

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 815**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/898** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2008 PCT/FR2008/052154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09071855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08856862 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2214689**

54 Título: **Composición cosmética o dermatológica que contiene un extracto de orquidea y método de tratamiento cosmético que utiliza dicha composición**

30 Prioridad:

**30.11.2007 FR 0759482**

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

**05.03.2019**

73 Titular/es:

**LVMH RECHERCHE (100.0%)  
185 avenue de Verdun  
45800 St. Jean de Braye , FR**

72 Inventor/es:

**LEPLANQUAIS, VIRGINIE;  
SAUVAN, NANCY;  
PECHER, VIRGINIE y  
GERARD, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 702 815 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 o dermatológica que contiene un extracto de orquídea y método de tratamiento cosmético que utiliza dicha composición.

5 La invención se refiere a una composición cosmética o dermatológica que contiene un extracto de orquídea y métodos de tratamiento cosmético que utiliza dicha composición.

10 Las orquídeas (Orchidaceae) son objeto de numerosas investigaciones en el campo de los medicamentos o de la cosmética, destinadas a identificar novedosos compuestos que tengan propiedades interesantes.

Las orquídeas del género *Vanda* son orquídeas epífitas o litófitas de los bosques tropicales de Asia y Australia.

15 Se trata de orquídeas monopodales de los bosques de baja altitud con humedad atmosférica elevada.

El género comprende una cincuentena de especies con muchos híbridos.

**Estado de la técnica**

20 Las virtudes terapéuticas de las orquídeas del género *Vanda* están muy bien documentadas.

Bulpitt («The uses and misuses of orchids in medicine», *QJM*, 2005, 98 (9), 625-631), por ejemplo, ha notificado que la orquídea *Vanda coerulea* forma parte de la Farmacopea india, sin precisar más a este respecto.

25 Manandhar et al. (*Fitoterapia*, 1994, 65 (1), 7-13) han notificado el uso de *Vanda cristata* en el distrito Kaski de Nepal, para curar cortes y heridas mediante la aplicación de una pasta a base de la planta. Esta orquídea también se habría utilizado como expectorante (Husen et al., *Orchids an important group of plants for traditional system of medicine in India*, *Indian Forester*, vol.129, n.º 5, 2003, páginas 651-653).

30 Sigh et al. han estudiado las propiedades medicinales de las plantas utilizadas por la tribu Tharu del distrito de Nainital, en la región de Uttar Pradesh en India (*Int. J. Pharmacogn.*, 1994 32 1, 51-58). La aplicación de una pasta de *Vanda tessellata* (otro nombre de *Vanda roxburghii*) obtenida a partir de la planta completa, y aplicada con sal, cura las fracturas óseas. La administración oral de un extracto acuoso de esta misma planta también reduciría las fracturas.

35 Husen et al. (en *Indian Forester*, vol.129, n.º 5, 2003, páginas 651-653) han confirmado el interés de la orquídea *Vanda roxburghii* para el tratamiento de fracturas, pero también para curar las otitis, el asma, las sífilis y los dolores dentales. Las raíces de *Vanda tessellata*, aplicadas localmente en forma de una pasta calman el reumatismo (Reddy et al., *Indian Forester*, vol.131, n.º 1, 2005, páginas 90-96).

40 También se ha descrito en la solicitud de patente japonesa JP 2006-257056 que un extracto de *Vanda roxburghii* se puede utilizar como agente estrogénico para el tratamiento del envejecimiento de la piel. Por otro lado, se ha observado una mejora de la cicatrización cutánea mediante la aplicación de un extracto acuoso de las hojas de esta misma orquídea (Nayak et al., *International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 4, n.º 4, 2005, páginas 200-204).

50 Chawla et al. (*Ind. J. Pharm. Sci.*, 1992, 54 (4), 159-61) y Prasad et al. (*Journal of the Indian Medical Association* vol. 46, n.º 5, 1966, páginas 234-237) han descrito las propiedades antiinflamatorias de varios extractos de raíces de *Vanda roxburghii* en disolventes orgánicos tales como éter, cloroformo o metanol. Los primeros autores pusieron de manifiesto la presencia de un alquilferulato, más precisamente el acetiltetracosilferulato, en el extracto etéreo, y del beta-silosterol-D-glucósido en el extracto de cloroformo. Estos extractos muestran una actividad antiinflamatoria de intensidad variable y menor a la del ibuprofeno.

55 La orquídea *Vanda teres* ha sido objeto de muy pocas publicaciones científicas. Se indicará sin embargo que Sarma ha notificado en el *Indian Journal of Environment and Ecoplanning* (2007), 13 (1-2), 91-100, que los extractos de la planta *Papilionanthe teres* (sinónimo de *Vanda teres*) se han utilizado para tratar la debilidad, aplicándolos a la frente de los paciente durante la fiebre elevada y que, por otra parte, los extractos del tallo de esta misma planta se han podido utilizar para proteger del reuma y de la tos.

60 Las propiedades terapéuticas de otra orquídea, *Vanda testacea*, también se han comunicado. Sus hojas trituradas, aplicadas en forma de cataplasma, se han utilizado para curar las fracturas del ganado (Reddy et al., *Indian Forester*, vol. 131, n.º 1, 2005, páginas 90-96). Husen et al., en *Indian Forester*, vol.129, n.º 5, 2003, páginas 651-653, han mencionado su utilidad para curar el reumatismo, los problemas nerviosos y las picaduras de escorpiones D5.

65 En la actualidad, los inventores de la presente invención han descubierto que, de manera completamente

inesperada, que las orquídeas de la especie *Vanda teres* tenían notables actividades cosméticas y dermatológicas, en particular, notables propiedades de prevención o de ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo asociados a notables propiedades antiinflamatorias.

