SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 079

(21) Číslo prihlášky: **250-95**

(22) Dátum podania prihlášky: **20. 8. 1993**

(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **4. 2. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2003**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **92/10267**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **25. 8. 1992**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **14. 9. 1995**
Vestník ÚPV SR č.: **09/1995**

(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **23. 12. 2002**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/FR93/00819**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO94/04132**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:

A61K 7/48

(73) Majiteľ: **LVMH RECHERCHE, Nanterre, FR;**

(72) Pôvodca: **Meybeck Alain, Courbevoie, FR;**
Bonte Frédéric, Ing., Courbevoie, FR;
Redziniak Gérard, Saint Cyr en Val, FR;

(74) Zástupca: **Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Použitie ekdysteroidov alebo ekdysteroidových derivátov na prípravu kozmetickej alebo dermatologickej kompozície**

(57) Anotácia:
Použitie ekdysteroidov, ekdysteroidových derivátov, alebo rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky na prípravu kozmetickej alebo dermatologickej kompozície, ktorá je určená najmä na dosiahnutie hladšieho a jemnejšieho stavu a vzhľadu kože, na posilnenie vodnej bariérovej funkcie pokožky a na posilnenie kohézie buniek v pokožke. Túto kompozíciu je možné použiť na zlepšenie vzhľadu vlasov. Bunkové médium sa používa výhodne na veľkoobjemovú kultiváciu keratinocytov.

SK 283079 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka v podstate použitia ekdysteroidov na prípravu kozmetických alebo dermatologických kompozícií, ktoré sú určené najmä na posilnenie vodnej bariérovej funkcie kože. Tiež sa uvedený vynález týka použitia tkanivového kultivačného média na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek a promótovanie, urýchlenie alebo zlepšenie diferenciácie kožných buniek.

Doterajší stav techniky

Ekdysteroidy predstavujú skupinu 2,3,14-trihydroxy-Δ--7-6-ketosteroidov. Z tejto skupiny je možné uviesť α--ekdyzón alebo (2β, 3β, 14α,22 [R],25 - pentahydroxy-7--cholesten-6-ón; 2-deoxyekdyzón alebo 3β, 14β, 22 [R],25--tetrahydroxy-5β-7-cholesten-6-ón, ekdysterón, alebo β--ekdyzón, alebo 2β,3β,14α,20β,22,25-hexol-7-cholesten-6--ón, β-ekdyzón-22-acetát, alebo 20-hydroxy-ekdyzón-22--acetát, alebo 2β,3β,14,20,22[R],25-hexahydroxy-7-cholesten-6-ón-22-acetát, 5-hydroxyekdysterón, alebo 2β,3β,5α, 14,20,22[R],25-heptahydroxy-5β-7-cholesten-6-ón a 2-deoxy-β-ekdyzón, alebo 3β,14,20, 22[R],25-pentahydroxy--5β-7-cholesten-6-ón. Tieto ekdysteroidy, a najmä ekdysterón (v niektorých prípadoch označovaný ako β-ekdyzón alebo alternatívne krustekdyzón) sú z doterajšieho stavu techniky dostatočne dobre známe, pričom sa tiež o nich zmieňuje v publikácii Merck Index, 10th Edition, 1983, str. 505, No. 3470.

O týchto ekdysteroidoch, a najmä to platí o ekdysteróne, je z týchto publikácií podľa doterajšicho stavu techniky známe, že hrajú dôležitú úlohu tak v živočíšnej ríši, platí to hlavne o hmyze, ako i v rastlinnej ríši. V prípade hmyzu majú tieto hormóny dôležitý význam pri raste a rozmnožovaní. Napríklad ekdysterón sa podieľa hlavne na rôznych metamorfózach, ku ktorým dochádza až do štádia dospelosti hmyzu (pozri napriklad CNRS publikácia: Biologie 1990 „Enjeux et Problématiques", autor A. Berkaloff a kol.

Čo sa týka rastlín, potom je potrebné uviesť, že aktivita týchto látok nebola až doteraz celkom objasnená. Predpokladá sa, že tieto látky ovplyvňujú tvorbu kvetov (pozri publikácia CIENCIA e Cultura (1980), volume 32, No. 10, str. 1384 - 1390).

Z doterajšieho stavu techniky bolo tiež zistené, že ekdysteroidy a najmä ekdysterón a jeho acylované deriváty, obzvlášť acetylované formy týchto derivátov, regulujú keratínocytovú diferenciáciu.

Táto diferenciácia sa sama osebe prejavuje najmä na epidermálnej úrovni a síce vo väčšej celulárnej súdržnosti (kohézii), v regulovaní keratínocytovej transformácie na korneocyty, k čomu dochádza v dôsledku straty jadra a zvýšenia celulárnej kornifikácie a vo zvýšení počtu vrstiev korneocytov vytvárajúcich zrohovatenú vrstvu, pričom tieto javy súhrnne prispievajú k hladšiemu, mäkšiemu a jemnejšiemu vzhľadu kože, k posilneniu ochrannej funkcie kože čo sa týka vplyvov okolitého prostredia a k posilneniu vodnej bariéry, čo zabraňuje preventívne nadmernej strate vody kožou a na úrovni vlasových folikulov, kde dochádza k regulovaniu alebo dokonca k zvýšeniu syntézy keratínocytov keratínu, predstavujúceho hlavnú zložku nosnej strednej časti každého jednotlivého vlasu.

V tomto smere je pre odborníkov pracujúcich v danom odbore známy článok Eckerta a Rorkeho v publikácii Journal Environment Health Perspective, Volume 30 (1989), str. 109 - 116.

Podstata vynálezu

Základným cieľom uvedeného vynálezu je vzhľadom na uvedené vyriešiť technický problém spočívajúci v nájdení možnosti diferenciácie keratínocytov takým spôsobom, aby bolo dosiahnuté ich regulovanie alebo promotovanie, pričom výsledok by bol určený najmä na liečenie kožných porúch sprevádzaných poruchami keratínocytovej diferenciácie, ako je napríklad psoriáza, ďalej na obnovenie, zachovanie a/alebo posilnenie ochrannej funkcie pokožky, najmä prostredníctvom zlepšenia alebo posilnenia zrohovatenej vrstvy a vodnej bariérovej vrstvy, čo vedie k hydratačnému účinku, obzvlášť tým, že sa zabráni nadmernej strate vody pokožkou, čo sa zrejme výhodne uplatní pri liečení psoriatickej pokožky a na zlepšenie kvality vlasov, čo povedie k lepšiemu a atraktívnejšiemu vzhľadu vlasov.

Hlavným cieľom uvedeného vynálezu je preto vyriešiť technický problém spočívajúci v nájdení možnosti diferenciácie kožných buniek, najmä keratínocytov, takým spôsobom, aby bolo možné dosiahnuť ich promotovanie, urýchlenie a zlepšenie počas ich kultivácie v kultivačnom médiu.

Podľa uvedeného vynálezu bol prvýkrát tento problém vyriešený uspokojivým spôsobom a síce tak, že je možné toto riešenie aplikovať v priemyselnom meradle na prípravu kozmetických lebo dermatologických prostriedkov alebo na prípravu kultivačného média, najmä média použiteľného pre veľkoobjemovú kultúru kožných buniek a tiež tak na ich kultiváciu.

Podľa prvého aspektu sa uvedený vynález týka použitia prinajmenšom jedného ekdysteroidu alebo prinajmenšom jedného ekdysteroidového derivátu alebo prinajmenšom jedného rastlinného alebo živočíšneho extraktu, ktorý obsahuje tento ekdysteroid alebo uvedený ekdysteroidový derivát, na prípravu kozmetickej alebo dermatologickej kompozície určenej na liečenie kožných porúch súvisiacich s poruchami keratínocytovej diferenciácie, ako je napríklad psoriáza, na obnovenie zachovania a/alebo posilnenia ochrannej funkcie kože, hlavne prostredníctvom zlepšenia alebo posilnenia zrohovatenej vrstvy a vodnej bariérovej funkcie a tiež tak kohézie buniek pokožky alebo alternatívne na zlepšenie kvality vlasov čo sa týka ich konštitúcie; alebo na prípravu bunkového alebo tkanivového kultivačného média, najmä na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek, najmä keratínocytov.

Podľa ďalšieho uskutočnenia podľa vynálezu sa používa kombinácia niekoľkých ekdysteroidov alebo ekdysteroidových derivátov, alebo v alternatívnom vyhotovení kombinácia prinajmenšom jedného ekdysteroidu a rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky.

V tomto prípade je zrejme výhodné uskutočnenie, podľa ktorého je uvedeným ekdysteroidom ekdysterón alebo ekdysterónový derivát, hlavne acylovaný, hydroxylovaný alebo deoxylovaný derivát týchto látok.

Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia tohto riešenia je uvedeným acylovaným derivátom monoacetát alebo multiacetát ekdysterónu.

Podľa najvýhodnejšieho uskutočnenia riešenia podľa vynálezu je uvedený ekdysterónový derivát vybraný zo skupiny zahrnujúcej β-ekdyzón-2-acetát, β-ekdyzón-3--acetát, β-ekdyzón-2,3-diacetát, β-ekdyzón-2,3,22-triacetát, β-ekdyzón-2,3,22,25-tetraacetát, 5-hydroxyekdysterón a 2--deoxyekdysterón.

Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia riešenia podľa vynálezu je uvedeným rastlinným alebo živočíšnym extraktom obsahujúcim ekdysteroid, výhodne ekdysterón, extrakt z *Achyranthes bidentata, Paris axialis, Paris fargesii, Paris dunniana, Paris vietnamensis, Paris polyphylla, Po-*

lypodium vulgare, Cyanotis arachnoidea, Ajuga decumbens, Pfaffia paniculata, Pfaffia iresinoides, Vitex glabrata, Achyranthes aspera, Sesuvium portulacastrum, Serratula sogdiana, Rhaponticum integrifolium, Rhaponticum (alebo *Leuzea*) *carthamoides, Silene tatarica, Silene otites, Silene scabrifolia, Silene nutans, Silene brahuica, Silene traemixta, Silene dioca, Lychnis flos-cuculi, Ajuga iva, Serratula tinctoria, Cyathula officinalis, Cyathula capitata* alebo *Bombyx mori.*

Podľa obzvlášť výhodného uskutočnenia podľa vynálezu sú v tomto prípade výhodné rastlinné extrakty látky získané z *Polypodium vulgare, Ajuga decumbens, Cyanotis arachnoidea, Achyranthes bidentata a Rhaponticum* (alebo *Leuzea*) *carthamoides.*

Podľa ďalšieho výhodného variantu riešenia podľa vynálezu sa používa kombinácia ekdysterónu a prinajmenšom jeden monoacetát alebo multiacetát, hlavne ide o 2--acetát alebo 3-acetát, alebo rastlinný extrakt obsahujúci túto kombináciu. Podľa uvedeného vynálezu bolo zistené ako účinné riešenie, že acetátové deriváty ekdysteroidov v kombinácii s ekdysterónom posilňujú uvedené aktivity. Táto aktivita je ešte ďalej posilnená kombináciou s ajugasterónom C, ktorý je prípadne vo svojej 2-monoacetátovej alebo 3-monoacetátovej forme.

Podľa ďalšieho alternatívneho uskutočnenia uvedeného vynálezu môže byť tento ekdysteroid alebo jeho derivát alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky, prinajmenšom čiastočne inkorporovaný v lipozómoch.

V tejto súvislosti je potrebné poznamenať, že termínom „prinajmenšom čiastočne inkorporovaný v lipozómoch" sa mieni to, že tento ekdysteroid alebo jeho derivát, alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky, sa kombinuje s lipozómami bez ohľadu na formu tejto kombinácie. Inak uvedené, v kontexte uvedeného vynálezu sa týmto kombinovaním mieni to, že uvedený ekdysteroid alebo jeho deriváty alebo rastlinné alebo živočíšne extrakty obsahujúce tieto látky môžu byť celkom zapuzdrené alebo čiastočne zapuzdrené v týchto lipozómoch alebo sa môžu jednoducho iba vyskytovať vo vonkajšom prostredí v prítomnosti lipozómov.

Prípravu lipozómov, ktoré prinajmenšom čiastočne obsahujú prinajmenšom jeden ekdysteroid podľa uvedeného vynálezu, je možné vykonať jednou z radu známych metód a procesov podľa doterajšieho stavu techniky, ktoré sa zaoberajú inkorporovaním účinných látok, najmä steroidov, v lipozómoch.

Vo výhodnom uskutočnení sa pri tejto príprave podľa uvedeného vynálezu používa postup atomizácie zložiek lipidovej fázy, čo umožňuje získanie lipidového prášku, ktorý je ľahko dispergovateľný vo vodnom roztoku za vzniku lipozómov, ako je napríklad postup opisovaný v patente Spojených štátov amerických č. US-A-4 508 703. Takto získaná lipozómová suspenzia môže byť homogenizovaná, napríklad ultrazvukovou metódou, alebo v prípade veľkoobjemovej produkcie pomocou postupu tlakovej homogenizácie, ako je to uvedené v patente Spojených štátov amerických č. US-A-4 621 023.

Vo výhodnom uskutočnení podľa uvedeného vynálezu sa ekdysteroid alebo jeho deriváty alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky inkorporuje do lipidovej fázy lipozómov. Týmto spôsobom sa dosiahne to, že sa ekdysteroid alebo jeho derivát alebo extrakt obsahujúci tieto látky rozpustí so zložkami lipidovej fázy pred atomizáciou v organickom roztoku obsahujúcom prinajmenšom jeden amfifilný lipid, ako je napríklad lecitín zo sójových bôbov, a prípadne lipofilná hydrofóbna zlúčenina, ako je napríklad cholesterol alebo β-sitosterol. Vo výhodnom vyhotovení sa ako rozpúšťadlo použije rozpúšťadlo vybrané zo súboru zahrnujúceho dichlórmetán, chloroform a metanol a zmesi týchto rozpúšťadiel.

Organický roztok môže vo výhodnom uskutočnení podľa uvedeného vynálezu obsahovať antioxidačnú látku, ako je napríklad α-tokoferol.

Získaný lipidový prášok sa disperguje vo vhodnom vodnom médiu, ako je napríklad roztok PBS pufra, glukózový roztok alebo roztok chloridu sodného. Týmto spôsobom sa získa lipozómová suspenzia.

Vo výhodnom uskutočnení podľa uvedeného vynálezu, najmä v prípade lipozómovej zmesi, sa po získaní tejto zmesi, prípadne po jej homogenizovaní, táto lipozómová kompozícia podrobí zgélovateniu, pričom sa mieša s gélom ako je napríklad vinylpolymérový gél, najmä sa používa látka predávaná pod obchodným označením CarbopolR 940. Táto gélovacia metóda je tiež opisovaná v patente Spojených štátov amerických č. US-A-4 508 703, najviac je tento postup opisovaný v príkladoch.

Vo výhodnom uskutočnení podľa uvedeného vynálezu sa koncentrácia ekdysteroidu pohybuje v rozmedzí od 0,001 % do 30 % hmotn., vo výhodnom vyhotovení v rozmedzí od 0,01 % do 10 % hmotn., vzťahujúc na lipidovú fázu uvedených lipozómov.

Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia podľa uvedeného vynálezu je uvedený ekdysteroid alebo jeho derivát alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky prinajmenšom čiastočne vpravený do cyklodextrínu. Na vpravenie týchto látok do cyklodextrínu sa používajú postupy bežne známe a používané podľa doterajšieho stavu techniky. Napríklad je možné uviesť, že sa cyklodextrín rozpustí vo vodnom pufri, ako napríklad pufor PBS typu. Potom sa pridá ekdysteroid alebo jeho derivát alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky v ekvimolárnom množstve a pri miešaní, pričom postup prebieha pri teplote miestnosti. Miešanie tejto zmesi sa vykonáva tak dlho, pokiaľ sa nezíska čírý roztok. Tento roztok sa potom použije na prípravu kozmetického alebo dermatologického prostriedku podľa uvedeného vynálezu. Tento postup je v podstate rovnaký ako v prípade kombinovania látok, čo je uvedené skôr. Výsledkom tohto vpravenia do cyklodextrínu je celkom neočakávané podstatné zvýšenie aktivity tohto ekdysteroidu alebo jeho derivátu alebo rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky. Podiel tohto cyklodextrínu a ekdysteroidu alebo jeho derivátu alebo rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky v rozpúšťacom roztoku sa môže pohybovať v širokom rozsahu. Vo výhodnom vyhotovení podľa uvedeného vynálezu sa táto koncentrácia cyklodextrínu pohybuje v rozmedzí od 0,1 % do 5 % hmotn., a v prípade ekdysteroidu sa táto koncentrácia pohybuje v rozmedzí od 0,1 % do 2 % hmotn.

Tieto ekdysteroidy a ich deriváty, vo výhodnom uskutočnení ekdysterón alebo jeho deriváty je možné získať v izolovanej forme alebo vo forme extraktu zo všetkých dostupných prírodných zdrojov alebo v alternatívnom vyhotovení chemickým syntetickým postupom. Hlavným prírodným zdrojom týchto ekdysteroidov je hmyz a okrem toho najmä veľký počet rastlín, ako sú napríklad rastliny uvedené. Tiež bolo na získanie týchto látok vyvinutých niekoľko syntetických postupov, známych z doterajšieho stavu techniky.

Extrakcia z hmyzu

Podiel ekdysteroidu, najmä α-ekdyzónu alebo β--ekdyzónu, ktorý je obsiahnutý v hmyze, je extrémne malý. Napríklad v mole *Bombyx mori* je obsiahnuté 5 x 10-6 %

hmotnosti hmyzu (pozri A. Butenhadt a kol., Z. Naturforsch. B, 9, 389 (1954)).

Vzhľadom na uvedené sa táto extrakcia ekdysteroidu z hmyzu nemôže stať všeobecne používaným priemyselným procesom.

Ale vo švajčiarskom patente Hunger Ricci CH-A-478 565 sa opisuje extrakcia ekdysterónu z nymf alebo kukiel, ktorá slúži na získanie látok určených na prípravu kozmetických prostriedkov.

Extrakcia z rastlín

Koncentrácia ekdysteroidov a najmä ekdysterónov, sa v rastlinách z jedného druhu k inému druhu veľmi odlišuje. Napríklad je možné uviesť, že koncentrácia ekdysterónu v semenách *Achyranthes aspera* je asi 0,025 % a v rastline *Sesuvium portulacastram* asi 0,35 %. Percentuálny podiel je vyjadrený ako hmotnosť vztiahnutá na sušinu.

Medzi rastliny, ktoré je možné použiť na extrakciu ekdysteroidov, najmä na extrakciu ekdysterónu, je možné uviesť: *Serratula sogdiana* a *Rhaponticum integrifolium*, ktoré majú tú výhodu, že sú schopné kultivácie, pozri Horticultural Abs. OC051-01546, ako referencia v Rastitel'nye Resursy (1980), volume 16, No. 2, str. 193 - 198 (Rusko). Tiež je možné použiť extrakciu ďalších nasledujúcich látok:

- *Serratula tinctoria* (HUT-029 390),
- *Serratula inermis* (SU-1 146 050),
- *Achyranthes fauriei* (FR-1 525 385),
- *Cyathula* (FR-1 525 385),
- *Polypodium vulgare* (patent USA č. 3 527 777),
- *Cyanotis arachnoidea* (C.A. 89-176 352, referencia v publikácii Nien Schui Lin a kol. Acta Chimica Sinica, 1978, volume 36, No. 2, str. 137 - 141),
- *Ajuga decumbens* (JP-46-014 665),
- *Pfaffia iresinoides* (Derwent 88-045806 alebo JP-63-002 928),
- *Pfaffia paniculata* (Derwent 84-052423 alebo JP-59-010 600),
- *Kaladanové semeno* (DE-2 201 991),
- *Ipomea petaloidea* (DE-2 834 703),
- *Silenes* (HUT 029 390 a SU 924 051).

Tieto zdroje ekdysteroidov sú uvedené iba ako príklady, pričom nijako neobmedzujú rozsah možných použitých látok a tiež tým nie je prehľad týchto zdrojov nijako vyčerpávajúci.

Okrem ekdysterónu môžu niektoré extrakty tiež obsahovať acetylované deriváty (pozri C. A. 89-176352).

Tiež je možné ekdysteroidy podľa uvedeného vynálezu získať chemickou syntézou (pozri napríklad patenty Spojených štátov amerických č. US-A-3 354 152, US-3 354 154, US-3 378 549, US-3 455 905, US-3 440 241, US-3 378 549 a patenty Francúzska FR-1 494 371 a FR-1 524 924 a FR-A-1 498 237.

Ako príklad všeobecnej metódy extrahovania ekdysteroidu, vo výhodnom vyhotovení podľa vynálezu ekdysterónu, z rastlín je možné uviesť postup opisovaný v publikácii Chem. Pharm. Bull. (1969), 17 (2), str. 340 - 342, autor S. Imai a kol.

Podľa tohto postupu sa čerstvá rastlina maceruje päťnásobným množstvom metanolu a takto získaná zmes sa homogenizuje a filtruje. Tento postup sa opakuje ešte raz. Získané extrakty sa skoncentrujú a pridá sa voda, čím sa získa roztok 30 % metanolu vo vode.

Tento roztok sa potom extrahuje hexánom. Frakcia s 30 % metanolu sa potom znova skoncentruje a extrahuje etylesterom kyseliny octovej. Vodná frakcia sa extrahuje n-butanolom. Butanolový extrakt sa potom skoncentruje odparením a potom sa spracuje chromatografickou metódou na silikagéli s použitím zmesi chloroformu a metanolu. Po rekryštalizácii vykonanej v zmesi etanolu a etylesteru kyseliny octovej sa ekdysterón získa vo forme bezfarebných ihličiek.

Tiež je potrebné uviesť, že je možné monoacetylované deriváty ekdysteroidov získať chemickými metódami dobre známymi z doterajšieho stavu techniky. Napríklad je známa metóda, pri ktorej sa ekdysteroid uvádza do kontaktu so zmesou kyseliny octovej a pyridínu v hmotnostnom pomere 1 : 5 pri teplote miestnosti. Táto reakcia sa zvyčajne nechá prebiehať počas 30 minút až jednej hodiny. Potom sa reakčný priebeh zastaví prídavkom metanolu. Týmto spôsobom sa získa zmes rôznych monoacetátov ekdysteroidov, pričom jednotlivé produkty je potom možné oddeliť bežnými chromatografickými postupmi. Týmto spôsobom je možné napríklad pripraviť monoacetáty ekdysterónu v polohách 2, 3, 22 a 25.

Okrem toho je rad ekdysteroidov bežne dostupný na trhu. V tomto smere je možné napríklad uviesť ekdysterón, 5-hydroxyekdysterón, 2-deoxyekdysterón, ekdysterón-22--acetát α-ekdyzón a 2-deoxy-α-ekdyzón, ktoré je možné získať od firmy SIGMA pod obchodným označením SIGMA 5142, SIGMA P 9531, SIGMA D 7775, SIGMA H 5267, SIGMA E 9004 a SIGMA D 7900.

Kompozície podľa uvedeného vynálezu, ktoré sú opísané v uvedenom texte a ktoré obsahujú ekdysteroid, vo výhodnom uskutočnení ekdysterón alebo deriváty týchto látok, prípadne vo forme prinajmenšom čiastočne inkorporované v hydratovaných lamelárnych lipidových fázach alebo v lipozómoch, môžu mať rôzne formy, bežne používané v kozmetike alebo dermatológii. Napríklad je možné uviesť, že tieto prostriedky môžu byť vo forme gélov, krémov, mlieka alebo tekutých liekových foriem.

Účinok týchto kompozícií, ktoré sa aplikujú na ošetrované miesta pokožky, spočíva v tom, že sa dosiahne regulácia keratínocytovej diferenciácie, čím sa promotuje tvorba alebo obnovenie dobrej kvality pokožky, najmä čo sa týka zrohovatenej vrstvy, čo sa dosiahne hlavne v dôsledku zlepšenia zloženia a jej štrukturálneho charakteru. Týmto spôsobom sa umožní, aby na jednej strane pokožka mala optimálne vlastnosti čo sa týka ochrany pred vplyvom okolného prostredia, čo nastáva najmä v dôsledku posilnenia celulárnej kohézie, a na druhej strane, aby sa dosiahlo ošetrenie porúch pokožky súvisiace s poruchami keratínocytovej diferenciácie.

Vzhľadom na uvedené, umožňujú prostriedky podľa uvedeného vynálezu najmä obnoviť, zachovať a posilniť ochrannú funkciu kože ako bariéry, najmä ako vodnej bariéry, a tým zrejme dosiahnuť hydratačný účinok, lebo sa zabráni nadmerným stratám vody pokožkou. Prostriedky podľa uvedeného vynálezu je teda možné výhodne použiť na liečenie suchej kože, nehľadiac na stupeň suchosti tejto kože vrátane ichtyotickej pokožky a na liečenie psoriatickej pokožky.

Podľa druhého aspektu sa vynález týka kozmetického a dermatologického prostriedku určeného na liečenie kožných porúch sprevádzaných poruchami keratínocytovej diferenciácie, ako je napríklad psoriáza, na obnovenie, zachovanie a/alebo posilnenie ochrannej funkcie pokožky, najmä posilnenie alebo zlepšenie zrohovatenej vrstvy a vodnej bariérovej funkcie, a tiež tak kohézia buniek pokožky, alebo alternatívne na zlepšenie kvality vlasov, čo sa týka ich konštitúcie, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje ako účinnú zložku ekdysteroid alebo ekdysteroidový derivát alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci

uvedený ekdysteroid alebo uvedený ekdysteroidový derivát, definovaný skôr.

Podľa ďalšieho uskutočnenia sa získa kozmetická alebo dermatologická kompozícia, ktorá prejavuje hydratačnú schopnosť, najmä tým, že zabraňuje nadmerným stratám vody pokožkou, ktorú je možné použiť na liečenie suchej pokožky, najmä ichtyotickej pokožky.

Podľa ďalšieho uskutočnenia umožňuje kozmetická alebo dermatologická kompozícia podľa uvedeného vynálezu obnoviť normálnu keratínocytovú diferenciáciu, pričom táto kompozícia je určená na použitie pri liečení psoriatickej pokožky.

V kontexte uvedeného vynálezu sa ekdysteroid alebo ekdysteroidový derivát zvyčajne používa vo forme, keď je vpravený do kozmeticky alebo dermatologicky prijateľného vehikula (nosičového základného materiálu). Okrem toho je možné tento ekdysteroid alebo ekdysteroidový derivát, definovaný v uvedenom texte, vpraviť do hydratovanej lamelárnej lipidovej fázy alebo do lipozómov, čo je možné vykonať rovnakým spôsobom, ako bolo uvedené hore.

Podľa tretieho aspektu sa uvedený vynález tiež týka použitia bunkového alebo tkanivového kultivačného média, najmä na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje podiel prinajmenšom jedného ekdysteroidu alebo prinajmenšom jedného ekdysteroidového derivátu alebo prinajmenšom jedného rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky, v množstve účinnom na promotovanie, urýchlenie alebo zlepšenie diferenciácie kožných buniek, najmä keratínocytov.

Podľa štvrtého aspektu sa uvedený vynález tiež týka promotovania, urýchlenia alebo zlepšenia diferenciácie kožných buniek, najmä keratínocytov, najmä v súvislosti s veľkoobjemovou kultúrou kožných buniek, na prípravu umelej kože alebo na prípravu vzoriek rekonštituovanej kože, ktorého podstata spočíva v tom, že sa pri ňom používa kultivačné médium definované v časti opisujúcej použitie, pozri skôr, alebo v nasledujúcom opise.

Tento postup podľa uvedeného vynálezu, ktorý sa označuje ako proces diferenciácie buniek, má z priemyselného hľadiska veľký význam. Medzi významné aspekty tohto postupu je možné uviesť nasledujúce:

- výroba biochemických mediátorov veľkoobjemovým kultivačným spracovaním keratínocytov v bioreaktoroch,
- príprava umelej kože na účely vykonávania kožných štepov, kde sa postup podľa uvedeného vynálezu najmä výhodne využije v prípade autoštepov u obetí popálenín tretieho stupňa, alebo dôjde k veľkej časovej úspore pri príprave umelej kože. Hlavne je potrebné uviesť, že urýchlenie a zlepšenie keratínocytovej diferenciácie samo osebe sa prejaví v rýchlejšej tvorbe zrohovatenej vrstvy dobrej kvality,
- príprava vzoriek kože zahrnujúcich rekonštituovanú kožu, určených napríklad na testovanie penetrácie kože alebo toxicity látok alebo prostriedkov aplikovaných miestne, ak sú tieto látky a prostriedky určené najmä na lokálne ošetrenie alebo na systemické ošetrenie (konkrétne transdermálne ošetrenie).

Podľa konkrétneho variantu tohto uskutočnenia tento kultivačný proces zvyčajne zahrnuje prípravu kultivačného média na rast ľudských keratínocytov obsahujúceho DMEM živné základné médium (GibcoR), epidermálny rastový faktor („EGF"), 10 % fetálneho teľacieho séra, izoproterenol a/alebo forskolín a okrem toho tiež hydrokortizón. Podľa uvedeného vynálezu obsahuje toto médium tiež ekdysteroid alebo ekdysteroidový derivát alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky, ktoré boli špecifikované v uvedenom opise, napríklad β-ekdyzón, alebo jeden z ich derivátov, najmä acetát, zvyčajne v koncentrácii v rozmedzí od 0,01 % do 0,5 % hmotn..

Pri vykonávaní tohto postupu sa veľkoobjemová kultivácia buniek kože vykonáva inokuláciou keratínocytov takým spôsobom, aby bolo dosiahnuté ich imobilizovanie na nosičovom materiáli, ako sú napríklad duté vlákna, mikroguľôčky alebo mikroporézna matrica, čo sa vykonáva s použitím uvedeného kultivačného média. Pri vykonávaní tohto postupu je možné využiť perfúziu tohto média, pričom sa vytvorí zdroj, ktorý je dostatočný na rast a diferenciáciu i v prípade, keď je použitá biomasa objemná.

Toto kultivačné médium je možné výhodne podľa vynálezu použiť na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek, najmä keratínocytov, na prípravu umelej kože alebo na prípravu vzoriek rekonštituovanej kože.

Čo sa týka použitia uvedených látok v kultivačnom médiu, podľa jedného z výhodných uskutočnení uvedeného vynálezu je možné použiť ekdysteroid alebo ekdysteroidový derivát alebo rastlinný extrakt obsahujúci tieto látky v množstve v rozmedzí od 0,01 % do 0,5 % hmotn., vzťahujúc na celkovú hmotnosť konečného kultivačného média.

Okrem toho, podľa obzvlášť výhodného uskutočnenia podľa uvedeného vynálezu je možné zaviesť do kozmetického alebo dermatologického prostriedku prídavnú účinnú látku, najmä účinnú látku s hydratačným účinkom, ako je napríklad kyselina hyalurónová.

Kozmetickú kompozíciu je možné použiť na obnovenie, zachovanie a/alebo posilnenie ochrannej funkcie pokožky vrátane funkcie vodnej bariéry, na obnovenie, zachovanie a/alebo posilnenie zrohovatenej vrstvy a na zlepšenie kvality vlasov, čo sa týka ich konštitúcie, ktorého podstata spočíva tom, že sa na zodpovedajúcu plochu pokožky alebo skalpu postihnutej osoby aplikuje kozmeticky účinné množstvo prostriedku obsahujúceho prinajmenšom jeden ekdysteroid alebo prinajmenšom jeden ekdysteroidový derivát alebo prinajmenšom jeden rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky, najmä sa tieto látky použijú v koncentrácii v rozmedzí od 0,0001% do 5 % hmotn., vo výhodnom uskutočnení v množstve od 0,01 % do 1 % hmotn., vzťahujúc na celkovú hmotnosť tejto kompozície.

Vo všetkých uvedených aspektoch, uvedených v uvedenom texte, sa vo výhodnom uskutočnení podľa uvedeného vynálezu koncentrácia ekdysteroidu alebo ekdysteroidového derivátu alebo rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky v konečnom kozmetickom alebo dermatologickom prostriedku pohybuje v rozmedzí od 0,0001 % do 5 % hmotn., a podľa ešte výhodnejšieho uskutočnenia v rozmedzí od 0,01 % do 1 % hmotn., vzťahujúc na celkovú hmotnosť tohto prostriedku.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Ďalšie aspekty, znaky a výhody uvedeného vynálezu budú zrejmé z nasledujúceho opisu niekoľkých príkladov konkrétneho uskutočnenia použitia ekdysteroidov v kozmetických alebo dermatologických prostriedkoch, konkrétneho uskutočnenia kozmetických a dermatologických prostriedkov obsahujúcich tieto látky a bunkového alebo tkanivového média podľa uvedeného vynálezu, pričom tieto príklady sú iba ilustratívne a nijako neobmedzujú rozsah tohto vynálezu.

Vo všetkých uvedených príkladoch sú uvedené percentá hmotnostné, ak nebude v konkrétnom prípade uvedené inak.

Príklad 1
Testovanie účinnosti keratínocytovej diferenciácie

Pri tomto teste bola počas vykonávania estetického chirurgického zákroku typu „vytiahnutie kože", vykonávanom na tvári ženy vo veku 42 rokov, odobratá vzorka kože, ktorá bola použitá na ďalší výskum.

V dni D = -2 bolo šesť Petriho misiek inokulovaných 105 keratínocytových buniek oddelených z uvedenej vzorky, pričom bolo použité bežné kultivačné médium známe z doterajšieho stavu techniky používané na kultiváciu keratínocytov a podobné prípady.

V dni D = 0 a v dni D = 7 bolo kultivačné médium vymenené v troch miskách zo šiestich rovnakým médiom, pričom tieto misky predstavovali neošetrené kontrolné misky a vo zvyšných troch miskách, ktoré predstavovali ošetrené misky, bola výmena vykonaná s rovnakým uvedeným médiom, ale v tomto médiu bolo rozpustených 250 Tg/ml ekdysterónu.

V dni D = 12 bolo vykonané sčítanie buniek a rovnako aj inklúzia týchto buniek do epoxidovej živice po zafixovaní a označení celulárnych štruktúr pomocou uranylacetátu.

Rozdelenie každého z týchto blokov živice, získaných uvedeným spôsobom, bolo vykonané tak, aby boli získané ultratenké frakcie, pričom na tento účel je možné použiť prístroj známy pod označením mikrotom, ktoré boli potom pozorované v transmisnom elektrónovom mikroskope.

V nasledujúcej tabuľke I sú zaznamenané výsledky týchto pozorovaní prc každú z troch zón kontrolnej kultúry a kultúry ošetrenej ekdysterónom.

Tabuľka 1

	Kontrolná vzorka	Vzorka s ekdysterónom
Horná zóna	Známky degenerácie Žiaden zrohovatený obal okolo buniek vo väčšine rozlíšených horných celulárnych vrstiev Žiadne keratohyalinové granuly	Viac v podstate zrohovatených vrstiev Početné korneocyty so silným zrohovateným obalom Diferencované desmozómy Keratohyalinové granuly Výskyt malého počtu organel
Medziľahlá zóna	Malý počet tonofilamentov Veľké intercelulárne medzery Žiadne keratohyalinové granuly	Keratínové filamenty Výskyt mnohých tonofilamentov Zmenšené intercelulárne medzery
Základná zóna	Výskyt malého počtu hemidesmozómov	Cytokeratínové filamenty Početné hemidesmozómy

Z výsledkov uvedených v tabuľke 1 je zrejmé, že pri použití ekdysterónu podľa uvedeného vynálezu sa získa kultúra, ktorú tvoria početné vrstvy vysoko diferencovaných keratínocytov, čím je demonštrovaný vysoko významným spôsobom regulačný účinok ekdysteroidov, ako je napríklad ekdysterón, na keratínocytovú diferenciáciu.

Okrem toho je nevyhnutné poznamenať, že vo výslednom účinku tejto normalizácie keratínocytovej diferenciácie, umožňujú prostriedky podľa uvedeného vynálezu, ktoré obsahujú ekdysteroid definovaný v uvedenom opise, udržanie dobrého stavu pokožky „normálneho" typu, najmä čo sa týka udržania jej ohybnosti a pružnosti a jej funkčnej úlohy, hlavne jej bariérovej úlohy.

Prostriedky podľa uvedeného vynálezu je možné teda použiť výhodne na hydratáciu pokožky, na prevenciu a ošetrenie rôznych druhov suchých pokožiek prejavujúcich rôzny stupeň suchosti, vrátane ichtyotických druhov pokožiek, alebo na liečenie psoriatických druhov pokožiek.

Ďalej je nevyhnutné poznamenať, že v konečnom dôsledku je výskyt suchej kože alebo psoriázy sprevádzaný poruchami keratínocytovej diferenciácie. Najmä je nevyhnutné uviesť, že psoriatické keratínocyty sú zle vyvinuté a ich vývoj nie je skončený, počet a veľkosť tonofilamentov je zmenený a niektoré bunky zrohovatenej vrstvy stále obsahujú organely alebo dokonca jadrá, čo naznačuje to, že diferenciácia neprebehla správnym spôsobom. V prípade týchto ťažkostí sú tiež pozorované veľké intercelulárne medzery.

V prípade suchých druhov pokožiek, najmä v prípade ichtyózy, je keratínocytová diferenciácia nedokonalá a je sprevádzaná malformáciami keratohyalinových granúl a desmozómov. Pokožka má abnormálnu keratinizáciu, ktorá vedie k poruche bariéry, najmä vodnej bariéry, k poruchám vlastností pokožky a k strate elasticity.

V ďalších príkladoch sú uvedené niektoré priemyselne využiteľné kozmetické a dermatologické prostriedky.

Príklad 2
Dermatologický prostriedok na obnovenie vodnej bariéry pokožky

- ekdysterón	0,5 gramu
- Cremophor RH40R	1 gram
- Carbomer 980R	0,2 gramu
- trietanolamín	0,18 gramu
- PEG 6-32 stearát	7 gramov
- cetylalkohol	2 gramy
- prírodné oleje	25 gramov
- parfumované vodné vehikulum	doplnok do 100 gramov.

Uvedené zložky boli zmiešané bežným spôsobom, pričom bola získaná emulzia, ktorá sa aplikuje ráno a v noci za súčasnej jemnej masáže ošetrovaných plôch. Táto emulzia sa používa ako denný a/alebo nočný krém.

Príklad 3
Dermatologický prostriedok na liečenie psoriatickej pokožky

- ekdysterón-2-acetát	0,3 gramu
- Carbopol 980R, 2 % gél	35 gramov
- parfumované vodné vehikulum	doplnok do 100 gramov.

Podľa tohto uskutočnenia bol ekdysterón-2-acetát vpravený do vodného vehikula na účely jeho rozpustenia a potom bol pridaný Carbopol vo forme gélu, čím bol získaný gélový prostriedok, ktorý bol potom aplikovaný miestne na danú léziu počas 6 týždňov.

Príklad 4
Kozmetický prostriedok na udržanie uspokojivého stavu hydratácie pokožky

- ekdysterón	0,18 gramu
- α-bisabolol	0,1 gramu

- hyalurónová kyselina	1 gram
- močovina	3 gramy
- kozmeticky prijateľné vehikulum vo forme telového mlieka	doplnok do 100 gramov.

Podľa tohto príkladu sa mlieko aplikuje na ošetrované miesta, najmä na nohy po depilácii. Prostriedok podľa tohto príkladu umožňuje hlavne posilnenie funkcie pokožky ako vodnej bariéry tým, že sa zlepší epidermálna intercelulárna kohézia. Týmto spôsobom sa dosiahne to, že si pokožka udržiava a zachováva uspokojivý stupeň hydratácie.

Príklad 5

Lipozomálny kozmetický prostriedok na opätovné vyrovnanie deskvamácie zrohovatenej vrstvy pokožky a obnovenie jemnosti a hladkosti pokožky

- ekdysterón	0,1 gramu
- lecitín zo sóje	2 gramy
- β-sitosterol	0,2 gramu
- kozmetický krém typu emulzie oleja vo vode na báze kvalénu	doplnok do 100 gramov.

Podľa tohto príkladu bola v prvom stupni pripravená vodná suspenzia lipozómov zapuzdrujúcich ekdysterón v lipidovej fáze uvedených lipozómov. Na tento účel bol použitý nasledujúci postup.

Na prípravu bolo použitých 0,1 gramu bežne obchodne dostupného ekdysterónu, 2 gramy lecitínu zo sójových bôbov a 0,2 gramu β-sitosterolu, ktoré boli rozpustené v 50 mililitroch zmesi dichlórmetánu a metanolu v pomere 4 : 1. Takto získaný roztok bol potom odparený pri zníženom tlaku (približne za tlaku 26,6 kPa) v rotačnej nádobe s guľatým dnom, ktorá bola zahriata na teplotu 45 °C. Takto získaný lipidový film bol potom vložený do 25 mililitrov vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného s koncentráciou 0,2 gramu/liter a fosforečnanu dvojsodného s koncentráciou 1,44 gramu/liter za súčasného premiešavania, čo bolo vykonávané za miešania počas 1 hodiny.

Týmto spôsobom bolo získaných približne 25 mililitrov suspenzie lipozómov zapuzdrujúcich ekdysterón, pričom táto suspenzia bola potom podrobená homogenizovaniu ultrazvukom (15 minút, 150 W, 4 °C).

V druhom stupni bola takto získaná lipozómová suspenzia vpravená bežným spôsobom do emulgovaného vehikula, čím bol získaný krém podľa uvedeného vynálezu.

Tento krém je možné aplikovať denne na tvár v prípade hrubej pokožky alebo odlupujúcich sa šupiniek pokožky.

Tento prostriedok posilňuje kohéziu zrohovatenej vrstvy a normalizuje oddeľovanie odumretých buniek, čím sa dosiahne hladší stav a vzhľad pokožky.

Príklad 6

Postup prípravy extraktu z rastliny Rhaponticum carthamoides

Podľa tohto príkladu bolo 250 gramov koreňa rastliny *Rhaponticum carthamoides* rozdrvené na prášok a tento prášok bol extrahovaný počas 2 hodín 2,5 litrami metanolu za teploty varu a pod spätným chladičom.

Po dôkladne vykonanej filtrácii, pri ktorej boli oddelené pevné častice, bolo rozpúšťadlo odparované tak dlho, pokiaľ nebol získaný suchý produkt označený ako „extrakt rastliny *Rhaponticum carthamoides* podľa vynálezu“ vo forme tzv. sušiny.

Tento surový extrakt je potom možné použiť na prípravu kozmetických a/alebo farmaceutických prostriedkov a tiež tak i na prípravu kultivačného média.

Príklad 7

Postup prípravy extraktu z rastliny *Achyranthes bidentata*

Postup podľa tohto príkladu bol vykonávaný rovnakým spôsobom ako postup podľa príkladu 6 s tým rozdielom, že v tomto prípade boli použité suché korene rastliny *Achyranthes bidentata.*

Produkt takto získaný bol označený ako „extrakt rastliny *Achyranthes bidentata* podľa uvedeného vynálezu“, pričom bol získaný v suchom stave.

Tento surový extrakt je možné potom použiť na prípravu kozmetických a/alebo farmaceutických prostriedkov a tiež tak i na prípravu kultivačného média.

Príklad 8

Kozmetický prostriedok obsahujúci extrakt z rastliny *Rhaponticum carthamoides* určený na preventívne ošetrenie suchej pokožky

- extrakt z rastliny *Rhaponticum carthamoides*	0,5 gramu
- krémová emulzia ako vehikulum typu olej vo vode	doplnok do 100 gramov

Podľa tohto príkladu sa extrakt z rastliny *Rhaponticum carthamoides* vpraví bežným spôsobom do krémovej emulzie ako vehikula, čím sa získa krém podľa uvedeného vynálezu.

Tento krém je potom možné aplikovať denne na časti tela, ktoré je potrebné ošetriť.

Príklad 9

Kozmetický prostriedok obsahujúci extrakt z rastliny *Achyranthes bidentata* určený na použitie na liečenie ichtyotickej pokožky

- glycerol	3 gramy
- hyalurónová kyselina	1 gram
- extrakt z rastliny *Achyranthes bidentata* získaný podľa príkladu 7	0,2 gramu
- krémová emulzia ako vehikulum typu olej vo vode	doplnok do 100 gramov.

Podľa tohto príkladu bol extrakt rastliny *Achyranthes bidentata* vpravený bežným spôsobom spoločne s glycerolom a hyalurónovou kyselinou do krémovej emulzie ako vehikula, čím bol získaný krém podľa uvedeného vynálezu.

Tento krém je potom možné aplikovať denne na postihnuté plochy pokožky, kým sa nedosiahne oveľa hladší a jemnejší stav a vzhľad, čo nastáva v dôsledku pôsobenia na korneocyty a týmto ošetrením sa dosiahne posilnenie ich zrohovateného obalu a lepšia vzájomná kohézia.

Príklad 10

Kozmetický prostriedok, ktorý obsahuje kombináciu ekdysteroidov na obnovenie normálneho stavu pokožky

Podľa tohto príkladu bola najprv získaná nasledujúca kombinácia ekdysteroidov:

- približne 85 % ekdysterónu,
- približne 13 % racemickej zmesi obsahujúcej ekdysterón 2-monoacetát a 3-monoacetát,
- približne 2 % ajugasterónu C.

Ekdysterón predstavuje bežne obchodne dostupný produkt. Jeho 2-acetátový alebo 3-acetátový derivát je možné pripraviť chemickým postupom, pri ktorom sa vykonáva

bežne známa kontrolovaná acetylácia v prítomnosti zmesi kyseliny octovej a pyridínu tak, ako to bolo uvedené v hore uvedenom texte. Ajugasterón C je možné získať extrakciou z rastlín, hlavne z rastliny druhu *Ajuga*, napríklad je možné použiť postup uvedený v japonskom patente JP 71-028038, pri ktorom sa ako východisková surovina používa rastlina *Ajuga decumbens*.

Získané produkty sa rozpustia v zmesi obsahujúcej 50 % vody a alkoholu. Takto získaný roztok sa potom odparí do sucha, čím sa získa uvedená kombinácia v práškovej forme.

Táto kombinácia sa potom vpraví do kozmeticky prijateľnej krémovej emulzie ako vehikula typu olej vo vode, napríklad v dostatočnom množstve tak, aby bola dosiahnutá koncentrácia 0,05 % ekdysteroidu vzhľadom na celkovú hmotnosť takto pripraveného kozmetického prostriedku.

Príklad 11

Kozmetický prostriedok obsahujúci kombináciu ekdysteroidu a cyklodextrínu, ktorý má hydratačný a regeneračný účinok

Podľa tohto príkladu bola kombinácia ekdysteroidov, pripravená postupom podľa príkladu 10, dispergovaná v koncentrácii 1 % vo vodnom roztoku obsahujúcom 2,5 % cyklodextrínu, čo bolo vykonávané miešaním a tak dlho, kým nebol získaný číry roztok. Týmto spôsobom bolo dosiahnuté vpravenie ekdysteroidov do molekúl cyklodextrínu. Takto získaný roztok cyklodextrínu obsahujúci ekdysteroidy bol potom pridaný ku krémovej emulzii ako vehikula typu olej vo vode v dostatočnom množstve tak, aby bola získaná emulzia obsahujúca 0,1 % hmotnostné ekdysteroidu.

Tento prostriedok je možné aplikovať denne na požadované plochy pokožky na posilnenie jej hydratačného stavu a na získanie oveľa hladšieho a jemnejšieho vzhľadu.

Príklad 12

Postup prípravy kultivačného média a jeho použitie na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek

V prípade prípravy tohto kultivačného média a rovnako tak i použitia tohto média na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek je možné odkázať najmä na publikáciu: Philip C. Familletti a kol., Biotechnology, volume 6, január 1988, str. 41 až 44, a tiež tak na odkazy citované v tejto publikácii, najmä: Arathoon a kol., Journal Science (1986), 232, str. 1390 a nasledujúce a na publikáciu Ku, K. a kol., Journal Biotechnology Bioeng. (1981), 23, str. 79 a nasledujúce.

Týmto spôsobom sa pripraví optimálne kultivačné médium na rast ľudských keratínocytov, ktoré obsahuje DMEM (Gibco) živné základné médium, rastový faktor EGF, 10 % fetálneho teľacieho séra, izoproterenol a/alebo forskolín a tiež aj hydrokortizón.

Vo výhodnom uskutočnení toto médium obsahuje 20-hydroxyckdyzón alebo jeden z jeho derivátov v koncentrácii 0,001 až 0,1 %.

Veľkoobjemová kultivácia kožných buniek sa vykonáva inokulovaním keratínocytov tak, aby boli imobilizované na nosičovom materiáli, ako sú napríklad duté vlákna, mikroguľôčky alebo mikroporézne matrice, čo sa vykoná pri použití uvedeného kultivačného média. Toto usporiadanie sa doplní perfúznym systémom na perfúziu média, napríklad typu uvedeného v publikácii Sylvie Guichard-Balestrini, Journal Biofutur, suplement No. 56, apríl 1987, str. 2 až 14, čím sa zaistí dostatočný prívod média na rast a diferenciáciu i v situácii, keď je biomasa objemná.

Na konci tejto kultivácie sa oddelia látky vylúčené keratínocytovými bunkami, najmä látky obsahujúce lipidy, ako zdroj východiskových materiálov na prípravu kozmetických alebo farmaceutických prostriedkov na miestnu aplikáciu na kožu alebo skalp.

Pomocou produktov podľa uvedeného vynálezu je možné vykonať ošetrenie rekonštituovanej kožnej kultúry, najmä kultúry keratínocytov alebo epidermálnych buniek kultivovaných na vhodnom nosičovom materiáli, ako je napríklad nosičový materiál na báze kolagénu (obsahujúci alebo neobsahujúci fibroblasty), napríklad materiál opisovaný v publikácii La Recherche (1987), 185, str. 149 - 159, a v publikácii Br. J. Dermatol. 1986, 114, 91 - 101, alebo nosičový materiál z odrezanej pokožky.

V prípade použitia prostriedku podľa uvedeného vynálezu je možné dosiahnuť rýchlejšiu alebo úplnejšiu epidermizáciu. Podľa uvedeného vynálezu je teda lekárovi k dispozícii biologické médium na autoštepy, ktoré umožnia pracovať s malým oneskorením, napríklad v prípade rozsiahlych popálenín. Uvedený vynález tiež umožňuje vykonávanie testov na penetráciu alebo na toleranciu proti rôznym látkam s rekonštituovanou pokožkou v dobrej konkurenčnej kvalite a v priemyselnom meradle.

Pokladá sa za samozrejmé, že do rozsahu uvedeného vynálezu patria tiež všetky ekvivalenty riešenia, ktoré boli opísané v uvedenom opise, rovnako ako rôzne varianty a kombinácie týchto riešení

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie prinajmenšom jedného ekdysteroidu alebo prinajmenšom jedného ekdysteroidového derivátu alebo prinajmenšom jedného rastlinného alebo živočíšneho extraktu, ktorý obsahuje tento ekdysteroid alebo uvedený ekdysteroidový derivát, na prípravu kozmetickej alebo dermatologickej kompozície určenej na liečenie kožných porúch súvisiacich s poruchami keratínocytovej diferenciácie, ako je napríklad psoriáza, na obnovenie, zachovanie a/alebo posilnenie ochrannej funkcie kože, najmä prostredníctvom zlepšenia alebo posilnenia zrohovatenej vrstvy a vodnej bariérovej funkcie a rovnako tiež kohézie buniek pokožky, alebo alternatívne na zlepšenie kvality vlasov, čo sa týka ich konštitúcie; alebo na prípravu bunkového alebo tkanivového kultivačného média, najmä na veľkoobjemovú kultiváciu kožných buniek, hlavne keratínocytov.

2. Použitie podľa nároku 1, pri ktorom sa používa kombinácia niekoľkých ekdysteroidov alebo ekdysteroidových derivátov, alebo v alternatívnom vyhotovení kombinácia prinajmenšom jedného ekdysteroidu a rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, pri ktorom je uvedeným ekdysteroidom ekdysterón alebo ekdysterónový derivát, najmä acylovaný, hydroxylovaný alebo deoxylovaný derivát týchto látok.

4. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, pri ktorom je uvedeným acylovaným ekdysteroidovým derivátom monoacetát alebo multiacetát ekdysterónu.

5. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 4, pri ktorom je uvedeným ekdysteroidom ekdysterónový derivát vybraný zo skupiny zahrnujúcej β-ekdyzón-2-acetát, β-ekdyzón-3-acetát, β-ekdyzón-2,3-diacetát, β-ekdyzón-2,3,22-triacetát, β-ekdyzón- 2,3,22,25-tetraacetát, 5-hydroxyekdysterón a 2-deoxyekdysterón.

6. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 5, podľa ktorého je uvedeným extraktom obsahujúcim ekdysteroid, vo výhodnom vyhotovení ekdysterón, alebo ekdysteroidový

derivát extrakt z *Achyranthes bidentata, Paris axialis, Paris fargesii, Paris dunniana, Paris vietnamensis, Paris polyphylla, Polypodium vulgare, Cyanotis arachnoidea, Ajuga decumbens, Pfaffia paniculata, Pfaffia iresinoides, Vitex glabrata, Achyranthes aspera, Sesuvium portulacastrum, Serratula sogdiana, Rhaponticum integrifolium, Rhaponticum* (alebo *Leuzea*) *carthamoides, Silene tatarica, Silene otites, Silene scabrifolia, Silene nutans, Silene brahuica, Silene traemixta, Silene dioca, Lychnis flos-cuculi, Ajuga iva, Serratula tinctoria, Cyathula officinalis, Cyathula capitata* alebo *Bombyx mori.*

7. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 6, podľa ktorého sú uvedeným extraktom obsahujúcim ekdysteroid, vo výhodnom vyhotovení ekdysterón, alebo ekdysteroidové deriváty extrakty získané z *Polypodium vulgare, Ajuga decumbens, Cyanotis arachnoidea, Achyranthes bidentata* a *Rhaponticum* (alebo *Leuzea*) *carthamoides.*

8. Použitie podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, podľa ktorého sa použije kombinácia obsahujúca ekdysterón a prinajmenšom jeden monoacetát alebo multiacetát tejto látky, najmä ide o 2-acetát alebo 3-acetát, alebo rastlinný extrakt obsahujúci túto kombináciu.

9. Použitie podľa nároku 8, podľa ktorého uvedená ekdysteroidová kombinácia obsahuje okrem uvedených látok ajugasterón C, alebo 2-monoacetát alebo 3-monoacetát tejto látky.

10. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 9, pri ktorom je uvedený ekdysteroid alebo jeho derivát, alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky, prinajmenšom čiastočne inkorporovaný v lipozómoch.

11. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 9, podľa ktorého je uvedený ekdysteroid alebo derivát tejto látky alebo rastlinný alebo živočíšny extrakt obsahujúci tieto látky prinajmenšom čiastočne vpravený do cyklodextrínu.

12. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 11, podľa ktorého je hmotnostná koncentrácia ekdysteroidu, ekdysteroidového derivátu alebo rastlinného alebo živočíšneho extraktu obsahujúceho tieto látky v rozmedzí od 0,0001 % do 5 % hmotn., výhodne v rozmedzí od 0,01 % do 1 % hmotn., vzťahujúc na celkovú hmotnosť konečného prostriedku.

13. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 12, podľa ktorého použitý prostriedok obsahuje okrem uvedených látok ešte prídavnú účinnú látku, najmä účinnú látku s hydratačným účinkom, ako je kyselina hyalurónová.

14. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 13, podľa ktorého je uvedený kozmetický alebo dermatologický prostriedok určený na liečenie suchej pokožky a ichtyotickej pokožky, alebo na liečenie psoriatickej pokožky alebo na zlepšenie kvality vlasov, čo sa týka ich konštitúcie.

15. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 14, podľa ktorého sa kultivačné médium použije na promótovanie keratínocytovej diferenciácie v súvislosti s veľkoobjemovou kultúrou kožných buniek, najmä na prípravu umelej kože alebo na prípravu vzoriek rekonštituovanej kože.

Koniec dokumentu