



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **332272**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 1/16 (2006.01)

A61K 8/99 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20004016	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.02.03 PCT/FR1999/00220
(22)	Inng.dag	2000.08.09	(85)	Videreføringsdag	2000.08.09
(24)	Løpedag	1999.02.03	(30)	Prioritet	1998.02.11, FR, 9801637
(41)	Alm.tilgj	2000.10.11			
(45)	Meddelt	2012.08.13			
(83)	Biol.mat. dep	CNCM I 1844			
(73)	Innehaver	sanofi-aventis, 174, avenue de France, FR-75013 PARIS, Frankrike			
(72)	Oppfinner	Pierre Casellas, 10, rue Carl Von Linné, FR-34090 MONTPELLIER, Frankrike			
		Jean-Marie Derocq, 6, rue des Clauzes, FR-34570 MURVIEL-LES-MONTPELLIER, Frankrike			
		Jean-Marie Pereillo, Portet-sur-Garonne, Frankrike			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Preparat med stimulerende aktivitet på interleukin-6 produksjon, fremgangsmåte for fremstilling av aktivt middel, samt stamme Rhodotorula SEBR 2002			
(56)	Anførte publikasjoner	JP 63264513, JP 06345636			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen vedrører et kosmetisk preparat som inneholder minst en forbindelse med aktivitet som stimulerer IL-6 produksjon ved keratinocytter blandet med en eksipiens for kosmetiske preparater.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et preparat med stimulerende aktivitet på interleukin-6 (IL-6) produksjon ved keratinocytter.

- 5 Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av et aktivt middel med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter.

Oppfinnelsen vedrører også en stamme *Rhodotorula* SEBR
10 2002.

- Blant de mange cytokiner fremstilt ved hjelp av celler, er den spesifikke stimuleringen av IL-6 syntese av spesiell interesse ved anvendelse innen kosmetologi.
- 15 Foruten dets aktiverende virkninger på cellulær og humoral immunitet, spiller IL-6 en aktiv rolle i forbindelse med mekanismene for epidermis regenerering. In vitro stimulerer IL-6 kollagen syntese, så vel som keratinocytt- og fibroblast-proliferasjon. In vivo, i
- 20 transgene mus som har overekspresjon av IL-6 i huden, observeres en fortykning av stratum corneum. Denne økning av det superfisielle lag av epidermis skjer uten en pro-inflammatorisk manifestasjon, og menes å reflektere forbedringen i beskyttelsen av huden overfor
- 25 lokale lesjoner. Denne gruppe av data, som er avledet fra litteraturen, indikerer at IL-6 fremmer reparasjonen av skade tilført epidermis og setter ned hudens aldring.

- Man kan således vise til K. Yoshisaki et al., Cytokine,
30 1990 2, 381-387; R.M. Grossman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6367-6371; Kirbauer et al., J. Immunol., 1989, 142, 1922-1928; K. Turken et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 5068-5072; J. Taylor-Papadimitriou et al., Cell. Differ., 1982, 11, 169-180;
- 35 L. Aarden et al., Lymhphokines, 1985, 10, 175-182. Det er vel kjent at i forbindelse med aldring av huden vil først hornlaget til epidermis bli tykkere men epidermopoese avtar og cellulær kohesjon i basal-

membranen modifiseres. For å hjelpe huden med å bekjempe aldring er det således viktig å forsyne den med et aktivt middel som kan stimulere keratinocyttoproliferasjon for å bevirke en fortykning av epidermis. I dermis, har

5 cellene som er ansvarlige for konstruksjonen av den dermale arkitektur, fibroblastene, en økende nedsatt aktivitet, og følgene av dette er en nedgang i kollagen-, elastin- og glykosoaminoglykansyntese. Parallelt, vil effektene av lyseksponering føre til en akselerert

10 nedbrytning av eksisterende dermalfibre (actinisk aldring). Denne gruppe av effekter fører til en forstyrrelse i dermalstrukturen som frarøver huden dens mekaniske kvaliteter som elastisitet, fasthet og tonisitet, og som således fremmer forekomsten av rynker.

15 For å motvirke effektene av aldring, er det således viktig å forsyne huden med et aktivt middel som vil stimulere fibroblaster og hjelpe disse til å rekonstruere deres miljø/livsforhold. For å være anvendbar bør denne

20 effekt ikke ledsages parallelt av en økning i enzymatisk aktivitet av fibernedbrytning, særlig av kollagenase. Den bør heller ikke modifisere hudens naturlige funksjoner.

25 Man har nå funnet at komponentene eller ekstraktene som er i stand til å stimulere IL-6 produksjon ved humane keratinocytter in vivo utgjør "aktive midler" som kan anvendes for framstilling av kosmetiske preparater, og mer spesielt har man funnet at kosmetiske preparater som

30 inneholder en forbindelse som er i stand til å stimulere IL-6 produksjon ved humane keratinocytter in vivo kan anvendes for å reorganisere hudvevet uten interferering med de naturlige funksjoner derav. Forbindelsene med stimulerende aktivitet på IL-6 gjennom humane

35 keratinocytter, også i det etterfølgende betegnet "aktive midler", er kjent til å kunne indusere en virkning per se på stimuleringen av keratinocyttoproliferasjon (autokrin

virkning av IL-6 på keratinocytter som er beskrevet i litteraturen).

Forbindelsene med stimulerende aktivitet på IL-6 gjennom humane keratinocytter er imidlertid blitt vist til å kunne indusere, via deres virkning på fibroblasten, en økning i tonisiteten av denne celledermale livsforhold. Disse forbindelser induserer til og med en lett økning i antallet kollagenfibre, uten økning i kollagenaseaktivitet.

Et første formål med den foreliggende oppfinnelse vedrører således en stamme *Rhodotorula* SEBR 2002, som er kjennetegnet ved at den er deponert ved the C.N.C.M. of the Pasteur Institute under deponeringsnummer I 1844, og mutanter derav.

Oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av et aktivt middel med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter, som er kjennetegnet ved at en stamme ifølge oppfinnelsen og som er angitt i krav 1 dyrkes på et fermenteringsmedium og under konvensjonelle betingelser inntil oppnåelse av en stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter i fermenteringsmosten.

Oppfinnelsen vedrører også et preparat med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter, som er kjennetegnet ved at det er oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og som angitt i krav 2.

Et kosmetisk preparat som inneholder en forbindelse som er i stand til å stimulere interleukin-6 produksjon ved hjelp av humane keratinocytter in vivo blandet med en kosmetisk eksipiens er beskrevet.

Forbindelsen med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon, eller aktivt middel, som er inneholdt i det kosmetiske preparat, kan være en ikke-peptidforbindelse, et peptid, en ekstrakt av celler eller av vev av

5 planteopprinnelse, eller et produkt oppnådd ved fermentering av en mikroorganisme, for eksempel av en bakterie eller av en sopp eller mere spesielt av en gjær.

Egenskapene til stammen SEBR 2002 vil beskrives i det

10 etterfølgende, sammen med fremgangsmåten for oppnåelse av ekstrakten med stimulerende aktivitet på interleukin-produksjon ved hjelp av keratinocytter.

Stamme

15

Funn

Organismen som danner ekstraktene med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved humane keratinocytter i

20 henhold til dette spesielle aspekt av den foreliggende oppfinnelse er en stamme av gjær som er isolert fra en oljefelt-vannprøve tatt fra et oljeboringssted i Loiret (Frankrike), som er blitt tildelt internt nummer SEBR 2002. En prøve av denne mikroorganisme ble deponert 11.

25 februar 1997 hos The C.N.C.M. of the Pasteur Institute, hvor den ble registrert under referansen I 1844.

De biokjemiske egenskaper til denne mikroorganisme er blitt bestemt på API 50 CH søyler (spesifikk for

30 sukkere), som selges av BioMérieux, og med den YT biologiske testen (spesifikk for gjær solgt av Biolog Inc. USA). Det er således blitt bestemt at denne mikroorganismen tilhører familien *Basidiomycetes*, slekter *Rhodotorula*.

35

Den er en polymorf mesofil gjær. Den utvikler seg bra ved 28°C på et YPG (gjærpeptonglukoseagar)

dyrkningsmedium, idet fargen på koloniene er orangerødt-lyserødt.

Denne organisme utviser egenskaper som gjør det mulig å
5 relatere den til arten minuta.

Denne gjærstamme *Rhodotorula* sp er som nevnt blitt deponert med The C.N.C.M. of the Pasteur Institute under deponeringsnummer I 1844. Dens produksjonsmutanter er
10 også et formål for den foreliggende oppfinnelse.

Isoleringen av denne nye stamme ble gjennomført ved å følge den konvensjonelle metoden som omfatter å fortynne en liten mengde vann av prøven til forskjellige
15 konsentrasjoner og utsprenge et lite volum av hver fortykning på overflaten av en Petri-skål som inneholder et nærings-agarmedium. Etter noen døgns inkubasjon ved 28°C, som gjør at mikroorganismene kan utvikle seg, blir det tatt ut prøver av de forskjellige kolonier
20 individuelt og disse ble sub-dyrket på næringsagarer for å oppnå mere rike kulturer derav.

Etter dyrking på næringsagarmedium og etter flere påfølgende sub-dyrkinger som gjør det mulig å oppnå en
25 rik og ren kultur av stammen av interesse, blir en batch 0 for konservering av stam-stammen, og deretter primære og sekundære batcher for utsåing, dannet.

For dette fremstilles en gjærsuspensjon idet man starter
30 fra en Petri-skålkultur på et næringsagarmedium og ved anvendelse av et utvinningsmedium idet dette medium inneholder en kryoprotektor for å sikre god levedyktighet av mikroorganismen under konserveringen ved frysing.

35 Den oppnådde gjærsuspensjonen fordeles i kryorør som konserveres ved -80°C: disse rør utgjør batch 0.

Deretter, fremdeles i henhold til samme prosedyre, fremstilles en andre batch for utsåing som fremstilles ved å utgå fra et kryorør av den primære utsåingsbatch.

- 5 Fremstillingen av utsåingsbatcher 0, 1 og 2 sikrer lengevirkende tilgang til stammen og således til ønsket aktivitet.

Fremgangsmåte

10

Fremgangsmåten for fremstilling av ekstraktene med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved hjelp av humane keratinocytter omfatter dyrking av denne nye stamme I 1844, eller dens produksjonsmutanter, på et
15 medium og under passende dyrkingsbetingelser, og deretter med ekstrahering av den aktive fraksjonen.

Den aktive fraksjonen kan være i biomassen eller i supernatanten.

20

Fermetering

- Dyrking av stammen I 1844 kan gjennomføres ved hjelp av en hvilken som helst aerob dyrkingsmetode. For dette
25 formål anvendes forskjellige maskintyper som er vanlig anvendt innen fermenteringsindustrien. Den etterfølgende fremgangsmåte kan særlig velges for å gjennomføre prosedyren.

30 Dyrking i kolbe

- Ved anvendelse av den sekundære utsåingsbatch, blir Petri-skåler sådd og etter inkubasjon i fra to til tre døgn oppnås en gjæringsuspensjon som anvendes for utsåing i
35 omrørte Erlenmeyer kolber som inneholder et passende medium. Den omrørte kolbe kan også inokuleres direkte med et rør av utsåingsbatchen. Dyrking i kolbe med omrøring kan vare fra ett til tre døgn.

Dannelse av aktivitet observeres ved å ekstrahere den oppnådde biomasse ved filtrering eller sentrifugering med organiske løsningsmidler.

5

Rett fra første dyrkingstrinn i kolber kan det være fordelaktig å gjennomføre to påfølgende dyrkingstrinn: et første trinn for å formere cellene og propagere biomassen, og et andre trinn for produksjon. I dette sistnevnte tilfellet er en varigheten på ett eller to dogn tilstrekkelig for det første trinn.

Aktiviteten av stimulering av IL-6 produksjon ved hjelp av humane keratinocytter som er inneholdt i biomasseekstrakten av kulturene uttrykkes ved en stimuleringsindeks eller faktor, betegnet SI_{IL-6} (SI), som beregnes ved hjelp av forholdet mellom mengdene IL-6 dannet ved induksjon ved hjelp av ekstraktene og den målte basalverdi (ikke-indusert):

20

$$SI_{IL-6} = \frac{\text{Indusert IL-6 produksjon}}{\text{Basal IL-6 produksjon}}$$

En biomasseekstrakt betraktes til å være aktiv når, som bestemt ved 1°/oo sluttkonsentrasjon med hensyn til den tørre ekstrakt, på SVK 14 keratinocytter, den gir en SI mellom verdiene 1, 2 og 6, foretrukket fra 1,5 til 4,5.

25

En liter kultur gjør det mulig å oppnå omtrent fra 10 til 50 ml ekstrakt som har en stimuleringsindeks på mellom 1,5 og 4,5 for en 100-ganger fortynning (1/100).

30

Den ønskede aktivitet kan oppnås ved å ekstrahere biomassen fra kolbekulturene men, for å oppnå den ønskede aktivitet i en større mengde, viser det seg å være fordelaktig å fremstille en fermentorkultur og deretter ekstrahere dens biomasse.

35

Fermentordyrking

Fermentoren inokuleres med en 1 - 2 døgns gammel
rystekolbekultur, idet det er foretrukket at kulturen
5 fremdeles er i den eksponensielle fase.

I en fermentor, avhengig av de anvendte
dyrkingsbetingelsene, kan aktiviteten observeres helt fra
de første timer med dyrking, men det er fordelaktig å
10 vente til man oppnår den stasjonære vekstfase før
ekstraksjonen finner sted. Fermentordyrking av I 1844
gjør det mulig og bedre kontrollere dyrkingsbetingelsene
som er beskrevet i det etterfølgende for eksempel pH og
gjennomlufting.

15 Den stimulerende aktivitet gjennom keratinocytter oppnådd
i en fermentor kan variere avhengig av de anvendte
dyrkingsbetingelser. En liter kultur gjør det mulig å
oppnå, etter ekstraksjon av biomassen, omtrent 50 ml
20 ekstrakt med en SI på mellom 1,5 og 4,5 for en 100-ganger
fortynning (1/100).

Dyrkingsbetingelser

25 Dyrkingsmediet som anvendes i fermenteringsmetoden bør
inneholde minst en karbonkilde som kan være assimilert,
en nitrogenkilde som være assimilert og mineralelementer.
Som karbonkilder som kan være assimilert, kan det for
eksempel anvendes karbohydrater som glukose, mannose,
30 maltose, dekstriner, glycerol, aminosyrer og proteiner.

Som karbonkilder som kan være assimilert kan man også
anvende eddiksyre, suberinsyre, sitronsyre, propionsyre,
ravsyre og 2-ketogklutarsyre, eller animalske oljer eller
35 planteoljer.

De beste nitrogenkilder som kan være assimilert finner
man blant proteiner, peptoner og aminosyrer. Disse

kilder omfatter for eksempel kasein, laktalbumin og gluten, og hydrolysatene derav, fiskemel, gjærekstrakter eller peptoner.

- 5 Biomasseproduksjonen kan økes ved å tilsette, under dyrking, den ene eller den andre av disse to vesentlige substrater.

10 Blant mineralelementene som tilsettes til dyrkingsmediet for å sikre mikroorganismevekst og for å optimalisere assimileringen av karbon- og nitrogenkildene ved hjelp av mikroorganismecellene, kan man nevne kalium-, natrium-, jern-, magnesium-, kalsium - eller mangansalter, såvel som fosfoforbindelser som fosfater og sporelementer.

15 Kulturen omrøres og gjennomluftes i en tid som varierer mellom 10 timer og 60 timer, som gjør det mulig å oppnå fordelaktige resultater.

20 pH i dyrkingsmediet holdes foretrukket ved lett sur verdi, og den optimale inkubasjonstemperatur er mellom 23°C og 38°C, idet det foretrukne området er fra 25°C til 33°C.

25 Dyrkingsbetingelsene som mediets sammensetning og pH i mediet, inkubasjonstemperaturen, omrøringshastigheten og fermenterings-lufttilførselen kan variere innen vide grenser, og velges for å oppnå de best mulige resultater.

30 **Ekstraksjon**

Dannelsen av den aktive ekstrakt som utviser en stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter krever en rekke ekstraksjonstrinn.

35 Et første trinn omfatter å separere biomassen fra resten av mediet og for dette er det mulig å anvende sentrifugering, tangential mikrofiltrering, filtrering

ved hjelp av en roterende trommel eller en annen metode som passende anvendes av fagkyndige på området for å separere biomassen fra et fermenteringsmedium. Biomassen bringes deretter i kontakt, i noen få timer, med en
5 blanding av løsningsmidler som gjør det mulig å ekstrahere molekyler av hydrofob natur.

Den foretrukne varighet av denne kontakt er over natten, det vil si omtrent 15 timer.

10

Biomassen og den mettede organiske fase separeres deretter ved frontal filtrering, og deretter fjernes biomassen. Den organiske fase avdampes deretter under vakuum ved en temperatur fra romtemperatur til 50°C inntil
15 det oppnås en tørr ekstrakt.

Fremstilling av den aktive ekstrakt

Den tørre ekstrakten som således er oppnådd kan tas opp i
20 forskjellige løsningsmidler som konvensjonelt anvendes innen kosmetologi.

Opptagingskonsentrasjonen velges for å få fullstendig oppløsning av ekstrakten og for å være kompatibel med den
25 etterfølgende bruk.

Ekstrakten med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter innføres, i en andel av 5 til 10% tørre ekstrakt i henhold til aktiviteten, i en 50/50
30 (volum/volum) etanol/vann-blanding som utgjør det foretrukne løsningsmiddel ifølge oppfinnelsen. Dersom man ønsket pulver istedet for en oppløsning, kan den tørre ekstrakt simpelthen frysetørkes.

35 En analyse av stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter gjennomført på en prøvemengde av hver ekstrakt som er oppnådd gjør det mulig å evaluere

aktiviteten derav og verifisere reproduserbarheten av metoden.

For å fjerne spor av restbiomasse og for å sikre den
5 mikrobiologiske stabilitet, filtreres ekstrakten gjennom
en membran med en 0,2 µm ekskluderings-grenseverdi, og
fordeles aseptisk i sterile kolber. Den aseptiske
fremstilling av disse oppløsninger gjør det mulig å unngå
tilsetning av et conserveringsmiddel. Forskjellige
10 biologiske analyser ble gjennomført og gjorde det mulig å
vise at ekstrakten avledet fra denne nye mikroorganisme I
1844 har en svært verdifull stimulerende aktivitet på IL-
6 produksjon ved keratinocytter. Deres kraftige
aktivitet ble demonstrert i forskjellige analyser som
15 predikterer en reparasjon av de forskjellige skader
påført epidermis, og med en langsommere aldring av huden.

Karakteriseringen av den stimulerende effekt av
ekstrakten I 1844 på in vitro IL-6 syntese ved humane
20 keratinocytter er gjennomført som følger.

Ekstrakt I 1844 og anvendte produkter

Forskjellige prøver av ekstrakten I 1844 som ble avledet
25 fra forskjellige fermentor-dyrkinger gjennomført under
tilsvarende betingelser ble anvendt. Prøvene ble
oppbevart ved 4°C i en 50/50 (volum/volum)
etanol/vannblanding i en konsentrasjon på 0,1 g/g
tørrekstrakt, og deretter fortynnet til den ønskede
30 sluttkonsentrasjon på brukertidspunktet.

Referanseproduktet for induksjon av Il-6 syntese var LPS
(*E. coli* 055:B5) Sigma, som ble oppbevart ved -20°C i en
konsentrasjon på 10 mg/ml i PBS. PolymyxinB, som er en
35 LPS inhibitor, ble også oppnådd fra Sigma.

Fortynning av produktene

Produktene ble fortynnet i keratinocyt-inkubasjonsmediet (se nedenfor). Unntatt hvor annet er indikert, ble I 1844 ekstraktene fremstilt som indikert over evaluert ved sluttkonsentrasjon på 1°/∞ med hensyn til den tørre ekstrakt. LPS ble analysert ved en konsentrasjon på 10 µg/ml.

Evalueringsmodell

10 Celler

Den humane keratinocyt-linje som anvendes var SVK 14 linjen (J.Taylor-Papadimitriou et al., Cell. Differ., 1982, 11, 169-180) som ble holdt i kultur i DMEM medium inneholdende 4,5 g/l glukose, 100 mmol natriumpyruvat, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin og 10% føtalt kalveserum (FCS). For sammenligning, ble normale humane lymfocytter (PBMNC) som var renset på en Ficoll gradient, og som stammet fra friske frivillige, så vel som keratinocytter som stammet fra A 431 linjen (ATCC CRL 1555) og normale humane keratinocytter avledet fra plastisk brystkirurgi (Biopredic, Rennes), dyrket i det samme medium som det som er beskrevet i det foregående men som også inneholder 10 mg/ml EGF og 50 µg bovint hypofyseekstrakt.

Inkubasjon med produktene

For IL-6 induksjon utsås cellene in triplo i et sluttvolum på 200 µl ved en densitet på 5×10^4 celler/brønn i 96-brønns dyrkingsmikroplater. Etter inkubasjon i 24 timer ved 37°C i en atmosfære som inneholder 95% luft og 5% CO₂, fjernes mediet og erstattes med det samme volum medium med 1% FCS inneholdende produktene i konsentrasjoner som indikert. Etter ytterligere 18 til 24 timers dyrking, fjernes kultur-supernatanten fra hver in-triplo, samles og fryses ved -20°C inntil bestemmelsen av cytokininnholdet.

Cytokinanalyser

IL-6, IL-1 β , TNF α og IL-8 ble kvantifisert ved hjelp av
 5 ELISA prøvesett (R&D, Abington, UK). Hver supernatant
 ble evaluert in duplo i henhold til produsentens
 instruksjoner. Deteksjonsgrensen for disse analyser er 3
 pg/ml. I tillegg til den immunologiske analyse av
 proteinet ved hjelp av ELISA teknikken, ble den aktive
 10 form av IL-6 også evaluert ved hjelp av biologisk analyse
 på B9 murine hybridomaceller (L. Aarden et al.,
 Lymphokines, 1985, 10, 175-182).

Resultater

15 Resultatene uttrykkes enten i absolutt verdi av mengde av
 utskilte cytokiner (i p/ml protein for ELISA analysen
 eller U/ml for den B9 biologisk analyse av IL-6: idet en
 enhet er definert som mengden cytokin som induserer 50%
 20 av den maksimale B9 celleproliferative effekt), eller ved
 stimuleringsindeksen SI som definert i det foregående som
 beregnes til å være forholdet mellom indusert cytokin-
 produksjon og basal produksjon:

$$SI_{IL-6} = \frac{\text{Indusert IL-6 produksjon}}{\text{Basal IL-6 produksjon}}$$

25

Resultater

Ekstrakten med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon
 30 vil heretter simpelthen betegnes "ekstrakt I 1844".
 Nummeret til ekstrakten anvendt for hvert forsøk, så vel
 som konsentrasjonen derav, er indikert.

Virkning av ekstrakten I 1844 på keratinocyt IL-6
 35 **stimulering**

Ekstrakten I 1844 stimulerer SVK 14-keratinocyt IL-6 syntese på en konsentrasjonsavhengig måte. Ved å ha den gjennomsnittlige mengde basal IL-6 produsert + 3 SD ($11,8 + [3 \times 0,8] = 13,6$ pg/ml) som positivitetsgrenseverdien, stimulerer ekstrakten I 1844 IL-6 syntese signifikant ved og over konsentrasjoner i området 0,12% (SI = 1,23), og EC₅₀ er lik 0,25% og den maksimale effekt oppnås ved konsentrasjonen på 2% for hvilken IL-6 syntese stimuleres med en faktor på 2,3.

10

Studiet ble utvidet til en annen human keratinocytlinje (A 431 linje), så vel som til normale humane keratinocytter. Til forskjell fra det som ble observert på SVK 14 linjen, er ekstrakten I 1844 i stand til å stimulere IL-6 produksjon med en faktor som er større enn 2 både i en annen keratinocytlinje (A 431) og i en primær kultur av normale keratinocytter.

15

Effekten av ekstrakten I 1844 er således ikke begrenset til linjer, men kan generaliseres til normale celler.

20

Spesifisitet av effekten av ekstrakten I 1844

Spesifisiteten av effekten av ekstrakten I 1844 ble verifisert ved ulike nivåer som viser:

25

- at effekten ikke skyldes en kontaminering med bakteriell LPS, hvis kapasitet til å stimulere IL-6 produksjon er kjent, og at celler av lymfoid opprinnelse som også er i stand til å produsere IL-6 var ufølsomme overfor ekstrakten I 1844;
- at blant cytokinene som kan syntetiseres ved hjelp av keratinocytter, ble kun IL-6 produksjon stimulert under innvirkning av ekstrakten I 1844.

30

Tilstedeværelsen av polymyxin som er en LPS inhibitor modifierer ikke den induktive effekt av ekstrakten I 1844 på SVK 14-keratinocyt IL-6 produksjon, mens LPS-indusert stimulering logisk inhiberes av denne

35

forbindelse. Dette resultat indikerer at effekten som observeres med ekstrakten I 1844 ikke skyldes en kontaminering på grunn av et bakterielt endotoksin. I tillegg indikerer evalueringen gjennomført ved B9
5 bioassay at ekstrakt I 1844-stimulert IL-6 produksjon er biologisk aktiv.

Sammenligningsstudiet på ulike cellulære targeter viser at blodlymfocytter (PBMNC), til forskjell fra
10 keratinocytter, er ufølsomme overfor den stimulerende aktivitetseffekt av ekstrakten I 1844 på IL-6 produksjon. I motsetning til dette er LPS, som er i stand til å stimulere begge celletyper, effektiv i begge tilfeller. Dette studium viser således at ekstrakten I 1844
15 stimulerer keratinocytter uten å påvirke celler av lymfoid opprinnelse.

Endelig stimulerer ekstrakten I 1844 IL-6 syntese uten samtidig å øke nivået av IL-1, IL-8 eller TNF α . Blant
20 cytokinene er IL-8 av en spesiell natur siden den er i stand til, via sine kjemotaktiske egenskaper, og lokalt rekruttere nøytrofile polynukleære celler. Det spiller således en viktig rolle i forbindelse med inflammasjon. Ekstrakt I 1844 stimulerer IL-6 produksjon uten å øke
25 produksjonen av andre cytokiner som studeres.

Denne gruppe av data: fravær av LPS effekt, target-retting av kun keratinocytter og IL-6 begrenset stimulering, gjør det mulig å konkludere med at
30 virkningen av ekstrakten I 1844 er spesifikk og at der ikke er noen pro-inflammatorisk effekt.

Ekstrakten I 1844 stimulerer således på reproduserbar måte keratinocyt IL-6 produksjon. Denne effekt
35 observeres både på humane keratinocytter som er blitt etablert som linjer og på normale humane keratinocytter som er avledet fra primærkultur. Den egenskap som ekstrakten I 1844 har til å stimulere IL-6 syntese ved

keratinocytter er spesifikk. Den skyldes en egenskap som er spesifikk for ekstrakten I 1844 og ikke en eksogen kontaminering som bakteriell endotoksin, den berører ikke celler av lymfoid opprinnelse og, blant de testede
5 cytokiner, observeres den kun for IL-6: ekstraktens I 1844 spesifisitet er dobbel, både cellulær og molekylær. Karakteriseringen av den stimulerende aktivitetseffekt av ekstrakten I 1844 på keratinocytt IL-6 gjorde det mulig å definere IL-6 stimuleringsindekser på mellom 1,5 og 4,5
10 som et aktivitetskriterium for en hvilken som helst prøve evaluert på SVK-14 celler.

Karakteriseringen av effekten av ekstrakten I 1844 på kollagenfiberkontraksjon ble gjennomført som følger.

15

Formålet med dette studium er å teste effekten av ekstrakten I 1844 på kollagenfiberkontraksjon. En kollagengel fremstilt ved å blande fibroblaster og kollagen anvendes. Under innvirkningen av tensjoner
20 utøvet ved hjelp av cellene, organiseres kollagenet i fibrer. Dette fenomen kvantifiseres ved hjelp av kontraksjonen av gelen.

Cellelinjen som anvendes er MRC5 stammen, som er en
25 stamme av fibroblaster avledet fra human embryonal-lunge. Den dyrkes i BMS medium (Basal Eagle Medium) med Glutamax I inneholdende 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% fungizon og 1% NEAA (ikke-essensielle aminosyrer), Gibco.

30 Det anvendte kollagen er type I kollagen avledet fra rottehalesener, som en 2 mg/ml oppløsning i eddiksyre.

Fremgangsmåte for å oppnå gelene

35 Fremstilling av cellesuspensjonen

Etter trypsinbehandling av en MRC5 kultur oppnådd i en 75 cm² Petri-skål, fremstilles cellesuspensjonen i DMEM

inneholdende 10% FCS og antibiotika i en mengdeandel på 1×10^6 celler/ml, for å oppnå 500 000 celler pr. gel.

5 Fremstillingen av blandingen finner sted på is for å utsette geldannelse.

De forskjellige bestanddeler tilsettes med omrøring i den etterfølgende rekkefølge og mengdeandeler:

1,76 x DMEM	2,3 ml
Type I kollagen	1,5 ml
0,1N NaOH	0,25 ml
FCS	0,45 ml
Cellesuspensjon	0,5 ml

10

Denne godt homogeniserte blanding fordeles i en Petri-skål med diameter 5 cm (bakteriologisk type, NUNC) og inkuberes ved 37°C. Gelen dannes i løpet av 10 minutter. Gelen
 15 fjernes fra skålens vegg omtrent 2 timer senere ved anvendelse av et skalpellblad. Gelenes diameter måles deretter 24, 48 og 72 timer etter dannelse ved anvendelse av en linjal som er delt inn i millimeter.

20 **Behandling**

Ekstrakten I 1844 fortynnes i 1,76 x DMEM mediet under fremstillingen av gelen for å oppnå sluttkonsentrasjoner på 0,1%, 0,2% og 0,5%. En fenoloppløsning med en sluttkonsen-
 25 trasjon på 6,4 g/l anvendes som en kontraksjons-inhiberingskontroll.

Kvantitativ analyse

30 Ekstrakten I 1844 induserer ved og over konsentrasjonen på 0,1%, en signifikant økning i kontraksjon. Fenolen anvendt som en kontraksjonsinhiberingskontroll gir 0% kontraksjon.

De kvantitative analyser ved elektronmikroskopiobservering av de kontraherte geler etter 72 timer i nærvær og fravær av ekstrakten I 1844 viser aktive celler som synes å være i en proteinsyntesefase. Behandlingen med ekstrakten I 1844
5 synes ikke å modifisere antallet eller størrelsen av fibrene merkbart.

Ekstrakten I 1844 er effektiv ved og over en dose på 0,1%. Den øker fibroblastaktivitet som viser seg ved en økning i
10 kontraksjonen av kollagengelen og i antallet fibrer ved kun den høyeste konsentrasjonen.

Karakteriseringen av effekten av ekstrakten I 1844 på kollagenaseaktivering ble gjennomført som følger.

15 Formålet med dette studium er å teste effekten av ekstrakten I 1844 på kollagenase-aktivering. For dette anvendes en kollagengel fremstilt ved å blande fibroblaster og tritiumbehandlet kollagen. I dette miljø vil fibroblastene
20 reorganisere, remodulere og kontrahere kollagenet til å gi en dermal-type struktur. For dette danner fibroblastene kollagenase som frigjøres inn i kulturmediet i den latente form som kan aktiveres under innvirkningen av proteinaser. Kollagenaseaktiviteten måles ved dens kapasitet til å kutte
25 et tritiumbehandlet kollagensubstrat til oppløselige radioaktive peptider. Den latente kollagenase aktiviseres ved hjelp av trypsin behandlet med 1,1-tosylamid-2-fenyl-etylklormetylketon (TPCK). Cellelinjen som anvendes er MRC5 stammen, som er en stamme av fibroblaster avledet fra human
30 embryonal lunge. De dyrkes i BME medium (Basal Eagle Medium) med Glutamax I inneholdende 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 1% fungezon og 1% NEAA (ikke-essensielle aminosyrer) Gibco.

35 Det anvendte kollagen er type I kollagen avledet fra rotte-halesener som en oppløsning på 2 mg/ml i eddiksyre. Det tritium-merkede kollagen er i oppløsning på 0,3 mg/ml i

eddiksyre, og dets aktivitet er 0,06 mCi/ml (Dupont Net-660).

Fremgangsmåte for å oppnå gelene

5

Fremstilling av cellesuspensjonen

Etter trypsinbehandling av en MRC5 kultur oppnådd i en 75 cm² Petri-skål, fremstilles cellesuspensjonen i DMEM inneholder
10 10% FCS og antibiotika i en mengdeandel på 1×10^6 celler/ml.

Fremstilling av blandingen finner sted på is for å forsinke geldannelse.

15 De forskjellige bestanddeler tilsettes med omrøring i den etterfølgende rekkefølge og mengdeandeler:

2 x DMEM	400 µl
Tritium-merket type I kollagen	300 µl
0,1N NaOH	100 µl
FCS	100 µl
Cellesuspensjon	100 µl

20 200 µl av denne godt homogeniserte blanding fordeles i en 24-brønnsplate og inkuberes ved 37°C. Radioaktiviteten er 0,4 µCi/brønn.

En time senere avsettes 500 µl DMEM medium + 3% FCS i hver
25 brønn.

Hver 24 time i 7 døgn måles aktiviteten av den aktiverte og latente kollagenase. For dette fjernes 500 µl medium fra hver brønn og telles ved væskescintillasjon. 300 µl
30 oppløsning av trypsin/TPCK på 25 mg/ml i DMEM avsettes i hver brønn og inkuberes ved 37°C i 15 minutter. Virkningen av trypsinet stanses ved å tilsette 200 µl av en oppløsning

av trypsininhibitor på 100 mg/ml i destillert vann. 500 µl medium fjernes og telles ved væskescintillasjon. 500 µl medium + 3% FCS tilsettes igjen til hver brønn og platen får igjen inkubere i ytterligere 24 timer.

5

Ekstrakten I 1844 fortynnes i 2 x DMEM mediet under fremstilling av gelen for å oppnå sluttkonsentrasjoner på 0,1% og 0,5%.

- 10 Ekstrakten I 1844 modifierer ikke den totale kollagenase-aktivitet. På et gitt tidspunkt er de respektive andeler av latent og aktivert kollagenase ikke modifisert med hensyn til kontrollen, skjønt en økning i den latente kollagenase observeres over tid både i kontrollene og i de behandlede
- 15 prøver. Produktet bevirker ikke noen kollagenaseaktivering.

- For fremstilling av de kosmetiske preparater ifølge oppfinnelse, blir de således konstituerte I 1844 ekstrakter blandet med konvensjonelle fortynningsmidler og vandige og
- 20 ikke-vandige løsningsmidler som er forenelig med topisk anvendelse, så vel som med de aktive komponenter for det aktuelle preparat. Passende løsningsmidler og/eller fortynningsmidler vil velges i henhold til deres kapasitet til å overføre den aktive komponent i ekstrakten ifølge
- 25 oppfinnelsen til de epidermale og dermale hudstrukturer.

I 1844 ekstraktene ble også vist til å være fullstendig uten genotoksisitet i Ames og DNA-reparasjonsanalyser.

- 30 Deres stabilitet er kompatibel med deres anvendelse i kosmetiske preparater.

- De kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen inneholder ekstrakten I 1844 i prosentandeler fra 0,00001 vekt% til 5
- 35 vekt% regnet på preparatets totale vekt, blandet med eksipiensene som er vanlig anvendt for å fremstille kosmetiske formuleringer som skal påføres på huden.

De nevnte prosentandeler kan variere innen området som indikert i det foregående som en funksjon av den intrinsiske aktivitet til ekstrakten I 1844 inkludert i preparatet.

- 5 Nevnte ekstrakt I 1844 er foretrukket tilstede i prosentandeler fra 0,0001 vekt% til 2 vekt% regnet på preparatets totale vekt.

- 10 Ved fremstilling av preparatene ifølge oppfinnelsen blandes ekstrakten I 1844 med de konvensjonelle fortynningsmidler og vandige eller ikke-vandige løsningsmidler som er forenelige med anvendelse på huden, så vel som med andre komponenter i selve preparatet. Passende løsningsmidler og/eller fortynningsmidler velges i henhold til deres evne til å
15 avsette den aktive ekstrakt I 1844 ifølge oppfinnelsen på huden.

- Disse preparater inneholder generelt eksipienser eller tilsetningsstoffer som er valgt fra bestanddeler som
20 konvensjonelt anvendes i preparater som skal påføres lokalt, i henhold til behovet hos de spesielle formuleringer som man ser på.

- De kan for eksempel inneholde fortykningsmidler,
25 mykningsmidler, bløtgjørende midler, stabilisatorer, preserveringsmidler, antiskumm midler, surfaktanter, antioksydanter, fargestoffer og/eller pigmenter og/eller andre typer av fyllstoffer, duftmidler, silikoner og diverse fettsubstanser.

- 30 Ekstrakten I 1844 er alltid fra 0,00001 vekt% til 5 vekt%, foretrukket fra 0,0001 til 2 vekt% regnet på preparatets totale vekt, hvor nevnte mengde beregnes med hensyn til vekten av den tørre ekstrakt.

- 35 Preparatene ifølge oppfinnelsen omfatter foretrukket en ekstrakt av fermenteringsmosten av den nye stammen I 1844 i mengdeandeler, på en vekt/vektprosentbasis, som avhenger av

graden av aktivitet av den anvendte ekstrakt og således av konsentrasjonen av den tørre substans og av den spesifikke aktivitet til denne substans.

- 5 For å oppnå de kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen kan det være passende å anvende de urene ekstrakter som er oppnådd direkte fra fermenteringen uten noe rensetrinn, i mengdeandeler fra 0,00001 til 5 vekt%, fordelaktig fra 0,0001 til 2 vekt%, og særlig fra 0,001 til 2 vekt% med
10 hensyn til den totale vekt av preparatet, foretrukket fra 0,01 til 2 vekt% med hensyn til den totale vekt av preparatet.

- Disse vektprosentandeler er beregnet på grunnlag av vekten
15 av den fremstilte tørre ekstrakt. Mere spesielt inneholder preparatene ifølge oppfinnelsen mere eller mindre rensede ekstrakter som er oppløst og som kan oppnås ved fermentering av stammen *Rhodotorula* som er deponert hos The C.N.C.M. of the Pasteur Institute under deponeringsnummer I 1844, eller
20 en av produksjonsmutantene derav, med eksipiensers som normalt anvendes for utforming av denne type, slik som dem nevnt i det foregående.

- Formen på preparatene ifølge oppfinnelsen kan være en
25 emulsjon hvor bestanddelen eller blandingen av bestanddeler, med et eventuelt stabiliseringsmiddel, kombineres med eksipientene som for tiden anvendes i kosmetiske preparater og som er kompatible med de nevnte bestanddeler, som lanolin eller planteoljer, mineraloljer eller syntetiske oljer.

- 30 Preparatene ifølge oppfinnelsen kan også tilveiebringes i form av en gel i passende eksipiensers som celluloseestere eller andre geldannelsesmidler som akrylderivater og kan inneholde det aktive prinsipp i oppløst form eller
35 suspendert i mikrogranuler.

Preparatene ifølge oppfinnelsen kan også være i form av en lotion eller av en oppløsning hvor blandingen av bestanddeler er oppløst eller mikrodispergert.

- 5 Formen på prepratene ifølge oppfinnelsen kan således være en mikrodispersjon i en væske inneholdende vann, så vel som en eller flere kompatible surfaktanter. Dispersjonene utviser egenskapene til mikroemulsjoner, særlig transparensen og den lave viskositet, og har i praksis en opptreden som sanne
10 oppløsninger. De kan også fremstilles ekstemporært.

- En fordelaktig form av preparatene ifølge oppfinnelsen er et fluid som påføres topisk via en adhesiv bærer, som heretter betegnes "plaster", hvor dette plaster tillater en
15 kontrollert diffusjon av de aktive komponenter som eventuelt aktiveres ved hjelp av fysiske fenomener som elektriske mikrostrømmer.

- De kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen kan også
20 inneholde andre aktive komponenter som enten har en effekt av den samme type som den til kollagensyntesestimulatorer, kollagenase eller elastaseinhibitorer, vasoprotektorer eller produkter som kan bidra til å stimulere keratinocyttproliferasjon eller til å stimulere syntesen av
25 ekstracellulære matriksbestanddeler (kollagen, elastin, glykosaminoglykaner) eller produkter som er anvendbare i denne type av topisk preparat slik som cellefornyelsesakseleratorer, kollagenase- eller elastase-inhibitorer, vasoprotektorer, radikal-fjernere, aktive midler for å
30 gjenopprette hudbarrierefunksjon (ceramider, essensielle fettsyrer) eller fuktemidler.

- Preparatene ifølge oppfinnelsen utviser god stabilitet og kan oppbevares i ønsket tid for bruk ved temperaturer mellom
35 -10°C og 60°C uten at man har sedimentering av bestanddeler eller faseseparasjon, eller en nedgang i aktivitet som kan kompromittere bruken derav.

Disse preparater tolereres godt, de utviser ingen fototoksisitet og deres påføring på huden i forlengede perioder gir ingen bivirkninger.

- 5 Preparatene ifølge oppfinnelsen, i deres forskjellige presentasjonsformer, kan anvendes som preparater for å forebygge og/eller bekjempe hudaldring enten den er intrinsisk eller ekstrinsisk av natur, hovedsakelig aktinisk aldring i dette tilfellet.

10

De kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen som er utformet for anti-aldningsformål kan bringes i kontakt med epidermis eller håret eller hårsystemet for å modifisere utseendet derav og for å beskytte dem.

15

Det er vel kjent at fasthet er en essensiell kvalitet for å holde en hud ung. Den utgjør i realiteten et sant merke på cellevitalitet, og dens forsvinning betinger utviklingen av de andre tegn på aldring som dannelse av rynker eller fravær av utstråling.

20

- Så lenge som dermis opprettholder sin fulle densitet og en elastisk smidighet, forblir epidermis også glatt, smidig og svært tonisk. Hudaldring er et komplekst fenomen som begynner i ungdommen. Frie radikaler, genetiske faktorer og sol er noen av årsakene til dette, som imidlertid er mangfoldige og variable. Alle disse av hudens strukturer rammes på alle nivåer og over tid blir cellene færre i antall. De produserer et vev med dårligere kvalitet som taper den opprinnelige fasthet og elastiske natur.

25

30

- Det er blitt konstatert at metabolismen til epidermalceller avtar og at basallaget derav taper sin buktede form og blir rettlinjet. Den totale keratinocyttopulasjon går tilbake og hornlaget mister således dets effektivitet. I tillegg kontrollerer det vannavdamping dårlig. Det er også blitt konstatert av aktiviteten til fibroblaster, som utgjør nøkkelcellene av dermis, avtar ettersom årene går.

35

Kollagenet som dannes blir deretter fibrøst og rigid. Elastinsyntese går ned enda tidligere. Naturen til dermis endrer således tekstur, og den blir tynnere, kollapser og blir mindre resistent overfor musklernes sammentrekning.

5 Denne løshet danner sprekker som således utgjør rynkene.

Den glattende restruktureringsformel for de kosmetiske preparater i henhold til oppfinnelsen gjeninnsetter, på alle av hudens nivåer, det naturlige grunnlag for
10 fasthetsprosessen.

De responderer på hudens umerkelige mikrotransformasjoner som resulterer i hudens tap av fasthet, elastisitet og ungdommelighet.

15

De kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen er også beregnet på moden hud for hvilke de utgjør en anti-aldningspleie. Ekstrakten I 1844 virker da på hudens rekonstruksjonsfaktor, og gjenetablerer således både dens
20 strukturelle (fasthet og tonisitet) og superfisielle (komfort og utstråling) eller dype (fasthet og tonisitet) og overflate (utstråling og komfort) fysiologiske balanse. De vitaliserende eller restrukturerende kosmetologiske preparater ifølge oppfinnelsen kan henholdsvis anvendes i
25 løpet av dagen og/eller om natten.

De kosmetiske preparater kan også inneholde andre ytterligere aktive midler. De kan for eksempel være vitaminer eller midler mot skjønnhetsflekker.

30

Deres enestående restruktureringskvaliteter er også forsterket og amplifisert ved den synergistiske natur av en kombinasjon med for eksempel en marin planktonekstrakt. Den marine plankton-avledede ekstrakt gjør det mulig å sikre
35 optimal gjenutløsning av hudens fukteevne og fasthet.

Det er også mulig å anvende plantestimulerende midler som fruktekstrakter, som for eksempel epleplantestimulerende

midler som velges for deres anti-radikalegenskaper. De
utgjør spesielt aktive nye anti-radikalmidler som er rike på
flavoner, steroler, essensielle fettsyrer og vitaminer
inkluderende vitamin E. Huden beskyttes således maksimalt
5 mot farene med frie radikaler som spesielt dannes ved UV
stråler og stress.

Perfluoroljer kan også anvendes i de kosmetiske preparater
ifølge oppfinnelsen, og i tillegg er en egenskap med disse
10 perfluoroljer at de glatter ut de grove delene og
fordypningene i forbindelse med mikrolindring av hudens
struktur. De stryker ut linjer i ansiktet og bevirker
synlig forskjønnelse av hudoverflaten som sann "forming" av
ungdommelighet.

15 De kosmetiske preparater ifølge oppfinnelsen stimulerer
således epidermalcelle-fornyelse og kollagen- og
elastinproduksjon, sikrer optimal gjenutløsning av den
naturlige fukteprosess og, i enda større grad, beskytter
20 huden fullstendig mot frie radikaler som utgjør en av hudens
essensielle faktorer med hensyn til aldring. Epidermis, som
gjenoppretter sin dynamikk, har således enda en gang en
bedre fuktighetsevne og huden fremstår som yngre, glattere
og mere tonisk. Linjene i spesielt ansiktet har trukket seg
25 tilbake i større grad og huden fremstår som restrukturert
fra innsiden, og er således synlig fastere.

Ekstrakten I 1844 som er inneholdt i de kosmetiske
preparater i det foregående virker på huden som et samlende
30 aktivt middel.

Kliniske forsøk ble gjennomført på 120 30 - 60 år gamle
kvinner. De testet kvalitetene på de kosmetiske preparatene
ifølge oppfinnelsen i 4 uker.

35 I 87% ble en synlig effektivitet av produktet med hensyn til
fasthet, glatthet og fuktighetsevne konstatert på deres hud.
For 82% ble produktets omfattende kosmetiske kvalitet

verdsatt, som for eksempel enkel påføring, rask penetrering, totalt fravær av en fettaktig film, så vel som en følelse av velvære og av komfort.

- 5 Andre kliniske studier omfatter demonstrasjon av effektiviteten av de kosmetiske preparater ifølge oppfinnelse for å forbedre huden, på mikrofordypnings-nettverket, hudens biomekaniske egenskaper og dens luminositet.

10

Den serie som er spesifikk tiltenkt for moden hud gjorde det mulig å registrere at, med en dagpleie for følsom hud og tørr hud, oppnås en statistisk signifikant svekking av de fine linjer og av mikrolindring, en forbedring m.h.t.

- 15 skarphet og forekomst av mikrofordypnings-nettverket, såvel som en forbedring i hudtonisitet.

Dagpleie for normal hud og blandingshud viser en statistisk signifikant svekking av de fine linjer, en forbedring m.h.t.

- 20 skarpheten av mikrofordypnings-nettverket og en forbedring av hudtonisitet.

Antirynke-nattpleie og nattpleie for økt fasthet viste en statistisk signifikant svekking av de dype rynker, de fine linjer og mikrolindring, en forbedring m.h.t. skarphet og forekomst av mikrofordypnings-nettverket, og en forbedring av hudens fasthet og tonisitet.

25

Den regenererende dyptgående pleie viste en statistisk signifikant svekking av rynker og mikrolindring, en forbedring i skarphet og forekomst av mikrofordypnings-nettverket.

30

Disse forskjellige kliniske resultater ble bekreftet ved hjelp av forskjellige metoder som er vel kjent for fagkyndige på området innen kosmetologi, som for eksempel magnetresonanstomografi (MRI) mikroprobeteknikken som gjør det mulig å måle fuktighetsevne, transmisjonsmikroskopi for

35

å evaluere hud-rekonstitusjon, høyoppløsnings-ekkgografi for å måle hudtykkelse eller fosfor-31 spektrometri for å måle cellulær aktivitet.

- 5 En kosmetisk behandlingsmetode er også beskrevet som er kjennetegnet ved at en kosmetisk effektiv mengde av ekstrakten I 1844 i en vehikkel for kosmetisk anvendelse påføres epidermis og/eller håret eller hårsystemet.
- 10 De etterfølgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Eksempel 1

Fremstilling av en ekstrakt avledet fra stammen *Rhodotorula* I 1844.

15

1.1 Fermentering

Fermenteringen av stammen *Rhodotorula* I 1844 ble gjennomført på forskjellige dyrkingsmedier.

1.1.1.

a) Stammen formeres i Petri-skåler på et sub-dyrkingsmedium.

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	10 g
Trypton	10 g
Glukose	20 g
Agar	15 g
Renset vann q.s.	1 l

- Kulturen inkuberes i 48 timer ved 30°C. En gjærsuspensjon oppnås deretter ved å tilsette, til hver Petri-skål, 10 ml
- 25 av et passende utvinningsmedium med følgende sammensetning:

NaCl	9,00 g
KCl	0,42 g
CaCl ₂	0,48 g
NaHCO ₃	0,20 g
Glyserol	150,00 g
3-[N-Morfolino]propansulfonsyre	3,00 g
Renset vann q.s.	1 l

- b) 5 ml av denne suspensjon anvendes for å inokulere en 2 liters Erlenmeyerkolbe inneholdende 500 ml dyrkingsmedium med følgende sammensetning:

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	10 g
Peptonisert melk	20 g
Mais-uttrekk	10 g
Glukose	30 g
Sporelementoppløsning	10 ml
Renset vann q.s.	1 l

hvor sporelementoppløsningen inneholder de etterfølgende forbindelser:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
H_3BO_3	0,56 g
$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Renset vann q.s.	1 l

10

Kulturen får utvikle seg i 48 timer ved 30°C i en 2 liters Erlenmeyer kolbe med omrøring ved 150 opm.

15

1.1.2.

- a) 0,2 ml gjærsuspensjon fra den sekundære utsåingsbatch anvendes for å inokulere en 500 ml kolbe inneholdende 100 ml dyrkingsmedium med følgende sammensetning:

20

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	20 g
Trypton	20 g
Glukose	20 g
Sporelementoppløsning	10 ml
Renset vann q.s.	1 l

Sporelementoppløsningen er identisk med den som
 5 er beskrevet i eksempel 1.1.1.

Kulturen får utvikle seg i 24 timer ved 30°C med
 omrøring ved 200 opm.

10 b) 100 ml av kulturen oppnådd i det foregående
 anvendes for å inokulere en 20 liters fermentor som
 inneholder 12 liter medium i sammensetninger identisk
 med det angitt i eksempel 1.1.1.b, hvortil det
 tilsettes 1 ml/l Struktol.

15

Kulturen får utvikle seg ved 30°C med en luftgjennom-
 strømningshastighet på 1 vvm og ved varierende
 omrøring for å opprettholde et trykk av oppløst
 oksygen på 30%. pH innstilles til 5,0 med ammoniakk.

20

Etter 25 timer tilsettes en konsentrert
 glukoseoppløsning for å opprettholde vekst. Dyrkingen
 stanses på vekstplatået etter 32 timer.

25 **1.1.3.**

100 ml av en kolbekultur omrørt på samme måte som i
 eksempel 1.1.2. fremstilles og denne kultur anvendes
 for å inokulere en 20 liters fermentor som inneholder
 12 liter dyrkingsmedium med følgende sammensetning:

30

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	20 g
Trypton	20 g
Glukose	30 g
Sporelementoppløsning	10 ml
Struktol	1 ml
Renset vann q.s.	1 l

Sporelementoppløsningen er identisk med den som er beskrevet i eksempel 1.1.1.

5

Kulturen utvikles under de samme betingelser som i eksempel 1.1.2.b.

Etter 31 timer tilsettes en konsentrert
10 glukoseoppløsning for å opprettholde vekstfasen.
Dyrkingen stanses på vekstplataet etter 34 timer.

1.1.4.

Fire 2 liters omrørte kulturer i kolbe fremstilles
15 inneholdende 500 ml medium med samme sammensetning som
i eksempel 1.1.2.a.

De fire kolbene inokuleres hver med 0,75 ml pr. kolbe
av en gjærsuspensjon fra den sekundære utsåingsbatch.
20 Kulturene får utvikle seg i 24 timer ved 30°C og 200
opm. De samles deretter for å inokulere en 450 liters
fermentor som inneholder 230 liter medium med følgende
sammensetning:

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	30 g
Trypton	20 g
Roferose	30 g
Sporelementer	10 ml
Struktol	1 ml
Renset vann q.s.	1 l

Sporelementoppløsningen er identisk med den som er beskrevet i eksempel 1.1.1.

Kulturen får utvikle seg ved 30°C med en luftgjennomstrømningshastighet på 1 vvm og idet omrøringen varieres for å opprettholde et trykk av oppløst oksygen nær opp til 30%.

pH innstilles til 5,5 med ammoniakk og etter 30 timer tilsettes en konsentrert glukoseoppløsning for å opprettholde vekstfasen.

Dyrkingen stanses på vekstplatået etter 37 timer.

1.1.5.

0,75 ml av en gjærsuspensjon fra den sekundære utsåingsbatch anvendes for å inokulere hver av seks 2 liters kolber inneholdende 500 ml dyrkingsmedium med følgende sammensetning:

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	20 g
Kaseinhydrolysat	20 g
Glukose	20 g
Sporelementer	10 ml
Renset vann q.s.	1 l

Sporelementoppløsningen er identisk med den som er beskrevet i eksempel 1.1.1.

Kulturen får utvikle seg i 24 timer ved 30°C med omrøring ved 220 opm.

De seks kolbene samles deretter for å inokulere en 450 liters fermentor som inneholder 300 liter medium med følgende sammensetning:

Autolysat av <i>Saccharomyces cerevisia</i>	30 g
Kaseinhydrolysat	20 g
Glukose	20 g
Sporelementer	10 ml
Struktol	1 ml
Renset vann q.s.	1 l

Sporelementoppløsningen er identisk med den som er beskrevet i eksempel 1.1.1.

- 5 Kulturen får utvikle seg ved 30°C med luftgjennomstrømningshastighet på 1 vvm og med varierende omrøring for å opprettholde et trykk av oppløst oksygen nær 30%.
- 10 pH innstilles til 5,5 med ammoniakk og etter 35 timer tilsettes en konsentrert glukoseoppløsning for å opprettholde vekstfasen. Dyrkingen stanses på vekstplataet etter 40 timer.

15 **1.2 Ekstraksjon**

1.2.1

- Ekstraksjonen gjennomføres på 9 liter most oppnådd i henhold til eksempel 1.1.1. (18 2 liters kolber inne-
- 20 holdende 500 ml most).

Sentrifugering gjennomføres ved 9000 opm (14 000 g) i 10 minutter og 154 g av våt biomasse oppnås.

- 25 Denne biomasse bringes i kontakt med 6 liter diklometan/metanol (volum/volum) blanding ved romtemperatur med omrøring over natten.

- Biomassen fjernes deretter ved filtrering og den
- 30 organiske fase avdampes til tørrhet under vakuum ved 50°C.

Avdampingsresten (9,8 g) utgjør det tørre ekstrakt og dette oppløses på nytt i 112 ml metanol.

Den således oppnådde fraksjonen filtreres gjennom 0,2
5 μm og evalueres i den biologisk analyse med keratinocytstимулering, idet den utviser en stimuleringsindeks (SI) for keratinocytter på 1,9 når den er fortynnet 200 ganger (1/200).

10 **1.2.2.**

Ekstraksjonen gjennomføres i 12 liter kulturmost fra eksempel 1.1.2.

Den samme prosedyre som i eksempel 1.2.1. følges, men
15 ekstraksjonen gjennomføres på 1900 g våt biomasse som er oppnådd med 80 liter av en diklormetan/metanol (50/50) blanding. Det vil si ved anvendelse av et forhold mellom løsningsmiddelblanding og våt biomasse nær opp til 40 liter løsningsmiddelblanding pr. kg våt
20 biomasse.

Etter kontakt over natten fjernes biomassen ved filtrering og den organiske fase avdampes til tørrhet under vakuum ved 50°C. 98,3 g tørr ekstrakt oppnås
25 som tas opp med 375 g av 50/50 (volum/volum) etanol/vann- blandingen.

Den 0,2 μm filtrerte oppløsning som inneholder 0,2 g/g tørr ekstrakt som således er oppnådd utviser en
30 stimuleringsindeks (SI) på 2,1 for en 1/200 fortynning.

1.2.3

Ekstraksjonen gjennomføres på 11 liter kultur fra
35 eksempel 1.1.3. Den samme prosedyre følges som i eksempel 1.2.2., og 2,2 kg av den oppnådde våte biomasse ekstraheres med 80 liter av 50/50 (volum/volum) diklormetan/metanolblanding.

Biomassen fjernes deretter via filtrering og den organiske fase avdampes til tørrhet under vakuum ved 50°C.

5

98 g av den tørre ekstrakt oppnås som tas opp i en 392 g etanol/vann (50/50) (volum/volum) blanding for å oppnå en oppløsning som inneholder 0,2 g/g.

10 Etter filtrering gjennom 0,2 µm evalueres denne oppløsning i den biologiske keratinocytstimulerings-analyse idet den utviser en stimuleringsindeks (SI) på 2,8 for en fortynning på 1/200.

15 **1.2.4**

Ekstraksjonen gjennomføres på 12 liter kultur fremstilt på samme måte som eksempel 1.1.3., men i dette tilfellet anvendes en kontinuerlig sentrifuge for å separere biomassen. 1,6 kg våt biomasse oppnås
20 og denne biomassen behandles med 80 liter av 50/50 (volum/volum) diklormetan/metanol-blanding.

Etter kontakt over natten fjernes biomassen ved filtrering og den organiske fase avdampes til tørrhet
25 under vakuum ved 50°C.

83 g tørr ekstrakt oppnås som tas opp i 747 g av en 50/50 (volum/volum) etanol/vannblanding for å oppnå en oppløsning som inneholder 0,1 g/g tørr ekstrakt.

30

Den oppnådde oppløsning filtreres gjennom 0,2 µm og utviser en stimuleringsindeks (SI) på 3,5 fortynning på 1/100.

35 **1.2.5.**

Ekstraksjon av 230 liter kultur fra eksempel 1.1.3. gjennomføres og etter separering av biomassen med en kontinuerlig sentrifuge oppnås 29 g våt biomasse. 8

kg av denne biomassen behandles med 80 liter av en 50/50 (volum/volum) diklormetan/metanolblanding, det vil si ved anvendelse av et løsningsmiddelblanding/våtbiomasse-forhold som er nær opp til 10 liter løsningsmiddel-blanding pr. 1 kg våt biomasse.

Etter kontakt over natten fjernes biomassen ved filtrering og den organiske fase avdampes til tørrhet under vakuum ved 50°C.

Etter avdamping av den organiske fase oppnås 314 g tørr ekstrakt som tas opp i 286 g av en 50/50 (volum/volum) etanol/vannblanding.

Den således oppnådde oppløsning (0,1 g/g tørr ekstrakt) utviser en stimuleringsindeks (SI) på 2,8 for en fortykning på 1/100.

1.2.6

Ekstraksjon av 330 liter kultur fra eksempel 1.1.5. gjennomføres. Ved anvendelse av en kontinuerlig sentrifuge oppnås en 54,4 kg våt biomasse. 27,7 kg av denne biomassen behandles med 272 liter av en 50/50 (volum/volum) diklormetan/metanolblanding, det vil si ved anvendelse av et løsningsmiddelblanding/våtbiomasse-forhold nær opp til 5 liter løsningsmiddelblanding pr. 1 kg våt biomasse.

Etter kontakt over natten fjernes biomassen ved filtrering og den organiske fase avdampes til tørrhet under vakuum ved 50°C.

Etter avdamping av den organiske fase oppnås 1447 g tørr ekstrakt som tas opp i 13,023 g av en 50/50 (volum/volum) etanol/vannblanding for å oppnå en oppløsning som inneholder 0,1 g tørr ekstrakt. Etter filtrering gjennom 0,2 µm evalueres denne oppløsning i

den biologiske keratinocytstimuleringsanalyse, og den utviser en stimuleringsindeks på 2,6 for en fortynning på 1/100.

- 5 I de etterfølgende eksempler er mengdene indikert som vektprosentdelere.

Eksempel 2: Dagkrem for ansiktet

Karbomer	0,15
Trietanolamin	0,1
Propylenglykol	5
Xantangummi	0,2
Glycerol	3
Glycerylstearat	3
Peg stearat	2
Stearet-20	2
Oktylpalmitat	10
Cetylalkohol	2
Stearylalkohol	0,25
Perfluorolje	0,2
Kolesterol	0,5
Syntetisk bivoks	5
Dimetikon	5
Marin planktonekstrakt	0,5
Epleekstrakt	3
Bisabolol	0,5
Tokoferylacetat	1
Druekjerneekstrakt	0,5
Preserveringsmiddel	0,8
Duftmiddel	0,5
Ekstrakt I 1844	0,1
Demineralisert vann q.s.	100

Eksempel 3: Pleiekonsentrat for ansiktet

Butylenglykol	5
Karbomer	0,2
Trietanolamin	1
Polysorbat-60	0,8
Sorbitanstearat	0,6
Flytende petroleumsgel	2
Lanolin	0,3
Dipelargonat	5
Triglycerid	5
Cetylalkohol	0,25
Dikaprylat/Dikaprat	5
Glycerylstearat	3,00
Plantesterol	0,5
Dimetikon	0,5
Stearinsyre	2
Pantenol	0,5
Natriumhyaluronat	0,05
Bisabolol	0,1
Tokoferylacetat	1
Soyabønneekstrakt	0,5
Preserveringsmiddel	0,8
Duftmiddel	0,5
Ekstrakt I 1844	0,25
Demineralisert vann q.s.	100

Eksempel 4: Fluid emulsjon for ansiktet

Butylenglykol	5
Xantangummi	0,2
Glycerolstearat	1
Peg stearat	1
Triglycerid	5
Cetylalkohol	0,5
Titanoksyd	1
Dimetikon	3
Polyakrylamid	5
Ceramider	1
Pantenol	1
Natriumhyaluronat	0,05
Bisabolol	0,1
Tokoferylacetat	1
Preserveringsmiddel	0,7
Duftmiddel	0,5
Ekstrakt I 1844	0,15
Demineralisert vann q.s.	100

5 Eksempel 5: Lotion

Peg-32	5
Fosfatbuffer	0,5
Dimetikonkopolyol	5
Polysorbate-20	0,1
Polypropylenglykol	10
Marin planktonekstrakt	1
Epleekstrakt	5
Bisabolol	0,5
Tokoferylacetat	0,5
Hveteproteinekstrakt	2
Preserveringsmiddel	1
Duftmiddel	0,3

Ekstrakt I 1844	0,1
Demineralisert vann q.s.	100

Eksempel 6: Gel

Karbomer	1
Nøytraliseringsmiddel	0,25
Propylenglykol	5
Pantenol	1
Aloe-Vera ekstrakt	1
Kornblomstekstrakt	5
Gjærekstrakt	0,5
Hveteekstrakt	0,25
Natriumhyaluronat	0,01
Preserveringsmiddel	0,7
Ekstrakt I 1844	0,05
Demineralisert vann q.s.	100

5

Eksempel 7: Kremmaske

Karbomer	0,5
Trietanolamin	0,5
Sorbitanstearat	1,5
Peg stearat	3
Cetylalkohol	5
Planteolje	20
Titanoksyd	0,7
Glycerol	7
Tokoferol	0,75
Epleekstrakt	3
Bisabolol	0,5
Retinylpalmitat	0,5
Natriumhyaluronat	0,02
Preserveringsmiddel	1
Duftmiddel	0,3

Ekstrakt I 1844	0,1
Fargestoffer	
Demineralisert vann q.s.	100

Eksempel 8: Maske for avskylling

Akrylkopolymer	1
Trietanolamin	1
Glycerol	15
C14-C16 Olefinsulfonater	5
Peg eter og kokoat	2
Marin planktonekstrakt	1
Epleekstrakt	5
Soybønneekstrakt	0,5
Askobyfosfat	3
Silkeproteinekstrakt	2
Preserveringsmiddel	0,8
Duftmiddel	0,5
Ekstrakt I 1844	0,15
Demineralisert vann q.s.	100

5

10

15

20

25

PATENTKRAV

1. Stamme *Rhodotorula* SEBR 2002,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er deponert ved
the C.N.C.M. of the Pasteur Institute under deponerings-
nummer I 1844, og mutanter derav.
2. Fremgangsmåte for fremstilling av et aktivt middel med
10 stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratino-
cytter,
k a r a k t e r i s e r t v e d at en stamme som angitt
i krav 1 dyrkes på et fermenteringsmedium og under
konvensjonelle betingelser inntil oppnåelse av en
15 stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratino-
cytter i fermenteringsmosten.
3. Preparat med stimulerende aktivitet på IL-6 produksjon
ved keratinocytter,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er oppnådd ved
hjelp av fremgangsmåten som angitt i krav 2.
4. Preparat som angitt i krav 3, som er oppnådd ved
fremgangsmåten som angitt i krav 2 hvori biomassen
25 anvendes som sådan eller konsentrert.
5. Preparat som angitt i krav 3, som utviser en stimu-
lerende aktivitet på IL-6 produksjon ved keratinocytter
med en stimuleringsindeks SI på mellom 1,2 og 6.
30
6. Preparat som angitt i ett eller flere av kravene
3 - 5, som er oppnådd ved ekstraksjon av biomassen,
avdampning av løsningsmidler og vann, og fortynning av
den tørre ekstrakt i et løsningsmiddel som er forenlig
35 med kosmetisk anvendelse.