

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

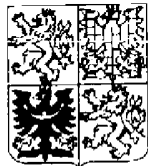
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 1088-99

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18. 09. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.09.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/721878**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**  
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/05139**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/13019**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**A 61 K 7/48**

(71) Přihlašovatel:

UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;

(72) Původce:

Granger Stewart Paton, Paramus, NJ, US;

Scott Ian Richard, Allendale, NJ, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha  
1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Kosmetický prostředek**

(57) Anotace:

Kosmetický prostředek obsahující a/ 0,001 až 10 % retinoidu, který se volí z retinolu, retinyl-esteru a směsi těchto látek, b/ 0,0001 až 50 % kyseliny, která se volí z kyseliny oleanolové, urosolové a směsi těchto látek a c/ kosmeticky přijatelný nosič. Prostředek je vhodný na vrásčitou kůži, suchou, drsnou a olupující se pokožku, pokožku po oslunění, ale také na zdravou pleť k zábraně nebo zpomalení jejího stárnutí.

CZ 1088-99 A3

Kosmetický prostředek

Oblast techniky

Vynález se týká kosmetického prostředku, obsahujícího kyselinu a retinoid.

Dosavadní stav techniky

Retinol (vitamin A), je endogenní sloučenina, která se přírodně vyskytuje v lidském organismu a má zásadní význam pro normální diferenciaci epitheliálních buněk. Z tohoto důvodu byly přírodní i syntetické deriváty vitamínu A široce užívány k léčení různých kožních onemocnění a k obnově pokožky. Kyselina retinová byla užívána například k léčení akné, vrásek, lupenky, stařeckých skvrn a odlišně zbarvených oblastí pokožky, jak bylo popsáno například v publikacích Vahlquist A. a další, J. Invest. Dermatol., sv. 94, Hollad D. B. a Cunliffe W. J., 1990, str. 496 až 498, Ellis C. N. a další, Pharmacology of Retinols in Skin, Vasel, Karger, sv. 3, 1989, str. 249 až 252, Lowe N. J. a další, Pharmacology of Retinols in Sin, sv. 3, 1989, str. 240 až 248 a PCT patentová přihláška č. WO 93/19743.

Předpokládá se, že použití retinolu nebo esterů retinolu je výhodnější než použití kyseliny retinové. Retinol je endogenní látka, estery retinolu se hydrolyzují in vivo za vzniku retinolu a retinol i retinylestery jsou z uvedeného důvodu bezpečnější než kyselina retinová. Vynález je z části založen na zjištění, že při kombinaci retinolu nebo retinylesteru s kyselinou oleanolovou a/nebo ursolovou dochází k synergní inhibici diferenciaci keratinocytů. Kombinovaný účinek kyseliny oleanolové a/nebo ursolové a retinolu nebo retinylesteru je analogický účinku kyseliny retinové. Znamená to, že směs kyseliny oleanolové a/nebo ursolové s retinolem

nebo retinylesterem má obdobný účinek jako kyselina retinová, použití této směsi je však bezpečnější.

### Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří kosmetický prostředek pro péči o pleť, který obsahuje

- a) 0,001 až 10 % retinoidu, který se volí z retinolu, retinylesteru nebo směsi těchto látek,
- b) 0,0001 až 50 % sloučeniny, která se volí z kyseliny oleanolové, ursolové a směsi těchto látek a
- c) kosmeticky přijatelný nosič.

Uvedený prostředek je možno použít k péči o pleť místním nanesením prostředku na pokožku. Tímto způsobem je možno napodobit účinek kyseliny retinové na pokožku.

Pod pojmem "péče o pleť" se rozumí například: prevence a/nebo léčení suché pokožky nebo pokožky, poškozené zářením, zvláště slunečním zářením, léčení nebo prevence vrásek, stařeckých skvrn a jiných projevů stárnutí pokožky, jako jsou zvýšení flexibility stratum corneum nebo zesvětlení barvy pokožky, dále je možno pod tímto pojmem rozumět také potlačení tvorby mazu a obecně zlepšení stavu pokožky.

