

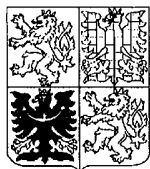
# PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2001 - 2329**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.11.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.12.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9828380**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.12.2001**  
(Věstník č. 12/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/09165**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/37039**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 7/48**

(71) Přihlašovatel:

**UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;**

(72) Původce:

Alaluf Simon, Sharnbrook, GB;  
Green Martin Richard, Sharnbrook, GB;  
Iwata Koichi, Ridgefield Park, NJ, US;  
McNeill Gerald Patrick, Channahon, IN, US;  
Powell Jonathan Richard, Sharnbrook, GB;  
Rawlings Anthony Vincent, Wirral, GB;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Prostředek pro místní podání**

(57) Anotace:

Předmětem řešení je prostředek pro místní podání, obsahující:

(a) konjugovanou kyselinu linolovou a/nebo její deriváty, zahrnující konjugované části kyseliny linolové, přičemž alespoň 50 % hmotn. konjugované kyseliny linolové a/nebo jejích derivátů je přítomno jako trans-10, cis-12 isomer; a (b) dermatologicky přijatelný nosič. Výrobek je zvláště vhodný pro zesvětlení lidské pokožky.

## **Prostředek pro místní podání**

### **Oblast techniky**

Vynález se týká prostředků pro místní podání na lidskou pokožku a jejich použití ke zesvětlení lidské pokožky.

### **Dosavadní stav techniky**

Mnoho lidí se zajímá o stupeň pigmentace své pokožky. Například lidé se stařeckými skvrnami nebo pihami si mohou přát, aby byly tyto pigmentové skvrny méně výrazné. Jiní mohou chtít omezit ztmavnutí pokožky vyvolané slunečním svitem nebo zesvětlení své přirozené barvy kůže. Pro splnění těchto požadavků bylo učiněno mnoho pokusů o vytvoření výrobků, snižujících tvorbu pigmentu v melanocytech. Ovšem látky, rozpoznané až do nynějška, mají sklon vykazovat nežádoucí vedlejší účinky, například dráždí pokožku. V důsledku toho nejsou takové látky vhodné pro kosmetické použití, anebo mohou být nanášeny jen v takových koncentracích, při nichž je jejich účinek na zesvětlení pokožky menší, než by bylo požadováno. Pro snížení nežádoucích vedlejších účinků lze uvažovat použití kombinace různých látek zesvětlujících pokožku. Existuje však značné riziko, že použitím takové kombinace se vzhledem ke kompetitivním účinkům sníží zesvětlení pokožky. Proto přetrvává potřeba zlepšení účinnosti kosmetických výrobků, zesvětlujících pokožku.

GB 2 287 405 předkládá kosmetický přípreavek pro bělení pokožky, který obsahuje kombinaci extraktu z *Glycyrrhyza glabra* nebo odpovídajících rostlinných druhů a  $\alpha$ -hydroxy-,  $\beta$ -hydroxy- nebo keto-kyseliny či amidu, soli nebo esteru takové látky. Uvádí se, že kombinace působí synergicky k inhibování tyrosinázy, čímž inhibuje tvorbu melaninu.

WO 94/07462 předkládá prostředky sloužící kromě jiného i k zesvětlení pokožky, obsahující retinol nebo jeho derivát a -diové kyseliny.

WO 94/09756 navrhuje použití retinolu nebo jeho derivátu, spolu se zvoleným činidlem zesvětlujícím pokožku, k různým účelům včetně zesvětlení barvy pokožky. Upřednostňovaným činidlem zesvětlujícím pokožku je hydrochinon, ovšem zmiňována jsou i různá jiná činidla, včetně extraktu z lékořice.

US 4 990 330 popisuje výrobky bělicí pokožku, obsahující koji-kyselinu v kombinaci s jinými látkami, které jsou zvoleny z celé škály látek, včetně kyseliny azelaové. Je uvedeno, že kombinace synergicky inhibuje syntézu melaninu.

JP 63284119 podle Derwentova abstraktu navrhuje externí činidlo k použití na pokožku, mající bělicí účinky a chránící vůči UV-záření, které obsahuje kyselinu isoferulovou nebo její sole a organickou kyselinu či její sole.

JP 6199646 podle Derwentova abstraktu popisuje kosmetický výrobek k bělení pokožky, který obsahuje rostlinný extrakt, močovinu a stabilizátor močoviny. Extrakt může být zvolen z široké škály rostlin včetně glycyrrhizae radix (lékořicového kořenu). Podobně může být stabilizátor močoviny zvolen ze široké skupiny, která zahrnuje alifatické dikarboxylové kyseliny.

WO 98/17269 předkládá prostředky, obsahující zinečné sole konjugované kyseliny linolové, k léčbě kožních onemocnění jako jsou ekzém, lupenka a dermatitidy. Popsané prostředky nejsou používány k inhibici syntézy melaninu, ani nejsou obohaceny specifickým trans 10, cis 12 isomerem konjugované kyseliny linolové.

