

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 733**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/9783 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2019 PCT/EP2019/059298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2019 WO19197548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2019 E 19715955 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3773929**

54 Título: **Procedimiento de producción de un extracto de semillas de *Entada* enriquecido en metabolitos de interés, extracto obtenido mediante un procedimiento de este tipo y aplicaciones cosméticas y dermocosméticas de dicho extracto**

30 Prioridad:

12.04.2018 FR 1853216

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

10.10.2022

73 Titular/es:

**EXSYMOL (100.0%)
4, Avenue Albert II
98000 Monaco, MC**

72 Inventor/es:

SEGUIN, MARIE-CHRISTINE

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 924 733 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

Procedimiento de producción de un extracto de semillas de *Entada* enriquecido en metabolitos de interés, extracto obtenido mediante un procedimiento de este tipo y aplicaciones cosméticas y dermocosméticas de dicho extracto

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención un extracto obtenido a partir de una materia vegetal y enriquecido en metabolitos de interés, a los extractos resultantes de un procedimiento de este tipo y a las composiciones que comprenden dichos extractos, así como a sus aplicaciones cosméticas y dermocosméticas.

10 Según la Organización Mundial de la Salud, las plantas calificadas de "planta medicinal" por sus propiedades beneficiosas para la salud humana se utilizan desde tiempos inmemoriales en medicina tradicional, en particular entre las sociedades poco industrializadas, para las que el acceso a los medicamentos sintéticos modernos sigue siendo costoso (Sofowora A. *et al.*, Afr. J. Tradit. Complément Altern. Med., 2013, vol. 10, pp. 210-229).

15 Una de ellas, la especie *Entada phaseoloides*, que pertenece al género "Entada" y más ampliamente a la familia botánica de las fabáceas, encuentra así desde hace mucho tiempo una utilización en las medicinas no convencionales ayurvédica, china, o incluso tribal (Deepa C. *et al.*, Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol., 2017, vol. 4, pp. 92-99). Su distribución es más bien cosmopolita ya que la planta se desarrolló inicialmente en zonas tropicales cálidas tales como los bosques costeros de países que bordean el Océano Índico: Madagascar, Sudáfrica, India, Australia, etc. (Deepa C. *et al.*, Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol., 2017, vol. 4, pp. 92-99). Se encuentra también en Asia, tal como en la cadena central y oriental del Himalaya y hasta una altitud de 1300 metros (Singh O. *et al.*, J. Asian Natur. Products Res., 2011, vol. 13, pp. 682-687), o también en China bajo, precisamente, la denominación "*Entada phaseoloides* (L.) Merrill" (Xiong H. *et al.*, Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, vol. 45, pp. 624-626 y referencias citadas). La morfología de la planta es la de una liana trepadora, portadora tras su inflorescencia de grandes vainas que pueden alcanzar hasta 2 m de longitud y 13 cm de anchura. Cada vaina contiene entre 10 y 20 semillas de color rojo pardo, con envoltura muy dura, y cuya forma se asemeja a la de una lente de objetivo que puede llegar hasta los 10 cm de diámetro (Sugimoto S. *et al.*, J. Natur. Medecines, 2018, vol. 72, pp. 12-19).

30 Las virtudes medicinales reconocidas de la planta considerada en su totalidad con sus principales órganos (tallo, hojas y semillas) son numerosas y muy variadas: analgésica, antiinflamatoria, antiartrítica, antidiabética, antioxidante, hepatoprotectora, antimicrobiana, antiespasmódica, antitúsciva, astringente, etc. Los experimentos y estudios farmacológicos llevados a cabo hasta ahora se realizaron, sin embargo, principalmente sobre las semillas de la planta (Deepa C. *et al.*, Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol., 2017, vol. 4, pp. 92-99). Es cierto que, por un lado, una vez simplemente triturada y molida su carne blanquecina, estas semillas muestran un amplio campo de utilizaciones: remedio contra la ictericia, el estreñimiento, las mordeduras de serpiente, los dolores abdominales, pero también una utilización como estimulante del crecimiento del cabello, afrodisíaco, vomitivo, vermífugo, etc. (Barua C.C. *et al.*, Int. J. Res. Biosciences, 2015, vol. 4, pp. 88-97; Barua C.C. *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 2014, vol. 2, pp. 1-18). Por otro lado, el análisis de los constituyentes fitoquímicos de la semilla de *Entada phaseoloides* revela la acumulación y el almacenamiento de varios metabolitos secundarios de interés (Shodhganga *et al.*, 2005, dirección URL: [shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/42603/9/09-chapter 4.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/42603/9/09-chapter%204.pdf)). Sobre todo, están presentes abundantemente las saponinas que, en las plantas en general, resultan ser unos glucósidos oleosos de triterpenos cíclicos o de esteroides, y que, en el caso de *Entada phaseoloides*, tras una hidrólisis ácida, linera una sapogenina cristalina, el ácido entagénico, y los glucósidos arabinosa y xilosa. Se atribuye muy particularmente, para las saponinas de semillas de *Entada phaseoloides*, una actividad antiinflamatoria significativa, acoplada con unas actividades antidiabéticas e hipolipidémicas (Barua C.C. *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 2014, vol. 2, pp. 1-18 y referencias citadas). Después, las semillas de *Entada phaseoloides* contienen una multitud de ácidos fenólicos y otros flavonoides, esencialmente en forma de glicoconjugados tal como la entidad "faseoloidina" citada frecuentemente en la bibliografía sobre la planta y que, después de la caracterización, resultó ser el derivado 2-O-β-D-glucopiranosido del ácido homogentísico (Barua A.K., Phytochem., 1988, vol. 27, pp. 3259-3261). Precisamente, dicha riqueza en compuestos fenólicos ha hecho de estas semillas, lógicamente después, una materia prima de calidad para la obtención de antioxidantes naturales potentes y nutritivos (Barua C.C. *et al.*, Int. J. Pharm. Bio. Sci., 2015, vol. 6, pp. 366-376). Asimismo, y de manera original en esta planta trepadora, se ha demostrado la presencia en estas semillas de estructuras de tioamida denominadas "entadamidas", aisladas y caracterizadas por primera vez por académicos japoneses a mediados de los años 1980 (Ikegami F. *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1985, vol. 33, pp. 5153-5154 & Phytochem., 1987, vol. 26, pp. 1525-1526). Estos metabolitos, con el número precisamente de dos estructuras identificadas en las semillas, se denominan "entadamida A" y "entadamida B". Corresponden químicamente a los compuestos "trans-N-(2-hidroxi-etil)-3-metil-tio-propenamida" y "N-(2-hidroxi-etil)-3,3-bis(metil-tio)-propenamida", e inmediatamente después de su caracterización ambos fueron propuestos como nuevos medicamentos antiinflamatorios tras demostrarse un efecto inhibitor sobre la lipoxigenasa (Ikegami F. *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 1989, vol. 37, pp. 1932-1933).

