

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 7/48

A61P 17/16



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99804968.9

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1182833C

[22] 申请日 1999.2.3 [21] 申请号 99804968.9

[30] 优先权

[32] 1998.2.11 [33] FR [31] 98/01637

[86] 国际申请 PCT/FR1999/000220 1999.2.3

[87] 国际公布 WO1999/040896 法 1999.8.19

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.11

[71] 专利权人 圣诺菲 - 合成实验室公司

地址 法国巴黎

[72] 发明人 P·卡塞拉斯 J·-M·德罗克

J·-M·佩雷洛

审查员 何 瑜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 杨丽琴

权利要求书 1 页 说明书 28 页

[54] 发明名称 含有对白细胞介素 - 6 的产生具有
刺激活性的化合物的化妆组合物

[57] 摘要

本发明涉及一种化妆组合物, 其中含有混合了
制备化妆品用的赋形剂的至少一种具有刺激角质细
胞产生 IL - 6 活性的化合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种化妆组合物，其含有至少一种具有刺激角质细胞产生 IL-6 活性的发酵提取物，并混合有制备化妆品用的赋形剂，其中，具有刺激角质细胞产生 IL-6 的活性的发酵提取物是红酵母 SEBR 2002 菌株的发酵
5 提取物，所述红酵母菌株以 I 1844 的保藏号保藏于 Pasteur 研究所的 C. N. C. M。

2. 菌株红酵母 SEBR 2002，其以 I 1844 保藏号保藏于 Pasteur 研究所的 C. N. C. M。

3. 具有刺激角质细胞产生 IL-6 活性的发酵提取物在制造用于克服
10 皮肤老化的化妆组合物中的应用，其中，所述发酵提取物是红酵母 SEBR 2002 菌株的发酵提取物，所述红酵母菌株以 I 1844 的保藏号保藏于 Pasteur 研究所的 C. N. C. M。

4. 红酵母 SEBR 2002 菌株在制备具有刺激角质细胞产生 IL-6 活性的发酵提取物方面的应用，其中所述红酵母 SEBR 2002 以 I 1844 的保藏
15 号保藏于 Pasteur 研究所的 C. N. C. M。

5. 化妆处理方法，其特征在于，在表皮上涂敷化妆有效量的含在化妆用载体中的权利要求 1 所述的具有刺激产生 IL-6 活性的发酵提取物。

含有对白细胞介素-6的产生具有刺激活性的
化合物的化妆组合物

5 本发明涉及含有能够在体内刺激人角质细胞产生白细胞介素-6 (IL-6) 的活性化合物的化妆组合物。

在由细胞产生的各种广谱细胞因子中, 特定的刺激合成 IL-6 对于在化妆学中的应用具有特殊的意义。除了其对细胞和体液免疫的活化作用以外, IL-6 积极地参与到皮肤再生的机制中。在体外, IL-6
10 刺激胶原的合成以及角质细胞和成纤维细胞的增生。在体内, 在皮肤中过表达 IL-6 的转基因小白鼠皮肤中, 观察到角质层增厚。出现皮肤表层的这种增加而没有前炎症表现, 并且被认为反映了皮肤在防护局部损害方面的改善。由文献得到的这组数据表明, IL-6 促进修复在表皮出现的损伤和延缓皮肤老化。

15 可以参考 K. Yoshisaki 等细胞因子, 1990, 2, 381 ~ 387; R. M. Grossman 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6367 ~ 6371; Kirbauer 等免疫学杂志, 1989, 142, 1922 ~ 1928; K. Turken 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 5068 ~ 5072; J. Taylor-Papadimitriou 等细胞分化, 1982, 11, 169 ~ 180; L. Aarden 等淋
20 巴因子, 1985, 10, 175 ~ 182。众所周知, 在皮肤老化过程中, 一方面, 在表皮中角质层增厚, 但表皮生成减少, 而且在基底膜附近的细胞内聚力改变。因此, 重要的是要给皮肤提供一种活性剂, 以便有助于抗皮肤老化, 其中该活性剂能够刺激角质细胞的增生, 以造成表皮增厚。另一方面, 在真皮中, 负责构筑皮肤结构的细胞, 成纤维细胞
25 具有显著降低的活性, 其结果减少胶原、弹性蛋白和糖胺聚糖的合成。与此同时, 曝露在光线下的结果导致现有真皮纤维的加速降解(光化老化)。所有这些效果导致真皮结构破坏, 这样使皮肤失去其弹性、密实性和紧张性等机械性能, 促使皱纹出现。

因此, 为了克服老化作用, 重要的是给予皮肤一种活性剂, 它将
30 刺激成纤维细胞并有助于重新构筑其环境。为了使其有用, 此效果不应同时伴随着纤维降解的酶活性, 特别是胶原酶活性的增大。也不应该改变皮肤的天然功能。

现在已经发现，能够在体内刺激由人角质细胞产生 IL-6 的组分或提取物构成可以用于制备化妆组合物的“活性剂”，更具体地说，已经发现，可以将含有能够在体内刺激人角质细胞产生 IL-6 的化合物的化妆组合物用于重建皮肤组织，而不会干扰皮肤的天然功能。对人角质细胞产生 IL-6 具有刺激活性的化合物在后面也被称作“活性剂”，它们显示出能够诱导出尤其是对刺激角质细胞增生的作用（在文献中叙述的 IL-6 对角质细胞的自分泌作用）。

另外，对人类角质细胞产生 IL-6 具有刺激活性的化合物显示出能够通过其对成纤维细胞的作用，诱发此细胞真皮环境紧张性的增加。这些化合物甚至诱导胶原纤维数量的轻微增加，但不增加胶原酶的活性。

所以，本发明的第一个目的涉及一种化妆组合物，它含有能够在活体内刺激人类角质细胞产生 IL-6 的化合物，并混合有化妆赋形剂。

在此化妆组合物中所含有的对 IL-6 产生具有刺激活性的化合物，或活性剂可以是非肽化合物、肽、细胞提取物或植物来源的组织，或者是微生物比如细菌或蕈类，更具体是酵母发酵获得的产物。

下面将叙述 SEBR 2002 菌株特性，以及对角质细胞产生白介素-6 具有刺激活性的提取物的制备方法。

菌株

发现

按照本发明这个特定的方面，产生对人角质细胞产生 IL-6 具有刺激活性的提取物的生物是一个酵母菌株，它分离自在 Loiret（法国）的石油钻孔地点提取的油田水样，赋予其内部序号 SEBR2002。此微生物样品于 1997 年 2 月 11 日保藏于 Pasteur 研究所的 C.N.C.M.，登记号是 I 1844。