5 De esta forma, el solicitante ha mostrado en particular que un extracto de *Vanda teres* presentaba propiedades especialmente interesantes en *Vanda teres* presentaba propiedades especialmente interesantes en el campo de la cosmética, en la forma de una actividad tal que permite utilizar dicho extracto para contribuir al mantenimiento de la integridad de la estructura de la piel.

10 En efecto, este extracto inhibe las enzimas metaloproteinasas MMP-2 y 9 responsables entre otras de la degradación de las fibras de colágeno de la matriz extracelular, aumenta la expresión del gen IL-10.

De estas diferentes actividades, resulta un efecto de prevención y ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo.

15 Además de estas propiedades inesperadas, el extracto de la invención también tiene una actividad antiinflamatoria por inhibición de la secreción de mediadores de la inflamación, en particular la interleuquina 8 (IL-8) y la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>).

20 El extracto obtenido a partir de orquídeas de la especie *Vanda teres* puede utilizarse, por tanto, como principio activo en una composición cosmética que comprende al menos un excipiente cosméticamente aceptable, y destinada a su aplicación sobre al menos una parte de la piel del rostro o del cuerpo, para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo.

25 Este extracto también se puede utilizar ventajosamente en composiciones cosméticas o dermatológicas por sus notables propiedades antiinflamatorias.

#### **Objetos de la invención**

30 La presente invención tiene por objeto principal proporcionar un nuevo agente cosmético o dermatológico adecuado para atenuar o retardar los efectos del envejecimiento cutáneo, garantizando más especialmente el mantenimiento de la integridad de la estructura cutánea, análogamente para luchar contra las inflamaciones de la piel, y una composición cosmética o dermatológica que comprende dicho principio activo.

35 La invención tiene también por objeto resolver el problema técnico mediante una solución especialmente sencilla, relativamente barata y de utilidad a escala industrial y cosmética.

#### **Resumen de la invención**

40 Según un primer aspecto, la invención se refiere a una composición cosmética o dermatológica que contiene al menos un extracto de orquídea del género *Vanda*, obtenido a partir de al menos una parte de una orquídea de la especie *Vanda teres*, en solución o en dispersión en un vehículo cosmético o dermatológicamente aceptable compatible con una aplicación tópica sobre la piel.

45 Según un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de dicho extracto en una composición cosmética o dermatológica, como agente cosmético o dermatológico destinado a mantener la estructura de la piel, en particular limitando la degradación de la matriz extracelular de las capas superficiales de la dermis y la epidermis y/o para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo, en particular la formación de arrugas y/o para obtener un efecto protector, corrector o reestructurante de la piel y/o como agente antiinflamatorio.

50 Según un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento cosmético de la piel destinado especialmente a obtener un efecto de prevención o ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo, que comprende la aplicación sobre al menos una parte del cuerpo o del rostro de una composición cosmética que constituye el objeto del primer aspecto de la invención.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención tiene así por primer objeto una composición cosmética o dermatológica que contiene un extracto obtenido a partir de un material vegetal formado por orquídeas de la especie *Vanda teres*.

60 El material vegetal utilizado puede ser la planta completa o una parte de la planta tal como las hojas, el tallo, las flores o las raíces.

El extracto se obtuvo preferentemente a partir de los tallos y/o las raíces y/o las hojas de la orquídea, preferentemente los tallos.

65 El extracto se prepara por diferentes procedimientos de extracción conocidos del experto en la materia.

No obstante, la extracción se realiza preferentemente mediante la puesta en contacto del material vegetal seleccionado con un disolvente polar o una mezcla de disolventes polares.

Antes de esta etapa de puesta en contacto de al menos una parte de la planta con al menos un disolvente polar, esta parte de la planta se podrá opcionalmente secar y/o triturar.

5 Como disolvente polar o mezclas de disolventes polares que se puede utilizar en la etapa de extracción, se seleccionará ventajosamente un disolvente o mezcla de disolventes seleccionada entre agua, un alcohol C1-C4, por ejemplo etanol, un glicol C2 a C6 seleccionado preferentemente entre glicerol, butilenglicol y propilenglicol y sus mezclas.

10 De acuerdo con una aplicación preferida de la invención, la extracción se realiza usando una mezcla hidroalcohólica, especialmente una mezcla de agua y etanol, preferentemente una mezcla de agua y etanol, respectivamente con una relación de aproximadamente 90/10 v/v.

15 De acuerdo con otra variante de la invención, la extracción también se puede realizar mediante un procedimiento que aplica un disolvente polar en estado subcrítico, siendo dicho disolvente ventajosamente agua en estado subcrítico.

20 Antes de la propia etapa de extracción, el material vegetal puede haberse secado y/o triturado.

De acuerdo con una aplicación preferida de la extracción, el material vegetal se encuentra en estado seco y triturado.

25 La extracción puede también comprender, de manera opcional, una etapa adicional que consiste en un tratamiento del extracto destinado a decolorarlo parcial o completamente, o a purificarlo.

Esta etapa de decoloración puede, por ejemplo, consistir en un tratamiento del extracto mediante una solución de un disolvente o una mezcla de disolventes polares, preferentemente en un tratamiento mediante una solución etanol/agua en una relación de aproximadamente 70/30 v/v, en presencia de partículas de carbón activo.

30 La extracción se puede completar mediante una etapa de eliminación parcial o total de los disolventes de extracción.

En el primer caso, generalmente se concentra el extracto hasta obtener un concentrado acuoso desprovisto de cantidades significativas de disolvente orgánico, en el segundo caso se obtiene un residuo seco.

35 De forma alternativa, el producto de la etapa de extracción se puede hidrofilar o atomizar para presentarlo en forma de un polvo.

40 El polvo se puede utilizar en el estado de una composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la invención o redispersarse en un disolvente o una mezcla de disolventes.

De forma general, el producto de la etapa de extracción se puede disolver o dispersar en un disolvente o mezcla de disolventes, para utilizarse como principio activo en las composiciones cosméticas o dermatológicas de la invención.

45 el disolvente o mezcla de disolventes en el que se disuelve o se dispersa el extracto puede ser idéntico o diferente al que se ha utilizado en la extracción.

El extracto de la invención también se puede adsorber sobre un soporte ventajosamente seleccionado entre polvo de nailon, poroso o no poroso, y micas o cualquier otra sustancia mineral lamelar.

50 En este caso, el extracto utilizado es, preferentemente, un extracto acuoso.

La composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la invención comprende una cantidad de extracto de la invención para obtener el efecto buscado.

55 La composición de acuerdo con la invención comprende de esta forma, preferentemente, de 0,001 % al 5 %, preferentemente del 0,01 % al 1 %, en peso seco de extracto de Vanda teres.

60 Los ensayos realizados por los inventores han demostrado que las propiedades de las composiciones de la invención vinculadas a la presencia del extracto de Vanda teres también se pueden obtener o mejorar en las composiciones cosméticas o dermatológicas, en las que el extracto está asociado con otros principios activos que tienen efectos cosméticos similares y/o complementarios al extracto de la invención.

65 De este modo, el extracto de la invención, solo o junto con otros principios activos que participan en el mantenimiento de la integridad de la estructura de la piel, también se puede asociar de forma ventajosa con uno o varios principios activos seleccionados entre filtros UVA y/o UVB, sustancias antirradicalarias, sustancias calmantes,

sustancias aclarantes del tono y/o que regulen los trastornos pigmentarios cutáneos, sustancias que tengan un efecto hidratante.

5 Los inventores han descubierto también que las notables propiedades cosméticas o dermatológicas vinculadas a la presencia en la composición de un extracto de al menos una parte de la planta de *Vanda teres* podrían, en algunos casos, mejorarse ampliamente cuando esta composición contiene, además, al menos un extracto de al menos otra planta que pertenece a la familia de las orquídeas (Orchidaceae).

10 Este extracto adicional de otra planta que pertenece a la familia de las orquídeas podrá ser, especialmente, un extracto de al menos una orquídea del género *Vanda* y, más especialmente, un extracto de al menos una parte de una orquídea de la especie *Vanda denisoniana* y/o de al menos una parte de una orquídea de la especie *Vanda coerulea*.

15 Las composiciones de la invención podrán comprender, al mismo tiempo, un extracto de al menos una parte de la planta *Vanda teres* asociada con al menos un extracto de al menos una parte de otra orquídea del género *Vanda* tal como se ha definido anteriormente y, opcionalmente, al menos otro extracto de una planta que pertenezca a la familia de las orquídeas.

20 De acuerdo con una realización especialmente ventajosa, las composiciones de la invención comprenden al menos un extracto de tallo de *Vanda teres* y/o un extracto de raíz de *Vanda teres*, junto con un extracto de tallo de *Vanda denisoniana* y/o un extracto de tallo de *Vanda coerulea*.

25 Los ensayos realizados por los inventores han mostrado, en efecto, que la presencia en la misma composición de al menos un extracto de *Vanda teres* asociado con al menos un extracto de otra orquídea del género *Vanda* lleva en muchos casos a propiedades cosméticas o dermatológicas mejoradas.

30 Los inventores también han podido, en algunos casos, poner de manifiesto verdaderas sinergias observadas por la mezcla de al menos un extracto de *Vanda teres* con al menos otro extracto de al menos una parte de al menos otra orquídea del género *Vanda*.

35 De este modo, los ensayos realizados por los inventores han podido poner de manifiesto que los extractos de raíces de *Vanda teres*, incluso aunque dichas partes no sean por sí mismas las más activas de la planta, mejoran notablemente las propiedades de prevención o de ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo o las propiedades antiinflamatorias observadas con los extractos de plantas del género *Vanda*.

40 Como se evidencia en los ejemplos siguientes, como ejemplo de asociaciones que mejoran de forma significativa o incluso que presentan una auténtica sinergia, se citarán las asociaciones de extractos de tallos de *Vanda teres* con extractos de tallos y/o de raíces de *Vanda denisoniana* y/o con extractos de tallos de *Vanda coerulea*.

45 Se citará especialmente que se han podido observar verdaderos efectos de sinergia, también en lo que respecta a la actividad de prevención o de ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo de la actividad antiinflamatoria en combinando en la composición, un extracto de tallos de *Vanda teres*, un extracto de raíces de *Vanda teres*, un extracto de tallos de *Vanda denisoniana* y un extracto de tallos de *Vanda coerulea* y esto, en proporciones que pueden variar ampliamente.

50 Además del extracto de la invención, dicha composición cosmética o dermatológica comprende al menos un excipiente cosmética o dermatológicamente aceptable que puede seleccionarse entre pigmentos, colorantes, polímeros, agentes tensioactivos, agentes de reología, perfumes, electrolitos, agentes de ajuste del pH, agentes antioxidantes, conservantes, y sus mezclas.

55 La composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la invención también puede ser por ejemplo un suero, una loción, una emulsión, una crema, especialmente una crema con color o incluso también un hidrogel, preferentemente una mascarilla, o presentarse en forma de una barra, o también de un parche.

60 Las composiciones de la invención presentan un efecto especialmente buscado para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo, y que permiten obtener un efecto protector, corrector, reestructurante, cuando se aplica sobre la piel del rostro o del cuerpo.

65 La presente invención se refiere, como se ha expuesto anteriormente, una utilización de los extractos tales como se han definido anteriormente como agente cosmético o dermatológico destinado a mantener la estructura de la piel, en particular limitando la degradación de la matriz extracelular de las capas superficiales de la dermis y la epidermis y/o para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo, en particular la formación de arrugas y/o para obtener un efecto protector, corrector o reestructurante de la piel y/o como agente antiinflamatorio.

Como se evidencia claramente en los ejemplos siguientes, el solicitante ha puesto de manifiesto el interés de los extractos de la planta *Vanda teres* asociados opcionalmente, además, a otros extractos de *Vanda* para mejorar las

actividades relacionadas a continuación:

- actividad antiinflamatoria por inhibición de la secreción de mediadores de la inflamación IL-8 y PGE<sub>2</sub>,
- propiedades antirradicalarias, que protegen la piel de los daños causados por el estrés oxidante,
- 5 - síntesis de fibras de fibronectina y de colágeno de tipo I, fibras de la matriz extracelular que permiten el mantenimiento de la estructura de la piel,
- inhibición de las enzimas MMP-2 y 9 que degradan las fibras de la matriz extracelular

10 De este modo, la invención se refiere también a un uso de los extractos de *Vanda teres* anteriormente definidos como agente cosmético o dermatológico o en la fabricación de una composición cosmética destinada a mantener la estructura de la piel, en particular limitando la degradación de la matriz extracelular proteica de las capas superficiales de la dermis y la epidermis y también para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo, en particular la formación de arrugas, o también para obtener un efecto protector, corrector, reestructurante.

15 La invención también tiene por objeto un método de tratamiento cosmético que utiliza las composiciones cosméticas que comprenden una cantidad eficaz de dicho extracto para contribuir al mantenimiento de la integridad de la estructura de la piel, especialmente, por estimulación de la síntesis de fibronectina, por inhibición de las enzimas MMP-2 y 9 responsables de la degradación de las fibras de colágeno y por el aumento de la expresión del gen que codifica la inteleuquina IL-10.

20 Dicho método de tratamiento cosmético comprende la aplicación en al menos una zona concentrada de la piel del rostro o del cuerpo, una composición tal como se ha descrito anteriormente y que comprende un extracto tal como se ha descrito anteriormente.

25 En los ejemplos, todos los porcentajes se proporcionan en peso, la temperatura es en grados centígrados, la presión es la presión atmosférica, salvo indicación en contrario.

30 Además de las orquídeas del género *Vanda*, el material vegetal a partir del cual se prepara el extracto de la invención puede comprender uno o varios extractos de otras plantas, en forma de extractos de plantas completas o de partes de plantas.

35 Estas plantas pueden ser bien orquídea de un género diferente al género *Vanda*, o bien plantas de otra familia, conocidas por tener propiedades similares o complementarias a las puestas de manifiesto por las orquídeas del género *Vanda*.

Se podrán seleccionar, especialmente, plantas cuyos extractos sean conocidos por ralentizar o prevenir los efectos del envejecimiento cutáneo, por diversos mecanismos tales como el mantenimiento de la estructura de la piel o una acción sobre las arrugas.

40 Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán claramente a la luz de la descripción explicativa que sigue a continuación, realizada en referencia a los ejemplos de preparación de los extractos, y a los ejemplos de composiciones cosméticas que utilizan dichos extractos, que se proporcionan a título ilustrativo solamente.

## 45 Ejemplos

### I. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

#### **Ejemplo 1: preparación de un extracto de tallos de *Vanda teres* (extracto n.º 1 de acuerdo con la invención)**

50 El material vegetal (tallos de la planta) en estado seco se trituró extemporáneamente.

Se introdujeron 10 g de material vegetal triturado en un matraz redondo de 250 ml al que se habían añadido 150 ml de una mezcla etanol/agua (90/10 v/v).

55 El matraz redondo provisto de un refrigerante de bolas con agitación magnética se sumergió en un baño termostático, a continuación se calentó hasta la temperatura de reflujo del disolvente.

El reflujo se mantuvo 30 min con agitación.

60 Tras detener el calentamiento, el matraz redondo se dejó enfriar a temperatura ambiente fuera del baño.

A continuación la mezcla se filtró al vacío en un buchner con un filtro GF/F Whatman 70 µm y, una vez tarado: se obtuvo el filtrado 1.

65 La torta se lavó sobre el buchner con 50 ml del disolvente de extracción: se obtuvo el filtrado 2.

Los 2 filtrados se combinaron, se pesaron.

El filtrado así obtenido se introdujo en un matraz redondo previamente tarado, después se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio en un baño de agua ajustado a una temperatura máxima de 50 °C.

5 Se obtiene un residuo seco que se cuantifica para determinar el rendimiento másico de extracción, expresado con respecto a la masa vegetal seca introducida.

10 El rendimiento de extracción expresado en masa de extracto seco obtenido por 100 g de materia vegetal seca triturada de partida es de 12,4.

### **Ejemplo 2: Preparación de un extracto de raíces de *Vanda teres* (extracto n.º 2 de acuerdo con la invención)**

15 Se utilizó el mismo protocolo que el empleado en la preparación del extracto n.º 1 del ejemplo 1 pero se aplicó a un material vegetal compuesto por raíces de *Vanda teres*.

Se obtuvo un extracto que se denomina en lo sucesivo como extracto n.º 2 de la invención, con un rendimiento de extracción de 14,8.

### **Ejemplo 3: Preparación de otros extractos de partes de plantas del género *Vanda***

Se utilizó el mismo protocolo que el definido en el ejemplo 1 para preparar diferentes extractos de *Vanda teres* y *Vanda coerulea*.

