

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

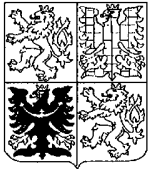
**2001 - 886**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

**A 61 K 7/00**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/150841**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**  
(Věstník č. 8/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03234**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/15179**

(71) Přihlašovatel:

UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;

(72) Původce:

Weinkauf Ronni Lynn, Edgewater, NJ, US;  
Santhanam Uma, Edgewater, NJ, US;  
Palanker Laura Rose, Midvale, UT, US;  
Januario Thomas Eugane, Middletown, NY, US;  
Brinker Anita Marie, Highland Park, NJ, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Kosmetický prostředek**

(57) Anotace:

Prostředky obsahující alfa hydroxykyseliny a dále obsahující kyselinu petroselinovou jako činidlo, působící proti podráždění a/nebo proti pálení.

**CZ 2001 - 886 A3**

## **Kosmetický prostředek**

### **Oblast techniky**

Předkládaný vynález se týká použití kyseliny petroselinové v kosmetickém prostředku a ve způsobu ke snížení nebo odstranění podráždění pokožky nebo pálení, indukovaných alfa hydroxykyselinami.

### **Dosavadní stav techniky**

Bylo ověřeno, že alfa hydroxykyseliny (tzv. AHA) poskytují kosmetický přínos, jako je zlepšení vzhledu světelným zářením poškozené nebo přirozeně zestárlé pokožky, vylehčení pokožky, úprava stařeckých skvrn a podobně. Bohužel jejich použití ve vysokých koncentracích může být příležitostně spojeno s podrážděním pokožky, např. zarudnutím kůže a pocitem pálení po nanesení. Viz např. A. M. Kligman: J. Geriatr. Dermatol. 5(3), 128-131, 1997. Podráždění může být zlepšeno snížením množství aktivní přísady v prostředku, anebo snížením průstupu aktivní látky pokožkou. Vážnou nevýhodou obou přístupů je to, že dochází k oslabení účinnosti. Podráždění působené AHA může být omezeno zvýšením pH prostředku, avšak tento způsob poskytuje menší účinnost vzhledem ke sníženému pronikání AHA pokožkou. Žádoucí je snížit nebo odstranit schopnost AHA vyvolávat podráždění za současného zachování jejich účinnosti.

Evropská patentová přihláška č. 0 631 722 (Johnson & Johnson) předkládá použití kyseliny glykolové ke snížení podráždění pokožky retinolem. Patent US 5 516 793 (Duffy) předkládá použití kyseliny askorbové pro zlepšení podráždění, vyvolaného různými místně nanášenými přísadami, včetně AHA.

Použití olejů, bohatých na petroselinovou kyselinu, například oleje ze semen koriandru, v kosmetických prostředcích určených pro pokožku, bylo již dříve uvedeno (EP 0709084 A2). EP 0709084 předkládá použití oleje z

koriandrových semen jako zvlhčujícího činidla, ale neobjevuje schopnost kyseliny petroselinové snižovat podráždění. Navíc je zmiňována volitelná přítomnost různých přísad, například keratolytických činidel jako hydroxykyselin (kyseliny n-oktanoyl-5-salicylové). Kyselina salicylová je beta hydroxykyselinou, o níž je známo, že účinkuje jiným způsobem než alfa hydroxykyseliny a předpokládá se, že je méně dráždivá.

Výše diskutovaný stav techniky nepředkládá kombinace AHA s olejem z koriandrových semen nebo kyselinou petroselinovou v kosmetických prostředcích a nezdá se navrhopat použití kyseliny petroselinové pro snížení podráždění nebo pálení, spojených s použitím alfa hydroxykyselin.

#### **Podstata vynálezu**

Předkládaný vynález zahrnuje, z jedné části, prostředek obsahující alfa hydroxykyselinu (AHA) a obsahující dále kyselinu petroselinovou.

Vynález rovněž zahrnuje způsob kosmetického snížení podráždění nebo pálení, indukovaného místním nanesením prostředku obsahujícího AHA, přičemž tento způsob zahrnuje místní nanesení kyseliny petroselinové ke snížení podráždění, indukovaného prostředkem. V souladu s vynalezeným způsobem může být kyselina petroselinová přítomna společně s AHA ve stejném prostředku, anebo může být nanášena z odděleného prostředku.

Podle předkládaného vynálezu je díky místnímu nanesení kyseliny petroselinové sníženo nebo odstraněno podráždění či pálení, indukované místním nanesením AHA. Bylo zjištěno, jako součást předkládaného vynálezu, že ne všechna známá činidla, působící proti podráždění, zlepšují podráždění indukované působením AHA.

