

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 299**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 35/36** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04734958 .4**  
96 Fecha de presentación: **26.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1626987**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2006**

54 Título: **Extracto de cornamenta de ciervo**

30 Prioridad:  
**27.05.2003 NZ 52615703**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.06.2012**

73 Titular/es:  
**VELVET ANTLER RESEARCH NEW ZEALAND  
LIMITED  
AGRESEARCH INVERMAY, PRIVATE BAG 50034  
MOSGIEL, NZ**

72 Inventor/es:  
**Coates, Dawn Elizabeth;  
HAINES, Stephen, Roy y  
Suttie, James Miller**

74 Agente/Representante:  
**Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 383 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Extracto de cornamenta de ciervo.

**Campo Técnico**

5 Esta invención se refiere a un extracto de cornamenta de ciervo. En particular, la presente invención se refiere a extractos angiogénicos obtenidos de terciopelo de la cornamenta de ciervo, para su uso en el tratamiento de heridas en la práctica médica humana y animal.

**Técnica Anterior**

10 Las heridas, en particular las heridas persistentes, que son difíciles de cicatrizar, requieren un suministro de sangre que pueda alimentar la herida y mediar el proceso de cicatrización y minimizar la formación de cicatrices. Generalmente, las terapias usadas más comúnmente para tratar las heridas persistentes no ayudan a la herida a proporcionar su propio suministro de sangre y, por lo tanto, el proceso de cicatrización es lento.

15 Existen varias terapias para el tratamiento de heridas crónicas, sin embargo, el uso de vendajes de compresión aparece todavía como un tratamiento común (Marshall *et al.*, 2001). Están disponibles otras terapias y se han propuesto algunas terapias naturales que funcionan a través de mecanismos que implican la regulación de la tensión de oxígeno y apoyan así los tratamientos con oxígeno hiperbárico (Sen *et al.*, 2002).

20 La cicatrización de las heridas por una angiogénesis incrementada (el proceso de la vascularización de los tejidos) es aparente con algunas terapias propuestas. En un estudio reciente, la adenosina parece haber incrementado la velocidad a la que cicatrizaban las heridas actuando como un agonista del receptor de adenosina A(2A) (Mohtesinos *et al.*, 2002). Esto resultó en un número incrementado de micro vasos en las heridas tratadas. La angiogénesis incrementada es un mecanismo probable subyacente a la cicatrización mejorada mostrada en ese artículo.

25 Se ha mostrado que el muy conocido clásico factor de crecimiento angiogénico Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) causa angiogénesis y una cicatrización incrementada de las heridas cuando se administra por terapia génica para asegurar una administración local sostenida (Deodato *et al.*, 20002). Malinda *et al.* (1998) han encontrado que la Timosina  $\alpha$ 1 estimula la migración de las células endoteliales, la angiogénesis y la cicatrización de las heridas, lo que confirma que también es un agente potente de cicatrización de heridas.

30 Las cornamentas de ciervo se mudan y regeneran anualmente. La cornamenta crece hasta 2 cm al día durante su fase de crecimiento, tiempo durante el cual se denomina "cuerna de terciopelo". El crecimiento está dirigido por una población de células madre que se encuentran en el tejido mesenquimático en la punta de la cuerna (Li *et al.*, 2002). La cuerna de terciopelo está altamente vascularizada y los vasos sanguíneos en la cuerna deben crecer a la misma velocidad que la cuerna para apoyar el crecimiento de la cornamenta. Hemos identificado este sistema como una fuente potencial de factores angiogénicos que apoyarán los procesos de cicatrización de heridas.

35 Hay un artículo que sugiere que el pedículo de cicatrización o regeneración, que denominan el blastema, puede tener potencial angiogénico (Auerbach *et al.*, 1976). Este artículo implicaba el cribado por parte del autor de una variedad de tejidos incluyendo blastema de cornamenta con el objetivo de mostrar que algunos tejidos contenían potencial angiogénico. Sin embargo, de forma importante, este artículo no contenía ningún dato que mostrara actividad real angiogénica o de cicatrización de heridas. El blastema se refiere al tejido de cicatrización que aparece una vez que la cornamenta se ha mudado, y es diferente de la cornamenta en crecimiento más madura que los inventores han estudiado y mostrado en esta especificación.

40 Weng Liang *et al.*, 2001 han publicado que han encontrado un polipéptido que es útil en la cicatrización de heridas de la piel y en la proliferación de las células epiteliales. Sin embargo, las heridas ensayadas eran sólo heridas superficiales de la superficie de la piel y no arañazos profundos y no se hace mención en el artículo a que el polipéptido sea útil respecto a la angiogénesis o la proliferación de las células endoteliales.

Se ha publicado que el terciopelo de ciervo contiene factores que estimulan el crecimiento de los vasos sanguíneos aunque no se hace referencia a otros aspectos específicos respecto a la naturaleza de estos factores:

45 • LATEST RESEARCH, [En línea] 07 abril 2003, páginas 1-10, XP002997580 Obtenido de: URL:<http://www.deervelvetinformation.org/research.htm>; y

• LATEST RESEARCH, [En línea] 07 abril 2003, páginas 1-14, XP002998682 Obtenido de Internet: URL:<http://www.velvita.com/latestresearch.htm> .

50 Tomando como base sus pesos moleculares, se esperaría encontrar a la mayor parte de los factores angiogénicos clásicos en la fracción de peso molecular alto, una excepción a esta regla sería los péptidos de la familia de la Timosina.

No se admite que ninguna referencia constituya técnica anterior. La discusión de las referencias indica lo que sus autores afirman y los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de los documentos

citados. Se entenderá claramente que, aunque varias de las publicaciones de la técnica anterior son referidas en la presente memoria, esta referencia no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la técnica, en Nueva Zelanda ni en ningún otro país.

5 Se sabe que al término "comprende" se le puede atribuir, bajo jurisdicciones distintas, un significado exclusivo o inclusivo. Para el propósito de esta especificación, y a no ser que se indique otra cosa, el término "comprende" tendrá un significado inclusivo - es decir, que se entenderá que significa una inclusión no sólo de los componentes listados a los que hace referencia directamente, sino también de otros componentes o elementos no especificados. Esta base racional también se usará cuando se usa el término "comprendido" o "que comprende" respecto a una o más etapas en un método o proceso.

10 Es un objeto de la presente invención tratar los problemas anteriores o al menos proporcionar al público una elección útil.

Los aspectos y ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción consiguiente que se proporciona sólo como ejemplo.

### **Descripción de la invención**

15 Según un aspecto de la presente invención se proporciona un extracto aislado de terciopelo de ciervo que contiene péptidos que tienen pesos moleculares que son sustancialmente menores de o iguales a 10 kDa en la fabricación de un medicamento para tratar heridas, en el que los péptidos del extracto se separan mediante precipitación de los péptidos de peso molecular alto con etanol al 70% v/v.

20 Se prevé que la composición puede tomar una variedad de diferentes formulaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la composición puede formularse como: un gel, una loción, un bálsamo, un pulverizador, un apósito transdérmico, o semejantes, como será evidente para un experto en la técnica.

25 El término "péptido(s)" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier péptido o combinación de péptidos presente en el terciopelo de ciervo incluyendo péptidos, proteínas y polipéptidos que incluyen polímeros de aminoácidos; y también incluye péptidos, proteínas y polipéptidos que han sido modificados para incluir otros restos incluyendo pero sin limitarse a restos de carbohidrato y/o de lípido.

El término "componente(s)" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier componente o combinación de componentes presente en el terciopelo de ciervo incluyendo pero sin limitarse a péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, lípidos y factores de crecimiento.

30 El término "efecto proliferativo" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la capacidad de los extractos o composiciones de la presente invención para causar que las células y/o tejido crezcan rápidamente y/o se multipliquen para producir nuevas células o tejido.

El término "células endoteliales" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a células que forman el endotelio que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos. Esto incluye tanto los vasos sanguíneos venosos como arteriales, así como capilares, los vasos coronarios y el recubrimiento interno del corazón.

35 El término "herida" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una lesión en la que la piel, tejido o un órgano se rompe, perfora, corta o divide o perturba de otra forma, como resultado de una enfermedad, accidente o cirugía. Este término se refiere a llagas o lesiones; incluyendo úlceras.

El término "herida(s) persistente(s)" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a heridas que cicatrizan lentamente y duran mucho tiempo. Este término también puede referirse a heridas crónicas.

40 El término "congelar-descongelar" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a someter a los péptidos de la presente invención a sustancialmente  $-20^{\circ}\text{C}$  y elevar hasta temperatura ambiente que es sustancialmente  $18-25^{\circ}\text{C}$ .

Los pesos moleculares de los péptidos de la presente invención pueden determinarse por una variedad de métodos diferentes sin apartarse del alcance de la presente invención.

45 Generalmente, los pesos moleculares de los péptidos de la presente invención pueden determinarse por Cromatografía de Filtración en Gel, electroforesis, espectrometría de masas u otro método adecuado.

50 Los términos "Terciopelo de Ciervo", "Terciopelo" o "Cornamenta" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a cualquier parte de la cuerna en crecimiento. En general, pueden incluirse todas las puntas y el vástago principal completo de la cuerna. Sin embargo, en realizaciones preferidas la piel del terciopelo puede eliminarse cuando se preparan los extractos angiogénicos y la región basal del vástago principal adyacente a y por debajo de la punta de la frente también pueden excluirse.

- 5 El terciopelo de ciervo es un tejido complejo que, una vez seco, está comprendido principalmente por péptidos, proteínas y minerales pero también contiene otros componentes tales como carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres. Los extractos de terciopelo de ciervo pueden contener, por lo tanto, una mezcla de todos estos componentes que son solubles en el disolvente de extracción. Cuando se usan condiciones de extracción acuosas se espera razonablemente que los componentes principales del extracto sean péptidos o proteínas (Sunwoo *et al.*, 1995).
- Generalmente, el terciopelo de ciervo se tomará de ciervo rojo. Sin embargo, también pueden usarse otras especies de ciervo, tal como wapití, gamo o de cola blanca, como fuente de terciopelo de ciervo.
- El término "Angiogénico" o "Angiogénesis" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la capacidad de una sustancia de inducir el crecimiento de los vasos sanguíneos.
- 10 Preferiblemente, el terciopelo se recoge durante la fase de crecimiento. Sin embargo, esto no debería verse como limitante del alcance de la presente invención ya que el terciopelo de la cornamenta madura también podría recogerse y usarse para la presente invención.
- 15 El terciopelo puede procesarse para conservar el terciopelo por uno o más de los métodos siguientes: liofilización, congelación, inmersión en caliente o secado en horno. Sin embargo, esto no debería verse como limitante del alcance de la presente invención.
- Preferiblemente, el terciopelo puede procesarse por inmersión en caliente.
- Los componentes de la presente invención pueden incluir cualquier vehículo, excipiente, estabilizador y/o otro aditivo de formulación farmacéuticamente o veterinariamente aceptable: como será evidente para un experto en la técnica.
- 20 El terciopelo de ciervo puede extraerse por una variedad de métodos diferentes sin desviarse del alcance de la presente invención.
- En una realización preferida, la extracción puede utilizar disolventes orgánicos.
- En otra realización preferida, la extracción puede utilizar disoluciones acuosas.
- 25 El término "extracto de proteínas totales" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un extracto acuoso preparado sin ninguna intención de controlar los pesos moleculares de los péptidos o proteínas contenidos en el extracto. Por definición, los extractos de proteínas totales también contendrán otros componentes solubles en agua del terciopelo de ciervo que no son péptidos o proteínas, pero que se co-extraen con los péptidos o proteínas.
- En una realización preferida, el método de fraccionamiento puede utilizar etanol al 70% como el disolvente orgánico en el que el terciopelo de ciervo se sumerge antes de la extracción acuosa. El término "extracto después del pre-tratamiento con etanol" se usa en la presente memoria para referirse a un extracto preparado usando este método.
- 30 En otra realización preferida, el método de fraccionamiento puede utilizar la adición de etanol frío a una disolución acuosa de un extracto de proteínas totales de terciopelo de ciervo, para causar la precipitación de las proteínas de alto peso molecular que se eliminan por centrifugación o filtración. El término "extracto precipitado con etanol" se usa en la presente memoria para referirse a un extracto preparado usando este método.
- En una realización adicional, el método de fraccionamiento puede utilizar ultrafiltración.
- 35 Generalmente, el extracto final de terciopelo de la presente invención puede ser una disolución acuosa, un sólido seco amorfo o un polvo liofilizado. Sin embargo, esto no debe verse como una limitación del alcance de la presente invención.
- Preferiblemente, la disolución acuosa puede ser en agua, disolución salina tamponada con fosfato (PBS) u otro disolvente acuoso adecuado.
- 40 Además de la descripción contenida en la presente memoria respecto al método preferido de extracción, pueden encontrarse detalles adicionales que se refieren a la extracción que pueden ser de ayuda a un experto en la técnica en NZ 524868 y la solicitud PCT No. NZ2004/000058.
- Así, las realizaciones preferidas de la presente invención pueden tener varias ventajas sobre la técnica anterior que pueden incluir:
- 45
1. Proporcionar un método de extracción para obtener composiciones angiogénicas de terciopelo de ciervo.
  2. Proporcionar una composición de terciopelo de ciervo que tiene efectos angiogénicos.
  3. Proporcionar una composición de terciopelo de ciervo que puede usarse en el tratamiento de heridas o lesiones.
  4. Proporcionar una composición de terciopelo de ciervo que puede usarse en el tratamiento de heridas persistentes.

