



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 25 307 T2 2006.04.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 140 124 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 25 307.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/03272**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 961 160.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/38701**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.12.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **06.07.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.04.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 36/18 (2006.01)**

**A61K 36/48 (2006.01)**

**A61K 36/54 (2006.01)**

**A61K 36/28 (2006.01)**

**A61K 36/31 (2006.01)**

**A61K 36/899 (2006.01)**

**A61P 19/00 (2006.01)**

**A61P 25/00 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**9816328 23.12.1998 FR**

(73) Patentinhaber:

**Laboratoires Expanscience, Courbevoie, FR**

(74) Vertreter:

**Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BOUMEDIENE, Karim, F-14420 Ussy, FR; PUJOL,  
Jean-Pierre, F-14440 Douvres-la-Delivrande, FR;  
GUILLOU, Bernard, Georges, F-44240 La  
Chapelle-sur Erdre, FR; MSIKA, Philippe, F-75018  
Paris, FR; GHAYOR, Chafik, F-14000 Caen, FR**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON UNVERSEIFBAREN PFLANZLICHEN ÖLEN FÜR DIE HERSTELLUNG PHAR-  
MAZEUTISCHER PRÄPARATE**

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

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

**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Verwendung von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, insbesondere von Avocado-, Soja- und/oder Lupinenöl, mit einer stimulierenden Wirkung auf die Expression von TGF- $\beta$  für die Herstellung eines Arzneimittels, welches für die Behandlung von Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lyme-Krankheit, Arthritis psoriatica und Osteoporose, bestimmt ist, wie auch eine kosmetische Verwendung, gemäß welcher man auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen eine Zusammensetzung auf der Grundlage von unverseifbaren Anteilen von pflanzlichen Ölen aufträgt.

**[0002]** Die Patentanmeldung FR 2 231 394 offenbart, dass der unverseifbare Anteil von Soja als Lipidsenker verwendet werden kann.

**[0003]** Die Patentanmeldung EP 643 960 beschreibt die Verwendung der unverseifbaren Fraktion von Sojaöl für die Behandlung von Mischhaut aufgrund deren Emolliens-Aktivität und deren Lipase inhibierender Aktivität.

**[0004]** Die Veröffentlichung von H. Thiers et al., »un groupe d'agents thérapeutiques nouveaux: les insaponifiables des huiles végétales, leurs caroténoïdes, leurs phytostérols et leurs indéterminés administrés en solution alcoolique«, *Thérapie*, Band 16, 1961, Seiten 235–251, beschreibt insbesondere die Verwendung des unverseifbaren Anteils aus Palme in Form von Pommade aufgrund seiner Eutrophie-Wirkung und des unverseifbaren Anteils von Avocado, um dyskeratotische Läsionen zu bekämpfen oder ferner um Strahlungsdermitiden zu bekämpfen.

**[0005]** Die Patentanmeldung FR 2 762 512 beschreibt Zusammensetzungen auf der Grundlage von Lupinenöl, umfassend eine oder mehrere Fraktionen von Lupinenöl in Form eines unverseifbaren Anteils und deren kosmetische oder pharmazeutische Verwendung, insbesondere für den Lichtschutz, gegen die Alterung (aktinische oder nicht-aktinische) und für den Schutz der Haut gegen oxydierende Angriffe.

**[0006]** Die Patentanmeldung FR 2 678 632 bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines unverseifbaren Anteils von Avocadoöl, Arzneimittel, die diesen enthalten, wie auch kosmetische Zusammensetzungen oder Nahrungsmittelzusätze, die für die Erhaltung der guten Funktionsfähigkeit der knöchernen Knorpel und für die Verhütung der Hautalterung, von Arthrose oder von Parodontopathien nützlich sein können.

**[0007]** Schließlich beschreibt die internationale Anmeldung WO 99 59523, die lediglich hinsichtlich der Neuheit entgegengehalten werden kann, topische pharmazeutische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff eine Mischung von Pollenextrakten und von unverseifbaren Anteilen eines pflanzlichen Öls enthalten.

**[0008]** Unter „TGF- $\beta$ “ versteht man gemäß der Erfindung die verschiedenen Isoformen des TGF- $\beta$ , d.h. die Isoformen des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  („Transforming Growth Factor- $\beta$ “). Die Isoformen des TGF- $\beta$  bilden eine Familie von homodimeren Polypeptiden von ungefähr 25 kD Molekulargewicht. Unter den 5 bekannten Isoformen sind die am besten charakterisierten TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 (Sporn et al., (1987), *J. Cell Biol.* 105, 1039–1045; Roberts und Sporn (1990), *Handbook of Exp. Pharmacol.*, 35, 419–472, Springer Verlag, Heidelberg). Obgleich diese beiden Isoformen lediglich 71% Homologie zeigen, scheinen sie viele gemeinsame Aktivitäten aufzuweisen. Der TGF- $\beta$ 1 wurde zuallererst ausgehend von den humanen Plättchen isoliert, man weiß aber indessen, dass die meisten Zellen in der Lage sind, diesen zu exprimieren. Der TGF- $\beta$ 2 wurde ausgehend von Plättchen, von Rinderknochen und von Glioblastomzellen gereinigt.

**[0009]** Es ist bekannt, dass der TGF- $\beta$  an komplexen Mechanismen der Entwicklung von diversen Pathologien beteiligt ist und dass es wünschenswert ist, die Wirkung von TGF- $\beta$  zu verstärken, in anderen Worten dessen Expression durch die Zellen, die ihrerseits an den Mechanismen dieser Pathologien beteiligt sind, für eine günstige Entwicklung dieser Letzteren zu erhöhen.

**[0010]** So ist beispielsweise bekannt, dass durch die artikulären Chondrozyten exprimiertes TGF- $\beta$  an anabolen Reaktionsmechanismen, d.h. Mechanismen einer Wiederherstellung, des artikulären Knorpels, die während der ersten Stadien der Arthrose beobachtet werden und die dazu tendieren, den Abbau des Knorpels, welcher aus der Aktivität von durch die Chondrozyten unter der Einwirkung von Zytokinen, wie Interleukin-1 (IL-1), übermäßig sekretierten Metalloproteasen resultiert, zu kompensieren, beteiligt ist.

**[0011]** Außerdem ist bekannt, dass TGF- $\beta$  in günstiger Weise an den Mechanismen der Knochenmodellierung, die während der Osteoporose auftreten, beteiligt ist. Dies ist insbesondere durch Boyce et al. von der Universität von Texas ((1996), *Nature Med.* (2), 10, 1132–1136) gezeigt worden.

**[0012]** Schließlich spielt TGF- $\beta$  gleichfalls eine günstige Rolle bei bestimmten Differenzierungsmechanismen von Nervenzellen, die durch den Nervenzellwachstumsfaktor (NGF oder „Nerve Growth Factor“)

induziert werden, wie auch bei zahlreichen Aspekten der Gewebereparatur, insbesondere von kutanen Geweben.

**[0013]** Außerdem versteht man unter „Inhibitor PAI-1 des Plasminogenaktivators“ gemäß der Erfindung den spezifischen Inhibitor PAI-1, der mit dem anderen Inhibitor PAI-2 auf bekannte Weise die Aktivität der Gewebeform (tPA) und des Urokinase-Typs (uPA) des Plasminogenaktivators PA reguliert. Die beiden Formen von PA, tPA und uPA, werden durch zwei unterschiedliche Gene produziert und haben unterschiedliche Molekulargewichte wie auch eine unterschiedliche immunologische Reaktivität (Dano et al., (1985), Adv. Cancer Res. 44, 139–166; Hart et al., (1988), Comp. Bioch. Physiol. 90 B, 691–708). Die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 bilden stabile Komplexe mit dem tPA und dem uPA. PAI-1 ist die hauptsächliche Form im Plasma und wird durch die Endothelzellen, die Plättchen und die Gelenkzellen, wie die Synovialzellen und die Chondrozyten, produziert (Hart et al., 1988; Campbell et al., 1991; Hamilton et al., 1992).

**[0014]** Es wird besonders vorteilhaft sein, die Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators stimulieren zu können mit der Maßgabe, dass man so eine Hemmung der Wirkung der Metalloproteasen und folglich insbesondere einen Beitrag zu der Wirkung des TGF- $\beta$  für eine günstige Entwicklung der nachfolgend aufgeführten Pathologien erhält.

**[0015]** Es wurde jetzt ganz und gar überraschend und unerwartet festgestellt, dass die Verwendung von unverseifbaren Anteilen eines pflanzlichen Öls es erlaubt, nicht nur eine Wirkung einer Stimulation der Expression von TGF- $\beta$  zu erhalten, sondern auch eine Wirkung einer Stimulation der Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators.

**[0016]** So betrifft die Erfindung die Verwendung von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls mit einer stimulierenden Wirkung auf die Expression von TGF- $\beta$  für die Herstellung eines Arzneimittels, welches für die Behandlung von Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lyme-Krankheit, Arthritis psoriatica und Osteoporose, bestimmt ist.

**[0017]** Insbesondere ist die erfindungsgemäße Verwendung dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel dazu bestimmt ist, die Expression von TGF- $\beta$  und insbesondere die Expression der Isoformen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 zu stimulieren.

**[0018]** Spezieller ist die erfindungsgemäße Verwendung, wie dies klar aus dem nachfolgenden Beispiel 1 hervorgeht, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel dazu bestimmt ist, die Expression von TGF- $\beta$  durch das Zwischenglied der DNA-Sequen-

zen, die zwischen Basenpaar (bp) –1132 und Basenpaar (bp) –732 des Promotors von TGF- $\beta$  und insbesondere des Promotors der Isoform TGF- $\beta$ 1 gelegen sind, zu stimulieren.

**[0019]** Die erfindungsgemäße Verwendung ist gleichfalls dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel dazu bestimmt ist, die Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators zu stimulieren.

**[0020]** Allgemein ist der unverseifbare Anteil der Teil eines Fetts, welcher nach länger andauernder Einwirkung einer alkalischen Base in Wasser unlöslich bleibt und durch ein organisches Lösemittel extrahiert werden kann. In dem Hauptteil der unverseifbaren Anteile von pflanzlichen Ölen sind fünf große Gruppen von Substanzen vorhanden: gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe, aliphatische oder terpenische Alkohole, Sterole (oder „Phytosterole“), Tocopherole und Tocotrienole, die Carotinoid-Pigmente und Xanthophylle.

**[0021]** Vorzugsweise wird der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl, dem unverseifbaren Anteil von Lupinenöl und den Mischungen von diesen Letzteren ausgewählt.

**[0022]** Der Vergleich der Gehalte an unverseifbaren Anteilen von verschiedenen pflanzlichen Ölen: Soja, Baumwolle, Kokosnuss, Olive und Avocado, zeigt einen sehr bedeutenden Gehalt an unverseifbarem Anteil von Avocadoöl, der durch Extraktion gemäß diversen bekannten Verfahren erhalten wird. Typischerweise erstrecken sich die erhaltenen Gehalte an unverseifbarem Anteil in Avocadoöl von 2 bis 7% gegenüber 0,5% in Kokosnussöl, 1% in Sojaöl, 1% in Olivenöl.

**[0023]** Der bedeutendste Gehalt an unverseifbarem Anteil in Avocadoöl bezogen auf die anderen pflanzlichen Öle wie jene, die oben erwähnt worden sind, erklärt sich insbesondere aus dem Vorhandensein in dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl von Bestandteilen, die man im allgemeinen nicht gleichermaßen in dem unverseifbaren Anteil von zahlreichen anderen pflanzlichen Ölen findet, wie furanische Verbindungen und polyhydroxylierte Fettalkohole, und die allein mehr als 50% des unverseifbaren Anteils ausmachen. Die diesem unverseifbaren Anteil von Avocado eigenen Inhaltsstoffe können in zwei chemischen Fraktionen, welche als „Fraktion I“ und „Fraktion H“ bezeichnet werden, verteilt sein. Die aktiven Verbindungen für die erfindungsgemäße Verwendung erweisen sich insbesondere als in der Fraktion H und deren Vorstufen vorhanden. Die Fraktion H erscheint auf einem Gasphasenchromatogramm des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl an erster Stelle.

**[0024]** Der unverseifbare Anteil von Avocadoöl, der gemäß der Erfindung verwendet wird, kann ausgehend von der frischen Frucht erhalten werden; der unverseifbare Anteil von Avocadoöl, der gemäß der Erfindung verwendet wird, ist aber vorzugsweise der unverseifbare Anteil von Öl von getrockneter Avocado (d.h. der unverseifbare Anteil, welcher ausgehend von dem Öl der getrockneten Avocadofrucht erhalten wird).

**[0025]** Gemäß der Erfindung umfasst der unverseifbare Anteil von Avocado vorzugsweise wenigstens dessen an furanischen Derivaten angereicherte Fraktion (Fraktion H), dessen an polyhydroxylierten Fettalkoholen angereicherte Fraktion (Fraktion I) oder eine Mischung von diesen Fraktionen.

**[0026]** Bezüglich des unverseifbaren Anteils von Sojaöl kann man anmerken, dass dieser unverseifbare Anteil hauptsächlich aus Sterolen (40 bis 65%) und Tocopherolen ( $\geq 10\%$ ) gebildet wird. Die hauptsächlichsten Sterole sind das  $\beta$ -Sitosterol (40 bis 70% der gesamten Sterole), Campesterol (15 bis 30% der gesamten Sterole) und das Stigmasterol (10 bis 25% der gesamten Sterole). Die Tocopherole liegen in Form einer Mischung von  $\alpha$ -Tocopherol (5 bis 35% der gesamten Tocopherole),  $\gamma$ -Tocopherol (45 bis 70% der gesamten Tocopherole) und von  $\delta$ -Tocopherol (10 bis 43% der gesamten Tocopherole) vor.

**[0027]** Das Lupinenöl kann ausgehend von Mehlen und/oder Körnern von Lupine extrahiert werden.

**[0028]** Die Lupine ist ein naher Verwandter der Erbse, der Saubohne, der Sojabohne und der grünen Bohne. Die Körner werden traditionellerweise bei der Ernährung des Menschen aufgrund seines hohen Gehalts an Proteinen eingesetzt. Sie wird gleichfalls der Ernährung der Wiederkäuer in Form der ganzen Pflanze oder von deren Körnern beigefügt und ebenso häufig als Gründüngung eingesetzt. Speziell weisen vier Spezies der Lupine einen wirklichen landwirtschaftlichen Nutzen auf: die weiße Lupine (*Lupinus albus*), die blaue Lupine (*Lupinus angustifolius*), die gelbe Lupine (*Lupinus luteus*) und die wechselnde Lupine (*Lupinus mutabilis*).

**[0029]** Es wurde festgestellt, dass das Lupinenöl einen besonders hohen Gehalt an polyphenolischen Derivaten, Carotinen (insbesondere  $\beta$ -Carotin) und Tocopherolen aufweist.

**[0030]** Gemäß der Erfindung ist gleichfalls bevorzugt, einen jeglichen unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls zu verwenden, welcher an Phytosterolen, Tocopherolen, Tocotrienolen, terpenischen und triterpenischen Kohlenwasserstoffen, natürlichen Antioxidationsmitteln reiche Fraktionen enthält, insbesondere den unverseifbaren Anteil von Canola-, Colza-, Sonnenblumen-, Palm-, Mais-, Sesam-, Weizen-

keimöl, den unverseifbaren Anteil von Sojaöl und die Mischungen von diesen Letzteren. Der Fachmann auf diesem Gebiet versteht leicht, dass der Ausdruck „reich“ Bezug nimmt auf Gehalte an diesen verschiedenen, jeweils vorstehend aufgeführten Bestandteilen, die über den jeweiligen mittleren Gehalten liegen, die unter Berücksichtigung der Gesamtheit der pflanzlichen Öle, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind, erhalten werden.

**[0031]** Im Stand der Technik wurden mehrere Verfahren beschrieben, um die unverseifbare Fraktion eines pflanzlichen Öls zu extrahieren.

**[0032]** Man kann insbesondere das Verfahren zur Herstellung des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl aufführen, wie es in dem Patent FR-2 678 632 im Namen der Laboratoires Pharmascience beschrieben und beansprucht wird. Dieses Verfahren erlaubt, einen unverseifbaren Anteil von Avocado zu erhalten, welcher verglichen mit den klassischen Verfahren zur Herstellung eines unverseifbaren Anteils von Avocado reich an Fraktion H ist.

**[0033]** Man kann gleichfalls das Verfahren zur Herstellung eines unverseifbaren Anteils von Sojaöl aufführen, welcher ausgehend von einem Konzentrat des unverseifbaren Anteils von Sojaöl erhalten wird. Dieses Konzentrat des unverseifbaren Anteils wird durch Molekulardestillation gemäß einem Verfahren, wie es für Lupinenöl in der Patentanmeldung FR-2 762 512 beschrieben worden ist, das aber an Sojaöl angepasst worden ist, hergestellt. In diesem Verfahren wird das Sojaöl in einem Molekulardestillationsapparat vom Zentrifugentyp oder des mit einem abgeschabten Film arbeitenden Typs bei einer Temperatur zwischen ungefähr 210 und 250°C und unter einem starken Vakuum zwischen 0,01 und 0,001 Millimeter Quecksilber (entsprechend 0,13 bis 1,3 Pa) destilliert. Das erhaltene Destillat weist einen Gehalt an unverseifbarem Anteil zwischen 5 und 30 Gew.-% auf und bildet folglich ein Konzentrat des unverseifbaren Anteils von Sojaöl. Eben dieses Konzentrat wird dann gemäß einem klassischen Verseifungsverfahren in Gegenwart von ethanolischem Kaliumhydroxid verseift. Die erhaltene Mischung wird mit Dichlorethan in einer Gegenstromsäule extrahiert. Die Lösemittelphase wird schließlich durch Hindurchleiten durch einen Fallfilmverdampfer vom Lösemittel befreit, um den unverseifbaren Anteil von Soja zu gewinnen.

**[0034]** Als Beispiel für ein Verfahren zur Herstellung des unverseifbaren Anteils von Lupinenöl kann man jenes aufführen, das in der Patentanmeldung FR-2 762 512 beschrieben worden ist. Es sei insbesondere auf das Beispiel 3 dieser Anmeldung verwiesen.

**[0035]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsweise der Erfindung ist der unverseifbare Anteil eines

pflanzlichen Öls eine Mischung von unverseifbaren Anteilen von Avocado- und Sojaöl, wobei das Gewichtsverhältnis des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl zu dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl zwischen ungefähr 0,1 und ungefähr 9 eingeschlossen und vorzugsweise zwischen ungefähr 0,25 und ungefähr 0,6 eingeschlossen liegt.

**[0036]** Insbesondere kann man vorteilhafterweise die Mischung von unverseifbaren Anteilen von Avocado- und Sojaöl verwenden, wie sie von der Firma Laboratoires Pharmascience unter der Bezeichnung „Piascledine 300®“ vertrieben wird, die aus einer Mischung von 33,3 Gew.-% unverseifbarem Anteil von Avocado und 66,6 Gew.-% unverseifbarem Anteil von Soja bezogen auf das Gesamtgewicht der Mischung besteht (wobei die restlichen 0,1% aus kolloidalem Siliciumdioxid und Butylhydroxytoluol gebildet werden).

**[0037]** Man setzt den unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls gemäß der Erfindung vorzugsweise derart ein, dass er in dem Arzneimittel entsprechend einem Anteil zwischen ungefähr 1 und ungefähr 80 Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht des Arzneimittels vorhanden ist.

**[0038]** Das durch die erfindungsgemäße Verwendung hergestellte Arzneimittel kann beispielsweise außerdem eine pharmazeutisch annehmbare Träger-substanz, welche vorzugsweise an eine Verabreichung auf oralem, topischem äußerlichem, enteralem oder parenteralem Wege angepasst ist, umfassen.

**[0039]** Insbesondere umfasst dieses Arzneimittel eine Träger-substanz, welche an eine Verabreichung auf oralem Wege angepasst ist.

**[0040]** Das durch die erfindungsgemäße Verwendung hergestellte Arzneimittel ist folglich aufgrund seiner die Expression von TGF- $\beta$  stimulierenden Wirkung und seiner die Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators stimulierenden Wirkung vorteilhafterweise für die Behandlungen der vorstehend aufgeführten Pathologien bestimmt.

**[0041]** Die Erfindung betrifft schließlich gleichfalls eine Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl, dem unverseifbaren Anteil von Lupinenöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befind-

liche) Strukturen oder Formationen, und welche für die kosmetische Behandlung von Narben der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keinen Pollenextrakt umfasst.

**[0042]** Außerdem betrifft die Erfindung eine Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen, und welche für die Behandlung der intrinsischen Alterung der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keinen Pollenextrakt umfasst.

**[0043]** Schließlich betrifft sie die Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen, und welche für die kosmetische Behandlung der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen, die einer aktinischen Strahlung ausgesetzt worden sind, bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keinen Pollenextrakt umfasst.

**[0044]** Außerdem veranschaulicht das nachfolgende Beispiel 2 eine erfindungsgemäße Verwendung, nämlich zur Stimulierung der Biosynthese von Collagen, insbesondere durch Fibroblasten der Dermis. Die erfindungsgemäße Verwendung ist spezieller dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel für die Rekonstruktion der extrazellulären Matrix bestimmt ist und noch spezieller für die Behandlung von Störungen der extrazellulären Matrix, die mit der Hautalterung verbunden sind, bestimmt ist.