US 4 393 043 popisuje kosmetické přípravky pro místní aplikaci vitamínů na pokožku, zejména vitamínu F, který sestává zejména z kyseliny linolové. Přípravky jsou stabilizovány přidáním rostlinného oleje. Nejsou zde nikde zmíněny prostředky obohacené jedním specifickým isomerem kyseliny linolové, ani přípravky nejsou používány k inhibici syntézy melaninu.

Výše zmíněné výrobky dosud nenalezly široké přijetí a v této oblasti tak zůstává potřeba zlepšení.

Autoři vynálezu nyní zjistili, že rostoucí redukci melaninového produktu lze získat aplikací na kůži takových kosmetických prostředků, které obsahují specifický isomer konjugované kyseliny linolové, nebo jeho deriváty.

### **Podstata vynálezu**

Podle prvního aspektu předkládaného vynálezu je zde poskytován prostředek pro místní podání, zahrnující:

(a) konjugovanou kyselinu linolovou, a/nebo její deriváty, zahrnující částice konjugované kyseliny linolové, kde alespoň 1 % hmotn. konjugované kyseliny linolové a/nebo částic je přítomno jako trans 10, cis 12 isomer; a

(b) dermatologicky přijatelné vehikulum (pojidlo, nosič).

Takové prostředky jsou zvláště vhodné k místnímu nanášení na lidskou pokožku k posílení redukce tvorby melaninu a tím k zesvětlení pokožky, na niž byly nanесeny.

Podle druhého aspektu poskytuje předkládaný vynález kosmetický postup pro zesvětlení lidské pokožky, způsob, zahrnující nanášení prostředku pro místní podání, jak byl popsán výše, na kůži.

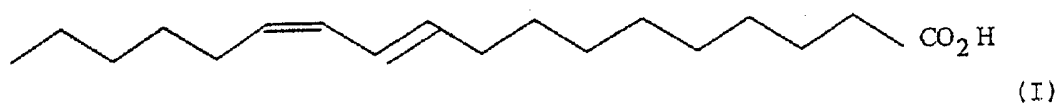
V dalším aspektu vynález rovněž poskytuje použití konjugované kyseliny linolové, a/nebo derivátů této látky, obsahujících částice konjugované kyseliny linolové, v prostředku pro místní použití k zesvětlení lidské pokožky, v němž alespoň 1 % hmotnosti konjugované kyseliny linolové a/nebo částic je přítomno jako trans 10, cis 12 isomer.

V ještě dalším aspektu vynálezu, se zvrát zesvětlení kůže, vyvolaného působením výše popsané konjugované linolové kyseliny a/nebo jejích derivátů, zabráňuje začleněním ochrany vůči slunečnímu záření, absorbující ultrafialové záření, do prostředků podle prvního aspektu předkládaného vynálezu. Výrazem "ochrana vůči slunečnímu záření" se míní jakýkoli materiál, ať organický nebo anorganický, který může chránit pokožku před ultrafialovým zářením v rozmezí 290 až 400 nm.

Trans10, cis12 isomer, obsahující konjugovanou linolovou kyselinu

Konjugovaná kyselina linolová (zde označovaná jako CLA) zahrnuje skupinu polohových a geometrických isomerů kyseliny linolové, u nichž jsou možné různé konfigurace cis a trans dvojných vazeb v polohách (6, 8), (7, 9), (8, 10), (9, 11), (10, 12) nebo (11, 13). Existuje tedy 24 odlišných isomerů CLA.

Základní aktivní látkou prostředků podle předkládaného vynálezu je trans 10, cis 12 (dále zde uváděný jako t10, c12) isomer. Tento konkrétní isomer volné kyseliny má strukturu (I), znázorněnou níže:



Vynález rovněž obsahuje deriváty volné kyseliny, které tak obsahují konjugované částice kyseliny linolové. Deriváty s výhodou zahrnují ty, jež jsou získány substitucí karboxylové skupiny kyseliny, jako jsou estery (např. retinylové estery, triglyceridové estery, monoglyceridové estery, diglyceridové estery, fosfoestery), amidy (např. ceramidové deriváty), sole (např. sole alkalického kovu a sole kovů alkalických zemin, amonné sole); a/nebo ty, jež jsou získány substitucí na C18 uhlíkového řetězce, jako  $\alpha$ -hydroxy- a/nebo  $\beta$ -hydroxyderiváty.

V případě triglyceridových esterových derivátů jsou zahrnuty veškeré polohové isomery CLA substituentů na glycerolové kostře. Triglyceridy musejí obsahovat alespoň jednu CLA částici. Například ze tří esterifikovatelných poloh glycerolové kostry mohou být polohy 1 a 2 esterifikovány CLA a jiným tukem v poloze 3, anebo v jiném případě může být glycerolová kostra esterifikována CLA v polohách 1 a 3 a jiným tukem v poloze 2.

Kdekoli je v tomto popisu vynálezu použitý výraz "konjugovaná kyselina linolová" nebo "CLA", je třeba ho chápat tak, že jsou v něm rovněž zahrnuty deriváty, obsahující CLA částice.

