



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 28 071 T2** 2006.11.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 229 894 B1**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 28 071.3**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/04304**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 973 108.4**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/035920**  
(86) PCT-Anmeldetag: **09.11.2000**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **25.05.2001**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.08.2002**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **17.05.2006**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.11.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 8/67** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**165830 P 16.11.1999 US**

(73) Patentinhaber:  
**Unilever N.V., Rotterdam, NL**

(74) Vertreter:  
**Lederer & Keller, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:  
**PILLAI, Unilever Research U.S. Inc., Sreekumar,  
Edgewater, NJ 07020, US; GRANGER, Stewart  
Paton Unilever Research U.S., Edgewater, NJ  
07020, US; POCALYKO, Unilever Res. U.S. Inc.,  
David Joseph, Edgewater, NJ 07020, US;  
MAHAJAN, Unilever Res. U.S. Inc., Manisha  
Narayan, Edgewater, NJ 07020, US**

(54) Bezeichnung: **KOSMETISCHE MITTEL ENTHALTEND KICHERERBSEN-EXTRAKT UND RETINOIDE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft kosmetische Zusammensetzungen, die Kichererbsenextrakt in Kombination mit Retinoiden enthalten, und Verfahren zum Konditionieren der Haut durch Auftragen solcher Zusammensetzungen auf die Haut.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** Retinol (Vitamin A) ist eine endogene Verbindung, die natürlich im menschlichen Körper vorkommt und für normale epitheliale Zelldifferentiation wesentlich ist. Natürliche und synthetische Vitamin-A-Derivate wurden umfangreich bei der Behandlung einer Vielzahl von Hautstörungen und als Hautreparatur- und -erneuerungsmittel verwendet. Retinsäure wurde verwendet, um eine Vielzahl von Hautzuständen, wie Akne, Falten, Psoriasis, Altersflecken und Hautverfärbung, zu behandeln.

**[0003]** Innerhalb der Zellen sind Retinol und Retinsäure an spezielle zelluläre Bindungsproteine gebunden, wobei zwei von den Hauptproteinen CRABP-1 und -2 (Roos et al., *Pharmacological reviews*: 50, 315–333, 1998) sind. Diese Proteine wirken beim Regulieren der intrazellulären Konzentration von Retinoiden durch Wirken als sowohl Lagerungs- als auch Transportproteine beim Retinoidmetabolismus. Die Spiegel von diesem Protein werden durch die Menge an Retinsäure innerhalb der Zellen reguliert. Höhere Zellspiegel von Retinoiden erhöhen die Expression von CRABP-2. Deshalb ist die Menge von diesem Protein in den Zellen ein Maß der Retinoidaktivität der Zellen. Hautzellen enthalten CRABP-2, sowohl in der Epidermis als auch der Dermis. CRABP-2-Reaktion auf Retinoidverabreichung in Fibroblasten *in vitro* wird als ein reproduzierbares Maß von Retinoidbioaktivität verwendet, das die Hautreaktionen des Menschen vorhersagt (Elder et al., *J. Invest. Dermatol.*, 106: 517–521, 1996). Deshalb ist CRABP-2-Expression von Fibroblasten ein Maß von Retinoidaktivität, das zu verschiedenen kosmetischen Hautvorteilen (Antialterung, Antifaltenbildung, Hautkonditionierung, usw.) führt.

**[0004]** Kichererbse oder Spanische Erbse (*Cicer arietinum*), eine übliche Speiselinse, enthält Flavonoide, einschließlich Daidzein, Formononetin, Biochanin-A, Pratensein, Homoferreirin, Medicarpin, Maackiain, Methylcumöstrol, Medicagol, Formononetinglucosid und Biochanin-A-glucosid (Ingham et al., In: *Progress in the chemistry of Organic natural products*, Band 43: Ed-W. Herz et al., Springer-Verlag, Wien, New York, 1983). Über von Kichererbsen abgeleitete Flavonoide wurde mitgeteilt, dass sie Lipid senkende Wirkungen im Blut und in der Leber von Ratten bewirken. Verschiedene Ernährungsstudien berichten über von Kichererbse abgeleitetes Protein zur Verwendung als Nahrungsergänzungen und Wege zum Verbessern der Proteinqualität von Kichererbsen. Vasiliou, US-Patent 4 761 285 berichtet über die Verwendung von Kichererbsen als eine Nahrungsergänzung oder zur inneren oder örtlichen Behandlung von Hämorrhoiden. In Indien ist eine kosmetische Maske oder Hautbehandlung, die aus Kichererbsenpulver hergestellt wurde, welches mit Wasser vermischt wurde, eine übliche Schönheitsbehandlung.

**[0005]** Die vorliegende Erfindung basiert zum Teil auf dem Auffinden, dass das organische Lösungsmittel Kichererbsenextrakt in Kombination mit Retinoiden CRABP-2-Expression in Fibroblasten verstärkt.

## KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

**[0006]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine kosmetische Hautpflegezusammensetzung, umfassend:

- (i) einen Extrakt mit organischem Lösungsmittel aus Kichererbsen in einer Menge von 0,00001 bis 10 Gew.-%,
- (ii) ein Retinoid in einer Menge von 0,001 bis 10 Gew.-% und
- (iii) einen kosmetisch verträglichen Träger.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung schließt auch ein Verfahren zum Verbessern oder Verhindern des Zustands von faltiger, furchiger, trockener, schuppiger, gealterter oder durch Licht geschädigter Haut und Verbessern von Hautdicke, Elastizität, Biogsamkeit, Strahlen, Glanz und Rundlichkeit ein, wobei das Verfahren Auftragen der erfindungsgemäßen Zusammensetzung auf die Haut einschließt. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind zur örtlichen Auftragung auf menschliche Haut vorgesehen, die bereits trocken, schuppig, furchig, faltig, gealtert, lichtgeschädigt ist, oder können prophylaktisch aufgetragen werden, um die verschlechternden Änderungen zu vermindern.

## BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG IM EINZELNEN

**[0008]** Alle Mengen sind auf das Gewicht der Zusammensetzung bezogen, sofern nicht anders ausgewiesen.

**[0009]** Kichererbsen sind zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in Form eines organischen Extrakts geeignet. Der Kichererbsenextrakt wird zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung aus getrockneten Kichererbsen hergestellt. Getrocknete Kichererbsen können von Arrowhead Mills, Reformhäusern oder Supermärkten erhalten werden.

**[0010]** Die organischen Kichererbsenextrakte werden durch Extrahieren der getrockneten Kichererbsen mit einem Lösungsmittel durch Rühren von 1 Teil getrockneter Kichererbsen mit 2 bis 5 Teilen des Lösungsmittels für 4 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur hergestellt. Geeignete Lösungsmittel werden nachstehend beschrieben. Die Extrakte werden durch Filtration und/oder Zentrifugierung gereinigt, dann durch Verdampfung (gegebenenfalls unter Vakuum) getrocknet, um den organischen Kichererbsenextrakt zu erhalten.

**[0011]** Zur Herstellung von Kichererbsenextrakt zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignete Lösungsmittel schließen Ethanol, Methanol, Hexan, Chloroform, Dichlormethan und Essigsäureethylester ein, sind jedoch nicht darauf begrenzt. Bevorzugte Lösungsmittel sind Dichlormethan, Methanol oder Ethanol, um die Wirksamkeit zu optimieren. Der Extrakt kann weiterhin aufkonzentriert, fraktioniert, erneut extrahiert oder gereinigt werden, beispielsweise durch Extraktion mit organischem Lösungsmittel oder durch Chromatographie.

**[0012]** Im Allgemeinen liegt die Menge des Kichererbsenextrakts in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in dem Bereich von 0,00001% bis 10 Gewichtsprozent der Zusammensetzung. Um vorzugsweise die Kosten zu senken und die Wirkung zu maximieren, liegt die Menge des Kichererbsenextrakts im Bereich von 0,01 bis 10% und besonders bevorzugt liegt sie im Bereich von 0,1% bis 5 Gewichtsprozent der Zusammensetzung.