**[0045]** Außerdem ist bekannt, dass TGF- $\beta$  auf der Ebene des Haarzyklus wirkt, indem es im Sinne einer Hemmung das Nachwachsen des Haars moduliert. Außerdem erweist sich, dass gemäß einem noch schlecht geklärten Mechanismus TGF- $\beta$  eine Wirkung auf die follikulären Gewebe ausübt, deren Wirkung darin besteht, den Ausfall des Haars hervorzurufen. Diese beiden Wirkungen weisen folglich einen auf dem Gebiet der Epilation evidenten kosmetischen Nutzen auf. Insbesondere erlauben die komplementären depilatorischen Wirkungen (Hemmung des Nachwachsens des Haars und Bewirkung des Ausfallens des Haars) es dem Verwender in vorteilhafter Weise, die klassischen, lästigeren und häufig kostspieligeren Epilationstermine, einschließlich der Termine für das mechanische Rasieren, insbesondere beim Mann, in größeren zeitlichen Abständen wahrzunehmen. Diese kosmetische Verwendung kann man sich beispielsweise in Form eines nach der Epilation oder nach der Rasur zu verwendenden Balsams, welcher die klassischen kosmetischen Wirkungen dieser Art von Balsam (Hydratisierung, beruhigende Wirkung u.s.w.) und diese depilatorischen Wirkungen kombiniert, vorstellen.

**[0046]** So hat die Erfindung ferner die Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl, dem unverseifbaren Anteil von Lupinenöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die für die kosmetische, enthaarende Behandlung der Haut bestimmt ist, zum Auftragen auf die Haut, und welche wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Gegenstand.

**[0047]** Der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls ist in der kosmetischen Zusammensetzung vorzugsweise entsprechend einem Anteil zwischen ungefähr 0,1 und ungefähr 10 Gew.-% eingeschlossen bezogen auf das Gesamtgewicht der kosmetischen Zusammensetzung vorhanden.

**[0048]** Die Erfindung wird jetzt mit Hilfe von Beispielen, die in keinem Falle so interpretiert werden dürfen, dass sie deren Umfang beschränken können, veranschaulicht.

**[0049]** Die **Fig. 1** (d.h. die **Fig. 1.A** und **Fig. 1.B**) stellt eine Abbildung eines Northern-Blot-Experiments (**Fig. 1.A**), welche eine verstärkte Expression der mRNA von TGF- $\beta$ 1 in den mit den unverseifbaren Anteilen von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>; Referenz „IAS“ in den **Fig. 1** bis 6) behandelten Zellen zeigt, wie auch ein Histogramm (**Fig. 1.B**), welches einer quantitativen Proteinbestimmung entspricht, welches die verstärkte Proteinexpression von

TGF- $\beta$ 1 in den mit Piasclédine 300<sup>®</sup> behandelten Zellen zeigt, dar (die Referenz- oder Vergleichsprobe wird in den **Fig. 1** bis 6 mit „T“ bezeichnet).

**[0050]** Die **Fig. 2** (d.h. die **Fig. 2.A** und **Fig. 2.B**) zeigt die Wirkungen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja allein, von TGF- $\beta$ 1 allein und der Kombination [unverseifbare Anteile von Avocado und von Soja und TGF- $\beta$ 1) auf die Expression der mRNAs der Isoformen TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2, wie am Ende des nachfolgenden Beispiels 1, Abschnitt 2.1, erläutert. Insbesondere zeigen die Northern-Blot-Abbildungen (**Fig. 2.A**) die Expression der mRNA von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und von  $\beta$ -Aktin, welches als Referenz oder Vergleich herangezogen wurde. Die Ergebnisse der Expression der mRNAs der Isoformen TGF- $\beta$ 1 bzw. TGF- $\beta$ 2 sind in Form der jeweiligen Histogramme angegeben (**Fig. 2.B**).

**[0051]** Die **Fig. 3** (d.h. die **Fig. 3.A**, **Fig. 3.B**, **Fig. 3.C** und **Fig. 3.D**) veranschaulicht die Wirkungen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 im Verlauf der Zeit und je nach den eingesetzten Dosen. Die **Fig. 3.A** ist eine Photographie eines Elektrophoresegels des Produkts einer RT-PCR-Amplifizierung ausgehend von mRNA von TGF- $\beta$ 1 von mit unterschiedlichen Mengen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind normalisiert und in Histogrammform ausgedrückt (**Fig. 3.B**). Die **Fig. 3.C** ist eine Photographie eines Elektrophoresegels des Produkts einer RT-PCR-Amplifizierung ausgehend von mRNA von TGF- $\beta$ 1 von unterschiedliche Zeitspannen lang mit den unverseifbaren Anteilen von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind normalisiert und in Histogrammform ausgedrückt (**Fig. 3.D**).

**[0052]** Die **Fig. 4** zeigt die Wirkungen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) auf die Expression der Luciferase abhängig von unterschiedlichen Konstrukten des Promotors von TGF- $\beta$ 1.

**[0053]** Die **Fig. 5** ist eine Photographie eines Elektrophoresegels des Produkts einer RT-PCR-Amplifizierung ausgehend von der mRNA der TGF- $\beta$ 1- und TGF- $\beta$ 2-Rezeptoren und ausgehend von mRNR von  $\beta$ -Aktin, welches als Referenz oder Vergleich herangezogen wurde, stammend aus Zellen, die mit den unverseifbaren Anteilen von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) behandelt worden sind.

**[0054]** Die **Fig. 6** (d.h. die **Fig. 6.A**, **Fig. 6.B** und **Fig. 6.C**) veranschaulicht die Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (Piasclédine 300<sup>®</sup>) auf die Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators. Die **Fig. 6.A** stellt eine Pho-

tographie eines Elektrophoresegels von Proteinen, erhalten durch Extraktion ausgehend von Zellen, die mit Piasclédine 300<sup>®</sup> oder mit TGF- $\beta$  behandelt worden sind, dar. Die [Fig. 6.B](#) ist eine Photographie eines Northern-Blot, welcher die Expression von PAI-1-RNA in den mit Piasclédine 300<sup>®</sup> behandelten Zellen zeigt. Die Ergebnisse des Northern-Blot-Experiments sind normalisiert und in der [Fig. 6.C](#) in Histogrammform ausgedrückt.

**[0055]** Die [Fig. 7](#) zeigt die Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und der Fraktionen H und I auf die Expression von TGF- $\beta$ 1.

**[0056]** Die [Fig. 8](#) (d.h. die [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#)) zeigt die Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und der Fraktionen H und I auf die Biosynthese von Collagen ([Fig. 8A](#)) und von nicht-collagenartigen Proteinen ([Fig. 8B](#)) durch Dermis-Fibroblasten in Kultur.

Beispiel 1: Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 und auf die Expression des PAI-1.

## 1.1. Materialien und Methoden

### 1.1.1. Kultur und Behandlung von artikulären Chondrozyten

**[0057]** Die Chondrozyten werden ausgehend von Kälberknorpelgeweben isoliert, wie in dem Artikel von Benya et al. („The progeny of articular chondrocytes synthesize collagen types I and II trimer, but not type II. Verification by cyanogen bromide peptide analysis“, *Biochemistry* 1977; 16: 865–872) beschrieben. Es werden Primärkulturen von Chondrozyten eingesetzt, um phänotypische Veränderungen zu minimieren. Die Kulturen werden in einer Menge von  $6,0 \times 10^6$  Zellen pro 175 cm<sup>2</sup>-Gefäß (für die Extraktion von RNA), in einer Menge von  $5,0 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in Platten mit 6 Vertiefungen (9,6 cm<sup>2</sup>) (für die Markierung des PAI-1) und in einer Menge von  $1,2 \times 10^6$  Zellen in 100 mm-Petrischalen (Transfektion) verteilt. Die Kulturen werden in komplettem DMEM-Medium (DMEM für „Dulbecco's modified Eagle's medium“), enthaltend 10% fötales Kälberserum (FCS) und Antibiotika, bei 35°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft inkubiert, bis Konfluenz erreicht wird (mit der Ausnahme der Transfektionsversuche). Die Kulturen werden in Gegenwart der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja in Form des Produkts „Piasclédine 300<sup>®</sup>“ (vertrieben von der Firma Laboratoires Pharmascience), welches 33,3 unverseifbaren Anteil von Avocadoöl und 66,6 unverseifbaren Anteil von Sojaöl enthält, wobei die Konzentration von Piasclédine 300<sup>®</sup> 10  $\mu$ g/ml beträgt, und in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 1 ng/ml (vertrieben von der Firma R & D Sys-

tems) während der angegebenen Zeitspannen inkubiert. In den Fällen, wo Piasclédine 300<sup>®</sup> in Dimethylformamid (DMF) gelöst wird, nimmt man in alle Versuche Vergleichsversuche, welche die gleiche Konzentration an DMF enthalten, auf.

### 1.1.2. RNA-Extraktion

**[0058]** Die Gesamt-RNA wird durch die differenzielle Solubilisierungsmethode mittels Phenol/Chloroform unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Kits RNAXel der Firma Eurobio extrahiert. Die RNA-Konzentrationen werden durch die Messung des Werts der optischen Dichte bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) bestimmt. Die Verhältnisse OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> liegen über 1,8. Die Unversehrtheit der RNA-Proben wird durch Elektrophorese auf einem 1%-igen Agarosegel in Gegenwart von Ethidiumbromid kontrolliert. In dem Falle einer Verunreinigung mit genomischer DNA führt man eine ergänzende Ausfällung mit 6 M Lithiumchlorid LiCl aus, um reine RNA-Proben zu erhalten.

### 1.1.3. Hybridisierung der RNA (Northern-Blot)

**[0059]** Man lässt 10  $\mu$ g-Proben von denaturierter RNA auf einem 1%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel wandern. Die RNA wird durch Kapillarität auf eine Nylonmembran (Pall Biotyne, Gelman Sciences) transferiert und durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen (Bioblock UV Crosslinker, Frankreich) immobilisiert. Man verwendet drei unterschiedliche Sonden, um die mRNA-Werte für TGF- $\beta$ , PAI-1 und  $\beta$ -Aktin auszuwerten: (a) man erzeugt eine cDNA-Sonde mit 336 Basenpaaren (bp) für TGF- $\beta$ 1 durch RT-PCR (Umkehrtranskription und Polymerasekettenreaktion) unter Verwendung der nachfolgend angegebenen Primer, (b) ein cDNA-Fragment von 3000 bp, welches dem humanen PAI-1 entspricht (bereitgestellt durch das Labor von Dr. J-P Pelletier, Montreal, Kanada), und (c) eine Sonde von 548 bp von  $\beta$ -Aktin, erzeugt durch RT-PCR mit den nachfolgend aufgezählten spezifischen Primern. Die cDNA-Sonden werden unter Verwendung des Kits für die zufallsgesteuerte Markierung von Primern (Gibco BRL, Frankreich) und [<sup>32</sup>P]-dCTP als radioaktiver Markierungsverbindung (Amersham, Frankreich) radioaktiv markiert. Jede Sonde wird getrennt bei 55°C hybridisiert und zweimal 20 min bei Umgebungstemperatur und einmal bei 55°C mit einem 2  $\times$  SSC-Puffer, welcher 0,1% SDS enthält, gewaschen. Man detektiert die Signale durch Autoradiographie mit Filmkontakt unter Verwendung eines Kodak-Films (X-OMAT AR5) mit Verstärkerschirmen. Die relative optische Dichte der Autoradiographiesignale wird gegenüber den Werten des  $\beta$ -Aktins unter Verwendung der Densitometrie-technik durch zweidimensionale Laserabtastung und der Software ImageQuaNt (Molecular Dynamics, Frankreich) normalisiert.

## 1.1.4. RT-PCR-Analyse

**[0060]** Proben von 1 µg Gesamt-RNA werden in cDNA umgekehrt transkribiert in Gegenwart von 100 pM eines Antisinn-Primers, 10 Einheiten „RNasin<sup>®</sup>“ (einem Ribonukleaseinhibitor, der von der Firma Promega vertrieben wird), 10 mM Dithiothreitol, 0,5 mM von jedem Desoxynukleotidtriphosphat (dNTPs) (Life Technologies), einem ersten 5X „Strand“-Puffer und 60 Einheiten reverser Transkriptase des Moloney-Mäuseleukämievirus (Life Technologies). Die Reaktion erfolgt während 1 h bei 42°C. Die Amplifizierung der erzeugten cDNA erfolgt in einem Omni E Hybaid-Thermocycler unter Verwendung des PCR-Kits von Life Technologies in Gegenwart der folgenden Sinn- und Antisinn-Primer: TGF-β1, Sinn 5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC-3'/Antisinn 5'-GCT GCA CTT GCA GGA GGG CAC-3' (Lupparello et al., „Transforming Growth Factor-β1, -β2 and -β3, urokinase and parathyroid hormone-related peptide expression in 8701-Bc breast cancer cell and clones, Differentiation, 1991; 55: 73–80); TβR-1, Sinn 5'-ATT GCT GGA CCA GTG TGC TTC GTC-3'/Antisinn 5'-TAA GTC TGC AAT ACA GCA AGT TCC ATT CTT-3' (Franzen et al.), „Cloning of TGF-β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF-β type II receptor“ Cell, 1992; 75: 681–692); TβR-II, Sinn 5'-CGC TTT GCT GAG GTC TAT AAG GCC-3'/Antisinn 5'-GAT ATT GGA GCT CTT GAG GTC CCT-3' (Lin Hy et al., „Expression cloning of the TGF-β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase“ Cell, 1992; 68: 775–785); β-Aktin, Sinn 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3'/Antisinn 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3' (Lupparello et al., a.a.O.). Man führt 35 Zyklen aus unter Verwendung der folgenden Bedingungen: 95°C während 30 s, 55°C während 30 s und 72°C während 1 min. Dann fügt man einen ergänzenden Schritt bei 72°C während 10 min hinzu. Die Anzahl von Zyklen wird in der exponentiellen Phase der zuvor ermittelten Amplifizierungskurve ausgewählt. Die Transkripte wurden durch Elektrophorese auf einem 2%-igen Agarosegel analysiert und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Amplifizierungsreaktionen haben erwartete Transkriptgrößen TGF-β1: 336 bp, TβR-I: 668 bp, TβR-II: 454 bp, β-Aktin: 548 bp geliefert). Die Identität der Produkte der PCR wird gleichfalls durch Restriktionsendonukleaseverdau und durch Southern-Blot unter Verwendung der jeweiligen humanen Sonden, die für TβR-I und TβR-II der gesamten Länge der cDNAs und für TGF-β1, β-Aktin den durch RT-PCR erzeugten Fragmenten entsprechen, bestätigt. Nach Photographie der Gele mit einem Polaroid 665-Film wird die Intensität der entsprechenden Banden durch densitometrische Abtastung, ausgeführt mit der Software ImageQuant (Molecular Dynamics), quantifiziert und gegenüber den Werten für die β-Aktin-mRNA normalisiert.

## 1.1.5. Messung des reifen sekretierten TGF-β1

**[0061]** Um die Menge von aktivem TGF-β1 in dem durch die Kontroll-Vergleichszellen oder die mit den unverseifbaren Anteilen von Avocado und von Soja behandelten Zellen konditionierten Medium zu messen, werden die konfluenten Monolayer-Zellen in den Kulturplatten mit 6 Vertiefungen 24 h in dem Medium, welches 10% FCS enthält, mit oder ohne 10 µg Piasclédine 300<sup>®</sup> inkubiert. Die Zellen werden dreimal hintereinander mit einem serumfreien Medium, ergänzt mit 200 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 5, 30 und 60 min gewaschen und in 1 ml serumfreiem Medium 6 zusätzliche Stunden inkubiert. Das konditionierte Medium wird dann in Silikonröhrchen für eine Mikrozentrifugation gesammelt, zentrifugiert und die Menge von aktivem, reifem TGF-β1 wird in dem Überstand durch quantitative Immunbestimmung des TGF-β1 unter Verwendung des Kits Quantikine<sup>®</sup> (Quantikine<sup>®</sup> R&D Systems, U.S.A.) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

## 1.1.6. Radioaktive Markierung für die Synthese von PAI-1

**[0062]** Konfluente Kulturen in Platten mit 6 Vertiefungen (9,6 cm<sup>2</sup>) werden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (40 µCi/ml, Amersham, Frankreich) in Gegenwart von Piasclédine 300<sup>®</sup> (10 µg/ml) und von TGF-β1 (1 ng/ml) 24 h markiert. Die Extraktion der radioaktiv markierten Proteine und die Charakterisierung des PAI-1 durch Elektrophorese erfolgen, wie in der Veröffentlichung von Laiho, M., et al. „Transforming Growth Factor-β induction of type-1 plasminogen activator inhibitor“ J. Biol. Chem. 1987; 262: 17467–17474) beschrieben, mit einigen Modifizierungen. Kurz zusammengefasst, werden die Medien abgezogen und die Zellschichten werden in 1 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, welcher 0,5% Natriumdesoxycholat und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid enthält, abgeschabt. Die Proben werden bei 4°C, 10000 g 10 min zentrifugiert. Die Überstände werden mit Concanavalin A (Con A)-Sepharose (Pharmacia) (50 µl einer 50%-igen (Vol./Vol.) Suspension in PBS) absorbiert. Die Con A-Sepharose wird dreimal hintereinander mit einer PBS/Tween 80 (0,01%)-Mischung gewaschen und die gebundenen Proteine werden in Laemmli-Puffer (Laemmli et al., „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>“ Nature, 1970 227: 680–685), welcher 10% 2-Mercaptoethanol enthält, gelöst. Die an das Concanavalin A gebundenen Proteine werden einer Polyacrylamid-Elektrophorese auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) unterworfen, gefolgt von einer Fluorographie. Ovalbumin (M<sub>r</sub> 46000) und Carboanhydrase (M<sub>r</sub> 29000) werden als Molekulargewichtsmarker verwendet. Es wird durch das vorangehend erwähnte Immunblotting unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-anti-PAI-1-Antikörpers (Dako, Kopenha-

gen, Dänemark), wie in der vorstehend angegebenen Veröffentlichung von Laiho, M., et al. beschrieben, bestimmt, dass die Bande mit 46 kD dem PAI-1 entspricht.

#### 1.1.7. Zelltransfektion und Luciferase-Aktivitätstest

**[0063]** Für die transitorischen Transfektionen verteilt man die Zellen in 100 mm-Petrischalen und man lässt sie sich bis zu 70–80% Konfluenz vermehren. Die Zellen werden dann durch die Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode (Bradford et al., „A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“, Anal. Biochem. 1976; 72: 248–254) mit 9 µg geeigneten Plasmiden und 3 µg pSV40-β Gal (Promega), einem Expressionsvektor der β-Galactosidase, welche als interner Vergleich verwendet wird, um die Wirksamkeit der Transfektion zu normalisieren, cotransfiziert. Nach 24 h wird das Medium durch ein Medium, welches DMF (1:1000) in Abwesenheit oder in Anwesenheit von Piasclédine 300® (10 µg/ml) enthält, ersetzt.

**[0064]** Die Zellen werden 48 h nach der DNA-Zugabe geerntet und die Extrakte werden hinsichtlich der Luciferase-Aktivität getestet. Kurz zusammengefasst, werden die Petrischalen zweimal hintereinander mit PBS gewaschen und die Zellen werden mit 300 µl Lysepuffer (0,45 mM Tris-HCl, pH 7,5) lysiert. Die Lysate werden drei Einfrier-Auftau-Zyklen unterworfen. Nach einer Zentrifugation misst man die Lumineszenz eines 50 µl-Aliquots von Lysat von jeder Petrischale in einem Luminometer (Berthold Lumat 9501) während 20 s nach Zugabe von Luciferin (Luciferase Assay System, Firma Promega). Um die Aktivität der Luciferase zu normalisieren, bestimmt man die Proteinkonzentration und die Aktivität der β-Galactosidase. Die Proteinkonzentration von Zelllysaten von 4 µl aus jeder Petrischale wird nach Bradford gemessen, wie oben angegeben. Die Zelllysate werden auf die β-Galactosidaseaktivität getestet, indem Resofurin-β-D-galactopyranosid als Substrat verwendet wird, und man misst die OD bei 572 nm.

#### 1.1.8. Konstruktion der Plasmide

**[0065]** Die den Promotor des TGF-β1 enthaltenden Konstrukte werden ausgehend von dem Plasmid phTG2 (Kim et al., „Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-β1 gene“, J. Biol. Chem. 1989; 264: 402–408), bereitgestellt durch den Arzt S. J. Kim (Laboratoires de Chemoprevention, NIH/NCI, Bethesda), erzeugt. Der Verdau des Plasmids phTG2 mit den Enzymen HindIII bzw. XbaI erzeugt DNA-Fragmente, die den jeweiligen Promotorsequenzen –1132 bis +11 bzw. –732 bis +11 entsprechen. Nach Auffüllen der kohäsiven Enden durch das Klenow-Fragment werden die DNA-Fragmente mit KpnI verdaut und werden dann

in die SmaI/KpnI-Stelle in das Standard-Reporterplasmid pGL2, das das Gen der Luciferase ohne Promotorsequenz kodiert, kloniert (Promega). Das die Promotorregion –454/+11 enthaltende Konstrukt entspricht der Klonierung einer DNA-Sequenz, die durch Verdau von phTG2 durch HindIII und KpnI erhalten wird, in eine SmaI-KpnI-Stelle des Standard-Reporterplasmids pGL2.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (Piasclédine 300®) auf die Expression von TGF-β1 und TGF-β2.

**[0066]** Die Wirkung von Piasclédine 300® auf die artikulären Chondrozyten vom Rind wird in konfluenten Primärkulturen, die 24 h in Gegenwart oder in Abwesenheit von Piasclédine 300® (10 µg/ml) inkubiert werden, bestimmt, wobei die Vergleichsproben die gleiche Konzentration Dimethylformamid (DMF 1:1000), welches als Lösemittel des Extrakts eingesetzt wird, enthalten. Es wurde keinerlei morphologische Veränderung oder Zellablösung bei Konzentrationen bis zu 100 µg/ml beobachtet, wie durch Phasenkontrastmikroskopie bestimmt wurde. Gleichwohl wurde die Konzentration von 10 µg/ml für die meisten Versuche ausgewählt in dem Falle, wo der Wert von DMF in den Proben mit 100 µg/ml zu hoch und potentiell schädlich für die Zellen gewesen wäre. Die Expression von TGF-β1 und TGF-β2 wurde nach Extraktion der Gesamt-RNA durch Northern-Blot bestimmt.

