

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 490**

51 Int. Cl.:

C07H 15/203 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011** **E 11720876 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 2556080**

54 Título: **Composición cosmética**

30 Prioridad:

09.04.2010 FR 1052719

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

24.09.2015

73 Titular/es:

GUERLAIN SOCIETE ANONYME (33.3%)
68 Avenue des Champs-Elysees
75008 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)

72 Inventor/es:

SIMMLER, CHARLOTTE;
LEPLANQUAIS, VIRGINIE;
NOBLESSE, EMMANUELLE;
ANDRE, PATRICE y
LOBSTEIN, ANNE LISE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 546 490 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 cosmética

- 5 La invención se relaciona con nuevos derivados del ácido eucómico (ácido 2-(4-hidroxibencil) málico), con composiciones cosméticas o dermatológicas que contienen al menos uno de estos compuestos y con métodos de cuidado que utilizan dichas composiciones.

Estado de la técnica

- 10 Las mitocondrias constituyen la fábrica de producción de energía celular gracias a su cadena respiratoria y a la fosforilación oxidativa. Durante el envejecimiento cutáneo, especialmente fotoinducido, se observa una disminución de las funciones mitocondriales.

- 15 Como norma general, una cadena respiratoria mitocondrial defectuosa conduce a un aumento intracelular de especies oxigenadas reactivas (EOR), lo que acelera el proceso de envejecimiento cutáneo. Esta disfunción mitocondrial es responsable de una disminución del metabolismo energético celular que compromete al final la producción de energía celular. En cosmética, los principios activos capaces de estimular el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y de activar así el metabolismo energético celular reivindican funciones anti-envejecimiento (CoQ10, Resveratrol). Además, los principios activos cosméticos que estimulan la renovación y por lo tanto la diferenciación celular participan en el mantenimiento de una piel sana y joven.

- 20 La presente invención se relaciona con nuevos compuestos derivados del ácido eucómico (ácido 2-(4-hidroxibencil) málico), especialmente obtenidos a partir de un extracto de la orquídea *Papilionanthe teres*, que presentan tales propiedades.

- 25 El ácido eucómico es conocido. Fue primeramente aislado a partir de un extracto de bulbos de *Eucomis punctata* (familia de las Liliáceas) (Heller y *al.*, Helvetica Chimica Acta, 1984, 57 (6), 1766-84) y se identificó después en otras especies vegetales, tales como *Lotus japonicus* (Fabaceae), *Crotalaria sessiflora* (Fabaceae), *Crataegus pinnatifida* (Rosaceae) o también *Encyclia michuacana* (Orchidaceae).

- 30 La familia de las Orchidaceae (Orquidáceas u Orquídeas) es una familia muy grande de plantas monocotiledóneas. Es la familia vegetal más diversificada, contando con más de veinticinco mil especies, repartidas en ochocientos cincuenta géneros. Un cierto número de orquídeas han sido ya objeto de estudios en el ámbito de la cosmética, destinados a aplicaciones para los cuidados de la piel.

- 35 Por ejemplo, la solicitud de patente FR 2.924.348 divulga un extracto obtenido a partir de al menos una parte de la orquídea *Vanda teres*, ahora clasificada en el género *Papilionanthe* como especie denominada *Papilionanthe teres*, así como la utilización de dicho extracto como principio activo en una composición cosmética que contiene al menos un excipiente cosméticamente aceptable y que está destinada a ser aplicada sobre la piel para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento cutáneo.

- 40 Este extracto de *Papilionanthe teres* es, pues, particularmente interesante desde el punto de vista de sus actividades, especialmente cosméticas o dermatológicas. Sin embargo, por lo que los inventores saben, no se ha aislado ni identificado al día de la fecha ninguna molécula responsable de estas actividades.

Fines de la invención

- 45 La presente invención tiene como fin principal proporcionar nuevos compuestos químicos utilizables como principios activos cosméticos o dermatológicos aptos para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento cutáneo y/o para mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o favorecer la cicatrización cutánea.

- 50 Tiene igualmente por objeto proporcionar estos nuevos compuestos en una forma utilizable como principio activo en una composición cosmética o dermatológica, especialmente en forma de extractos vegetales enriquecidos en al menos uno de estos nuevos compuestos.

- 55 Según otro aspecto, la invención se relaciona con una composición cosmética o dermatológica que contiene al menos uno de estos compuestos como agente cosmético o dermatológico, o tal principio activo en forma de extracto vegetal, en un vehículo cosmética o dermatológicamente aceptable compatible con una aplicación tópica sobre la piel.

- 60 La invención tiene igualmente por objeto resolver el problema técnico consistente en el aislamiento y la caracterización de una o más moléculas activas de un extracto de la orquídea *Papilionanthe teres*.

- 65 La invención tiene finalmente por objeto proponer una solución a estos problemas técnicos de un modo particularmente simple, relativamente poco costoso y utilizable a escala industrial y cosmética.

Descripción detallada de la invención

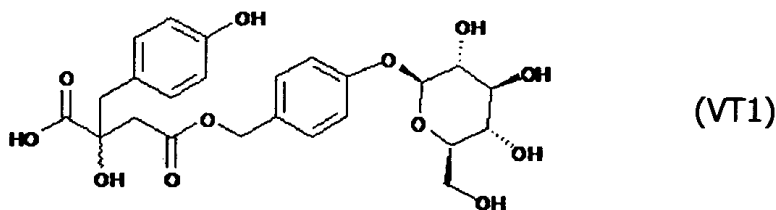
Los inventores de la presente invención aislaron e identificaron nuevos compuestos derivados del ácido eucómico, obtenidos especialmente a partir de un extracto de la orquídea *Papilionanthe teres*. Estos nuevos compuestos son denominados de manera colectiva « vandaterósidos » en la presente solicitud (abreviado como « VT »).

Los inventores pusieron igualmente en evidencia el impacto de los vandaterósidos de la invención sobre el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial de los queratinocitos humanos (KHN y HaCaT), interesándose más concretamente en los complejos I y II de la cadena respiratoria, así como en la citocromo C oxidasa. También mostraron que estimulan significativamente el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y la diferenciación celular de los queratinocitos humanos. Estas moléculas actúan, por lo tanto, en el núcleo de la regulación del metabolismo energético y de la regulación del estrés oxidativo celular y presentan, pues, un inesperado interés como principios activos en composiciones cosméticas o dermatológicas para luchar contra el envejecimiento cutáneo. Estimulando la renovación y la diferenciación celular, los compuestos participan en el metabolismo celular y estimulan la renovación del *stratum corneum* y contribuyen al mantenimiento de una piel sana y joven.

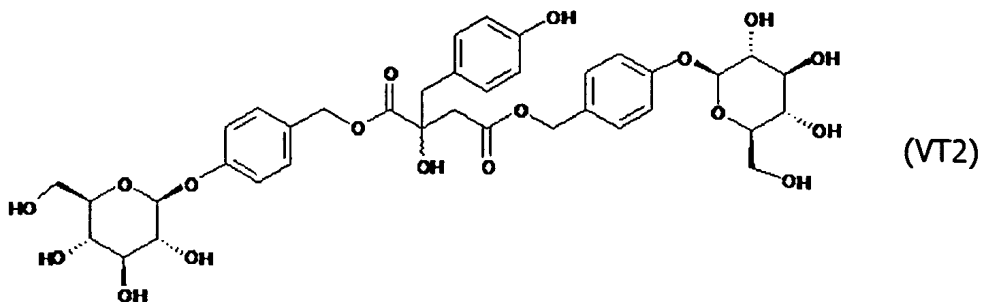
Las técnicas empleadas recurren por una parte a la medición de la transformación del XTT (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio) en formazán soluble por los complejos I y II de los KHN, y por otra a la medición propia de la actividad enzimática de la citocromo C oxidasa extraída de las mitocondrias de queratinocitos humanos modificados (HaCaT).

Del mismo modo, los inventores evaluaron la acción de estos vandaterósidos sobre la producción de proteínas de expresión (transglutaminasa, involucrina, desmogleína I) de la diferenciación de los KHN por inmunomarcaje. Este proceso de diferenciación participa en la renovación celular de la envuelta córnea.

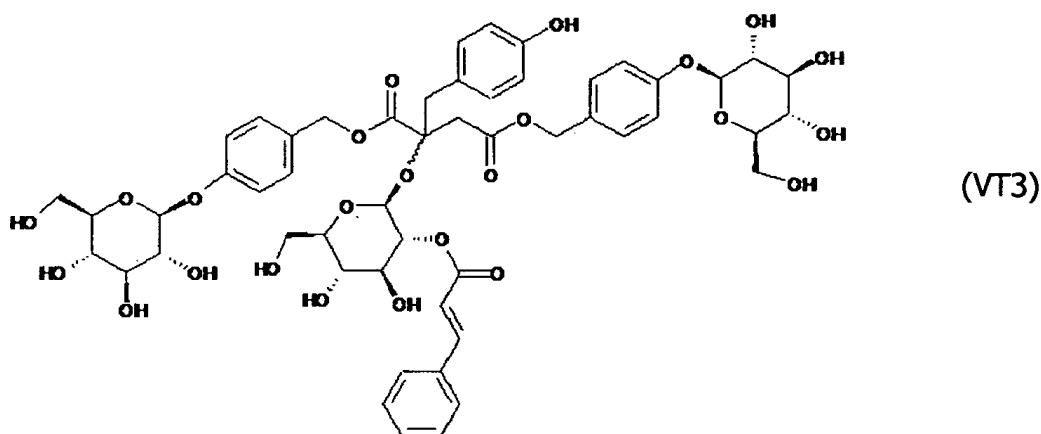
Un primer objeto de la invención contempla compuestos que presentan las fórmulas siguientes:



y en particular el 4-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(p-hidroxibencil)malato,



y en particular el 1,4-bis(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(p-hidroxibencil)malato,



y en particular el 1,4-bis(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(éster 2-β-D-glucopiranosil-3-trans-cinamoílico)-2-(p-hidroxibencil)malato.

Un segundo objeto de la invención se relaciona con un extracto de planta caracterizado por estar específicamente enriquecido en uno o más de los compuestos definidos anteriormente.

Dicho extracto es ventajosamente obtenido a partir de al menos una parte de una orquídea, en particular de una orquídea perteneciente al género *Papilionanthe*, *Vanda* o *Encyclia*.

Un extracto preferido se caracteriza, en particular, por ser obtenido a partir de la orquídea *Papilionanthe teres*, especialmente a partir de tallos, de raíces y de flores de dicha orquídea, y por incluir al menos un compuesto VT1 y/o VT2 y/o VT3.

Se entiende por « específicamente enriquecido » o « enriquecido » un extracto que se obtiene mediante una etapa destinada a aumentar voluntariamente el contenido del extracto en compuestos VT1 y/o VT2 y/o VT3.

Dicho extracto enriquecido es, en particular, ventajosamente obtenido por una etapa de eliminación de los azúcares o por fraccionamiento, y por ejemplo por cromatografía de exclusión estérica.

Son extractos típicos aquéllos cuyo extracto seco tiene una concentración de compuestos VT1 y/o VT2 y/o VT3 superior a la de un extracto seco obtenido tras extracción, sin etapa destinada a aumentar específicamente la concentración de los compuestos antes citados.

Preferentemente, dicho extracto enriquecido tiene al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70% y aún preferiblemente al menos un 80% en peso de compuesto VT1 y/o VT2 y/o VT3, con respecto al peso total del extracto seco.

Un extracto particular de la invención, ventajosamente preparado a partir de la orquídea *Papilionanthe teres*, se caracteriza por incluir uno o más compuestos seleccionados entre VT1 y/o VT2 en un contenido acumulado superior al 40% en peso con respecto al peso del extracto seco, preferentemente superior al 60% y aún preferentemente superior al 80%.

Otro extracto de la invención, igualmente ventajosamente preparado a partir de la orquídea *Papilionanthe teres*, se caracteriza por incluir el compuesto VT3 en un contenido superior al 8% en peso con respecto al peso del extracto seco, preferentemente superior al 15% en peso, preferentemente superior al 25% en peso y aún preferentemente superior al 40% en peso.

Ventajosamente, el extracto de la invención se caracteriza por estar constituido por al menos un 80% en peso de los compuestos VT1, VT2 y VT3 con respecto al peso total del extracto seco, preferentemente al menos un 90% en peso.

Un extracto enriquecido preferido es más particularmente preparado a partir de los tallos o de las raíces de la orquídea *Papilionanthe teres*.

Un tercer objeto de la invención se relaciona con una composición cosmética o dermatológica que contiene como principio activo cosmético o dermatológico al menos un compuesto definido anteriormente y/o un extracto de planta que contiene dicho compuesto, ventajosamente según una cualquiera de las variantes y de los modos de realización descritos anteriormente.

Además de al menos uno de los compuestos o extractos antes citados, la composición cosmética puede igualmente contener uno o más de otros principios activos cosméticos o dermatológicos, en forma de moléculas purificadas y/o de extractos vegetales, que presenten efectos cosméticos similares y/o complementarios a los de dichos compuestos.

La composición puede así especialmente contener uno o más de otros extractos de plantas, obtenidos a partir de plantas enteras o de partes de plantas o también de soluciones preparadas a partir de extractos de estas plantas, siendo ventajosamente obtenidos los extractos por los procedimientos clásicamente empleados por el experto en la técnica, y más particularmente por extracción con ayuda de un solvente polar o de una mezcla de solventes polares, ventajosamente seleccionados entre agua, alcoholes C₁-C₄ o glicoles.

Los otros principios activos cosméticos o dermatológicos pueden ser seleccionados, por ejemplo, entre sustancias que tengan una actividad antienvjecimiento; sustancias que tengan una actividad despigmentante o una actividad aclarante de la piel; sustancias que tengan una actividad adelgazante; sustancias que tengan una actividad hidratante; sustancias que tengan una actividad calmante, sedante o relajante; sustancias que estimulen la microcirculación cutánea para mejorar el brillo de la tez, en particular de la cara; sustancias que tengan una actividad seborreguladora para el cuidado de las pieles grasas; sustancias destinadas a limpiar o purificar la piel; y sustancias que tengan una actividad antirradicales.

La composición puede ventajosamente contener al menos un extracto de orquídea, tal como una orquídea perteneciente al género *Brassocattleya*, por ejemplo un extracto de la orquídea *Brassocattleya marcella*, o al género *Encyclia*, por ejemplo un extracto de la orquídea *Encyclia michuacana*, o al género *Cattleya*, o al género *Vanda*, por ejemplo un extracto de una orquídea entre *Vanda coerulea* o *Vanda denisoniana*, o también al género *Papilionanthe*.

Ventajosamente, la composición contiene además al menos un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable, que puede ser especialmente seleccionado entre pigmentos, colorantes, polímeros, agentes tensioactivos, agentes de reología, perfumes, electrolitos, ajustadores del pH, agentes antioxidantes, conservantes y sus mezclas.

La composición cosmética o dermatológica se presenta ventajosamente en forma de suero, de loción, de crema o de hidrogel, especialmente una mascarilla, o también en forma de barra o de parche.

Un cuarto objeto de la invención se relaciona con al menos un compuesto tal como se ha definido anteriormente o con al menos un extracto de planta que contiene tal compuesto, ventajosamente según una cualquiera de las variantes y de los modos de realización antes descritos, para su utilización como principio activo cosmético o dermatológico en una composición cosmética o dermatológica.

Ventajosamente dicho compuesto o dicho extracto es un principio activo destinado a luchar contra el envejecimiento cutáneo, especialmente para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento de la piel, reestructurar la epidermis, reafirmar la piel y/o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y las propiedades protectoras de la epidermis, y/o a mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o a favorecer la cicatrización cutánea.

La invención se relaciona igualmente con al menos un compuesto tal como se ha definido anteriormente, o con un extracto de planta que contiene tal compuesto, ventajosamente según una cualquiera de las variantes y de los modos de realización antes descritos, para su utilización como principio activo en una composición cosmética o dermatológica, estimulando dicho principio activo la expresión y/o la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y/o de la citocromo C oxidasa y/o de la cadena respiratoria de las mitocondrias y/o el metabolismo energético celular y/o la diferenciación y la renovación de las células epiteliales.

Ventajosamente dicho principio activo permite actuar a nivel de la epidermis, y en particular de las células epiteliales, y aún más en particular de los queratinocitos.

La invención se relaciona igualmente con al menos un extracto de la orquídea *Papilionanthe teres*, en particular de tallos o de raíces de la orquídea *Papilionanthe teres*, que contiene tal compuesto, ventajosamente según una cualquiera de las variantes y de los modos de realización descritos anteriormente, para su utilización como principio activo destinado a luchar contra el envejecimiento cutáneo, especialmente para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento de la piel, reestructurar la epidermis, reafirmar la piel y/o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y las propiedades protectoras de la epidermis, y/o a mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o a favorecer la cicatrización cutánea, en una composición cosmética o dermatológica, estimulando dicho principio activo la expresión y/o la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y/o de la citocromo C oxidasa y/o de la cadena respiratoria de las mitocondrias y/o el metabolismo energético celular y/o la diferenciación y la renovación de las células epiteliales.

Ventajosamente, los compuestos de la invención son activos para estimular la expresión de las proteínas de diferenciación de los queratinocitos.

Para cada uno de los objetos de la invención antes citada, la concentración de compuesto tal como se ha definido anteriormente o de extracto que contiene tal compuesto, utilizado a modo de principio activo cosmético o dermatológico, en una composición cosmética o dermatológica está comprendida entre el 0,0001 y el 1% en peso, más particularmente entre el 0,001 y el 0,1% en peso, aún mejor entre el 0,01 y el 0,1% en peso, con respecto al peso de dicha composición.

Las composiciones de la invención presentan un efecto particularmente buscado para luchar contra el envejecimiento cutáneo, especialmente para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento de la piel, reestructurar la epidermis, reafirmar la piel y/o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y las propiedades protectoras de la epidermis, y/o para mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o para favorecer la cicatrización cutánea.

La invención describe igualmente un método de cuidado cosmético o dermatológico, caracterizado por consistir en la aplicación sobre las zonas de piel afectadas de una composición cosmética o dermatológica tal como se ha definido anteriormente, en una cantidad eficaz para luchar contra el envejecimiento cutáneo, especialmente para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento de la piel, reestructurar la epidermis, reafirmar la piel y favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y las propiedades protectoras de la epidermis, y/o para mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o para favorecer la cicatrización cutánea.

Ventajosamente, dicho método consiste en la aplicación de dicha composición sobre una zona de piel de la cara, del cuello o del cuerpo, especialmente de las manos, que presenta signos de envejecimiento, tales como la presencia de arrugas o de arrugas de pequeño tamaño.

La presente invención se relaciona igualmente con un procedimiento de preparación de un compuesto según la invención, o de un extracto enriquecido según la invención, consistiendo dicho procedimiento en una etapa de extracción de al menos una parte de una planta, ventajosamente de una orquídea, en particular de la orquídea *Papilionanthe teres*, que contiene tal compuesto, y al menos una etapa de enriquecimiento del extracto obtenido en la etapa de extracción en uno o más compuestos VT1 y/o VT2 y/o VT3.

Preferentemente, con anterioridad a la etapa de extracción, este procedimiento incluye una etapa de trituración de la planta entera o de al menos una parte de la planta, preferentemente los tallos, las hojas o las raíces, y luego una etapa de extracción de esta planta o de las partes de dicha planta.

La planta o las partes de plantas son ventajosamente secadas o congeladas antes de la trituración.

Preferentemente, la extracción es realizada con ayuda de al menos un solvente polar. Entre los solventes polares, se puede utilizar un solvente único o una mezcla de solventes. Los solventes polares utilizados son preferentemente el agua; un alcohol, preferentemente C₁-C₄ y especialmente el metanol, el etanol o un propanol; y un poliol, y especialmente un glicol, y por ejemplo el glicerol, el propilenglicol o el butilenglicol.

Entre las mezclas de solventes, se utiliza preferentemente una mezcla hidroalcohólica, y preferentemente una mezcla de etanol/agua, y más particularmente una mezcla de etanol/agua en una proporción del orden de 90/10 v/v.

Se puede efectuar la extracción preferentemente en un solvente polar a reflujo, y preferentemente en el Soxhlet. Es posible optimizar la extracción en el Soxhlet utilizando solventes de polaridad creciente, como por ejemplo con una sucesión de solventes de tipo alcano (por ejemplo pentano, hexano, ciclopentano, ciclohexano, heptano, etc.), alcano halogenado (por ejemplo diclorometano) y luego alcohol (por ejemplo etanol o metanol).

Se puede concentrar luego el extracto para eliminar el solvente o la mezcla de solventes. Se puede obtener, por lo tanto, un compuesto seco, que puede solubilizarse o dispersarse en un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable para una utilización final en una composición de la invención.

El procedimiento de la invención comprende ventajosamente una etapa de enriquecimiento del extracto obtenido en la etapa de extracción antes mencionada en uno o más de los compuestos tales como los definidos anteriormente.

El procedimiento comprende, en particular, una etapa de enriquecimiento por eliminación de los azúcares o por fraccionamiento, y por ejemplo por cromatografía de exclusión estérica.

Además, el extracto puede ser decolorado parcial o completamente, especialmente en presencia de carbón activo tras haberlo puesto en presencia de un solvente polar.

Se pueden purificar las fracciones extraídas por cualquier método conocido por el experto en la técnica, y por ejemplo por cromatografía, especialmente cromatografía en columna de gel y/o cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR o HPLC).

Otros fines, características y ventajas de la invención aparecerán claramente a la luz de la descripción explicativa que se da a continuación, que se hace en relación a ejemplos de preparación de extractos y a pruebas que ponen

en evidencia las propiedades de los extractos y a un ejemplo de composición cosmética que utiliza tales extractos, dados simplemente a título de ilustración y que no sabrían, pues, en modo alguno limitar el alcance de la invención.

En los ejemplos, todos los porcentajes son dados en peso, la temperatura es en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica, salvo indicación en contrario.

En las figuras:

La figura 1 representa las fórmulas semidesarrolladas de los compuestos VT1, VT2, y VT3 de la invención, así como del ácido eucómico.

La figura 2 representa los espectros de masa de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención.

La figura 3 representa los espectros de RMN ^1H de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención.

La figura 4 representa los espectros de RMN ^{13}C (DEPT135) de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención.

La figura 5 representa el perfil obtenido por CLAR y detección UV del extracto según el ejemplo 1.2 (solubilizado en 5 mg/ml de MeOH) que contiene los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención.

La figura 6 representa el efecto de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención sobre la activación de las deshidrogenasas mitocondriales. Duración del tratamiento 48 h. Control negativo DMSO (0,1%, v/v). Medias $\pm$ DE (desviación estándar) calculadas a partir de tres experimentos.

La figura 7 representa la actividad de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención sobre la expresión de la citocromo C oxidasa. Tratamiento de las células HaCaT: 3 h. Control negativo: células no tratadas (DMSO (0,1%, v/v), control positivo: Resveratrol (11,41 $\mu\text{g/ml}$). Medias $\pm$ DE (desviación estándar) obtenidas en tres experimentos independientes.

La figura 8 representa la actividad de los compuestos VT1, VT2 y VT3 de la invención sobre la biogénesis mitocondrial. Tratamiento de las células HaCaT: 48 h. Control negativo: células no tratadas (DMSO (0,1%, v/v), control positivo: Resveratrol (11,41 $\mu\text{g/ml}$). Medias $\pm$ DE (desviación estándar) obtenidas en tres experimentos independientes.

La figura 9 representa el efecto del tratamiento con ayuda de los compuestos VT1, VT2 o VT3 de la invención sobre la expresión de la transglutaminasa.

La figura 10 representa una fotografía al microscopio electrónico de la expresión de la transglutaminasa en presencia de los compuestos VT1, VT2 o VT3 de la invención.

La figura 11 representa el efecto del tratamiento con ayuda de los compuestos VT1, VT2 o VT3 de la invención sobre la expresión de la involucrina.

La figura 12 representa el efecto del tratamiento con ayuda de los compuestos VT1, VT2 o VT3 de la invención sobre la expresión de la desmogleína 1.

La figura 13 representa una fotografía al microscopio electrónico de la expresión de la desmogleína 1 en presencia de los compuestos VT1, VT2 o VT3 de la invención.

Ejemplo

Ejemplo 1: Extractos de *Papilionanthe teres*

Se analizan diferentes partes de la orquídea *Papilionanthe teres* con el fin de detectar la presencia de vandaterósidos en cada una de estas partes de la planta y de determinar su contenido.

Se trituran 100 g de materia vegetal (MV) seca, constituida por tallos (ejemplo 1.1 y 1.2), raíces (ejemplo 1.3) u hojas (ejemplo 1.4) de la orquídea *Papilionanthe teres* (origen Tian Zi, China) antes de la etapa de extracción.

Ejemplo 1.1. Extracto hidroalcohólico de tallos de *Papilionanthe teres*

Se prepara un extracto total hidroalcohólico de la MV seca (etanol (EtOH)/agua 90/10 v/v, razón MV/solvente: 1/15) a reflujo (30 min, 80°C). Se obtiene este extracto total con un rendimiento másico del 12,8% (masa de extracto/masa de MV seca).

Ejemplo 1.2. Extracto metanólico de tallos de *Papilionanthe teres*

Una extracción de tipo Soxhlet (equipo SOXTEC Avanti 2055), más específica que la del ejemplo 1.1, permite agotar la MV seca por utilización sucesiva de tres solventes de polaridad creciente: ciclohexano (45 min, 180°C), diclorometano (ciclo 1: 45 min, 180°C, ciclo 2: luego 30 min, 180°C) y metanol (MeOH) (2 ciclos de 45 min, 180°C).

Este extracto metanólico, que concentra los vandaterósidos, es obtenido con un rendimiento másico del 6,9% (masa de extracto/masa de MV seca).

Ejemplo 1.3. Extracto hidroalcohólico de raíces de *Papilionanthe teres*

Se prepara un extracto hidroalcohólico total según las condiciones siguientes: EtOH/agua 90/10, utilizando una

razón MV/solvente de 1/15. Se prepara el extracto a reflujo (30 minutos, 80°C). El rendimiento másico obtenido para el extracto de raíces es del 14,8%.

Ejemplo 1.4. Extracto hidroalcohólico de hojas de *Papilionanthe teres*

Se prepara un extracto hidroalcohólico total según las condiciones siguientes: EtOH/agua 90/10, utilizando una razón MV seca triturada/solvente de 1/15. Se prepara el extracto a reflujo (30 minutos, 80°C). El rendimiento másico obtenido es del 15,0% para el extracto de hojas.

Se analizan estos extractos (ejemplos 1.1 a 1.4) según las condiciones descritas en el ejemplo 2 (Fraccionamiento, aislamiento) para confirmar la presencia de 3 compuestos respectivamente denominados VT1, VT2 y VT3 tras aislamiento y elucidación estructural. Sus concentraciones respectivas en los diferentes extractos y fracciones son determinadas por RP-HPLC según el método del ejemplo 2.1, por calibrado externo: se preparan diluciones seriadas de cada uno de los compuestos aislados VT1, VT2 y VT3 para determinar la curva de calibración.

En la siguiente tabla 1 se indican los resultados (véase también la fig.5):

Tabla 1

	VT1	VT2	VT3
Extracto hidroalcohólico de tallos de <i>P. teres</i>	6,7 ± 1,7	14,1 ± 0,6	2,6 ± 0,2
Extracto MeOH de tallos de <i>P. teres</i>	9,4 ± 0,4	19,3 ± 1,2	3,4 ± 0,7
Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>P. teres</i>	8,1 ± 0,6	13,4 ± 0,9	2,9 ± 0,0
Extracto hidroalcohólico de raíces de <i>P. teres</i>	1,6 ± 0,4	24,8 ± 2,5	2,0 ± 0,0
Tabla 1: concentraciones de los vandaterósidos VT1, VT2 y VT3 en los diferentes extractos de <i>P. teres</i> (% m/m medias ± DE, inyecciones por triplicado)			

Conclusiones

Se desprende de estos análisis que:

- los vandaterósidos VT1, VT2 y VT3 están presentes en todas las partes de plantas de *Papilionanthe teres* (tallos, hojas y raíces);
- el extracto de raíces de *Papilionanthe teres* concentra VT2 en un contenido igual a 1,8 veces el determinado en los extractos hidroalcohólicos de tallos o de hojas.

Ejemplo 2: Extractos específicamente enriquecidos en vandaterósidos

Se seleccionan los extractos obtenidos según el ejemplo 1 anterior para proceder a una etapa de fraccionamiento estérico destinada a enriquecer específicamente estos extractos en compuestos respectivamente denominados VT1, VT2 y VT3 tras aislamiento y elucidación estructural.

Ejemplo 2.1. Fraccionamiento por cromatografía en columna de gel

Se realiza el fraccionamiento del extracto metanólico obtenido según el ejemplo 1.2. en columna de gel Sephadex LH 20 (LH20-100-Sigma) (28*180 mm) con ayuda de un gradiente de solvente polar (pase de 100% de agua a 100% de metanol, caudal de 1 ml/min).

Se diluye 1 gramo (g) de este extracto metanólico en una mezcla de agua/metanol (50/50 v/v) y se deposita sobre 30 g de gel Sephadex. Se separan las moléculas polares según su tamaño y su solubilidad en el solvente de elución.

Se obtienen 20 fracciones de 10 ml, que son juntadas según sus perfiles similares obtenidos por cromatografía en capa fina (eluyente: acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:agua (100:11:11:26 v/v/v/v); soporte: gel de sílice 60 F₂₅₄ (0,25 mm, MERCK); revelado: vainillina (Merck)-H₂SO₄ (97% Flucka) 5%), para obtener al final diez fracciones.

Se realizan análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida (RP-HPLC) destinados a identificar las fracciones, entre las diez de partida, que concentran los compuestos presentes en el extracto total.

El análisis de RP-HPLC es realizado con ayuda de un cromatógrafo (Varian), provisto de una columna Nucleodur C₁₈ec (5 µm, 250 mm x 4,6 mm d.i.), equipado con una bomba (Prostar 230) y con un detector de matrices de diodos (Prostar 330). Se utiliza como solvente de elución una mezcla de MeOH-(agua + 0,1% de ácido fórmico (HCO₂H)), a un caudal de 1 ml/min, según un gradiente lineal que parte de un 20% hasta un 47% de MeOH en 13,5 minutos, manteniendo luego un 47% de MeOH durante 10 minutos y finalmente de un 47% a un 100% de MeOH en 10 minutos. Se visualizan las fracciones a una longitud de onda comprendida entre 200 nm y 400 nm.

Se recoge una masa de 178 mg de la fracción A y de 39,5 mg de la fracción B.

Ejemplo 2.2. Aislamiento de los compuestos

- 5 Se utilizan las dos fracciones A y B seleccionadas en el ejemplo 2.1 para purificar los compuestos de la invención y proceder a su cuantificación en cada una de las fracciones del ejemplo 2.1.

10 El aislamiento de los compuestos VT1, VT2 y VT3 a partir de cada una de las dos fracciones seleccionadas es llevado a cabo por CLAR semipreparatoria, con ayuda de un cromatógrafo Gilson, equipado con una bomba de gradiente (Gilson 322), con un detector UV (Gilson UV-VIS 151) y con una columna Nucleodur C18ec (5 µm, 250 mm x 21 mm d.i.). Se prepara cada fracción a 30 mg/ml en MeOH y se filtra después (Filtres Minisart RC 15, 0,45 µm). Las condiciones de elución recurren a una mezcla de MeOH-(agua + 0,1% de HCO₂H) en las condiciones siguientes: de un 20% a un 47% de MeOH en 13,5 minutos, un 47% de MeOH durante 10 minutos y vuelta a un 20% en 5 minutos con un caudal de 14 ml/min. Se realiza la detección a 205 nm.

15 Tras purificación por CLAR semipreparatoria de la fracción A, se recoge una masa de 64 mg del compuesto VT1 y una masa de 112 mg del compuesto VT2.

20 Tras purificación de la fracción B según el mismo método, se recoge una masa de 20 mg del compuesto VT3.

En la siguiente tabla 2, se indican los contenidos en cada uno de los compuestos VT1, VT2 VT3 y el contenido acumulado (VT1+VT2+VT3) de cada una de las fracciones A y B y en la fracción (A+B).

Tabla 2

25	VT1	VT2	VT3	VT1+VT2+VT3
%VT en la fracción A+B				90,00
%VT en la fracción A	35,00	63,00	-	98,00
%VT en la fracción B	-	-	51,00	51,00

Conclusiones

30 Las fracciones A y B constituyen cada una un extracto específicamente enriquecido en compuestos que constituye un objeto de la invención, ya que cada una está constituida en más de un 50% en peso por compuestos).

35 Estas dos fracciones pueden igualmente ser reunidas en una única fracción (A+B), que constituye también un ejemplo de extracto específicamente enriquecido de la invención. Esta combinación permite obtener un extracto que contiene cada uno de los tres compuestos identificados (VT1, VT2 y VT3), encontrándose la totalidad en un contenido del 90% en peso en el extracto seco.

Cada uno de estos extractos es así utilizable como principio activo cosmético o dermatológico en composiciones cosméticas o dermatológicas.

40 Ejemplo 3: Elucidación estructural de los compuestos

La elucidación estructural de los compuestos extraídos de la MV de la orquídea *Papilionanthe teres* (ejemplo 1.2) y luego aislados por fraccionamiento estérico y R-CLAR recurre a un conjunto de técnicas espectrales.

45 • Material

Espectrometría de masa (EM)

50 Los vandaterósidos son analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200RRLC, equipada con una columna C₁₈ Supelco Discovery (25 cm x 2,1 mm d.i. x 5 µm) y acoplada a un espectrómetro de masa Agilent 6520 Accurate Mass QTOF provisto de una fuente ESI.

55 Las condiciones de elución recurren a una mezcla de acetonitrilo (ACN)-(agua + 0,01% de HCO₂H) en las condiciones siguientes: de un 2% a un 50% de ACN en 30 minutos, luego paso a un 95% de ACN en 5 minutos, mantenimiento a un 95% de ACN durante 5 minutos y vuelta a un 2% de ACN en 5 minutos, con un caudal de 0,6 ml/min.

60 Además, se obtuvieron los espectros de masa de alta resolución de tipo ESI MS en un espectrómetro Bruker microToF-Q con una fuente ESI positiva. Se realizaron las calibraciones con ayuda de una solución 10⁻⁴M de formiato de Li en una mezcla de isopropanol/agua (50/50 v/v).

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizaron los análisis de RMN en un espectrómetro Bruker 400 MHz Avance III. La obtención de espectros 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (Cosy, HSQC, HMBC) es necesaria para una elucidación estructural completa de las moléculas aisladas. Los espectros son analizados con el programa RMN Notebook.

Se diluye un mínimo de 10 mg de las moléculas purificadas en 600 μl de DMSO deuterizado (DMSO D_6 , $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$; 99,9% D, Sigma). La concentración mínima así obtenida es próxima a 16 mg/ml.

Espectrometría ultravioleta (UV)

Se obtienen los espectros UV característicos de los vandaterósidos con ayuda de un equipo Shimadzu UV-2401PC. Se disuelven las moléculas en MeOH $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ para VT1 y $2,5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ para VT2 y VT3. Se determina el coeficiente de extinción molar ξ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) según la ley de Beer-Lambert:

$$A = \xi \times c \times l$$

A = Absorbancia de la molécula a una longitud de onda λ

C = Concentración de la molécula (en mol/l)

l = Longitud del trayecto óptico (en cm)

Polarimetría

La determinación del poder rotatorio $[\alpha]$ específico de la luz polarizada por el carbono asimétrico de los vandaterósidos es llevada a cabo en un polarímetro Perkin Elmer 341. Se mantienen las moléculas en soluciones a 1 mg/ml en MeOH y se ponen en la celda de medición del polarímetro con el fin de medir el ángulo de rotación de la luz polarizada a 589 nm y 20°C . Se determina así $[\alpha]^{20^\circ}$ de cada una de las moléculas según la ley de Biot:

$$\alpha = [\alpha]^{T^\circ} \times l \times c$$

α = Ángulo de rotación observado (en grados)

l = Longitud de la cubeta (en dm)

c = Concentración de la solución (en g/ml)

$[\alpha]^{T^\circ}$ = Poder rotatorio específico definido a una temperatura T y medido para una longitud de onda dada (expresado en $\text{g}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1}$)

Resultados de la elucidación estructural

En la siguiente tabla 3, se indican los datos del espectro de RMN obtenido para cada uno de los compuestos VT1, VT2 y VT3:

Tabla 3

Nº	VT1		VT2		VT3	
	^{13}C	^1H (J en Hz)	^{13}C	^1H (J en Hz)	^{13}C	^1H (J en Hz)
1	173,73		173,42		170,00	
2	75,30		75,31		80,36	
3	42,45	2,41 (d: 16,0) 2,74 (d: 16,0)	42,35	2,48 (d: 16,7) 2,84 (d: 16,7)	39,51	2,95 (d: 17,7) 2,81 (d: 17,7)
4	171,64		169,42		169,00	
5	43,64	2,77 (m)	43,53	2,81 (m)	40,82	2,99 (m) 3,01 (m)
6	125,70		125,43		125,34	6,21 (d, 2,5)
7, 11	131,50	6,90 (d: 8,5)	131,17	6,91 (d: 8,5)	131,47	6,96 (d: 8,5)
8,10	114,91	6,59 (d: 8,5)	114,48	6,60 (d: 8,5)	114,43	6,58 (d: 8,5)
9	155,96		155,90		156,11	
1'	129,14		128,98		130,35	
7'	65,85	4,98	65,15	4,96	65,58	4,93 (d: 5) 4,97 (d: 5)
2', 6'	129,40	7,22 (d: 8,5)	129,44	7,25 (d: 8,6)	129,71	7,27 (d: 8,4)
5', 3'	116,20	6,98 (d: 8,5)	115,96	7,01 (d: 8,6)	116,06	7,03 (d: 8,4)
4'	157,53		157,08		157,31	
4'O-Glc-1	100,54	4,84 (d: 7,0) β	100,17	4,86 (d: 6,8) β	100,06	4,88 (d: 7,2) β

2	73,12	3,23 (m)	73,05	3,23 (m)	73,22	3,23 (m)
3	77,00	3,35 (m)	76,84	3,30 (m)	76,59	3,28 (m)
4	69,74	3,15 (m)	69,53	3,15 (m)	69,67	3,15 (m)
5	76,60	3,28 (m)	76,44	3,28 (m)	76,98	3,33 (m)
6	60,70	3,68 (dd: 1,5/12,5) 3,45 (dd: 6,1/12,5)	60,52	3,68 (dd: 4,9/11) 3,46 (dd: 5,3/11)	60,66	3,69 (dd: 1,7/11,7) 3,47 (dd: 6,8/11,7)
4"-O-Glc-1			100,17	4,84 (d: 6,8) β	100,12	4,87 (d: 7,2) β
2			73,05	3,23 (m)	73,22	3,23 (m)
3			76,84	3,30 (m)	76,59	3,28 (m)
4			69,53	3,15 (m)	69,67	3,15 (m)
5			76,44	3,28 (m)	76,98	3,33 (m)
6			60,52	3,68 (dd: 4,9/11) 3,46 (dd: 5,3/11)	60,66	3,69 (dd: 1,7/11,7) 3,47 (dd: 6,8/11,7)
1 "			128,86		128,71	
7"			65,63	4,96	66,23	5,01 (d: 6,6)
2",6"			129,40	7,22 (d:8,6)	129,64	7,27 (d:8,4)
5",3"			115,90	7,00 (d:8,6)	116,16	7,03 (d:8,4)
4"			157,08		157,34	
3-O-Glc-1					98,04	4,82 (d:7,8) β
2					71,60	3,26 (m)
3					77,98	4,92 (dd: 9,5/9,5)
4					67,44	3,39 (m)
5					76,50	3,10 (m)
6					60,28	3,49 (dd: 4,5/11,8) 3,68 (dd: 1,7/11,8)
Cin-1					165,71	
Cin-2					118,42	6,67 (d: 15,7)
Cin-3					144,19	7,68 (d: 15,7)
Cin-4					134,17	
Cin-5,9					128,26	7,74 (dd: 2,8/6,8)
Cin-6,8					128,94	7,44 (m)
Cin-7					128,67	7,44 (m)

Tabla 3: espectro de RMN (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, DMSO D_6 , δ en ppm, J en Hz) obtenido para cada uno de los compuestos VT1, VT2 y VT3.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para los diferentes métodos analíticos utilizados para cada compuesto.

5 • VT1

Aspecto: resina de color amarillo

Solubilidad: soluble en MeOH y DMSO y poco soluble en agua

RMN: datos de ^1H RMN y ^{13}C RMN (DMSO D_6 , 400 MHz y 100 MHz)

10 → figuras 3 a 4 y tabla 3

MS: HR-ESI-MS ion $[(\text{M}+\text{NH}_4)]^+$ a $m/z = 526,19236$ (fórmula molecular calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$: 508,15808 Δ : -0,89 ppm). → figura 2 y tabla 4

Tabla 4

Lista de picos

m/z	z	Abund	Fórmula	Ion
526.19236	1	734161	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N O}_{12}$	$(\text{M}+\text{NH}_4)^+$
527.19494	1	168021	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N O}_{12}$	$(\text{M}+\text{NH}_4)^+$

Resultados del cálculo de la fórmula

Fórmula	Mejor	Masa	Tgt Masa	Dif. (ppm)	Especie iónica	Punt.
$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	VERDADERO	508,15853	508,15808	-0,89	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N O}_{12}$	95,88

15

UV: máxima de absorción a 203 (log ξ 4,2), 225 (log ξ 4,0) y 278 (log ξ 3,2) nm. → figura 5

$[\alpha]_{\text{MeOH}}^{20} = -50^\circ \text{ g}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1}$

Hidrólisis ácida

Tras hidrólisis ácida de las moléculas (3 h a 80°C, en presencia de HCl 2,0 M), se lava la fase acuosa 3 veces con n-butanol saturado en agua y se evapora después a sequedad. Se añade una mezcla (1:4, v/v) de piridina y 1-(trimetilsilil)imidazol (Sigma) al residuo seco y se calienta después durante 1 hora a 60°C para realizar una derivación. Se diluyen entonces de 1 a 2 µl de la mezcla de reacción en 500 µl de CH₂Cl₂ analítico y se analizan luego por cromatografía gaseosa (de tipo Trace GS Ultra) provista de una columna capilar TR-5MS SQC (15 m x 0,25 mm * 0,25 µm) y acoplada a un espectrómetro de masa (DSQII Thermo Scientific). Se obtiene la detección por impacto electrónico a 70eV. Las condiciones utilizadas son las siguientes: 1 minuto a 40°C y luego gradiente de 10°C/min hasta 250°C y mantenimiento de una fase estacionaria a 250°C (caudal de helio 1 ml/min, temperatura del inyector 250°C, temperatura de la línea de transferencia 285°C). Se realiza la detección después de 2 minutos de análisis; el intervalo de medición de masa va de 0 a 500.

Se identifica el azúcar liberado tras la hidrólisis ácida por comparación con el tiempo de retención y el espectro de masa del control de D-glucosa (Merck) (Tr=15,60 minutos) que ha sufrido el mismo proceso de derivación. Para los tres vandaterósidos analizados, el azúcar identificado tras la hidrólisis es la D-glucosa.

• VT2

Aspecto : polvo blanco amorfo

Solubilidad: en agua, formación de un gel a aproximadamente 10 mM. VT2 es soluble en MeOH y en DMSO y poco soluble en agua

RMN: datos de ¹H RMN y ¹³C RMN (DMSO D₆, 400 MHz y 100 MHz)

→ figuras 3 a 4 y tabla 3

MS: HR-ESI-MS ion [(M+NH₄)]⁺ a m/z = 794,28867 (fórmula molecular calculada para C₃₇H₄₄O₁₈: 776,25276 Δ: -0,01 ppm). → figura 2 y tabla 5

Tabla 5

Lista de picos

m/z	z	Abund	Formula	Ion
213.09124		35369		
359.11334		139175		
453.15531	1	145631		
454.15825	1	36147		
465.15525		43977		
794.28867	1	618328	C37 H48 N O18	(M+NH4)+
795.29123	1	229976	C37 H48 N O18	(M+NH4)+
796.29232	1	58672	C37 H48 N O18	(M+NH4)+
799.242		31867	C37 H44 Na O18	(M+Na)+

Resultados del cálculo de la fórmula

Fórmula	Mejor	Masa	Tgt Masa	Dif. (ppm)	Especie iónica	Punt.
C37 H44 O18	VERDADERO	776,25277	776,25276	-0,01	C37 H44 Na O18	98,6

UV: máxima de absorción a 203 (log ε 4,5) 225 nm (log ε 4,5) y 278 (log ε 3,5) nm. → figura 5
[α]_{MeOH}^{20°} = -56° g⁻¹.ml.dm⁻¹

Hidrólisis ácida: consultar VT1

• VT3

Aspecto: resina de color amarillo

Solubilidad: compuesto soluble en MeOH y DMSO, poco soluble en agua

RMN: datos de ¹H RMN y ¹³C RMN (DMSO D₆, 400 MHz y 100 MHz)

→ figuras 3 a 4 y tabla 3

MS: HR-ESI-MS ion [(M+NH₄)]⁺ a m/z = 1086,38484 (fórmula molecular calculada para Q₂H₆₀O₂₄: 1068,34745 Δ: -1,89 ppm). → figura 2 y tabla 6

Tabla 6

Lista de picos

CC

1/z)

m/z	z	Abund	Formula	Ion
107.04922		15338		
131.04919		111862		
149.05972		39325		
293.10284	1	220337		
294.10592	1	33624		
359.11327		35374		
453.15517		36506		
455.15568		34663		
818.28701		16049		
855.17968		30955		
1086.38484	1	287785	C52 H64 N O24	(M+NH4)+
1087.38772	1	157791	C52 H64 N O24	(M+NH4)+
1088.38858	1	54091	C52 H64 N O24	(M+NH4)+
1091.33884	1	44018	C52 H60 Na O24	(M+Na)+
1092.34148	1	25636	C52 H60 Na O24	(M+Na)+
1096.31521	2	21723		
1096.81644	2	24710		
1097.31801	2	19284		

Resultados del cálculo de la fórmula

Fórmula	Mejor	Masa	Tgt Masa	Dif. (ppm)	Especie iónica	Punt.
C52 H60 O24	VERDADERO	1068,34948	1068,34745	-1,89	C52 H60 Na O24	96,2

UV: máximas de absorción observadas a 223 (log ξ 4,5) nm y 276 (log ξ 3,5) nm. → figura 5 $[\alpha]_{\text{MeOH}}^{20} = -37^\circ \text{ g}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1}$

5

Hidrólisis ácida: consultar VT1

Ejemplo 4: actividad biológica de los compuestos de la invención

10 Tratamientos

Se prepara una solución madre de cada uno de los tres compuestos aislados anteriormente, VT1, VT2 y VT3, en DMSO (Sigma).

15 Se diluyen entonces las soluciones madre directamente en el medio de cultivo para el tratamiento de las células (queratinocitos humanos normales KHN o línea de células HaCaT).

• Estimulación de las deshidrogenasas mitocondriales en queratinocitos

20 Se cultivan los queratinocitos humanos normales (KHN), aislados de párpados de mujeres de tipo caucásico de 37 años, en 3 pases en medio de queratinocitos libre de suero [Keratinocytes Serum Free Medium (KSF, Invitrogen)] complementado (Invitrogen) y al que se había añadido un 5% de suero de ternera fetal (SVF, Invitrogen).

25 Se siembran los KHN en placas de 96 pocillos (Greiner Bio One) a razón de $1 \cdot 10^4$ células/pocillo y se incuban después a 37°C , con un 5% de CO_2 , durante 24 h. Se tratan luego estas células, tras irradiación con UV_B (60 mJ/cm^2 , irradiador Vilbert-Lourmat) o sin irradiación, con diluciones seriadas de los compuestos VT1, VT2 y VT3 (de 6,25 a 0,78 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluidos en DMSO (Sigma) a una concentración final del 0,1% v/v. Se incuban las placas a 37°C , con un 5% de CO_2 . Se considera a las células no tratadas que contienen un 0,1% v/v de DMSO como control negativo. Después de 48 h de tratamiento, se eliminan los sobrenadantes y se deposita la solución de XTT (Cell proliferation kit II, Roche Diagnostic) en cada pocillo con el fin de determinar la actividad global de las deshidrogenasas mitocondriales. Se evalúa esta actividad gracias a la transformación de la sal de tetrazolio XTT en formazán soluble, por un mecanismo celular basado en las actividades enzimáticas de la NAD(P)H deshidrogenasa

30

glicolítica (complejo I) y de la succinato deshidrogenasa (complejo II), constitutivas de la cadena respiratoria mitocondrial. La cantidad de formazán coloreado (determinada por lectura de la densidad óptica a 450 nm) está directamente relacionada, por una parte, con la actividad enzimática de las deshidrogenasas mitocondriales, y por otra con la cantidad de células metabólicamente activas (Roehm *et al.*, J. Immunol. Methods, 1991; 142: 257-265).

Después de 3 horas de incubación, el XTT se reduce a un formazán soluble por las deshidrogenasas. Se realiza la lectura de las placas de 96 pocillos a 450 nm con un espectrofluorómetro (SpectraFluor Plus, Tecan). Se determinan las proteínas totales en cada pocillo por la técnica del BCA (Bicinchoninic Acid Assay) (kit Uptima Interchim).

Los resultados son expresados como la media de las densidades ópticas (DO) a 450 nm y normalizados con respecto a la concentración total de proteínas celulares (expresada en µg/ml), lo que permite medir únicamente la actividad de las deshidrogenasas y librarse del impacto de la proliferación celular sobre la medición de las DO obtenidas.

Los resultados medios obtenidos para cada concentración de moléculas (Rm) son comparados con los obtenidos para el control negativo (Rc):

$Rm/Rc > 1$ indica una estimulación de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

• Estimulación de la citocromo C oxidasa en queratinocitos humanos modificados (HaCaT)

El objetivo del estudio es evaluar el potencial de los compuestos objeto de la invención para estimular los rendimientos de la cadena respiratoria mitocondrial. Se llevan a cabo los ensayos con queratinocitos humanos genéticamente modificados (HaCaT).

Se cultivaron las células HaCAT en placa de 6 pocillos en medio RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 con/sin HEPES (invitrogen) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (SVF, Invitrogen) y una mezcla de penicilina/estreptomicina hasta la confluencia. Se las trató luego en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) con 4,5 g/l de glucosa, un 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumine AM2618 invitrogen) con diluciones seriadas de vandaterósidos (de 6,25 a 0,78 µg/ml) diluidos en DMSO (concentración final del 0,1% v/v). Se utilizó el resveratrol (Sigma) a 50 µM, o sea, 11,41 µg/ml, como referencia positiva. Se consideró a las células no tratadas que contenían un 0,1% v/v de DMSO como control negativo. Después de 3 h de tratamiento, se lisaron las células (HEPES 20 mM, 0,1% de Tritón, EDTA 1 mM) y se realizó la determinación de las proteínas celulares totales por la técnica de Bradford (B6916 Sigma). Se ajustó entonces la concentración de proteínas totales de cada muestra a 2 mg/ml.

Se incubó el lisado celular en presencia de un tampón de ensayo (Sigma) con el fin de determinar la cinética enzimática sin adición de sustrato, indicada como V_0 . Se añadió citocromo C reducido (de corazón equino, C-7752 Sigma) mediante DTT (DiTioTreitol, Sigma) al tampón de ensayo a 50 µM con el fin de medir la velocidad de la reacción enzimática. Se siguió la desaparición del citocromo C reducido mediante un espectrofotómetro [Beckman DU 640] a 550 nm durante 90 segundos según las instrucciones del fabricante (Sigma). Se calcularon los resultados a partir de las curvas de cinética enzimática y se expresan como actividad de la citocromo C oxidasa (U/µg de proteínas). Las ecuaciones que permiten el cálculo de las actividades enzimáticas son las siguientes:

- Actividad enzimática del citocromo C en U/ml = $A_{COX} = (DA/min)/21,84$, donde:
- $DA/min = A/min(v) - A/min(v_0)$
- 21,84 (mM) = ϵ (coeficiente de extinción molar) del ferrocitocromo C a 550 nm
- A = Absorbancia a 550 nm
- $A/min(v) =$ Absorbancia a 550 nm en el tiempo « v » en minutos, correspondiente al tiempo de la medición tras la adición del sustrato;
- $A/min(v_0) =$ Absorbancia a 550 nm en el tiempo « v_0 » (al inicio, es decir, antes de la adición de sustrato) en minutos.

Los resultados son expresados por comparación de la actividad enzimática medida en presencia de los vandaterósidos (A_{COX} muestras) con respecto a la actividad enzimática control (A_{COX} control), o sea, (A_{COX} muestras)/(A_{COX} control).

Una razón calculada (A_{COX} muestras)/(A_{COX} control) superior a 1 indica una estimulación de la actividad de la citocromo C oxidasa en presencia de las muestras.

• Medición de la biogénesis mitocondrial en queratinocitos humanos modificados (HaCaT)

Para los vandaterósidos VT1 y VT2, que mostraron un efecto estimulante de la actividad del citocromo C, se realizan mediciones de biogénesis mitocondrial.

El objetivo es verificar si el aumento de la actividad enzimática medida está o no ligado a una estimulación basal de

la cadena respiratoria de las mitocondrias inicialmente presentes o a un aumento del número de mitocondrias intracelulares, indicativo de una estimulación de la biogénesis mitocondrial.

Se cultivan las células HaCaT en placa de 6 pocillos y se las trata después como se ha descrito anteriormente. Después de 48 h de tratamiento, se lisan las células con ayuda de un tampón constituido por 10 mM de Tris-base, 1 mM de EDTA, 0,3 M de acetato de sodio y un 1% de SDS (1 ml/pocillo) y según un tiempo de incubación de una noche a 55°C. Se extrae el ADN mitocondrial del lisado celular con una solución de fenol (razón 1/1). Se llevan a cabo dos ciclos de centrifugación a 4.000 rpm (5 minutos). Se añade entonces una solución de CHCl_3 /alcohol isoamílico (24:1, v/v) a la fase acuosa superior, recuperada tras decantación. Se centrifuga después la mezcla (5 minutos, 4.000 rpm, 4°C).

Se induce la precipitación del ADN total por adición al sobrenadante de una mezcla de etanol absoluto/acetato de sodio 3 M (2,5/1,10^e, v/v). Tras centrifugación (30 minutos, 12.000 rpm, 4°C), se lavan las pellas con EtOH de 70° v/v, se secan después y se recogen en agua desionizada. Se realiza la determinación del ADN con un espectrómetro (Nanodrop Thermo Scientific). Se ajustan las soluciones de ADN a una concentración de 10 ng/ μl .

Se mide la expresión de tres genes diferentes por qPCR. Esta técnica permite medir la cantidad de ADN polimerizado gracias a un marcador fluorescente. Los genes seleccionados son dos genes mitocondriales 16S y COX2, correspondientes, respectivamente, a los genes de expresión de un ribosoma mitocondrial y de la citocromo C oxidasa, así como un gen UCP-2 localizado en el núcleo celular (ADN genómico). La medida de la expresión de este gen sirve de control.

Los cebadores empleados son los siguientes:

ADN 16S: sentido (5'-TGG-ACA-ACC-AGC-TAT-CAC-CA-3') y antisentido (5'-ACT-TTG-CAA-GGA-GAG-CCA-AA-3');
ADN COX-2: sentido (5'-AGG-CGA-CCT-GCG-ACT-CCT-TGA-3') y antisentido (5'-TTA-GCT-TTA-CAG-TGG-GCT-CTA-GAG-GC-3');
ADN UCP-2: sentido (5'-CCT-AGC-GCT-GCC-TCA-TAA-AC-3') y antisentido (5'-CCT-ATG-GGT-CTG-TGC-CTG-TT-3').

Los experimentos de qPCR son realizados en placas de 96 pocillos. Se realiza una gama de ADN, correspondiente a la mezcla de ADN de todas las muestras, según una dilución seriada para cada cebador. Se mezclan las muestras de ADN celulares con una mezcla de MIX-PCR SYBR Green (Applied Biosystems), a la que se ha añadido agua desionizada. Se llevan a cabo 45 ciclos de PCR con una temperatura de hibridación de 60°C (termociclador Stepone Plus, Applied Biosystems).

Se efectúa la medición de fluorescencia al cabo de los 45 ciclos y se determina la cantidad de ADN obtenido con ayuda de la gama de ADN.

Los resultados son expresados en cantidad de ADN 16S y COX2 (Q_{COX2}), calculada en función de la cantidad de ADN genómico UCP-2 ($Q_{\text{UCP-2}}$), y que se define como $(Q_{\text{COX2}})/(Q_{\text{UCP-2}})$.

Una razón calculada ($Q_{\text{COX2}})/(Q_{\text{UCP-2}}$) superior a 1 indica un aumento de la cantidad de ADN mitocondrial, reflejo de un aumento del número de mitocondrias intracelulares.

Resultados

Las mediciones XTT después de 48 h de tratamiento muestran que los compuestos estudiados estimulan significativamente las funciones respiratorias mitocondriales de los queratinocitos. No se observa, sin embargo, ningún efecto-dosis significativo.

Además, tras irradiación con UV_B de los queratinocitos, no se observa ninguna estimulación significativa de las deshidrogenasas.

Los compuestos VT1 y VT2 son los compuestos que estimulan más eficazmente la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales de queratinocitos.

En particular, el compuesto VT2 estimula significativamente la actividad de las deshidrogenasas a la concentración más baja estudiada de 0,78 $\mu\text{g/ml}$, o sea, 1 μM (+39% con respecto al control negativo) (fig. 6).

Los tres compuestos estudiados activan la citocromo C oxidasa, a niveles de concentración más bajos que el resveratrol (control positivo), siendo el compuesto VT2 el mejor activador de la citocromo C oxidasa. A una concentración de 1,56 $\mu\text{g/ml}$ (2 μM), VT2 estimula la actividad de la citocromo C oxidasa a un nivel de actividad comparable al resveratrol a la concentración de 11,41 $\mu\text{g/ml}$ (50 μM) (fig.7).

Se observa un efecto-dosis únicamente para el compuesto VT1.

Para VT1 y VT2, se realiza una medición de biogénesis mitocondrial con el fin de saber si el aumento de la actividad enzimática medida está ligado a una estimulación basal de la cadena respiratoria de las mitocondrias inicialmente presentes o a un aumento del número de mitocondrias intracelulares.

Los resultados indican que, a las concentraciones estudiadas, a excepción de VT1 a 6,25 µg/ml, ninguno de los dos compuestos induce una activación de la biogénesis mitocondrial, y por lo tanto un aumento del número de mitocondrias intracelulares.

Por consiguiente, los resultados obtenidos, que ponen en evidencia un aumento de la actividad enzimática de la citocromo C oxidasa o de las deshidrogenasas mitocondriales, son el reflejo de una estimulación basal de estas actividades enzimáticas y no de un aumento del número de mitocondrias intracelulares.

VT1 y VT2 presentan el mejor potencial de activación mitocondrial, por medio de una estimulación de la actividad enzimática de las deshidrogenasas de los complejos I y II y por estimulación de la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.

Los compuestos VT1 y más particularmente VT2 presentan, pues, cada uno una actividad significativa frente a la cadena respiratoria mitocondrial de queratinocitos por estimulación de los complejos I y II de dicha cadena y estimulación de la actividad de la citocromo C oxidasa. Esto confirma que activan el metabolismo energético de la célula cutánea a través de sus funciones respiratorias mitocondriales.

Esta actividad justifica el uso de los compuestos de la invención, especialmente VT1 y/o VT2, como principios activos cosméticos o dermatológicos, y más particularmente para el tratamiento cosmético o dermatológico de las pieles maduras, tal como la lucha contra el envejecimiento cutáneo y/o el mantenimiento o el mejoramiento de la hidratación cutánea y/o la cicatrización cutánea.

• Estimulación de la diferenciación de queratinocitos humanos normales (KHN)

Las desmogleínas son cadherinas, proteínas transmembranales, que unen las células epiteliales entre sí, como los queratinocitos, gracias a la formación de desmosomas. Al igual que la loricrina, la involucrina es una proteína expresada por los queratinocitos constitutivos de la capa córnea y que han alcanzado el estadio terminal de diferenciación. Estos queratinocitos son denominados corneocitos. Las transglutaminasas, encimas dependientes del Ca^{2+} , aseguran la formación de puntos covalentes entre estas proteínas. Estos tres tipos de proteínas constituyen, por lo tanto, marcadores de diferenciación precoz (desmogleína I) y tardía (involucrina y transglutaminasas) de los queratinocitos. Se observa una ralentización de la renovación de los queratinocitos, de su actividad y de su transformación en corneocitos durante el envejecimiento cutáneo. Se observa una atrofia de la epidermis. La piel se deshidrata y se ralentizan entonces las funciones protectoras y de cicatrización de la epidermis. La piel adquiere entonces un aspecto apagado y seco.

Método

Se cultivan los KHN en pase 3 en medio KSFM completo en matraz T75. En el estadio de preconfluencia, se tripsinizan los KHN y se siembran a razón de 20.000 células por pocillo en sistemas de cultivo Lab-Tek II, 8 pocillos (Nalge Nunc International). 4 pocillos por condición de tratamiento. Al 80% de confluencia, las células son tratadas durante 5 días con las diferentes composiciones de principios activos (VT1, VT2, VT3, cada uno a 12 µg/ml) hasta el estadio de posconfluencia. Se emplea Vitactyl® clair (extracto de *Malva sylvestris*, Silab) al 3% como control positivo.

Inmunomarcaje

Se lavan las células con PBS (PBS Tablets, Invitrogen GIBCO) y se fijan después con formalina (solución de formalina al 10% tamponada a neutralidad, Sigma) durante 10 minutos.

Después de lavar con PBS, se llenan las cámaras de cultivo con una solución de Tritón al 0,1% (Tritón X-100, Sigma) durante 10 minutos con el fin de permeabilizar las membranas y se lavan luego 2 veces con PBS. Se recubren entonces las células con una solución de PBS/BSA al 1% (BSA, Sigma) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retira la solución de PBS/BSA de las láminas inclinándolas sobre papel absorbente.

Se recubren luego las células con una solución de anticuerpos primarios durante 60 minutos a temperatura ambiente:

- antitransglutaminasa (monoclonal de ratón - Harbor Bio-Products) diluida 1/200,
- antidesmogleína 1 (monoclonal de ratón - Zymed) diluida 1/100;
- antiinvolucrina (monoclonal de ratón - Neomarkers) diluida 1/200.

Después de lavar con PBS, se recubren luego las células con una solución de anticuerpo secundario diluido 1/200 (Alexa fluor 488, IgG de cabra antirratón (Molecular Probes)). Se incuban las láminas durante 60 minutos a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Se lavan las láminas tres veces con PBS.

5 Montaje

Se desmonta la cámara de cultivo de las láminas y se depositan varias gotas de medio de montaje (Fluorescent Mounting Medium, DAKO) sobre las células y se las recubre después con un cubreobjetos (24 x 60 mm, Knittel Glaeser).

10

Adquisición de las fotos en microscopía confocal

Se realizan las imágenes al videomicroscopio (Nikon TE 2000) con un filtro Alexa fluor 488.

15 Para cada condición, se toman cuatro fotos en fluorescencia verde (expresión de los marcadores) con el objetivo x20. Los parámetros de adquisición (tiempo de exposición, ganancia) son idénticos para cada marcador estudiado.

Se analizan las fotos con el programa de análisis de imagen Leica QWin. Se crea un programa con el fin de cuantificar la expresión de estos marcadores de diferenciación.

20

Resultados

Los resultados muestran que los compuestos de la invención estimulan significativamente la expresión de las proteínas de diferenciación de los queratinocitos con respecto al control negativo.

25

Entre los compuestos estudiados, VT1 y VT2 son los más eficaces (fig. 8 a 13). Además, VT2 estimula la expresión de la involucrina a un nivel superior al del control positivo empleado al 3%.

30 Esto demuestra que los vandaterósidos, y más particularmente VT1 y VT2, estimulan la renovación de los queratinocitos, constitutivos de la capa superior de la epidermis.

Los vandaterósidos favorecen la renovación del *stratum corneum*, dando así un aspecto más joven a la piel. Este fenómeno contribuye a mantener las funciones protectoras y reparadoras de la epidermis, manteniendo o mejorando al mismo tiempo la hidratación cutánea.

35

REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado entre el 4-(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(p-hidroxibencil)malato (VT1), el 1,4-bis(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(p-hidroxibencil)malato (VT2) y el 1,4-bis(4-β-D-glucopiranosiloxibencil)-(2R)-2-(éster 2-β-D-glucopiranosil-3-*trans*-cinamoílico)-2-(p-hidroxibencil)malato (VT3).
2. Extracto de orquídea que contiene al menos un 40% en peso de uno o más de los compuestos definidos en la reivindicación 1 con respecto al peso total del extracto seco.
3. Extracto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** es obtenido a partir de al menos una parte de una orquídea perteneciente al género *Papilionanthe*, *Vanda* o *Encyclia*.
4. Extracto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** contiene uno o más compuestos seleccionados entre VT1 y/o VT2, en un contenido acumulado superior al 40% en peso con respecto al peso del extracto seco.
5. Extracto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** contiene el compuesto VT3 en un contenido superior al 8% en peso con respecto al peso del extracto seco.
6. Extracto según la reivindicación 2, **caracterizado por que** el extracto está constituido por al menos un 80% en peso de los compuestos VT1, VT2 y VT3 con respecto al peso total del extracto seco.
7. Extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado por que** es preparado a partir de los tallos o de las raíces de la orquídea *Papilionanthe teres*.
8. Composición cosmética o dermatológica que contiene, como principio activo cosmético o dermatológico, al menos un compuesto tal como se ha definido en la reivindicación 1 y/o al menos un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
9. Compuesto tal como se ha definido en la reivindicación 1 o al menos un extracto tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para su utilización como principio activo cosmético o dermatológico en una composición cosmética o dermatológica, estando destinado dicho principio activo
 - a luchar contra el envejecimiento cutáneo, especialmente para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento de la piel, reestructurar la epidermis, reafirmar la piel y/o favorecer la atenuación o la resorción de las arrugas y las propiedades protectoras de la epidermis, y/o a mantener o mejorar la hidratación cutánea y/o a favorecer la cicatrización cutánea, o
 - a estimular la expresión y/o la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y/o de la citocromo C oxidasa y/o la cadena respiratoria de las mitocondrias y/o el metabolismo energético de las células y/o la diferenciación y la renovación de las células epiteliales, más particularmente a nivel de los queratinocitos.
10. Procedimiento de preparación de un compuesto tal como se ha definido en la reivindicación 1 o de un extracto tal como se ha definido en la reivindicación 7, **caracterizado por que** comprende al menos una etapa de extracción realizada con ayuda de al menos un solvente polar de al menos una parte de la orquídea *Papilionanthe teres* que contiene tal compuesto, y al menos una etapa de enriquecimiento en uno o más compuestos VT1, VT2 o VT3 del extracto obtenido en la etapa de extracción por eliminación de los azúcares o por fraccionamiento, especialmente por cromatografía de exclusión estérica.

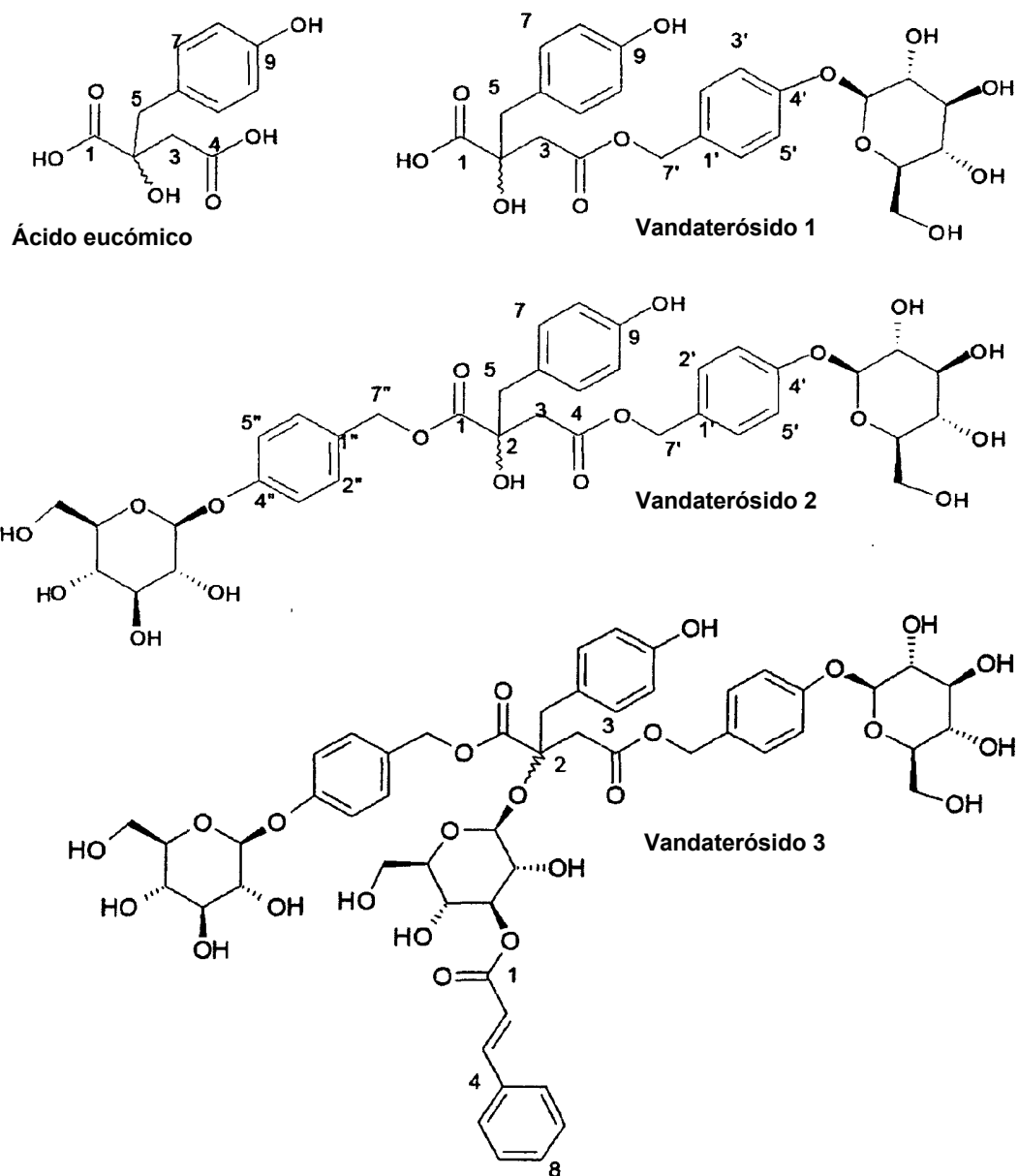


FIG.1

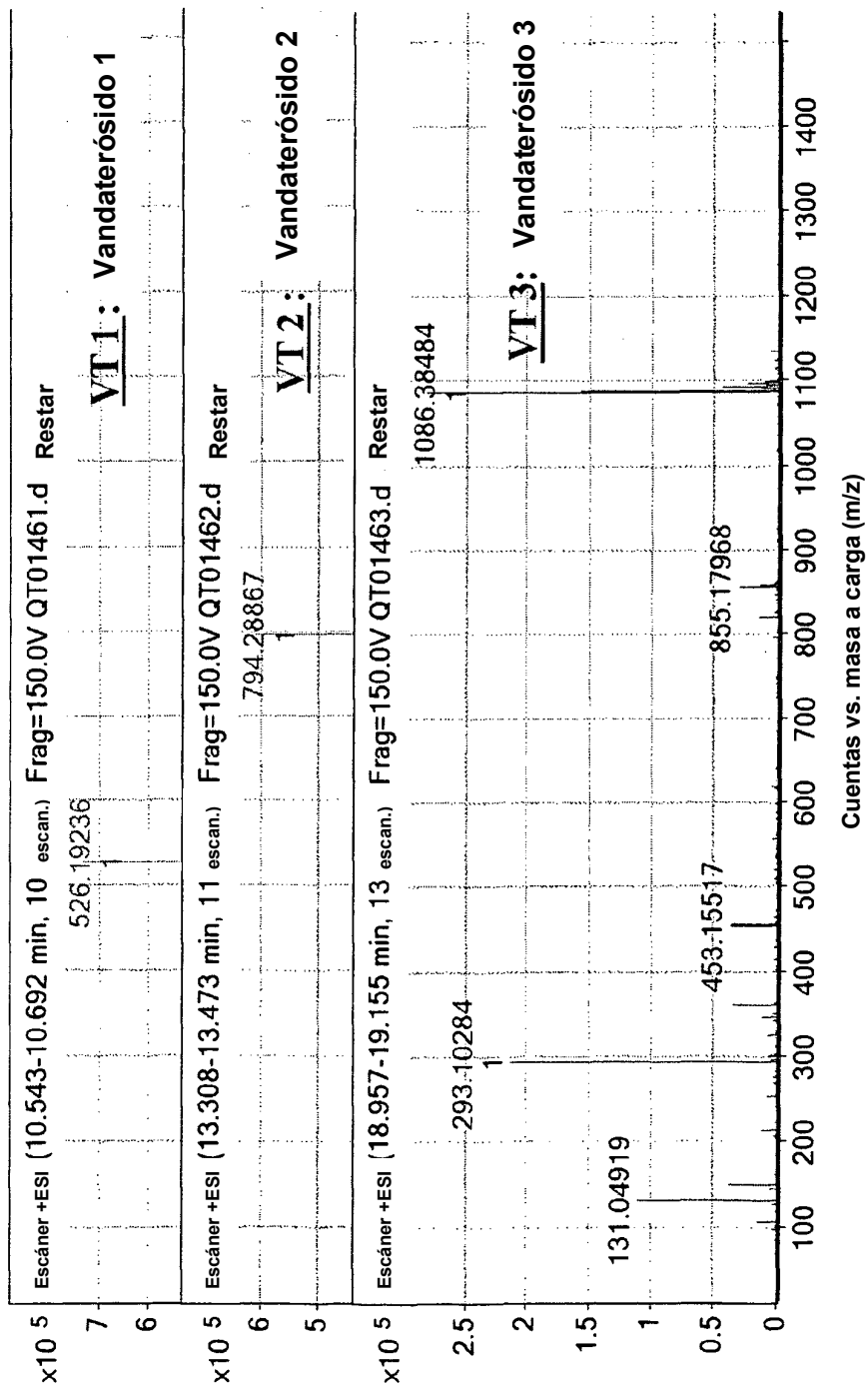


FIG.2

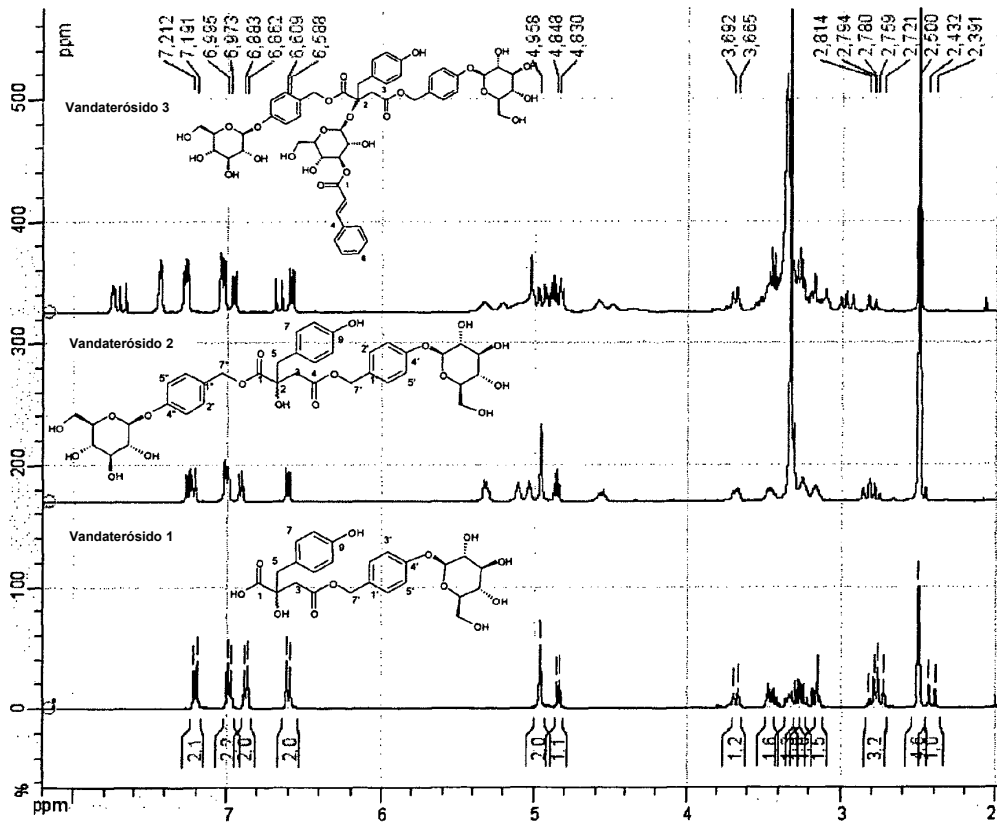


FIG.3

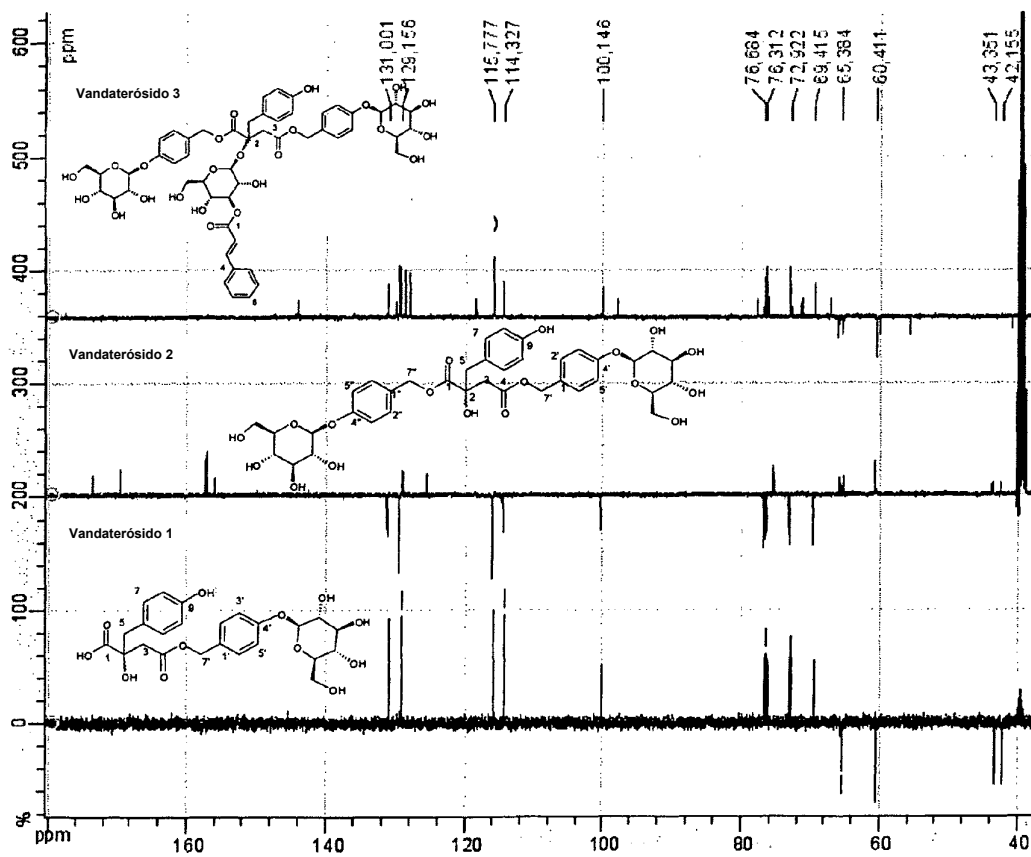


FIG.4

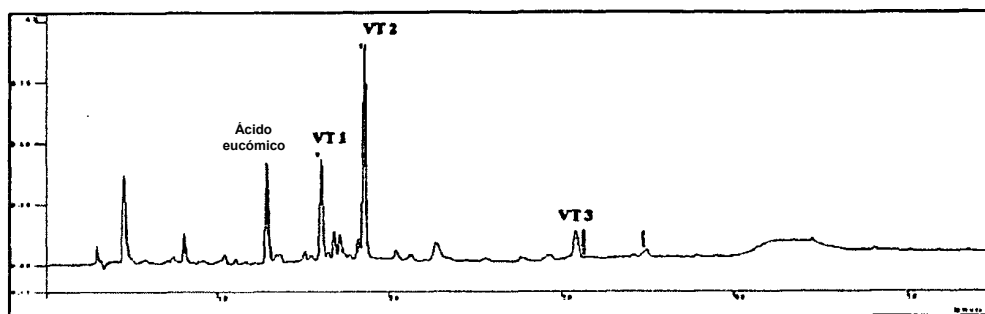


FIG.5

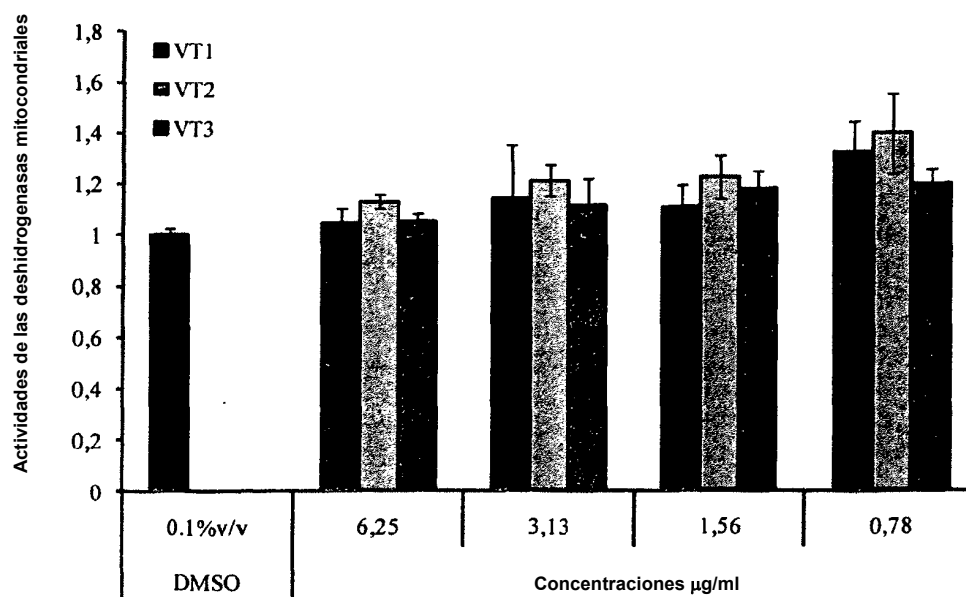


FIG.6

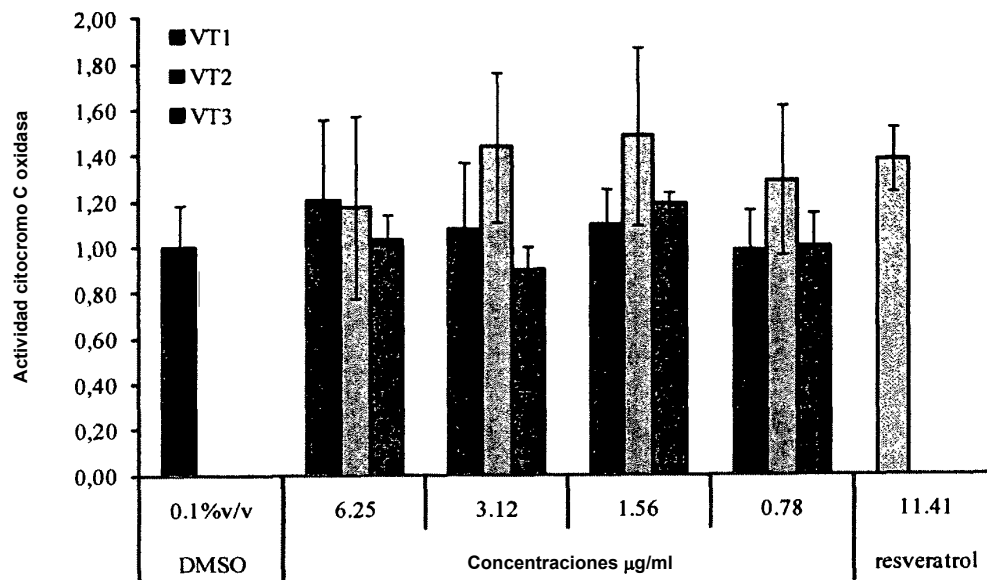


FIG.7

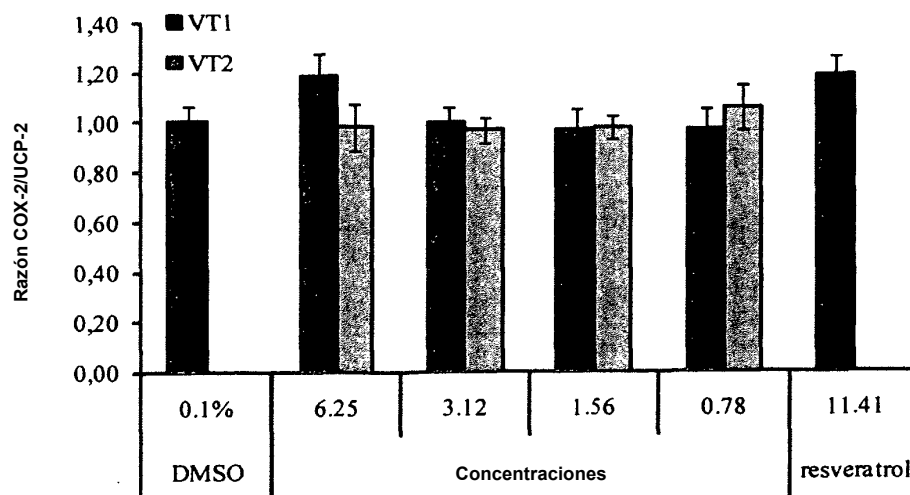


FIG.8

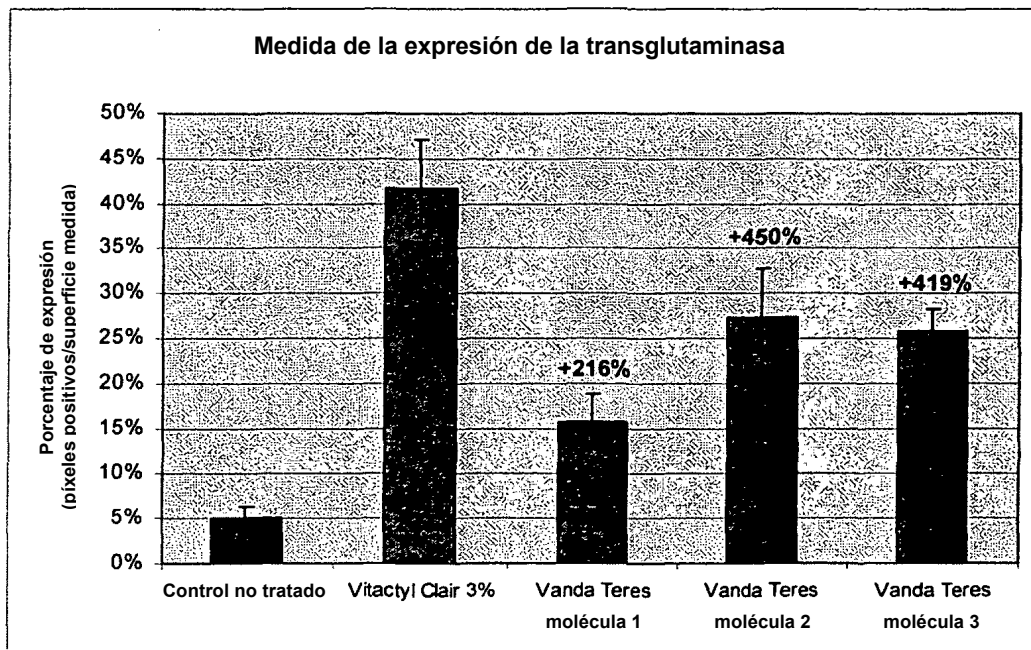


FIG.9

Medida de la expresión de la transglutaminasa

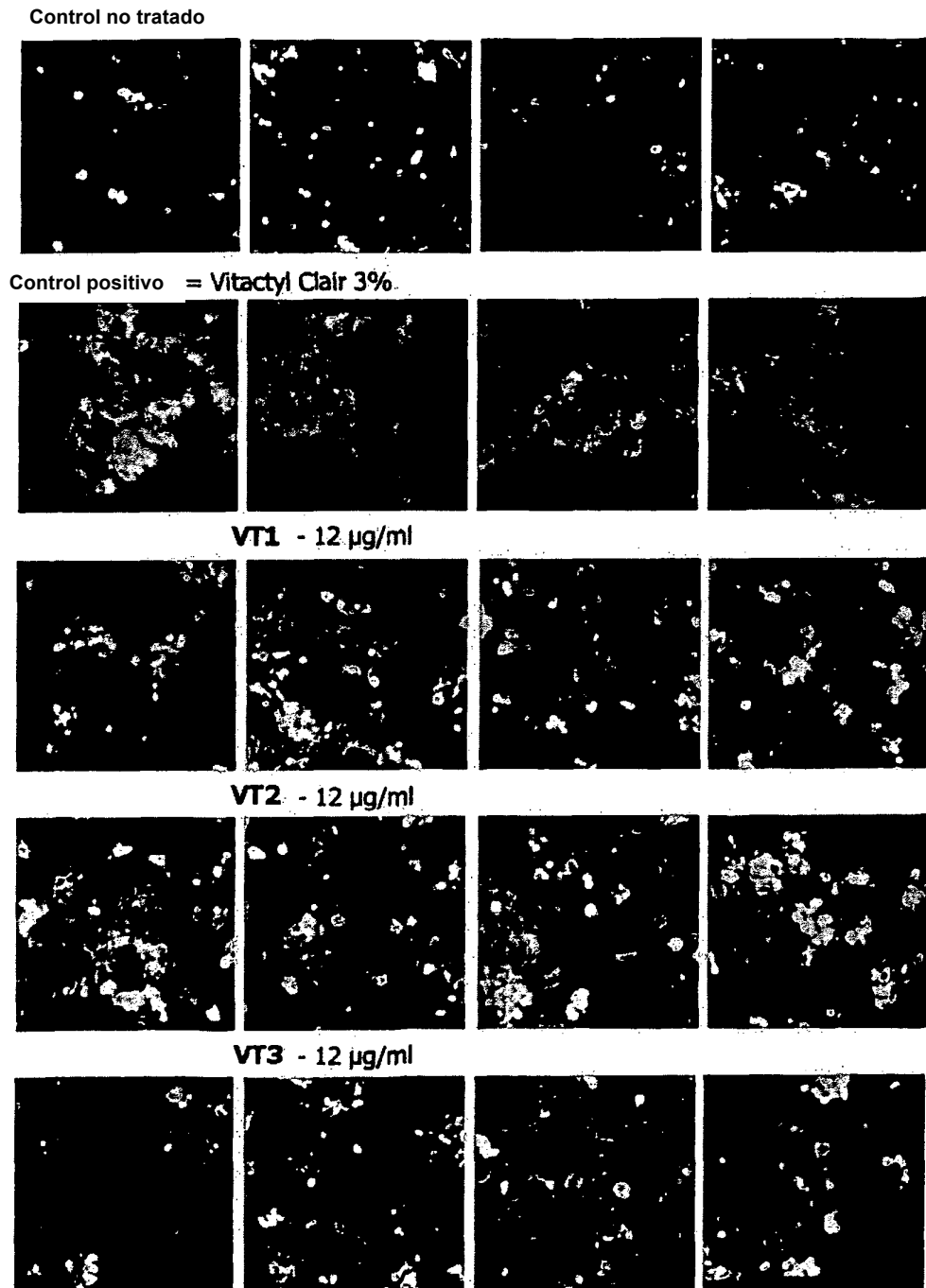


FIG.10

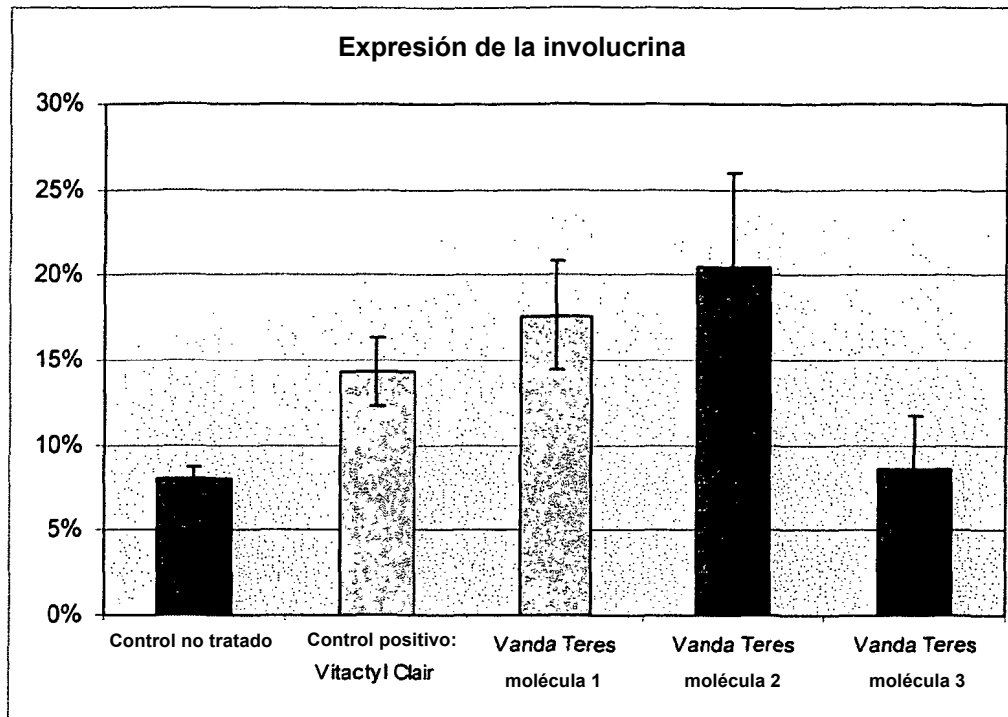


FIG.11

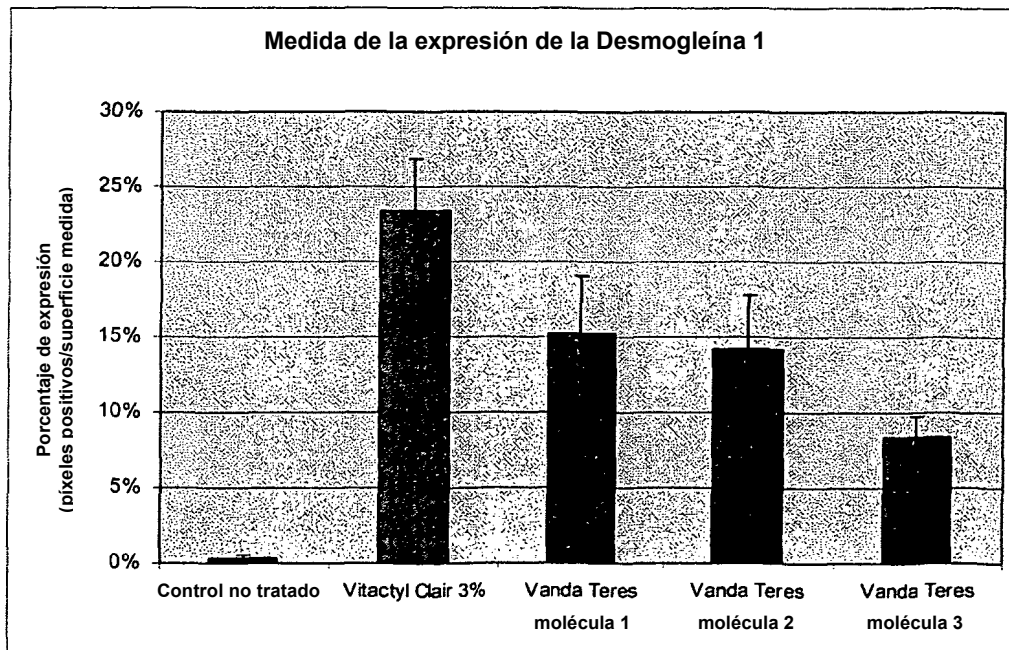


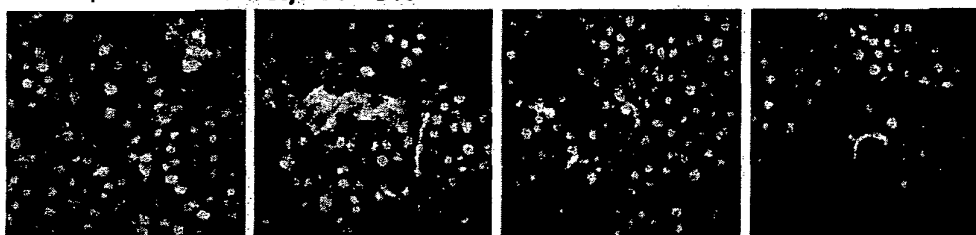
FIG.12

Medida de la expresión de la desmogleína 1

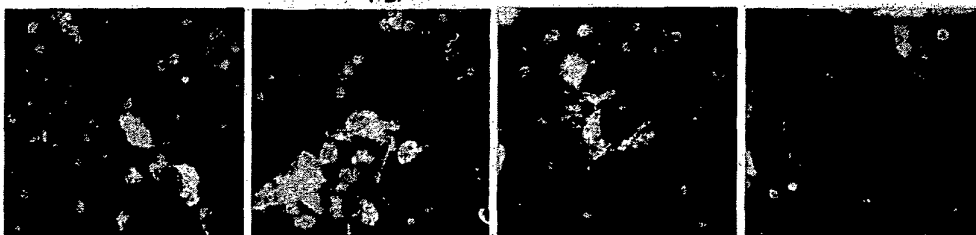
Control no tratado



Control positivo = Vitactyl Clair 3%



VT1 - 12 µg/ml



VT2 - 12 µg/ml



VT3 - 12 µg/ml



FIG.13