Výraz "CLA částice" se vztahuje k acylové části (částím) dlouhého alifatického řetězce CLA derivátu.

Výraz "t10, c12 isomer obsahující CLA" znamená, že alespoň 1 % hmotn. celkové CLA a/nebo CLA částic, přítomných v prostředku, je ve formě trans 10, cis 12 isomeru. S výhodou je ve formě t10, c12 isomeru alespoň 20 %, lépe pak alespoň 50 % hmotn. celkové CLA a/nebo částic přítomných v prostředku. Ve zvláště upřednostňovaném ztělesnění je ve formě t10, c12 isomeru alespoň 70 %, hmotn. celkové CLA a/nebo částic.

CLA a/nebo její deriváty obsahující CLA částice podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny způsobem, popsáním ve WO 97/18320. Upřednostňovaný způsob přípravy je uveden níže v Příkladu 1.

Aktivní látka, isomer t10, c12 obsahující CLA, pro použití podle předkládaného vynálezu, je v prostředku pro místní podání přítomna v účinném množství. Běžně je celkové množství aktivní látky přítomno v množství od 0,00001 % do 50 % hmotnostních prostředku. Ještě lépe je toto množství v rozmezí od 0,01 % do 10 % a nejlépe od 0,1 % do 5 % pro maximální přínos při nejmenších nákladech.

## Dermatologicky přijatelné vehikulum

Prostředek podle vynálezu rovněž obsahuje dermatologicky/kosmeticky přijatelné vehikulum, působící jako ředidlo, dispersní látka nebo nosič pro aktivní látku, t10, c12 isomer, obohacený CLA. Vehikulum může obsahovat materiály běžně používané u výrobků pro péči o pokožku jako jsou voda, kapalná nebo pevná změkčovadla, silikonové oleje, emulgátory, rozpouštědla, zvlhčovadla, zahušťovadla, prášky, hnací látky (propelanty) a podobně.

Vehikulum bude obvykle tvořit od 5 % do 99,9 % a s výhodou od 25 % do 80 % hmotnosti prostředku a může, v nepřítomnosti jiných kosmetických přídatných látek, vytvářet zůstatek prostředku.

## Volitelné látky přínosné pro pokožku a kosmetické přídatné látky

Kromě aktivní látky, t10, c12 isomeru s obsahem CLA, mohou být začleněny do prostředku i jiné specifické aktivní látky přínosné pro pokožku, jako jsou ochranné látky vůči slunečnímu záření a/nebo jiná činidla zesvětlující pokožku. Pokud je ochrannou látkou vůči slunečnímu záření organická látka, bude obvykle obsahovat alespoň jedno chromoforní činidlo absorbující v ultrafialové oblasti od 290 do 400 nm. Chromoforní organická činidla chránící před slunečním zářením lze rozdělit do následujících kategorií (se specifickými příklady), zahrnujících: kyselinu p-aminobenzoovou, její sole a deriváty (ethylové, isobutylové, glycerylové estery; kyselinu p-dimethylamino-benzoovou); anthraniláty (o-aminobenzoáty; methylové, fenylové, benzylové, fenylethylové, linalylové, terpinyllové a cyklohexenyllové estery); salicyláty (oktylové, amylové, fenylové, benzylové, menthylové, glycerylové a dipropylenglykolové estery); deriváty kyseliny skořicové (menthylové a benzylové estery, a-fenylcinnamonnitril; butylcinnamoylpyruvát); deriváty kyseliny dihydroxyskořicové (umbelliferon, methylumbelliferon, methylaceto-umbelliferon); deriváty kyseliny trihydroxyskořicové (esculetin, methylesculetin,

daphnetin, a glukosidy, esculin a daphnin); uhlovodíky (difenylbutadien, stilben); dibenzalaceton a benzalacetofenon; naftolsulfonáty (sodné sole 2-naftol-3,6-disulfonové kyseliny a 2-naftol-6,8-disulfonové kyseliny); kyselinu dihydroxynaftoovou a její sole; o- a p-hydroxybifenyldisulfonáty; kumarinové deriváty (7-hydroxy, 7-methyl, 3-fenyl); diazoly (2-acetyl-3-bromoindazol, fenylbenzoxazol, metylnaftoxazol, různé arylbenzothiazoláty; chininové sole (bisulfát, sulfát, chloridoleát a tanát); chinolinové deriváty (8-hydroxychinolinové sole, 2-fenylchinolin); hydroxy- nebo methoxy-substituované benzofenony; kyselinu močovou a vilourovou; kyselinu tříslou a její deriváty (např. hexaethylether); (butylkarbityl) (6-propylpiperonyl)ether; hydrochinon; benzofenony (oxybenzon, sulisobenzon, dioxybenzon, benzoescorcinol, 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenon, 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzofenon, oktabenzon; 4-isopropyldibenzoylmethan, butylmethoxydibenzoylmethan; etocrylen; a 4-isopropyl-dibenzoylmethan).

Zvláště vhodné jsou: 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamát, 4,4'-t-butyl-methoxydibenzoylmethan, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, oktyldimethyl-p-aminobenzoová kyselina, digalloyltrioléat, 2,2-dihydroxy-4-methoxybenzofenon, ethyl-4-[bis(hydroxypropyl)]aminobenzoát, 2-ethylhexylsalicylát, glyceryl-p-aminobenzoát, 3,3,5-trimethylcyklohexylsalicylát, methylantranilát, p-dimethylaminobenzoová kyselina nebo aminobenzoát, 2-ethylhexyl-p-dimethylaminiobenzoát, 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina, 2-(p-dimethylaminofenyl)-5-sulfoniobenzoxazolová kyselina a směsi takových látek.

Vhodná obchodně dostupná organická činidla, chránící vůči slunečnímu záření, jsou ta, popsána v následující tabulce.



Tabulka 1

| název podle CTFA                              | firemní název      | dodavatel         |
|-----------------------------------------------|--------------------|-------------------|
| benzofenon-3                                  | UVINUL M-40        | BASF Chemical Co. |
| benzofenon-4                                  | UVINUL MS-40       | BASF Chemical Co. |
| benzofenon-8                                  | SPECTRA-SORB UV-24 | American Cyanamid |
| DEA-methoxyskořičnan                          | BERNEL HYDRO       | Bernel Chemical   |
| ethyldihydroxypropyl-PABA                     | AMERSCREEN P       | Amerchol Corp.    |
| glyceryl-PABA                                 | NIPA G.M.P.A.      | Nipa Labs.        |
| homosalate                                    | KENESTER HMS       | Humko Chemical    |
| menthylantranilát                             | SUNAROME UVA       | Felton Worldwide  |
| octocrylene                                   | UVINUL N-539       | BASF Chemical Co. |
| oktyldimethyl-PABA                            | AMERSCOL           | Amerchol Corp.    |
| oktylmethoxyskořičnan                         | PARSOL MCX         | Bernel Chemical   |
| oktylsalicylát                                | SUNAROME WMO       | Felton Worldwide  |
| PABA<br>(kys. paraaminobenzoová)              | PABA               | National Starch   |
| 2-fenylbenzimidazol-5-sulfono-<br>vá kyselina | EUSOLEX 6300       | EM Industries     |
| TEA-salicylát                                 | SYBARINE W         | Felton Worldwide  |
| 2-(4-methylbenzyliden)kafr                    | EUSOLEX 6300       | EM Industries     |
| benzofenon-1                                  | UVINUL-400         | BASF Chemical Co. |
| benzofenon-2                                  | UVINUL D-50        | BASF Chemical Co. |
| benzofenon-6                                  | UVINUL D-49        | BASF Chemical Co. |
| benzofenon-12                                 | UVINUL 408         | BASF Chemical Co. |
| 4-isopropyldibenzoylmethan                    | EUSOLEX 8020       | EM Industries     |
| butylmethoxydibenzoylmethan                   | Parsol 1789        | Givaudan Corp.    |
| etocrylene                                    | UVINUL N-35        | BASF Chemical Co. |

DEA = diethanolamin, TEA = triethanolamin

Použity mohou být i anorganické látky, chránící před slunečním zářením, jako mikromletý oxid titaničitý, oxid zinečnatý, polyethylen, polyamidy (např. nylon) a různé jiné polymery. Množství činidel, chránících před slunečním zářením (ať organických nebo anorganických), se bude obecně pohybovat od 0,1 do 30 %, lépe od 2 do 20 % a optimálně od 4 do 10 % hmotnostních.

Vehikulum může rovněž dále obsahovat přídatné látky jako jsou parfémy, antioxidanty, zneprůhledňující látky, konzervační látky, barviva a pufry.

#### Příprava výrobku, formování, použití a balení

Pro přípravu prostředku pro místní podání podle předkládaného vynálezu může být použito obvyklého způsobu přípravy výrobků pro péči o pokožku. Aktivní složky jsou obecně začleněny do dermatologicky přijatelného nosiče běžným způsobem. Aktivní složky mohou být vhodně nejprve rozpuštěny nebo dispergovány v části vody či jiného rozpouštědla nebo tekutiny, která má být začleněna do prostředku. Upřednostňovanými prostředky jsou emulze typu oleje ve vodě nebo typu vody v oleji.

Prostředek může být také ve formě běžných výrobků pro péči o pokožku jako je krém, gel či pleťová voda a podobně. Prostředek může být rovněž ve formě tak zvaného "smývatelného" výrobku, například koupelového či sprchového gelu, který může obsahovat dávkovací zařízení pro aktivní látky k podpoře přilnavosti na pokožku během oplachování. Nejvíce se upřednostňuje výrobek ve formě "nesmývaného" výrobku, určeného pro nanesení na pokožku bez záměrného opláchnutí brzo po nanesení.

Prostředek může být balen jakýmkoli vhodným způsobem jako v nádobce, v lahvi, v tubě, v nádobce s kuličkovým rolerem a podobně, a to běžným způsobem.