Vynález tedy rovněž zahrnuje použití kyseliny petroselinové v kosmetickém prostředku pro snížení podráždění nebo pálení, indukovaného působením AHA.

Pokud není uvedeno jinak, jsou veškerá množství uváděna hmotnostně vzhledem k prostředku.

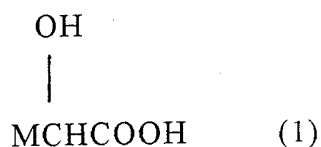
Kyselina petroselinová / $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ / je nezbytnou přísadou prostředků podle vynálezu.

Množství kyseliny petroselinové v prostředcích podle vynálezu se obecně pohybuje od 0,05 % do 20 % hmotnosti prostředku, lépe od 0,1 % do 10 % a nejlépe od 0,5 do 5 % hmotnosti prostředku.

AHA zesilují proliferaci a zvyšují biosyntézu ceramidů v keratinocytech, zvyšují tloušťku epidermu a zvyšují olupování a uvolňování buněk normální pokožky, výsledkem čehož je hladší, mlaději vyhlížející pokožka.

Alfa hydroxykyselina může být kombinací stereoisomerů (DL, D nebo L).

Alfa hydroxykyseliny (AHA) mají obecnou strukturu (1):



kde M je vodík nebo nasycený či nenasycený, rovný nebo větvený uhlovodíkový řetězec, obsahující od 1 do 27 atomů uhlíku.

Ještě lépe je hydroxykyselina zvolena z kyseliny mléčné, kyseliny 2-hydroxyoktanové, kyseliny hydroxylaurové, kyseliny glykolové a jejich směsí. Pokud existují stereoisomery těchto kyselin, přednost se dává L-isomeru.

Rozumí se, že v závislosti na pH prostředku může být hydroxykyselina přítomna jako sůl, například amonná, draselná nebo sodná sůl.

Ačkoli prostředky podle vynálezu mohou mít jakékoli pH v obecném rozmezí od 2,5 do 10, jsou prostředky podle vynálezu zvláště výhodné, pokud mají kyselé pH (zejména pokud obsahují hydroxykyselinu), nejlépe pH 3 až 4, neboť takové prostředky jsou zvláště účinné. Bohužel, při tomto pH prostředky rovněž vyvolávají podráždění.

Zvláštní výhodou prostředků podle vynálezu je možnost použití vyšších množství hydroxykyselin nebo retinoidů, aniž by způsobily podráždění pokožky. Množství hydroxykyselinové složky přítomné v prostředku podle vynálezu s výhodou činí 0,01 až 20 %, lépe 0,1 až 12 % a nejlépe 2 až 12 % hmotnosti prostředku.

Prostředky podle vynálezu, jimž se dává největší přednost a které obsahují jako činidlo působící proti podráždění kyselinu petroselinovou, zahrnují kyselinu glykolovou a/nebo kyselinu mléčnou, neboť bylo zjištěno, že tyto přísady vyvolávají podráždění, nicméně bylo ověřeno, že jsou zvláště účinné při poskytování kosmetických výhod.

Prostředky pro péči o pokožku podle vynálezu také zahrnují kosmeticky přijatelné vehikulum (pojídlo) nebo nosič, které je inertní, obvykle přísadu přítomnou v největším množství a sloužící k dodání aktivních nebo výkonných přísad.

Vehikula jiná než voda mohou zahrnovat kapalná nebo pevná změkčovadla, rozpouštědla, zvlhčující činidla, zahušťovadla a prášky. Zvláště upřednostňovaným nevodným nosičem je polydimethylsiloxan a/nebo polydimethylfenylsiloxan. Silikony podle tohoto vynálezu mohou být ty, jejichž viskozita se pohybuje kdekoli mezi přibližně  $1 \times 10^{-5}$  m<sup>2</sup>/s (10 cSt) až 10 m<sup>2</sup>/s (10 000 000 cSt) při 25°C. Zvláště žádoucí jsou směsi silikonů o nízké a vysoké viskozitě. Tyto silikony jsou dostupné od firmy General Electric Company pod zapsanými značkami Vicasil, SE a SF a od firmy Dow Corning Company jako 200 a 550 Serie. Množství silikonů, která mohou být použita v prostředcích

podle předkládaného vynálezu, se pohybují kdekoli v rozmezí od 5 do 95 % a lépe od 25 do 90 % hmotnosti prostředku. Množství vehikula se může pohybovat v rozmezí přibližně od 2 do 99 %, lépe přibližně od 50 do 99 % a nejlépe přibližně od 80 do 99 % hmotnosti celého prostředku.

