

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A61K 7/40

(11) 공개번호   특1999-0077234  
(43) 공개일자   1999년10월25일

|               |                                                                                                                               |             |               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------|
| (21) 출원번호     | 10-1998-0705376                                                                                                               | (87) 국제공개번호 | WO 1997/25969 |
| (22) 출원일자     | 1998년07월14일                                                                                                                   | (87) 국제공개일자 | 1997년07월24일   |
| 번역문제출일자       | 1998년07월14일                                                                                                                   |             |               |
| (86) 국제출원번호   | PCT/US1997/00791                                                                                                              |             |               |
| (86) 국제출원출원일자 | 1997년01월17일                                                                                                                   |             |               |
| (81) 지정국      | EA 유라시아특허 : 벨라루스 러시아                                                                                                          |             |               |
|               | EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 스위스                                                |             |               |
|               | 국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 바베이도스 브라질 캐나다 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국 리투아니아 마케도니아 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 터어키 우크라이나 폴란드 루마니아 |             |               |
| (30) 우선권주장    | 588,771 1996년01월19일 일본(JP)                                                                                                    |             |               |
| (71) 출원인      | 더 유니버시티 오브 미시간                                                                                                                |             |               |
|               | 미국 48109 미시간주 앤 아버 알럼 2071 우버린 타워 사우스 스테이트 스트리트 3003                                                                          |             |               |
| (72) 발명자      | 부리스 존 제이                                                                                                                      |             |               |
|               | 미국 미시간주 48109-0314 앤 아버 타우만 헬스 케어 센터 1910 메디칼센터 디파트먼트 오브 더마톨로지 더 유니버시티 오브 미시간                                                 |             |               |
|               | 피셔 게리 제이                                                                                                                      |             |               |
|               | 미국 미시간주 48109-0528 앤 아버 이스트 캐더린 1301 룸 6558 빌딩크레스지 I 디파트먼트 오브 더마톨로지 더 유니버시티 오브 미시간                                            |             |               |
| (74) 대리인      | 나영환, 이상섭                                                                                                                      |             |               |

**심사청구 : 있음**

**(54) 피부의 광노화를 억제하는 방법**

**요약**

본 발명은 (1) 손상되지 않은 피부내의 UVB 조사 유도성 MMP 활성화, (2) 전사 인자 AP-1과 NF- $\kappa$ B중 어느 하나 또는 둘 모두, 또는 (3) AP-1을 구성하는 jun 단백질이나 fos 단백질의 활성화 및/또는 생성과 관련 있는 1종 이상의 GTP 결합 단백질이나 키나제중에서 1종 이상을 억제하는 제제를 투여하여 UVB 조사 노출 시 손상되지 않은 피부의 광노화를 억제하는 방법에 관한 것이며; 또한, 전술한 바와 같은 노출 이전에 상기 억제제를 피부에 국소 투여하는 방법에 관한 것이다.

**명세서**

**기술분야**

본 발명은 광보호 분야에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 세포간질성 메탈로프로테이나제(MMP) 생성 및/또는 활성화에 대한 억제제를 사용하여 손상되지 않은 피부의 광노화를 억제하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

광노화는 햇빛에 반복적인 노출 결과 피부 외관과 기능의 변화를 나타내는 데 사용되는 용어이다. 광노화의 주요 원인 인자는 햇빛의 자외선(UV) 성분, 특히 중간 UV(UVB라고 부름, 290 내지 320 nm 파장)이다. 현재, 광노화를 일으키는데 요구되는 UVB 노출 정도는 알려져 있지 않다. 하지만, 일반적으로 흉반을 일으키고 햇빛에 탈 수 있는 정도의 UVB에 반복 노출되면 광노화를 일으킬 수 있다. 임상적으로, 광노화는 거칠어짐, 주름, 착색 반점, 혈색이 나뻐, 설사, 모세혈관확장, 흑점, 자반 및 쉬운 타박상, 위축, 섬유증, 탈색 부위 및 극심하게는 전암성 종양 및 악성 종양을 나타낸다. 일반적으로, 광노화는 얼굴, 귀, 두피의 대머리 부위, 목 및 손과 같이 평소 햇빛에 노출되는 피부에서 일어난다.

이와 같이 노화되지 않은 피부의 광노화를 예방하고 이미 광노화된 피부를 치료하는 방법은 많이 알려져 있다. 평소 햇빛에 노출되는 피부 부위의 광노화를 예방하는데 통상 사용되는 방법은 선스크린제를 이용하는 것이다. 선스크린제는 UV를 흡수, 반사 또는 분산시키는 국소투여용 제제이다. 일부 선스크린제는 산화 아연, 산화 티탄, 점토 및 염화 제2철과 같은 불투명한 미립자 물질을 주성분으로 한다. 이 제제는

육안으로 관찰가능하며 폐색적이므로 많은 사람들은 이 불투명 제제가 화장용으로는 바람직하지 않다고 생각하고 있다. 다른 선크림제로는 가시광선 파장을 흡수하지 않기 때문에 무색성이고 투명한 p-아미노 벤조산(PABA), 옥시벤존, 디옥시벤존, 에틸헥실-메톡시 신나미드 및 부틸메톡시디벤조일메탄을 함유하는 화학제를 포함한다. 이러한 투명 선크림제는 화장용으로는 보다 바람직하지만, 비교적 지속시간이 짧고 세척이나 땀에 의해 쉽게 제거될 수 있다. 또한, 모든 선크림제는 비타민 D 생성을 감소시킨다.

문헌[Rieger, M.M. Cosmetics and Toiletries(1993) 108:43-56]은 피부의 UV-유도성 노화에 있어서 반응성 산소 종(ROS)의 역할에 대하여 논하고 있다. 이 문헌은 피부에 공지의 항산화제를 국소 투여하면 피부에 존재하는 ROS를 감소시킬 수 있어 광손상을 경감시킬 수 있다고 보고한다.

레티노이드류는 햇빛에 손상된 피부의 광노화 효과를 지연시키는데 사용되어 왔다. 미국 특허 제 4,877,805호는 광노화 과정을 감속시키는 개입 요법으로서 광노화된 피부 치료방법을 개시하고 있다. 이 특허 문헌은 노화 효과가 나타나기 전에 그러한 치료 요법을 개시하는 점에 대해서는 거의 논하고 있는 바가 없다. 이와 관련하여 본 출원인들이 아는 바로는 미손상된 피부의 광노화를 예방하기 위해 레티노이드류를 사용하는 방법을 제안하는 종래 기술은 없다.

MMP는 결합 조직의 생리학, 병리학적 파괴에 주요 역할을 하는 일군의 효소이다. 이 군에 속하는 성분으로서 10가지 이상의 성분들이 동정되었다. 이들은 번호순으로 부르거나(MMP-1, MMP-2 등) 일반명으로 부르기도 한다. MMP는 여러 가지 구조적 성질과 기능적 성질을 공유하지만 각각의 조직 기질 특이성은 상이하다. 예컨대, 간질성 콜라게나제(MMP-1) 및 PMN-콜라게나제(MMP-8)는 콜라겐 I형, II형, III형, VII형, VIII형, IX형 및 젤라틴을 분해하고; 72 kDa(MMP-2)와 92kDa(MMP-9)의 IV형 콜라게나제/젤라티나제는 콜라겐 IV형, V형, VII형, X형, XI형, 젤라틴, 엘라스틴 및 피브로넥틴을 분해하며; 스트로멜리신-1(MMP-3), 스트로멜리신-2(MMP-10) 및 스트로멜리신-3(MMP-11)은 피브로넥틴, PG 코어 단백질, 콜라겐 IV형, V형, IX형 및 X형, 라미닌 및 엘라스틴을 분해하고; PUMP-1(MMP-7)은 콜라겐 IV형, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴 및 PG 코어 단백질을 분해하며; 메탈로엘라스타제(MMP-12)는 엘라스틴과 피브로넥틴을 분해한다.

