

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 758**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10774593 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2431046**

54 Título: **Utilización de extractos de hojas de olivo en una composición farmacéutica para inducir angiogénesis y vasculogénesis**

30 Prioridad:

14.05.2009 ES 200901296

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**SANIDAD Y RESIDENCIAS 21, S.A. (33.3%)
Cronista Rey Díaz 2
14006 Córdoba, ES;
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%) y
QUESPER R&D, S.L. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**QUESADA GÓMEZ, JOSÉ MANUEL;
SANTIAGO MORA, RAQUEL MARÍA;
CASADO DÍAZ, ANTONIO y
LUQUE DE CASTRO, MARÍA DOLORES**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 535 758 T3

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

Descripción

Utilización de extractos de hojas de olivo en una composición farmacéutica para inducir angiogénesis y vasculogénesis

5

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del sector médico-farmacéutico y específicamente en el campo técnico de la promoción de la angiogénesis y la vascularización, la reparación endotelial y el tratamiento de las heridas y úlceras.

10

Constituye el objeto de la presente invención la utilización de extractos de hoja de olivo para la elaboración de una composición farmacéutica con capacidad de inducir angiogénesis y vascularización. Esta composición puede utilizarse en general para aplicaciones terapéuticas en las que se desee promover la diferenciación de células madre a células endoteliales progenitoras (EPCs) y/o células endoteliales maduras, así como la inducción de la formación de vasos a partir de esas células endoteliales. Entre otras aplicaciones, las enfermedades cardiovasculares, los procesos isquémicos en general, las úlceras y la cicatrización de las heridas, son patologías a las que estará dirigida esta composición angiogénica e inductora de la vascularización, tanto en el ámbito de la medicina como en el veterinario.

15

20

ESTADO DE LA TÉCNICA

La formación y remodelación de vasos sanguíneos ocurre en los procesos denominados vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis Carmeliet, P. (2004). "Manipulating angiogénesis in medicine." *J Intern Med* 255(5): 538-61. La vasculogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliales (EPCs) que migran y se diferencian a células endoteliales en aquellos lugares en donde se inicia la vascularización. La angiogénesis consiste en la formación de nuevas ramificaciones de capilares a partir de vasos sanguíneos existentes. La arteriogénesis, por su parte, se refiere al remodelado de una arteria existente como consecuencia de su adaptación al flujo sanguíneo.

25

30

La arteriogénesis difiere de la angiogénesis en su mecanismo. La primera se produce principalmente como consecuencia de un estrés físico (p. ej. la rotura u obstrucción de un vaso) y la segunda se produce principalmente por hipoxia.

35

Fisiológicamente, el organismo regula la angiogénesis a través de una serie de mecanismos que actúan como interruptores "on" y "off". Los interruptores "on" son conocidos como factores de crecimiento angiogénico, mientras que a los "off" se les conoce como inhibidores angiogénicos endógenos. Cuando ocurre un aumento descontrolado y/o excesivo de la angiogénesis pueden desarrollarse patologías como cáncer, aterosclerosis y retinopatía diabética, entre otras. Mientras que una disminución de la angiogénesis favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, procesos isquémicos en general, úlceras y dificultad en la cicatrización de heridas, etc.

40

El tratamiento de patologías asociadas a una menor angiogénesis comprende la utilización de factores de crecimiento que promueven la formación de vasos, como el factor de crecimiento endotelial (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor-1 alfa inducible de hipoxia (HIF-1 α), FGF-4, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la peptidasa tejido kallikrein (TK), activadores de los receptores activados por proteinasas (PAR-activadores), la trombina, la proteína "frizzled-A" y el óxido nítrico [Madeddu, P. (2005). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration." *Exp Physiol* 90(3): 315-26], entre otros.

45

50

El uso de los factores de crecimiento como el VEGF para el tratamiento de procesos isquémicos no está aún bien establecido, debido a que es complicado aplicar la dosificación adecuada y a que pueden producir importantes efectos secundarios como hipotensión y edemas tisulares. [Simons M. and Ware J.A. (2003) "Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease". *Nat Rev Drug Discov* 2(11):863-71].

55

Actualmente se están probando también terapias celulares con la aplicación de células madre o EPCs para promover la angiogénesis con fines terapéuticos [Tarzami, S. T. and J. P. Singh (2004) "Pharmacological revascularisation in coronary and peripheral vascular disease." *Expert Opin Investig Drugs* 13(10): 1319-26]. Las células madre, debido a su plasticidad, pueden diferenciarse en elementos vasculares y no vasculares, por lo que pueden regenerar la parte dañada por la isquemia. Así, por ejemplo, en el caso de infarto de miocardio, dichas células, pueden, además, diferenciarse en miocitos, recuperando el tejido dañado.

