

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2019-75
(22) Přihlášeno: 11.02.2019
(40) Zveřejněno: 11.03.2020
(Věstník č. 11/2020)
(47) Uděleno: 29.01.2020
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 11.03.2020
(Věstník č. 11/2020)

A61K 35/66 (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 38/43 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 8/30 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

LAI Y. et al.: „Activation of TLR2 by small molecule produced by Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defence against bacterial skin infections,“ Journal of Investigative Dermatology, vol. 130, no. 9, 2010, str. 2211 – 2221, ISSN 0022-202X; SHU M. et al.: „Fermentation of Propionibacterium acnes, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against mericillin-resistant Staphylococcus aureus“, PlosOne, vol. 8, no. 2, 2013, str. e55380, ISSN 1932-6203; KRAMER S.: „Nitrosomonas eutropha: A study of the effects of Nitrosomonas on pathogenic bacterium and the effects of current hygiene habits on the colonization of Nitrosomonas eutropha within our normal flora,“ JCCC Honors Journal, vol. 7, no. 1, 2015, článek 3, ISSN 2154-7548; LEE N. Y. et al.: „Dermal microflora restoration with ammonia-oxidizing bacteria Nitrosomonas eutropha in the treatment of keratosis pilaris: A randomized clinical trial,“ Journal of Drugs in Dermatology, vol. 17, no. 3, 2018, str. 285 – 288, ISSN 1545-9616.
WO 2013122931; WO 2015184134; WO 2018051021.

- (73) Majitel patentu:
BiomCare s.r.o., Dobříš, CZ
- (72) Původce:
prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc., DSc., Praha 6,
Bubeneč, CZ
RNDr. Jan Engl, CSc., Rumburk, Rumburk 1, CZ
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ
Mgr. Adam Norek, Ph.D., Brno, Štýřice, CZ
- (74) Zástupce:
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková
kancelář, RNDr. Roman Hák, U průhonu 827/5,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název vynálezu:
**Kombinované několikastupňové
mikrobiální přípravky a způsob jejich
aplikace**

- (57) Anotace:
Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek pro posílení přirozené biologické bariéry a obrany na kůži a sliznicích oslabené například v případě dysbiotických stavů, symptomů a onemocnění na kůži, jako jsou atopická dermatitida, akné, růžovka, lupenka a vitiligo, popřípadě oslabené v důsledku termického nebo mechanického poškození, jako je popálení, pořezání a zhmoždění, založený na sekvenčním použití účinných látek schopných
- 1) v prvním stupni rozrušit biofilmy tvořené patogenními mikroorganismy na kůži a potlačit viabilitu uvolněných patogenních mikroorganismů
 - 2) ve druhém stupni uklidnit zánět způsobený rozbourěným imunitním systémem a obnovit účinnou biologickou bariéru
 - 3) ve třetím stupni dosáhnout obnovy normální fyziologické mikroflóry porušené dysbiosou a

4) ve čtvrtém stupni poskytnout látky podílející se na dlouhodobé nespecifické ochraně a přispívající ke správné konzistenci a výživě na kůži, vyznačující se tím, že účinné látky mohou být aplikovány na kůži a sliznice ve formě olejových emulzí, krémů, mastí, gelů i jiných kosmetických nebo lékařských kompozic s olejovou komponentou. Metoda aplikace kombinovaného několikastupňového mikrobiálního kosmetického přípravku založená na postupné aplikaci ve čtyřech obdobích tak, že každé z prvního, druhého a třetího období trvá jeden až dva týdny, a čtvrté období trvá jeden až šest týdnů, s tím, že aplikace je prováděna alespoň jednou denně, výhodně ráno a večer, pomocí rozstřiku nebo rozetřením příslušného stupně přípravku na postižená místa a případně i jejich okolí, nebo v případě výskytu velmi citlivých ložisek se aplikuje pouze do okolí těchto ložisek.

Kombinované několikastupňové mikrobiální přípravky a způsob jejich aplikace

Oblast techniky

Vynález se týká mikrobiálních bezbuněčných přípravků, které jsou účinné zejména pro posílení biologické komponenty kožní bariéry a udržení dobré kondice mikrobiálních komunit v kůži. Mohou být využity jako přípravky kosmetické i léčivé.

Dosavadní stav techniky

Koncepce rovnováhy mikrobiálních komunit v různých částech těla a blahodárného vlivu majoritních komensálních mikroorganismů na zdraví kůže a formování normální imunity v této části těla pochází již ze 60. a 70. let minulého století, kdy byly základy tohoto oboru položeny vědci bádajícími na pomezí mikrobiologie a imunologie. V tomto raném období byly objeveny základní principy mikrobiálních rovnováh, avšak jejich přesná povaha zůstala skryta vzhledem k metodickým omezením (detekce jednotlivých mikroorganismů pouze na základě kultivačních a biochemických metod). K dramatické změně této situace došlo během prvních dvou desetiletí nového milénia, kdy získal vědecký výzkum nové možnosti využívající kultivačně nezávislé analýzy jednotlivých přítomných mikroorganismů pomocí PCR amplifikace identifikačních sekvencí (nejčastěji ITS sekvencí nacházejících se v genech pro ribosomální RNA) v kombinaci s významným urychlením DNA sekvence pomocí zařízení využívajícího principu DNA sekvenování nové generace (NGS, z angl. Next Generation Sequencing). Kromě metodického pokroku pak k vědeckému poznání a upřesnění mikrobiálních komunit v různých částech lidského těla přispěl mezinárodní projekt Human Microbiome Project garantující zejména nasazení dostatečné vědecké a finanční kapacity pro řešení jednotlivých úkolů. Počátkem současné dekády tak mohly být publikovány prvé výsledky popisující lidský mikrobiom u normálních jedinců a u jedinců trpících různými onemocněními souvisejícími s mikrobiální nerovnováhou (dysbiosou) (Grice a Segre 2011, Human Microbiome Project Consortium 2012, Sanford a Gallo 2013). Pokud jde o onemocnění na kůži a sliznicích, bylo ukázáno, že oslabení dominantního komensálního mikroorganismu kůže, bakterie *Staphylococcus epidermidis* (dále *S. epidermidis*), může vést k oslabení biologické komponenty kožní bariéry a kůže se pak stává náchylnou k infekcím obávaným patogenem kůže, bakterií *Staphylococcus aureus* (dále *S. aureus*).

Vzhledem k nákladům a úsilí vloženým do projektu Human Microbiome Project očekávala veřejnost řadu praktických výstupů, zejména však uvedení na trh mnoha různých prostředků na řešení dysbiotických stavů a chorob s těmito stavy spojených. Doposud se však praktických řešení spojených s uplatněním nových poznatků objevilo velmi málo. Smoragiewicz a spol. (US2011/195057) popisují inhibiční vliv vybraných kmenů laktobacilů na methicillin-rezistentní *S. aureus*. Gallo a Nakatsuji (US2015/290209) popisují nové antimikrobiální činidlo pocházející z mikroorganismu *S. epidermidis* označené jako firmocidin. Kleinberg a Zhang (US2016/263154) vyvinuli jednoduchou chemickou kompozici působící jako prebiotikum modifikující lidský kožní mikrobiom mechanismem snížení proliferace dominantního patogena kůže bakterie *S. aureus* na úkor kožní komensální bakterie *S. epidermidis*. Park a spol. (KR2017/3478) popisují vynález založený na kmenech *S. epidermidis* rozrušujících biofilmy tvořené na kůži patogenními mikroorganismy. Takayama a Yuko (CN2018/107922956) popisují modifikovaný kmen *S. epidermidis* produkující zvýšená množství antimikrobiálních peptidů a jeho použití pro ochranu kůže. Podobný je i vynález Nakatsuji a Galo (US2018/289751) navrhuje antimikrobiální terapii založenou na kmenech bakterie *S. epidermidis* produkujících hogicidinové peptidy nazývané SH-lantibiotika a též patent Kazue a spol. (CN2018/107922956).

Využití nových poznatků o mikrobiotách lidské kůže je dále předmětem několika publikací uveřejněných během posledních let. Naik a spol. (2012) ukázali, že kožní mikrobiota mají

autonomní úlohu při tvorbě lokálního imunitního systému a obranu proti mikrobiálním patogenům. Skutečnost, že dysbiosu je společně s infekcí patogenní bakterií *S. aureus* hlavním hnacím motorem zánětu u atopické dermatitidy byla prokázána Kobayashim a spol. (2015) na modelu ADAM17-deficientních myši. Vztah dysbiosy a různých problémů citlivé kůže je ve studiích opakovaně prokazován - například Kong a spol. (2012) a Ganju a spol. (2016).

Různé publikované studie konečně předkládají velké množství důkazů z hlediska identifikace konkrétních skupin a typů látek, jejichž nepřítomnost se může podílet na vzniku problematické pokožky. Většinou se jedná o látky produkované dominantním kožním komensálním mikroorganismem *S. epidermidis* chybějící v případě deficiencie tohoto mikroorganismu na kožních lezích postižených dysbiosami. Specifická proteináza tohoto mikroorganismu štěpící cílové proteiny za zbytkem kyseliny glutamové podobná V8 proteináze je označena Esp a byla prokázána její úloha při eliminaci (inhibici) patogenních biofilmů na kůži a též při degradaci specifických povrchových proteinů patogena *S. aureus* (Iwase a spol. 2010, Sugimoto a spol. 2013). Jako typický protizánětlivý faktor se ukázala být kyselina lipoteichoová sekretovaná bakterií *S. epidermidis* (Lai a spol. 2009). Novější studie ovšem prokázaly, že řada přirozených komensálních kmenů tohoto mikroorganismu izolovaných z kožních stěrů není dobrým producentem této látky, na rozdíl od netoxického a biofilmy netvořícího sbírkového kmene *S. epidermidis* ATCC_12228 (Garcia-Gomez a spol. 2017). V posledku byla identifikována kritická úloha antimikrobiálních peptidů produkovaných některými kmeny *S. epidermidis*, z nich potom zejména y-modulinu a peptidů náležících do SH-lantibiotik (Cohen a spol. 2010a, Cohen a spol. 2010b, Nakatsuji a spol. 2017).

Všechna výše navržená řešení mají řadu významných omezení. Mnohá z těchto řešení byla odzkoušena pouze na laboratorní úrovni a jejich spolehlivé fungování tedy není opřeno o náležité praktické testy. Mnohé přípravky obsahují živé mikrobiální kmeny, což umožňuje jejich zařazení pouze mezi léčiva. Vzhledem ke složitému registračnímu procesu ovšem není doposud na trhu jediný přípravek tohoto druhu, tyto přípravky jsou pouze ve stádiu klinických zkoušek (a tedy nedostupné pro většinu postižené populace). Použití autologních kmenů přenesených na postižená místa autologní transplantací může být též problematické, protože kmeny v přirozených izolátech nemusí mít očekávané látky a účinky (Garcia-Gomez a spol. 2017).

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky částečně nebo úplně odstraňuje přípravek podle předloženého vynálezu, kdy jsou oproti předcházejícím řešením zejména nově uplatněny poznatky a principy získané přihlašovatelem během výzkumu a praktického ověřování vynálezu.

