición (a) y una composición (b) distintas, como las descritas con anterioridad, debe entenderse que las dos composiciones pueden estar en formulaciones iguales o similares y ser administradas según vías enterales o parenterales iguales o similares. De forma preferida, las composiciones según la invención están en una forma adaptada para la vía oral, no obstante, las composiciones pueden estar independientemente una de otra en una cualquiera de las formas sólidas o líquidas descritas con posterioridad.

10 En ciertos modos de realización de la invención, la fisetina (i) se administra a una dosis de 0,01 a 1 g/día, preferentemente de 0,1 a 1 g/día y el DHA (ii), o uno de sus derivados, es administrado a una dosis de 0,01 a 3 g/día, preferentemente de 0,1 a 1 g/día. Esta dosis habitual puede ser administrada en una o varias tomas.

Una composición según la invención que comprende al menos como principios activos (i) fisetina, asociada a (ii) DHA y/o a uno al menos de sus derivados, se puede encontrar en forma de una composición nutritiva o de una composición farmacéutica, como se describe con posterioridad.

15 Preferentemente, dicha composición comprende (i) fisetina, y (ii) DHA y/o uno al menos de sus derivados y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable. Según los modos de realizaciones de la invención, la fisetina y el DHA y/o uno al menos de sus derivados pueden ser los únicos principio activos estar asociados a otros principios activos que tienen o no la misma indicación terapéutica o nutritiva.

20 La Formulación de productos de combinación según la invención, así como la naturaleza y la cantidad de los ingredientes activos en la composición única o las composiciones de la cajita según la invención dependen de la finalidad terapéutica o nutritiva del tratamiento.

Composiciones nutritivas

25 La invención tiene también por objeto una composición nutritiva para su utilización para prevenir y/o tratar patologías que necesitan estimular la formación de huesos y/o inhibir la reabsorción ósea, caracterizada porque comprende, como compuesto(s) nutritivo(s) activo(s), (i) fisetina asociada (ii) DHA, o a uno de sus derivados escogidos en forma de glicérido o de fosfolípido.

Esta composición nutritiva puede estar destinada más particularmente:

30 • Estimular la formación del hueso en individuos jóvenes en fase de crecimiento, prevenir la pérdida ósea que se produce con el envejecimiento y/o con la menopausia y/o consecutivamente, a una patología como la diabetes o la gran obesidad y/o a la toma de ciertos medicamentos como corticoides;

• Prevenir o tratar trastornos asociados a un desequilibrio de relación entre la formación del hueso y la reabsorción ósea;

• Tratar un déficit óseo resultante de una fractura;

35 • Prevenir o tratar patologías escogidas entre la enfermedad de Paget pérdida ósea, patologías o trastornos asociados a una pérdida ósea como enfermedades dentales o periodontales, enfermedades, trastornos o afecciones osteolíticas como osteolisis observada en las proximidades de una prótesis y enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseos primarios y secundarios (lesiones metastáticas del hueso) y la hipercalcemia debida a un cáncer.

• Prevenir o tratar la osteopenia, la escasez ósea, la fragilización del tejido óseo o la osteoporosis.

40 Mediante "composición nutritiva" se entiende según la invención una composición como se describe con anterioridad, y que constituye una composición alimenticia o incluso un complemento alimenticio que no posee las características de un medicamento.

Una composición nutritiva según la invención está adaptada preferentemente a una administración oral.

45 Una composición nutritiva según la invención puede ser un alimento dietético utilizado para el mantenimiento de una buena salud del hombre o de un animal que la ingiere. Esta composición alimenticia se denomina también

habitualmente “alimento funcional” y está destinada a ser consumida ya sea como parte integrante del régimen alimenticio, es decir, como suplemento (o complemento) alimenticio, pero cuyo contenido en principio activo (i) fisetina asociado con (ii) DHA y/o uno al menos de sus derivados) implica una función fisiológica que va más allá del suministro de las necesidades nutritivas de base.

- 5 Una composición nutritiva según la invención, caracterizada porque comprende (i) fisetina, asociada con (ii) DHA (y/o uno al menos de sus derivados) como compuestos activos, se puede presentar en una gran diversidad de formas de composiciones alimenticias y de bebidas, comprendida la forma de productos lácteos, como leche y, particularmente leches infantiles y/o de crecimiento, yogures, postres lácteos, helados, quesos; diversas leches vegetales o de frutas, legumbre o algas como jugos, preferentemente jugos de frutas, ensaladas de frutas, compotas
- 10 de frutas, sopas, productos de cereales como pan, biscochos y pasteles, barras de cereales, cereales para el desayuno así como cereales infantiles, derivados de productos procedentes del mar, particularmente productos derivados de pescados, materias grasas como aceites o sustitutos de mantequilla, pastas para untar o incluso platos cocinados. Una composición podrá estar incluso en forma de postres, de productos de confitería, productos de sazonado de alimentos (particularmente especias y salsas), productos de confitería, etc.
- 15 Una composición nutritiva según la invención, caracterizada porque comprende (i) fisetina asociada con (ii) DHA (y/o al menos uno de sus derivados), como compuestos activos, se puede presentar también en forma de una gran diversidad de productos destinados a la alimentación animal, en particular para perros o gatos o incluso caballos o animales de crianza, ya estén en forma húmeda, en forma semihúmeda o en forma seca, particularmente en forma de croquetas.
- 20 La fisetina y el DHA, así como los derivados de DHA según la invención, se pueden encontrar en una forma más o menos purificada. Pueden ser obtenidos mediante síntesis química o purificados a partir de productos naturales que los contienen. En ciertos modos de realización, la fisetina y/o el DHA (o uno de sus derivados) son moléculas de síntesis; en otros modos de realización, la fisetina y/o el DHA (o uno de sus derivados) está en forma de extractos naturales que los contienen.
- 25 En particular, como ya se ha descrito con anterioridad, la fisetina o uno de sus derivados se puede encontrar en forma de extracto de fresa, mango, kiwi, melocotón, kaki, manzana, tomate, cebollas, pepino, ciertos árboles del género acacia (*Acacia greggii*, *Acacia berlandieri*), del árbol Quebracho colorado, del ciprés de Nootka (*Xanthocyparis nootkatensis*), de flores *Butea monosperma* (palash, lumbrera del bosque) y/o plantas del género Rhus. En ciertos modos de realización se utilizarán extractos de fresa, mango, de ciertos árboles del género acacia
- 30 (*Acacia greggii*, *Acacia berlandieri*), del árbol Quebracho colorado, del ciprés Nootka (*Xanthocyparis nootkatensis*), de flores *Butea monosperma* (palash, lumbrera del bosque) y/o de plantas del género Rhus.