60

65

La estrategia de la utilización de terapia celular presenta el problema de la pérdida de funcionalidad de las EPCs a las pocas horas después del trasplante. Para disminuir este fenómeno se ha propuesto: 1) una

liberación local de las células en lugar de una liberación sistémica, 2) administración de quimioquinas que promuevan la movilización de las EPCs, 3) enriquecimiento y expansión de los cultivos de EPCs y 4) aumento de la funcionalidad de las EPCs por modificación genética [Madeddu, P. (2005). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration." *Exp Physiol* 90(3): 315-26].

La formación de nuevos vasos está implicada también en la cicatrización de heridas, en donde se distinguen distintas etapas: angiogénesis, depósito de colágeno, formación de tejido granular, epitelización y contracción de la herida. En los procesos angiogénicos que ocurren durante la cicatrización intervienen las EPCs [Eming, S.A., Smola, H. Krieg, T. Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs* 2002; 172, 105-17].

En fases posteriores de la curación de la herida se induce una angiogénesis adicional por el incremento de VEGF en el tejido dañado, con un máximo a los varios días tras el daño [Karayiannakis AJ, Zbar A, Polychronidis A, Simopoulos C. Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res* 2003; 35, 492-6], de este modo, en el proceso de cicatrización y reparación de heridas es fundamental la angiogénesis y factores relacionados. De la misma manera, la presencia del factor VEGF, en determinadas concentraciones, en el medio de cultivo de células madre mesenquimales (MSCs) es la causa de la diferenciación de estas células hacia células del endotelio [Liu, JW, Dunoyer-Geindre S, Serre- Beinier V, Mai G, Lambert JF, Fish RJ, Pernod G, Buehler L, Bounameaux H, Kruithof EK. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 826-34]. En tumores, el sistema vascular se desarrolla de manera desordenada e irregular. Como consecuencia, el aporte sanguíneo en el tumor es inadecuado y provoca una disminución de la eficacia de quimio y radioterapias [Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." *Science* 307(5706): 58-62]. Por lo que, actualmente las terapias más innovadoras contra el cáncer están utilizando la acción combinada de agentes anti y proangiogénicos para revertir la anormalidad del sistema vascular en el tumor [Ellis, L. M. and D. J. Hicklin (2008). "VEGFtargeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity." *Nat Rev Cancer* 8(8): 579-91]. Actualmente, una gran cantidad de extractos vegetales ricos en compuestos antioxidantes están siendo estudiados no sólo por su actividad antioxidante, sino por su influencia en distintos procesos fisiológicos como la inflamación, la diferenciación celular, la tumorigénesis, o angiogénesis; por ejemplo la patente WO 2005/105127 describe la utilización de un extracto de piel de frutas cítricas con capacidad de acelerar la cicatrización de heridas en ratas y promover la angiogénesis.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe el uso de extractos de hoja de olivo para ser utilizados solos, en combinación con otros compuestos o con células madre, para el tratamiento de patologías en las que sea necesaria la inducción de angiogénesis y vasculogénesis.

Constituye el objeto de la presente invención una composición farmacéutica que contiene extractos de hoja de olivo, que cumplan la definición de extracto de hojas de Olivo publicado en *Pharmeuropa Olive* [(2007) Leaf dry extract *Pharmeuropa* 19(3): 510-511] para su utilización en la inducción de angiogénesis y vasculogénesis.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de extractos de hoja de olivo para la preparación de una composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de extractos de hoja de olivo para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de angiogénesis y vasculogénesis y procesos biológicos relacionados como cicatrización, reparación endotelial, procesos isquémicos etc.

En una realización preferida, la composición farmacéutica usada se presenta en forma de crema, pomada, bálsamo, solución, emulsión o ungüento para administración tópica.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende una concentración menor al 30% de extracto de hoja de olivo.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende entre 10-1 y 10-10 M de oleuropeína contenida en el extracto de hoja de olivo.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica entre 1 y 8 veces al día.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica conjuntamente con otro producto.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica por primera vez hasta 14 días después de la aparición del daño.

5 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica por medio de un parche transdérmico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende extractos de hojas de olivo enriquecidos en polifenoles y/o factores estimulantes de angiogénesis y vasculogénesis.