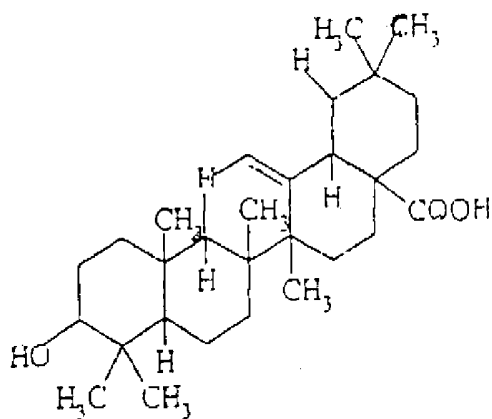
První základní složkou kosmetického prostředku podle vynálezu je sloučenina ze skupiny, tvořené retinolem a retinylesteru. Pod pojmem "retinol" se mimo jiné rozumí následující isomery retinolu. alfall-trans-retinol, 13-cis-retinol, 11-cis-retinol, 9-cis-retinol, 3,4-didehydroretinol. Výhodnými isomery jsou alfall-trans-retinol, 13-cis-retinol, 3,4-didehydroretinol a 9-cis-retinol. Nejvýhodnější je alfall-trans-retinol vzhledem k tomu, že je běžně dodáván.

Retinylester je ester retinolu. Retinylestery, vhodné pro použití v kosmetickém prostředku podle vynálezu mají 1 až 30 atomů uhlíku, s výhodou 2 až 20 atomů uhlíku v esterové skupině, nejvýhodnější jsou estery, obsahující 2, 3 a 16 atomů uhlíku vzhledem k tomu, že jsou běžně dostupné. Jako příklady retinylesterů je možno uvést například: retinylpalmitát, retinylformiát, retinylacetát, retinylpropionát, retinylbutyrát, retinylvalerát, retinylisovalerát, retinylhexanát, retinylheptanoát, retinylloktanoát, retinylnonanoát, retinyldekanoát, retinylundekanoát, retinyl Laurát, retinyltridekanoát, retinylmyristát, retinylpentadekanoát, retinylheptadekanoát, retinylstearát, retinylisostearát, retinylnonadekanoát, retinylarachidonát, retinylbehenát, retinyl-linoleát a retinyloleát.

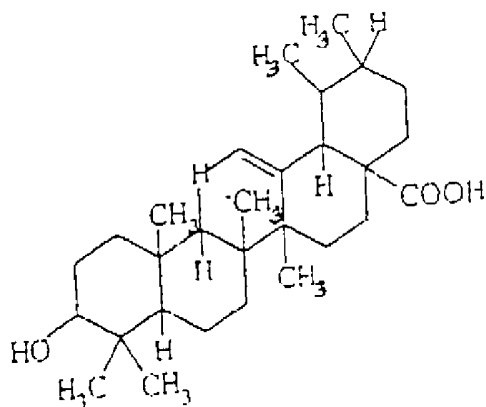
Výhodné estery pro použití v kosmetickém prostředku podle vynálezu se volí z retinylpalmitátu, retinylacetátu a retinylpropionátu vzhledem k tomu, že tyto látky se běžně dodávají a jsou proto nejlevnější. Retinyl linoleát je rovněž výhodný vzhledem ke své účinnosti.

Retinol a/nebo retinylester je v prostředku podle vynálezu obsažen v množství 0,001 až 10 %, s výhodou v množství 0,01 až 1 % a zvláště 0,01 až 0,5 %.

Druhou základní složkou kosmetického prostředku podle vynálezu je kyselina oleanolová, ursolová nebo směs těchto kyselin, které mají následující strukturu



kyselina oleanolová



kyselina ursolová

V závislosti na pH kosmetického prostředku mohou být obě kyseliny, kyseliny oleanolová a/nebo ursolová přítomny ve formě solí, například s alkalickými kovy nebo s kovy alkalických zemin.

Kyselina oleanolová a/nebo ursolová jsou v kosmetickém prostředku obsaženy v množství 0,0001 až 50, s výhodou 0,01 až 10 a zvláště 0,1 až 5 % hmotnostních.

## Kosmeticky přijatelný nosič

Kosmetický prostředek podle vynálezu obsahuje také kosmeticky přijatelný nosič jako ředidlo, disperzní prostředí nebo nosič pro retinol a/nebo retinylester a N-substituovaný amid mastné kyseliny, nosič nebo nosné prostředí slouží zejména ke snadnému nanášení kosmetického prostředku na pokožku.

Nosná prostředí, odlišná od vody nebo užívaná společně s vodou zahrnují kapalná nebo pevná změkčovadla, rozpouštědla, zahušťovadla, látky, zadržující vodu a různé práškové materiály. Zvláště výhodným nosičem nevodné povahy je polydimethylsiloxan a/nebo polydimethylfenylsiloxan. Silikony pro použití v kosmetickém prostředku podle vynálezu mají s výhodou viskozitu 10 až 10 000 000 mm<sup>2</sup>/s při teplotě 25 °C. Zvláště vhodné jsou směsi silikonů s nízkou a vysokou viskozitou. Tyto silikony se běžně dodávají pod obchodními názvy Vicasil SE a SF (General Electric Company) a pod čísla 200 a 550 (Dow Orning Company). Množství silikonu, které je možno použít v prostředku podle vynálezu je 5 až 95 %, s výhodou 25 až 90 % hmotnostních prostředku.