El DHA o sus derivados según la invención se pueden encontrar en forma de extractos de pescados grasos como salmón, trucha, atún, sardina, arenque, caballa, anchoa, fletán; harinas de pescados; moluscos; frutos del mar; camarones; vieiras; aceite de pescado y particularmente aceite de sábalo, hígado de bacalao de arenque, de

35 caballa, de sardina o de salmón; tofu; algas; huevos; despojos o placenta; gallina; calabaza; brócoli; hojas de legumbres como lechuga, canónigos o espinacas; germen de trigo; legumbres secas como lentejas, guisantes o habas; aceites vegetales como aceite de colza, de maíz, de cáñamo, de girasol, de canola, de semilla de lino, de lino o de gérmenes de trigo; granos como pipas de calabaza, de lino o de cáñamo; de soja; de chía; de perilla; de arbusto elefante; de arándanos; de microalgas; de algas marrones; de fruto de acai, de espino amarillo y/o de nuez.

- 40 Una composición nutritiva según la invención, que se presenta en forma líquida o en forma sólida, particularmente en forma de polvo, pastilla, liofilizado, gránulo, comprimido, cápsula, jarabe, infusión, jugo o macerado, puede consistir por tanto en un producto de extracción obtenido a partir de al menos un compuesto natural como se describe con anterioridad, que comprende (i) fisetina y al menos un compuesto natural que comprende (ii) DHA (y/o uno de sus derivados). Una composición nutritiva según la invención puede comprender también un producto de
- 45 extracción obtenido a partir de dichos compuestos naturales.

Como ejemplo, una composición nutritiva según la invención se puede presentar en forma de un jugo, una infusión o un macerado de frutas y/o legumbres, en particular un jugo de fresa, mango, kiwi, melocotón, kaki, manzana, tomate, cebollas y/o pepino, preferentemente asociado con jugo de arándanos, fruto de acai, de calabaza, de brócoli, de hojas de legumbres como lechuga, canónigos o espinacas y/o espino amarillo.

- 50 Una composición nutritiva según la invención se puede presentar también en forma de una bebida, por ejemplo, agua mineral, a la que se añade un extracto de una composición natural que comprende (i) fisetina y a partir de al menos un compuesto natural que comprende (ii) DHA y/o al menos uno de sus derivados.

La utilización de principios activos (i) y (ii) de origen natural según la invención es extremadamente ventajosa, ya que los productos naturales que contienen estos principios activos, como las frutas y, particularmente, fresas,

- manzanas, mangos para la fisetina y el pescado y sus derivados (harinas, aceite), legumbre secas o nuez para el DHA están asociados una imagen de gran muy natural, es decir, productos alimenticios sanos, también transmisores de una sensación de placer. Este tratamiento nutritivo por tanto puede ser fácilmente incluido en el contexto de una alimentación equilibrada durante un período muy prolongado, característico de las afecciones crónicas. Además, estos compuestos pueden ser tomados directamente en el contexto de un tratamiento nutritivo, sin transformación y/o adición de sustancias complementarias.
- Además, estos compuestos naturales están fácilmente disponibles (pueden ser productos a gran escala en el contexto regional y/o europeo) y pueden ser fácilmente almacenados.
- En un modo de realización particular, la composición nutritiva de la invención comprende como compuestos nutritivos activos (i) y (ii) fisetina y DHA, respectivamente. Incluso más particularmente, dicha composición comprende fisetina y DHA como únicos compuestos nutritivos activos. Estos compuestos nutritivos activos (i) y (ii) pueden estar en una forma más o menos purificada, particularmente en forma de extractos naturales como se describió con anterioridad o pueden ser producidos mediante síntesis química. Incluso más particularmente, dicha composición comprende fisetina y DHA como únicos componentes nutritivos activos.
- Una composición nutritiva según la invención podrá estar en forma de una composición única o de un producto de combinación, como se describió con anterioridad.
- Preferentemente, una composición nutritiva, adaptada a un uso humano o veterinario según la invención, comprende una cantidad de fisetina adaptada para una administración oral habitual de 0,01 a 1 g, preferentemente de 0,1 a 1 y ocasionalmente una cantidad de DHA, y/o uno de sus derivados, de 0,01 a 3 g, preferentemente de 0,1 a 1 g.
- En ciertos modos de realización, la fisetina puede estar presente en una composición de la invención a un contenido (en peso con respecto al peso total de la composición) de uno a 98,9%, preferentemente a un contenido de 1 a 80%, de 1 a 50%, de 1 a 20% de 1 a 10%, de 1 a 5%, de 1 a 2%; igualmente el DHA o uno de sus derivados puede estar presente a un contenido de uno a 98,9%, de 1 a 80%, preferentemente a un contenido de 1 a 50%, de 1 a 20%, de 1 a 10% de 1 a 5% o de 1 a 2%.
- Preferentemente, una composición nutritiva, adaptada para un uso humano o veterinario según la invención comprenderá como principios activos al menos (i) fisetina y (ii) DHA y/o uno de sus derivados. Incluso preferentemente, esta composición contiene una relación de fisetina/DHA que varía de 100/1 a 1/100, en particular de 50/1 a 1/50, de 20/1 a 1/50, de 10/1 a 1/50, de 10/1 a 1/10, de 1/1 a 1/50 o de 1/1 a 1/10.
- Una composición nutritiva según la invención comprende además de los principios activos, al menos un excipiente o soporte fisiológicamente aceptable. Estos excipientes o soportes fisiológicamente aceptables han sido descritos con anterioridad. De forma preferida, estos están adaptados a una administración por vía oral. En ciertos modos de realización de una composición nutritiva según la invención, un soporte adaptado puede ser un soporte alimenticio, particularmente cuando las composiciones están en forma de composición alimenticia.
- Una composición nutritiva según la invención podrá estar en forma de una composición única o de un producto de combinación, como se describió con anterioridad.
- En un modo de realización, la composición nutritiva de la invención comprende como compuestos nutritivos activos (i) y (ii), fisetina y DHA, respectivamente.
- Según un modo de realización particular, dicha composición comprende fisetina y DHA como únicos compuestos nutritivos activos. Estos compuestos nutritivos activos (i) y (ii) pueden estar en una forma más o menos purificada, particularmente en forma de extractos naturales como se describió con anterioridad o pueden ser producidos mediante síntesis química. Incluso más particularmente, dicha composición comprende fisetina y DHA como únicos compuestos nutritivos activos.
- En otro modo de realización, una composición nutritiva según la invención puede comprender otros compuestos en combinación con (i) fisetina (ii) DHA (y/o uno de sus derivados). Estos compuestos adicionales están destinados, por ejemplo, a restablecer el equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea y/o a conservar o mejorar la salud ósea y/o a permitir una mejor asimilación por el organismo de los principios activos de la composición, mejorar el sabor o la consistencia de la composición.
- Como ejemplo, una composición nutritiva de la invención puede comprender de forma no limitativa al menos los compuestos mencionados con posterioridad.

- 5 La composición nutritiva según la invención puede comprender una fuente de calcio, por ejemplo en la forma de un compuesto orgánico o inorgánico fisiológicamente aceptable, como sales de calcio inorgánicas (cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de calcio o carbonato de calcio) o componentes orgánicos que contienen calcio como polvo de leche descremada, caseinato de calcio o incluso sales orgánicas de calcio (citrato de calcio, maleato de calcio o sus mezclas).
- La cantidad de calcio contenida en una composición nutritiva según la invención está adaptada para una administración cotidiana suministrada por dicha composición, comprendida entre 100 mg y 1000 mg, preferentemente entre 200 mg y 700 mg y de forma especialmente preferida entre 300 mg y 600 mg de calcio.
- 10 Una composición nutritiva según la invención puede comprender también vitaminas como vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina C, ácido fólico, tiamina, riboflavina, vitamina B6, vitamina B12, niacina, biotina o incluso ácido pantoténico.
- Una composición nutritiva según la invención puede comprender también elementos minerales y elementos residuales como sodio, potasio, fósforo, magnesio, cobre, zinc, hierro, selenio, cromo y molibdeno.
- 15 Puede comprender también fibras solubles como agar-agar, alginato, algarroba, carragenano, goma arábica, goma guar, goma de karaya, pectina o goma de xantano, estando estas fibras solubles en forma hidrolizada o no hidrolizada.
- Puede comprender también compuestos que aportan energía, por ejemplo, una o varias fuentes de hidratos de carbono escogidos entre maltodextrinas, almidón, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, xilitol, sorbitol o incluso proteínas, péptidos o aminoácidos.
- 20 Puede comprender también otros tipos de sustancias como, por ejemplo, fibras alimenticias, particularmente fibras insolubles y/o prebióticos.
- Además, una composición nutritiva según la invención puede comprender también aromas naturales o artificiales, por ejemplo, aromas de frutas como banana, naranja, melocotón piña o frambuesa u otros aromas vegetales como vainilla, cacao, café, etc.
- 25 En ciertos modos de realización de la invención, la asociación, o la composición que la contiene, comprende, además, como principio activo, ácido eicosapentanoico (EPA) o uno de sus derivados, es decir, los metabolitos y precursores del EPA, así como sus sales fisiológicamente aceptables y/o sus formas esterificadas y/o oxigenadas (oxilipinas, mono-, di- y tri-hidroxi-DHA). Mediante derivados de EPA se entiende igualmente las formas de glicéridos o fosfolípidos. Según este modo de realización, el EPA, o uno de sus derivados, podrá ser obtenido mediante
- 30 síntesis química o purificado a partir de un compuesto natural. Por tanto, el EPA podrá estar en una forma más o menos purificada, particularmente en forma de extracto natural que lo contiene.
- Composiciones farmacéuticas humanas o veterinarias según la invención
- La invención tiene también por objeto una composición farmacéutica humana o veterinaria para el tratamiento de patologías que necesitan una simulación de la forma del hueso, caracterizada porque comprende, como principio
- 35 activo, al menos (i) fisetina y (ii) DHA.
- Preferentemente, esta composición farmacéutica según la invención comprende al menos, como principios activos, (i) fisetina, (ii) DHA y/o al menos uno de sus derivados, y será así particularmente indicada para inhibir la reabsorción ósea en un hombre o animal.
- 40 Normalmente, una composición que comprende al menos como principios activos (i) fisetina y (ii) DHA y/o al menos uno de sus derivados y se utiliza para la prevención y/o el tratamiento de patologías que necesitan una inhibición de la reabsorción ósea, y/o la prevención o el tratamiento de una patología asociada a un desequilibrio del metabolismo óseo, es decir, una composición farmacéutica adecuada para inhibir la reabsorción ósea.
- Una composición farmacéutica según la invención comprende al menos, como principio activo, fisetina y DHA en una cantidad adaptada para estimular la formación del hueso.
- 45 De forma preferida, una composición farmacéutica según la invención comprende, como principio activo, fisetina y DHA y/o uno de sus derivados en cantidades suficientes para permitir un efecto sinérgico sobre la inhibición de la diferenciación de osteoclastos y, en consecuencia, sobre la inhibición de la reabsorción ósea.

Una composición farmacéutica según la invención puede ser útil también para estimular la formación en los huesos de individuos jóvenes (hombre o animales en fase de crecimiento) con el fin de aumentar la densidad ósea alcanzada al comienzo de la edad adulta y elevar la masa ósea máxima (pico de masa ósea) al comienzo de la edad adulta; prevenir la pérdida ósea asociada al envejecimiento y/o a ciertas patologías y/o a la toma de medicamentos; tratar un déficit óseo resultante de una fractura, provenir o tratar trastornos o patologías asociados a una pérdida ósea y/o a un desequilibrio de la remodelación ósea como la osteoporosis, enfermedad de Paget, en enfermedades dentales y periodontales, hipercalcemia debida a cáncer, enfermedades, trastornos o afecciones osteolíticas como la pérdida ósea o la osteolisis observada en las proximidades de una prótesis y enfermedades tumorales osteolíticas como la mayoría de los tumores óseos primarios y secundarios (lesiones metastáticas de los huesos); para tratar o prevenir la osteopenia, la fragilización del tejido óseo y/o la escasez ósea.

Se puede tratar de una composición farmacéutica humana o veterinaria. Una composición farmacéutica según la invención comprende al menos fisetina y DHA en asociación con al menos un excipiente escogido entre el grupo constituido por excipientes fisiológicamente aceptables. Preferentemente, una composición farmacéutica de la invención comprende como principio activo (i) fisetina y (ii) DHA o uno de sus derivados, en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

En un modo de realización, los principios activos (i) y (ii) de esta composición son, respectivamente fisetina y DHA.

En un modo de realización particular, los principios activos de esta composición consisten en fisetina y DHA o uno de sus derivados.

Los principios activos (i) y (ii) como se definen con anterioridad pueden estar en una forma más o menos purificada, obtenidos particularmente a partir de una síntesis química o en forma de extractos naturales que los contienen. Estos extractos han sido descritos también con anterioridad.

La composición farmacéutica según la invención se presenta en una forma adaptada para la administración oral o parenteral, particularmente por vía intravenosa (directamente o mediante perfusión), subcutánea, intradérmica o intramuscular. Las formulaciones y, particularmente, los excipientes serán adaptados por un experto en la técnica en función del modo de administración escogido.

Preferentemente, esta composición se presenta en una forma adaptada para una administración por vía oral.

En este modo de realización el (o los) excipiente(s), o el (o los) soporte(s) fisiológicamente aceptable(s), están adaptados para una administración por vía oral. Los adyuvantes, vehículos y excipientes fisiológicamente aceptables se describen también en la publicación titulada "Handbook of Pharmaceutical Excipients, Seconde édition, American Pharmaceutical Association, 1994.

Una composición farmacéutica según la invención se presenta de forma indiferente en una forma sólida o en una forma líquida. Han sido descritas con anterioridad diferentes formulaciones, así como excipientes fisiológicamente aceptables.

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

En forma líquida, se preferirá una composición farmacéutica en forma de una suspensión acuosa o una suspensión no acuosa o incluso en forma de una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua.

Las formas farmacéuticas sólidas pueden comprender, como vehículos, adyuvantes o excipientes, al menos un agente diluyente, un aroma, un agente solubilizante, un agente lubricante, un agente de suspensión, un agente aglutinante, un agente disgregante y un agente de encapsulación. Estos compuestos son, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, materiales celulósicos, manteca de cacao, etc. Las composiciones en forma líquida pueden comprender también agua, en su caso, mezclada con propilenglicol o polietilenglicol y, ocasionalmente, también agentes colorantes, aromas, estabilizantes y agentes espesantes.

Las técnicas de preparación de composiciones farmacéuticas según la invención se pueden encontrar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, en la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences, Mid. Publishing Co, Easton, PA, USA.

Para formular una composición farmacéutica según la invención, el experto en la técnica podrá consultar ventajosamente la última edición de la Farmacopea Europea o la Farmacopea de Los Estados Unidos de América

(USP).

El experto en la técnica en particular podrá consultar ventajosamente la cuarta edición "2002" de la Farmacopea Europea o incluso a edición USP 2-NF 20 de la Farmacopea Americana (U.S. Pharmacopeia).

5 Las relaciones de fisetina/DHA (o uno de sus derivados) así como las concentraciones de estos principios activos en las composiciones unitarias han sido mencionados en el contexto de composiciones nutritivas y generalmente están adaptadas también para composiciones farmacéuticas según la invención.

10 Como se mencionó con anterioridad, una composición de la invención, en particular una composición farmacéutica, puede comprender fisetina y DHA, o uno de los derivados de DHA escogido en forma de un glicérido o un fosfolípido y principios activos complementarios. Estos principios activos podrán tener una indicación igual a la fisetina o la asociación según la invención, bien tener una indicación terapéutica diferente. Preferentemente, en este modo de realización, los principios activos complementarios estarán destinados a prevenir o tratar patologías asociadas a un desequilibrio de la formación y la reabsorción ósea y, por tanto, a estimular la formación ósea y/o a inhibir la pérdida ósea.

15 Los principios activos complementarios han sido descritos particularmente en la parte relativa a las composiciones nutritivas y generalmente están adaptados para las composiciones farmacéuticas de la invención.

20 La invención se refiere también a un método para prevenir o tratar un trastorno asociado a un desequilibrio del metabolismo óseo, en particular un trastorno asociado a una pérdida de la masa ósea, comprendiendo dicho método una etapa en el transcurso de la cual se administra a los pacientes una cantidad terapéuticamente eficaz de fisetina asociada a una cantidad terapéuticamente eficaz de DHA y/o uno de sus derivados o incluso una composición farmacéutica que contiene fisetina asociada a DHA y/o uno de sus derivados.

La invención se ilustra, además, sin por ello limitarla, mediante los resultados experimentales siguientes.

Ejemplos

1 - Materiales y método

Reactivos

25 Los reactivos se adquirieron en la empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA: fisetina - ref F4043, DHA - ref D2534, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico, LPS serotipo 026:B6, hidroxipropilcelulosa, p-nitrofenil-fosfato, BSA), R&D Systems Europe Ltd (Abingdon, Royaume-Uni: RANKL), Extrasíntesis (Genay, France: fisetina - ref 1167 S), Invitrogen-Life technologies (Saint-Aubin, France : TRIZOL).

Cultivo celular

30 Los proteoblastos primarios se aislaron a partir de la cavidad craneana de ratas Wistar recién nacidas mediante digestión enzimática como se describió con anterioridad [Declercq, H., Van den Vreken, N., De Maeyer, E., Verbeeck, R., Schacht, E., De Ridder, L., and Cornelissen, M. (2004). Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 25, 757-68.]. Los precursores de osteoclastos RAW264.7 fueron obtenidos de la entidad ATCC (Manassas, VA, USA). Los Preosteoblastos y los RAW264.7 fueron cultivados en medio α -MEN (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) complementado con 10% de SVF descomplementado y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina.

Coloración TRAP

40 Para la coloración TRAP, se sembraron 60 mil células RAW264.7 en pocillos de placas de 12 pocillos durante 12 horas y seguidamente se trataron con DMSO/etanol como testigo o fisetina (5 μ M en DMSO) o DHA (50 μ M en etanol) o la combinación de los dos (fisetina 5 μ M y DHA 50 μ M) durante 3 horas. Las células fueron seguidamente inducidas a diferenciarse en presencia de RANKL (50 ng/ml), con DMSO/etanol o fisetina (5 μ M) o DHA (50 μ M) o una combinación de los dos (fisetina 5 μ M y DHA 50 μ M) durante 4 días con un cambio de medios después de 2 horas. Se utiliza BSA deslipidada y sin endotoxinas para solubilizar el DHA con una relación 1/5 (BSA/DHA).

45

Volumen (µl)	Testigo	RANKL	Fisetina	DHA	F/DHA
BSA 1mM	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
DHA 20 mM	0,0	0,0	0,0	25,0	25,0
ETOH	25,0	25,0	25,0	0,0	0,0
FISSETINA 5mM	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0
DMSO	10,0	10,0	0,0	10,0	0,0
RANKL 1000X	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0
SVF	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
αMEN	8865,0	8855,0	8855,0	8855,0	8855,0

La coloración de TRAP se realizó utilizando el estuche de ensayo "leukocyte acid phosphatase" (Sigma-Aldrich) según las recomendaciones del proveedor después de una fijación de las células. Seguidamente se hizo un recuento de las células TRAP + multinucleares.

5 Ensayos de mineralización

Se sembraron los preosteoblastos primarios a $1,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 12 pocillos tratadas con colágeno. Treinta y seis horas más tarde, las células fueron pretratadas con DMSO como testigo o con fisetina (1 a 5 µM) durante 12 horas, seguidamente se les indujo a diferenciarse con 25 µg/ml de ácido ascórbico y beta-glicerofosfato 5 mM en presencia de DMSO o fisetina (1 a 5 µM). Después de 17 días de cultivo con un cambio de los medios cada dos días, las células se fijaron con etanol al 70% y los depósitos de calcio se colorearon con una solución alizarina roja 40 mM (pH 4,2). La zona de intensidad de los nódulos se cuantificó utilizando el programa de ordenador ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Medición de la actividad ALP

Se sembraron preosteoblastos primarios a 3500 células mediante pocillos en placas de 96 pocillos tratadas con colágeno. Treinta y seis horas más tarde, las células fueron pretratadas con DMSO como testigo con fisetina (1 a 5 µM) durante 12 horas, seguidamente se les indujo a diferenciarse con 25 µg/ml de ácido ascórbico y beta-glicerofosfato 5 mM en presencia de DMSO o fisetina (1 a 5 µM). La actividad enzimática ALP se midió en cinética después de 0, 5, 7 y 12 días de tratamiento con un cambio de medios cada dos días. Las células fueron lisadas mediante ciclos de gel-desgel y los lisados se sometieron a homogeneización en 200 µl de tampón de hexahidrato de cloruro de magnesio, dietanolamina a un pH de 9,8. Los lisados celulares (10 µl) se añadieron a 200 µl de solución de p-nitrofenil-fosfato (16,2 mM) y se midió la absorbancia utilizando un lector de microplacas a 405 nm cada 90 segundos durante 30 minutos. Para cada muestra, se analizó la concentración de proteínas para expresar los resultados en forma de µmol de p-nitrofenol/hora/mg de proteínas.

RT-PCR cuantitativo

La extracción de los ARN totales (células femorales) se efectuó utilizando el reactivo TRIzol, la transcripción inversa (RT) se realizó por medio de un estuche de ensayo de síntesis de ADNc Dynamo (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y el análisis PCR en tiempo real se realizó con el dispositivo Mastercycler ep Realplex2 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Todos los valores fueron normalizados mediante GAPDH. Las secuencias de los oligoelementos utilizados son ALP F 5'-GGCCAGCTACACCACAACA-3' / ALP R 5'-CTGAGCGTTGGTGTATATGTCTT-3' / OCN F 5'-AGACTCCGGCGCTACCTT -3' / OCN R 5'-CAAGCAGGGTTAAGCTCACA-3' / COL1 F 5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3' / COL1 R 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3' / GAPDH F 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' / GAPDH R 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'.

Estudios de animales

A todo lo largo el estudio, los animales fueron alojados en un entorno controlado (ciclo de 12:12 h de luz-oscuridad, 20-22° C, 50-60% de humedad relativa, 1 ratón por jaula de plástico con acceso libre a agua. Los ratones C57BL/6J fueron entregados dos semanas antes del estudio para una aclimatación al ambiente experimental bajo régimen estándar semipurificado. Para todos los experimentos, los ratones de 8 semanas (n= 12/grupo) fueron cebados con el vehículo (1% de etanol, 0,2% de hidroxipropilcelulosa en agua destilada) o con fisetina (5 a 50 mg/kg en el vehículo) durante una semana. Seguidamente, para el experimento OWX, los ratones fueron pseudo-operados u ovariectomizados bilateralmente y recibieron habitualmente, mediante sonda, vehículo o fisetina durante 4 semanas. Al final del experimento, el suero, las trompas de Falopio, las tibias y los fémures se recogieron para ser analizados. Mediante un experimento de la pérdida ósea inducida por LPS, se inyectaron el vehículo (PBS) o el LPS (serotipo 026: B6, 25 mg/kg) por vía subcutánea al nivel de la cavidad craneana, una vez a la semana durante tres semanas bajo anestesia. Durante estas tres semanas, los ratones recibieron el vehículo 1% de etanol, 0,2 % de hidroxipropilcelulosa en agua destilada o bien fisetina habitualmente mediante sonda. Al final del experimento, es suero, las tibias y los fémures se recogieron para un análisis. Se realizaron experimentos similares y se interrumpieron 24 horas después de la primera inyección de LPS y se tomaron muestras de los fémures para una extracción de los ARN y el análisis de qRT-PCR.

Análisis de la BMD

El análisis morfológico óseo se efectuó utilizando un escáner eXplore CT 120 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Después de haber retirado los tejidos blandos, los fémures de la izquierda se colocaron en un tampón de PBS con 10% de formaldehído a 4°C durante una semana para ser analizados. La adquisición se compuso en 360 observaciones obtenidas mediante aumentos de las primeras recogidas durante una rotación completa del pórtilo, con una exposición de 20 MS/observación, siendo los parámetros del tubo de rayos X de 100 kv y 50 mA. Las imágenes se reconstruyeron por medio de un algoritmo de haz cónico modificado con un Vóxel isótropo de 0,045 x 0,45 x 0,45 mm³. La tomografía se analizó utilizando el programa de ordenador MicroView ® version 2.3 (GE Healthcare). Se utilizó un fantasma de calibración de hidroxiapatita (SB3, Gamex RMI, WI) para convertir los niveles de grises en valores de densidad ósea. El análisis de la densidad mineral ósea se realizó a nivel del hueso trabecular distal del fémur y la fracción volumétrica (BVF = volumen de hueso/volumen total) constituida en el centro del fémur sobre una zona cilíndrica (r = 0,7 mm), comenzando a 0,1 mm de la placa de crecimiento, de forma próxima y extendiéndose sobre 0,32 mm en la dirección próxima. La densidad mineral ósea se estima como una media de los niveles de grises convertidos en el interior de la zona de interés.

Análisis de la microarquitectura

Para efectuar una medición, la muestra se dispuso sobre una placa giratoria que puede ser desplazada automáticamente en sentido axial (no angular: 0,675°/reconstrucción de franja angular: 186,30°). Se colocó un filtro de aluminio (5 mm de grosor) entre la fuente de rayos X y la muestra. La microarquitectura (esponjosa secundaria) se analizó utilizando el dispositivo de rayos X micro-CT SkyScan 1072 (BRUKER-microCT, Kontich, Bélgica). Se obtuvieron fotos de 1024 x 1024 pixeles utilizando los parámetros de 37 kw y 215 µA. Según los parámetros de la cámara, los pixeles miden 5,664 µm que llevan a un vóxel de 1,817 x 10⁻⁷ mm³. El cálculo de los parámetros istomorfológicos se realizó utilizando los programas de ordenador ctan ® y Nrecon ® (versión 1.11. y 1.6.1.7 respectivamente).

Medición de la osteocalcina sérica

Los niveles de osteocalcina sérica, un marcador específico de la formación ósea, se midieron utilizando un ensayo ELISA de ratón según el protocolo del fabricante (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA, USA).

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como media ± desviación típica. Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza de Fisher (2 grupos) o bien de Newman-Kell (más de dos grupos) utilizando XLSTAT (Addinsoft, París, Francia). Los resultados se consideraron como significativos para p > 0,05.

2 - Resultados

Acción sinérgica de la asociación fisetina/DHA sobre la inhibición de la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL *in vitro*

La Figura 1 muestra que la citoquina *Receptor Activator of Nf-κB Ligand* (RANKL) induce la formación de células multinucleares positivas para el marcado de Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP o TRACP; Figura 1A) denominadas osteoclastos, de acuerdo con lo que se describió anteriormente por el laboratorio del solicitante

Wittrant Y Et al., Bone. 2008 42(6):1122-30). De forma coherente con la experiencia del solicitante, la presencia de fisetina 5 μ M ácido docosahexanoico (DHA) 50 μ M inhibe esta inducción hasta un valor de 45% y 23%, respectivamente (735 +/- 251 osteoclastos/cm² en la condición RANKL, 404 +/- 148 osteoclastos/cm² en la condición RANKL + fisetina, 564 +/- 259 osteoclastos/cm² en la condición RANKL + DHA). De forma innovadora, cuando la fisetina y el DHA se combinan, esta asociación anula casi totalmente la formación de osteoclastos (-97%; 735 +/- 251 osteoclastos/cm² en la condición RANKL, 24 +/- 24 osteoclastos/cm² en la condición RANKL + fisetina + DHA). Por tanto, estos datos demuestran claramente que la fisetina y el DHA no provocan solamente un concierto sino una sinergia para limitar la diferenciación de las células responsables de la reabsorción ósea. En efecto, la inhibición de la diferenciación osteoclástica mediante la combinación fisetina + DHA es superior a la suma de las inhibiciones de las moléculas aislada (45 + 23 = 68% < 97%; Figura 1B). El análisis estadístico muestra que solo los grupos "testigo" y "RANKL + fisetina + DHA" no son significativamente diferentes. En este contexto, las letras diferentes son atribuidas a grupos significativamente diferentes (a#b#c#d).

Acción de la fisetina *in vitro* sobre la diferenciación de osteoblastos

La Figura 2 se divide en tres entidades que permiten explorar diferentes propuestas relativas al análisis de la diferenciación de osteoblastos primarios. De acuerdo con la experiencia, la figura 2A muestra que la presencia de la combinación de ácido ascórbico (AA) y β -glicerofosfato (β GP) estimula la formación de nódulos mineralizados por osteoblastos después de 17 días de cultivo. De forma interesante, la adición de fisetina eleva esta mineralización de forma dependiente de la dosis con respecto a la condición "AA + β GP solos" (+ 62% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M; +105% para la condición AA + β GP + fisetina 2,5 μ M; + 169% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M). Conforme al análisis estadístico, (*) quiere decir significativamente diferente de la condición "testigo/no inducido" y (#) significativamente diferente de la condición "AA + β GP solos". Paralelamente, el análisis de la actividad alcalina fosfatasa (Figura 2B; actividad ALP), marcador específico de osteoblastos diferenciados, confirma una estimulación por la adición de fisetina, igualmente de forma dependiente de la dosis, con respecto a la condición "AA + β GP solos" representada por la línea de abajo en gris 10% (+32% para la condición AA + α GP+ fisetina 1 μ M - línea gris 25%; +63% para el estados AA + β GP + fisetina 2,5 μ M - línea gris 50%; 87% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M - línea negra). Conforme al análisis estadístico, (#) quiere decir significativamente diferente de la condición "AA + β GP solos". De forma coherente, el análisis del nivel de expresión de tres transcritos (Figura 2C) muestra una estimulación por la fisetina de la expresión de los marcadores de la diferenciación osteoblástica con respecto a la condición "AA + β GP solos" (+ 84% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 146% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el día 7; + 37% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 88% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el día 14 para la expresión de fosfatasa alcalina/63% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 177% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el D7; + 63% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 131% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el D14 para la expresión de osteocalcina/34% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 80% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el D7; 60% para la condición AA + β GP + fisetina 1 μ M y + 138% para la condición AA + β GP + fisetina 5 μ M en el D14 para la expresión de colágeno de tipo 1). Conforme al análisis estadístico, (#) quiere decir significativamente diferente de la condición "AA + β GP solos".

Acción de la fisetina *in vivo* sobre la pérdida ósea inducida por ovariectomía

La figura 3 muestra la capacidad potencial de prevención sobre la pérdida ósea de la fisetina sola; de acuerdo con la figura 1, ésta pone de manifiesto la capacidad potencial *in vivo* de la asociación "fisetina + DHA". En un modelo de múridos, la pérdida ósea es inducida por ovariectomía (Figura 3A). La pérdida ósea inducida por ovariectomía "OVX" es validada mediante la medición de la densidad mineral ósea (-15% con respecto a la condición testigo "SH"; Figura 3B; DMO trabecular). De forma interesante, la administración habitual de fisetina permite prevenir la pérdida ósea inducida por ovariectomía (solamente - 4% para la condición de fisetina 25 mg/kg con respecto a la condición testigo "SH"). De acuerdo con el análisis estadístico, (*) quiere decir significativamente diferente de la condición testigo "SH" y (#) significativamente diferente de la condición "OVX sin fisetina". El efecto preventivo de la fisetina sobre la pérdida ósea está validado también mediante la medición de los parámetros arquitectónicos. Como se ilustra en la tabla siguiente, el volumen óseo/volumen total, el número de trabéculas y el grosor de las trabéculas son significativamente más considerables en animales OVX + fisetina 25 mg/kg con respecto a los animales OVX (aumento respectivo de 20,37%, 16,31% y 3,55%).

	OVX	OVX + fisetina 25 mg/kg	Valor de p
Volumen óseo/volumen total (%)	13,40 ± 1,74	16,13 ± 0,96	0,034
Número de trabéculas	1,90 ± 0,22	2,21 ± 0,12	0,046

(mm-1)

Grosor de las trabéculas (μm)	70,35 \pm 1,295	72,85 \pm 1,563	0,049
Espacio inter-trabecular (μm)	285,68 \pm 54,69	265,50 \pm 29,41	0,540

De forma coherente, la proporción sérica de osteocalcina es estimulada también mediante la administración habitual de fisetina a 25 mg/kg que se plasma así en un aumento de la actividad de síntesis de la matriz ósea por los osteoblastos (61% con respecto a la condición testigo "SH" Figura 3C; osteocalcina sérica). De acuerdo con el análisis estadístico, (*) quiere decir significativamente diferente de la condición "SH".

5 Listado de secuencias

- <110> Institut National de la Recherche Agronomique INRA
- <120> Utilización de una asociación de dos compuestos para el tratamiento y/o la prevención de trastornos óseos
- <130> Z055PCT/EP
- <140> WO2014/187784
- <141> 2014-05-13
- <150> FR13/54275
- <151> 2013-05-13
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> ALP F 5'-3'
- <400> 1
- ggccagctac accacaaca 19
- <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> ALP R 5'-3'
- <400> 2
- ctgagcgttg gtgttatatg tctt 24
- <210> 3
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> OCN F 5'-3'
- <400> 3
- agactccggc gctacctt 18

ES 2 790 428 T3

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> OCN R 5'-3'

10 <400> 4
caagcagggt taagtcaca 20

<210> 5
<211> 21
15 <212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> COL1 F 5'-3'

20 <400> 5
catgttcagc ttgtggacc t 21

<210> 6
25 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
30 <223> COL1 R 5'-3'

<400> 6
gcagctgact tcaggatgt 20

35 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
40 <223> GAPDH F 5'-3'

<400> 7
45 aactttggca ttgtggaagg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

50 <220>
<223> GAPDH R 5'-3'

<400> 8
55 ggatgcaggg atgatgttct 20

REIVINDICACIONES

1. Asociación que comprende al menos
- (i) fisetina y
- (ii) ácido docosahexanoico (DHA), o uno de sus derivados escogidos en la forma de un glicérido o un fosfolípido,
- 5 para su utilización para el tratamiento y/o la prevención de trastornos asociados a una pérdida ósea y/o a un desequilibrio de la relación entre la formación y la reabsorción ósea.
2. Asociación para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque los derivados de DHA están en forma de un glicérido y en forma de mono-, di- o tri-glicéridos.
3. Asociación para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para inhibir la reabsorción ósea y/o para estimular la formación ósea y/o para prevenir o tratar la osteopenia, la escasez ósea, la fragilización del
- 10 tejido óseo o la osteoporosis.
4. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque los trastornos asociados a una pérdida ósea y/o a un desequilibrio de la relación entre la formación y la reabsorción ósea se escogen entre una pérdida ósea asociada al envejecimiento y/o a la menopausia, pérdida ósea consecuencia de ciertas patologías o de la toma de medicamentos, osteolisis observada en las proximidades de una prótesis, pérdida ósea asociada a patologías dentales o periodontales, enfermedad de Paget, enfermedades tumorales osteolíticas, hipercalcemia debida a cáncer y fracturas.
- 15
5. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la fisetina y/o el DHA o uno de sus derivados están en forma de un extracto natural que lo contienen.
- 20
6. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque contiene una relación de fisetina/DHA de 100/1 a 1/100.
7. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque (i) la fisetina es administrada a una dosis de 0,01 a 1 g/día y (ii) el DHA, o uno de sus derivados, es administrado a una dosis de 0,01 a 3 g/día.
- 25
8. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque está en forma de un producto de combinación que comprende al menos:
- a) una cantidad eficaz de fisetina y
- b) una cantidad eficaz de DHA o uno de sus derivados;
- para una utilización secuencial, separada o simultánea en el tiempo.
- 30
9. Asociación para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque es formulada en forma de al menos una composición que comprende al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
10. Asociación para su utilización según la reivindicación 9, caracterizada porque está en forma de al menos dos composiciones (a) y (b) que comprenden, respectivamente, al menos una cantidad eficaz (i) de fisetina y al menos una cantidad eficaz (ii) de DHA o uno de sus derivados;
- 35 comprendiendo al menos una de dichas composiciones al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
11. Composición que comprende una asociación para su utilización según una de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizada porque está adaptada para una administración por vía oral.
12. Composición que comprende una asociación para su utilización según la reivindicación 11, caracterizada porque dicha composición se presenta en forma de una pastilla, polvo, liofilizado, gránulo, comprimido, capsula, jarabe,
- 40 infusión, jugo, macerado, extracto seco, extracto blando o extracto hidroalcohólico.

13. Composición que comprende una asociación para su utilización según la reivindicación 12, caracterizada por dicha composición se presenta en forma de producto lácteo, derivado de leches vegetales, producto derivado de frutas o legumbres, producto derivado de pescados, producto de cereales, materia grasa, plato cocinado o bebida.

5 14. Composición que comprende una asociación para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque contiene además al menos un compuesto escogido entre el grupo constituido por sales de calcio inorgánicas, compuestos que contienen calcio, vitaminas, elementos minerales, fibras, prebióticos o compuestos que aportan energía.

Figura 1
RANKL

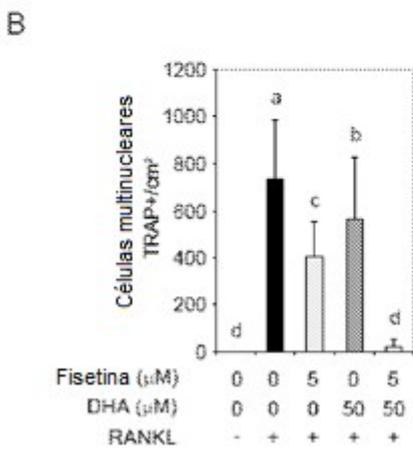
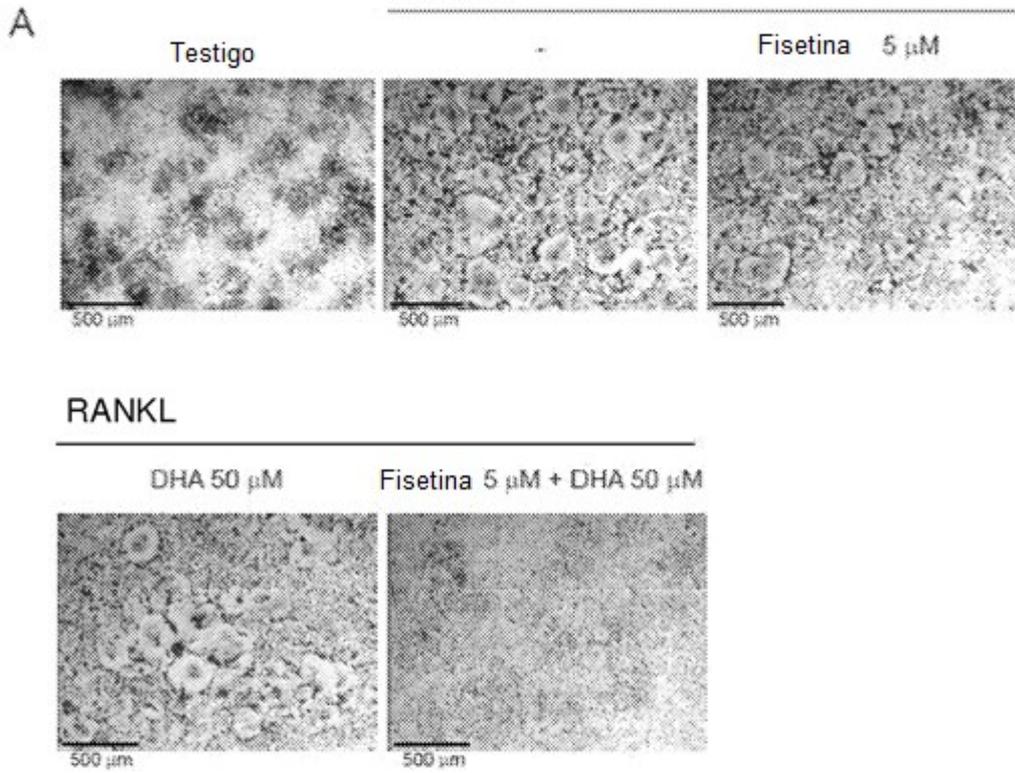


Figura 2

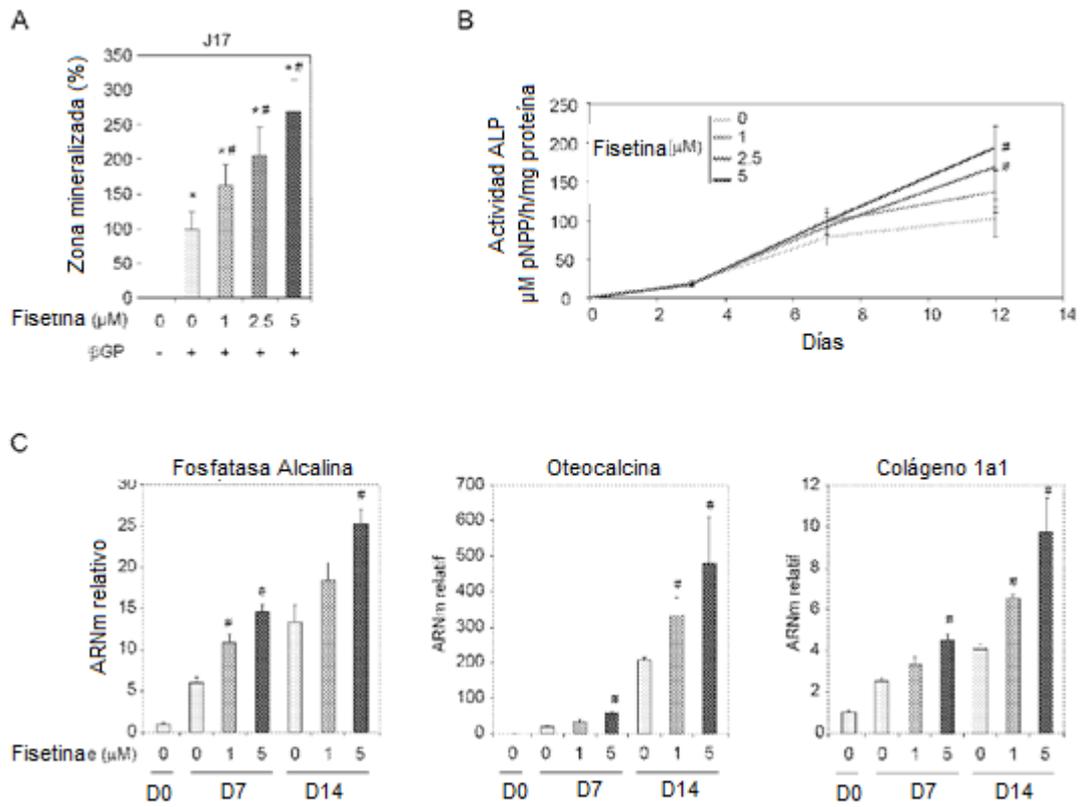


Figura 3