Výrobek může být nanášen na pokožku stejným způsobem jako běžné výrobky pro péči o pokožku, např. může být nanášen 1 až 3 krát denně na pokožku např. tváře a/nebo rukou a paží. V případě pigmentových skvrn může uživatel například zvolit nanášení výrobku pouze na postižená místa. Zesvětlení kůže se obvykle stane viditelným po 2 až 3 měsících v závislosti na stavu pokožky, koncentraci aktivních složek ve výrobku a množství nanášeného výrobku a četnosti jeho nanášení. Předkládaný výrobek je zvláště vhodný pro obecné zesvětlení pokožky, zejména pokud obsahuje také ochranné činidlo proti slunečnímu záření v tom případě, že výrobek je určen pro denní používání.

Pro lepší pochopení předkládaného vynálezu jsou uvedeny, pouze pro jeho dokreslení, následující příklady.

#### **Příklady provedení vynálezu**

##### **Příklad 1**

Tento příklad ozřejmuje syntézu CLA, obsahující 80,5 % hmotnostních t10, c12 isomeru vzhledem ke hmotnosti celkových částic CLA.

Směsné isomery CLA se připravují alkalickým působením za vysoké teploty na saflorový olej, přičemž vzniká CLA se stejnými množstvími isomeru c9, t11 a isomeru t10, c12. CLA obohacená isomerem c9, t11 se ze směsi odděluje selektivní esterifikací s laurylalkoholem za použití *Geotrichum Candidum* jako katalyzátoru. Po kroku esterifikace a oddělení jsou zbývající volné kyseliny CLA obohaceny isomerem t10, c12 a izolovány.

##### **Výroba směsných isomerů CLA**

Hydroxid sodný (0,6 kg) jako vysoce čisté analytické činidlo (označení Analar®, AR) byl rozpuštěn v 6 kg propylenglykolu o farmaceutické čistotě smísením a zahřátím na 80 až 85°C. Vzorek byl ochlazen a poté byly přidány 2

kg saflorového oleje. Za použití zařízení pro pokusná množství byla směs udržována ve varu pod zpětným chladičem (při refluxu) po dobu 3 hodin za rychlého míchání a při teplotě 170°C. Pak byla reakční směs ochlazená přibližně na 95°C, míchání bylo zpomalené na střední rychlost a směs byla neutralizována za použití 1,28 litru 35,5 % kyseliny chlorovodíkové, rozpuštěné v demineralizované vodě (8 l), při udržování teploty přibližně na 90°C. Reakční směs byla ponechána se usadit a vodná fáze byla slita. Olejová fáze byla dvojnásobně promyta vždy 1 litrem 5 % AR solného roztoku a dvojnásobně promyta vždy 1 litrem demineralizované vody při 90°C, přičemž byl odstraňován jakýkoli mýdlovitý materiál. Olej obohacený CLA byl sušen při 100°C ve vakuu před odvodněním při teplotě přibližně 50°C a zfiltrován na Büchnerově nálevce přes filtrační papír Whatman a tenkou vrstvu celitového hyflo-filtru. Olej s obsahem směsných isomerů CLA byl do své spotřeby uchováván pod dusíkem při -25°C.

#### Výroba CLA, obohacené c9, t11 isomerem

##### (I) Příprava laurylesterů:

CLA, připravená ze světlice (2,0 kg), byla přidána ke 2 molárním ekvivalentům laurylalkoholu (1-dodekanol; 98 % od Aldrich chem.) spolu s 5,96 kg demineralizované vody. Teplota byla upravena na 25°C a 1 % (hm./hm.) *Geotrichum Candidum* (od Amano Pharmaceuticals, Japonsko) bylo přidáno po předchozím smísením s malým množstvím vody a důkladně mícháno. Reakce byla ukončena po 44 hodinách. Nádobu byla zahřáta na 80 až 90°C, vodná vrstva byla odčerpána a olej byl promyt demineralizovanou vodou a sušen ve vakuu 30 minut při 100°C. Poté byl olej zchlazen na 50°C a zfiltrován na Büchnerově nálevce přes filtrační papír Whatman a tenkou vrstvu celitového hyflo-filtru.

##### (II) Oddělení obohacené t10, c12 CLA:

Zbylý laurylalkohol byl odstraněn při 130°C rychlostí 25 až 35 ml za minutu molekulární destilací. Zbytek byl hrubě rozdělen na laurylestery (obohacené c9, t11 CLA) a volné kyseliny (obohacené t10, c12 CLA) odpařením při 158°C a rychlosti toku 25 až 35 ml za minutu.