10 En una realización preferida, la composición farmacéutica dañado comprende células madre mesenquimales.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en forma de crema, pomada, bálsamo, solución, emulsión o ungüento para administración tópica.

15 En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende una concentración de extracto de hoja de olivo menor al 30%.

20 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica entre 1 y 8 veces al día.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica conjuntamente con otro producto.

25 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica por medio de un parche transdérmico.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se aplica por primera vez hasta 14 días después de la aparición del daño.

30 En un último aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de heridas o úlceras que comprende la aplicación de una composición farmacéutica según lo descrito anteriormente.

35 Específicamente, la composición que contiene extractos de hojas de olivo puede utilizarse, sola o en asociación con otras sustancias, en la formación de células endoteliales derivadas de células madre mesenquimales y también en la formación de vasos a partir de células endoteliales.

Constituye igualmente un objeto de la presente invención la utilización de extractos de hojas de olivo en la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de angiogénesis y vasculogénesis.

40 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares (por ejemplo, estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales). *In vitro*, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular; originalmente recibía el nombre de factor de permeabilidad vascular (*vascular permeability factor*).

50 El extracto de hoja de olivo usado en la presente invención posee la capacidad de estimular la síntesis de VEGF y con esto la vasculogénesis y angiogénesis. Estos procesos son el primer paso para la recuperación tisular, por lo que el extracto de hoja de olivo es capaz de promover la cicatrización en heridas y úlceras, especialmente las que aparecen en pacientes diabéticos y/o de avanzada edad.

55 La composición se prepara para administración oral, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, tópica, intratraqueal, intramuscular, intravenosa o para inhalación.

60 Como ocurre habitualmente en la preparación de formulaciones farmacéuticas, en la formulación de la presente invención, se incorporaran, en adición al principio activo oleuropeína y/o extracto de hojas de olivo a diversas concentraciones, todos aquellos ingredientes convencionales para un experto en la práctica galénica, que permitan las mejores propiedades de dosificación, conservación, penetración, bioasequibilidad de dichos principios activos, para que los mismos puedan actuar con la máxima eficacia posible. A modo de ejemplo, suelen incorporarse estabilizantes, conservantes y antioxidantes.

65 Por ejemplo, para su uso en piel, pueden emplearse como soporte de las formulaciones bases ya preparadas comercialmente, como emulsiones de aceite-en-agua y de agua-en-aceite, que tienen excelente tolerancia cutánea; también pueden emplearse por las características del producto distintos tipos de geles. Nosotros hemos empleado para evaluar en humanos el efecto del extracto de hojas de

olivo sobre heridas cutáneas, una crema de agua-en-aceite y agua gelificada a las concentraciones empleadas en los animales con resultados extraordinariamente favorables en la totalidad de los casos tratados como se evidencia en las fotografías siguientes.

5

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. A y B compara dos imágenes de microscopia óptica de células madre mesenquimales. Las células tratadas con extracto de hojas de olivo, imagen B, forman estructuras tubulares típicas del proceso angiogénico. Esas mismas células sin el tratamiento con extracto de hojas de olivo no son capaces de formar dichas estructuras, imagen A.

Figura 2. Imágenes obtenidas con microscopio óptico comparando la formación de estructuras tubulares en células HUVECs en medio endotelial sin tratamiento (figura 2A), tratadas con VEGF (figura 2B) y tratadas con extracto de hojas de olivo (figura 2C) sobre matrigel.

Figura 3. Se muestran en A los resultados de los tratamientos realizados con el extracto de hoja, y en B los resultados de los tratamientos con oleuropeína pura. La evolución de las heridas que han recibido directamente el tratamiento se muestra en las gráficas de la derecha; mientras la evolución de las que no han recibido tratamiento se muestra en las gráficas de la izquierda.

Figura 4. Muestra la respuesta en las heridas de un animal al que se administró oleuropeína 10^{-7} M.

Figura 5. Muestra la respuesta en las heridas de un animal al que se administró el extracto de hoja de olivo conteniendo 10^{-5} M de oleuropeína.

Figura 6. Muestra la evolución de la úlcera de un paciente al que se le aplicó la composición de la invención, desde el día 0 (6.A) al día 11 (6.B).

30

EJEMPLOS

La actividad angiogénica de los extractos de hojas de olivo que cumplan como mínimo los requisitos de extracto de hojas de Olivo publicado en Pharmeuropa Olive [(2007) Leaf dry extract Pharmeuropa 19(3): 510-511] queda demostrada por:

1) Evidencias fenotípicas: tras 15-28 días de cultivo de células madre mesenquimales con extractos de hojas de olivo se forman estructuras típicas de células endoteliales tales como microvasos.