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfassen weiterhin ein Retinoid, ausgewählt aus Retinol oder Retinylester. Der Begriff „Retinol“ schließt die nachstehenden Isomeren von Retinol ein: all-trans-Retinol, 13-cis-Retinol, 11-cis-Retinol, 9-cis-Retinol, 3,4-Didehydroretinol. Bevorzugte Isomeren sind all-trans-Retinol, 13-cis-Retinol, 3,4-Didehydroretinol, 9-cis-Retinol. Besonders bevorzugt ist all-trans-Retinol auf Grund seiner breiten kommerziellen Verfügbarkeit.

**[0014]** Retinylester ist ein Ester von Retinol. Der Begriff „Retinol“ wurde vorstehend definiert. Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignete Retinylester sind  $C_1$ - $C_{30}$ -Ester von Retinol, vorzugsweise  $C_2$ - $C_{20}$ -Ester und besonders bevorzugt  $C_2$ -,  $C_3$ - und  $C_{16}$ -Ester, weil sie besser zugänglich sind. Beispiele für Retinylester schließen ein, sind jedoch nicht darauf begrenzt: Palmitinsäureretinylester, Ameisensäureretinylester, Essigsäureretinylester, Propionsäureretinylester, Buttersäureretinylester, Valeriansäureretinylester, Isovaleriansäureretinylester, Hexansäureretinylester, Heptansäureretinylester, Octansäureretinylester, Nonansäureretinylester, Decansäureretinylester, Undecansäureretinylester, Laurinsäureretinylester, Tridecansäureretinylester, Myristinsäureretinylester, Pentadecansäureretinylester, Heptadecansäureretinylester, Stearinsäureretinylester, Isostearinsäureretinylester, Nonadecansäureretinylester, Arachidonsäureretinylester, Behensäureretinylester, Linsäureretinylester, Ölsäureretinylester.

**[0015]** Der bevorzugte Ester zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist aus Palmitinsäureretinylester, Essigsäureretinylester und Propionsäureretinylester ausgewählt, weil diese die am leichtesten kommerziell verfügbaren und deshalb die kostengünstigsten sind. Linsäureretinylester ist auch auf Grund seiner Wirksamkeit bevorzugt.

**[0016]** Retinol oder Retinylester wird in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung in einer Menge von etwa 0,001 bis etwa 10%, vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,01% bis etwa 1%, besonders bevorzugt in einer Menge von etwa 0,01 bis etwa 0,5 Gewichtsprozent der Zusammensetzung, angewendet.

**[0017]** Die Zusammensetzung umfasst auch einen kosmetisch verträglichen Träger, um als ein Verdünnungsmittel, Dispersionsmittel oder Träger für den Kichererbsenextrakt und das Retinoid in der Zusammensetzung zu wirken, sodass deren Verteilung erleichtert wird, wenn die Zusammensetzung auf die Haut aufgetragen wird.

**[0018]** Träger, die von Wasser verschieden sind oder zusätzlich dazu, können flüssige oder feste Erwei-

chungsmittel, Lösungsmittel, Feuchthaltemittel, Verdickungsmittel und Pulver einschließen. Ein besonders bevorzugter nichtwässriger Träger ist ein Polydimethylsiloxan und/oder ein Polydimethylphenylsiloxan. Erfindungsgemäße Silikone können jene mit Viskositäten im Bereich von irgendwo von etwa 10 bis 10 000 000 mm<sup>2</sup>/s (Centistokes) bei 25°C sein. Besonders erwünscht sind Gemische von Silikonen mit niedriger und hoher Viskosität. Diese Silikone sind von der General Electric Company, unter Handelsmarken Vicasil SE und SF, und von der Dow Corning Company, unter den 200- und 550er-Reihen, erhältlich. Die Silikonmengen können in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen im Bereich von etwa 5% bis 95%, vorzugsweise 25% bis 90 Gew.-% der Zusammensetzung, verwendet werden.

**[0019]** Der kosmetisch verträgliche Träger wird gewöhnlich 5% bis 99,9% vorzugsweise 25% bis 80 Gew.-%, der Zusammensetzung umfassen und kann in Abwesenheit von anderen kosmetischen Hilfsstoffen den Ausgleich der Zusammensetzung bilden. Vorzugsweise ist der Träger mindestens 80 Gew.-% Wasser, auf das Gewicht des Trägers. Vorzugsweise umfasst das Wasser mindestens 50 Gew.-% der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, bevorzugter 60 bis 80 Gew.-%, auf das Gewicht der Zusammensetzung.

#### Wahlweise Hautvorteilsmaterialien und kosmetische Hilfsmittel

**[0020]** Ein Öl oder öliges Material kann zusammen mit einem Emulgator vorliegen, um entweder eine Wasser-in-Öl-Emulsion oder eine Öl-in-Wasser-Emulsion bereitzustellen, größtenteils in Abhängigkeit von dem mittleren hydrophilen-lipophilen Ausgleich (HLB) des angewendeten Emulgators.

**[0021]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen schließen vorzugsweise Sonnenschutzmittel ein. Sonnenschutzmittel schließen jene Materialien ein, die üblicherweise zum Blockieren von Ultraviolettlicht angewendet werden. Erläuternde Verbindungen sind die Derivate von PABA, Cinnamat und Salicylat. Beispielsweise können Methoxyzimtsäureoctylester und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon (auch als Oxybenzon bekannt) verwendet werden. Methoxyzimtsäureoctylester und 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon sind unter den Handelsmarken Parsol MCX bzw. Benzophenon-3 erhältlich. Die exakte Menge an in den Emulsionen angewendetem Sonnenschutzmittel kann in Abhängigkeit von dem vor der Sonnen-UV-Strahlung erwünschten Schutzgrad variieren.

**[0022]** Erweichungsmittel können auch in die erfindungsgemäßen kosmetischen Zusammensetzungen eingearbeitet werden. Anteile von solchen Erweichungsmitteln können im Bereich von 0,5% bis 50%, vorzugsweise zwischen 5% und 30 Gewichtsprozent, der Gesamtzusammensetzung liegen. Erweichungsmittel können in solche allgemeine chemische Kategorien, wie Ester, Fettsäuren und Alkohole, Polyole und Kohlenwasserstoffe, eingeteilt werden.

**[0023]** Ester können Mono- oder Diester sein. Annehmbare Beispiele von Fettsäurediestern schließen Adipinsäuredibutylester, Sebacinsäurediethylester, Dimersäurediisopropylester und Bernsteinsäuredioctylester ein. Annehmbare verzweigt-kettige Fettsäureester schließen Myristinsäure-2-ethylhexylester, Stearinsäureisopropylester und Palmitinsäureisostearylester ein. Annehmbare dreibasige Säureester schließen Trilinolensäuretriisopropylester und Zitronensäuretrilaurylester ein. Annehmbare geradkettige Fettester schließen Palmitinsäurelaurylester, Milchsäuremyristylester und Ölsäurestearylester ein. Bevorzugte Ester schließen Cococaprylat/Caprat (ein Gemisch von Cococaprylat und Cococaprat), Propylenglycolmyristyletheracetat, Adipinsäure-diisopropylester und Octansäurecetylester ein.

**[0024]** Geeignete Fettalkohole und Säuren schließen jene Verbindungen mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen ein. Besonders bevorzugt sind Verbindungen, wie Cetyl-, Myristyl-, Palmitin- und Stearylalkohole und -säuren.

**[0025]** Unter den Polyolen, die als Erweichungsmittel dienen können, sind lineare und verzweigt-kettige Alkylpolyhydroxylverbindungen. Beispielsweise sind Propylenglycol, Sorbit und Glycerin bevorzugt. Auch verwendbar können polymere Polyole, wie Polypropylenglycol und Polyethylenglycol, sein. Butylen- und Propylenglycol sind als Eindringverstärker auch besonders bevorzugt.

**[0026]** Beispielhafte Kohlenwasserstoffe, die als Erweichungsmittel dienen können, sind jene mit Kohlenwasserstoffketten im Bereich von irgendwo von 12 bis 30 Kohlenstoffatomen. Spezielle Beispiele schließen Mineralöl, Rohvaseline, Squalen und Isoparaffine ein.

**[0027]** Eine weitere Kategorie von funktionellen Bestandteilen innerhalb der erfindungsgemäßen kosmetischen Zusammensetzungen sind Verdickungsmittel. Ein Verdickungsmittel wird gewöhnlich in Mengen irgendwo von 0,1 bis 20 Gewichtsprozent, vorzugsweise etwa 0,5% bis 10 Gewichtsprozent, der Zusammensetzung

vorliegen. Beispielhafte Verdickungsmittel sind vernetzte Polyacrylatmaterialien, die unter der Handelsmarke Carbopol von der B. F. Goodrich Company erhältlich sind. Gummis können angewendet werden, wie Xanthan-, Carrageenan-, Gelatine-, Karaya-, Pektin- und Johannisbrotbaumgummi. Unter bestimmten Umständen kann die verdickende Funktion durch ein Material, das auch als ein Silikon oder Erweichungsmittel dient, erreicht werden. Beispielsweise haben Silikongummis oberhalb 10 Centistokes und Ester, wie Stearinsäureglycerinester, duale Funktionalität.

**[0028]** Pulver können in die erfindungsgemäßen kosmetischen Zusammensetzungen eingearbeitet werden. Diese Pulver schließen Kreide, Talkum, Kaolin, Stärke, Smektitone, chemisch modifiziertes Magnesiumaluminiumsilikat, organisch modifizierten Montmorillonitton, hydratisiertes Aluminiumsilikat, pyrogenes Siliziumdioxid, Aluminiumstärkeoctenylsuccinat und Gemische davon ein.

**[0029]** Weitere unterstützende geringe Komponenten können auch in die kosmetischen Zusammensetzungen eingearbeitet werden. Diese Bestandteile können färbende Mittel, Opazitätsmittel und Parfüms einschließen. Mengen von diesen anderen unterstützenden geringen Komponenten können im Bereich von irgendwo 0,001 bis 20 Gewichtsprozent der Zusammensetzung liegen.

#### Verwendung der Zusammensetzung

**[0030]** Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist hauptsächlich als Produkt zur örtlichen kosmetischen Auftragung auf menschliche Haut, insbesondere als ein Mittel zum Konditionieren, Befeuchten und Glätten der Haut und Verhindern oder Vermindern des Aussehens von furchiger, faltiger oder gealterter Haut vorgesehen.

**[0031]** Bei der Verwendung wird eine kleine Menge der Zusammensetzung, beispielsweise 1 bis 100 ml, auf exponierte Flächen der Haut aus einem geeigneten Behälter oder Applikator aufgetragen und, falls erforderlich, wird sie dann darüber versprüht und/oder in die Haut gerieben, unter Anwendung der Hand oder Finger oder einer geeigneten Vorrichtung.

#### Produktform und Verpackung

**[0032]** Die erfindungsgemäßen örtlichen Hautbehandlungszusammensetzungen können als eine Lotion, eine Creme oder ein Gel formuliert werden. Die Zusammensetzung kann in einen geeigneten Behälter, der für seine Viskosität geeignet ist und zur Verwendung durch den Verbraucher vorgesehen ist, verpackt werden. Beispielsweise kann eine Lotion oder Creme in eine Flasche oder einen Rollkugelapplikator, oder eine mit Treibmittel betriebene Aerosolvorrichtung oder einen Behälter, der mit einer Pumpe, die für eine Fingerbetätigung geeignet ist, ausgestattet ist, verpackt werden. Wenn die Zusammensetzung eine Creme ist, kann sie einfach in einer nicht verformbaren Flasche oder einem Quetschbehälter, wie einer Tube oder einem mit Deckel versehenen Gefäß, gelagert werden. Die Zusammensetzung kann auch in Kapseln, wie jene, die in US-Patent 5 063 507 beschrieben sind, eingeschlossen sein. Die Erfindung stellt folglich auch einen geschlossenen Behälter bereit, der eine, wie hierin definierte, kosmetisch verträgliche Zusammensetzung enthält.

**[0033]** Die nachstehenden speziellen Beispiele erläutern weiterhin die Erfindung, jedoch ist die Erfindung nicht darauf begrenzt. In allen Beispielen wurden Kichererbsen von den örtlichen Supermärkten erhalten. Retinoide wurden von Sigma erhalten. Der Student-T-Test wurde verwendet, um alle p-Werte zu berechnen.

#### BEISPIELE

**[0034]** Die nachstehenden Verfahren wurden angewendet:

##### Verfahren:

##### 1. Herstellung von Kichererbsenextrakten:

**[0035]** Getrocknete Kichererbsen wurden von örtlichen Supermärkten bezogen und in einem Trockenzerkleinerer gepulvert. Ein alkoholischer Extrakt der Kichererbsen wurde durch Rühren von 1 g des trockenen Kichererbsenpulvers in 10 ml Ethanol für 4 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur hergestellt. Der Extrakt wurde durch Filtration und Zentrifugierung geklärt, um einen 10%igen Extrakt von Kichererbse in Ethanol zu erhalten.

## 2. Zellkulturverfahren:

**[0036]** Humane adulte Fibroblasten, die von dem vor Sonne geschützten inneren Arm von 25–30 Jahre alten weiblichen Probanden erhalten wurden, wurden verwendet. Die Zellen wurden in 1:1 DMEM/Hams F12-Medien, enthaltend 10% FBS, gehalten bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, unter normaler atmosphärischer Sauerstoffspannung wachsen lassen. Der dritte Durchgang von adulten Fibroblasten wurde in DMEM-Medien mit 10%igem FBS in 12-Vertiefungs-Platten bei einer Beimpfungsdichte von 40 000 Zellen/ml/Vertiefung wachsen lassen. Die Zellen bei 80% Zusammenfluss wurden in serumfreiem und phenolrotfreiem (PRF) DMEM-Medien zweimal gespült. Die Vorbehandlung mit Kichererbsenextrakt für 4 Stunden wurde durchgeführt und dann mit Retinoiden dosiert und wurde 48 Stunden inkubiert. Nach Inkubation wurden die Vertiefungen zweimal mit 1 × PBS gewaschen und die Zellmonoschicht wurde in 100 µl Zellysepuffer (enthält 1 × PBS, 1% Triton-X, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, enthaltend Proteaseinhibitor (10 mg/ml PMSF in Isopropanol, 10 µl/ml)) geerntet. Die Suspension wurde bei 14 000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand gesammelt und eine aliquote Menge des Überstands zur Proteinquantifizierung verwendet. Die Proteinkonzentration wurde unter Anwendung eines Pierce-Proteinkits bestimmt. Der Rest des 100 µl Überstands (Zellysat) wurde in einem Gemisch von 40 µl Probenpuffer (NOVEX) und 0,5% β-Mercaptoethanol (BME) durch Sieden der Probe für 5 Minuten denaturiert.

**[0037]** Gleiche Mengen Protein wurden dann auf 16% Trisglycingele zur Proteinanalyse durch SDS-Page und Western-Immuno-Blotting für CRABP-2-Proteinexpression beladen.

## 3. Nachweis von zellulärem Retinsäure-Bindungsprotein 2 (CRABP-2) in Fibroblasten

**[0038]** Um die Spiegel von CRABP-2 in den Fibroblasten, die wie vorstehend beschrieben hergestellt wurden, zu messen, wurde der Zellüberstand in 4 × Probenpuffer und 0,5% BME suspendiert, 5 Minuten gekocht und zum Western-Blotting verwendet. Gleiche Mengen Protein wurden auf 16% Trisglycingelen für CRABP-2-Proteinanalyse durch SDS-Page und Western-Immuno-Blotting gegeben. Die Gele wurden zu Nitrocelluloseblots überführt und Western-Blotting wurde unter Anwendung von monoklonalen Antikörpern auf CRABP-2 gemäß Standardverfahren ausgeführt. Die CRABP-2-Proteinbande wurde in den Western-Blots unter Anwendung des Chemilumineszenzsystems, das von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) erhalten wurde, visualisiert. Die Banden in dem Film wurden durch densitometrisches Abscannen quantifiziert; die Daten aus den Dreifachproben wurden als % Kontrolle berechnet und in den nachstehenden Tabellen als % Anstieg gegenüber der Kontrolle (mit Kontrolle als 100%) ± Standardabweichung der dreifachen Ausführungen ausgedrückt.

## BEISPIELE 1–4

**[0039]** Die Beispiele untersuchten die Wirkung auf CRABP-2-Expression von Fibroblasten von Kombinationen von verschiedenen Konzentrationen von Kichererbsenextrakt und Retinoiden.

## BEISPIEL 1: 100 nM Retinoide und 0,1 µl eines 10%igen Kichererbsenextrakts

Gruppen	CRABP-2 Spiegel	als % Kontrolle	p Wert gegen Kontrolle	p Wert gegen Retinoid	p Wert gegen Kichererbse	Synergie
Kontrolle	0,7+/-0,2	100+/-29	1			
Retinol	2,02+/-0,23	289+/-34	0,0000056	1		
Palmitinsäure-retinylester	1,84+/-0,16	262+/-24	0,00053	1		
Linolsäure-retinylester	2,06+/-0,09	294+/-12	0,0000014	1		
Essigsäure-retinylester	1,44+/-0,26	206+/-37	0,0022	1		
Kichererbsen-extrakt	1,71+/-0,09	2<55 + /-13	0,00010			
Kichererbse + Retinol	3,38+/-0,22	482+/-32	4,4E-07	0,00208	0,000031	Ja
Kichererbse + Palmitinsäure-retinylester	1,85+/-0,36	264+/-52	0,000113	0,975	0,564	Nein
Kichererbse + Linolsäure-retinylester	1,89+/-0,19	270+/-28	0,000075	0,256	0,23	Nein
Kichererbse + Essigsäure-retinylester	3,72 + /-1,06	532+/-151	0,000177	0,022	0,030	Ja

## BEISPIEL 2: 100 nM Retinoide und 1,0 µl eines 10%igen Kichererbsenextrakts

Gruppen	CRABP-2 Spiegel	als % Kontrolle	p Wert gegen Kontrolle	p Wert gegen Retinoid	p Wert gegen Kichererbse	Synergie
Kontrolle	0,7+/-0,2	100+/-29	1			
Retinol	2,02+/-0,23	289+/-34	0,0000056	1		
Palmitinsäure-retinylester	1,84+/-0,16	262+/-24	0,00053	1		
Linolsäure-retinylester	2,06+/-0,09	294+/-12	0,0000014	1		
Essigsäure-retinylester	1,44+/-0,26	206+/-37	0,0022	1		
Kichererbsen-extrakt	1,46+/-0,37	209+/-54	0,0049			
Kichererbse + Retinol	5,52+/-0,02	789+/-3,0	7,3E-08	0,000293	7,3E-04	Ja
Kichererbse + Palmitinsäure-retinylester	3,24+/-0,42	462+/-60	0,0000019	0,049	0,016	Ja
Kichererbse + Linolsäure-retinylester	3,69+/-1,5	527+/-223	0,00167	0,147	0,075	Nein
Kichererbse + Essigsäure-retinylester	3,48+/-0,21	498+/-30	2,88E-07	0,00047	0,0012	Ja

BEISPIEL 3: 500 nM Retinoide und 0,1 µl eines 10%igen Kichererbsenextrakts

Gruppen	CRABP-2 Spiegel	als % Kontrolle	p Wert gegen Kontrolle	p Wert gegen Retinoid	p Wert gegen Kichererbse	Synergie
Kontrolle	0,7+/-0,2	100+/-29	1			
Retinol	0,72+/-0,04	102+/-6	0,877	1		
Palmitinsäure-retinylester	0,94+/-0,31	135+/-45	0,196	1		
Linolsäure-retinylester	0,81+/-0,16	115+/-23	0,455	1		
Essigsäure-retinylester	1,65+/-0,49	235+/-70	0,0057	1		
Kichererbsen-extrakt	1,71+/-0,09	245+/-13	0,00010		1	
Kichererbse + Retinol	0,74+/-0,22	106+/-31	0,78	0,86	0,0021	Nein
Kichererbse + Palmitinsäure-retinylester	2,63+/-0,58	376+/-83	0,0000124	0,0118	0,045	Ja
Kichererbse + Linolsäure-retinylester	3,83+/-1,79	547+/-256	0,00026	0,043	0,011	Ja
Kichererbse + Essigsäure-retinylester	6,31+/-1,63	901+/-233	4,5E-05	0,033	0,0082	Ja

BEISPIEL 4: 500 nM Retinoide und 1,0 µl eines 10%igen Kichererbsenextrakts:

Gruppen	CRABP-2 Spiegel	als % Kontrolle	P Wert gegen Kontrolle	p Wert gegen Retinoid	p Wert gegen Kichererbse	Synergie
Kontrolle	0,7+ /-0,2	100+/-29	1			
Retinol	0,72 +/-0,04	102+/-6	0,877	1		
Palmitinsäure-retinylester	0,94 +/-0,31	135+/-45	0,196	1		
Linolsäure-retinylester	0,81 +/-0,16	115+/-23	0,455	1		
Essigsäure-retinylester	1,65 +/-0,49	235+/-70	0,0057	1		
Kichererbsen-extrakt	1,71 +/-0,09	245+/-13	0,00010		1	
Kichererbse + Retinol	3,19 +/-0,14	456+/-20	3,53E-07	9,45E-06	0,0018	Ja
Kichererbse + Palmitinsäure-retinylester	2,78+/- 0,11	393+/-15	1,02E-06	0,000733	0,0047	Ja
Kichererbse + Linolsäure-retinylester	3,43+/- 0,26	490+/-37	5,7E-07	0,000132	0,0018	Ja
Kichererbse + Essigsäure-retinylester	3,74 +/- 0,09	534+/-13	6,27E-08	0,0044	0,00054	Ja

**[0040]** Die in Beispielen 1–4 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Retinoide bei gewissen Konzentrationen mit Kichererbsenextrakt bei gewissen Konzentrationen Synergie eingehen. Optimale Synergie wurde mit allen den Retinoiden bei einem Spiegel von 500 nM und 1 µl Kichererbsenextrakt beobachtet.

**[0041]** Es sollte verständlich sein, dass die speziellen Formen der Erfindung, die hierin erläutert und beschrieben werden, nur als repräsentativ anzusehen sind. Änderungen, die in dieser Beschreibung vorgeschlagen

wurden, jedoch nicht nur jene, können in erläuterten Ausführungsformen erfolgen, ohne von den deutlichen Lehren der Offenbarung abzuweichen. Folglich sollte beim Bestimmen des vollen Umfangs der Erfindung Bezug auf die nachstehenden, beigefügten Ansprüche genommen werden.

### **Patentansprüche**

1. Kosmetische Hautpflegezusammensetzung, umfassend
  - (i) einen Extrakt mit organischem Lösungsmittel aus Kichererbsen in einer Menge von 0,00001 bis 10 Gew.%,
  - (ii) ein Retinoid, ausgewählt aus Retinol und Retinylestern, in einer Menge von 0,001 bis 10 Gew.-% und
  - (iii) einen kosmetisch verträglichen Träger.
2. Kosmetisches Verfahren zum Verbessern des Aussehens von faltiger, furchiger, schuppiger oder gealterter Haut und Verbessern von Hautdicke, Elastizität, Bielsamkeit und Rundlichkeit, wobei das Verfahren Auftragen der Zusammensetzung nach Anspruch 1 auf die Haut umfasst.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Verbesserung des Aussehens von trockener oder lichtgeschädigter Haut.
4. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zum Erhöhen des Spiegels an zellulärem Retinsäure-Bindungsprotein in den Hautfibroblasten.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen