

Tengeri állat-eredetű és növényi extraktumok kombinációját tartalmazó készítmények

KIVONAT

A találmány tárgya készítmény, amely a következőket tartalmazza:

i) porcogó extraktum enzimatis proteolitikus hasítással előállítva vagy a porcogóból enzimatis proteolitikus hasítással extrahálható vegyületek szintetikus formája;

ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns, amely hidrofil antioxidáns szőlőmagból extrahálható vagy a szőlőmagból extrahálható antioxidáns szintetikus formája; és

iii) egy vagy több lipofil antioxidáns, amelyben az antioxidánsok egyike likopén és amely lipofil antioxidáns természetes forrásokból extrahálható vagy természetes forrásokból extrahálható lipofil antioxidánsok szintetikus formája.

A találmány szerinti készítmények orális adagolásával csökkenthetők a bőröregedésével és a kollagén szintézis csökkenésével összefüggő különböző bőr tünetek.

A találmány tárgyát képezik a cím szerinti készítményeket alkalmazó kozmetikai és profilaktikus eljárások is.

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

Tengeri állat-eredetű és növényi extraktumok kombinációját tartalmazó készítmények

A találmány orális adagolásra alkalmas készítményekre vonatkozik, amelyek porcot vagy porcból extrahálható vegyületeket és hidrofíl és lipofíl antioxidánsokat tartalmaznak.

A szervezetünkben, így például a bőrön UV sugárzás, környezetszennyezés, alkohol, stb. hatására szabad gyökök képződnek. A túl sok szabad gyök komoly károsodást vált ki a szövetek szerkezetében, beleértve a bőr szerkezetet és így azon az öregedés jelei kezdenek megjelenni.

Ezért mind hidrofíl, mind lipofíl mind ezek kombinációját tartalmazó antioxidánsokat alkalmaznak a szabad gyökök bőrön kifejtett oxidatív stressz hatásainak csökkentésére (Maffei Facino és mtsai, Free Radical Scavenging and Anti-enzyme Activities of Procyanidines from Vitis vinifera, Arzneim. - Forsch./Drug Res., 44(1), Nr. 5 (1994), 592-601).

Az US 5 648 277 számú szabadalmi leírásban mind hidrofíl, mind lipofíl antioxidánsokat tartalmazó orális adagolású készítményeket ismertetnek.

A JP 09 241637 számú szabadalmi leírásban készítményeket ismertetnek, amelyek hatásos szabad gyök megkötőt és uronsavakat vagy mükopoliszacharidokat tartalmaznak.

Megállapították azt is, hogy a tengeri porc eredetű mükopoliszacharidokat tartalmazó protein komplexek adagolásával lehetőség van a bőr dermis textúrájának javítására, miáltal az sokkal sűrűbbé és finomabbá válik (Kieffer ME, Efsen J., J. Eur. Dermatol. Venereol., 1998. szeptember, 11(2):129-136).

A jelen találmány feltalálói felismerték, hogy egy porc extraktum és egy növényi extraktum speciális keverékének kombinációja meglepő módon növeli a bőrben a kollagén szintézist és észrevehető mértékben csökkenti a gyökök által közvetített oxidációt a dermis-en belül. A kollagén szintézis csökkenése, valamint a gyökös oxidáció egyaránt összefüggésben van a bőröregedési folyamatával.

Ezek alapján a találmányunk orális adagolású készítményekre vonatkozik, amelyek növényi extraktumot és porc extraktumot tartalmaznak, amely növényi extraktum szőlőmag extraktumot és paradicsom extraktumot tartalmaz.

A találmány közelebbről olyan orális adagolású készítményre vonatkozik, amely növényi extraktumot és porc extraktumot tartalmaz, ahol a növényi extraktum szőlőmag extraktum és likopént tartalmaz kb. 5:1 és 15:1 közötti, előnyösen kb. 10:1 tömegarányban.

A találmány vonatkozik továbbá olyan orális adagolású készítményre, amely a következőket tartalmazza: i) porc(ogó), egy vagy több ebből extrahálható vegyület vagy ezek származékai, ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns és iii) egy vagy több lipofil antioxidáns, amely készítmény a kollagén szintézis legalább 35%-os növelésére képes sejtmódelben.

A fentiek szerinti készítmény alkalmas az egészséges bőr általános fenntartására, az UV hatására bekövetkező bőr degenerálódás és öregedés kialakulásának késleltetésére, a bőrön az öregedés jeleinek kezelésére.

A találmány értelmében a "hidrofil" kifejezés a hidrofil antioxidánsokkal kapcsolatban azt jelenti, hogy az antioxidáns elegendően oldódik a test vizes közegében és ily módon képes abban hatni. A találmány értelmében egy antioxidánst hidrofilnek tekintünk, ha annak oldhatósága 0,05 g/100 g érték feletti érték. A hidrofil antioxidáns oldhatósága vízben előnyösen 0,5 g, még előnyösebben 1 g, különösen előnyösen 5 g, még előnyösebben 10 g, még különösebben előnyösen 25 g, különösen 50 g feletti, így például 100 g feletti 100 g vízben.

Hasonlóképpen, a találmány értelmében a lipofil antioxidáns általában azt jelenti, hogy az antioxidáns elegendően oldódik a szervezet zsírjaiban és így képes abban hatást kifejteni. Ez azt is jelenti, hogy vízben való oldhatósága kicsi. A találmány értelmében egy antioxidánst lipofilnek tekintünk, ha annak oldhatósága vízben 0,05 g/100 g érték alatti. A lipofil antioxidáns oldhatósága vízben előnyösen 0,005 g alatti, különösen előnyösen 0,0005 g feletti 100 g érték vízben.

A "porc extraktum" kifejezés magában foglalja a porcogót, az ebből extrahálható komponenseket és ezek származékait, beleértve a porcogóból extrahálható vegyületek szintetikus formáit és a szintetikusan előállított származékokat. A "porc (porcogó) extraktum" kifejezés vonatkozhat olyan vegyületekre is, amelyek kötőszöveteket tartalmazó más szövetekben vannak jelen, például a bőrön vagy nyers bőrön és ezekből extrahál-

hatók. A porcogó származhat például a következőkből: tengeri állatok porcogója, hal porcogó, puhatestűek porcogója, valamint szárazföldi emlősök porcogója. A tengeri állat lehet például valamely következő: bálna, delfin vagy fóka; a hal lehet például cápa, lazac, tonhal, tőkehal vagy más ismert hal; a puhatestű lehet például tintahal; a szárazföldi emlős állat lehet például szarvasmarha, sertés, csirke, kacska vagy pulyka. A porcogó vagy ebből nyert extraktum lehet például előnyösen szarvasmarha porcogó, sertés porcogó, cápa porcogó, tintahal porcogó, csirke porcogó vagy lazac porcogó vagy ezekből származó extraktumok.

A porcogót önmagában is alkalmazhatjuk. Előnyösen szárított, például liofilizált aprított porcogót alkalmazunk. A fenti típusú porcogók vagy más szövetek alkalmas extraktumait, amelyek a megfelelő komponenseket tartalmazzák, például a főzött szövetek részleges enzimatis proteolitikus hidrolízisével, majd a hidrolizátum ezt követő szűrésével és szárításával, például porlasztva szárításával vagy liofilizálásával állítjuk elő. Az ilyen extraktumok előnye, hogy részlegesen vagy teljesen oldhatók vizes közegben (előállítás például az US 3 862 003 számú szabadalmi leírás szerint).

A porcogó extraktum tipikusan tartalmaz egy vagy több, a porcogóból extrahálható vegyületet és előnyösen tartalmaz glükózaminoglükánokat, adott esetben peptidekhez kapcsolva. A porcogó extraktum előnyösen kontroitin-szulfátot, keratán-szulfátot, hialuronsavat vagy dermatán-szulfátot vagy ezek keverékét tartalmazza. A "porcogó extraktum" kifejezés vonatkozik a porcogóból származó vegyületekre, de magába foglal

olyan vegyületek is, amelyeket adott esetben más forrásból nyernek. Különösen előnyös porcogó extraktum forrás a cápa porcogó.

A "porcogó extraktum" kifejezés vonatkozik a porcogóból vagy ezek származékaiból extrahálható vegyületekre. Mint már említettük, a porcogó extraktum származhat más természetes forrásból, de lehet szintetikusan előállított is, azaz szintetikusan vagy szemi-szintetikusan előállított. Előnyösen a porcogó extraktumot természetes forrásból nyerjük, az extraktum különösen porcogóból extrahálható extraktum.

Mint már említettük, a találmány orális adagolású készítményre vonatkozik, amely növényi extraktumot és porcogó extraktumot tartalmaz, ahol a növényi extraktum szőlőmag extraktum és paradicsom extraktum és ezek tömegaránya 2:1 és 1:2 közötti érték, előnyösen 1:1.

Azt találtuk, hogy a porcogó extraktum és egy speciális összetételű növényi extraktum meglepő hatású a bőr kollagén szintézisének növelésében, valamint az UV sugárzás hatására bekövetkező oxidatív stressz hatások, így például gyökös oxidáció jelentős csökkentésére, amely oxidáció degeneratív hatású a dermisben.

A szőlőmag extraktum és paradicsommag extraktum kombinációjának előnyös hatása antioxidáns szerként nem várt módon rendkívüli módon növelhető a porcogó extraktum adagolásával. Ez az eredmény azért is meglepő, mivel a porcogó extraktum önmagában nem rendelkezik antioxidáns hatással.

Általában a porcogó extraktum és növényi extraktum tömegaránya 1:2 és 2:1 közötti érték, előnyösen 1:1.



A porcogó extraktum előnyösen valamely következő glükózaminoglikánt tartalmaz: kondroitin-észter, keratán-észter, hialuronsav vagy ennek észtere, dermatán-észter, heparin vagy heparán-észter. Ezek proteinhez vagy peptidhez is kötve lehetnek, vagy a kondroitin-észter, keratán-észter, hialuronsav vagy annak észtere, dermatán-észter, heparin, heparán-észter, előnyösen kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, hialuronsav vagy annak észtere, dermatán-szulfát, heparin vagy heparán-szulfát epimer vagy polimer formái.

A glükózaminoglikánok lehetnek kondroitin-4-szulfát, kondroitin-6-szulfát vagy keratán-szulfát, adott esetben mind-egyik peptidhez kötve. Különösen előnyösen a találmány szerinti készítményekben alkalmazott porcogó extraktum kondroitin-szulfátot tartalmaz adott esetben peptidhez kötve.

A találmány egy előnyös kiviteli formájánál a porcogó extraktum 5-100 tömeg% kondroitin-szulfátot tartalmaz.

