

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de Septiembre de 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/069912 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 7/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00090

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de Febrero de 2002 (28.02.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200100508 2 de Marzo de 2001 (02.03.2001) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
CODERCH NEGRA, María, Luisa [ES/ES]; Insto. de
Investigaciones Químicas y Ambientales, Consejo Supe-
rior de Investigaciones Científicas, C/Jordi Girona, 18-26,
E-08034 Barcelona (ES). FONOLLOSA ARGEMÍ,
Jordi [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Químicas
y Ambientales, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, C/Jordi Girona, 18-26, E-08034 Barcelona
(ES). PERA LÓPEZ, Montserrat, de [ES/ES]; Insto.
de Investigaciones Químicas y Ambientales, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, C/Jordi Girona,
18-26, E-08034 Barcelona (ES). MARTÍ GELABERT,
Meritxell [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Químicas
y Ambientales, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, C/Jordi Girona, 18-26, E-08034 Barcelona

(ES). MAZA RIBERA, Alfonso, de, la [ES/ES]; Insto.
de Investigaciones Químicas y Ambientales, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, C/Jordi Girona,
18-26, E-08034 Barcelona (ES). PARRA JUEZ, José,
Luis [ES/ES]; Insto. de Investigaciones Químicas y Am-
bientales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
C/Jordi Girona, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).

(74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; Con-
sejo Superior de Investigaciones Científicas, Oficina de
Transferencia de Tecnología, C/Serrano, 113 - 2ª Planta,
E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: USE OF CERAMIDE-RICH LANOLIN FRACTIONS IN SKIN TREATMENT AND COMPOSITIONS CONTAIN-
ING SAID FRACTIONS

(54) Título: UTILIZACIÓN DE FRACCIONES DE LANOLINA RICAS EN CERAMIDAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA
PIEL, Y COMPOSICIONES QUE LAS CONTIENEN

(57) Abstract: The discovery that lanolin contains ceramides, albeit in small proportions, has made it possible to obtain lanolin
fractions with relative high contents of natural ceramides from wool. Said lanolin fractions have a moisturizing and protective activ-
ity in the human skin that resembles at least that obtained with synthetic ceramides currently used in cosmetic and dermatological
products to enhance the skin protective barrier function of the stratum corneum. Hence, said fractions can be used in the preparation
of cosmetic and/or pharmaceutical compositions for the treatment of the human skin.

(57) Resumen: El descubrimiento de que la lanolina contiene ceramidas, aunque en proporciones bajas, ha permitido obtener frac-
ciones de la lanolina con contenidos relativamente elevados de ceramidas naturales de la lana. Dichas fracciones de lanolina muestran
una actividad hidratante y protectora de la piel humana, al menos semejante a la obtenida con las ceramidas sintéticas actualmente
empleadas en cosmética y dermatología para reforzar la función de barrera protectora de la piel propia del estrato córneo, por lo que
pueden ser utilizadas para preparar composiciones cosméticas y/o farmacéuticas para el tratamiento de la piel humana.



WO 02/069912 A1

**UTILIZACIÓN DE FRACCIONES DE LANOLINA RICAS EN CERAMIDAS
PARA EL TRATAMIENTO DE LA PIEL, Y COMPOSICIONES QUE LAS
CONTIENEN**

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a la utilización de fracciones de lanolina ricas en ceramidas para preparar productos cosméticos y para el tratamiento de la piel, y a las composiciones cosméticas y farmacéuticas que contienen dichas fracciones.

10 Estado de la técnica anterior

El término ceramida se asigna a una serie de estructuras lipídicas naturales o sintéticas, tales como las descritas por Downing D.T. et al. en *The Journal of Investigative Dermatology* 84:410-412 (1985). Dichas ceramidas son amidas grasas de esfingosina o fitoesfingosina y se suelen agrupar en 6 tipos, tal como se recoge en la mencionada publicación de Downing et al.

Las ceramidas localizadas en el estrato córneo de la piel forman una parte substancial de la barrera lipídica de la piel humana, que es la responsable de la protección de la misma contra las agresiones del medio exterior y de mantener el equilibrio de hidratación necesario para su buena conservación.

Resulta bien conocido el empleo de ceramidas en diferentes productos para el tratamiento y cuidado de la piel, pudiendo citarse al respecto, a título de mero ejemplo, la descripción de la patente norteamericana US-A-5830481. En realidad, en los productos comerciales actualmente existentes para el tratamiento de la piel se utilizan de manera preponderante las ceramidas de origen sintético.