65 En aplicación tópica sobre la piel, se encuentra un mismo beneficio antiinflamatorio a través de dos formulaciones, pomada y pasta, probadas, que contienen pulpa triturada de semillas de *Entada phaseoloides*. En efecto, han demostrado una eficacia por lo menos igual a la de un antiinflamatorio notorio no esteroideo, el diclofenaco (Dawane J.S., N. Am. J. Med. Sci., 2011, vol. 3, pp. 513-517). De manera idéntica en materia de cuidado cutáneo,

pero refiriéndose más específicamente solo a la entadamida A, se puede señalar asimismo la solicitud de patente EP 3103436 presentada por la solicitante, en la que el compuesto "(E)-N-(2-hidroxietil)-3-metilpropenamida", es decir, una réplica sintética de la entadamida A, muestra en los ensayos que ilustran la invención un amplio espectro de actividades protectoras frente a la radiación solar. La entadamida A se encuentra así lógicamente reivindicada en una composición cosmética o dermocosmética destinada a la fotoprotección. De nuevo para esta entadamida A, pero también para un "entadamida A-glucósido", un artículo muy reciente subraya su acción inhibitoria sobre la producción de melanina, parecida a la del compuesto de referencia en la materia, la arbutina (Sugimoto S. *et al.*, J. Nat. Med., 2018, vol. 72, pp. 12-19). Sus autores predicen incluso para el conjunto de los derivados de entadamida, teniendo en cuenta su estructura considerada poco similar a la de los actuales "cosmetic drugs" disponibles comercialmente, una prospectiva ventajosa con la conclusión siguiente: "*entadamides derivatives can be expected to be used as a new type of cosmetic*" (Sugimoto S. *et al.*, J. Nat. Med., 2018, vol. 72, pp. 12-19).

Reforzado por esas observaciones, y en respuesta a una demanda creciente para la integración de agentes activos de origen natural innovadores, seguros y eficaces en los productos cosméticos, el interés de la solicitante en los derivados de entadamida prosiguió después de su solicitud de patente anterior, pero nuevamente, esta vez, a través del diseño de un extracto vegetal procedente de semillas de *Entada* con el contenido óptimo de dichos metabolitos con fines cosméticos.

Para esta planta, un conocimiento limitante es que numerosos metabolitos acumulados en sus semillas existen en una forma esencialmente precursora, a veces menos activa biológicamente, con su conjugación con uno o varios glucósidos de configuración o de conformación específica (Kren V., Glycoscience, 2008, pp. 2589-2644). Se trata así de las β -D-glucopiranososa y β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranososa para la entadamida A (Xiong H. *et al.*, Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, vol. 45, pp. 624-626), de la β -D-glucopiranososa para el ácido homogentísico (Barua A.K., Phytochem., 1988, vol. 27, pp. 3259-3261), o también de la N-acetilglucosamina encontrada en las saponinas triterpénicas (Iwamoto Y. *et al.*, J. Nat. Med., 2012, vol. 66, pp. 321-328). Otra dificultad es la constatación de una entadamida A en forma glicosilada inestable en solución en el agua y que evoluciona desfavorablemente hacia la formación de subproductos de estructura mal definida y desprovistos por lo tanto de cualquier interés cosmético.

Por consiguiente, y teniendo en cuenta lo anterior, el problema técnico que se propone resolver la presente invención es desarrollar a escala industrial un procedimiento para la obtención de un extracto de semillas de *Entada* enriquecido en entadamida A, precisamente una entadamida A en forma libre o aglicona. Dicho procedimiento implicará por lo tanto una etapa de hidrólisis del glucósido precursor, y la búsqueda al final de un extracto utilizable directamente en cosmética, es decir, sin ninguna etapa de separación y por lo tanto, de purificación.

El problema a resolver en el diseño del extracto en cuestión se basa también en la necesidad de evitar la hidrólisis concomitante de otros constituyentes del extracto. Así, se debe evitar muy particularmente la presencia normalmente esperada de ácido homogentísico resultante de la hidrólisis simultánea de su precursor glucosilado, es decir, la faseoloidina, ya que es de conocimiento adquirido que este ácido-fenol, por otro lado irritante cutáneo y ocular según los criterios de la clasificación del reglamento europeo n° 1272/2008, se oxida fácilmente en quinonas que polimerizan y forman así pigmentos poco solubles en el agua y de color muy oscuro (Consdon R. *et al.*, Biochem J., 1951, vol. 50, pp. 274-278). Un extracto provisto de ácido homogentísico es, por lo tanto, inestable en el tiempo y tenderá a evolucionar espontáneamente hacia la formación de un precipitado coloreado, lo cual hace, por lo tanto, que dicho extracto sea incompatible con las limitaciones impuestas por la formulación cosmética. Otro escollo a evitar es finalmente la hidrólisis simultánea de las saponinas que estarán presentes en el extracto, ya que conducirá a la pérdida de las actividades biológicas que le son reconocidas, así como a la formación de compuestos triterpénicos aglicónicos poco solubles por ello en el agua, y, por lo tanto, susceptibles de nuevo a conducir a la aparición de un precipitado en el extracto.

Para alcanzar estos objetivos, la solicitante ha girado originalmente hacia unas técnicas de hidrólisis química, para constatar entonces que no era posible obtener la selectividad esperada presentada anteriormente. Se orientó entonces hacia unas técnicas de hidrólisis enzimática, conocidas por el experto en la materia por ser más selectivas (Wang J. *et al.*, African J. Biotech., 2011, vol. 10, pp. 14160-1466). La explotación de hidrolasas endógenas, en particular de glucosidasas, cuya presencia se señaló en algunas plantas de la familia de las Fabáceas, a la que pertenece la especie *Entada phaseoloides* (Sriputan T. *et al.*, 1998, Proceedings of the twenty-four congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Programme and abstracts, ISBN 974-86505-5-3, pp. 638-639), apareció como una oportunidad para resolver el problema técnico planteado por la invención. Por un lado, permite evitar la adición de enzimas hidrolíticas de origen exógeno que pueden ser, después, difíciles de eliminar del extracto final. Por otro lado, una reciente bibliografía ha hecho referencia específicamente a β -glucosidasas endógenas en varias plantas cultivadas por sus semillas, y en particular a su capacidad para convertir grandes cantidades de isoflavonas glucósidas en isoflavonas agluconas, y aumentar *in fine* la biodisponibilidad de estas para su utilización en alimentación (Fujita A. *et al.*, Appl. Biochem. Biotechnol., 2015, vol. 176, pp. 1659-1672).

Sobre esta base, la solicitante ha buscado aprovechar esta actividad enzimática endógena de las plantas con semillas, para conseguir una hidrólisis originalmente selectiva. Las hidrolasas de semillas de *Entada phaseoloides*, sin embargo, se mostraron, inicialmente, intrínsecamente poco selectivas. Sin embargo, en un segundo paso, y

este es el fundamento de la presente invención, la solicitante descubrió que un procedimiento secuencial de extracción permitía obtener, según un panel apropiado de condiciones operativas, una hidrólisis enzimática muy selectiva de los principales metabolitos glicoconjugados presentes en las semillas de *Entada phaseoloides*, con una selectividad objetivada por unas diferencias de cinética de hidrólisis dependientes de la naturaleza del sustrato.

