

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 680**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/28** (2006.01)  
**A61K 36/286** (2006.01)  
**A61K 31/201** (2006.01)  
**A61K 31/231** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 8/37** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2007.01)  
**A61K 47/14** (2007.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2016 PCT/EP2016/070438**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17037075**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2016 E 16758171 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3344270**

54 Título: **Composición que contiene un extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico**

30 Prioridad:

**31.08.2015 DE 102015011132**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.07.2021**

73 Titular/es:

**DR. AUGUST WOLFF GMBH & CO. KG  
ARZNEIMITTEL (100.0%)  
Sudbrackstrasse 56  
33611 Bielefeld, DE**

72 Inventor/es:

**SOEBERDT, MICHAEL;  
ABELS, CHRISTOPH y  
KNIE, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María**

ES 2 845 680 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

Composición que contiene un extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y cosméticas elaboradas a partir de un extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico, en particular emulsiones que contienen un extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico como combinación de principios activos, y al uso de dichas composiciones como medicamento, producto médico y/o cosmético.

**Antecedentes de la técnica**

10 Las preparaciones de equinácea púrpura (*Echinacea purpurea* y *Echinacea angustifolia*) se utilizan ampliamente en el tratamiento de resfriados e infecciones de las vías respiratorias superiores. En general, se supone que el efecto de la *Echinacea* es posible gracias a las interacciones con el sistema inmunitario. Se pudo demostrar que una determinada proporción en los extractos de *Echinacea*, cuyo efecto antiinflamatorio ya ha sido descrito por otros grupos de trabajo, influye en el sistema cannabinoide endógeno. Esta proporción es de la clase de alquilamidas (Raduner S y col., J Biol Chem 2006, 281, 14192-14206). Estas alquilamidas muestran una actividad inmunomoduladora (Gertsch J, Planta Med 2008, 74, 638-650).

20 La capsaicina es un agonista del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), que muestra efectos antinociceptivos y antipruriginosos después de la administración tópica. Las formas de dosificación tópica de capsaicina son, entre otras cosas, para el tratamiento del prurito inducido por hemodiálisis (Breneman DL, y col. J Am Acad Dermatol 1992, 26, 91-94), acuagénico (Lotti T, y col. J Am Acad Dermatol 1994, 30, 232-235) y braquiorradial (Goodless DR, Eaglestein WH, J Am Acad Dermatol 1993, 29, 783-784). Otras áreas de aplicación son neuralgia parestésica (Leibsohn E, Cutis 1992, 49, 335-336) y prurigo nodular (Ständer S, Luger T, Metze D, J Am Acad Dermatol 2001, 44, 471-478).

25 Los componentes de *Echinacea purpurea* se han descrito como inhibidores de la tirosinasa (Jiang L, y col., J Med Plants Res 2012, 6, 5317-5321). La actividad de la tirosinasa está relacionada con la producción de melanina por los melanocitos (Kim, YJ, Uyama H, Cell Mol Life Sci 2005 62, 1707-23). Por tanto, la inhibición de la tirosinasa puede conducir a una biosíntesis reducida de melanina, que a su vez conduce a una pigmentación reducida, por ejemplo, de la piel. Esto puede conducir a alteraciones cosméticas cuando se utilizan preparaciones que contienen un inhibidor de la tirosinasa, tal como un extracto de *Echinacea*, ya que podría haber diferencias en la pigmentación de la piel tratada y no tratada.

30 Se ha descrito la mejora del estado de la piel después del tratamiento con una formulación con un extracto de *Echinacea* (Yotsawimonwat S, y col., Int J Cosm Sci 2010, 32, 340-346). Para este propósito, se usaron extractos alcohólicos de las partes aéreas de plantas de *Echinacea purpurea*. Se demostró que tanto una formulación en crema como en gel, que contienen el extracto alcohólico de *Echinacea*, mejoran la hidratación de la piel en los sujetos de prueba sin dañar la barrera. Sin embargo, la vida útil de las preparaciones fue muy limitada. A 4 °C fue de 2 y 4 meses, respectivamente, para la crema y el gel. Añadiendo un antioxidante, la vida útil podría aumentarse a 7 meses.

Además de los conocidos efectos inmunoestimuladores y antiinflamatorios de los extractos de *Echinacea purpurea*, existen hallazgos controvertidos de estudios clínicos con respecto a los efectos secundarios con preparaciones que contienen *Echinacea* (Manayi A, Varizian M, Saeidnia S, Pharmacogn Rev 2015, 9, 63-72). Por ejemplo, se han observado prurito, eritema y urticaria como efectos secundarios graves del tratamiento con *Echinacea*.

40 El documento WO 2012/013551 A1 desvela un extracto de *Echinacea angustifolia* en combinación con aceite de semilla de linaza, oliva u onagra.

En el artículo "Echinacea pupurea, Planta tota 10 % Salbe", 1 de diciembre de 2005 se desvela una combinación de *Echinacea purpurea* con aceite de sésamo.

El documento US 2009/197974 A1 describe la combinación de aceite de cártamo y *Echinacea angustifolia*.

45 El artículo "Anti-inflammatory activity of alkylamides from *Echinacea purpurea*...", Soeberdt M. y col., Journal of Investigative Dermatology, Nature Publishing Group, EE. UU., Vol. 134, No. Supl. 1, 1. de mayo de 2014, describe los efectos antiinflamatorios de las alquilamidas de *Echinacea purpurea*.

50 El artículo "Comparison of shock wave therapy and nutraceutical composed of *Echinacea angustifolia*, alpha lipoic acid..." Notarnicola, Angela y col., International Journal of Immunopathology and Pharmacology, Sage Publications Ltd., GB, Vol. 28, No. 2, 1 de junio de 2015, páginas 256-262, describe el uso de *Echinacea angustifolia* en un nutracéutico para el tratamiento de CTS (síndrome del túnel carpiano).

El artículo "Effects of an *Echinacea* ointment on the regeneration of irritated skin", Holcova S. y col., Cosmetic Medicine 2004 DE, Volumen 25, No. 5-6, 1 de enero de 2004, páginas 247-251, describe los efectos de una pomada de *Echinacea* en la regeneración de la piel irritada y estresada.

### Definición del objetivo

El objetivo era proporcionar una combinación de principios activos que, en comparación con un extracto de *Echinacea* en solitario, presenta mejores propiedades. En particular, debería proporcionarse una composición que tenga un efecto antipruriginoso. Otro objetivo era mejorar la estabilidad de la formulación para permitir que la composición se usara comercialmente. Otro objetivo de la presente invención fue prevenir los efectos indeseables del extracto de *Echinacea*, que perjudican la aplicación cosmética. En particular, debe evitarse la formación de eritemas después del tratamiento con el extracto de *Echinacea*. También fue de particular interés evitar que el extracto de *Echinacea* tenga un impacto negativo en la formación de pigmentos en la piel.

Estos objetivos se consiguen mediante la presente solicitud según las reivindicaciones. En particular, se ha descubierto sorprendentemente que la composición según la invención tiene un excelente efecto antipruriginoso, por ejemplo, en pacientes con dermatitis atópica, y al mismo tiempo muestra una larga vida útil de al menos dos años a temperatura ambiente. Por tanto, el marketing comercial es muy posible. Además, se ha demostrado, según la invención, que la regeneración de la barrera cutánea natural se promueve de forma muy eficaz en sujetos de prueba y pacientes con una barrera cutánea ya alterada. También fue sorprendente que el tratamiento con las composiciones según la invención conduzca a un aumento significativo de los lípidos en la piel. En este contexto, cabe mencionar en particular el aumento de la ceramida de cadena larga EOS, que es particularmente importante para la estabilidad de las bicapas lipídicas del estrato córneo, ya que un  $\omega$ -hidroxiácido graso en la ceramida base está esterificado con ácido linoleico. La esterificación crea una cadena lateral de C36 que se extiende a la siguiente bicapa lipídica. Por tanto, se habla de la "función de clavo" de estas ceramidas.

El efecto antipruriginoso se evidencia, entre otras cosas, por una activación sorprendentemente clara del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) cuando se administra la combinación de principios activos según la invención. Además, el experto en la materia no esperaba que la combinación de los principios activos de *Echinacea* y ácido linoleico/derivados de ácido linoleico previniera el efecto indeseable conocido de la *Echinacea* sobre la formación de pigmentos de la piel. La alteración de la formación de pigmentos (pigmentación reducida) observada en la piel cuando se administra *Echinacea* no ocurre con la combinación, según la invención, de principios activos de *Echinacea* con ácido linoleico y/o derivados de ácido linoleico. Esto se evidencia por la sorprendente actividad tirosinasa no disminuida cuando se usa la combinación de principios activos según la invención.

Por tanto, la presente invención se refiere a una composición que contiene a) un extracto de *Echinacea* y b) ácido linoleico y/o derivados de ácido linoleico como se define en la reivindicación 1. El extracto de *Echinacea* es, preferentemente, un extracto lipófilo. El extracto de *Echinacea* es, de forma particularmente preferente, un extracto obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico. Según la invención, también se prefiere un contenido de alquilamida del extracto entre el 1 y el 50 %, preferentemente entre el 10 y el 40 % y de manera particularmente preferente entre el 15 y el 30 % (basándose en el peso).

Según la invención, la composición contiene los componentes a) y b) en las relaciones en peso de 1:1000 a 1:1; preferentemente 1:50 a 1:10. Además, la composición de la invención contiene, preferentemente, el 0,001-5 % en peso de extracto de *Echinacea*, preferentemente el 0,025-2 % en peso de extracto de *Echinacea*, de forma particularmente preferente el 0,05-1 % en peso de extracto de *Echinacea*, basándose en el peso de la composición total, y el 0,001-10 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,001-10 % en peso de ácido linoleico, preferentemente el 0,01-5 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,01-5 % en peso de ácido linoleico, basándose, en cada caso, en el peso de la composición total.

Preferentemente, la composición según la invención también contiene uno o varios adyuvantes cosméticos y/o farmacéuticos. La composición es, de forma particularmente preferente, una emulsión.

Según la invención, la composición se usa como medicamento, como producto médico o como cosmético. Se usa principalmente para el tratamiento de prurito, piel seca y/o piel irritada (por ejemplo, piel enrojecida después de quemaduras solares, abrasiones o piel irritada de otro modo, etc.), y también de afecciones inflamatorias de la piel, tales como en particular dermatitis atópica (neurodermatitis, eccema atópico). En una realización preferida, la piel es el cuero cabelludo.

Los componentes individuales de la composición según la invención se explican con más detalle a continuación.

El extracto de *Echinacea* usado según la invención como componente a) de la composición es de *Echinacea purpurea*, obteniéndose el extracto de raíz (*radix*). Según la invención, la extracción se puede realizar con disolventes orgánicos tales como alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol), soluciones acuosas de alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol), alcanos (por ejemplo, pentano, hexano, heptano), hidrocarburos clorados (por ejemplo, cloroformo, cloruro de metileno), cetonas (por ejemplo, metililecetona, acetona), o por extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>). Se prefieren los extractos lipófilos. La extracción con dióxido de carbono supercrítico es particularmente preferida según la invención, ya que se puede usar ácido carbónico de fuente natural y el extracto se puede obtener de manera suave y particularmente pura. Además, el disolvente CO<sub>2</sub> puede eliminarse fácilmente sin dejar residuos y reciclarse en un sistema de circuito cerrado.

El contenido de alquilamida en el extracto se encuentra preferentemente entre el 1 y el 50 %, preferentemente entre el 10 y el 40 % y de forma particularmente preferente entre el 15 y el 30 % (basándose en el peso). El contenido de alquilamida se puede determinar usando métodos analíticos conocidos. Un ejemplo es la determinación por espectrometría de masas del contenido de alquilamida. Además, la determinación del contenido de alquilamida puede realizarse cromatográficamente, por ejemplo, se puede realizar por cromatografía HPLC con sustancias de referencia.

El ácido linoleico y/o uno o más derivados de ácido linoleico están contenidos como segundo componente activo b) de la composición según la invención. El ácido linoleico es ácido (cis,cis)-octadeca-9,12-dienoico, un ácido graso diinsaturado con 18 átomos de carbono (18:2). Por tanto, es uno de los ácidos grasos omega-6. Según la invención, se pueden usar tanto ácido linoleico libre como un derivado de ácido linoleico. El aceite de cártamo, el aceite de germen de trigo y el aceite de colza son según la invención. Los derivados de ácido linoleico y el ácido linoleico pueden extraerse de estos aceites de una manera conocida antes de su uso. Como alternativa, los aceites y grasas naturales se pueden usar directamente como el componente de ácido linoleico b) en la composición según la invención. Se prefiere particularmente el aceite de cártamo.

Las proporciones de los componentes a) y b) en la composición son, preferentemente, las siguientes: el 0,001-5 % en peso de extracto de *Echinacea*, preferentemente el 0,025-2 % en peso de extracto de *Echinacea*, de forma particularmente preferente el 0,05-1 % en peso de extracto de *Echinacea*, basándose en el peso de la composición total, y el 0,001-10 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,001-10 % en peso de ácido linoleico, preferentemente el 0,01-5 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,01-5 % en peso de ácido linoleico, basándose, en cada caso, en el peso de la composición total. Además del extracto de *Echinacea*, las composiciones según la invención no contienen preferentemente más extracto, en particular ningún extracto vegetal adicional. La fuente de ácido linoleico (los aceites y grasas naturales reivindicados tales como el aceite de cártamo) no debe entenderse según la invención como un extracto.

Las composiciones según la invención también contienen, preferentemente, uno o varios adyuvantes cosméticos o farmacéuticos. Las composiciones según la invención se encuentran, preferentemente, en forma de emulsión y de forma particularmente preferente como formulación tópica. Es particularmente adecuada una crema o leche para la piel. Los adyuvantes utilizables según la invención son, por tanto, los adyuvantes habituales en estos campos técnicos, en particular los materiales que se sabe que se usan en formulaciones tópicas. Los adyuvantes adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2001/066076 A y DE 10 2005 029 387 A1. En la sección de ejemplos de la presente solicitud a continuación se dan dos composiciones particularmente preferidas en forma de crema y leche para la piel.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra los efectos del extracto de *Echinacea*, aceite de cártamo y una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo en comparación con las sustancias de control capsaicina y capsazepina sobre la activación de TRPV1.

La figura 2 es un gráfico que muestra la curva de dosis-respuesta de los efectos de una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo en comparación con las sustancias de control capsaicina y capsazepina sobre la activación de TRPV1.

La figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del extracto de *Echinacea* sobre la actividad tirosinasa en células de melanoma B16. Se utilizó ácido kójico como control positivo para la inhibición de la actividad tirosinasa.

La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto del aceite de cártamo sobre la actividad tirosinasa en células de melanoma B16.

La figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo sobre la actividad tirosinasa en células de melanoma B16.

La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico en comparación con la crema placebo sobre la pérdida de agua transepidérmica (A: crema placebo; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico).

La figura 7 es un gráfico que muestra la reducción de la sensación de sequedad de la piel tras el tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

La figura 8 es un gráfico que muestra la reducción del prurito tras el tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

La figura 9 es un gráfico que muestra la comparación antes/después de las laminillas lipídicas (LBV-TEM) después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (gráfico con evaluación cuantitativa, parte superior, A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: Crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15, imagen representativa de microscopio electrónico de transmisión (TEM) día 1, centro, imagen de TEM día 15, parte inferior).

- La figura 10 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de colesterol después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 5 La figura 11 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ácidos grasos libres (FFA) después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 10 La figura 12 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida EOS después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 15 La figura 13 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida NP después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 20 La figura 14 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida NH después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 25 La figura 15 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido total de lípidos después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- La figura 16 es un gráfico que muestra la comparación antes/después de las laminillas lipídicas (LBV-TEM) después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (gráfico con evaluación cuantitativa, parte superior, A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15, imagen representativa de microscopio electrónico de transmisión (TEM) día 1, centro, imagen de TEM día 15, parte inferior).
- 30 La figura 17 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de colesterol después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 35 La figura 18 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ácidos grasos libres (FFA) después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 40 La figura 19 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida EOS después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 45 La figura 20 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida NP después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 50 La figura 21 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido de ceramida NH después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- 55 La figura 22 es un gráfico que muestra la comparación antes/después del contenido total de lípidos tras el tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- La figura 23 es un gráfico que muestra la comparación antes/después de la hidratación de la piel después del tratamiento con una crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (A: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: crema con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).
- La figura 24 es un gráfico que muestra la comparación antes/después de la hidratación de la piel después del tratamiento con una leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico

(A: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 1; B: leche para la piel con *Echinacea* y derivados de ácido linoleico/día 15).

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### 5 Determinación de la actividad agonista de TRPV1.

##### A) Método experimental

Se cultivan  $2 \times 10^4$  células 293T-VR1 (o células 293T parentales como control) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 200  $\mu$ l de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), que además contiene un 10 % de suero fetal de ternero y un 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomycina). Las células se incuban durante 6 h con las sustancias de prueba o los controles (capsaicina, agonista de TRPV1 (1  $\mu$ M); capsazepina, antagonista de TRPV1 (10  $\mu$ M); o capsaicina (1  $\mu$ M) y capsazepina (10  $\mu$ M)). A continuación, se determina la viabilidad celular.

El efecto citotóxico de las sustancias de prueba se determinó usando el método MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Para ello, se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de una solución de MTT en DMEM (5 mg/ml). A continuación, se incubó durante 4 h a 37 °C en la oscuridad. Se detuvo la reacción, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de DMSO. Se incubó durante 10 minutos con agitación suave. A continuación, se midió la absorción a 550 nm usando un lector de placas TECAN GENios Pro (Tecan Group Ltd., Suiza). Los resultados se presentaron como un porcentaje del control (solución de vehículo, 100 %). La determinación se realizó por triplicado.

##### B) Efectos de las sustancias de prueba sobre la activación de TRPV1

La figura 1 muestra los efectos del extracto de *Echinacea*, aceite de cártamo y una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo en comparación con las sustancias de control capsaicina y capsazepina sobre la activación de TRPV1. El tratamiento con el control positivo, el agonista de TRPV1 capsaicina, redujo la viabilidad celular al 54,9 %. El antagonista de TRPV1 capsazepina en solitario no tuvo ningún efecto (viabilidad celular del 106,1 %). El efecto de la capsaicina podría bloquearse con capsazepina (101,3 % de viabilidad celular), lo que demuestra la mediación del efecto citotóxico a través de TRPV1. No se observaron efectos citotóxicos en las células tratadas con el extracto de *Echinacea* (5  $\mu$ g/ml o 50  $\mu$ g/ml) (102,3 o 106,0 % de viabilidad celular). En las células tratadas con aceite de cártamo (5  $\mu$ g/ml o 50  $\mu$ g/ml) se observó solamente un efecto citotóxico pequeño e insignificante (90,5 o 96,5 %). Sorprendentemente, se descubrió que una mezcla del extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo (5  $\mu$ g/ml de cada uno o 50  $\mu$ g/ml de cada uno) tenía un efecto citotóxico claro y significativo. Con una viabilidad celular del 85,0 %, la magnitud del efecto fue mayor incluso para la concentración más baja que para el aceite de cártamo en solitario. Para la concentración más alta, se determinó una viabilidad celular de solamente el 79,3 %.

Sorprendentemente, estos resultados mostraron que existe un efecto sinérgico de la mezcla del extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo sobre la activación de TRPV1, que ya ocurre a concentraciones más bajas y supera claramente los efectos de las sustancias individuales.

La figura 2 muestra la curva de dosis-respuesta de los efectos de una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo en comparación con las sustancias de control capsaicina y capsazepina sobre la activación de TRPV1.

En este experimento, la actividad agonista de la capsaicina de control positivo fue algo menor (70,6 % de viabilidad celular). Como en el experimento anterior, el efecto de la capsaicina podría inhibirse nuevamente con el antagonista de TRPV1 capsazepina (104,4 % de viabilidad celular). La mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo mostró efectos agonistas dependientes de la dosis. Para la concentración más alta (50  $\mu$ g/ml en cada caso) se logró una magnitud de efecto (51,2 % de viabilidad celular) que supera el efecto de la capsaicina.

### Ejemplo 2:

#### Inhibición de la actividad tirosinasa en células de melanoma B16

##### A) Método experimental

Para determinar la actividad tirosinasa, se cultivaron células de melanoma B16 de ratón (4A5, ATCC) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), que además contenía suero fetal de ternero al 10 % y antibióticos al 1 % (penicilina/estreptomycina). Las células se trataron con diversas concentraciones de las sustancias de prueba durante tres días. A continuación, las células se lisaron a 4 °C durante 30 minutos con un tampón de lisis (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8, Triton X-100 al 1 %, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM) que contenía un cóctel inhibidor de proteasa. Los lisados se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó como fuente de tirosinasa. La mezcla de reacción para determinar la actividad tirosinasa contiene tampón fosfato 20 mM, pH 6,8 y L-Dopa (Sigma-Aldrich) 1,25  $\mu$ M. Después de incubación durante 30 minutos a 37 °C, se determinó la formación de dopacromo. Para ello, se midió la absorción a una longitud de onda de 475 nm en un lector de placas de microtitulación (TriStar LB 941, Berthold Technologies, GmbH & Co. KG). Se utilizó ácido kójico como control positivo para la inhibición de la actividad

tirosinasa.