**[0067]** Wie die Fig. 1 zeigt, hat die Behandlung von BAC (Bovine Articular Chondrocytes) mit Piasclédine 300® in einer Konzentration von 10 µg/ml eine bemerkenswerte Erhöhung auf der Ebene der TGF-β1-mRNA bezogen auf die Vergleichsproben bewirkt, wenn die mRNA kaum nachweisbar war. Es wurden auf den Northern-Blots zwei Transkripte von 1,9 und 2,4 kb beobachtet. Diese durch Piasclédine 300® induzierte verstärkte Expression des TGF-β1-Gens ist spezifisch, denn die Expression der mRNA von β-Aktin, welches einem Haushaltsgen entspricht, hat sich unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht auf signifikante Weise verändert.

**[0068]** Um zu bestimmen, ob diese Wirkung auf die Transkription von einer Erhöhung der Synthese der TGF-β-Proteine begleitet wird, erlaubt eine quantitative Bestimmung mittels ELISA, die Konzentration von in die mit Piasclédine 300® behandelten Zellkulturmedien freigesetztem TGF-β1 abzuschätzen. Die Fig. 1 zeigt, dass die Produktion von immundetektierbarem TGF-β1 durch eine 24-stündige Exposition gegenüber 10 µg/ml Piasclédine 300® erhöht wird. Obgleich der Versuch nicht erlaubt, das latente TGF-β von dem aktivierten TGF-β zu unterscheiden, resultiert daraus klar, dass es eine Korrelation zwi-

schen der Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Transkription und die Translation und auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 gibt.

**[0069]** In einer zweiten Reihe von Experimenten untersuchte man die Wirkungen von Piasclédine 300<sup>®</sup> auf den Wert der Expression sowohl von TGF- $\beta$ 1 als auch von TGF- $\beta$ 2 in Gegenwart oder in Abwesenheit von exogenem TGF- $\beta$ 1. Wie die **Fig. 2** zeigt, wurde die Expression von TGF- $\beta$ 2 gleichfalls durch Piasclédine 300<sup>®</sup> stimuliert. Interessanterweise wurde im Falle von TGF- $\beta$ 1 ein Synergieeffekt beobachtet, welcher zeigt, dass in dem System unerwartet Verstärkungsschleifen auftreten können.

2.2. Wirkungen (Zeit- und Dosisabhängigkeiten) der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 abhängig von der Zeit und den Dosen

**[0070]** Da diese Ergebnisse zeigen, dass Piasclédine 300<sup>®</sup> eine Erhöhung der Expression von TGF- $\beta$  induziert, wollte man die Auswirkungen von unterschiedlichen Konzentrationen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und von unterschiedlichen Inkubationsdauern auf den Expressionsgrad der mRNAs von TGF- $\beta$ 1 bestimmen. Insoweit, als das durch die Northern-Blot-Methode für die als Vergleich dienenden nicht-behandelten Chondrozyten detektierte Signal relativ schwach ist (siehe **Fig. 1**), wurde bevorzugt, die RT-PCR-Methode einzusetzen, um diese Versuche auszuführen. Die Behandlung von Chondrozyten mit Piasclédine 300<sup>®</sup> in steigenden Konzentrationen (5, 10 und 25  $\mu$ g/ml) erlaubt, eine Reaktion auf die Stimulation für Piasclédine 300<sup>®</sup>-Konzentrationen von 10 und 25  $\mu$ g/ml mit einer bedeutenderen Wirkung bei einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml zu beobachten. Die Konzentration von 5  $\mu$ g/ml ist wahrscheinlich zu gering, um irgendeine Wirkung hervorzurufen (siehe **Fig. 3**). Die Behandlung von Chondrozyten mit Piasclédine 300<sup>®</sup> in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml während Zeitspannen von 12, 24 oder 48 h erlaubt, eine Erhöhung des Expressionsniveaus der mRNAs von TGF- $\beta$ 1 bei allen Inkubationsdauern mit einem Maximum bei 48 h zu beobachten (siehe **Fig. 3**).

2.3. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die durch die 5'-flankierende Region des TGF- $\beta$ 1-Gens dirigierte zelluläre Expression

**[0071]** Entsprechend den vorangegangenen Ergebnissen, die zeigen, dass die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja die Transkriptionsaktivität des Promotors des TGF- $\beta$ 1-Gens stimulieren können, besteht der Gegenstand dieses Versuchs darin, die cis wirkenden Sequenzen des TGF- $\beta$ 1-Gens, welche in der Lage sind, diesen Effekt zu vermitteln, zu ermitteln. Eine Reihe von Fragmenten der 5'-Region des Promotors des humanen TGF- $\beta$ 1-Gens, wel-

che mit dem Luciferase-Gen fusioniert worden sind, werden durch Transfektion in Rinder-Chondrozyten eingeschleust, die dann 24 h mit Piasclédine 300<sup>®</sup> in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml behandelt werden. Die Expression der Luciferase-Aktivität wird dann für jedes Plasmid getestet. Wie dies **Fig. 4** zeigt, induziert das längste eingesetzte Konstrukt (-1132 bis +11) eine Expression von Luciferase-Aktivität, die 8-fach stärker ist als jene des Vergleichskonstrukts. Die anderen Sequenzen, die der am weitesten stragabwärts liegenden Region entsprechen (-732 bis +11), erzeugen keine signifikante Änderung hinsichtlich der Expression der Luciferase verglichen mit jener der Vergleichskonstrukte.

**[0072]** Diese Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Sequenzen, die auf die Stimulation durch die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja hinsichtlich der Expression des TGF- $\beta$ 1-Gens ansprechen, sich zwischen -1132 und -732 befinden.

2.4. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren

**[0073]** In dem Maße, wo die biologische Aktivität von TGF- $\beta$  über seine Bindung an die zellulären Membranrezeptoren vermittelt wird, bietet sich an, die Wirkungen der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Expression der Rezeptoren von TGF- $\beta$  zu untersuchen, indem die entsprechenden mRNA-Niveaus untersucht werden. Wie die **Fig. 5** zeigt, induziert die Behandlung mit Piasclédine 300<sup>®</sup> keinerlei Variation des Expressionsniveaus der mRNAs von T $\beta$ R-I und von T $\beta$ R-II. Die Analyse dieser Daten durch densitometrische Abtastung und Normalisation bezogen auf das Signal des  $\beta$ -Aktins zeigt, dass das relative Verhältnis für den T $\beta$ R-I, ermittelt mittels einer Amplifizierung in 35 Zyklen, bei den behandelten Kulturen 1,16 beträgt, verglichen mit dem Wert von 1,23 bei den Vergleichsproben und dem Wert von 0,83 für den T $\beta$ R-II gegenüber 0,70 bei den Vergleichsproben.

2.5. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja auf die Expression des PAI-1

**[0074]** In den konfluenten Monolayer-Kulturen von Chondrozyten, die in diesen Versuchen eingesetzt wurden, haben vorangegangene Assays gezeigt, dass der durch die Zellen produzierte PAI-1 im Wesentlichen in der Schicht der Zelle, welche eine reichlich vorhandene, umgebende Matrix umfasst, gefunden wird. Es wurde festgestellt, dass das Medium lediglich geringfügige Mengen an neu synthetisiertem PAI-1 enthielt. Folglich extrahiert man den mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten PAI-1 ausgehend von der Fraktion Zellen + Matrix, ohne zwischen dem intrazellulären Teil und dem extrazellulären Teil des gesamten produzierten PAI-1 zu unterscheiden. Wie die

**Fig. 6** zeigt, was, wenn man Kulturen von Rinder-Chondrozyten mit TGF- $\beta$ 1 während 24 h behandelte, die durch Gelelektrophorese isolierte PAI-1-Fraktion signifikant bedeutender als jene der Vergleichskulturen. Dieses Ergebnis hat den Beweis geliefert, dass die Zellen auf den TGF- $\beta$ 1 in Form einer Expression des PAI-1 ansprachen, und hat das System validiert, das eingesetzt wurde, um die Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja zu bestimmen. Es ist klar, dass unter den gleichen Bedingungen die Extrakte von Avocado und von Soja die Synthese von PAI-1 erhöhen konnten, praktisch in dem gleichen Ausmaß, wie dies der TGF- $\beta$ 1 tat (siehe **Fig. 6**).

**[0075]** Um zu bestimmen, ob die stimulierende Wirkung der unverseifbaren Anteile von Soja und von Avocado auf die Synthese von PAI-1 auf der transkriptionellen Ebene auftritt, führte man einen Northern-Blot ausgehend von ausgehend von auf die gleiche Weise wie für die Markierung des PAI-1-Proteins behandelten Kulturen isolierter Gesamt-RNA aus. Die Hybridisierung mit der mit  $^{32}\text{P}$  markierten PAI-1-cDNA-Sonde hat gezeigt, dass die Menge von mRNA, welche PAI-1 kodiert, während den 24 h der Behandlung mit den unverseifbaren Anteilen von Avocado und von Soja erhöht ist, was die Korrelation enthüllt, die zwischen dem Expressionsniveau der mRNA und der Proteinmenge besteht (siehe **Fig. 6**). Es wird so nahegelegt, dass die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja in der Lage sind, die Synthese von PAI-1 auf transkriptioneller Ebene zu erhöhen.

Beispiel 2: Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und der Fraktionen H und I auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 und auf die Biosynthese von Collagen durch Dermis-Fibroblasten in Kultur

**[0076]** Die für diese Untersuchung eingesetzten Zellen sind humane Fibroblasten, die aus der Vorhaut von jungen Kindern stammen. Sie wurden durch die Explantat-Technik erhalten und in DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“), welchem 10% fötales Kälberserum (FCS) hinzugefügt worden war, kultiviert. Die Kulturen werden in einem Inkubationschrank mit 5% CO<sub>2</sub>, 37°C gehalten und das Medium wird alle drei Tage gewechselt.

1. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und der Fraktionen H und I auf die Expression von TGF- $\beta$ 1

#### 1.1 Versuchsprotokoll

**[0077]** Humane Dermis-Fibroblasten wurden in Platten mit sechs Vertiefungen von 9,6 cm<sup>2</sup> in DMEM, welchem 10% fötales Kälberserum (FCS) hinzugefügt worden war, (3 ml) ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Fibroblasten-Kulturen 24 h mit DMEM + 2%

FCS vorinkubiert. Die Inkubation im eigentlichen Sinne erfolgt in DMEM + 0% FCS, um zu vermeiden, dass der im Serum vorhandene TGF- $\beta$  mit der quantitativen Bestimmung interferiert. Diesem Medium wird 1,5 ml der verschiedenen getesteten Präparationen, nämlich eine Kontrolle (C), Piasclédine 300<sup>®</sup> (PIAS), ein unverseifbarer Anteil von Soja (IS), ein unverseifbarer Anteil von Avocado (IA) und dessen an furanischen Derivaten (H) und an polyhydroxylierten Fettalkoholen (I) angereicherte Fraktionen, hinzugesetzt. Die quantitative Bestimmung erfolgt unter Verwendung eines ELISA-Kits (R&D Systems).

#### 1.2. Ergebnisse

**[0078]** Die quantitative Bestimmung des TGF- $\beta$ 1 erfolgt an dem Kulturmedium, indem den Anweisungen des Lieferanten gefolgt wird. Es wird eine Eichprobenreihe erstellt, indem bekannte Mengen von TGF- $\beta$ 1 verwendet werden, was erlaubt, eine Gerade der optischen Dichte (OD) bezogen auf die Konzentration zu zeichnen und die Gleichung der Gerade wie auch den Korrelationskoeffizienten zu bestimmen. Die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 in unseren Proben wird berechnet, indem die mit den unterschiedlichen getesteten Präparationen erhaltenen ODs verwendet werden. Die Ergebnisse sind in pg/ml TGF- $\beta$ 1 ausgedrückt und repräsentieren den Mittelwert von 3 Proben.

**[0079]** Diese in der **Fig. 7** aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass PIAS, IS, IA, H und I die Produktion von TGF- $\beta$ 1 durch die Dermis-Fibroblasten in Kultur stimulieren.

2. Wirkung der unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja und der Fraktionen H und I auf die Biosynthese von Collagen durch Dermis-Fibroblasten in Kultur

#### 2.1. Versuchsprotokoll

**[0080]** Konfluente Kulturen von Dermis-Fibroblasten (6 Vertiefungen von 9,6 cm<sup>2</sup>) werden mit Ascorbinsäure vorinkubiert (3 ml). Nach 24 h wird das Medium durch 1,5 ml Medium (DMEM/10% FCS, welchem  $\beta$ /APN (Aminopropionitril), Ascorbinsäure und  $^3\text{H}$ -Prolin (2  $\mu\text{Ci/ml}$ ) hinzugefügt worden war) ersetzt.

**[0081]** Die Biosynthese von Collagenen wurde durch die Quantifizierungstechnik mittels gereinigter bakterieller Collagenase, beschrieben von Peterkofsky und Diegelmann (1971) gemessen.

**[0082]** 24 h nach der Behandlung der Kulturen mit den verschiedenen getesteten Präparationen, nämlich einer Kontrolle (C), Piasclédine 300<sup>®</sup> (PIAS), einem unverseifbaren Anteil von Soja (IS), einem unverseifbaren Anteil von Avocado (IA) und dessen an furanischen Derivaten (H) und an polyhydroxylierten

Fettalkoholen (I) angereicherten Fraktionen in einer Konzentration von 20 µg/ml (vorab solubilisiert in absolutem Ethanol) erfolgt die Quantifizierung an dem Kulturmedium, denn in Anwesenheit von Aminopropionitril liegt der Hauptteil des durch die Fibroblasten in Kultur synthetisierten Collagens (95%) in löslicher Form vor.

## 2.2. Ergebnisse

**[0083]** Die Ergebnisse sind in den [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) aufgeführt. Wie die [Fig. 8A](#) zeigt, erhöhen die Präparationen PIAS, IS, IA, H und I die Biosynthese des Collagens durch humane Dermis-Fibroblasten bei Konzentrationen von 20 µg/ml.

**[0084]** Die beobachteten Wirkungen sind spezifisch für die Collagene, denn es gibt, wie die [Fig. 8B](#) zeigt, keine Wirkung auf die Biosynthese der nicht-collagenartigen Proteine.

**[0085]** Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigt, dass die Substanzen PIAS, IS, IA, H und I die Biosynthese von Collagen durch die Dermis-Fibroblasten in Kultur stimulieren.

## 3. Schlussfolgerung

**[0086]** Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (PIAS, IS, IA, H und I) die Biosynthese von Collagen durch Dermis-Fibroblasten in Kultur stimulieren. Außerdem sind diese Wirkungen für Collagen spezifisch in dem Maße, als es keine Wirkung auf die Biosynthese der nicht-collagenartigen Proteine gibt.

**[0087]** Außerdem erhöhen die eingesetzten Präparationen die Produktion von TGF-β1 durch die Dermis-Fibroblasten.

**[0088]** Dieses letztgenannte Ergebnis zeigt, dass die Stimulation der Biosynthese des Collagens durch die verschiedenen Präparationen über einen Weg erfolgt, an welchem TGF-β1 beteiligt ist.

**[0089]** Die im Rahmen dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja (PIAS, IS, IA, H und I) in der Lage sind, die Biosynthese von Collagen, dem Hauptmolekül der extrazellulären Matrix (ECM), welche durch die Dermis-Fibroblasten produziert wird, zu erhöhen. Außerdem erhöhen diese Präparationen die Produktion von TGF-β1, einem starken Stimulator der Synthese der hauptsächlichsten Makromoleküle der ECM.

**[0090]** Die unverseifbaren Anteile von Avocado und von Soja weisen folglich durch ihre Wirkung auf die Biosynthese des Collagens und von TGF-β1 ein bedeutendes Potenzial für die Rekonstruktion der ECM,

insbesondere bei dem Phänomen der Hautalterung auf.

## Patentansprüche

1. Verwendung von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls mit einer stimulierenden Wirkung auf die Expression von TGF-β für die Herstellung eines Arzneimittels, welches für die Behandlung von Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lyme-Krankheit, Arthritis psoriatica und Osteoporose, bestimmt ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel dazu bestimmt ist, die Expression der Isoformen TGF-β1 und TGF-β2 durch das Zwischenglied der DNA-Sequenzen, die zwischen -1132 und -732 bp des Promotors der Isoform TGF-β1 gelegen sind, zu stimulieren.

3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel dazu bestimmt ist, gleichfalls die Expression des Inhibitors PAI-1 des Plasminogenaktivators zu stimulieren.

4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl, dem unverseifbaren Anteil von Lupinenöl und den Mischungen von diesen Letzteren ausgewählt wird.

5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Avocadoöl ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Öl von getrockneter Avocado ist.

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil von Avocado wenigstens dessen an furanischen Derivaten angereicherte Fraktion (Fraktion H), dessen an polyhydroxylierten Fettalkoholen angereicherte Fraktion (Fraktion I) oder eine Mischung von diesen Fraktionen umfasst.

8. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Sojaöl ist.

9. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Lupinenöl ist.

10. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls eine Mischung des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl und des unverseifbaren Anteils von Sojaöl ist, wobei das Gewichtsverhältnis des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl zu dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl zwischen ungefähr 0,1 und ungefähr 9 eingeschlossen liegt.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls an Phytosterolen, Tocopherolen, Tocotrienolen, terpenischen und triterpenischen Kohlenwasserstoffen und natürlichen Antioxidationsmitteln reiche Fraktionen enthält.

12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Canola-, Colza-, Sonnenblumen-, Palm-, Mais-, Sesam-, Weizenkeimöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl und den Mischungen von diesen Letzteren ausgewählt wird.

13. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls in dem Arzneimittel entsprechend einem Anteil zwischen ungefähr 1 und ungefähr 80 Gew.-% eingeschlossen bezogen auf das Gesamtgewicht des Arzneimittels vorhanden ist.

14. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel außerdem einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, welcher für eine Verabreichung auf oralem, topischem äußerlichem, enteralem oder parenteralem Wege angepasst ist, umfasst.

15. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel außerdem einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, der für eine Verabreichung auf oralem Wege angepasst ist, umfasst.

16. Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, wie in Anspruch 4 definiert, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen, und welche für die kosmetische Behandlung von Narben der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keine Pol-

lenextrakte umfasst.

17. Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen, und welche für die Behandlung der intrinsischen Alterung der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keinen Pollenextrakt umfasst.

18. Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem unverseifbaren Anteil von Avocadoöl, dem unverseifbaren Anteil von Sojaöl und den Mischungen von diesen Letzteren, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst, zum Auftragen auf die Haut, die benachbarten Schleimhäute und/oder jegliche sichtbare epidermale (auf der Hautoberfläche befindliche) Strukturen oder Formationen, und welche für die kosmetische Behandlung der Haut, der benachbarten Schleimhäute und/oder jeglicher sichtbarer epidermalen (auf der Hautoberfläche befindlicher) Strukturen oder Formationen, die einer aktinischen Strahlung ausgesetzt worden sind, bestimmt ist, mit der Maßgabe, dass die kosmetische Zusammensetzung keinen Pollenextrakt umfasst.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Avocadoöl ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Öl von getrockneter Avocado ist.

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil von Avocado wenigstens dessen an furanischen Derivaten angereicherte Fraktion (Fraktion H), dessen an polyhydroxylierten Fettalkoholen angereicherte Fraktion (Fraktion I) oder eine Mischung von diesen Fraktionen umfasst.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls der unverseifbare Anteil von Sojaöl ist.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls eine Mischung des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl und des unverseifbaren Anteils von Sojaöl ist, wobei das Gewichtsverhältnis des unverseifbaren Anteils von Avocadoöl und des unverseifbaren Anteils von Sojaöl zwischen 0,1 und ungefähr 9 eingeschlossen liegt.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls an Phytosterolen, Tocopherolen, Tocotrienolen, terpenischen und triterpenischen Kohlenwasserstoffen und natürlichen Antioxidationsmitteln reiche Fraktionen enthält.

25. Verwendung, außer einem therapeutischen Behandlungsverfahren, von wenigstens einem unverseifbaren Anteil eines pflanzlichen Öls, wie in einem der Ansprüche 4 bis 11 definiert, für die Herstellung einer kosmetischen Zusammensetzung, die für die kosmetische, enthaarende Behandlung der Haut bestimmt ist, zum Auftragen auf die Haut, und welche wenigstens einen aus kosmetischer Sicht annehmbaren Träger umfasst.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der unverseifbare Anteil eines pflanzlichen Öls in der Zusammensetzung entsprechend einem Anteil zwischen ungefähr 0,1 und ungefähr 10 Gew.-% eingeschlossen bezogen auf das Gesamtgewicht der kosmetischen Zusammensetzung vorhanden ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

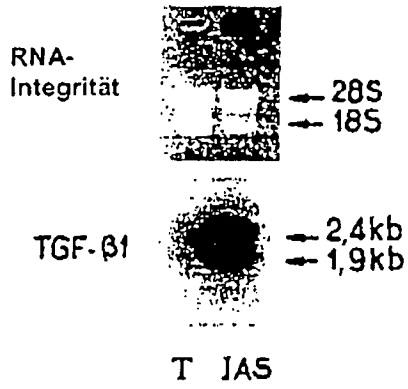


FIG 1.A

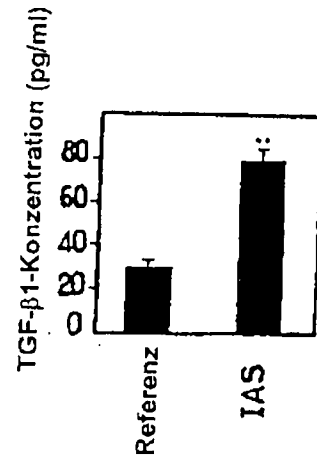


FIG 1.B

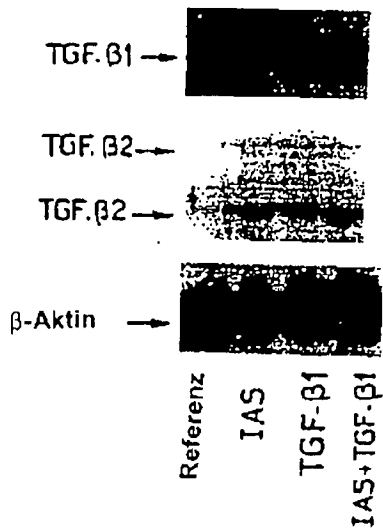


FIG 2.A

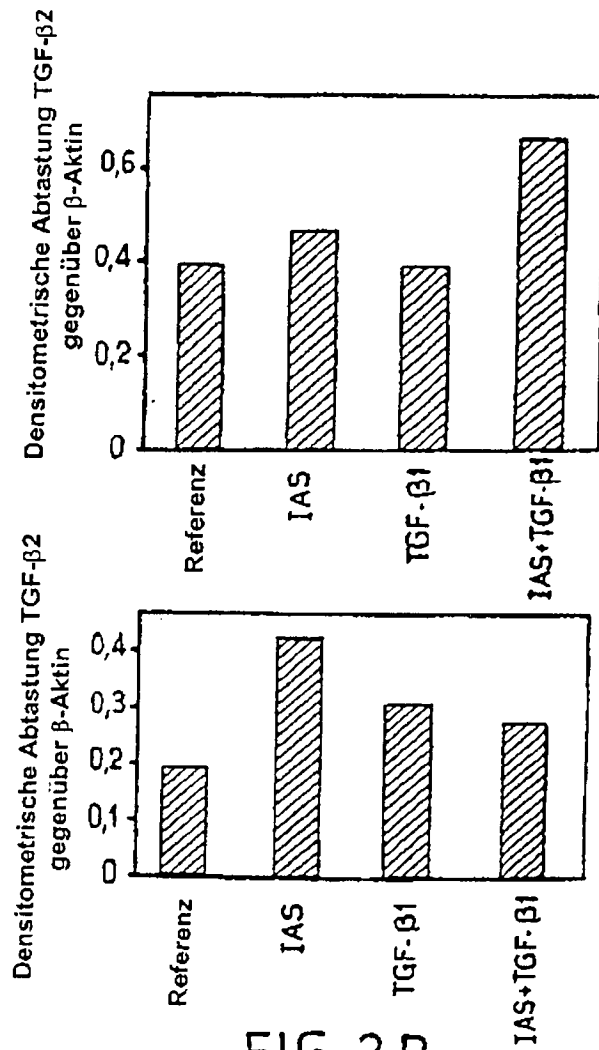


FIG 2.B



FIG.3A

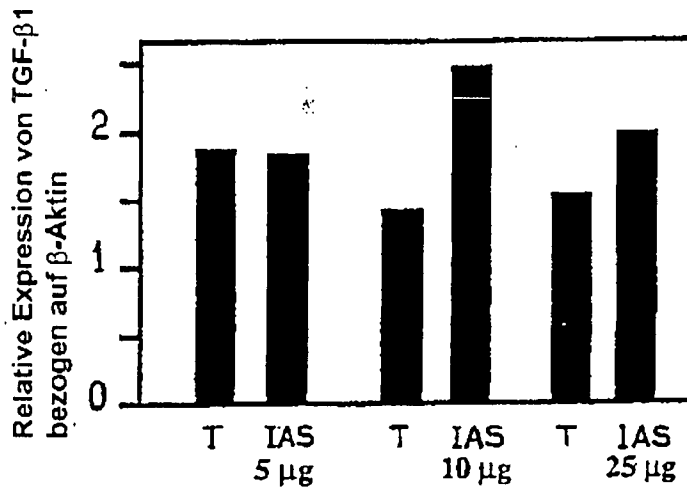
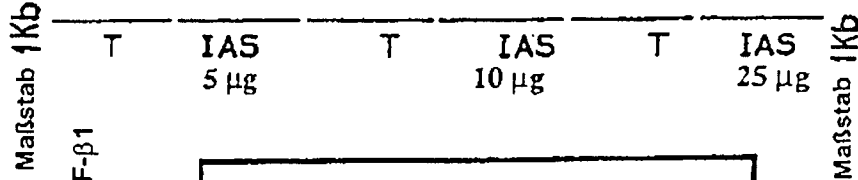


FIG.3B



FIG.3C

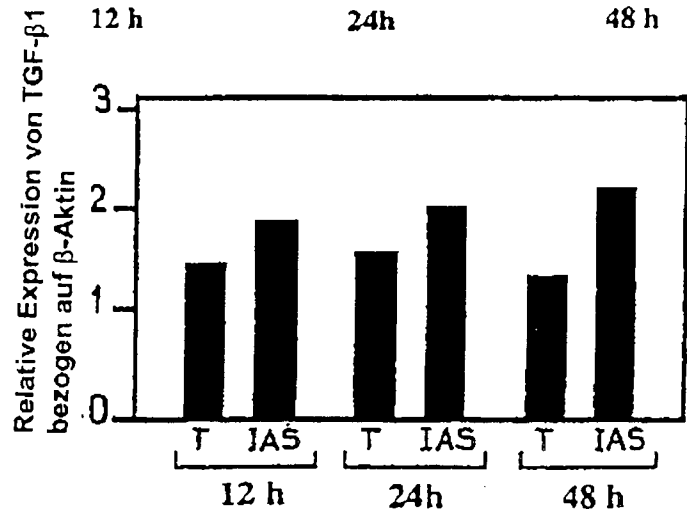
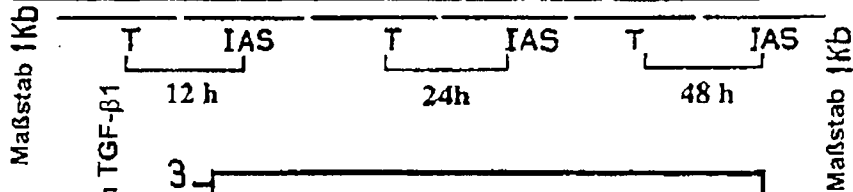


FIG.3D

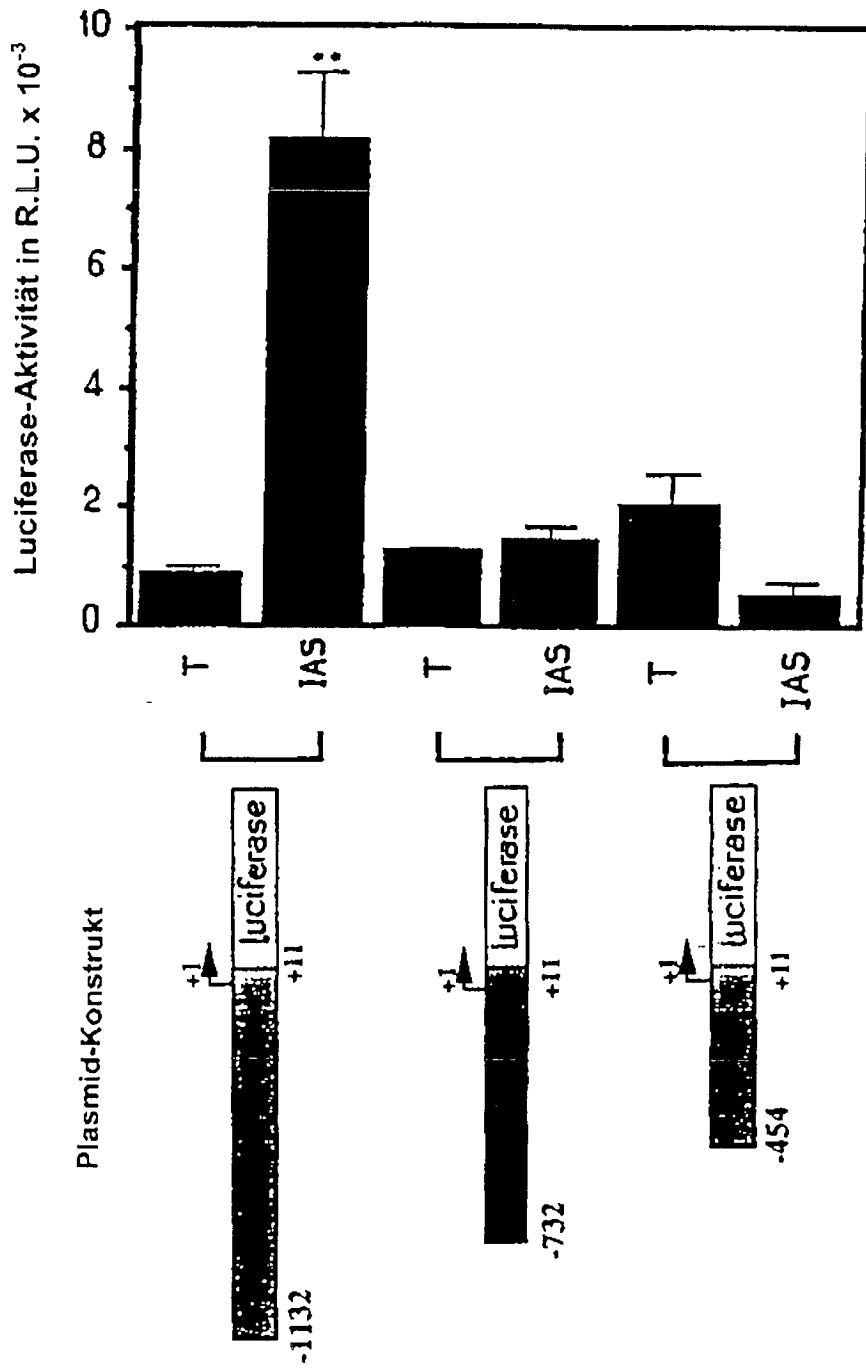


FIG. 4

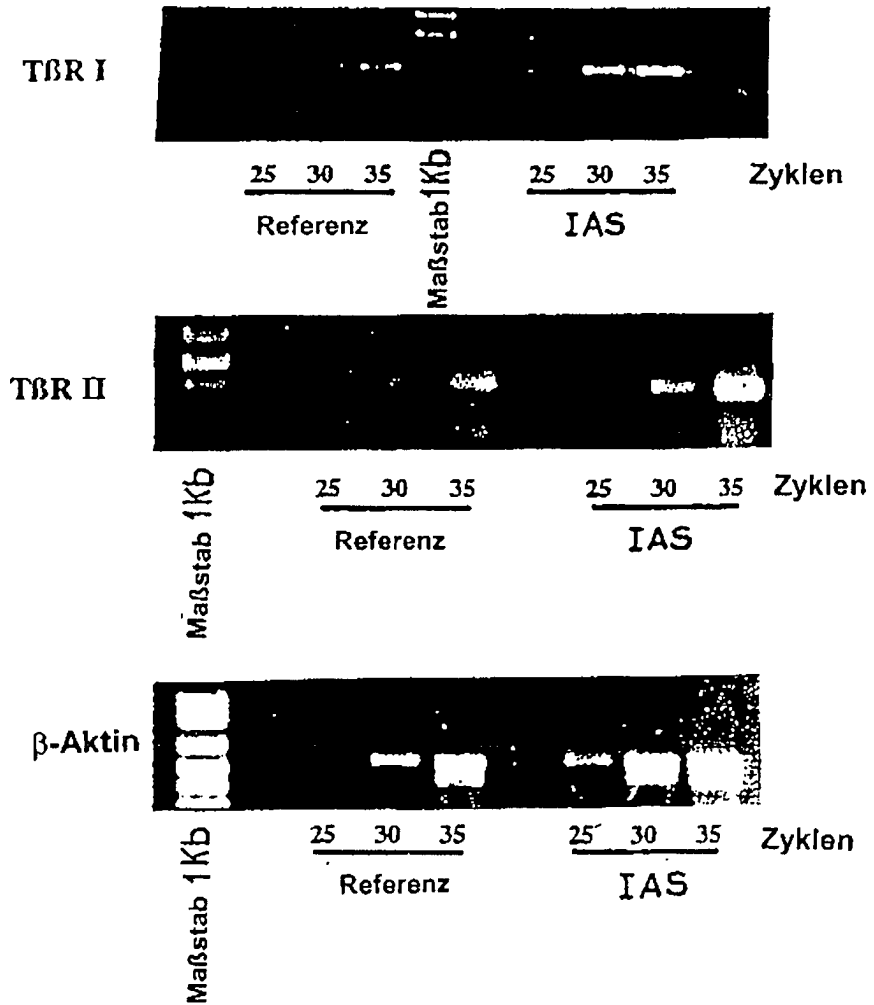


FIG.5

MW (kDa)

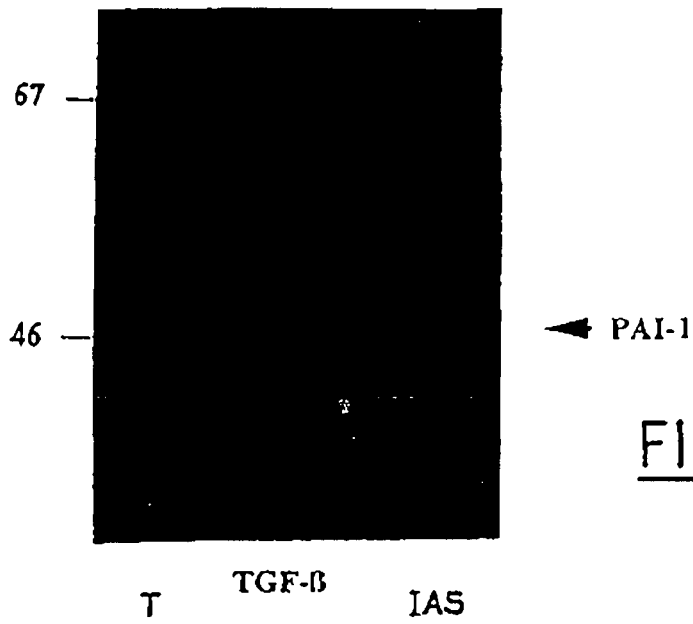


FIG. 6A

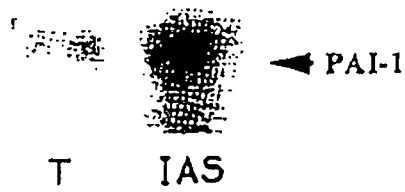
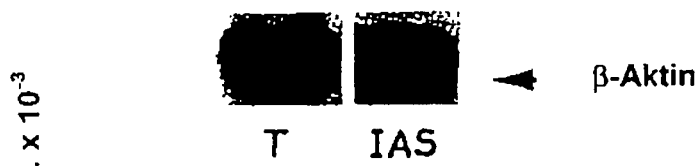


FIG. 6B



Luciferase-Aktivität in R.L.U. x 10<sup>-3</sup>

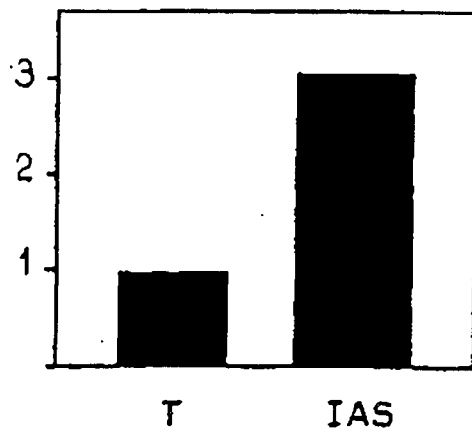
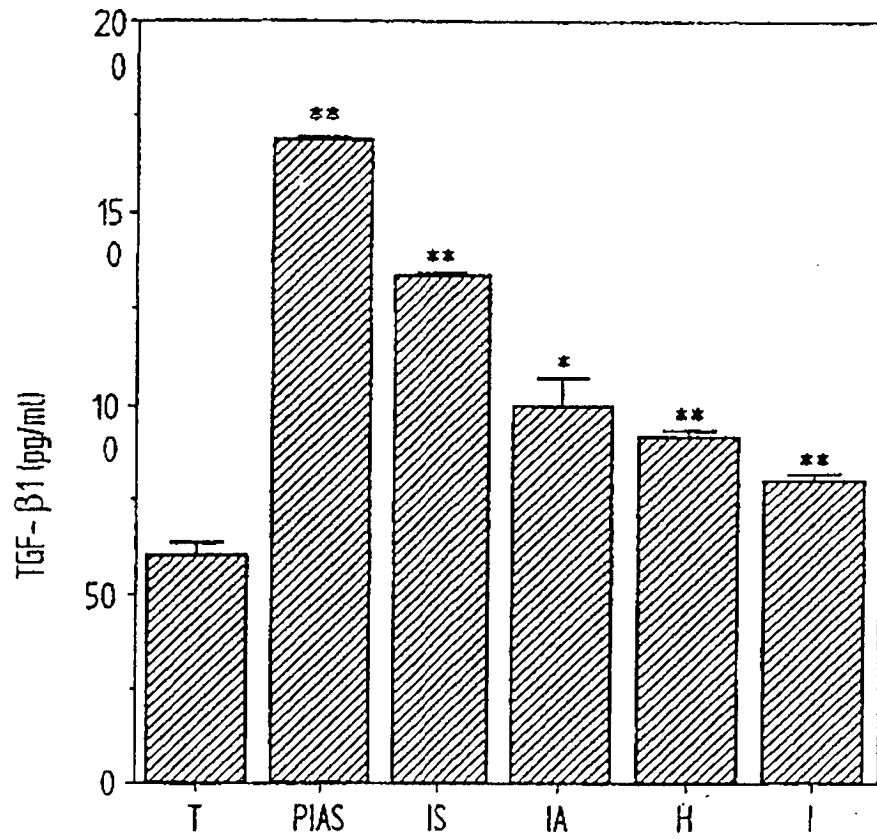


FIG. 6C



\* : p<0,05; \*\* : p<0,01

FIG.7

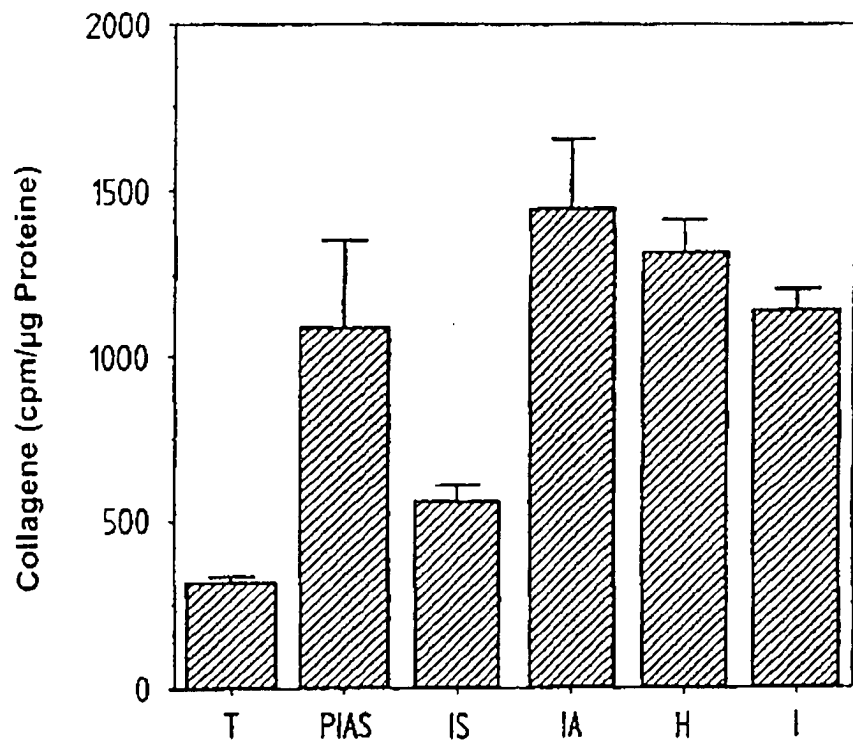


FIG.8A

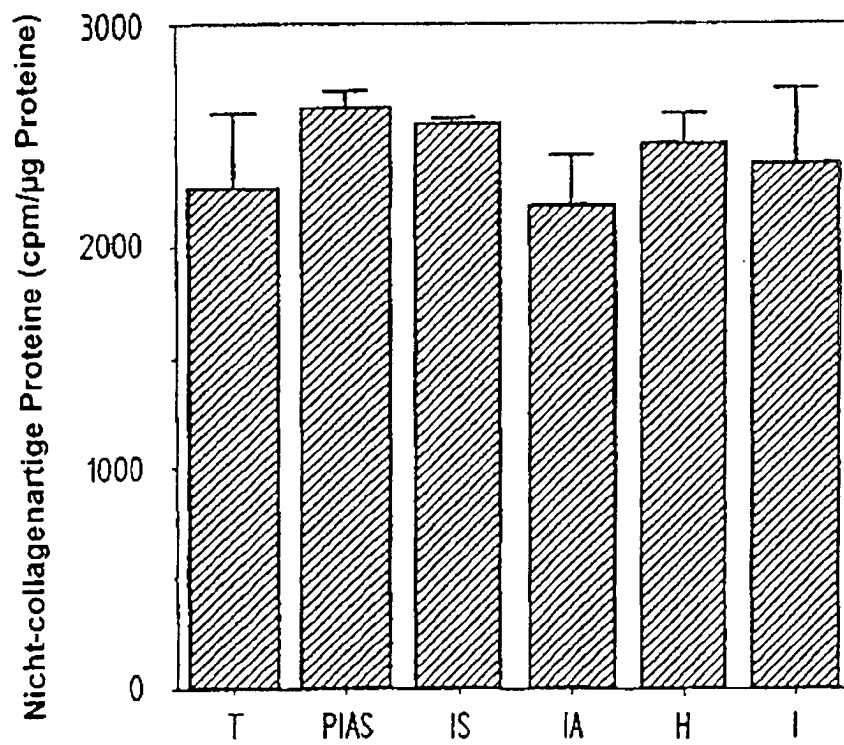


FIG.8B