En otras palabras, los inventores de la presente invención han puesto en evidencia que la hidrólisis de las formas β -D-glucopiranosidos de entadamida A y de la faseoloidina por una β -glucosidasa endógena podía, contrariamente a los prejuicios técnicos, no ser ya concomitante, con la realización de una etapa de activación y después de desactivación enzimática en unas condiciones controladas muy precisamente: disolvente, concentración, temperatura, pH y tiempo de hidrólisis. En particular, según estas condiciones controladas, los inventores de la presente invención han descubierto que la introducción de ciertos disolventes orgánicos en el medio de hidrólisis en una etapa precisa del procedimiento permitía detener rápidamente el proceso de hidrólisis enzimática inactivando, de manera irreversible, las glucosidasas endógenas. Jugando así sobre la sensibilidad respectiva de los metabolitos, ha sido posible limitar finalmente la hidrólisis solo a los glucósidos de la entadamida A.

Con respecto a un estado de la técnica susceptible de aproximarse a la solución del problema, la técnica anterior revela, en primer lugar, una bibliografía bastante abundante entorno a la Extracción Acuosa Enzimática denominada "EAE" (Muniglia L. *et al.*, Part of the "Green Chemistry and Sustainable Technology" book, 2014, pp. 167-204). Esta se propone, esencialmente, con fines de "química verde" y no se basa de ninguna manera, en el caso de un sustrato vegetal, en la hidrólisis selectiva *in situ*, es decir, en la extracción, de uno de los compuestos presentes en la planta. La presente invención se desmarca también del objeto de la solicitud internacional WO95/10530 y de su solicitud prioritaria, que se refiere a un procedimiento para producir un extracto vegetal enriquecido en isoflavonas agluconas a partir de una o varias enzimas beta-glucosidasa, de tal manera que una mayoría de las isoflavonas gluconas se convierta en isoflavonas agluconas. Contrariamente a la presente invención, no se hace referencia a una hidrólisis selectiva de una en particular de las isoflavonas gluconas presentes en la planta.

La presente invención tiene, por lo tanto, como primer objeto un procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A, que comprende las etapas siguientes:

- (i) una fase de activación de las enzimas endógenas, preferentemente de una β -glucosidasa, por dispersión, bajo agitación mecánica, de dichas semillas en una proporción másica semilla/agua de 0,02 a 2;
- (ii) una fase de hidrólisis enzimática de la dispersión obtenida en la etapa (i) por tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 25°C y 100°C, y durante un periodo comprendido entre 2 minutos y 12 horas, a un pH comprendido entre 4 y 8;
- (iii) una fase de inhibición de la actividad enzimática en la dispersión obtenida en la etapa (ii) por vía termoquímica, comprendiendo dicha fase sucesivamente las etapas siguientes:
 - a. la adición de un agente que inhibe irreversiblemente la actividad de las enzimas endógenas en una proporción volúmica agente inhibidor/agua comprendida entre 0,1 y 10;
 - b. un tratamiento térmico del medio de reacción obtenido en la etapa (iii/a) a una temperatura comprendida entre 25°C y 75°C y durante un tiempo comprendido entre 2 minutos y 12 horas;
 - c. una eliminación del agente inhibidor previsto en la etapa (iii/a) a presión reducida para la obtención de un filtrado acuoso enriquecido en entadamida A y que contiene una faseoloidina nativa no hidrolizada;
- (iv) la adición de un disolvente cosméticamente aceptable al filtrado acuoso obtenido en la etapa (iii/c), seguida de una etapa de ajuste del pH comprendido entre 3 y 7.

Por "extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A" tal como se obtiene al final de la etapa (iv), se debe entender, en primer lugar, un extracto que cumple por lo menos uno de los criterios siguientes:

- un extracto enriquecido en entadamida A en forma libre (aglucona) y que no contiene ya entadamida A glucona o que contiene solamente unas trazas de entadamida A glucona que no excedan un contenido másico de 0,2 mg/g (es decir 200 ppm);
- un extracto enriquecido en entadamida A, en particular por comparación con un extracto obtenido según una extracción tradicional de tipo hidroalcohólica que permite la recuperación de solamente unas cantidades muy bajas de metabolito aglucona;
- un extracto que comprende un contenido másico comprendido entre 1 y 5 mg/g de entadamida A, preferentemente un contenido comprendido entre aproximadamente 2 y 3 mg/g de entadamida A;

- un extracto que comprende un contenido másico comprendido entre 9 y aproximadamente 85 mg/g de faseolidina, preferentemente un contenido comprendido entre 30 y 60 mg/g de faseolidina;
- 5 - un extracto en el que la relación másica faseolidina/entadamida A está comprendida entre 15 y 25, preferentemente la relación másica es de 20;
- un extracto en el que la relación másica entadamida A glucona/entadamida A es inferior a 0,5, preferentemente inferior a 0,1;
- 10 - un extracto caracterizado por una proporción de conversión de la entadamida A glucona en entadamida A de por lo menos un 90%, preferentemente un 99%;
- un extracto que no se ha sometido a ninguna etapa de separación por cromatografía.

15 En particular, el extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A comprende un contenido másico comprendido entre 1 y 5 mg/g de entadamida A, un contenido másico comprendido entre 9 y 85 mg/g de faseolidina, y trazas de entadamida A glucona que no exceden un contenido másico de 0,2 mg/g.

20 En segundo lugar, se debe entender por "extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A" un extracto que cumple por lo menos uno de los criterios siguientes:

- un extracto que no contiene ácido homogentísico o que contiene solamente trazas de ácido homogentísico que no exceden un contenido máximo de algunas decenas de ppm, preferentemente de 50 ppm (es decir 0,05 mg/g);
- 25 - un extracto que comprende un contenido másico comprendido entre 3 y 40 mg/g de saponinas, preferentemente un contenido comprendido entre 10 y 20 mg/g de saponinas;
- un extracto que contiene una cantidad óptima de faseolidina con un rendimiento de extracción en faseolidina de por lo menos un 90%, preferentemente de un 100%.
- 30

Se entiende por "semillas del género *Entada*" según la invención, unas semillas enteras o peladas, germinadas o no germinadas, molidas o trituradas, y eventualmente reducidas al estado de polvo. Según un modo de realización preferido de la invención, estas semillas proceden de una o varias de las especies *Entada phaseoloides*, *Entada rheedei*, *Entada parvifolia*, *Entada pursaetha*, *Entada scandes*, *Entada gigas* y *Entada africana* con respecto a la similitud anunciada de sus fitoconstituyentes (Deepa C. *et al.*, Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol., 2017, vol. 4, pp. 92-99; Sugimoto S. *et al.*, J. Natur. Medecines, 2018, vol. 72, pp. 12-19; Abu Sufian Md. *et al.*, Int. Res. J. Pharm., 2015, vol. 6, pp. 411-414), de sus sinonimias o incluso de su calificación de "subespecie" (Ohashi H. *et al.*, Taiwan, 2010, vol. 55, pp. 43-53). Ventajosamente, se trata de semillas procedentes de las especies *Entada phaseoloides* o *Entada rheedei*. Muy particularmente, se trata de semillas procedentes de la especie *Entada phaseoloides*.

Según un modo de realización preferido de la invención, las semillas están peladas, molidas o trituradas, y eventualmente reducidas al estado de polvo.

Según un modo de realización preferido de la invención, la proporción másica semilla/agua de la etapa (i) está comprendida entre 0,1 y 1, preferentemente la proporción másica es de 0,2.

Según un modo de realización preferido de la invención, la temperatura en el tratamiento térmico de la etapa (ii) está comprendida entre 45 y 60°C, preferentemente la temperatura es de 55°C.

Según un modo de realización preferido de la invención, la duración del tratamiento térmico de la etapa (ii) está comprendida entre 10 minutos y 1 hora, preferentemente la duración es de 3 minutos.

Según un modo de realización preferido de la invención, el pH se ajusta entre 4 y 6 durante el tratamiento térmico de la etapa (ii).

Según un modo de realización preferido de la invención, el agente inhibidor de la actividad de las enzimas endógenas utilizado en la etapa (iii/a) es un disolvente orgánico miscible en agua, ventajosamente un agua glucosada o un alcohol seleccionado de entre el etanol, el metanol, el propanol y sus isómeros, el butanol y sus isómeros, el pentanol, el hexanol, y sus mezclas. Ventajosamente, se trata del etanol o del metanol. Muy particularmente, se trata del etanol.

Según un modo de realización preferido de la invención, la proporción volúmica agente inhibidor/agua de la etapa (iii/a) está comprendida entre 0,5 y 5, preferentemente la proporción volúmica es de 1.

Según un modo de realización preferido de la invención, la temperatura en el tratamiento térmico de la etapa (iii/b) está comprendida entre 45 y 60°C, preferentemente la temperatura es de 55°C.

5 Según un modo de realización preferido de la invención, la duración del tratamiento térmico de la etapa (iii/b) está comprendida entre 10 minutos y 1 hora, preferentemente la duración es de 30 minutos.

10 Según un modo de realización preferido de la invención, el disolvente cosméticamente aceptable utilizado en la etapa (iv) es un disolvente glicólico, seleccionado ventajosamente de entre el 1,3-propanodiol, el 1,2-propanodiol (propilenglicol), el metilpropanodiol, el fenoxipropanodiol, el 1,2-butanodiol (butilenglicol), el 1,3-butanodiol, el 1,4-butanodiol, el 2,3-butanodiol, el 1,2-hexanodiol, el 1,2-dihidroxietano (etilenglicol), el dietilenglicol, el dipropilenglicol, el trietilenglicol, el tripropilenglicol, el dietoxidiglicol, el pentilenglicol, hexilenglicol, el 1,2-octanodiol (caprililglicol), el glicerina (glicerol), y sus mezclas. Ventajosamente, se trata del 1,3-propanodiol, del 1,2-butanodiol o de la glicerina. Muy particularmente, se trata del 1,3-propanodiol.

15 Según un modo de realización preferido de la invención, el pH de ajuste de la etapa (iv) es de 4,5.

A título de ejemplo ilustrativo del primer objeto de la invención, un extracto de semillas de la especie *Entada phaseoloides* enriquecido en entadamida A se prepara según un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

20 (i) activación de la β -glucosidasa endógena de 10 g de semillas peladas y después trituradas de *Entada phaseoloides* mediante su puesta en suspensión bajo agitación mecánica en 50 g de agua;

25 (ii) hidrólisis enzimática de la suspensión a una temperatura de 55°C durante 30 minutos;

(iii) adición de 50 ml de etanol y medio de reacción llevado a una temperatura de 55°C durante 30 minutos más, seguida de una filtración para la obtención de un filtrado límpido;

30 (iv) 100 g de filtrado ("extracto bruto") obtenido en la etapa (iii) se adicionan con 7,3 g de 1,3-propanodiol, que, después de la concentración a presión reducida e introducción de 50 ml de agua, nueva concentración a presión reducida, adición de algunas gotas de HCl 6N y ajuste mediante 24,3 g de agua, proporcionan un extracto hidroglicólico denominado "extracto de semillas de *Entada*" en la formulación y pruebas 1 a 7 siguientes y que contienen, en estas condiciones:

- 35
- 2,5 mg/g de entadamida A;
 - 43 mg/g de faseoloidina;
 - 10 a 15 mg/g de saponinas;
 - una relación másica faseoloidina/entadamida A inferior a 20;
 - una relación másica entadamida A glucona/entadamida A inferior a 0,1;

40

 - una cantidad no detectable de ácido homogentísico, por lo menos inferior a 0,05 mg/g;
 - una cantidad no detectable de entadamida A glucona, por lo menos inferior a 0,05 mg/g.

45 La presente invención se refiere además a un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento tal como el definido anteriormente.

Otro objeto según la invención es un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención, para su utilización en cosmética o en dermocosmética ya que dicho extracto presenta un haz de respuestas ventajosas para la piel, ilustrado mediante las pruebas 1 a 7 siguientes:

- 50
- una capacidad para oponerse a la isomerización fotoinducida de un agente fotoprotector endógeno, el ácido *trans*-urocánico, por consiguiente, una capacidad para limitar los efectos inmunosupresores del componente ultravioleta B de la radiación solar (UV-B: λ 290-320 nm) [véase la prueba 1a siguiente]. A propósito de dicha actividad fotoinhibidora del extracto según la invención frente a la isomerización fotoinducida del ácido *trans*-urocánico en ácido *cis*-urocánico, se debe observar, y es otro aspecto importante de la invención, la contribución notable, desconocida hasta la fecha según le consta a la solicitante, de la faseoloidina no hidrolizada, superior como mínimo al 25% en dicha actividad fotoprotectora frente a la radiación UV-B [véase la prueba 1b siguiente];

55

 - una potente actividad antioxidante para dicho extracto, de interés en el plano cutáneo para oponerse a cualquier estrés oxidativo generador de radicales libres o especies reactivas derivadas del oxígeno (O_2^\bullet , H_2O_2 , OH^\bullet , etc.). Dicho efecto se observó cuando dicho extracto se evaluó en el marco de las pruebas con ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) [véase la prueba 2a siguiente] y con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) [véase la prueba 2b siguiente];

60
- 65

- una capacidad para limitar la sobreproducción fotoinducida de una proteína, la galectina-7; dicho efecto sobre este marcador proteico constituye otra indicación de la eficacia del extracto para oponerse eficazmente a la inmunosupresión inducida por los UV-B [véase la prueba 3 siguiente];
- 5 - una capacidad para limitar la liberación de mediadores proinflamatorios de citoquinas de tipo IL-8 y TNF-alfa inducidos por la radiación UV-B, marcadores designados para estudiar los efectos inflamatorios de los UV-B [véanse las pruebas 4 y 5 siguientes];
- 10 - una capacidad para luchar eficazmente contra otros componentes de la radiación solar, tales como la radiación ultravioleta-A (UV-A: λ 320-400 nm) o la radiación visible (VIS: λ 400-700 nm), en particular contra la luz azul (λ 380-470 nm) en la que dicho extracto, debido a sus propiedades antioxidantes, es capaz de oponerse a la sobreproducción de una metaloproteinasas matricial, la MMP-1, inducida por la luz azul y que degrada el colágeno [véase la prueba 6 siguiente];
- 15 - una capacidad para limitar, sobre explantes de piel humana en cultivo, los daños del ADN inducidos por la combinación de las radiaciones UV-B, UV-A y VIS, y expresados por la cantidad de dímeros de pirimidina ("CPD") [véase la prueba 7 siguiente];
- 20 - una capacidad para proteger la bacteria comensal *Staphylococcus epidermidis* de los daños inducidos por UVB [véase la prueba 8 más adelante].

Para una de las pruebas mencionadas anteriormente (prueba 2), se deben señalar los valores comparativos entre el extracto según la presente invención y una réplica sintética de la entadamida A contemplada en la solicitud de patente EP 3103436 presentada por la solicitante.

Según un modo de realización preferido de la invención, la utilización de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención se refiere a la prevención o a la lucha contra los efectos de la radiación solar nocivos para la piel, en particular contra la radiación ultravioleta-B (UV-B: λ 290-320 nm), ya sea para reforzar la eficacia de fórmulas fotoprotectoras aplicadas tópicamente o, más generalmente, para ralentizar el fotoenvejecimiento.

Según otro modo de realización preferido de la invención, y debido a las virtudes antioxidantes del extracto según la invención, la utilización de dicho extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención se refiere a la prevención o a la lucha contra los signos cutáneos resultantes de estreses tales como la contaminación atmosférica, el contacto con xenobióticos químicos o atmósferas con humo.

Otro modo de realización preferido de la invención se refiere a un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención para, y debido a sus virtudes antiinflamatorias, su utilización dermocosmética en el tratamiento del acné, de la seborrea, de la rosácea o de la dermatitis atópica.

Otro modo de realización preferido de la invención es su utilización cosmética en la conservación de la homeostasis del microbioma en la superficie de la piel, debido a las propiedades fotoprotectoras y antioxidantes mostradas por el extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención.

Finalmente, otro objeto de la invención se refiere a una composición, para utilización cosmética o dermocosmética, que comprende, a título de ingrediente activo principal, un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A tal como se ha definido anteriormente, en asociación con uno o varios adyuvantes fisiológicamente compatibles con la piel o los faneros.

La cantidad de extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A tal como se ha definido anteriormente en las composiciones mencionadas está comprendida entre el 1% y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición, preferentemente entre el 1,5% y el 5% en peso.

Las composiciones según la invención están adaptadas para una administración por vía tópica cutánea, se presentan en cualquier forma utilizada normalmente para dicha administración. A título indicativo y no limitativo, las composiciones pueden presentarse en forma de suspensiones, lociones, cremas, geles acuosos o hidroalcohólicos, polvos y emulsiones múltiples que pueden ser eventualmente unas microemulsiones o unas nanoemulsiones, etc.

Las composiciones según la invención pueden contener, como adyuvante fisiológicamente aceptable, por lo menos un adyuvante conocido por el experto en la materia y aceptable en los campos cosmético o dermocosmético, seleccionado de entre los aceites, las ceras, los elastómeros de silicona, los tensioactivos, los cotensioactivos, los espesantes y/o gelificantes, los humectantes, los emolientes, los filtros solares orgánicos o inorgánicos, los

fotoestabilizantes, los conservantes, los colorantes, los agentes matificantes, los agentes tensores, los secuestrantes, los perfumes, etc., y sus mezclas.

5 Las composiciones según la invención pueden comprender además uno o varios agentes activos adicionales, seleccionados, sin que esta lista sea limitativa, de entre los agentes desglucantes, los agentes que estimulan la síntesis de colágeno o de elastina o que previenen su degradación, los agentes que estimulan la síntesis de glicosaminoglicanos o de proteoglicanos o que previenen su degradación, los agentes que aumentan la proliferación celular, los agentes propigmentantes, los agentes antioxidantes o antirradicales o anticontaminación, los agentes hidratantes, los agentes drenantes o detoxificantes, los agentes antiinflamatorios, 10 los agentes descamantes, los agentes calmantes y/o antiirritantes, los agentes que actúan sobre la microcirculación (antiojeras), los agentes que refuerzan los sistemas de defensa cutánea, los agentes favorables para el refuerzo de la función de barrera, los agentes que estimulan el metabolismo celular: crecimiento celular, producción de biomoléculas útiles para la piel tales como el colágeno, los agentes que se oponen a los efectos nefastos del estrés psicológico, las chaperonas moleculares, los agentes que limitan los inconvenientes asociados a una sobreproducción de sebo, los agentes que se dirigen a determinadas patologías cutáneas tales como la dermatitis atópica, la rosácea, los trastornos de la cicatrización, y sus mezclas.

Muy particularmente, en las utilidades y las composiciones según la invención, el extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante el procedimiento según la invención es un extracto de semillas peladas y trituradas de *Entada phaseoloides*.

La presente invención se ilustra a continuación, a título puramente indicativo, mediante el ejemplo siguiente de formulaciones de composición según la invención que contiene un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido con la entadamida A citada anteriormente.

25 **Fórmula A (crema) - aplicación tópica: foto-envejecimiento (porcentajes máxicos)**

Extracto de semillas de <i>Entada phaseoloides</i>	2%
Poliisobuteno hidrogenado	7%
Miristato de isobutilo	3%
Palmitato de cetilo	7%
Monoestearato de etilenglicol	5%
Laurato de sorbitán	2%
Polisorbato 20	2%
Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida y aceite mineral)	0,3%
Fenoxietanol	0,5%
Agua	csp 100%

30 **Fórmula B (gel) - aplicación tópica: anticontaminación (porcentajes máxicos)**

Extracto de semillas de <i>Entada phaseoloides</i>	4%
Carbómero (copolímero de acrilato/acrilamida y aceite mineral)	1,5%
Benzoato de sodio	0,2%
Ácido sórbico	1%
1,3-butanodiol	10%
Glicerina	5%
Sosa	0,13%
Fenoxietanol	0,9%
Agua	csp 100%

La presente invención se ilustra también a continuación, a título puramente indicativo, mediante las pruebas siguientes mencionadas anteriormente en la descripción de la invención (pruebas 1 a 7).