**Descripción breve de los dibujos**

Los aspectos adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción siguiente que se proporciona sólo como ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 5 Figura 1 Perfil de Cromatografía de Filtración en Gel de la fracción de alto peso molecular de terciopelo de ciervo como se obtiene por ultrafiltración del extracto de proteínas totales. Se muestra una escala aproximada de peso molecular debajo del cromatograma y la Línea Discontinua marca la posición esperada de elución de las proteínas de 10 kDa;
- 10 Figura 2 Perfil de Cromatografía de Filtración en Gel de la fracción de bajo peso molecular de terciopelo de ciervo como se obtiene por ultrafiltración del extracto de proteínas totales. Se muestra una escala aproximada de peso molecular debajo del cromatograma y la Línea Discontinua marca la posición esperada de elución de las proteínas de 10 kDa;
- 15 Figura 3 Perfil de Cromatografía de Filtración en Gel del extracto de proteínas totales de terciopelo de ciervo. Se muestra una escala aproximada de peso molecular debajo del cromatograma y la Línea Discontinua marca la posición esperada de elución de las proteínas de 10 kDa;
- 20 Figura 4 Perfil de Cromatografía de Filtración en Gel del extracto de bajo peso molecular como se obtiene por la extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%. Se muestra una escala aproximada de peso molecular debajo del cromatograma y la Línea Discontinua marca la posición esperada de elución de las proteínas de 10 kDa;
- 25 Figura 5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de Extracto de Terciopelo de Bajo Peso Molecular como se obtiene por extracción después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70% ("Extracto LMW") y de un extracto de proteínas totales de terciopelo de ciervo ("Extracto TP"). (A) Teñido con Azul de Coomassie Brillante G250. (B) Teñido posteriormente con plata. Los carriles contenían bien 5, 10, 25 ó 50 µg de extracto. Una mezcla de marcadores de peso molecular ("Marcadores MW") se cargó en el primer y último carril del gel y los pesos moleculares de las proteínas marcadoras se indican al lado de las imágenes;
- 30 Figura 6 Un gráfico de barras que muestra los efectos de los diferentes extractos de cornamenta en la proliferación de Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana en respuesta a suero al 1% ("Control"), extracto de proteínas totales de terciopelo antes ("Extracto de Proteínas Totales") y después de hervir durante 3 minutos ("Extracto de Proteínas Totales Hervido") o extracto de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol al 70%) ("Extracto de Bajo Peso Molecular"). Los extractos de terciopelo se usaron a una concentración de 500 µg/ml y también contenían suero al 1%;
- 35 Figura 7 Un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de migración celular. La migración de las células BAE en respuesta a suero al 1% ("Control"), extracto de proteínas totales de terciopelo ("Proteínas Totales"), extracto de bajo peso molecular preparado por precipitación con etanol ("Precipitado con EtOH") o extracto de bajo peso molecular preparado por ultrafiltración ("Ultrafiltrado"). Los extractos de terciopelo se usaron a concentraciones de 100 µg/ml y 500 µg/ml y también contenían suero al 1%;
- 40 Figura 8 Otro gráfico que muestra los resultados de un ensayo de migración celular. La migración de las células BAE en respuesta a suero al 1% ("Control") o el extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción del terciopelo después de pre-tratamiento con etanol al 70%) antes ("AE") y después de hervir durante 3 min ("AE Hervido"). Los extractos de terciopelo se usaron a concentraciones de 100 µg/ml y 500 µg/ml y también contenían suero al 1%;
- 45 Figura 9 Fotos de hibridaciones *in situ* usando sondas VEGF en la región precartilágo de una punta de terciopelo de la cornamenta. A) Campo brillante de la sonda antisentido. B) Campo oscuro de la sonda antisentido que muestra el área de hibridación. C) Campo brillante de la sonda con sentido. D) Campo oscuro de la sonda con sentido que sólo muestra el fondo. Área precartilágo con marcaje. V, Vaso Sanguíneo;
- 50 Figura 10 Un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de cicatrización de heridas en ratas. Las heridas se trataron con 25 µl de disolución salina ("Control") o con extracto de terciopelo de bajo peso molecular (1 mg/ml en disolución salina) ("Tratado"). El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol. Las dosis se aplicaron en los días 0, 2, 4, 7 y 10. Los datos presentados son tamaños medios de las heridas en los días siguientes de provocar la herida, como porcentajes de los tamaños originales de las heridas. Las barras de error mostradas en los días 2, 4, 7, 10, 14 y 17 son los errores estándar de las diferencias entre las medias. Los niveles de significancia indicados con asteriscos son: \*P<0,05, \*\*P<0,01;
- 55 Figura 11 Gráficos que muestran los resultados de ensayos de cicatrización de heridas en ratas que investigan el efecto de dosis del extracto de bajo peso molecular, como se obtiene por extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%, en la velocidad del cierre de la herida. Las heridas se trataron con 25 µl de disolución salina ("Control") o con el extracto de terciopelo de bajo peso molecular ("Tratado"). El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol y se aplicó a (a) 0,1 mg/ml (b) 2

mg/ml (c) 10 mg/ml (d) 100 mg/ml. Las dosis se administraron en los días 0, 2, 4, 6, 8, y 10 excepto para 100 mg/ml que no tuvo aplicación en el día 10. Los datos presentados son tamaños medios de las heridas en los días siguientes de provocar la herida, como porcentajes de los tamaños originales de las heridas. Las barras de error mostradas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 son los errores estándar de las diferencias entre las medias. Los niveles de significancia indicados con asteriscos son: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;

**Figura 12** Gráficos que muestran los resultados de ensayos de cicatrización de heridas en ratas que investigan el efecto de la frecuencia de la aplicación del extracto de bajo peso molecular, como se obtiene por extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%, en la velocidad del cierre de la herida. Las heridas se trataron con 25  $\mu$ l de disolución salina ("Control") o con el extracto de terciopelo de bajo peso molecular ("Tratado"). El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol. En (a) se administraron dosis múltiples a 10 mg/ml en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mientras que en (b) se administró una única aplicación a 10 mg/ml en el día 0. Los datos presentados son tamaños medios de las heridas en los días siguientes de provocar la herida, como porcentajes de los tamaños originales de las heridas. Las barras de error se muestran en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 son los errores estándar de las diferencias entre las medias. Los niveles de significancia indicados con asteriscos son: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;

**Figura 13** Gráficos que muestran los resultados de ensayos de cicatrización de heridas en ratas que investigan el efecto de diferentes formulaciones del extracto de bajo peso molecular, como se obtiene por extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%, en la velocidad del cierre de la herida. Las heridas se trataron con 25  $\mu$ l de varias formulaciones que contienen ("Tratado") o no contienen ("Control") el extracto de terciopelo de bajo peso molecular. El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol. Las heridas tratadas recibieron el extracto en los días 0, 2, 4, 6 y 8 formulado a 2 mg/ml en (a) Disolución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), (b) gel Methocel E-4M, (c) gel Pluronic F-127 o (d) gel Carbopol-934P. Los datos presentados son tamaños medios de las heridas en los días siguientes de provocar la herida, como porcentajes de los tamaños originales de las heridas. Las barras de error mostradas en los días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 son los errores estándar de las diferencias entre las medias. Los niveles de significancia indicados con asteriscos son: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;

**Figura 14** Imágenes que muestran la histología de las heridas como se revela por la tinción Tricromo de Masson de tejido de herida 4 días después de una única aplicación del extracto de terciopelo de bajo peso molecular ("Tratado") o de PBS ("Control"). El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol. (A) es una imagen con poca magnificación de una herida control en la que es evidente la Biopsia en Sacabocados (herida) a la derecha de la línea horizontal. La imagen con mayor magnificación (C) de la herida control revela la costra (S) en la superficie de la herida y el tejido de la herida por debajo (WT). Una Biopsia en Sacabocados (herida) después de tratamiento con el extracto de bajo peso molecular es evidente en (B). Una mayor magnificación (D) de la herida tratada revela tejido dérmico (DT) con lo que parecen ser espacios vasculares y una epidermis en formación (E). Las barras de la escala en (A) y (B) = 200  $\mu$ m, y en (C) y (D) = 100  $\mu$ m; y

**Figura 15** Inmunohistoquímica de laminina de tejido de la herida 4 días después de una única aplicación del extracto de terciopelo de bajo peso molecular ("Tratado") o de PBS ("Control"). El extracto de bajo peso molecular se preparó por extracción después de pre-tratamiento con etanol. (A) En la herida control sólo se detectó laminina en el tejido en el borde de la herida y no dentro de la biopsia en sacabocados. (B) En la herida tratada, la laminina se detectó tanto en el borde de la herida como dentro de la herida. (C) Mayor magnificación de la herida control en (A) con pocos vasos visibles. (D) Mayor magnificación de la herida tratada en (B) con vasos basales y nuevos vasos subyacentes al epitelio evidentes. (E) Mayor magnificación del borde de la herida en (A) revela los vasos sólo en el tejido no herido. (F) IgG de conejo control para el anticuerpo laminina sin detección de la señal. Las barras de la escala en (A) y (B) = 200  $\mu$ m, y en (C) y (F) = 100  $\mu$ m.

## **Mejores modos para llevar a cabo la invención**

### **Experimental**

#### **Métodos**

##### **Recogida del Tejido:**

Las cornamentas de terciopelo de ciervo se recogieron de venados ciervo común de 3 años en los días 55-60 de crecimiento después de la muda de las cornamentas previas.

El terciopelo se extrajo según la regulación establecida por el Código de Recomendaciones y Estándares Mínimos para el Bienestar de los Ciervos durante la Recogida de Cornamentas, Julio 1992 (revisado 1997), Ministerio de Agricultura y Pesca, Wellington, Nueva Zelanda.

El terciopelo se procesó comercialmente por inmersión en caliente o liofilización. La inmersión en caliente se basa en el método tradicional chino, en el que palos de la cornamenta se suspenden desde la base (es decir, las puntas hacia abajo) y se sumergen reiteradamente en agua casi hirviendo durante breves periodos de tiempo. Después de haber sido sumergidos, se deja que se enfríen antes de ser sumergidos de nuevo. La inmersión continúa hasta que

burbujea plasma transparente de las bases cortadas de las cornamentas. Las cornamentas se ponen en un secador con baja humedad a aproximadamente 15°C durante varias semanas hasta que están secas.

- 5 Se seleccionaron las cornamentas procesadas (Sumergidas en Caliente o Liofilizadas). La piel del terciopelo se extrajo de la cornamenta usando un cuchillo afilado. Se incluyeron todas las partes de las cornamentas del ciervo común a los 55-60 días de crecimiento excepto las regiones basales de los palos principales que se excluyeron hasta e incluyendo las puntas de la frente. El terciopelo se cortó con una sierra de banda en anillos con un grosor de 1-2 cm y se cortaron con escoplo en bloques pequeños con un tamaño de varios centímetros antes de ser molidos hasta un polvo usando un molino (Thomas, EEUU) equipado con una pantalla de 0,5 mm.

### Extracción y Fraccionamiento

- 10 El terciopelo de ciervo se extrae y se fracciona para dar una fracción de peso molecular bajo que es rica en factores de crecimiento angiogénicos. Esta fracción puede prepararse de múltiples maneras incluyendo ultrafiltración, diálisis, cromatografía de filtración en gel, precipitación de proteínas de peso molecular alto de la disolución usando disolventes orgánicos (por ejemplo, etanol) o por extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo del ciervo con disolventes orgánicos, por ejemplo, etanol al 70%. Los tres métodos usados aquí para la producción del extracto han sido ultrafiltración, mediante precipitación de peso molecular alto usando etanol y mediante extracción acuosa después de pre-tratamiento del terciopelo de ciervo con etanol al 70%.

### Extracción del Terciopelo de Ciervo y Fraccionamiento por Ultrafiltración

#### *Preparación de un Extracto de Proteínas Totales del Terciopelo de Ciervo*

- 20 Se preparó un extracto de Tampón Fosfato a partir de 5 g de polvo de terciopelo de ciervo liofilizado usando 100 ml de tampón fosfato. El tampón fosfato contenía ortofosfato *di*-sódico de hidrógeno (1,15 g/L), ortofosfato potásico de *di*-hidrógeno (0,24 g/L), cloruro de potasio (0,2 g/L) y cloruro de sodio (8,0 g/L). La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente y se filtró a través de papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A). El filtrado se centrifugó a 11.500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante (93 ml) se decantó en botellas Schott pesadas y se congeló superficialmente antes de liofilizarlo a 15°C.

- 25 *Fraccionamiento del Extracto de Proteínas Totales de Terciopelo de Ciervo por Ultrafiltración*

- El extracto de terciopelo de Tampón Fosfato (15 mg) se disolvió en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml y se decantó en un dispositivo de ultrafiltración (Centriprep-YM10, Amicon, EEUU) que tiene un punto de corte nominal de peso molecular de 10 kDa. El tubo se centrifugó a 2.100 g durante 40 minutos a 4°C. El ultrafiltrado se recogió después de este tiempo y el tubo se centrifugó de manera similar dos veces más durante 20 minutos cada una hasta que sólo quedó una pequeña cantidad de retenido de alto peso molecular. Los ultrafiltrados se combinaron y se decantaron en un tubo nuevo Centriprep. La ultrafiltración se repitió para asegurar que no había contaminación con proteínas de alto peso molecular. El ultrafiltrado final que contiene la fracción de bajo peso molecular se liofilizó, se pesó y se almacenó para un uso futuro. El retenido que contiene la fracción de alto peso molecular se trató de manera similar.

- 35 **Preparación de un Extracto de Bajo peso Molecular por Precipitación de Proteínas de Alto Peso Molecular De una Disolución de Extracto de Proteínas Totales Usando Etanol**

- Se preparó un extracto de proteínas totales de terciopelo de ciervo agitando suavemente polvo seco de terciopelo de ciervo (10 g) en agua desionizada (100 ml) durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 2.100 g durante 15 minutos y el sobrenadante se decantó en una botella de centrífuga limpia. El sobrenadante se centrifugó más a 21.000 g durante 15 minutos con el fin de aclarar completamente la disolución del extracto de proteínas totales, que se enfrió hasta 4°C. Se añadió gradualmente etanol al 100% frío (4°C) (3 volúmenes) con agitación constante. La mezcla turbia se centrifugó a 21.000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar las proteínas de alto peso molecular precipitadas. El sobrenadante se transfirió a un matraz de evaporación Büchi y el disolvente se eliminó en vacío en un evaporador giratorio Büchi. El residuo seco amorfo, que comprende el extracto de terciopelo de bajo peso molecular, se almacenó a temperatura ambiente sellado en el matraz de evaporación antes de usarlo.

### Preparación de un Extracto de Bajo Peso Molecular por Extracción de Terciopelo de Ciervo Después de Pre-tratamiento con Etanol

#### *Preparación a Escala de Laboratorio*

- 50 El método elegido para preparar este extracto es por extracción acuosa después del pre-tratamiento del polvo de terciopelo de ciervo con etanol al 70%. En este caso, se mezclaron 100 g de polvo de terciopelo de ciervo sometidos a inmersión en caliente con 600 ml de etanol al 70% (grado alimentario). La mezcla se agitó durante 3 horas y se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado. La mayor parte del etanol remanente se eliminó en vacío del residuo de terciopelo mediante el uso de un evaporador giratorio Büchi. A lo largo del proceso de evaporación se suministró un calor suave al matraz de evaporación mediante el uso de un baño de agua a 30°C. Se añadió agua

desionizada (2 L) al terciopelo seco y la mezcla se agitó durante 12 horas. Después de este tiempo, la mezcla de extracción se filtró progresivamente a través de papel Whatman No 1, después papel No 6 y finalmente papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A). El residuo de terciopelo se desechó y el filtrado se centrifugó a 11.500 rpm durante 10 minutos a 20°C. El sobrenadante se congeló superficialmente y se liofilizó a 15°C. Se obtuvo un rendimiento total de 4,10 g (rendimiento del 4,1%) y se utilizó para los experimentos de bioensayo *in vitro* detallados más adelante.

#### Preparación a escala piloto

El polvo de cornamentas de terciopelo de ciervo sometidas a inmersión en caliente, preparado como se ha descrito anteriormente, se pretrató con etanol al 70% en 34 lotes separados. Cada lote de entre 84,0-172,6 g de polvo de terciopelo se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente con 6 volúmenes (p/v) de etanol al 70%. La mayor parte del disolvente se eliminó en vacío en primer lugar mediante el uso de un evaporador giratorio equipado con un baño de agua a 30°C (Buchi Rotavapor-R) y después con una bomba de aceite (Edwards Speedivac ED35). El polvo de terciopelo de ciervo pre-tratado se congeló en contenedores de plástico antes de secarlo en un liofilizador (Cuddon) para eliminar las trazas finales de disolvente.

Se añadió agua potable (86 L) al polvo de terciopelo de ciervo pre-tratado con etanol combinado (4,3 kg) y la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. El residuo sólido se extrajo del extracto líquido haciendo pasar la mezcla a través de una centrífuga continua de tazón sólido Dynocone Modelo 612 (Clark Chapman, Derby Reino Unido). El extracto de terciopelo se filtró, primero a través de una bolsa de filtro de 10 µm y después una bolsa de filtro de 1 µm (ambas GAF), antes de congelarlo en bandejas de acero inoxidable y secarlo en un liofilizador (Cuddon). El extracto de terciopelo de bajo peso molecular liofilizado se raspó de las bandejas del secador para proporcionar 92 g (rendimiento del 2,1%) como un sólido amorfo marrón claro. La mayor parte de este material (90 g) se esterilizó por irradiación  $\gamma$  (Shering-Plough, Upper Hutt, NZ), tratamiento durante el cual recibió una dosis mínima de 2,5 Mrads y se usó en la formulación y en los estudios de cicatrización de heridas en ratas detallados más adelante.

#### 25 Cromatografía de Filtración en Gel

Los extractos de terciopelo se analizaron por Cromatografía de Filtración en Gel en una columna Superosa 12 HR 10/30 (Amersham Biosciences) usando tampón fosfato 0,05 M (pH 6,9) que contiene cloruro de sodio 0,3 M y azida sódica al 0,05% como el tampón de elución. Las muestras se disolvieron en tampón fosfato 0,05 M (pH 6,9) a una concentración de 2-5 mg/ml y se inyectaron 10 µl de cada disolución en la columna y se eluyó a una velocidad de caudal de 0,75 ml/min. Las proteínas eluidas se detectaron por medición de absorción UV a 280 nm.

Se realizó la calibración del peso molecular de la columna Superosa 12 por separación de una mezcla estándar de proteínas conocidas con pesos moleculares conocidos bajo las mismas condiciones que las usadas para los extractos de terciopelo. La mezcla contenía lo siguiente: Tiroglobulina (669 kDa);  $\gamma$ -Globulinas Bovinas (Fracción Cohn II, 160 kDa); Albúmina de Suero Bovino (66,7 kDa); Ovoalbúmina (grado VI, 46 kDa); Anhidrasa Carbónica (bovina) (29 kDa); Citocromo C (corazón de caballo) (12,4 kDa); L-Tirosina (181 Da). Todos los estándares se obtuvieron de Sigma, excepto la L-Tirosina que se obtuvo de BDH. Los pesos moleculares aparentes de los picos de las proteínas eluidas se determinaron por interpolación usando una curva de calibración, que se construyó representando el logaritmo del peso molecular de la proteína frente al tiempo de retención.

#### Electroforesis SDS-PAGE

Un extracto de proteínas totales de terciopelo de ciervo y un extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) se corrieron en un gel 16,5% Tris-glicina SDS-poliacrilamida (BioRad). Las muestras se desnaturalizaron con 2-mercaptoetanol y se calentaron hasta 99°C durante 4 minutos antes de cargarlas en el gel. Se cargaron en el gel 10 µl de mezcla de marcadores de peso molecular MultiMark (Invitrogen) y 5, 10, 25 y 50 µg de cada uno de los extractos. Los geles se corrieron durante 50 minutos a 190 Voltios. Los geles se extrajeron y se tiñeron durante 45 minutos con una disolución al 0,25% de Azul de Coomassie brillante G-250 (BDH) preparada en partes iguales de metanol y ácido tricloroacético al 25%. Los geles se destiñeron en una disolución de ácido tricloroacético al 5% toda la noche. Los geles se lavaron durante 5 minutos en metanol al 25%/ácido acético al 1% y después durante 5 minutos en metanol al 1%/ácido acético al 0,5% antes de fijarlos en una disolución de glutaraldehído al 1% durante 5 minutos. Se realizaron seis lavados (1,5 minutos/lavado) en agua desionizada (MilliQ).

La tinción con plata se realizó añadiendo 92,5 µl de hidróxido de sodio 10 M a 1,44 ml de disolución de amoniaco al 28% y diluyendo hasta 45 ml con agua MilliQ, para producir la Disolución A. La Disolución B consistió en 0,5 g de nitrato de plata en 2,5 ml de agua MilliQ. Las Disoluciones A y B se mezclaron inmediatamente antes del uso y el gel se tiñó en la mezcla durante 10 minutos. Después de la tinción, el gel se lavó tres veces en agua MilliQ durante un tiempo total de diez minutos. Finalmente, el gel se reveló durante aproximadamente 1 minuto en disolución de ácido cítrico al 0,005%/formaldehído al 0,02% y el revelado se paró por la adición de metanol al 25%/ácido acético al 0,26% durante 2 minutos. Los geles se fotografiaron usando una cámara digital Kodak DC120 para la presentación.



### Ensayo de Proliferación Celular

Las células endoteliales de la vena umbilical humana se cultivaron en Medio 199 (GibcoBRL) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GibcoBRL), 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en matraces de cultivo de tejidos T75 (Nunclon™) en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Las células se tripsinizaron (tripsina al 0,025%, EDTA 0,265 mM, GibcoBRL) y se sembraron en placas de 96 pocillos (Nunclon™) a una densidad de 3.000 células/pocillo/200 µl y se cultivaron durante 3 días. Las células se mantuvieron en suero al 1% durante 24 horas y se trataron con suero al 1% que contenía 1 ng/ml de bFGF en presencia o ausencia de los extractos de terciopelo de ciervo durante 48 horas más. Dos horas antes de terminar la incubación, se añadieron a cada pocillo 20 µl de Aqueous One Solution Reagent Celltiter 96®. Después de terminar la incubación a 37°C en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%, se registraron las densidades ópticas de los pocillos a 490 nm ("DO<sub>490</sub>") usando un lector de placas (BioTek).

### Migración de las Células Endoteliales Aórticas Bovinas

Se dejó que las células endoteliales aórticas bovinas (BAE) crecieran hasta la confluencia en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GibcoBRL®) que contenía suero fetal bovino al 10% (GibcoBRL) en placas de 12 pocillos (Nunclon™). Las monocapas se "hirieron" raspando con una punta de pipeta desechable a lo largo de las placas. Después de lavar con PBS de Dulbecco más calcio (0,1 g/L) (GIBCO™, Invitrogen Corporation), las monocapas heridas se cultivaron durante 48 horas más en suero fresco al 1% en presencia o ausencia de los extractos de terciopelo de ciervo. Éstos eran un extracto de terciopelo de proteínas totales, un extracto de bajo peso molecular preparado por ultrafiltración, un extracto de bajo peso molecular preparado por precipitación de las proteínas de alto peso molecular a partir de una disolución de un extracto de proteínas totales, y un extracto de bajo peso molecular preparado después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%. El último extracto de bajo peso molecular también se ensayó después de hervirlo a 100°C durante tres minutos. Algunos pocillos se incluyeron como controles positivos y se cultivaron en suero al 10%. El grado de movimiento de las células en las monocapas heridas se determinó haciendo fotomicrografías en el momento de provocar la herida inicial y 48 horas después de provocar la herida. Las fotomicrografías se hicieron con una magnificación de 20x en un microscopio invertido Olympus CK2 y se imprimieron en un tamaño estándar de 15 cm de ancho por 10 cm de profundidad. Sobre la fotografía se puso una cuadrícula con líneas separadas 1,5 cm y con una longitud de 10 cm que eran paralelas a una línea base. La línea base se puso en la "línea de la herida" por encima de la cual las células se habían raspado originalmente. Se registró el número de células interceptadas por cada una de las líneas. Esto permitió una evaluación del número de células que había migrado 1,5, 3,0, 4,5, 6,0, 7,5 ó 9,0 cm desde la línea base en la fotomicrografía.

### Hibridación *In situ*

#### *Producción de sondas*

El protocolo de hibridación *in situ* se basó en los métodos descritos por Clark *et al.*, (1996). La sonda, que abarca los exones 1-4 de VEGF se clonó en el vector de transcripción pGEMT® Easy (Promega, Madison, WI). Éste se linealizó por digestión de restricción con SacII, NcoI (New England Biolabs, Beverly, MA) o Sall (Boehringer Mannheim, Alemania) para proporcionar sondas con sentido y antisentido. Las ribosondas monocatenarias con sentido y antisentido se marcaron por transcripción con 10 µCi/µl [<sup>33</sup>P]UTP según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI).

#### *Preparación de las secciones*

Las secciones se desparafinaron en xileno, después en concentraciones decrecientes de etanol, después se sumergieron en HCl 0,2 M durante 20 minutos (temperatura ambiente) y se lavaron en 2 x SSC (1 X SSC contiene cloruro de sodio 150 mM y clorato de sodio 15 mM, pH 7,0) durante 30 minutos. Se realizó digestión con proteinasa K (Sigma Chemical) a una concentración de 2 µg/ml en Tris-HCl 200 mM (pH 7,2), EDTA 50 mM (pH 8,0) a 37°C durante 15 minutos. Los portas se sumergieron durante 2 x 5 minutos (temperatura ambiente) en una disolución de trietanolamina 100 mM (pH 8,0), anhídrido acético al 0,25%. Los portas se lavaron en 2 x SSC (temperatura ambiente) durante 5 minutos, se deshidrataron y se secaron.

#### *Hibridación*

Un µl de ribosonda marcada como anteriormente bajo producción de sondas (a aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> cpm/µl) se mezcló con 20-60 µl de tampón de hibridación. El tampón de hibridación contenía: formamida desionizada al 50% (v/v), NaCl 0,3 M, Tris-HCl 10 mM (pH 6,8), fosfato de sodio 10 mM (pH 6,8), EDTA 5 mM (pH 8,0), 1 x disolución de Denhardt (0,02% (p/v) cada uno de BSA, Ficoll y polivinil pirrolidona), sulfato de dextrano al 10% (p/v), ditiotritol 50 mM y 1 mg/ml de ARNt de levadura (Life Technologies). Esta mezcla, que contiene la sonda, se desnaturalizó a 95°C y se aplicó a las secciones de tejido pretratadas y secadas que se cubrieron entonces con piezas pequeñas de parafilm; no se realizó prehibridación. La hibridación se realizó durante 18 horas a 54°C en un contenedor sellado humidificado con formamida al 50% y NaCl 0,3 M.

Los portas se lavaron en 5 x SSC a 50°C durante 15 minutos (x2) y después en 2 x SSC con formamida al 50% a 65°C durante 30 minutos. Se realizaron cuatro lavados cada uno de 5 minutos de duración en 2 x SSC a 37°C. Los portas se incubaron a 37°C durante 30 minutos con ARNasa A (Sigma Chemical) a una concentración final de 20 µg/ml en 1 x disolución de lavado (NaCl 400 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5). La ARNasa A se eliminó lavando los portas en 2 x SSC que contiene formamida al 50%, a 65°C durante 30 minutos seguido de lavados de 15 minutos en 2 x SSC y 0,2 x SSC, ambos a 37°C. Las secciones de deshidrataron mediante etanol al 30, 60, 80 y 95% que contiene acetato de amonio 0,3 M y dos lavados finales en etanol al 100% solo.

Las secciones se secaron al aire y se cubrieron con emulsión autorradiográfica (emulsión LM-1; Amersham International plc). Los portas cubiertos con emulsión se almacenaron desecados, en una caja a prueba de luz a 4°C durante 3 semanas. Los portas se revelaron (revelador D19; Kodak, Rochester, NY, EEUU) y se fijaron (tiosulfato de sodio al 30%) fotográficamente para producir granos de plata visibles sobre los sitios de la hibridación. Las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Gill y se observaron en un microscopio Zeiss Axioplan usando tanto iluminación de campo brillante como oscuro.

### Preparación de Formulaciones que Contienen el Extracto de Terciopelo de Bajo Peso Molecular

Se prepararon formulaciones tópicas en gel del extracto angiogénico del terciopelo de ciervo usando tres tipos diferentes de polímeros, concretamente Carbopol-934P, Pluronic F-127 y Methocel-E4M. El Carbopol-934P fue una muestra regalo de Chemcolor New Zealand Limited, Pluronic F-127 fue una muestra regalo de BASF New Zealand Limited y Methocel-E4M FG fue una muestra regalo de Dow Chemical Limited Australia.

#### Preparación del tampón fosfato isotónico

El tampón fosfato isotónico (0,063 M) pH 7,0 se preparó disolviendo 1,295 g de ortofosfato *di*-sódico de hidrógeno anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,9125 g de ortofosfato sódico de *di*-hidrógeno monohidrato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) y 1,199 g de cloruro de sodio en agua. El volumen se llevó hasta 250 ml con agua.

#### Formulación con Carbopol-934P

El Carbopol se preparó en disolución de manitol isotónica en agua.

Para preparar gel Carbopol de doble concentración, se añadieron 0,5 g de Carbopol-934P a 50 ml de disolución de manitol isotónica de doble concentración, que se agitó usando un agitador magnético durante 30 minutos y se mantuvo al lado para permitir que las burbujas de aire subieran a la superficie. La disolución de manitol se preparó mezclando 5,07 g de manitol disueltos en agua hasta un volumen de 50 ml. El pH se ajustó a 7,0 añadiendo disolución de hidróxido de sodio al 10% (p/v) en agua.

Se preparó una disolución de doble concentración del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) disolviendo el extracto a una concentración de 4 mg/ml en agua destilada.

Para preparar la formulación control, se añadieron 3 g de gel Carbopol de doble concentración a 3 ml de agua y esto se mezcló suavemente con una espátula. Se almacenó a 4°C antes de su uso.

Para preparar la formulación de tratamiento, se añadieron 3 g de gel Carbopol de doble concentración a 3 ml de disolución de extracto de doble concentración y esto se mezcló suavemente con una espátula. Se almacenó a 4°C antes de su uso.

#### Formulación con Pluronic F-127

La formulación de Pluronic F-127 se preparó en tampón fosfato isotónico pH 7,0.

El gel Pluronic de doble concentración se preparó añadiendo 20 g de Pluronic F-127 a 50 ml de tampón fosfato isotónico frío que se había agitado suavemente usando un agitador magnético. Después de la adición, la disolución se agitó durante 10 minutos más. Se mantuvo a 4°C toda la noche, se sonicó durante tres horas y se almacenó a 4°C toda la noche.

Se preparó una disolución de doble concentración del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) disolviendo el extracto a una concentración de 4 mg/ml en tampón fosfato isotónico.

La formulación control se preparó pesando 4 g de gel Pluronic de doble concentración y añadiendo 4 ml de tampón fosfato isotónico a esto. Se mantuvo en una caja de hielo durante pocos minutos para convertir el gel Pluronic en una disolución (Pluronic en agua a 4°C es una disolución y a 37°C es un gel). Se mezcló suavemente con una espátula y se almacenó a 4°C antes de su uso.

Para preparar la formulación de tratamiento, se recogieron 4 g de gel Pluronic de doble concentración en un vial. A esto se añadieron 4 ml de disolución de extracto de doble concentración y se puso en la caja de hielo durante pocos

minutos para convertir el gel Pluronic en una disolución. Se mezcló suavemente con una espátula y se almacenó a 4<sup>o</sup>C antes de su uso.

#### *Formulación con Methocel-E4M*

La formulación de Methocel-E4M se preparó en tampón fosfato isotónico pH 7,0.

5 El gel Methocel de doble concentración se preparó añadiendo lentamente 2 g de Methocel-E4M FG a 25 ml de tampón fosfato isotónico agitado que se había calentado hasta 80<sup>o</sup>C. Se añadieron 25 ml adicionales de tampón fosfato isotónico, que se habían enfriado hasta 4<sup>o</sup>C a la dispersión de Methocel y se agitó adicionalmente durante tres minutos. La mezcla se mantuvo a 4<sup>o</sup>C durante cinco horas.

10 Se preparó una disolución de doble concentración del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) disolviendo el extracto a una concentración de 4 mg/ml en tampón fosfato isotónico.

El control, de formulación solo, se preparó pesando 5 g del gel Methocel de doble concentración. A esto se añadieron 55 ml de tampón fosfato y la mezcla se mezcló suavemente con una espátula. Esto se almacenó a 4<sup>o</sup>C antes de su uso.

15 Para preparar la formulación de tratamiento, se recogieron 5 g de gel Methocel de doble concentración en un vial. A esto se añadieron 55 ml de disolución de extracto de doble concentración y esto se mezcló suavemente con una espátula. La mezcla se almacenó a 4<sup>o</sup>C antes de su uso.

#### **Ensayos de Cicatrización de Heridas en Ratas**

20 Estos experimentos se realizaron bajo las condiciones establecidas por el Animal Ethics Committee en la Wellington School of Medicine y Health Services.

25 Se aclimataron ratas Lewis macho (con una edad de 19-23 semanas) al entorno y se estabularon individualmente durante la duración del experimento. Las ratas recibieron alimento normal y agua a lo largo de la duración del experimento suplementado con una dosis oral diaria de gelatina (4 ml) empezando el Día 0. En el Día 0, se anestesió a los animales con inyección (i.p.) de ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (5 mg/kg de peso corporal). A cada animal se le practicaron dos biopsias de piel completa de 8 mm en la superficie dorsal a lo largo de la columna vertebral. Las heridas se hicieron 6 cm y 8 cm distales de la base del cráneo. Se tuvo cuidado para asegurar que cada biopsia se hacía en los ángulos correctos en la piel. Las heridas se frotaron con gasa para eliminar el exceso de sangre y se fotografiaron con un marcador de escala y un número de identificación. Las disoluciones de tratamiento y control se añadieron a las heridas. Después de la recuperación, se proporcionó una inyección subcutánea de Temgisc a 0,05 mg/kg de peso corporal. La reapiación de los tratamientos y los controles fue en intervalos de 2-3 días como se indica en las leyendas de las figuras (Figuras 10-13) y durante este procedimiento se anestesió a los animales ligeramente con halotano al 3,5%. Las heridas se fotografiaron en el momento de la reapiación y cada 2-3 días hasta que se produjo el cierre completo de la herida.

35 Las proporciones de dosis y la frecuencia de la aplicación del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) se evaluaron en el modelo de cicatrización de heridas en ratas. El vehículo, régimen de dosificación y concentración del terciopelo se indican en las leyendas de las figuras (Figuras 10-13). Cada animal tenía una herida que recibió 25 µl del tratamiento mientras que la otra herida recibió 25 µl de la sustancia control. Todos los experimentos se realizaron usando seis animales, excepto para la dosis de 1 mg/ml (Figura 10) que tenía sólo cuatro animales. Las fotografías de cada herida se hicieron con una cámara Canon EOS 3000N (macro lentes F2.8). Las impresiones de cada exposición se registraron digitalmente y el área de la herida se calculó a partir de estas imágenes usando software NIH Image 1.63. Los tamaños de las heridas en cada punto de tiempo se calcularon como porcentajes de los originales y se realizó un análisis estadístico por análisis de varianza (ANOVA) para cada punto de tiempo.

#### **Histología de las Heridas**

45 Las heridas se hicieron en los lomos de las ratas como se ha descrito anteriormente. Se hizo una única aplicación de PBS en la herida control en cada rata en el día 0, mientras que a la herida tratada se le aplicó en el mismo día una disolución 10 mg/ml del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) en PBS. Los animales (N=6) se sacrificaron 4 días después de hacerles la herida. Las heridas se extirparon y para cuatro animales el tejido se puso en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas antes de ser transferido a etanol al 70%. El tejido de los otros dos animales se retuvo para análisis de colágeno. Después de cortarlas a la mitad, las heridas se incluyeron en cera de parafina y las superficies cortadas se seccionaron. Las secciones se cortaron a 5 µm en portas recubiertos con APES (3-aminopropiltriethoxi-silano).

#### *Tinción de las Heridas con Tricromo de Masson*

La tinción se realizó como describen Bancroft y Stevens (1990). Las secciones se desparafinaron con xileno (5 minutos x 2) seguido de rehidratación en una serie de disoluciones de etanol de concentración decreciente. Las secciones se tiñeron con Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos antes de lavarlas en agua del grifo durante 10 minutos. Se pusieron en disolución de Fucsina Ácida al 0,5% durante 5 minutos y se lavaron en agua destilada. Se usó ácido fosfomolibdico al 1% durante 5 minutos antes de la tinción con Azul de Metilo al 2% durante 5 minutos y lavado en agua destilada. El tratamiento con ácido acético al 1% durante 2 minutos se siguió con deshidratación de las secciones, en una serie de disoluciones de etanol de concentración creciente, tratamiento con xileno y cubierta del porta con DePex (BDH).

Se hicieron fotografías con una cámara digital Canon PowerShot G5 (5 mega píxel) usando un microscopio Zeiss Axioplan. Las imágenes se capturaron por control remoto usando el programa de software Canon Remote Control a una resolución de 72 píxeles por pulgada, y se transfirieron a Adobe Photoshop (versión 5.5) para ser anotado para presentación.

#### *Inmunohistoquímica de Laminina en las Heridas*

Las secciones se desparafinaron con xileno (5 minutos x 2) seguido de rehidratación en una serie de disoluciones de etanol de concentración decreciente. Todos los reactivos, anticuerpos y enzimas se obtuvieron de Zymed Laboratories Inc, CA a no ser que se especifique otra cosa. Las secciones se trataron con Pepsina (No. de Cat. 20671651) durante 15 minutos a 37°C. Los procedimientos posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Después de lavar con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (5 minutos x 2) los sitios de unión no específica se bloquearon por tratamiento con suero de cabra normal al 20% en 1% BSA/PBS durante 30 minutos. Las secciones se incubaron durante una hora con anticuerpo policlonal de conejo anti-laminina (dilución 1:1.000) (Novus Biologicals Inc., No. de Cat. NB 300-144). Para los controles negativos, el anticuerpo primario se substituyó con inmunoglobulina IgG de conejo no inmune (10 µg/ml). Las secciones se lavaron en PBS (5 minutos), polvo de leche desnatada al 0,5%/Tween-20 al 0,1%/2x PBS (10 minutos x 2) y PBS (5 minutos), seguido de incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo biotinilado (5 µg/ml) durante 30 minutos. Las secciones se lavaron de nuevo en PBS (5 minutos), polvo de leche desnatada al 0,5%/Tween-20 al 0,1%/2x PBS (10 minutos x 2) y PBS (5 minutos). Se aplicó Zymed Peroxo-block durante 9 minutos para inactivar las peroxidases endógenas. Después de lavar con PBS (5 minutos x 2), las secciones se incubaron con Conjugado HRP-Estreptavidina (2,5 µg/ml) durante 10 minutos. Las secciones se lavaron en PBS (5 minutos x 2) y se revelaron con un kit de 3,3'-diaminobencidina (DAB). Después de lavar en agua, las secciones se deshidrataron en una serie de disoluciones de etanol de concentración creciente seguido de tratamiento con xileno y se cubrieron los portas usando DePex (BDH). Se hicieron fotografías en una película en blanco y negro 400ASA Kodak usando un microscopio Zeiss Axioplan. Las imágenes se transfirieron a Adobe Photoshop (versión 5.5) para ser anotado para presentación.

## **Resultados**

### **Fraccionamiento y Cromatografía de Filtración en Gel**

El fraccionamiento del terciopelo de ciervo por ultrafiltración a través de dispositivos Centriprep-YM10 resultó en una fracción de alto peso molecular (Figura 1) y una fracción de bajo peso molecular (Figura 2).

En la Figura 3 se proporciona un perfil cromatográfico de filtración en gel de un extracto de proteínas totales. Éste muestra que las proteínas en el extracto de terciopelo de proteínas totales tenían una variedad de pesos moleculares y como se esperaba había un predominio de proteínas de alto peso molecular. En comparación, un perfil equivalente del extracto de bajo peso molecular obtenido por pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70% (Figura 4) muestra que el proceso de pre-tratamiento con etanol resultó en un extracto de terciopelo que contenía proteínas que eran predominantemente menores de 10 kDa. En este extracto fueron evidentes seis picos principales.

### **Electroforesis SDS-PAGE**

Se usó un gel de poliacrilamida con SDS teñido en primer lugar con Coomassie (Figura 5A) y después con plata (Figura 5B) en un intento de visualizar y caracterizar adicionalmente las proteínas presentes en el extracto de terciopelo de bajo peso molecular comparado con el extracto de proteínas totales. El extracto de proteínas totales mostró una variedad de proteínas particularmente por encima de 60 kDa y alrededor de 20 kDa, pero sólo dos bandas obvias fueron evidentes en los carriles de los extractos de bajo peso molecular, con tinción con Coomassie o plata. Éstas tenían alrededor de 6 kDa y por encima de 60 kDa de peso molecular aparente.

### **Ensayo de Proliferación Celular**

Los extractos de cornamenta fueron capaces de incrementar la proliferación de células Endoteliales de Vena Umbilical Humana en cultivo cuando se compara con suero al 1% (Figura 6). Esta proliferación incrementada fue más notable para el extracto de bajo peso molecular (preparado después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%). Debe indicarse que cuando el extracto de terciopelo de proteínas totales se hirvió durante 3 minutos retuvo su actividad proliferativa en las células endoteliales.

### Migración de Células Endoteliales Aórticas Bovinas

5 Para confirmar adicionalmente la actividad angiogénica de los extractos se investigó la migración de células endoteliales aórticas bovinas (BAE). Los extractos de bajo peso molecular preparados tanto por los métodos de ultrafiltración como precipitación con etanol incrementaron significativamente la distancia y el número de células que migraban fuera de la línea desde la que las células se habían raspado comparado con los controles (Figura 7).

Como se muestra en la Figura 8, el hervir durante 3 minutos el extracto de bajo peso molecular (obtenido por el método de pre-tratamiento con etanol) no redujo el efecto de incremento del extracto sobre la migración de las células BAE.

### Hibridación *In Situ*

10 Además de esto, hemos mostrado que la actividad angiogénica de la cornamenta probablemente no se deba al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) que es el mejor conocido de los factores angiogénicos potentes. La hibridación *in situ* se realizó usando una sonda que abarca los exones 1-4 de VEGF y es así capaz de detectar todas las variantes de corte y empalme. Los resultados en la Figura 9 revelan que el ARNm de VEGF sólo se detectó en las células Precartilago de la cornamenta y no en las células inmediatamente adyacentes a los vasos sanguíneos. La cantidad de ARNm de VEGF parece ser relativamente pequeña.

También hemos examinado el ARNm de la cornamenta para algunos de los demás factores angiogénicos clásicos usando hibridación *in situ* (datos no mostrados). Sorprendentemente, no hemos sido capaces de encontrar cantidades significativas de ARNm del Factor de Crecimiento de Fibroblastos ácido o básico lo que sugiere que otros factores deben estar desempeñando un papel importante en la estimulación de la angiogénesis en la cornamenta.

### 20 Ensayos de Heridas en Ratas

La Figura 10 muestra el cierre en porcentaje de las heridas tratadas con disolución salina o con una disolución 1 mg/ml del extracto de bajo peso molecular preparado después de pre-tratamiento del terciopelo con etanol al 70%. Las heridas tratadas mostraron una cicatrización de la herida significativamente más rápida que las heridas control tratadas sólo con disolución salina.

25 El modelo de heridas en ratas se usó para ensayar el intervalo de dosis por el tratamiento. El extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) se comparó con el vehículo solo, que era PBS (tratamiento control). Un volumen de 25 µl de cada disolución se puso en las heridas. A una dosis de 0,1 mg/ml de extracto de terciopelo hubo alguna separación de los grupos control y tratado, sin embargo en ningún punto de tiempo la diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 11a). A una dosis de 2 mg/ml el extracto de terciopelo de bajo peso molecular mejoró significativamente la velocidad de cierre de la herida en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 14 (Figura 11b). La dosis de 10 mg/ml del extracto de terciopelo de bajo peso molecular mostró un cierre de la herida estadísticamente más rápido en los días 8 y 10 (Figura 11c). Una dosis muy alta del extracto (100 mg/ml) incrementó de manera similar la velocidad de cierre de la herida, con los días 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mostrando una mejora significativa (Figura 11d).

35 El efecto de una única dosis del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol), proporcionada a 10 mg/ml en el día de la herida, se comparó con vehículo solo (control) (Figura 12). La dosis única del extracto mejoró la velocidad de cierre de la herida, siendo la diferencia entre las heridas tratadas y las heridas control estadísticamente significativa en el día 8.

40 Varias formulaciones del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) se investigaron a una dosis de 2 mg/ml (Figura 13). Los controles en cada caso fueron los vehículos solos sin el extracto. La formulación del extracto con Methocel mejoró significativamente la velocidad de cierre de la herida en los días 2-14 comparado con el vehículo solo (Figura 13b). El extracto formulado con Pluronic mejoró significativamente la velocidad de cierre de la herida en todos los días medidos, sin embargo el vehículo solo (control) tuvo un impacto negativo en el estadio inicial de la cicatrización (Figura 13c). Cuando el extracto se formuló con Carbopol la velocidad de cierre de la herida mejoró significativamente en los días 2, 4, 6, 8, 10 y 14 (Figura 13d).

### Histología de las Heridas

La histología de las heridas se investigó en el día 4 de cicatrización después de una única aplicación a 10 mg/ml del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol), comparado con una única dosis de PBS. En este ensayo se usaron seis animales, sin embargo sólo cuatro se usaron para histología. El sitio de cicatrización de la biopsia en sacabocados fue evidente con el tejido no herido localizado en la parte izquierda de la biopsia (Figuras 14A, B). En la herida control el área de la biopsia en sacabocados se distinguió por la costra en la superficie y el tejido de la herida por debajo. Este tejido de la herida estaba interrumpido y constituido por matriz extracelular con un componente celular intercalado (Figuras 14A, C). La herida tratada mostró una histología notablemente diferente (Figuras 14B, D). La costra (Figura 14B) apareció en lugares parecidos a un epitelio. Subyacente a la superficie había una capa de tejido organizado que denominamos tejido dérmico (Figura 14D). Éste no parecía ser particularmente rico en colágeno como para resultar en una cicatriz.

Parecía tener una buena organización celular y tener una red rica de vasos sanguíneos que mediaría un proceso natural de cicatrización de la herida. Las heridas tratadas de 3 de los 4 animales fueron muy similares a la mostrada, mostrando la cuarta menos diferencia entre la herida tratada y la control que la presentada en la Figura 14.

5 La investigación histológica se siguió de inmunohistoquímica para la proteína de la membrana basal laminina. La inmunohistoquímica de laminina de las heridas control no mostró vasos, o un número reducido de vasos comparado con las heridas tratadas, particularmente bajo la superficie epitelial (Figuras 15A, C). En las heridas control, se detectó laminina en el borde de la herida lo que indica que la tinción con anticuerpo había funcionado en estas secciones (Figura 15E). En las heridas tratadas fueron claramente evidentes vasos basales así como vasos subyacentes a la superficie epitelial (Figuras 15B, D). Los vasos de la superficie tenían una morfología diferente que los vasos basales y se tiñeron más débilmente hacia la superficie epitelial.

### Discusión

15 En este trabajo, la atención se ha centrado en el tamaño de los péptidos y proteínas contenidos en los extractos y fracciones obtenidos de terciopelo de ciervo. Esto surge del conocimiento de que el componente principal del tejido de terciopelo de ciervo seco es proteína y que los factores angiogénicos clásicos también son proteínas. Sin embargo, se admite que otros componentes no proteicos estarían innegablemente contenidos en los extractos y fracciones de terciopelo descritas por los autores y que éstos pueden haber contribuido a, o haber sido responsables de, las actividades observadas.

20 El descubrimiento de una fracción de bajo peso molecular sustancialmente menor de o igual a 10 kDa que tiene actividad angiogénica fue sorprendente considerando que muchos factores de crecimiento angiogénicos clásicos tienen un tamaño mayor de 10 kDa (Tabla 1).

25 Los análisis de cromatografía de filtración en gel y los análisis por SDS-PAGE proporcionaron una información aparentemente opuesta sobre la composición del extracto de terciopelo de bajo peso molecular. En un gel de SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie Brillante G250 y después con plata (Figura 5), el extracto de bajo peso molecular presentó menos bandas de lo esperado a partir de los resultados del análisis de cromatografía de filtración en gel (Figura 4). Además, las proteínas de pesos moleculares mayores de 10 kDa se tiñeron relativamente más intensamente de lo esperado. Sin embargo, una tinción incompleta o falta de tinción de las proteínas en los geles de SDS-PAGE es una característica muy admitida de las tinciones tanto con Coomassie como con plata (por ejemplo, Smith, 2002; Kondratiuk *et al.*, 1982). La intensidad menor que la esperada de la tinción de las proteínas por debajo de 10 kDa en el extracto de bajo peso molecular se debe probablemente a este fenómeno.

30 El ARN mensajero del factor de crecimiento angiogénico potente VEGF, como se detecta por hibridación *in situ* en tejido de la cornamenta de ciervo (Figura 9), estaba confinado a la región de precartilago y estaba presente sólo en niveles bajos. La hibridación *in situ* para el ARNm de aFGF o bFGF no encontró transcritos asociados con las regiones en las que ocurre la angiogénesis (datos no mostrados). Esto planteó la pregunta de qué factores estimulan el crecimiento de los vasos sanguíneos en la cornamenta hasta 2 cm/día.

35 Se midió la respuesta proliferativa de las Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC) a los extractos. Se encontró que el extracto de terciopelo de proteínas totales causaba la proliferación de HUVEC incluso después de ser hervido durante 3 minutos (Figura 6). El extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol al 70%), causó una proliferación notable de HUVEC. Cuando se evaluó en ensayos de migración de células endoteliales con células Endoteliales Aórticas Bovinas (BAE) el extracto de terciopelo de proteínas totales, el extracto de bajo peso molecular preparado por precipitación con etanol y el extracto de bajo peso molecular preparado por ultrafiltración, todos hicieron migrar a más células más en el área raspada (Figura 7). El extracto de bajo peso molecular preparado por precipitación con etanol mostró la mayor respuesta a 100 µg/ml, mientras que a 500 µg/ml la respuesta fue menos notable indicando así una respuesta a la dosis.

45 El extracto de bajo peso molecular, preparado por extracción del terciopelo después de pre-tratamiento con etanol al 70%, se ensayó para actividad antes y después de hervirlo durante 3 minutos (Figura 8). Los resultados muestran que el hervido no tuvo efecto en la actividad a ninguna de las dosis ensayadas. Esto confirmó que las moléculas implicadas en la actividad angiogénica son estables cuando se calientan hasta 3 minutos.

50 El extracto de bajo peso molecular, preparado por extracción del terciopelo después de pre-tratamiento con etanol al 70%, se ha ensayado *in vivo* en ratas y se encontró que aceleraba la cicatrización de las heridas hasta tres días (Figura 10). Se encontró que las heridas tratadas cicatrizaban significativamente más rápido tanto al comienzo como al final del proceso de cicatrización lo que sugiere que el extracto tiene un efecto sobre la duración total de la cicatrización. Esta deducción se confirmó por experimentos adicionales *in vivo* (Figuras 11 y 13).

55 Los resultados de los ensayos de heridas en animales indican un número de atributos positivos para el extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol). Por ejemplo, retuvo su actividad potente después de exposición a una dosis esterilizante (2,5 Mrads) de irradiación  $\gamma$ . El extracto parece tener una proporción de dosis eficaz para un cierre mejorado de la herida de entre 1 mg/ml y 100 mg/ml (Figuras 10 y 11). No se observó un impacto negativo a ninguna proporción de dosis. El número de aplicaciones

requerido para producir una respuesta se investigó proporcionando un único tratamiento con el extracto de terciopelo de bajo peso molecular en el día de la herida (Figura 12). Se observó una velocidad incrementada del cierre de la herida comparado con las heridas control, alcanzando la diferencia una significancia estadística en un punto de tiempo (día 8). Éste es un descubrimiento interesante y se necesitará ensayar varios regímenes de dosificación para establecer cuál es el que proporciona el resultado óptimo.

Varias formulaciones del extracto de terciopelo de bajo peso molecular (preparado por extracción después de pre-tratamiento con etanol) a una dosis de 2 mg/ml se ensayaron en el modelo de cicatrización de heridas en ratas (Figura 13). Las formulaciones preparadas con Methocel y Carbopol fueron muy similares a la formulación usando PBS como vehículo y mejoraron significativamente la velocidad de cierre de la herida en la mayor parte de los puntos de tiempo. La formulación con Pluronic puede estar contraindicada tomando como base que el vehículo solo tuvo un impacto negativo en la velocidad inicial del cierre de la herida (Figura 13c). Estos resultados indican que el extracto puede administrarse en una variedad de formulaciones y todavía retiene actividad.

La histología de las heridas se investigó usando Tricromo de Masson, que es un agente de tinción general pero que mostrará eficazmente las proteínas de la matriz extracelular. Las imágenes de la Figura 14 revelan que 4 días después de la herida, el tejido dérmico en la herida tratada con bajo peso molecular tiene una estructura como se esperaría para la piel normal. Existe evidencia de que la epidermis empieza a reformarse y de que el tejido dérmico que contiene vasos sanguíneos y un componente celular organizado ha incrementado la velocidad del cierre de las heridas en un intervalo de dosis de 1 mg/ml-100 mg/ml. No se observaron efectos secundarios negativos en los animales en ningún estadio. La morfología de las heridas tratadas sugiere que el extracto induce una respuesta de cicatrización de las heridas sana que implica angiogénesis. Estos resultados indican que el tratamiento de las heridas con el extracto de terciopelo de bajo peso molecular es una manera eficaz de mejorar la velocidad del cierre de las heridas y así supone una ayuda para la cicatrización de las heridas.

#### Tabla 1.

**Ejemplos** de los pesos moleculares de algunos factores de crecimiento angiogénicos conocidos. (El tamaño incluye cualquier precursor no procesado).

Factor de Crecimiento Angiogénico	Número de Registro Primario	Peso Molecular
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A	P15692	27 kDa
Factor de Crecimiento de Fibroblastos 1	P05230	17 kDa
Factor de Crecimiento de la Placenta	P49763	25 kDa
Pleyotrofina	P21247	19 kDa
Angiopoyetina-1	Q15389	58 kDa
Angiopoyetina-2	Q15123	57 kDa
CYR61	O00622	42 kDa
Timosina $\beta$ 4	P01253	5 kDa

Los aspectos de la presente invención se han descrito sólo como ejemplo y debe apreciarse que pueden hacerse modificaciones y adiciones a éstos sin apartarse del alcance de ésta como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

- Auerbach R., Kubai L., Sidky Y. 1976 Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues, and lymphocytes. *Cancer Research* 36:3435-3440.
- Bancroft and Stevens (eds.). 1990. *Theory and practice of histological techniques*, 3<sup>rd</sup> Edition.
- Clark D.E., Smith S.K., Sharkey A.M., Sowter H.M., Charnock-Jones D.S. 1996 Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-met; localisation and expression in the human placenta throughout pregnancy. *Journal of Endocrinology* 151:459-467.
- Deodato B., Arsic N., Zentilin L., Galeano M., Santoro D., Torre V., Altavilla D., Valdembrì D., Bussolino F., Squadrito F., Giacca M. 2002 Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing. *Gene Therapy* 9:777-785.
- Kondratiuk T.P., Kurskiĭ M.D., Fedorov A.N., Osipenko A.A., Meshkova L.I., Litvinenko E.A. 1982. [Characterization of endogenous phosphorylation substrates of sarcoplasmic reticulum fragments from fast skeletal muscles of the rabbit]. *Biokhimiia* 47:950-6
- Li C., Clark D.E., Lord E.A., Stanton J-A.L., Suttie J.M. 2002 Sampling techniques to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery. *The Anatomical Record* 268:125-130.
- Malinda K.M., Sidhu G.S., Banaudha K.K., Gaddipati J.P., Mabeshwari R.K., Goldstein A.L., Kleinman H.K. 1998 Thymosin  $\beta$ 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. *The Journal of Immunology* 160:1001-1006.
- Marshall J.L., Mead P., Jones K., Kaba E., Roberts A.P. 2001 The implementation of venous leg ulcer guidelines: process analysis of the intervention used in a multi-centre, pragmatic, randomized, controlled trial. *Journal of Clinical Nursing* 10:758-766.



Montesinos M.C., Desai A., Chen J.F., Yee H., Schwarzschild M.A., Fink J.S., Cronstein B.N. 2002 Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *American Journal of Pathology* 160:2009-2018.

Sen C.K., Khanna S., Gordillo G., Bagchi D., Bagchi M., Roy S. 2002 Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957:239-249.

Smith, B.J. 2002. Quantification of proteins on polyacrylamide gels. In: Walker, J.M. (ed.). *The Protein Protocols Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition*. Humana Press Inc., Totowa, N.J. pp 237-242.

Sunwoo, H.H., Nakano, T., Hudson, R.J. and Sim, J.S. 1995. Chemical composition of antlers from wapiti (*Cervus elaphus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2846-2849.

Weng Liang Et Al: Velvet antler polypeptides promoted proliferation of epidermic cells and fibroblasts and skin wound healing YAOXUE XUEBAO, vol. 36, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 817-820, XP009065372 ISSN: 0513-4870.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un extracto aislado de terciopelo de ciervo que contiene péptidos que tienen pesos moleculares que son sustancialmente menores de o igual a 10 kDa en la fabricación de un medicamento para tratar heridas en el que los péptidos del extracto se separan mediante precipitación de los péptidos de peso molecular alto con sustancialmente etanol al 70% (v/v).
2. Uso de un extracto aislado de terciopelo de ciervo según la reivindicación 1 en el que el medicamento es para tratar heridas crónicas o persistentes.

Figura 1.

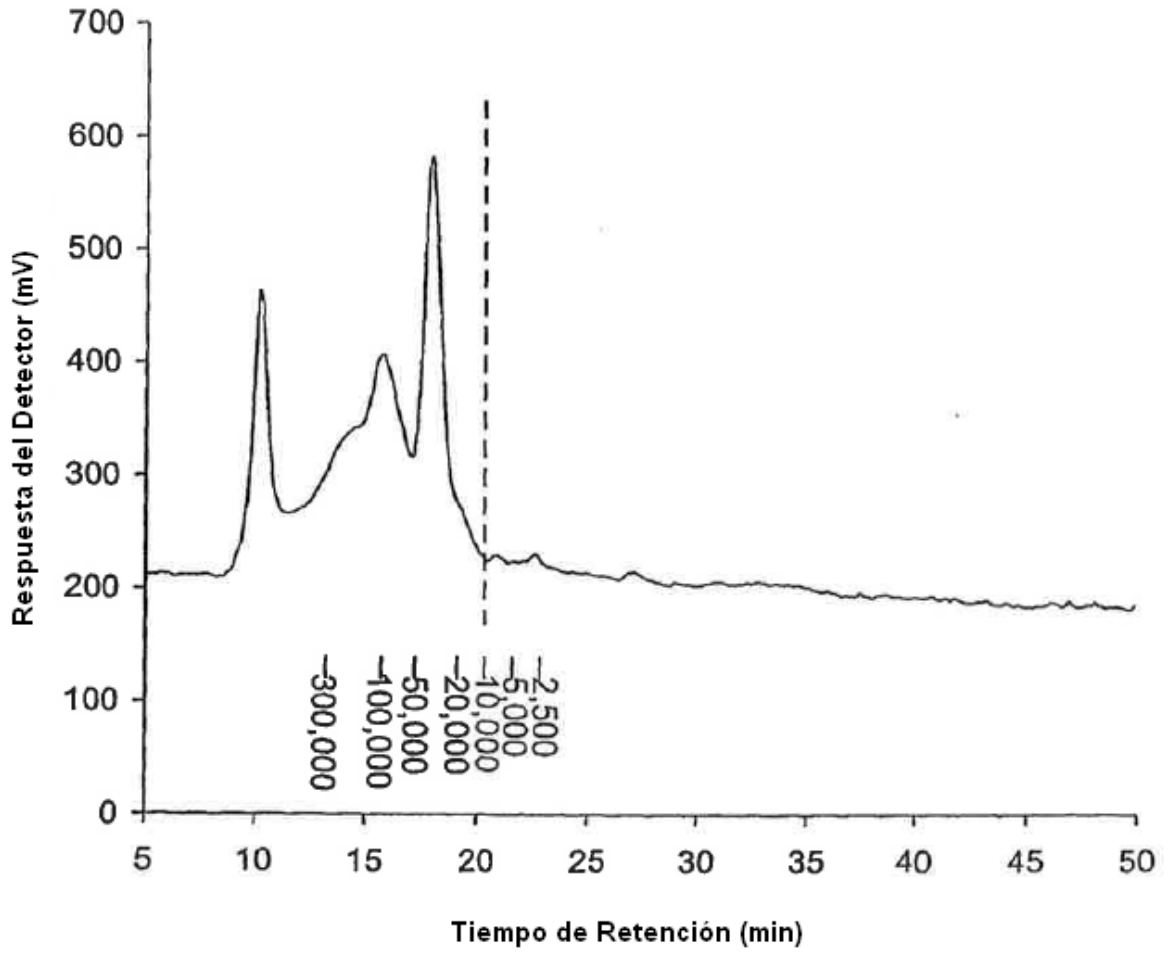


Figura 2

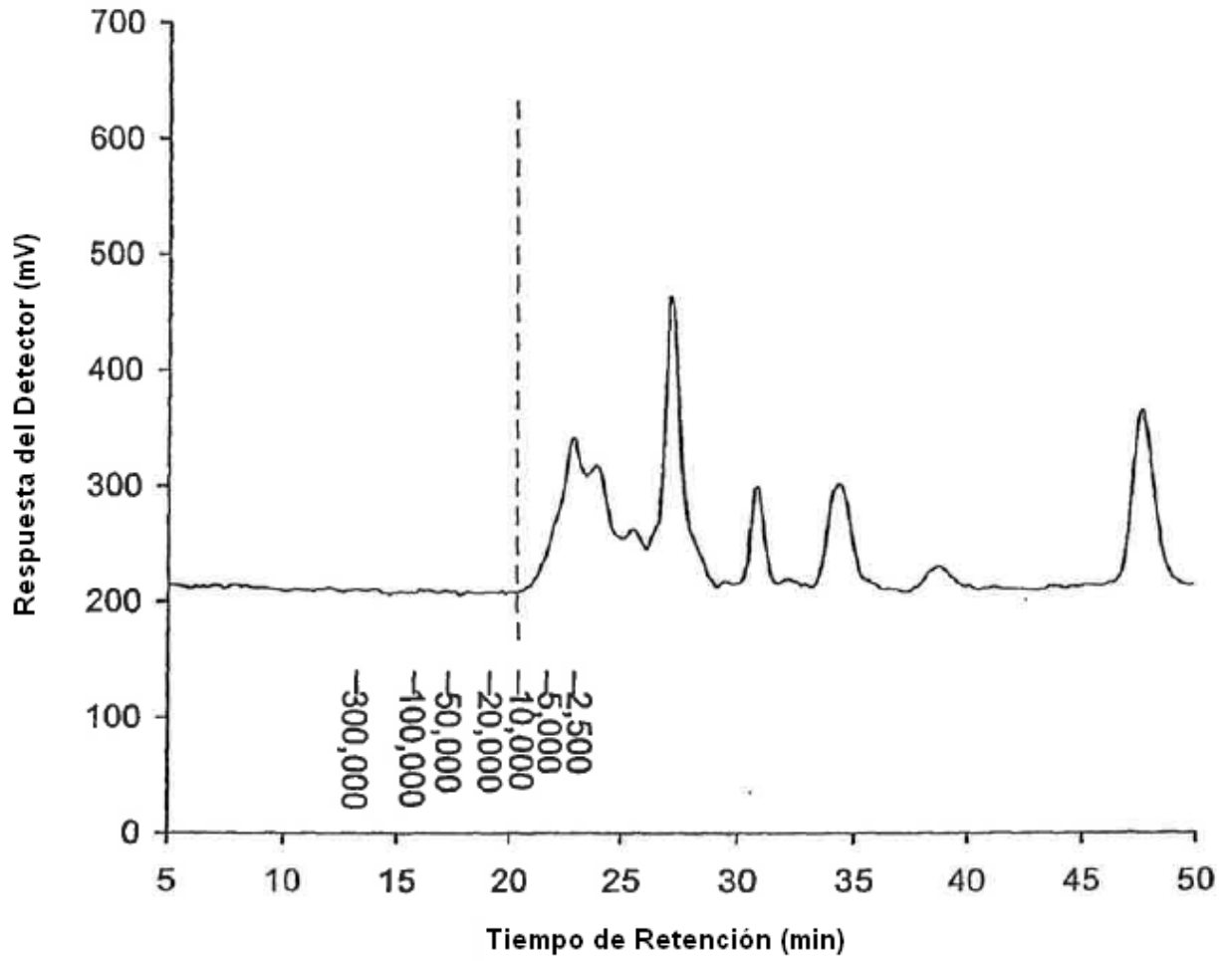


Figura 3

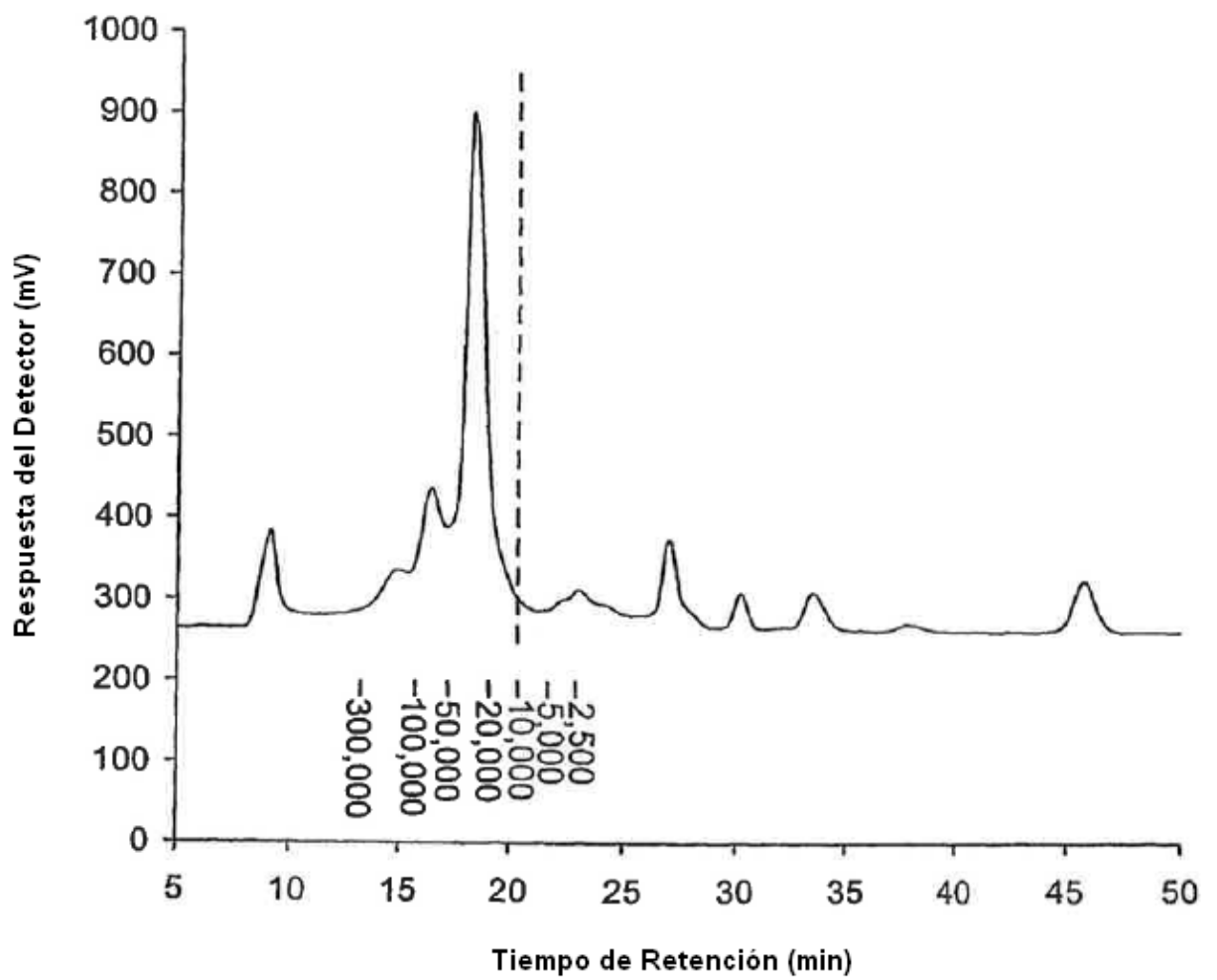


Figura 4

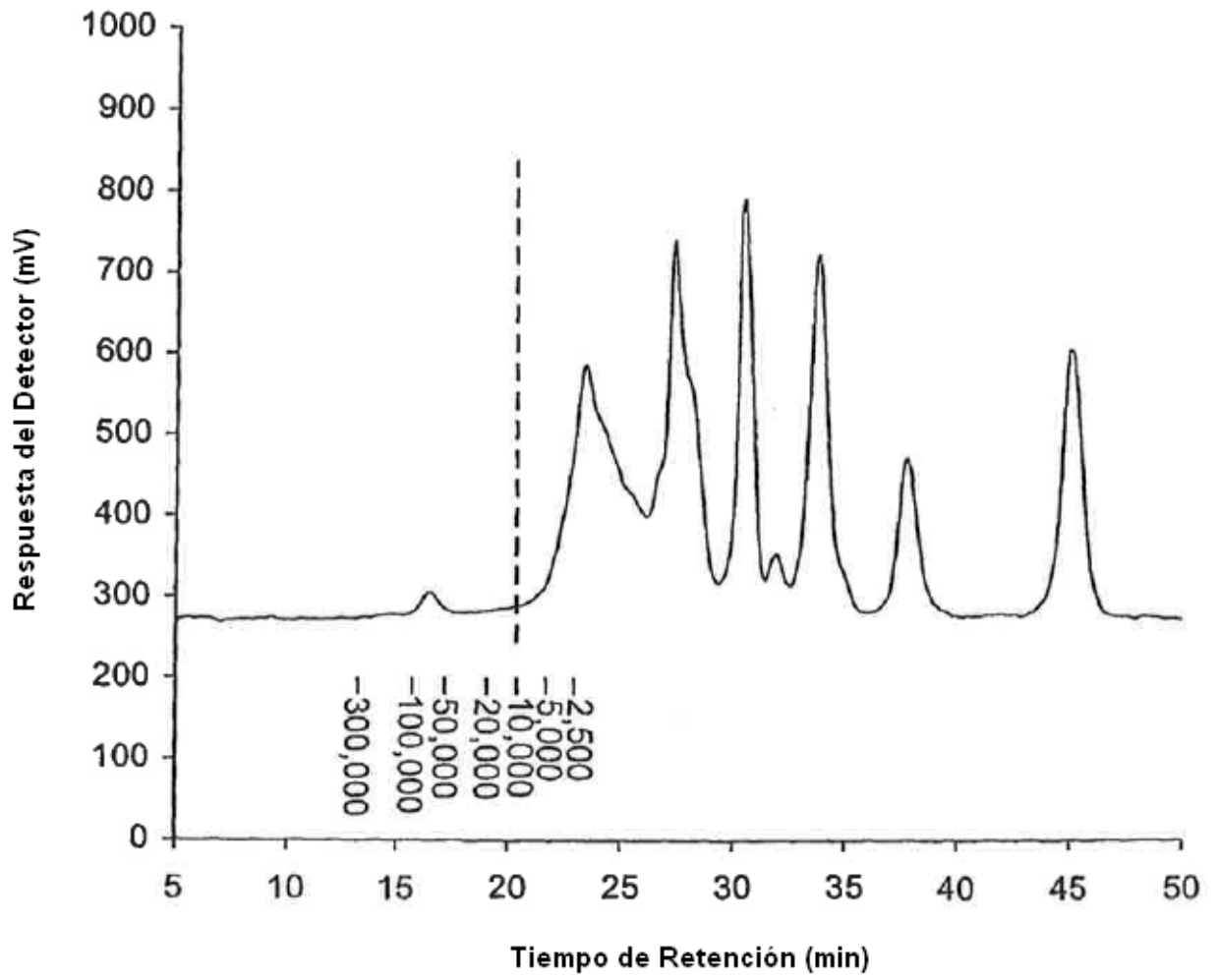


Figura 5.

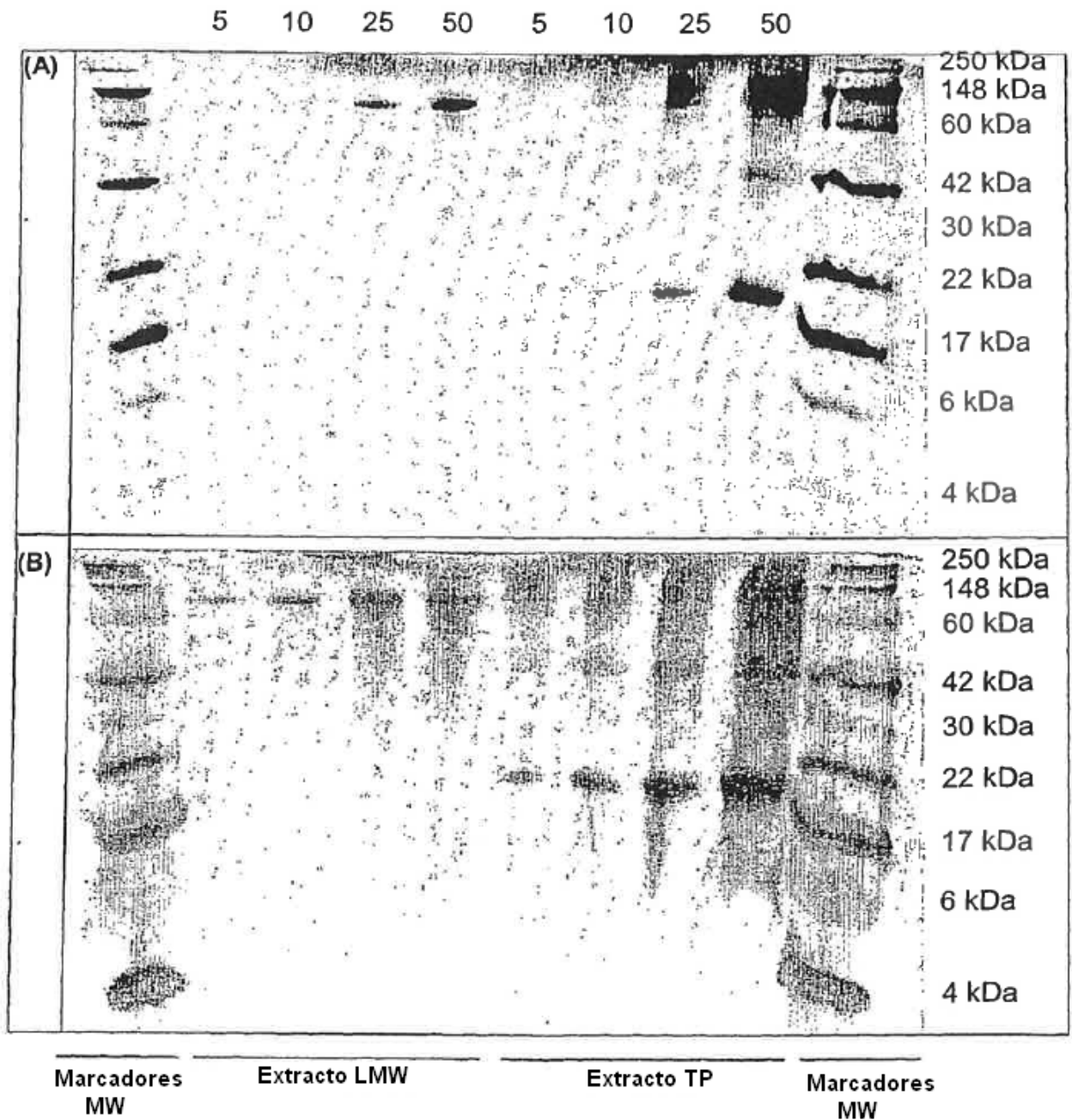


Figura 6.

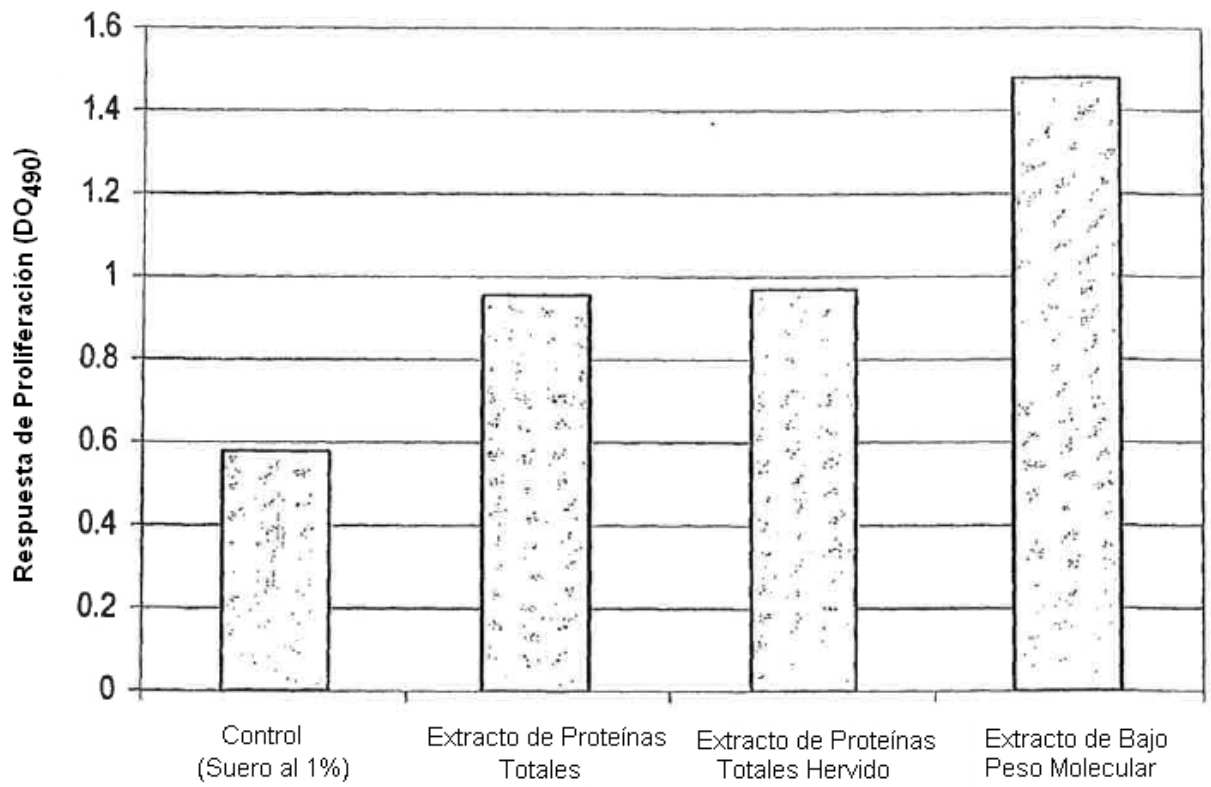




FIGURA 7.

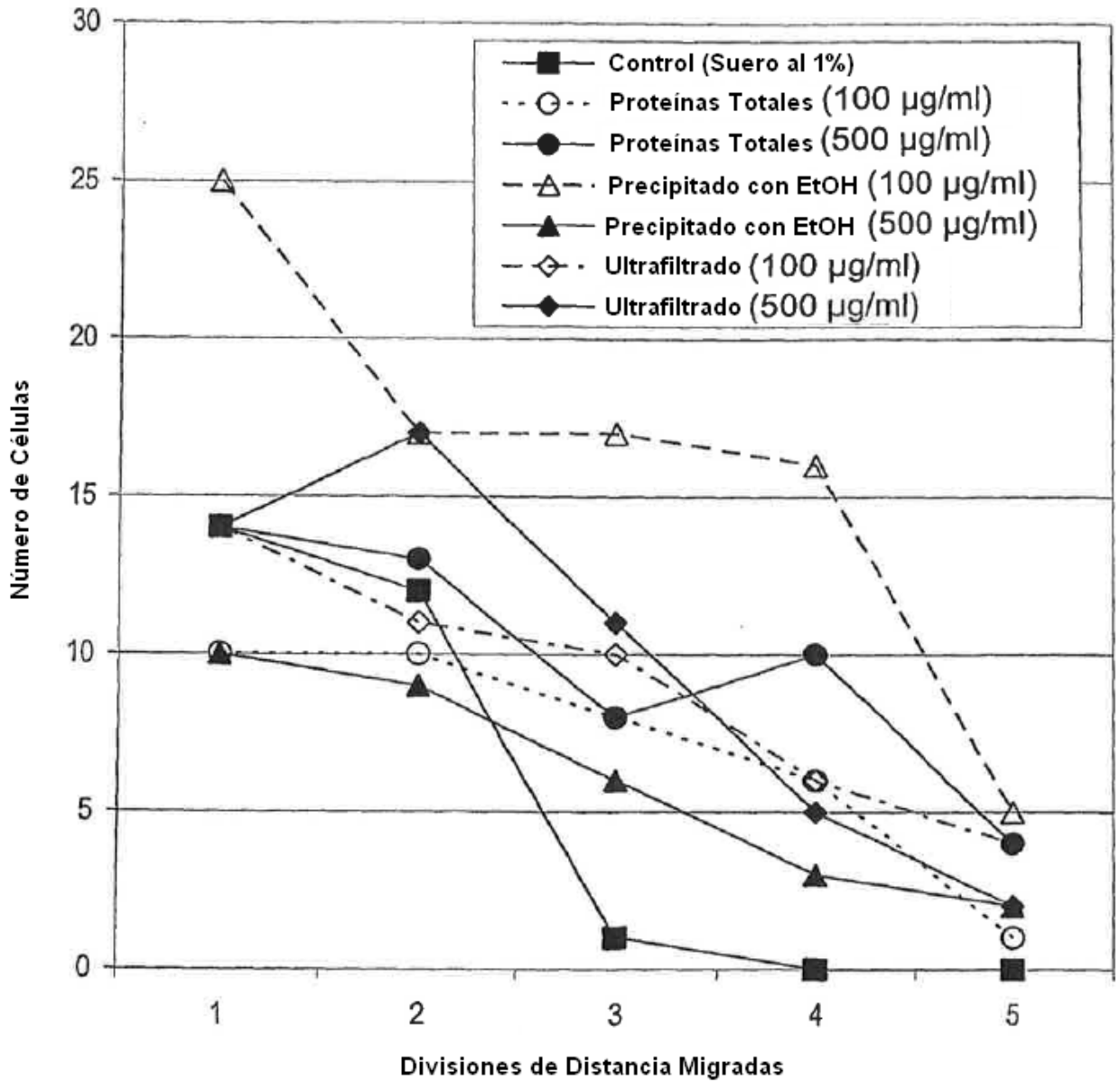


Figura 8.

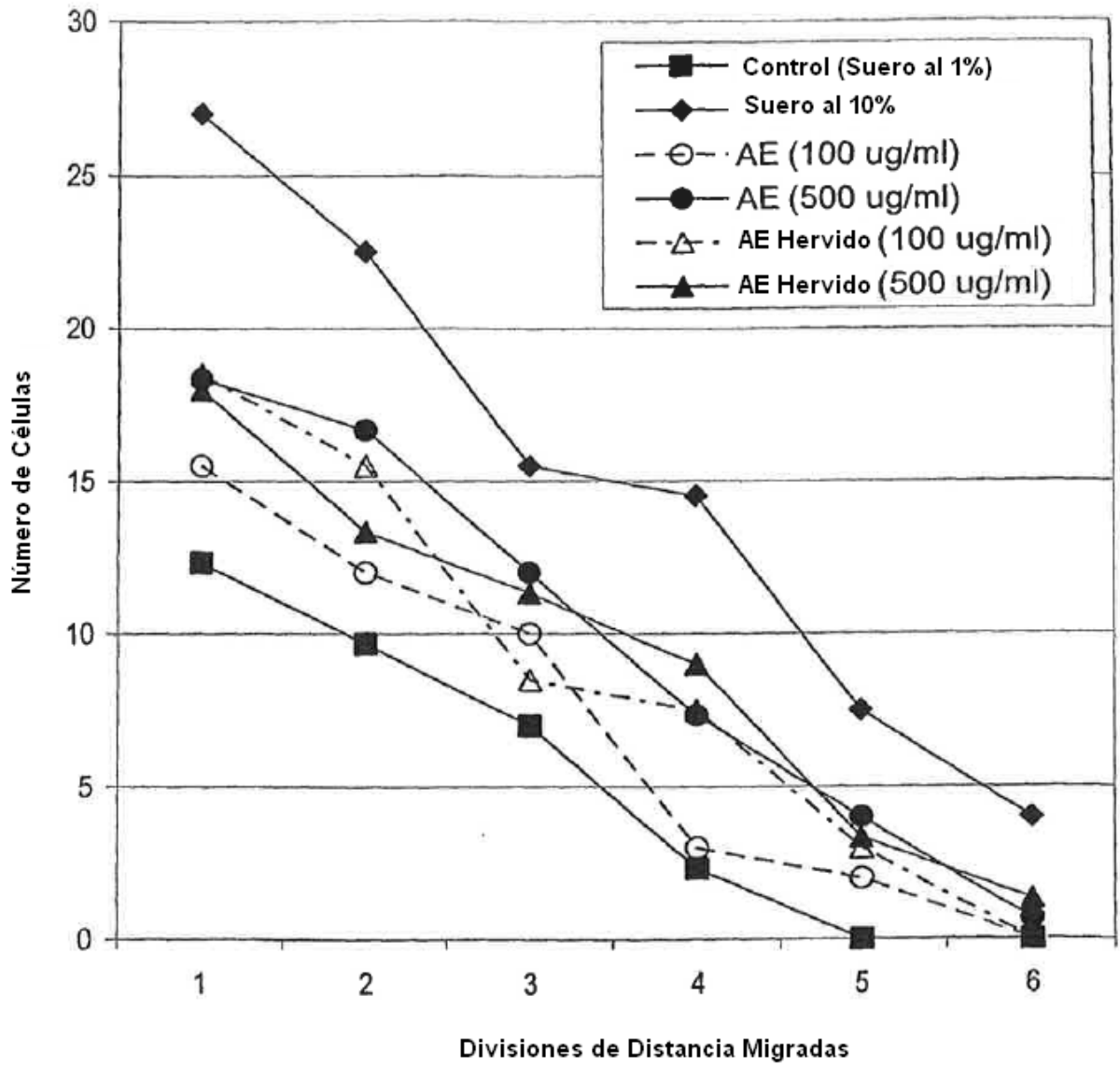


Figura 9.

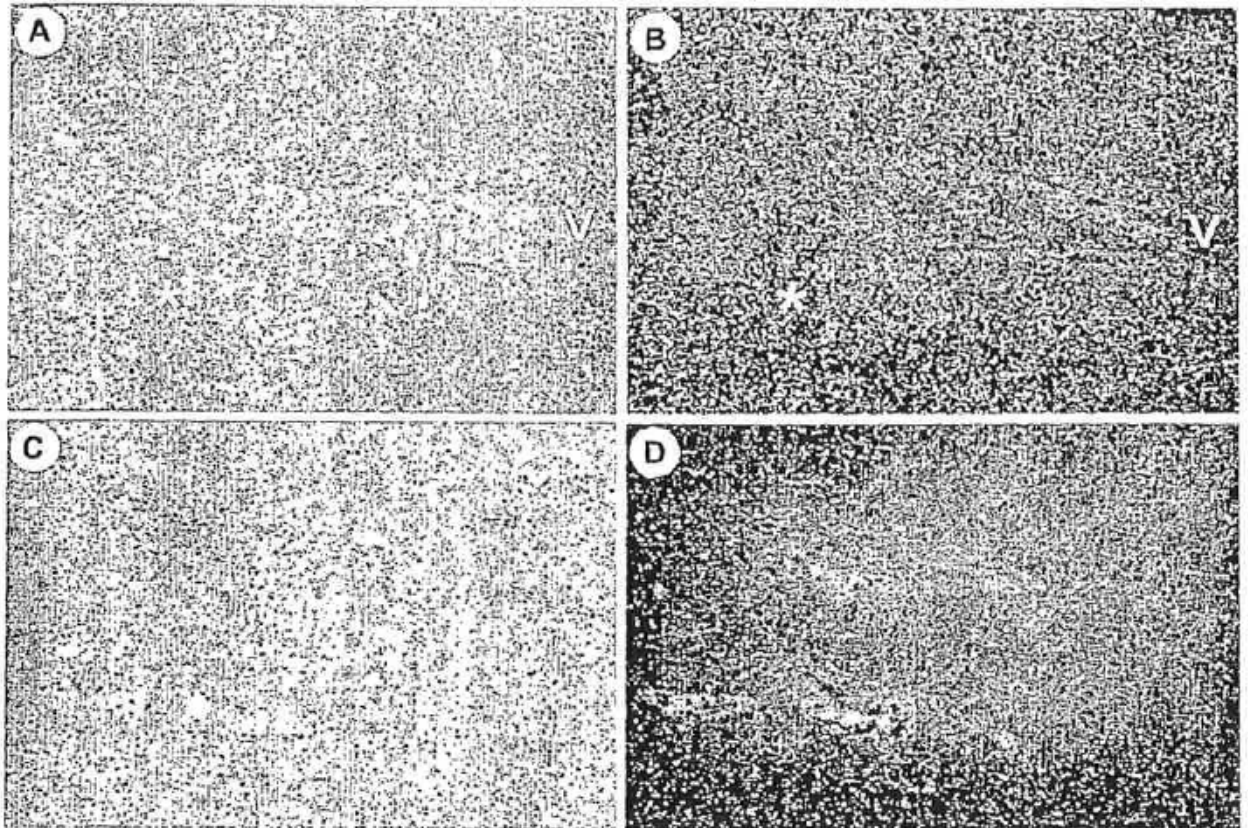


Figura 10.

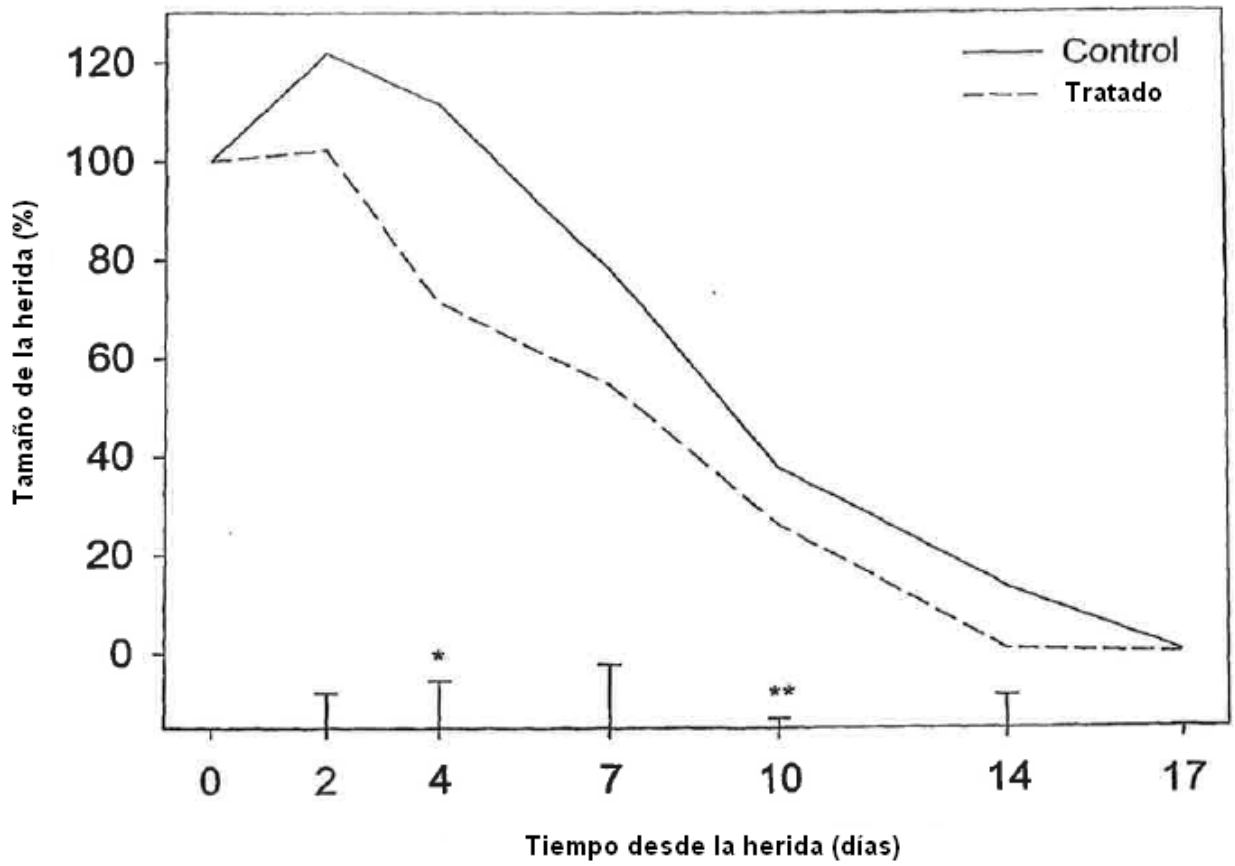


Figura 11.

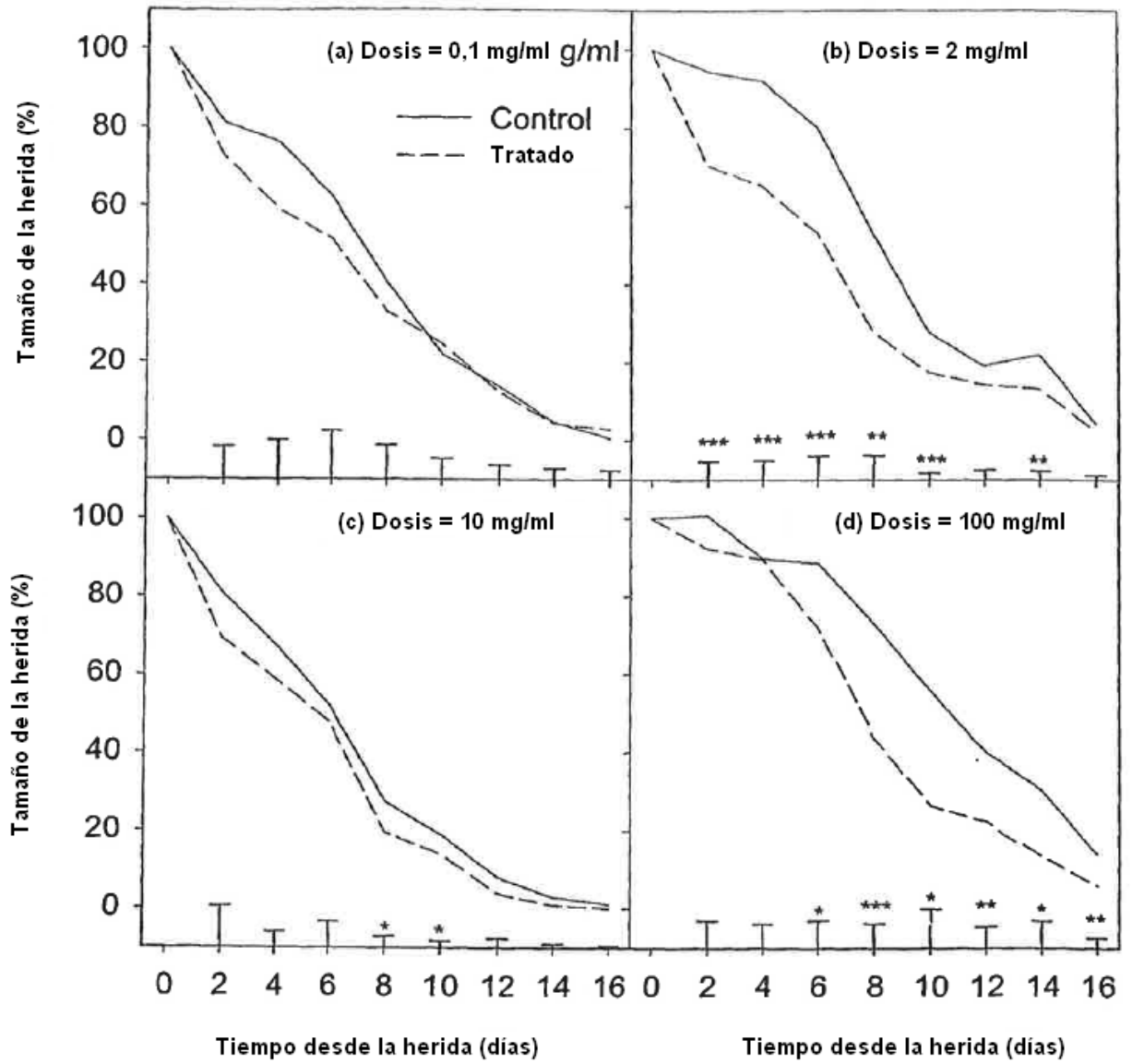


Figura 12.

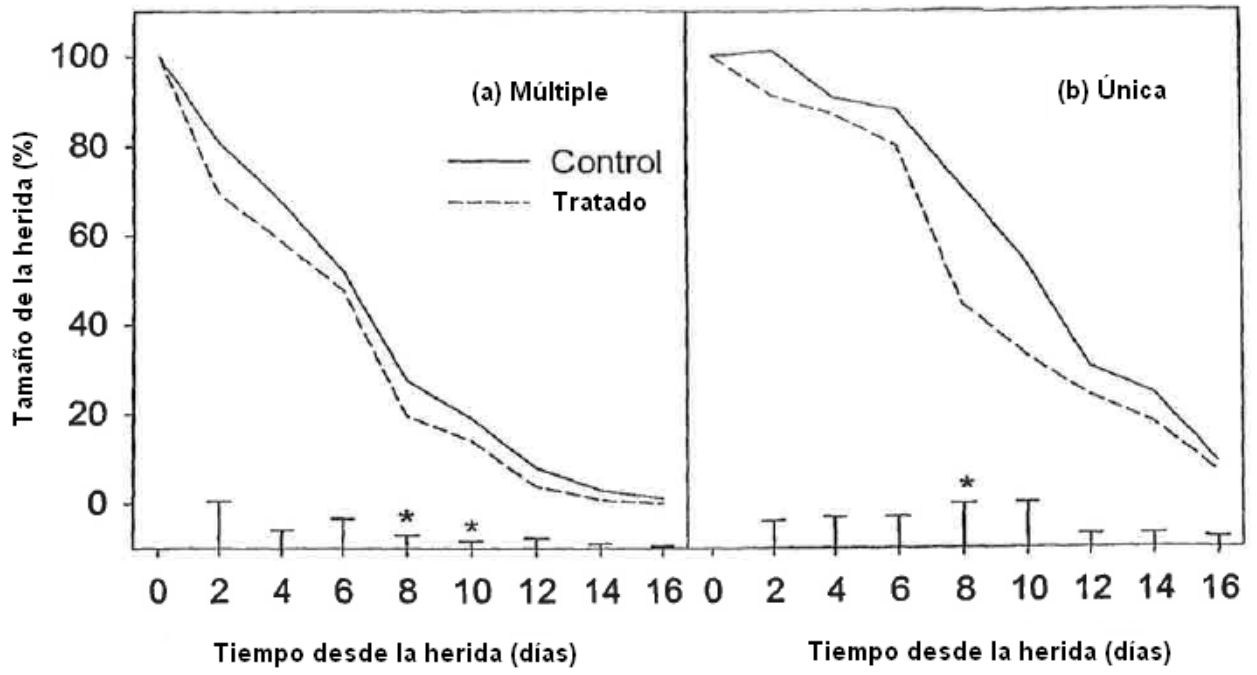


Figura 13.

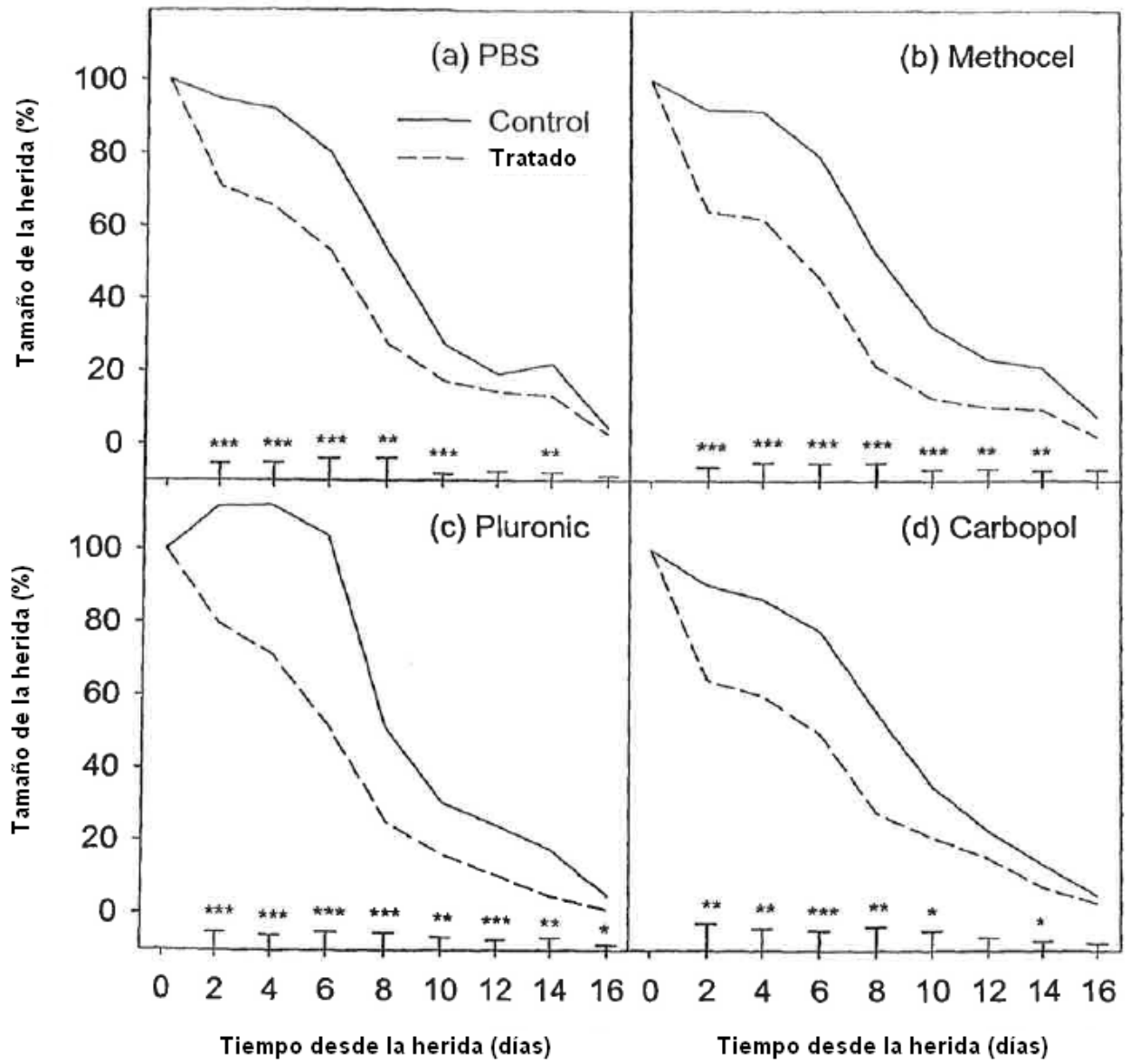


Figura 14.

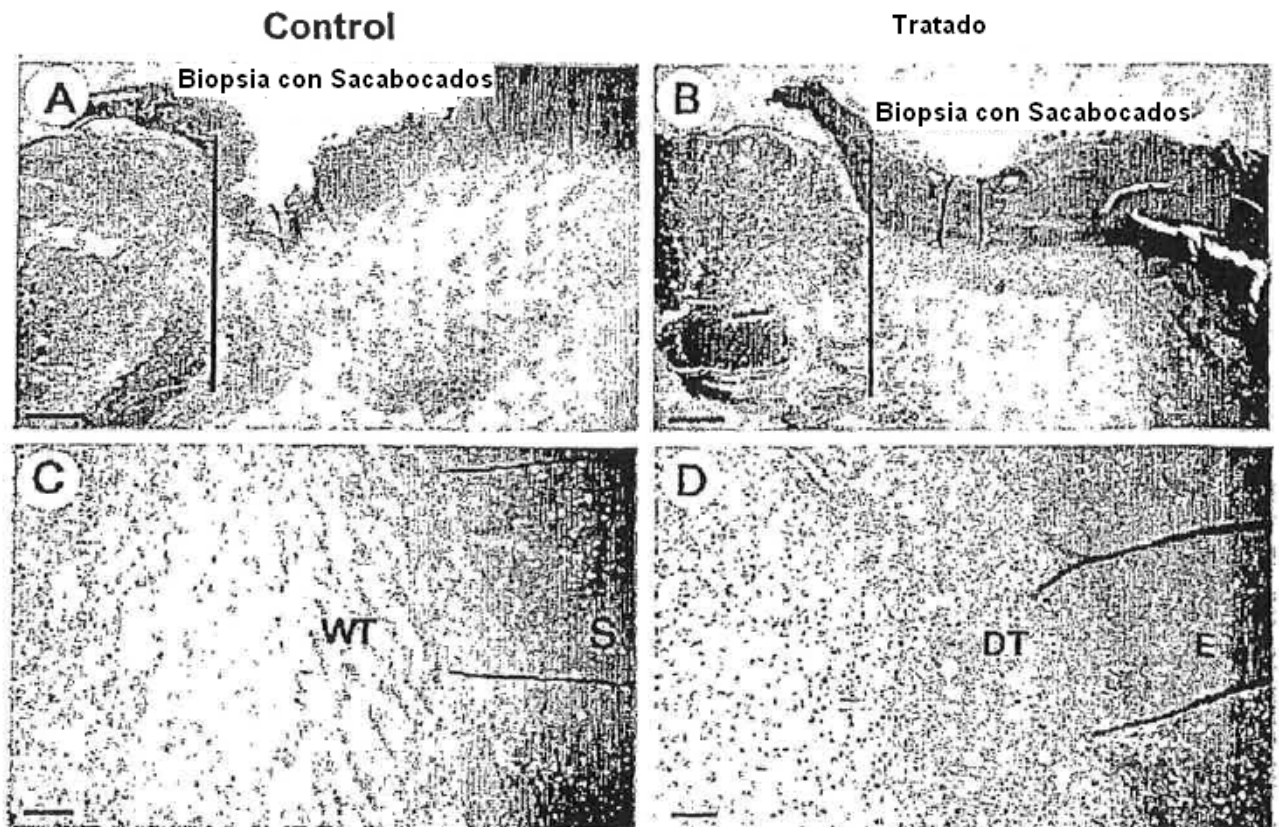




Figura 15.

