



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 774**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02805314 .8**

96 Fecha de presentación : **10.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1455601**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54

Título: **Composición para estimular el crecimiento óseo y el mantenimiento de la salud ósea.**

30

Prioridad: **11.12.2001 EP 01204838**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.11.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.11.2010**

73

Titular/es: **Société des Produits NESTLÉ S.A.**  
**Case Postale 353**  
**1800 Vevey, CH**

72

Inventor/es: **Offord-Cavin, Elizabeth;**  
**Federici, Ermanno;**  
**Lemaure, Bernard y**  
**Courtois, Didier**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 347 774 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).

COMPOSICIÓN PARA ESTIMULAR EL CRECIMIENTO ÓSEO Y EL  
MANTENIMIENTO DE LA SALUD ÓSEA

5 **Descripción**

La presente invención se refiere a una composición para el mantenimiento de la salud ósea o la prevención, alivio y/o tratamiento de los trastornos óseos.

**Antecedentes de la invención**

10 Los huesos sanos requieren un remodelado óseo eficaz, que implica un equilibrio entre la formación y la resorción óseas. La mayoría de enfermedades óseas se deben a una resorción ósea incrementada, convirtiendo su inhibición en un objetivo terapéutico primario, por lo tanto la mayoría de  
15 agentes farmacéuticos desarrollados hasta hoy son antiresortivos. Por ejemplo, los estrógenos bloquean la producción de citoquinas que estimulan la generación y diferenciación de los osteoclastos. Se están desarrollando SERMs (moduladores de la respuesta selectiva de los  
20 estrógenos) que proporcionan beneficios para la salud ósea reduciendo simultáneamente el riesgo de efectos hormonales adversos sobre los tejidos mamarios y del endometrio. Se supone que funcionan mediante un mecanismo similar a los estrógenos en el hueso. Los bisfosfonatos (tales como el alendronato, el risedronato, etc.) se concentran en el hueso  
25 y son, hasta hoy, los inhibidores más eficaces de la resorción ósea. Inhiben una ruta enzimática crítica, necesaria para la actividad y supervivencia de los osteoclastos. La calcitonina es una hormona polipeptídica  
30 que inhibe la resorción ósea mediante el bloqueo de la actividad de los osteoclastos. Entre las nuevas dianas se

incluyen el bloqueo de los miembros de la familia de receptores/ligandos de TNF y sus rutas de señalización, particularmente RANK/RANKL, la inhibición de metaloproteinasas específicas del hueso, tales como la catepsina K, o la inhibición de quinasas específicas.

El desarrollo de agentes terapéuticos que estimulan la formación ósea ha sido más lento que el de los de la resorción. Se conocen algunos agentes químicos o farmacéuticos que estimulan el crecimiento óseo en el ser humano. Por ejemplo, la patente WO n° 9619246 describe un método para estimular el crecimiento óseo en n paciente humano mediante la administración intermitentes de hormona paratiroidea, proteína de tipo PTH o un agonista durante por lo menos un mes. En la patente WO n° 9619501, un factor derivado del páncreas inhibe la resorción del hueso y estimula las células óseas a proliferar e incrementa la formación de hueso.

Un avance reciente importante ha sido la demostración del papel de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) como agente clave en la estimulación de la formación ósea y y de que las estatinas (fármacos efectos para reducir el colesterol mediante la inhibición de la síntesis del mismo) mejoran la formación del hueso, en parte mediada por la inducción de la BMP-2. La administración de BMP-2 recombinante se ha demostrado que induce la formación de hueso o de cartílago. En la patente US n° 6150328 se describe un método para la inducción de la formación de hueso y cartílago comprende administrar una proteína morfogenética ósea purificada mediante el cultivo de una

célula transformada con ADN codificante de BMP. Además, la patente WO n° 9711095 se refiere a la utilización de composiciones de proteína morfogenética ósea para el tratamiento de tumores neurales y el crecimiento óseo y la cicatrización de heridas. Además de las BMPs, algunos factores de crecimiento (GF), tales como el GF de tipo insulina (IGF-1), el GF- $\beta$  transformante (TGF- $\beta$ ), los GFs fibroblásticos (FGFs) se encuentran bajo investigación como terapias locales en la cicatrización de fracturas y defectos óseos. Sin embargo, la administración sistémica es problemática debido a la metabolización producida en el intestino y también debido a posibles efectos sobre otros tejidos. Se está proponiendo la terapia génica como una opción. La alternativa es que la diana sea la regulación osteoblástica de su producción utilizando reguladores dietéticos o farmacéuticos de su gen o de su expresión proteica.

Aunque dichos compuestos químicos y compuestos farmacéuticos han sido demostrados para el tratamiento de trastornos óseos, resultaría de interés proporcionar un modo nutricional seguro y eficiente de estimular el crecimiento óseo y de prevenir, aliviar o tratar trastornos óseos/articulares en mamíferos.

El documento US n° B1-6.274.176 describe una composición que comprende una mezcla de hierbas para la utilización como agente antiinflamatorio para el alivio de la artritis y la gota en mamíferos.

La patente WO n° 01/02996 describe una composición que comprende por lo menos una hierba especificada para la utilización en el tratamiento de la osteoporosis.

La patente US n° 2001/012523 se refiere a composiciones  
5 nutricionales o farmacéuticas que contienen un extracto o concentrado de una planta del género *Anethum*. Las composiciones resultan útiles para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o condiciones que se caracterizan por la resorción ósea incrementada, tales como la enfermedad  
10 de Paget, la enfermedad ósea inducida por tumor o particularmente la osteoporosis.

#### **Descripción resumida de la invención**

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición  
15 destinada a la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos o al mantenimiento de la salud ósea en mamíferos, que comprende como ingrediente activo una cantidad eficaz de por lo menos una planta o extracto vegetal seleccionado por su capacidad de inducir la  
20 expresión de proteína morfogenética ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Rosmarinus*.

Notablemente, ahora se ha descubierto que las plantas o extractos vegetales de *Rosmarinus* presentan la capacidad de estimular el crecimiento óseo mediante la regulación de  
25 factores de crecimiento endógenos en tejido óseo o cartilaginoso. Presentan la capacidad de inducir la expresión de proteínas morfogenéticas óseas *in vivo* y en un ambiente óseo local, que presenta un efecto positivo sobre la formación y reparación óseas, sobre el mantenimiento de

la salud o prevención óseas, y el alivio y/o tratamiento de trastornos óseos.

La composición según la invención puede utilizarse en la preparación de un producto nutricional, un suplemento, un  
5 pisolabis o un medicamento destinado para el ser humano o para animales de compañía.

La administración en un individuo de una composición alimentaria según la presente invención resulta en una regeneración ósea mejorada durante la cicatrización de  
10 fracturas. Ayuda a incrementar la formación ósea y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y a optimizar la masa ósea máxima.

Ayuda a mantener la masa ósea con la edad y reduce el riesgo de osteoporosis.

15 Además, ayuda a construir el cartílago en mamíferos, a prevenir la osteoartritis en animales de compañía o en seres humanos, resultando en una mejor actividad o movilidad del individuo.

#### **Descripción detallada de la invención**

20 Con respecto al primer objetivo de la presente invención, la planta o extracto vegetal de *Rosmarinus* según la invención contiene compuestos fitoquímicos que presentan un potencial anabólico mediante la inducción de la expresión de proteína morfogenética ósea.

25 En una realización preferente, la planta o extracto vegetal procede de cualquier parte de la planta de origen, por ejemplo de hojas, tubérculos, frutos, semillas, raíces, granos, embriones o cultivos celulares. La planta o extracto celular puede encontrarse en forma de un extracto seco

liofilizado de hojas, raíces y/o frutos dependiendo de la planta de origen, o planta fresca o fracción enriquecida obtenida mediante un procedimiento de extracción con solvente inorgánico u orgánico conocido de la técnica.

5 En una realización más preferente puede ser de partes aéreas de *Rosmarinus officinalis*.

Los compuestos fitoquímicos pueden ser genisteína, daidzeína, lactucina, lactucopicrina, 3-doxi-lactucina, geraniol o carvona.

10 La planta o extracto vegetal según la invención puede utilizarse en la preparación de una composición alimentaria. Dicha composición puede encontrarse en la forma de un alimento nutricionalmente equilibrado o alimento para mascotas, un suplemento dietético, un pisco-labis o una  
15 composición farmacéutica.

La planta o extracto vegetal puede utilizarse solo o asociado a otras plantas, tales como achicoria, tea, cacao,, o con otras moléculas bioactivas, tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras probióticas, glucosamina, condroitín  
20 sulfato, por ejemplo.

En una realización, se prepara una composición alimentaria para el consumo humano. Esta composición puede ser una fórmula nutricional completa, un producto lácteo, una bebida fría o estable al almacenamiento, una sopa, un  
25 suplemento dietético, un sustituto alimentario, y una barra nutricional o un dulce.

Aparte del extracto vegetal según la invención, la fórmula nutricional puede comprender una fuente de proteínas. Las proteínas dietéticas preferentemente se

utilizan como fuente de proteínas. Las proteínas dietéticas pueden ser cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas lácteas, proteínas cárnicas y proteínas del huevo), proteínas  
5 vegetales (tales como proteína de soja, proteína del trigo, proteína del arroz y proteína del guisante), mezclas de aminoácidos o combinaciones de los mismos. Las proteínas lácteas, tales como la caseína, las proteínas del suero y las proteínas de la soja resultan particularmente  
10 preferentes. La composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de grasas.

En el caso de que la fórmula nutricional incluya una fuente de grasas, la fuente de grasas preferentemente proporciona entre aproximadamente 5% y aproximadamente 55%  
15 de la energía de la fórmula nutricional; por ejemplo entre aproximadamente 20% y aproximadamente 50% de la energía. Los lípidos que forman la fuente de grasas pueden ser cualquier grasa adecuada o mezclas de grasas. Las grasas vegetales resultan particularmente adecuadas, por ejemplo aceite de  
20 soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de azafrán, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de canola, lecitinas y similares. También pueden añadirse grasas animales, tales como grasas lácteas, si se desea.

Puede añadirse una fuente de carbohidratos a la fórmula  
25 nutricional. Preferentemente proporciona entre aproximadamente 40% y aproximadamente 80% de la energía de la composición nutricional. Puede utilizarse cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz y

maltodextrinas, y mezclas de los mismos. También puede añadirse fibra dietética si se desea. En caso de utilizarse, preferentemente comprende hasta aproximadamente 5% de la energía de la fórmula nutricional. La fibra dietética puede ser de cualquier origen adecuado, incluyendo, por ejemplo, 5 soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma arábiga y fructooligosacáridos. También pueden incluirse vitaminas y minerales adecuados en la fórmula nutricional en una cantidad que cumpla las directrices apropiadas.

10 Puede incorporarse uno o más emulsionantes de grado alimentario en la fórmula nutricional si se desea, por ejemplo ésteres del ácido diacetiltartárico de monoglicéridos y diglicéridos. Pueden incluirse sales y estabilizadores similarmente adecuados. También pueden 15 combinarse vitaminas y minerales con el extracto vegetal.

La composición nutricional preferentemente es entéricamente administrable; por ejemplo en forma de polvos, tableta, cápsula, concentrado líquido, producto sólido o bebida lista para beber. En el caso de que se desee producir 20 una fórmula nutricional en polvo, la mezcla homogeneizada se transfiere a un aparato de secado adecuado, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvos.

En otra realización, una composición nutricional 25 comprende un cereal de tipo lácteo conjuntamente con una formulación probiótica. Preferentemente, el cereal de tipo lácteo es un cereal para bebés que actúa como portador para la formulación probiótica.

En otra realización, puede enriquecerse un producto alimentario habitual con por lo menos una planta o extracto vegetal según la presente invención. Por ejemplo una leche fermentada, un yogur, un queso fresco, una leche cuajada, un  
5 producto de confitería, por ejemplo un dulce o una bebida endulzada, una barra de confitería, copos o barras de cereal para el desayuno, bebidas, leches en polvo, productos de base soja, productos fermentados no lácteos o suplementos nutricionales para la nutrición clínica.

10 La cantidad de la planta o extracto vegetal en la composición puede variar según la planta de origen y su utilización. En una realización preferente, una dosis diaria eficiente es de por lo menos aproximadamente 1 mg, y más preferentemente de entre 1 mg y 200 mg de la molécula activa  
15 al día.

En una realización, puede prepararse una composición farmacéutica que contiene por lo menos un extracto o compuesto fitoquímico tal como se ha indicado anteriormente, en una cantidad suficiente para alcanzar el efecto deseado  
20 en un individuo. Dicha composición puede ser una tableta, un líquido, cápsulas, cápsulas blandas, pastas o pastillas, gomas, o soluciones o emulsiones bebibles, un suplemento oral seco y un suplemento oral húmedo. La composición farmacéutica contendrán además portadores y excipientes que  
25 resultan adecuados para administrar la molécula activa respectiva de diferente naturaleza a la del tejido diana. El tipo de portador/excipiente y la cantidad del mismo dependerá de la naturaleza de la sustancia y del modo de administración de fármaco y/o la administración contemplada.

Se apreciará que el experto en la materia seleccionará, basándose en sus propios conocimientos, los componentes y forma galénica apropiados.

La planta o extracto vegetal según la invención puede utilizarse en la preparación de una composición alimentaria para animales de compañía. Dicha composición puede administrarse en el animal de compañía en forma de suplemento de su dieta normal o como componente de un alimento para animales de compañía nutricionalmente completo, y más preferentemente en un alimento para animales de compañía hipocalórico. También puede ser una composición farmacéutica.

La planta o extracto vegetal puede utilizarse solo o asociado a otras plantas, tales como achicoria, tea, cacao o con otra molécula bioactiva, tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras probióticas, glucosamina, condroitín sulfato, por ejemplo.

Preferentemente, la composición alimentaria para animales de compañía contiene aproximadamente 0,01 a 0,5 gramos de plantas secas por gramo de alimento seco para animales de compañía para un perro de 15 kg, y 0,001 a 0,1 gramos de plantas secas por gramo de alimento húmedo para animales de compañía para un perro de 15 kg.

La composición alimentaria para animales de compañía nutricionalmente completo según la invención puede encontrarse en forma de polvos, forma seca, un pisco-labis o un producto alimentario frío para animales de compañía o estable al almacenamiento. Puede enfriarse o proporcionarse en forma de producto estable al almacenamiento. Estos

alimentos para animales de compañía pueden producirse por medios conocidos de la técnica.

El alimento para animales de compañía opcionalmente también puede contener un probiótico, un microorganismo  
5 probiótico u otro agente activo, por ejemplo un ácido graso de cadena larga. La cantidad de probiótico en el alimento para animales de compañía preferentemente es inferior a 10% en peso. Por ejemplo, el probiótico puede comprender entre  
10 aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% en peso del alimento para animales de compañía. Para los alimentos para animales de compañía que utilizan achicoria como la fuente del probiótico, puede incluirse achicoria en una proporción comprendida entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 10% en peso de la mezcla alimentaria; más preferentemente de  
15 entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% en peso.

En el caso de que se utilice un microorganismo probiótico, el alimento para animales de compañía preferentemente contiene entre aproximadamente  $10^5$  y aproximadamente  $10^{10}$  células del microorganismo probiótico  
20 por gramo del alimento para animales de compañía; más preferentemente de entre aproximadamente  $10^6$  y aproximadamente  $10^8$  células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para animales de compañía puede contener entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 20% en  
25 peso de la mezcla del microorganismo probiótico; preferentemente de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 6% en peso, por ejemplo entre aproximadamente 3% y aproximadamente 6% en peso.

En caso necesario, el alimento para animales de compañía se suplementa con minerales y vitaminas de manera que sea nutricionalmente completo. Además, también pueden incorporarse en el alimento para animales de compañía según se desee diversos otros ingredientes, por ejemplo azúcar, sal, especias, condimentos, agentes saborizantes y similares.

En otra realización, pueden prepararse complementos dietéticos para mejorar la calidad del alimento para animales de compañía. A modo de complementos dietéticos, pueden encapsularse o pueden prepararse en forma de polvos o empaquetarse conjuntamente o separadamente de una comida principal, sea húmeda o seca. A título de ejemplo, pueden empaquetarse en sobrecitos en forma de polvos o de un gel o líquido u otro portador adecuado, unos polvos que contienen extractos según la invención. Estas unidades empaquetadas separadamente pueden proporcionarse conjuntamente con una comida principal o en paquetes multiunidad para la utilización con una comida principal o pisco-labis siguiendo las instrucciones para el usuario.

La cantidad de alimento para animales de compañía que debe ser consumida por el animal de compañía para obtener un efecto beneficioso dependerá del tamaño, tipo y edad del animal de compañía. Sin embargo, una cantidad del alimento para animales de compañía para proporcionar una cantidad diaria de entre aproximadamente 0,5 y 5 gramos de plantas secas por kg de peso corporal habitualmente resultaría adecuada para perros y gatos.

La administración en un ser humano o animal del alimento o composición alimentaria para animales de compañía tal como se ha indicado anteriormente resultará en una regeneración ósea mejorada durante la cicatrización de  
5 fracturas.

Ayuda a estimular la formación ósea y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y la optimización de la masa ósea máxima. En particular, puede proporcionar un crecimiento óseo óptimo durante la infancia.

10 Reduce el riesgo de la osteoporosis y mejora la recuperación tras una fractura.

Además, ayuda a construir cartílago en los mamíferos, evita la osteoartritis en animales de compañía y seres humanos, resultando en una mejor actividad o movilidad del  
15 individuo.

Los ejemplos siguientes se proporcionan únicamente a título ilustrativo y en modo alguno deben interpretarse como limitativos del objeto de la presente solicitud. Todos los porcentajes se proporcionan en peso, a menos que se indique  
20 lo contrario. Los ejemplos están precedidos por una breve descripción de la figura.

**Figura 1:** medición de la expresión endógena de ARNm de BMP-2 en células hPOB-tert mediante RT-PCR tras el tratamiento con extractos de *Lindera benzoin* (P.E. 740, 50  
25 µg/ml) o de *Cyperus rotundus* (P.E. 250, 10 µg/ml) durante 48 horas y que muestra la estimulación del BMP-2 en 3,8 y 2,8 veces el control, respectivamente. La validación del presente ensayo se ha realizado con lovastatina (0,5 µg/ml)

como control positivo, mostrando una inducción por BMP-2 de 2,5 veces.

**Figura 2:** comparación entre los valores de inhibición medidos para el ensayo con huesos calvarios (A) y el ensayo con fosas (B) para los extractos procedentes de *Ocimum gratissimum* (738), *Amelanchier alnifolia* (734), *Glycine max* (768), *Cyperus rotundus* (205) y *Carthamus tinctorius* (746).

### **Ejemplos**

Los ejemplos siguientes ilustran la invención reivindicada, en la que la planta o extracto vegetal es *Rosmarinus*. Se ejemplifican otras plantas y extractos vegetales a título comparativo.

### **Ejemplo 1: ensayos sobre la formación y resorción óseas**

#### **1. Formación de hueso**

Se cribaron 91 extractos para formación de hueso mediante el ensayo del informador del gen de BMP-2 (proteína morfogenética ósea) y para la resorción ósea mediante el ensayo de huesos calvarios.

Dichos 91 extractos correspondían a 30 plantas diferentes.

### **Materiales y métodos**

#### **• Preparación de extractos para los ensayos de cribado:**

Se desgrasó el material vegetal molido utilizando hexano y después se extrajo con una mezcla de alcohol y agua, con diferentes porcentajes de agua, de entre 10% y 90%, preferentemente de 50%. Los alcoholes podían ser alcoholes metílicos o etílicos, proporcionando el extracto 1a.

En una alícuota del residuo de dicho primer extracto, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa. Los enzimas pueden sustituirse por condiciones ácidas. La operación puede realizarse bajo  
5 condiciones suaves (temperatura ambiente) o mediante reflujo con diferentes concentraciones de ácido. La fase hidrolizada acuosa se extrajo con un solvente no miscible, preferentemente acetato de etilo, proporcionando el extracto 2a.

10 El extracto puede secarse, liofilizarse o suministrarse en forma líquida.

En algunos casos, los polifenoles pueden descartarse mediante un tratamiento de polivinilpolipirrolidona (PVPP), evitando los artefactos en los ensayos de cribado.

15 Tras la preparación de los extractos, se pesa cada extracto, se redissuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 20 mg/ml y se almacenaron en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron como solución madre y posteriormente se diluyeron en medio para cada ensayo. En  
20 los sistemas de ensayo se sometió a ensayo un abanico de dosis.

- Ensayo de formación de hueso

Ensayo de luciferasa-BMP-2. Se determinó la actividad de los extractos utilizando células 2T3 que contenían el  
25 promotor de BMP-2 ligado operatoriamente al gen de luciferasa. Un incremento de la actividad de luciferasa en los lisados celulares refleja un incremento de la actividad del promotor de BMP-2. Los extractos se sometieron a ensayo a una dilución inicial de 100  $\mu\text{g/ml}$  con diluciones de  $\frac{1}{2}$

bajando hasta 0,2 µg/ml. Se midió la actividad de promotor de BMP-2 mediante la medición de la actividad de luciferasa en extractos celulares.

Trece plantas proporcionaron un resultado 5 significativamente positivo en la estimulación de la expresión de BMP-2 (Tabla 1).

Tabla 1

<b>Nombre latino</b>	<b>Nombre vulgar</b>	<b>parte</b>	<b>conc. (µg/ml)</b>	<b>Extracto de principio activo/nº</b>
<i>Acorus calamus</i>	Cálamo aromático	rizoma	5	MeOH/agua/731
<i>Amelanchier ovalis</i>	Guillomo	fruto	10	MeOH/agua/219
<i>Artemisia vulgaris</i>	Artemisa	partes aéreas	10	Acetato de etilo/225
<i>Cyperus rotundus</i>	Castañuela	rizoma	10	Acetato de etilo/205
<i>Taraxacum officinalis</i>	Diente de león	hojas	50	Acetato de etilo/750
<i>Lindera benzoin</i>	Calicanto	partes aéreas	50	Acetato de etilo/740
<i>Prunus persica</i>	Melocotonero	semilla	25	Acetato de etilo/772
<i>Glycine max</i>	Soja	cultivos celulares	50	Acetato de etilo/768
<i>Iris pallida</i>	Lirio	tubérculos	100	MeOH/agua/239
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	hojas	50	MeOH/agua/2004; acetato de etilo/2005
<i>Carvi</i>	Alcaravea	semillas	25	acetato de etilo/2074
<i>Thyme</i>	Tomillo	hojas	25	acetato de etilo/2067
<i>Mentha spicata</i>	Hierbabuena	hojas	100	acetato de etilo/2072
<i>Vitis vinifera</i>	Vid	fruto	100	acetato de etilo/2069

Los ejemplos de nuevas preparaciones de las mismas plantas y subfracciones de las mismas que estimulan BMP-2 son:

*Lindera benzoin*, extracto activo/n° acetato de etilo/740/2059; subfracción activa/n° 2060 *Taraxacum officinalis*, extracto activo/n° acetato de etilo/750/2034; subfracción activa/n° 2035

*Cyperus rotundus*, extracto activo/n° acetato de etilo/205/2011; subfracción activa/n° 2012,2013

10 *Iris pallida*, extracto activo/n° MeOH/agua/239; subfracción activa/n° 760/762/2021, 2022

Se prepararon subfracciones mediante fraccionamiento en un cartucho de gel de sílice de fase reversa mediante elución utilizando solventes de polaridad variable. Las isoflavonas de soja pura genisteína y daidzeína ( $10^{-6}$  M) estimularon BMP-2, mientras que el estradiol no la estimuló.

La inducción de BMP-2 aparentemente no se encuentra restringida a la actividad de tipo estrogénico, debido a que resulta estimulada por fitoestrógenos pero no por el estrógeno mismo. Lo anterior implica que la actividad de los fitoestrógenos (tales como la genisteína y la daidzeína) puede encontrarse mediada por un mecanismo no estrogénico. La actividad de promotor de BMP-2 no resulta estimulada por el estradiol, de esta manera no resulta necesario que la estrogenicidad de los compuestos vegetales se encuentre activa en el presente ensayo.

Planta	extracto activo n°	concentración (µg/ml)
<i>Glycine max</i>	Acetato de etilo/2001	10, 50
<i>Rosmarinus officinalis</i>	MeOH/agua/2004	10, 50

<i>Rosmarinus officinalis</i>	Acetato de etilo/2005	10
<i>Cyperus rotundus</i>	Subfracción/2012	10, 50
<i>Iris pallida</i>	Subfracción/2022	10
<i>Thyme</i>	Acetato de etilo/2067	10
<i>Carvi</i>	Acetato de etilo/2074	10

Ejemplo de formación ósea en cultivo orgánico de huesos calvarios.

El método utilizado fue el descrito en Science 5 286:1946-1949, 1999. Los extractos se evaluaron en un ensayo *in vitro* de 4 días de huesos calvarios murinos neonatales. Los huesos se incubaron con los extractos durante la totalidad de los 4 días. Se evaluó la formación de hueso mediante análisis histológico.

## 10 2. Resorción ósea, ensayo de huesos calvarios

Se evaluó la capacidad de los extractos de inhibir la resorción ósea estimulada por IL-1 ( $10^{-10}$  M) se evaluó en el ensayo de resorción ósea neonatal. Se evaluó cada extracto para su capacidad de inhibir la resorción ósea a una 15 concentración de 10 µg/ml.

Se evaluó en el ensayo de resorción ósea neonatal la capacidad de los extractos preparados tal como en el Ejemplo 1, de inhibir la resorción ósea estimulada por IL-1 ( $10^{-10}$  M). Se evaluó cada extracto para su capacidad de inhibir la 20 resorción ósea a una concentración de 10 µg/ml. Se indican en la Tabla 2 los extractos vegetales que resultaron positivos.

Tabla 2

Nombre latino	Nombre vulgar	Parte	Extracto activo/nº
<i>Amelanchier alnifolia</i>	Guillomo de Saskatchewan	Fruto	Acetato de etilo/734

<i>Ocimum gratissimum</i>	Albahaca	Hojas	MeOH/H <sub>2</sub> O/737
<i>Ocimum gratissimum</i>	Albahaca	Hojas	Acetato de etilo/738
<i>Carthamus tinctorius</i>	Cártamo	Semilla	Acetato de etilo/746
<i>Cyperus rotundus</i>	Castañuela	Rizoma	Acetato de etilo/205
<i>Glycine max</i>	Soja	Cultivos celulares	768

Las plantas siguientes fueron activas en el ensayo de resorción ósea: *Amelanchier alnifolia*, *Ocimum gratissimum* y *Carthamus tinctorius* y *Glycine max*. *Cyperus rotundus* inhibió la resorción ósea e indujo la BMP-2.

**Ejemplo 2: efecto de los extractos vegetales sobre la expresión endógena de BMP-2 en osteoblastos humanos**

Las plantas que se encontró que eran positivas para la inducción de BMP-2 en el Ejemplo 1 se sometieron a ensayo adicionalmente en una línea celular periosteal/preosteoblástica humana, hPOB-tert, para su capacidad de inducir la expresión endógena de BMP-2. Este ensayo en células osteoblásticas confirmó los resultados mostrados en el Ejemplo 1.

Por ejemplo, el tratamiento de las células hPOB-tert con extractos de *Lindera benzoin* (extracto 740, 50 µg/ml) y de *Cyperus rotundus* (extracto 205, 10 µg/ml) durante 48 horas estimuló la expresión de BMP-2 en 3,8 y 2,8 veces el nivel del control (ver la figura 1). La validación de este ensayo se llevó a cabo con lovastatina (0,5 µg/ml) como control positivo, mostrando la inducción de BMP-2 en 2,5 veces.

Al alcanzar la confluencia, se incubaron las células con 0,05 µg/ml de lovastatina o con los extractos vegetales. Se extrajo el ARN total con reactivo TRIzol (Gibco). Se transcribieron inversamente 10 µg de ARN utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Boehringer). Se amplificaron las secuencias de ADNc de BMP-2 durante 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C utilizando cebadores oligonucleótidos específicos (5':TTGCGGCTGCTCAGCATGTT; 3'-CATCTTGCATCTGTTCTCGGAA). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. La cuantificación se llevó a cabo utilizando software para imágenes de NIH y se normalizaron los resultados con actina como gene de mantenimiento.

Se muestran los resultados en la figura 1.

### **Resorción ósea**

Los extractos vegetales que se encontraron positivos en el ensayo de calvarios se sometieron a ensayo nuevamente en un segundo ensayo de resorción ósea, es decir en un ensayo de fosa utilizando células mixtas de hueso de conejo cultivadas en secciones de hueso bovino (Tezuka K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 186(2):911-7, 1992, y Lorget F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 268(3):899-903, 2000). Las fosas de resorción se visualizaron mediante tinción para TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato). Se realizó un recuento de las células positivas.

Se muestra en la figura 2 una comparación entre la actividad de los extractos a una concentración de 10 µg/ml en los dos sistemas de ensayo.

**Ejemplo 3: alimentos secos para animales de compañía (no según la invención)**

Se preparó una mezcla de pienso a partir de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 5,5% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 22% en peso de harina de pollo, 2,5% de achicoria seca, aproximadamente 10% de tubérculos de *Cyperus rotundus*, estando formado el resto de sales, vitaminas y minerales.

Se alimentó la mezcla de pienso a un preacondicionador y se humectó. A continuación, se alimentó el pienso humectado a un aparato de extrusión-cocción y se gelatinizó. La matriz gelatinizada que salía del extrusor se forzó a través de una matriz y se extruyó. El extruido se cortó en trozos adecuados para la alimentación de perros, se secó a aproximadamente 110°C durante aproximadamente 20 minutos y se coció para formar pellets.

Dicho alimento seco para perros presentó un efecto positivo sobre la salud ósea y de los cartílagos e incrementó su movilidad.

**20 Ejemplo 4: alimento húmedo enlatado para animales de compañía con suplemento (no según la invención)**

Se preparó una mezcla a partir de 73% de canal de ave, pulmones de cerdo e hígado de vaca (molida), 16% de harina de trigo, 2% de pigmentos, vitaminas y sales inorgánicas. Esta mezcla se emulsionó a 12°C y se extrusionó en forma de un pudín, que seguidamente se coció a una temperatura de 90°C. Se enfrió a 30°C y se cortó en trozos. Se mezclaron 45% de estos trozos con 55% de una salsa preparada a partir de 98% de agua, 1% de pigmento y 1% de goma guar. Las latas

de aluminio se rellenaron y se esterilizaron a 125°C durante 40 minutos.

A modo de suplemento destinado a la mezcla con el alimento para animales de compañía antes de servirlo, un  
5 empaquetamiento adicional (por ejemplo un sobre) contiene 25 gramos de partes aéreas de *Cyperus rotundus* en polvo que deben añadirse al alimento diario. La cantidad correspondiente para el animal de compañía es de aproximadamente 25 gramos/día y puede suministrarse en forma  
10 de suplemento con la lata (por ejemplo en la parte superior de la misma).

**Reivindicaciones**

1. Composición que contiene una planta o extracto vegetal que contiene compuestos fitoquímicos que presentan la capacidad de estimular la proteína morfogenética ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Rosmarinus*, destinada a la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos y al mantenimiento de la salud ósea en seres humanos o animales de compañía.

2. Utilización de una planta o extracto vegetal que contiene compuestos fitoquímicos que presentan la capacidad de estimular la proteína morfogenética ósea, en la que la planta o extracto vegetal es *Rosmarinus*, para la preparación de una composición para la utilización en la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos óseos y el mantenimiento de la salud ósea en seres humanos o animales de compañía.

3. Composición según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, en la que la planta es de cualquier parte de la planta de origen: hojas, tubérculos, frutos, semillas, raíces, granos, embriones o cultivos celulares.

4. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la planta o extracto vegetal son partes aéreas de *Rosmarinus officinalis*.

5. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los compuestos fitoquímicos son lactucina, lactucopicrina, 3-desoxilactucina, geraniol o carvona.

6. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la planta o extracto vegetal se utiliza solo o asociado a otras plantas, tales como achicoria, té, cacao o con otras moléculas bioactivas, tales como antioxidantes, ácidos grasos, fibras probióticas, glucosamina y condroitín sulfato.

7. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es un alimento o composición de alimento para animales de compañía.

8. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición se presenta en forma de un alimento o alimento para animales de compañía nutricionalmente equilibrado, un suplemento dietético o un pisco-labis.

9. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición es una composición farmacéutica.

10. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición ayuda a la regeneración ósea durante la cicatrización de fracturas, ayuda a incrementar la formación de hueso y la densidad mineral ósea durante el crecimiento y a optimizar la masa ósea máxima.

11. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición ayuda a construir cartílago en seres humanos o animales de compañía.

12. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición ayuda a

prevenir la osteoartritis en seres humanos o animales de compañía, que resulta en una mejor actividad o movilidad del individuo.

13. Composición o utilización según cualquiera de las  
5 reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición está destinada al tratamiento, alivio y/o profilaxis de la osteoartritis en animales de compañía y en seres humanos.

14. Composición o utilización según cualquiera de las  
10 reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición está destinada al tratamiento o prevención de la osteoporosis.

---

**FIGURA 1**

5

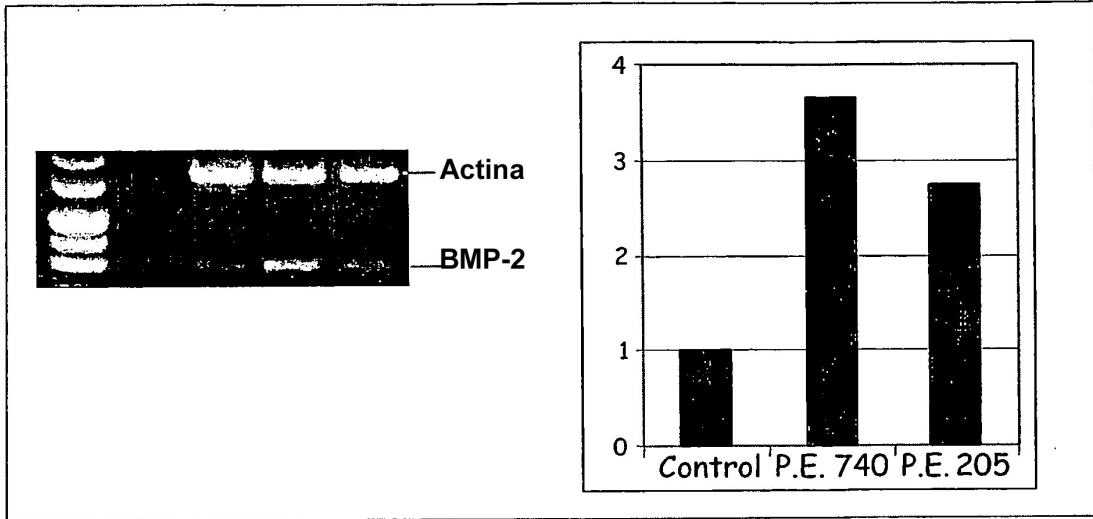


FIGURA 2

% de inhibición