使用由 BioMérieux 销售的 API 50 CH 平台（对糖特异性的），以及通过 YT 生物学测试（对美国 Biolog 公司销售的酵母特异性的）测定此微生物的生化特性。鉴定出此微生物属于担子菌纲红酵母属（*Basidiomycetes, Rhodotorula*）。

它为多形、嗜常温酵母。在 28℃ 下的 YPG（琼脂酵母胨葡萄糖）培养基中发育良好，菌落的颜色是带橙色的桃红色。

此微生物显示使其可能与种相关的特性。

以序号 I 1844 保藏于 Pasteur 研究所 C. N. C. M. 的红酵母属菌株及其生产突变体也构成本发明的一个目的。

按照常用的方法进行此新菌株的分离，这包括将少量水样稀释到不同的浓度，将少量体积的稀释液铺至装有琼脂营养培养基的平皿上。在 28℃ 下培养几天以后，这使得这种微生物能够繁殖，分别取样各个菌落，并传代培养到营养琼脂上，如以获得更大量的培养物。

在琼脂营养培养基上培养和多次连续传代培养以后，这使得有可能得到大量而纯的感兴趣菌株的培养物，将贮存菌株保存为第 0 批，然后制备第一和第二种子批。

为此，由在营养琼脂培养基中的平皿培养物并使用恢复培养基制备酵母的悬浮液，此培养基含有低温保护剂，其能够在通过冷冻进行保存时保证微生物良好的成活力。

将得到的酵母悬浮液分配至保存于 -80℃ 的冷冻试管中：这些试管组成第 0 批。

按照同样的操作程序，但是是由第 0 批试管开始，制备第一级种子批。

然后，仍按照同样的操作程序，由第一级种子批的冷冻试管制备第二级种子批。

制备出 0、1 和 2 批保证了对菌株和由此的所需活性的长期获得。

方法

具有刺激人类角质细胞产生 IL-6 活性的提取物的制备方法包括在培养基中和在适当的培养条件下培养此新菌株 I 1844，或者其生产突变体，然后提取活性组分。

活性组分可在生物质中或在上清液中。

发酵

可以用各种需氧培养的方法进行菌株 I 1844 的培养。为此目的，使用在发酵工业常用的各种类型的设备。下面的方法尤其可用于进行此操作。

培养瓶培养

由第二批种子批，平皿接种，在培养 2~3 天后产生酵母悬浮液，其被用其来为装有适当培养基并带搅拌的锥形瓶接种。在带搅拌的锥形瓶中的培养可以持续 1~3 天。

5 通过用有机溶剂进行过滤或离心提取对得到的生物物质进行提取来观察活性的产生。

从在锥形瓶中的第一步培养步骤起，进行两个连续的培养步骤可能是有利的：第一步用于增殖细胞和繁殖生物物质，第二步用于生产。在后一种情况下，对于第一步，1~2 天的时间足够了。

10 在培养生物物质提取物中所含的刺激人类角质细胞产生 IL-6 的活性用称为 IS_{IL-6} (IS) 的刺激指数或因子来表示，其计算方法是用提取物诱导产生的 IL-6 的量与测量的基础水平（未诱导）的比值：

即：

$$IS_{IL-6} = \frac{\text{诱导的 IL-6 的产生}}{\text{基础的 IL-6 的产生}}$$

15 当在角质细胞 SVK 14 中相对于干提取物最终浓度为 1‰ 所测定的 IS 为值 1.2~6，优选为 1.5~4.5 时，则生物物质提取物被看作是有活性的。

1L 培养物可能得到大约 10~15mL 刺激指数为 1.5~4.5 的提取物，用于稀释到 1/100。

20 通过提取在瓶中的培养物的生物物质可以得到所需活性，但为了得到更大量所需活性，很明显最好先在发酵器中进行培养，然后从发酵生物物质中进行提取。

在发酵器中培养

25 用在搅拌的锥形瓶中培养 1~2 天的培养物给发酵器接种，优选培养物仍处于指数期。

在发酵器中，根据使用的培养条件，在培养开始数小时就可以观察到活性，但优选等到达到稳定增长期然后再进行提取。在发酵器培养 I 1844 使得能更好地控制将在下面说明的培养条件，如 pH 值和通风情况。

30 根据所应用的培养条件不同，在发酵器中得到的刺激角质细胞活性可以不同。1L 培养物在提取生物物质之后可以得到大约 50mL 具有 IS

值为 1.5 ~ 4.5 的提取物，用于稀释 100 倍（1/100）。

培养条件

在发酵方法中使用的培养基应该含有至少一种可同化的碳源、一种可同化的氮源和无机元素。作为可同化的碳源，可以使用比如碳水化合物，如葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、糊精、甘油、氨基酸和蛋白质。

作为可同化的碳源，还可以使用乙酸、环庚酸、柠檬酸、丙酸、琥珀酸和 2-酮戊二酸或动物油或植物油。

最好的可同化氮源在蛋白质、肽和氨基酸中找到。这些氮源包括比如，酪蛋白、乳清蛋白、谷蛋白及其水解物、鱼粉、酵母提取物或肽。

在培养的过程中，通过添加这两种主要物质中的一种和/或另一种，可以增加生物质的生产。

为保证微生物生长，以及使微生物细胞的碳源和氮源同化最优化而在培养基中添加的无机元素中，可以举出钾、钠、铁、镁、钙或锰的盐，以及磷化合物，如磷酸盐和痕量元素。

在 10 ~ 60 小时的时间内搅拌和向培养物通风，这样可得到优化的结果。

培养基的 pH 值优选保持微酸性值，最佳培养温度为 23 ~ 38℃，优选的范围是 25 ~ 33℃。

各种培养条件，比如培养基的组成和 pH 值、培养温度、搅拌速度以及发酵的通风情况等都可以在很宽的范围内变化，并被选择以获得最好的可能结果。

提取

得到具有刺激角质细胞产生 IL-6 活性的活性提取物需要许多提取步骤。

第一步包括将生物质与发酵汁的其余部分分开；为此可以使用离心、切向微过滤、旋转滚筒过滤或其它本领域技术人员常用分离生物质和发酵汁的方法。然后将生物质和可提取疏水性分子的溶剂混合物接触几个小时。

接触时间优选是过夜，即大约 15 小时。

然后通过正面过滤分离生物质和加入的有机相，除去生物质。

然后在环境温度~50℃的温度下真空蒸发有机相，直至得到干提取物。

5 制备活性提取物

可以将如此得到的干提取物溶解于在化妆品学中经常使用的各种溶剂中。

选择的溶解浓度使得提取物要完全溶解，并且要与最终的使用相容。

- 10 具有刺激角质细胞产生 IL-6 的活性的提取物，以根据活性是干提取物的 5-10% 的比例，将其加入到乙醇/水混合物 (50/50, v/v) 中，它组成了本发明优选的溶剂。如果希望得到粉末，而不是溶液，可以简单地将干提取物冷冻干燥。

- 15 对所得到的每种提取物的等份试样中进行的刺激角质细胞生产 IL-6 的活性的分析使得有可能可以估量其活性，并验证本方法的可重复性。

- 20 为了除去所有痕迹量的残留生物质并保证其微生物稳定性，在排阻阈为 0.2 μm 的膜上过滤提取液，并用无菌操作装在灭菌瓶中。此溶液的无菌制备能够避免加入防腐剂。进行了不同的生化实验，有可能证实了由此新微生物 I 1844 得到的提取物具有极有价值的刺激角质细胞产生 IL-6 的活性。在不同的实验中证实了其很强的活性，这表明可以修复对表皮引起的损伤，并延缓皮肤的老化。

I 1844 提取物在体内对人类角质细胞合成 IL-6 的刺激作用的鉴定如下面进行。

25

I 1844 提取物和使用的产物

在使用的类似条件下制备来自不同发酵培养物的不同 I 1844 提取物试样。样品在 4℃ 下保存在乙醇/水 (50/50, v/v) 混合物中，浓度是 0.1g/g 干提取物，然后在使用时稀释到所希望的浓度。

- 30 诱导 IL-6 合成的参考产物是脂多糖 LPS (*E. Coli* 055:B5) Sigma, 保存在-20℃, 浓度为 10mg/mL PBS. LPS 的抑制剂多粘菌素 B 由 Sigma 公司提供。

产物的稀释

在角质细胞培养基中稀释产物（参见下文）。除非另有说明，将如上面所述的方法制备的 I 1844 提取物在最终浓度相对于干提取物
5 为 1% 时进行评价。在 $10\mu\text{g/mL}$ 的浓度下测试 LPS。

评估模型

细胞

使用的人角质细胞系是在含有 4.5g/L 葡萄糖、100mmol 丙酮酸
10 钠、50U/mL 青霉素、 $50\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10% 的胎牛血清 (SAV) 的 DMEM 培养基中培养的 SVK 14 系 (J. Taylor-Papadimitriou 等, 1982, 11, 169~180)。作为比较，在与上面的叙述相同但还含有 10mg/mL 的 EGF 和 $50\mu\text{g}$ 牛垂体提取物的培养基中培养，在 Ficoll[®] 梯度上提纯并来自健康志愿者的正常人淋巴细胞，以及来自 A 431 系 (ATCC CRL
15 1555) 的角质细胞和来自乳房成形手术的正常人角质细胞 (Biopredic, Rennes)。

用产物培养

为了诱导 IL-6，以最终体积 $200\mu\text{L}$ 将细胞接种三份，在 96 孔
20 培养微平板上的密度为 5×10^4 细胞/孔。在 95% 的空气和 5% 的二氧化碳的气氛下，在 37°C 培养 24 小时以后，去除培养基并用相同体积含有如上所述浓度的产物的含 1% FCS 的培养基更换。再培养 18~24hr 之后，除去每组三份的培养物的上清液，收集，在 -20°C 下冷冻，直至测定其细胞因子含量。

25

细胞因子的检测

借助于 ELISA 分析试剂盒（英国，Abington 的 R & D 公司）定量 IL-6、IL- 1β 、TNF α 和 IL-8。按照制造者的说明书对每种上清液进行两次测定。这些检测的检出限是 3pg/mL。除了通过 ELISA 技术
30 对蛋白质的免疫分析以外，通过对鼠杂交瘤细胞 B9 的生物分析也检测了活性形式的 IL-6（见 L. Aarden 等 L 淋巴因子, 1985, 10, 175~182）。

结果的表示

结果表示为分泌的细胞因子的量的绝对值（对于 ELISA 分析为 pg/mL 蛋白质，或者对于 IL-6 的 B9 的生物分析为 U/mL：一个单位
5 被确定为诱导 50% 的 B9 细胞的最大增殖效果的细胞因子的量），或者表示为如前面所定义的刺激指数 IS，其被计算是诱导的细胞因子的产生与基础产生的比值：

$$IS_{IL-6} = \frac{\text{诱导的 IL-6 的产生}}{\text{基础的 IL-6 的产生}}$$

10

结果

在下面将把具有刺激产生 IL-6 活性的提取物简单称为 I 1844 提取物。指出了每次实验使用的提取物的序号及其浓度。

I 1844 提取物对刺激角质化细胞产生 IL-6 的影响

15 I 1844 提取物以浓度依赖的方式刺激角质化细胞 SVK 14 合成 IL-6。考虑将产生的基础 IL-6 的平均量 +3SD (11.8 + [3 × 0.8] = 13.6 pg/mL) 为正极限，在 0.12% 区域 (SI:1.23) 和以上的浓度时，I 1844 提取物显著刺激 IL-6 的合成，EC₅₀ 等于 0.25%，在浓度等于 2% 时得到最大的效果，对此 IL-6 合成的刺激因子为 2.3。

20 研究扩展到其它人角质细胞系（细胞系 A 431），以及正常人角质细胞。不象对 SVK 14 所观察的一样，无论是对另外的角质细胞系（A 431），还是对正常角质细胞的初次培养物，I 1844 提取物都能够以大于 2 的因子刺激产生 IL-6。

25 因此，I 1844 提取物的作用不被限制在这些谱系，也适用于正常细胞。

I 1844 提取物作用的特异性

通过下面证实了在不同水平 I 1844 提取物作用的特异性：

—作用不是由于细菌 LPS 的污染，其刺激产生 IL-6 的能力是已
30 知的，也能够产生 IL-6 的淋巴源的细胞，对 I 1844 提取物是不敏感的。

—在能够由角质化细胞合成的细胞因子当中，仅 IL-6 的产生是

受 I 1844 提取物的影响。

当 LPS 所诱导的刺激被多粘菌素合理地抑制时，LPS 抑制剂多粘菌素的存在不改变 I 1844 提取物对角质细胞 SVK 14 产生 IL-6 的诱导效果。这个结果表明，观察到的 I 1844 提取物的效果，并不因为细菌内毒素的污染而导致的。另外，对 B9 进行的评估表明，I 1844 提取物刺激产生的 IL-6 是有生物活性的。

对不同的细胞靶进行的对比研究表明，与角质化细胞相反，血淋巴细胞（PBMNC）对 I 1844 提取物刺激产生 IL-6 的活性作用不敏感。相反，能够刺激两类细胞的 LPS 在两种情况下都是有效的。所以此项研究表明，I 1844 提取物刺激角质细胞而对淋巴源细胞没有影响。

最后，I 1844 提取物刺激 IL-6 的合成而同时具有增加水平的 IL-1、IL-8 和 $\text{TNF-}\alpha$ 。在细胞素当中，IL-8 具有特殊的性质，因为就其趋化性来说它能够在局部水平上吸收多核中性白细胞。因此在炎症当中它起着重要的作用。I 1844 提取物刺激产生 IL-6 而不增加其它所研究的细胞因子的产生。

所有这些数据：不存在 LPS 效果、仅仅以角质细胞为靶细胞和限于刺激 IL-6，都让我们可以得出 I 1844 提取物作用是特异性的和不存在促炎症作用的结论。

因此，I 1844 提取物可以重复刺激角质细胞产生 IL-6。此作用在已建立细胞系的人类角质化细胞和来自初次培养的人正常角质细胞中被观察。I 1844 刺激角质细胞合成 IL-6 的性质是特异性的。这是由于 I 1844 提取物固有的特性决定的，不是由于细菌性内毒素类的外源污染，它不影响淋巴源细胞，并且在被试验的细胞因子中只对 IL-6 进行了观察：I 1844 提取物的特异性是双重的，同时有细胞特异性和分子特异性。I 1844 提取物的刺激角质化细胞产生 IL-6 活性效果的鉴定使得能够定义 1.5 至 4.5 之间的 IL-6 刺激指数作为对于所有基于 SKV 14 试样进行评估的样品的活性标准。

如下进行了 I 1844 提取物对胶原纤维收缩的作用的鉴定。

此项研究的目的是测试 I 1844 提取物对胶原纤维收缩的影响。使用通过将成纤维细胞和胶原混合制成的胶原凝胶。在由细胞所产生的张力作用下，胶原形成纤维。此现象由凝胶的收缩量化。

使用的细胞系是细胞系 MRC5，它是源于人胚胎肺的成纤维细胞的

一个菌株。在含有包含 10%SVF、1%的青霉素-链霉素、1%的两性霉素 B 和 1%的 NEAA（非必需氨基酸）Gibco®的 Glutamax I 的 BME 培养基（基础 Eagle 培养基）上进行培养。

使用的胶原是源于大鼠尾腱的 I 型胶原，为 2mg/mL 的醋酸溶液。

5

获得凝胶的方法

制备细胞悬浮液

在 75cm²的平皿中得到的 MRC5 培养物用胰蛋白酶处理后，以 1×10^6 细胞/ml 的比例，在含有 10%SVF 和抗菌素的 DMEM 中制备细胞悬浮液，以获得 500,000 细胞/凝胶。

在冰上制备混合物以使凝胶化延迟。

在搅拌下按照下面的顺序和比例加入各种组分：

DMEM 1.76X	2.3mL
I 型胶原	1.5mL
NaOH 0.1N	0.25mL
FCS	0.45mL
细胞悬浮液	0.5mL

将匀浆良好的此混合物分配在直径 5cm 的平皿中（细菌学类型，NUNC）并在 37℃ 下培养。在 10 分钟内形成凝胶。在大约 2 小时以后，借助于解剖刀片将凝胶从平皿壁上取下。借助于 mm 刻度尺，在形成以后 24、48 和 72 小时测量凝胶的直径。

处理

在凝胶产生期间，在 1.76X DMEM 培养基中稀释 I 1844 提取物，以得到最终浓度为 0.1%、0.2% 和 0.5%。使用最终浓度为 6.4g/L 的苯酚溶液作为收缩抑制对照。

定量分析

在浓度为 0.1% 或之上时，I 1844 提取物诱发收缩明显增加。被用作收缩抑制对照的苯酚产生 0% 收缩。

在有 I 1844 提取物存在和没有其存在下，72 小时以后，对收缩的凝胶进行电子显微镜观察所进行的定量分析显示出活性细胞，它们

看来处于蛋白质合成期。用 I 1844 提取物进行的处理似乎基本不改变纤维的数量或尺寸。

剂量为 0.1%或之上时, I 1844 提取物是有效的。它增加成纤维细胞的活性, 这表现为仅在最高浓度时胶原凝胶的收缩增强和纤维数
5 增多。

如下进行 I 1844 提取物对胶原酶活化的影响的鉴定。

此项研究的目的是测试 I 1844 提取物对胶原酶活化的影响。为此使用通过将成纤维细胞和氘化胶原混合而制备的胶原凝胶。在此环境下, 成纤维细胞将胶原重组、改型并使之收缩, 以产生真皮型结构。
10 为此, 成纤维细胞产生胶原酶, 其以潜在的形式释放至培养基中, 在蛋白酶作用下此潜在的形式可以被活化。以将氘化胶原底物消化为可溶的放射性肽的能力来测定胶原酶的活性。用被 1,1-甲苯磺酰胺-2-苯基乙基-氯甲基酮 (TPCK) 处理的胰蛋白来活化潜在的胶原酶。使用的细胞系是 MRC5 系, 它为源于人胎肺的成纤维细胞的细胞株。在
15 带有含 10%FCS、1%的青霉素-链霉素、1%的两性霉素 B 和 1%的 NEAA (非必需氨基酸) Gibco®的 Glutamax I 的 BME 培养基 (基础 Eagle 培养基) 上培养它们。

使用的胶原是源于鼠尾腱的 I 型胶原, 为 2mg/mL 醋酸溶液。用氘标记的胶原为 0.3mg/ml 的醋酸溶液, 其放射性是 0.06mCi/Ml (Du
20 Pont Net-660)。

凝胶的制备方法

制备细胞悬浮液

在用胰蛋白酶处理在 75cm²的平皿上得到的 MRC5 培养物后, 以 1
25 × 10⁶ 细胞/mL 的比例在含有 10%的 FCS 和抗菌素的 DMEM 中制备细胞悬浮液。

在冰上制备混合物以延迟凝胶化。

在搅拌下按下面的顺序和比例加入各组分:

DMEM 2X	400 μ L
氘化 I 型胶原	300 μ L
0.1N NaOH	100 μ L
FCS	100 μ L
细胞悬浮液	100 μ L

在 24 孔平板上分配 200 μ L 良好匀浆的此混合物,并在 37℃ 下培养。放射性是 0.4 μ Ci/孔。

1 小时以后,在每个孔中放入 500 μ l DMEM+3%FCS 培养基。

在 7 天内,每 24 小时测量活化和潜在胶原酶的活性。为此,在
5 每个孔中取出 500 μ L 培养基,通过液体闪烁计数。在每孔放入 300
 μ L 的 25mg/mL 胰蛋白酶-TPCK 的 DMEM 溶液,在 37℃ 下培养 15 分钟。
加入 200 μ L 的 100mg/mL 胰蛋白酶的蒸馏水溶液抑制剂在蒸馏水中的
100mg/mL 溶液终止胰蛋白酶的作用。取出 500 μ L 的培养基,通过液
体闪烁计数。在每孔中再加入 500 μ L 的 DMEM 培养基+3%FCS,将该板
10 再培养 24hr。

在凝胶产生期间,将 I 1844 提取物用 2 $\times$ DMEM 培养基稀释,以
得到最终浓度为 0.1%和 0.5%。

I 1844 提取物没有改变胶原酶的总活性。在给定的时间内,潜在
和活化胶原酶各自的比例与对照组没有变化,尽管随着时间的延长,
15 在对照组和处理样品观察到潜在的胶原酶的增加。该产物没有导致任
何胶原酶的活化。

在制备本发明的化妆组合物时,将如此构成的 I 1844 提取物与
和局部使用以及实际组合物活性成分相适应的常规稀释剂以及含水
或不含水溶剂相混合。适当的溶剂和/或稀释剂将按照其运载本发明
20 提取物活性组分至皮肤表皮和真皮中的能力进行选择。

本发明的 I 1844 提取物在 Ames 和 DNA 修补检测方面也显示出完
全不存在基因毒性。

其稳定性与在化妆组合物中的应用是相容的。

本发明的化妆组合物含有为组合物总重量的 0.00001%至 5% (重
25 量计) 的 I 1844 提取物,其与制备皮肤用化妆配方常用的赋形剂混
合。

作为在组合物中包含的 I 1844 提取物的固有活性的函数,所述

百分比可以在上述范围内变化。

相对于组合物的总重量，所述 I 1844 提取物的百分比优选为 0.0001%至 2%（重量计）。

5 在制备本发明的组合物时，将 I 1844 提取物与适合于皮肤应用以及组合物本身其它成分的常规稀释剂和含水或不含水溶剂混合。适当的溶剂和/或稀释剂根据其将本发明的活性 I 1844 提取物沉积至皮肤上的能力来选择。

此组合物一般含有赋形剂或添加剂，它们选自根据所设想的特定配方的必要性，用于局部施用的组合物中常用的成分。

10 它们可以含有例如增稠剂、软化剂、稳定剂、防腐剂、消泡剂、表面活性剂、抗氧剂、着色剂和/或颜料和/或其它类型的填料、香精、聚硅氧烷和各种脂肪物质。

相对于组合物的总重量，I 1844 提取物总是占 0.00001%至 5%（重量计），优选 0.0001%至 2%（重量计），所述量是以干提取物重量计。

15 本发明组合物优选含有新菌株 I 1844 的发酵液提取物，其基于重量/重量百分比的比例取决于所用提取物的活性程度，因此就取决于干物质的浓度和此物质的比活。

20 为了得到本发明的化妆组合物，通常可以使用从发酵直接得到的粗提取物，用不着任何的提纯步骤，其比例为相对于组合物的总重量为 0.00001%至 5%，优选 0.0001%至 2%，更优选 0.01%至 2%（重量计）。

此重量百分比自然是在制备的干提取物重量的基础上计算的。

25 更具体说，本发明的组合物含有或多或少提纯的提取物，它们被溶解并可通过发酵来自红酵母属的菌株获得，该菌株以号 I 1844 保藏于 Pasteur 研究所的 C.N.C.M，或者其生产突变体，同时含有通常用于此种制剂的赋形剂，如在上面叙述的那些。

本发明组合物的形式可以是乳液，其中的一种或几种组分的混合物，与任选的稳定剂一起，被与在化妆组合物中经常使用并与所述组分相容的赋形剂混合，这些赋形剂如羊毛脂、植物油、矿物油或合成油。

30 本发明组合物还可以以在适当的赋形剂中的凝胶形式提供，这些赋形剂如纤维素酯或其它凝胶化剂，如丙烯酸类衍生物，并可含有呈溶解形式或悬浮于微粒中的活性成分。

本发明的组合物也可以采取洗剂或溶液的形式，其中各组分的混合物是溶解或微分散的。

因此，本发明组合物的形式可以是一种在液体中的微分散液，其中该液体中含有水以及一种或几种相容的表面活性剂。这些分散液显示微乳液的特性，尤其是透明、低粘度，并实际上具有真溶液的外观。它们还可以即时配制。

本发明组合物一个有利的形式是借助于粘性载体局部施用的流体，在后面称之为“贴片”，此贴片使任选活化的活性组分受物理现象如微电流控制地扩散。

本发明的化妆组合物还可以含有其它活性组分，这些活性组分具有与合成胶原刺激剂、胶原酶抑制剂或弹性蛋白酶抑制剂、血管保护剂或有助于刺激角质化细胞增生、刺激超细胞基质组分（胶原、弹性蛋白、糖胺聚糖）的产品或可用于此类局部施用组合物的产品，比如细胞增长促进剂、胶原酶或弹性蛋白酶抑制剂、血管保护剂、防辐射剂、修复皮肤屏障功能的活性剂（神经酰胺、必需脂肪酸）或吸水剂等相同类型的作用。

本发明组合物具有良好的稳定性，可以在-10~60℃的温度下保存必需的时间以供使用，而没有组分的沉淀或产生相分离，或可损害其使用的活性的降低。

这些组合物有很好的耐受性，它们不具有任何光毒性，将其长时间施用于皮肤没有任何副作用。

为其不同存在形式的本发明组合物可以用作各种制剂，用来预防和/或对抗内因性或外因性皮肤老化，在此情况下主要是光老化。

设计用于抗老化目的本发明的化妆组合物可以与表皮或毛发系统接触，以改善其外观及对其进行保护。

众所周知，为了使皮肤年轻，紧密是重要的品质。实际上这构成了细胞生命力的真实的标志，其消亡就决定了其它老化迹象的演变，如起皱纹或缺乏光泽。

只要真皮保持住其充实的密度和柔软的弹性，表皮就仍然是光滑、柔软和很强壮的。皮肤的老化是一种复杂的现象，从很年轻时就开始了。自由基、遗传因素、太阳是其中几个原因，但它们又是多重和可变的。皮肤的整个结构在所有层次上受影响，而且随着时间细胞

数量减少。这导致组织的品质更差，失去了初始的结实和弹性性质。

已经观察到，表皮细胞的代谢变慢，其基层失去了曲折状，变成了方形的。角质细胞的总群体退化，因此角质层失去了其效果。再有，它还控制水的不良蒸发。还观察到构成真皮关键细胞的成纤维细胞的活性逐年减少。形成的胶原这时纤维化并变硬。弹性蛋白的合成甚至过早下降。真皮的性质如此改变了组织并变薄塌缩，变得不那么耐肌肉的牵拉。这样的松弛造成裂口，从而形成皱纹。

本发明化妆组合物重建光滑的方法是在所有皮肤的水平上为使皮肤结实的进程重新确立天然的基础。

这相当于对失去坚固性、弹性和青春的皮肤进行感觉不到的微观重建。

本发明的化妆组合物还用于成熟的皮肤，为其进行抗老化治疗。这时，I 1844 提取物对皮肤重建的因素起作用，因此重建其结构（坚固性和紧张性）与表面（舒适和光泽），或深处（坚固性和紧张性）与表面（光泽和舒适）的物理平衡。赋予生命活力和重建的本发明化妆组合物可分别在白天和/或晚上使用。

该化妆组合物还可以含有其它附加的活性剂。它可以为例如维生素或抗色斑剂。

与比如海洋浮游生物提取物一起使用的协同特性也增强和扩大其无与伦比的重建品质。源于海洋浮游生物的提取物可以保证皮肤的吸水和坚固性的最佳推进。

也可以使用植物刺激素，如水果提取物，例如苹果植物刺激素，由于其抗自由基特性而被选择。富含黄酮、胆固醇、基本脂肪酸和维生素，特别是维生素E的物质，它们构成了新型的特别能抗自由基的活性物。这时，皮肤能够最大限度地不受特别是由紫外线产生的自由基和应激的损害的保护。

在本发明化妆组合物中还可以使用全氟的油，此外这些全氟的油具有使皮肤的凹凸不平处和颗粒微突起部分变得光滑的性能。真实地“塑造”青春，这使我们重塑了容颜，在视觉上美化了皮肤表面。

因此，本发明的化妆组合物刺激了表皮细胞的更新和胶原和弹性蛋白的产生，保证了吸水天然进程的最佳实现，更完全地保护了皮肤不受自由基的侵害，而这是导致皮肤老化的主要因素。由于重新赋予

了活力，此时表皮重新获得了更好的吸水性，皮肤显得恢复了青春、更加光滑、更加结实。特别是面部的容颜更加整洁，皮肤仿佛被从内部重新塑造过，看起来更加结实。

在上述化妆组合物中所含有的 I 1844 提取物对皮肤的作用是作为聚集活性剂。

对 120 名 30 至 60 岁的妇女进行了临床试验。她们对本发明的组合物进行了四个星期的试验。

对于 87% 的人，观察到该产品对她们的皮肤在紧固性、光滑性和吸水性上有可见的效果。对于 82% 的人对此化妆品的性能给予好评，比如：容易涂敷、渗透迅速、完全没有油脂的膜，感觉良好、舒适。

其它的临床研究包括证实本发明组合物对皮肤突起、微凹陷网状物、皮肤的生物力学性能及其光泽的效果。

专门用于成熟皮肤的品种让我们观察到，在白天护理敏感及干燥的皮肤，使微皱纹、微突起得到明显稳定的缓和，整洁度和微凹陷网状物外观得到改善，皮肤的紧张度也得到改善。

夜间的抗皱纹/重建结实的护理对深皱纹、微皱纹和微突起都得到明显稳定的缓和，整洁度和微凹陷网状物的改善，对皮肤紧固性和结实度的改善。

强化再生护理对微皱纹和微突起显示出明显稳定的缓和，对整洁度和微凹陷网状物显示出改善。

化妆领域专业人员所熟知的各种方法都确认了这些不同的临床结果，比如磁共振图象（IRM）的微量探针技术能够测量吸水性；透射显微镜可以评价皮肤的重建；高分辨率超声回波描记术可以测量皮肤厚度，而磷 31 的分光光度计可以测定细胞活性。

本发明的再一个目标是化妆护理方法，其特征在于，在表皮和/或毛发系统上涂敷含在化妆品用载体中的具有化妆效果量的 I 1844 提取物。

下面的实施例说明本发明，但不对其构成限制。

实施例 1

制备源于红酵母 I 1844 菌株的提取物。

1.1 发酵

在传代培养基上进行红酵母 I 1844 菌株的发酵。

1.1.1

a) 将在平皿上的谱系移植到接种介质上。

啤酒糖酵母自溶产物	10g
胰蛋白胨	10g
葡萄糖	20g
琼脂	15g
纯水直至	1L

- 5 在 30℃ 下培养此培养物 48hr。然后在每个平皿中加入 10mL 具有下列组成的适当回收培养基，得到酵母的悬浮液：

NaCl	9.00g
KCl	0.42g
CaCl ₂	0.48g
NaHCO ₃	0.20g
甘油	150.00g
3-[N-吗啉基]丙磺酸 (MOPS)	3.00g
纯水适量直至	1L

b) 用 5mL 此悬浮液接种 2L 锥形瓶，内装 500mL 具有如下组成的培养基：

啤酒糖酵母自溶产物	10g
脓化的奶	20g
谷物浸渍液	10g
葡萄糖	30g
微量元素溶液	10mL
纯水至	1L

这里，微量元素溶液由如下的化合物组成：

FeSO ₄ ·7H ₂ O	1g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.025g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g
H ₃ BO ₃	0.56g
(NH ₄) ₆ Mo ₂₄ ·4H ₂ O	0.02g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
纯水适量直至	1L

在以 150rpm 的搅拌下，在 2L 的锥形瓶中，在 30℃ 下将培养物培养 48hr。

1.1.2

- 5 a) 使用 0.2mL 来自第二种子批的酵母悬浮液，给 500mL 装有 100mL 具有如下成分的培养基的烧瓶接种：

啤酒糖酵母自溶产物	20g
胰蛋白胨	20g
葡萄糖	20g
微量元素溶液	10mL
纯水适量直至	1L

微量元素溶液与实施例 1.1.1 中所述的相同。

在 200rpm 的搅拌下，在 30℃ 下将培养物培养 24hr..

- 10 b) 使用 100mL 如上面得到的培养物，给装有 12L 组成与实施例 1.1.1.b 所述相同的再加入了 1mL/L 的 Struktol® 的培养基的 20L 发酵器接种。

在 1vvm 通风速率下和变化的搅拌下，于 30℃ 下培养培养物，以使得保持 30% 的溶解氧的压力。用氨将 pH 值调节到 5.0。

在 25hr 后，加入葡萄糖浓溶液以使继续增长。

- 15 在 32hr 时，增长呈水平状时终止培养。

1.1.3. +

以与实施例 1.1.2. 相同的方式，在搅拌的瓶中制备 100mL 培养物，并使用此培养物为装有 12L 具有如下成分培养基的 20L 发酵器接种：

啤酒糖酵母自溶产物	20g
胰蛋白胨	20g
葡萄糖	30g
微量元素溶液	10mL
Struktol®	1mL
纯水适量直至	1L

微量元素溶液如在实施例 1.1.1 中所述。

在与实施例 1.1.2.b 相同的条件下培养此培养物。

在 31hr 时，加入葡萄糖浓溶液使继续增长。在 34hr 时，增长呈水平状时终止培养。

5

1.1.4

制备含与实施例 1.1.2.a 相同组成的培养基的 4 种 2L 搅拌锥形瓶培养物。

这 4 个锥形瓶每个都用 0.75ml 来自第二种子批酵母的悬浮液接种。在 30℃ 和 200rpm 下培养此培养物 24hr。然后将它们合并给装有 230L 具有如下组成的培养基的 450L 发酵器接种：

啤酒糖酵母自溶产物	30g
胰蛋白胨	20g
Roférose	30g
微量元素溶液	10mL
Struktol®	1mL
纯水至	1L

微量元素溶液与实施例 1.1.1 中所述相同。

在 1vvm 通风速率和变化的搅拌下，于 30℃ 下培养培养物，使得保持 30% 的溶解氧的压力。

15 用氨将 pH 值调节到 5.5，在老化 30hr 时加入葡萄糖浓溶液，以维持生长期。

在 37hr 时，当增长达水平时终止培养。

1.1.5

20 使用 0.75mL 来自第二种子批酵母悬浮液给包含 500mL 具有如下

组成的培养基的 6 个 2L 瓶子接种：

啤酒糖酵母自溶产物	20g
酪蛋白水解物	20g
葡萄糖	20g
微量元素溶液	10mL
纯水至	1L

微量元素溶液与实施例 1.1.1 中所述相同。

在 220rpm 的搅拌下，在 30℃ 下将培养物培养 24hr。

然后合并 6 个瓶以对含有 300L 具有如下组成的培养基的 450L 发

5 酵器接种：

啤酒糖酵母自溶产物	30g
酪蛋白水解物	20g
葡萄糖	30g
微量元素溶液	10mL
Struktol®	1mL
纯水至	1L

微量元素溶液与实施例 1.1.1 中所述的相同。

在 1vvm 通风速率和变化的搅拌下，于 30℃ 下培养培养物，使得保持约 30% 的溶解氧的压力。

用氨将 pH 值调节到 5.5，在 35hr 时，加入葡萄糖浓溶液，以维
10 持生长期。

在老化 40hr 时，当增长达水平时终止培养。

1.2 提取

1.2.1

15 用 9L 按实施例 1.1.1 (18 个装有 500mL 发酵汁的 2L 瓶子) 得到的发酵汁进行提取。

以 9000rpm (14,000g) 离心 10 分钟，得到 154g 湿的生物物质。

在室温和搅拌下将此生物物质与 6L 二氯甲烷/甲醇混合物 (v/v) 接触过夜。

20 然后过滤除去生物物质，在 50℃ 下将有机相真空蒸发至干。

蒸发的残渣 (9.8g) 就构成了干提取物，将其溶解于 112mL 甲醇

中。

在 $0.2\ \mu$ 的过滤器上过滤如此得到的级分，进行刺激角质细胞的生物测试，当其被稀释 200 倍时（1/200），对角质细胞的刺激指数（IS）为 1.9。

5

1.2.2

对 12L 实施例 1.1.2 的培养汁液进行提取。

按照与实施例 1.2.1 相同的操作程序，但是是在用 80L 的二氯甲烷/甲醇混合物（50/50）获得的 1,900g 湿生物物质中进行提取，即使
10 用的溶剂混合物/湿生物物质混合物的比例接近每 kg 湿生物物质 40L 溶剂混合物。

在接触过夜后过滤除去生物物质，在 50°C 下真空蒸发有机相。

得到 93.8g 干提取物，将其溶解于 375g 乙醇/水混合物（50/50， v/v ）中。

15 包含如此得到的 0.2g/g 干提取物在 $0.2\ \mu\text{m}$ 的过滤器上过滤后的溶液显示刺激指数（IS）是 2.1，用于稀释 1/200。

1.2.3

用 11L 实施例 1.1.3 的培养物进行提取。按照于实施例 1.2.2 相同的操作程序，用 80L 二氯甲烷/甲醇（50/50， v/v ）提取 2.2kg 得到的湿生物物质。
20

然后过滤除去生物物质，在 50°C 下真空蒸发有机相。

得到 98g 干提取物，将其溶解于 392g 乙醇/水（50/50， v/v ）混合物，以得到 0.2g/g 的溶液。

25 在 $0.2\ \mu\text{m}$ 的过滤器过滤后，评价此溶液的角质细胞刺激生物学测试；其显示刺激指数（IS）为 2.8，供稀释 1/200。

1.2.4

用与实施例 1.1.3 相同方式制备的 12L 培养物进行提取，但在此
30 情况下，用连续离心进行生物物质分离。得到 1.6kg 湿生物物质，用 80L 二氯甲烷/甲醇（50/50， v/v ）混合物处理此生物物质。

在接触过夜后，过滤除去生物物质，在 50°C 下真空蒸发有机相。

得到 83g 干提取物，将其溶解于 747g 乙醇/水混合物（50/50，v/v）中，以得到 0.1g/g 干提取物的溶液。

用 0.2 μ m 的过滤器过滤获得的溶液，如此得到的溶液的刺激指数（IS）是 3.5，用于稀释 1/100。

5

1.2.5

将 230L 的实施例 1.1.3 培养物进行提取，在连续离心分离生物物质后，得到 29kg 湿生物物质。用 80L 二氯甲烷/甲醇（50/50，v/v）混合物处理 8kg 此生物物质，即使用的混合溶剂/湿生物物质的比例接近于每 kg 湿生物物质 10L 混合溶剂。

10

在接触过夜后过滤除去生物物质，在 50℃ 下真空蒸发有机相。

在蒸发后得到 314g 干提取物的有机相，将其溶解于 2,826g 乙醇/水混合物（50/50，v/v）中。

如此得到的溶液（0.1g/g 干提取物）的刺激指数（IS）是 2.8，用于稀释 1/100。

15

1.2.6

将 330L 的实施例 1.1.5 培养物进行提取，借助于连续离心，得到 54.4kg 湿生物物质。用 272L 二氯甲烷/甲醇（50/50，v/v）混合物处理 27.7kg 此生物物质，使用的混合溶剂/湿生物物质的比例接近于每 kg 湿生物物质 5L 混合溶剂。

20

在接触过夜后过滤除去生物物质，在 50℃ 下真空蒸发有机相。

在蒸发后得到 1447g 干提取物的有机相，将其溶解于 13,023g 乙醇/水混合物（50/50，v/v）中，得到含 0.1g 干提取物的溶液。在过滤后，用 0.2g 这样的溶液进行评价其刺激角质细胞的生物学测试，其刺激指数（IS）是 2.6，用于稀释 1/100。

25

在下面的实施例中，给出的量是重量百分数。

30

实施例2 日用面霜

Carbomer	0.15
三乙醇胺	0.1
丙二醇	5
黄原胶	0.2
甘油	3
硬脂酸甘油酯	3
硬脂酸聚乙二醇酯	2
Steareth 20	2
棕榈酸辛酯	10
鲸蜡醇	2
硬脂醇	0.25
全氟油	0.2
胆固醇	0.5
合成 Abeille 蜡	5
聚二甲基硅氧烷	5
海洋浮游生物提取物	0.5
苹果提取物	3
红没药醇	0.5
醋酸生育酚酯	1
葡萄籽提取物	0.5
防腐剂	0.8
香精	0.5
I 1844 提取物	0.1
软化水至	100

实施例3 面用浓缩护理剂

丁二醇	5
Carbomer	0.2
三乙醇胺	1
聚山梨酸酯 60	0.8
硬脂酸缩水山梨糖醇酯	0.6
凡士林油	2
羊毛脂	0.3
[lacuna]Dipelargonate	5
[lacuna]甘油三酯	5
鲸蜡醇	0.25
[lacuna]二辛酸酯/二癸酸酯	5
硬脂酸甘油酯	3.00
植物甾醇	0.5
聚二甲基硅氧烷	0.5
硬脂酸	2
泛醇	0.5
透明质酸钠	0.05
红没药醇	0.1
醋酸生育酚酯	1
大豆芽提取物	0.5
防腐剂	0.8
香精	0.5
I 1844 提取物	0.25
软化水至	100

实施例 4 面用乳液

丁二醇	5
黄原胶	0.2
硬脂酸甘油酯	1
硬脂酸聚乙二醇酯	1
[lacuna]甘油三酯	5
鲸蜡醇	0.5
氧化钛	1
聚二甲基硅氧烷	3
聚丙烯酰胺	5
神经酰胺	1
泛醇	1
透明质酸钠	0.05
红没药醇	0.1
醋酸生育酚酯	1
防腐剂	0.7
香精	0.5
I 1844 提取物	0.15
软化水至	100

实施例 5: 洗剂

聚乙二醇 32	5
磷酸盐缓冲液	0.1
共聚二甲基硅氧烷	5
聚山梨酸酯 20	0.1
丙二醇	10
海洋浮游生物提取物	1
苹果提取物	5
红没药醇	0.5
醋酸生育酚酯	0.5
小麦蛋白质提取物	2
防腐剂	1
香精	0.3
I 1844 提取物	0.1
软化水至	100

实施例 6: 凝胶

Carbomer	1
中和剂	0.25
丙二醇	5
泛醇	1
羊角掌提取物	1
矢车菊提取物	5
酵母提取物	0.5
小麦提取物	0.25
透明质酸钠	0.01
防腐剂	0.7
I 1844 提取物	0.05
软化水至	100

实施例 7: 防护乳

Carbomer	0.5
三乙醇胺	0.5
硬脂酸缩水山梨糖醇酯	1.5
硬脂酸聚乙二醇酯	3
鲸蜡醇	5
植物油	20
氧化钛	0.7
甘油	7
泛醇	0.75
苹果提取物	3
红没药醇	0.5
棕榈酸视黄醇酯	0.5
透明质酸钠	0.02
防腐剂	1
香精	0.3
I 1844 提取物	0.1
着色剂	
软化水至	100

实施例 8: 漂洗面膜

丙烯酸类共聚物	1
三乙醇胺	1
甘油	15
C ₁₄₋₁₆ 烯烃磺酸盐	5
聚乙二醇醚和椰子酸酯	2
海洋浮游生物提取物	1
苹果提取物	5
大豆芽提取物	0.5
磷酸抗坏血酸酯	3
丝蛋白提取物	2
防腐剂	0.8
香精	0.5
I 1844 提取物	0.15
软化水至	100