MMP 유전자의 발현은 전사 인자 AP-1 및 NF- $\kappa$ B에 의해 유도된다[Angel, P. 등, Cell(1987) 49:729-739 및 Sato, H.와 Seiki, M., Oncogene(1993) 8:395-405]. AP-1과 NF- $\kappa$ B의 활성화는 시토킨(예컨대, 인터루킨 IL-1, IL-6 및 TNF $\alpha$ ), 생육인자(TGF $\alpha$ , bFGF) 및 산화제, 열 및 자외선과 같은 환경 스트레스에 의해 매개된다. AP-1을 구성하는 jun 단백질(C-jun, jun-B 및 jun-D)과 fos 단백질(C-fos, fos-B, fra-1 및 fra-2)의 AP-1 유도 및 생성은 많은 분자들(예, RAC, CDC42, MEKK, JNKK, JNK, RAS, RAF, MEK 및 ERK)에 의해 매개된다. AP-1과 NF- $\kappa$ B는 자외선에 노출된 포유류 세포에서 활성화되는 것으로 알려져 있다[Devary, Y. 등, Science(1993) 261:1442-1445]. 또한, 문헌[Wlaschek, M. 등, Photochemistry and Photobiology(1994) 59(5):550-556]은 섬유아세포를 UVA 조사하면 IL-1과 IL-6을 매개로 하여 MMP-1이 유도되고 이러한 유도가 광노화시 콜라겐을 손실시키는 것으로 보고하고 있다.

또한, MMP나 전사 인자들의 발현에 영향을 미치는 MMP나 전사 인자의 억제제도 알려져 있다. 문헌[Hiil, P.A. 등, Biochem J(1995) 308:167-175]은 2가지 MMP 억제제, CT1166과 R031-7467에 대하여 개시하고 있다. 문헌[Gowravaram, M.R. 등, J. Med. Chem(1995) 38:2570-2581]은 MMP를 억제하는 일련의 히드록사메이트의 개발에 대하여 논하고 있고, 공지의 MMP 억제제로서 티올류, 포스포산염류, 포스포아미드산염류 및 N-카르복시 알킬류를 언급하고 있다. 이 문헌은 MMP 억제제가 아연을 킬레이트하는 부와 MMP의 특이성 포켓의 아부분(亞部分)에 결합하는 펩티드성 단편을 포함한다고 개시하고 있다. 문헌[Hodgson, J., Biotechnology (1995) 13:554-557]은 갈라딘(Galardin), 바티마스태트(Batimastat) 및 마리마스태트(Marimastat)를 비롯하여 여러 종류의 MMP 억제제의 임상적 중요성을 논하고 있다. 기타 다른 MMP 억제제로는 부탄디아미드[Conway, J.G. 등, J Exp Med(1995) 182:449-457], TIMP[Mauch C., 등, Arch Dermatol Res(1994) 287:107-114] 및 레티노이드류[Fanjul, A. 등, Nature(1994) 372:107-111; Nicholson, R.C. 등, EMBO Journal(1990) 9(13) 4443-4454; 및 Bailly, C. 등, J Investig Derm(1990) 94(1):47-51]를 포함한다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 개요

본 발명은 피부를 UVB에 노출시키면 노출된 피부에서 AP-1과 NF- $\kappa$ B가 빠르게 증가하여 MMP를 유도한다는 발견에 근거한 것이다. UVB 노출시 일어나는 MMP 양의 증가는 피부에 존재하는 결합 조직의 단백질을 분해하는 작용을 한다. 이러한 손상이 완전하게 수복되지 못한다면 UVB 반복 노출로 축적되어 광노화를 유발하는 햇빛 자극을 남기게 된다.

따라서, 본 발명은 UVB에 노출되기 전에 UVB 유도성 MMP의 억제제를 UVB 유도성 MMP의 유도 및/또는 활성을 억제하기에 충분한 양으로 인체에 투여하여, UVB에 손상되지 않은 인체 피부가 노출되었을 때 그 피부의 광노화를 예방하기 위한 것이다. 놀라운 것은, 이러한 예방 작용이 홍반을 일으키는 UVB 조사량 뿐만 아니라 그 이하의 조사량에 대해 나타난다는 것이다.

또 다른 본 발명의 양태는 UVB에 반복 노출로 인한 미손상된 피부의 광노화를 예방하기 위한 억제제 제조시 UVB 유도성 MMP 유도 또는 활성의 억제제를 사용하는 방법에 관한 것이다.

## 도면의 간단한 설명

도 1은 UVB가 MMP 생성을 유도하는 경로를 도시한 흐름도.

도 2a 내지 도 2d, 도 3a 내지 도 3d, 도 4a 내지 도 4d 및 도 5a 내지 도 5e는 하기 실시예에 기재한 시험 결과를 도시한 그래프.

발명을 수행하기 위한 양태

본 발명은 미손상된 인간 피부, 즉 광노화 영향을 나타내지 않는 피부의 광노화를 억제(즉, 경감 또는 예방)하는데 사용된다. 따라서, 본 발명에 따른 치료요법은 일반적으로, 평소에 매일 햇빛에 노출되는 머리, 목, 손 및 팔 등의 피부에 대해 그 피부가 광노화의 명백한 증후를 나타내기 전에 실시되어야 한다. 흉반을 일으키는 조사량 이하의 UVB에 반복 노출되어도 광노화를 일으킬 수 있기 때문에, 본 발명은 낮은 조사량에 노출되는 피부에 대해 실시되어야 한다. 이와 관련하여 대부분의 피부 상태가 양호한 사람에게 대해 흉반을 일으키는 UVB 조사량 범위는 30 내지 50 mJ/cm<sup>2</sup> 범위이다. 따라서, 본 발명은 이러한 범위 이하의 조사량(일반적으로 햇빛에 수분간 노출된 것에 해당하는 약 5mJ/cm<sup>2</sup> 이상)에 노출된 피부의 광노화를 예방할 수 있을 것이다.

광노화는 MMP에 의한 피부의 세포외 세포간질의 UVB 유도성 분해를 억제시킴으로써 본 발명에 따라 예방되거나 억제된다. 이것은 햇빛에 노출되는 피부에 MMP 억제제를 투여함으로써 실시된다. 이와 관련하여 'MMP 억제제'란 용어는 전술한 피부내에서 UVB 유도성 MMP의 발현을 직접 또는 간접적으로 억제(즉, 현저하게 경감시키거나 소실)하거나 전술한 MMP의 효소적 활성을 억제하는 제제를 의미한다. '간접적 억제'란 UVB 유도성 MMP의 발현을 경감시키거나 소실시키는 방식으로 피부내의 jun 및 fos 단백질을 유도하는 3종의 키나제 캐스캐이드와 관련있는 1종 이상의 분자 및/또는 전사 인자 AP-1과 NF- $\kappa$ B중 어느 하나 또는 둘 모두와의 상호작용을 의미하는 것이다.