B) Inhibición de la actividad tirosinasa por las sustancias de prueba

La figura 3 muestra la inhibición de la actividad tirosinasa por el extracto de *Echinacea* en comparación con el ácido kójico.

- 5 Para el control positivo ácido kójico se determinó una inhibición de la actividad tirosinasa del 30,2 %. El extracto de *Echinacea* no mostró inhibición de la actividad tirosinasa a una concentración de prueba de 5 µg/ml. Para la concentración de prueba más alta de 50 µg/ml, se determinó una inhibición del 41,8 %. Por tanto, el efecto fue mayor que el del control positivo. La figura 4 muestra la inhibición de la actividad tirosinasa por el aceite de cártamo en comparación con el ácido kójico.
- 10 El ácido kójico como control positivo mostró una inhibición de la actividad tirosinasa del 35,3 %. No se observó inhibición de la actividad tirosinasa para el aceite de cártamo a ninguna de las dos concentraciones de prueba.

La figura 5 muestra la inhibición de la actividad tirosinasa por el extracto de *Echinacea* y una mezcla de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo en comparación con el ácido kójico. Como en los dos experimentos anteriores, se observó de nuevo una inhibición de la actividad tirosinasa para el ácido kójico de control positivo. Esta fue del 34,3 %.

- 15 Para el extracto de *Echinacea*, se descubrió una inhibición de la actividad tirosinasa del 24,3 y el 52,8 % para ambas concentraciones (5 µg/ml y 50 µg/ml). Esto confirmó los resultados del primer experimento. Sorprendentemente, no se descubrió inhibición de la actividad tirosinasa para las mezclas de extracto de *Echinacea* y aceite de cártamo. Esta fue el 89,4-107,5 % del control.

- 20 Estos resultados muestran que al añadir aceite de cártamo al extracto de *Echinacea*, la inhibición de la actividad la tirosinasa puede cancelarse y la concentración de prueba del extracto de *Echinacea* permanece igual.

Ejemplo 3:

Regeneración de la barrera cutánea tras el tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS).

- 25 El objetivo del estudio fue determinar la influencia de una composición según la invención sobre la regeneración de la función de barrera deteriorada después de un tratamiento de veinticuatro horas con dodecilsulfato de sodio (prueba del parche).

A) Diseño del estudio

El estudio fue un estudio aleatorizado, con enmascaramiento doble con una comparación intraindividual en sujetos sanos (n = 23).

B) Realización del estudio

- 30 El día 1 del estudio, se aplicó una solución con SDS al 0,5 % de forma oclusiva en el antebrazo volar utilizando parches (Finn Chambers®, extragrande, en Scanpore®) durante 24 horas. Después de retirar el parche el día 2, se midió el daño de la barrera. En los días 2 a 11, las áreas de prueba se trataron con los productos de prueba dos veces al día. Se tomaron mediciones instrumentales los días 3, 5 y 8.

- 35 Como productos de prueba se utilizaron una crema según la invención con extracto de *Echinacea* (0,5 % en peso) y derivados de ácido linoleico (correspondiente a la crema de ejemplo descrita a continuación) y una crema placebo. Los productos de prueba se aplicaron dos veces al día en un área de 5 cm x 6 cm cada vez. En cada caso, se aplicaron 2 mg/cm<sup>2</sup> de las sustancias de prueba.

Los sujetos eran hombres o mujeres. Sus edades oscilaban entre los 18 y los 55 años.

Determinación de la pérdida de agua transepidérmica:

- 40 La pérdida de agua transepidérmica (TEWL) es un método no invasivo para determinar la integridad de la función de barrera del estrato córneo y se considera un parámetro sensible para la irritación cutánea inducida por tensioactivos. La TEWL se determinó con un DermaLab (Cortex, Dinamarca) (determinación triple). La sonda de medición se colocó en el área de la piel a medir durante 40 s para cada medición. Los primeros 20 s sirvieron para equilibrar el sistema. Los valores de los segundos 20 s se promediaron y se tomaron como valor medido. Los valores para TEWL se dieron en la unidad g/m<sup>2</sup>h. El intervalo habitual para pieles normales no irritadas es de 3 a 9 g/m<sup>2</sup>h. La piel ligeramente irritada con una barrera cutánea dañada suele mostrar valores entre 10 y 18 g/m<sup>2</sup>h, dependiendo del valor inicial de los sujetos. La piel muy irritada con una barrera cutánea claramente deteriorada produce valores de >25 g/m<sup>2</sup>h. Por tanto, un aumento de los valores de TEWL es indicativo de una alteración de la función de la barrera cutánea.

C) Efectos de los productos de prueba sobre la barrera cutánea

- 50 La figura 6 muestra el efecto de la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico en comparación con la crema placebo sobre la pérdida de agua transepidérmica.

La aplicación de ambos productos de prueba condujo a una reducción significativa de la pérdida de agua transepidérmica, que fue  $>20 \text{ g/m}^2\text{h}$  el día 2. Sorprendentemente, los resultados mostraron que el efecto de la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico sobre la reducción de la pérdida de agua transepidérmica el día 8 es significativamente mayor que el de la crema placebo.

5 Ejemplo 4:

Estudio en pacientes con dermatitis atópica (3 meses)

A) Diseño del estudio

El estudio fue un estudio con enmascaramiento doble, aleatorizado, controlado por producto de comparación, con una comparación intraindividual.

10 B) Realización del estudio

Como preparaciones de prueba se utilizaron la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (0,5 % en peso) y derivados de ácido linoleico (correspondiente a la crema de ejemplo descrita a continuación) y una crema convencional (crema de Agua/Aceite, contenido de grasa aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 2,5 % de extracto vegetal que contiene betulina). Los productos se aplicaron dos veces al día. El área de aplicación fue de  $1600 \text{ cm}^2$  (40 x 40 cm, aproximadamente el 9 % de la superficie de un macho adulto) para cada producto en las áreas contralaterales de la piel. Se seleccionaron como lugares de aplicación la fosa cubital y todo el brazo o, como alternativa, la fosa poplítea y la mitad de la pierna por encima y por debajo de la rodilla o la mitad de la parte superior del cuerpo. Los productos se aplicaron durante aproximadamente 3 meses (85 días). La cantidad de aplicación por aplicación de producto fue de 1,5 g. En los días 1 (inicio), 29 (1 mes), 57 (2 meses) y 85 (3 meses) el investigador evaluó el prurito y el paciente evaluó la sensación de sequedad.

C) Disminución de la sensación de piel seca y prurito tras el tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (n = 46-48)

La figura 7 muestra la evolución temporal de la reducción de la sensación de piel seca después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

25 Después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico, la sensación de piel seca disminuyó en un 40 % el día 29 en comparación con el inicio del tratamiento. Los días 57 y 85 la reducción fue del 40 y el 50 %. La disminución de la sensación de piel seca el día 85 fue significativamente mayor que la de la preparación de comparación (-35 %).

30 La figura 8 muestra la reducción del prurito a lo largo del tiempo después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico, el prurito disminuyó en un 47,6 % el día 29 con respecto al inicio del tratamiento. Los días 57 y 85, la reducción del prurito fue del 52,4 %. La disminución del prurito los días 57 y 85 fue significativamente mayor que la de la preparación de comparación (-33,3 % en cada caso).

35 Ejemplo 5:

Estudio de 14 días en pacientes con dermatitis atópica

A) Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo con una comparación intraindividual, con enmascaramiento doble.

B) Realización del estudio

40 El estudio se realizó con sujetos con diátesis atópica (edad de 18 a 70 años (22 mujeres, 3 hombres, SCORAD local entre 1 y 15)). Como preparaciones de prueba se utilizaron la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (0,5 % en peso) y derivados de ácido linoleico y la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* (0,1 % en peso) y derivados de ácido linoleico (correspondientes a la crema y la leche para la piel de ejemplo que se describen a continuación). Los productos se aplicaron dos veces al día durante 14 días.

45 La hidratación de la piel el día 1 y el día 15 se determinó mediante corneometría.

El examen de la barrera cutánea epidérmica directamente sin muestreo invasivo se llevó a cabo utilizando el método de análisis Lipbarvis® (Lipid Barrier Visualization, LBV) por Microscopy Services Dähnhardt (Flintbek, Alemania). Para ello, se tomaron de tres a cinco capas de piel utilizando un sistema adhesivo/soporte particularmente suave.

Comparaciones antes/después de laminillas lipídicas (LBV-TEM):

50 Las muestras se prepararon y examinaron en un microscopio electrónico de transmisión. Un software especial

determinó la longitud de las laminillas lipídicas y las puso en relación con el espacio intercelular. El número de laminillas lipídicas permite extraer conclusiones muy precisas sobre la eficacia del principio activo aplicado.

Determinación de lípidos cutáneos (LBV-LIP):

5 Mediante el análisis por HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*) de la muestra de piel para los lípidos totales e individuales, se cuantificaron los lípidos cutáneos importantes tales como el colesterol, los ácidos grasos, las ceramidas EOS, NP y NH.

C) Aumento de laminillas lipídicas tras el tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico o la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico, aumento de la síntesis de lípidos propios de la piel y aumento de la hidratación cutánea (n = 20)

10 Las figuras 9 (crema) y 16 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después de las laminillas lipídicas (LBV-TEM) después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Según la invención, se descubrió un aumento significativo en el número de laminillas lipídicas en ambos casos.

Las figuras 10 (crema) y 17 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido de colesterol después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

15 Se descubrió un aumento en el contenido de colesterol para ambos productos. La diferencia fue particularmente significativa para la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Las figuras 11 (crema) y 18 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido de ácidos grasos libres (FFA) después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

20 Según la invención, se descubrió un aumento en el contenido de ácidos grasos libres para ambos productos.

Las figuras 12 (crema) y 19 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido de ceramida EOS después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

25 Según la invención, se descubrió un aumento en el contenido de ceramida EOS para ambos productos. La diferencia fue particularmente significativa para la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Las figuras 13 (crema) y 20 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido de ceramida NP después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

30 Según la invención, se descubrió un aumento en el contenido de ceramida NP para ambos productos. La diferencia fue particularmente significativa para la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Las figuras 14 (crema) y 21 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido de ceramida NH después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

35 Según la invención, se descubrió un aumento en el contenido de ceramida NH para ambos productos. La diferencia fue particularmente significativa para la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Las figuras 15 (crema) y 22 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después del contenido total de lípidos después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Según la invención, se descubrió un aumento en el contenido total de lípidos para ambos productos. La diferencia fue significativa para ambos grupos.

40 Las figuras 23 (crema) y 24 (leche para la piel) muestran la comparación antes/después de la hidratación de la piel después del tratamiento con un producto que contiene extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico o la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico, la hidratación de la piel se incrementó significativamente.

45 Ejemplo 6:

Estudio clínico para investigar el potencial de irritación y sensibilización

A) Diseño del estudio

El estudio fue un estudio con enmascaramiento doble, aleatorizado, de un solo centro y controlado por producto de

comparación.

B) Realización del estudio

- 5 El estudio se realizó con 105 sujetos voluntarios (de 18 a 75 años, mujeres y hombres, fototipo de piel I-IV, sin enfermedades cutáneas agudas en las áreas expuestas). Como preparaciones de prueba se utilizaron la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (0,5 % en peso) y derivados de ácido linoleico y la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* (0,1 % en peso) y derivados de ácido linoleico (correspondientes a la de crema y la leche para la piel de ejemplo que se describen a continuación) así como el placebo de la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico.

Fase de irritación/inducción:

- 10 Los productos se aplicaron oclusivamente con FinnChamber® Large (18 mm) en Fixomull® Stretch en la misma área del parche durante un período de 14 días. Se aplicaron seis veces durante 48 o 72 horas (150 µl por aplicación). Las áreas de prueba estaban en la zona lumbar de la espalda. El eritema se evaluó visualmente en una escala de 0 a 6, 10 a 30 minutos después de retirar el parche (días 3, 5, 8, 10, 12, 15).

Fase de exposición (recuperación de una semana después de la fase de inducción):

- 15 Los productos se aplicaron de forma oclusiva con FinnChamber® Large (18 mm) a Fixomull® Stretch. Se aplicaron una vez durante 48 horas (150 µl por aplicación). Las áreas de prueba estaban en la parte superior del brazo. El eritema se evaluó visualmente en una escala de 0-6, 10-30 minutos y 48 horas después de que se quitó el parche.

Métodos estadísticos:

Potencial de irritación:

- 20 La puntuación de irritación acumulativa de cada sujeto se calculó como la suma de las puntuaciones durante la fase de irritación. Los valores de la última observación se transfirieron para los valores perdidos. Si se registró una calificación de 2 o superior, se transfirió el valor de la calificación 2. Se generaron estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana) para la puntuación de irritación acumulativa.

Potencial de sensibilización:

- 25 Se usaron las siguientes categorías de potencial de sensibilización:

Bajo: ningún sujeto reacciona con un grado 2 o superior o hasta dos sujetos con un grado 1 en ambos puntos de evaluación durante la fase de sensibilización.

Moderado: hasta dos sujetos reaccionan con grado 2 o superior o hasta cuatro sujetos con grado 1 en ambos puntos de evaluación durante la fase de sensibilización.

- 30 Alto: más de dos sujetos reaccionan con grado 2 o superior o más de cuatro sujetos con grado 1 en ambos puntos de evaluación durante la fase de sensibilización.

C) Potencial de irritación y sensibilización

Se descubrió un potencial de irritación de bajo a moderado para todos los productos probados. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

- 35 La aplicación oclusiva de los productos de prueba durante 48 horas durante la fase de exposición no dio como resultado la formación de eritema de grado 1 o superior los días 24 y 26. Según el protocolo, todos los productos se clasificaron como productos con bajo potencial de sensibilización.

- 40 Teniendo en cuenta la aplicación oclusiva múltiple durante 48 horas sin interrupción entre las aplicaciones, la ausencia o el bajo nivel de irritación después de la primera aplicación y el bajo nivel de signos clínicos adicionales de irritación, la tolerancia cutánea de todos los productos se clasificó de muy buena a buena.

El potencial de sensibilización se clasificó como bajo sin potencial alergénico detectable.

Ejemplo 7:

Estudio clínico de irritación con SDS

A) Diseño del estudio

- 45 El estudio se llevó a cabo como un estudio con enmascaramiento.

B) Realización del estudio

El estudio se llevó a cabo con 44 sujetos femeninos. Todos los sujetos participaron en el tratamiento oclusivo de 24 horas con SDS (dodecil sulfato de sodio). Después de evaluar el valor inicial, nueve sujetos fueron excluidos debido a una irritación insuficiente o no homogénea por el SDS. Se excluyeron tres sujetos adicionales antes de la evaluación inicial debido a la irritación severa por el SDS. Los 31 sujetos que completaron el estudio tenían entre 24,9 y 65,6 años. Como preparaciones de prueba se utilizaron las cremas según la invención con extracto de *Echinacea* (1 o 2 % en peso) y derivados de ácido linoleico. Se realizó una comparación con piel sin tratar y piel irritada con SDS (no irritada/sin tratar, irritación con SDS/sin tratar). El objetivo principal fue evaluar las propiedades cosméticas de las dos cremas según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico. El objetivo secundario fue determinar la influencia de las cremas según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico sobre la reducción del eritema.

La barrera cutánea de los sujetos se dañó por la aplicación oclusiva de solución de SDS al 2 % en FinnChamber® (18 mm) en las áreas de prueba en el antebrazo durante 24 horas. La pérdida de agua transepidermica (TEWL, DermaLab®) y la hidratación de la piel (Corneometer® MDD4) se midieron 4 h, 48 h, 3 d y 6 d después de la irritación con SDS. Además, el eritema se determinó visualmente (clasificación por expertos). Las dos cremas según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico se aplicaron aleatoriamente en dos áreas de prueba. Otra área de prueba en el antebrazo no se trató. Un área de prueba en la parte superior del brazo (no irritada/sin tratar) sirvió como zona de control. Las dos cremas según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico (~2 µl/cm<sup>2</sup>) se aplicaron dos veces al día.

Las mediciones y evaluaciones visuales se realizaron en los siguientes momentos:

- antes del tratamiento con producto, 4 h después de retirar el parche (t<sub>0</sub>)
- después de la 4ª aplicación del producto, 48 h después de retirar el parche (t<sub>1</sub>)
- después de la 6ª aplicación del producto, 3 d después de retirar el parche (t<sub>2</sub>)
- después de la 12ª aplicación del producto, 5 d después de retirar el parche (t<sub>3</sub>)

C) Pérdida de agua transepidermica (TEWL)

El tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (1 % en peso) y derivados de ácido linoleico condujo a una reducción leve e insignificante de la TEWL en los tiempos a y t<sub>1</sub> en comparación con el área no tratada. No se detectaron grandes diferencias en los tiempos t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub> entre los dos grupos. Después del tratamiento con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (2 % en peso) y derivados de ácido linoleico, los valores de TEWL fueron generalmente más altos que en el caso de la piel sin tratar. Una TEWL aumentada debe equipararse con una función de barrera más baja. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: pérdida de agua transepidermica (TEWL), datos originales en g/(m<sup>2</sup>h)

Tiempo de medición	Irritada con SDS/sin tratar	Crema con el 1 %	Crema con el 2 %
t <sub>0</sub>	41,3	39,9	41,5
t <sub>1</sub>	30,7	28,6	32,0
t <sub>2</sub>	18,6	19,1	22,2
t <sub>3</sub>	10,9	11,5	13,1

D) hidratación de la piel (Corneometer®)

Las áreas de prueba tratadas con las cremas según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico mostraron valores aumentados de forma estadísticamente significativa para la hidratación de la piel en t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub> en comparación con las áreas de piel no tratadas irritadas con SDS. En t<sub>1</sub>, los valores de hidratación de la piel también fueron más altos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: hidratación de la piel, datos originales [UA]

Tiempo de medición	Irritada con SDS/sin tratar	Crema con el 1 %	Crema con el 2 %
t <sub>0</sub>	35,6	35,1	33,0
t <sub>1</sub>	19,3	20,9	20,6
t <sub>2</sub>	11,9	15,9	14,9
t <sub>3</sub>	9,6	16,1	12,8

E) Determinación visual del eritema

Como se esperaba, no se observó eritema en las áreas de prueba no tratadas y no irritadas. Como resultado, las puntuaciones de eritema en todas las áreas irritadas fueron significativamente más altas. No se observó una gran

- 5 diferencia entre las áreas tratadas con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico y las áreas no tratadas irritadas con SDS. Sin embargo, se descubrió que la puntuación para las áreas tratadas con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (1 % en peso) y derivados de ácido linoleico fue menor en  $t_3$  que para las áreas no tratadas irritadas con SDS. En contraste con esto, sólo se descubrió una puntuación más baja en  $t_0$  para las áreas tratadas con la crema según la invención con extracto de *Echinacea* (2 % en peso) y derivados de ácido linoleico. En todos los demás momentos de medición, la puntuación de eritema fue más alta que para las áreas no tratadas irritadas con SDS (no significativa). Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: evaluación visual del eritema, datos originales

Tiempo de medición	No irritada/sin tratar	Irritada con SDS/sin tratar	Crema con el 1 %	Crema con el 2 %
$t_0$	0,00	1,69	1,69	1,61
$t_1$	0,00	1,44	1,47	1,50
$t_2$	0,00	1,19	1,21	1,29
$t_3$	0,00	0,94	0,87	0,97

- 10 En resumen, se constató que las cremas según la invención con extracto de *Echinacea* (1 o 2 % en peso) y derivados de ácido linoleico tienen una influencia positiva sobre la hidratación de la piel. Esta ventaja supera la irritación ligeramente mayor que se observa cuando se usan concentraciones más altas del extracto de *Echinacea*.

#### Ejemplo 8:

##### Estabilidad de formulación

- 15 La crema con extracto de *Echinacea* (0,5 % en peso) y derivados de ácido linoleico y la leche para la piel con extracto de *Echinacea* (0,1 % en peso) y derivados de ácido linoleico (correspondientes a la crema de ejemplo y la leche para la piel de ejemplo descritas a continuación) se sometieron a una prueba de estabilidad a largo plazo. Para este propósito, las muestras se almacenaron en diferentes condiciones (25 °C/60 % de HR, 30 °C/65 % de HR y 40 °C/75 % de HR). Los resultados de las investigaciones mostraron que la vida útil de las dos composiciones es de al menos dos años a temperatura ambiente.

Sorprendentemente, se pudo demostrar en los ejemplos 3 a 5 enumerados anteriormente que la crema según la invención y la leche para la piel según la invención con extracto de *Echinacea* y derivados de ácido linoleico tienen una influencia positiva sobre la función barrera de la piel.

- 25 El tratamiento provocó un aumento significativo de los lípidos propios de la piel, que son fundamentales para restaurar o mantener la barrera. En particular, también se incrementó el contenido de ceramida EOS, lo que es particularmente importante para la estabilidad de las bicapas lipídicas del estrato córneo debido a la denominada "función de clavo".

Macroscópicamente, los estudios pudieron mostrar una reducción en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y un aumento en la hidratación de la piel. Además, el prurito se redujo después del tratamiento con los productos según la invención.

- 30 Los ejemplos enumerados anteriormente demuestran que sorprendentemente no solamente como se describe en Yotsawimonwat S, y col., Int J Cosm Sci 2010, 32, 340-346, la hidratación de la piel en sujetos de prueba sin daño de barrera se puede mejorar, sino que las composiciones según la invención también pueden contribuir a la regeneración de una barrera ya perturbada. En particular, se debe enfatizar en este contexto que las composiciones según la invención difieren de las composiciones conocidas que contienen *Echinacea* no solamente en la presencia adicional de ácido linoleico/derivados de ácido linoleico. Los extractos de *Echinacea purpurea* usados también difieren. Yotsawimonwat y col. utilizaron un extracto alcohólico de las partes aéreas de *Echinacea*, que contiene una alta proporción de componentes fenólicos con efecto antioxidante. La proporción de alquilamidas en dichos extractos es muy baja. Las composiciones según la invención contienen, preferentemente, un extracto de raíces de *Echinacea*. Este se obtuvo preferentemente mediante CO<sub>2</sub> supercrítico, por lo que contiene una alta proporción de alquilamidas lipófilas y no contiene fenoles.

Además, se descubrió sorprendentemente que las composiciones según la invención pueden conservarse durante un período de más de dos años. Este también es el caso cuando se almacenan a temperatura ambiente. Por el contrario, las formulaciones descritas por de Yotsawimonwat y col., solamente se pueden almacenar durante un máximo de 7 meses después de la adición de un antioxidante cuando se almacenan a 4 °C.

- 45 También fue sorprendente para el experto en la materia que la composición según la invención presenta efectos antipruriginosos.

Ejemplos de composiciones/formulaciones según la presente invención:

## ES 2 845 680 T3

### Crema con extracto con CO<sub>2</sub> de raíz de *Echinacea purpurea* al 2 %:

Arlacel 1690	1,600 kg
Laurato de hexildecilo	2,000 kg
Cera de abejas	0,375 kg
Cera de piel de naranja	0,450 kg
Oleato de decilo	1,200 kg
Oxynex LM	0,030 kg
Estearato de zinc	0,375 kg
Aceite de cártamo	2,550 kg
Miristato de isopropilo	1,500 kg
Extracto con CO <sub>2</sub> de raíz de <i>Echinacea purpurea</i>	0,600 kg
Alcohol bencílico	0,300 kg
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,150 kg
Glicerol	0,900 kg
Agua, purificada	17,970 kg

### Crema con extracto con CO<sub>2</sub> de raíz de *Echinacea purpurea* al 1 %:

Arlacel 1690	1,600 kg
Laurato de hexildecilo	2,000 kg
Cera de abejas	0,375 kg
Cera de piel de naranja	0,450 kg
Oleato de decilo	1,200 kg
Oxynex LM	0,030 kg
Estearato de zinc	0,375 kg
Aceite de cártamo	2,550 kg
Miristato de isopropilo	1,500 kg
Extracto con CO <sub>2</sub> de raíz de <i>Echinacea purpurea</i>	0,300 kg
Alcohol bencílico	0,300 kg
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,150 kg
Glicerol	0,900 kg
Agua, purificada	18,270 kg

### Crema con extracto con CO<sub>2</sub> de raíz de *Echinacea purpurea* al 0,5 %:

Arlacel 1690	1,600 kg
Laurato de hexildecilo	2,000 kg
Cera de abejas	0,375 kg
Cera de piel de naranja	0,450 kg
Oleato de decilo	1,200 kg
Oxynex LM	0,030 kg
Estearato de zinc	0,375 kg
Aceite de cártamo	2,550 kg
Miristato de isopropilo	1,500 kg
Extracto con CO <sub>2</sub> de raíz de <i>Echinacea purpurea</i>	0,150 kg
Alcohol bencílico	0,300 kg
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,150 kg
Glicerol	0,900 kg
Agua, purificada	18,420 kg

## ES 2 845 680 T3

### Leche para la piel con extracto con CO<sub>2</sub> de raíz *Echinacea purpurea* al 0,1 %:

Estearato de zinc	0,300 kg
Cera de piel de naranja	0,200 kg
Arlacel 1690	1,500 kg
Laurato de hexildecilo	2,500 kg
Aceite de cártamo	2,550 kg
Oleato de decilo	1,500 kg
Miristato de isopropilo	1,200 kg
Alcohol bencílico	0,300 kg
Oxynex LM	0,030 kg
Extracto con CO <sub>2</sub> de raíz de <i>Echinacea purpurea</i>	0,030 kg
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,150 kg
Glicerol	0,900 kg
Agua, purificada	18,840 kg

### Leche para la piel con extracto con CO<sub>2</sub> de raíz *Echinacea purpurea* al 0,02 %:

Estearato de zinc	0,300 kg
Cera de piel de naranja	0,200 kg
Arlacel 1690	1,500 kg
Laurato de hexildecilo	2,500 kg
Aceite de cártamo	2,550 kg
Oleato de decilo	1,500 kg
Miristato de isopropilo	1,200 kg
Alcohol bencílico	0,300 kg
Oxynex LM	0,030 kg
Extracto con CO <sub>2</sub> de raíz de <i>Echinacea purpurea</i>	0,006 kg
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,150 kg
Glicerol	0,900 kg
Agua, purificada	18,864 kg

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que contiene a) un extracto de *Echinacea* y b) ácido linoleico y/o derivados de ácido linoleico, en la que el extracto de *Echinacea* procede de *Echinacea purpurea radix* y los derivados de ácido linoleico se encuentran en forma de aceite de cártamo, aceite de germen de trigo y/o aceite de colza.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el extracto de *Echinacea* es un extracto lipófilo.
3. Composición según la reivindicación 1 y/o la reivindicación 2, **caracterizada por que** el extracto de *Echinacea* es un extracto con CO<sub>2</sub>.
- 10 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada por que** el extracto de *Echinacea* tiene un contenido de alquilamida comprendido entre el 1 y el 50 %, preferentemente entre el 10 y el 40 % y de forma particularmente preferente entre el 15 y el 30 %.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** la composición contiene los componentes a) y b) en las siguientes relaciones en peso: 1:1000 a 1:1; preferentemente 1:50 a 1:10.
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizada por que** en ella están contenidos el 0,001-5 % en peso de extracto de *Echinacea*, preferentemente el 0,025-2 % en peso de extracto de *Echinacea*, basándose en el peso de la composición total, y el 0,001-10 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,001-10 % en peso de ácido linoleico, preferentemente el 0,01-5 % en peso de ácido linoleico y/o una cantidad tal de derivados de ácido linoleico que corresponde al 0,01-5 % en peso de ácido linoleico, basándose, en cada caso, en el peso de la composición total.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además uno o más adyuvantes cosméticos y/o farmacéuticos, preferentemente en forma de emulsión.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso como medicamento.
- 30 9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, como medicamento.
10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, como cosmético.
- 35 11. Uso según la reivindicación 9 o 10, para el tratamiento de la piel seca.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias de la piel y/o prurito y/o piel irritada.
- 40 13. Composición para su uso según la reivindicación 12, en la que el estado inflamatorio de la piel es la dermatitis atópica.

**Figuras 1-24:**

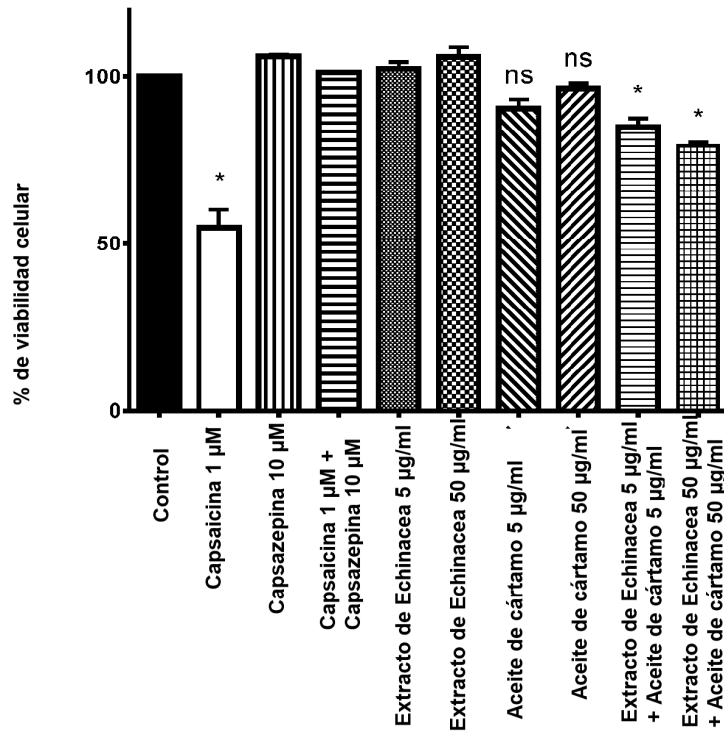


Figura 1

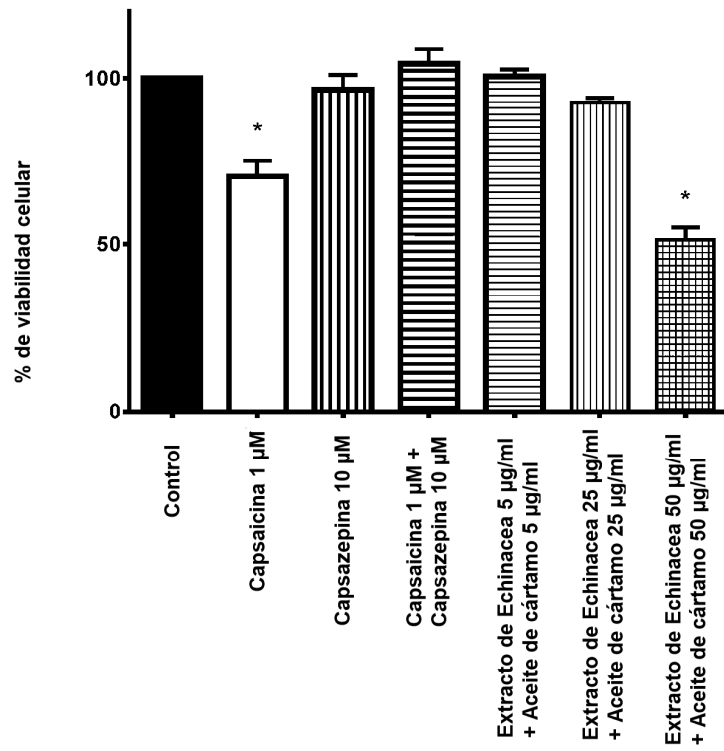


Figura 2

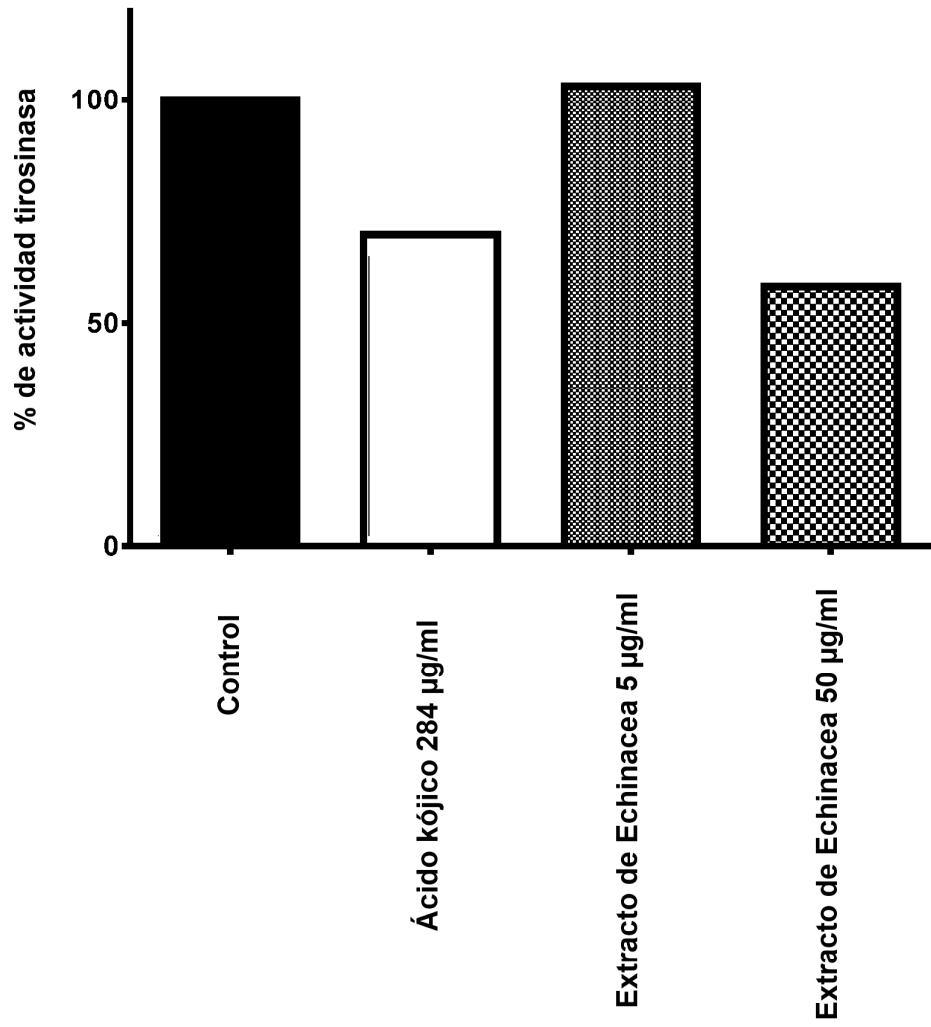


Figura 3

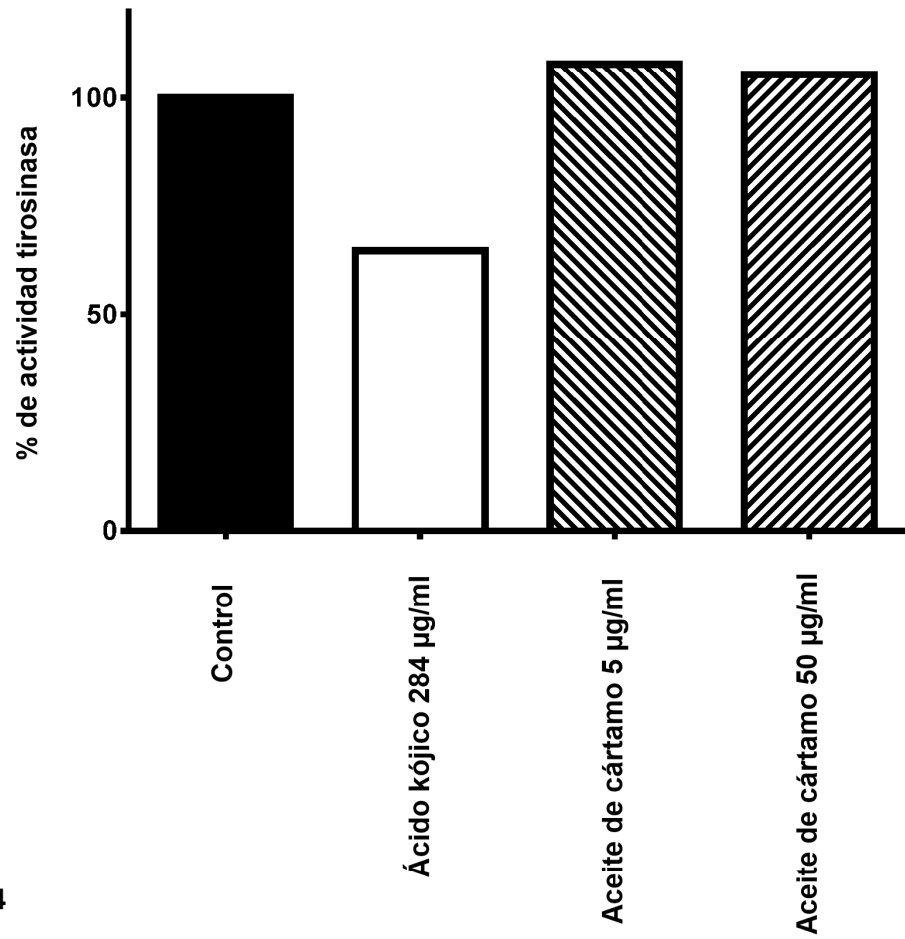


Figura 4

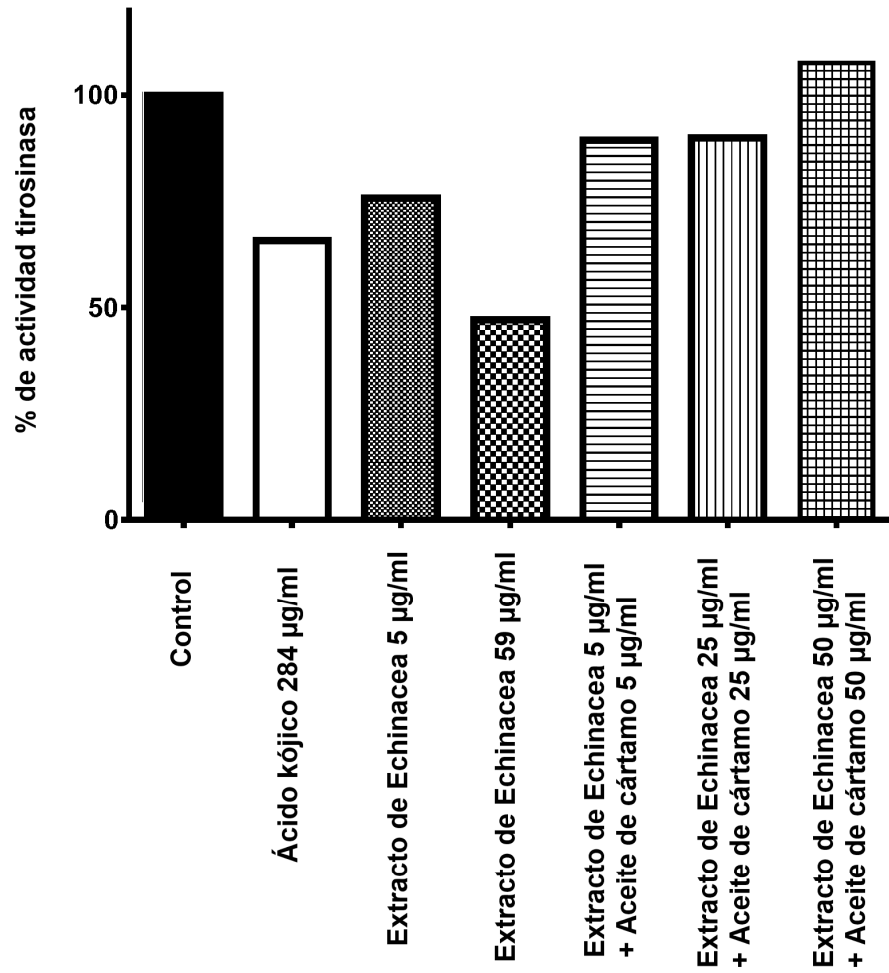


Figura 5

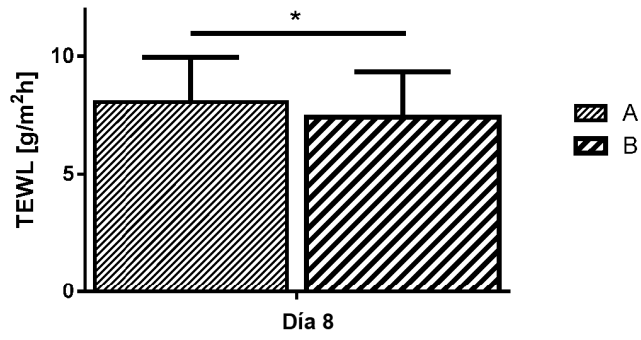


Figura 6

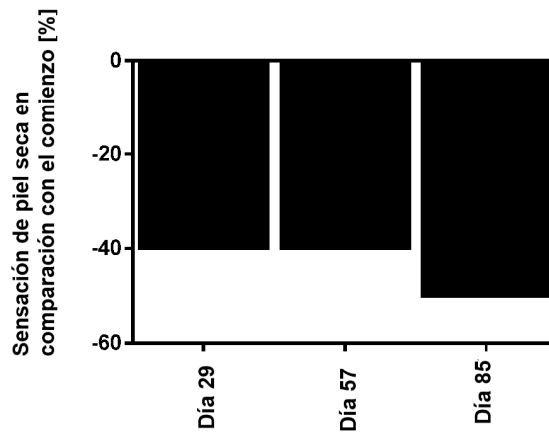


Figura 7

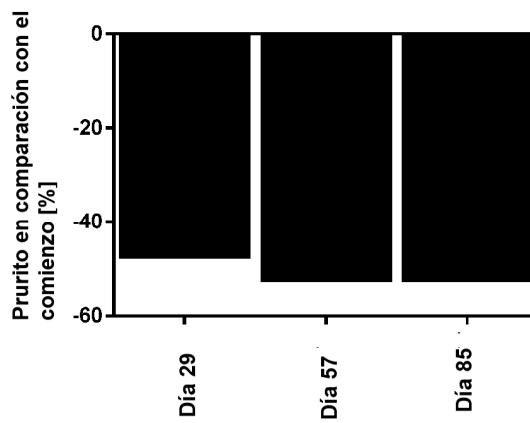


Figura 8

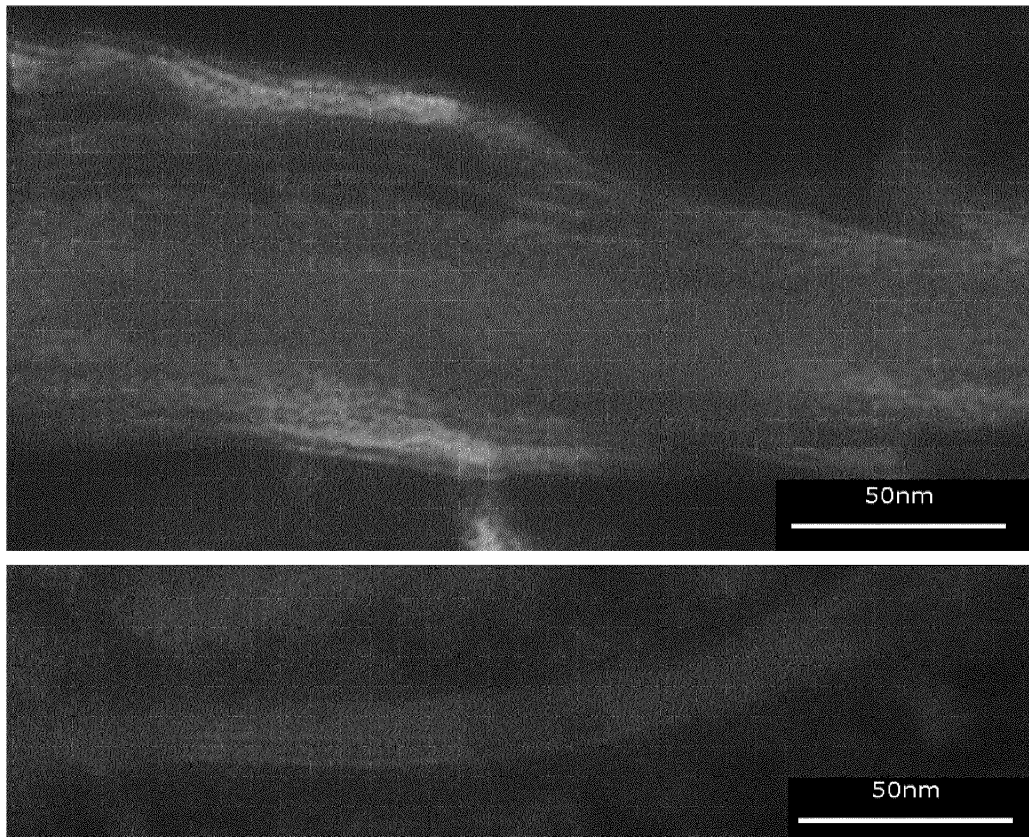
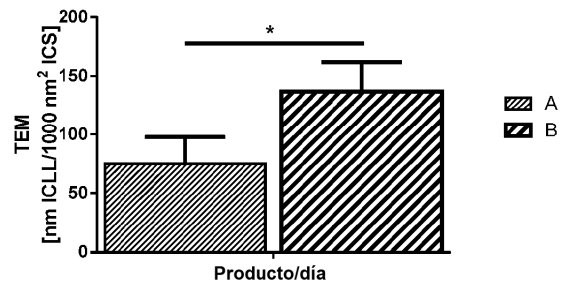


Figura 9

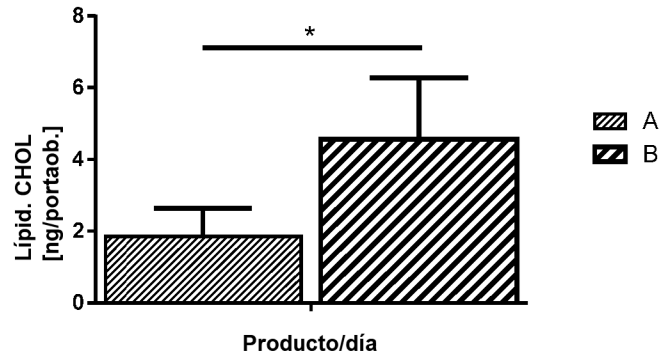


Figura 10

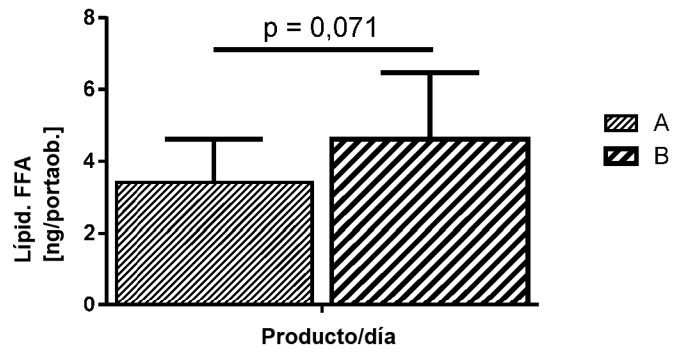


Figura 11

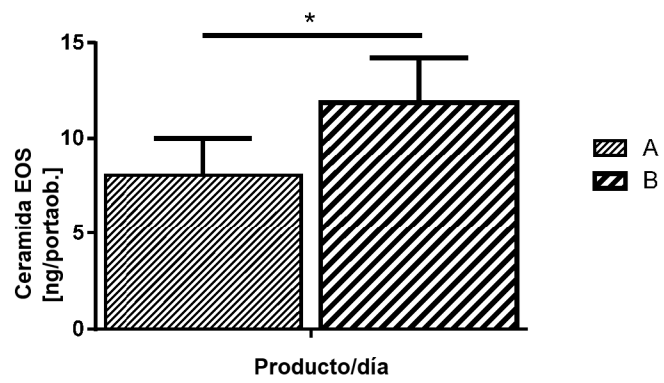


Figura 12

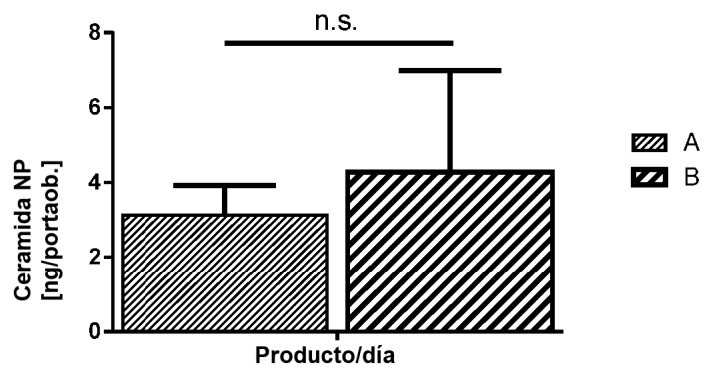


Figura 13

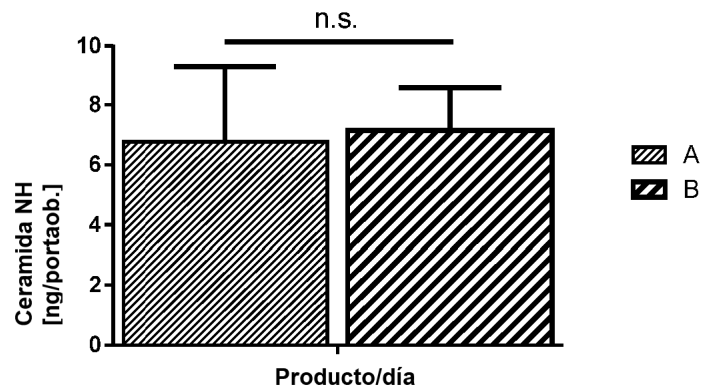


Figura 14

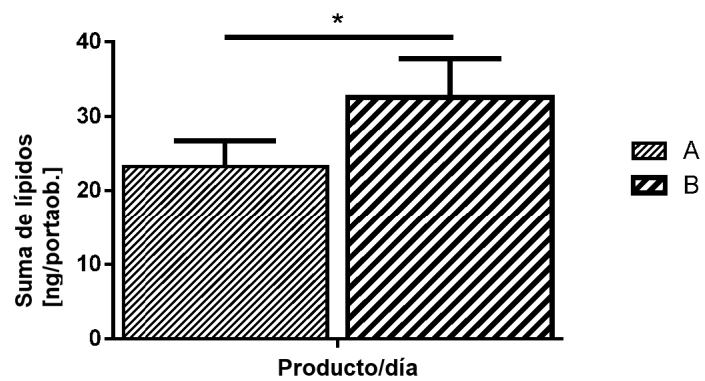


Figura 15

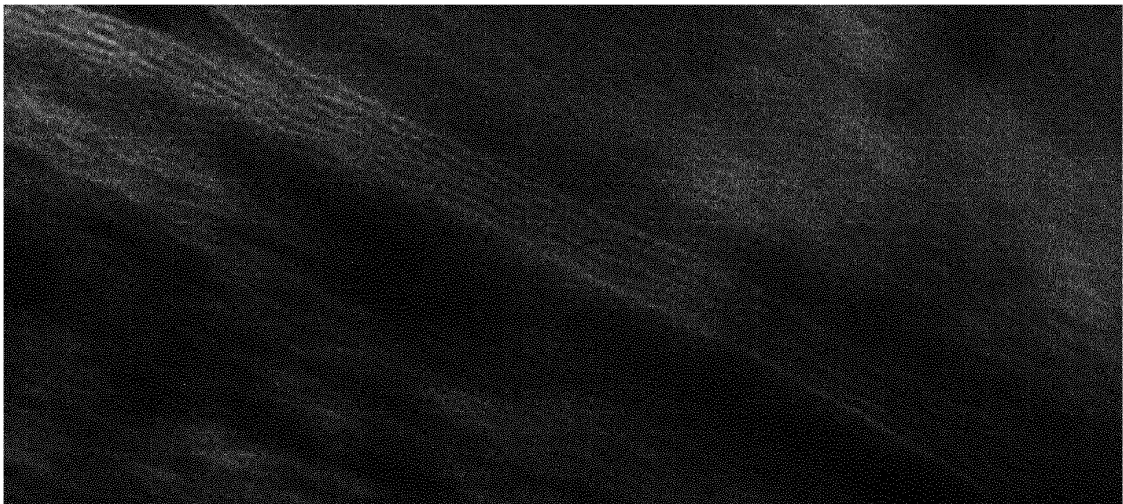
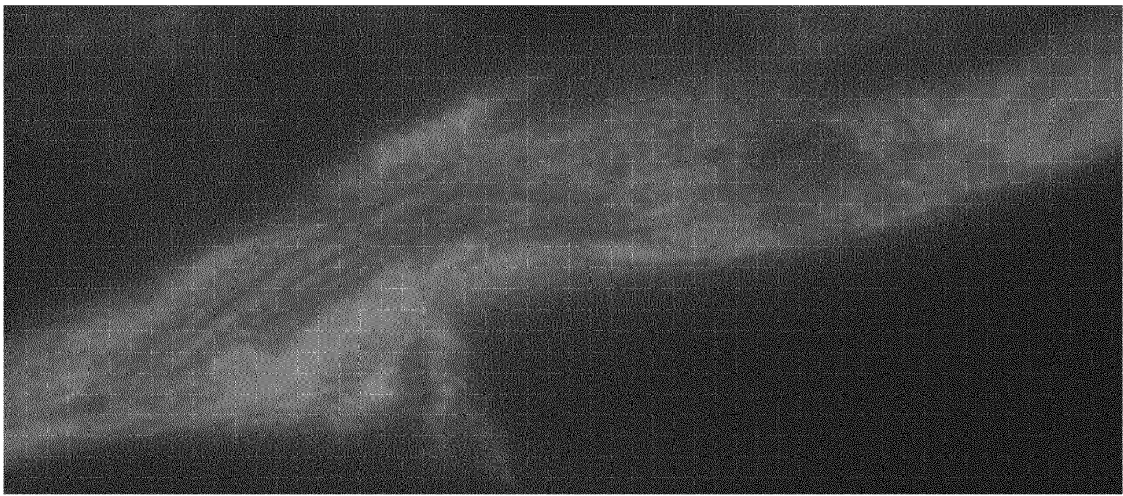
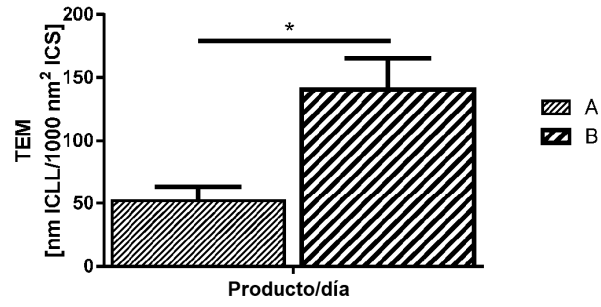


Figura 16

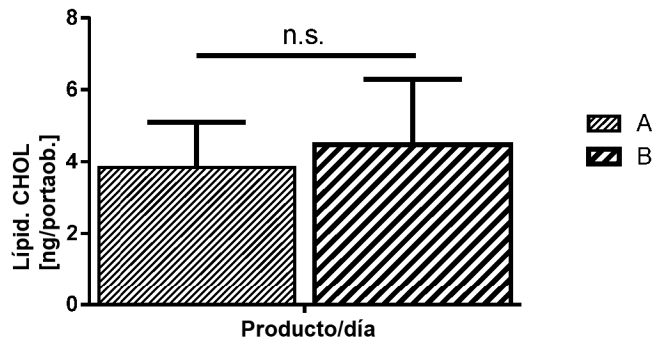


Figura 17

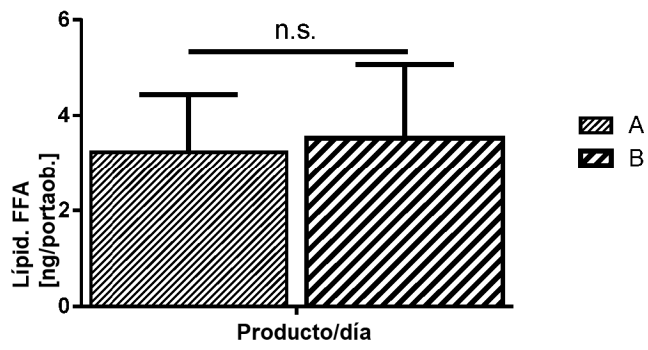


Figura 18

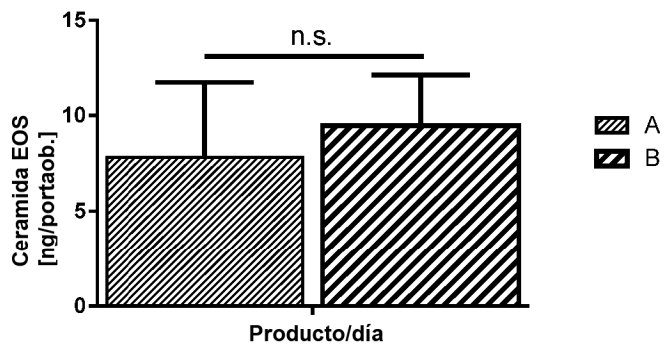


Figura 19

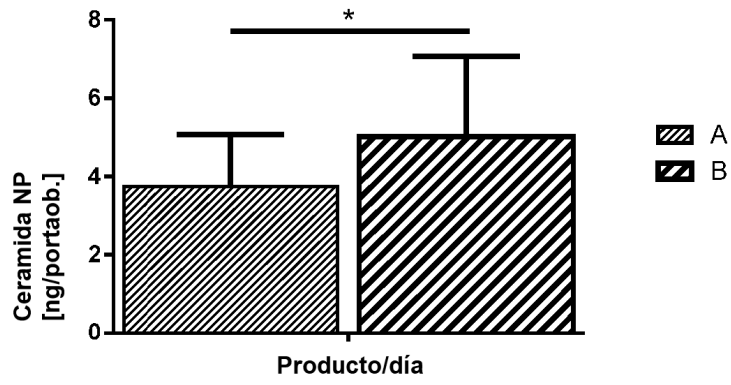


Figura 20

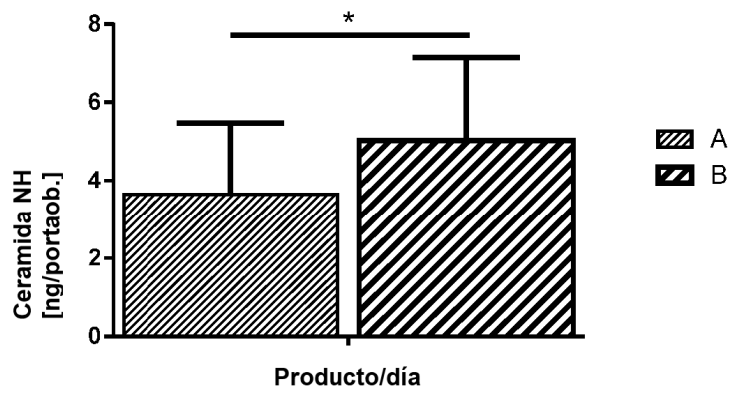


Figura 21

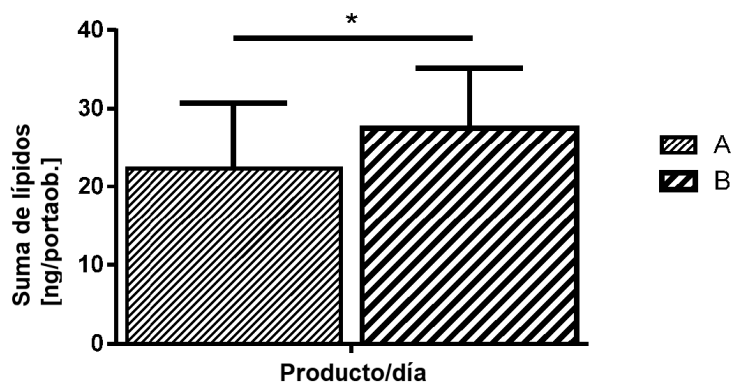


Figura 22

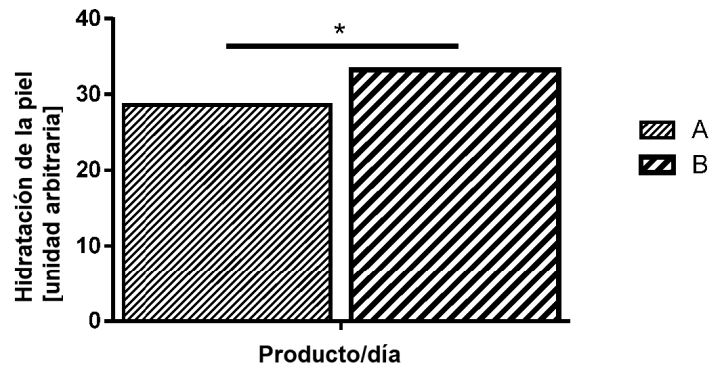


Figura 23

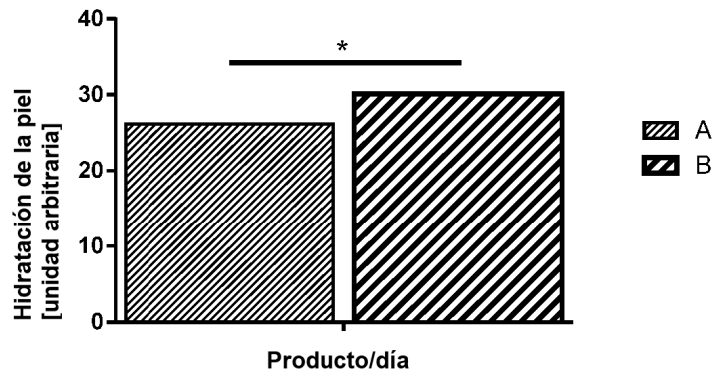


Figura 24