Se han descrito algunos extractos de productos naturales ricos en ceramidas y su eventual utilización en cosmética. Así, en la solicitud de patente FR-A-2753200 se describe un extracto de la lecitina de la soja, en la solicitud de patente PCT WO92/13543 se describe un extracto de larvas de gusano de seda y en las solicitudes de patente FR-A-2739853 y WO-A-98/46558 se describen extractos de hojas de morera.

En nuestra solicitud de patente española nº P9901541, se describe la utilización para el tratamiento de la piel de extractos de los lípidos internos de la lana

ricos en ceramidas, haciendo especial hincapié en que dichos lípidos internos de la lana no provienen de la lanolina ni guardan relación directa con ella.

La lanolina es el conjunto de lípidos que se encuentra en la superficie de las fibras de lana. Dichos lípidos son secretados por las glándulas sebáceas de la piel de la oveja, se depositan en la superficie de las fibras mediante simple contacto, y no guardan relación con los lípidos de las estructuras internas de las fibras de la lana, cuyo origen es endógeno.

Resulta conocido el empleo de lanolina, así como la de algunas de sus fracciones, en productos cosméticos y farmacéuticos para el cuidado de la piel, aunque hasta la fecha los autores de la presente invención no conocen que se haya descrito que determinadas fracciones de la lanolina pueden contener proporciones relativamente elevadas de ceramidas naturales capaces de reforzar la actividad protectora de la piel del estrato córneo con una eficacia superior a la propia de la lanolina, cuyo empleo cosmético suele limitarse al de una mera base adicional en composiciones que pueden además contener ceramidas de origen sintético.

En la patente US2758125 se describe una fracción de lanolina, denominada "lanolin oil", obtenida mediante la disolución de lanolina en una mezcla de disolventes caliente, por ejemplo una mezcla de n-heptano y metietilcetona, eliminación de la masa grasa que se separa al enfriar, y aislamiento de la fracción "ligera" por evaporación de los disolventes. En la mencionada patente se describe que el "lanolin oil" obtenido puede ser utilizado en composiciones cosméticas, si bien no se indican detalles sobre los componentes que contiene. En las patentes US3052608, US3666857 y US4279262 se hace referencia adicional al uso cosmético del "lanolin oil" descrito en la patente US2758152, anteriormente mencionada.

En la patente US4091035 se describe el fraccionamiento de la lanolina mediante su disolución en n-hexano y la extracción de la disolución obtenida con etanol al 93%. En este caso, la fracción polar se descarta expresamente para su posible uso cosmético. Por su parte, en la patente US4138416, la eliminación de los componentes polares de la lanolina se efectúa mediante elución de una disolución de la misma en hexano a través de una columna provista de un relleno capaz de retener los componentes polares. La fracción útil a los efectos cosméticos es la que se obtiene mediante evaporación del hexano.

En la patente US4165327 se describe un fraccionamiento de la lanolina consistente en la extracción con una mezcla de metanol y agua de una disolución de lanolina en hexano. En este caso solo se aprovecha para uso cosmético la fracción apolar y la fracción metanólica, polar, se descarta.

5 Por último, en las patentes US4960592 y US5641809 se describe el uso cosmético de una mezcla de lanolina y "lanolin oil" obtenido por "cristalización fraccionada" de la lanolina en disolventes, que es el método utilizado en la patente US2758125 anteriormente mencionada. En estas patentes se hace una descripción detallada de los componentes de la lanolina y el "lanolin oil" sin hacer mención a la
10 existencia de ceramidas.

Los análisis efectuados en las fracciones de "lanolin oil" o "lanolin alcohols" accesibles comercialmente muestran que las mismas contienen proporciones muy bajas de ceramidas, por lo general inferiores al 3% en peso.

Así pues, en el estado de la técnica anteriormente expuesto no se describe
15 explícitamente que determinadas fracciones de lanolina contengan ceramidas, y tampoco se describe, ni explícita ni implícitamente, el uso cosmético de fracciones de lanolina que contengan proporciones relativamente elevadas de ceramidas. De hecho, lo descrito en varias de las patentes mencionadas induce al experto a descartar "a priori" el uso cosmético de fracciones polares de lanolina, tales como las que provienen de la
20 extracción con disolventes alcohólicos o acuoso-alcohólicos de una disolución de lanolina en un disolvente netamente apolar como por ejemplo el hexano.

Dada la preponderancia actual del empleo de ceramidas sintéticas en la preparación de productos cosméticos y para el tratamiento de la piel, se mantiene la necesidad de encontrar nuevos extractos naturales ricos en ceramidas procedentes de
25 materiales accesibles y baratos, y la lanolina es un material que, debido a que se produce habitualmente como subproducto en la industria de obtención de fibras de lana, resulta especialmente barato y accesible.

Objeto de la invención

30 El objeto de la presente invención es la utilización de fracciones de lanolina ricas en ceramidas para preparar productos cosméticos y para el tratamiento de la piel.

Dentro del objeto de la presente invención deben considerarse también las composiciones cosméticas y farmacéuticas que contienen fracciones de lanolina ricas en ceramidas.

5 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que la lanolina contiene ceramidas naturales en proporciones relativamente bajas y que, a partir de la lanolina, se pueden obtener fracciones enriquecidas en dichas ceramidas naturales que muestran una importante actividad protectora e hidratante de la piel, al menos similar a la propia de las ceramidas utilizadas hasta la fecha, lo que permite su utilización en la preparación de composiciones cosméticas y dermatológicas.

Siendo la lanolina un producto natural muy barato y de fácil acceso, la presente invención permite sustituir con ventaja a las ceramidas sintéticas y a los extractos naturales conocidos hasta la fecha en la preparación de las mencionadas composiciones.

A los efectos de la presente invención, una fracción de lanolina enriquecida en ceramidas es la que contiene al menos un 4% en peso de ceramidas naturales de la lana, preferiblemente al menos un 5% en peso, más preferiblemente al menos un 10% en peso.

Las fracciones de lanolina enriquecidas en ceramidas pueden ser obtenidas mediante extracción de una disolución de lanolina en un disolvente apolar con un disolvente de tipo alcohólico o acuoso-alcohólico. La fracción alcohólica o acuoso-alcohólica de la lanolina, una vez eliminado el disolvente por métodos convencionales, por ejemplo mediante evaporación del mismo, es la que resulta útil a los efectos de la presente invención por contener los niveles de ceramidas requeridos.

El disolvente apolar puede ser un disolvente hidrocarbonado alifático, preferiblemente n-hexano o n-heptano, y la proporción de lanolina respecto del disolvente apolar puede estar comprendida entre 10 y 100 g/L, preferiblemente entre 20 y 80 g/L.

El disolvente alcohólico puede ser un alcohol alifático de cadena de hasta ocho carbonos, lineal o ramificado, preferiblemente metanol, etanol, isopropanol, n-propanol o n-butanol, más preferiblemente metanol o etanol. La proporción de agua en

el caso de un disolvente acuoso-alcohólico puede estar comprendida entre 5% (v/v) y el 40% (v/v), preferiblemente entre el 10% (v/v) y el 30% (v/v).

La temperatura de extracción puede estar comprendida entre los 0° C y los 40° C, siendo preferible una temperatura comprendida entre 15° C y 25° C.

5 Resultan especialmente preferidos los métodos de fraccionamiento consistentes en disolver la lanolina en n-hexano, proceder a la extracción de la disolución hexánica, a temperaturas cercanas a la ambiente, con metanol o una mezcla de metanol y agua 4:1 (v/v), y finalmente eliminar el disolvente metanólico o acuoso-metanólico mediante evaporación del mismo.

10 Cuando se utiliza metanol como disolvente de extracción se pueden obtener fracciones de lanolina que contienen del orden del 5% en peso de ceramidas y representan el 15% - 20% en peso de la lanolina de partida, mientras que con una mezcla metanol/agua 4:1 (v/v) se pueden obtener fracciones que contienen del orden del 15% en peso de ceramidas y representan el 2,0% - 2,5% en peso de la lanolina de
15 partida.

La eliminación de los disolventes alcohólicos o acuoso-alcohólicos de las disoluciones obtenidas durante el proceso de extracción conduce a la obtención de las fracciones de lanolina enriquecidas en ceramidas apropiadas para el objeto de la presente invención, que pueden ser empleadas indistintamente en forma de disoluciones
20 oleosas en disolventes lipofílicos fisiológicamente aceptables, o en forma de estructuras liposómicas, por ejemplo semejantes a las descritas en la publicación L. Coderch et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1713-1718 (1996), resultando preferidas las formas liposómicas debido a su estabilidad, facilidad de manejo y formulación, y a su excelente capacidad de absorción por la piel.

25 Los ensayos de aplicación de las fracciones de lanolina así obtenidas sobre la piel humana, que se explicarán con más detalle en el apartado de ejemplos, muestran que dichas fracciones manifiestan una acusada capacidad para reducir la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) y una mejora en la capacidad de hidratación de la piel, sobre todo en condiciones de agresión química de la misma, con valores
30 claramente comparables a los obtenidos con composiciones de ceramidas comerciales que imitan la naturaleza de los lípidos del estrato córneo.

Por ello, las fracciones de lanolina objeto de la invención pueden ser formuladas de manera ventajosa, en distintas proporciones, como componentes esenciales en composiciones farmacéuticas y/o cosméticas para el cuidado y tratamiento de la piel humana.

5 Las composiciones farmacéuticas y/o cosméticas mencionadas pueden ser de cualquiera de los tipos conocidos por el experto para su aplicación tópica, tales como pomadas, ungüentos, cremas, emulsiones, soluciones, tinturas, etc., que pueden ser preparadas mediante la asociación de las fracciones de lanolina con excipientes fisiológicamente aceptables y otros componentes de acabado adecuados, utilizando
10 técnicas bien conocidas por el experto tales como el mezclado, disolución, emulsión, etc. A modo de referencia, pueden resultar apropiados, por ejemplo, los tipos de composición y aditivos y componentes auxiliares descritos en la patente norteamericana US-A-5830481.

Las composiciones así obtenidas muestran una excelente capacidad de
15 refuerzo de la barrera lipídica protectora de la piel humana y mejoran sensiblemente el grado de hidratación de la misma.

Los ejemplos que siguen a continuación se exponen a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación suficientemente clara y completa de la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los
20 aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Ejemplos

25 Ejemplo 1.- Obtención de una fracción de lanolina enriquecida en ceramidas mediante extracción con metanol.

Se disuelven a temperatura ambiente 60 g de lanolina en 1 L de n-hexano y, en un embudo de decantación apropiado, se coloca la disolución hexánica de lanolina, junto con 250 mL de metanol, y se procede a agitar vigorosamente durante cinco
30 minutos. Se deja reposar el embudo de decantación el tiempo necesario como para que decanten las fases y se colecta la fase inferior metanólica. La fase superior hexánica se

extrae dos veces más, con 250 mL de metanol cada vez, y se reúnen las fases metanólicas, descartándose la fase hexánica.

Se elimina el metanol mediante un rotavapor, obteniéndose una fracción de lanolina que pesa entre 9 y 12 g, en función del grado de agotamiento del disolvente.

5

Ejemplo 2.- Obtención de una fracción de lanolina enriquecida en ceramidas mediante extracción con metanol/agua.

Se disuelven a temperatura ambiente 20 g de lanolina en 1 L de n-hexano y, en un embudo de decantación apropiado, se coloca la disolución hexánica de lanolina, junto con 250 mL de metanol/agua 4:1 (v/v), y se procede a agitar vigorosamente durante cinco minutos. Se deja reposar el embudo de decantación el tiempo necesario como para que decanten las fases y se colecta la fase inferior acuoso/metanólica. La fase superior hexánica se extrae dos veces más con 250 mL de metanol/agua 4:1 (v/v) cada vez y se reúnen las fases acuoso/metanólicas, descartándose la fase hexánica.

15 Se eliminan el metanol y el agua mediante un rotavapor, obteniéndose una fracción de lanolina que pesa entre 0,4 y 0,5 g, en función del grado de agotamiento del disolvente.

Ejemplo 3.- Contenido en ceramidas de las fracciones de lanolina.

20 Para la cuantificación de los lípidos se utiliza un analizador automático TLC/FID IATROSCAN MK-5 (Iatron Lab. Ink. Tokyo, Japón). Las condiciones de trabajo del aparato escogidas son las recomendadas en la literatura para obtener unos resultados óptimos: Flujo de aire: 2000 mL/min; flujo de hidrógeno: 160-180 mL/min; velocidad de barrido: 2-3 mm/s. Los datos se procesan mediante el programa de software BOREAL v.2.5.

25 Las fracciones de la lanolina se depositan directamente con un aplicador automático (Sample spotter SES 3202/IS-01, Alemania) sobre columnas de sílica (Sílica gel SIII Chromarods) y se eluyen verticalmente hasta 10 cm mediante tres sistemas disolventes en orden de polaridad creciente. El sistema hexano/éter dietílico/ ácido fórmico (47:23:0,3) sirve para separar los lípidos apolares y cuantificarlos mediante un barrido parcial del 85%. Los sistemas cloroformo/hexano/acetona/metanol (55:5:7:3) y 30 posteriormente cloroformo/hexano/acetona/metanol (50:10:9:1), sirven para separar y

cuantificar los lípidos polares restantes. Después de cada elución se procede a la eliminación del disolvente por calefacción a 60° C, seguido de enfriamiento en cámara a temperatura ambiente y sequedad. El mismo procedimiento se aplica a los estándares (Ácido palmítico y colesterol de Fluka Chemicals Co. (Buchs, Suiza); éster de
5 colesterol, 7OH-colesterol, triglicéridos, diglicéridos, galactoceramida, ceramida tipo II y tipo IV de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EEUU); Ceramida tipo III y Tipo VI(b) de Cosmoferm (Delft, Países Bajos) para así determinar sus curvas de calibración y posteriormente poder cuantificar cada componente.

Mediante el método indicado se analizan los siguientes productos
10 derivados de la lanolina:

- LAN-1: Lanolina anhidra comercializada por la compañía Lanolines Stella bajo la marca STELLUX AI.
- LAN-2: Lanolina utilizada como producto de partida en los ejemplos 1 y 2.
- LOI-1: "Lanolin oil" comercializado por la compañía Lanolines Stella bajo la
15 marca STELLANOL.
- LOI-2: "Lanolin oil" comercializado por la compañía Lanolines de la Tossée bajo la marca LANOR CRYSTAL.
- LOL-1: "Lanolin alcohols" comercializado por la compañía Lanolines de la Tossée bajo la marca LANOR A.
- 20 LC-M: Fracción de lanolina obtenida de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 1.
- LC-MA: Fracción de lanolina obtenida de acuerdo con lo descrito en el ejemplo 2.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I, en la que los resultados numéricos se expresan en % en peso sobre el peso total de muestra analizada.

Tabla 1.- Análisis de fracciones de lanolina

	LAN-1	LAN-2	LOI-1	LOI-2	LOL-1	LC-M	LC-MA
Ceras	54,4	48,4	43,6	48,9	1,8	34,5	3,2
Acidos grasos	12,7	10,3	14,9	20,7	10,0	11,7	2,3
Alcoholes superiores	6,1	4,4	4,4	5,8	43,9	14,6	1,4
Esteroles	3,4	2,6	3,4	3,9	30,6	6,3	8,2
Ceramida II	0,4	1,1	0,5	0,5	0	1,7	5,7
7OH-colesterol	1,1	1,3	1,2	1,3	4,4	2,4	6,0
Ceramida III/IV	0,8	1,0	0,8	0,9	1,2	1,8	5,3
Ceramida VI (b)	1,0	1,7	1,1	1,2	1,3	2,3	4,8
Cerebrósidos	2,2	2,6	2,4	3,1	2,5	4,1	5,9
% de lípido analizado	82,1	73,3	72,3	86,3	95,6	79,3	42,8
% Ceramidas	2,3	3,7	2,4	2,6	2,48	5,8	15,8

El % de lípido analizado corresponde al total de lípidos analizables con el método empleado. El resto hasta el 100% corresponde a derivados del colesterol, alguno de ellos desconocido, a compuestos polares, fracciones proteicas, etc.

De los resultados expresados en la tabla, se deduce con claridad lo siguiente:

- La lanolina industrial contiene ceramidas en proporciones significativas, aunque relativamente bajas (inferiores al 4% en peso).
- Las fracciones de "lanolin oil" o "lanolin alcohols" accesibles comercialmente presentan un bajo contenido en ceramidas, semejante al de la lanolina.
- Las fracciones de lanolina apropiadas para el objeto de la presente invención (ejemplos 1 y 2) presentan un contenido en ceramidas sensiblemente más elevado que el de la lanolina y el de las fracciones comerciales antes mencionadas, del orden del 5% o superior, siendo de destacar el elevado contenido ceramídico de las fracciones obtenidas por extracción con disolventes acuoso-alcohólicos, que llega a ser superior al 15% en peso.

Ejemplo 4.- Procedimiento de obtención de formas liposómicas aptas para su aplicación dermatológica.

Técnica general.- La muestra lipídica disuelta en cloroformo/metanol 2:1 (v/v) se evapora a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno, y la película formada en las paredes del recipiente se resuspende con el volumen adecuado de solución de NaCl al 0.9% en peso para obtener una suspensión de concentración lipídica de 25 mg/mL. La formación de liposomas multilamelares se lleva a cabo sonicando la muestra a 65° C, que es una temperatura superior a la de transición de fases de los lípidos implicados, durante 15 minutos en un sonicador LABSONIC 1510 (B. Braun, Germany).

Después de 24 h de reposo a temperatura ambiente, la obtención de liposomas unilamelares de tamaño definido se realiza extrusionando la suspensión de liposomas multilamelares tres veces, a 65° C, a través de filtros de tamaño de poro de 800, 400 y 200 nm (MILLIPORE, Irlanda), proporcionando una suspensión de liposomas cuyo tamaño se comprueba que es aproximadamente de 200 nm mediante la técnica de Light Scattering, empleando un espectrómetro de fotocorrelación AUTOSIZER IIc (Malvern, UK).

Utilizando la técnica general expuesta se preparan tres muestras liposómicas:

Liposomas A: Preparados a partir de una composición lipídica de ceramidas comerciales que imita la propia del estrato córneo de la piel humana, preparada previamente mediante mezcla de 40% ceramidas III (Cosmoferm, Delft, Holanda), 25% colesterol, 25% ácido palmítico y 10 % sulfato de colesterol (Fluka Chemicals Co., Buchs, Suiza).

Liposomas B: Que contienen 40% de la fracción de lanolina LC-MA obtenida en el ejemplo 2, 25% colesterol, 25% ácido palmítico y 10 % sulfato de colesterol (Fluka Chemicals Co., Buchs, Suiza).

Liposomas C: Que contienen solamente la fracción de lanolina LC-M obtenida en el ejemplo 1.

Ejemplo 5.- Estudio de la eficacia en la piel humana sana.

La finalidad de este ensayo es evaluar el efecto de la aplicación tópica de los liposomas formados a partir de las fracciones de lanolina ricas en ceramidas sobre la función barrera y la hidratación de la piel sana, y compararlo con el efecto que producen los liposomas obtenidos a partir de una composición lipídica que simula la propia del estrato córneo (SC) humano.

La evaluación de estas propiedades de la piel se efectúa mediante mediciones realizadas con el Tewameter® TM 210 y el Corneometer® CM 825, ambos de Courage & Khazaka (Germany). El Tewameter mide la pérdida transepidérmica de agua (TEWL), lo que indica el estado de la función barrera de la piel. Valores elevados de TEWL se corresponden con una función barrera pequeña, es decir, una piel menos protegida frente a la agresión externa y con menor capacidad de limitar la entrada de sustancias extrañas dentro del cuerpo y la salida de agua hacia el exterior. El Corneometer se basa en la medida de la capacitancia de la piel, en unidades arbitrarias, la cual está directamente relacionada con la cantidad de agua presente en la misma y, por lo tanto, se trata de un instrumento eficaz en la determinación de la hidratación cutánea.

En los estudios de eficacia de las muestras participaron 7 voluntarios sanos, 6 mujeres y 1 hombre, de edad comprendida entre 25 y 57 años. Durante el periodo de tratamiento se permitió que los sujetos se lavaran con normalidad. Sin embargo, se les advirtió de no aplicar ningún otro tipo de producto para el cuidado de la piel en los antebrazos.

En 10 días se realizaron 8 aplicaciones en zonas intactas del antebrazo de $4.4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de las muestras Liposomas A y Liposomas B, descritas en el ejemplo 4, y un placebo inocuo e inefectivo. El grado de hidratación cutánea se evaluó cada día y siempre antes de realizar la aplicación tópica. Asimismo, se evaluó el TEWL en condiciones basales (día 1) y 24h después de la última aplicación (día 11).

Los valores obtenidos para la capacitancia de la piel y el TEWL se expresan en las tablas 2 y 3, doblemente relativizados como porcentaje de variación respecto a los valores basales y los valores de la zona no tratada o control.

Tabla 2.- Variación de la capacitancia, expresada como % de variación sobre los valores basales y control

Día	Placebo	Liposomas A	Liposomas B
2	96	98	100
3	104	106	102
4	104	108	103
5	105	107	108
8	98	102	99
9	97	105	102
10	99	106	103

Tabla 3.- Variación del TEWL al final del tratamiento, expresada como % de variación sobre los valores basales y control

5

Muestra	TEWL
Placebo	98,3
Liposomas A	99,0
Liposomas B	95,7

De los resultados observados en las tablas 2 y 3 se deduce que ambos tipos de liposomas producen un aumento de la hidratación en las zonas tratadas, del orden del 7% – 8% a partir del quinto día de tratamiento. Además, los liposomas B producen una disminución del TEWL del orden del 5% lo que indica una mejora apreciable, aunque ligera, de la función barrera de la piel sana.

10

Ejemplo 6.- Estudio de la protección de la piel humana frente a la dermatitis de contacto inducida por un detergente.

15

Tras el tratamiento descrito en el ejemplo 5, las zonas que habían sido tratadas con las diferentes muestras liposómicas, así como la zona control, se expusieron durante 24 h a una solución acuosa de laurilsulfato sódico (SLS) mediante un parche oclusivo. Para ello se aplicaron 50µl de una solución de SLS (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0.5% en un disco de papel de filtro colocado en el interior de la cámara de aluminio del parche (d=12mm, Large Finn Chamber, Epitest Oy, Finlandia).

20

El grado de irritación resultante se evaluó, al cabo de 24h de retirar el parche, mediante la medición del TEWL.

Los resultados se expresan en la tabla 4 como variación del TEWL respecto el valor basal, tomando como éste el obtenido en el ejemplo 5 para el día 11.

5

Tabla 4.- Variación del TEWL tras la exposición a SLS.

Muestra	TEWL (% valor basal)
Control	222,2
Placebo	221,2
Liposomas A	203,1
Liposomas B	202,7

Se observa que la exposición al SLS afectó en menor grado a aquellas zonas que habían sido tratadas previamente con las soluciones liposómicas. Es decir, podría interpretarse que los liposomas A y B se han incorporado a los lípidos intercelulares del estrato córneo, reforzando así la barrera y, por lo tanto, disminuyendo la susceptibilidad hacia la dermatitis de contacto irritante inducida por el SLS.

Ejemplo 7.- Estudio de la reparación de la piel humana con dermatitis de contacto inducida por un detergente.

15

Con el objeto de inducir una dermatitis de contacto irritante, se aplicaron parches oclusivos con SLS en zonas de piel intacta del antebrazo de los siete voluntarios del ejemplo 5. En este caso se aplicaron 50µl de una solución acuosa de SLS al 2% y el parche (Large Finn Chambers, 12mm) se dejó en contacto con la piel durante 4h. El TEWL se utilizó como parámetro en la determinación de la alteración de la función barrera, de manera que se evaluó antes de la exposición al SLS y 20 h después de retirar el parche.

Tras la agresión química producida por el SLS, se aplicaron diariamente durante 10 días 5µl de las 3 muestras liposómicas descritas en el ejemplo 4 y del placebo. Se realizaron medidas de TEWL los días 1, 3, 7 y 11 después de la exposición

25

al SLS y, siempre antes de realizar la aplicación de las muestras, con la finalidad de estudiar la recuperación de la función barrera alterada por el SLS.

En la tabla 5 se muestran los valores de TEWL obtenidos antes y después del tratamiento con SLS que, lógicamente, muestran el incremento esperado después de la agresión química.

Tabla 5.- Valores de TEWL antes y después de la agresión con SLS
(media \pm desviación estándar, n=7)

Zona	TEWL basal	TEWL después SLS
Control	8,7 \pm 1,9	16,5 \pm 7,1
Placebo	8,8 \pm 2,5	16,1 \pm 7,5
Liposomas A	8,8 \pm 2,1	16,8 \pm 7,9
Liposomas B	9,6 \pm 2,4	14,6 \pm 7,2
Liposomas C	9,4 \pm 1,9	16,5 \pm 7,3

En el estudio de la recuperación de la función barrera, los valores de TEWL se relativizaron doblemente de manera que el 100% indica la agresión producida por el SLS y el 0% representa el estado basal, es decir, la recuperación completa. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Recuperación de TEWL a lo largo del tratamiento.
Variación de TEWL en porcentaje sobre valor basal y control.

	Día 3	Día 7	Día 11
Control	66,7	44,9	29,5
Placebo	89,0	53,4	32,9
Liposomas A	56,3	37,5	21,3
Liposomas B	64,0	42,0	24,0
Liposomas C	73,2	40,8	22,5

Durante los 10 días de estudio posteriores a la exposición de SLS se observa una disminución progresiva de los valores de TEWL. Cabe destacar que en aquellas zonas tratadas con los liposomas de los tres tipos se produce una aceleración en

el proceso de recuperación de la función barrera, en comparación con la reparación fisiológica observada en la zona no tratada (control). Por el contrario, la aplicación tópica del placebo disminuye la velocidad de la reparación de la barrera cutánea.

En resumen, de los resultados obtenidos en los ejemplos 5 a 7 se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 5 • La aplicación tópica diaria de las fracciones de lanolina ricas en ceramidas en la piel humana sana aumenta la hidratación cutánea y promueve una acción protectora, disminuyendo la susceptibilidad de la piel al estímulo irritante en un 20%.
- 10 • Las mencionadas fracciones de lanolina poseen una capacidad para acelerar el proceso de reparación de la función barrera de la piel alterada por un detergente al menos similar al de las ceramidas convencionales utilizadas hasta la fecha.
- 15 • En general, las fracciones de la lanolina ricas en ceramidas (Liposomas B y C) producen efectos similares a aquellos obtenidos con ceramidas sintéticas (Liposomas A) cuando se aplican tópicamente tanto en pieles sanas como en aquellas alteradas por un detergente.

REIVINDICACIONES

1.- El uso de fracciones de lanolina que contienen al menos un 4% en peso de ceramidas naturales de la lana para la preparación de composiciones cosméticas y/o farmacéuticas para el tratamiento de la piel humana.

2.- El uso según la reivindicación 1, caracterizado porque las fracciones de lanolina contienen al menos un 10% en peso de ceramidas naturales de la lana.

3.- El uso según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque las fracciones de lanolina contienen al menos un 15% en peso de ceramidas naturales de la lana.

4.- Una composición cosmética y/o farmacéutica para el tratamiento de la piel humana caracterizada porque comprende una fracción de lanolina que contiene al menos un 4% en peso de ceramidas naturales de la lana.

5.- Una composición según la reivindicación 4, caracterizada porque comprende una fracción de lanolina que contiene al menos un 10% en peso de ceramidas naturales de la lana.

6.- Una composición según las reivindicaciones 4 y 5, caracterizada porque comprende una fracción de lanolina que contiene al menos un 15% en peso de ceramidas naturales de la lana.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 02/00090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC⁶ A61K 7/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPOQUE, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5830481 A (DANIELE CAUWET-MARTIN et al.) 03.11.1998 column. 1, lin. 20-30; column. 4 lin. 57-62; fig. 5 y 11	1-6
X	WO 0104244 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 18.01.2001 THE WHOLE DOCUMENT	1-6
A	FR 2753200 A1 (PIERRE FABRE DERMOCOSMETIQUE SOCIETE ANONYME) 13.03.1998	
A	WO 9846558 A1 (CABINET CHANET JACQUES) 22.10.1998	
A	L. CORDERCH et al. The Effect of Liposomes on Skin Barrier Structure. Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol. 1999:12;235-246	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 JUNE 2002 (20.06.02)		28 JUNE 2002 (28.06.02)
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 02/00090

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5830481	03.11.1998	CA 2158622 PL 310714 EP 0704200 FR 2725130 JP 8113511 HU 73034 CN 1129558 BR 9504727 AT 155677 DE 69500457 ES 2109062 KR 181335 RU 2133117 HU 217525 US 6039962 PL 181245	30.03.1996 01.04.1996 03.04.1996 05.04.1996 07.05.1996 28.06.1996 28.08.1996 08.10.1996 15.08.1997 04.12.1997 01.01.1998 20.03.1999 20.07.1999 28.02.2000 21.03.2000 29.06.2001
----- WO 0104244	----- 18.01.2001	----- AU 5408400 ES 2157807 EP 1201736	----- 30.01.2001 16.08.2001 02.05.2002
----- FR 2753200	----- 13.03.1998	----- NONE	-----
----- WO 9846558	----- 22.10.1998	----- FR 2739853 AU 2642297	----- 18.04.1997 11.11.1998
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 02/00090

<p>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD CIP⁷ A61K 7/00 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.</p>		
<p>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</p>		
<p>Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación) CIP⁷ A61K</p>		
<p>Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda</p>		
<p>Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, EPOQUE, BIOSIS, MEDLINE</p>		
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</p>		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	US 5830481 A (DANIELE CAUWET-MARTIN et al.) 03.11.1998 column. 1, lin. 20-30; colum. 4 lin. 57-62; fig. 5 y 11	1-6
X	WO 0104244 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 18.01.2001 todo el documento	1-6
A	FR 2753200 A1 (PIERRE FABRE DERMOCOSMETIQUE SOCIETE ANONYME) 13.03.1998	
A	WO 9846558 A1 (CABINET CHANET JACQUES) 22.10.1998	
A	L. CORDERCH et al. The Effect of Liposomes on Skin Barrier Structure. Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol. 1999;12;235-246	
<p><input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo</p>		
<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>		
<p>Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 20 junio 2002 (20.06.2002)</p>		<p>Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 28 JUN 2002 23.06.02</p>
<p>Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá, 1, 28071-Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304</p>		<p>Funcionario autorizado M. Ybarra n° de teléfono + 34 91 34 95536</p>

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 02/00090

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5830481	03.11.1998	CA 2158622 PL 310714 EP 0704200 FR 2725130 JP 8113511 HU 73034 CN 1129558 BR 9504727 AT 155677 DE 69500457 ES 2109062 KR 181335 RU 2133117 HU 217525 US 6039962 PL 181245	30.03.1996 01.04.1996 03.04.1996 05.04.1996 07.05.1996 28.06.1996 28.08.1996 08.10.1996 15.08.1997 04.12.1997 01.01.1998 20.03.1999 20.07.1999 28.02.2000 21.03.2000 29.06.2001
WO 0104244	18.01.2001	AU 5408400 ES 2157807 EP 1201736	30.01.2001 16.08.2001 02.05.2002
FR 2753200	13.03.1998	NINGUNO	
WO 9846558	22.10.1998	FR 2739853 AU 2642297	18.04.1997 11.11.1998