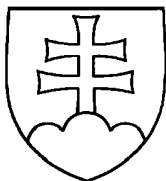


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 21.10.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 96/12822
(32) Dátum priority: 22.10.96
(33) Krajina priority: FR
(40) Dátum zverejnenia: 18.01.2000
(86) Číslo PCT: PCT/IB97/01319, 21.10.97

(21) Číslo dokumentu:

873-98

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

A 61K 35/78
A 61K 7/48

(71) Prihlasovateľ: ROC, Issy-les-Moulineaux, FR;

(72) Pôvodca vynálezu: Castelli Dominique, Paris, FR;
Friteau Laurence, Créteil, FR;
Ries Gerd, Le Vésinet, FR;

(74) Zástupca: Bušová Eva JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie extraktov z ginka biloba na prípravu farmaceutických kompozícií a spôsob kozmetického ošetrovania pri použití extraktu z ginka biloba**

(57) Anotácia:
Je opísané použitie aspoň jednej účinnej zložky, ktorú je možné získať extrakciou z ginka biloba, na prípravu kompozície s imunomodulačnou účinnosťou a jej využitie na kozmetické ošetrovanie citlivej kože.

Použitie extraktov z ginkga biloba pre prípravu farmaceutických kompozícií a spôsob kozmetického ošetrovania pri použití extraktu z ginkga biloba

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia extraktov, ktoré je možné získať z ginkga biloba, v imunomodulačnej oblasti. Tieto extrakty sú použiteľné predovšetkým pri liečení symptómov imunitných porúch na koži alebo pri prevencii, prípadne modulácii týchto chorôb.

Doterajší stav techniky

Ginkgo biloba je dvojdomý strom, ktorého domovom je ďaleký východ a ktorého listy sa používajú pri príprave lekárskeho produktu.

Extrakty sa používajú pri liečení intelektuálnej deficiencie, intermitentnej krivkavosti, obliteračných arteriopatií a Raynaudovej choroby starých pacientov. Extrakty z ginkga sa takisto odporúča použiť v prípade retinálnej deficiencie, kde by mohli byť zložky ginkgolidovej skupiny predovšetkým použité pre dosiahnutie požadovanej aktivity.

Teraz sa neočakávane zistilo, že extrakty získané z ginkga biloba vykazujú imunomodulačnú aktivitu. Cieľom vynálezu je teda použiť aspoň jednu účinnú zložku, ktorú je možné získať extrakciou z ginkga biloba, pri príprave kompozície, ktorá ak sa podáva topickou cestou, vykazuje imunomodulačnú aktivitu.

Imunitné reakcie sú regulované komplexným systémom a sú súčasťou udržiavania všeobecne dobrého telesného stavu. Majú účasť na obrane organizmu pred cudzorodými látkami v artikulárnych patogénnych číniidlách alebo pred hostiteľskými bunkami, ktoré podstúpili neoplastickú transformáciu.

Súčasťou tejto obrany je rozpoznanie cudzej povahy antigénu

a aktivácia bunkových alebo hormonálnych mediátorov, čo závisí od genetických faktorov, cez gény hlavného histokompatibilného komplexu.

Avšak tento mechanizmus môže byť v niektorých prípadoch nežiadúci, ak sa prejavuje príliš intenzívne, alebo proti okolitým antigénom, ktoré nie sú vnútorne škodlivé, čo je takisto prípad transplantácie orgánu alebo tkaniva. Okrem toho určité dysfunkcie vedú k chybnému rozpoznaníu hostiteľských buniek, ktoré sú potom zničené svojim vlastným imunitným systémom a môžu spôsobiť mnohé patologické zmeny (napríklad roztrúsený lupus erythematodes, dermatomyozitídu, kĺbový reumatizmus alebo určité typy fulminantnej hepatitídy).

Takisto sa zistilo, že pokiaľ ide o alergické subjekty, vyskytujú sa ľudia s takzvanou "citlivou" kožou. U týchto jedincov sa citlivosť kože prejavuje zvýšenou mierou. Napriek tomu, že sú jej príčiny komplexné, zdá sa, že často sú súčasťou týchto príčin faktory alergickej a zápalovej povahy.

Pojem "citlivosť kože" pokrýva široké spektrum prejavov, zahrnujúcich reaktívnu kožu a intolerantnú kožu. Aktivačnými faktormi môže byť samotné životné prostredie, napríklad vietor, znečistenie, teplotné zmeny, extrémne tvrdá voda alebo nevhodné hygienické návyky, nevhodné kozmetické alebo ochranné produkty. Tento jav je možné takisto spojovať so stresom a emóciami, ktoré pociťuje objekt a do istej miery môže súvisieť takisto so stravovaním alebo príjmom medikamentov. Takisto existujú individuálne predispozičné faktory (predovšetkým neurologický alebo hormonálny faktor) alebo rodinné predispozičné faktory, ktoré tieto reakcie ešte posilňujú.

Subjektívne pocity kožného diskomfortu sa môžu bežne prejavovať subjektívnymi a/alebo objektívnymi príznakmi. Koža je ľahkým cieľom pre popálenie, poleptanie alebo pichnutie; koža môže vnímať pocit zahrievania, úderu alebo pálenia. Na koži môže dôjsť k sčervenaniu alebo deskvamácii (odlupovaniu buniek).

Nepravideľne je možné takisto pozorovať xerózu, seboroickú dermatitídu, telangiektáziu, vezikuly alebo dokonca edém.

Tento stav sa môže prejavovať na úrovni kože, mukózných membrán alebo skalpu. V poslednom uvedenom prípade môže tento stav súvisieť s výskytom lupín a/alebo plešivosti.

Ako už bolo naznačené vyššie, jednou z príčin tohoto stavu je často alergický komponent. Navyše z tohoto stavu sa môže vyvinúť dermatologická choroba imunoalergického typu, napríklad atopia, ekzém alebo neurodermatitída.

Alergické stavy, ktoré sú výsledkom imunologického mechanizmu zápalu, boli na základe povahy imunologickej reakcie rozdelené do štyroch typov.

Podstata vynálezu

Teraz sa zistilo, že extrakty ginkga majú imunomodulárnu aktivitu. To je možné demonštrovať na zmesi lymfoepidermálnych kultúr.

Kože a predovšetkým epiderma, v ktorej sa nachádzajú Langerhansove bunky, hrá dôležitú úlohu pri imunitnej obrane tela. Stanovenie funkcie Langerhansových buniek (LC), ako buniek predkladajúcich antigén, a skutočnosť, že keratinocyty môžu generovať faktory, ktoré sú súčasťou imunitnej obrany, stáli pri zrode pojmu "kožný imunitný systém". Periférna pozícia Langerhansových buniek im prideľuje významnú úlohu pri preberaní, príprave a predkladaní antigénu T lymfocytom. Predkladanie antigénu zahŕňa interakciu medzi molekulami triedy II hlavného histokompatibilného komplexu (HLA-DR) exprimovanými Langerhansovými bunkami a T receptorom CD4+ lymfocytov. Počas ranej fázy senzibilizácie sú antigény v epiderme preberané Langerhansovými bunkami a prevedené na imunogénne peptidy. K antigénnemu predaniu T lymfocytov dochádza gangliónne, prostredníctvom interakcie medzi komplexom HLA-DR-imunogénnymi

peptidmi na povrchu Langerhansových buniek a T receptorom CD4+ lymfocytov.

MLEC tvorí model, ktorý umožňuje stanoviť imunomodulačné vlastnosti látky, ktoré sú schopné modifikovať kožnú imunologickú rovnováhu meraním proliferácie lymfocytov, indukovanej alogénnymi epidermálnymi bunkami, poskytujúcimi antigén pri ošetrovaní touto látkou alebo bez tohoto ošetrenia.

Antialergická aktivita sa potvrdzuje na keratinocytoch a bunkách makrofágu. Makrofágy sú mimoriadne výhodné bunky, pretože predstavujú bunky, ktoré sa nachádzajú na úrovni kože a ktoré regulujú nielen lokálne zápalové reakcie, ale vďaka svojej schopnosti poskytovať antigén a produkovať veľké množstvo cytokínov, ktoré regulujú lokálnu imunitu, takisto aj imunitné odpovede. Tieto makrofágy sa takisto zúčastňujú komunikácie s obehovým systémom, ktorý môže, ak je to vhodné, mobilizovať rôzne bunkové typy (monocyty, neutrofilny, eozinofily a T lymfocyty) a tým zvyšujú nešpecifickú a špecifickú obrannú silu uvažovaného tkaniva.

Účinnosť účinnej látky, extrahovanej z ginkga biloba, bola teda hodnotená na kultúrach ľudských keratinocytov a makrofágov stimulovaných IL-4, ktorý indukuje CD23 receptor na povrchu buniek a následne imunitnými komplexmi obsahujúcimi IgE, alebo nestimulovaných kultúrach. Tento typ stimulácie vyvoláva alergický zápal (IgE); uvádza bunky do kontextu prooxidačnej odpovede (generovanie superoxidového aniónu alebo NO voľných radikálov, ktoré je možné stanoviť meraním produkcie dusíkových derivátov) a imunozápalovej odpovede (produkcia cytokínov, napríklad TNF- α).

Túto imunomodulačnú účinnosť takisto zvyšuje skutočnosť, že účinné látky extrahované z ginkga sú takisto účinné pri liečení zápalu, ktorý je nešpecifický a objavuje sa lokálne.

Účinná látka (látky), použiteľné v rámci vynálezu, je

prítomná v kompozícii vo forme extraktu, získaného z ginkga biloba. Pre realizáciu vynálezu sú vhodné rôzne varianty extraktu ginkga biloba; výhodné extrakty, ktoré obsahujú menej ako približne 7 % hm./hm. terpénu.

Ginkgo biloba má komplexné chemické zloženie, ktorého súčasťou sú alifatické alkoholy a uhľovodíky, steroidy, aminokyseliny, polyfenoly, napríklad luteolín, kvercitol a špecifickejšie biflavóny, odvodené od amentaflavónu (bilobetín, ginkgetín). Ginkgo biloba ďalej obsahuje kyselinu ginkgolovú a anakardové deriváty obsahujúce seskviterpénový reťazec, terpény odvodené od limonénu a terpény s terc.-butylovými skupinami (bilobalidy a ginkgolidy).

Extrakty, vhodné pre realizáciu vynálezu, môžu obsahovať menej ako približne 3 hm. % terpénových derivátov, vzťahnuté na hmotnosť sušiny, výhodne menej ako približne 1 hm. % a výhodnejšie menej ako približne 0,5 hm. %.

Z použitého extraktu je výhodne v podstate odstránený chlorofyl, lipidy, vosky a lektíny.

Tomuto extraktu takisto v podstate chýbajú látky, akými sú kyselina ginkgolová, biflavonoidy alebo voľné aglykóny.

Koncentrácia proantokyanidínov je výhodne nižšia ako 5 hm. %, vzťahnuté na hmotnosť suchého extraktu.

Extrakty, ktoré je možné použiť v rámci vynálezu, obsahujú výhodne viac ako 24 hm. % flavónových heterozidov, vzťahnuté na hmotnosť sušiny, výhodne viac ako 28 hm. % a výhodnejšie približne 29 až 35 hm. %.

Flavónové heterozidy sú zlúčeniny, ktorých aglykónom je flavonol, napríklad kvercetín, kaempferol alebo izoramnetín. Existujú mono-, tri- a predovšetkým diglukozidy, ktorých základnými karbohydrátovými stavebnými zložkami sú glukóza a

ramnóza. Ich podstatná časť je prítomná vo forme kumarínových esterov kvercetínu a kaempferolového glukoramnozidu.

Extrakt ginkga, ktorý je veľmi vhodný pre realizáciu vynálezu, obsahuje, pri obsahu vody nižšom ako 3 % hm./hm., 32 ± 3 % hm./hm. flavónových heterozidov, menej ako 10 ppm kyseliny ginkgolovej, menej ako 5 % hm./hm. proantokyanidínu a menej ako 0,5 % hm./h. terpénu.

Vynález sa teda takisto týka použitia aspoň jednej účinnej látky, ktorú je možné získať z ginkga biloba, pri príprave kompozície, ktorá umožňuje zabrániť, liečiť a/alebo modulovať vyššie definované reakcie citlivej kože.

Vynález sa ďalej týka použitia účinných látok extrahovaných z ginkga, ako boli definované vyššie, pri príprave kompozícií, ktoré sú určené na liečenie alebo ktoré je možné použiť pri prevencii stavu zvoleného zo skupiny zahrnujúcej: vitiligo, psoriázu, multiformný erytém, neurodermatitídu, xerodermu, ružienku, žihľavku, pemfigus, lupus erythematosus, dermatitídu, benígnu letnú fotodermatózu a ekzém.

Extrakt ginkga biloba je možné podľa vynálezu použiť prispôbením ich dávky pri modulácii určitých imunitných systémov.

Tieto extrakt môžu byť teda navrhnuté pre moduláciu určitých dermatologických stavov spojených s AIDS; napríklad súčasné chápanie Kaposiho choroby, ktorá bežne vykazuje štyri klinické formy (a pre ktorú je navrhnutým kauzativným činidlom vírus herpetickej skupiny) spočíva v tom, že hyperplázia obsahuje v podstate zápalové bunky.

Kompozície podľa vynálezu obsahujú približne 0,0001 až 10 % hm./hm. extraktu ginkga biloba, výhodne 0,01 až 2 % hm./hm..

Extrakt je možné vo formuláciách použiť ako také, alebo je

možné ich dopredu zlúčiť s fosfolipidmi, ktoré zvyšujú ich biologickú dostupnosť vo vehikulách lipozómového typu, alebo s produktom Phytosome.

Predmetom vynálezu je takisto spôsob kozmetického ošetrovania hyperreaktívnej kože, pri ktorom sa aspoň jedna účinná látka, ktorú je možné získať z ginkga biloba extrakciou, aplikuje topickou cestou.

Kompozícia podľa vynálezu budú formulované s kozmeticky a/alebo dermatologicky účinnými vehikulami, ktoré sú odborníkom v danom odbore známe.

Stručný popis obrázkov

Obr. 1 znázorňuje proliferáciu lymfoepidermálnych buniek v prítomnosti alebo neprítomnosti rôznych koncentrácií extraktu ginkga biloba.

Na obrázku sú použité nasledujúce symboly:

PBMC	:	T lymfocyty samotné
EC	:	kompletné epidermálne bunky samotné
Alogénne PBMC + EC	:	kompletné epidermálne bunky v prítomnosti T lymfocytov.

Nasledujúce príklady majú len ilustratívny charakter a nijako neobmedzujú rozsah vynálezu, ktorý je jednoznačne vymedzený priloženými patentovými nárokmi.

Príklady realizácie vynálezu

Príklad 1

1. Materiály a metódy

Produkty

Počas štúdie sa použili nasledujúce produkty: IL-4 sa získal od spoločnosti Immunogenex (Los Angeles, CA) a použil sa v koncentrácii 10 ng/ml; monoklonálne IgE's sa získali od spoločnosti Stallergene (Fresnes, Francúzsko) a protilátky anti-IgE's od spoločnosti Nordic (Tilburg, Holandsko).

Kultúra keratinocytov

Primárne kultúry keratinocytov sa získajú z neonatálnych predkožiek a udržuju sa v proliferácii *ex vivo* v médiu, ktoré neobsahovalo teľacie sérum. Súbežné kultúry keratinocytov sa trypsinizujú a v čerstvom médiu prevedú do dvadsaťštyrijamkových platní, pri hustote buniek 10^5 buniek/ml/jamku. Prítomnosť IgE receptora (CD23) na povrchu buniek sa kontroluje imunoznačením.

Kultúra makrofágov

Bunky makrofágu sa získajú z periférnej krvi normálnych (nealergických) darcov. Mononukleárne bunky sa izolujú na gradiente fikor a kruh lymfoidných buniek sa izoluje, trikrát premyje a potom sa bunky kultivujú tak, aby došlo k priľnutiu makrofágových buniek. Tieto bunky sa izolujú po priľnutí, ktoré trvalo jednu hodinu a kultivujú (10^6 buniek/ml/jamka). Pred stimuláciou, uskutočňovanou pomocou IL-4, sa pomocou imunoznačenia skontrolovala prítomnosť IgE receptora (CD23) na povrchu buniek.

Aktivácia buniek

Bunky sa najprv aktivujú pomocou IL-4 tak, aby indukovali CD23 a potom sa počas troch až piatich dní pred izolovaním rôznych supernatantov kultivujú a stimulujú pomocou imunitných komplexov obsahujúcich IgE. Dusíkové deriváty sa hodnotia použitím metódy podľa Griessa a TNF hladina sa meria použitím testovacích sád od spoločnosti Medgénix (Fleurus, Belgicko).

2. Výsledky

Účinky extraktu ginkga biloba na keratinocyty a makrofágy, stimulované pomocou IL-4

Suché listy ginkga biloba sa podrobia kontinuálnej extrakcii zmesou acetónu a vody, uskutočňovanej pri vákuu, pričom niekoľko krokov, v ktorých sa uskutoční odstránenie rozpúšťadla a rovnako tak aj chlorofylu, lipidov, voskov, lektínov a určitých látok, vedie k získaniu extraktu, ktorý je tu označený ako H37.

Tento extrakt existuje vo forme jemného prášku zodpovedajúceho nasledujúcim aplikáciám:

- reziduálne rozpúšťadlá	
* etanol	< 3 %
* acetón	< 0,1 %
* butanol	< 0,1 %
* etylacetát	< 0,1 %
- sulfátový popol	< 1,5 %
- obsah vody	< 3 %
- proantokyanidy	< 5 %
- terpény	< 0,5 %
- kyselina ginkgolová	< 10 ppm
- ťažké kovy	< 20 ppm
- flavónové heterozidy	32 ± 3 %

Tento extrakt je rozpustný pri koncentrácii 6 % (hm./hm.) v PEG 400 a pri koncentrácii 4 % (hm./obj.) v 90% etanole.

Bunky sa stimulujú 48 hodín v prítomnosti IL-4 (10 ng/ml) tak, aby indukovali na svojom povrchu receptor s nízkou afinitou k IgE's (CD23). Na konci tejto kultivačnej periódy 30 až 80 % keratinocytov a makrofágov exprimovalo CD23. Jednotlivé varianty nie sú v žiadnom prípade odrazom rozdielnej alergickej situácie medzi jednotlivými jedincami. Nech je situácia akákoľvek, testované produkty v tejto indukčnej fáze nemodifikujú indukciu

CD23; v skutočnosti je zníženie menšie ako 5% a nemôže byť pozorované (n = 8).

Tabuľka 1: Indukcia expresie CD23 rôznymi bunkami, stimulovanými IL-4 v prítomnosti alebo pri absencii 10 mg/ml H37

Bunky	Médium	+ IL-4
Makrofágy	< 5 %	45 ± 4
+ H37	< 5 %	41 ± 2
Keratinocyty	ND	55 ± 7
+ H37	ND	51 ± 4

* Bunky sa stimulovali 48 hodín v prítomnosti 10 ng/ml IL-4 alebo pri absencii IL-4 a v prítomnosti alebo pri absencii rôznych produktov, ND = nie je detegovateľné.

Po zachytení CD23 imunitnými komplexmi, obsahujúcimi IgE, sa indukuje produkcia veľkého počtu mediátorov a cytokínov (predovšetkým TNF) a produktov odvodených od oxidačného metabolizmu, napríklad dusíkových derivátov. Táto stimulácia redefinuje *in vitro* zápalovú reakciu alergického typu.

Získané výsledky sú zhrnuté v nasledujúcich dvoch tabuľkách.

Tabuľka 2A: Produkcia nitroderivátov (NO_2^- μM) po stimulácii imunitnými komplexmi obsahujúcimi IgE ± 10 mg/ml H37

Bunky	Expt-1	Expt-2	Expt-3	Expt-4
Makrofágy	25(5)*	30(2)	55(11)	15(2)
+H37	15(2)	17(75)	21(50)	6(2)
Keratinocyty	17(13)	13(3)	23(12)	13(5)
+H37	12(11)	8(2)	10(10)	8(6)

* Hodnoty v zátvorkách sú hodnoty pre bunky, ktoré neboli

stimulované imunitnými komplexmi obsahujúcimi IgE

H37 produkt vykazuje inhibičnú účinnosť pri produkcii nitroderivátov, makrofágmi a keratinocytmi stimulovanými imunitnými komplexmi, ktoré obsahujú IgE.

Tabuľka 2B: Produkcia TNF (pg/ml) po stimulácii imunitného komplexu obsahujúceho IgE ± 10 mg/ml H37

Bunky	Expt-1	Expt-2	Expt-3	Expt-4
Makrofágy	975(105)*	275(35)	455(40)	310(89)
+H37	850(105)	215(25)	365(35)	275(87)
Keratinocyty	185(ND)	158(ND)	315(35)	308(ND)
+H37	155(ND)	120(ND)	245(30)	276(ND)

* Hodnoty v zátvorkách sú hodnoty pre bunky, ktoré nie sú stimulované imunitnými komplexmi obsahujúcimi IgE, ND = nie je detegovateľné.

H37 produkt mierne znižuje produkciu TNF makrofágmi a keratinocytmi stimulovanými imunitnými komplexmi obsahujúcimi IgE.

Takže sa zdá, že H37 produkt má účinnosť proti alergickým zápalom. Táto charakteristika je veľmi dôležitá, pretože závažnosť zápalových odpovedí, predovšetkým alergického pôvodu, spôsobuje nerovnováhu oxidačného metabolizmu týchto buniek. Je to predovšetkým táto nerovnováha, ktorá je zodpovedná, aspoň čiastočne za reguláciu imunologického fenoménu, súvisiaceho s týmito reakciami: čo je prípad špecifických alergických reakcií a produkcie cytokínov.

Príklad 2

Štúdie účinku H37 na alogénne zmesové lymfoepidermálne kultúry (MLEC) (poskytnutie antigénu T bunkám)

Základ zmiešaných lymfoepidermálnych kultúr (MLEC) tvorí základ zmiešaných lymfocytových kultúr, pričom jediný rozdiel spočíva v tom, že stimulačnou populáciou je suspenzia kompletných epidermálnych buniek (keratinocyty, Langerhansove bunky a pod.). Pretože táto ko-kultivácia umožňuje hodnotiť schopnosť Langerhansových buniek poskytovať T lymfocytom antigén, je predovšetkým veľmi vhodná pre testovanie molekúl (alebo stresu), schopných modifikovať imunitné odpovede kože.

Dávky kontrolných kompletných epidermálnych buniek a takisto dávky epidermálnych buniek sa kultivovali spolu s T lymfocytmi. Ošetrovanie exogénnou molekulou sa uskutočňuje súčasne s ko-kultiváciou. Potom sa meria proliferácia lymfocytu, indukovaná epidermálnymi bunkami. Tento spôsob umožňuje monitorovať imunitné funkcie Langerhansových buniek počas lymfoepidermálnej ko-kultivácie a ich modifikáciu, spôsobenú exogénnymi ošetrovaniami.

Štúdie sa uskutočňovali v alogénnej situácii (rôzni darcovia epidermálnych buniek a T lymfocytov) s čerstvo odobranými kompletnými epidermálnymi bunkami, získanými pri plastickej operácii prsníka.

Postup

Pre štúdiu sa použili epidermálne bunky, získané od dvoch alebo troch rôznych darcov.

Epidermálne bunky sa ko-kultivujú alogénnymi T lymfocytmi na deväťdesiatšesťjamkových platniach: počet kompletných epidermálnych buniek je zhodný s počtom lymfocytov (10^3 epidermálnych buniek - 10^5 T lymfocytov na jamku).

Celková ko-kultivačná doba trvala 6 dní, zabudovanie tritiovaneho tymidínu sa uskutočňuje 18 hodín pred ukončením ko-kultivácie (piaty deň).

Proliferácia lymfocytov sa určila meraním zabudovaného tritiovaného tymidínu (počet rádioaktívne značených jedincov po "premiešaní" platní).

V čase ko-kultivácie epidermálnych buniek a alogénnych T lymfocytov sa pridali molekuly (H37 extrakt alebo cyklosporín).

Vzorky ošetrené testovanými molekulami

Predmetom štúdií bola ko-kultivácia epidermálnych buniek a alogénnych T lymfocytov s molekulou vo zvýšených koncentráciách, ktoré sa dosiahli pridaním malého objemu koncentrovaného roztoku molekuly (4 finálna koncentrácia). Pre H37, ktorý je rozpustný vo vode, sa pripraví zásobný roztok vo vode a potom v médiu. Pre cyklosporín, ktorý je rozpustný v DMSO, sa zásobný roztok pripraví v DMSO a potom dcérske roztoky v médiu.

Malé časti konečného DMSO sa použili v jamkách (0,1% finálne pre kontrolné DMSO a pre cyklosporín).

Ako negatívne kontrolné vzorky sa použili:

- neošetrené epidermálne bunky samotné (kontrola EC)
- neošetrené T lymfocyty samotné (kontrolné PBMC);

ďalšie kontroly: epidermálne bunky samotné, ošetrené DMSO (rozpúšťadlo použité pre cyklosporín); T lymfocyty samotné, ošetrené DMSO (rozpúšťadlo použité pre cyklosporín); epidermálne bunky samotné, ošetrené molekulou pri najvyššej koncentrácii; a T lymfocyty samotné, ošetrené molekulou pri najvyššej koncentrácii.

Ako pozitívne kontrolné vzorky sa použili:

- epidermálne bunky + alogénne T lymfocyty (EC = kontrolné PBMC)
- epidermálne bunky + T lymfocyty ošetrené 0,1 % (obj./obj.) DMSO (rozpúšťadlo použité pre cyklosporín).

Štandardom je Cyklosporín (Cyclo) 10^6 M.

Produkt H37 sa použil v nasledujúcich koncentráciách:

1	:	0,03	%
2	:	0,01	%
3	:	0,001	%
4	:	0,0001	%

Výsledky

Predbežné experimenty ukázali, že H37 produkt, až do koncentrácie 0,03 %, nevykazuje žiadnu cytotoxickú aktivitu ako v prípade lymfocytov, tak v prípade epidermálnych buniek.

MLEC výsledky sú znázornené na priloženom obrázku.

Výsledky sú vyjadrené ako percentné zabudovanie tritiovaného tymidínu (%). 100% hodnota zodpovedá úrovni zabudovania tymidínu pre EC+PBMC systém (kompletné epidermálne bunky v prítomnosti alogénnych krvných T lymfocytov) v neprítomnosti akéhokoľvek produktu (kontrola).

Experimenty ukazujú, že k proliferácii T lymfocytov dochádza v prítomnosti kompletných epidermálnych buniek (zvýšenie zabudovania tritiovaného tymidínu). Amplifikácia lymfocytovej proliferácie sa viaže na kmeň epidermálnych buniek, ktorý bol v jednotlivých experimentoch vždy iný. To indukuje proliferáciu, zodpovedajúcu poskytnutiu antigénu T lymfocytom Langerhansovými bunkami prípravku kompletných epidermálnych buniek.

Cyklosporín, známy imunomodulátor, inhibuje proliferáciu lymfocytov v MLEC (70% inhibícia).

Produkt H37 má značný inhibičný vplyv na proliferáciu lymfocytov v MLEC pri koncentrácii 1 (0,03 %) a 2 (0,01 %).

Tieto výsledky ukazujú, že produkt H37 má imunomodulačné vlastnosti, ktoré sa prejavujú počas MLEC "in vitro".

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie aspoň jednej účinnej látky, ktorú je možné získať extrakciou z ginkga biloba, pre prípravu kompozície s imunomodulačnou účinnosťou pri topickom spôsobe aplikácie.

2. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že uvedená kompozícia je určená pre terapeutické alebo proliferatívne ošetrovanie imunodependentných kožných reakcií.

3. Použitie podľa nároku 1 a 2, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že aspoň jedna účinná zložka je prítomná v kompozícii vo forme extraktu, získaného z listov ginkga biloba.

4. Použitie podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že koncentrácia terpénu v extrakte ginkga biloba tvorí menej ako 3 hm. %, vztiahnuté na hmotnosť sušiny.

5. Použitie podľa niektorého z nárokov 3 a 4, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že flavónové heterozidy sú prítomné v extrakte ginkga biloba v koncentrácii vyššej ako 24 hm. %, vztiahnuté na hmotnosť sušiny.

6. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 4, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kompozícia je určená na ošetrovanie alebo prevenciu intolerancie a/alebo alergických reakcií kože a mukózných membrán.

7. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 6, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že uvedená kompozícia je určená na terapeutické alebo proliferatívne ošetrovanie stavu, zvoleného zo skupiny zahrnujúcej atopiu, vitiligo, psoriázu, multiformný erytém, neurodermatitídu, xerodermu, žihľavku, pemfigus, ružienku, lupus erythematodes, dermatitídu, benígnu letnú fotodermatózu, ekzém a dermatologické príznaky spojené s AIDS.

8. Použitie podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že extrakt ginkga biloba je prítomný v kompozícii v koncentrácii 0,0001 až 10 hm. %, vzťahnuté na hmotnosť kompozície.

9. Použitie podľa niektorého z nárokov 3 až 8, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, extrakt ginkga biloba je prítomný v kompozícii v koncentrácii 0,01 až 2 hm. %, vzťahnuté na hmotnosť kompozície.

10. Spôsob kozmetického ošetrovania hyperaktívnej kože, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje aplikáciu aspoň jednej účinnej látky, ktorú je možné získať z ginkga biloba extrakciou, topickou cestou.

11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa dermatokozmetická kompozícia, obsahujúca extrakt z ginkga biloba v kombinácii s dermatologicky prijateľnými vehikulami, aplikuje topickým spôsobom.

Obr. 1