도 1은 UVB 유도성 MMP 발현의 경로를 도식적으로 나타낸 것이다. 도 1에 도시된 바와 같이, UVB 노출은 AP-1 및 NF- $\kappa$ B의 활성을 자극하는 반응성 산소 중간체(ROI)를 생성시키고, 결과적으로 시토킨과 생육인자를 유도한다. 이러한 시토킨과 생육인자는 이들의 수용체와 상호작용하여 작은 GTP 결합 단백질인 RAC/CDC42 및 RAS를 유발시킨다. 이 단백질들은 AP-1을 구성하는 jun 및 fos단백질의 생성에 필수적인 3종의 키나제 캐스캐이드를 활성화시킨다. AP-1은 특정 MMP 발현을 유도한다. 광노화를 억제하는 제제는 도 1에 도시한 MMP, 전사 인자 AP-1과 NF- $\kappa$ B 및/또는 3종의 키나제 캐스캐이드와 관련있는 1종 이상의 분자들에 작용할 수 있다. 아스피린과 E5510[Fujimori, T. et al., Jpn J Pharmacol(1991) 55(1):81-91]은 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제한다. B-581[Garcia A.M., et al., J Biol Chem(1993) 268(25): 18415-18], BZA-5B[Dalton M.B. et al., Cancer Res(1995) 55(15):3295-3304], 파네실 아세테이트, 및 ( $\alpha$ -히드록시 파네실)인산과 같은 파네실 트랜스퍼라제 억제제는 RAS에 작용하여 ERK 캐스캐이드의 활성화를 억제하는 반면; 제라닐 제라닐트랜스퍼라제 억제제 및 리소필린은 JNK 캐스캐이드의 활성화를 억제한다. SB202190[Lee, J.C. et al., Nature(1994) 372: 739-746] 및 PD98059 [Dudley, D.T., et al., PNAS(USA)(1995) 92:7686-7689]와 같은 화합물은 캐스캐이드중의 특정 키나제를 억제한다. 미국 특허 제 4,877,805호에 개시된 것과 같은 레티노이드류와 문헌[Fanjul, et al., Nature(1994) 372:104-110]에 기재된 것과 같은 AP-1 길항작용에 특이적인 해리된 레티노이드류, 글루코코르티코이드 및 비타민 D3은 AP-1이 표적이다. 레티놀외에 기타 다른 레티노이드류로는 비타민 A(레티놀)의 천연 및 합성 유사체, 비타민 A 알데히드(레티날), 비타민 A 산(모든-트랜스 레티산 및 13-시스 레티산을 포함하는 레티산) 및 EP 379367 A2에 기재된 다른 것들을 포함한다. 마지막으로, MMP는 BB2284(Gearing, A.J.H. et al., Nature(1994) 370: 555-557), GI129471(McGehean G.M., et al., Nature(1994) 370:558-561), TIMPS, 갈라딘, 바티마스테트 및 마리마스테트와 히드록사메이트 및 다른 공지의 억제제에 의해 억제될 수 있다.

이러한 MMP 억제제들은 1종 이상이 햇빛에 노출되는 피부에 국소 투여되는 것이 바람직하다. 이러한 투여 방식을 위해, 억제제는 크림, 젤, 연고, 분무액 또는 로션으로 조제되는 것이 일반적이다. 이러한 억제제(들)를 조제하는 데에는 약리학적 및 화학적으로 허용성인 통상의 부형제를 사용할 수 있다. 이러한 부형제의 예는 미국 특허 제4,877,805호 및 EPA 공개 0586106 A1에 기재되어 있다. 전술한 바와 같이 소정의 조성물중에는 1종 이상의 억제제를 함유할 수 있다. 예컨대, 피부의 MMP 분해 작용에 영향을 미치는 것과 관련있는 2종 이상의 다른 분자들에 작용하는 억제제 혼합물을 사용할 수 있다. 또한, 이 제제는 피부염 화제, 피부 침투 향상제, 안료 및 향료와 같은 첨가제를 포함할 수 있다. 또한, 제제는 피부로 억제제(들)를 지속적으로 방출시키는 흡수제 입자(예컨대, 중합체 비드)와 같은 성분을 포함할 수 있다. 이 제제중에 존재하는 억제제(들)의 중량 농도는 일반적으로 0.01% 내지 10%, 보다 바람직하게는 0.1% 내지 1%일 것이다. 일반적으로 피부 1cm<sup>2</sup>당 투여되는 조성물의 양은 약 50mg이다.

억제제는 햇빛에 노출되기 전에 미손상된 피부에 투여하는 것이 바람직하다. 투여 섭생법(즉, 매일, 매주 등)은 주로 억제제(들)의 지속수명(예컨대, 대사작용, 피부내 반감기)과 작용하는 분자 표적에 따라 달라질 것이다. 또한, 목욕, 발한 및 햇빛 노출정도에 따라 영향을 받을 수도 있다. 통상, 매일 투여하는 것이 일반적이다.

본 발명은 하기 실시예를 통해 보다 상세히 설명된다. 이 실시예들은 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다.

## 실시예

분자 기준의 UVB 유도성 광노화 측정

UVB 고 조사량에 의한 MMP 유도

UVB 노출 후 MMP-1, MMP-3, MMP-9 및 MMP-2의 mRNA, 단백질 및 효소 활성 정도에 있어서의 시간 경과에 따른 변화는 다음과 같이 측정하였다.

검체는 가볍게 피부 착색시키거나 적당하게 피부 착색시킨 백인 성인(남자와 여자가 대략 동일한 수)이다. 각 검체에게서 겨우 인지될 정도의 피부 홍조화를 일으키는데 요구되는 UVB 조사량(최소 흉반 조사량, 또는 'MED')은 광조사한 지 24시간 후에 측정되었다. 모든 검체들에 대한 1 MED는 30 내지 50 mJ/cm<sup>2</sup> 범위이다. 4개의 F36T12 ERE-VHO UVB 관을 함유하는 울트라라이트 패널라이트 램프(Ultralite Panelite lamp)를 사용하여 2 MED UVB를 검체의 엉덩이에 조사하였다. 조사 강도는 IL443 광치료 복사계와 SED240/UVB/W 광검출기를 사용하여 모니터하였다. 광원에서부터 48cm 거리에서 측정된 UVB 산출량은 0.5 mW/cm<sup>2</sup>였다. 각 검체의 피부는 광조사 후 8시간, 16시간, 24시간, 48시간 및 72시간째 4 부위(1 부위는 광조사되지 않은 부위이고, 3 부위는 광조사된 부위임)에서 각막절개도로 분리하였다. 조직을 순간 동결시키고 총 RNA를 분리하여, 문헌[Fisher G.J. et al., J Invest Dermatol(1991) 96:699-707]에 기재된

바와 같이 노던 블롯으로 분석하였다. 밴드 강도는 포스포이미저(Phosphor Imager)로 정량하였다. MMP 전 사체에 대한 값은 조절 유전자 36B4의 값으로 규정화하였다. 이 시험들의 결과는 도 2a(MMP-1), 도 2b(MMP-3), 도 2c(MMP-9) 및 도 2d(MMP-2)에 도시한다. 결과는 평균치  $\pm$  SEM(8시간, 16시간, 48시간 및 72시간 처리 군에 대해서는  $n=6$ 이고, UVB 무처리 대조군과 24 시간 처리 군에 대해서는  $n=17$ 임)으로서, 조사처리되지 않은 피부에 대해 상대적인 규정화된 값의 증가 배수로 나타내었다. 도면들에 나타난 밴드들은 여러 검체들의 혼합물이다.

