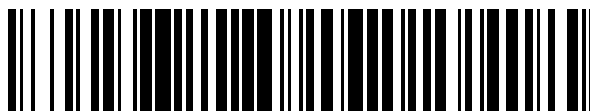


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 129**

51 Int. Cl.:
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05775496 .2**
96 Fecha de presentación: **09.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1768684**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2007**

54 Título: **Composición que comprende un extracto de loto azul para el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas**

30 Prioridad:
09.06.2004 FR 0406240
10.06.2004 FR 0406283
11.06.2004 FR 0406333

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.09.2012

73 Titular/es:
LABORATOIRE NUXE
25, RUE DES PETITS HOTELS
75010 PARIS, FR

72 Inventor/es:
LECLERE, Jacques

74 Agente/Representante:
Morgades Manonelles, Juan Antonio

ES 2 387 129 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 comprende un extracto de loto azul para el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas.

5 La presente invención comprende la utilización de una composición basada en un extracto de loto azul, si procede asociado a un extracto de amapola y/o a un extracto de malvavisco, con un efecto relajante de la piel, que puede actuar eficazmente contra las mioclonías faciales incontroladas responsables de los signos de envejecimiento de la piel y, en particular, las arrugas de expresión.

10 La piel constituye un auténtico órgano que comprende una pluralidad de capas integradas, que van desde la capa superficial, la epidermis, hasta las capas más profundas, la dermis y la hipodermis, y cada una de las mismas presenta unas propiedades específicas que permiten que el conjunto reaccione y se adapte a las condiciones de su entorno.

15 La epidermis, compuesta principalmente por queratinocitos (el 90% de las células epidérmicas), melanocitos (entre el 2 y el 3% de las células epidérmicas) y las células de Langerhans, presenta un espesor variable en las distintas partes del organismo. Puesto que constituye la capa externa de la piel, la epidermis desempeña un papel fundamental para garantizar la protección y el mantenimiento de un buen trefismo. Por este motivo se han desarrollado muchas composiciones para proteger y mejorar sus funciones y, en particular, reforzar su elasticidad y su firmeza.

20 La dermis, más espesa, sólida, rica en nervios, vasos sanguíneos y glándulas sudoríparas, comprende principalmente colágeno, elastina y proteoglicanos. Estos tres tipos de moléculas las sintetizan los fibroblastos dérmicos. Las fibras de colágeno, que representan el 70% del peso seco de la dermis, garantizan la resistencia mecánica y la textura de la piel, la elastina es la responsable de la elasticidad, y los proteoglicanos desempeñan un papel importante en la estructura y la hidratación la piel. Otras células tales como los macrófagos y los leucocitos también están presentes en la capa de la dermis.

25 La hipodermis, que es la capa más profunda de la piel, contiene los adipocitos que producen lípidos para que en el tejido subcutáneo elabore una capa grasa que protege los músculos, los huesos y los órganos internos ante los golpes.

El envejecimiento de la piel puede ser intrínseco o extrínseco, es decir, causado por el medio ambiente.

35 Uno de los primeros signos del envejecimiento de la piel es una pérdida de elasticidad y la formación arrugas y líneas de expresión, que son el resultado directo del deterioro de la capa de soporte constituida por la dermis. La aparición de manchas pigmentarias, la disminución de espesor de la piel y su hundimiento son asimismo cambios que se observan durante el envejecimiento.

40 Muchos factores contribuyen a acelerar la degradación del colágeno de la dermis y, en particular, la exposición al sol, los radicales libres, ciertos cambios hormonales asociados a la vejez y el tabaquismo.

45 Los primeros signos de envejecimiento de la piel, tales como las arrugas y las líneas de expresión, están causados generalmente por el estrés y los cambios biológicos y fisiológicos, acelerados por el medio ambiente. De hecho, la capacidad de la piel para reemplazar el colágeno dañado disminuye con el tiempo y aparecen espacios e irregularidades en la red de colágeno. En el nivel de la piel, el envejecimiento provoca particularmente una disminución de la síntesis de proteínas (colágeno, elastina), disminución de la síntesis de proteoglicanos, entre otros, así como un aumento de las metaloproteinasas del tipo MMP3.

50 Dicho envejecimiento de la piel se presenta acompañado de sensaciones de pesadez, presión durante el sueño y asimismo contracciones de los músculos faciales, responsables de las arrugas de expresión, en particular alrededor de los ojos y de la boca, o la modificación de microrrelieve por la epidermis como consecuencia sobre todo del estrés. En particular, las arrugas de expresión las provocan una pluralidad de contracciones y espasmos que soportan diariamente los rasgos faciales bajo la acción de los músculos subcutáneos de la cara que se contraen y se relajan sucesivamente de un modo incesante según el ritmo de emociones.

55 Por lo tanto, para luchar contra dichos signos de envejecimiento, resulta necesario reducir las fuerzas de contracción de los músculos faciales inhibiendo la liberación de los neurotransmisores. Dicha inhibición tiene como consecuencia el relajamiento de los rasgos faciales y la reducción de la profundidad de las arrugas faciales.

60 Se conocen algunos tratamientos que pueden limitar o inhibir las mioclonías faciales. De este modo, se sabe que resulta posible realizar un tratamiento cosmético inyectando la toxina botulínica en las arrugas a fin de paralizar las células que se encuentran en contacto con la toxina, proporcionando a la piel un aspecto más suave. Ciertas composiciones cosméticas contienen sustancias que ejercen una acción exfoliante, tales como los α -hidroxiácidos, por ejemplo el ácido láctico y el ácido glicólico, facilitando la eliminación de células muertas y estimulando la formación de colágeno y elastina. Se conocen asimismo composiciones basadas en el ácido retinoico o retinol que

pueden actuar contra los signos del envejecimiento cutáneo tales como la sequedad, la pérdida de elasticidad de la piel y la formación de arrugas, así como cremas relajantes con una base de magnesio o manganeso que inhiben el flujo de calcio en las células, provocando la contracción muscular, para reducir los microespasmos de la piel y retardar la aparición de las arrugas de expresión.

5 El loto azul (*Nymphaea caerulea*) ya se utilizaba en el antiguo Egipto por su fragancia suave y se consumía su raíz como producto alimentario. El loto sagrado, que pertenece a otra especie, *Nelumbo nucifera*, distinto en origen y composición, comprende enzimas tales como la metiltransferasa, que tiene un efecto contra el envejecimiento, tal como se indica en la patente US n.º 6.468.564. La patente US n.º 5.925.348 describe una composición cosmética
10 que comprende asimismo un extracto de semillas de loto sagrado como fuente de metiltransferasa destinado a luchar contra el envejecimiento de la piel.

La *Nymphaea*, y en particular el loto, así como los nenúfares comprenden, en todas sus partes, la ninfeína y la nufarina (que son alcaloides) así como otros componentes poco definidos.

15 La amapola (*Papaver rhoeas*) contiene readina, un alcaloide del grupo de las tetrahydrobenzoacepinas, que se supone que presentan propiedades neurolépticas. Se ha descrito que dicha planta se puede utilizar en casos de eretismo cardíaco en adultos, como calmante en adultos y niños y asimismo en el tratamiento sintomático de la tos.

20 El malvavisco (*Althea officinalis*) es una planta de la que se han utilizado durante mucho tiempo diversas partes tales como hojas y, sobre todo, raíces, en particular en composiciones alimentarias o complementos dietéticos, debido asimismo a sus propiedades conocidas. De este modo, se ha observado que la raíz del malvavisco desempeña una acción antiinflamatoria y calmante en el organismo y asimismo un efecto antitusígeno que ha justificado su utilización en jarabes pediátricos. Se conoce que la raíz del malvavisco contiene un azúcar neutro, el ramnogalacturonano, que
25 inhibe el reflejo de la tos provocada por un estímulo mecánico en los gatos con una dosis de 50 mg/kg en peso (G Nosalova *et al. Pharmazie*. 1992, 47(3):224-6). La raíz del malvavisco se ha utilizado asimismo como masticatorio para aliviar los efectos de la aparición de la dentición en los niños.

Se han propuesto asimismo los extractos de flores u hojas de malvavisco para composiciones fitofarmacéuticas destinadas a favorecer la hidratación de la piel o incluso como analgésicos para el tratamiento de enfermedades de la cavidad bucal y de la laringe.

30 Resulta asimismo muy conocida su utilización como aditivo en composiciones alimentarias o productos de confitería. De este modo, la patente US n.º 6.605.306 describe un complemento dietético que comprende diversos extractos vegetales entre los que se encuentra la *Althea officinalis* por su acción antiinflamatoria.

Sin embargo, a pesar de las diversas composiciones disponibles, todavía existe la necesidad de poder disponer de nuevas composiciones tópicas alternativas que permitan combatir eficazmente los efectos del envejecimiento de la piel y, en particular, de composiciones tópicas basadas en extractos vegetales adecuados procedentes
40 sustancialmente de plantas conocidas por sus propiedades beneficiosas.

Según la presente invención, se ha descubierto que resultaba posible actuar eficazmente contra las mioclonías faciales incontroladas responsables de los signos de envejecimiento de la piel y, en particular, las arrugas de expresión, utilizando composiciones tópicas basadas en extractos de loto azul (*Nymphaea caerulea*), a las que se
45 añaden, si procede, extractos de malvavisco (*Althea officinalis*) y/o amapola (*Papaver rhoeas*).

La presente invención tiene como objetivo la utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) en la preparación de una composición tópica destinada a combatir las mioclonías faciales incontroladas.

50 La presente invención tiene asimismo como objetivo la utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) asociado a un extracto de malvavisco (*Althea officinalis*) y/o un extracto de amapola (*Papaver rhoeas*) en la preparación de una composición tópica destinada a combatir las mioclonías faciales incontroladas.

La presente invención tiene como objetivo adicional un procedimiento cosmético para combatir las mioclonías faciales incontroladas, que comprende aplicar sobre las zonas afectadas de la piel una composición que contiene una cantidad eficaz de la composición tópica según la presente invención.

60 La presente invención tiene asimismo como objetivo la utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) en la preparación de un medicamento dermatológico para la prevención y el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas.

La presente invención tiene asimismo como objetivo la utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) asociado a un extracto de malvavisco (*Althea officinalis*), y/o un extracto de amapola (*Papaver rhoeas*) en la preparación de un medicamento dermatológico para la prevención y el tratamiento de las mioclonías faciales
65 incontroladas.

Las composiciones según la presente invención se distinguen en que comprenden un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) en una cantidad eficaz para combatir las arrugas de expresión, así como soportes y excipientes aceptables en dermatología y en cosmetología.

5 De este modo, las composiciones tópicas de la presente invención se pueden utilizar ventajosamente en dermatología y en cosmetología para reducir las contracciones a fin de evitar las mioclonías faciales incontroladas.

10 Los extractos vegetales de loto azul de las composiciones según la presente invención han presentado en ensayos in vitro una que pueden inhibir los neurotransmisores capaces de generar las mioclonías reflejas, gracias a unos neuropéptidos cuya regulación está relacionada con la producción de acetilcolina y de adrenalina. Los ensayos se realizaron en un cultivo del ganglio dorsal de feto de ratón.

Los resultados, que se detallan a continuación, han puesto de manifiesto, según las concentraciones utilizadas:

- 15 - una disminución de hasta un 41% de la sustancia P,
 - una disminución de hasta un 36% de la CGRP (*Calcitonine Gene Related Protein* ["proteína relacionada con el gen de la calcitonina"])
 - una disminución de hasta un 37% de la acetilcolina,
 - una disminución de hasta un 35% de la afinidad del receptor de la sustancia P en el nivel de los queratinocitos
 20 humanos en cultivo,
 - una inhibición del 24% de la recepción de la adrenalina en los receptores adrenérgicos.

25 Dichos resultados se obtuvieron con un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) y una combinación de extractos de loto azul y de amapola (*Papaver rhoeas*), a la que se puede añadir eventualmente extractos de malvavisco (*Althea officinalis*), y confirman que, en aplicación tópica, un extracto de loto azul, o una composición que contiene el mismo, si procede con la adición de amapola y/o malvavisco, produce un efecto de relajación muscular.

30 En lo que se refiere al loto azul, los ensayos realizados por la presente solicitante han demostrado que, entre las diversas partes de la planta, se prefiere utilizar las semillas maduras, cuyo suministro y conservación no suponen generalmente dificultad técnica alguna.

35 Según una forma de realización ventajosa, el extracto de loto azul utilizado en la presente invención se obtiene mediante la maceración hidroalcohólica o hidroglicólica de semillas pulverizadas y, preferentemente en una mezcla de propilenglicol / agua en una proporción (v/v) de aproximadamente 50/50.

El extracto se presenta en forma de líquido marrón - negro, y se caracteriza por:

- 40 - materia seca 2 a 2,5%
 - densidad 1,019
 - índice de refracción 1,393
 - pH 6,2 a 6,6

45 Los ensayos se realizaron utilizando muestras con una dosificación, respectivamente, del 0,1%, 0,5% y 1% del extracto.

Los resultados se describirán posteriormente en el Ejemplo 8.

50 El extracto de loto azul utilizado en la presente invención se puede utilizar solo o junto con otros principios activos compatibles, es decir, que no son susceptibles de reaccionar entre sí o de ocultar o limitar sus efectos específicos.

Según una forma de realización preferida, el extracto de loto azul se combina con un extracto de amapola y/o un extracto de malvavisco.

55 El extracto de amapola se presenta en forma de líquido amarillo pálido, y se caracteriza por:

- 60 - materia seca 0,05 a 0,6%
 - densidad 1,010 a 1,060
 - índice de refracción 1,375 a 1,395
 - pH 6,5 a 7,5

La proporción en peso del extracto de amapola con respecto al extracto de loto azul puede estar comprendida entre aproximadamente 1/4 y 4/1 y preferentemente es de aproximadamente 1/1. Los dos extractos en forma líquida se pueden mezclar para formar un complejo.

El extracto de malvavisco utilizado, si procede, en las composiciones se proporciona preferentemente en forma acuosa. Según una forma de realización ventajosa, el extracto de malvavisco se obtiene por lixiviación desde raíces de malvavisco (*Althea officinalis*) en polvo.

5 El extracto de malvavisco se presenta en forma de líquido de color amarillo - ámbar, con un olor característico, que se caracteriza por:

	- materia seca	1,5 a 2%
	- agua	98 a 98,5%
10	- densidad	0,993 a 1,00
	- índice de refracción	1,336
	- pH	6,0 a 6,2
	- osas neutras	839 mg/l
15	- osas ácidas	459,8 mg/l

Los ensayos realizados por la presente solicitante han demostrado que, entre las diversas partes de la planta, se prefiere utilizar la raíz de malvavisco, que se encuentra fácilmente disponible y cuya conservación no supone generalmente problema alguno.

20 Cuando se utilizan juntos, los extractos de loto azul, amapola y malvavisco se utilizan en cantidades equivalentes, es decir, en una proporción en peso de aproximadamente 1/1/1. Los extractos se pueden mezclar en forma líquida para formar un complejo.

25 Según una forma de realización ventajosa, el extracto de loto azul, al que se ha añadido opcionalmente amapola y/o malvavisco, se complementa con principios activos o ingredientes auxiliares seleccionados por sus propiedades complementarias, a fin de reforzar el efecto de inhibición de las mioclonías faciales o completar los efectos contra el envejecimiento de la composición. Por lo tanto, resulta particularmente ventajoso combinar la misma con cantidades aptas de proteínas de semillas de amaranto (*Amaranthus caudatus*) o globulinas de guisantes para proporcionar firmeza a la piel, aceite de *Calophyllum* para reforzar el efecto antiarrugas, *Imperata cylindrica*, por ejemplo MOIST 24® de la compañía Sederma, para favorecer la hidratación de la piel mediante la modificación de la presión osmótica, aceite de *Echium* por su efecto antiinflamatorio, o además un palmitoil pentapéptido-3 tal como el Matrixyl® o derivados tales como el palmitoil GHK (que presenta la cadena glicil-histidil-lisina) y el palmitoil GQPR (glicil-glutamil-prolil-arginina) o el palmitoil VGVAPG (valil-glicil-valil-alanil-prolil-glicina) asociado a una ceramida-2, así como, de un modo general, cualquier combinación con una ceramida.

35 Las composiciones se pueden presentar en cualquier forma farmacéutica convencional apta para una aplicación tópica.

40 Estas pueden comprender entre el 0,2% y el 10% en peso de extracto de loto azul, tal como se ha definido anteriormente, con respecto al peso total de la composición y, preferentemente entre el 0,5 y el 5% en peso. La elección de la dosis en la composición se puede realizar en función del uso previsto. Para un tratamiento antiarrugas prolongado, se utilizan preferentemente dosis inferiores de aproximadamente el 0,5 al 1%, mientras que un tratamiento localizado puede requerir dosis más elevadas.

45 Cuando comprenden un extracto de loto azul junto con un extracto de amapola y/o un extracto de malvavisco, las cantidades de cada uno de dichos extractos pueden ser tal como se ha indicado anteriormente y, preferentemente, inferiores al 5% en peso para cada extracto.

50 Las composiciones se pueden presentar en formas utilizadas convencionalmente para su aplicación tópica, es decir, en forma de gel, loción, emulsión (en particular crema o leche), máscara o pomada, que contengan excipientes y soportes habituales compatibles y farmacéuticamente aceptables. Se pueden presentar asimismo en forma de toallitas empapadas en una solución que contiene el extracto de loto según la presente invención, si procede, junto con el extracto de amapola y/o el extracto de malvavisco. Estas formas de administración tópica se preparan mediante técnicas conocidas y, por ejemplo, en el caso de una crema, mediante la dispersión de una fase grasa en una fase acuosa para obtener una emulsión de aceite en agua, o viceversa, para preparar una emulsión de agua en aceite. En el caso de las cremas, se prefiere utilizar emulsiones con una estructura laminar que contengan poco o nada de productos etoxilados.

60 Las composiciones tópicas utilizadas según la presente invención pueden comprender, por ejemplo, excipientes aptos para una administración tópica externa, en particular excipientes aptos desde el punto de vista dermatológico y cosmetológico. Dichos excipientes aptos para la formulación resultan muy conocidos por los expertos en la materia y comprenden, en particular, agentes de penetración, tales como etoxidifenol, fitantriol, octilododecanol y escina; espesantes tales como gomas naturales y polímeros sintéticos; emolientes y agentes tensioactivos tales como octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo, isononanoato de cetearilo, dimeticona, ciclometicona, 3-diisoestearato de poliglicerilo, poliisobuteno hidrogenados, alcohol cetílico, palmitato cetílico, fosfato cetílico; emulsionantes; conservantes tales como fenoxietanol, parahidroxibenzoato de metilo (metilparabeno), parahidroxibenzoato de etilo

(etilparabeno), parahidroxibenzoato de propilo (propilparabeno) y Phenonip® combinando fenoxietanol y parahidroxibenzoato de metilo, etilo, butilo e isobutilo; colorantes; perfumes; etc. En las composiciones se pueden utilizar otros ingredientes: hidratantes tales como propilenglicol, glicerina, butilenglicol y asimismo vitaminas antioxidantes tales como vitamina E, por ejemplo, acetato de tocoferol o tocotrienol, vitamina C, polifenoles naturales. Se puede añadir asimismo a la composición acondicionadores cutáneos tales como el nilón y el nitrato de boro.

Los siguientes ejemplos ilustran más detalladamente la presente invención sin limitar su alcance. En todos los ejemplos siguientes de composiciones, las partes se expresan en peso a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

Según las técnicas convencionales, se prepara una loción relajante de los músculos faciales que presenta la siguiente composición en peso.

15	Extracto de semillas de loto azul	3,0
	Glicerina	5,0
	2-metil-1,3-propanodiol	5,0
20	Phenonip®	0,5
	Pantenol	0,2
	Alantoína	0,1
	PEG 40 de aceite de ricino	1,5
	Dipropilenglicol	1,0
	Perfume	0,5
25	Agua desmineralizada	csp (cantidad suficiente para) 100,0

El extracto de semillas de loto azul utilizado en la composición anterior es un extracto hidroglicólico obtenido mediante la maceración de semillas pulverizadas en una mezcla de propilenglicol / agua 50/50 (v/v) que presenta las características especificadas anteriormente.

La loción que presenta la composición indicada anteriormente se utiliza aplicándose en la cara, de una a dos veces al día.

Ejemplo 2

Según las técnicas convencionales, se prepara una crema relajante de los músculos faciales que presenta la siguiente composición en peso.

40	Extracto de semillas de loto azul	5,0
	Glicerina	5,0
	Fenoxietanol	0,5
	Edetato tetrasódico	0,05
	Butilenglicol	1,0
45	Carbómero	0,2
	Tocoferol libre	0,7
	Alcohol behenílico autoemulsionable	5,0
	Octildodecanol	4,0
	Palmitato de cetilo	2,0
	Aceite de rosa Mosqueta	1,0
50	Trometamina	0,2
	Matrixyl®	3,0
	Conservantes	0,3
	Perfume	0,2
55	Agua desmineralizada	csp 100,0

El extracto de semillas de loto azul utilizado en la composición anterior es idéntico al del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Según las técnicas convencionales, se prepara una toallita relajante de los músculos faciales empapada en una loción que presenta la siguiente composición en peso.

65	Extracto de semillas de loto azul	5,0
	Glicerina	5,0
	PEG 400	4,0
	Sorbitol al 70%	2,0

	Butilenglicol	4,0
	Phenonip®	0,5
	Perfume hidrosoluble	1,0
5	Agua desmineralizada	csp 100,0

Ejemplo 4

Según las técnicas convencionales, se prepara una loción relajante de los músculos faciales combinando extractos de loto azul y de amapola, que presenta la siguiente composición en peso.

10	Complejo loto azul / amapola	3,0
	Glicerina	5,0
	2-metil-1,3-propanodiol	5,0
	Phenonip®	0,5
15	Pantenol	0,2
	Alantoína	0,1
	PEG 40 de aceite de ricino	1,5
	Dipropilenglicol	1,0
	Perfume	0,5
20	Agua desmineralizada	csp 100,0

El complejo utilizado en la composición anterior comprende un extracto hidroglicólico de semillas de loto azul y un extracto hidroglicólico de amapola, ambos obtenidos por maceración semillas pulverizadas en una mezcla de propilenglicol / agua 50/50 (v / v).

25 La loción que presenta la composición indicada anteriormente se utiliza aplicándose en la cara, de una a dos veces al día.

Ejemplo 5

30 Según las técnicas convencionales, se prepara una crema relajante de los músculos faciales que presenta la siguiente composición en peso.

35	Complejo loto azul / amapola	5,0
	Glicerina	5,0
	Fenoxietanol	0,5
	Edetato tetrasódico	0,05
	Butilenglicol	1,0
	Carbómero	0,2
40	Tocoferol libre	0,7
	Alcohol behenílico autoemulsionable	5,0
	Octildodecanol	4,0
	Palmitato de cetilo	2,0
	Aceite de rosa Mosqueta	1,0
45	Trometamina	0,2
	Matrixyl®	3,0
	Conservantes	0,3
	Perfume	0,2
50	Agua desmineralizada	csp 100,0

El complejo de loto azul / amapola utilizado en la composición anterior es idéntico al del Ejemplo 1.

Ejemplo 6

55 Según las técnicas convencionales, se prepara una toallita relajante de los músculos faciales empapada en una loción que presenta la siguiente composición en peso.

60	Complejo loto azul / amapola	5,0
	Glicerina	5,0
	PEG 400	4,0
	Sorbitol al 70%	2,0
	Butilenglicol	4,0
	Phenonip®	0,5
	Perfume hidrosoluble	1,0
65	Agua desmineralizada	csp 100,0

Ejemplo 7

Según las técnicas convencionales, se prepara una crema relajante de los músculos faciales que presenta la siguiente composición en peso.

5	Extracto de semillas de loto azul	2,0
	Extracto de amapola	2,0
	Extracto de raíz de malvavisco (<i>Althea officinalis</i>)	2,0
10	Glicerina	5,0
	Fenoxietanol	0,5
	Edetato tetrasódico	0,1
	Butilenglicol	1,0
	Carbómero	0,2
15	Tocoferol libre	0,7
	Alcohol behenílico autoemulsionable	5,0
	Octildodecanol	4,0
	Palmitato de cetilo	2,0
	Aceite de rosa Mosqueta	1,0
20	Trometamina	0,2
	Matrixyl®	3,0
	Conservantes	0,3
	Perfume	0,2
25	Agua desmineralizada	csp 100,0

Los extractos de loto azul, amapola y malvavisco anteriores se utilizan preferentemente en forma de complejo combinando los extractos mezclados en forma líquida.

Ejemplo 8

El estudio de los efectos del extracto de loto azul de la presente invención se ha realizado en ganglios de la raíz dorsal de las ratas, tal como se indicó anteriormente.

Protocolo experimental

Los cultivos de ganglios de la raíz dorsal se prepararon a partir de muestras tomadas de fetos de ratas tras 14 días de gestación. Los ganglios obtenidos con la máxima esterilidad posible, se conservaron en una disolución amortiguadora del pH con antibiótico. Los ganglios se cultivaron en un medio DMEM que contenía suero fetal de ternera durante 17 días. Durante dicho período de cultivo, los ganglios produjeron extensiones de las dendritas que secretaban neuropéptidos.

Tras 17 días de cultivo, se retiró el medio y se añadió medio fresco, ya sea solo o combinado con distintas concentraciones del extracto según la presente invención. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una estufa con un 95% de oxígeno y un 5% de CO₂.

Al final del período de incubación (24 horas), se recuperó el medio de cultivo. Los neuropéptidos (sustancia P, CGRP, adrenalina y acetilcolina) se analizaron utilizando un anticuerpo monoclonal específico.

Determinación de la sustancia P

Los cultivos primarios de células nerviosas se obtuvieron a partir de las muestras tomadas en el ganglio de la raíz dorsal de fetos de ratón tal como se indicó anteriormente. Las células se incubaron en presencia o ausencia del producto que se estaba estudiando. Al final del período de incubación, se extrajo el medio, se analizó a continuación la sustancia P mediante la reacción inmunológica con anticuerpos monoclonales específicos para este neuropéptido.

El ensayo se realizó por triplicado tras 24 horas de tratamiento.

- lote 1: control negativo
- lote 2: control positivo (inducción mediante la capsaicina)
- 60 - lote 3: tratado con el producto extracto de loto azul (3 concentraciones)
- lote 4: tratado con complejo de loto azul / amapola (2 concentraciones)

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

65

	Sustancia P (pg/ml)	Porcentaje
Control	42,8 ± 7,4	-
Control positivo capsaicina (25 pM)	64,5 ± 11,4	+51
Extracto de loto azul (0,1%)	36,8 ± 12**	-14
Extracto de loto azul (0,5%)	31,8 ± 7,8*	-25
Extracto de loto azul (1%)	25,2 ± 8,2*	-41
Complejo amapola / loto (0,5%)	38,5 ± 10,1	(ns)
Complejo amapola / loto (1%)	35,8 ± 7,4*	-16

* Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,05$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).
** Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,01$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).

Determinación de la CGRP

5 Los cultivos primarios de células nerviosas se obtuvieron del mismo modo que la sustancia P y se realizó la determinación de la CGRP mediante la reacción inmunológica con anticuerpos monoclonales específicos para la CGRP.

El ensayo se realizó por triplicado tras 24 horas de tratamiento.

- 10 - lote 1: control negativo
- lote 2: control positivo (inducción mediante la capsaicina)
- lote 3: tratado con el producto extracto de loto azul (3 concentraciones)
- lote 4: tratado con complejo de loto azul / amapola (2 concentraciones)

15 Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

	CGRP (pg/ml)	Porcentaje
Control	290 ± 15,8	-
Control positivo capsaicina (25 pM)	345 ± 9,7	+19
Extracto de loto azul (0,1%)	215 ± 15,8*	-25
Extracto de loto azul (0,5%)	202 ± 22*	-30
Extracto de loto azul (1%)	185 ± 34*	-36
Complejo amapola / loto (0,5%)	245 ± 11,8**	-15
Complejo amapola / loto (1%)	223 ± 25,8*	-23

* Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,05$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).
** Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,01$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).

Determinación de la acetilcolina

20 Las células nerviosas se sembraron tal como anteriormente. Las células se incubaron en presencia o ausencia del extracto de loto azul según la presente invención. Al final del período de incubación, se extrajo el medio, se analizó a continuación la acetilcolina mediante la reacción inmunológica con anticuerpos monoclonales específicos.

25 El ensayo se realizó por triplicado tras 24 horas de tratamientos.

- 30 - lote 1: control negativo
- lote 2 a 4: tratado con el producto extracto de loto (3 concentraciones)
- lote 5: tratado con complejo de loto azul / amapola (2 concentraciones)

La dosis de acetilcolina se determinó utilizando el kit Amplex™ Red (acetilcolina / acetilcolinesterasa) que proporciona un método ultrasensible. Los posibles usos de este kit comprenden la detección de inhibidores de la acetilcolinesterasa y la medición de la liberación de acetilcolina en los sinaptosomas.

35 Se analizó la dosis de acetilcolina utilizando un lector de microplacas utilizando con una excitación de 560 nm y una detección de la fluorescencia a 590 nm.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

	Acetilcolina (µM)	Porcentaje
Control	23,5 ± 2,8	-
Extracto de loto azul (0,1%)	20,8 ± 0,7	-11 (ns)
Extracto de loto azul (0,5%)	16,7 ± 2,5*	-29
Extracto de loto azul (1%)	14,8 ± 3,2*	-37

Complejo amapola / loto (0,5%)	20,5 ± 1,5**	-12
Complejo amapola / loto (1%)	19,6 ± 2,2**	-16
* Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,01$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).		
** Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,05$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).		

Análisis de la afinidad con respecto al receptor de la sustancia P en el nivel de los queratinocitos humanos en cultivo

5 Las células se incubaron en presencia o ausencia del producto considerado estudiando o del ligando no radiactivo (Sar9, Met(O₂)11)-SP, con la 3H (Sar9, Met(O₂)11)-SP.

Tras la incubación, la se midió la radiactividad para determinar el potencial del producto considerado para competir con la sustancia P.

10 El ensayo se realizó por triplicado tras 24 horas de tratamiento.

- lote 1: control negativo
- lote 2 a 4: tratado con el producto extracto de loto azul (3 concentraciones)
- lote 5 a 7: tratado con el complejo amapola / loto azul (3 concentraciones)

15 Este estudio se basó en la competición entre el extracto de loto azul y la sustancia P marcada. Este resultado indica una disminución de la fijación específica de la sustancia P marcada a su receptor cuando el producto compite con la misma.

20 Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

	Cpm	Porcentaje
Control	1580 ± 124	-
Extracto de loto azul (0,1%)	1205 ± 32*	-23
Extracto de loto azul (0,5%)	1212 ± 102*	-23
Extracto de loto azul (1%)	1113 ± 135*	-30
Complejo amapola / loto (0,1%)	1113 ± 122*	-29
Complejo amapola / loto (0,5%)	1123 ± 185*	-29
Complejo amapola / loto (1%)	1025 ± 202*	-35
* Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,01$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).		

De este modo, los resultados presentados anteriormente demuestran que el producto analizado:

- 25 - inhibe la liberación de la sustancia P, a una concentraciones del 0,5% y el 1%, respectivamente, en un 25% y un 41% con respecto al control sin tratar.
- inhibe la liberación de la CGRP, a unas concentraciones del 0,5% y el 1%, respectivamente, en un 30% y un 36% con respecto al control sin tratar.
- 30 - inhibe la liberación de la sustancia P en su receptor a unas concentraciones del 0,1%, el 0,5% y el 1%, respectivamente, en un 23% y un 30%.
- inhibe la liberación de la acetilcolina, a unas concentraciones del 0,5% y el 1%, respectivamente, en un 29% y un 37% con respecto al control sin tratar.

35 Estos resultados demuestran que el producto analizado puede eliminar la actividad de la sustancia P y de la CGRP inhibiendo su liberación y compitiendo con la sustancia P por su receptor. Dicha actividad en el nivel de los neuropéptidos y, con mayor exactitud, la inhibición de su liberación se puede deber a la inhibición de la acetilcolina.

40 De hecho, se demostró que la acetilcolina puede activar las fibras nociceptivas C y, por consiguiente, aumentar la concentración de CGRP y de la sustancia P.

Determinación de la adrenalina

45 Los resultados obtenidos tras el tratamiento de las mismas células que en los ensayos mencionados anteriormente por el extracto de loto azul de la presente invención demuestran una competición entre el extracto y la adrenalina con respecto al receptor adrenérgico. Dicha fijación en el receptor adrenérgico puede regular el mecanismo de la contractilidad mediante la calmodulina. La afinidad del complejo calcio - calmodulina hacia la ATPasa de la miosina depende del grado de fosforilación de una cinasa de las cadenas ligeras de la miosina. Cuando se fosforila la misma por la acción de la proteína cinasa A, disminuye la afinidad del complejo calcio - calmodulina hacia ATPasa de la miosina, provocando una relajación de las fibras musculares.

50 Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

ES 2 387 129 T3

	^{125}I Adrenalina (Cpm)	Porcentaje
Control	3850 ± 270	-
Extracto de loto azul (0,1%)	3415 ± 211	-11
Extracto de loto azul (0,5%)	3218 ± 198*	-16
Extracto de loto azul (1%)	2915 ± 153*	-24

* Significativamente distinto con respecto al control $p \leq 0,05$ (prueba de Wilcoxon para datos independientes).

Estos resultados ponen de manifiesto el efecto relajante de las fibras musculares ejercido por el extracto de loto azul de la presente invención.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6468564 B [0013]
 - US 5925348 A [0013]
 - US 6605306 B [0018]
- 10

Documentos que no corresponden a patentes citados en la descripción

- G. NOSALOVA et al. *Pharmazie.*, 1992, vol. 47 (3), 224-6 [0016]
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) en la preparación de una composición tópica para la prevención y el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas.
2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada porque** el extracto se obtiene a partir de semillas de loto azul (*Nymphaea caerulea*).
- 10 3. Utilización según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el extracto se obtiene mediante la maceración hidroglicólica de semillas pulverizadas.
4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizada porque** el extracto se obtiene mediante la maceración de semillas pulverizadas en una mezcla de propilenglicol y agua.
- 15 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** el extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) es un líquido marrón - negro, **que se caracteriza por:**
- | | | |
|----|------------------------|-----------|
| | - materia seca | 2 a 2,5% |
| | - densidad | 1,019 |
| 20 | - índice de refracción | 1,393 |
| | - pH | 6,2 a 6,6 |
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición comprende entre un 0,2 y un 10% en peso de extracto de loto azul.
- 25 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición comprende además un extracto de amapola (*Papaver rhoeas*) y/o un extracto de malvavisco (*Althea officinalis*).
- 30 8. Utilización según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el extracto de amapola (*Papaver rhoeas*) se presenta en forma de líquido amarillo pálido, **que se caracteriza por:**
- | | | |
|----|------------------------|---------------|
| | - materia seca | 0,05 a 0,6% |
| | - densidad | 1,010 a 1,060 |
| | - índice de refracción | 1,375 a 1,395 |
| 35 | - pH | 6,5 a 7,5 |
9. Utilización según la reivindicación 7, **caracterizada porque** el extracto de malvavisco (*Althea officinalis*) se presenta en forma de líquido de color amarillo - ámbar, con un olor característico, **que se caracteriza por:**
- | | | |
|----|------------------------|--------------|
| 40 | - materia seca | 1,5 a 2% |
| | - agua | 98 a 98,5% |
| | - densidad | 0,993 a 1,00 |
| | - índice de refracción | 1,336 |
| | - pH | 6,0 a 6,2 |
| 45 | - osas neutras | 839 mg/l |
| | - osas ácidas | 459,8 mg/l |
- 50 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** la composición comprende un extracto de loto azul y un extracto de amapola en una proporción en peso comprendida entre 1/4 y 4/1.
11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** la composición comprende un complejo constituido por una mezcla de loto azul, amapola y extractos de malvavisco en forma líquida.
- 55 12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición comprende, además, proteínas de amaranto (*Amaranthus caudatus*), o globulinas de guisantes, del aceite de *Calophyllum*, de *Imperata cylindrica*, del aceite de *Echium*, un palmitoilpentapéptido-3 o derivados tales como el palmitoil GHK y el palmitoil GQPR o el palmitoil VGVAPG asociado a una ceramida-2, así como una ceramida.
- 60 13. Utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) en la preparación de un medicamento dermatológico para la prevención y el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas.
14. Utilización de un extracto de loto azul (*Nymphaea caerulea*) asociado a un extracto de malvavisco (*Althea officinalis*), y/o un extracto de amapola (*Papaver rhoeas*) en la preparación de un medicamento dermatológico para la prevención y el tratamiento de las mioclonías faciales incontroladas.
- 65