Jako nejdůležitější nový princip vystupuje v předkládaném vynálezu několikastupňový návrh řešení problémů vyskytujících se na kůži náchylných jedinců, kdy je potřeba nejdříve kůži důkladně očistit a zbavit ji patogenů ukrytých v obtížně dostupných biofilmech před tím, než je provedena modulace zánětu způsobeného rozbouřeným imunitním systémem a jeho postupné uklidnění spojené s účinnou eliminací patogenů uvolněných z biofilmových deposit. Teprve po vyčištění kůže, eliminaci patogenů, zklidnění imunitního systému a zejména též normalizaci mikrobiální nerovnováhy a nastolení normálního složení kožní mikrobioty jsou aplikovány látky způsobující dlouhodobé posílení biologické komponenty kožní bariéry. Látky ve formě mikrobiálních extraktů, lyzátů nebo částečně purifikovaných směsí jsou získány zejména z komensálních kožních a z půdních mikroorganismů, včetně takových vyskytujících se na kůži moderního člověka pouze sporadicky. Toto mnohastupňové řešení je možno si představit jako sérii po sobě následujících vln, kdy následná aplikace plynule navazuje na předcházející aplikaci a tímto způsobem umožňuje potřebné snížení koncentrace jedné vlny účinných látek a postupné zvýšení koncentrace jiných látek vlny následující. Počet a časování jednotlivých vln byl přihlašovatelem neustále zdokonalován až do podoby systému čtyř vln s následnou aplikací dalších prostředků dlouhodobé stabilizace mikrobiomu kůže s použitím vhodných výživných a

podpůrných látek a prebiotik.

Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle předloženého vynálezu tedy obsahuje čtyři stupně přípravku, které se užijí postupně, přičemž první stupeň přípravku obsahuje účinné látky schopné rozrušit biofilmy tvořené patogenními mikroorganismy na kůži a potlačit viabilitu uvolněných patogenních mikroorganismů, druhý stupeň přípravku obsahuje účinné látky schopné uklidnit zánět způsobený rozbouřeným imunitním systémem a obnovit účinnou biologickou bariéru, třetí stupeň přípravku obsahuje účinné látky schopné dosáhnout obnovy normální fyziologické mikroflóry porušené dysbiosou, a čtvrtý stupeň přípravku obsahuje alespoň jednu účinnou látku podílející se na dlouhodobé nespecifické ochraně a přispívající k posílení náležité fyzikálně-chemické bariéry kůže a její výživě.

Řešení uváděná ve stavu techniky jsou založená převážně na aplikaci živých (viabilních) mikroorganismů včetně jejich kolonizace a následného sledování na jednotlivých místech aplikace. Takový postup je ovšem náročný zejména z pohledu registračních a regulačních řízení: živé mikroorganismy samozřejmě ovlivňují fyziologické a imunologické procesy na kůži a regulačně se tedy jedná o léčivé přípravky s živými mikroorganismy. Regulačně je tato kategorie jedna z nejnáročnějších a ke dni podání přihlášky tohoto vynálezu neexistuje na trhu jediný přípravek tohoto druhu. Do pozdních fází klinických zkoušek se zatím dostalo jen několik takových přípravků. Z praktického pohledu znamená tento problém významné zpoždění na cestě k jednotlivým uživatelům. Naopak řešení navrhané v předkládaném vynálezu je založené na použití mikrobiálních extraktů bez obsahu živých mikroorganismů, které je možno použít jako komponenty kosmetických přípravků pro posílení kožní bariéry bez významných regulačních omezení (příslušné extrakty jsou v kosmetické regulativě označené názvem příslušného původového mikroorganismu a přídavkem "ferment").

Účinné látky pro první stupeň několikastupňového přípravku obsahují jako aktivní komponenty zejména směsi hydrolytických enzymů s proteolytickými a glykohydrolytickými aktivitami, kdy toto složení je dáno známým složením patogenních biofilmů skládajících se ze směsi mikroorganismů spojených vzájemně adhezivními proteiny a kryjící se polysacharidovým filmem podobným svoji strukturou celofánu (tento film je tvořen zejména β -1,3-glukanem odpovídajícím svoji strukturou polysacharidu laminarinu, dale celulózu a chitinem). Kožní komensální mikroorganismy jsou podle publikovaných literárních dat schopné do určité míry rozrušit patogenní biofilmy tvořené kožními patogeny, přičemž tuto schopnost mají zejména proteinázy a v menší míře laminarinázy sekretované těmito mikroorganismy. Aktivní látky pro první stupeň přípravku lze získat z kožních komensálních mikroorganismů, konkrétně z bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Proteobacterium*. Pro předkládaný vynález byly cílové enzymové aktivity získány zejména z mikroorganismu *S. epidermidis*.

Pro zvýšení účinnosti bylo spektrum potřebných enzymových aktivit doplněno o hydrolázy nedostatečně zastoupené u komensálních mikroorganismů (celulázy, chitinázy). Vhodným zdrojem potřebných enzymů mohou být půdní bakterie rodu *Trichoderma*, *Pythium*, *Nitrosomonas* a *Mycobacterium*, jejichž extrakty jsou komerčně dostupné. Pro předkládaný vynález byly cílové enzymové aktivity získány zejména z mikroorganismu *Pythium nunn* (dále *P. nunn*), který je v literatuře popsán společně s *Trichoderma* jako hojný zdroj těchto enzymů (3). Pro praktickou aplikaci v kosmetických přípravcích se jako kritické jevílo získání homogenních šarží enzymových preparátů a tento úkol byl přihlašovatelem úspěšně vyřešen, jak je detailně uvedeno v příkladu 1. Dávkování enzymových aktivit ve finálním přípravku pro první stupeň vycházelo jednak z publikovaných poznatků v enzymových terapiích, jednak z našich vlastních laboratorních dat rozrušení biofilmů uvedených v příkladu 4. Účinné látky pro první stupeň přípravku tedy jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z kožních komensálních mikroorganismů vybraných z bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Proteobacterium* a půdních mikroorganismů vybraných z mikroorganismů rodu *Trichoderma*, *Pythium*, *Nitrosomonas* a *Mycobacterium*, výhodně z rodu *Staphylococcus* a

Pythium, nejvýhodněji z mikroorganismů *Staphylococcus epidermidis* a *Pythium nunn*. Účinné látky pro první stupeň zahrnují proteinázy, laminarinázy, celulózy a chitinázy.

Pokud jde o účinné látky pro druhý stupeň až čtvrtý stupeň, tyto látky byly v posledních letech identifikovány buď naším empirickým zkoušením, nebo jsou publikovány ve vědeckých studiích uvedených ve stavu techniky. Dobrá antimikrobiální aktivita a schopnost rozrušovat biofilmy byla prokázána laboratorními testy popsány v příkladu 4. Testy byly důležité pro určení ředících poměrů účinných látek pro jejich přidání do finálních přípravků a přinesly též některé překvapivé poznatky, zejména z hlediska schopnosti snižovat viabilitu mikroorganismů uvolněných z biofilmů (kombinovaný efekt rozrušení biofilmů a zabití patogenů). Účinné látky pro druhý stupeň přípravku jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z kožních komensálních mikroorganismů vybraných z bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Proteobacterium*, výhodně rodu *Staphylococcus*, nejvýhodněji *Staphylococcus epidermidis*. Účinné látky pro druhý stupeň zahrnují kyselinu lipoteichoovou, antimikrobiální peptidy SH-lantibiotikového typu, antimikrobiální peptid γ -modulin a Esp proteinázu.

Účinné látky pro třetí stupeň přípravku jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z půdních bakterií vybraných z mikroorganismů rodu *Trichoderma*, *Pythium*, *Nitrosomonas* a *Mycobacterium*, výhodně rodu *Nitrosomonas* a nejvýhodněji *Nitrosomonas europea*. Účinné látky pro třetí stupeň zahrnují jak nízkomolekulární látky, tak i proteiny, zejména proteiny obsahující membránový komplex oxidující močovinu a produkující oxid dusnatý.

Účinné látky pro čtvrtý stupeň jsou látky, které přispívají k hydrataci a regeneraci kůže a stabilizaci kožní mikroflóry a mohou být vybrány z následujících látek: xylitol, farnesol, L-arginin, světlicový olej, pupalkový olej, konopný olej, řepkový olej, olej z pšeničných klíčků, laktát, glycin, fruktosa, niacinamid, inositol, aspartát hořečnatý, glukonát zinečnatý a glukonát měďnatý. Alespoň jedna z těchto látek může být přítomna ve formulacích pro kterýkoliv z prvního až třetího stupně vícestupňového přípravku.

Výše uvedené účinné látky je možné formulovat do přípravků, výhodně ve formě pleťového mléka, krému, gelu nebo pěny, a v případě léčivých přípravků ve formě kožní emulze, krému, kožní pěny nebo gelu. Výhodné formy jsou pleťové mléko a kožní emulze, které mohou být případně i ve formě spreje.

Výsledný přípravek, resp. každý stupeň vícestupňového přípravku, obsahuje účinné množství příslušných výše uvedených účinných látek. Účinné množství odborník stanoví na základě testů popsanych v předkládané přihlášce nebo testů, které jsou odborníkům všeobecně známé. Výhodná účinná množství jsou uvedena v příkladech provedení vynálezu.

Za standardní aplikační dávku kožní emulze nebo pleťového mléka lze považovat dávku o objemu 1 až 5 ml, výhodně 3 ml. Aplikační dávka může být výhodně definována dávkovací pumpičkou, která může být součástí obchodního balení.

Obchodní balení vícestupňového přípravku může obsahovat pro každý stupeň samostatné balení o objemu např. 30 ml, 75 ml, 150 ml, 300 ml, 400 ml nebo 500 ml. Maloobjemová balení (30 ml, 75 ml, 150 ml) mohou být výhodně ve formě tuby, velkoobjemová (300 až 500 ml) ve formě lahvičky s dávkovací pumpičkou. Jiným výhodným balením je rozprašovač (sprej).

Uvedení připravených účinných látek do prostředí přípravku (kosmetického a/nebo léčivého) ve formě olejové emulze (kožní emulze, pleťového mléka) se ukázalo jako poměrně obtížné. Poměrně dlouhý proces zkoušení vedl nakonec k získání směsí s dostatečnou kompatibilitou a dlouhodobou stabilitou vhodné pro kosmetické aplikace. Finální optimalizovaná kompozice obsahovala vodu jako solvent, triethylamonium acetát jako pufrující komponentu poskytující optimální pH kůže kolem 4,7 až 4,8, glyceryl stearát jako emulgátor a polyakrylát crosspolymer 6

a xanthanovou gumu jako regulátory viskozity. Stanovená stabilita této kompozice v přítomnosti aktivních komponent činila více než 12 měsíců, z čehož byla odvozena i stabilita příslušného kosmetického přípravku. Během uvádění účinných látek do prostředí kosmetického přípravku byla překvapivým způsobem zjištěna významná stabilizace použitých enzymových aktivit v prostředí olejové emulze, kdy byly jak hodnoty změřených enzymových aktivit, tak i dlouhodobé stability až dvojnásobné.

V počátečních experimentech praktického testování byla ověřena účinnost formulovaných kosmetických přípravků na cílových skupinách uživatelů. Vzhledem k tomu, že se jednalo o kompozice plánované pro uvedení na trh zejména jako kosmetické přípravky, nebylo úplné odstranění zdravotního problému požadováno (a také k němu vždy nedošlo). Nicméně, ve všech aplikacích byly přípravky hodnoceny uživateli pozitivně i oproti mnoha alternativním přípravkům na trhu, kdy bylo oceňováno zejména úplné nebo částečné zlepšení vizuálního vzhledu poškozené kůže, zklidnění situace na místech aplikace z hlediska svědění a jiných nežádoucích jevů a pozitivní účinek vůči některým skupinám mikroorganismů (stafylokoky, plísně). Zcela originálním poznatkem potom je použití u popálenin a mechanických zranění kůže, kde se může uplatňovat jak efekt čištění, tak i stimulace růstu při obnově nové kůže.

Přípravek podle předloženého vynálezu obsahující čtyři stupně se výhodně aplikuje tak, že jednotlivé stupně se aplikují postupně ve čtyřech obdobích, přičemž v prvním období se aplikuje první stupeň přípravku, ve druhém období se aplikuje druhý stupeň přípravku, ve třetím období se aplikuje třetí stupeň přípravku a ve čtvrtém období se aplikuje čtvrtý stupeň přípravku, přičemž každé z prvních, druhého a třetího období trvá jeden až dva týdny a čtvrté období trvá jeden až šest týdnů. Přitom aplikace je prováděna alespoň jednou denně, výhodně ráno a večer, pomocí rozstřiku nebo rozetřením příslušného stupně přípravku na postižená místa a případně i jejich okolí, nebo v případě výskytu velmi citlivých ložisek se aplikuje pouze do okolí těchto ložisek.

Objasnění výkresů

Vynález je dále podrobně popsán na příkladných provedeních a blíže osvětlen na připojených schématických výkresech:

Obr. 1 Způsob přípravy a reprodukovatelnost přípravy účinných látek pro fázi čištění a disrupce (první stupeň), přičemž podrobněji ukazuje

obr. 1A analýzu jednotlivých šarží proteinů sekretovaných bakterií *S. epidermidis* kmene ATCC_12228 po jejich koncentraci a převedení do konzervačního pufru pro uvedení do kosmetického přípravku, kdy ve drahách 1 a 10 jsou umístěny molekulové standardy a ve drahách 2 až 9 potom osm jednotlivých popisovaných šarží,

obr. 1B analýzu jednotlivých šarží proteinů sekretovaných půdním mikroorganismem *P. nunn* kmene CBS_808.96 po jejich koncentraci a převedení do konzervačního pufru pro uvedení do kosmetického přípravku, kdy ve drahách 1 a 10 jsou umístěny molekulové standardy a ve drahách 2 až 9 potom osm jednotlivých šarží.

Obr. 2 Způsob přípravy a průkaz přítomnosti a koncentrace jednotlivých účinných látek pro fázi zklidnění imunitního systému (druhý stupeň), přičemž podrobněji ukazuje

obr. 2A celkové schéma frakcionace lyzátů bakterií *S. epidermidis* kmene ATCC_12228 založené na vysolování síranem amonným, přičemž jsou poté rozpustné látky v supernatantu po centrifugaci ("sup.") dále děleny chromatografií na sloupci fenyyl-Sepharosy HR, zatímco látky nacházející se v sedimentu po centrifugaci ("sed.") jsou dále děleny chromatografií na sloupci octadecylsilikagelu. Jednotlivé frakce získané po těchto chromatografiích jsou

uvedeny zkratkou “F”,

obr. 2B až 2E elektroforetickou a imunochemickou analýzu separovaných látek metodou elektroforezy ve 20% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), přičemž na obr. 2B a obr. 2C jsou analyzovány látky v supernatantu a na obr. 2C potom specificky kyselina lipoteichoová (LTA, lipoteichoic acid) a na obr. 2D a 2E látky v sedimentu, specificky potom na obr. 2E peptidy typu lantibiotik. Přibližná molekulární velikost látek separovaných na gelu je indikována pomocí molekulového markeru ukázaného vždy v pravé části obrázku. Prošlé frakce F1 a F2 z RPLC18 chromatografie bylo třeba též analyzovat na 12% gelu a zóna odpovídající Esp proteináze je vyznačena.

Obr. 3 Laboratorní testy antimikrobiální účinnosti připravených aktivních látek vůči kritickým patogenům na kůži a sliznicích s tím, že podrobněji ukazuje

obr. 3A diskový test účinnosti připravených antimikrobiálních látek vůči patogenní bakterii *S. aureus* kmene ATCC_6538, s tím, že na disky byly postupně aplikovány následující látky: v první, horní řadě SEF2K1 ředěný 10x, 10²x, 10³x a 10⁴x, ve druhé řadě SELY ředěný 10²x, 10³x, 10⁴x a 10⁵x, ve třetí řadě NIE1 ředěný 10x, 10²x, 10³x a 10⁴x a v poslední řadě tetracyklin o koncentraci 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml a 4 µg/ml,

obr. 3B kvantitativní MIC (minimum inhibitory concentration) test prováděný pro čtyři různé šarže SEF2 (vzorky 1 až 4), čtyři různé šarže SELY (vzorky 2 až 5) a čtyři různé šarže směsi rozpustných proteinů směsi průmyslových bakterií s obsahem bakterie rodu *Nitrosomonas* označené NIE1, NIE2, NIE3 a NIE4,

obr. 3C a 3D diskový test účinnosti připravených látek vůči patogenní kvasince *Candida albicans* kmene ATCC_10231, přičemž Petriho miska na obr. 3C byla inkubována 24 h při 30 °C a Petriho miska na obr. 3D byla inkubována při této teplotě 48 h. Na disky byly postupně aplikovány následující látky: v první, horní řadě SEF2K1 ředěný 10x, 10²x, 10³x a 10⁴x, ve druhé řadě SELY ředěný 10²x, 10³x, 10⁴x a 10⁵x, ve třetí řadě NIE1 ředěný 10x, 10 x, 10 x a 10 x a v poslední řadě enikonazol (chemická látka potlačující plísně a kvasinky) v koncentraci 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml a 8 mg/ml.

Obr. 4 Laboratorní test rozrušení biofilmu tvořeného patogenní bakterií *S. aureus* kmene ATCC_6538 s tím, že podrobněji ukazuje

obr. 4A příklad mikrotitrační destičky po inkubaci s látkami po dobu 24 hodin, promytí a detekci nerozrušeného biofilmu krystalovou violetí s tím, že jednotlivé experimenty byly prováděny v kvadruplikátu ve čtvercovém uspořádání vždy na čtyřech sousedních jamkách,

obr. 4B ukazuje průměrné hodnoty kvadruplikátních vyšetření, kdy byla tvorba biofilmů měřena pouze v konzervačním pufru (K) nebo v konzervačním pufru obsahujícím PNF1K1 (PN) nebo v konzervačním pufru obsahujícím SEF2K1 (SE) nebo v konzervačním pufru obsahujícím SELY (LY), nebo v konzervačním pufru obsahujícím různé indikované kombinace výše uvedených látek (experiment PNSELY a PNSE), přičemž výše uvedené látky byly testovány jednak v neředěné podobě (1x), jednak v podobě roztoků sériově ředěných médiem pro tvorbu biofilmů (10x, 100x, 1000x),

obr. 4C s identickými daty jako na obr. 4B, pouze vyjádřené jako % inhibice tvorby biofilmu vypočtené podle vzorce: % inhibice = (A₅₉₅ pro neznámý vzorek - A₅₉₅ pozadí) / (A₅₉₅ pro kontrolu - A₅₉₅ pro pozadí) x 100,

obr. 4D ukazuje viabilitu ve vzorcích bakterie *S. aureus* kmene ATCC_6538 stanovenou kultivačně (CFU, kolonie tvořící jednotky) ve vzorcích supernatantu po inkubaci s jednotlivými látkami odebraného před promývacím krokem.

Obr. 5 Průběh aplikace u pacienta (muž, 29 let) s celoživotním atopickým ekzémem v posledních letech lokalizovaným do oblasti kotníku. Na fotografiích je znázorněn stav před aplikací přípravku (panely A a B) a po skončení 4 týdnů aplikace se čtyřstupňovým přípravkem (panely C a D). Stav po aplikaci byl charakterizován jako významné zklidnění.

Obr. 6 Průběh aplikace u 22 let staré ženy s atopickým ekzémem na ruce a předloktí. Na fotografiích je znázorněn stav před aplikací přípravku (panely A a B) a po skončení 4 týdnů aplikace se čtyřstupňovým přípravkem (panely C a D). Stav po aplikaci byl charakterizován jako mírné zlepšení s významným zklidněním, přičemž ustalo pálení a svědění.

Obr. 7 Průběh aplikace u 74 let staré ženy s dlouhodobými problémy s plísňovými a kvasinkovými infekcemi na chodidlech a nártu. Na fotografiích je znázorněn stav před aplikací přípravku (panely A a B) a po skončení dvou týdnů aplikace zahrnujících první a druhý stupeň (panely C a D). Stav po aplikaci byl charakterizován jako významné zlepšení v situaci, kdy se dlouhodobě nedařilo situaci zlepšit pomocí standardní léčby.

Obr. 8 Průběh aplikace samotného přípravku pro první stupeň na popáleninu ruky u 58-letého muže. Přípravek ve formě pletěvého mléka byl aplikován dvakrát denně ráno a večer na prsteník obsahující rozsáhlejší a hlubší popáleninu, zatímco sousední prostředník s významně mírnějším popálením byl použit jako kontrolní plocha znázorňující postup hojení bez jakéhokoliv ošetření. Fotografie ukazují stav před aplikací (obr. 8A) a poté 3 dni, 7 dni a 12 dni po zahájení aplikací (obr. 8B, 8C a 8D) s použitím jen přípravku pro první stupeň. Stav po aplikaci uváděn jako dokonalé vyhojení kůže bez jizev nebo změny pigmentace.

Příklady uskutečnění vynálezu

Podstata vynálezu je dále demonstrována pomocí příkladných řešení popisujících a ukazujících způsob biotechnologické výroby potřebných účinných látek, laboratorní testování jejich antimikrobiálních účinků na kritické patogeny na kůži a sliznicích a konečně příklady praktických aplikací pro řešení některých vybraných problémů poškozené kůže. Pomocí příkladných provedení je demonstrována povaha, podstata a praktické ověření vynálezu, který však není těmito příkladnými provedeními omezován. Tato příkladná provedení jsou uvedena, aby popis byl důkladný a úplný a plně zprostředkoval podstatu vynálezu v rozsahu patentových nároků.

Provedení příkladných řešení je založeno na metodách běžných v oboru řešení. Pro kultivaci použitých mikroorganismů byla použita jednak běžná média doporučená poskytovatelem jednotlivých mikroorganismů, byla však též odzkoušena nová originální média vyhovující specifickým požadavkům některých kultivací. Kultivace mikroorganismů sloužících jako zdroj účinných látek byla prováděna jak v laboratorních třepáčkách, tak i za vysoce kontrolovaných podmínek s využitím 2 paralelních laboratorních fermentorů o objemu 5 l. Mikroorganismy byly separovány od fermentačního média v průtokové centrifuze a biomasa byla použita jako zdroj látek bakteriálního lyzátu. Médium bylo koncentrováno diafiltrací na polyestersulfonátových koncentračních membránách s molekulárním vylučovacím limitem 10 kDa. Po zakoncentrování byly rozpustné látky sekretované do média stejným způsobem převedeny do konzervačního pufru o pH 4,7, který obsahoval zejména stabilizátory a konzervanty. Ve směsi proteinů sekretovaných do média byl stanoven protein metodou podle Bradforda, aktivita proteináz azokaseinovou metodou a aktivita glykohydroláz stanovením množství redukujících sacharidů po inkubaci s příslušným polysacharidovým substrátem. Jedna enzymová jednotka byla definována jako množství enzymu schopné rozštěpit 1 nmol substrátu za minutu za daných experimentálních podmínek. Tato enzymová jednotka odpovídá jedné tisícině mezinárodní enzymové jednotky (U). Bakteriální biomasa po kultivaci *S. epidermidis* byla lyzována opakovanou sonikací do konzervačního média obsahujícího detergenty se sacharidovou hydrofilní komponentou a

vysokou hodnotou kritické micelární koncentrace: methyl-6-O-(N-heptylkarbamoyl)- α -D-glukosid, N-oktanoyl-N-methylglukamin a 2-cyklohexylethyl- β -D-maltosid. Extrahované komponenty byly dále frakcionovány vysolováním síranem amonným do 75% koncentrace a následnou separací pomocí hydrofobní chromatografie na fenyl-Sepharose a oktadecylsilikagelu.

5 Pro stanovení antimikrobiální účinnosti vůči klíčovým patogenům na kůži a sliznicích byly použity laboratorní testy jako je diskový test, test minimální inhibiční koncentrace (MIC, cit. 8) a test tvorby biofilmu na mikrotitračních destičkách (cit. 16).

Praktické testování přípravků bylo provedeno u jedinců se symptomy a problémy souvisejícími s porušením kožní bariéry a mikrobiální nerovnováhou. Jednalo se zejména o atopickou dermatitidu (atopický ekzém), kožní infekce způsobené bakterií *S. aureus*, kožní infekce způsobované plísněmi a kvasinkami a též jiná poškození kůže bez přímého napojení na mikrobiální rovnováhy, například popáleniny. Veškeré testy proběhly na základě podepsaného informovaného souhlasu s tím, že účastníkům testu byl k dispozici kromě testovacího přípravku

15 též návod k použití tohoto přípravku a dále aplikační protokol sloužící pro vedení pacienta během studie a zapisování získaných výsledků. Veškeré údaje získané během studie jsou anonymní, identita testujících osob nebyla přihlašovatelovi vyjevena. Výsledky studie ve formě dotazníků vyplněných uživateli a poskytnuté fotodokumentace jsou uchovávána v bezpečném úložišti na pracovišti přihlašovatele a budou použita výlučně pro potřeby přihlašovatele.

20 Příklad 1

Příprava účinných látek potřebných pro první stupeň přípravku rozrušujících biofilmy tvořené patogenními mikroorganismy na kůži a potlačujícími viabilitu uvolněných patogenních

25 mikroorganismů

V případě mikroorganismu *S. epidermidis* nebylo bohaté médium tryptone soya broth optimální zejména z pohledu nedefinovaného složení a přítomnosti nežádoucích nespecifických enzymových aktivit. Z tohoto důvodu bylo odzkoušeno dosti komplexní plně syntetické médium

30 obsahující běžné živiny společně s koktejlem minerálů a vitamínů doporučeným pro tuto bakterii. V případě mikroorganismu *P. nunn* byla potom modifikace vynucena zejména zařazením požadovaných induktorů cílových enzymových aktivit, tj. peptidů a oligosacharidových fragmentů polysacharidů mikrobiálních buněčných stěn. Zatímco laminarin (induktor laminarinázy, endo- β -1,3-glukosidázy) a methylcelulóz (induktor celulózy, endo- β -1,4-

35 glukosidáz jsou v literatuře pro tyto účely běžně zmiňované a používány, v případě induktoru chitinázy nebylo možné použít běžný polysacharid chitin nerozpustný ve vodě, ale bylo třeba provést jeho kyselou hydrolýzu na oligomery N-acetyl-D-glukosaminu. Tento postup pro účely fermentace vyhovoval, neboť materiál sloužící jako zdroj chitinu ve formě hrubě rozemletých skořápek krevet obsahoval též poměrně vysoká množství proteinů téhož původu. Směs peptidů a

40 chitinových oligomerů po kyselé hydrolýze tohoto materiálu proto dobře posloužila jak pro indukci chitináz a proteináz, tak jako zdroj dusíkatých živin. Po skončení fermentace bylo vyčištěné médium získáno průtokem fermentační směsi průtokovou centrifugou, zatímco sedimentované mikroorganismy byly získány na fólii vložené do válce průtokové centrifugy. Celkem byly pro komensální kožní bakterii provedeny čtyři fermentace v 5 l fermentoru, a

45 následně bylo zpracováno 20 l fermentační směsi ve formě osmi šarží. Čiré médium po centrifugaci v průtokové centrifuze bylo okysleno na pH 4,7 kyselinou octovou, byly do něj přidány konzervanty a po sterilní filtraci bylo médium zamrazeno. Vždy 2,5 l tohoto materiálu bylo po rozmrazení koncentrováno metodou filtrace v tangenciálním toku s použitím zařízení Minimate TFF a kazety s polyestersulfonátovou membránou s vylučovacím limitem 10 kDa

50 (obojí od firmy PALL Inc.) na celkový objem cca 100 ml, tj. asi 25x. Též metody bylo také použito k převedení do konzervačního pufru pomocí opakovaných cyklů naředění a zpětného koncentrování. Finální směs proteinů o koncentraci cca 1 mg/ml byla sterilně filtrována (filtry Corning s membránou 0,22 mm) a uložena při -20 °C v mrazáku až do dalšího použití. Reprodukovatelnost složení jednotlivých šarží sekretovaných proteinů komensální bakterie *S.*

55 *epidermidis* byla potvrzena metodou SDS elektroforesy s detekcí stříbrným komplexem. Byl

potvrzen identický proteinový profil s výjimkou šarže č. 4 (SEF2K4) (Obr. 1A), která byla z dalšího postupu vyřazena. Sekretované proteiny půdního mikroorganismu *P. nunn* ve formě 8 šarží (Obr. 1B) byly získány identickým postupem. V získaných proteinových extraktech byla změřena koncentrace proteinu, a dále byly změřeny enzymové aktivity hydrolytických enzymů proteináz, laminarináz, celuláz a chitináz. Souhrnné výsledky ukázaly v těchto sledovaných parametrech dobrou reprodukovatelnost s relativní odchylkou v intervalu 10 až 20 % pro hodnoty specifických enzymových aktivit a výtěžků až 30 % pro hodnoty stanovení proteinu. Pro první stupeň několikastupňového přípravku se sledují hodnoty proteinu a enzymových aktivit ve finálním aplikačním přípravku, které dosahují hodnot: 15 µg/ml proteinu, 0,23 mU/ml proteináz, 0,56 mU/ml laminarináz, 0,27 mU/ml celuláz a 0,47 mU/ml chitináz.

Příklad 2

Příprava účinných látek potřebných pro druhý stupeň přípravku uklidňujících zánět a obnovujících účinnou biologickou bariéru kůže

V počátečních zkouškách byl do olejové emulze pro druhý stupeň zahrnut hrubý detergentový extrakt bakteriálních buněk *S. epidermidis* kmene ATCC_12228 a hrubý γ -modulin (modifikovaný N-terminální formylací) z peptidové syntézy. Nicméně tato prvá kompozice způsobovala nežádoucí reakce na jemné kůži jedinců s atopickým ekzémem a bylo žádoucí ji dále upravit. Purifikace jednotlivých komponent byla provedena podle schématu na Obr. 2A zahrnujícího srážení detergentového extraktu síranem amonným do koncentrace 3 mol/l (75% nasycení) a následné zpracování nevysráženého podílu i sraženiny separátním postupem zahrnujícím kolonovou chromatografii na vhodných nosičích s obrácenou fází: fenyl-Sepharosou a oktadecylsilikagelem. Nesrážený podíl byl filtrován a přímo v 3 mol/l síranu amonném nanesen na kolonu fenyl-Sepharosy (1,6 x 11 cm, 22 ml) ekvilibrovanou ve 3 mol/l síranu amonném v prostředí 0,05 mol/l sodno acetátového pufru pH 4,7. Po aplikaci vzorku byla kolona tímto puftrem promyta a následovala eluce samotným acetátovým puftrem. Na konci chromatografie byla kolona promyta 80% ethanolem v acetátovém pufru. Sraženina ze síranového srážení byla rozpuštěna v acetátovém pufru a nastavena na koncentraci síranu amonného 1 mol/l a po centrifugaci a filtraci byla takto upravená sraženina nanesena na kolonu oktadecylsilikagelu (velikost částic 60 až 130 µm, modifikace oktadecylem v rozsahu 20 až 22 % hmotn., 1,6 x 13 cm, 26 ml) ekvilibrovanou v identickém prostředí. Po promytí byla kolona v jednom kroku převedena do výše uvedeného acetátového pufru a poté následovala gradientová eluce ethanolem v rozsahu 0 až 95 % objemu v tomto pufru. Byly odebírány 10 ml frakce a byla provedena analýza na obsah účinných komponent elektroforézou v prostředí 20% polyakrylamidového gelu s obsahem dodecylsulfátu sodného. Gely byly zpracovány duplicitně s tím, že na jednom gelu byla provedena detekce látek barvením stříbrným komplexem, zatímco látky z druhého gelu byly elektropřenosem převedeny na PVDF membránu (0,2 µm), která byla po blokování odtučněným mlékem inkubována se specifickými protilátkami proti detekovaným komponentám značenými biotinem a imunologická reaktivita byla detekována pomocí streptavidin-peroxidasového komplexu a 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazonu s 4-chloro-1-naphthol za tvorby hnědočerveného nerozpustného komplexu (Obr. 2B až 2E). Pro detekci Esp proteinázy byl též použit 12% polyakrylamidový gel z důvodu velikosti této komponenty. Odhad koncentrace jednotlivých aktivních látek byl proveden oproti standardu zpracovanému za identických podmínek. γ -modulin ve formě hrubého produktu peptidové syntézy s obsahem cílového peptidu cca 75 % byl přečištěn od meziproduktů syntézy a činidel chromatografií na fenyl-Sepharose podle publikované metodiky (16) a jeho koncentrace byla stanovena spektrofotometricky s použitím teoreticky předpovězeného molárního absorpčního koeficientu (nástroj ProtParam na web.expasy.org). Koncentrace Esp proteinázy byla odhadnuta přímo z intenzity signálu na gelu. Pro aplikaci ve druhém stupni byl připraven ze 4 účinných látek tisícinásobný koncentrát oproti optimálním aplikačním koncentracím zjištěným z vědecké literatury uvedené ve stavu techniky tohoto vynálezu. Pro druhý stupeň finální přípravek obsahoval směs látek obsahující 10 µg/ml lipoteichoové kyseliny bakterie *S. epidermidis*, 5 µg/ml specifické serinové proteinázy Esp bakterie *S. epidermidis*, 12 µg/ml SH-lantibiotických peptidů bakterie *S. epidermidis* a 38 µg/ml

γ -modulinu bakterie *S. epidermidis*. Reprodukovatelnost přípravy jednotlivých šarží byla z hlediska obsahu výše uvedených látek dostačující (s relativní odchylkou do 10 %).

Příklad 3

Příprava účinných látek potřebných pro třetí stupeň přípravku působící obnovení normální fyziologické mikroflóry

Výchozí materiál pro bakteriální extrakt sestával z mikrobiální komunity charakteristické pro čistíčky vod a byl laskavě poskytnut na Centru aplikovaného výzkumu Dobříš (CAVD) Mgr. Jakubem Hejnicem PhD a Ing. Pavlem Píchou PhD z Ústavu technologie vody a prostředí Vysoké školy chemicko-technologické (VŠCHT) Praha. Obsah bakterií rodu *Nitrosomonas* extenzivně odstraněných z mikrobiomu lidské kůže v důsledku používání mýdel a detergentů (www.aobiome.com) byl odhadnut na 25 až 30 %. Membránový komplex obsahující asi 50 % buněčného proteinu a 90 % ubiquinonu a cytochrome c oxidázy byl izolován popsáním postupem (8) zahrnujícím opakované zmražení a rozmražení následované centrifugací při 20 000 x g_{av} po dobu 20 min. Čirý supernatant byl odlit a membránový komplex několikrát promyt, centrifugován při 3000 x g_{av} 20 min a resuspendován na koncentraci 5 mg/ml. Nízkomolekulární látky obsažené s supernatantu po první centrifugaci byly purifikovány na koloně oktadecylsilikagelu stejně jako v příkladu provedení č. 2. Frakce eluovaná z kolony 30% ethanolom byla opatrně odpařena a získaný materiál byl přidán do membránové frakce do finální koncentrace 15 mg/ml. Postup extrakce byl opakován celkem čtyřikrát a byly tak získány extrakty NIE1, NIE2, NIE3 a NIE4. Na specializovaném pracovišti VŠCHT Praha byla též potvrzena schopnost získaných extraktů rozkládat močovinu vylučovanou lidskou kůží na amoniak a dále na oxidy dusíku, jmenovitě oxid dusnatý. Extrakty byly přidány do přípravku pro třetí stupeň po jejich stonásobném naředění ve finální sumární koncentraci 20 µg/ml.

Příklad 4

Výběr látek zajišťujících výživu kůže a další propagaci a stabilizaci normální mikroflóry ve čtvrtém stupni přípravku

Před přípravou finálních formulací se jevílo jako vhodné vyzkoušet různé formulace látek uváděných v literatuře jako vhodné komponenty pro výživu kůže a další propagaci a stabilizaci normální mikroflóry, respektive potlačení kožních patogenů. Z tohoto důvodu byla provedena rychlá optimalizace různých kompozic obsahujících sloučeniny jako je xylitol, farnesol, L-arginin, světlicový olej, pupalkový olej, konopný olej, řepkový olej, olej z pšeničných klíčků, laktát, glycin, fruktosa, niacinamid, inositol, aspartát hořečnatý, glukonát zinečnatý a glukonát měďnatý. Po provedení testů antimikrobiální a biofilmy rozrušující aktivity, jak je uvedeno v příkladech provedení č. 6 a 7, a za současného zhodnocení dostupnosti těchto sloučenin v kosmetické kvalitě a jejich ceny bylo rozhodnuto farnesol a světlicový olej do základu plet'ového mléka nepřidávat a ostatní výše zmíněné sloučeniny potom zahrnout v následujících koncentracích (uváděno v pořadí snižujícího se obsahu): xylitol 6 % hmotn., konopný olej 5 % hmotn., řepkový olej 5 % hmotn., L-arginin 1 % hmotn., pupalkový olej 1 % hmotn., olej z pšeničných klíčků 1 % hmotn. U minoritních komponent, jako je laktát, glycin, fruktosa, niacinamid, inositol, aspartát hořečnatý, glukonát zinečnatý a glukonát měďnatý, se jejich přidání do 0,1 % hmotnosti ukázalo jako dostatečné.

Příklad 5

Příklady vhodných kosmetických kompozic kompatibilních s účinnými látkami a výsledky testů stability

Pro zajištění kompatibility a dlouhodobé stability po dobu nejméně jednoho roku byly zkoušeny různé kompozice (olejové emulze) jako základ plet'ového mléka nebo kožní emulze. U

jednoduchých olejových emulzí se objevily problémy s mikrobiologickou čistotou, resp. kontaminací i přes přidané konzervanty. U emulze komplexnějšího složení byla použita I vyšší koncentrace konzervačních látek. U této emulze se již problémy s mikrobiální kontaminací neobjevily a po přidání účinných látek se směs jevila stabilní po dobu 3 měsíců při doporučené teplotě skladování (15 až 25 °C). Poté však docházelo k viditelnému krémování (separace olejových látek ve vrchní vrstvě). Proto byla zkoušena ještě složitější kompozice obsahující mj. nové emulgátory a další pomocné látky. Výsledky s touto kompozicí byly již velmi dobré a dlouhodobá stabilita byla až po dobu 9 měsíců, problémem této kompozice však byla vysoká viskozita bránící účinné aplikaci. Finální olejová emulze (viz dále) vykazovala všechny vlastnosti nutné pro správnou a uživatelsky příjemnou aplikaci a současně stabilitu lepší než 12 měsíců (1 rok) za doporučených podmínek skladování (15 až 25 °C). Tato kompozice byla tedy použita pro přípravu všech testovacích přípravků ve všech stupních.

Při přípravě optimalizované testovací emulze se postupovalo standardním způsobem s prudkým mícháním vodné fáze obsahující komponenty rozpustné ve vodě (včetně detergentů) a olejové fáze (včetně emulgátorů) za zvýšené teploty a následným postupným ochlazením za neustálého prudkého míchání (laboratorní, popř. průmyslový mixer s otáčkami min. 10 000 ot/min).

Celkové složení připravené olejové emulze č. 4 dle kosmetického vyjádření tedy je (všechna uváděná čísla jsou procenta hmotnosti): voda 68,9397; xylitol 5,0; konopný (*Cannabis sativa*) olej 5,0; řepkový (*Brassica campestris*) olej 5,0; glycerol 4,0; močovina 4,0; glyceryl stearát citrát 2,0; olivový olej 1,0; olej z pšeničných klíčků 1,0; pupalkový (*Oenothera biennis*) olej 1,0; L-arginin 1; fenoxylethanol 0,9; levandulová silice 0,2; L-arginin 0,2; polyakrylátcrosspolymer-6 0,25; ethylhexylglycerin 0,1; Lactil® 0,1; Sepitonic® 0,1; D,L-a-tokoferol 0,01; a barvivo A12385 (E123) amarant 0,003.

Praxe obvyklá při výrobě kosmetických nebo léčivých přípravků typu pletťových mlék nebo kožních přípravků vyžadovala, aby komponenty určené pro čtvrtý stupeň poskytující výživu kůži a stabilizující kožní mikroflóru byly přidány již do výše uvedené kompozice. Ta tedy představovala finální složení pro čtvrtý stupeň.

Kompozice pro první stupeň obsahovala v základu tvořeném výše popsanou kompozicí ještě enzymové aktivity přítomné po naředění přidaných mikrobiálních extraktů. Přípravek tak obsahuje v jedné 3 ml aplikační dávce napříkladně 0,03 až 0,06 mg proteinu, 0,47 až 0,94 mU proteináz, 1,13 až 2,26 mU laminarináz, 0,53 až 1,06 mU celuláz a 0,93 až 1,86 mU chitináz (U je mezinárodní enzymová jednotka definovaná jako množství enzymu schopné rozštěpit 1 μmol substrátu za minutu).

Pro druhý stupeň bylo v typické 3 ml aplikační dávce přípravku obsaženo 8,0 až 12,0 μg kyseliny lipoteichoové (typ *S. epidermidis*), 30,0 až 40,0 μg antimikrobiálních peptidů SH-lantibiotikového typu, 16,0 až 20,0 μg antimikrobiálního peptidu γ-modulinu a 13,0 až 21,0 μg Esp proteinázy z *S. epidermidis*.

Konečně pro třetí stupeň ve 3 ml aplikační dávce pletťového mléka bylo obsaženo 60,0 μg směsi látek z *Nitrosomonas*, z toho 45,0 μg nízkomolekulárních látek a 15,0 μg proteinového komplexu.

Příklad 6

Stanovení antimikrobiálních aktivit v laboratorním testu

Faktické antimikrobiální aktivity a schopnost rozrušovat biofilmy byla pro získané mikrobiální extrakty testována s použitím standardních laboratorních testů, jmenovitě diskového testu na Petriho miskách (diskový test), testu minimální inhibiční koncentrace na mikrotitračních destičkách (MIC test) a testu rozrušení biofilmu s detekcí zbytkového biofilmu pomocí

krystalové violeti (biofilmový test). Výsledky rozrušení biofilmů jsou popisovány v následujícím příkladu provedení č. 7.

Prvým testem byla zkouška na schopnost inhibovat růst majoritního kožního patogena bakterie *S. aureus* kmene ATCC_6538. Tento kmen je velmi agresivní a je používán jako standard ve studiích desinfekcí a antiseptických činidel. Nejvýznamnějších účinků bylo dosaženo v diskovém testu pro sekretované proteiny bakterie *S. epidermidis* ředěné stonásobně, lyzát připravený z těchto bakterií ředěný stonásobně a stonásobně ředěný extrakt průmyslových bakterií z čističek rodu *Nitrosomonas* (Obr. 3A). Tyto výsledky byly potvrzeny v MIC testu pro různé šarže těchto preparátů, kdy 3 ze 4 šarží sekretovaných proteinů *S. epidermidis* účinně inhibovaly růst bakterie *S. aureus* ještě v koncentraci (stanovené jako celkový protein) 0,1 µg/ml (a jedna šarže inhibovala při koncentraci 1 µg/ml). Podobně byl lyzát bakterií *S. epidermidis* schopen inhibovat růst patogenních bakterií ještě při koncentraci 0,1 µg/ml, čtvrtá šarže též inhibovala růst při koncentraci 1 µg/ml. Naopak inhibiční účinky směsi průmyslových bakterií s obsahem bakterií rodu *Nitrosomonas* byly asi o dva řády nižší, kdy tři šarže inhibovaly při koncentraci 10 µg/ml a jedna při koncentraci 100 µg/ml (Obr. 3B). Konečně byla antimikrobiální účinnost testována na kvasince *Candida albicans*, která může nabývat u jedinců s problematickou kůží agresivnější podoby, a kromě infekce dominantním patogenem *S. aureus* představuje koinfekce agresivní formou kvasinky *Candida albicans* nejčastější komplikující faktor u těchto jedinců. Byl použit rychle rostoucí agresivní kmen ATCC_10231 používaný při kontrolách sterility a pro testování protiplísňových látek. V případě této kvasinky omezily účinně její růst pouze rozpustné sekretované proteiny a lyzát z bakterie *S. epidermidis*, (Obr. 3C a 3D).

Příklad 7

Stanovení biofilmy rozrušujících aktivit v laboratorním testu

V biofilmovém testu byly zkoušeny schopnosti získaných účinných látek rozrušovat biofilmy tvořené patogenem *S. aureus* s cílem ověřit publikované výsledky a stanovit potenci těchto látek. Pro tyto experimenty byl použit standardní test rozrušení biofilmu s detekcí krystalovou violetí a vyhodnocení výsledků spektrofotometricky při 595 nm. Z důvodu variability biologických stanovení byl každý experiment nasazován paralelně ve čtyřech jamkách (kvadruplikát), prezentovaná data pak byla průměrem těchto čtyř stanovení (Obr. 4A). Schopnost testovaných účinných látek rozrušit biofilmy byla zkoušena ve čtyřech různých koncentracích, kdy překvapivě nejlepší výsledky poskytovaly látky ředěné 10x, a ještě lépe 100x (Obr. 4B). Při testování kombinací účinných látek se jako optimální v testu rozrušení biofilmů jevila kombinace rozpustných sekretovaných proteinů z bakterie *S. epidermidis* a půdního mikroorganismu *P. nunn* (označeno PNSE, Obr. 4B a Obr. 4C). Dalším významným laboratorním parametrem je viabilita patogenních mikroorganismů uvolněných z biofilmů: pokud zůstávají takto uvolněné bakterie viabilní, hrozí na místě aplikace nebezpečí rekolonizace i tvorby nových biofilmů po ukončení aplikace. Proto byly bakterie po 24hodinové inkubaci před promytím a detekcí destičky odebrány a byla kultivačně testována jejich viabilita. Tento experiment jasně prokázal, že použité mikrobiální extrakty mají schopnost nejen biofilm rozrušit, ale i zabít (či alespoň významně snížit viabilitu) uvolněných patogenních bakterií. Nejlepších účinků opět bylo dosaženo směsí sekretovaných proteinů obou mikroorganismů při ředění 100x a 1000x (Obr. 4D).

Příklad 8

Praktické zkoušky několikastupňových přípravků

Po dokončení výroby čtyřstupňového přípravku ve formě plet'ového mléka (každý stupeň formulován do emulze č. 4 z příkladu 5) a získání potřebné Zprávy o bezpečnosti kosmetického přípravku probíhaly praktické studie v několika kolech.

V prvním kole testování byl přípravek aplikován v režimu čtyřtýdenní aplikace (každý stupeň po

dobu jednoho týdne ráno a večer) u 10 zdravých jedinců s normální neporušenou kůží. S výjimkou velmi mírného svědění u přípravku pro první stupeň nebyly pozorovány po měsíční aplikaci žádné vedlejší ani nežádoucí reakce. Tyto výsledky společně s výsledky uvedenými ve Zprávě o bezpečnosti ukazovaly na bezpečnost přípravku při jeho aplikaci na zdravou kůži normálních jedinců.

Ve druhém kole byla provedena aplikace u rodinných příslušníků v okruhu známých, u nichž se vyskytly různé problémy kůže, ať již na základě dlouhodobě pozorované náchylnosti k určitým onemocněním (akné, atopický ekzém, růžovka, lupénka) nebo i na základě akutního popálení. V tomto kole testování šlo o zjištění počáteční reakce v jednotlivých skupinách stejně jako o zjištění možného rozsahu aplikací. Přitom byla učiněna dvě důležitá pozorování: (1) u jedinců s citlivou a podrážděnou kůží se objevila reakce na komponentu druhého stupně, tento problém byl řešen další purifikací extraktu jak je uvedeno v příkladu 2, (2) počáteční pocit, že přípravek je účinný i pro rychlejší hojení běžných mechanických nebo termických poškození kůže (pořezání, popálení) byl potvrzen nešťastným případem dělníka pracujícího na pracovišti přihlašovatele s rozsáhlou popáleninou ruky, kdy došlo ke zhoršení stavu po propuštění z kliniky popálenin spojeném s lokální sepsí, která nemohla být vyřešena ani podáním antibiotik a hrozila amputace končetiny. Nicméně po dvou týdnech aplikace zahrnující prostředky pro první a druhý stupeň došlo k velmi významnému zlepšení stavu a odeznění infekce.

Ve třetím kole došlo na základě počátečních zkušeností, detailního návodu k použití přípravku, aplikačního formuláře (dotazníku) a informovaného souhlasu pacienta k systematickému testování, do kterého byl zařazen čtyřfázový přípravek zahrnující všechny popsane účinné látky.

29 let starý muž uvedl problémy s výskytem atopického ekzému již od útlého věku, který v posledních letech lokalizoval do oblasti kotníku. Problém nemohl být vyřešen pomocí velkého množství prostředků nabízených na trhu kosmetiky. Čtyřfázový prostředek byl aplikován po dobu 4 týdnů dvakrát denně. Po aplikaci uživatel uvádí významné zlepšení stavu, které bylo možné sledovat i z fotodokumentace (Obr. 5). Subjektivně uživatel uvádí zklidňující působení, i když byla uvedena poměrně dlouhá doba na zasychání a vstřebání (která je zdůvodněna přítomností hydratujících komponent v aplikačním přípravku).

22 let stará žena trpěla dlouhodobě atopickým ekzémem na ruku, který nemohl být vyřešen pomocí běžných prostředků nabízených na trhu kosmetiky. Uživatelce byl nabídnut čtyřfázový prostředek, fakticky však došlo k aplikaci pouze pro první a druhý stupeň v rozsahu jednoho týdne pro každou kompozici. Uživatelka popisuje po dokončení poloviny aplikačního režimu částečné vyřešení problému spojené s významným zklidněním. Částečné zklidnění a menší zmenšení rozsahu afekce je patrné i na poskytnuté fotodokumentaci (Obr. 6).

74 let stará žena - diabetička s poškozením ledvin závislá na ošetření dialýzou třikrát týdně si stěžovala na dlouhodobé problémy s plísňemi na nohou a zrohovatěním a rozpraskáním kůže v oblasti nártu a plosky. Žena aplikovala čtyřstupňový přípravek po dobu 4 týdnů přesně podle návodu na přípravku. Po měsíční aplikaci byla uživatelka velmi spokojená, neboť se podařilo plísňovou infekci významně omezit a lokalizovat, pacientka uvádí vyřešení problému na 80 % původně zasažené plochy. Poskytnutý výzkumný přípravek se významně odlišoval od řady jiných použitých přípravků a krémů, které neměly žádný účinek nebo bylo pozorováno pouze dočasné zlepšení a po několika dnech se opět stav zhoršil. Poskytnutá dokumentace (Obr. 7) odpovídá subjektivním pocitům uváděným uživatelkou.

58 let starý muž utrpěl popáleninu na ruce v důsledku nehody v laboratoři, která zasáhla prsteník levé ruky se vznikem hluboké, mokvající popáleniny a prostředník levé ruky s postižením menšího rozsahu (Obr. 8A). Aplikace kosmetického přípravku pouze pro první stupeň (monokompozice) byla prováděna po dobu dvou týdnů na hůře postižený prsteník, prostředník byl ponechán bez aplikace jako kontrola. Po 12 dnech aplikace byla obě místa zcela zhojena, s plně zacelenou kůží a mírným zčervenáním v místě postižení (Obr. 8D). Během dalších dvou

týdnů došlo bez jakékoliv další aplikace k úplné normalizaci na původní stav, prsty byly bez jizev nebo jakýchkoliv známek poškození či změny pigmentace.

- 5 V době podání tohoto vynálezu praktické testování organizované přihlašovatelem pokračuje ve formě aplikací u větších skupin uživatelů pod dohledem dermatologů. Cílem této části je shromáždit dostatečný soubor dat umožňující statistické vyhodnocení a získat zkušenosti pro přípravu klinických zkoušek se zkoušenými léčivými přípravky.

10 Průmyslová využitelnost

- Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle předloženého vynálezu může být použit k výrobě souprav kosmetiky nebo i jednotlivých kosmetických přípravků vhodných pro aplikaci na problematickou kůži jedinců s atopickou dermatitidou, akné, růžovkou, lupénkou, vitiligo a jiných poškození kůže stejně jako pro výrobu kosmetických prostředků proti popáleninám. Dále mohou být jednotlivé zde uváděné kompozice nebo jejich kombinace použity pro prevenci kožních onemocnění a problémů pro posílení biologické složky ochranné bariéry kůže. Rovněž mohou být směsi a komponenty uváděné v tomto vynálezu použity pro výrobu léčivých přípravků, zejména pro použití při léčení atopické dermatitidy, akné, růžovky, lupénky, vitiligo, poškození kůže mechanickým poraněním nebo popálením.

Citovaná literatura

- 25 1. Cohen AL, Yamasaki K, Sanchez KM a spol. (2010a) J Invest Dermatol 130: 192-196.
2. Cohen AL, Yamasaki K, Muto J a spol. (2010b) PLoS One 5: e8557.
3. Elad Y, Lifshitz R, Baker R (1985) Physiol Plant Pathol 27, 131-148.
4. Gallo RL, Nakatsuji T US2015/290209 A1 (published on 15th October 2015).
5. Ganju P, Nagpal S, Mohammed MH a spol. (2016) Sci Rep 6: 18761.
- 30 6. Garcia-Gomez E, Miranda-Ozuna JFT, Diaz-Cedillo F a spol. (2017) J Med Microbiol 66: 864-87.
7. Grice EA, Segre JA (2011) Nat Rev Microbiol 9: 244-253.
8. Hooper AB, Erickson RH, Terry KR (1972) J Bacteriol 110: 430-438.
9. Human Microbiome Project Consortium (2012) Nature 486, 207-214.
- 35 10. Iwase T, Uehara Y, Shinji H a spol. (2010) Nature 465: 346 - 349.
11. Kazue T, Makioka Y CN2018/107922956 A (published on 17th April 2018).
12. Kleinberg I, Zhang Z US2016/263154 A1 (published on 15th September 2016).
13. Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K a spol. (2015) Immunity 42, 756-766.
14. Kong HH, Oh J, Deming C a spol. (2012) Genome Res 22: 850-859.
- 40 15. Lai Y, DiNardo A, Nakatsuji T a spol. (2009) Nat Med 15, 1377-1386.
16. McKevitt AI, Bjornson GL, Mauracher CA a spol. (1990) Infect Immun 58, 1473-1475.
17. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C a spol. (2012) Science 337: 1115-1119.
18. Nakatsuji T, Chen TH, Narala S a spol. (2017) Sci Transl Med 9: eaah4680.
19. Nakatsuji T, Gallo RL US2018/289751 A1 (published on 11th October 2018).
- 45 20. Park TH, Kim SH, Jin YJ, An SS, Lee JH KR2017/3478 A (published on 9th January 2017)
21. Sanford JA, Gallo RL (2013) Semin Immunol 25, 370-377.
22. Smoragiewics W, Karska-Wysocki B, Bazo M US2011/0195057 A1 (published on 11th August 2011).
23. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K a spol. (2013) J Bacteriol 195: 1645-1655.
- 50 24. Takayama K, Makioka Y CN2018/107922956 A (published on 17th April 2018).

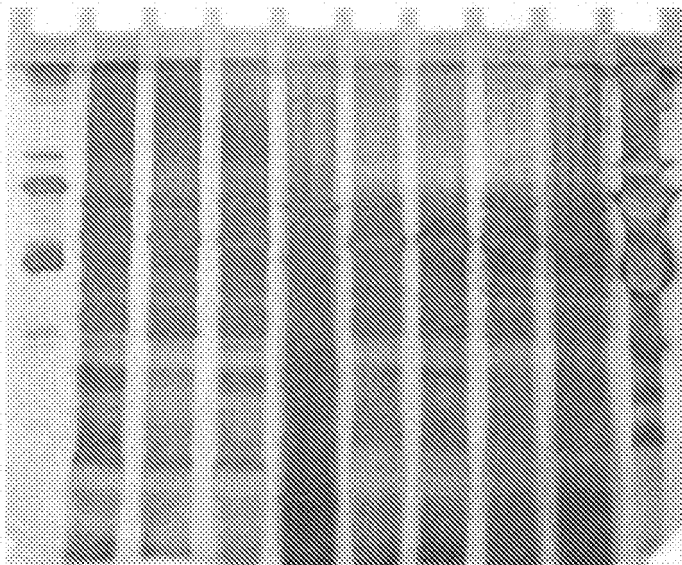
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek, **vyznačující se tím**, že je formulován do 4 stupňů pro postupnou aplikaci na kůži; přičemž
- první stupeň přípravku jako účinné látky obsahuje látky rozrušující biofilmy tvořené patogenními mikroorganismy na kůži a potlačující viabilitu uvolněných patogenních mikroorganismů, kterými
- 10 jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z kožních komensálních mikroorganismů vybraných z bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Proteobacterium* a půdních mikroorganismů vybraných z mikroorganismů rodu *Trichoderma*, *Pythium*, *Nitrosomonas* a *Mycobacterium*;
- 15 druhý stupeň přípravku jako účinné látky obsahuje látky uklidňující zánět a obnovující účinnou biologickou bariéru kůže, kterými jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z kožních komensálních mikroorganismů vybraných z bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a *Proteobacterium*;
- 20 třetí stupeň přípravku jako účinné látky obsahuje látky obnovující normální fyziologickou mikroflóru, kterými jsou bezbuněčné extrakty nebo lyzáty připravené z půdních bakterií rodu *Nitrosomonas* nebo *Mycobacterium*;
- a čtvrtý stupeň přípravku obsahuje látky poskytující výživu kůži a dále podporující rozvoj komensálních mikroorganismů za současného potlačení rozvoje patogenů, kdy se jako účinná
- 25 látka vyskytuje alespoň jedna látka vybraná ze skupiny obsahující xylitol, farnesol, L-arginin, světlíkový olej, pupalkový olej, konopný olej, řepkový olej, olej z pšeničných klíčků, laktát, glycin, fruktózu, niacinamid, inositol, aspartát hořečnatý, glukonát zinečnatý a glukonát měďnatý.
- 30 2. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že bezbuněčné extrakty nebo lyzáty kožních komensálních mikroorganismů jsou připraveny z bakterie *Staphylococcus epidermidis* a extrakty nebo lyzáty připravené z půdních mikroorganismů jsou připraveny z oomycety *Pythium nunn* a/nebo bakterie *Nitrosomonas*
- 35 *europa*.
3. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že první stupeň přípravku obsahuje v jedné 3 ml aplikační dávce aktivitu proteináz v množství 0,47 až 0,94 mU, laminarináz v množství 1,13 až 2,26 mU, celuláz v množství 0,53 až
- 40 1,06 mU a chitináz v množství 0,93 až 1,86 mU.
4. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 1 nebo 2 **vyznačující se tím**, že druhý stupeň přípravku obsahuje v jedné 3 ml aplikační dávce 8,0 až 12,0 µg kyseliny lipoteichoové, 30,0 až 40,0 µg antimikrobiálních peptidů SH-lantibiotikového typu, 16,0 až
- 45 20,0 µg antimikrobiálního peptidu γ-modulinu a 13,0 až 21,0 µg Esp proteinázy.
5. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že třetí stupeň přípravku obsahuje v jedné 3 ml aplikační dávce 60,0 µg směsi látek z *Nitrosomonas europa*, z toho je 45,0 µg nízkomolekulárních látek a 15,0 µg proteinového
- 50 komplexu obsahujícího membránový komplex oxidující močovinu a produkující oxid dusnatý.
6. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 5 pro použití jako kosmetický přípravek.

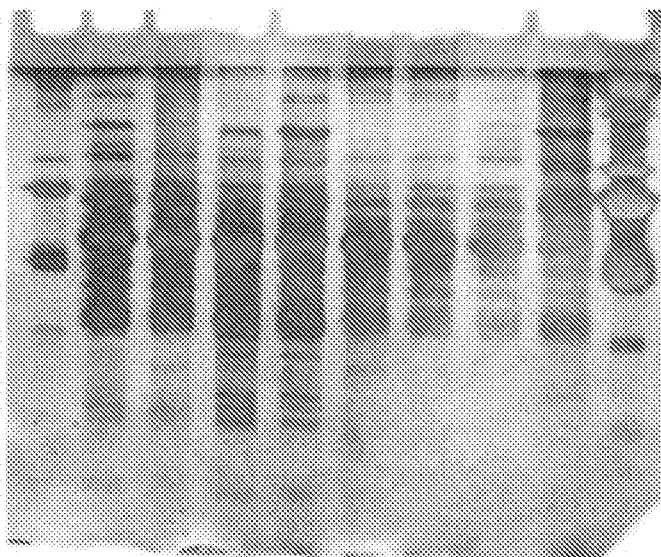
7. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 6 pro použití jako kosmetický přípravek ke zklidnění a regeneraci podrážděné nebo popálené kůže a/nebo posílení biologické komponenty kožní bariéry a udržení dobré kondice mikrobiálních komunit na kůži.
- 5 8. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 5 pro použití jako léčivý přípravek.
- 10 9. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 8 pro použití jako léčivý přípravek při léčení nemocí nebo poranění kůže.
- 15 10. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 9 pro použití jako léčivý přípravek při léčení atopické dermatitidy, akné, růžovky, lupénky, vitiliga, poškození kůže způsobeného mechanickým poraněním nebo popálením.
- 20 11. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10 pro postupnou aplikaci ve čtyřech obdobích tak, že v prvním období se aplikuje první stupeň přípravku, ve druhém období se aplikuje druhý stupeň přípravku, ve třetím období se aplikuje třetí stupeň přípravku a ve čtvrtém období se aplikuje čtvrtý stupeň přípravku, přičemž každé z prvního, druhého a třetího období trvá jeden až dva týdny a čtvrté období trvá jeden až šest týdnů.
- 25 12. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 11, **vyznačující se tím**, že každý stupeň přípravku je formulován do aplikační formy vybrané z kožní emulze, krému, masti, gelu, pěny, pleťového mléka nebo jiné kosmetické nebo farmaceutické kompozice s olejovou komponentou.
- 30 13. Kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že každý stupeň přípravku obsahuje vodu jako solvent, olivový olej jako olejovou komponentu, kyselinu citronovou nebo kyselinu octovou nebo kyselinu mléčnou v kombinaci s triethanolaminem jako pufrující složku, glycerin a močovinu jako kondicionéry, fenoxylethanol, tokoferol a ethylhexylglycerin jako konzervanty, amaranth jako barevnou látku, glyceryl stearát a cetylalkohol jako emulgátor, polyakrylát crosspolymer-6 a xanthanovou gumu jako regulátory viskozity a levandulový olej jako vonnou komponentu.
- 35 14. Způsob kosmetického ošetření, **vyznačující se tím**, že se na kůži nebo sliznici aplikuje kombinovaný několikastupňový mikrobiální přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 postupně ve čtyřech obdobích tak, že v prvním období se aplikuje první stupeň přípravku, ve druhém období se aplikuje druhý stupeň přípravku, ve třetím období se aplikuje třetí stupeň přípravku a ve čtvrtém období se aplikuje čtvrtý stupeň přípravku, přičemž každé z prvního, druhého a třetího období trvá jeden až dva týdny a čtvrté období trvá jeden až šest týdnů.
- 40 15. Způsob ošetření podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že aplikace je prováděna alespoň jednou denně, výhodně ráno a večer, pomocí rozstřiku nebo rozetřením příslušného stupně přípravku na postižená místa a případně i jejich okolí, nebo v případě výskytu velmi citlivých ložisek se aplikuje pouze do okolí těchto ložisek.
- 45

8 výkresů

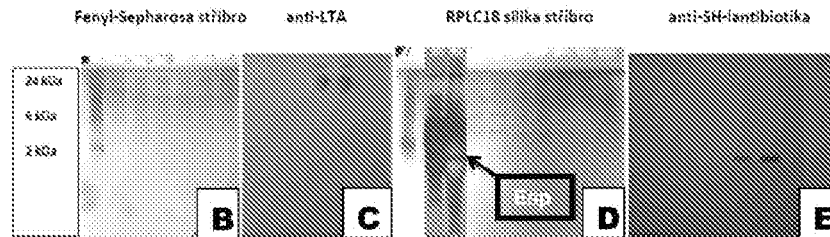
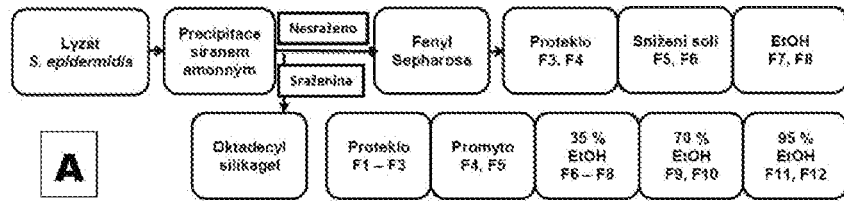
A



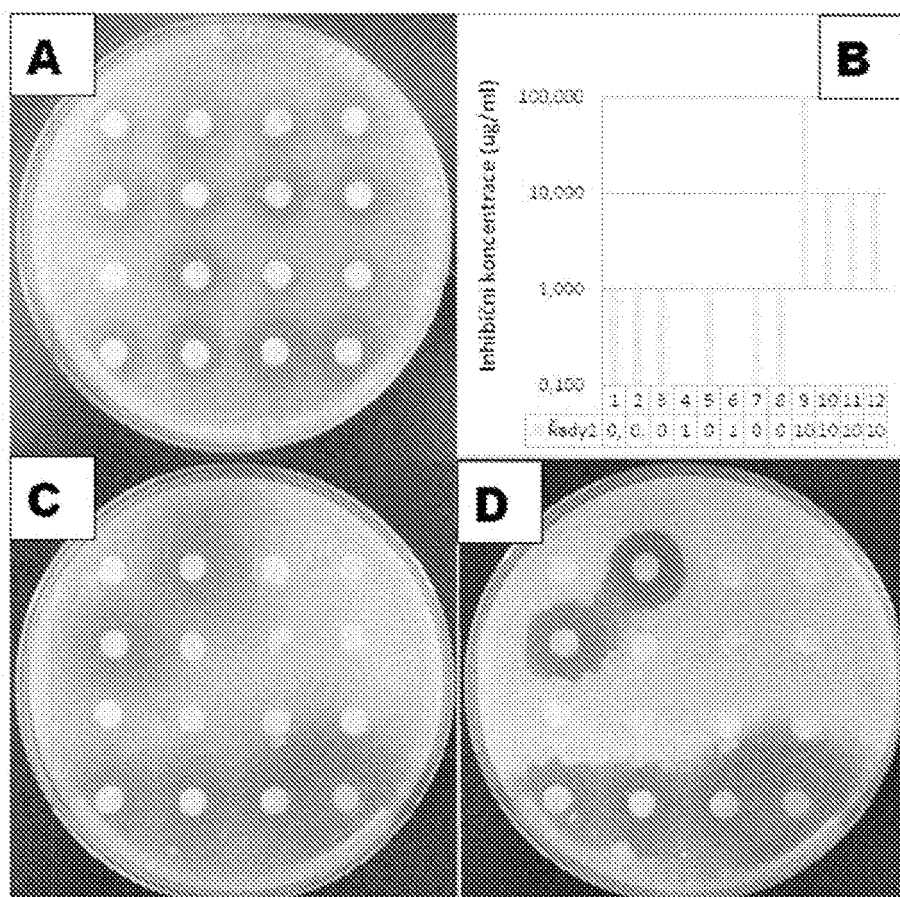
B



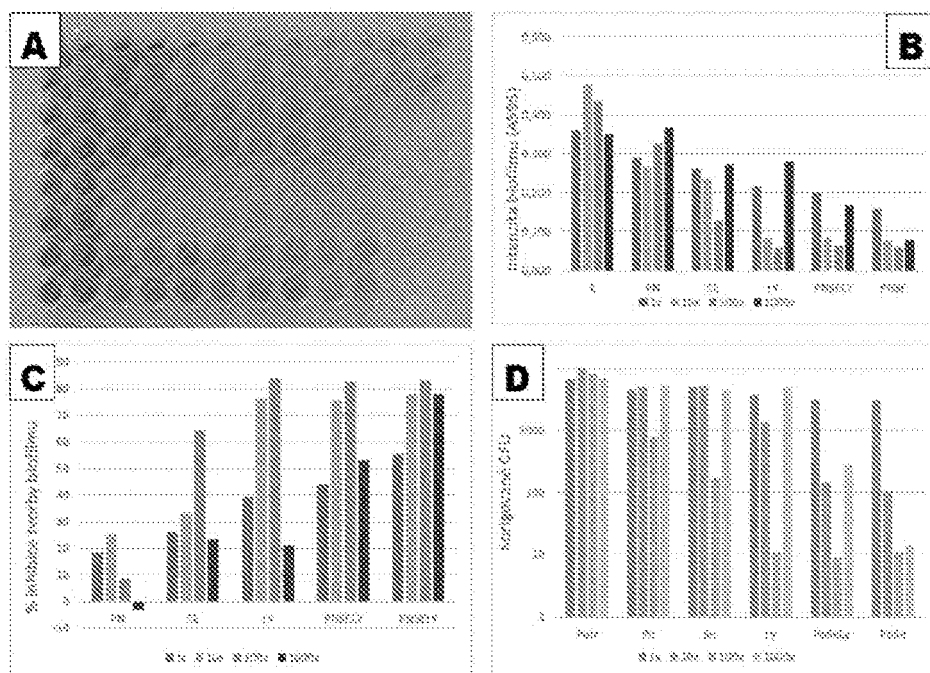
Obr. 1



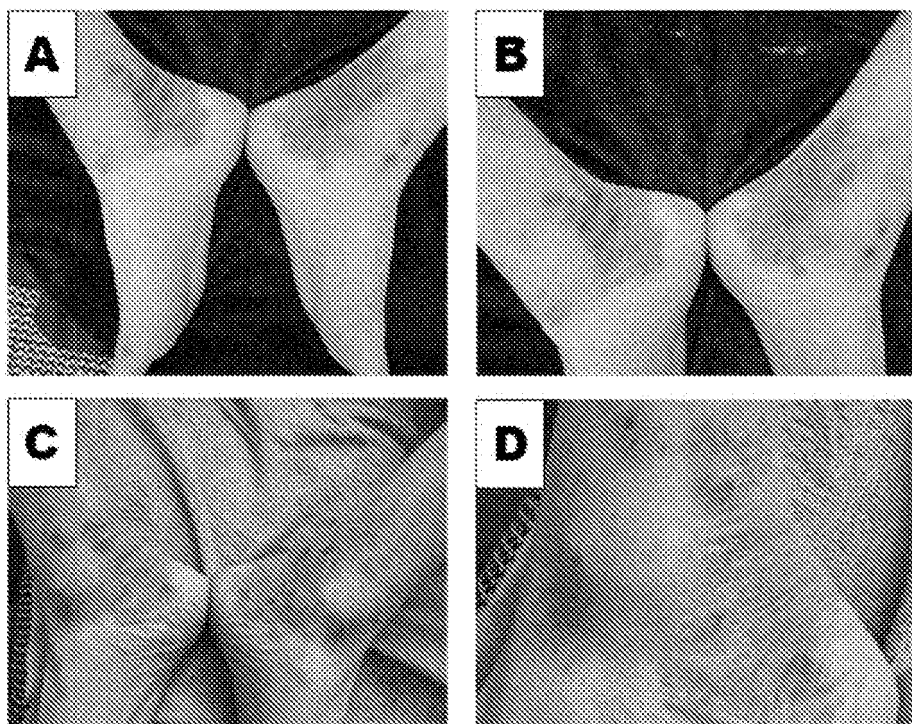
Obr. 2



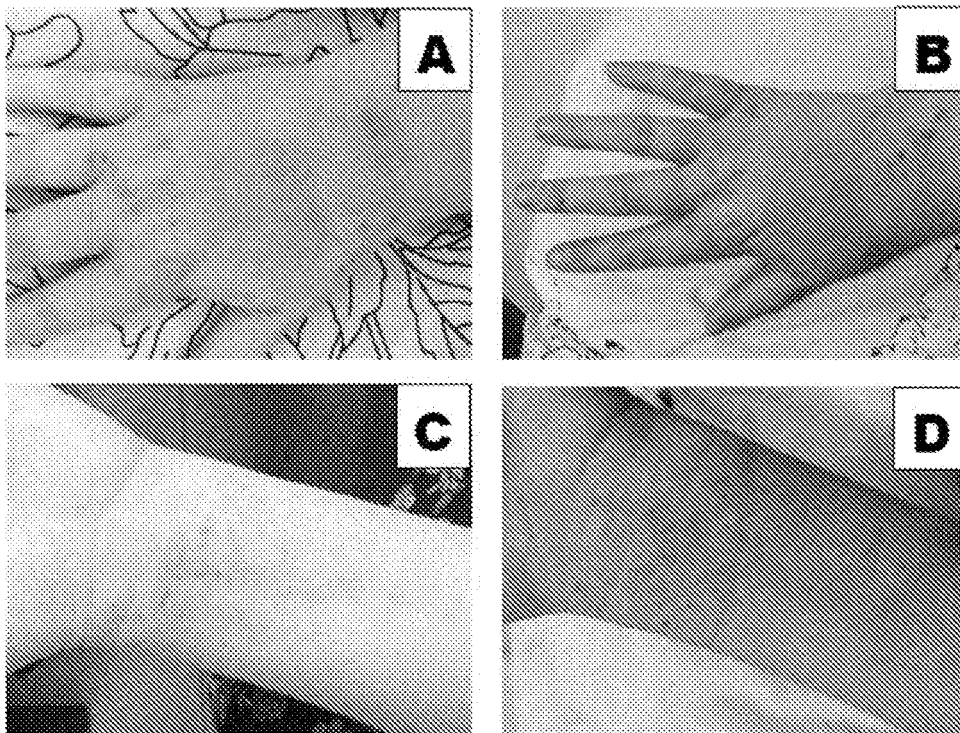
Obr. 3



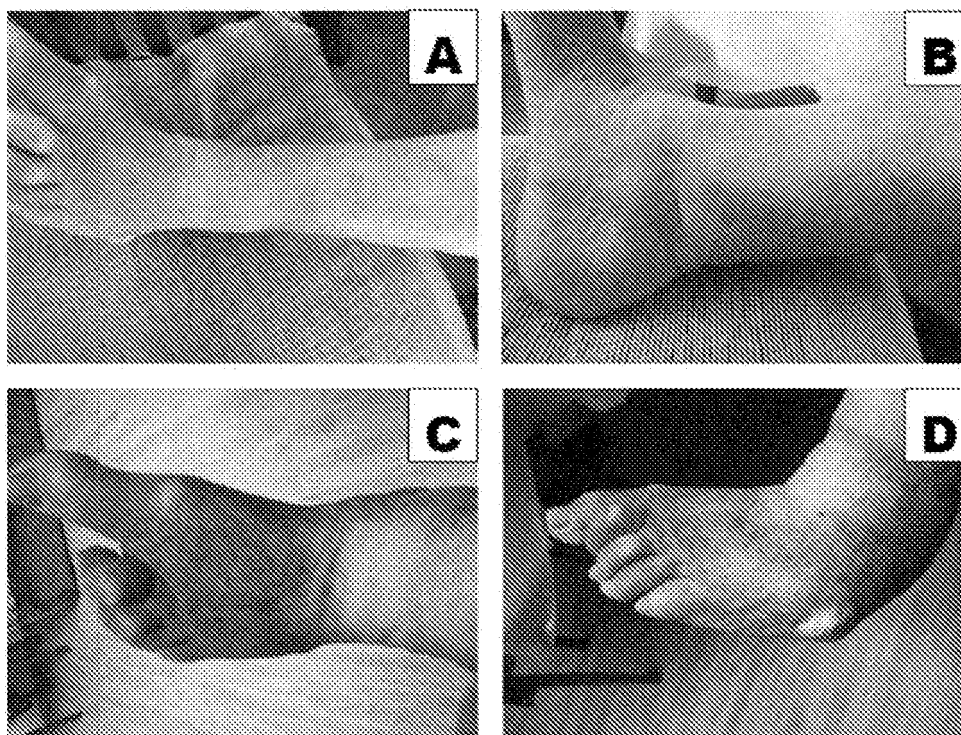
Obr. 4



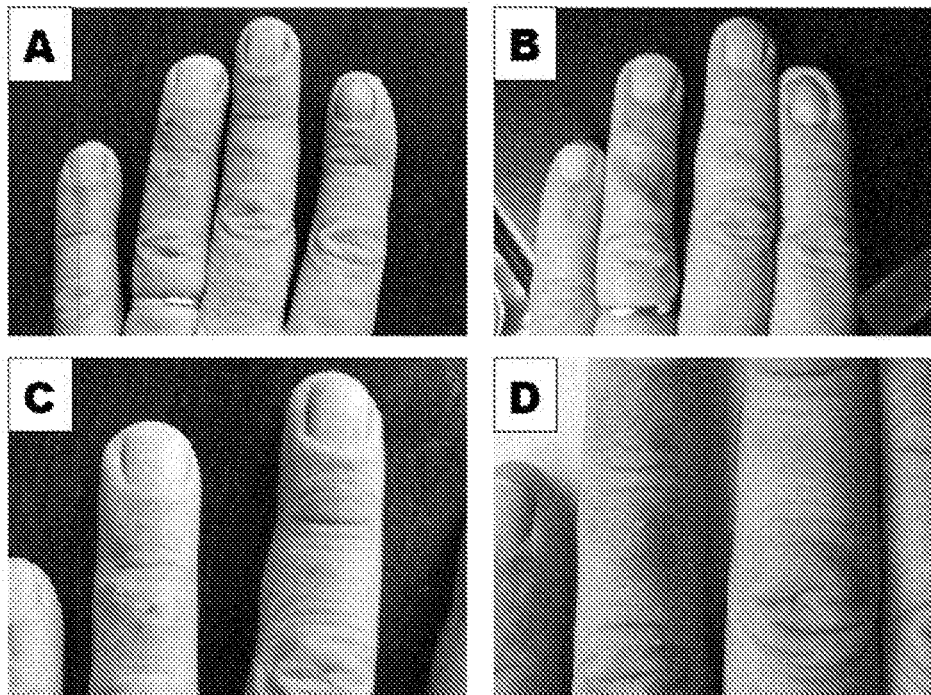
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8