Podle předkládaného vynálezu je vehikulum s výhodou představováno alespoň z 60 % hmotn. vodou, vzhledem k hmotnosti vehikula. Prostředky podle vynálezu jsou s výhodou emulzemi oleje ve vodě pro zlepšení dodávání hydroxykyselin do pokožky. (Viz A. Sah: An in-vitro study of the effect of formulation variables and product structure on the delivery of alpha-hydroxy acid (Lactic acid) to skin, MS Thesis, Departement of Pharmaceutical Sciences of the College of Pharmacy, University of Cincinnati, OH, červenec 1996). Takové zlepšené dodávání je často doprovázeno zvýšeným podrážděním nebo pálením, což činí použití kyseliny petroselinové v takových emulzích zvláště kritickým. V upřednostňovaných emulzích typu olej ve vodě podle předkládaného vynálezu voda tvoří alespoň 50 % hmotn. emulze podle vynálezu a nejlépe 50 až 70 % hmotn. vzhledem ke hmotnosti prostředku.

#### Volitelné látky prospívající pokožce a kosmetické doplňky

V kosmetických prostředcích podle předkládaného vynálezu mohou být přítomné různé typy aktivních přísad. Aktivní látky jsou definovány jako pokožce prospěšná činidla, lišící se od změkčovadel, a jiná než přísady, které jen zlepšují fyzikální charakteristiky prostředku. Ačkoli se neomezují na tuto kategorii, obecné příklady zahrnují sloučeniny působící proti vráskám, ochranná činidla proti slunečnímu záření a samoopalovací činidla.

Ochranná činidla proti slunečnímu záření zahrnují materiály, běžně používané k blokování ultrafialového záření. Ilustrativními sloučeninami jsou oxid titaničitý, deriváty PABA (kyseliny para-aminobenzoové), kyseliny skořicové a salicylové. Použit lze například oktylmethoxyskořičnan (cinnamát) a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (známý také jako oxybenzon).

Oktylmethoxyskořičnan a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon jsou obchodně dostupné pod zapsanými značkami Parsol MCX a Benzophenone-3. Přesné množství ochranného činidla proti slunečnímu záření, použitého v emulzích, se může lišit v závislosti na stupni požadované ochrany před UV zářením.

Jinou kategorií funkčních přísad v kosmetických prostředcích podle předkládaného vynálezu jsou zahušťovadla. Zahušťovadlo bude obvykle přítomno v množstvích kdekoli mezi 0,1 a 20 % hmotn. a s výhodou přibližně mezi 0,5 % a 10 % hmotnosti prostředku. Příkladnými zahušťovadly jsou zesíťované polyakrylátové materiály, dostupné pod zapsanou značkou Carbopol od B.F. Goodrich Company. Mohou být použity také guma, jako xanthanová guma, karagen, želatina, karaya, pektin a karubová guma. Za určitých okolností může být zahušťovací funkce zajišťována materiálem, který rovněž slouží jako silikon nebo změkčovadlo. Například silikonové guma v přebytku  $1 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$  (10 cSt) a estery jako stearát glycerolu mají dvojí funkčnost.

Do kosmetického prostředku podle vynálezu mohou být začleněny prášky. Tyto prášky zahrnují talek, křidu, Fullersovu hlinku, kaolin, škrob, smektitové jíly, chemicky modifikovaný křemičitan hořečnato-hlinitý, organicky modifikovaný montmorillonitový jíl, hydratovaný křemičitan hlinitý, kouřovou siliku, hlinitý škrobový oktenylsukcinát a směsi těchto látek.

Další doplňkové menší složky mohou být rovněž začleněny do kosmetických prostředků. Takové přísady mohou zahrnovat barvicí činidla, zneprůhledňující činidla a parfemační činidla. Množství těchto jiných složek se mohou pohybovat kdekoli v rozmezí od 0,001 % do 20 % hmotnosti prostředku.

#### Použití prostředku

Prostředek podle vynálezu je prvotně zamýšlen jako výrobek pro místní nanášení na lidskou pokožku, zvláště jako činidlo pro zjemnění pokožky a jako kondicionér a pro prevenci nebo snížení vráscitosti či vzhledu zestárlé kůže.

Při používání se malé množství prostředku, například 1 až 10 ml, nanese na vystavené plochy pokožky z vhodného zásobníku nebo aplikátoru a pokud je to nezbytné, je potom rozetřeno a/nebo vmasírováno do pokožky za použití ruky, prstů nebo vhodného zařízení.

Podle předkládaného způsobu dle tohoto vynálezu je podráždění pokožky, indukované aktivní přísadou, sníženo nebo odstraněno místním nanesením petroselinové kyseliny. Kyselina petroselinová může být společně přítomna s aktivní přísadou, nebo může být na pokožku nanášena odděleně od aktivní přísady.