- 25
- extracto de tallo de *Vanda denisoniana*, (rendimiento de extracción de 10,6)
  - extracto de tallo de *Vanda coerulea*, (rendimiento de extracción de 8,9)
  - extracto de raíces de *Vanda coerulea*

30 Estos diferentes extractos se utilizarán en los ejemplos siguientes tanto por separado, como en mezcla y combinados en diferentes proporciones con el extracto del ejemplo 1 y/o con el extracto del ejemplo 2.

## **II. PROTOCOLO, MATERIAL Y MÉTODO DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD**

35 Las dosis de utilización de los extractos se determinan previamente en el ensayo XTT (reactivo: sal de tetrazolio) en un cultivo celular de dos líneas de células, células HaCaT (línea de queratinocitos inmortalizados *in vitro*) y de fibroblastos humanos normales (FHN).

### **1. Marcadores de inflamación**

#### **40 1-1) dosis de interleuquina-8 (IL-8)**

La inflamación es una respuesta fisiológica normal e inmediata a cualquier agresión de naturaleza mecánica o infecciosa.

45 Una producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS) conlleva la liberación de algunas citoquinas responsables del fenómeno proinflamatorio, que lleva a una aceleración del envejecimiento cutáneo.

50 En este caso se puede observar un aumento de la interleuquina-8 (IL-8) en la epidermis: los queratinocitos participan activamente en la defensa inmunitaria secretando citoquinas, de las que la IL-8 crea un gradiente quimiotáctico que atrae las células implicadas en la inflamación: linfocitos T, neutrófilos... Se ha demostrado que los queratinocitos expresan y liberan la IL-8, bajo la estimulación de la interleuquina -1  $\beta$ .

• protocolo

55 Las células HaCaT se sembraron a razón de 10000 células/pocillo (medio de cultivo KSFM complementado, Gibco) en una microplaca de 96 pocillos. La placa se introdujo en la estufa (37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>) durante 24 horas.

Los extractos sometidos a ensayo, a las dosis de uso anteriormente determinadas mediante el ensayo XTT, se pusieron en presencia de las células después de dilución adecuada en el medio de cultivo.

60 En paralelo, las células se estimularon con IL-1  $\beta$  a 25 ng/ml (R&D Systems).

Una columna se trató con colecalciferol a 0,39  $\mu$ g/ml (Sigma) y se estimuló (para obtener el testigo positivo) y una columna no tratada se estimuló con IL-1  $\beta$ .

65 La columna de células no tratada se puso en presencia de disolvente de solubilización DMSO (condición testigo).

## ES 2 702 815 T3

Cada concentración de producto, el testigo positivo y el testigo sin tratamiento, se evaluaron en 4 pocillos con queratinocitos humanos normales (KHN).

5 Después de 24 horas de tratamiento, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se almacenaron a -20 °C. La dosificación se realizó según el protocolo descrito en el kit "Human IL-8/ NAP-1 ELISA" (Abcys).

Este ensayo permite dosificar, por medición espectrofotométrica a 450 nm, la cantidad de IL-8 presente en los sobrenadantes, proporcional a la absorbancia medida.

10 *1-2) dosificación de las prostaglandinas E2 (PGE2)*

El aumento de la tasa de PGE2 se puede realizar en determinadas condiciones patológicas, como la inflamación o determinados cánceres.

15 PGE2 es el mediador principal de los fenómenos de respuestas inflamatorias durante los daños tisulares.

• protocolo

20 Las células HaCaT se sembraron a razón de 10000 células/pocillo (medio de cultivo KSFM complementado, Gibco) en una microplaca de 96 pocillos.

La placa se introdujo en la estufa (37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>) durante 24 horas.

25 Los extractos sometidos a ensayo se pusieron en presencia de las células, tras dilución adecuada en medio de cultivo.

Una columna se trató con indometacina a 1 µg/ml (Sigma) para obtener el testigo positivo, y una columna no se trató pero se dejó en presencia de DMSO.

30 Cada concentración de producto, el testigo positivo y el testigo sin tratamiento, se evaluaron en 4 pocillos con KHN.

Después de 24 horas de tratamiento, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se almacenaron a -20 °C.

35 La dosificación se realizó según el protocolo descrito en el kit de dosificación PGE2 de R&D Systems.

Esta técnica permite dosificar, por medición espectrofotométrica a 450 nm, la cantidad de PGE2 presente en los sobrenadantes, que es inversamente proporcional a la absorbancia medida.

40 2. Medida de la expresión del mensajero de la interleuquina-10 (IL-10)

La IL-10, que se describe como un factor que inhibe la producción de citoquinas por los linfocitos Th1 y las funciones efectoras de los monocitos/macrófagos, es de hecho una citoquina capaz de actuar sobre numerosas dianas.

45 Su función principal parece ser la inhibición de la respuesta inflamatoria.

IL-10 también regula la proliferación y la diferenciación de algunas células inflamatorias o también de los queratinocitos.

• protocolo

50 El efecto de los extractos de orquídeas se evaluó por el método RT-QPCR en queratinocitos humanos en monocapa (NHEK) en confluencia normal (confluencia convencional en biología molecular), en medio SFM con bajo contenido de calcio sin complementos, en formatos adaptados.

55 Los extractos y el medio se estudiaron durante 24 horas, después se realizó la extracción del ARN total, seguido por tratamientos con ADNasa y transcripción inversa de acuerdo con los protocolos normalizados.

60 Una PCR cuantitativa por triplicado permitió medir la expresión del marcador IL-10 respecto al marcador de referencia G3PDH.

3. Marcadores de mantenimiento de la estructura de la piel

65 Los ensayos se realizaron sobre fibroblastos humanos normales (FHN), células de la dermis que favorecen el mantenimiento de la estructura de la piel.

Los FHN se sembraron a la densidad de 5000 células/pocillos y 200 µl/pocillos de medio de cultivo MEM (Gibco)

Invitrogen) complementado con glutamina (Gibco Invitrogen, concentración final 2 mM) y 10 % de SFT (suero de feto de ternera), en una microplaca de 96 pocillos (Falcon).

5 Los bordes de la placa no tendrán células, y la placa de cultivo se introdujo en la estufa durante 24 horas para obtener un 80 % de confluencia celular.

### 3-1) dosificación de las enzimas MMP-2 y 9

10 Las enzimas "metaloproteinasas de la matriz" (MMP) tienen la función de degradar las proteínas de la matriz extracelular.

Tienen un papel importante en numerosos procesos fisiológicos normales tales como el desarrollo embrionario, la morfogénesis, y el remodelado tisular.

15 MMP-2, también denominada gelatinasa A, se expresa en las células mesenquimales (principalmente los fibroblastos) durante el desarrollo y la regeneración tisular. Esta expresión está estrechamente asociada con células tipo neutrófilos, macrófagos y monocitos.

20 Con MMP-9, esta proteína degrada el colágeno tipo IV, compuesto principal de las membranas basales y de la gelatina (colágeno desnaturalizado).

También puede degradar otros tipos de colágenos (V, VII y X), la elastina y la fibronectina.

25 MMP-9, denominada gelatinasa B, tiene 3 dominios de fibronectina tipo II y un dominio homólogo al colágeno de tipo V.

La Pro-MMP-9 se puede activar por MMP-3 o por algunas proteinasas bacterianas.

30 Los sustratos de MMP-9 pueden ser colágenos nativos tipo IV, V, VII, X y XI, la fibronectina...

- protocolo

35 Los extractos, a las dosis de uso anteriormente determinadas mediante el ensayo XTT, se pusieron en presencia de las células después de dilución adecuada en medio de cultivo.

Una columna se trató con anogelina a 25 µg/ml, y una columna se puso en presencia del disolvente de solubilización DMSO (condición testigo).

40 Cada concentración de producto, el testigo positivo y el testigo sin tratamiento, se evaluaron en 4 pocillos con KHN.

Después de 48 horas de tratamiento, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se almacenaron a -20 °C.

45 La dosificación de MMP-2 y 9 se realizó según los protocolos descritos en los kits Quantikine de R&D Systems que permiten dosificar, respectivamente, por medición espectrofotométrica a 450 nm, las cantidades de MMP-2 y MMP-9 presentes en los sobrenadantes.

### 3-2) dosificación de las fibras de colágeno I y fibronectina

- protocolo

50 Como anteriormente, los extractos se pusieron en presencia de las células después de dilución adecuada en medio de cultivo.

55 Una columna se trató con vitamina C (ácido ascórbico, Sigma) 0,1 µM, y una columna se puso en presencia del disolvente de solubilización DMSO (condición testigo).

Cada concentración de producto, el testigo positivo y el testigo sin tratamiento, se evaluaron en 4 pocillos con KHN.

60 Después de 48 horas de tratamiento, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se almacenaron a -20 °C.

La dosificación se realizó según los protocolos descritos en los kits EIA de Takara.

Estos 2 ensayos utilizan una técnica inmunoenzimática que permite dosificar, respectivamente, por medición espectrofotométrica a 450 nm, las cantidades fibras de colágeno y fibronectina presentes en los sobrenadantes.

65

4. Propiedades antirradicalarias

Sobre los extractos, se realizó el ensayo TBARs que mide el índice de protección de los lípidos de la membrana de las células en cultivo.

5 Las HaCaT se sembraron con 67 pasos en placas de 24 pocillos a razón de 75.000 células por 1 ml por pocillo. Después de 24 horas de incubación en la estufa (37 °C, 5 % CO2) correspondiente al 80 % de confluencia, las células se pusieron en presencia de los extractos de orquídeas.

10 También se preparó un testigo constituido por placas de células no tratadas con los extractos de orquídeas.

El tratamiento se realizó por triplicado y al 1 % (1 µl/ml de muestra), en un plazo de 24 horas (37 °C, 5 % CO2).

15 Se trabajaron dos placas de la misma manera, simultáneamente para el tratamiento con extracto y para el testigo, para irradiar una de las dos placas con UVA a razón de 12 J/cm<sup>2</sup> (cambio de medio de cultivo por PBS para las dos placas).

20 Al finalizar la irradiación, se eliminaron los sobrenadantes de dos placas, se añadieron 500 µl de SDS al 0,8 % a cada pocillo de células.

Después de 5 minutos de contacto, la recuperación de las células realizó por rascado de los pocillos.

25 250 µl de células se pusieron en presencia de 375 µl de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % y 375 µl de ácido acético al 20 % en tubos pirex con tapón, puestos en un baño de agua a 95 °C durante una hora.

Después de una última etapa de centrifugación, el sobrenadante se recuperó para leer su absorbancia a 532 nm.

30 Se midió la absorbancia de la muestra sometida a irradiación UV, así como de la muestra no irradiada, que se corrige de la forma siguiente:

- Absorbancia corregida = (Absorbancia medida - Absorbancia del agua)

Para el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación, el cálculo se realiza de la siguiente forma:

35 - Absorbancia corregida (testigo) = (Absorbancia corregida (disolvente UV) - Absorbancia corregida (disolvente))

El porcentaje de inhibición de cada muestra se obtiene mediante la fórmula: (Absorbancia corregida (UV muestra) - Absorbancia corregida (muestra no tratada)) / Absorbancia corregida (testigo).

**III. ACTIVIDADES DE LOS EXTRACTOS DE LA INVENCION**

1. Actividad antiinflamatoria

*Inflamación (HaCat) - dosificación de IL-8 y de PGE<sub>2</sub>*

45 Los extractos se analizaron a dosis de utilización determinadas previamente en el ensayo XTT, que son respectivamente:

- 50 - 25 µg/ml para las raíces de la planta,
- 50 µg para los tallos de la planta,
- 12,5 µg para las hojas.

Los porcentajes de inhibición de la liberación de IL-8 y PGE<sub>2</sub> se calcularon para cada tratamiento con un extracto de orquídeas, con respecto a la cantidad inicial de IL-8 presente en los sobrenadantes de cultivos no tratados.

55 Los resultados se indican en la tabla siguiente:

género	especie	órgano	IL8	PGE2
Vanda	teres	tallos	-30 %	-33 %
Vanda	teres	hojas	-14 %	-67 %
Vanda	teres	raíces	-8 %	-57 %

Se constata una disminución significativa de la liberación de los marcadores de IL-8 y PGE<sub>2</sub>.

Este efecto de inhibición sobre la liberación de estos marcadores de inflamación traduce una actividad antiinflamatoria del extracto sometido a ensayo.

5 Esta actividad antiinflamatoria bloquea el fenómeno proinflamatorio producido por el exceso de producción de radicales libres y evita de esta forma la aceleración del envejecimiento cutáneo.

## 2. Ensayos antirradicalarios

10 El ensayo realizado en un extracto de tallos de Vanda teres indica una inhibición de la peroxidación del 41 %.

## 3. Dosificación del procolágeno de tipo I, de fibronectina y actividad MMP-2 y 9 (FHH)

Los extractos se sometieron a ensayo a la dosis de 25 µg/ml.

15 Los resultados se agrupan en la tabla siguiente:

género	especie	órgano	colágeno	fibronectina	MMP2	MMP9
Vanda	teres	tallos	8 %	28 %	-45 %	-36 %
Vanda	teres	hojas	27 %	0	-34 %	-15 %
Vanda	teres	raíces	-20 %	0	-43 %	-10 %

20 El tratamiento de las células con cada uno de los extractos sometidos a ensayo se traduce en una disminución importante de las enzimas metaloproteinasas responsables de la degradación de la matriz extracelular formada, especialmente para el colágeno.

25 Los extractos mostraron una actividad de inhibición respecto de las metaloproteinasas, que se traduce por un efecto cosmético de prevención del envejecimiento cutáneo mediante una ralentización de la degradación de la matriz extracelular.

Se destaca además, que el extracto de tallos mostró una acción significativa sobre la síntesis de colágeno y de fibronectina y que los extractos de hojas han mostrado una actividad especialmente significativa en la síntesis de colágeno.

## 30 4. Expresión del gen que codifica la IL-10 (KHN)

Un extracto de tallos de Vanda teres produjo un aumento significativo del 1000 % de la expresión de este gen con respecto a la expresión de un testigo no tratado.

## 35 Conclusiones de los ensayos

De los ensayos anteriores se deduce que los extractos de tallos tienen un potencial excelente en términos de actividad biológica global de prevención o ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los diferentes marcadores.

## 40 **IV. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE MEZCLAS DE EXTRACTOS DEL GÉNERO VANDA**

45 En este ejemplo se ha realizado un estudio sistemático de la actividad de prevención o de ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo y de la actividad antiinflamatoria de un número elevado de mezclas de los cuatro tipos de extractos siguientes:

- extracto de raíces de Vanda teres,
- extracto de tallos de Vanda denisoniana,
- extracto de tallos de Vanda coerulea,
- 50 - extracto de tallos de Vanda teres.

Los diferentes ensayos se realizaron con una concentración total en extractos de 25 µg/ml para cada uno de los ensayos, para poder comparar la eficacia de las diferentes mezclas con las eficacias obtenidas con cada uno de los tipos de extractos tomados individualmente.

55 Para realizar este estudio, se han utilizado especialmente dos modelos biológicos:

- expresión de MMP-2 en los sobrenadantes de cultivo de FHN,
- expresión de PGE2 en los sobrenadantes de cultivo de HaCAT.

Cada mezcla o extracto sometido a ensayo se preparó para obtener una concentración correspondiente a 25 µg/ml.

Para cada experiencia, los valores del testigo positivo y los valores de los extractos se compararon utilizando el test de Student. La diferencia se considera significativa cuando el valor es inferior o igual a 0,05.

5 Los ensayos realizados permitieron caracterizar gran cantidad de mezclas especialmente interesantes que tenían actividades significativas con respecto a cada uno de los modelos estudiados, incluso verdaderos efectos de sinergia.

10 Como mezclas interesantes, se citará una mezcla que contiene un extracto de raíces de Vanda teres, un extracto de tallos de Vanda teres y un extracto de tallos de Vanda denisoniana en proporciones equivalentes (1/3 de cada extracto), así como una mezcla de un extracto de raíces de Vanda teres y de un extracto de tallos de Vanda denisoniana en proporciones equivalentes (50/50).

15 También se citará una mezcla que contenía los cuatro extractos anteriormente citados en proporciones equivalentes (25 %) así como una mezcla que tiene la composición siguiente:

- raíces de Vanda teres: 12,5 %,
- tallos de Vanda denisoniana: 62,5 %,
- 20 - tallo de Vanda coerulea: 12,5 %,
- tallos de Vanda teres: 12,5 %.

Todas estas mezclas se consideran especialmente interesantes en cada uno de los dos modelos.

## 25 V. COMPOSICIONES COSMÉTICAS DE LA INVENCION

### Ejemplo 4 - Composición cosmética que comprende el extracto de la invención

30 El extracto de orquídeas utilizado como principio activo en la composición cosmética de este ejemplo se obtuvo reproduciendo el procedimiento del ejemplo 1, pero aplicándolo a una mezcla de tallos de Vanda denisoniana, de Vanda teres y de Vanda coerulea, en estado seco y triturado, y según una relación 1/1/1 de estas tres plantas.

El extracto seco así obtenido se puso seguidamente en solución al 1 % p/p en una mezcla glicerol/agua 60/40 v/v.

35 Esta solución se utilizó como principio activo en la preparación de la composición cosmética siguiente (% expresado como p/p):

<u>Fase A</u>	
Solución al 1 % en extracto de orquídeas	0,3 %
Fenoxietanol	0,5 %
Goma xantana	0,2 %
Polímeros reticulados de acrilato/acrilato de alquilo C20-30	0,15 %
EDTA tetrasódico	0,1 %
Agua	cs

<u>Fase B</u>	
Poliisobuteno hidrogenado	4 %
Escualano	3 %
Triglicérido caprílico/cáprico	3 %
Pentilenglicol	3 %
Estearato de glicerilo	3 %
Estearato PEG-100	2,5 %
Cera de abeja	1,5 %
Carbonato de dicaprililo	1,5 %
Alcohol cetílico	1 %
Alcohol estearílico	1 %
Dimeticona	1 %

<u>Fase C</u>	
Hidróxido de sodio	0,04 %
Agua	cs 100 %

40 Se dispersaron los gelificantes de la fase A en agua, después se calentó a 80-85 °C, antes de solubilizar el resto de componentes, comprendida la solución del extracto de orquídeas.

Los compuestos de la fase B se calentaron a 85 °C para formar una fase homogénea.

## ES 2 702 815 T3

Se emulsionó la fase A en la fase B mediante un mezclador Ystral.

La emulsión aceite/agua así obtenida se neutralizó finalmente mediante una solución acuosa de hidróxido de sodio % p/p, y después se enfrió.

5

La composición obtenida es una crema destinada a aplicarse sobre el rostro o una parte del rostro.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición cosmética en forma de un sérum, una loción, una emulsión, una crema, una crema con color, un hidrogel, una mascarilla, una barrita o una película de parche, **caracterizada por que** contiene
- 10 - de 0,001 % al 5 % en peso seco de al menos un extracto de al menos una parte de una orquídea de la especie Vanda teres, en solución o en dispersión en un vehículo cosméticamente aceptable compatible con una aplicación tópica sobre la piel, y
- 10 - al menos un excipiente seleccionado entre pigmentos, colorantes, polímeros, agentes tensioactivos, agentes de reología, perfumes, agentes de ajuste del pH, agentes antioxidantes, y conservantes.
- 15 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** dicho extracto se obtiene a partir del tallo y/o las raíces y/o las hojas de la orquídea Vanda teres.
- 15 3. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** dicho extracto es un extracto de tallo.
- 20 4. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** dicho extracto se obtiene mediante la puesta en contacto de al menos una parte de dicha orquídea, opcionalmente seca y/o triturada con al menos un disolvente polar.
- 25 5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4 **caracterizada por que** dicho disolvente polar se selecciona entre el grupo que consiste de agua, alcoholes C1-C4, especialmente etanol, glicoles C2 à C6, especialmente glicerol, butilenglicol y propilenglicol.
- 25 6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicho disolvente es una mezcla hidroetanólica, preferentemente una mezcla que comprende aproximadamente un 90 % de agua en 10 % de etanol, en volumen.
- 30 7. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada por que** dicho disolvente polar es un disolvente en estado subcrítico, en especial de agua en estado subcrítico.
- 35 8. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada por que** dicho extracto se ha sometido a al menos una etapa de decoloración y/o de purificación.
- 35 9. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada por que** dicho extracto se introduce en dicha composición después de haberse absorbido sobre un soporte, especialmente sobre un soporte que comprende polvo de nailon, poroso o no poroso, o micas o una sustancia mineral lamelar.
- 40 10. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada por que** dicho extracto es un extracto acuoso.
- 45 11. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada por que** contiene de 0,01 al 1 % en peso seco de dicho extracto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 12. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada por que** contiene, además, al menos un extracto de al menos otra planta que pertenece a la familia de las orquídeas (Orchidaceae).
- 50 13. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizada por que** contiene, además, al menos un extracto de al menos otra orquídea del género Vanda, especialmente un extracto de al menos una parte de una orquídea de la especie Vanda denisoniana y/o de al menos una parte de una orquídea de la especie Vanda coerulea.
- 50 14. Composición de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada por que** contiene al menos un extracto de tallo de Vanda teres y/o un extracto de raíces de Vanda teres, junto con un extracto de tallo de Vanda denisoniana y/o un extracto de tallo de Vanda coerulea.
- 55 15. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizada por que** comprende un extracto de raíces de Vanda teres.
- 60 16. Uso, en una composición cosmética, de un extracto tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 8 como agente cosmético destinado a mantener la estructura de la piel, en particular limitando la degradación de la matriz extracelular de las capas superficiales de la dermis y la epidermis y/o para atenuar o retrasar los efectos del envejecimiento cutáneo, en particular la formación de arrugas y/o para obtener un efecto protector, corrector o de reestructuración de la piel.
- 65

17. Método de tratamiento cosmética de la piel destinado especialmente a obtener un efecto de prevención o ralentización de la aparición de los signos del envejecimiento cutáneo, **caracterizado por que** comprende la aplicación de al menos una parte del cuerpo o del rostro de una composición cosmética tal como se ha definido en una de las reivindicaciones a 1 a 15.