도 2a 내지 도 2d에 도시된 바와 같이 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9의 mRNA 유도는 16 내지 24 시간내에 최대(6 내지 60 배)였고 48 시간 내지 72 시간내에 기준선 부근으로 복귀되었다. MMP-2 mRNA는 검출되는 정도였으나, 광조사 후 24시간내에 단지 1.6배 증가하였다. 2 MED UVB에 의한 MMP-1 단백질과 MMP-9 단백질의 시간 경과에 따른 유도와 활성은 관찰된 그 단백질들의 mRNA 양과 대응하였다. MMP-2 단백질이나 활성은 전혀 유도되지 않았다.

MMP-3(스트로멜리신 1)-특이적인 프로브로 UVB 처리된 피부를 노던 분석한 결과, 총 길이 MMP-3 프로브로 얻어지는 결과와 동일한 결과를 얻은 반면(도 2b), MMP-10(스트로멜리신 11)-특이적인 프로브를 사용하여 하이브리드한 시험에서는 어떤 신호도 얻지 못하였다. 이것은 UVB가 스트로멜리신류 중에서도 주로 스트로멜리신 1을 유도한다는 것을 나타낸다.

#### UVB 저 조사량에 의한 MMP 유도

전술한 바와 같이 검체를 0.01 내지 2 MED 범위의 UVB 조사량에 노출시켰다. 광 조사 후 24 시간째, 조사 처리 부위와 무처리 부위로부터 총 두께의 피부 시료(6mm 원통형)를 얻었다. 이 시료를 트리스 HCl(pH 7.6) 20mM,  $\text{CaCl}_2$  5mM 중에서 균질화한 뒤, 3000 x g에서 10분동안 원심분리하였다. 상청액을 사용하여 화학발광성을 검출하는 웨스턴 블롯으로 MMP-1 단백질 및 MMP-9 단백질을 측정하고(100 $\mu$ g/레인), 문헌[Hu, C.L. et al., Anal Biochem(1978) 88:638-643]에 기재된 바와 같은  $^3\text{H}$  원성유성 콜라겐의 가수분해와 문헌[Hibbs, M.S. et al., J Biol Chem(1985) 260:2493-2500]에 기재된 바와 같은 젤라틴 자이모그래피(20 $\mu$ g/분석)로 각각 활성을 측정하였다. 사용된 MMP-2와 MMP-9 항체는 각각 문헌[Werb, Z. et al., J Cell Biol(1989) 109:877-889] 및 [Murphy, G. et al., Biochem J(1989) 258:463-472]에 기재되어 있다. 이 시험 결과는 도 3a 및 도 3b에 도시하였다.

도 3a에서, MMP-2 단백질 값은 빈 막대를 사용하여 나타낸 반면, MMP-2 활성값은 빗금무늬 막대로 나타내었다. 도 3a에 삽입된 그림은 2가지 검체의 대표적인 웨스턴 블롯을 도시한 것이다. 보다 큰 54 kDa 밴드는 본래의 MMP-2이고, 이보다 작은 45 kDa 밴드는 MMP-2의 단백질 분해 처리된 활성 형태이다.

도 3b에서, MMP-9 단백질 값은 빈 막대로 나타낸 반면, MMP-9 활성 값은 빗금무늬 막대로 나타내었다. 도 3b의 삽입 그림은 대표적인 웨스턴 블롯(좌측 패널)과 대표적인 자이모그램(우측 패널)을 나타낸다. 자이모그램상의 복수의 밴드는 MMP-9의 광분해 처리된 활성 형태이다.

밴드 강도는 레이저 농도계로 정량하였다. 그 결과는  $n=10$ 의 평균값  $\pm$  SEM으로 나타내었다.

도 3a 및 도 3b에 도시된 바와 같이, MMP-2 및 MMP-9 단백질들의 유도와 활성은 조사량 의존적이며, 단백질과 활성면에 있어서 MMP들의 변화는 서로 대응되었다. MMP-2는 시험된 모든 UVB 조사량에 의해 유도된 반면, MMP-9는  $\geq 0.1$  MED의 조사량에 의해 유도되었다. 유도는 1 MED에서 최대였고, 0.1 MED에서 최대치의 1/2 이었다. 0.1 MED UVB는 여름 날 2분 내지 3분간 광조사 받는 것과 동일한 조사량으로서, 인지될 정도의 피부 홍조화는 일으키지 않는다.

#### UVB 저 조사량에 의한 AP-1 및 NF- $\kappa$ B 유도

검체를 광조사 처리하고 조직 시료를 전술한 바와 같이 채취하였다. 문헌[Fisher, G.J. et al., J.Biol.Chem(1994) 269:20629-20635]에 기재된 바와 같이 시료로부터 핵 추출물을 제조하였다. 약  $10^8$  세포를 함유하는 생검 조직(습윤 중량 약 200mg)으로부터 핵 추출 단백질을 평균 500 $\mu$ g 생성하였다. 전기영동적 이동성 전이 분석(8 $\mu$ g의 핵 추출 단백질)은 문헌[Fisher, G.J. et al., 상기 문헌 참조]에 기재된 바와 같이 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 컨센서스 및 변이된 DNA-결합 서열들을 함유하는  $^{32}\text{P}$ -표지된 DNA 프로브를 사용하여 실시하였다. 초과이동물(supershift)에 대한 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)에서 입수하였다. jun 및 fos 항체는 각각 jun 과 fos 군에 속하는 모든 성분들에 대해 넓은 반응성을 나타냈다. NF- $\kappa$ B 항체는 p65/Rel A에 특이적이었다. 이 분석의 결과는 도 4a, 도 4b, 도 4c 및 도 4d에 도시하였다(NS는 비특이적인 실시예를 나타낸다). 이 도면들에 삽입된 그림은 대표적인 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 자연된 복합체를 도시한 것이다. +Compet는 비표지된 프로브를 100배 과량 첨가함을 나타내고; Mut는 변이된  $^{32}\text{P}$  프로브를 나타내는 것이다.

도 4a는 광조사되지 않은 피부와 광조사된 피부(2 MED UVB 조사후 4 시간째)에 나타나는 AP-1 및 NF- $\kappa$ B 결합성을 도시한 것이다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 전술한 2가지 전사 인자들이 나타내는 이들의 DNA 반응 인자들에 결합성은 변이된 표지 프로브를 가진 자연된 복합체의 소실로 증명되는 바와 같이 특이적이었다. 항체 초과이동물은 UVB 조사된 피부 추출물에서 관찰되는 특이적인 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 자연된 복합체가 각각 jun 단백질과 fos 단백질 및 Rel A 단백질을 포함한다는 것을 증명하는 것이다.

도 4b와 도 4c는 2 MED UVB에 의한 시간 경과에 따른 AP-1 및 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합 유도성을 각각 도시한 것이다. 그 결과는 평균값  $\pm$  SEM,  $n=9$ 로 기록하였다. 도시된 바와 같이 2가지 인자들에 의한 유도성은 15분 이내에 관찰되었다.

도 4d는 AP-1(빈 막대로 표시) 및 NF- $\kappa$ B(빗금무늬 막대로 표시) 유도의 조사량 의존성을 도시한 것이다. DNA 결합성은 광조사후 30분째에 측정하였다. 도시된 바와 같이, 2가지 인자들에 의한 최대 유도율의 1/2은 약 0.1 MED에서 일어났고, 최대 유도율은 1 MED에서 일어났다. 이 인자들의 유도성에 대한 UVB 조사량의 의존성 결과는, MMP-2와 MMP-9의 UVB 유도성 증가에 전술한 전사 인자들이 관여한다는 결과와 일관되게

상기 2가지 MMP의 유도성에 대해 전술한 바와 매우 부합하였다.

#### AP-1, MMP-2 및 MMP-9에 의한 UVB 유도 억제성

모두 트란스형인 레틴산(t-RA) 0.1%와 그 부형제(70% 에탄올과 30% 프로필렌 글리콜) 또는 글루코코르티코이드(GC) 클로베타솔 프로피오네이트 0.05%와 그 부형제(백색 와셀린중에 함유된 프로필렌 글리콜 2% + 소르비탄 세스퀴올레이트 2%)를 문헌[Fisher G.J. et al., J Invest Dermatol(1991) 96:699-707]에 기재된 바와 같이 48 시간동안 검체에게 투여하였다(제제 300mg/피부 6cm<sup>2</sup>). 그 다음 처치된 피부 부위를 2 MED UVB로 광조사 처리하였다. AP-1 측정시에는 광노출후 30 분내에, MMP 측정시에는 광노출후 24 시간내에 전술한 바와 같이 피부를 채취하였다. t-RA가 UVB 유도성 피부 홍조화를 변화시키는지를 측정하기 위해, 검체를 0.1% t-RA와 그 부형제로 24 시간동안 처리하였다. 처리된 부위를 10 내지 80 mJ/cm<sup>2</sup> UVB로 광조사 처리하고, 24 시간 후에 미놀타 색채측정기로 피부 홍조화를 측정하였다. 이 시험 결과는 도 5a, 도 5b, 도 5c, 도 5d 및 도 5e에 도시하였다.

도 5a는 AP-1 측정치를 기록한 것이다. 도시된 바와 같이, t-RA로 피부를 전처리한 결과 UVB-유도성 AP-1 DNA 결합성은 약 70% 까지 감소하였다.

도 5b 및 도 5c는 MMP-1 및 MMP-9 측정치를 기록한 것이다. 도시된 바와 같이, t-RA 전처리 결과 UVB 유도성 MMP-1 및 MMP-9의 mRNA, 단백질 및 활성은 50% 내지 80% 감소하였다.

도 5d는 피부 홍조화에 대한 t-RA 전처리 효과에 대한 시험을 기록한 것이다. 도시된 바와 같이, t-RA 흡수가 UVB 범위(t-RA 최대 = 351 nm)와 중복될 지라도 t-RA는 UVB 유도성 피부 홍조화를 경감시키지 못했다. 따라서, 경감되는 AP에 의한 MMP 유도성은 t-RA에 의한 UVB 흡수로 나타나는 유도성보다 특이적이라는 것을 알 수 있다.

도 5e는 GC에 의한 피부 전처리 효과를 기록한 것이다. 도시된 바와 같이 GC 전처리는 MMP-1 및 MMP-9 활성을 t-RA 예비처리시 관찰되는 정도와 유사한 정도로 경감시켰다.

본원에 기재된 문헌들은 본원에 참고문헌으로 인용된 것이다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

(a) 손상되지 않은 인체 피부내의 UVB 조사 유도성 MMP 활성화, (b) 전사 인자 AP-1과 NF- $\kappa$ B중 어느 하나 또는 둘 모두, 및 (c) AP-1을 구성하는 jun 단백질이나 fos 단백질의 활성화 및/또는 생성과 관련있는 1종 이상의 GTP 결합 단백질이나 키나제중에서 1 가지 이상에 대한 억제제를 투여하는 단계; 및 전술한 피부를 자외선 B(UVB)에 노출시키기 전에 전술한 억제제를, UVB 유도성 MMP, AP-1과 NF- $\kappa$ B중 어느 하나 또는 둘 모두, 또는 jun 단백질이나 fos 단백질의 활성화 및/또는 생성과 관련있는 1종 이상의 GTP 결합 단백질이나 키나제의 생성 또는 활성을 억제하기에 충분한 양으로 전술한 피부에 투여하는 단계를 포함하여, UVB 조사에 인체 피부 노출시 광손상되지 않은 인체 피부의 광노화를 억제하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 광노화를 억제하는 방법이 피부를 홍조화시키는데 필요한 최소 조사량 이하의 UVB 조사량에 노출시 유도되는 광노화를 억제하는 것임을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, UVB 조사량이 약 5 mJ/cm<sup>2</sup> 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 억제제가 AP-1과 NF- $\kappa$ B중 1종 이상의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 억제제가 UVB 유도성 MMP의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 억제제가 jun 단백질이나 fos 단백질의 생성에 필수적인 GTP 결합 단백질이나 키나제를 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제4항에 있어서, 억제제가 AP-1을 억제하며, 레티노이드, 글루코코르티코이드 또는 비타민 D3인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

제4항에 있어서, 억제제가 NF- $\kappa$ B를 억제하며, 글루코코르티코이드, 아스피린 또는 E5510인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제5항에 있어서, 억제제가 TIMP, 갈라딘(Galardin), 바티마스테트(Batimastat), 마리마스테트(Marimastat) 또는 히드록사메이트인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

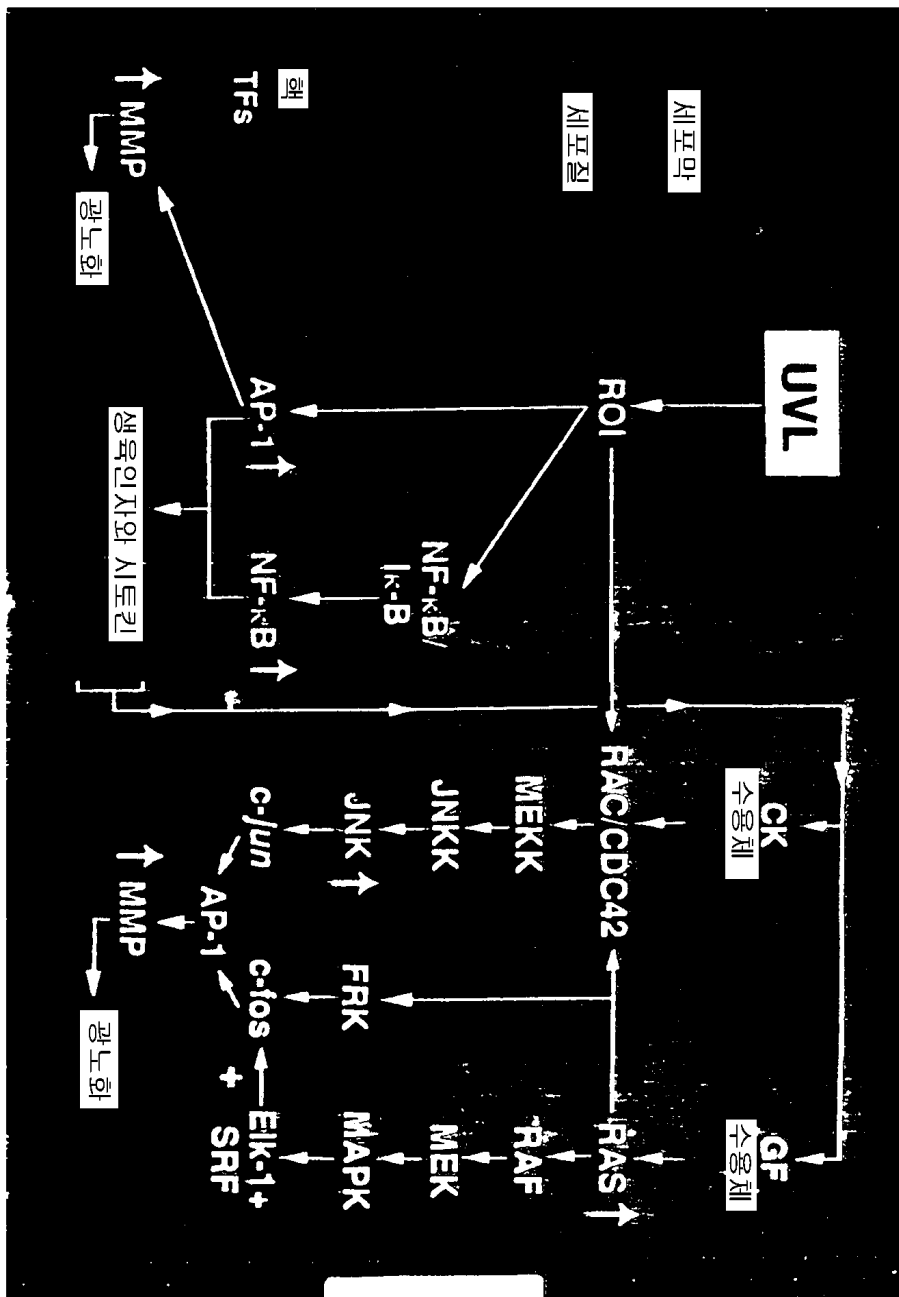
제6항에 있어서, 억제제가 파네실 트랜스퍼라제 억제제, 제라닐 제라닐트랜스퍼라제 억제제, SB202190 또는 PD98059인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

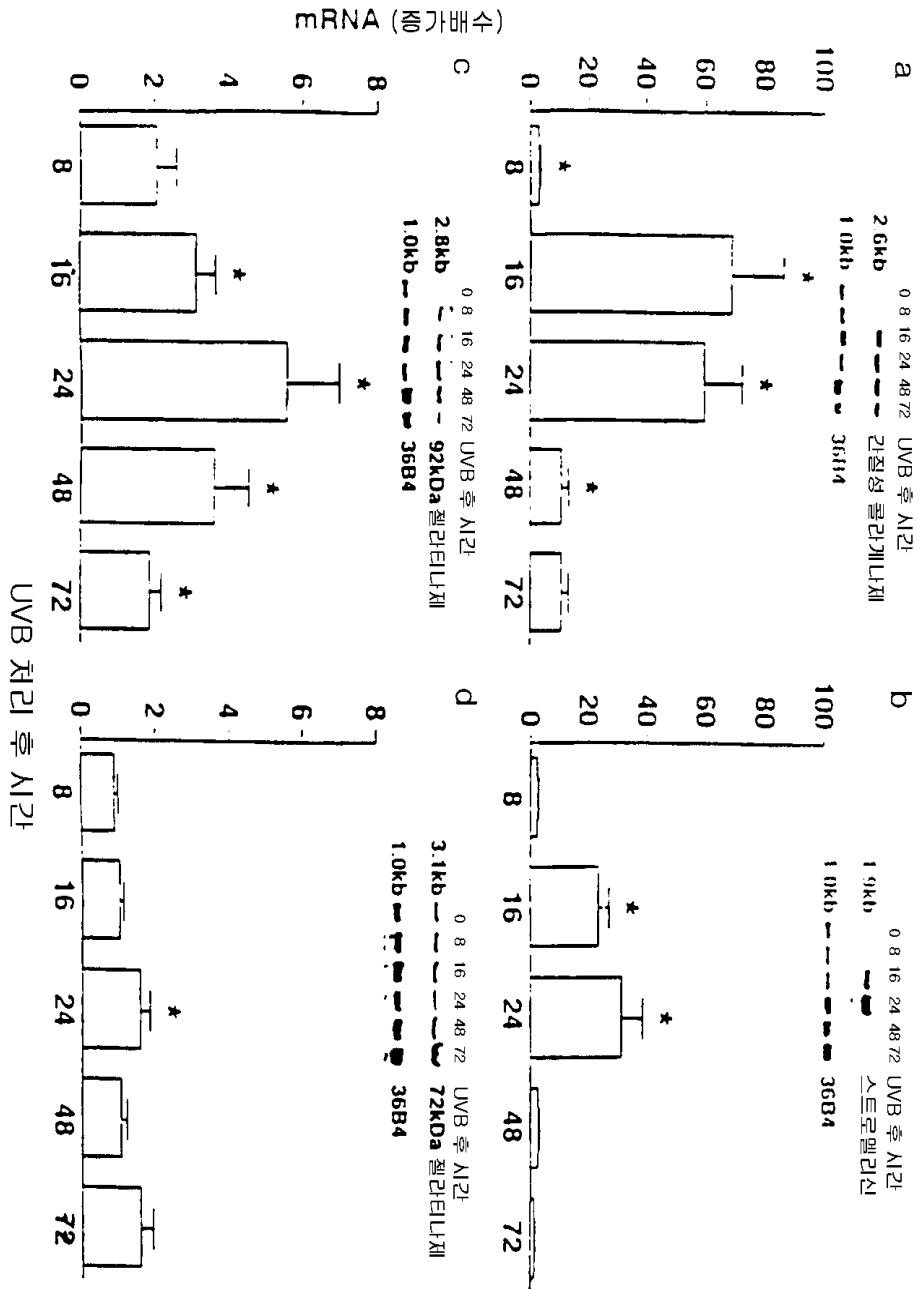
손상되지 않은 인체 피부의 광노화를 예방하기 위한 약제 제조에 사용되는 자외선 B 조사 유도성 세포간질 메탈로프로테이나제 억제제의 용도.

도면

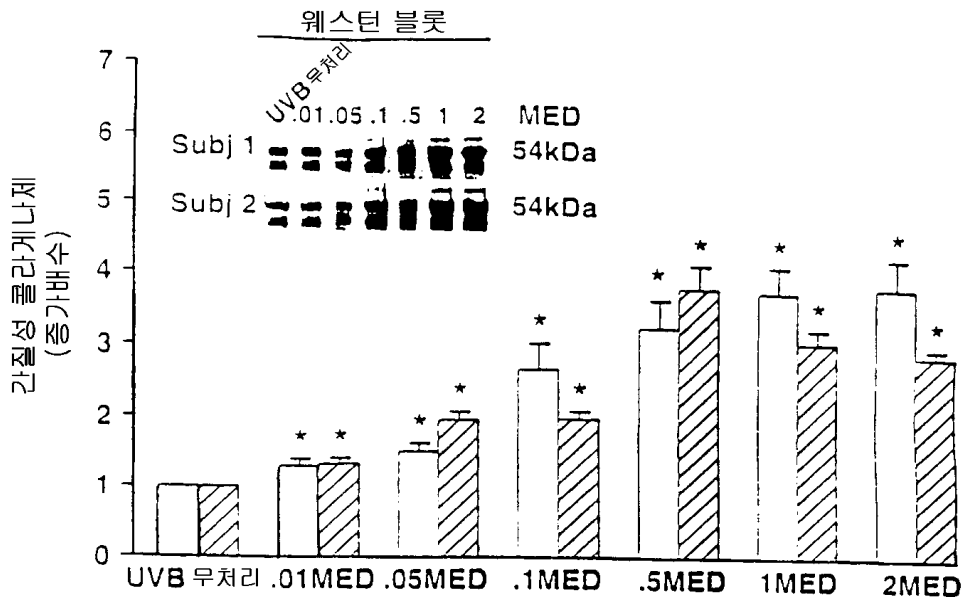
도면1



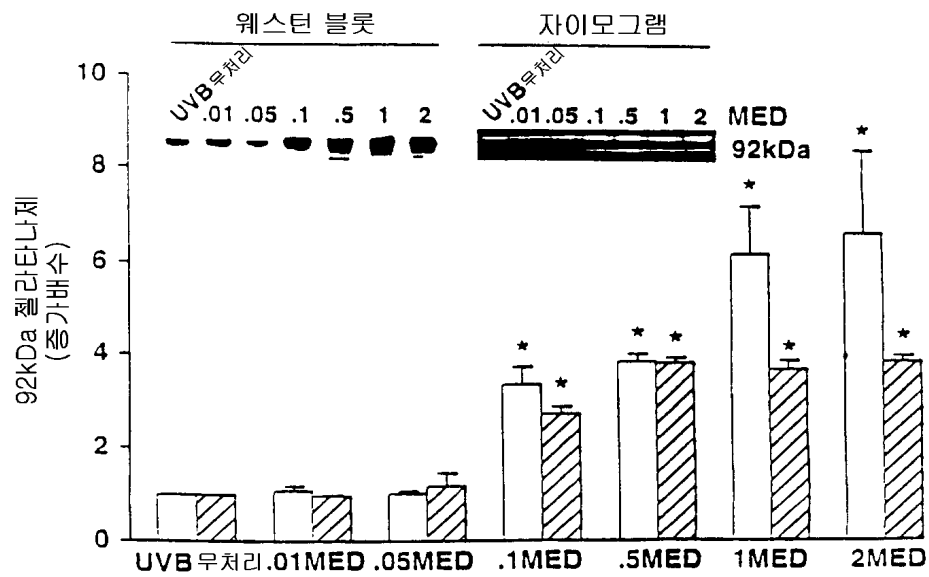
도면2



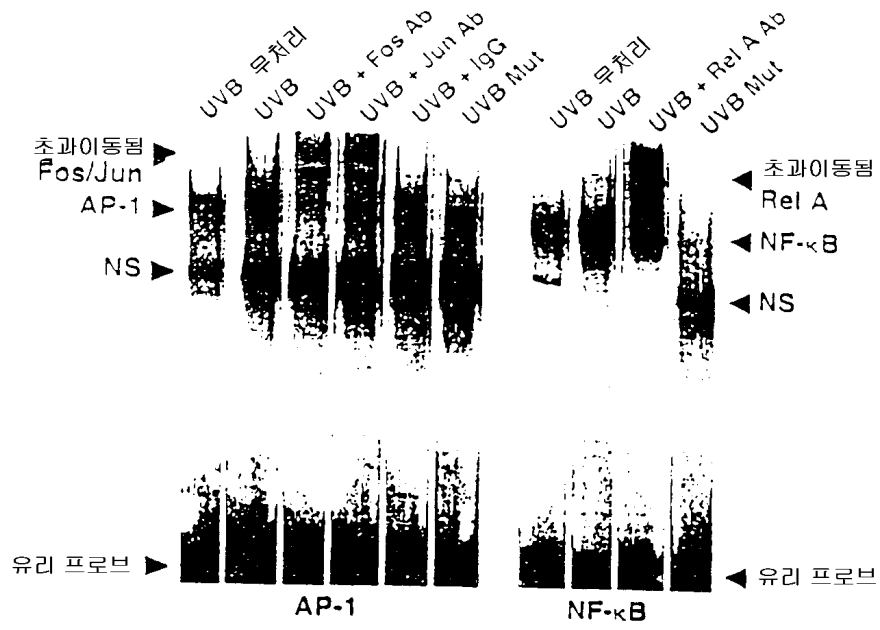
도면3a



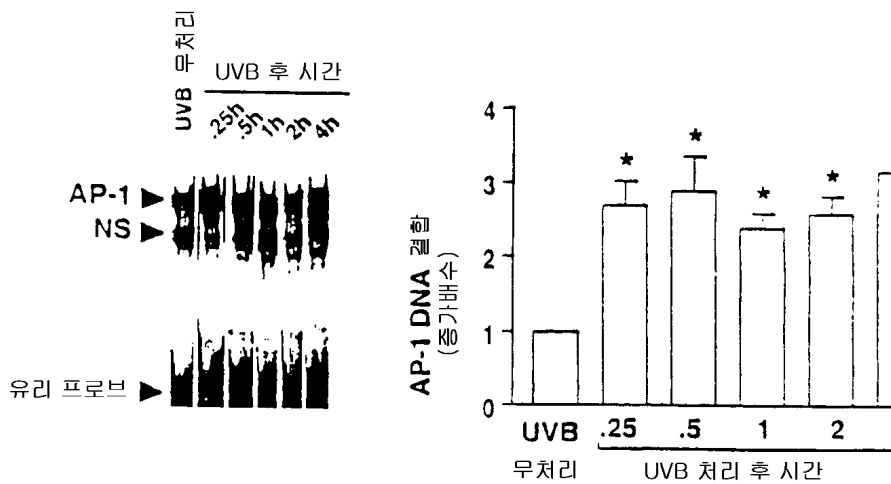
도면3b



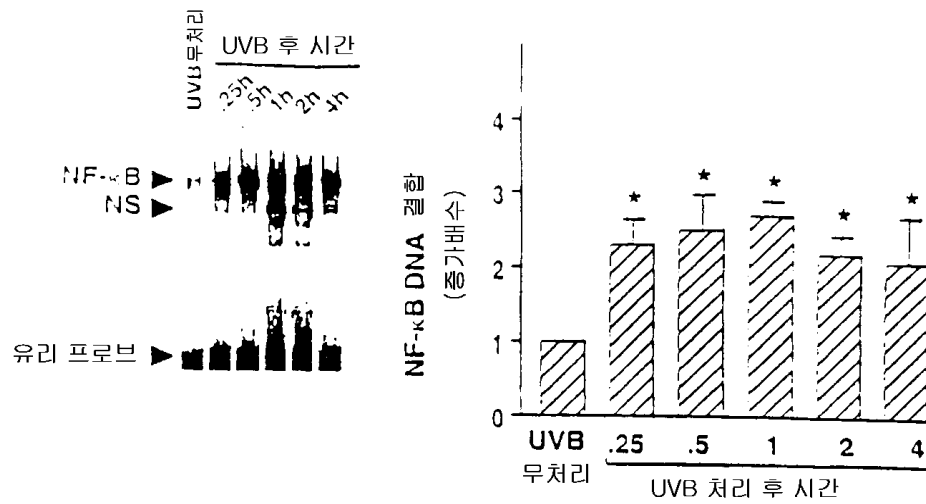
도면4a



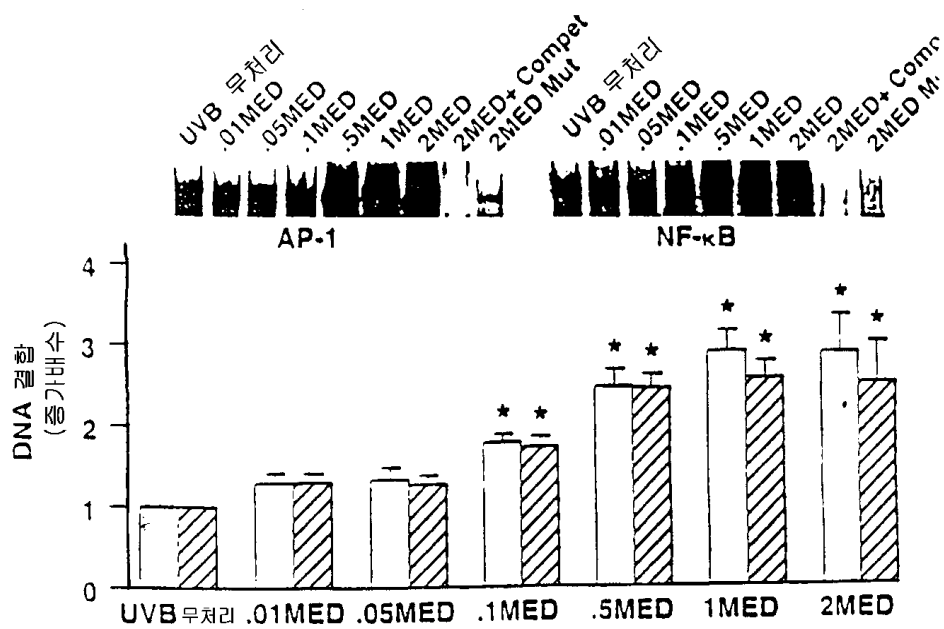
도면4b



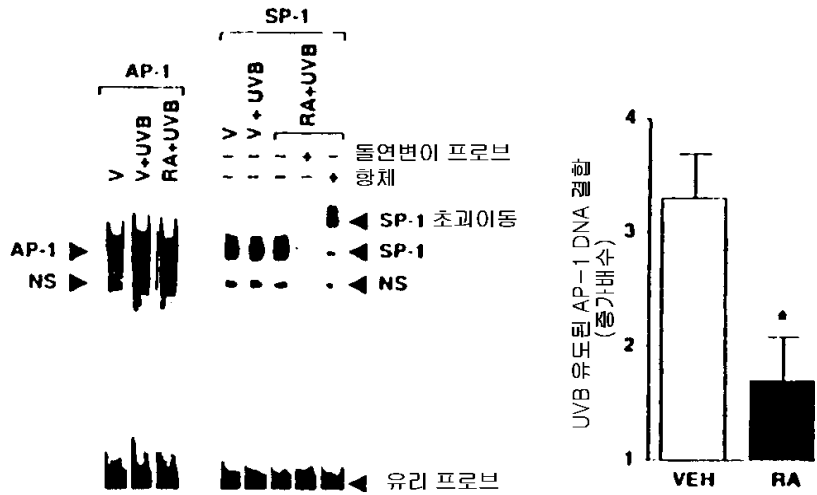
도면4c



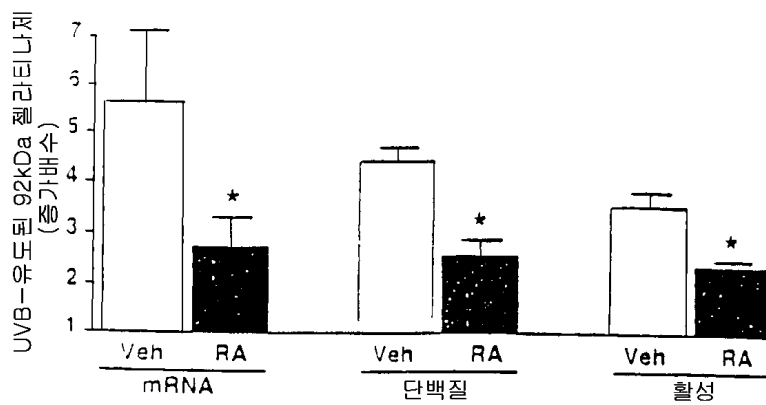
도면4d



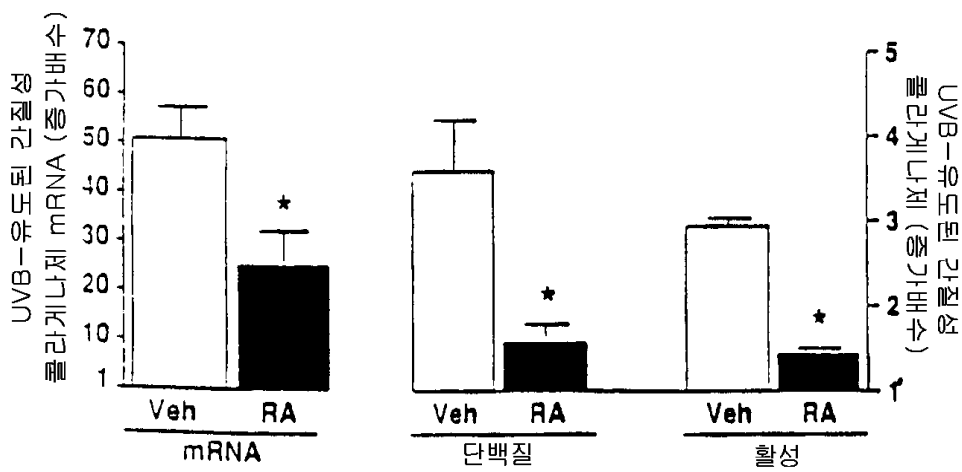
도면5a



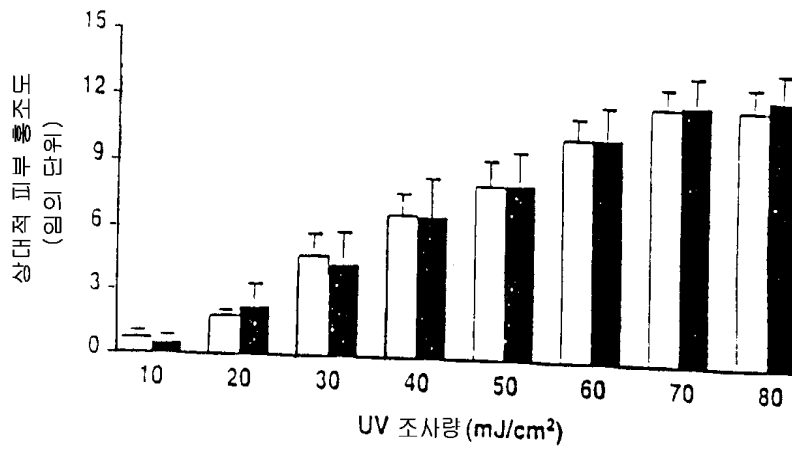
도면5b



도면5c



도면5d



도면5e