#### Isolace obohacené t10, c12 CLA

Volné kyseliny CLA z kroku (II) uvedeného výše byly opět destilovány při 160-165°C a rychlosti toku 20 až 30 ml za minutu ke snížení obsahu esteru. Obsah zbytkového laurylalkoholu byl dále snížen destilací při 131°C a rychlosti toku 25 až 30 ml za minutu. Pro odstranění veškerého zbytkového laurylalkoholu byly volné alkoholy esterifikovány na mastné kyseliny přítomné v reakční směsi za použití SP392 *Mucor miehei* lipázy (5%, šarže 0110 od Novo Nordisk). Obohacená t10, c12 CLA, obsahující mastné kyseliny, byla oddělena od laurylesterů za použití molekulární destilace ve vakuu při 155°C a rychlosti toku 15 až 20 ml za minutu. Složení obohacené t10, c12 CLA, vyrobené tímto způsobem, je uvedena níže v Tabulce 1.

Tabulka 1

| složení typ. preparátu mastných kyselin<br>CLA, obohaceného t10, c12 (hm. %) | <b>B</b>                  |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| c9, t11                                                                      | 8,3                       |
| t10, c12                                                                     | 53,9 (80,5 % celkové CLA) |
| c9, c11 & c10, c12                                                           | 2,9                       |
| t9, t11t & t10, 12t                                                          | 1,1                       |
| jiná CLA                                                                     | 0,7                       |
| <b>celková CLA</b>                                                           | <b>66,9</b>               |
| mastné kyseliny 16:0                                                         | 13,6                      |
| 16:1                                                                         | -                         |
| 18:0                                                                         | 4,6                       |
| 18:1                                                                         | 10,3                      |
| 18:2 (ne CLA)                                                                | 3,1                       |
| jiné mastné kyseliny                                                         | 1,5                       |

## Příklad 2

### Příprava t10, c12 CLA triglyceridů

CLA obohacená t10, c12 isomerem (10 g), připravená podle příkladu 1, byla smísena s 1,01 g (10,1 %) glycerolu (Pricerine 9083 glycerin CP od firmy Ellis and Everards) a přidáno bylo 0,5 g (přibližně 5 %) nespecifické lipázy z SP392 *Mucor Miehe* (*Mucor Miehe* od firmy Novo Nordisk, šarže 0110). Smíchané látky byly míchány ve vakuu v rotační odparce při 60°C za slabého unikání dusíku.

Po 96 hodinách byla reakce zastavena filtrací směsi přes tenkou vrstvu filtrační pomůcky celite super-cel na Büchnerově nálevce, čímž byla shromážděna olejová fáze s obsahem CLA triglyceridů. Její složení je uvedeno níže v Tabulce 2.

Tabulka 2

| složení mastných kyselin v triglyceridech | poměrné proc. údaje z celkových mastných kyselin lipidu |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| c9, t11                                   | 8,3                                                     |
| t10, c12                                  | 54,8 ( <b>81,7 % celkové CLA</b> )                      |
| c9, c11 & c10, c12                        | 2,7                                                     |
| t9, t11t & t10, 12t                       | 1,3                                                     |
| jiná CLA                                  | 0                                                       |
| <b>celková CLA</b>                        | <b>67,1</b>                                             |
| mastné kyseliny 16:0                      | 13,5                                                    |
| 16:1                                      | 0,1                                                     |
| 18:0                                      | 4,9                                                     |
| 18:1                                      | 10,3                                                    |
| 18:2 (ne CLA)                             | 3,4                                                     |
| jiné mastné kyseliny                      | 0,7                                                     |

### Příklad 3

#### Metodologie stanovení

##### Uchovávání buněk

Buňky melanomu B16-F1 myši (Americká sbírka typů kultur, American Type culture Collection, Maryland, USA) byly uchovávány v kultivačních lahvích o objemu 75 cm<sup>2</sup> v médiu RPMI 1640 (ICN-Flow, katalog. číslo 12-60-54), doplněném L-glutaminem (4 mmol.l<sup>-1</sup>) a 10% fetálním hovězím sérem (FBS) při 37°C ve vodou nasycené atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu. Buňky byly pasážovány dvakrát týdně.

##### Stanovení pigmentace

Málo se slévající B16 buňky byly zaočkovány na 96 jamkové mikrotitrační destičky v hustotě 5 000 buněk na jamku a poté byly kultivovány přes noc v médiu DMEM (Life Technologies, NY), obsahujícím 10% fetální hovězí sérum a 1% penicilin/streptomycin bez fenolové červeně při 37°C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Po 24 hodinách bylo médium nahrazeno čerstvým médiem, obsahujícím testované látky, nebo kontrolní vehikulum. Buňky byly inkubovány 72 hodin, po nichž byl melanin v kontrolních jamkách viditelný. Dále bylo médium obsahující melanin z každé jamky přeneseno do prázdné 96 jamkové destičky a kvantifikováno odečtením absorbance při 530 nm za použití spektrofotometru pro mikrotitrační destičky (Dynatech MR5000) a korigováním vůči základní absorpci čerstvého média. Vzhledem k tomu, že korigovaná absorpce odpovídá koncentraci melaninu, procentní množství pigmentace pro látku, testovanou na zesvětlení pokožky, může být počítáno jako:

$$\% \text{ pigmentace} = (\text{OD}_{530} \text{ test} / \text{OD}_{530} \text{ ref}) \times 100 \%$$

kde  $OD_{530}$  test a  $OD_{530}$  ref označují průměrnou korigovanou absorpci média z buněk s testovanou látkou a průměrnou korigovanou absorpci média z buněk bez testované látky. Procentní inhibice vyvolaná testovanou látkou tedy činí  $100 - \% \text{ pigmentace}$ .