Egy előnyös kiviteli formánál a találmány szerinti készítmény kevesebb, mint 1 tömeg% kollagént, még előnyösebben kevesebb, mint 0,5%, különösen előnyösen kevesebb, mint 0,1% kollagén proteint tartalmaz. Tipikusan olyan készítményt készítünk, amely nem tartalmaz kollagént észrevehető mennyiségben. Az extraktumot előnyösen enzimatis proteolitikus hidrolízissel nyerjük és így a kollagén proteineket peptidekké emésztjük. Az ilyen alacsony kollagén tartalmú készítmények mutatják a nem várt előnyös hatásokat. Ennek következtében kollagént vagy kollagén forrást előnyösen pluszban nem adagolunk a találmány szerinti készítményhez. Egy különösen elő-



nyős kiviteli formánál a készítmény lényegében kollagén mentes.

A találmány szerinti készítmények általában kevesebb, mint 0,025% béta-karotint, előnyösen kevesebb, mint 0,02% béta-karotint, különösen kevesebb, mint 0,01% béta-karotint tartalmaznak. Ily módon a találmány további szempontja olyan készítményre vonatkozik, amely a fentiek szerinti előnyös hatást igen kevés vagy lényegében béta-karotin nélkül biztosítja.

Ugyanakkor, a jelen felfogásunk szerint a likopén tartalom, relatíve vagy abszolúte, különösen fontos a találmány szerinti készítmény nem várt előnyös hatásainak eléréséhez. A növényi extraktum, különösen a paradicsom extraktum, likopént tartalmaz. Előnyösen a paradicsom extraktum 5-12%, tipikusan kb. 10 tömeg% likopént tartalmaz. A paradicsom extraktum származhat egyetlen vagy több paradicsom keverékéből egyaránt.

Egy előnyös kiviteli formánál a paradicsom extraktumot a *Lycopersicum aesculentum* fajtából nyerjük és így biztosítjuk a likopén abszolút és relatív mennyiségét.

Az előnyös kiviteli formánál a találmány szerinti készítményt 0,1-5 tömeg% likopént, előnyösen 0,2-4 tömeg% likopént, így például 0,3-2 tömeg% likopént, különösen előnyösen 0,3-1 tömeg% likopént, így 0,3-0,8 tömeg%, még inkább 0,3-0,6 tömeg% likopént tartalmaz.

A találmány szerinti készítmény egy másik definíció szerint növényi extraktumot és porcogó extraktumot tartalmaz, ahol a növényi extraktum szőlőmag extraktum és likopén, és ezek tömegaránya 5:1 és 15:1 közötti érték, előnyösen 10:1 kö-

rüli érték. Mint már említettük, a likopén ilyen arányban a jelen felfogásunk szerint igen fontos szerepet játszik a meglepően előnyös antioxidáns hatás biztosításában.

Egy előnyös kiviteli formánál a lipofil antioxidáns aktivitása (IC_{50}) kisebb, mint $1,2 \times 10^{-7}$ az R^+/ROO^+ csoportok megkötésére vizes közegben a telítetlen foszfolipid lipid peroxidációjánál. Általában ez a legfeljebb $1,2 \times 10^{-7}$ IC_{50} érték vizes közegben a likopén karotenoid vegyületre jellemző (ez ψ, ψ -karoténnek is nevezik). A likopént általában bizonyos friss gyümölcsök, így paradicsom, görögdinnye, vörös grapefruit vagy guajáva gyümölcs extrakciójával nyerik ismert módon vagy szintetikus úton állítják elő szintén ismert módon.

A találmány szerinti orális adagolású készítmények előnyös hatása a három komponens új kombinációjának eredménye: porcogó extraktum, szőlőmag extraktum és paradicsom extraktum. A szőlőmag extraktum biztosítja a hidrofil antioxidánsokat. A paradicsom extraktum biztosítja a lipofil antioxidánsokat. Így a találmány antioxidánsok és porcogóból extrahálható vegyületek új kombinációjára vonatkozik. A találmány vonatkozik továbbá a készítmények orális adagolására, amely készítmények a következőket tartalmazzák: i) porcogó, egy vagy több ebből extrahálható vegyület vagy ezek származéka, ii) egy vagy több hidrofil anitoxidáns, és iii) egy vagy több lipofil antioxidáns; és amely készítmény a kollagén szintézist legalább 35%-kal növeli az A vizsgálati módszer szerint meghatározva.

A kollagén szintézis jelentős mértékben csökken az öregező bőrsejtekben. A kollagén csökkenése a bőr textúrájának és

rheológiai jellemzőinek megváltozását eredményezi és tipikus tünetei az öregedésnek a ráncok, csökkent simaság és a rugalmasság és a tömörség elvesztése.

Mint az a 2. példából kitűnik, a találmány szerinti készítmény meglepő módon jelentős mértékben növeli a kollagén szintézist összehasonlítva más kombinációkkal és az egyedi komponensekkel. A kollagén szintézist a radioaktív prolin ($[^{14}\text{C}]$ -prolin) prolintartalmú proteinekbe való beépülésének mérésével vizsgáltuk, ez a protein tekinthető elsődlegesen kollagénnek és benne az össz aminosavak 30%-a prolin.

Dermális fibroblasztok tápközegben való tenyésztésénél, amely közeg szőlőmag extraktum (G) és paradicsom extraktum (T) kombinációját (GT) tartalmazza (US 5 648 277), a prolin beépülés csökkenése tapasztalható, 3,6%, illetve 4,8% a kontroll esetén, ez 25%-os csökkenést jelent. A hal extraktum (F) és paradicsom extraktum (T) kombinációjának (FT) jelenlétében nincs szignifikáns változás a prolin beépülésben, mivel a beépülés mértéke 5%, illetve 4,8% a kontrollnál, ez csupán 4% növekedést jelent. A hal extraktum (F) és szőlő extraktum (G) kombinációját (FG) tartalmazó sejtkultúrában egy kis mértékű növekedés tapasztalható a prolin beépülésére: 5,5% beépülés, ez 10%-os növekedést jelent a kontrollhoz viszonyítva. A csak hal extraktumot (F) tartalmazó sejtkultúrában a prolin beépülés növekedésének mértéke 6,2%, ez 29% növekedést jelent.

Azonban, a találmány szerinti kombinációt tartalmazó készítménynél, amely hal extraktumot (F), szőlőmag extraktumot (G) és paradicsom extraktumot (T) tartalmaz (FGT) igen jelentős, 80%-os növekedés tapasztalható a prolin beépülésére

(8,4% prolin épül be). Figyelembe véve, hogy a GT extraktumnál a kollagén szintézis 25%-kal csökken és a F extraktum 29%-os növekedést eredményez a kollagén szintézisben, az F és GT kombinációjával tapasztalható 80%-os növekedés igen meglepő eredmény.

A találmány szerinti készítményben az egy vagy több hidrofíl antioxidáns lehet természetes vagy szintetikus eredetű, előnyösen természetes eredetű. Egy jellemző kiviteli formánál a természetes forrás fenyőkéreg, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Aesculus hippocastanum*, *Gingo Biloba*, *Cardus marianum*, *Vaccinium myrtillus*, *Silibum marianum*.

Egy előnyös kiviteli formánál az egy vagy több hidrofíl antioxidáns *Vitis vinifera* szőlőmagjából extrahálható anyag. Az egy vagy több hidrofíl antioxidáns természetes forrása max. 25 tömeg% katechint, epikatechint és galluszsavat; max. 90 tömeg% epikatechin dimert, trimert és/vagy tetramert és/vagy gallátot; és max 10 tömeg% epikatechin pentamert, hexamert és/vagy hetamert és/vagy gallátot tartalmaz.

Az egy vagy több hidrofíl antioxidáns lehet valamely következő anyag: polifenolok észterei, aszkorbinsav (C-vitamin és észterei) és ezek gyógyszerészetileg elfogadható sói. A polifenolok tipikusan katechinek; leukoantocianidinek és flavanonok; flavaninek, flavonok és antocianinek; flavonolok; flavonolignánok és ezek oligomerjei.

Egy előnyös kiviteli formánál a hidrofíl antioxidáns katechin, amely lehet proantocianin A2 és oligomer procianidol (OPC), különösen előnyösen oligomer procianidol.

A flavonolignánok előnyösen szilimarín vagy ennek egy vagy több komponense, így szilibin, szilidianin, szilikrisztin és izoszilibin.

A találmány szerinti készítményben a hidrofíl antioxidáns IC_{50} aktivitása legfeljebb 5×10^{-7} az $R^\bullet/ROO^\bullet$ gyökök megkötésére vizes közegben a telítetlen foszfolipid lipid peroxidációjánál.

Mint már említettük, különösen előnyös hidrofíl antioxidáns a szőlőmag, különösen *Vitis vinifera* extraktuma, ezt úgy nyerjük, hogy a szőlőmagokat szerves oldószerrel extraháljuk, ez lehet például aceton és/vagy etil-acetát vagy más hasonló vegyület, majd az oldószert elpárologtatjuk, a visszamaradó anyagot vízben oldjuk, szűrjük, a szűrletet szárítjuk például porlasztva szárítással vagy liofilizációval. Egy különösen előnyös kiviteli formánál ez az extraktum max. 25 tömeg% katechint, epikatechint és galluszsavat, max. 90 tömeg% epikatechin dimert, trimert és/vagy tetramert és/vagy gallátot és max. 10 tömeg% epikatechin pentamert, hexamert és/vagy heptamert és/vagy gallátot tartalmaz.

Az egy vagy több lipofil antioxidáns lehet természetes vagy szintetikus eredetű, előnyösen természetes eredetű. A lipofil antioxidáns lehet antioxidánsok keveréke is, így például egy természetes forrás extraktuma, amely lipofil antioxidánsok komplex keverékét tartalmazza. Alkalmas természet forrás a lipofil antioxidánshoz a paradicsom fajok, különösen a *Lycopersicum esculentum*.

Az egy vagy több lipofil antioxidáns tipikusan valamely karotenoid, prokarotenoid, tokoferol, fitoszterol vagy ubikinon.

A karotenoidok különösen értéke lipofil antioxidánsok, ezek lehetnek például a következők: α -karotin, β -karotin, γ -karotin, δ -karotin, likopén (ψ, ψ -karotin), zeaxantin, kriptoxantin, lutein vagy xantofil.

Mint már említettük, a karotenoid likopén különösen előnyös lipofil antioxidáns. A találmány szerinti készítmény különösen előnyösen likopént tartalmaz. A lipofil antioxidáns céljára szolgáló extraktumok előnyösen 5-12 tömeg% likopént, így 7-12 tömeg% likopént, különösen előnyösen 10% likopént tartalmaznak. Ez a készítményben megfelel 0,1-5 tömeg% likopénnek, előnyösen 0,2-4 tömeg% likopénnek, így 0,3-2 tömeg% likopénnek, különösen előnyösen 0,3-1 tömeg%, még előnyösebben 0,3-0,8 tömeg%, így 0,3-0,6 tömeg% likopénnek.

A természetes forrású lipofil antioxidáns előnyösen a következőket tartalmazza:

5-12%	likopén
1,15%	tokoferolok
0,05%-0,15%	béta-karotin
0,5-0,75%	fitoén
0,05-0,55%	fitofluén;
különösen előnyösen:	
7-12%	likopén
1-1,15%	tokoferolok
0,05%-0,15%	béta-karotin
0,5-0,75%	fitoén
0,05-0,55%	fitofluén.