Kosmeticky přijatelný nosič bude tvořit obvykle 5 až 99,9, s výhodou 25 až 80 % hmotnostních prostředku a může v nepřítomnosti dalších kosmeticky přijatelných složek doplnit kosmetický prostředek na požadované množství. S výhodou tvoří nosné prostředí nejméně z 50 % a zvláště z 80 % hmotnostních voda. Výhodný obsah vody je zvláště 60 až 80 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost kosmetického prostředku.

Případné další účinné a pomocné složky

K získání emulze typu voda v oleji nebo olej ve vodě, může být v kosmetickém prostředku podle vynálezu obsažen olej nebo materiál typu oleje spolu s emulgátorem v závislosti na hydrofilnělipofilní rovnováze HLB použitého emulgátoru.

Kosmetické prostředky podle vynálezu s výhodou obsahují ochranné látky proti slunečnímu záření. Jde o materiály, běžně užívané k ochraně proti ultrafialovému záření. Z těchto látek je možno uvést deriváty PABA, cinnamát a salicylát. Je například možno použít oktylmethoxycinnamát a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, známý také jako oxybenzon. Oktylmethoxycinnamát a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon se běžně dodávají pod obchodními názvy Parsol MCX a Benzophenon-3. Přesné množství těchto látek v emulzi se může měnit v závislosti na požadovaném stupni ochrany proti slunečnímu záření.

Další výhodnou případnou složkou jsou esenciální mastné kyseliny EFA, to znamená takové mastné kyseliny, které jsou nezbytné pro tvorbu plasmatické membrány všech buněk, například u keratinocytů dochází při nedostatku EFA ke zvýšené proliferaci. Tento stav je možno léčit dodáním EFA. EFA také podporují biosyntézu lipidů v pokožce a zejména lipidy pro tvorbu bariery. Z esenciálních mastných kyselin je možno zvláště uvést kyselinu linolovou, gamma-linolenovou, homo-gamma-linolenovou, columbinovou, eicosa-(n-6,9,13)-trienovou, erachidonovou, timnodonovou, hexaenovou a směsi těchto kyselin.

Další výhodnou případnou složkou mohou být azoly, například climbazol, bifonazol, clotrimazol, ketoconazol, miconazol, econazol, itraconazol, fluconazol, terconazol, butoconazol, sulconazol, lionazol a směsi těchto látek. Azoly mohou být do kosmetického prostředku podle vynálezu přidává-

ny v množství 0,001 až 50, s výhodou 0,001 až 10 a zvláště v množství 0,1 až 5 % hmotnostních.

Do kosmetických prostředků podle vynálezu se často přidávají změkčovadla. Množství změkčovadel se může pohybovat v rozmezí 0,5 až 50, s výhodou 5 až 30 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost prostředku. Změkčovadla pro toto použití jsou látky z různých chemických skupin, jako estery, mastné kyseliny a alkoholy, polyoly a uhlovodíky.

Estery mohou být monoestery nebo diestery. Přijatelnými příklady diesterů mastných kyselin mohou být dibutyladipát, diethylsebakát, diisopropyldimerát a dioktylsukcinát. Přijatelné estery mastných kyselin s rozvětveným řetězcem zahrnují 2-ethylhexylmyristát, isopropylstearát a isostearylpalmitát. Přijatelné estery trikarboxylových kyselin zahrnují triisopropyltrilinoleát a trilaurylcitrát. Přijatelné estery mastných kyselin s přímým řetězcem zahrnují laurylpalmitát, myristyllaktát, oleylerukát a stearyloleát. Výhodnými estery jsou kokokaprylát/kapráť (směs kokokaprylátu a kokokapráťu), acetát myristyletheru propylenglykolu, diisopropyladipát a cetyloktanát.

Z vhodných mastných alkoholů a kyselin je možno uvést sloučeniny, obsahující 10 až 20 atomů uhlíku. Zvláště výhodné jsou cetyl-, myristyl-, palmityl- a stearylalkoholy a příslušné kyseliny.

Z polyolů, použitých jako změkčovadla je možno uvést alkylpolyhydroxysloučeniny s přímým nebo rozvětveným řetězcem. Výhodnými látkami z této skupiny jsou propylenglykol, sorbitol a glycerol. Použitelné jsou také polymerní polyoly, jako polypropylenglykol a polyethylenglykol. Butylenglykol a propylenglykol jsou zvláště výhodné jako látky, které usnadňují průnik.

Z uhlovodíků, použitých jako změkčovadla je možno uvést zejména uhlovodíky, obsahující 12 až 30 atomů uhlíku. Specifickými příklady mohou být minerální olej, vazelína, squalen a isoparafiny.

Další kategorií funkčních složek pro kosmetické prostředky podle vynálezu jsou zahušřovadla. Látky tohoto typu budou obvykle obsaženy v množství 0,1 až 20, s výhodou 0,5 až 10 % hmotnostních z celkové hmotnosti kosmetického prostředku. Jako příklady zahušřovadel je možno uvést zesíťené polyakryláty, dodávané pod obchodním názvem Carbopol (B. F. Goodrich Company). Je také možno užít gumy, jako xanthan, carrageenan, želatinu, karayu, pektin a gumu z bobů. Za určitých okolností může být zahušřovadlo voleno z látek, použitých jako silikon nebo jako změkčovadla. Například silikonové pryže s viskositou vyšší než 10 centistoke a také některé estery, například glycerolstearát mohou v kosmetickém prostředku splnit dvojí funkci.

Do kosmetických prostředků podle vynálezu je možno začlenit také práškové materiály. Takovými složkami jsou například křída, mastek, kaolin, škrob, smektit, chemicky modifikovaný křemičitan hořečnatohlinitý, organicky modifikovaná montmorilonitová hlínka, hydratovaný křemičitan hlinitý, vysušený oxid křemičitý, oktenylsukcinát škrobu ve formě hlinité soli a směsi těchto látek.

Do kosmetických prostředků podle vynálezu mohou být zařazeny v malém množství také další složky, jako jsou barviva, parfémy a podobně. Množství těchto složek se může pohybovat v rozmezí 0,001 až 20 % hmotnostních.

## Použití kosmetického prostředku

Kosmetický prostředek podle vynálezu je primárně určen pro místní podání na lidskou pokožku, zejména k péči o pleť a k prevenci nebo odstranění vrásek nebo jiných projevů stárnutí pokožky.

Při použití se malé množství prostředku, například 1 až 100 ml, nanese na příslušné části pokožky z vhodné nádoby nebo aplikátoru a popřípadě se pak materiál roztírá a/nebo vetře do pokožky rukou, prsty nebo vhodnými pomůckami.

## Výrobky a balení

Prostředky podle vynálezu pro místní podání mohou být například emulze, krémy nebo gely. Tyto materiály mohou být baleny do vhodných nádobek podle viskozity a předpokládaného použití. Například emulze nebo krémy je možno uložit do lahviček, popřípadě opatřených ve výstupním otvoru kuličkou pro snadnější nanášení, nebo je možno prostředek uložit do přístroje pro nanášení aerosolu s hnacím prostředkem nebo do nádoby s mechanickým nanášením pomocí prstů. V případě krému je možno použít nedeformující se kelímek nebo také tubu. Prostředek je rovněž možno ukládat do kapslí, například podle US 5 063 057.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu. V příkladové části přihlášky budou užity různé materiály a budou také prováděny různé typy zkoušek.

## Materiály a metody

### Buněčná kultura

Lidské keratinocyty, izolované z předkožky novorozence působením trypsinu se pěstují v Eaglově prostředí v Dulbeccově modifikaci DME Hams F12 (1 : 1) s 10 % fetálního telecího séra v přítomnosti ozáření myších fibroblastů 3T3 pro zahájení dělení kolonií keratinocytů. Buňky byly pěstovány až do druhé pasáže a pak byly udržovány ve zmrazeném stavu pro příští použití. Pak byly keratinocyty opět rozmrazeny ve svrchu uvedeném prostředí a pěstovány 5 dnů, načež bylo prostředí vyměněno na prostředí na bazi MCBD 153, prosté séra a vhodné pro pěstování keratinocytů, KGM (Clonetic Corporation, San Diego, CA), prostředí obsahuje 0,15 mM vápníku, nebo je také možno užít prostředí KSFM, prosté séra a vhodné pro pěstování keratinocytů (GIBCO), které obsahuje 0,09 mM vápníku. Ve dni 7 vytvořil buněčný materiál vrstvu, souvislou na 80 až 90 %, vrstva byla zpracována trypsinem a nanášena na plotny v prostředí, prostém séra, pro různé zkoušky.

### Zkouška na transglutaminázu

### Zkouška na transglutaminázu a diferenciaci keratinocytů

V průběhu konečné diferenciaci epidermis se vytváří na vnitřním povrchu periferie buněk vrstva bílkoviny s tloušťkou 15 nm, označovaná jako obalová vrstva CE. Tato vrstva CE je tvořena řadou bílkovin, které byly spolu zesíťovány za tvorby  $N^{\text{eta}}_{-}$ (gamma-glutamyl)lysinisodipeptidových vazeb, tato tvorba je katalyzována působením nejméně dvou různých transglutamináz TG, k jejichž expresi dochází v epidermis. K ex-

presi transglutaminázy I TG I dochází ve velkém množství v diferencovaných vrstvách epidermis, zvláště v granulární vrstvě, avšak nedochází k ní v nediferencované bazální vrstvě. To znamená, že uvedený enzym je vlastně průkazem diferenciace keratinocytů, přičemž vyšší množství enzymu je vždy ukazatelem diferencovanějšího stavu. Při průkazu tohoto enzymu zkouškou ELISA při použití protilátky proti uvedenému enzymu je možno prokázat stav diferenciace vypěstovaných keratinocytů, jak bude uvedeno v následujících příkladech.

V případě příkladu 1 bylo použito následujícího postupu:

Keratinocyty, vypěstované svrchu uvedeným způsobem, byly nanášeny na plotnu s 96 vyhloubeními v množství 3000 buněk na vyhloubení ve 200 mikrolitrech živného prostředí. Po inkubaci 4 dny bylo prostředí vyměněno za prostředí, obsahující zkoumané látky, každá látka byla užita v dané koncentraci vždy v šesti opakováních. Pak byly buňky pěstovány dalších 72 hodin a pak po odsátí živného prostředí byly plotny uloženy při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pro použití byly plotny vyjmuty z mrazicího zařízení a buněčný materiál byl promyt PBS. Bylo přidáno 100 mikrolitrů sterilní vody a buněčný materiál se rozruší zmrazením na  $-70^{\circ}\text{C}$  s následným rozmrazením. Buňky se inkubují 1 hodinu při teplotě místnosti v PBS se 3 % BSA, jde o promývací pufr se sérovým albuminem skotu, pak se buněčný materiál promyje čerstvým podílem promývacího pufru. Buňky se inkubují spolu s 50 mikrolitry primární myší monoklonální protilátky proti lidské transglutamináze, IgG (Biomedical Industries) v ředění 1 : 2000 v promývacím pufru 1 hodinu při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  a pak se promyjí dvakrát po sobě promývacím puftrem. Pak se buněčný materiál inkubuje 150 mikrolitry sekundární protilátky (fragment Fab, protilátka IgG proti myším tkáním, konjugované s peroxidázou, Amersham) v ředění 1 : 4000 v promývacím pufru 1 hodinu při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$ ,

načež se dvakrát promyje promývacím pufrem. Buňky se inkubují s roztokem substrátu, jde o roztok 4 mg o-fenylendiaminu a 3,3 mikrolitru 30% peroxidu vodíku v 10 ml 0,1 M citrátového pufru o pH 5,0 celkem 5 minut při teplotě místnosti ve tmě pod hliníkovou fólií. Reakce se zastaví přidáním 50 mikrolitrů 4 N kyseliny sírové. Absorbance vzorků se odečítá příslušným přístrojem při 492 nm. Ze šesti vzorků byly ke čtyřem vzorkům přidány obě protilátky, ke dvěma byla přidána pouze sekundární protilátka ke stanovení vazby protilátky, konjugované s enzymem. Koncentrace transglutaminázy byly stanoveny odečtením takto zjištěného pozadí z koncentrace, zjištěné v jednotlivých vzorcích a stanovením směrodatné odchylky pro vzorky, k nimž byly přidány obě protilátky.

V případě příkladu 2 bylo použito následujícího postupu:

Keratinocyty, vypěstované svrchu uvedeným způsobem byly nanесeny na plotnu s 96 vyhloubeními v množství 3000 buněk na vyhloubení ve 200  $\mu$ l živného prostředí. Po inkubaci 4 dny bylo prostředí nahrazeno prostředím s obsahem zkoumaných látek, zkoušky byly prováděny v šesti opakováních. Pak byl buněčný materiál pěstován ještě 72 hodin, načež byly po odsátí živného prostředí plotny uloženy při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Po vyjmutí z mrazicího zařízení byl buněčný materiál znovu zmrazen a rozmrazen a pak třikrát promyt PBS. Pak byly buňky inkubovány 1 hodinu při teplotě místnosti v pufru TBS s 5 % BSA. Pak byly buňky inkubovány se 100 mikrolitry primární protilátky, monoklonální myší protilátky IgG proti lidské transglutamináze (Biomedical Technologies Inc.) v ředění 1 : 2000 v pufru TBS s 1 % BSA 2 hodiny při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$ , načež byly 6x promyty promývacím pufrem TBS s 1 % BSA a s 0,05 % Tween-20. Pak byl buněčný materiál inkubován se 100 mikrolitry fragmen-

tu Fab sekundární protilátky, protilátky IgG proti myším tkáním, konjugované s peroxidázou (Amersham) v ředění 1 : 4000 v promývacím pufru celkem 2 hodiny při teplotě 37 °C, načež byl materiál 3x promyt promývacím pufrům a pak ještě 3x PBS. Buňky pak byly inkubovány s roztokem substrátu, 4 mg o-fenylendiaminu a 3,3 mikrolitrů 30% peroxidu vodíku v 10 ml 0,1M citrátového pufru o pH 5,0 celkem 5 minut při teplotě místnosti a ve tmě pod hliníkovou folií. Reakce byla zastavena přidáním 50 mikrolitrů 4 N kyseliny sírové. Absorbance vzorků byla odečítána příslušným přístrojem při 492 nm. Ze šesti opakování byly ke čtyřem vzorkům přidány obě protilátky a ke dvěma z nich pouze sekundární protilátka ke stanovení pozadí vazby enzymu konjugovanou protilátkou. Koncentrace transglutaminázy I byly stanoveny odečtením tohoto pozadí od výsledku pro každý ze vzorků za současného stanovení směrodatné odchylky.

#### Stanovení DNA

Množství transglutaminázy I, zjištěná po zpracování buněk může být ovlivněna počtem buněk, to znamená, že čím větší bude počet buněk, tím vyšší bude koncentrace enzymu. Koncentrace enzymu byla tedy normalizována na obsah DNA v buňkách téhož vyhloubení, čímž byly vyloučeny variace, způsobené rozdílem v počtu buněk. Kvantitativní stanovení DNA je zvláště vhodným ukazatelem počtu buněk včetně keratinocytů vzhledem k tomu, že každá z buněk má stejný genom a tím i stejné množství DNA. Celkové množství DNA ve vyhloubení je tedy přímo úměrná počtu buněk v tomto vyhloubení. Pak je možno stáhnout údaje o koncentraci enzymu na zjištěné množství DNA.

Keratinocyty byly nanесeny na plotny s 96 vyhloubeními v množství 3000 buněk na vyhloubení ve 200 mikrolitrech živného prostředí. Po inkubaci 4 dny bylo prostředí nahrazeno prostředím s obsahem zkoumaných látek, každá zkouška byla provedena v šesti opakováních. Pak byly buňky pěstovány ještě 72 hodin, načež bylo živné prostředí odstraněno odsátím a plotny byly uloženy nejméně na 1,5 hodiny při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pak byly plotny vyjmuty z mrazicího zařízení a na 30 minut rozmrazeny, do každého vyhloubení bylo přidáno 100 mikrolitrů barviva Hoechst (konečná koncentrace 1 mikrogram/ml) a plotny byly inkubovány 15 minut, překryty a výsledek byl odečítán fluorimetrem (excitace 360 nm, emise 460 nm). Pak byl roztok barviva odstraněn a vyhloubení byla promyta PBS a tak připravena na stanovení transglutaminázy.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

Kyselina retinová je účinnější než retinol při změně stadia diferenciacе keratinocytů

Byl sledován účinek transglutaminázy, normalizované na obsah DNA v buňkách po přidání kyseliny retinové RA a retinolu ROH, výsledky jsou shrnuty v následující tabulce 1:

0000

Tabulka 1

	průměr TGáza/DNA $\times 10^{-3} \pm$ s.d. (% kontroly)	průměr TGáza/DNA hodnota p proti kontrolě	P pro $2.5 \times 10^{-3}$ M ROH	P pro $2.5 \times 10^{-4}$ M ROH	P pro $2.5 \times 10^{-5}$ M ROH
kontrola	$2.44 \pm 0.24$ (100%)	-	0.001	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-3}$ M RA	$0.16 \pm 0.11$ (7%)	0.001	0.001	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-4}$ M ROH	$1.14 \pm 0.22$ (47%)	0.001	-	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-5}$ M RA	$1.34 \pm 0.40$ (55%)	0.001	0.2	0.001	0.001
$2.5 \times 10^{-6}$ M ROH	$1.89 \pm 0.30$ (77%)	0.001	0.001	-	0.001
$2.5 \times 10^{-7}$ M RA	$1.87 \pm 0.49$ (77%)	0.001	0.001	0.784	0.001
$2.5 \times 10^{-8}$ M ROH	$2.70 \pm 0.59$ (>100%)	0.001	0.001	0.001	-

n = 3

Všechny zkoušené koncentrace kyseliny retinové, to znamená  $2,5 \times 10^{-7}$  M,  $2,5 \times 10^{-8}$  M a  $2,5 \times 10^{-9}$  M snižovaly diferenciaci keratinocytů ve významně vyšším rozsahu než retinol ve stejných koncentracích. Snížení množství transglutaminázy bylo závislé na dávce jak v případě kyseliny retinové, tak v případě retinolu. To je v souladu se skutečností, že kyselina retinová má na diferenciaci epitelu větší účinnost než retinol.

#### Příklad 2

Synergní účinek kyseliny oleanolové a retinolu při inhibici diferenciaci keratinocytů

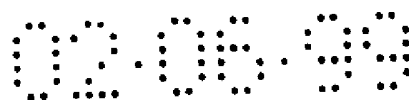
Byl sledován účinek zkoumaných látek po dobu 72 hodin na koncentraci transglutaminázy I, normalizovanou na obsah DNA v buněčném materiálu. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2.

T a b u l k a 2

Vliv retinolu a kyseliny oleanolové na TGázu/DNA v keratinocytech

	průměr TGázy/DNA x 10 <sup>5</sup> ± s.d. % kontroly	P proti kontrola	P pro 2.5 x 10 <sup>5</sup> M ROH	P pro 2.5 x 10 <sup>5</sup> M 10 <sup>5</sup> M RA	P pro 10 <sup>5</sup> M kyseliny oleanolovou
kontrola	22.46 ± 2.05 (100%)	-	0.001	0.001	0.001
2.5x10 <sup>5</sup> M RA	9.95 ± 2.74 (44%)	0.001	0.001	-	0.001
2.5x10 <sup>5</sup> M Retinol	18.27 ± 3.30 (81%)	0.001	-	0.001	0.001
10 <sup>5</sup> M kyselina oleanolová	20.95 ± 1.95 (93%)	0.001	0.001	0.001	-
2.5x10 <sup>5</sup> M ROH + 10 <sup>5</sup> M kyselina oleanolová	14.83 ± 3.90 (66%)	0.001	0.001	0.001	0.001

n = 3



Kyselina retinová v koncentraci  $2,5 \times 10^{-7}$  M byla velmi účinná při snižování koncentrace transglutaminázy I v keratinocytech, až na 44 % kontrolní hodnoty. Retinol v téže koncentraci byl méně účinný než kyselina retinová a kyselina oleanolová v koncentraci  $10^{-4}$  M měla jen malý inhibiční účinek na koncentraci transglutaminázy I v keratinocytech. Kombinace  $2,5 \times 10^{-7}$  M retinolu a  $10^{-6}$  M kyseliny oleanolové však snížila koncentraci enzymu v keratinocytech až na 66 % kontrolní hodnoty. To znamená, že kyselina oleanolová a retinol mají synergní účinek na potlačení diferenciaci keratinocytů, který je srovnatelný s účinkem kyseliny retinové.

V příkladech 1 a 2 byla kyselina retinová užitá jako pozitivní kontrola a referenční sloučenina, s jejímž účinkem byl srovnáván účinek ostatních látek. Kyselina retinová snižuje koncentraci transglutaminázy v keratinocytech pokožky v závislosti na použité dávce. Jinak vyjádřeno, snižuje kyselina retinová diferenciaci keratinocytů. Retinol má na tuto diferenciaci statisticky významně nižší vliv než kyselina retinová.

Bylo však zcela neočekávaně zjištěno, že účinek retinolu na keratinocyty, pěstované v kultuře je možno zvýšit až na úroveň, srovnatelnou s účinkem kyseliny retinové tak, že se retinol kombinuje s kyselinou oleanolovou. Jde o synergní účinek, který je srovnatelný s účinkem kyseliny retinové na diferenciaci keratinocytů.

V příkladech 3 až 8 jsou uvedeny prostředky podle vynálezu pro místní podání, které je možno vyrobit běžnými postupy a které jsou určeny pro péči o pleť, zejména při tvorbě vrásek, u drsné a suché pleti, stárnoucí pokožky nebo po oslunění. Prostředky jsou vhodné i pro zdravou pleť k zábraně nebo zpomalení jejího stárnutí.

## Příklad 3

Kosmetický prostředek pro místní podání

	% hmotnostní
retinol	0,5
plně hydrogenovaný kokosový olej	3,9
kyselina ursolová	5
brij 92 <sup>x</sup>	5
bentone 38	0,5
NgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
butylovaný hydroxytoluen	0,01
parfém	podle potřeby
voda do	100

<sup>x</sup> Brij 92 je polyoxyethylen (2) oleylether.

## Příklad 4

Krém typu olej ve vodě

	% hmotnostní
kyselina retinová	0,15
minerální olej	4
kyselina oleanolová	1
Brij 56 <sup>x</sup>	4
Alfol 16RD <sup>x</sup>	4
triethanolamin	0,75

butan-1,3-diol	3
xanthanová guma	0,3
parfém	podle potřeby
butylovaný hydroxytoluen	0,01
voda do	100

<sup>x</sup> Brij 56 je cetylalkohol POE (10)  
Alfol 16RD je cetylakohol.

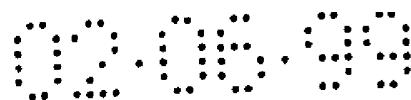
#### Příklad 5

#### Alkoholový lotion

	% hmotnostní
retinylpalmitát	0,15
kyselina oleanolová	0,1
ethanol	40
parfém	podle potřeby
butylovaný hydroxytoluen	0,01
voda do	100

#### Příklad 6

#### Alkoholový lotion



	% hmotnostní
retinol	0,15
kyselina ursolová	0,1
ethanol	40
antioxidační činidlo	0,1
parfém	podle potřeby
voda do	100

Příklad 7

Opalovací krém

	% hmotnostní
retinol	0,01
kyselina ursolová	0,1
silikonový olej 200 cts	7,5
glycerylmonostearát	3
cetostearylalkohol	1,6
polyoxyethylen (20) cetylalkohol	1,4
xanthanová guma	0,5
Parsol 1789	1,5
oktylmethoxycinnát (Parsol MCX)	7
parfém	podle potřeby
barvivo	podle potřeby
voda do	100

## Příklad 8

Pleťový krém nevodné povahy

	% hmotnostní
kyselina retinová	0,15
kyselina oleanolová	1
silikonová pryž SE-30 <sup>1</sup>	10
kapalný silikon 345 <sup>2</sup>	20
kapalný silikon 344 <sup>3</sup>	55,79
squalen	10
kyselina linolová	0,01
cholesterol	0,03
kyselina 2-hydroxy-n-oktanová	0,7
linoleát vitamínu E	0,5
květinový olej	0,5
ethanol	2

<sup>1</sup> Dimethylsilikonový polymer s molekulovou hmotností nejméně 50 000 a viskositou nejméně 10 000 cts při teplotě 25 °C (GEC),

<sup>2</sup> cyklický pentamer dimethylsiloxanu (Dow Corning Corp.),

<sup>3</sup> tetramer dimethylsiloxanu (Dow Corning Corp.).

Zastupuje:

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Kosmetický prostředek pro péči o pleť, v y z n a -  
č u j í c í s e t í m , že obsahuje

- a) 0,001 až 10 % retinoidu, který se volí z retinolu,  
retinylesteru a směsi těchto látek,
- b) 0,0001 až 50 % kyseliny, která se volí z kyseliny  
oleanolové, ursolové a směsi těchto látek a
- c) kosmeticky přijatelný nosič.

2. Kosmetický prostředek podle nároku 1, v y z n a -  
č u j í c í s e t í m , že se retinylester volí ze sku-  
piny retinylpalmitát, retinylacetát, retinylpropionát, re-  
tinyllinoleát a směsi těchto látek.

3. Kosmetický prostředek podle nároku 1, v y z n a -  
č u j í c í s e t í m , že jako složku a) obsahuje retinol.

4. Kosmetický prostředek podle nároku 1, v y z n a -  
č u j í c í s e t í m , že jako složku a) obsahuje reti-  
nylester.

5. Způsob péče o pleť, v y z n a č u j í c í s e  
t í m , že se na pleť nanáší kosmetický prostředek podle ně-  
kterého z nároků 1 až 4.

6. Způsob napodobení účinku kyseliny retinové, v y -  
z n a č u j í c í s e t í m , že se nanáší na pleť kosme-  
tický prostředek podle některého z nároků 1 až 4.

Zastupuje: