



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 652**

51 Int. Cl.:
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02707337 .8**
96 Fecha de presentación : **22.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1379146**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

54 Título: **Preparación para la prevención y/o tratamiento de la alteración del metabolismo óseo.**

30 Prioridad: **23.03.2001 EP 01201101**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.09.2009

73 Titular/es: **N.V. Nutricia
Postbus 1
2700 MA Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:
**Van Helvoort, Adrianus, Lambertus, Bertholdus;
Van Norren, Klaske;
Gros-van Hest, Marjan y
Lansink, Mirian**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Preparación para la prevención y/o tratamiento de la alteración del metabolismo óseo.

5 La presente invención se refiere a una preparación para la prevención y/o tratamiento de trastornos relacionados con la alteración del metabolismo óseo.

10 Aunque parece una sustancia inerte mineral, el hueso es un tejido vivo dinámico conjuntivo que se renueva constantemente. Contiene células y fibras de colágeno especializadas incrustadas dentro de un mineral cristalino. Los minerales, células, fibras y sustancias fundamentales forman la matriz orgánica u "osteóide". El mineral óseo es un complejo de sal que comprende fosfato cálcico, citrato, boro, sodio, zinc, magnesio y flúor. La mayoría de los huesos del esqueleto contienen dos tipos de tejido óseo: hueso compacto y hueso trabecular. El hueso realiza su recambio metabólico constantemente mediante una combinación de formación ósea por osteoblastos y de resorción ósea por osteoclastos. Si los niveles de calcio en la sangre son inferiores, la resorción ósea aumenta para alcanzar los valores requeridos de calcio en cualquier parte del cuerpo.

15 La alteración del metabolismo óseo puede ser caracterizado por un desequilibrio entre la formación y la resorción ósea. Esto puede ocurrir en relación con diferentes tipos de trastornos. Por ejemplo: osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedad hepática y el metabolismo óseo alterado, provocado por insuficiencia renal o hemodiálisis, fracturas óseas, cirugía ósea, embarazo, anorexia nerviosa y en personas inmóviles, desnutridas y con pérdida de peso.

20 La enfermedad más común en la población de avanzada edad es la osteoporosis. Esta enfermedad se caracteriza por la extensa pérdida de hueso que conlleva a un aumento en la fragilidad del hueso y una mayor posibilidad de fractura. Ésta causa un dolor considerable, discapacidad, desfiguración y pérdida de independencia y supone un coste y carga para los servicios sanitarios. Internacionalmente, más de 1,5 millón de fracturas suceden cada año como resultado de la osteoporosis.

25 Hay dos tipos de osteoporosis reconocidas. La primera aparece normalmente en edades comprendidas entre 50 y 75 y afecta seis veces más a mujeres (osteoporosis postmenopáusica) que a hombres.

30 La pérdida de hueso se acelera con el envejecimiento. La mayoría de fracturas se localizan en el hueso trabecular, especialmente la muñeca y la columna vertebral. El segundo tipo es conocido como osteoporosis senil y afecta tanto a hombres como a mujeres mayores de 75 años y no implica más que la pérdida de hueso normal. Los factores de riesgo para ambos tipos de osteoporosis son la alta ingesta de cafeína, el consumo de alcohol, el bajo peso corporal y la baja ingesta de calcio.

35 La causa más importante y bien documentada de la osteoporosis postmenopáusica es la deficiencia de estrógenos. Después de la menopausia, los ovarios dejan de producir esta hormona lo cual está directamente relacionado con la pérdida de contenido mineral óseo. Un tratamiento muy eficaz para los síntomas postmenopáusicos, incluyendo la osteoporosis, es la terapia de sustitución hormonal (TSH) y esta sustitución de estrógenos previene eficazmente el desarrollo de la osteoporosis. Debido a que la TSH puede tener graves efectos secundarios, por ej. la estimulación del crecimiento de tejido mamario, están ganando popularidad los suplementos nutricionales para la prevención de la osteoporosis.

40 Para otros tipos de osteoporosis, la causa principal aún no ha sido definida. Puesto que las personas mayores tienen normalmente bajas cantidades de calcio en su dieta, los niveles de calcio en el cuerpo son bajos. El cuerpo, no obstante, necesita un nivel de calcio en la sangre estable para otras diferentes funciones importantes, tal como la señalización celular aumentando así la resorción ósea para mantener adecuados los niveles de este mineral en caso de una insuficiencia en la ingesta de calcio.

45 El procedimiento común para reducir la pérdida de hueso con suplementos nutricionales es el uso de fitoestrógenos. Estos compuestos son derivados de fuentes botánicas, tales como soja o cimífuga y tienen una estructura molecular que se asemeja al estrógeno. Los fitoestrógenos pueden ser clasificados como isoflavonas (genisteína, daidzeína), lignanos y coumestanos. El mecanismo de acción de los fitoestrógenos aún no ha sido resuelto. Es posible que su actividad esté relacionada con el hecho de que éstos se unen a los receptores de estrógeno de forma similar al estrógeno, siendo sus efectos comparables a la TSH convencional. También es posible que actúen directamente en los osteoclastos y osteoblastos mediante un mecanismo receptor de estrógeno independiente.

50 WO-A-01/03687 enseña un método para inhibir o reducir la biosíntesis o bioactividad de las hormonas sexuales esteroides endógenas en seres humanos por la administración de una combinación de fitosterol(es) y fitoestrógeno(s). El fitoestrógeno es seleccionado de clases de lignanos, isoflavonas, flavonas y coumestano. Se ha demostrado que el uso de tales combinaciones proporciona los beneficios de un menor riesgo respecto a varios cánceres, mientras que al mismo tiempo conserva los beneficios para la salud cardiovascular y ósea.

65 WO-A-91/11117 expone suplementos dietéticos comprendiendo vitaminas y minerales junto con otros componentes beneficiosos entre ellos bioflavonoides y aquellos que protegen de enfermedades de corazón y de cáncer al igual que inmunoestimuladores.

ES 2 325 652 T3

WO-A-98/50026 expone una composición para el tratamiento de síntomas menopáusicos y osteoporosis mediante un miembro de un pequeño subgrupo de isoflavonas (comprendiendo daidzeína, genisteína, biochanina y formononetina) que se distingue por su capacidad para unirse a receptores de estrógeno en animales (incluyendo las células humanas).

En EP-A-807.435 se conoce el uso de luteolina como inhibidor indirecto de la HMG-CoA reductasa para el tratamiento de aterosclerosis, infarto de corazón y otros trastornos cardiovasculares. La luteolina ayuda a regular el nivel de colesterol en sangre.

Los fitoestrógenos y en particular las isoflavonas son por ejemplo descritos en Alekel, D.L. *et al*, 2000, "Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women", *Am J Clin Nutr.* 72:844-52; Messina, M. y Messina V., 2000, "Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview", *J ReN Nutr.* 10:63-8; Erdman J.W. *et Al*, 2000, "Provocative relation between soy and bone maintenance.", *Am J Clin Nutr.* 2000, 72:679-680.

En WO 98/50054 se describe que los extractos vegetales pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades o condiciones caracterizadas por el aumento de resorción ósea. Ejemplos descritos son allium (cebolla, ajo), petroselinum (perejil), brassica (brécol) y extractos de eruca (arrugula o roquette). En WO 00/20014 se describen los extractos de lycopersicon (tomate). En WO 00/20015 se mencionan los extractos de anetum (eneldo).

Se acaba de descubrir que un grupo específico de componentes naturales puede ser usado para el tratamiento y/o prevención de los trastornos anteriormente mencionados relacionados con la alteración del metabolismo óseo. Por tanto, la presente invención proporciona el uso de apigenina y/o luteolina combinado con calcio, vitamina D y/o vitamina K para la producción de una preparación para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con la alteración del metabolismo óseo.

Los componentes de la invención (apigenina, luteolina) son obtenidos preferiblemente de fuentes naturales. También las mezclas pueden ser usadas. Más adecuado son los análogos funcionales como formas glicosiladas y extractos de plantas que contienen estos componentes. Los componentes según la invención son usados en una cantidad de 0.1 mg a 1 g, preferiblemente de 5 a 700 mg, más preferiblemente de 25 a 500 mg por dosis diaria.

La preparación para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con la alteración del metabolismo óseo según la presente invención puede ser una preparación farmacéutica, tal como una pastilla, una cápsula, un sobre o un supositorio o una preparación nutricional, así como un suplemento nutricional, una alimentación por sonda, un alimento completo o una preparación para mejorar la salud. La preparación es conveniente para el tratamiento de estos trastornos en mamíferos incluyendo seres humanos.

Las preparaciones contienen preferiblemente también uno o más de los siguientes elementos:

- a. calcio;
- b. minerales óseos, tales como magnesio y boro;
- c. ácido gamma-linolénico;
- d. vitaminas como vitamina D y vitamina K;
- e. estrógenos o uno o más compuestos que imiten los efectos de los estrógenos usados en Terapia de Sustitución de Estrógenos;
- f. bifosfonatos e
- g. isoflavonas.

El calcio se añade para aumentar la deposición de calcio en los huesos. La fuente de calcio puede ser cualquier compuesto inorgánico u orgánico adecuado que contenga calcio. Ejemplos son las sales de calcio inorgánico, por ejemplo cloruro de calcio, fosfato cálcico, sulfato de calcio, óxido de calcio, hidróxido cálcico o carbonato cálcico. Ejemplos de compuestos de calcio orgánico son la leche en polvo o caseinato de calcio, citrato de calcio, malato de calcio, malato de citrato de calcio o lactato de calcio. Preferiblemente la cantidad de calcio es de 200 a 1500 mg por dosis diaria.

Los minerales óseos se añaden para fortalecer los huesos. Preferiblemente la preparación contiene de 100 mg a 500 mg de magnesio y de 2 mg a 6 mg de boro por dosis diaria.

El ácido gamma-linolénico se utiliza para regular el metabolismo del calcio, preferiblemente en una cantidad de 25 mg a 100 mg por dosis diaria.

ES 2 325 652 T3

Las vitaminas se añaden como cofactores para optimizar el metabolismo óseo. Preferiblemente, la dosis diaria de vitamina K debería ser de 25 µg a 5 mg de vitamina K. La vitamina D se utiliza para aumentar la absorción de calcio en el intestino. Preferiblemente se presenta en la preparación de 5 µg a 20 µg (200 UI a 800 UI) por dosis diaria.

Los estrógenos o uno o más compuestos que imitan los efectos del estrógeno usados para sustituir el estrógeno pueden también ser incluidos en la preparación para el tratamiento y/o prevención de la osteoporosis. Ejemplos de estos compuestos son los fitoestrógenos, como genisteína, lignanos o coumeranos o preparaciones farmacéuticas como 17β-estradiol, estrógenos esterificados, sulfato de estrona, estrógeno equino conjugado y etinilestradiol. Para los fitoestrógenos la cantidad de estos compuestos es de 5-100 mg. Para las preparaciones farmacéuticas la cantidad activa es definida por las instrucciones de los fabricantes.

Se utilizan uno o más bifosfonatos para inhibir la resorción ósea osteoclástica. Ejemplos de estos compuestos son alendronato y risedronato. Preferiblemente la cantidad de estos compuestos es de 5 mg a 50 mg.

Las isoflavonas pueden ser obtenidas (aisladas) de soja o cimífuga o pueden ser isoflavonas sintéticas. Las isoflavonas pueden ser añadidas en una cantidad de 10 a 75 mg por dosis diaria.

Las preparaciones de la invención pueden contener además otras fuentes de energía, tales como grasas y carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, fibras, sabores, conservantes, colorantes, edulcorantes, etc.

Los componentes activos según la invención pueden ser usados como sustancias puras pero pueden también tener forma de extractos de plantas o partes de las mismas. Se puede usar morina por ejemplo en forma de extractos de jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) y morera blanca (*Morus alba*). Se puede usar luteolina por ejemplo en forma de extractos de cáscaras de cacahuete (*Arachis hypogaea*), alcachofa (*Cinara scolimus*) y apio (*Apium graveolens*). Se puede usar apigenina por ejemplo en forma de extractos de manzanilla (*Recutita de matricaria*) o apio (*Apium graveolens*).

Los extractos pueden ser usados por métodos conocidos en la técnica, por ej. extrayendo la materia prima con agua o un disolvente de calidad alimentaria o mezclas de los mismos. Un disolvente de calidad alimentaria preferido es el etanol. Tras la extracción, la fase líquida que contiene los ingredientes activos puede ser concentrada o secada por evaporación o criodesecación.

Los extractos de petroselinum (perejil), eruca (arrugula o roquete), lycopersicon (tomate) y anetum (eneldo) están excluidos de la invención.

Los componentes y preparaciones de la presente invención pueden ser usados particularmente para trastornos caracterizados por la alteración del metabolismo óseo. El trastorno puede ser osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolítica en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedades hepáticas o alteración del metabolismo óseo provocada por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, embarazo, anorexia nerviosa y en personas inmóviles, desnutridas y con pérdida de peso.

A continuación la invención será ilustrada mediante los ejemplos siguientes y la figura 1 adjunta que muestra la actividad de fosfatasa alcalina en células de médula ósea de ratón tras una exposición de 3 semanas a los componentes de la invención.

Ejemplos

1. Formulaciones

Suplemento nutricional 1

Componentes	Cantidad por porción	
Apigenina	15	mg
Luteolina	15	mg

Suplemento nutricional 2

Componentes	Cantidad por porción	
Morina	10	mg
Apigenina	20	mg
Luteolina	5	mg

ES 2 325 652 T3

Suplemento nutricional 3

Componentes	Cantidad por porción	
Calcio	800	mg
Extracto de morera blanca (con morina glicosilada)	10	mg
Extracto de manzanilla (con apigenina glicosilada)	10	mg
Extracto de alcachofa (con luteolina glicosilada).	10	mg
<i>Las cantidades de componentes activos se expresan como aglicones</i>		

Suplemento nutricional 4

Componentes	cantidad por porción	
Calcio	800	mg
Vitamina D3	200	IU
Morina	10	mg
Apigenina	10	mg
Luteolina	100	mg

Suplemento nutricional 5

Componentes	cantidad por porción	
Calcio y Calcimate®	800	mg
Vitamina D3	200	IU
Magnesio	200	mg
Boro	2	mg
Morina	5	mg
Apigenina	25	mg
Luteolina	20	mg
Ácido gamma-linolenico	25	mg

Suplemento nutricional 6

Componentes	cantidad por porción	
Calcio y Calcimate®	800	mg
Vitamina D3	200	IU
Magnesio	200	mg
Boro	2	mg
Isoflavonas	30	mg
Apigenina	50	mg
Ácido gamma-linolenico	25	mg
Vitamina K1	500	µg

Suplemento nutricional 7

Componentes	cantidad por porción	
Calcio	800	mg
Vitamina D3	200	IU
Cimífuga con isoflavonas	40	mg
Extracto de soja con isoflavonas glicosiladas	30	mg
Morina	10	mg
Apigenina-7-glucósido	10	mg
Luteolina-4' glucósido	10	mg
<i>Las cantidades de componentes activos e isoflavonas se expresan como aglicones</i>		

Efecto estimulante en células de médula ósea de ratón

El siguiente experimento es ilustrado en la Figura 1 que muestra la actividad de fosfatasa alcalina en células de médula ósea de ratón después de 3 semanas de exposición a los componentes de la invención.

Experimento

Las células de médula ósea fueron aisladas de ratones hembra NMRI de seis meses de edad. Después del lavado, las células fueron diluidas en un medio MEM alfa sin rojo de fenol (1% p/s, 15% de carbón tratado de FCs) y sembrado en placas de 24 pocillos (1.25×10^6 células/pocillo). Tras 24 horas de incubación (37°C, 5% CO₂) las células fueron expuestas a los componentes activos (1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M) junto con ácido ascórbico (50 µg/ml) y β-glicerolfosfato (1 mM). Los medios de exposición fueron renovados cada 3 días.

Tras 2 y 3 semanas de incubación, las células fueron lavadas con PBS y almacenadas a -20°C. Tras la tisis se determinaron las cantidades de ADN y las actividades de fosfatasa alcalina como se describe abajo. Las cantidades de ADN son medidas para determinar el número de células y la actividad de fosfatasa alcalina se utiliza como un marcador para la diferenciación de osteoblastos.

Lisis

Se añadieron 300 µl de tampón de tisis (1 X SSC/0.01% SDS) a las células congeladas. Después de 1 hora de incubación (37°C) las placas fueron sonificadas durante 10 minutos y las suspensiones de células fueron usadas para las mediciones de la actividad ALP.

Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (ALP)

25 µl de lisado de célula fue transferido por duplicado a placas de 96 pocillos. 25 µl de 1*SSC/0.01%SDS sirvió como control negativo. Se añadió 175 µl de tampón de ensayo ALP (10 mM glicina, 0.1 mM MgCl₂, 0.01 mM ZnCl₂, 6 mM P nitrofenilfosfato, pH 10.5) a cada pocillo. La actividad ALP fue medida a una longitud de onda de 405 nm a temperatura ambiente durante 10 minutos a intervalos de 30 segundos. Los resultados de este ensayo son mostrados en la Figura 1, que muestra la actividad de fosfatasa alcalina en células de médula ósea de ratón tras ser expuestos durante 3 semanas a los componentes activos. La actividad es expresada como producción p-nitrofenol en nmol/minuto/pozo. (media ± sem, 2 experimentos independientes medidos por duplicado)

La Figura 1 muestra que las incubaciones de células de médula ósea de ratones con 1 mM de apigenina y luteolina dan como resultado una mayor señal de fosfatasa alcalina en osteoblastos diferenciados. La estimulación es más pronunciada que el efecto de la isoflavona genisteína cuya prevención de pérdida de hueso ha sido demostrada *in vivo* (rata y humano). Se obtuvieron resultados similares con morina (no se muestran datos).

Documentos citados en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante fue recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de la patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Patentes citadas en la descripción

- WO 0103687 A [0010]
- WO 9111117 A [0011]
- WO 9850026 A [0012]
- EP 807435 A [0013]
- WO 9850054 A [0015]
- WO 0020014 A [0015]
- WO 0020015 A [0015]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **ALEKEL**, D.L. *et al.* Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women *Am J Clin Nutr.*, 2000, vol. 72, 844-52 [0014]
- **MESSINA**, M. **MESSINA** V. Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview *J Ren Nutr.*, 2000, vol. 10, 63-8 [0014]
- **ERDMAN** J.W. *et al.* Provocative relation between soy and bone maintenance *Am J Clin Nutr.*, 2000, vol. 72, 679-680 [0014]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de apigenina y/o luteolina, combinado con calcio, vitamina D y/o vitamina K, para la producción de una preparación para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con la alteración del metabolismo óseo en un mamífero.
2. Uso según la reivindicación 1, que comprende el uso de luteolina.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde el trastorno es osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolítica en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedad hepática o alteración del metabolismo óseo provocada por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, embarazo, anorexia nerviosa y en pacientes inmóviles, desnutridos y con pérdida de peso.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la preparación comprende uno o más extractos seleccionados del grupo que consiste en cáscaras de cacahuete (*Arachis hipogaea*), alcachofa (*Cinara scolimus*), apio (*Apium graveolens*) y manzanilla (*Matricaria recutita*).
- 20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la preparación es una preparación farmacéutica, tal como una pastilla, una cápsula, un sobre o un supositorio o una preparación nutritiva, tal como un suplemento nutritivo, una alimentación por sonda, un alimento completo o una preparación para mejorar la salud.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en combinación con isoflavonas.
- 25 7. Preparación conteniendo
 - a. apigenina y luteolina y
 - b. un ingrediente que proporciona una cantidad eficaz de calcio, vitamina D y/o vitamina K.
- 30 8. Preparación según la reivindicación 7, donde la preparación comprende además una cantidad eficaz de isoflavonas.
9. Preparación según la reivindicación 8, donde las isoflavonas son aisladas de la soja o de la cimífuga.
- 35 10. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que comprende extractos seleccionados del grupo que consiste en cáscaras de cacahuete (*Arachis hipogaea*), alcachofa (*Cinara scolimus*), apio (*Apium graveolens*) y manzanilla (*Matricaria recutita*).
- 40 11. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, comprendiendo además uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en magnesio, boro y ácido gamma-linolénico.
12. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, comprendiendo además estrógenos o uno o más estrógenos que imitan compuestos usados en la Terapia de Sustitución de Estrógenos.
- 45 13. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, comprendiendo además uno o más bifosfonatos.
14. Uso de una preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 para la producción de una preparación para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con la alteración del metabolismo óseo.
- 50 15. Uso según la reivindicación 14, donde el trastorno es osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis osteolítica en pacientes con cáncer, osteodistrofia en enfermedad hepática o alteración del metabolismo óseo provocado por insuficiencia renal o hemodiálisis, fractura ósea, cirugía ósea, embarazo, anorexia nerviosa y en pacientes inmóviles, desnutridos y con pérdida de peso.

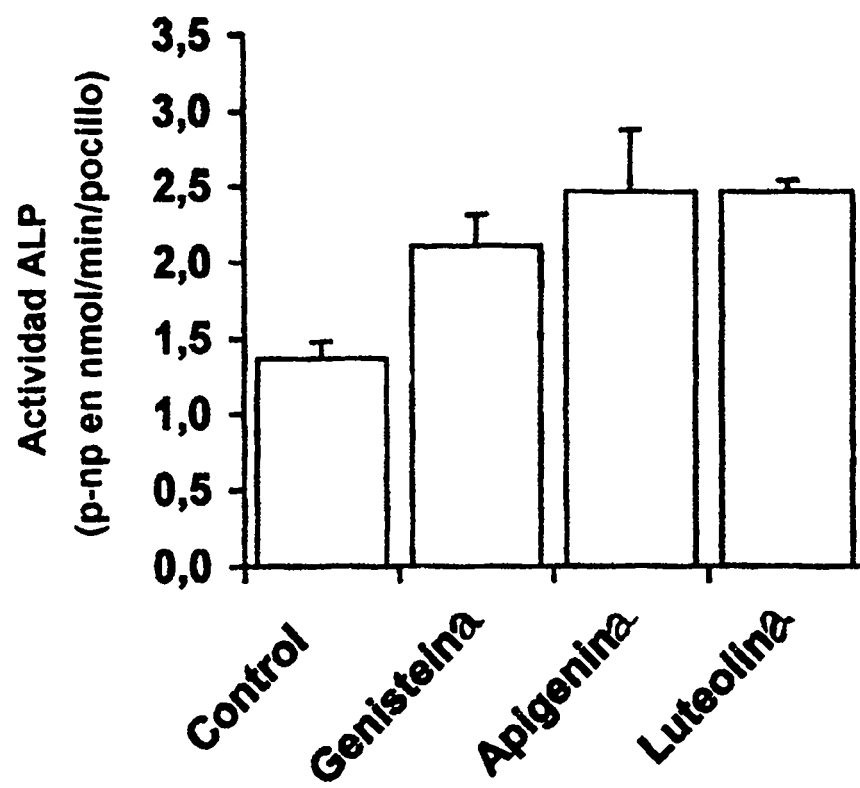


Fig.1