2) Evidencias de expresión de marcadores de membrana: El tratamiento con extractos de hojas de olivo provoca un aumento de células con marcadores de superficie CD144 y VEGFR2.

3) Evidencias de expresión de genes implicados en la diferenciación endotelial: VEGF, PCAM, PDGFR y VEGFR1.

Estas evidencias se han puesto de manifiesto mediante los siguientes ejemplos.

45

1. Ensayos de inducción y estimulación de la angiogénesis y vasculogénesis.

Cultivo de células madre mesenquimales

Las células madres mesenquimales obtenidas de médula ósea humana fueron expandidas y crecidas en medio esencial mínimo modificación alfa (α -MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM Ultraglutamina y con antibióticos. Cuando las células estuvieron próximas a la confluencia se trataron con extractos de hoja de olivo. Como controles, una parte de los cultivos no fueron tratados. Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO2 y los medios fueron cambiados cada 3 días a lo largo de todo experimento.

55

Células endoteliales

La línea establecida de células endoteliales obtenidas de vena umbilical humana (HUVE) fue suministrada por Lonza Group, Ltd. Switzerland, estas células fueron expandidas en frasco con medio básico endotelial (EBM, Lonza) suplementado con antibióticos y suero fetal bovino. Cuando las células llegaron a la confluencia fueron subcultivadas. El medio fue cambiado cada 3 días. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron las células del segundo y tercer pase. Los tratamientos que recibieron estas células fueron:

- 1.- Extracto de hojas a diversas concentraciones
- 2.- VEGF 10 μ g/mL
- 3.- Control, sin tratamiento

65

Estudios de citometría de flujo y anticuerpos monoclonales

Para el estudio y análisis de los marcadores celulares de membrana se realizaron ensayos de citometría de flujo. Las células fueron lavadas con PBS

+ 3% suero fetal bovino, los anticuerpos monoclonales anti-humano conjugados, CD144-FITC y VEGFR2-PE fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas fueron lavadas tres veces, resuspendidas en 0.5 ml de PBS y analizado el marcaje con un citómetro de flujo FACScan Caliber (Benton-Dickinson).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Para analizar la expresión de marcadores génicos angiogénicos se utilizó la PCR en tiempo real. El RNA total de las células fue obtenido utilizando el reactivo Tri Reagent (Sigma Aldrich) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado a partir de un microgramo de RNA total, que previamente había sido tratado con DNAsal (Sigma Aldrich), utilizando el kit iScript TMcDNA Sintesis Kit de Biorad. La PCR en tiempo real utilizada para cuantificar los mRNA analizados fue llevada a cabo en un sistema Light-Cycler (Roche) utilizando SYBRRGreen. Estas reacciones fueron realizadas en un volumen final de 10 µL con 1 µL de cDNA, 10 pmol de cada primer y QuantitecR SYBRRGreen master mix (Qiagen). Las condiciones para el Light-Cycler fueron 95°C durante 15min, 40 ciclos de 95°C durante 30s, 60°C durante 15 segundos y 72°C durante 30s. El ciclo umbral (Ct) del gen diana fue estandarizado con el correspondiente ciclo umbral del gen constitutivo pGAPDH.

Angiogénesis

Para llevar a cabo los ensayos de angiogénesis In Vitro se utilizó el kit Endothelial Tube Formation Assay, Cell Biolab Inc. Las condiciones del ensayo son las que se indicaban en las instrucciones del proveedor. Los medios utilizados fueron medio endotelial básico suplementado sin tratar (control negativo) y tratado con VEGF (control positivo) o con extracto de hoja de olivo. Las estructuras formadas fueron marcadas mediante un anticuerpo conjugado con calcein AM suministrado en el kit específico para los túbulos.

Resultados obtenidos en la diferenciación de células madre mesenquimales a células endoteliales

La capacidad de los extractos de hojas de olivo para promover la angiogénesis en células madres se pone de manifiesto en la Figura 1, donde pueden observarse las estructuras tubulares, características de células endoteliales obtenidas por diferenciación de células madre mesenquimales tratadas con los extractos de hojas de olivo.

El análisis por citometría de los marcadores de superficie característicos de células endoteliales, como son el CD144 y VEGFR2, mostró que éstos se encuentran en MSCs tratadas con extracto de hoja de olivo y en todos los casos analizados el porcentaje de estos marcadores endoteliales en las células tratadas con los extractos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control.

La expresión génica de diferentes genes involucrados en la diferenciación endotelial como VEGF, PCAM, PDGFR y VEGFR1 mostró un aumento con el tratamiento con extracto de hoja de olivo.

Resultados obtenidos en la inducción de angiogénesis en células endoteliales

La capacidad de los extractos de hojas de olivo para promover la angiogénesis en células endoteliales fue probada y evaluada mediante experimentos celulares en sustrato de Matrigel. Las células endoteliales tratadas con extracto de hoja de olivo presentaron una capacidad equiparable al VEGF para promover la formación de estructuras tubulares típicas de la formación de vasos sanguíneos (Figura 2).

Comparación de los resultados con el estado de la técnica.

Como ya se ha hecho referencia en apartados anteriores de este documento, la angiogénesis comienza con un daño tisular, lo que provoca la activación de la proliferación de las células endoteliales y el ensamblaje de las mismas en estructuras tubulares alrededor de las cuales se formarán las nuevas paredes del vaso [Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis 2008 Biochemistry].

Los resultados aquí presentados con los extractos de hojas de olivo permiten proponer la aplicación de éstos como factor angiogénico, debido a su capacidad de diferenciar células madre hasta células endoteliales capaces de formar estructuras tubulares.

Los resultados obtenidos con los extractos de hojas de olivo como promotor de angiogénesis son equiparables o superiores a los del VEGF. Este factor es uno de los más importante agentes angiogénicos, y está involucrado en estudios actuales cuyo objetivo es hallar terapias para patologías relacionadas con la angiogénesis, como son las isquemias o la cicatrización de heridas entre otras. En los resultados presentados los efectos mostrados por los extractos de hoja de olivo son similares o superiores a los mostrados por el VEGF, lo que respalda la utilización de estos como inductores angiogénicos [Jabbarzadeh, E. Induction of angiogenesis in tissueengineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. PNAS 2008]; [Guerrero, M., K. Athota, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor-165 gene therapy promotes cardiomyogenesis in reperfused myocardial infarction." J Interv Cardiol 21(3): 242-51]; [Michaels, J. T., M. Dobryansky, et al. (2005).

"Topical vascular endothelial growth factor reverses delayed wound healing secondary to angiogenesis inhibitor administration." *Wound Repair Regen* 13(5): 506-12]; [Galiano, R. D., O. M. Tepper, et al. (2004). "Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells." *Am J Pathol* 164(6): 1935-47].

5 El tratamiento de células madre mesenquimales humanas con extractos de hojas de olivo ha propiciado la diferenciación de estas células a células endoteliales, y más aún hasta células que han sido capaces de formar las estructuras tubulares requeridas en todo proceso angiogénico y vasculogénico. Ésto se encuentra en consonancia con lo descrito por Alviano et al, entre otros, quienes han mostrado el potencial de diferenciación de células madre mesenquimales a células endoteliales bajo la influencia de factores angiogénicos como el VEGF [Alviano, F., V. Fossati, et al. (2007). "Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro." *BMC Dev Biol* 7: 11].

15 Los resultados obtenidos tanto en la expresión génica de marcadores endoteliales como en el análisis de los marcadores de superficie de las células madre mesenquimales diferenciadas a endoteliales con extracto de hoja y VEGF ponen de manifiesto que el efecto inductor que tienen estos extractos es equiparable al del VEGF, reconocido inductor de la diferenciación de estas células a endoteliales.

20 **2. Ensayos de inducción y estimulación de la cicatrización.**

2. a) Ensayos en animales

25 Se utilizaron ratones db/db (BKS.Cg-m +/- Leprdb) hembra con edad de 10 a 12 semanas. Se obtuvieron a través de Charles River Laboratories (Spain), el peso medio de los animales a la recepción de los mismos fue de 35,64g. A lo largo de todo el estudio los animales se mantuvieron en animalarios especialmente diseñados para permitir el control del entorno ambiental de los animales, tal como humedad relativa (30-70%), temperatura (22±2°C), presión del aire, número de renovaciones y fotoperiodo (12/12 horas de luz/oscuridad). La accesibilidad al agua fue "ad libitum" y la dieta una estándar para rata seca y peletizada suministrada por PanLab (Barcelona, Spain). Tras el periodo de aclimatación se realizó un reparto aleatorio de los ratones en los diferentes grupos de estudio. En este estudio se utilizaron tres dosis diferentes de un extracto de hojas de olivo cuya riqueza en oleuropeína era del 41,5%, además, en otros grupos de animales, se utilizó oleuropeína pura en las tres concentraciones utilizadas en el extracto. Como sustancia de referencia se utilizó rhVegf (Sigma Aldrich) y como control del experimento se utilizó un grupo placebo. Todos los compuestos utilizados en este estudio fueron disueltos en PBS. Las concentraciones utilizadas en este ensayo vienen detalladas en la tabla 1.

Grupo	Sustancia de ensayo	Concentración
A	Placebo (PBS)	
B	Extractos de hojas	10e-2M de oleuropeína
C	Extractos de hojas	10e-5M de oleuropeína
D	Extractos de hojas	10e-7M de oleuropeína
E	Oleuropeína	10e-2M de oleuropeína
F	Oleuropeína	10e-5M de oleuropeína
G	Oleuropeína	10e-7M de oleuropeína
H	VEGF (referencia)	5µg.ml ⁻¹

40 Tabla 1: Composiciones administradas a los distintos grupos de estudio y sus respectivas concentraciones

45 En el día 0 del experimento se realizaron dos heridas escisionales de 6 mm en el dorso de cada ratón, bajo condiciones asépticas y utilizando instrumental quirúrgico. Cada ratón recibió en una de las heridas (lado derecho) el tratamiento correspondiente a su grupo y en el otro (lado izquierdo) ninguno recibió tratamiento. Los tratamientos se administraron tópicamente sobre las heridas, los días 0, 2, 4, 6 y 8 del experimento. El proceso de sanación de la herida fue seguido y evaluado a lo largo del experimento (ver figura 3).

50 En los días de administración del tratamiento se realizaron fotografías de ambas heridas de cada ratón para su posterior evaluación (ver figuras 4 y 5).

Para realizar el seguimiento de la cicatrización de las heridas se utilizó un procedimiento de planimetría digital por el que se cuantifico el área de cada herida.

55 Las diferencias entre grupos han sido determinadas mediante un análisis estadístico Anova-two way seguido de un postanálisis de Bonferroni. Se han considerado diferencias cuando la p<0.05.

Los resultados de estos experimentos muestran un efecto muy positivo de los extractos de hojas de olivo en la cicatrización de las heridas, similares a los observados cuando se utiliza oleuropeína. Tanto la herida que recibió tratamiento (lado derecho) como la que no (lado izquierdo) muestran un incremento de cicatrización (figura 3) que es estadísticamente significativo con respecto al control (grupoA- tratamiento con PBS en ambas heridas).

En todos los tiempos evaluados y con las tres dosis de extractos de hojas analizadas se observa un efecto cicatrizante equiparable al producido por el VEGF en ambas heridas. Incluso en el caso de las heridas tratadas directamente se observa que la diferencia con el grupo control se inicia antes en el tiempo, a los dos días, con las tres dosis de extractos de hojas utilizadas que con el VEGF.

2. b) Ensayos en humanos

La formulación de la invención para aplicar a humanos puede prepararse en su forma más sencilla o elemental disolviendo el correspondiente extracto de hoja de olivo que contenga una concentración conocida de oleuropeína, en concentraciones que vayan desde 10^{-2} M hasta 10^{-7} M, en una mezcla con gel de agua, o cremas hidratantes comerciales comunes, para darles consistencia y facilitar la aplicación local sobre la zona afectada de la piel.

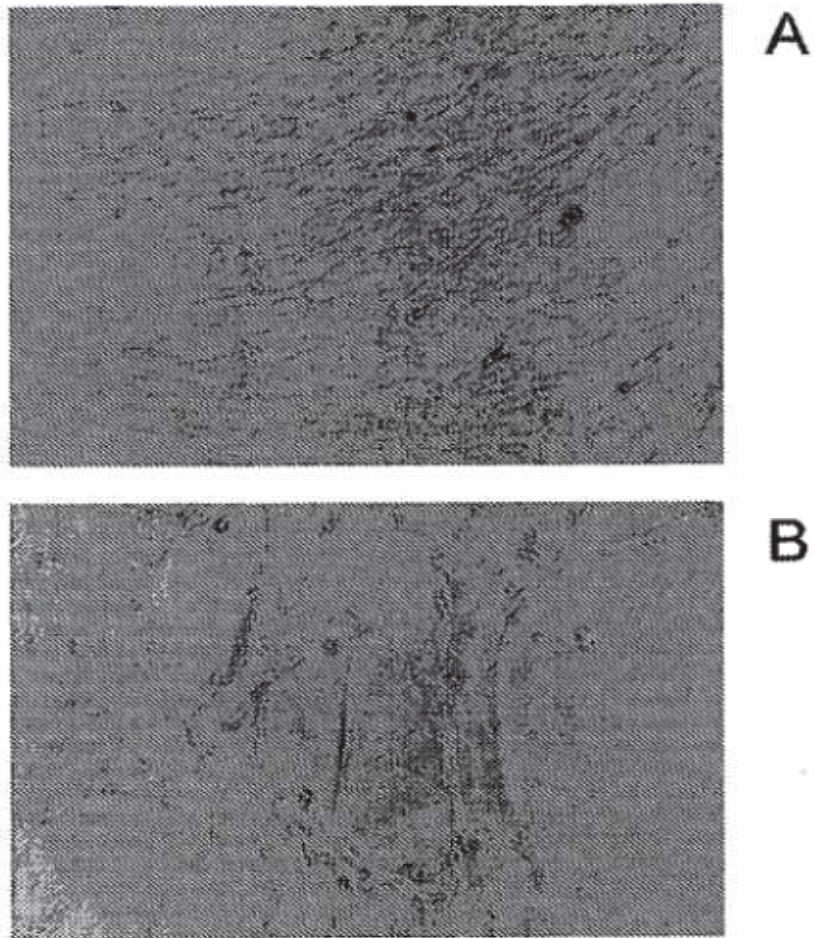
La evaluación de las formulaciones citadas se llevó a cabo con pacientes ancianos y/o diabéticos con úlceras de distintos tipos etiológicos. Ningún paciente presentó hipersensibilidad a los extractos, mostrándose una respuesta positiva que comenzó a evidenciarse ya en los primeros días de tratamiento, siendo los resultados óptimos antes de alcanzarse el mes de tratamiento en todos los casos.

Por lo que corresponde a los efectos adversos, tan solo en algún caso evidenciamos rubefacción pero en ningún caso hubo que retirar la administración del producto. La figura 6 muestra los resultados obtenidos sobre un paciente.

Reivindicaciones

- 5 1. Extracto de la hoja de olivo para usar en el tratamiento de heridas de la piel.
2. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de heridas de la piel que comprende el extracto de la hoja de olivo de acuerdo con la reivindicación 1 adaptada para administración tópica.
- 10 3. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 2 en forma de una crema, pomada, bálsamo, solución, emulsión, parche transdérmico o ungüento.
- 15 4. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde la composición farmacéutica comprende una concentración de menos que 30% del extracto de la hoja de olivo de la reivindicación 1.
- 20 5. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica comprende de 1 -10% del extracto de la hoja de olivo de la reivindicación 1.
- 25 6. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el tratamiento comprende la aplicación de la composición farmacéutica a la herida o úlcera de 1 a 8 veces por día.
- 30 7. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el tratamiento comprende la aplicación de la composición farmacéutica a la herida por primera vez hasta 14 días después de la aparición del daño.
- 35 8. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 que comprende además polifenoles y/o factores estimulantes de la angiogénesis y vasculogénesis.
- 40 9. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende además células madre mesenquimales.
- 45
- 50
- 55
- 60

FIG 1



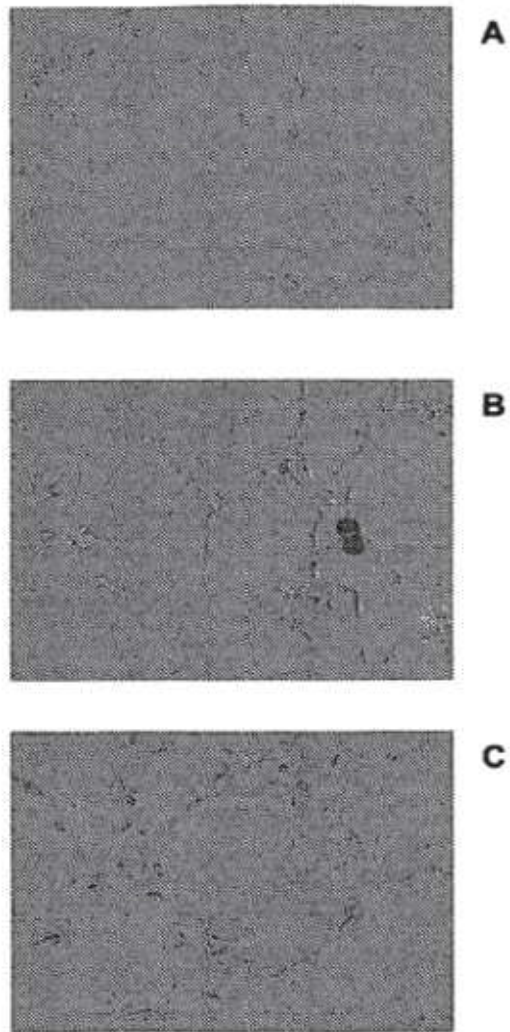


FIG 2

FIG 3

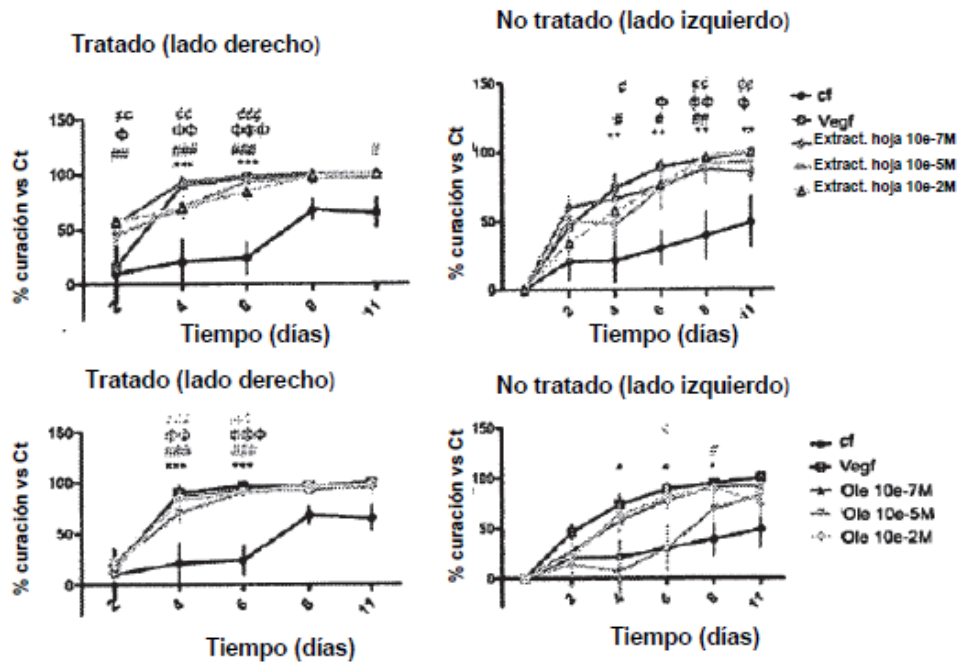


FIG 4

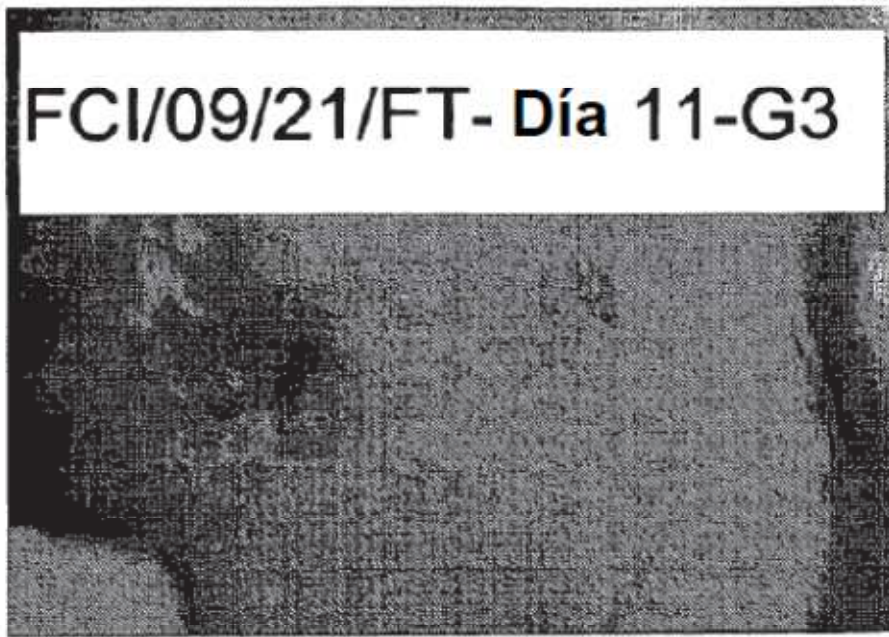




FIG 5

FIG 6