#### Stanovení životnosti buněk

Produkce melaninu může být snížena inhibicí melanogenese, ale může být ovlivněna také cytotoxicitou, nebo buněčnou proliferací. K otestování, zda k takovým jevům došlo, byla sledována životnost buněk absorpcí neutrálního červeného barviva. Neutrální červen je vodou rozpustné barvivo, které prochází neporušenou plazmatickou membránou a koncentruje se v lysosomech neporušených buněk. Celkové zachycení neutrální červeně je úměrné počtu živoucích buněk v kultuře.

Ihned po odstranění média z mikrotitračních jamek pro stanovení melaninu bylo k buňkám přidáno 200  $\mu\text{l}$  čerstvého, předeštěného barviva neutrální červen (od firmy Sigma, UK, katalog. číslo 2889) v množství 25  $\mu\text{g/ml}$  média a inkubováno 3 hodiny jako při kultivaci buněk. Barvivo, které nebylo absorbováno buňkami, bylo odstraněno převrácením destičky a poklepáním na ssavý papír. Buňky byly promyty 200  $\mu\text{l}$  PBS (pufrovaný solný roztok), který pak byl opět odstraněn. Následně bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  rozpouštědla (50 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 49 % ethanolu, 1 % kyseliny octové). Po 20 minutách při teplotě okolí byla každá destička 5 sekund protřepávána na třepačce pro mikrotitrační destičky. Absorpce byla měřena tak, jak bylo popsáno výše.

#### Testy

Tabulka 3 viz níže udává látky, stanovované v testu zesvětlení pokožky a množství, v nichž byly podávány. Rovněž jsou v ní uvedena procenta inhibice tvorby melaninu, vyvolané dříve popsányými testovanými látkami.



Hodnoty menší než 100% melaninová kontrola ukazují na inhibici melanogenese. Výsledky v tabulce 3 tedy ukazují, že CLA obsahující t10, c12 isomer CLA inhibuje tvorbu melaninu.

V pokusech byly testované sloučeniny naředěny pomocí DMEM v množstvích, uvedených níže v tabulce 3.

"CLA t10, c12" v tabulce odpovídají CLA, kde 80,5 % hmotn. z celkové CLA představuje t10, c12 isomer, tj. aktivní činidlo, patřící do rozsahu předkládaného vynálezu. Připraveno bylo podle popisu ve výše uvedeném příkladu 1.

Tabulka 3

| působení            | melanin v médiu |       |                 | životnost buněk měřená neutrální červení |       |                 |
|---------------------|-----------------|-------|-----------------|------------------------------------------|-------|-----------------|
|                     | % kontroly      | S. D. | t-test/kontrola | % kontroly                               | S. D. | t-test/kontrola |
| kontrola            | 100,0           | 8,5   |                 | 100,0                                    | 4,6   |                 |
| 1:100 t10, c12 CLA  | 4,0             | 0,9   | ** (0,000)      | 1,2                                      | 0,6   | ** (0,000)      |
| 1:250 t10, c12 CLA  | 4,2             | 0,8   | ** (0,000)      | 89,5                                     | 3,5   | ** (0,000)      |
| 1:500 t10, c12 CLA  | 4,0             | 0,5   | ** (0,000)      | 90,4                                     | 3,3   | ** (0,000)      |
| 1:750 t10, c12 CLA  | 9,7             | 11,5  | ** (0,000)      | 97,6                                     | 7,2   | (0,257)         |
| 1:1000 t10, c12 CLA | 9,8             | 6,4   | ** (0,000)      | 96,2                                     | 4,4   | * (0,042)       |

Studentův t-test: \*\*  $p < 0,01$  \*  $p < 0,05$  (n=4)

#### Příklad 4

Níže uvedené složení popisuje emulzní krém podle předkládaného vynálezu.

| plný chem. název či název dle CTFA                                                                | firemní název             | %<br>hmotnostní |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------|
| triglycerid CLA (80,5 % t10, c12 isomeru vzhledem k hmotn. celk. CLA částic vyrobených dle př. 2) |                           | 2,0             |
| dvojsodná sůl EDTA                                                                                | Sequesterene Na2          | 0,05            |
| křemičitan hořečnat-hlinitý                                                                       | Veegum Ultra              | 0,6             |
| methylnparaben                                                                                    | Methyl Paraben            | 0,15            |
| simethicon                                                                                        | DC Antifoam Emulsion      | 0,01            |
| butylenglykol 1,3                                                                                 | Butylene Glycol 1,3       | 3,0             |
| hydroxyethylcelulóza                                                                              | Natrosol 250HHR           | 0,5             |
| glycerin, podle US lékopisu                                                                       | Glycerine USP             | 2,0             |
| xanthanová guma                                                                                   | Keltrol 1000              | 0,2             |
| triethanolamin                                                                                    | Triethanolamine 99 (%)    | 1,2             |
| kyselina stearová                                                                                 | Pristerene 4911           | 3,0             |
| propylparaben, nehořlavý                                                                          | Propylparaben NF          | 0,1             |
| glycerylhydrostearát                                                                              | Naturechem GMHS           | 1,5             |
| stearylalkohol                                                                                    | Lanette 18DEO             | 1,5             |
| isostearylpalmitát                                                                                | Protachem ISP             | 6,0             |
| oktanoát C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> alkoholů                                                | Hetester FAO              | 3,0             |
| dimethicon                                                                                        | Silicone Fluid 200 (50 %) | 1,0             |
| cholesterol, nehořlavý                                                                            | Cholesterol NF            | 0,5             |
| stearát sorbitanu                                                                                 | Sorbitanstearat           | 1,0             |
| butylovaný hydroxytoluen                                                                          | Embanox BHT               | 0,05            |

|                           |                           |                       |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| tokoferylacetát           | Acetát vitamínu E         | 0,1                   |
| stearát PEG-100           | MYRJ 59                   | 2,0                   |
| stearyllaktylát sodný     | Pationic SSL              | 0,5                   |
| retinylpalmitát           | Palmitát vitamínu A       | 0,06                  |
| kyselina hydroxykaprylová | kyselina hydroxykaprylová | 0,01                  |
| alfa-bisabolol            | alfa-bisabolol            | 0,2                   |
| voda, deionizovaná        |                           | dle potřeby<br>do 100 |

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

Dimethicone, Simethicon = protipěňivé emulze na bázi dimethylpolysiloxanu,  
vyrábí např. firmy Dow Corning či Elkay

PEG = polyethylenglykol

#### **Příklad 5**

Složení krému na pokožku (typu oleje ve vodě) s ochranou vůči slunečnímu záření podle předkládaného vynálezu je popsáno níže:

| přísada                          | hmotn. %    |
|----------------------------------|-------------|
| hydroxyethylcelulóza             | 0,50        |
| křemičitan hořečnat-hlinitý      | 0,75        |
| kakaové máslo                    | 1,25        |
| skvalen                          | 1,05        |
| isostearyl isononanoátu          | 2,25        |
| DC Silicone Fluid 200® (50 CST)  | 1,25        |
| DC Silicone Fluid 200® (100 CST) | 0,50        |
| butylenglykol                    | 3,00        |
| Parsol MCX®                      | 3,00        |
| Parsol 1789®                     | 3,00        |
| glycerin                         | 2,50        |
| hyaluronát sodný                 | 0,50        |
| CLA triglycerid t10, c12         | 5,00        |
| glycereth-7-hydroxystearát       | 1,50        |
| kyselina stearová                | 3,50        |
| cetyl/stearylalkohol             | 2,55        |
| sodná PCA                        | 2,10        |
| glyceryl hydroxystearátu         | 1,25        |
| tokoferol                        | 0,35        |
| methylparaben                    | 0,20        |
| propylparaben                    | 0,10        |
| Glydant®                         | 0,30        |
| steareth-20                      | 1,20        |
| dvojsodná sůl EDTA               | 0,05        |
| triethanolamin                   | 1,50        |
| deionizovaná voda                | dle potřeby |

Parsol MCX® = 2-ethylhexyl-p-methoxyskořičnan

Parsol 1789 = butylmethoxydibenzoylmethan; avobenzon

DC Silicone Fluid 200® = dimethylsiloxanový polymer, viskozita v SI:

$$1\text{cps}=10^{-6}\text{m}^2\text{s}^{-1}$$

Glydant® = [DMDM(dimethylolmethyl)hydantoin]

glycereth = polyethylenglykolový ester glycerinu

steareth 20 = polyoxyethylen(20)stearylether

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prostředek pro místní podání, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) konjugovanou kyselinu linolovou, a/nebo její deriváty, kde alespoň 50 % hmotn. konjugované kyseliny linolové a/nebo jejích derivátů je přítomno jako trans-10, cis-12 isomer; a

(b) dermatologicky přijatelný nosič.

2. Prostředek pro místní podání podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje 0,00001 % až 50 % hmotnostní prostředku a lépe 0,01 až 10 % hmotnostní prostředku uvedené konjugované kyseliny linolové a/nebo jejích derivátů.

3. Prostředek pro místní podání podle kteréhokoli z nároků 1 či 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že rovněž obsahuje ochranu vůči slunečnímu záření.

4. Způsob kosmetického zesvětlení lidské pokožky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se na pokožku nanáší prostředek pro místní podání podle nároku 1, 2 nebo 3.

5. Použití konjugované kyseliny linolové a/nebo jejích derivátů v kosmetickém prostředku pro místní podání k zesvětlení lidské pokožky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že alespoň 50 % hmotn. konjugované kyseliny linolové a/nebo jejích derivátů je přítomno jako trans 10, cis 12 isomer.