#### Forma výrobku a balení

Prostředek k místnímu ošetření pokožky podle vynálezu může být formulován jako pleťová voda, tekutý krém, krém nebo gel. Prostředek může být balen ve vhodném zásobníku, vyhovujícím jeho viskozitě a zamýšlenému použití zákazníkem. Například pleťová voda nebo tekutý krém mohou být baleny do lahve nebo aplikátoru s otočnou kuličkou, nebo do kapsle či hnacím plynem poháněného aerosolového zařízení, anebo do zásobníku vybaveného pumpičkou, vhodnou pro ovládání prsty. Pokud je prostředek ve formě krému, může být jednoduše skladován v nedeformovatelné lahvičce nebo ve vytlačovacím zásobníku, jako je tuba nebo zavíčkovaná nádobka.

Vynález rovněž poskytuje uzavřený zásobník, obsahující kosmeticky přijatelný prostředek, jak je zde definován.

Kyselina petroselinová může být balena odděleně od prostředku, obsahujícího alfa hydroxykyseliny.

Následující specifické příklady dále ozřejmí vynález, ovšem vynález se na ně neomezuje.

**Příklady provedení vynálezu****Srovnávací příklad 1**

Byl připraven emulzní základ, mající následující složení.

plný chem. název či název dle CFTA	firemní název a % aktivní složky jak je získána	% hmotnostní
voda, deionizovaná		46,54
dvojsodná sůl EDTA	Sequesterene Na2	0,05
křemičitan hořečnato-hlinitý	Veegum Ultra	0,6
methylparaben	Methyl Paraben	0,15
dimethicon	DC Antifoam Emulsion	0,01
butylenglykol 1,3	Butylene Glycol 1,3	3,0
hydroxyethylcelulóza	Natrosol 250HHR	0,5
glycerin, podle US lékopisu	Glycerine USP	2,0
xanthanová guma	Keltrol 1000	0,2
triethanolamin	Triethanolamine 99 (%)	1,2
kyselina stearová	Pristerene 4911	3,0
propylparaben, nehořlavý	Propylparaben NF	0,1
glycerylhydrostearát	Naturechem GMHS	1,5
stearylalkohol	Lanette 18DEO	1,5
isostearylpalmitát	Protachem ISP	6,0
oktanoát C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> alkoholů	Hetester FAO	3,0
dimethicon	Silicone Fluid 200 (50 %)	1,0
cholesterol, nehořlavý	Cholesterol NF	0,5
stearát sorbitanu	Sorbitansteearát	1,0
butylovaný hydroxytoluen	Embanox BHT	0,05
tokoferylacetát	Acetát vitamínu E	0,1
stearát PEG-100	MYRJ 59	2,0

<i>sodium</i> stearoyllaktylát	Pationic SSL	0,5
retinylpalmitát	Palmitát vitamínu A 84%	0,06
kyselina hydroxykaprylová	kyselina hydroxykaprylová	0,01
voda, deionizovaná		dle potřeby do 99,80
alfa-bisabolol	alfa-bisabolol	0,2
pH		7 - 8

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

Dimethicone = protipěšivá emulze na bázi dimethylpolysiloxanu, vyrábí firma  
Dow Corning jako Dow Corning245 Fluid

PEG = polyethylenglykol

Přídavné přísady uváděné níže v Tabulce 1 byly přidávány namísto vody.

Subjekty byly testovány metodou testu podráždění, popsanou níže.

#### Metoda testu podráždění

Test čtyřnásobného použití náplasti: Cílem bylo srovnat úroveň podráždění vyvolaného různými testovanými materiály po opakovaných použití náplasti. Testované materiály byly uvedeny do styku s pokožkou v uzavřených podmínkách. Zevní horní část paže hodnotícího byla určena jako oblast nanášení. Páskový obvaz (páska Scanpor®) byl použit k upevnění polštářkových náplastí (25 mm Hill Top® Chamber, doplněno kotoučem vycpávky Webril® o průměru 18 mm) na místo. Použity byly obě paže hodnotícího. Náplasti byly upevňovány v symetrickém náhodném pořadí.

Náplasti byly upevněny v 9,00 hodin v pondělí ráno a odstraněny v 9,00 hodin v úterý ráno (24 hodin vystavení účinkům). Nová sada náplastí byla upevněna v 15, 00 hodin v úterý odpoledne a odstraněna ve středu ráno v 9,00 hodin (18 hodin vystavení účinkům). Třetí sada náplastí byla upevněna v 15

hodin ve středu odpoledne a odstraněna v 9,00 hodin ve čtvrtek ráno (18 hodin vystavení účinkům). Konečná sada náplastí byla upevněna v 15,00 hodin ve čtvrtek odpoledne a odstraněna v 9,00 hodin v pátek ráno (18 hodin vystavení účinkům).

Při každém odstranění náplastí byla místa omyta teplou vodou a poklepáváním vysušena. Poté byla testovaná místa označena chirurgickou tužkou pro označování kůže k zajištění polohy pro hodnocení a následné upevnění náplastí. Testovaná místa byla hodnocena v 15,00 hodin v úterý, středu, čtvrtek a pátek v průběhu studie, před dalším upevněním náplastí.

Podráždění kůže jako mírné zarudnutí, vysušenost a/nebo svědění testovacích míst se očekává. Otok testovacích míst je možný. Pokud některé testovací místo vykazovalo mírné zarudnutí nebo jakýkoli otok při jakémkoli vyhodnocení, nebylo toto určité místo znovu přelepováno náplastí.

Testovací místa na obou rukou byla vizuálně hodnocena dvěma zkušenými posuzovateli při odpovídajícím osvětlení. Testovací místa byla rozdělena podle závažnosti příznaků. Posuzovatel hodnotící odpovědi v první části stanovení pokračoval v posuzování i po všechny další dny průběhu studie.

V hodnocení reakcí získala místa s nejzávažnější odpovědí nejnížší bodové hodnocení (skóre). Místa s druhou nejzávažnější odpovědí získala druhé nejnížší skóre a tak dále. Nebylo používáno žádné povinné hodnocení. Pokud dvě či více míst nevykazovala odpověď nebo měla stejnou odpověď (místa se nelišila), byl určen průměr umístění (skóre). Pokud místo nebylo vzhledem ke stupni podráždění dále hodnoceno, místo si podrželo umístění (skóre), které získalo v době přerušování dávkování.

#### Statistická analýza

Výsledky hodnocení nalepení náplastí byly statisticky srovnány

neparametrickými statistickými metodami. Testované materiály, obsahující látky působící proti podráždění, byly srovnány s odpovídajícími kontrolními látkami, obsahujícími pouze hydroxykyselinu a/nebo retinoid. Použita byla Friedmanova suma umístění. Působení byla srovnávána se složením 2 (kontrola) v každém bodu stanovení za použití Friedmanovy analýzy, přičemž testující osoba působila jako seskupení (tj. každá testovaná osoba byla testována vzhledem ke každému sledovanému působení). Hodnota "p" menší než 0,1 byla brána jako statisticky významná.

Prostředky, obsahující složky, jak jsou uvedeny v tabulce 1, byly testovány za použití metody testu podráždění. Testováno bylo 20 subjektů. Čím vyšší je součet umístění (skóre), tím menší je podráždění.

Tabulka 1

Výsledky z testu podráždění

prostředek	přísady	suma umístění (den 4)
1	základní složení	68,5*
2	kontrola:zákl. složení + 8% kys. glykolová a 0,075% retinol	46,5
3	prostředek č. 2 + 3% olej ze semen černého rybízu	58,0
4	prostředek č. 2 + 1% sambucus	44,5

\*významně méně dráždiví než prostředek č. 2

*Sambucus canadensis* = bezinka

Z výsledků v tabulce 1 je zřejmé, že po čtyřech přelepeních byla 8% kyselina glykolová spolu s 0,075% retinolem (č.2) významně dráždivější než základní složení č. 1. 1% bezinky nebo 3% olej ze semen černého rybízu podráždění významně nesnížily. Nicméně podráždění vyvolávané alfa

hydroxykyselinou je problémem, který nelze řešit nanesením ani tak dobře známých protidráždivých činidel, jako je bezinka a černý rybíz.

### Srovnávací příklad 2

Prostředky 1, 5 a 11 až 14, obsahující přísady uvedené v Tabulce 2, byly testovány za použití metody testu podráždění, popsané v Příkladu 1. Testováno bylo sedmnáct jedinců. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2. Čím vyšší je součet umístění (skóre), tím menší je podráždění.

Tabulka 2

Výsledky testu podráždění

prostředek č.	přísady	součet umístění (den 4)
1	základní složení	74,5 <sup>a</sup>
5	zákl. složení + 8% kys. glykolová + 0,075% retinol	61,5
11	prostředek č. 5 + 1% zelený čaj	51,0
12	prostředek č. 5 + 0,1% K <sub>2</sub> kyselina glycyrrhetinová	54,5
13	prostředek č. 5 + 3% Quench T*	58,5
14	prostředek č. 5 + 3% Polyolový prepolymer-2**	57,0

<sup>a</sup> statisticky méně dráždivý než prostředek č. 5

\* činidlo působící proti podráždění od firmy Centerchem (obsahující vodu, butylenglykol, extrakt z kokových zrn, guaranový extrakt, extrakt z maté).

\*\* činidlo působící proti podráždění od firmy Penederm, Inc. (název podle CFTA je polypropylenglykol-12/SMDI kopolymer).

Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tabulce 2, žádné ze známých testovaných činidel působících proti podráždění nebylo schopno významně snížit podráždění, indukované prostředkem č. 5 (obsahujícím 8% kyselinu glykolovou a 0,075% retinol).

### Příklad 3

Tento příklad ukazuje, že místní nanesení alfa hydroxykyselin uvolňuje interleukin 1-alfa (IL-1 $\alpha$ ) ze *stratum corneum*, rohovité vrstvy pokožky.

Je známo, že *stratum corneum* je "skladem" prozánětlivého cytokinu IL-1 $\alpha$  (L. Wood, P. Elias, C. Calhoun, J. Tsai, C. Grunfeld, K. Feingold: Barrier Disruption Stimulates Interleukin - 1 $\alpha$  Expression and Release from Pre-Formed Pool in Murine Epidermis. J. Invest. Dermatol. 106, 397-403, 1996). Následující příklad dokresluje, že místní nanesení alfa hydroxykyselin indukuje uvolnění IL-1 $\alpha$  v lidské pokožce.

#### Ex vivo imunohistochemické barvení IL-1 $\alpha$ :

Pokožka zemřelého byla po dobu 30 minut v ledu ovlivňována prostředkem o základním složení (viz srovnávací příklad 1), který dále obsahoval 8% kyselinu glykolovou (GA) o pH 3,8; nebo krém vehikula (základní složení), nebo vodný roztok 8% kyseliny mléčné (LA) o pH 3,8; nebo pufr Tris (pH 7,6). Biopsie o průměru otvoru 8 mm byly odebrány a fixovány ve formaldehydu. Řezy 5 $\mu$  byly inkubovány spolu s polyklonálním anti-lidským IL-1 $\alpha$  (R&D Systems, zředění 1/50) a rozvíjeny za použití komplexního postupu s avidinem-biotinem-křenovou peroxidázou podle instrukcí výrobce (Vector Labs) a 3-amino-9-ethylkarbazolem jako chromogenem. Intenzita pozitivního označení (% nabarvené plochy) IL-1 $\alpha$  byla kvantifikována za použití zařízení ImagePro Plus, verze 3 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3

	8% kys. mléčná	pufř Tris	8% glykolový krém	krém vehikula
% zbarvené plochy	42,7 ± 12*	14,2 ± 10,4	48,4 ± 15,4**	2,0 ± 1,7

\* významné ve srovnání s pufřem Tris v t-testu,  $p < 0,01$

\*\* významné ve srovnání s vehikulem v t-testu,  $p < 0,03$

Z výsledků uvedených v Tabulce 3 je zřejmé, že působení 8% kyselinou mléčnou zvýšilo barvení IL-1 $\alpha$  ve srovnání s kontrolou, pufřem Tris. Nadto 8% krém kyseliny glykolové vyvolal významný nárůst barvení IL-1 $\alpha$  ve srovnání s vehikulem. Místní nanesení alfa hydroxykyselin (kyseliny glykolové a kyseliny mléčné) se zdálo stimulovat okamžité uvolnění IL-1 $\alpha$  v pokožce (epidermu). Rohovitá vrstva, *stratum corneum*, se zdá být nejpochoptitelnějším zdrojem, neboť je známo, že velká množství IL-1 $\alpha$  jsou uchovávána v korneocytech a/nebo v jejich okolí.

IL-1 $\alpha$ , uvolněný po ovlivnění alfa hydroxykyselinou, je schopen spustit kaskádu kyseliny arachidonové, která přeměňuje kyselinu arachidonovou na množství metabolitů zánětu, jako je prostaglandin E2 (PGE2). Prostaglandiny hrají centrální roli v zánětu a týkají se proto pathogenese a ovlivnění podráždění (T. Kupper v *Immunology: The Role of Cells and Cytokines in immunity and Inflammation*, J.J. Oppenheim a E.J. Schevach, editoři, Oxford University Press, New York, 1990, str. 283-305).

#### Příklad 4

Následující příklad ukazuje, že kyselina petroselinová může účinně inhibovat indukci PGE2, vyvolanou IL-1 $\alpha$ , který je naopak uvolňován alfa hydroxykyselinami. Kyselina petroselinová by tedy mohla být účinná při snižování podráždění, vyvolaného alfa hydroxykyselinami.

Neonatální (novorozenecké) lidské kožní fibroblasty (5 až 9 pasáží) byly nasazeny pro pěstování při hustotě 7 500 buněk na jamku do 96-jamkových destiček pro tkáňové kultury (Corning-Costar, Corning, NY). Použitým médiem bylo podle Dulbecca modifikované Eaglovo médium (DMEM) s vysokým obsahem glukózy (dodává firma Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD), doplněné 2 mmol.l<sup>-1</sup> L-glutaminem, 10% fetálním hovězím sérem, antimykotickým roztokem a roztokem antibiotik (vše rovněž od Life Technologies). Po 48 hodinách byla každá jamka dvakrát promyta 200 μl DMEM bez obsahu séra a buňkám byly v DMEM s L-glutaminem přidány v objemu 200 μl IL-1α v koncentraci 1 ng/ml a/nebo aktivní látka. Po 6 hodinách byly buňky mikroskopicky testovány vzhledem ke kvalitativní životnosti a médium bylo sebráno a zamraženo až do provedení analýzy. Každé ovlivnění se provádělo ve čtverném pořadí.

Enzymové imunostanovení (imunoassay) se provádělo za použití obchodní sady PGE2 (Amersham, Buckinghamshire, Anglie). Specifickými protilátkami vůči PGE2 se předem povleče sada mikrotitračních jamek. Stanovení spočívá v kompetici (soutěži) mezi neoznačeným PGE2 (standard nebo vzorek) a určeným pevným množstvím peroxidázou označeného PGE2 o omezené množství specifických protilátek vůči PGE2, vázaných na jamky. Standardy s obsahem 0, 1, 2, 4, 8, 16 a 32 pg/jamku nebo 50 μl média/jamku byly aplikovány s 50 μl/jamku 0.1 mol.l<sup>-1</sup> fosfátového pufru o pH 7,5 a ponechány 3 hodiny při 4°C. Po skončení této inkubace bylo do každé jamky přidáno 50 μl křenové peroxidázy, konjugované s PGE2 a destička byla inkubována 1 hodinu při 4°C. Pak byla destičky čtyřnásobně promyty 0,01 mol.l<sup>-1</sup> fosfátovým pufrům o pH 7,5, obsahujícím 0,5% Tween 20, v množství 300 μl na jamku. Poté byl přidán substrát 3,3,5,5-tetramethylbenzidin/peroxid vodíku ve 20% dimethylformamidu v množství 150 μl na jamku a destičky byly inkubovány přesně 30 minut při teplotě místnosti. Reakce byla zastavena přidáním 1 mol.l<sup>-1</sup> kyseliny sírové v objemu 100 μl na jamku. Ke kvantifikování barvy v jamkách odečtením absorbance při 450 nm byl použit spektrofotometr

pro mikrotitrační destičky Dynatech MR7000 (Dynatech, Chantilly, VA). Byla vynesena standardní křivka a z ní extrapolováno množství PGE2 ve vzorcích.

Protizánětlivý potenciál testovaných sloučenin byl hodnocen schopností sloučeniny inhibovat PGE2, indukovaný působením IL-1 $\alpha$ . Statistická významnost byla stanovena za použití Studentova t-testu. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4

ovlivnění	PGE 2 (pg/ml)	% snížení vzhledem k IL-1 $\alpha$
kontrola	267,6 $\pm$ 48,6	
IL-1 $\alpha$	598,2 $\pm$ 118,3	
IL-1 $\alpha$ + 0,01% kys. petroselinová	201,2 $\pm$ 40,1	120% *
IL-1 $\alpha$ + 0,001% kys. petroselinová	308,3 $\pm$ 97,2	80%

\* statisticky významné při  $p < 0,05$  ve srovnání s hodnotou pro IL-1 $\alpha$  samotný

Z výsledků v Tabulce 4 je zřejmé, že kyselina petroselinová může účinně inhibovat indukci PGE2, vyvolanou účinkem IL-1 $\alpha$ , který je naopak uvolňován působením alfa hydroxykyselin. Kyselina petroselinová by tedy mohla být účinná při snížení podráždění, působeného alfa hydroxykyselinami.

Příklady 5 až 8 ozřejmují místně nanášené prostředky podle předkládaného vynálezu. Prostředky mohou být zpracovávány běžným způsobem a jsou vhodné pro kosmetické použití. Zvláště se tyto prostředky hodí pro nanášení na vrásčitou, drsnou, suchou, šupinkovatou, zestárlou a/nebo UV zářením poškozenou pokožku ke zlepšení vzhledu a pocitu v pokožce, stejně jako pro nanášení na zdravou pokožku k prevenci nebo zpoždění nástupu takových poškození.

### Příklad 5

Typická emulze typu olej ve vodě, patřící do rozsahu vynálezu, je následovná:

<u>chemický název</u>	<u>% hmotn.</u>
propylenglykol	1
glycerin	1
hydroxyethylcelulóza	0,5
křemičitan hořečnato-hlinitý	0,5
imidazolidinylmočovina	0,5
čtyřsodná sůl EDTA	0,05
vazelína	2
isopropylpalmitát	5
dimethicon	0,5
cholesterol	0,5
cetylalkohol	0,5
kyselina isostearová	3
retinylpalmitát	0,1
PEG-40 stearát	1
PEG-100 stearát	1
sorbitanstearát	1
kyselina petroselinová	0,5
kyselina glykolová	7
hydroxid amonný	do pH 4,0
voda deionizovaná	dle potřeby do 100 %

PEG = polyethylenglykol

### Příklad 6

Jinou typickou emulzí typu olej ve vodě, patřící do rozsahu vynálezu, je následovná:

<u>chemický název</u>	<u>% hmotn.</u>
propylenglykol	1
hydroxyethylcelulóza	0,5
křemičitan hořečnat-hlinitý	0,5
imidazolidinylmočovina	0,2
vazelína	2
isopropylpalmitát	5
dimethicon	0,5
cholesterol	0,5
kyselina stearová	3
kyselina isostearová	1,5
glycerolstearát	1,5
PEG-40 stearát	1
PEG-100 stearát	1
sorbitansteart	1
cetylalkohol	0,5
kyselina petroselinová	2
kyselina glykolová	10
hydroxid amonný	do pH 3,8
voda deionizovaná	dle potřeby do 100 %

#### **Příklad 7**

Typickou emulzí typu voda v oleji, patřící do rozsahu vynálezu, je následovná:

<u>chemický název</u>	<u>% hmotn.</u>
isostearylneopentanoát	20
PEG-8 kaprylové/kaprinové glyceridy	6

cetyloktanoát	17
polyglyceryl-6-dioleát	15
cyklomethicon	20
glycerylisostearát	0,5
kyselina isostearová	0,5
ceramid III	0,1
PPG-5-ceteth-20	3
kyselina L-mléčná/mléčnan draselný	6
kyselina hydroxykaprylová	0,1
voda deionizovaná	1,3
kyselina petroselinová	0,5

cyklomethicon = změkčovadlo na bázi tetrameru či pentameru těkavých silikonů  
ceteth = cetostearylalkohol  $C_{16}H_{34}O$

### Příklad 8

Připravena byla následovná emulze typu olej ve vodě, patřící do rozsahu vynálezu:

<u>chemický název</u>	<u>% hmotn.</u>
xanthanová guma	0,2
dvojsodná sůl EDTA	0,1
sodná sůl kys. chloristé	0,5
diazodinylmočovina	0,3
oxid titaničitý	1
kyselina stearová	3
cyklomethicon	0,3
cetylalkohol	0,5
glycerylsteárat	0,5
PEG-100 steárat	0,5
steareth-2	0,2

lecithin	0,5
tokoferol	0,2
oktylmethoxyskořičnan	6
kyselina petroselinová	0,5
kyselina glykolová	3
kyselina jablečná	2
kyselina mléčná	2
extrakt zeleného čaje	1
triethanolamin	do pH 3,8
voda deionizovaná	dle potřeby do 100 %

steareth-2 = polyoxyethylen-2-stearylether

Rozumí se, že specifické formy vynálezu, které jsou zde ozřejmeny a popsány, jsou zamýšleny pouze jako reprezentativní příklady.

Zastupuje:

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje:
  - (i) hydroxykyselinu v množství od 0,01 % do 20 % hmotnosti prostředku;
  - (ii) kyselinu petroselinovou v množství od 0,05 % do 20 % hmotnosti prostředku; a
  - (iii) kosmeticky přijatelné vehikulum.
  
2. Prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že množství hydroxykyseliny činí 0,1 % až 12 % hmotnosti prostředku.
  
3. Prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že hydroxykyselina je zvolena ze skupiny, sestávající z kyseliny glykolové, kyseliny mléčné a směsí těchto sloučenin.
  
4. Způsob kosmetického snížení pálení nebo podráždění, indukovaného místním nanesením prostředku, obsahujícího alfa hydroxykyselinu, vyznačující se tím, že zahrnuje místní nanesení kyseliny petroselinové v množství, které je účinné ke zmírnění podráždění, indukovaného prostředkem.

Zastupuje: