

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 950**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/351** (2006.01)  
**A61K 31/7004** (2006.01)  
**A61K 36/63** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2006.01)  
**A61K 47/32** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/ES2011/070343**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO2011141611**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11743251 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2570124**

54 Título: **Composiciones de Oleuropeína para cicatrización de heridas y úlceras en ancianos y/o diabéticos**

30 Prioridad:  
**14.05.2010 WO PCT/ES2010/070327**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2017**

73 Titular/es:  
**SANYRES SUR S. L. (33.3%)**  
**C/ 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 y**  
**CASADO DÍAZ, ANTONIO**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 613 950 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**

Composiciones de Oleuropeína para cicatrización de heridas y úlceras en ancianos y/o diabéticos

**5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un nuevo uso de la oleuropeína para el tratamiento en personas de avanzada edad o ancianas y/o diabéticas, de cicatrización de heridas y úlceras.

10 En particular la presente invención se refiere concretamente a composiciones que contienen oleuropeína como único ingrediente o principio activo para el tratamiento en personas de avanzada edad, ancianos y/o diabéticos, de cicatrización de heridas y úlceras, seleccionadas del grupo que consiste en : pie diabético, úlcera por presión y úlceras venosas.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La oleuropeína se obtiene principalmente, pero no con carácter excluyente, de las hojas del olivo *Olea europaea*, original de la región mediterránea donde tanto el fruto como el aceite que se extrae del mismo son ingredientes principales de la denominada "dieta mediterránea".

20 La oleuropeína es el componente fenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas verdes (de la variedad *olea europea* que da nombre al glicósido) y se encuentra en el aceite de oliva virgen al que da su sabor amargo. También las hojas de olivo contienen oleuropeína como componente principal. El principio activo (p.a.) empleado en la presente invención, la oleuropeína, se obtuvo a partir de extractos de hojas de olivo (Farmacopea Europea 6.4: contenido mínimo de oleuropeína del 16%) y posterior aislamiento y purificación.

25 Su extracto no solo es saludable sino que es la base para formar un sistema inmune no tóxico<sup>1</sup>. Existe evidencia clínica que ha demostrado que extractos de hojas de olivo reducen la presión sanguínea<sup>2,3,4,5</sup>. También se ha publicado que un extracto líquido hecho directamente de hojas frescas de olivo posee una capacidad antioxidante de casi el doble de la de un extracto de té verde y 400% más alta que la vitamina C<sup>6</sup>. En artículos de literatura no patente se describe que la oleuropeína tiene varias propiedades de tipo farmacológico como por ejemplo antioxidante<sup>7</sup>, anti-inflamatorio<sup>8</sup>, anti-cancerígeno<sup>9,10</sup>, antitímico<sup>11</sup> y antiviral<sup>12</sup>. Además, la oleuropeína ha demostrado ser cardioprotectora contra la cardiotoxicidad de la adriamicina<sup>13</sup> y se ha visto que muestra actividades anti-isquémicas e hipolipidémicas<sup>14</sup>.

30 Respecto a los documentos de patentes, el US 2004/0097428 A1 se refiere a métodos de inhibición del cáncer y de otras enfermedades que conducen a formación de cicatrices, que comprende la administración de oleuropeína y productos de su hidrólisis en cantidades efectivas terapéuticamente (la reivindicación 12 menciona más de cien tipos de cáncer).

35 US 2002/0110600 A1 se refiere a una composición para aliviar los síntomas de enfriamientos y gripes, que comprende 80-88% de un extracto de hoja de olivo que contiene oleuropeína. En KR 20070065955 se refiere a una pasta de dientes que comprende microcápsulas que contienen ingredientes funcionales para proporcionar el contacto de la oleuropeína directamente con la cavidad oral para inhibir bacterias, hongos y mejorar la mucosa interna de la boca.

40 El documento ES 2 274 721 A1 se refiere al uso de la oleuropeína para la fabricación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de una condición relacionada con la enfermedad vascular periférica, particularmente la insuficiencia venosa, donde el trastorno son las hemorroides o las varices.

45 El documento US 2003/0004117 A1 se refiere a métodos de inhibición de la angiogénesis mediante el uso de una composición en forma de extracto de plantas que comprende oleuropeína.

50 El documento WO2010/070183 A1, de los mismos autores de la presente solicitud, se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden oleuropeína y extractos de hojas de olivo para inducir angiogénesis y vasculogénesis.

55 El documento MX 2007016417 A, se refiere a una composición que comprende como ingrediente esencial un extracto de *allium* cepa L en 1-25% y además una mezcla de polietilenglicol (PEG) que comprende 15-50% PRG 4000 y 5-30% PEG 300, un alcohol (preferentemente etanol 15-50 % o etanol: agua en relación 50:10%) y un aceite vegetal (reivindicaciones 1-2, 4-5) preferentemente aceite de oliva en un 5-20% (reivindicación 3); la preparación de la composición (reivindicación 6) y su uso para la prevención o el tratamiento del pie diabético, principalmente heridas infectadas y ulceraciones externas de la piel (reivindicación 7). Sin embargo, este documento no considera el aceite de oliva y/o sus componentes como ingredientes esenciales de la invención, ya que solo lo incorpora para obtener la formulación en forma de composición líquida. Otras formulaciones descritas en el documento, tal como la

65

pomada, no incorporan dicho componente, utilizando mezclas de polietilenglicol de alto y bajo peso molecular para obtener la formulación en pomada deseada.

- 5 Así, se puede concluir que la oleuropeína se conoce para el tratamiento de diversas enfermedades y como modulador de varios procesos fisiológicos. Sin embargo, hasta ahora no se conoce que se hayan tratado de curar con oleuropeína ciertas enfermedades que tienen lugar en un grupo concreto de personas, como son personas de avanzada edad, ancianos y/o diabéticos y que son más específicas de dichos grupos, como son el pie diabético, la úlcera por presión y las úlceras venosas.

### OBJETO DE LA INVENCION

- 10 El objeto de la presente invención son por tanto composiciones farmacéuticas que contiene oleuropeína para el tratamiento en personas de avanzada edad o ancianas y/o diabéticas, de cicatrización de heridas y úlceras

- 15 En una realización particular de la presente invención, las composiciones contienen como único principio activo la oleuropeína con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80%, para el tratamiento en un grupo concreto de pacientes como son, personas de avanzada edad, ancianas y/o diabéticas de cicatrización de heridas y úlceras, seleccionadas del grupo que consiste en: pie diabético, úlcera por presión y úlceras venosas.

Las composiciones de la presente invención contienen por tanto oleuropeína con un grado de pureza determinado como único ingrediente activo en la formulación, así como los correspondientes vehículos farmacéuticamente aceptables y habitualmente utilizados en la industria farmacéutica.

- 20 A los efectos de la presente invención se consideran personas de avanzada edad y/o ancianos, un grupo de pacientes concreto caracterizado por presentar una sintomatología y/o estado funcional físico y edad determinados.

- 25 La sintomatología y/o estado funcional físico característico del grupo de pacientes seleccionado a los efectos de la presente invención, personas de avanzada edad, son por lo general una combinación de distintos factores, entre otros, enfermedad crónica, insuficiencia vascular, insuficiencia venosa crónica, deficiencia en factores de crecimiento, falta de regeneración de los tejidos, diabetes, anemia, hipoproteinemia, obesidad, defectos neurológicos, carencias nutricionales, inmovilidad, etc.

La edad característica del grupo de tratamiento referido en la presente invención es superior a 55 años, preferiblemente aquellas personas que superen los 65 años, más preferiblemente, personas que superan los 70 años.

- 30 Son por tanto objetos de la presente invención:  
Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como único ingrediente

activo para el tratamiento en personas de avanzada edad o ancianas y/o diabéticas, de cicatrización de heridas y úlceras seleccionadas del grupo que consiste en: pie diabético, úlcera por presión y úlcera venosa.

- 35 Es también un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende oleuropeína, caracterizada porque la oleuropeína se encuentra presente a una concentración de  $10^{-1}M$  a  $10^{-11}M$ , preferiblemente a una concentración de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}M$ , más preferiblemente a una concentración de  $10^{-2} M$ .

- 40 Es también objeto de la presente invención una composición farmacéutica, caracterizada porque la oleuropeína presente en la composición tiene un grado de pureza de al menos el 30, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80%.

- 45 Es también objeto de la presente invención una composición farmacéutica caracterizada porque se presenta en forma de gel, crema (emulsión o/w), o solución acuosa y comprende adicionalmente los correspondientes vehículo aceptables en farmacia.

Es también objeto de la presente invención la utilización de las composiciones farmacéuticas de la presente invención en un régimen de aplicación a 12 horas, 24 horas y 48 horas.

### 50 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Úlcera venosa. Fase I: Porcentaje de reducción diaria del área ulcerada a concentración  $10^{-2}M$ , gel, crema y solución acuosa.

Figura 2: Úlcera venosa. Fase II: Evolución porcentual superficie cicatrizada a concentración  $10^{-10}M$ .

Figura 3: Úlcera venosa. Fase III: Evolución porcentual superficie cicatrizada a concentración  $10^{-1}M$ .

Figura 4: Úlcera venosa. Fase IV: Promedio evolución porcentual superficie cicatrizada a concentraciones  $10^{-1}M - 10^{-11}M$ .

5 Figura 5: Úlcera venosa. Fase IV: Porcentaje promedio reducción diaria de úlcera a concentraciones  $10^{-10}M - 10^{-11}M$ .

Figura 6: Úlcera venosa. Fase V: Porcentaje de reducción diaria del área ulcerada a una concentración de  $10^{-2}M$  y regímenes de aplicación a 12h., 24h., y 48h.

10 Figura 7: Úlcera venosa. Fase VI: Porcentaje de reducción diaria del área ulcerada. Oleuropeína con grado de pureza de 41,5% vs. 80%.

Figura 8: Pie diabético: Porcentaje de reducción diaria del área ulcerada a concentraciones  $10^{-2}M$  y  $10^{-9}M$  y regímenes de aplicación a 12h. y 24h.

Figura 9: Úlcera por presión: Superficie cicatrizada al término del estudio a concentraciones  $10^{-2}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $10^{-9}M$  y regímenes de aplicación a 12h., 24h. y 48h.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal y como se ha comentado con anterioridad, la sintomatología y/o estado funcional físico determinante de las enfermedades a tratar en la presente invención en personas de avanzada edad es por lo general una combinación de distintos factores, entre otros, enfermedad crónica, insuficiencia vascular, insuficiencia venosa crónica, deficiencia en factores de crecimiento, falta de regeneración de los tejidos, anemia, diabetes, hipoproteinemia, obesidad, defectos neurológicos, carencias nutricionales, inmovilidad, etc.

A continuación procede, para cada una de las enfermedades concretas a tratar, una explicación de los factores que inciden en su génesis y desarrollo.

25 El pie diabético, según el "Consenso Internacional sobre Pie Diabético" es una infección, ulceración o destrucción de los tejidos profundos relacionados con alteraciones neurológicas y distintos grados de enfermedad vascular periférica en las extremidades inferiores que afecta a pacientes con diabetes mellitus<sup>15,16</sup>. Es importante remarcar que no debe confundirse "pie diabético" con el pie de una persona diabética, ya que no todos los diabéticos desarrollan esta complicación, que depende en gran medida del control que se tenga de la enfermedad, de los factores intrínsecos y ambientales asociados al paciente y en definitiva del estado evolutivo de la patología de base.

30 Cuando se dice que el pie diabético tiene una "base etiopatogénica neuropática" se hace referencia a que la causa primaria que hace que se llegue a padecer un pie diabético está en el daño progresivo que la diabetes produce sobre los nervios, lo que se conoce como neuropatía. Los nervios están encargados de informar sobre los diferentes estímulos (nervios sensitivos) y de controlar a los músculos (nervios efectores)<sup>17</sup>. En los diabéticos, la afectación de los nervios hace que se pierda la sensibilidad, especialmente la sensibilidad dolorosa y térmica, y que los músculos se atrofién, favoreciendo la aparición de deformidades en el pie, ya que los músculos se insertan en los huesos, los movilizan y dan estabilidad a la estructura ósea<sup>18</sup>.

40 El hecho de que una persona pierda la sensibilidad en el pie implica que si se produce una herida, un roce excesivo, una hiperpresión de un punto determinado o una exposición excesiva a fuentes de calor o frío no se sientan.<sup>19</sup> Ya que el dolor es un mecanismo defensivo del organismo que incita a tomar medidas que protejan de factores agresivos, los diabéticos pueden sufrir heridas y no darse cuenta. Además, la pérdida de control muscular favorece la aparición de deformidades y éstas pueden al mismo tiempo favorecer roces, cambios en la distribución de los apoyos del pie durante la marcha y predisponer a determinados puntos del pie a agresiones que, de no ser atajadas a tiempo, pueden resultar fatales.<sup>20,21,22</sup>

45 La isquemia, o sufrimiento tisular derivado de la insuficiencia arterial, es frecuente en los diabéticos, como consecuencia del daño que sufren los vasos sanguíneos de éstos a causa de la enfermedad. Las arterias tienen la función de aportar nutrientes y oxígeno a las células para que éstas funcionen correctamente. El pie es una zona de riego comprometido por su distancia al corazón y si a esto sumamos el daño que sufren los vasos sanguíneos puede imaginarse que la circulación arterial del pie se vea ampliamente disminuida.

5 Respecto a los factores desencadenantes del pie diabético<sup>23</sup>, se ha constatado que a partir de una piel débil y seca, debido a la insuficiencia de riego sanguíneo a la que se le suma una falta de sensibilidad del paciente, un traumatismo, tal como un golpe, un elemento punzante o cortante<sup>24</sup>, una pequeña piedrecita que se introduce en el zapato o, sin ir más lejos, una rozadura producida por un calzado demasiado estrecho<sup>25</sup>, pueden llegar a producir el origen de la enfermedad.

10 Así se forma una herida que, en primera instancia, el diabético ni siquiera advertirá por la pérdida de sensibilidad. Esta herida, al no ser tratada, es una puerta abierta para los microorganismos, causantes de la infección. Como la respuesta inflamatoria está disminuida, los patógenos no encuentran demasiada resistencia, colonizan la zona, el tejido se destruye y difícilmente cicatriza. Se produce por tanto, una ulceración. Las úlceras son heridas caracterizadas por una pérdida de sustancia y especialmente por su escasa tendencia a la cicatrización<sup>26</sup>.

15 Las úlceras requieren todos los cuidados podológicos y médicos que estén al alcance del paciente, ya que además de no resolverse espontáneamente tienden a agravarse, llegando en muchos casos a gangrenarse, lo que obliga a ejecutar amputaciones parciales o incluso totales de las zonas afectadas. Se estima que las complicaciones derivadas de la diabetes son la principal causa de amputación no traumática en el mundo<sup>27</sup>. Las úlceras del pie diabético requieren un diagnóstico y tratamiento multidisciplinario, generalmente llevado a cabo por especialistas en diabetes y cirujanos. El tratamiento conocido en el estado de la técnica consiste en vendajes apropiados, antibióticos (contra estafilococos, estreptococos y cepas anaeróbicas), desbridamiento y revascularización arterial.

20 Los especialistas están estudiando el papel del óxido nítrico en la cicatrización de una herida del pie diabético<sup>28</sup>. El óxido nítrico que ya se emplea en el estado de la técnica es un poderoso vasodilatador que ayuda a llevar los nutrientes a las heridas deficientes en oxígeno. En 2004, se hizo un estudio que concluyó que para personas con pie diabético la terapia con oxígeno hiperbárico (utilización médica del oxígeno a una presión superior a la atmosférica) podría mejorar la cicatrización a un año<sup>29,30</sup>. Sin embargo, a veces el tratamiento generalizado no es apropiado para ciertos pacientes y se debe hacer una evaluación individual antes de dar un tratamiento concreto, incluso dando una combinación de distintos tratamientos si se considerara necesario.

25 Una úlcera por presión (UPP), también conocida como llaga por presión, úlcera por decúbito o escara de decúbito, se define como "una superficie de daño localizado en la piel y el tejido subyacente causada por presión, roce, fricción o una combinación de éstas" (EPUAP 2003, Grupo Europeo sobre UPP (EUROPEAN PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL)).

30 Pueden aparecer en cualquier zona del cuerpo, siendo más frecuentes en las prominencias óseas (sacro, caderas y talones). Las UPP son relativamente frecuentes en el ámbito hospitalario, afectando sobre todo a pacientes ancianos que padecen inmovilidad, una patología aguda grave y/o déficits neurológicos.

El factor más importante en el desarrollo de las UPP es la presión mantenida. A ella se pueden asociar fuerzas de fricción paralelas y/o tangenciales, así como una serie de factores de riesgo que dependen fundamentalmente de las condiciones del paciente de avanzada edad tal y como se comentan a continuación.

35 Las UPP precisan la existencia de trastornos de la microcirculación en zonas de apoyo del cuerpo situadas sobre una superficie dura. Por ese motivo las áreas con prominencias óseas son las zonas más frecuentes de aparición de UPP. La presión mantenida sobre piel y tejidos blandos produce un aumento de la presión intersticial con obstrucción de vasos sanguíneos (formación de microtrombos) y linfáticos, que conduce a autólisis y acumulo de residuos tóxico-metabólicos. La isquemia local prolongada conduce a necrosis y posterior ulceración de tejidos, tanto a nivel de piel como planos profundos. La presión hidrostática de los capilares cutáneos oscila entre 16 y 32 mmHg. Toda presión que supere estas cifras disminuye el flujo sanguíneo y puede producir daño isquémico incluso en menos de dos horas.

45 Las fuerzas de roce (fuerzas de fricción paralelas a la superficie epidérmica) y las fuerzas de cizallamiento (fuerzas tangenciales que incrementan la fricción en las zonas de presión cuando la cabecera de la cama se eleva más de 30°), disminuyen la presión requerida para provocar daño tisular.

Se han descrito una serie de factores de riesgo en la aparición de la UPP dependientes de las condiciones del paciente de avanzada edad. De todos ellos la inmovilidad es el factor más importante.

50 Una revisión de estudios epidemiológicos realizada en el Reino Unido, Canadá y los EE.UU. describe la prevalencia informada de la úlcera por presión en el Reino Unido entre un 4,4% y un 37%, dependiendo del tipo de institución. Se calcula que la prevalencia en España en hospitales de agudos es del 12%, lo que supone un alto coste para el sistema de salud, generando también un aumento de las cargas de trabajo para los profesionales de enfermería.

Tradicionalmente en España la epidemiología relativa a las úlceras por presión ha sido escasa y de carácter generalmente local. Sin embargo, en los últimos años, se está produciendo un fuerte desarrollo en el conocimiento epidemiológico debido sobre todo al apoyo de sociedades científicas, la dimensión que ha ido adquiriendo el problema y a la toma de conciencia de los gestores sanitarios y los profesionales.

- 5 Se calcula que su incidencia en la población general es del 1.7% entre los 55 y 69 años y del 3.3% entre los 70 y 75 años. No existen datos fiables de su incidencia en atención primaria. En alguna serie se estima que el 60% se desarrollan en el hospital. Más del 70% de las UPP ocurren en mayores de 70 años.

Este tipo de úlceras se clasifican en:

- 10 • Úlceras de primer grado: aparece la piel enrojecida, este enrojecimiento no desaparece al retirar la presión que se ejerce sobre la zona.
- Úlcera de segundo grado: la piel se agrieta a nivel de la epidermis y dermis, se da la formación de vesículas.
- 15 • Úlcera de tercer grado: se da una pérdida de continuidad de la piel, con la aparición de necrosis del tejido celular subcutáneo que forma una costra de color negro llamada escara.
- Úlcera de cuarto grado: es una úlcera necrótica extensa que alcanza al músculo, al hueso, e incluso a vasos y nervios.

20 Y por último, las úlceras venosas son heridas que ocurren, generalmente en las piernas y que aparecen mayoritariamente en personas de avanzada edad. Son la mayor causa de heridas crónicas, aproximadamente entre el 70% y 90%<sup>31</sup> de los casos. Normalmente aparecen en la región supra maleolar interna, aunque también pueden aparecer en la zona externa o situarse ligeramente hacia arriba a la altura de media pantorrilla. Su tamaño es variable, y se caracterizan por la falta de dolor, (excepto cuando están infectadas). La piel que rodea la úlcera, normalmente muestra todos los signos de la dermatosis de la insuficiencia venosa. Existen múltiples teorías sobre su origen aunque posiblemente se deba a distintas causas. Actualmente las teorías más aceptadas sobre su origen las relacionan con el desencadenamiento sobre una base pre-ulcerosa de un proceso isquémico. Así con la evolución de la hipertensión venosa se produciría una exudación de proteínas de alto peso molecular hacia el exterior de los vasos, acompañando la extravasación de hematíes o siguiendo a pequeñas hemorragias locales. Estas proteínas o bien se organizarían, como en el caso del fibrinógeno que se convierte en fibrina o bien neutralizarían a otras proteínas, como sucede con la alfa-2-macroglobulina que inhibe a los factores de crecimiento. También la hipertensión venosa provocaría un acúmulo de leucocitos y fenómenos de trombosis local de las vénulas. Estos procesos fisiopatológicos se producen de manera reiterada con el envejecimiento.

25 Todo ello tendría como resultado la existencia de una zona alrededor de los vasos de bajo contenido en factores de crecimiento, cuya carencia provocaría la falta de regeneración de los tejidos una vez se pierde la capacidad protectora de la epidermis. Así, la reepitelización y formación de nueva dermis se vería alterada por el efecto de este estado en personas de avanzada edad cuando se produce una rotura de la piel.

35 Las úlceras venosas son más frecuentes en mujeres, con una relación hombre-mujer de 1-3. La incidencia típica es a partir de los 65 años, con un porcentaje del 5,6% de la población. Por tanto, son habituales en enfermería a nivel ambulatorio o domiciliario. Una vez que se desencadenan tienden a tener una evolución insidiosa, con dificultad para cicatrizar, gran afectación de la piel circundante y frecuentes recidivas. La edad es un factor de riesgo fundamental, las varices aparecen con una frecuencia cuatro veces mayor y la infección es siete veces más frecuente a los 60 años.

La progresión típica de las úlceras venosas es la siguiente:

- En una primera etapa aparece el edema (las venas dilatadas generan insuficiencia valvular con lo que el retorno venoso se entorpece y se produce una hiperpresión capilar con aumento de la permeabilidad del mismo, generándose el edema), corona flebectásica o telangiectásica (reacción eritematosa en el tobillo).
- 45 - En una segunda fase se detectan venas dilatadas y tortuosas, dermatitis ocre o pigmentaria (por la extravasación y depósitos de hemosiderina), atrofia blanca (resultado de una capilaritis crónica que a la larga provoca la desaparición de los capilares sanguíneos apareciendo unas zonas de piel de color blanquecino y atrofia dérmica); dermatosclerosis en manguito (debida al edema crónico y la invasión de fibroblastos, los tejidos se transforman en una banda esclerosada, leñosa que rodea el tercio distal con edema por encima y debajo dando el aspecto de "pierna en botella de champagne", linfodema (extremidad elefantiasica), eczemas de estasis (que provocan prurito), infecciones (exudados, celulitis), hemorragias.
- 50 - Y la última fase correspondería a la aparición de úlceras activas.

En conclusión, las características propias de las úlceras venosas en general son las siguientes:

1. Pulsos presentes.
  - 2.
  3. Tamaño variable, desde pequeñas a muy extensas, a veces rodean toda la pierna.
  - 4.
  5. Pueden ser únicas o múltiples (tienden a unirse).
  - 6.
  7. De forma generalmente redondeada, u ovalada, aunque pueden ser irregulares.
  - 8.
  9. Sus bordes son suaves, algo levantados, de color rojo violáceo y brillante en ocasiones, posteriormente al hacerse crónicas los bordes se vuelven más pálidos y duros.
  - 10.
  11. El fondo de la úlcera depende del estado en que se encuentre y de su antigüedad, generalmente es rojo por la congestión, aunque puede ser amarillento si hay esfacelos o necrosis. Puede haber secreción purulenta como evidencia de una infección secundaria. Cuando se favorece su curación muestra abundante tejido de granulación.
  - 12.
  13. En cuanto al dolor, son moderadamente dolorosas, en la clínica se pueden observar úlceras indoloras, pero también otras muy dolorosas, generalmente éstas pueden estar infectadas y acompañarse de múltiples lesiones perúlcerosas como las ya descritas.
  - 14.
  15. Su asiento habitual es el área paramaleolar media, pero su localización preferente es la región lateral interna de tercio inferior de la pierna, es decir la zona supramaleolar interna.
  - 16.
  17. A veces llegan a rodear toda la pierna, es raro que afecten a pies o a muslos, pero no es infrecuente que aparezcan entre el tobillo y la rodilla.
  - 18.
10. Las circunstancias que rodean a las úlceras venosas hacen que la cicatrización esté retardada, haciéndose heridas tórpidas.
11. Las postflebiticas, de bordes más excavados e irregulares, llegando a veces a dejar al descubierto músculos y tendones, generalmente múltiples, con grandes trastornos cutáneos, tienen peor pronóstico por la afectación irreversible del sistema profundo que es insustituible. En algunos casos la lesión aparece después de unos meses del episodio trombótico, aunque lo más frecuente es la aparición después de unos dos años.
12. Además factores generales como la anemia, la diabetes, la hipoproteinemia, la obesidad, los malos hábitos de vida y por último las infecciones favorecen la mala evolución.
- A diferencia de lo que ocurre en personas de avanzada edad, una cicatrización o curación normal de una herida requiere una circulación, nutrición y estado inmunitario apropiados, y que se eviten las fuerzas mecánicas negativas. Habitualmente, lleva menos de 14 días para que se complete el proceso y tras la hemostasia presenta tres fases que pueden solaparse en el tiempo: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación con contracción de la herida.
- a) Fase inflamatoria: plaquetas agregadas y células parenquimatosas dañadas en el sitio de lesión tisular segregan factores de crecimiento y otros mediadores químicos de la cicatrización de heridas para atraer y activar células inflamatorias y fibroblastos. La vasodilatación y el aumento de permeabilidad de los capilares locales permiten que se trasladen neutrófilos al sitio de la herida para fagocitar bacterias y desechos.
- b) Fase proliferativa: en el plazo de algunas horas desde la formación de la herida, comienza el proceso de reepitelialización. Se desprenden células epidérmicas de la membrana basal y migran a través de la superficie de la herida. Los macrófagos activados fagocitan desechos y liberan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros factores de crecimiento para estimular la formación de tejido de granulación.
- c) Remodelación: los fibroblastos remodelan la matriz de colágeno para potenciar la resistencia del tejido y disminuyen el espesor de la herida. Durante la segunda semana de cicatrización, los fibroblastos adoptan un fenotipo de miofibroblasto para facilitar la contracción de la cicatriz que está formándose.
- Evidentemente este proceso de cicatrización y curación de heridas no se reproduce en personas de avanzada edad. En el grupo de pacientes seleccionados a efectos de la presente invención, una herida no puede cicatrizar apropiadamente en un intervalo de tiempo adecuado. Ello debido al resultado de la alteración de la secuencia temporal y las concentraciones de biomoléculas que son reguladores clave de la cicatrización de heridas, tales como citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, proteasas e inhibidores de proteasas. Pacientes de avanzada edad, presentan por tanto una cicatrización retrasada y escasa respuesta al tratamiento convencional.

## 1. Determinación del principio activo y su concentración en las formulaciones farmacéuticas

5 Como se ha mencionado anteriormente, el único principio activo (p.a.) de las formulaciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención es la oleuropeína con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80%.

10 Dicho principio activo puede obtenerse con el grado de pureza deseado a través de técnicas convencionales de extracción y purificación a partir de hojas de olivo y/o extractos de hojas de olivo, entre otras fuentes.

No obstante, a los efectos de ilustrar la presente invención, el principio activo oleuropeína con un grado de pureza del 41,5% fue obtenido de la firma comercial Interquim, S.A. y el principio activo con un grado de pureza del 80% fue obtenido de la firma comercial Extrasynthese, S.A (distribuido en España a través de Cymit Química, S.L.).

15 La cantidad de principio activo (oleuropeína) a emplear varía en función de dos parámetros: la concentración que se desee (en este caso las concentraciones fabricadas fueron  $10^{-1}$  M,  $10^{-2}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M y  $10^{-11}$  M) y la pureza del principio activo oleuropeína empleado (como hemos mencionado, en este estudio se empleó, a modo de ejemplo, oleuropeína con dos purezas diferentes: 41,5% y 80%).

20 Las concentraciones se basan en el Peso Molecular (PM) de oleuropeína, que es 540,52 g/mol. Por lo tanto, para preparar una solución de  $10^{-2}$ M se pesaron 5,4052 g/l, o lo que es lo mismo, 0,54052g/100ml.

25 El principio activo facilitado por Interquim, S.A. tenía una pureza del 41,5%, por lo que la cantidad de oleuropeína necesaria para preparar las formulaciones farmacéuticas de acuerdo a la presente invención es 13,02 g/l, o lo que es lo mismo, 1,302g/100ml.

30 El principio activo facilitado por Extrasynthese tenía un grado de pureza del 80%, por lo que para la misma concentración de oleuropeína en la fórmula ( $10^{-2}$ M), fueron necesarios 6,7566 g/l, o, lo que es lo mismo, 0,6757 g/100ml.

**Tabla 1. Cantidad de oleuropeína necesaria en función de la concentración deseada y la pureza del principio activo**

Oleuropeína: Peso molecular 540,52 g / mol			
Concentración	Cantidad (en 100ml)	Pureza oleuropeína (%)	Cantidad (en 100ml)
$10^{-1}$	5,4052 g	41,5%	13,025
$10^{-1}$	5,4052 g	80%	6,757
$10^{-2}$	0,5405 g	41,5%	1,3025
$10^{-2}$	0,5405 g	80%	0,6757
$10^{-4}$	0,0054 g	41,5%	0,0013
$10^{-4}$	0,0054 g	80%	0,0007

35 Las demás diluciones empleadas ( $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M) se obtuvieron a partir de éstas mediante diluciones seriadas.

## 2. Preparación formulaciones galénicas gel, crema (emulsión o/w) y solución acuosa

40 A modo de ejemplo reproducimos el método de fabricación empleado para la concentración  $10^{-2}$ M con una pureza de oleuropeína del 41,5%. El resto de concentraciones fueron realizadas siguiendo el mismo patrón, con la única variación de la cantidad de principio activo incorporado, que varió según lo descrito anteriormente (véase Tabla 1), en función de la concentración deseada y de la pureza en oleuropeína de la materia base.

### 45 2.1 Gel

La preparación del gel consta de tres fases:

En primer lugar, se prepara la base del gel; posteriormente, el principio activo; y por último se mezclan ambos.

50

#### 2.1.1. Ingredientes

2.1.1.1. Ingredientes para preparación de 100g de gel carbómero neutro



- Gelificante: Carbopol 940: 1 g
- 
- Conservante antimicrobiano: Phenonip: 0,5% (entre 0,25%-1%)
- 
- Agua purificada para su uso en laboratorio csp: 100 g
- 
- Trietanolamina csp pH 6,5
- 
- Ácido etilendiaminotetraacético ó EDTA: 0,01%
- 

2.1.1.2 Ingredientes para la incorporación (disolución) del principio activo

- Oleuropeína: 1,3025 g (0,5405 g de 41.5% de pureza)
- 
- Propilenglicol: 5 g
- 

**2.1.2 Método de preparación del gel**

2.1.2.1 Preparación de la base gel (gel carbómero neutro).

1. En primer lugar, se disuelven el Phenonip y el EDTA en el agua purificada.
- 2.
3. A continuación, se dispersa el Carbopol 940 previamente desagregado y se deja reposar la mezcla a 2-8°C (en nevera) durante 24 horas.
- 4.
5. Pasadas las 24 horas, el pH de la mezcla es de 3.5, por lo que no presenta aspecto de gel, sino de líquido viscoso. Por tanto, para acabar la gelificación y situar el pH en un rango óptimo de 6-6,5, se añade la trietanolamina en cantidad suficiente (alrededor de 0,6%) para obtenerlo y completar la gelificación.

2.1.2.2. Preparación del principio activo oleuropeína

7. La oleuropeína (0,5405 g) en forma de polvo se dispersa en 5g de propilenglicol utilizando un mortero y un pistilo de cristal. La incorporación del principio activo en el propilenglicol no da ningún problema y el resultado es una pasta homogénea de color marrón intenso (la intensidad varía en función del grado de dilución).

2.1.2.3. Incorporación del principio activo a la base gel

9. A continuación, bajo agitación intensa y a temperatura ambiente, se incorpora la mezcla de propilenglicol y principio activo a la cantidad de gel suficiente para obtener 100g.

De esta manera, se obtuvo un gel con las siguientes proporciones:

Ingredientes	Cantidades (% en peso )
Oleuropeína al 41,5%	1,3025 (0,5405)
Carbopol	1
Phenonip	0,5
Trietanolamina	0,6
EDTA	0,1
Propilenglicol	5
Agua purificada para usar en laboratorio	91,4975 (csp 100ml)

**2.1.3. Justificación ingredientes empleados y alternativas a los mismos**

a) Gelificante:

Existen gran cantidad de gelificantes además del carbopol (carboximetil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o incluso bases ya preparadas (Hispagel®, Liqua-Gel® otras). La primera de ellas, Hispagel, fue incluso empleada en los dos primeros pacientes de la Fase I de las pruebas sobre úlceras venosas, añadiéndose en cualquier caso a la base la misma proporción de p.a. oleuropeina, tal y como se detalla en el apartado 3.4.

Se eligió el carbopol por su buena estabilidad a lo largo del tiempo, por su carácter neutro, porque presenta una perfecta tolerancia cutánea y por su estabilidad frente a la gran mayoría de principios activos. Únicamente podría

verse alterado en presencia de luz ultravioleta, pero en envase cerrado no presenta ningún problema de conservación u oxidación.

5 Carbopol®: Se trata de polímeros sintéticos del ácido acrílico, de alto peso molecular y carácter aniónico. Existen diferentes tipos de Carbopol®, que vienen designados por números, pero los que más se utilizan actualmente en farmacia son dos: el Carbopol® 934 y el Carbopol® 940. En la presente invención se ha empleado el Carbopol® 940.

10 Descripción: polvo fino blanco higroscópico, prácticamente inodoro, formando pequeños grumos.. Solubilidad: en agua es soluble lentamente (gelifica), en etanol muy poco soluble y en cloroformo y éter es insoluble. pH disp. acuosa: 3.0-4.5 al 1%. Pérdida por desecación: ≤ 2.0%. Viscosidad del gel al 0.5%: 40.000-60.000cPs.

b) Conservante:

15 De la gran cantidad de conservantes existentes, se ha seleccionado el Phenonip® (Mezcla de parabenos en 2-fenoxietanol) por su amplio espectro frente a microorganismos y baja toxicidad. Existen otros conservantes muy potentes que también podrían emplearse en la fórmula (e.g. kathon 0,1%), pero al ser el gel pensado para uso cutáneo en herida abierta, se prefirió Phenonip.

20 Otros conservantes adecuados a efectos de la presente invención son mezclas de parabenos (Methylparaben y Propilparaben), Quaternium-15 u otros similares.

c) Disolvente:

25 Se utilizó propilenglicol porque mejora el resultado del gel de Carbopol®, al potenciar su extensibilidad. A su vez, proporciona una mejor (más homogénea) incorporación del principio activo en el gel. El rango de incorporación es del 1%-10%.

30 Otro disolvente adecuado a los efectos de la presente invención es glicerina.

d) Agente alcalinizante (regulador de pH):

Se ha empleado la trietanolamina para situar el gel en el rango de pH adecuado.

35 Otros agentes alcalinizantes posibles a los efectos de la presente invención son, por ejemplo una solución de NaOH al 10% o KOH al 10%.

e) Antioxidante:

40 Al ser el producto pensado para aplicación sobre úlceras abiertas, no se ha añadido ningún antioxidante.

45 Opcionalmente podría utilizarse un antioxidante sin que la acción del producto se viera afectada, tal y como se hizo, según se describe en el apartado 3.4, en los dos primeros pacientes a quienes se aplicó oleuropeina en el estudio (pacientes 5 y 6). A modo de ejemplo cabe citar los siguientes: bisulfito sódico (E-223) (0,05%-0,1%), empleado en las mencionadas formulaciones alternativas; ácido ascórbico (Vitamina C sódica E-301) (0,5%); Vitamina E (0,5%); mezcla de Vitaminas C y E (proporción 1:5) (0,5%), Butilhidroxitolueno [E-321] (0.1%), etc.

De incluirse un antioxidante, se incorporaría al agua antes de añadir el carbopol®.

## 50 **2.2 Crema (emulsión o/w)**

La preparación del gel consta de tres fases:

55 En primer lugar, se debe preparar la base; posteriormente, el principio activo; y por último incorporar el p.a. a la base.

### **2.2.1. Ingredientes**

2.2.1.1. Ingredientes para preparación de 100g de base de emulsión acuosa

- 60
- Neo PCL (Un rango adecuado para la crema sería 18% a 25% de Neo pcl, en función de la consistencia deseada)
  - 
  - Agua purificada para su uso en laboratorio csp 100 g (en función de la cantidad de NeoPcl –o de
  - 65 antioxidante si se incorporase-, entre 82% y 75%)
  -

- Conservante: Mezcla de Nipagin al 0,2% y Nipazol al 0,2% (proporción 1:1)
- 
- Antioxidante: Bisulfito sódico 0,05%
- 
- 5 • Secuestrante de trazas metálicas: EDTA (0,1%)
- 

2.2.1.2 Ingredientes para la incorporación (disolución) del principio activo

- Oleuropeína al 41,5%: 1,3025 g (0,5405 g de oleuropeína)
- 
- Propilenglicol: 5 g
- 

2.2.2 Método de preparación de la emulsión o/w

2.2.2.1 Preparación de la base (emulsión acuosa)

1. En primer lugar, se pesa el Neo Pcl al 25% (un rango óptimo estaría entre el 18% y el 25%, en función de la consistencia deseada).
- 2.
- 20 3. Se incorpora el conservante (la mezcla de Nipagin al 0,2% y Nipazol al 0,2% en proporción 1:1) al agua purificada para uso en laboratorio, cuya proporción será csp 100 g (en nuestro caso 75%).
- 4.
5. Se homogeneizan el agua purificada con conservante y el NeoPcl con empleando un pistilo o mediante agitación mecánica.
- 25 6.

De haberse empleado alguna de las bases autoemulsionadas que se comercializan, -véase en siguientes apartados "Ingredientes empleados y alternativas a los mismos"-, los tres pasos anteriores no hubieran sido necesarios. La incorporación del conservante en ese caso se hubiera realizado en el punto 4, homogeneizándolo junto con la oleuropeína y el bisulfito sódico en los 5 g de propilenglicol.

2.2.2.2. Preparación del principio activo oleuropeína

7. El p.a. oleuropeína con una pureza de 41.5% (sólido en forma de polvo) se dispersa junto al bisulfito sódico (0,05%), en 5g de propilenglicol utilizando para ello un mortero y un pistilo de cristal. La incorporación del principio activo en el propilenglicol no provoca ningún problema y el resultado es una pasta homogénea de color marrón intenso (la intensidad variará en función del grado de dilución).
- 8.

2.2.2.3. Incorporación del principio activo a la base

9. A continuación, bajo agitación intensa y a temperatura ambiente, se incorpora la mezcla de propilenglicol y principio activo a la cantidad de base suficiente para obtener 100g.
- 10.

De esta manera, se obtuvo una emulsión acuosa con las siguientes proporciones:

Ingredientes	Cantidad (% en peso total)
Oleuropeína al 41,5%	1,3025 (0,5405)
NeoPcl	22,1475
Conservante (Nipagin y Nipazol)	0,4
Agua purificada	71 (csp 100ml)
Propilenglicol	5
Bisulfito sódico	0,05
EDTA	0,1

2.2.3. Ingredientes utilizados y alternativas a los mismos

- a) Bases:
- b)

Para las muestras en base de emulsión acuosa se utilizó una emulsión elaborada con Neo Pcl o/w.

Neo pcl® o/w: Incorpora Cetearth-10, cera de abeja, heptanoato de estearilo, octanoato de cetilo, Spermaceti, Myristoyl, Dimethicone, aceite mineral y aceite de Lanolina al 25%.

El Neo pcl se utilizó por sus buenas propiedades y porque es excelente para incorporar principios activos, además de no provocar reacciones alérgicas. No obstante, se podrían haber utilizado otras bases autoemulsionables como son además del NeoPcl, a modo de ejemplo, las siguientes: Base F 2230 o/W; Xalifin-15; o un emulgente polimérico.

5 Adicionalmente, se podrían haber utilizado emulsiones estandarizadas, como por ejemplo, y no con carácter excluyente: Base beeler, crema lanette ó crema cetomacrogol

c) Conservantes: Se podrían haber escogido, además del seleccionado y sin carácter excluyente, los expuestos para el gel (incluido el Phenonip al 0,5%).

10 d)

e) Disolvente: Además del propilenglicol, podrían haberse utilizado, y sin carácter excluyente, los expuestos para el gel.

f)

15 g) Antioxidantes: No se han incluido al tratarse de crema para aplicación en úlcera abierta. Opcionalmente, podrían incluirse, sin carácter excluyente, los mismos definidos para el gel.

h)

### 2.3. Solución acuosa

#### 2.3.1. Ingredientes para solución acuosa

- 1,301g de principio activo con un grado de pureza de 41,5% (oleuropeína)
- 
- Conservante: Phenonip 0,5% (o cualquiera de los empleados en el gel).
- 
- 25 • Agua purificada csp 100g
- 
- Propilenglicol 5% (se podrían usar hasta 10g según se quiera espesar). No es imprescindible.
- 

#### 2.3.2. Método de preparación de solución acuosa de uso tópico

- 30 1. Primero se mezcla el conservante (Phenonip) con el agua purificada para uso en laboratorio (si se quiere incorporar un antioxidante como el metabisulfito, se incorporaría aquí).
- 2.
- 35 3. El principio activo se mezcla con propilenglicol 5% con un pistilo, y después se añade al agua y se agita todo con varilla o agitador mecánico.
- 4.
5. Posteriormente, se incorpora el principio activo a la anterior mezcla de conservante y agua purificada mediante agitación intensa con varilla o agitador mecánico.
- 6.
- 40 7. Opcionalmente se puede añadir EDTA.
- 8.

De esta manera, se obtuvo una solución acuosa con las siguientes proporciones:

Ingredientes	Cantidad (% en peso total)
Oleuropeína al 41,5%	1,3025 (0,5405)
Conservante (Phenonip)	0,5
Agua purificada	93,1975 (csp 100ml)
Propilenglicol	5
EDTA	0,1

45 Opcionalmente, se podría incorporar un antioxidante. A modo de ejemplo, el Metabisulfito sódico 0.05 g, aunque cualquier antioxidante hidrosoluble como los mencionados para el gel sería válido.

50 Siguiendo el mismo patrón de procedimiento e ingredientes se formularon composiciones a diferentes concentraciones de principio activo y grado de pureza de oleuropeína (80%), de acuerdo con la Tabla 1. Dichas formulaciones fueron testadas en las pruebas clínicas que a continuación se detallan a los efectos de demostrar la efectividad de las composiciones de la presente invención en el tratamiento de las enfermedades concretas en el grupo de pacientes seleccionado.

#### EJEMPLOS: PRUEBAS CLÍNICAS REALIZADAS EN EL GRUPO DE PACIENTES SELECCIONADO

55 Los pacientes fueron seleccionados después de una visita de control, realizada con el fin de garantizar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión que se detallan a continuación:

**1. Criterios de inclusión**

Los pacientes participantes cumplían todos y cada uno de los siguientes criterios de inclusión:

- 5 1. Ser mayores de 60 años.
- 2.
- 3. Presencia de úlcera inframaleolar, supramaleolar o de pierna (venosa), o de presión; de carácter crónico (al menos 10 semanas de evolución), que no haya presentado mejoría significativa (reducción del tamaño > 25%) en los 15 días previos a la inclusión en las pruebas.
- 10 4.
- 5. Superficie granulada en la herida inferior al 70%<sup>32</sup>.
- 6.
- 7. Índice T/B >0,7
- 8.
- 15 9. En los pacientes diagnosticados de Diabetes Mellitus (DM), tipos 1 o 2 según los criterios de diabetes de la American Diabetes Association (ADA).
- 10.
- 11. Sin diagnóstico establecido de infección en la zona ulcerada basado en signos clínicos, tanto de la úlcera – linfangitis periulcerosa, modificación de las características del exudado, edema–, como en el ámbito sistémico – fiebre–.
- 20 12.
- 13. Pacientes con úlcera venosa: Grado FEDPALLA igual a II-III.
- 14.
- 15. Pacientes con pie diabético: Grado I o II en la Escala de Wagner.
- 25 16.
- 17. Pacientes con UPP: Estadios 2-3 según la Clasificación de UPP.
- 18.

**2. Criterios de exclusión**

30 Los pacientes no cumplían ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

- 1. Signos o síntomas clínicos de infección local. En aquellos pacientes que presentaron infección, se aplicaron los tratamientos antisépticos estándar. El empleo de apósitos de plata o de cadexómero yodado disminuye la carga bacteriana y permite controlar la infección sin importantes reacciones de hipersensibilidad local y/o sistémica ni lesión de los tejidos sanos. Ambos serán considerados como de primera intención en el tratamiento<sup>33</sup>.
- 35 El empleo de Sulfadiazinaargéntica, mupirocina, ácido fusídico y metronidazol son los únicos antibióticos recomendados de uso tópico en la úlcera y deben considerarse como de segunda intención y siempre con posterioridad a la utilización de los antisépticos reseñados anteriormente<sup>33</sup>.
- 40 Una vez eliminada la infección, los pacientes que cumplían el resto de criterios de inclusión en el estudio, fueron incorporados al mismo.
- 2. Presencia de exposición ósea en el fondo de la úlcera y/o palpación de hueso mediante sonda, y/o presencia de fracturas patológicas y/o secuestros óseos.
- 45 3. Pacientes con valores de HbA1C > 9%. O Índice T/B < 0,7 (En su caso)
- 4. Presencia de co-morbilidades que representen un incremento del riesgo a juicio de investigador.
- 50 5. Pacientes con enfermedad grave de cualquier etiología.
- 6. Pacientes con insuficiencia hepática (con valores de AST y/o ALT > 5 veces el valor normal establecido en los rangos de referencia del laboratorio local del hospital).
- 55 7. Pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina <30 ml/min).
- 8. Pacientes con enfermedades del tejido conectivo.
- 60 9. Pacientes bebedores y fumadores (para evitar factores confundentes).
- 10. Ciertos medicamentos también pueden ser confundentes, incluyendo algunos antibióticos (claritromicina, doxiciclina, tetraciclina), antiinflamatorios no esteroideos (aspirina, ibuprofeno), inhibidores de la COX-2 (celecoxib), diuréticos (bumetanida, furosemida), antihipertensivos (captopril, enalapril, metoprolol), corticoesteroides sistémicos, inmunosupresores, anti-artríticos (etanercept, infliximab), anti-diabéticos (agonistas pparγ : pioglitazona, rosiglitazona)
- 65

, pentoxifilina, becaplermina (Regranex) Los pacientes bajo estos tratamientos fueron excluidos, pudiendo ser incluidos tras una fase de retirada del medicamento de al menos 30 días antes de su entrada en el estudio.

5 11. . Mujeres embarazadas o en edad fértil, que no utilicen un método anticonceptivo eficaz, o mujeres en periodo de lactancia.

12.. Hipersensibilidad conocida a cualquiera de los componentes incluidos en los tratamientos empleados en el estudio.

10 13. Dada la gran influencia de la nutrición en el proceso de curación de las úlceras<sup>34</sup>, se excluyeron aquellos que no pudieron mantener un adecuado balance nutricional.

### **3. Descripción del tratamiento.**

15 Los pacientes fueron tratados de acuerdo al tipo de úlcera según se tratase de úlceras venosas, úlceras de pie diabético o úlceras de presión.

#### **3.1. Curas**

20 El diseño del estudio fue pragmático, las curas durante el periodo de estudio fueron iguales a las que venían recibiendo los pacientes antes de iniciarse la prueba clínica, tanto para los pacientes denominados control como para los pacientes tratados con oleuropeína.

25 La diferencia entre ambos grupos fue la aplicación de los productos que contenían oleuropeína en los pacientes bajo tratamiento en prueba, una vez realizada la cura de la herida y antes de proceder al vendado de la zona, en el caso de las úlceras venosas.

#### **Frecuencia de las curas:**

30 Las curas se realizaron cada 12, 24 ,48 horas según el diseño del estudio en cada caso. Preferentemente se empleó la cura cada 24 horas. Las curas fueron efectuadas bien por la enfermera o bien por los propios familiares del paciente siguiendo las instrucciones pertinentes de una enfermera.

#### **Desbridamiento:**

35 Siempre que se estimó necesario, antes de proceder a la cura de la herida, se efectuó un desbridamiento de la zona.

#### **Limpieza de las heridas:**

40 La limpieza de las heridas, fue exactamente igual a la que los pacientes venían siguiendo bajo tratamiento médico antes del inicio de la prueba clínica:

45 Limpieza de los bordes de la herida empleando una gasa empapada en agua tibia y jabón o suero fisiológico. Posteriormente, se aclaraba la zona con abundante suero fisiológico. La limpieza de la herida se realizaba empleando para ello gasas empapadas en suero fisiológico. Se efectuaron lavados de arrastre en aquellos casos en los que existía presencia de fibrina, y se realizaba el aclarado de la zona con abundante suero fisiológico. Finalmente, los bordes se secaban cuidadosamente con gasas estériles.

#### **3.2. Tratamientos específicos**

50 Todos los pacientes venían siendo tratados con espumas de poliuretano, apósitos de alginato cálcico o hidrogeles. Antes de comenzar el tratamiento y al menos durante 15-20 días se unificaron los procedimientos, practicándose la oclusión de úlcera en todos ellos con apósitos con silicona. Adicionalmente, en aquellos pacientes con úlcera de etiología venosa, siempre se practicó tratamiento compresivo.

55 Se establecieron tres grupos terapéuticos básicos:

a) Control: Se continuó con el tratamiento descrito anteriormente (curas y oclusión de la úlcera con apósitos de silicona).

60 b) Control más ácido hialurónico: En pacientes con úlcera venosa. Se continuó con el tratamiento descrito anteriormente (grupo control), añadiendo ácido hialurónico (sal sódica) al 0,2% [Jaloplast®], aplicando diariamente una fina capa antes de colocar el apósito de silicona.

c) Control más becaplermin (factor de Crecimiento Plaquetario BB humano recombinante): En pacientes con úlcera neuropática o por presión. Se continuó con el tratamiento descrito anteriormente (grupo control), añadiendo becaplermin al 0,01% [Regranex Gel®], aplicando diariamente una fina capa antes de colocar el apósito de silicona.

5 e) Tratamiento con oleuropeína: Se continuó con el tratamiento descrito anteriormente (grupo control), añadiendo oleuropeína a diversas dosificaciones y pautas horarias oportunamente especificadas más adelante, aplicando en una fina capa antes de colocar el apósito de silicona.

No se introdujo ninguna modificación sobre las pautas de tratamiento descritas.

10

### 3.3. Duración del estudio. Cronograma de valoraciones

Periodo de seguimiento: 6 semanas o hasta la total cicatrización de la úlcera.

15 Número de mediciones: Se llevaron a cabo seis mediciones, distribuidas de la siguiente manera:

- Medición 0: Día -15 (reclutamiento), prueba de confirmación de cumplimiento de condiciones de inclusión
- Medición 1: Inicio del ensayo (día 0)
- Medición 2: Día 14 (+/- 2 días)
- Medición 3: Día 28 (+/- 2 días)
- Medición 4: Día 35 (+/- 2 días)
- Medición 5: Día 42 (+/- 2 días)

20

25

### 3.4. Fármaco experimental empleado

Formulación farmacéutica según lo descrito con anterioridad que comprende como único principio activo oleuropeína con un porcentaje de pureza de p.a. del 41,5% u 80%; aplicado a través de los vehículos gel, crema/emulsión o/w o solución acuosa, preparados para su empleo en concentraciones y regímenes de aplicación según se indica en la presente invención.

35

Variantes de las formulaciones testadas clínicamente:

Como se ha mencionado anteriormente, a los primeros pacientes incluidos en la Fase I del estudio sobre úlceras venosas (pacientes 5 y 6) se les aplicó el p.a. sobre el vehículo gel, empleando para ello, en lugar de la preparación mostrada en el apartado 2.1, una base de gel ya preparada comercialmente (Hispagel), rebajada con agua al 50% para conseguir una mayor facilidad en la aplicación. Para el resto de pacientes a los que se aplicó gel en el tratamiento, se emplearon los ingredientes y el patrón de fabricación descrito en el apartado 2.1.

40

De esta manera, se obtuvo un gel con las siguientes proporciones:

Ingredientes	Cantidades (% en peso)
Oleuropeína al 41,5%	1,3025 (0,5405)
Phenonip	0,5
Bisulfito sódico	0,05
Propilenglicol	5
Hispagel (rebajado 50%)	46,57
Agua purificada para usar en laboratorio	46,57 (csp 100ml)

45

## 4. Métodos de evaluación de la respuesta del producto

### 4.1 Método para la medición del área de las úlceras y del resto de parámetros:

50

Para cada una de las mediciones por paciente, se dibujó sobre papel transparente esterilizado el perfil de la úlcera. Para ello, se utilizaron rotuladores STAEDTLER permanente DRY SAFE "F".

55

Las superficies de las úlceras se calcularon mediante planimetría estandarizada, importando los contornos obtenidos al programa AUTOCAD 2011, con el que se calculó la superficie y longitud del perímetro externo de cada úlcera en cada uno de los hitos de medición. El resto de parámetros evaluados (hidratación, dermatitis, vascularización,

bordes, depósitos en la úlcera) eran apreciables directamente a la vista y su evolución se anotaba en cada hito de medición.

**4.2. Variables principales de evaluación de la eficacia del tratamiento**

**4.2.1. Tasa de curación de las heridas**

La tasa de curación de las heridas se valoró mediante las siguientes ecuaciones<sup>35,36</sup> :

**Baremo 1.**

Variación porcentual de la superficie de la úlcera

$Av = (A0-A1)/A0$ , donde Av es la variación en el área de la úlcera, A1 el área en el control de referencia, A0 el área en el control anterior (inicio del estudio).

Expresa la reducción porcentual del área ulcerada.

**Baremo 2.**

Variación porcentual del perímetro de la úlcera:

$Pv = (P0-P1)/P0$ , donde Pv es la variación el perímetro de la úlcera, P1 el perímetro en el control de referencia, P0 el perímetro en el control anterior (inicio del estudio).

Expresa la reducción porcentual del perímetro de la úlcera.

**Baremo 3.**

Ecuación en función del Área (reducción diaria del área ulcerada)

$Av = (A0-A1)/t$ , donde Av es la variación en el área de la úlcera, A1 el área en el control de referencia, A0 el área en el control anterior (inicio del estudio) y t la variable de tiempo entre A0 y A1 expresada en días.

Expresa la reducción diaria del área ulcerada.

No se realizaron cálculos de la evolución del volumen de las úlceras porque, pese a que los mismos permiten valorar la progresión del tejido de granulación en la úlcera, la variabilidad en la interpretación de los resultados es elevada y no se recomienda realizar el estudio del volumen de la úlcera de forma sistemática<sup>36,37</sup>.

**4.2.2. Escalas de valoración de diagnóstico de úlceras generalmente aceptadas (FEDPALLA, Wagner y Estadios de las UPP).**

**4.2.2.1 Baremo 4.1. Valoración de la piel perilesional: escala de valoración FEDPALLA**

Para valorar la piel perilesional se emplea la escala de valoración FEDPALLA<sup>38</sup>. La escala contempla 5 variables y dentro de cada variable existen 5 parámetros (Tabla 2) con una puntuación del 5 al 1. La suma de cada parámetro da una puntuación que refiere el Grado de pronóstico para la epitelización (Tabla 2).

**Tabla 2**

Hidratación	Dermatitis	Vascularización	Bordes	Depósitos	Punt.
piel normal	piel normal	eritema rojo	Lisos	Escamas	1
macerada 1cm	eczema seco	eritema violáceo	inflamados y mamelones	Costras	2
macerada >1cm	eczema exudativo	negro-azulado- marrón	romos o excavados	hiperqueratosis	3
Seca	eczema vesiculoso	eritema>2cm y calor (celulitis)	esclerosados	pústulassero- purulentas	4
Seca + esclerosis	eczema con erosión o liquenificado	Negro (trombosado)	necrosado	edema, linfedema	5



Los grados van de menor a mayor en relación a la puntuación obtenida con la suma de los parámetros a tener en cuenta de la piel perilesional y que son inversamente proporcionales a éstos. Es decir, a mayor puntuación, menor grado y mejor pronóstico para la epitelización (Tabla 3)

5

**Tabla 3**

Puntos	Grados	Pronostico de epitelización
21-25	IV	Muy malo
16-20	III	Malo
11-15	II	Bueno
5-10	I	Muy bueno

**4.2.2.2 Baremo 4.2. Evaluación clínica del pie diabético**

10

En la evaluación clínica del pie diabético se emplea mayoritariamente la clasificación de Wagner-Merrit<sup>39</sup>, (Tabla 4), que permite categorizar las lesiones en función de la profundidad de la úlcera y ha mostrado una elevada correlación con la tendencia a cicatrización.

**Tabla 4**

Grado	Lesión	Características
0	Ninguna, pie riesgo	Callos gruesos, cabezas metatarsianas prominentes,dedos en garra, deformidades óseas.
1	Úlceras superficiales	Destrucción total del espesor de la piel
2	Úlceras profundas	Penetra en la piel, grasa, ligamentos pero sin afectarhueso, infectada
3	Úlceras profundas más absceso	Extensa, profunda, secreción y mal olor
4	Gangrena limitada	Necrosis de parte del pie
5	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos

15

**4.2.2.3. Baremo 4.3 Clasificación de las úlceras por presión (UPP)**

20

Se utilizó esta clasificación porque es la más aceptada a nivel nacional e internacional, tanto por el Grupo Nacional para el Estudio y Asesoramiento sobre las Úlceras por Presión (GNEAUPP), como por el European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP)<sup>40</sup> Es la definida por la Agencia Norteamericana de Calidad Investigación en Cuidados de Salud (AHQR) en 1989 y que se basa en la clasificación de grados (I-IV) realizada por Shea en 1975 y modificada a estadios (0-IV) por Torrance en 1983, eliminando el estadio de preúlceras:

25

**ESTADIO I**

Alteración observable en la piel integra, relacionada con la presión, que se manifiesta por un eritema cutáneo que no palidece al presionar, en pieles oscuras, puede presentar tonos rojos, azules o morados. En comparación con un área adyacente u opuesta del cuerpo no sometida a presión, puede incluir cambios en uno o más de los siguientes aspectos: Temperatura de la piel (caliente o fría), consistencia del tejido (edema, induración) y/o sensaciones (dolor, escozor).

30

**ESTADIO II**

Pérdida parcial del grosor de la piel, que afecta a la epidermis, dermis o ambas. Úlcera superficial que tiene aspecto de abrasión, ampolla o cráter superficial.

35

**ESTADIO III**

Pérdida total del grosor de la piel que implica lesión o necrosis del tejido subcutáneo, que puede extenderse hacia abajo pero no por la fascia subyacente.

40

**ESTADIO IV**

Pérdida total del grosor de la piel con destrucción extensa, necrosis del tejido o lesión en músculo, hueso o estructuras de sostén. Puede presentar cavernas, tunelizaciones o trayectos sinuosos.

45

**4.3. Variables secundarias**

**4.3.1. Baremo 5. Facilidad en la aplicación**

5 Los enfermeros encargados del tratamiento debían comparar la facilidad en la aplicación de cada uno de los productos (formulaciones galénicas gel, crema o solución) con respecto a otros productos similares. Para ellos, debían puntuar el producto en una escala del 1 al 10, tal y como se detalla a continuación:

- Muy cómodo con respecto a otros productos similares (9 ó 10 sobre 10)
- 
- 10 • Cómodo con respecto a otros productos similares (7 u 8 sobre 10)
- 
- Indiferente con respecto a otros productos similares (5 ó 6 sobre 10)
- 
- Incómodo con respecto a otros productos similares (3 ó 4 sobre 10).
- 15 •
- Muy incómodo con respecto a otros productos similares (1 ó 2 sobre 10).
- 

**4.3.2. Baremo 6. Seguridad**

20 Se planificó el registro de potenciales reacciones adversas o de toxicidad durante el estudio. No se recogieron datos apreciables en este sentido.

**5. Valoración de la eficacia, seguridad y aplicabilidad del producto (objetivos)**

25 **Variables de éxito (eficacia del producto)**

**Objetivos**

- 30 **a) En función del baremo 1. “Variación acumulada de la superficie de la úlcera en términos relativos”.**
- b)**
  - 1. Objetivo 1: Curación total de la herida (100% reducción del diámetro) o superior al 70% dentro del periodo de estudio (semana 6).
  - 2.
  - 3. Objetivo 2: Cicatrización de la superficie superior en 30 puntos porcentuales a controles (20 puntos si el paciente tiene un grado más en las escalas FEDPALLA, Wagner o de UPP).
  - 35 4.
- c) En función del baremo 2. “Variación acumulada del perímetro de la úlcera en términos relativos”.**
- d)**
  - 5. Objetivo 3: Cicatrización total del perímetro de la úlcera (100% de reducción) o superior al 70% dentro del periodo de estudio (semana 6).
  - 40 6.
  - 7. Objetivo 4: Reducción del perímetro superior en 30 puntos porcentuales a controles (20 puntos si el paciente tiene un grado más en las escalas FEDPALLA, Wagner o de UPP).
  - 8.
- 45 **e) En función del baremo 3. “Ecuación en función del área (expresada como porcentaje de reducción diaria del área ulcerada”.**
- f)**
  - 9. Objetivo 5: Porcentaje de reducción diaria del área de la úlcera en los pacientes tratados con oleuropeína superior en un 30% al porcentaje de reducción diario de los pacientes control.
  - 50 10.
- g) En función del baremo 4 (4.1, 4.2, 4.3). “Reducción de un grado o estadio en la escala de valoración de diagnóstico de úlceras generalmente aceptada que proceda (FEDPALLA –úlcera venosa-, Wagner –úlcera neuropática- y Estadios de las UPP –UPP-)”**
- h)**
  - 11. Objetivo 6: Lograr la reducción de las úlceras de grado III a grado I ó curación total. Lograr la reducción de las úlceras de grado II a curación total.
  - 55 12.
- i) En función del baremo 5. “Facilidad en la aplicación”**
- j)**
  - 13. Objetivo 7: Lograr una puntuación media igual o superior a 7 puntos (aplicación cómoda o muy cómoda).
  - 60 14.
- k) En función del baremo 6. “Seguridad”**
- l)**
  - 15. Objetivo 8: Ausencia de reacciones adversas o toxicidad.
  - 65 16.

## **6. DESARROLLO Y PRUEBAS CLÍNICAS**

Las pruebas clínicas en humanos, realizadas sobre un total de 48 pacientes, se realizaron siguiendo el siguiente orden:

- 5
1. Úlceras venosas
  - 2.
  3. Pie diabético
  - 4.
  - 10 5. Úlceras por presión (UPP)
  - 6.

A continuación se detallan las pruebas realizadas para cada aplicación terapéutica:

### **6.1 Úlceras venosas**

#### **6.2**

Los estudios clínicos realizados en pacientes con úlcera venosa se realizaron de manera exhaustiva, sobre 36 pacientes, dividiéndose en seis fases diferenciadas con métodos y objetivos diferenciados:

20 **Fase I. Evaluación del nivel de eficacia, aplicabilidad y seguridad de la oleuropeína fabricada a una concentración de  $10^{-2}$  bajo las formas galénicas gel, crema (emulsión o/w), solución acuosa.**

Objetivos específicos:

25 Comprobar la eficacia de las distintas formas galénicas frente a control, así como determinar si alguna de ellas se mostraba inferior al resto.

Ejecución:

30 Se fabricaron varios lotes sobre los vehículos gel, crema y solución con una concentración idéntica de principio activo ( $10^{-2}$ M). Se escogió comenzar las pruebas clínicas con esta concentración por ser la mayor concentración probada previamente en ratas. Es decir, se adoptó un criterio de prudencia.

35 Se seleccionaron diez pacientes para esta primera fase del estudio clínico. Todos ellos cumplían los criterios de inclusión detallados anteriormente en el estudio:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1. anterior.
- 
- Pacientes 3 y 4(\*): Control+Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2. anterior.
- 40 •
- Pacientes 5 y 6: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-2}$  M
- 
- Pacientes 7 y 8: Aplicación cada 24h de crema en concentración  $10^{-2}$  M
- 
- 45 • Pacientes 9 y 10: Aplicación cada 24h de solución en concentración  $10^{-2}$  M
- 

Como se puede observar, a todos los pacientes se les aplicó el producto cada 24 horas, a efectos de poder establecer una comparación.

50 (\*) Estos dos pacientes se incluyeron a efectos de demostrar que las composiciones reivindicadas con oleuropeína son superiores en términos de eficacia al estado de la técnica actual.

Conclusiones:

55 1. El empleo de oleuropeína por vía tópica en cualquiera de las tres formas galénicas empleadas mostró un elevado grado de eficacia (ofrecía unos resultados muy superiores a los de los dos grupos control –que representan el estado actual de la técnica- y resolvía úlceras crónicas sin mejoría significativa en las dos semanas precedentes).

60 2. Todos los objetivos principales (referentes a la reducción del área, del perímetro, al ritmo de cicatrización diario y la reducción en uno o más grados de la escala FEDPALLA) fueron cumplidos por los seis pacientes a los que se les administró oleuropeína, independientemente de la fórmula galénica empleada. Es destacable que el ritmo de cicatrización diario promedio de los pacientes a quienes se administró el producto objeto de la presente invención

fue un 98,71% superior (casi el doble) al ritmo de cicatrización promedio de los cuatro pacientes control –que incluía a los dos pacientes tratados con ácido hialurónico-. Véase Figura 1.

3. No obstante lo anterior, los resultados obtenidos por el producto en forma de gel mostraron una ligeramente mayor velocidad de curación, así como una mayor facilidad de aplicación según los enfermeros que las aplicaron, quienes valoraron como “muy cómodo” (9,5 sobre 10) el uso del gel, y como “cómodo” el uso de la crema y la solución acuosa (7,5 y 7 sobre 10, respectivamente). Ninguna de las tres formas galénicas empleadas causó molestias o problemas de toxicidad en los pacientes.

**Fase II. Evaluación del nivel de eficacia de la oleuropeína fabricada bajo las formas galénicas gel, crema (emulsión o/w), solución acuosa, con la mínima concentración de oleuropeína con eficacia testada anteriormente con éxito:**

**10<sup>-10</sup> M.**

Objetivos específicos:

El objetivo de esta segunda prueba fue dejar constancia de la eficacia y superioridad sobre el estado de la técnica del tratamiento con todas las formas galénicas probadas con éxito anteriormente (gel, crema y solución), aplicando en las pruebas clínicas la mínima concentración de principio activo ya empleada anteriormente con éxito en células (10<sup>-10</sup> M). Adicionalmente, se buscaba comparar la eficacia de esta concentración, muy diluida, con respecto a la concentración 10<sup>-2</sup> M, así como comparar la eficacia de las distintas formulaciones galénicas entre sí.

Ejecución:

A tal fin, se fabricaron productos en condiciones idénticas a las expuestas en la Fase I, con la mencionada variación en sus concentraciones de oleuropeína

(10<sup>-10</sup> M) (véase apartado 3.4), ya que se emplearon los niveles más bajos de concentración del principio activo probados en etapas anteriores de la investigación.

Se seleccionaron tres nuevos pacientes para el estudio (pacientes 5, 6 y 7), puesto que, a modo de control, se emplearon los mismos cuatro pacientes descritos en la Fase I. Todos ellos cumplían las condiciones de inclusión detalladas anteriormente:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1.
- 
- Pacientes 3 y 4: Control + Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2.
- 
- Paciente 5: Aplicación cada 24h de gel en concentración 10<sup>-10</sup> M
- 
- Paciente 6: Aplicación cada 24h de crema en concentración 10<sup>-10</sup> M
- 
- Paciente 7: Aplicación cada 24h de solución en concentración 10<sup>-10</sup> M
- 

Como se puede observar, a todos los pacientes se les aplicó el producto cada 24 horas, a efectos de poder establecer una comparación.

Conclusiones:

Las diferentes formulaciones con una concentración de oleuropeína de 10<sup>-10</sup> M mostraron un nivel de eficacia muy similar entre ellas, especialmente a partir de la semana 5 de tratamiento (véase Figura 2), repitiéndose el patrón ya observado en la Fase I de que los niveles de cicatrización del gel son ligeramente superiores (1,72% de cicatrización diaria frente a 1,68% y 1,65% de la crema y la solución), probablemente por la mayor facilidad que este medio ofrece para la absorción del principio activo.

Las tres formulaciones (gel, crema, solución) presentaron resultados inferiores a los mostrados para las formulaciones más concentradas:

- 2,58% de reducción media diaria en la Fase I (concentración 10<sup>-2</sup> M) frente al promedio de 1,68% en la Fase II (concentración 10<sup>-10</sup> M).
- 
- Cicatrización media al término del estudio (semana 6) del 99,27% en la Fase I frente al 70,70% en la Fase II.

•  
En cualquier caso, la eficacia de los productos con esta concentración y pureza de principio activo fue muy superior a controles. Nuevamente, ningún paciente presentó reacciones adversas o anomalías que pudieran guardar relación con el producto aplicado.

De esta manera, resulta muy razonable pensar que, bajo condiciones de fabricación idénticas, las formulaciones galénicas en forma de gel, crema, solución u otras similares que incluyan el principio activo de la presente invención con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80% en concentraciones comprendidas entre los dos extremos cuya eficacia ha sido probada con éxito ( $10^{-2}$  M y  $10^{-10}$  M), presentarán niveles de eficacia similares a los efectivamente probados.

En relación con lo anterior, y con el fin de comprobar si el producto era efectivo también en concentraciones más elevadas, se llevó a cabo la Fase III de las pruebas clínicas, que incluía pruebas con las tres formulaciones galénicas concentradas a  $10^{-1}$  M.

**Fase III. Evaluación del nivel de eficacia de la oleuropeína fabricada bajo las formas galénicas gel, crema (emulsión o/w), solución acuosa, con la máxima concentración de oleuropeína ( $10^{-1}$  M).**

Objetivos específicos:

Comprobar la eficacia del tratamiento con todas las formas galénicas probadas con éxito anteriormente (gel, crema y ungüento), aplicando una elevada concentración de principio activo ( $10^{-1}$  M), así como comparar su eficacia con respecto a las concentraciones ya testadas en las fases I y II.

Ejecución:

A tal fin, se fabricaron productos en condiciones idénticas a las expuestas para las Fases I y II, con la mencionada variación en sus concentraciones de oleuropeína ( $10^{-1}$  M). Véanse apartados 2 y 3.4.

Se seleccionaron, además de los cuatro pacientes control ya mencionados anteriormente, tres nuevos pacientes – todos ellos cumplían las condiciones de inclusión detalladas anteriormente en la presente invención–:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1.
- 
- Pacientes 3 y 4: Control + Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2.
- 
- Paciente 5: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-1}$  M
- 
- Paciente 6: Aplicación cada 24h de crema en concentración  $10^{-1}$  M
- 
- Paciente 7: Aplicación cada 24h de solución en concentración  $10^{-1}$  M
- 

Como se puede observar, a todos los pacientes se les aplicó el producto cada 24 horas, a efectos de poder establecer una comparación.

Conclusiones:

Las diferentes formulaciones con una concentración de oleuropeína de  $10^{-1}$  M con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80% mostraron un nivel de eficacia muy similar entre ellas, y muy superior en todos los casos a controles, siendo de nuevo la formulación en gel del producto la que presentó, de forma mínima, un mayor nivel de eficacia. Véase Figura 3.

De esta manera, y una vez concluidas las Fases I, II y III, resulta muy razonable pensar que, bajo condiciones de fabricación idénticas, las formulaciones galénicas en forma de gel, crema, solución acuosa u otras similares que incluyan oleuropeína en concentraciones comprendidas entre los dos extremos cuya eficacia ha sido probada con éxito:  $10^{-1}$  M y  $10^{-10}$  M (si bien el extremo inferior de concentraciones quedó reemplazado por  $10^{-11}$  M tras ser testado posteriormente con éxito en la Fase IV), presentarán niveles de eficacia similares a los efectivamente probados en pacientes.

En cualquier caso, la fase siguiente (Fase IV) del estudio clínico ahondó sobre este asunto, puesto que consistió en probar, para la forma gel, un espectro mayor de las concentraciones aplicables del principio activo comprendidas dentro del rango. La no realización de ensayos en un mayor número de formas galénicas, concentraciones y pacientes respondió únicamente a la dificultad para reclutar un número suficiente de pacientes que cumplieran las condiciones de inclusión en el estudio, máxime considerando que aún quedaban pendientes de realización las fases

V y VI de las pruebas clínicas sobre úlceras venosas, para las que se necesitaría un número importante de pacientes.

5 En cuanto a los objetivos secundarios del estudio, se volvieron a repetir las mismas apreciaciones por parte de los enfermeros: la aplicación del gel se mostró como ligeramente más cómoda, si bien la crema y la solución no presentaron ningún problema para su empleo. En lo referente a la seguridad, al igual que en el resto del estudio, no se presentaron anomalías en cuanto a reacciones adversas o toxicidad.

10 **Fase IV. Evaluación del nivel de eficacia de la formulación galénica gel en la práctica totalidad de concentraciones del rango en el cual el principio activo es eficaz:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ .**

15 Una vez demostrada la eficacia del producto en sus formas de gel, crema y solución en dos extremos del rango de concentraciones en los que la oleuropeína tiene efecto cicatrizante, -y habida cuenta de la dificultad para reclutar pacientes que cumplieran los estrictos requisitos marcados para entrar a formar parte del estudio-, la fase IV de las pruebas clínicas incluyó únicamente pruebas con la forma galénica gel.

Objetivos específicos:

20 Demostrar la eficacia del principio activo oleuropeína con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80% a diferentes concentraciones; y, en especial, a la concentración  $10^{-11}$  M, fuera del rango testado anteriormente. Para ello, esta fase IV de la prueba clínica se llevó a cabo únicamente, y a modo de ejemplo, en el medio gel.

25 Los resultados obtenidos con el vehículo gel son extrapolables al resto de formulaciones galénicas, habida cuenta de la elevada similitud existente entre los resultados de las diferentes formulaciones testadas (gel, crema, solución) para las tres concentraciones probadas anteriormente ( $10^{-1}$  M,  $10^{-2}$  M y  $10^{-10}$  M). Por tanto, los resultados obtenidos no deben entenderse como únicamente atribuibles a la formulación realizada en el medio gel, sino que ésta ha sido escogida, únicamente, a modo de ejemplo.

30 Ejecución:

La fabricación de los compuestos fue idéntica a la mostrada en las fases anteriores, a excepción obviamente de la concentración empleada de principio activo (véanse apartados 2 y 3.4).

35 El objetivo era disponer de datos de dos pacientes para cada una de las diferentes concentraciones a testar. Las concentraciones probadas fueron  $10^{-1}$  M,  $10^{-2}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M y  $10^{-11}$  M ( $10^{-2}$  M ya se había probado previamente en la fase II, pero los resultados se incluyeron nuevamente a efectos comparativos). Por ello, y teniendo en cuenta que las concentraciones  $10^{-1}$  M y  $10^{-10}$  M ya habían sido probadas en sendos pacientes durante las fases III y II, respectivamente, y que la concentración  $10^{-2}$  M ya había sido probada en dos pacientes en la fase I; la distribución de pacientes para esta fase quedó de la siguiente manera:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1.
- 
- Pacientes 3 y 4: Control + Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2.
- 
- Pacientes 5 y 6: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-1}$  (el paciente 5 se incluyó anteriormente en la Fase III).
- 
- 50 • Pacientes 7 y 8: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-2}$  (ambos pacientes se incluyeron anteriormente en la Fase I).
- 
- Pacientes 9 y 10: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-4}$  M
- 
- 55 • Pacientes 11 y 12: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-7}$  M
- 
- Pacientes 13 y 14: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-9}$  M
- 
- Pacientes 15 y 16: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-10}$  M (el paciente 15 se incluyó anteriormente en la Fase II).
- 
- Pacientes 17 y 18: Aplicación cada 24h de gel en concentración  $10^{-11}$
- 

65 Como se puede observar, a todos los pacientes se les aplicó el producto cada 24 horas, a efectos de poder establecer una comparación.

Conclusiones:

5 La Fase IV del estudio demostró que la oleuropeína es efectiva y superior a controles, bajo cualquiera de los baremos de medición establecidos en el apartado 4, en la totalidad del rango de concentraciones de producto, comprendido entre  $10^{-1}$  M y  $10^{-11}$  M. Véase Figura 4. Se apreció igualmente que la máxima eficacia del principio activo se alcanza bajo la concentración  $10^{-2}$  M (por encima incluso de  $10^{-1}$  M), y va disminuyendo muy progresivamente hasta  $10^{-11}$  M, cuya eficacia es sólo muy ligeramente superior a controles. Véase Figura 5.

10 Como se ha mencionado en fases anteriores, y habida cuenta de la correlación existente entre los resultados obtenidos por las fórmulas gel, crema y solución para las concentraciones  $10^{-1}$  M,  $10^{-2}$  M y  $10^{-10}$  M, es lógico pensar que los resultados obtenidos en las nuevas concentraciones probadas únicamente bajo la forma gel son extrapolables al resto de formulaciones. En cuanto a las variables secundarias de evaluación del producto, se confirmó una vez más –y esta vez ante una población de pacientes superior: diez nuevos pacientes, que el p.a. oleuropeína no presenta efectos adversos, además de que su empleo bajo el modo gel resulta de fácil aplicación a los enfermeros responsables de los tratamientos (puntuación media de 8,33 sobre 10).

20 **Fase V. Evaluación del nivel de eficacia del producto (en su forma de gel) bajo diferentes regímenes de aplicación (cada 24h Vs cada 12h Vs cada 48h).**

Objetivo:

25 Comprobar la eficacia del principio activo oleuropeína bajo diferentes regímenes de aplicación, puesto que hasta ese momento sólo se había aplicado el producto cada 24h.

Ejecución:

30 Para ello, esta Fase V de la prueba clínica se llevó a cabo, a modo de ejemplo, en el medio gel, por ser aquél sobre el que más datos se disponían y el más efectivo hasta ese momento. La preparación del producto fue igual a la realizada para la Fase II (véanse apartado 2 y 3.4)

35 Se escogieron para esta parte del estudio cuatro nuevos pacientes que cumplieran los requisitos para su inclusión descritos anteriormente. Por ello, y teniendo en cuenta que la concentración  $10^{-2}$  M, aplicada cada 24 horas, ya había sido testada durante la Fase II; la distribución de pacientes para esta fase del estudio quedó de la siguiente manera:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1.
- 
- Pacientes 3 y 4: Control + Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2.
- 
- Pacientes 5 y 6: Aplicación de una dosis cada 12h de gel en concentración  $10^{-2}$  M.
- 
- Pacientes 7 y 8 (procedentes de la Fase I): Aplicación de una dosis cada 24h de gel en concentración  $10^{-2}$  M.
- 
- Pacientes 9 y 10: Aplicación de una dosis cada 48h de gel en concentración  $10^{-2}$  M.
- 

50 Las curas se realizaron siempre antes de cada aplicación de producto (cada 12, 24 o 48 horas).

Conclusiones:

55 Esta fase del estudio sirvió para probar que la oleuropeína con un grado de pureza de al menos el 30%, preferiblemente, entre 41,5%, y 100%, en concreto 41,5% y 80% es superior a controles bajo cualquier régimen de aplicación incluso con aplicaciones cada 48h. Véase Figura 6. Adicionalmente, se comprobó que no existen diferencias significativas en la eficacia del p.a. entre los diferentes regímenes de aplicación testados (12h, 24h, 48h.).

60 Todos los objetivos marcados para la evaluación de la eficacia, facilidad en la aplicación y seguridad del producto se cumplieron bajo los tres regímenes de aplicación. Es de destacar que ninguno de los pacientes a los que se aplicó el producto cada 12 horas –con el consecuente incremento de la manipulación directa sobre la úlcera– presentara síntoma alguno de infección o reacción adversa. Este patrón se repitió en los pacientes con úlceras neuropáticas o por presión a quienes se aplicó el p.a. cada 12 horas.

**Fase VI. Evaluación del nivel de eficacia de formulaciones galénicas partiendo de dos principios activos con distinto grado de pureza**Objetivos específicos:

5 Comprobar que no existían variaciones significativas en los resultados de efectividad de las composiciones farmacéuticas en el rango de pureza del principio activo de la presente invención utilizado en la formulación de las composiciones farmacéuticas.

10 Ejecución:

Para realizar esta comparación de rendimientos, se fabricó un lote de geles con concentración en todos ellos de  $10^{-4}$  M (se fabricó nuevamente, a modo de ejemplo, en el medio gel, por ser aquél sobre el que más datos se disponían y el más efectivo hasta ese momento). La preparación se llevó a cabo siguiendo los patrones descritos teniendo en cuenta la diferente concentración del p.a. en el extracto (véanse apartados 2 y 3.4).

15 Se escogieron para esta parte del estudio seis nuevos pacientes que cumplieran los requisitos para su inclusión descritos anteriormente. Los resultados obtenidos por estos pacientes fueron comparados con los obtenidos por dos pacientes tratados en la Fase IV con el gel a  $10^{-4}$  M que incluía p.a. con un grado de pureza del 41,5%; así como con los cuatro pacientes control.

Los pacientes incluidos en esta fase del estudio se detallan a continuación:

- Pacientes 1 y 2: Control. Aplicación del tratamiento estándar de curas según apartado 3.1.
- 
- Pacientes 3 y 4: Control + Ácido Hialurónico. Aplicación del tratamiento con ácido hialurónico descrito en el apartado 3.2.
- 
- Pacientes 5 y 6 (procedentes de la Fase IV): Aplicación cada 24h. de gel con una concentración de p.a. de  $10^{-4}$  M conteniendo oleuropeina con un grado de pureza del 41,5%.
- 
- Pacientes 7, 8, 9, 10, 11 y 12: Aplicación cada 24h. de gel con una concentración de p.a. de  $10^{-4}$  M, conteniendo oleuropeina con un grado de pureza del 80%.
- 

35 Conclusiones:

Se ha demostrado que no existen diferencias muy significativas entre los resultados obtenidos con los geles que incorporaban el p.a. con un grado de pureza del 41,5% y los que incorporaban el p.a. con un grado de pureza del 80%, si bien este último presentaba una mayor velocidad de curación (promedio de cicatrización diaria del 2,33% para las úlceras tratadas con oleuropeina del 41,5% frente al 2,69% de la oleuropeina del 80%). El efecto cicatrizante del p.a. más purificado es además muy superior a controles (véase Figura 7). Por tanto, se puede concluir que el efecto cicatrizante del producto es positivo y se ve incrementado a mayor pureza del principio activo utilizado en la formulación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

45 Todos los objetivos de evaluación de eficacia se cumplieron con este producto que incorporaba un p.a. más puro. Del mismo modo, no se produjeron irritaciones o infecciones en los pacientes tratados con oleuropeina pura, lo que confirma el carácter seguro de este p.a con el grado de pureza reivindicado.

50 **6.2. Úlceras neuropáticas (pie diabético)****6.3.**

Una vez demostrada la eficacia del producto de la presente invención sobre las úlceras venosas, se decidió emplear el producto en pacientes que presentaran úlceras neuropáticas. En concreto, nuestro análisis se llevó a cabo sobre pacientes con un grado I o II en la escala de Wagner.

55 Objetivos específicos:

- Probar la eficacia de las mismas formulaciones galénicas reivindicadas para la curación de la úlcera venosa en pacientes con pie diabético.
- 
- Comprobar si existían diferencias significativas en la eficacia del fármaco en úlceras neuropáticas bajo dos regímenes de aplicación de las dosis diferentes (cada 12 horas y cada 24 horas).
- 

Ejecución:



Habida cuenta de la dificultad para reclutar pacientes que cumplieren las condiciones de inclusión expuestas anteriormente, y, puesto que, de las pruebas realizadas en pacientes con úlcera venosa se desprende que el nivel de eficacia de las formulaciones galénicas gel, crema y solución acuosa en sus distintas concentraciones es muy similar en todos los casos, las pruebas clínicas sobre pie diabético se realizaron en únicamente dos concentraciones: una de ellas concentrada ( $10^{-2}$  M) y otra de ellas muy poco concentrada ( $10^{-9}$  M). Ambas sobre la base de gel. Para cada una de ellas, se aplicó la formulación base utilizada en los primeros casos tratados de úlcera venosa (véase apartado 2), empleando dos regímenes de dosis diferentes (cada 12 y 24h). El grado de pureza del principio activo utilizado en esta prueba clínica fue del 41,5%.

No obstante, estas formulaciones y regímenes de dosis deben considerarse únicamente a modo de ejemplo, puesto que la efectividad del resto de formulaciones ha quedado comprobada en los pacientes con úlcera venosa.

Se evaluaron ocho pacientes que cumplieran los criterios descritos anteriormente, empleando las formulaciones siguientes:

- Grupo Control: Dos pacientes a los que se les aplicó el tratamiento con becaplermin establecido en el apartado 3.2 anterior.

- Paciente 1: Úlcera de 5,40cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación con becaplermin.

- Paciente 2: Úlcera de 5,86cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación con becaplermin.

Los pacientes control presentaban siempre diagnósticos de curación iguales o mejores que los pacientes a los que se aplicó la preparación base (Wagner Grado I frente a Wagner Grado I o II).

- $10^{-2}$ M de oleuropeína (tres pacientes):

- Paciente 3: Úlcera de 5,58cm<sup>2</sup>. Grado II. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación base.

- Paciente 4: Úlcera de 3,45cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación base.

- Paciente 5: Úlcera de 2,64cm<sup>2</sup>. Grado II. Aplicación de una dosis cada 12h de la preparación base.

- $10^{-9}$ M de oleuropeína (tres pacientes):

- Paciente 6: Úlcera de 1,62cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación base.

- Paciente 7: Úlcera de 7,70cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 24h de la preparación base.

- Paciente 8: Úlcera de 5,56cm<sup>2</sup>. Grado I. Aplicación de una dosis cada 12h de la preparación base.

Conclusiones:

Todos los pacientes tratados con las preparaciones que contenían oleuropeína, independientemente de la concentración y régimen de tratamiento (número de dosis), disminuyeron muy significativamente la superficie de la úlcera y redujeron en uno dos grados su clasificación según la clasificación de Wagner Merrit, superando en eficacia de modo claro a los controles y sin que se evidenciaran diferencias muy significativas entre los diferentes mecanismos de tratamiento (aplicaciones cada 12 o 24 horas y concentración del gel empleado).

En cuatro de los seis casos tratados con oleuropeína se resolvió por completo el problema de las úlceras que llevaban dos o más semanas sin experimentar mejoría significativa (100% cicatrización al término del tratamiento). Los dos pacientes restantes (pacientes 7 y 8), a quienes se aplicó una menor concentración de gel ( $10^{-9}$  M), alcanzaron niveles de cicatrización del 86,23% y 99,28%, respectivamente, frente al 48,95% de promedio de reducción de la superficie ulcerada del grupo control.

Es destacable que las menores concentraciones de principio activo testadas ( $10^{-9}$  M) presentaran, en cualquier caso, un nivel de eficacia muy superior a control. La úlcera que presentó una más rápida evolución (cicatrización media diaria del 8,33%) fue la correspondiente al paciente 6, tratado con oleuropeína a  $10^{-9}$  M en régimen de aplicación diaria. No obstante, se trataba de la úlcera con menor diámetro (1,62cm<sup>2</sup>). Véase Figura 8.

Los objetivos secundarios (facilidad de aplicación y seguridad) se vieron igualmente cumplidos: los enfermeros que aplicaron la composición afirmaron que el gel era de muy fácil aplicación (nota media obtenida de 8,33 sobre 10). Adicionalmente, no se detectaron molestias o problemas de toxicidad en los pacientes.

5 En cuanto a los objetivos más específicos mencionados anteriormente para las pruebas sobre pie diabético, se puede concluir como probado que las formulaciones galénicas reivindicadas para la curación de la úlcera venosa son también eficaces en pacientes con pie diabético; así como que no existieron diferencias significativas en la eficacia del fármaco entre aquellos casos en los que se aplicó cada 12 horas y aquellos en los que hizo cada 24 horas.

#### 6.4. Úlceras por presión (UPP)

#### 6.5.

10 Una vez probada con éxito la utilización del producto de la presente invención en sus diferentes formas galénicas, concentraciones de principio activo y regímenes de dosis tanto en úlceras venosas como en úlceras neuropáticas, era lógico pensar que también las úlceras por presión, adecuadamente tratadas, podrían presentar mejorías significativas con el empleo de nuestro producto.

#### 15 Objetivos específicos:

Probar la eficacia de las mismas formulaciones galénicas reivindicadas para la curación de la úlcera venosa y de pie diabético en pacientes con úlceras por presión. Adicionalmente, se comprobó la superioridad del producto con respecto a controles bajo diferentes regímenes de aplicación (dosis).

#### 20 Ejecución:

25 Las pruebas realizadas en pacientes con úlceras por presión siguieron un patrón diferente a las anteriores, puesto que para llevar a cabo las mismas se seleccionaron pacientes que presentaran más de una úlcera por presión –que no hubieran presentado reducción de su superficie en las dos últimas semanas como mínimo-. De esta manera, el control sería el propio paciente. Se decidió que la úlcera con peor diagnóstico (atendiendo a la escala de UPP) y/o mayor superficie sería tratada con oleuropeina, mientras que la úlcera restante actuaría como control siguiendo el régimen de curas descrito en el apartado 3. Adicionalmente, en el único paciente que presentaba tres úlceras por presión en localizaciones distintas, se analizaron las diferencias en el ritmo de cicatrización derivadas del empleo de tres regímenes de dosis diferentes del mismo producto (12h., 24h., y 48h.).

30 Para determinar la inclusión o exclusión de los pacientes en el estudio, empleamos la clasificación de las UPP mencionada en el apartado 4 (baremo 4.3), Todos los pacientes estudiados tenía úlceras en estadios II o III.

35 Los pacientes analizados en esta fase del estudio clínico se detallan a continuación:

- Paciente 1:

- 

- Control: Úlcera de 4,96cm<sup>2</sup> en el isquion (Estadio III).

40

- Gel 10<sup>-2</sup> M cada 24h: Úlcera de 5,32cm<sup>2</sup> en el sacro (Estadio III).

- 

- Paciente 2:

- 

- Control: Úlcera de 8,98cm<sup>2</sup> en el talón izquierdo (Estadio III).

45

- Gel 10<sup>-7</sup> M cada 24h: Úlcera de 18,03cm<sup>2</sup> en el sacro (Estadio III).

- 

- Paciente 3:

- 

- Control: Úlcera de 8,57cm<sup>2</sup> en el talón izquierdo (Estadio III).

50

- Gel 10<sup>-9</sup> cada 24h: Úlcera de 11,35cm<sup>2</sup> en el talón derecho (Estadio III y 13 meses de duración).

- 

55 • Paciente 4 (prueba efecto dosis):

- 

- Aplicación cada 48h (gel 10<sup>-4</sup> M): Úlcera de 8,37cm<sup>2</sup> en el glúteo (Estadio II).

- 

- Aplicación cada 12h (gel 10<sup>-4</sup> M): Úlcera de 10,56cm<sup>2</sup> en el talón derecho (Estadio II).

60

- Aplicación cada 24h (gel 10<sup>-4</sup> M): Úlcera de 1,19cm<sup>2</sup> en el sacro (Estadio II).

- 

#### Conclusiones:

Todas concentraciones y regímenes de dosis empleados presentan una eficacia muy superior a controles, sin que se hayan encontrado diferencias significativas entre cada uno de ellos. Véase Figura 9. De nuevo, se repite la pauta de que las formulaciones más concentradas presentan resultados muy ligeramente superiores a las más diluidas.

5 Del mismo modo que sucedía con las úlceras de pie diabético, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con aplicaciones cada 12h. y aquellos empleados cada 24h. (véanse en la Figura 9 los porcentajes de cicatrización del paciente 4 bajo los tres regímenes de aplicación empleados: 48h., 12h. y 24h.).

10 Por tanto, resulta razonable pensar que, además de las formulaciones galénicas y concentraciones probadas a modo de ejemplo en pacientes aquejados de UPP, el resto de formulaciones galénicas y concentraciones ya probadas en las fases anteriores del presente estudio clínico (úlceras venosas y neuropáticas) presentarán una capacidad de cicatrización muy superior a la obtenida siguiendo los tratamientos convencionales aplicados actualmente, independientemente del régimen de dosis que se emplee.

15 En relación con los objetivos principales del estudio, es de destacar que el ritmo de cicatrización de las úlceras tratadas con oleuropeína (objetivo 5) fue muy superior en todos los casos a las úlceras tratadas con becaplermin (paciente 1: un 57% más rápido, paciente 2: un 34%, paciente 3: un 29%), a pesar de que, como se ha mencionado anteriormente, la superficie de las úlceras tratadas con oleuropeína era muy superior a las úlceras control. Adicionalmente, todos las úlceras tratadas con oleuropeína que presentaban un estadio III rebajaron el mismo a estadio I o estadio I-II (objetivo 6).

20 En cuanto a los objetivos secundarios del estudio (objetivos 7 y 8), todos los enfermeros afirmaron que el gel era de fácil aplicación (puntuación media obtenida de 8,5 sobre 10) y no se detectaron molestias o problemas de toxicidad en los pacientes.

25

## REFERENCIAS

1. [http://healthychristianliving.com/olive\\_leaf\\_extract.htm](http://healthychristianliving.com/olive_leaf_extract.htm)
- 2.
- 30 3. Perrinjaquet-Mocetti *et al.* "Food Supplementation with an Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Reduces Blood Pressure in Borderline Hypertensive Monozygotic Twins, 2008.
- 4.
5. Somova *et al.* "Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves, 2003.
- 35 6.
7. Khayyal *et al.* "Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats, 2002.
- 8.
9. Zarzuelo *et al.* Vasodilatador effect of olive leaf, 1991.
- 40 10.
11. DR.Stevenson, L., *et al.* "Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Report on Olive Leaf Australia's Olive Leaf Extracts, Southern Cross University, 2005.
- 12.
13. Visioli F, Poli A, and Galli C. "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil" *Med.Res.Rev.* **2002**, 22: 65-75.
- 45 14.
15. Visioli F, Bellosta S, and Galli C, "Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages." *Life. Sci.* **1998**, 62: 541-546.
- 16.
- 50 17. Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. "Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2003**; 23:622-629.
- 18.
19. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H. "Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants." *Lancet Oncol.* **2000**, 1: 107-112.
- 55 20.
21. Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. "The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health." *Nutr. Res. Rev.* **2005**, 18:98-112.
- 22.
- 60 23. Fredrickson WR, F and S Group, Inc. "Method and composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves. US patent **2000**; 6:117,884.
- 24.
25. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papanalabros E, Kremastinos DT. "Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress." *J. mol. Cell. Cardio.* **2007**, 42: 549-558.
- 65 26.

27. Andreadou I, Lliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, Skaltsounia AL, Kamber E, Tsantili-Kakoulidou A, Kremastinos DT. "The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits." *J. Nut.* **2006**, 136: 2213-2219.
- 28.
- 5 29. David W. Voigt et al. "Economic Study of Collagen-Glycosaminoglycan Biodegradable Matrix for Chronic Wounds." *Wounds* **2006**, 18(1):1-7.
- 30.
31. "Scope: Management of type 2 diabetes: prevention and management of foot problems (update)"(PDF). Clinical Guidelines and Evidence Review for Type 2 Diabetes: Prevention and Management of Foot Problems. National Institute for Health and Clinical Excellence. 20 February **2003**. [http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/footcare\\_scope.pdf](http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/footcare_scope.pdf). Retrieved 2007-12-04.
- 10 32.
33. Rowe DW et al., "Abnormalities in proliferation and protein synthesis in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus". *Diabetes* **1997**, 26:284-290 [PMID 849809](#).
- 15 34.
35. Stephen A. Brigido et al., "Use of an Acellular Flowable Dermal Replacement Scaffold on Lower Extremity Sinus Tract Wounds", *Foot & Ankle Specialist* **2009**,2(2):67-72.
- 36.
- 20 37. McLennan S et al, Molecular aspects of wound healing, Primary intention (**2006**). 14(1):8-13
- 38.
39. E. Linden et al, Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease Results from Advanced Glycation End Products (AGE)-Mediated Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase through RAGE Activation, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol* (**2008**).3(3): 691 - 698 [PMID 18256374](#)
- 40.
- 25 41. Galkowska H et.al, Chemokines, cytokines and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin if chronic diabetic foot ulcers, *Wound Repair Regen* (**2006**). 14:558-565 [PMID 17014667](#)
- 42.
43. Neil Bennett et al, Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing, *Am J Surg* (**1993**). 166: 74-81 [PMID 8392302](#)
- 30 44.
45. Debbie Sharman, Moist wound healing: a review of evidence, application and outcome, *The Diabetic Foot* (**2003**). 6(3): 112-120
- 46.
- 35 47. Iakovos N Nomikos et al, Protective and Damaging Aspects of Healing: A Review, *Wounds* (**2006**). 18 (7): 177-185.
- 48.
49. Harold Brem, Marjana Tomic-Canic. "Cellular and Molecular basis of wound healing in diabetes". *JCI* **2007**,117(5):1219-1222.[PMID 17476353](#).
- 50.
- 40 51. Galkowska H.et.al. "Chemokines, cytokines and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers". *Wound Repair Regen* **2006**,14:558-565 [PMID 17014667](#).
- 52.
53. Spencer S; Spencer, Sue A."Pressure relieving interventions for preventing and treating diabetic foot ulcers". **2000**, *Cochrane Database System Rev*.3:CD002302.doi:10.1002/14651858.CD002302.[PMID 10908550](#).
- 45 54.
55. Schäffer M, Bongartz M, Fisher S, Proksch B, Viebahn R. "Nitric oxide restores impaired healing in normoglycemiaemic diabetic rats". *J. Wound Care* (July **2007**) 16(7):311-6.[PMID 17708383](#).
- 56.
57. Zamboni WA, Wong HP, Stephenson LL, Pfeifer MA (September **1997**). "Evaluation of hyperbaric oxygen for diabetic wounds: a prospective study". *Undersea Hyperb Med* **24**(3):175-9.[PMID 9308140](#).
- 50 58.
59. Kranke P, Benett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S (**2004**) "Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds" *Cochrane Database Sys Rev* (2): CD004123. [PMID 15106239](#).
- 60.
- 55 61. Snyder RJ (**2005**). "Treatment of nonhealing ulcers with allografts". *Clin.Dermatol.* **23**(4):388-95. [PMID 16023934](#).
- 62.
63. Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN. "The validity of the clinical sings and symptoms used to identify localized chronic wound infection". *Wound Repair Regen.* **2001**; 9 (3) : 178-86.
- 60 64.
65. O'Meara S, Al Kurdi D, Ovington LG. "Antibiotics and antiseptics for venous ulcers" (review). *The Cochane Library* **2008**. CD003557.
- 66.
67. Gray D, Cooper P. "Nutrition and wound healing: what is the link?" *J Wound Care.* **2001**;10(3):86-9.
- 65 68.

69. Jessup RL. "What is the best method for assessing the rate of wound healing? A comparison of 3 mathematical formulas". *Adv Skin Wound Care*. **2006**; 19:138-47.
- 70.
- 5 71. Marinello J. "Métodos de evaluación de las úlceras. Criterios predictivos de curación". En: Marinello Roura J, editor. *Úlceras de la extremidad inferior*. Barcelona: Glosa; **2005**. p. 275-85.
- 72.
73. Buntinx F, Beckers H, De Keyser G, Flour M, Nissen G, et al. "Inter-observer variation in the assessment of skin ulceration" .*J Wound Care*. **1996**; 5(4):166-70.
- 74.
- 10 75. Palomar F, Fornés B, Tornero A, Muñoz A. "Escala de Valoración FED-PALLA de la piel perilesional". *Enfermería Dermatológica* **2007**; 1:36-8
- 76.
77. Wagner FW. "The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment". *Foot Ankle*. **1981**; 2:64-122.
- 78.
- 15 79. European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP). "Directrices para el tratamiento de las úlceras por presión". [Internet]. Disponible en
80. <http://www.epuap.org/index.html> traducción:<http://www.gneaupp.org/documentos/epuap/directrices.txt> )

20

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso en el tratamiento de cicatrización de heridas y úlceras en personas de edad avanzada o los ancianos y/o diabéticos seleccionados del grupo que consiste en: pie diabético, úlcera por presión y úlcera venosa.
- 5 2. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende además del ingrediente activo oleuropeína, un agente gelificante, un conservante, un solvente, un agente alcalinizante y opcionalmente un antioxidante.
- 10 3. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición farmacéutica se presenta en forma de gel y comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la composición farmacéutica se presenta en forma de crema y comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la oleuropeína está presente en la composición farmacéutica a una concentración de  $10^{-1}$  M a  $10^{-11}$  M.
- 20 6. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la oleuropeína está presente en la composición farmacéutica a una concentración de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ M.
7. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento de cicatrización de heridas y úlceras en personas de edad avanzada o los ancianos y/o diabéticos es pie diabético.
- 25 8. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento de cicatrización de heridas y úlceras en personas de edad avanzada o los ancianos y/o diabéticos es úlcera venosa.
9. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento de cicatrización de heridas y úlceras en personas de edad avanzada o los ancianos y/o diabéticos es úlceras por presión.
- 30 10. Una composición farmacéutica que contiene oleuropeína como el único ingrediente activo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tratamiento comprende un régimen de aplicación a las 12 horas, 24 horas u 48 horas.

Figura 1

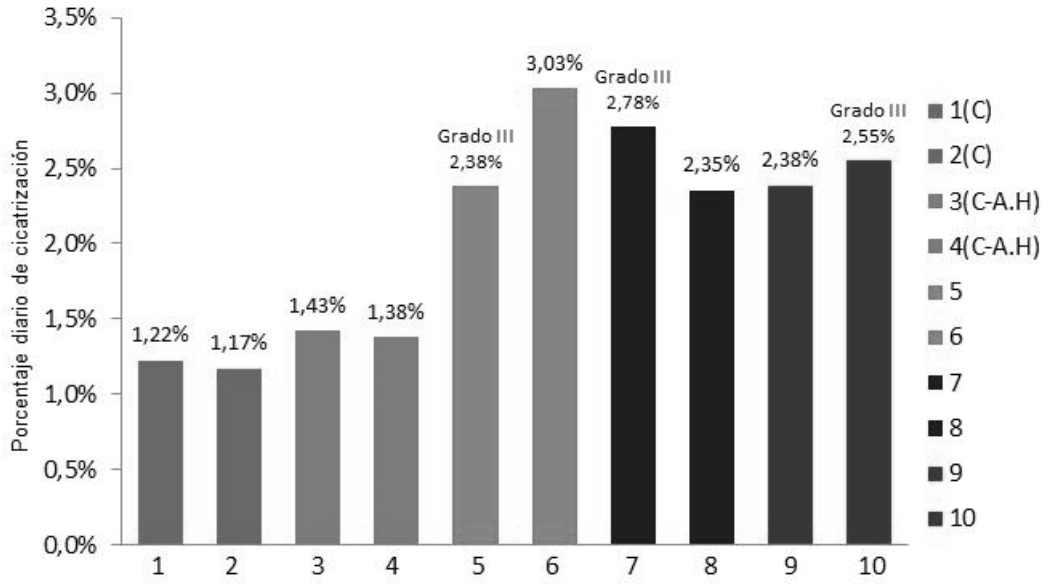


Figura 2

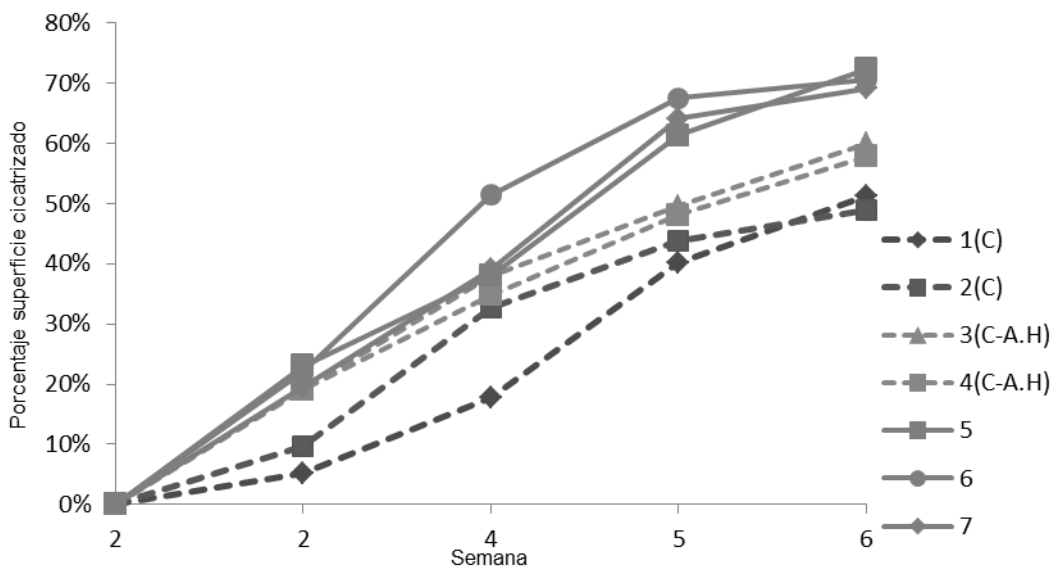


Figura 3

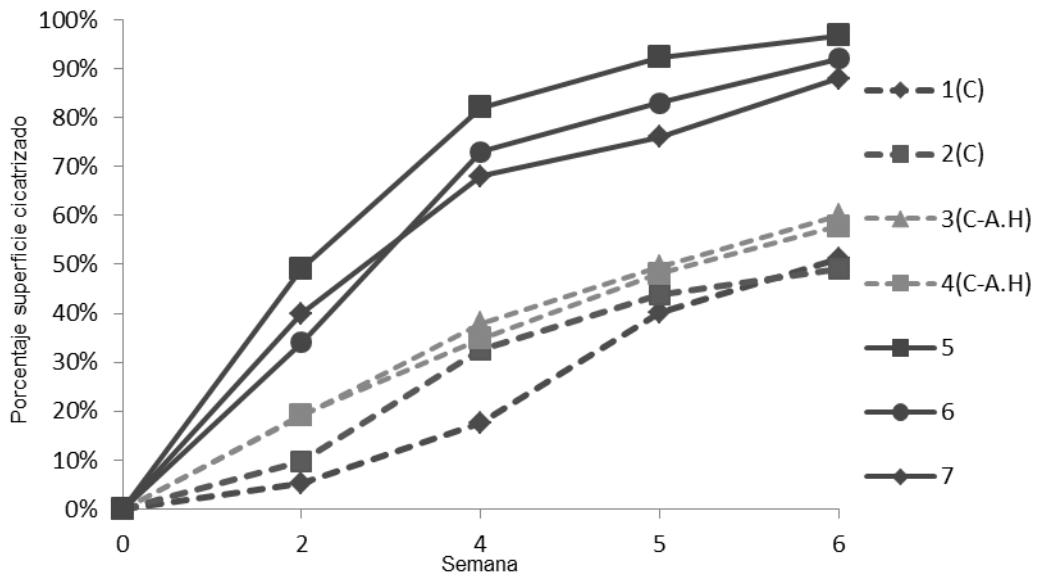


Figura 4

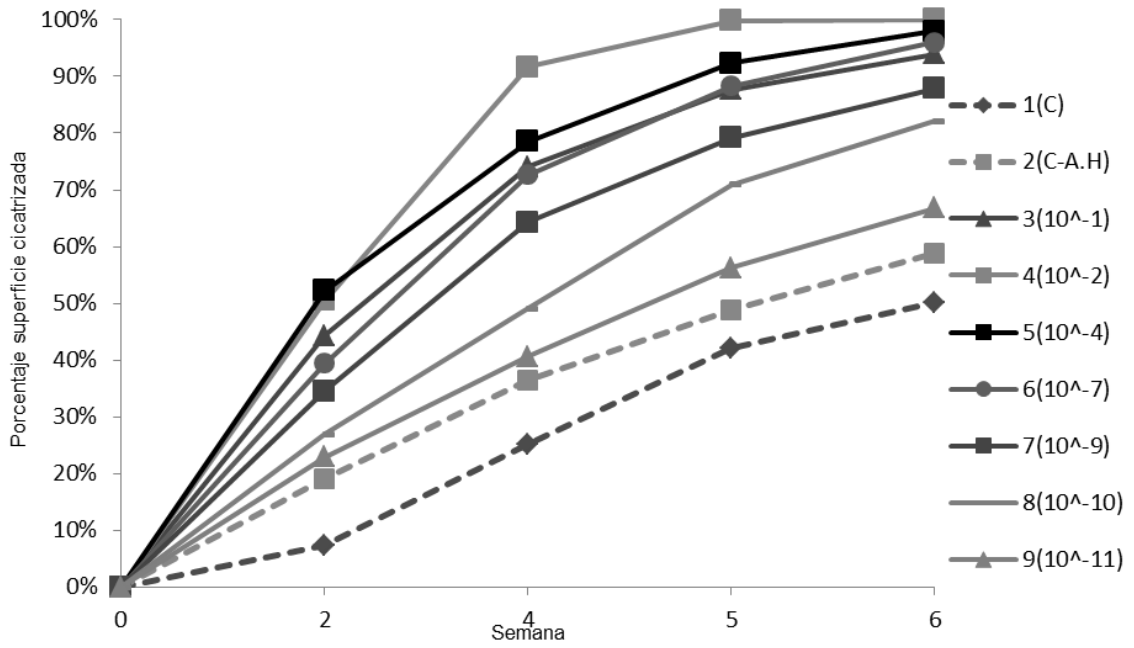




Figura 5

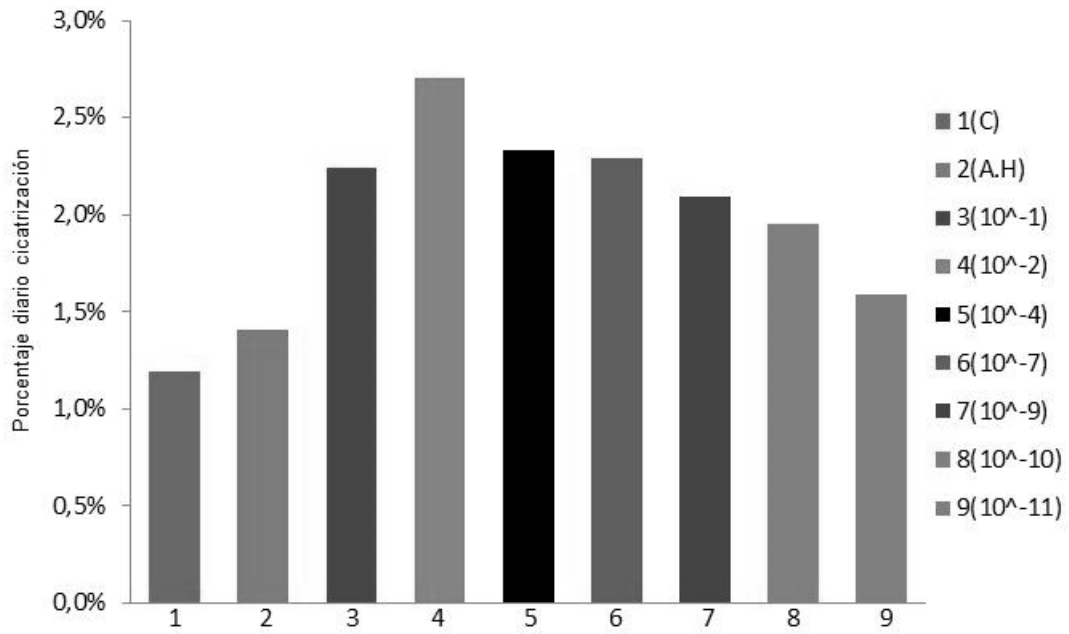


Figura 6

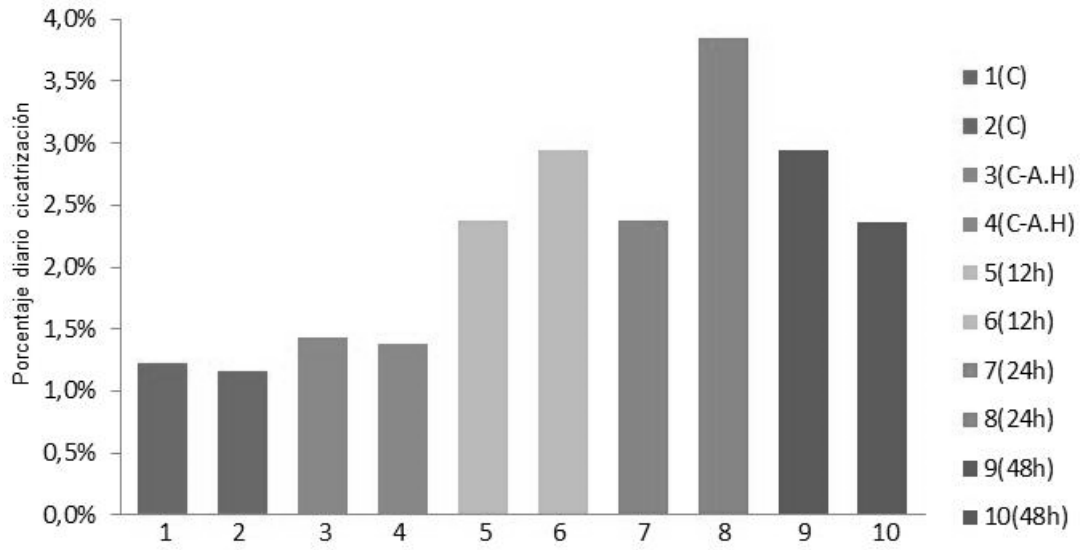


Figura 7

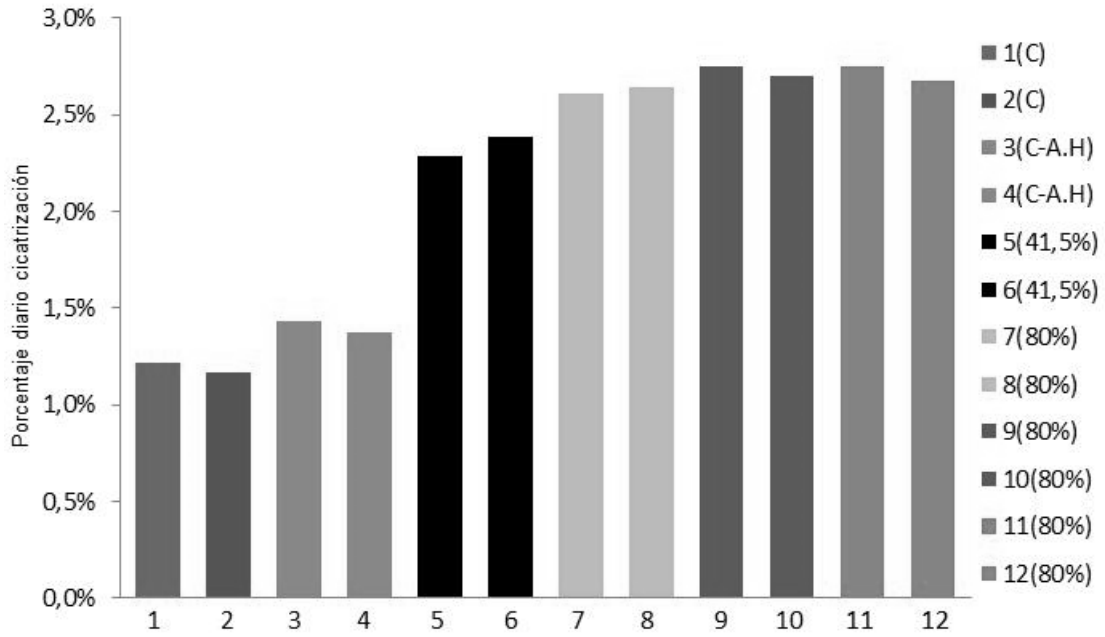


Figura 8

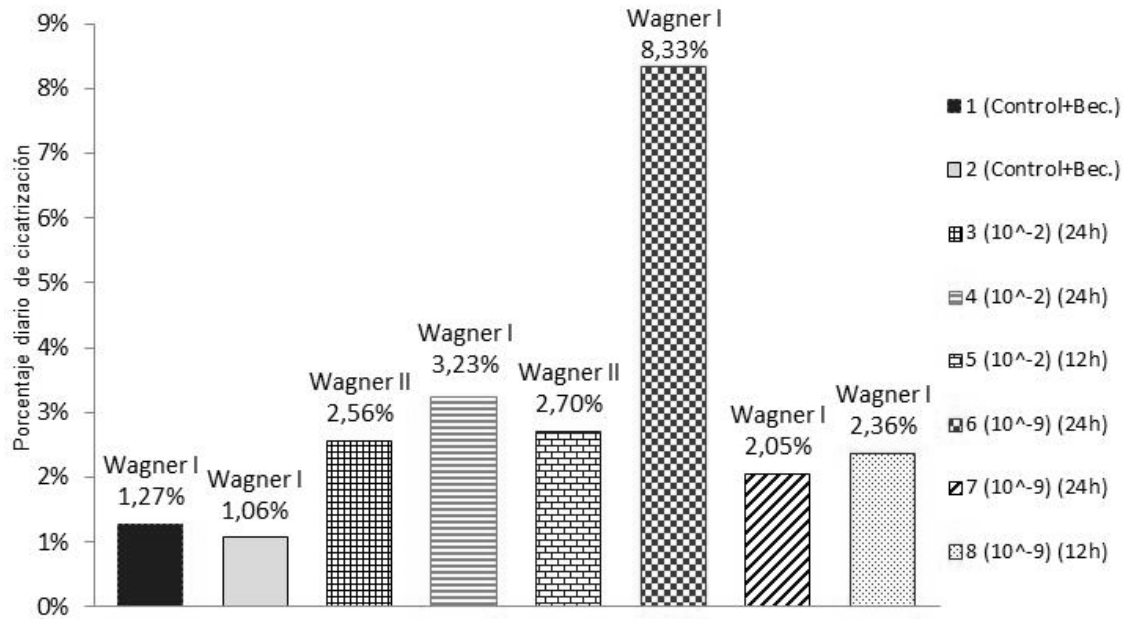


Figura 9