Az egy vagy több lipofil antioxidáns forrás előnyösen legalább 1% béta-karotint, így kevesebb, mint 0,75%, például ke-

vesebb, mint 0,5%, előnyösen kevesebb, mint 0,25%, még előnyösebben kevesebb, mint 0,2%, különösen kevesebb, mint 0,15% béta-karotint tartalmaz. Ennek megfelelően, a találmány szerinti készítmény általában kevesebb, mint 0,025%, előnyösen kevesebb, mint 0,02%, különösen kevesebb, mint 0,1% béta-karotint tartalmaz.

Ily módon a találmány egy további szempontja olyan készítmény biztosítása, amellyel a fenti előnyös hatásokat igen kis mennyiségű vagy lényegében béta-karotin nélkül lehet biztosítani.

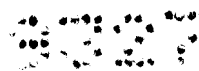
Egy tipikus kiviteli formánál a paradicsom extraktummal mint egyetlen forrással biztosítjuk a lipofil antioxidáns anyagot. Más szóval, a lipofil antioxidáns a paradicsom extraktum.

A találmány szerinti megoldás egy kiviteli formájánál a készítmény összetétele a következő:

20-40 tömeg%, így 20-25 tömeg%, előnyösen 27-35 tömeg%, különösen 30-35 tömeg% porcogó extraktum,
1-10 tömeg%, így 2-8 tömeg%, előnyösen 3-7 tömeg%,
például 3-5 tömeg% szőlőmag extraktum és
1-10 tömeg%, így 2-8 tömeg%, előnyösen 3-7 tömeg%,
különösen 3-5 tömeg% paradicsom extraktum.

Egy tipikus találmány szerinti készítményben a hal extraktum (F), a szőlőmag extraktum (G) és paradicsom extraktum (T) közötti tömegarány 5:1:1 és 15:1:1 közötti arány, így például 10:1:1.

Mint már a fentiekben említettük, a találmány szerinti készítmény képes a kollagén szintézist legalább 35%-kal növelni, az A vizsgálati módszerrel meghatározva. Előnyösen a talál-



mány szerinti készítmény A vizsgálati módszer körülményei között a kollagén szintézis legalább 40%-kal, így legalább 45%-kal, például legalább 50%-kal, különösen legalább 55%-kal, előnyösen legalább 60%-kal, így legalább 65%-kal, legalább 70%-kal, különösen előnyösen legalább 75%-kal növeli.

A találmány vonatkozik továbbá a kollagén szintézis növelésére vagy a kollagén szintézis csökkentésének mérséklésére a dermisben, ennél az eljárásnál a találmány szerinti készítményeket orálisan adagoljuk.

A jelent találmány feltalálói azt találták, hogy a találmány szerinti új készítmények nemcsak a kollagén szintézis növelését eredményezik, hanem más, az UV sugárzásnak kitett bőröregeedésének kezelésére is alkalmasak. Így egy kiviteli formánál a találmány szerinti készítmény csökkenteni képes a szabad gyökök által okozott hátrányos hatásokat legalább 40%-kal MMP-1 aktivitásban meghatározva, viszonyítva kontrollhoz, ezt a vizsgálatot a B vizsgálati módszert szerint végezzük és a csökkenés legalább 45%, így például legalább 50%. Az oxigén szabad gyökök és az ezekből származó káros hatások tipikusan az UV sugárzásának tudhatók be, de származhat más környezeti hatásokból is, továbbá fiziológiai vagy genetikai faktorokból is.

Az MMP-k UV-indukált túltermelődése egyike a fény által okozott öregedés (fotoöregedés) fő kiváltójának. Az UV sugárzás aktiválja a dermális sejteket, ez az MMP-k túltermelődését eredményezi, ez utóbbiak enzimek, amelyek lebontják a kollagént és más proteineket, amelyek a dermális extracelluláris matrixban találhatók. A dermális degradációt (lebomlást) egy

újraépülés követi, ami nem tökéletes. A nem tökéletes újraépülés a dermis szerkezeti integritásának hibáit okozza és ez ismétlődik minden egyes további UV sugárzás hatására, ami a dermális hegek és végül is a fotoöregedés látható jeleinek akkumulálódásához vezet (Fischer G.J. és mtársai, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, N. Engl. J. Med. 337-419-1428 (1997), Fischer G.J. & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that include Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo, J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3, 61-68 (1998), Fisher G.J., Talwar H.S., Lin J. & Voorhees, J.J. Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid, Photochem. Photobiol. 69, 154-157 (1999), Hase T. és mtársai, Histological increase in inflammatory infiltrate in sun-exposed skin of female subjects: the possible involvement of matrix metalloproteinase-1 produced by inflammatory infiltrate on collagen degradation, Br. J. Dermatol. 142, 267-273 (2000)).

Az MMP-k UV hatására bekövetkező képződését igazolták in vitro kísérletekkel is fibroblast tenyészetekben (Petersen M.J., Hansen C. & Craig S., Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts, J. Invest Dermatol. 99, 440-444 (1992), Scharffetter K. és mtársai, UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo, Arch. Dermatol. Res. 283, 506-511 (1991)). További, az MMP-k UV sugárzás által való indukálódásának

mechanizmusára vonatkozó vizsgálatok szerint az UV sugárzás szinglett oxigént (reakcióképes oxigén) indukál, ez közvetlen hatással van a sejtekre és indukálja az MMP-k képződését (Wlaschek M., Briviba K. & Stricklin P., Singlet Oxygen May Mediate Ultraviolet A-Induced Synthesis of Interstitial Collagenase, *J. Invest Dermatol.* 104, 194-198 (1995)). Így az antioxidánsok és különösen azok, amelyek a szinglett oxigént megkötik, ellen hatnak az UV-stimulált MMP szintézisnek. Azonban nem kizárható, hogy más szabad gyök fajták is részt vesznek az MMP szintézis stimulálásában. A tenyészetben lévő öreg sejtek, valamint az UV- vagy napfénynek kitett bőr sejtjei nagyobb mennyiségű MMP-t termelnek. A találmány szerinti készítmények alkalmazásával bekövetkező MMP-1 aktivitás csökkenés így jelzi annak alkalmazhatóságát az egészséges bőr fenntartására.

A találmány szerinti készítmények továbbá csökkentik a fokozottan glikozilált végtermékek (advanced glycosylation and products, AGE) képződését legalább 10%-kal a C vizsgálati módszer szerint meghatározva, viszonyítva a kontrollhoz, ez a csökkenés legalább 20%, így legalább 30%, 40%, 50% vagy 60%, előnyösen legalább 70%, különösen legalább 80% vagy 90%, még előnyösebben legalább 100% vagy 110%.

Az AGE-k (fokozottan glikozilált végtermékek, ismertek mint Amadori termékek is) glikálás (glikoxidáció) eredményei, ami egy nem specifikus kötési reakció a proteinek és szénhidrátok között. Az AGE-k mind az egye sejtekben, mind a szövetek extracelluláris matrixában akkumulálódnak, amely szövetek hosszú életű proteineket, így például kollagént tartalmaznak a

bőrben. Az AGE térhálósított proteinek nem-funkcionális proteinek, hajlamosak aggregálódni az extracelluláris matrixban vagy a sejtek citoplazmájában és úgy gondolják, hogy káros hatással vannak az általános protein szintézisre. Kezdetben egy korai termék (Amadori termék) képződik, amikor a glükóz a proteinekkel reakcióba lép. Ez az Amadori termék ezután további átrendeződésen megy keresztül, amikor is egy késői szakaszú barna pigmentek képződnek, amik képesek térhálósodni a proteinnel. Az átrendeződés után a késői szakaszú termékek tovább akumulálódnak a hosszú élettartamú proteinekben, így például a kollagénben, ez egy hosszú időtartamú folyamat és a proteinek nagymértékű térhálósodását eredményezi. Az *in vivo* AGE képződésről kimutatták, hogy fokozza a szervezet és a sejtek öregedését mind *in vivo*, mind *in vitro*. *In vivo* az AGE akumuláció mértéke feltehetően tükrözi a szérum glükóz szintjét. Az oxidációnak kritikus szerepet tulajdonítanak a késői szakaszú AGE képződésében, mivel a glikáció maga egy reverzibilis folyamat. Az oxidáció azonban felelős az állandó kémiai károsodásért és a proteinek funkcionalitásának elvesztéséért az állandó térhálósodás miatt (Fu M.X., Knecht K.J., Thorpe S.R. & Baynes J.W., Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose, Diabetes 41 Suppl 2, 42-48 (1992)). Azon túlmenően, hogy az AGE-k nem hatásosak és csökkentik az általános protein szintézist, kimutatták azt is, hogy kromoforok és UV fénnel való besugárzás után szignifikáns mennyiségű aktív oxigén gyököt képeznek (Masaki H., Okano Y. & Sakurai H., Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs)

during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damage, Biochim. Biophys. Acta 1428, 45-56 (1999)). Az oxidatív stressz hatás ily módon hozzájárul az AGE-k képződéséhez.

Egyszeri UV besugárzásra (5 J/cm^2) az AGE szint a nem-kiegészített kontroll sejtekben kb. 20-szorosára növekszik, viszonyítva a nem besugárzott kontroll sejtekhez. Hasonló körülmények között az AGE szint az F anyaggal kiegészített tenyészetekben kb. 40-szeresére növekszik, jelezve, hogy az F anyagnak nincs védőhatása az AGE képződéssel szemben UV sugárzásnál. Az AGE szint növekedés az F-kezelt sejteknél még drámaibb $7,5 \text{ J/cm}^2$ értékű besugárzásnál. A 3. ábrából kitűnik, hogy az AGE szint az FG-kiegészített sejteknél 72 egységgel növekszik, ami ugyanazon tartományba esik, mint a nem besugárzott kontroll sejtek (10%-os csökkenés a kontrollhoz viszonyítva).

Meglepő módon az FGT-kezelt sejtek esetében az AGE szint csökkenés 22 egység, viszonyítva a nem besugárzott sejtekhez, ami megfelel 120%-os AGE koncentráció csökkenésnek, viszonyítva a nem kezelt besugárzott sejtekhez.

Ily módon a találmány szerinti készítmények a prolin beépülés növekedését eredményezik és előnyös hatást fejtenek ki az UV hatásnak kitett sejtekre az MMP-1 aktivitás és AGE képződés tekintetében.

Ily módon a találmány oltalmi körébe tartozik egy készítmény, ami alkalmas a bőröregedés jeleinek kozmetikai kezelésére és a bőr egészséges állapotának általános fenntartására. Az öregedés tünetei származhatnak különböző faktorokból, így

napsugárzásból, korból, étrendből és más környezeti körülményből.

Egy tipikus találmány szerinti készítmény összetétele a következő:

1-80 tömeg% porcogóból extrahálható vegyület,
0,1-75 tömeg% szőlőmag extraktum, és
0,002-25 tömeg% likopén.

Egy különösen előnyös találmány szerinti készítmény összetétele a következő:

27-35 tömeg%, még előnyösebben 30-35 tömeg% porcogó extraktum,
1-10 tömeg%, így 3-5 tömeg% szőlőmag extraktum, és
0,1-5 tömeg%, különösen 0,2-1 tömeg% likopén.

A következő előnyös találmány szerinti készítményt állítottuk elő:

100-110 mg hal extraktum
95-105 mg növényi extraktum,
25-35 mg *Acerola* extraktum,
60-90 g mikrokristályos cellulóz,
3,5-4,5 mg szilícium-dioxid

ahol a növényi extraktum oligomer procianidolt és likopént és a hal extraktum glükózaminoglikánt tartalmaz.

Egy további előnyös találmány szerinti készítmény a következőket tartalmazza:

100-110 mg hal extraktum
95-105 mg növényi extraktum,
60-65 mg inulin,
25-35 mg aszkorbinsav,



10-20 mg cink-glükonát,
10-15 mg szilícium-dioxid,
ahol a növényi extraktum oligomer procianidolt és
likopént és a hal extraktum glükózaminoglikánt tartalmaz.

A találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak egyéb
további komponenseket is, így például vitaminokat, ásványi
anyagokat, aminosavakat és szénhidrátokat, egy előnyös kivite-
li formánál a találmány szerinti készítmény C vitamint vagy C
vitamint tartalmazó extraktumot, valamint még *Acerola* ekstrak-
tumot tartalmaz.

Mint már említettük, az alkotók relatív és abszolút meny-
nyisége a jelen értelmezésünk szerint igen nagy fontosságú a
találmány szerinti készítmények meglepő és előnyös tulajdon-
ságainak biztosítása szempontjából. Ennek megfelelően a hid-
rofil és lipofil antioxidánsok tömegaránya általában kb. 1:1 és
200:1, így 2:1 és 100:1, különösen 5:1 és 50:1, különösen 5:1
és 20:1, még előnyösebben 5:1 és 15:1, különösen előnyösen
7:1 és 12:1 közötti érték, így például 10:1.

Hasonlóképpen a porcogó, egy vagy több ebből
extrahálható vegyület és a hidrofil antioxidánsok közötti tö-
megarány kb. 1:1 és 200:1, így 2:1 és 100:1, különösen 5:1 és
50:1, még különösebben 5:1 és 20:1, előnyösen 5:1 és 15:1, kü-
lönösen előnyösen 7:1 és 12:1 közötti érték, így például 10:1.

Általában a találmány különösen előnyösen készítmények-
re vonatkozik, amelyben a i) porcogó egy vagy több ebből
extrahálható vegyület vagy származékai, ii) egy vagy több hid-
rofil antioxidáns és iii) egy vagy több lipofil antioxidáns meny-
nyisége együttesen olyan, hogy elnyomja az MMP-1 aktivitást,

az AGE képződést vagy növeli a kollagén szintézist az in vitro tenyésztett humán fibroblaszt sejtekben.

Ennek megfelelően a találmány egy további fontos szempontja szerint a találmány készítményekre vonatkozik, amelyekben a i) porcogó, egy vagy több ebből extrahálható vegyület vagy származékai, ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns és iii) egy vagy több lipofil antioxidáns olyan arányban vannak jelen, hogy elnyomják az MMP-1 aktivitást, elnyomják az AGE képződést vagy növeli a kollagén szintézist az in vitro tenyésztett humán fibroblaszt sejtekben.

Az előnyös kiviteli formák egy kombinációjában a találmány szerinti készítmény a következőket tartalmazza: 0,25-15 mg likopén és 2,5-100 mg szőlőmag extraktum, előnyösen 0,5-5 mg likopén, és 5,50 mg szőlőmag extraktum, különösen 0,75-2,5 mg likopén, és 10-30 mg szőlőmag extraktum, különösen 1-2,5 mg likopén, és 10-25 mg szőlőmag extraktum,

Egy további kombináció esetén a találmány szerinti készítmény 1:2,5 mg likopént, 5-50 mg szőlőmag extraktumot és 50-200 mg porcogó extraktumot tartalmaz.

A találmány szerinti készítmények orális adagolásúak, így lehetnek szilárd dózis formák, például tabletták, porok, granulátumok, kapszulák, ostyák vagy lehetnek folyékony dózis formák, így például oldatok, szuszpenziók, szirupos tonikok. Ezen dózis formákat a gyógyszerészetben ismert eljárások szerint állítjuk elő és tartalmazhatnak egy vagy több excipienst, amelyeket bármelyik, a szakterületen általánosan alkalmazott anyag közül választhatjuk. Szilárd készítmények esetén a szokásos, nem toxikus excipiensek lehetnek például a korlátozás szándéka nélkül a következők: gyógyszerészeti

ka nélkül a következők: gyógyszerészeti minőségű mannit, laktóz, keményítő, szójabab rost, magnézium-sztearát, nátrium-szacharin, talkum, valamely cellulóz, így mikrokristályos cellulóz, glükóz, szacharóz, szilícium-dioxid, magnézium-karbonát, stb. A folyékony dózis formákat előállíthatjuk a hatóanyag oldásával, diszpergálásával, stb. egy adott esetben jelenlévő, szokásos gyógyszerészetileg elfogadható adjuváns jelenlétében az excipientsben, amely lehet például víz vagy víz bázisú folyadék vagy juice, olaj vagy alkohol, így oldatot vagy szuszpenziót nyerünk. Kívánt esetben a találmány szerinti orális adagolású készítmény tartalmazhat kis mennyiségű ismert adalékokat, így például nedvesítő- vagy emulgeálószeret, puffereket, stb. A dózis formákat a szakterületen ismert módon alakítjuk ki, így például a következő irodalmi helyen ismertetettek szerint: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 15. kiadás, 1975; vagy Martindale, The Extra Pharmacopeia, The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 31, kiadás, 1996.

A találmány szerinti készítményt kialakíthatjuk úgy is, hogy a lipofil antioxidánst, így például a paradicsom extraktumot vagy a likopént tartalmazó extraktumot normál felszabadulású formára alakítjuk ki és a hidrofíl antioxidánst, például a szőlőmag extraktumot késleltetett vagy lassú felszabadulásúvá alakítjuk.

Mint azt az 5. példában bemutatjuk, a találmány szerinti készítmény orális alkalmazás esetén látható hatással van a bőr állapotára. A 4. ábrából kitűnik, hogy a találmány szerinti készítménnyel kezelt önkéntesek a bőr általános állapotának javu-

lását és a száj és szem körüli bőr simaságát és minőségének javulását tapasztalták. Ily módon az 1-4. példák szerinti eredmények in vivo is jelentkeznek, a készítmények láthatóan szisztémásan hatnak orális bevétel esetén.

A találmány szerinti készítmények alkalmazhatók orális kozmetikai termékként, táplálékként vagy táplálék kiegészítőként, gyógyszerként vagy dietetikus termékként.

A találmány vonatkozik továbbá a készítmények alkalmazására, az egészséges bőr általános fenntartására, a bőr kor és UV besugárzás hatására kialakuló degenerációjának késleltetésére, továbbá a bőröregedési tüneteinek kezelésére. A találmány szerinti készítmények alkalmasak a bőröregedésének, a napsugárzásnak vagy más UV sugárzásnak kitett bőr, a száraz bőr, durva bőr, elszíneződött bőr, acne-s bőr, heges bőr, feszültség jeleit viselő bőr, ekcéma és psoriasis kezelésére.

A bőröregedés tüneteinek, valamint az UV sugárzásból eredő károsodás kozmetikai vagy profilaktikus kezelésére szolgáló eljárásnál a találmány szerinti készítményt adagoljuk orálisan. Hasonlóképpen az oltalmi körbe tartozik a bőröregedésének, a napsugárzásnak vagy UV sugárzás más hatásának kitett bőr, száraz bőr, durva bőr, elszíneződött bőr, acne-s bőr, heges bőr, feszültség jeleit viselő bőr, ekcéma és psoriasis kozmetikai vagy profilaktikus kezelésére szolgáló eljárás is, amelynél a találmány szerinti készítményt orálisan adagoljuk. Az oltalmi körbe tartozik továbbá a találmány szerinti készítmények alkalmazása a bőröregedés tüneteinek megelőzésére vagy kialakulásuk lassítására, az UV sugárzás káros hatásainak megelőzésére vagy csökkentésére, feszültség jeleinek kezelésére, acne

kezelésére, ekcéma tüneteinek csökkentésére, a hegesedés és sebgyógyítás elősegítésére, a hegesedés csökkentésére, a psoriasis tüneteinek csökkentésére vagy a durva, elszíneződött vagy száraz bőr kezelésére szolgáló szerek előállítására.

Ennél az alkalmazásnál a napi dózis átlagos felnőtt személy esetében 55-3700 mg a fentiek szerinti porcogó komponens, hidrofil antioxidáns és lipofil antioxidáns keverékéből, előnyösen a mennyiség 70-1000 mg. Az adagolást napi dózisban vagy elosztva négyszer naponta, így például 1, 2, 3 vagy 4 alkalommal, előnyösen 1 vagy 2 alkalommal végezzük.

A találmány szerinti készítmény csomagolását ismert módon végezzük, így például tabletta tartályokba, kinyomható csomagokba vagy üvegcsékbe végezzük. Amennyiben az egyik komponens fényre érzékeny, ez különösen fennállhat, ha a lipofil antioxidáns likopén, javasolt a készítményt fénytől elzárni. Például a kinyomható csomagok esetén előnyös, ha az ismert formájú hólyagocskákat alumínium fóliából és alumínium bevonatú műanyag fóliából alakítjuk ki, így például egy műanyag/alumínium laminátum lemezből (például PVC, alumínium és orientált poliamid fólia laminátumból) és egy vékony, adott esetben bevonatos alumínium fóliából.

A találmány szerinti megoldást a következő, nem korlátozó példákkal mutatjuk be közelebbről.

1. példa

Hidrofil antioxidánsok, hidrofób antioxidánsok és porcogó extraktum hatásos koncentrációinak meghatározása

Különböző koncentrációjú szőlőmag extraktumot (1-200 $\mu\text{g/ml}$), porcogó extraktumot (0-1000 mg/ml) és paradicsom extraktumot (0-200 $\mu\text{g/ml}$) vizsgáltunk dózis függő módon in vitro tenyésztett humán bőr fibroblasztban. Az tenyészet körülmény között a sejttúlélés és növekedés mértékének értékelése után mindegyik hatóanyagra egy optimális koncentráció értéket választottunk ki.

Módszer

A vizsgálathoz a porcogó extraktumot, szőlőmag extraktumot és likopént tartalmazó paradicsom paszta oldatát a következőképpen állítottuk elő:

Porcogó oldat (40 mg/ml)

200 mg hal port (porcogó extraktum, a porcogó enzimatis proteolitikus hidrolízisével, majd a hidrolizátum szűrésével és porlasztva szárításával előállítva) feloldottunk 5 ml Hanks-féle pufferolt sóoldatban és sterilen szűrtük.

Szőlőmag oldat (40 mg/ml)

200 mg szőlőmag extraktumot (Indena, Milano, Olaszország) feloldottunk 5 ml Hanks-féle pufferolt sóoldatban (Hanks) és sterilen szűrtük.

Paradicsom oldat (elő-törzsoldat: 100 mg/ml)

Elő-törzsoldat: 400 mg paradicsom pasztát (40 mg likopén tartalom) feloldottunk 4 ml tetrahidrofuránban, sterilen szűrtük és felhasználásig -80°C -on tároltuk.

Paradicsom vizsgálati oldat (100 $\mu\text{g/ml}$)

Paradicsom vizsgálati oldat: a törzsoldatot 1:1000 arányban hígítottuk közvetlen a felhasználás előtt DMEM sejtközegben.

A humán fibroblaszt sejteket a következőképpen tenyésztettük: 10 000 sejt/lyuk mennyiségben beoltottunk egy 24-lyukú vizsgálati lemezt. A sejteket 1 éjszakán át hagytuk kötődni, majd a tápközegeket különböző koncentrációjú porcogó extraktumot (F), szőlőmag extraktumot (G) és paradicsom extraktumot (T) tartalmazó tápközegre cseréltük. A DMEM közeget (10% borjú magzati szérum + glutamin, penicillin/streptomycin) minden második-harmadik napon cseréltük, kivéve a TE tartalmú közeget, ezt minden nap cseréltük. A sejteket összefolyásig növesztettük (37°C, 5% CO₂, 95% nedvesség) és minden második napon számláltuk 300 µl tripszin/EDTA pr.lyuk alkalmazásával a sejtek leválasztására 10 perces 37°C-on végzett inkubálással, 200 µl-t felhasználtunk a sejt/ml érték meghatározásához.

A sejttúlélést és sejtnövekedés 15 nap után értékeltük. A sejttúlélést a sejtekben MTT-mérésével határoztuk meg. A felvétel mértéke megfelel a mitochondriális aktivitás szintjének, ez mutatja a sejtleletképességét. Az MMT-t kék színű vegyületté (formazan) redukáljuk, ezt UV/látható abszorpció 595 nm-en való mérésével határozzuk meg, a referencia 655 nm.

A sejtnövekedést több sejten határoztuk meg a tenyészedényben elektronikus Counter Coulter[®] alkalmazásával.

Eredmények

A 70 µg/ml porcogó extraktummal, 100 µg/ml szőlőmag extraktummal és 10 µg/ml paradicsom extraktummal (=1,0 µg/ml likopén) kiegészített sejttenyészetek optimális közeget biztosítottak a sejtnövekedéshez. Ez a koncentráció se nem to-



xikus, se nem változtatja meg a sejtosztódás mértékét. Az eredményeket igazoltuk továbbá hosszú időtartamú fibroblaszt tenyésztéssel is a fentiek szerinti kiválasztott kombinációval kiegészített sejtközegben 50 napon át. A mért kumulatív populációs kettőző szint értékek (cumulative population doubling levels, CPDL), amelyek megfelelnek a sejtosztódások és sejtnövekedések számának, nem befolyásolódnak a vizsgált anyagoktól. A kapott eredményeket az 1. táblázatban és 1. ábrán foglaljuk össze.

1. táblázat

Nap	O	F	FGT	GT
0	18	18	18	3
3	19,17	19,34	18,87	18,8
9	21,4	21,52	21,28	21,32
14	23,08	22,93	23,05	23,02
21	25,65	25,87	25,59	25,67
28	27,53	27,57	27,73	27,78
35	28,88	28,88	29,2	29,15
42	31,45	31,54	31,4	32,03
50	32,98	33,14	33,42	33,39

2. példa

A készítmények hatása a kollagén szintézisre

In vitro vizsgálatokat végeztünk az F, G és T hatásának kimutatására a kollagén szintézisre. A kollagén szintézist a prolintartalmú proteinekbe a radioaktív prolin ($[^{14}\text{C}]$ -prolin) beépülésének mértékével értékeltük, azok a proteinek tekinthetők főleg kollagénnek, ahol a prolincsoportok száma több, mint 30% az össz aminosavakra vonatkoztatva. Az F, G és T kombi-

nációt optimális mennyiségben (1. példa szerint meghatározva) adagoltuk a sejtközegbe és mértük a kiválasztódó és jelzett proteinek radioaktivitását 24 óra elteltével.

Módszer

Az F, G és T extraktumokat az 1. példa szerint állítottuk elő.

A radiojelzett prolinok beépülését a humán fibroblaszt sejtkultúrák sejtjeibe a következőképpen végeztük (teszt módszer A): az F, G és TR anyagok különböző kombinációit adagoltuk akkor, azon a napon, amikor a sejtek összefolyásig növekedtek (kb. 1 hét). A tápközeget naponta cseréltük. Összefolyásnál a tápközeget 0,5 ml radioaktív oldat (25 μ Ci) + 2,5 ml tápközeg F, G vagy T nélkül, összetételűre cseréltük.

A sejteket további 24 órán át inkubáltuk, majd a közeget elválasztottuk és a radioaktivitást mértük a következőképpen:

TCA kicsapás: 5 μ l tápközeget elkevertük 20 μ l BSA-val (0,5 g/ml) és 1 ml TCA-val (10%) és -20°C-on 30 percig állni hagytuk. A mintákat ezután felolvasztottuk, nitrocellulóz szűrőn átszűrtük és a szabad radioaktív prolint elválasztottuk a jelzett proteinektől. A szűrőt egy vizsgálócsőbe vittük, amelyhez 2,5 ml szcintillációs folyadékot adagoltunk. A vizsgálócsöveket 1 órán át állni hagytuk, majd az 5 μ l minta radioaktivitását mértük szcintillációs számlálóval.

Eredmények

A kapott eredményeket a 2a. és 2b. táblázatokban foglaljuk össze. A GT extraktumot tartalmazó sejtkultúrákban csökken a prolin beépülése a kontrollhoz viszonyítva: 3,6% beépülés, viszonyítva 4,8% kontrollhoz, ez 25%-os csökkenés. Az FT ext-

raktumot tartalmazó sejtkultúrákban szignifikáns változást a prolin beépülésre nem tapasztaltunk, mivel a beépülés mértéke 5%, viszonyítva a kontroll 4,8%-os értékéhez, ez 4% növekedést jelent csak. Az FG extraktumot tartalmazó sejtkultúráknál kismértékű növekedést tapasztaltunk a prolin beépülésben: 5,5% beépülés, ez 10% növekedés a kontrollhoz viszonyítva.

Az F extraktumot tartalmazó sejtkultúráknál a prolin beépülés növekedésének mértéke: 6,2%, ez 29%-os növekedés. A FGT tartalmú extraktumoknál azonban meglepően nagymértékű, 80%-os növekedést mértünk a prolin beépülésre: 8,4% prolin épült be.

Ennél a kísérletnél a 30%-os különbség szignifikánsnak tekinthető.

2. táblázat

Kezelés	Aktivitás f/perc	Aktivitás μCi (kimenő)	Beépült prolin (%)	Eredmény viszonyítva a kontrollhoz
GT	4516	0,0015	3,6	20%-os csökkenés
Kontroll	5787	0,0020	4,8	-
FT	4516	0,0021	5,0	nincs változás
FG	5137	0,0023	5,5	10%-os növekedés
F	5787	0,0026	6,2	30%-os növekedés
FGT	7738	0,0035	8,4	80%-os növekedés

3. példa

Készítmények hatása a humán fibroblasztokra UV besugárzás hatására



Az UV besugárzás felelős a bőr számos degeneratív elváltozásáért, ami az öregedés látható jeleihez vezet (fotoöregedés). Az F, G és C extraktumok és ezek kombinációinak UV sugárzás kiváltotta károsodás elleni potenciális védőhatását a fotoöregedéssel összefüggő biokémiai jelzőanyagok kimutatásával végeztük (MMP-1 és AGE-k mennyisége), ezek jelennek meg a bőr fibroblaszt sejtkultúrákban UV besugárzás hatására.

Humán fibroblaszt sejtkultúrákat UV sugárzás hatásának tettük ki négy egymást követő napon. Két különböző dózist alkalmaztunk (5 és 7,5 J/cm²), ez megfelel a maximális dózishoz, amelyeket a sejtek elviselnek a pusztulásuk előtt.

A sejtkultúrákat F, G és T különböző kombinációival egészítettük ki (F, FG, FT, GT és FGT). Az F, G és T anyagokat optimális koncentrációjukban alkalmaztuk (1. példa szerint meghatározva) és az MMP aktivitást és AGE képződést 1 nap és 4 nap elteltével mértük.

Módszerek

Az extraktumokat az 1. példában leírtak szerint állítottuk elő.

A sejt tenyésztést a következőképpen végeztük:

Adott passzálással nyert sejteket F, G és T tartalmú közegekben kezeltünk. Összefolyáskor 1:4 felosztást végeztünk, így négy edényt kaptunk minden kezeléshez. Összefolyásnál egy (1:4 felosztás) vagy kettő (1:2 felosztás) tenyészetet passzáltunk négy új edénybe.

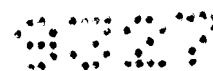
A sejtkultúrák UVA besugárzását a következőképpen végeztük:

Az UVA dózisokat 6x Philips 40W UVA Cleo Performance csövekben végeztük. A dózisok W/m^2 értékének meghatározására Hagner UVA mérőt alkalmaztunk és számoltuk a kívánt 5, 7,5, 10, illetve 15 J/cm^2 nagyságú dózisokhoz szükséges besugárzási időt. Az előzetes vizsgálatok szerint a sejtpusztulást nem előidéző optimális dózis értéke a $7,5 \text{ J/cm}^2$.

Az MMP-1 aktivitás (endogén aktivitás plusz látens szint) meghatározását az APBiotech, Code RPB 2629 ismert vizsgálati rendszer szerint végeztük (teszt módszer B).

Az AGE meghatározást ELISA módszeren alapulva végeztük (teszt módszer C):

- nap 1: a mikrolemezeket 50 ng AGE/sejt értékben bevontoltuk, majd karbonát pufferral hígítottuk $+4^\circ\text{C}$ -on 1 éjszakán át.
- nap 2: A lyukakat négyszer PBST pufferral átmostuk (PBS + 0,0% Tween 20), majd $200 \mu\text{l/lyuk}$ PBS-tej (6%) közzeggel 2 órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk. A lyukakat ezután négyszer PBST-vel mostuk, majd először hozzáadtunk $50 \mu\text{l AGE standardot}$ ($20\text{-}20\ 000 \text{ egység/lyuk}$) vagy $50 \mu\text{l mintát}$ ($50 \mu\text{g protein/ml}$), majd ezt követően $50 \mu\text{l AGE poliklón antitestet}$ (hígítás 1/1000). A lemezeket erőteljesen kevertük 2 órán át szobahőmérsékleten. A lyukakat ezután négyszer PBST-vel átmostuk, majd egy második adag antitestet adagoltunk (Polyclonal Rabbit, HRP, hígítás 1/1000) $50 \mu\text{l/lyuk}$ mennyiségben és gyors keverőn 2 órán át szobahőmérsékleten kevertük. Ezután a lyukakat négyszer PBST-vel átmossuk, majd a szubsztrátot adagoltuk



(1 OPD tabletta/3 ml ddH₂O + 1/1000 tf/tf hidrogén-peroxid (35%) 100 µl/lyuk mennyiségben. A lemezeket ezután sötét helyen tartottuk, majd a megfelelő szint kifejlesztése után a reakciót 50 µl H₂SO₄ (1M) adagolásával leállítottuk. A lemezek abszorpcióját 490 nm-en mértük (referencia 655 nm).

Eredmények

Az MMP-1 aktivitás és AGE képződés eredményeit a 2., illetve 3. ábrán foglaljuk össze.

I. MMP-1 aktivitás

A vizsgálatok szerint az UVA sugárzás MMP-1 aktivitást indukál a kezeletlen sejteknél (kontroll) mind a nap 1, mind a nap 4 vizsgálatoknál, ezzel igazolva, hogy MMP-1 indukálódik tenyésztett fibroblasztokban UVA sugárzás hatására. A kontroll sejtek MMP-1 aktivitása kb. megkettőződik a fotoöregedési eljárás során.

A GT-vel kezelt sejteknél 34, illetve 58%-os csökkenés mutatkozott a nap 1, illetve nap 4 vizsgálatoknál.

Viszont, MMP-1 aktivitás indukálódik az F anyaggal kiegészített sejtekben. Az MMP-1 aktivitás kb. megháromszorozódik, illetve megnégyszereződik az UV besugárzást követően az 1. illetve 4. napon.

Meglepő módon az F és GT anyagok kombinációjával (FGT) nem mutatkozik MMP-1 aktivitás növekedés az UV besugárzott sejtekben. Így az FGT-vel kezelt sejteknél az MMP-1 aktivitás fele a kontroll sejtekénél mért értékeknek azonos körülmények között.

3. táblázat

nap 1

	0 J/cm ²	5 J/cm ²	7,5 J/cm ²
Kontroll	1	2,01	1,80
GT	1	1,34	1,34
FGT	1	0,97	0,99

3a. táblázat

nap 4

	0 J/cm ²	5 J/cm ²	7,5 J/cm ²
Kontroll	1	2,02	2,3
GT	1	1,37	1,58
FGT	1	1,04	0,99

II. AGE képződés

A kapott eredményeket a 3. ábrán és 4. táblázatban foglaljuk össze. Egyetlen UV besugárzás hatására (5 J/cm²) az AGE szint a nem-kiegészített kontroll sejtekben kb. 20-szorosára növekszik a nem-besugárzott kontroll sejtekhez viszonyítva.

Ugyanilyen körülmények között az AGE szint az F-kiegészített kultúrákban 40-szeresére növekszik, ami azt mutatja, hogy az F anyag nem mutat védő hatást az AGE képződéssel szemben UV sugárzás hatására. A 3. ábrából kitűnik, hogy az AGE szintek az FG-kiegészített sejtekben 73 egységgel nőnek, ami ugyanazon nagyságrendű, mint a kezeletlen, besugárzott kontroll sejteké (10%-os csökkenés viszonyítva a kontrollhoz).

Ugyanakkor, az FGT anyaggal kezelt sejteknél meglepő csökkenés mutatkozik az AGE szintben, ennek értéke kb. 22

egység viszonyítva a nem besugárzott sejtekhez, ami megfelel 120%-os AGE koncentráció csökkenésnek, viszonyítva a nem kezelt besugárzott sejtekhez.

Így a találmány szerinti készítmények növelik a prolin beépülést, valamint előnyös hatásúak az UV sugárzásnak kitett sejtekre az MMP-1 aktivitás és AGE képződés tekintetében.

4. táblázat

	5 J/cm ²	7,5 J/cm ²
Kontroll	80,06	67,88
F	152,72	258,21
FG	72,04	118,58
FGT	-21,94	-34,92

4. példa

Találmány szerinti készítményeket állítunk elő az alábbi összetevőkből a megadott arányokban (a megadott mennyiségek a végső dózis egységeire vonatkoznak).

A likopén érzékeny az oxidációra, ezért a granulátumok elkeverését, kezelését, tablettákká sajtolását, tabletták tárolását és az alu-alu-hólyag lemezekbe való csomagolását nitrogén védőgázban végeztük.

1. készítmény (tabletta kód SF)

- 105 mg porcogó extraktum (a porcogó enzimatis proteolitikus hidrolízisével, majd a hidrolizátum szűrésével és porlasztva szárításával előállítva);
- 100 mg növényi extraktum (kb. 1,5 mg likopén tartalom paradicsomból extrahálva és kb. 14 mg flavonoid szőlőmagból



extrahálva, a további rész szójarost, paradicsomolaj és szilícium-dioxid; Alextan[®], gyártó Indena, Milano, Olaszország);

- 30 mg Acelora extraktum (kb. 7,5 mg aszkorbinsav, a többi Acelora alkotó és matrodextrin);
- 66 mg mikrokristályos cellulóz;
- 4 mg szilícium-dioxid (részecskeméret 2,4-3,6 µm).

A keverést Lödiger keverőben 6 percen át végeztük, majd a kapott porkeveréket tablettákká sajtoltuk, tömege 305 mg.

2. készítmény (tabletta kód SF-1)

- 105 mg porcogó extraktum (előállítása porcogó enzimatis proteolitikus hidrolízisével, majd a hidrolizátum szűrésével és porlasztva szárításával);
- 100 mg növényi extraktum (kb. 1,5 mg likopén paradicsomból extrahálva és kb. 14 mg flavonoid szőlőmagból extrahálva, a maradék szójarost, paradicsomolaj és szilícium-dioxid; Alextan[®], gyártó Indena, Milano, Olaszország);
- 30 mg Acelora extraktum (kb. 7,5 mg aszkorbinsav, a többi Acelora alkotó és matrodextrin);
- 81 mg mikrokristályos cellulóz;
- 4 mg szilícium-dioxid (részecskeméret 2,4-3,6 µm).

A keverést Lödiger keverőben 6 percen át végeztük, majd a kapott porkeveréket tablettákká sajtoltuk, tömege 320 mg.

3. készítmény (tabletta kód SS)

- 105 mg porcogó extraktum (előállítása porcogó enzimatis proteolitikus hidrolízisével, majd a hidrolizátum szűrésével és porlasztva szárításával);
- 100 mg növényi extraktum (kb. 1,5 mg likopén paradicsomból extrahálva és kb. 14 mg flavonoid szőlőmagból

extrahálva, a maradék szójarost, paradicsomolaj és szilícium-dioxid; Alextan[®], gyártó Indena, Milano, Olaszország);

- 62 mg inulin;
- 30 mg aszkorbinsav;
- 15 mg cink-glükonát;
- 13 mg szilícium-dioxid (részecskeméret 2,4-3,6 μm).

A keverést Lödiger keverőben 6 percen át végeztük, majd a kapott porkeveréket tablettákká sajtoltuk, tömege 325 mg.

Tipikus készítmény

FE: 105 mg

GE: 13,75 mg

TE: 14,38 mg (ebből likopén 10%= 1,44 mg)

5. példa

Az 1. példa szerinti készítményt fogyasztókkal vizsgáltatuk a bőrön való elfogadhatóság meghatározására.

129 önként jelentkezőt 3 hónapos vizsgálatnak vetettük alá, naponta 2 tablettát adagoltunk, amely 1. példa szerinti készítményt tartalmazott. Feljegyezték a bőr megjelenését és minőségét a vizsgálat megkezdése után, majd 1, 2, illetve 3 hónappal az alkalmazás után kiértékeltek a bőr megjelenését és minőségét az alábbi kódok szerint: 0 - az állapot nem változott, 1 - kis mértékben javult, 2 - javult, 3 - nagyon javult.

A 4. ábrán bemutatjuk a kiértékelés eredményeit az "átlagos bőr állapot", "lágyság", "a bőr minősége a szem körül és a száj körül" paraméterek függvényében. A megadott százalékos értékek az önkéntesek által megélt javulások.



Szabadalmi igénypontok

1. Készítmény, amely a következőket tartalmazza:

i) porcogó extraktum enzimatis proteolitikus hasítással előállítva vagy a porcogóból enzimatis proteolitikus hasítással extrahálható vegyületek szintetikus formája;

ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns, amely hidrofil antioxidáns szőlőmagból extrahálható vagy a szőlőmagból extrahálható antioxidáns szintetikus formája; és

iii) egy vagy több lipofil antioxidáns, amelyben az antioxidánsok egyike likopén és amely lipofil antioxidáns természetes forrásokból extrahálható vagy természetes forrásokból extrahálható lipofil antioxidánsok szintetikus formája.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza:

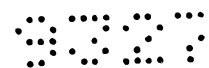
i) porcogó extraktum, amely enzimatis proteolitikus hasítással nyerhető vagy a porcogóból enzimatis proteolitikus hasítással extrahálható vegyületek szintetikus formája;

ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns, amely szőlőmagból extrahálható vagy szintetikus eljárással előállított; és

iii) egy vagy több lipofil antioxidáns, amelyben az antioxidánsok egyike likopén és amely lipofil antioxidánsok természetes forrásokból extrahálhatók vagy szintetikus úton előállítottak.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza:

i) porcogó extraktum, amely enzimatis proteolitikus hasítással nyerhető;



ii) egy vagy több hidrofil antioxidáns, amelyben a hidrofil antioxidánsok szőlőmagból extrahálhatók vagy szintetikus úton előállítottak; és

iii) egy vagy több lipofil antioxidáns, amelyben az antioxidánsok egyike likopén és amelyben a lipofil antioxidáns természetes forrásokból extrahálható vagy szintetikus úton előállított.

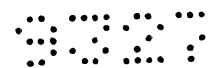
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben a porcogó extraktum és a porcogóból extrahálható vegyület valamely következő glükózaminoglikánt tartalmaz: kondroitin-észter, keratin-észter, hialuronsav vagy valamely észtere, dermatán-észter, heparin, heparán-észter vagy ezek epimerjei vagy polimerjei, amelyek bármelyike adott esetben peptidhez van kötve.

5. A 4. igénypont szerinti készítmény, amelyben a glükózaminoglikán valamely következő vegyület: kondroitin-4-szulfát, kondroitin-6-szulfát vagy keratin-szulfát, amelyek bármelyike adott esetben peptidhez van kötve.

6. Az 1-5. igénypont szerinti készítmény, amelyben a porcogó extraktum kondroitin-szulfátot tartalmaz adott esetben peptidhez kötve.

7. Az 1-6. igénypont szerinti készítmény, amely kevesebb, mint 1 tömeg%, előnyösen kevesebb, mint 0,5 tömeg%, különösen kevesebb, mint 0,1% kollagént tartalmaz, különösen előnyösen kollagén mentes.

8. Az 1-7. igénypont szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több hidrofil antioxidáns valamely következőből van extrahálva: fenyőkéreg *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*,



Aesculus hippocastanum, Gingo Biloba, Cardus marianum, Vaccinium myrtillus, Silibum marianum.

9. Az 1-8. igénypont szerinti készítmény, amelyben egy vagy több hidrofil antioxidáns oligomer procianidolt tartalmaz.

10. Az 1-9. igénypont szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több hidrofil antioxidáns *Vitis vinifera* szőlőmagjából extrahálható.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több hidrofil antioxidáns szőlőmag extraktumból származik.

12. A 8. igénypont szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több hidrofil antioxidáns *Vitis vinifera*-ból van extrahálva.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több hidrofil antioxidáns *Vitis vinifera* szőlőmagokból származik.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több lipofil antioxidáns paradicsom fajtából extrahálható.

15. Az 14. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben az egy vagy több lipofil antioxidáns legylább egyike paradicsom fajtából van extrahálva.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben a lipofil antioxidáns egy paradicsom extraktum.

17. A 13. vagy 14. igénypont szerinti készítmény, amelyben a paradicsom fajta *Licopersicum aesculentum*.

18. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amelyben a lipofil antioxidáns még tartalmaz valamely következő karotenoidot:



α -karotin, β -karotin, γ -karotin, δ -karotin, zeaxantin, kriptoxantin, lutein vagy xantofil.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely 0,1-5 tömeg%, előnyösen 0,2-4 tömeg%, így 0,3-2 tömeg%, még előnyösebben 0,3-1 tömeg%, különösen 0,3-0,8 tömeg%, így 0,3-0,6 tömeg% likopént tartalmaz.

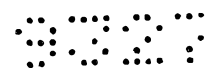
20. Az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely még valamely tokoferolt, fitoént és fitofluént tartalmaz.

21. Az 1-20. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely kevesebb, mint 0,025%, előnyösen kevesebb, mint 0,02%, különösen előnyösen kevesebb, mint 0,01% béta-karotint tartalmaz.

22. Az 1-21. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben a hidrofil és lipofil antixoidánsok tömegaránya kb. 1:1 és 200:1, így 2:1 és 100:1, különösen 5:1 és 50:1, még különösebben 5:1 és 20:1, előnyösen 5:1 és 15:1, különösen előnyösen 7:1 és 12:1 közötti érték, így 10:1.

23. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben az enzimatis proteolitikus hasítással előállítható porcogó extraktum vagy az enzimatis proteolitikus hasítással porcogóból előállítható vegyületek szintetikus formája és a hidrofil antioxidánsok tömegaránya kb. 1:1 és 200:1, így 2:1 és 100:1, különösen 5:1 és 50:1, még különösebben 5:1 és 20:1, előnyösen 5:1 és 15:1, különösen előnyösen 7:1 és 12:1 közötti érték, úgy mint 10:1.

24. A 11-23. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza: 0,25-15 mg likopén, és 2,5-100 mg szőlőmag extraktum, előnyösen 0,5-5 mg likopén



és 50 mg szőlőmag extraktum, különösen 0,75-2,5 mg likopén és 10-30 mg szőlőmag extraktum, még különösebben 1-2,5 mg likopén és 10-25 mg szőlőmag extraktum.

25. A 11-24. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely 1-2,5 mg likopént, 5-50 mg szőlőmag extraktumot és 50-200 mg porcogó extraktumot tartalmaz.

26. A 16-22. igénypont szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza:

- i) 20-40 tömeg% porcogó extraktum, úgy mint 25-35 tömeg%, előnyösen 27-35 tömeg%, úgy mint 30-35 tömeg%,
- ii) 1-10 tömeg% szőlőmag extraktum, úgy mint 2-8 tömeg%, előnyösen 3-7 tömeg%, úgy mint 3-5 tömeg% szőlőmag extraktum, és
- iii) 1-10 tömeg%, úgy mint 2-8 tömeg%, előnyösen 3-7 tömeg%, úgy mint 3-5 tömeg% paradicsom extraktum.

27. Az 1-26. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely még tartalmaz *Acerola* extraktumot.

28. A 11-27. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza:

- 100-110 mg porcogó extraktum
- 95-105 mg kombinált szőlőmag és paradicsom extraktum
- 25-35 mg *Acerola extraktum*
- 60-90 mg mikrokristályos cellulóz
- 3,5-4,5 mg szilícium-dioxid,

és amelyben a szőlőmag extraktum oligomer procianidolt tartalmaz; a paradicsom extraktum likopént tartalmaz és a porcogó extraktum valamely glükózaminoglikánt tartalmaz.



29. A 13-28. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely a következőket tartalmazza:

100-110 mg porcogó extraktum

95-105 mg kombinált szőlőmag és paradicsom extraktum

60-65 mg inulin

25-35 mg aszkorbinsav

10-20 mg cink-glükonát

10-15 mg szilícium-dioxid,

és amelyben a szőlőmag extraktum oligomer procianidolt tartalmaz; a paradicsom extraktum likopént és a porcogó extraktum valamely glükózaminoglikánt tartalmaz.

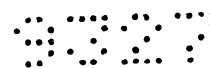
30. A 11-29. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely a szőlőmag extraktumot lassú felszabadulású és a likopént normál felszabadulású formában tartalmazza.

31. Az 1-30. igénypontok bármelyike szerinti készítmény orális adagolású kozmetikai termékként, táplálékként vagy táplálék kiegészítőként, gyógyszerként vagy dietetikus termékként való alkalmazásra.

32. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely szilárd dózis formájú, így tabletta, por, granulátum, kapszula, ostya vagy folyadék dózis formájú, így oldat, szuszpenzió, tonik vagy szirup.

33. Az 1-32. igénypontok bármelyike szerinti készítmény a bőr egészséges állapotának általános fenntartására, az öregedés vagy UV behatásra bekövetkező a bőrdegeneráció kialakulásának megelőzésére, és a bőröregedési tüneteinek kezelésére.

34. Az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti készítmény a bőröregedésének kezelésénél, a napsugárzásnak vagy bármilyen más UV sugárzásnak kitett bőr kezelésénél, a száraz bőr, durva



bőr, elszíneződött bőr, acne-s bőr, heges bőr, megnyúlt bőr, ekcéma vagy psoriasis kezelésénél történő alkalmazásra.

35. Az 1-34. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely képes a kollagén szintézist legalább 35%-kal növelni a teszt módszer A-val meghatározva.

36. Az 1-35. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely a szabad oxigén gyökök káros hatását az MMP-1 aktivitás alapján meghatározva legalább 40%-kal csökkenti a kontrollhoz viszonyítva, a teszt módszer B szerint meghatározva, amely csökkenés legalább 45%, így mint legalább 50%.

37. Az 1-36. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amely az AGE termékek képződését legalább 10%-kal csökkenti a kontrollhoz viszonyítva a teszt módszer C-vel meghatározva, a csökkenés legalább 20%, úgy mint legalább 30%, 40%, 50% vagy 60%, előnyösen legalább 70%, különösen legalább 80% vagy 90%, még előnyösebben legalább 100% vagy 110%.

38. A 35. igénypont szerinti készítmény, amely a kollagén szintézist legalább 40, legalább 45, úgy mint legalább 50, legalább 55, előnyösen legalább 60, úgy mint legalább 65, legalább 70, különösen előnyösen legalább 75 vagy legalább 80%-kal csökkenti.

39. A 36. igénypont szerinti készítmény, amely az oxigén szabad gyökök káros hatását az MMP-1 aktivitás alapján meghatározva legalább 40%-kal csökkenti a kontrollhoz viszonyítva, a teszt módszer B-vel meghatározva, a csökkenés legalább 45%, legalább 50%.

40. A 39. igénypont szerinti készítmény, amelynél a káros hatás UV besugárzás hatására következik be.



41. Az 1-32. igénypontok bármelyike szerinti készítmény alkalmazása szer előállítására, amely alkalmas a bőröregedési tüneteinek megelőzésére vagy lassítására, az UV besugárzás káros hatásainak megelőzésére vagy csökkentésére, a megnyúlás kezelésére, acne kezelésére, ekcéma tüneteinek kezelésére, hegképződés javítására, hegképződés csökkentésére, psoriasis tüneteinek csökkentésére vagy a durva, elszíneződött vagy száraz bőr kezelésére.

42. Kozmetikai vagy profilaktikus eljárás az öregedő bőr, a napsugárzásnak vagy az UV sugárzás egyéb hatásainak kitett bőr, száraz bőr, durva bőr, elszíneződött bőr, acne-s bőr, heges bőr, megnyúlás jeleit mutató bőr, ekcéma vagy psoriasis kozmetikai vagy profilektikus kezelésére **azzal jellemezve**, hogy az 1-32. igénypontok bármelyike szerinti készítményt adagoljuk orálisan.

43. Kozmetikai vagy profilektikus eljárás az öregedés tüneteit mutató bőr, az UV sugárzás hatásának kitett bőr kezelésére **azzal jellemezve**, hogy az 1-32. igénypontok bármelyike szerinti készítményt adagoljuk orálisan.

44. Eljárás a kollagén szintézis fokozására vagy a kollagén szintézis csökkenésének enyhítésére a dermisben **azzal jellemezve**, hogy az 1-32. igénypontok bármelyike szerinti készítményt adagoljuk orálisan.

+ meg. e. e.

HL

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

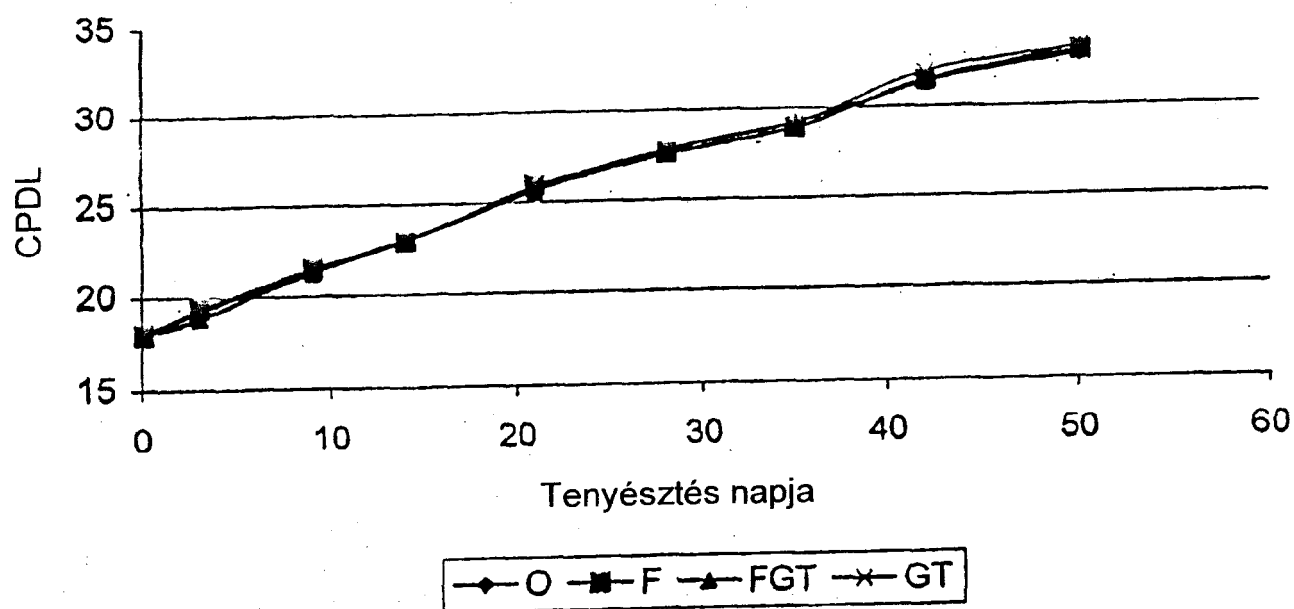

Olchváry Géza
szabadalmi ügyvivő

POS 1941

9327

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1/4

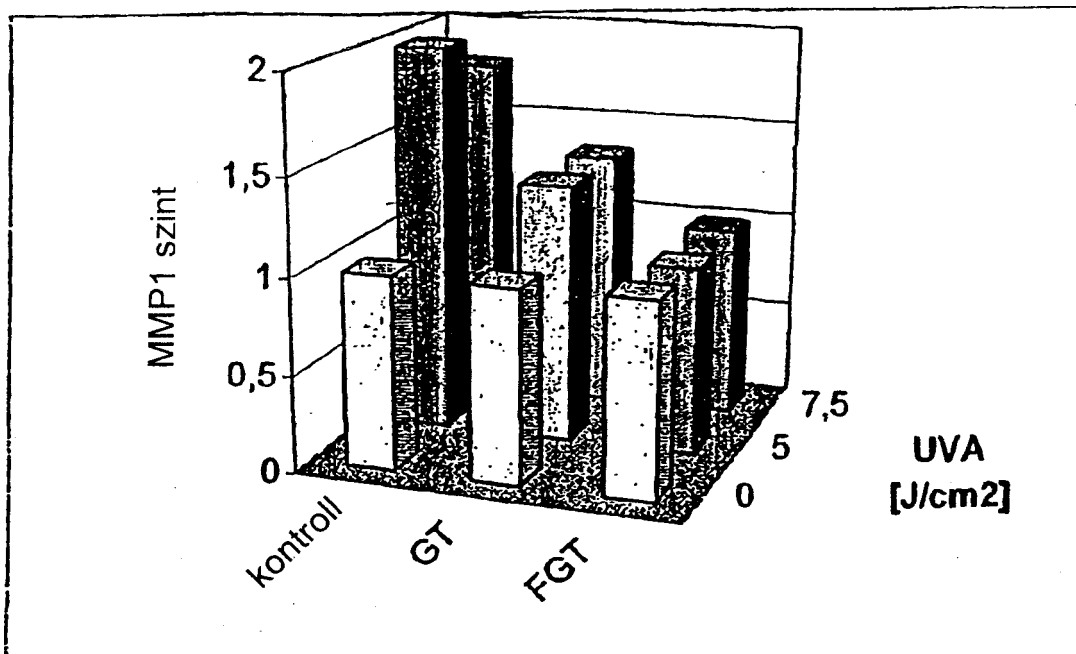


1. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

2/4

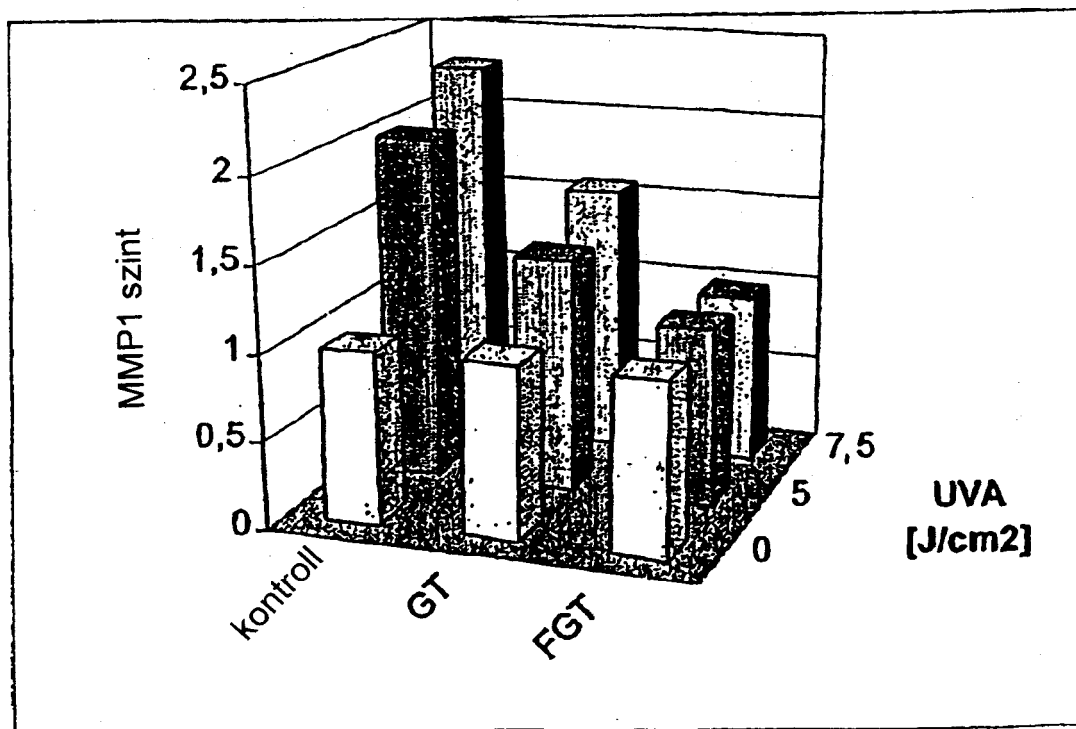
MMP1 szint



1 nap

2a ábra

MMP1 szint



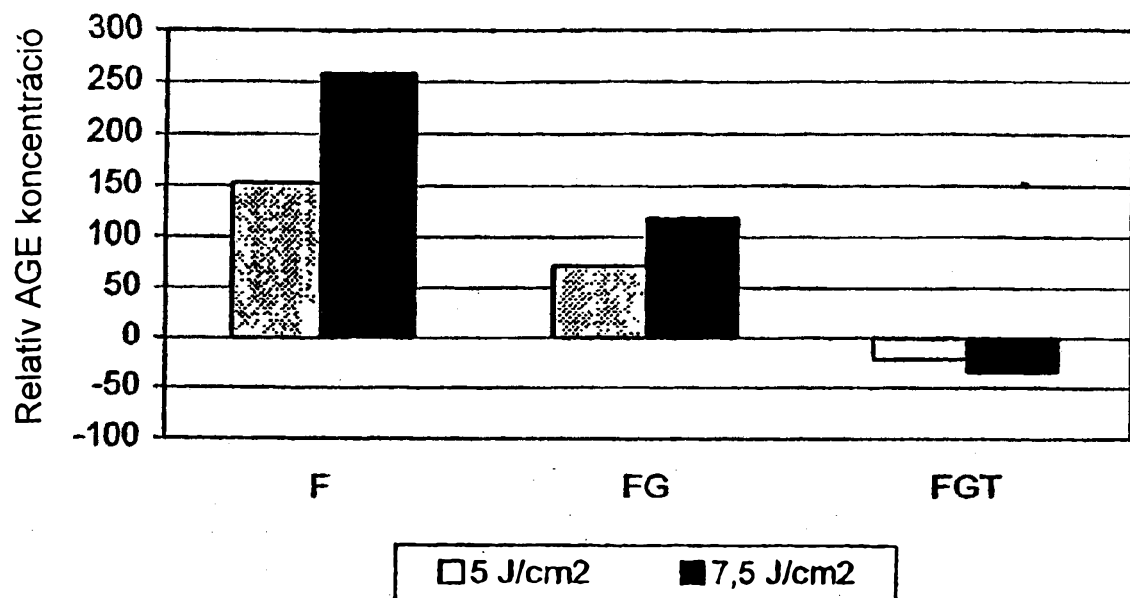
4 nap

2b ábra

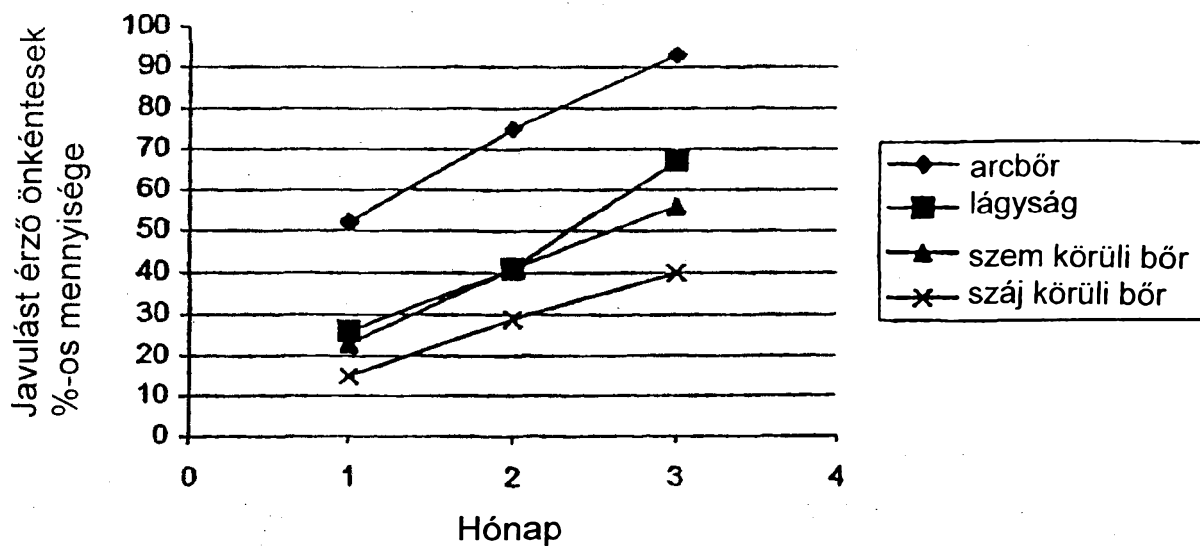
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

3/4

AGE koncentráció – 1 nap



3. ábra



4. ábra