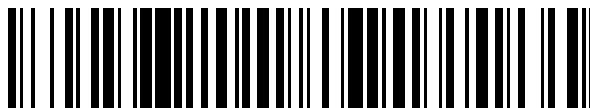


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 528 331**

(21) Número de solicitud: 201331232

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/045** (2006.01)

**A61K 31/575** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación:

**06.08.2013**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**06.02.2015**

Fecha de la concesión:

**25.11.2015**

(45) Fecha de publicación de la concesión:

**02.12.2015**

(73) Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
PUERTA DEL HIERRO (33.3%)  
C/ Joaquín Rodrigo, 2  
28222 Majadahonda (Madrid) ES;  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (33.3%) y  
HERO, AG (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**GRANADO LORENCIO, Fernando;  
ALEGRÍA TORÁN, Amparo;  
BARBERÁ SÁEZ, Reyes;  
GARCÍA LLATAS, Guadalupe;  
LAGARDA BLANCH, M<sup>a</sup> Jesús y  
SÁNCHEZ SILES, Luis Manuel**

(74) Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

(54) Título: **Composición con efecto en la salud ósea y cardiovascular**

(57) Resumen:

La presente invención hace referencia a una composición que comprende beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y, de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención además comprende el uso de dicha composición para la manufactura de un medicamento; en concreto de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de osteoporosis y enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, la presente invención también comprende un producto comestible, preferentemente como suplemento dietético, que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y cantidades adecuadas de otros ingredientes comestibles, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

|                |                |          |                |                |          |                |                |
|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|
| t <sub>0</sub> | t <sub>4</sub> |          | t <sub>0</sub> | t <sub>4</sub> |          | t <sub>0</sub> | t <sub>4</sub> |
| Composición 1  |                | Descanso | Composición 2  |                | Descanso | Composición 3  |                |

Figura 1

ES 2 528 331 B1

## DESCRIPCIÓN

### COMPOSICIÓN CON EFECTO EN LA SALUD ÓSEA Y CARDIOVASCULAR

#### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende beta-criptoxantina y esteroides vegetales, y al uso de la misma para la elaboración de un medicamento, producto comestible o un suplemento dietético para el tratamiento y/o prevención de  
10 enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

#### **Estado de la técnica**

La osteoporosis es una enfermedad que ocasiona la disminución de la resistencia y el  
15 aumento de la fragilidad de los huesos, provocada por la disminución global del tejido que lo forma. Esta afección se produce típicamente en mujeres amenorreicas o postmenopáusicas debido a la baja producción de estrógenos y otras hormonas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades vasculares se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos.

20 Un punto de unión para ambas dolencias son las causas por las que se desarrollan. Según la OMS, las principales causas son el consumo de tabaco, la falta de actividad física y una dieta poco saludable, además de la causa hormonal femenina.

25 Además, las fracturas ocasionadas por la osteoporosis, tales como las fracturas de cadera, ocasionan complicaciones como trombosis venosa profunda y tromboembolismo, lo que representa un aumento del riesgo cardiovascular.

La osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares, aumentan considerablemente la  
30 tasa de mortalidad y disminuyen la calidad de vida (Brenneman SK, Barrett-Connor E, Sajjan S, Markson LE, Siris ES. Impact of recent fracture on health-related quality of life in postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. 2006, Vol. 21, No 6, páginas. 809-16. doi:10.1359/jbmr.060301).

35 Existen en el mercado productos lácteos con esteroides vegetales añadidos, desarrollados para reducir factores de riesgo cardiovascular. Se han realizado diversos

meta-análisis que ponen en evidencia la reducción del colesterol-LDL (c-LDL) tras el consumo de esteroides vegetales (Demonty, I, Ras, RT, van der Knaap, HCM, Duchateau, GMJE, Meijer, L, Zock, PL, Geleijnse, JM, Trautwein, EA. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol. intake. J. Nutr. 2009, Vol. 139, No 2. páginas 271-284).

Estudios epidemiológicos recientes relacionan dietas ricas en carotenoides, en general, y beta-criptoxantina, en particular, que tienen actividad provitamínica A y actividad osteogénica *in vitro*, con buena salud ósea (Yamaguchi, M.  $\beta$ -Cryptoxanthin and bone metabolism: the preventive role in osteoporosis J. Health Sci. 2008 Vol 54 No. 4, páginas. 356-369); y estudios que relacionan inversamente la baja ingesta y/o concentraciones séricas de beta-criptoxantina con diferentes patologías óseas y densidad mineral ósea (Maggio, D, Polidori, MC, Barabani, M, Tufi, A, Ruggiero, C, Cecchetti, R, Aisa, MC, Stahl, W, Cherubini, A. Low levels of carotenoids and retinol in involuntal osteoporosis Bone 2006 Vol 38 No. 2, páginas 244-248). De hecho, en humanos, la suplementación dietética con zumos de fruta enriquecidos con beta-criptoxantina aumenta los niveles de biomarcadores circulantes de formación ósea (como la osteocalcina y osteocalcina-gamma-carboxilada) y disminuye los biomarcadores circulantes de resorción ósea, tales como la fosfatasa ácida tartrato resistente (Yamaguchi, M, Igarashi, A, Morita, S, Sumida, T, Sugawara, K. Relationship between serum  $\beta$ -cryptoxanthin and circulating bone metabolic markers in healthy individuals with the intake of juice (*Citrus unshiu*) containing  $\beta$ -cryptoxanthin J. Health Sci. 2005 Vol 51, No. 6, páginas 738-743)

Por tanto, dado que tanto la osteoporosis como las patologías cardiovasculares se desarrollan conjuntamente, en parte porque tienen causas desencadenantes comunes, y dado que la osteoporosis conlleva un incremento de la comorbilidad por patologías cardiovasculares secundarias, existe claramente una necesidad permanente de desarrollar composiciones que permitan mejorar ambas patologías conjuntamente.

## Descripción de la invención

### Definiciones

En la presente invención el término "osteoporosis" designa tanto a la enfermedad sistémica que afecta al esqueleto que cursa con una disminución de la densidad ósea y

una alteración de la estructura microscópica del tejido óseo que predispone a la aparición de fracturas, de manera espontánea o tras traumatismos mínimos, como a la osteopenia o condición caracterizada por baja densidad ósea.

- 5 A los efectos de la presente invención, la expresión “enfermedades cardiovasculares” designa aquellas enfermedades que se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos. Incluye, sin carácter limitante, cardiopatías coronarias, enfermedades cerebrovasculares, aumento de la tensión arterial o hipertensión, vasculopatías periféricas, cardiopatías reumáticas, cardiopatías congénitas e insuficiencia cardiaca.
- 10 En la presente invención, el término “composición” es usado para designar cualquier mezcla que comprenda al menos dos componentes.

En la presente invención, las expresiones “suplemento dietético”, “suplemento nutricional” y “alimento funcional” se usan indistintamente. A los efectos de la presente invención, por la expresión “alimento funcional” nos referimos a un alimento que  
15 comprende un ingrediente que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales, en el sentido de ser relevante para un óptimo estado de salud o para la reducción del riesgo de padecer una enfermedad.

A efectos de la presente invención, por la expresión “cantidad efectiva” se entiende una  
20 cantidad de agentes activos suficientemente alta para conseguir el efecto deseado beneficioso descrito en la invención, pero suficientemente baja para evitar efectos adversos serios indeseables en el ámbito de los conocimientos médicos. La dosis efectiva puede ser alcanzada en una sola toma o en varias tomas, separadas o no temporalmente.

25

En la presente invención, el término esteroides vegetales incluye fitosteroides y fitostanoles.

#### Breve descripción de la invención

30

La presente invención soluciona el problema planteado en el apartado anterior mediante una composición para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención, han observado que los  
35 compuestos beta-criptoxantina y los esteroides vegetales, campesterol, beta-sitosterol,

estigmasterol, sitostanol y campestanol, actúan sinérgicamente, como se muestra en la Tabla 3 de la presente invención.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a una  
5 composición sinérgica a base de ingredientes bioactivos naturales. En concreto, el primer aspecto de la invención se trata de una composición que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, stigmasterol, sitostanol y campestanol y de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 A la vista de lo anterior, un segundo aspecto de la invención es el uso de cualquier composición de la invención para la manufactura de un medicamento.

E igualmente, un tercer aspecto de la presente invención es el uso de cualquier  
15 composición de la invención para la manufactura de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de osteoporosis y enfermedades cardiovasculares.

Estos dos últimos aspectos de la invención también pueden ser formulados como  
20 composición de la invención para su uso como medicamento; y composición de la invención para la prevención y/o tratamiento de osteoporosis y enfermedades cardiovasculares.

Igualmente, estos dos últimos aspectos de la invención también pueden ser  
alternativamente formulados como un método para la prevención y/o tratamiento de  
osteoporosis y enfermedades cardiovasculares en un animal, incluyendo un hombre,  
25 que comprende la administración a dicho animal de una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones definidas en la presente invención.

La composición de la invención se puede formular como productos comestibles,  
farmacéuticos o veterinarios, en el que la beta-criptoxantina y los esteroides vegetales,  
30 campesterol, beta-sitosterol, stigmasterol, sitostanol y campestanol se mezclan con otro(s) agente(s) activo(s) y/o excipiente(s) farmacéutico(s) o veterinario(s) aceptable(s) (en el caso de un producto farmacéutico o veterinario) o con aditivos adecuados (en el caso de productos comestibles). En una realización preferida de la invención, los productos farmacéuticos y veterinarios contienen uno o más agentes activos  
35 adicionales.

La composición de la invención puede ser también incluida en una variedad de productos comestibles ("*edible products*" en inglés), como por ejemplo, y sin carácter limitante, productos lácteos, yogur, cuajada, queso (tipo quark, cremoso, etc.), leche fermentada, leche en polvo, producto a base de leche fermentada, helado y un alimento para mascotas. La expresión "producto comestible" se utiliza aquí en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que puede ser ingerida por un animal, pero excluyendo productos farmacéuticos y veterinarios.

Dentro de los productos comestibles, son particularmente interesantes los suplementos dietéticos. En el sentido de la presente invención, los suplementos dietéticos incluyen los nutracéuticos, extractos de alimentos que tienen efectos medicinales en la salud humana. Forraje para los alimentos de origen animal también se incluyen en el alcance de la invención. Las composiciones de la invención pueden ser usadas también como ingredientes de otros productos alimenticios.

Si la composición de acuerdo con la invención se utiliza como un suplemento dietético, se puede administrar como tal, se puede mezclar con un líquido bebible adecuado, como el agua, yogur, leche o jugo de fruta, o se puede mezclar con un alimento sólido o líquido. En este contexto, el suplemento dietético puede estar en la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, pastillas, dulces, jarabes y formas de administración correspondientes, generalmente en la forma de una dosis unitaria o múltiple dosis. Preferiblemente, la composición de la invención se administra en la forma de comprimidos, cápsulas o polvos, fabricados en procesos convencionales de la preparación de productos farmacéuticos.

En consecuencia, un cuarto aspecto de la presente invención es un producto comestible que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles, donde el producto comestible es un suplemento dietético. En definitiva, el uso de cualquiera de las composiciones de la presente invención para la elaboración un alimento funcional o complemento alimentario.

El producto comestible del cuarto aspecto de la invención no comprende conjuntamente leche desnatada, concentrado de zumo de mandarina y de uva y puré de plátano.

## Descripción de las figuras

La figura 1 muestra esquemáticamente la pauta y tiempos de administración de las composiciones del ejemplo 1, donde  $t=4$  corresponde a un período de 4 semanas de administración de la composición y  $t=0$  corresponde al inicio de la administración de la composición, que coincide con el final del intervalo de 4 semanas sin administración, siendo la duración total del estudio de 20 semanas.

## Descripción detallada de la invención

10

Como se ha indicado en el apartado anterior, la presente invención comprende composiciones con una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El efecto sinérgico de las composiciones de la invención a nivel de osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, se muestra en la reducción de los biomarcadores de riesgo cardiovascular, como se recoge en las Tablas 3 y 4.

En una realización particular de la presente invención, la cantidad de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol, al día ingeridas es de 500-1500  $\mu\text{g}$  de beta-criptoxantina/día/, durante un período de tiempo suficiente para conseguir el efecto sinérgico de la invención. En una realización aún más preferida de la invención, dicha composición se caracteriza porque la cantidad total de beta-criptoxantina es de 600-900  $\mu\text{g}$ .

En otra realización preferida de cualquier de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente, la cantidad total de campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol es de 1.3-3 g. Preferiblemente, la cantidad total de campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol es de 1.3-1.9 g. En una realización preferida de la presente invención, el intervalo de tiempo es de 4 semanas.

En otra realización más particular de la presente invención, las cantidades de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol ingeridas son de 620-840  $\mu\text{g}$  de beta-criptoxantina/día y de 1,3-1,9 g de campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol/día, durante un período de tiempo suficiente para conseguir el efecto sinérgico de la invención.

En otra realización más particular de la presente invención, la cantidad de los mencionados esteroides vegetales ingeridos es de 70-200 mg/día de campesterol, 15-50 mg/día de estigmasterol, 800-2300 mg/día de beta-sitosterol, 150-400 mg/día de sitostanol y 15-50 mg/día de campestanol.

En otra realización aún más preferida de la invención, las cantidades ingeridas para cada uno de los esteroides vegetales de la composición de la invención son: 78-107 mg/día de campesterol, 20-29 mg/día de estigmasterol, 1013-1526 mg/día de beta-sitosterol, 182-207 mg/día de sitostanol y 16-25 mg/día de campestanol.

En una realización aún más preferida de la presente invención, dicho intervalo de tiempo es de 4 semanas.

A continuación se describen algunos ejemplos que muestran, sin limitación, realizaciones específicas de la presente invención.

*Ejemplo 1. Preparación de las composiciones de los ejemplos*

Las composiciones de los ejemplos de la presente invención fueron preparadas en forma de bebida líquida (250 ml).

Se desarrollaron tres tipos de composiciones:

Composición 1: 750 µg de beta-criptoxantina.

Composición 2: 1.5 g de esteroides vegetales; en concreto 90,6 mg de campesterol, 25,25 mg de estigmasterol, 1296,92 mg de beta-sitosterol, 20,92 mg de campestanol y 41,06 mg de sitostanol.

Composición 3: 750 g de beta-criptoxantina y 1.5 g de esteroides vegetales, en concreto: 90,6 mg de campesterol, 25,25 mg de estigmasterol, 1296,92 mg de beta-sitosterol, 20,92 mg de campestanol y 41,06 mg de sitostanol.

Para la preparación de la composición 3, en un tanque los anteriormente mencionados esteroides vegetales microencapsulados dispersables en medio acuoso, se mezclaron

con extracto de mandarina concentrado para alcanzar el nivel de beta-criptoxantina deseado y se reconstituyó usando una mezcladora de alta velocidad. La mezcla resultante se calentó a 70°C y se homogenizó a 150 bares en dos etapas: 100 y 50 bares. Tras la homogeneización el producto resultante se pasteurizó a 90°C durante 30s y se envasó asépticamente en tetrabricks de 250mL. El proceso y condiciones fueron las mismas para las composiciones 1 y 2, pero sin adicionar la beta-criptoxantina en el caso de la composición 2, en la que como se ha indicado anteriormente, los esteroides vegetales en forma de polvo, insolubles en agua, fueron incorporados a las composiciones microencapsulados, para ser dispersado en medio acuoso.

El contenido en beta-criptoxantina de las composiciones 1 y 3 se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y detección mediante red de fotodiodos (Waters Associates, Milford, MA) a una longitud de onda de 450 nm y la identificación mediante comportamiento cromatográfico (tiempo de retención) comparado con patrones auténticos y espectro UV-VIS on-line.

Los esteroides vegetales fueron determinados por cromatografía de gases, con detector de ionización de llama (FID) y confirmada su identificación por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.

Tabla 1. Contenidos de beta-criptoxantina en las composiciones 1 y 3, expresadas como media, y en paréntesis el intervalo de confianza al nivel de probabilidad del 95%

|                     | Composición          |    |                      |
|---------------------|----------------------|----|----------------------|
|                     | 1                    | 2  | 3                    |
| β-Criptoxantina(μg) | 750<br>(627.5-872.5) | -- | 747.5<br>(655-842.5) |

*Ejemplo 2: Estudios de biodisponibilidad in vitro de las composiciones del ejemplo 1*

En la tabla 2 se muestra la bioaccesibilidad de la beta-criptoxantina y de los esteroides vegetales totales e individuales de las composiciones 1, 2 y 3 del ejemplo 1.

5 Tabla 2. Bioaccesibilidad (%), expresada como media y en paréntesis el intervalo de confianza al nivel de probabilidad del 95%.

|                    | Composición   |                     |                     |
|--------------------|---------------|---------------------|---------------------|
|                    | 1             | 2                   | 3                   |
| beta-criptoxantina | 83<br>(70-93) | --                  | 90<br>(84-97)       |
| Campesterol        | --            | 8.31<br>(6.70-9.93) | 6.66<br>(5.99-7.33) |
| Estigmasterol      | --            | 5.96<br>(4.47 7.45) | 4.02<br>(3.75-4.29) |
| Sitosterol         | --            | 6.42<br>(5.18-7.66) | 4.15<br>(4.05-4.25) |
| Campestanol        | --            | 6.82<br>(5.40-8.24) | 5.79<br>(4.42-7.16) |
| Sitostanol         | --            | 6.05<br>(4.29-7.81) | 4.41<br>(4.16-4.66) |
| EV totales         | --            | 6.48<br>(5.19-7.77) | 4.35<br>(4.20-4.50) |

EV= esteroides vegetales

10 Los intervalos de confianza de la Tabla 2 muestran que no hay diferencias en la biodisponibilidad *in vitro* cuando las beta-criptoxantina y los esteroides vegetales de las composiciones están solos (composición 1 y 2, respectivamente) o juntos (composición 3).

### *Ejemplo 3: Evaluación de la biodisponibilidad in vivo*

15 Se proporcionaron las tres composiciones del ejemplo 1 a 36 sujetos. En concreto, se seleccionaron mujeres en edad post-menopáusica, grupo de alto riesgo de desmineralización ósea y desarrollo de enfermedad cardiovascular. La selección se realizó mediante muestreo no-probabilístico. Se administró cada una de las  
20 composiciones del ejemplo 1 una vez al día durante 4 semanas (t=4), dejando un

intervalo de 4 semanas sin administración ( $t=0$ ), antes de administrar otra composición del ejemplo 1. La asignación de los sujetos fue generada por ordenador de forma aleatoria mediante una tabla de números pseudo-aleatorios.

5 Se requirió que todas las participantes cumplieran los criterios de inclusión establecidos, como perfil bioquímico, hematológico y niveles de vitamina A, D y beta-criptoxantina dentro de rangos de referencia, excepto para los niveles de colesterol total y c-LDL, considerados objetivos finales de la intervención. Como criterios de exclusión se tomaron el uso de suplementos de vitaminas/productos de herbolario, terapia  
10 hormonal sustitutiva, fibratos o estatinas, seguimiento de dietas de adelgazamiento, inflamación aguda (valores de proteína C reactiva (PCR)  $>10$  mg/dl), medicación crónica e infección o enfermedad intercurrente que pudieran afectar la biodisponibilidad de los componentes de las composiciones del ejemplo 1.

15 Se extrajeron muestras de sangre de cada mujer tras 8 horas de ayuno antes ( $t=0$ ) y después de la administración de cada una de las composiciones del ejemplo 1 ( $t=4$ ). Se determinó el nivel de beta-criptoxantina y de los mencionados esteroides vegetales en las muestras el mismo día de la extracción para reducir la variabilidad analítica. El orden de análisis fue aleatorio.

20 La determinación de beta-criptoxantina en suero se realizó tras extracción del suero con solventes orgánicos, evaporación y reconstitución en Tetrahidrofurano (THF)/Etanol para su análisis por cromatografía ultra-rápida (UPLC, Aquity System, Waters).

25 Para la determinación de beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y precursores del colesterol, desmosterol y latosterol, se realizó una saponificación directa en caliente, con una disolución hidroalcohólica de KOH. La fracción insaponificable se extrajo con hexano, se obtuvieron los derivados trimetilsililéteres con BSTFA:piridina y se analizaron mediante cromatografía de gases (CG-FID).

30 La biodisponibilidad *in vivo* de beta-criptoxantina, beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, desmosterol y latosterol detectados en suero tras la ingesta de las composiciones del ejemplo 1 se muestra en la Tabla 3, Los valores recogidos en la Tabla 3, son valores de concentración sérica en  $\mu\text{g/dL}$ , expresados como valor medio e  
35 intervalo de confianza (en porcentaje al nivel de probabilidad del 95%), donde los valores con superíndice "a", corresponden a valores con  $p<0.001$ .

Tabla 3. Concentraciones séricas de los compuestos durante los tratamientos

|                      | <b>t=0</b>           | <b>t=4</b>                       | <b>% de<br/>cambio<br/>t=0, t=4)</b> | <b>Incremento<br/>neto</b>          |
|----------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Composición 1</b> |                      |                                  |                                      |                                     |
| Beta-criptoxantina   | 16.9<br>(13.7-20.1)  | 56.5<br>(50.0-63.0) <sup>a</sup> | 310<br>(222-398)                     | 36.4<br>(29.9-43.0)                 |
| <b>Composición 2</b> |                      |                                  |                                      |                                     |
| Beta-sitosterol      | 4.0<br>(3.46-4.54)   | 6.34<br>(4.7-7.98)               | 64.32<br>(34.43-<br>92.21)           | 2.36<br>(0.94-3.78) <sup>80</sup>   |
| Campesterol          | 3.06<br>(2.7-4.20)   | 3.28 (2.94-<br>3.62)             | 12.7<br>(4.42, 20.98)                | 0.29<br>(0.04-5.54)                 |
| Estigmasterol        | 0.50<br>(0.38-0.58)  | 0.48 (0.38-<br>0.58)             | 14.2<br>(-<br>8.06,36.46)            | -0.01<br>(-0.12-0.10) <sup>15</sup> |
| Desmosterol          | 0.58<br>(0.45-0.64)  | 0.65<br>(0.59,0.71)              | 15.48<br>(8.61, 22.35)               | 0.07<br>(0.03-0.11)                 |
| Latosterol           | 2.91<br>(2.47-3.35)  | 3.13 (2.67-<br>3.59)             | 14.86<br>(2.41, 27.31)               | 0.17<br>(-0.16-0.50) <sup>20</sup>  |
| <b>Composición 3</b> |                      |                                  |                                      |                                     |
| Beta-criptoxantina   | 17.8 (13.9-<br>21.6) | 53.2<br>(47.3-59.0) <sup>a</sup> | 282 (198-<br>365)                    | 34.5 (29.9-<br>39.2)                |
| Beta-sitosterol      | 3.91<br>(3.45-4.37)  | 5.46<br>(4.39-6.53)              | 49.36<br>(24.81-<br>73.92)           | 1.56<br>(0.65-2.47) <sup>25</sup>   |
| Campesterol          | 2.91<br>(2.66-3.16)  | 3.25<br>(2.83-3.67)              | 10.75<br>(3.07, 18.43)               | 0.34<br>(0.08-0.60)                 |
| Estigmasterol        | 0.5<br>(0.41-0.58)   | 0.48<br>(0.40-0.55)              | 8.94<br>(-8.12, 26.0)                | -0.02<br>(-0.11-0.07) <sup>30</sup> |
| Desmosterol          | 0.62<br>(0.58-0.66)  | 0.63<br>(0.62-0.65)              | 2.91<br>(-3.71, 9.53)                | 0.01<br>(-0.03-0.05)                |
| Latosterol           | 3.21<br>(2.74-3.68)  | 3.13<br>(2.70-3.56)              | 1.29<br>(-7.88-<br>10.46)            | -0.08<br>(-0.36-0.20) <sup>35</sup> |

En primer lugar, los resultados de la Tabla 3 muestran que la biodisponibilidad de beta-criptoxantina no se modifica de forma significativa por la presencia de los esteroides vegetales, ni viceversa cuando ambos se suministran de forma simultánea en la composición 3. Esto indica que la composición 3 aporta la beta-criptoxantina y los esteroides vegetales adecuadamente.

Los datos de la Tabla 3 también avalan que las composiciones que contienen beta-criptoxantina (composiciones 1 y 3) aumentan de forma significativa ( $p < 0.001$ ) los niveles séricos de beta-criptoxantina. Asimismo, tras la ingesta de las composiciones 1 y 3, aumentaron los niveles séricos de beta-sitosterol y campesterol. Además tras el consumo de la composición 3 se observó que no aumentó la concentración sérica de desmosterol y disminuyó la de latosterol, que son precursores del colesterol, lo que refleja una reducción de la absorción de colesterol.

Como se deduce de los resultados mostrados en la Tabla 3 la biodisponibilidad in vivo de beta-criptoxantina no se modificó de forma significativa por la presencia de esteroides vegetales o viceversa cuando ambos componentes se suministraron conjuntamente en la composición 3.

20

#### *Ejemplo 4: Evaluación del efecto funcional de la bebida*

Para evaluar el riesgo de fractura osteoporótica y por tanto evaluar el efecto de las composiciones del ejemplo 1 sobre el remodelado óseo, se determinaron los siguientes marcadores de remodelado óseo: 1) marcadores de formación: péptido amino-terminal del pro-colágeno tipo 1 (TP1NP) y la osteocalcina (OC); y 2) marcador de resorción: *b-cross-laps* (CTX).

Estos parámetros se midieron al inicio y final de las 4 semanas de administración de cada composición del ejemplo 1 ( $t=0$  y  $t=4$ , respectivamente). La determinación se realizó mediante técnicas de inmunoensayo con detección por quimioluminiscencia (Elecsys, Roche Diagnostics).

Para la evaluación del efecto de la composición 3 sobre el riesgo cardiovascular, se determinaron los cambios en los niveles séricos de colesterol total, HDL y c-LDL,

triglicéridos, g-glutamyl-transferasa y PCR mediante métodos estándares de uso rutinario en la práctica clínica.

El efecto de la intervención se evaluó mediante distintos abordajes:

5

1.- Respuesta intra-sujeto a la intervención y comparación entre composiciones:

1.1.- se evaluó la respuesta observada en concentraciones séricas de los distintos parámetros evaluados para cada tipo de composición (diferencias intra-sujeto; t de Student para muestras emparejadas); así como las diferencias según el tipo de composición consumida (ANOVA y *post-hoc* Scheffé test)

1.2.- se determinó el porcentaje de cambio en los principales parámetros intra-sujeto y entre tipos de composición (t para datos emparejados y ANOVA y *post-hoc* Scheffé test).

2.- Modelo generalizado. Se realizaron ajustes de modelos lineales utilizando ecuaciones de estimación generalizadas (GEE) con objeto de considerar la posibilidad de que dos observaciones en el mismo sujeto puedan estar relacionadas; y la posibilidad de que dos observaciones en el mismo sujeto puedan estar relacionadas y la posibilidad de interacción entre intervención (tipo) y período (orden), lo que suponía la posibilidad del llamado efecto "arrastre".

La significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ , y los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) y el PROC GENMOD de SAS para Windows, versión 9.1 (SAS Institute, Cary, N.C.).

Riesgo cardiovascular

30 *Concentraciones en suero* (t test para datos emparejados; intrasujeto, valores finales frente a basales). La ingesta diaria de la composición 3 respecto a la de las composiciones 1 y 2, provocó un descenso significativo de los niveles séricos de colesterol total, (10 mg/dl, Paired t test,  $p = 0.009$ ), HDL (2.8 mg/dl,  $p = 0.018$ ) y LDL (10.3 mg/dl,  $p = 0.003$ ) en mujeres post-menopáusicas con hipercolesterolemia (ver Tabla 4).

35 *Cambios porcentuales* (One way ANOVA and *post-hoc* Scheffé test). El consumo regular de la composición 3 provocó un descenso relativo (5-7%) colesterol total, LDL y

HDL en comparación con los cambios observados con el consumo regular de las composiciones 1 y 2. Así, la reducción relativa observada fue significativa comparada con los cambios observados para la composición 2 ( $p=0.053$  para LDL) y para la composición 1 ( $p=0.003$  para LDL y  $p=0.051$  para colesterol total).

5

Los cambios observados demuestran un efecto beneficioso derivado del consumo de la composición 3, al reducir biomarcadores de riesgo cardiovascular. Asimismo, los resultados evidencian un efecto sinérgico de beta-criptoxantina y los esteroides vegetales de la composición 3 sobre marcadores de riesgo cardiovascular, efecto no observado con las composiciones 1 y 2.

10

#### Remodelado óseo

*Concentraciones en suero* (t test para datos emparejados; intrasujeto, valores finales frente a basales). La ingesta diaria de la composición 3 respecto a las composiciones 1 y 2 provocó un descenso significativo en los niveles séricos de: (1) marcadores de formación ósea: P1NP, 3.7 ng/dl,  $p=0.072$ ; osteocalcina, 1.86 ng/ml,  $p=0.006$ ; y (2) del marcador de resorción ósea: *beta-crosslaps*, 0.035 pg/ul,  $p=0.021$ ) (ver Tabla 4).

15

*Cambios porcentuales* (One way ANOVA y *post-hoc* Scheffé test). Los cambios anteriores suponen un descenso relativo en los niveles de los marcadores de remodelado óseo de más del 5% comparado con los cambios observados tras el consumo de las composiciones 1 y 2, aunque dichos cambios sólo mostraron tendencia para la osteocalcina al comparar la composición 2 y 3 ( $p=0.08$ ).

20

Tabla 4. Variación de los niveles de marcadores de riesgo cardiovascular y remodelado óseo (marcadores de efecto) a  $t=0$  y  $t=4$  para cada composición del ejemplo 1.

|                                                                              | Composición 1 | Composición 2       | Composición 3       |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|
| Marcadores de efecto                                                         |               |                     |                     |
| <i>Desmosterol</i><br>(precursor de<br>colesterol)<br>( $\mu\text{g/dl}$ )   | --            | 0.08 (0.02), 0.0006 | 0.011 (0.022), 0.60 |
| <i>Latosterol</i><br>(indicador sínt.<br>colesterol)<br>( $\mu\text{g/dl}$ ) | --            | 0.17 (0.19), 0.37   | -0.07 (0.15), 0.63  |

|                                                    |                      |                     |                        |
|----------------------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| <i>Colesterol Total</i><br>( $\mu\text{g/dl}$ )    | 1.07 (3.3), 0.75     | -0.69 (3.91), 0.86  | -10.0 (3.6), 0.009     |
| <i>HDL colesterol</i><br>( $\mu\text{g/dl}$ )      | -1.33 (1.46), 0.37   | -0.88 (1.14), 0.44  | -2.8 (1.13), 0.018     |
| <i>LDL colesterol</i><br>( $\mu\text{g/dl}$ )      | 4.67 (2.82), 0.107   | 0.09 (3.37), 0.978  | -10.3 (3.25), 0.0032   |
| <i>TP1NP</i> ( $\mu\text{g/dl}$ )                  | -2.4 (2.4), 0.322    | 0.42 (0.90), 0.639  | -3.61 (1.95), 0.072    |
| <i>Osteocalcina</i><br>( $\mu\text{g/dl}$ )        | -0.88 (0.79), 0.270  | 0.58 (0.58), 0.325  | -1.86 (0.63), 0.006    |
| <i>b-cross-laps</i><br>( $\text{pg}/\mu\text{l}$ ) | -0.024 (0.017), 0.18 | 0.009 (0.019), 0.63 | -0.035 (0.014), 0.0219 |

Efecto biológico. Dado que la osteoporosis se caracteriza por un incremento del remodelado óseo con una elevada resorción no compensada totalmente por la tasa de formación ósea, el consumo regular de la composición 3 comparado con el de la composición 1 y 2, reduce biomarcadores de remodelado óseo. Esto representa la disminución de la tasa de recambio óseo. Estos datos además demuestran el efecto sinérgico de la beta-criptoxantina y los esteroides vegetales de las composiciones de la invención sobre marcadores de remodelado óseo al no observarse dicho efecto tras el consumo de las composiciones 1 y 2.

Globalmente, tanto la magnitud del cambio como el sentido del efecto (reducción) son consistentes con los cambios observados en el análisis de comparación de medias intra-sujeto. Es decir, en base a estos resultados, el consumo de la composición 3 (b-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol): (1) aumenta los niveles de beta-criptoxantina, beta-sitosterol y campesterol en suero; (2) ejerce un efecto beneficioso sobre marcadores de riesgo cardiovascular al disminuir los niveles séricos de marcadores de riesgo cardiovascular (colesterol total y c-LDL); y (3) ejerce un efecto beneficioso sobre el remodelado óseo al reducir los niveles de marcadores tanto de formación como de resorción, lo que supone una menor tasa de recambio óseo y una ralentización del remodelado óseo.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Composición que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y de al menos un  
5 excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 2.- Composición según la reivindicación 1 caracterizada porque el al menos excipiente farmacéuticamente aceptable es para un producto veterinario.
- 10 3.- Producto comestible que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol y cantidades adecuadas de otros ingredientes comestibles, donde el producto comestible es un suplemento dietético.
- 15 4.- Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la manufactura de un medicamento.
- 5.- Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la manufactura de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de osteoporosis y  
20 enfermedades cardiovasculares.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, presentada en una única dosis o en varias dosis, caracterizada porque la cantidad total de beta-criptoxantina es 500-1500 µg.  
25
- 7.- Composición según la reivindicación 6, caracterizada porque la cantidad total de beta-criptoxantina es de 600-900 µg.
- 8.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, presentada en una  
30 única dosis o en varias dosis, caracterizada porque la cantidad total de campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol es de 1.3-3 g.
- 9.- Composición según la reivindicación 8, caracterizada porque la cantidad total de campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol y campestanol es de 1.3-1.9 g.  
35

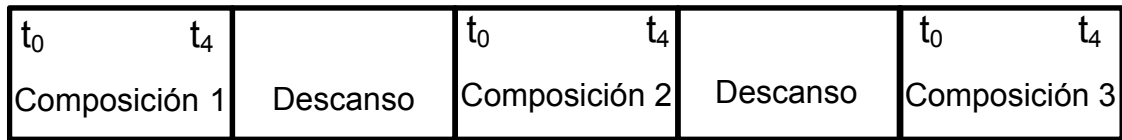


**Figura 1**



- ②① N.º solicitud: 201331232  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.08.2013  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | ALEMANY LAIA et al. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB // Junio 2013; VOL: 52 No: 1 Págs: 1-7 ISSN 0963-9969<br>Doi: doi:10.1016/j.foodres.2013.02.024<br>Gong Joshua; Goff H Douglas | 1-9                        |
| X         | US 2009264520 A1 (BHAGAT URVASHI) 22.10.2009, ejemplo 11.                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1-9                        |
| A         | WO 2008154294 A1 (UNICITY INTERNATIONAL INC et al.) 18.12.2008, párrafos [0035],[0039]; reivindicaciones 21,29.                                                                                                                                                                                                              | 1-9                        |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.03.2014

Examinador  
N. Vera Gutiérrez

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/045** (2006.01)

**A61K31/575** (2006.01)

**A23L1/30** (2006.01)

**A61P19/10** (2006.01)

**A61P9/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23L, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, CAS, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.03.2014

**Declaración**

|                                                 |                           |           |
|-------------------------------------------------|---------------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-2, 4-9 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 3        | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones          | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-9      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Fecha Publicación |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| D01       | ALEMANY LAIA et al. Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB // Junio 2013; VOL: 52 No: 1 Págs: 1-7 ISSN 0963-9969 Doi: doi:10.1016/j.foodres.2013.02.024<br>Gong Joshua; Goff H Douglas | Junio 2013        |
| D02       | US 2009264520 A1 (BHAGAT URVASHI)                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 22.10.2009        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de beta-criptoxantina, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, sitostanol, campestanol. Se refiere igualmente al producto comestible que comprende esa composición y al uso de la composición como medicamento.

El documento D01 recoge un estudio para evaluar el efecto de la digestión gastrointestinal sobre fitosteroles. Para ello se preparan cuatro bebidas, todas ellas enriquecidas con fitoesteroles, a base de leche y zumos de plátano, uva y mandarina enriquecidos con beta-criptoxantina. En la Tabla 1 se recogen los valores de campesterol, campestanol, estigmasterol, beta-sitosterol y sitostanol detectados en las bebidas después de ser sometidas a la digestión simulada.

A la vista de lo divulgado en D01, se considera que la invención tal como se define en la reivindicación 3 de la solicitud no es nueva (Artículo 6.1 L.P.)

El documento D02 divulga composiciones para el aporte diario de las dosis óptimas de ácidos grasos y otros compuestos procedentes de las plantas (fitoquímicos) y su uso en la profilaxis y el tratamiento de diversas enfermedades. En el ejemplo 11 se estudian los efectos sobre la osteoporosis tras la administración diaria de la composición descrita en la Tabla 10. Esta composición contiene beta-criptoxantina (600-850 microgramos), fitosteroles (90-150 mg), campesterol (0,8-1,5 mg), sitosterol (15-30 mg) y estigmasterol (0,3-1,5 mg), entre otros compuestos.

La incorporación de sitostanol y campestanol no parece conferir actividad inventiva a la composición de la invención. En el estado de la técnica es conocido que estos compuestos presentan la misma actividad que sus correspondientes esteroides y por ello son frecuentemente utilizados de manera conjunta en las composiciones nutracéuticas. Tampoco el hecho de incorporar un excipiente farmacéuticamente aceptable confiere actividad inventiva. Así, en ausencia de un efecto técnico sorprendente, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1-9 de la solicitud no implica actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.).