35 Los experimentos de las pruebas 3 a 5 se llevaron a cabo todos sobre unas epidermis humanas reconstruidas el D17, denominadas "EHR" (proveedor: Skinethic®), cultivadas en medio de mantenimiento y después irradiadas a una dosis de 300 mJ/cm² (lámpara Waldmann®) en presencia o no del extracto de semillas de *Entada* según la invención. Tras 24h de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se realizaron entonces las dosificaciones proteicas según los protocolos siguientes.

40 **Prueba 1: Puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para oponerse a la isomerización fotoinducida del ácido *trans*-urocánico**

45 Se llevaron a cabo dos series de experimentos, la primera con una dosis fija en radiación UV-B de 300 mJ/cm² (prueba 1a), la segunda con una dosis variable en radiación UV-B (prueba 1b) y utilizando como control una réplica sintética de la entadamida A, es decir el compuesto "(E)-N-(2-hidroxiethyl)-3-metilpropenamida" objeto de la solicitud

de patente EP 3103436.

Experimentalmente, la prueba se realizó en un tampón de citrato 0,01 M de pH 5,5, estando el pH ligeramente ácido en relación más con la acidez de las capas cutáneas superficiales en las que está localizado el marcador ácido *trans*-urocánico. Así, las disoluciones a irradiar (20 ml), es decir, el control con o sin el extracto según la invención, se colocaron en unas cajas de Petri de vidrio, no cubiertas, y después se sometieron, a temperatura ambiente, a una irradiación UV-B con la ayuda de un horno de UV-B (LabOSI®). A continuación, se extrajeron unas alícuotas (500 µl) en unos viales HPLC para ser almacenadas inmediatamente lejos de la luz y a baja temperatura (+4/+8°C), antes del análisis por dosificación HPLC. Se obtuvieron así unos perfiles cromatográficos, y se evaluó la cantidad residual de ácido *trans*-urocánico.

Los resultados obtenidos en el marco de la prueba 1a se reúnen en la tabla siguiente:

Tabla 1a

Compuesto	% de ácido <i>trans</i> -urocánico (a 300 mJ/cm ²)	% de aumento de ácido <i>trans</i> -urocánico
Ácido <i>trans</i> -urocánico (control no irradiado)	100	N/A
Ácido <i>trans</i> -urocánico (control irradiado)	37	N/A
Control (irradiado) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 2%	53	+ 43%
Control (irradiado) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 3%	56	+ 51%
Control (irradiado) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 5%	64	+ 73%

Los resultados de la tabla 1a anterior subrayan que el extracto de semillas de *Entada* según la invención, desde la más baja de las concentraciones probadas, es eficaz en la prevención de la fotoisomerización del ácido *trans*-urocánico en ácido *cis*-urocánico.

Experimentalmente, con respecto a la prueba 1b, el estudio se realizó de manera casi idéntica a la prueba 1a anterior, con la verificación previa de que en las condiciones experimentales definidas, el ácido *trans*-urocánico generaba una cantidad significativa de ácido *cis*-urocánico que se puede medir mediante análisis HPLC.

La dosis de irradiación fue de 64 y de 128 mJ.cm⁻². Los resultados obtenidos en el marco de la prueba 1b se reúnen en la tabla 1b siguiente:

Tabla 1b

Compuesto	% de inhibición de la isomerización <i>trans</i> → <i>cis</i> del ácido urocánico	
	64 mJ/cm ²	128 mJ/cm ²
Control: entadamida A (1 mM)	34	40
Extracto de semillas de <i>Entada</i> (entadamida A (1 mM) + faseoloidina)	54	59

Los resultados de la tabla 1b anterior subrayan en primer lugar que el extracto de semillas de *Entada* según la invención es eficaz en la protección contra el ácido *trans*-urocánico frente a la irradiación UV-B, con capacidad para limitar su fotoisomerización. A continuación, estos mismos resultados ponen en evidencia la importante contribución de la faseoloidina en este poder fotoprotector del extracto.

Prueba 2: puesta en evidencia de la actividad antioxidante de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides*

Se llevaron a cabo dos series de experimentos, la primera con la prueba con ABTS o ácido 2,2-azonobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (prueba 2a), la segunda con la prueba con DPPH o 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (prueba 2b). Se utilizó el ácido ascórbico como antioxidante de referencia.

Experimentalmente según la prueba con ABTS, se obtuvo previamente una solución madre de sal de ABTS (sal de diamonio de ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) oxidado), mezclando volumen a volumen 7 mM de sal de diamonio de ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) con 2,45 Mm de persulfato de potasio durante 16 horas. Esta solución se diluyó después en agua para obtener, en las condiciones de la prueba, una absorbancia de 0,5 a 734 nm. En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos se colocaron 100 µl de una solución del extracto según la invención a evaluar y 150 µl de solución de ABTS oxidado. Después de 6 minutos, se midió la absorbancia a 734 nm.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 2a siguiente:

Tabla 2a

Compuesto	CE ₅₀
extracto de Entada	74 mg/l (es decir 9,6 μM equivalentes de faseoloidina)
faseoloidina	8,3 μM
ácido ascórbico	24 μM

5 Experimentalmente, según la prueba con DPPH, en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se colocaron 100 μ de una solución del agente activo a evaluar y 100 μl de una solución etanólica de 1,1-difenol-2-picrilhidrazilo (DPPH-Aldrich D913-2) a 200 μM. Después de 30 minutos, se midió la absorbancia a 517 nm.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 2b siguiente:

10

Tabla 2b

Compuesto	EC 50
extracto de Entada	0,84 mg/l (es decir 109 μM equivalentes de faseoloidina)
faseoloidina	540 μM
ácido ascórbico	25 μM

Los resultados de las tablas 2a y 2b subrayan que la faseoloidina es un potente antioxidante, similar al ácido ascórbico, y confiere al extracto una actividad explotable en el marco de una aplicación cosmética.

15

Prueba 3: puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para limitar la secreción de una proteína, la galectina-7

20 Experimentalmente, después de la irradiación y recogida de los sobrenadantes, se llevó a cabo la dosificación de la galectina-7, una proteína apoptótica, con la ayuda de un kit ELISA (human Galectine-7 R&D System DY13339, proveedor: Biotechne). Los anticuerpos de captura anti-galectina-7 se fijaron en primer lugar en el fondo de pocillos de una placa de 96 pocillos. Después, tras lavar y bloquear, se depositaron en los pocillos 100 μl de los diferentes sobrenadantes de cultivo de EHR recogidos. Las moléculas de galectina-7 presentes en las muestras se fijaron así específicamente a los anticuerpos de captura y las que no se fijaron se eliminaron durante un aclarado. A continuación, se añadió a los pocillos el anticuerpo secundario de detección (portador de sitios biotinilados). Después del lavado, se añadió estreptavidina-HRP, una proteína con alta afinidad por la biotina, que se llegó a fijar a los sitios biotinilados del anticuerpo secundario. Después de un último aclarado para eliminar el excedente de estreptavidina-HRP, se añadió el sustrato de la peroxidasa y se bloqueó la reacción con una solución que contenía ácido sulfúrico al cabo de veinte minutos. La intensidad colorimétrica se midió por espectrofotometría a 450 nm.

25

30

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 3 siguiente:

Tabla 3

35

Compuesto	% de galectina-7 segregada	% de inhibición de la secreción de galectina-7
Control (EHR no irradiados)	100	N/A
Control (EHR irradiados)	1084	N/A
Control (EHR irradiados) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 2,5%	301	-72%

Los resultados de la tabla 3 subrayan que bajo una dosis de radiación UV-B, el extracto de semillas de *Entada* según la invención es capaz de reducir en más de un 70% la cantidad de galectina-7 segregada por las epidermis humanas reconstruidas.

40

Prueba 4: puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para limitar la liberación de mediadores pro-inflamatorios de tipo IL-8

45 Experimentalmente, después de la irradiación y recogida de los sobrenadantes, se realizó la dosificación de la citoquina IL-8, sinónimo de un aumento de la inflamación bajo UV-B, gracias a un kit ELISA de tipo "Human CXCL8/IL-8 Immunoassay D8000C" (proveedor: Biotechne). Se utilizó una técnica idéntica a la dosificación de galectina-7.

ES 2 924 733 T3

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 4 siguiente:

Tabla 4

Compuesto	% de IL-8 segregada	% de inhibición de la secreción de IL-8
Control (EHR no irradiados)	100	N/A
Control (EHR irradiados)	1213	N/A
Control (EHR irradiados) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 1,5%	221	-80%

5 Los resultados de la tabla 4 subrayan que bajo una dosis de radiación UV-B, el extracto de semillas de *Entada* según la invención es capaz de reducir en gran medida la secreción de IL-8.

Prueba 5: puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para limitar la liberación de mediadores inflamatorios (TNF alfa)

10 Experimentalmente, después de la irradiación y recogida de los sobrenadantes, se realizó la dosificación de la citoquina TNF-alfa, una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel importante en las reacciones inmunitarias y que tiene un lugar preponderante en la inmunosupresión fotoinducida, gracias a un kit ELISA de tipo "Quantikine Human TNF-alpha Immunoassay DTA00C" (proveedor: Biotechne), y con la misma técnica de análisis que para la galectina-7 y la IL-8.

15 Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 5 siguiente:

Tabla 5

Compuesto	% de TNF alfa segregado	% de inhibición de la secreción de TNF alfa
Control (EHR no irradiados)	100	N/A
Control (EHR irradiados)	229	N/A
Control (EHR irradiados) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 1,5%	165	-28%

20 Los resultados de la tabla 5 subrayan que bajo una dosis de radiación UV-B, el extracto de semillas de *Entada* según la invención es capaz de disminuir la secreción de TNF alfa.

25 Prueba 6: puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para limitar la sobreexpresión de la metaloproteinasa MMP-1 inducida por la radiación azul

30 Se aislaron unos fibroblastos humanos primarios ("NHDF") a partir de una plastia mamaria procedente de una paciente de 17 años. Las NHDF se cultivaron en un medio DMEM adicionado con 4,5 g/l de glucosa y un 10% de SVF. Se mantuvieron en una atmósfera a 37°C y al 10% de CO₂. El D-3, los fibroblastos se inocularon en placas de 24 pocillos a razón de 15000 células/cm². El D-1, los NHDF se incubaron a 37°C y al 10% de CO₂ durante 24h con el extracto de semillas de *Entada* según la invención. El D0, se renovaron los tratamientos y las células se expusieron a una dosis de 30 J/cm² de luz azul (lámpara Waldmann®, con una bombilla fluocompacta LIGHTTECH LTC 36W/2G11 CL 380-470 nm). Después de la irradiación, las células se reincubaron a 37°C y al 10% de CO₂ durante 24h suplementarias y se recogieron los sobrenadantes del cultivo con el fin de realizar una dosificación ELISA de la metaloproteinasa MMP-1 (kit Abcam, ab100603). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a la cantidad de células por condición y se sometieron a un análisis estadístico por triplicado. Se utilizó la N-acetil-cisteína ("NAC") como antioxidante de referencia.

40 Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 6 siguiente:

Tabla 6

Compuesto	% de MMP-1 segregada	% de inhibición de la secreción de MMP-1
Control (NHDF no irradiados)	100	N/A
Control (NHDF irradiados)	214	N/A
Control (NHDF irradiados) + N-acetil-L-cisteína (NAC) 5mM	61	-71%
Control (NHDF irradiados) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 0,05%	46	-79%

45 Los resultados de la tabla 6 subrayan una eficacia del extracto de semillas de *Entada* según la invención comparable a la de la N-acetil-cisteína.

Prueba 7: puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para limitar, sobre explantes de piel humana en cultivo, los daños del ADN inducidos por la combinación de las radiaciones UV-B, UV-A y VIS

5 La puesta en evidencia se evaluó con la ayuda de la técnica de inmunomarcaje *in situ* sobre explantes de piel humana en cultivo (piel humana procedente de un cuero cabelludo de la zona temporal de mujeres de tipo caucásico de 42 y 56 años de edad), después de la realización con escalpelo de cuadrados de piel de aproximadamente 1 cm². El cultivo de los explantes consistió en colocarlos en un medio de crecimiento "DMEM" que contenía 4,5 g/l de glucosa, suplementado con antibióticos (penicilina-estreptomina-anfotericina) y tratado tópicamente con el extracto de semillas de *Entada* según la invención a la concentración del 2,5%, y durante 48 horas a 37°C y al 5% de CO₂.

10 Después de la aplicación del extracto, los explantes se irradiaron en un simulador solar (SUNTEST CPS+). Después de la irradiación, el tratamiento se renovó inmediatamente y los explantes se pusieron en cultivo durante 24 horas. Al final del tiempo de cultivo, los explantes se congelaron, y después se obtuvieron unos cortes transversales de cada explante de 5 µm de grosor con la ayuda de un criotomo. Se realizó un inmunomarcaje de los dímeros de pirimidina ("CPD") con la ayuda de anticuerpos específicos. Se observó entonces cada corte o sección de piel con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia, con la toma de tres fotografías con un aumento de x20 para cada sección, y después se realizó una medición de la cantidad global de fluorescencia del marcaje con la ayuda de un software de análisis de imagen. Los resultados de cada condición se compararon con la condición de control.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 7 siguiente:

25 Tabla 7

Compuesto	Cantidad global de fluorescencia (UA)	% de disminución de CPD
Control (explantes no irradiados)	921116	N/A
Control (explantes irradiados)	4987094	N/A
Control (explantes irradiados) + extracto de semillas de <i>Entada</i> al 2,5%	1915520	-61%

Los resultados de la tabla 7 subrayan que bajo una dosis de radiación solar, el extracto de semillas de *Entada* según la invención es capaz de limitar notablemente la formación de dímeros de pirimidina (CPD) inducidos por la radiación solar.

Prueba 8: prueba de protección de la microbiota cutánea con una puesta en evidencia de la capacidad de un extracto de semillas de *Entada phaseoloides* para proteger la bacteria comensal *Staphylococcus epidermidis* de los daños UVB-inducidos

35 Experimentalmente, los ensayos se realizaron *in tubo*. La cepa bacteriana *Staphylococcus epidermidis* (Alliance bioexpertise ATCC 12228) se sometió a una irradiación UV-B de 100, 150 y 300 mJ/cm² (lámpara Waldmann, irradiancia 0,73mW/cm²), en presencia o no del extracto de interés al 1%, 1,5% y 2,5%.

40 Se depositaron después 100 µl de suspensión sobre gelosa TSA (Biomérieux, ref. 43011) y después se incubaron a 37°C en condiciones de cultivo aerobias. 24 horas después se efectuó un recuento por recuento manual de colonias bacterianas. Los resultados se expresan en porcentaje de UFC (Unidades que Forman Colonias) con respecto al control no irradiado, representativos de la viabilidad bacteriana.

45 Los resultados se presentan en la tabla 8 siguiente:

Tabla 8

Compuesto	% de CFU (viabilidad bacteriana)		
	No irradiado	100mJ/cm ²	150mJ/cm ²
<i>S. epidermidis</i> no tratado	100	77	49
<i>S. epidermidis</i> + extracto de <i>Entada</i> al 1%	99	89 (+16%)	73 (+49%)
<i>S. epidermidis</i> + extracto de <i>Entada</i> al 1,5%	98	95 (+23%)	89 (+82%)
<i>S. epidermidis</i> + extracto de <i>Entada</i> al 2,5%	97	97 (+26%)	94 (+92%)

50 Los resultados de la tabla 8 subrayan que bajo radiación UV-B, el extracto de semillas de *Entada* según la invención es capaz de proteger de la muerte celular a la bacteria principal que compone el microbioma cutáneo, *Staphylococcus epidermidis*.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A, que comprende las etapas siguientes:
- 5
- (i) una fase de activación de las enzimas endógenas, preferentemente de una β -glucosidasa, por dispersión, bajo agitación mecánica, de dichas semillas en una proporción másica semilla/agua de 0,02 a 2;
 - 10 (ii) una fase de hidrólisis enzimática de la dispersión obtenida en la etapa (i) por tratamiento térmico a una temperatura comprendida entre 25°C y 100°C, y durante un periodo comprendido entre 2 minutos y 12 horas, a un pH comprendido entre 4 y 8;
 - 15 (iii) una fase de inhibición de la actividad enzimática en la dispersión obtenida en la etapa (ii) por vía termoquímica, comprendiendo dicha fase sucesivamente las etapas siguientes:
 - a. la adición de un agente que inhibe irreversiblemente la actividad de las enzimas endógenas en una proporción volúmica agente inhibidor/agua comprendida entre 0,1 y 10;
 - 20 b. un tratamiento térmico del medio de reacción obtenido en la etapa (iii/a) a una temperatura comprendida entre 25°C y 75°C y durante un tiempo comprendido entre 2 minutos y 12 horas;
 - c. una eliminación del agente inhibidor previsto en la etapa (iii/a) a presión reducida para la obtención de un filtrado acuoso, enriquecido en entadamida A, y que contiene una faseolidina nativa no hidrolizada;
 - 25 (iv) la adición de un disolvente cosméticamente aceptable al filtrado acuoso obtenido en la etapa (iii/c), seguida de una etapa de ajuste del pH comprendido entre 3 y 7.
2. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según la reivindicación 1, en el que las semillas proceden de una o varias de las especies *Entada phaseoloides*, *Entada rheedei*, *Entada parvifolia*, *Entada pursaetha*, *Entada scandes*, *Entada gigas* y *Entada africana*.
3. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las semillas proceden de la especie *Entada phaseoloides*.
- 35 4. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho extracto comprende, al final de dicha etapa (iv), un contenido másico comprendido entre 1 y 5 mg/g de entadamida A, un contenido másico comprendido entre 9 y 85 mg/g de faseolidina, y trazas de entadamida A glucona que no exceden un contenido másico de 0,2 mg/g.
- 40 5. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la relación másica faseolidina/entadamida A está comprendida entre 15 y 25, y la relación másica entadamida A glucona/entadamida A es inferior a 0,5.
- 45 6. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente inhibidor de la actividad de las enzimas endógenas de la etapa (iii/a) es un disolvente orgánico miscible en agua, ventajosamente un agua glucosada o un alcohol seleccionado de entre el etanol, el metanol, el propanol y sus isómeros, el butanol y sus isómeros, el pentanol, el hexanol, y sus mezclas.
- 50 7. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según la reivindicación 6, en el que dicho agente es el etanol.
- 55 8. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el disolvente cosméticamente aceptable utilizado en la etapa (iv) es un disolvente glicólico, ventajosamente seleccionado de entre el 1,3-propanodiol, el 1,2-propanodiol, el metilpropanodiol, el fenoxipropanodiol, el 1,2-butanodiol, el 1,3-butanodiol, el 1,4-butanodiol, el 2,3-butanodiol, el 1,2-hexanodiol, el 1,2-dihidroxietano, el dietilenglicol, el dipropilenglicol, el trietilenglicol, el tripropilenglicol, el dietoxidiglicol, el pentilenglicol, el hexilenglicol, el 1,2-octanodiol, la glicerina, y sus mezclas.
- 60 9. Procedimiento de producción de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según la reivindicación 8, en el que dicho disolvente es el 1,3-propanodiol.
- 65 10. Extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A susceptible de ser obtenido mediante la realización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según la reivindicación 10, que

comprende un contenido másico comprendido entre 1 y 5 mg/g de entadamida A, un contenido másico comprendido entre 9 y 85 mg/g de faseoloidina, y trazas de entadamida A glucona que no exceden un contenido másico de 0,2 mg/g.

- 5 12. Extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para su utilización para la prevención o la lucha contra los efectos de la radiación solar nocivos para la piel, en particular contra la radiación ultravioleta-B.
- 10 13. Extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para su utilización para la prevención o la lucha contra los signos cutáneos resultantes de la contaminación atmosférica, del contacto con xenobióticos químicos o atmósferas con humo.
- 15 14. Utilización cosmética no terapéutica de un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, como agente útil para el mantenimiento de la homeostasis del microbioma presente en la superficie de la piel.
- 20 15. Extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para su utilización dermocosmética en el tratamiento del acné, de la seborrea, de la rosácea o de la dermatitis atópica.
- 25 16. Composición, de uso cosmético o dermocosmético, que comprende, a título de ingrediente activo principal, un extracto de semillas del género *Entada* enriquecido en entadamida A según una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en asociación con uno o varios adyuvantes fisiológicamente compatibles con la piel o los faneros, y en la que la cantidad de dicho extracto está comprendida entre el 1% y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición.