

I234467

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區)	申請專利, 申請日期:	案號:	, ☐ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1997 年 6 月 4 日	60/048,520	☒ 有主張優先權
美國	1997 年 9 月 5 日	60/057,976	☒ 有主張優先權

有關微生物已寄存於：

, 寄存日期：

, 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

技藝範圍

本發明之範圍屬於保護人類的皮膚避免日照之損害。更明確的說，本發明係關於局部施用的組成物及使用此組成物抑制皮膚受光照老化的方法，尤其是日光入射光及/或直接輻射引發之曝曬。

背景

受光照老化，此一名稱是指人類皮膚反覆受日光曝曬後在外觀及/或功能上所引起的變化，尤其是指皺紋及其他皮膚外觀上的變化。一般相信日光中之紫外光（UV），尤其是UVB，是引起受光照老化的主要原因。雖然經實驗方法可從特定的UVB射源，定量引起人類皮膚紅斑（變紅，常見於曬傷）之“最低的紅斑劑量”（“MED”），但是目前並不清楚何種程度之UVB曝曬會引起受光照老化。一般而言，重覆曝曬日光中能引起紅斑及曬黑之UVB強度則和受光照老化有關。

受光照老化的臨床特徵是粗糙、皺紋、斑點的色素沈積、汎黃、鬆弛、毛細管擴張、多雀斑、紫斑及容易瘀傷、萎縮、區域除色、最後為前惡性的、及最終之惡性腫瘤。受光照老化一般發生在經常曝曬日光的皮膚，例如：面耳部、頭皮暴露處、頸部、上臂及手。

一般日光曝曬之皮膚區域可用防曬劑，預防其受光照老化。防曬劑是局部製劑，含有可吸收、反射、及/或散射UV光之成分。某些防曬劑是以不透明的微粒狀物質為主，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (2)

包括：二氧化鋅、二氧化鈦、黏土及三氯化鐵。由於此製劑肉眼可見且會阻塞毛孔，所以許多人認為此類不透明的配方不是化粧學可接受的。其他在皮膚上為透明或半透明的防曬劑所含之化學物質，包括：p-胺基苯甲酸（PABA）、酚酮、二酚酮、乙基己基-甲氧基亞桂皮酸酯、辛克林（octocrylene）、辛基甲氧基亞桂皮酸酯、及丁基甲氧基二苄醯基甲烷。雖然此類防曬劑在化粧學上較可接受，但是，相對的使用壽命短，且容易被洗去或因流汗而脫落。

如同上述所言，一般病原學上可接受的皮膚光照傷害，係指足以造成紅斑（曬傷或變紅；簡言之，係為皮膚發紅）之日光曝曬，目前已知充足的UVB輻射會造成紅斑。此法則主導了目前使用的組成物抑制受光照老化之觀念及方法（包括使用可阻擋或吸收UVB的化合物），且此類組成物僅須在日光曝曬可能足以造成紅斑時使用。近年所用的防曬劑組成物，包括可阻擋UVA及UVB輻射的化合物組合。

到達地球表面可影響各種動物（包括人類）作息的太陽輻射包括紫外線（UV）（ $\lambda < 400$ nary）、可見光（ $400 \text{ nm} < \lambda < 700$ nary）及紅外光（IR）（ $\lambda > 700$ nary）。UV輻射一般分為UVA（320-400 nary）、UVB（290-320 nary）及UVC（ < 290 nary），而UVC輻射因為被同溫層中臭氧阻擋所以無法到達地球表面。

根據 Physiology, Biochemistry, and Molecular

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (3)

Biology of the Skin, 2nd Ed., ed. by L.A. Goldsmith (New York: Oxford Univ. Press, 1991) 所述, U V A 可產生黑色素及紅斑, 而 U V A 的曝曬可引發人類皮膚上 3 2 k D a 壓力蛋白質之合成。在 U V B / C 曝曬後紅斑並不會立即顯現, 然而 U V A 的確會產生具有劑量依存性的紅斑反應; 一般認為最易於產生紅斑的輻射為 2 5 0 - 2 9 0 n m, 其比 2 9 0 - 3 4 0 n m 下所產生的紅斑高出一千倍; 而 U V B / C 所產生的紅斑咸認為是與輻射的總曝曬度 (而非輻射曝曬強度) 有關。

咸認為能引發皮膚中反應性氧分子 (R O S) 的是 U V 太陽輻射。Rieger, M.M. Cosmetics and Toiletries (1993) 1 0 8 : 4 3 - 5 6 曾回顧評論在皮膚上局部施用熟知之抗氧化劑以降低其上的 R O S 。

類視網醇曾被用來延遲經太陽損害後皮膚的受光照老化效應。U . S . P a t . N o . 4 , 8 7 7 , 8 0 5 曾描述治療受光照老化之皮膚 (干預治療) 以減緩其受光照老化的過程。該專利顯示在最初施用類視網醇治療光照損害時, 在老化出現前並無成效。其它的研究則致力於如何逆轉皮膚曝曬後受光照損害的效應。見: G.D. Weinstein et al., "Topical Treatment for Treatment of Photodamaged Skine," Arch. Dennatol., 1 2 7 : 6 5 9 - 6 6 5 (M a y 1 9 9 1) ; J.S. Weiss et al., "Topical Treatment Improves Photoaged skin," J. Amer. Med. Assn., 2 5 9 (4) : 5 2 7 - 5 3 2 (J a n 2 2 / 2 9 ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

1 9 8 8) 。

基質的金屬蛋白質酶 (M M P s) 在生理及病理上主要是一種破壞結締組織 (特別是膠原) 之酵素。為人習知的有不同型態的膠原及膠原酶 (一種 M M P s) , 詳細的說明可見共同申請的 U.S. Patent Appln. Ser. N o . 0 8 / 5 8 8 , 7 7 1 (申請日期 1 月 1 9 日 , 1 9 9 6) , 在此併入本文作為參考。其他尚有為人習知的 M M P s 抑制劑 (亦即蛋白質酶的直接抑制劑) 及影響其表達的 M M P 轉錄因子 (亦即 A P - 1 的抑制劑) , 也在上述申請號 5 8 8 , 7 7 1 中有所著墨。

概括言之, 此技藝目前認定光照損害係由 U V B 輻射所引發, 而目前所使用之防曬劑足以預防光照損害。"Dr. Ceilley [現任美國皮膚科學會會長]認為避免陽光及使用防曬劑原可預防許多他經手治療的皮膚癌及其病人所關心的早發性皺紋", Skin SAVVY, Amer. Acad. Dermat. supp. to USA Today, May 1997。

發明摘要

本發明 (較佳的具體實施例) 的基礎是我們發現次紅斑劑量之太陽輻射能引發受光照老化。亦即此輻射曝曬雖然不足以引起紅斑, 但是可以引發 M M P s , 同時使皮膚的結締組織 (例如: 膠原蛋白及彈力蛋白) 降解, 因此造成光照損害。

本發明之另一特色是發現 U V A 輻射在光照損害 (尤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(5)

其是經 M M P s 引發的光照損害) 中扮演重要的角色。亦即太陽曝曬之 U V B 雖然不足以造成紅斑，但是仍有足夠的 U V 輻射(次紅斑 U V B 加上 U V A) 能引發 M M P 產生之光照損害。因此“光照損害”在技藝上應重新定義，不包括紅斑。所以 U V A 及 U V B 輻射之組合能顯著的損害皮膚。

本發明另一具體實施例發現抗氧化劑有預防光照損害之用途，能抑制 M M P 之產生。雖然抗氧化劑不能預防紅斑，但能顯著的降低人類皮膚 U V -曝曬後之 M M P 濃度。

本發明另一具體實施例發現類視網醇能抑制人類皮膚 U V -曝曬後 M M P 的引發。然而先前的技藝只提及類視網醇之用途是治療及修補受光照損害的皮膚，吾人發現類視網醇可干擾 U V -引發產生的 M M P，因此類視網醇在預防上可用於預防光照損害之發生。

總之，本發明之具體實施例包括一種(尤其是日常使用之)組成物，該組成物包括：U V A 隔絕劑、U V B 隔絕劑、及類視網醇或抗氧化劑，含塗抹上可接受的載體，視情況可包括其他抗氧化劑、類視網醇、M M P 抑制劑、或其混合物。

本發明亦包括預防光照損害事件的方法以預防光照損害，該方法針對經正常曝曬的皮膚(例如：臉、頭、手、及前臂)而在局部施用的組成物包括：U V A 隔絕劑、U V B 隔絕劑及抗氧化劑或類視網醇。

本發明另一具體實施例係關於其上塗覆或混合著

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

U V A 隔絕劑及 U V B 隔絕劑的窗型構造。本文之隔絕劑廣義的指在皮膚上對特定之光具有隔絕輻射之效應，能將其經直接吸收、反射、或緩和成無害波長之化合物。

圖形簡述

圖 1 是說明 U V 曝曬損害皮膚之一般路徑。

以下各圖係關於本文之實施例。

圖 2 是次紅斑 U V B / U V A 引發 A P - I 的証據。

圖 3 是次紅斑 U V B / U V A 曝曬後，視網酸 (R A) 及視網醇 (R O L) 抑制引發第 I 型膠原酶之証據。

圖 4 A - 4 D 是說明經 U V B / U V A 輻射曝曬後抗氧化劑對人類皮膚之效應。

圖 5 A - 5 D 是說明經 2 M E D U V B / U V A 曝曬後，人類皮膚局部塗抹”抗氧化劑”後對於產生紅斑及膠原酶活性的各種結果。

圖 6 A - 6 C 是說明經 1 M E D U V B / U V A 曝曬後，人類皮膚局部塗抹 N - 乙醯基半胱胺酸及薑黃色素對於產生紅斑及引發兩種 M M P s 之效應。

圖 7 A 是說明經 2 M E D U V B / U V A 曝曬後，人類皮膚局部塗抹市售之防曬劑對於引發紅斑的結果。

圖 8 A - 8 E 說明規則的次紅斑 U V B / U V A 重覆曝曬後，人類皮膚引發 M M P s 之效應及此類曝曬後視網酸抑制 M M P 之效應。

圖 9 A - 9 B 說明活體培養的人類角質細胞經 U V 曝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (7)

曬及 N A C 後，2 M E D U V - 引發的氣自由基之活體分析，及圖 9 C - 9 E 說明超氧化物陰離子及 c J U N m R N A 、 c J U N 磷激酶之產生及抑制。

圖 1 0 A - 1 0 D 說明 U V A 隔絕劑吸收 U V 及此隔絕劑預治療 U V - 曝曬人類皮膚，對於引發紅斑、膠原酶活性、及 c J U N 蛋白質的效應。

圖 1 1 A 及 1 1 B 說明預治療時間的效應。

較佳具體實施例之詳細描述

本發明係關於抑制（即降低或預防）皮膚（尤其是人類皮膚）受光照老化。依據本發明之較佳治療是施用於皮膚在日常受日光曝曬的部分，例如：頭、頸、手、臂手等。因為以低於能引起紅斑之 U V 劑量重覆曝曬後會導致受光照老化，因此本發明是針對接受此低劑量曝曬之皮膚。

對一般皮膚白皙的人而言，皮膚在接受介於 3 0 - 5 0 m J / c m ² 之間的 U V B 劑量時會引起紅斑。因此，本發明是在預防皮膚接受低於此劑量範圍之曝曬（大約大於 5 m J / c m ²，相當於數分鐘之日光曝曬）而受光照老化。正午時，日光到達地表，其輻射含有：0 . 5 % U V B ； 6 . 5 % U V A ； 3 8 . 9 % 可見光光；及 5 4 . 0 % I R 。此類輻射之能量通量如下：UVB 為 2.11 mJ/cm²*S (21.1W/m²)；UVA 為 8.57 mJ/cm²*s (85.7 W/m²)；可見光為 53.2 mJ/cm²*s (532W/m²)；而 IR 為 72.2 mJ/cm²*s (722 W/m²)。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (8)

撇開特定的理論，以下實施例較能整體說明圖 1 所描述之某些由 U V -引發的生化路徑導致皮膚之變化。如圖，U V 輻射引發 M A P 磷激酶串聯反應，產生兩條反應路徑：其中一條引發介白素導致紅斑；另一條引發 M M P 導致結締組織降解。然而目前之技藝認為這是 U V B 輻射產生的結果，因此我們用一系列的實驗證明 U V A 確實能產生光照損害，即使當 U V -曝曬的皮膚無肉眼可見之光照損害時亦同。此外必須認知 U V A 及 U V B 對人類皮膚太陽輻射曝曬後 U V 中介引發的 M M P s 均具反應性（可能是各自獨立的）。

測量 U V 輻射曝曬是以最小的紅斑劑量（M E D）為基準，其定義為足以使皮膚變紅之 U V 輻射曝曬。一（1）M E D 大約等於 $30 \text{ mJ} / \text{cm}^2 * \text{s}$ 之太陽輻射。先前技藝的原理是，足以引發紅斑（曬斑、紅斑）之自然日光曝曬可啟動受光照老化。使用下述之 U V 射源發射 U V A 及 U V B 輻射（U V A / U V B 之比例比自然日光低）証實若引發皮膚紅斑則同時亦可引發 M M P s。因此，目前技藝的原則是使用防曬劑，因為它可預防紅斑及預防受光照老化。

我們發現和目前相異的原則並且亦發現於 U V 曝曬前施用各種化合物對於人類皮膚有非預期的結果。其中一種非預期的結果是，不足以引起皮膚紅斑之 U V 曝曬，亦可引發人類皮膚 M M P 活性（即受光照老化）之增加。因此傳統的防曬劑可預防紅斑但是不能預防 U V 曝曬後 M M P

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(9)

活性增加引起之受光照老化。

另一個非預期的結果是隔絕 U V A 輻射在預防目的上可抑制經 U V -曝曬的人類皮膚其 M M P 活性及 c J U N 蛋白質濃度之增加，即能預防受光照老化。歸納以上之結果，發現次紅斑 U V 曝曬能引起受光照老化，本發明之特色之一是日常使用 U V A 隔絕劑，能預防受光照老化。因為 U V B 亦可引發 M M P s，所以最佳的組成物應包括 U V A 及 U V B 隔絕劑。

另一項未預期的發現是，用類視網醇進行皮膚預治療可以緩和典型 U V 曝曬後 M M P 活性之增加。據此，本發明預期在 U V 曝曬前局部的施用含類視網醇之組成物以預防受光照老化。

我們的研究中另一未預期的發現是，某些具抗氧化劑性質的化合物雖然它不能抑制 U V 曝曬後 M M P 活性之增加，但仍具有良好的抗紅斑的防曬效應。

另一未預期的發現是，某些抗氧化劑化合物在以 U V 輻射曝曬培養的人類角質細胞中能抑制反應性氧分子，並能抑制引發 M M P 之 c J U N m R N A。據此，U V 曝曬前局部的施用此化合物亦能預防 U V 曝曬後 M M P 的增加。

本發明包括預防皮膚受光照老化之方法，該方法每日施用的局部組成物含類視網醇及 U V A / B 隔絕劑。如本文所示，該方法和目前之醫療技藝的原則不同，次紅斑 U V 曝曬能促進蛋白質酶的產生。因為大多數人每日均接

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

受所謂非傳統的”日光浴”(溜狗或走路去工作)，因此每個人均會因太陽之次紅斑曝曬而產生U V引發的M M P活性，隨著年齡的增長而產生皺紋。雖然以往的生物學對人類皮膚經次紅斑U V曝曬後產生M M P s的功能提出解釋，然而本方法之所以能達成預防、或至少抑制此類之受光照老化，是因為每日局部的施用 (i) U V A / B 隔絕劑 (即廣汎的使用一種或多種化合物直接將光吸收、反射或緩和成無害波長的光，隔絕U V A / U V B 輻射對皮膚的效應)， (i i) 抗氧化劑，在預防上降低或抑制U V引發的反應性氧分子及 / 或M M P 活性之增加， (i i i) 類視網醇，在預防上降低或抑制U V引發的M M P 活性之增加， (i v) M M P s 的直接抑制劑，或 (v) 一種或多種此類成分的相容混合物。本發明較佳的具體實施例是具抗氧化劑之防曬劑組成物、M M P 抑制劑、類視網醇、及U V A 隔絕劑和U V B 隔絕劑。

本文中M M P s ”抑制劑”是抑制自然生理路徑上產生M M P 之一種或多種步驟及 / 或直接抑制一種或多種此類之蛋白質酶，及包括M A P 磷激酶串聯反應抑制劑。因此M M P 抑制劑能抑制一種或多種各類之信號傳導化合物及 / 或轉錄因子A P - I (即c J U N 及c F O S，能共同導至M M P s 之產生) 產生M M P s。

類視網醇是一類之M M P 抑制劑。此M M P s 抑制劑能作用在M M P s 及 / 或產生M M P s 之轉錄因子A P - 1 及N F - κ B。阿斯匹靈及E 5 5 1 0 (參見Fujimori, T.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

， et al.， Jpn. J. Pharmacol. (1991) 55 (1) 81-91) 能抑制 NF- κ B 之活化。

類視網醇 (例如：描述於 U.S. Pat. No. 4, 877, 805) 及游離的類視網醇是 AP-1 的專一性拮抗劑 (例如：描述於 Fanjul, et al. in Nature (1994) 372:104-110)、糖皮質激素、及維生素 D3 標的之 AP-1。增強維生素 D3 治療效應之化合物描述於共同申請案序號 08/832, 865 (J. Voorhees et al., Method for Assessing 1, 25 (OH) 2D3 Activity in Skin and for Enhancing the Therapeutic Use of 1, 25 (OH) 2D3-)，申請日期四月四日，1997，此揭示在此并入參考文獻。除了視網醇外，其他之類視網醇包括天然及合成之維生素 A (視網醇) 類似物、維生素 A 醛 (視網醛)、維生素 A 酸 (視網酸 (RA))，包括全-反、9-順、及 13-順視網酸)、安垂酸 (etretinate)，及其他描述於 E P - A 2 - 0 3 7 9 3 6 7、U S 4, 8 8 7, 8 0 5、及 U S 4, 8 8 8, 3 4 2 (此揭示在此并入參考文獻)。在活體具有類視網醇活性的各種合成的視網醇及具類視網醇活性之化合物可用於本發明，該化合物描述於 Allergan Inc. 之各種專利，例如：以下 U.S. Patents，號碼：

5, 5 1 4, 8 2 5 ; 5, 6 9 8, 7 0 0 ; 5, 6 9 6
 , 1 6 2, 5, 6 8 8, 9 5 7 ; 5, 6 7 7, 4 5 1,
 5, 6 7 7, 3 2 3 ; 5, 6 7 7, 3 2 0 ; 5, 6 7 5
 , 0 3 3 ; 5, 6 7 5, 0 2 4 ; 5, 6 7 2, 7 1 0 ;
 5, 6 8 8, 1 7 5 ; 5, 6 6 3, 3 6 7 ; 5, 6 6 3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

， 3 5 7 ; 5 , 6 6 3 , 3 4 7 ; 5 , 6 4 8 , 5 1 4 ;
 5 , 6 4 8 , 5 0 3 ; 5 , 6 1 8 , 9 4 3 ; 5 , 6 1 8
 , 9 3 1 ; 5 , 6 1 8 , 8 3 6 ; 5 , 6 0 5 , 9 1 5 ;
 5 , 6 0 2 , 1 3 0 。其他具類視網醇活性之化合物描述
 於其他之 U.S. Patents , 號碼: 5 , 6 4 8 , 5 6 3 ;
 5 , 6 4 8 , 3 8 5 ; 5 , 6 1 8 , 8 3 9 ; 5 , 5 9 9
 , 2 4 8 ; 5 , 6 1 6 , 7 1 2 ; 5 , 6 1 6 , 5 9 7 ;
 5 , 6 0 2 , 1 3 5 ; 5 , 5 9 9 , 8 1 9 ; 5 , 5 5 6
 , 9 9 6 ; 5 , 5 3 4 , 5 1 6 ; 5 , 5 1 6 , 9 0 4 ;
 5 , 4 9 8 , 7 5 5 ; 5 , 4 7 0 , 9 9 9 ; 5 , 4 6 8
 , 8 7 9 ; 5 , 4 5 5 , 2 6 5 ; 5 , 4 5 1 , 6 0 5 ;
 5 , 3 4 3 , 1 7 3 ; 5 , 4 2 6 , 1 1 8 ; 5 , 4 1 4
 , 0 0 7 ; 5 , 4 0 7 , 9 3 7 ; 5 , 3 9 9 , 5 8 6 ;
 5 , 3 9 9 , 5 6 1 ; 5 , 3 9 1 , 7 5 3 ; 等 , 以上及
 下文將會提到之參考文獻 , 全體在此併入參考文獻。

MM P 可被 : B B 2 2 8 4 (描述於 Gearing , J.H. et
 al. , Nature , (1994) 370:555-557) 、 GI129471 (參
 見 McGeehan G.M. , et al. , Nature (1 9 9 4) 3 7 0
 : 5 5 8 - 5 6 1) 、 及 M M P s (金屬蛋白質酶之組織
 抑制劑 , 抑制脊椎動物膠原酶及其他金屬蛋白質酶 , 包括
 凝膠酶及基質細胞溶解素 (stromelysin)) 抑制。本發明使
 用之其他化合物包括異羧酐酸酯及羧基-尿素衍生物 , 例如
 : 柯拉定 (Galardin) , 班提斯 (Batimastat) , 及瑪瑞斯
 (Marimastat) , 此類化合物已描述於 E P - A 1 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

0 5 5 8 6 3 5 及 E P - A 1 - 0 5 5 8 6 4 8 (治療之用途是抑制皮膚潰瘍、皮膚癌、及大泡性表皮鬆懈 (epidermolysis bullosa) 等病原學疾病之 MMP)。雖然 Goldsmith, L.A. (Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin, 2 nd. Ed. (New York: Oxford Univ. Press, 1991), Chpt. 17) 報告過類視網醇會引起 MMP mRNA 含量穩定之上升, 此代表類視網醇能控制 MMP 之轉錄; 但是我們在活體的人類皮膚實驗中卻沒有發現沒這回事。

其他的 MMP 抑制劑包括真尼坦 (genistein) 及昆絲坦 (quercetin) (描述於 U S 5 6 3 7 7 0 3、U S 5 6 6 5 3 6 1、及 F R - A - 2, 6 7 1, 7 2 4, 此類揭示全體在此併入參考文獻) 及相關的化合物, 及其他抗氧化劑, 例如: N A C (N-乙醯基胱胺酸)、綠茶萃取物 (圖中之 G T E) 等。

本發明其他抑制 M M P s 之化合物包括異羥肟酸酯及羥基-尿素衍生物, 例如: 柯拉定 (Galardin), 班提斯 (Batimastat), 及瑪瑞斯 (Marimastat), 揭示於 E P 5 S 8 6 3 5 A 1 及 B P 5 5 8 6 4 8 A 1 (能用於抑制 M M P s, 治療病原學中之皮膚潰瘍、皮膚癌、及大泡性表皮鬆懈 (epidermolysis bullosa))。

本發明除了使用類視網醇類之化合物外, 亦可使用任何抑制細胞色素 P - 4 5 0 酵素 (代謝視網酸) 之藥物。於皮膚中, 類視網醇可轉變成視網酸 (R A) 形成活性形式

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (14)

。視網酸 (R A) 可經羥化作用 (經 R A 4 - 羥化酶) 代謝成不活化之 4 - 羥基 - R A , 然後經細胞色素 P - 4 5 0 - 相關的單氧酶系統中介的反應氧化成 4 - 酮基 - R A (S. Kang et al., Liarozole Inhibits Human Epidermal Retinoic Acid 4-Hydroxylase Activity and Differentially Augments Human Skin Responses to Retinoic Acid and Retinol In Vivo, J. Invest. Dermatol., 107:183-187 (Aug. 1996) ; E.A. Duell et al., "Human Skin Levels of Retinoic Acid and cytochrome P-450-derived 4-Hydroxyretinoic after Topical Application of Retinoic Acid In Vivo Compared to Concentrations Required to Stimulate Retinoic Acid Receptor-mediated Transcription In Vitro, N J. Clin. Invest., Skin Retinoid Levels and Reporter Gene Activity, 90:1269-1274 (Oct. 1992) ; E.A. Deall et al., Retinoic Acid Isomers Applied to Human Skin in Vivo Each Induce a 4-Hydroxylase That Inactivates Only Trans Retinoic Acid, " J. Invest. Dermatol., 106 : 316-320 (Feb. 1996) ; 此類揭示全體在此并入參考文獻) 。 據此 , 干擾所有反 R A 移除代謝之化合物、塗抹施用的類視網醇活性代謝物 , 例如 : 9 - 順 R A 及 13 - 順 R A 均會增加皮膚中之 R A 含量。因此預防皮膚 (所有之反) R A 之自然降解能有效的增加其濃度 , 故能提供本文描述之優點。皮膚學上可接受的化合物之實施例並能有效抑制 P - 4 5 0 - 中介的 R A 降解 , 包括 : 氮雜茂 , 尤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

其是三氮唑，例如：肯托氮雜茂 (ketoconazole) (U S 4, 144, 346 及 4, 223, 036)，弗托氮雜茂 (fluconazole) (U S 4, 404, 216)，艾垂托氮雜茂 (itraconazole) (U S 4, 267, 179)，來若唑 (liarozole)，艾他氮雜茂 (irtemazole) 等；相關之化合物包括：雙氮嗟，例如：氟胞嘧啶。亦可將細胞色素 P - 450 抑制劑與減量之類視網醇合并使用；P - 450 抑制劑會降低類視網醇之代謝移除，故少量的類視網醇足以達成相同的結果。此外，測定特定化合物是否抑制 R A 降解的分析方法可測試 C R A B P (細胞質視網酸結合蛋白質) 之變化，若局部的施用此測試化合物會增加 R A 含量則 C R A B P 之含量亦會增加。

其他本發明申請專利範圍中可塗抹施用的 M M P s 抑制劑包括：四環素及其衍生物，例如：米諾四環素、吡咯四環素、氯四環素、甲烯土黴素、土黴素、脫氧土黴素、脫甲金黴素，及其各種鹽類。因為可能之過敏反應，應小心監視局部的四環素治療。

抗氧化劑可視為 M M P 抑制劑，因為其能壓制或降低導致 M M P 產生之自由基及反應性氧分子，例如：經 M A P 磷激酶連鎖反應。抗氧化劑包括谷胱甘肽及其前驅物，例如：N - 乙醯基半胱胺酸 (N A C)，更廣義者為 -N - C H 3 (C H 2)_n C O 半胱胺酸 (其中 n 是 0 至 8 的整數，較佳者不大於 4)，及相關的化合物及其衍生物，描述於 U . S . P a t . N o . 5, 296, 500 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

此揭示在此并入參考文獻)。抗氧化劑亦包括：(i) 脂溶性化合物例如：胡蘿蔔素及其衍生物，其他之類胡蘿蔔素，及維生素 E 及相關的生育酚；(i i) 水溶性化合物例如：維生素 C、谷胱甘肽、及 N A C；及(i i i) 其他化合物(例如：使蕃茄變紅的色素，及馬鈴薯的硫辛酸)。

各種油漆及染料工業中常見以 U V 隔絕劑來預防汽車、房屋、及衣服的色彩降解。用於人類皮膚之特佳 U V A 1 / 2 - 隔絕劑為 P A R S O L[®] 1 7 8 9 (Schering-Plough)，及上述 U . S . P a t . N o . 4 , 3 8 7 , 0 8 9 描述製備之 U V A - 隔絕劑。真正的 U V A 隔絕劑能抑制 c J U N m R N A 及膠原酶和凝膠酶之引發。

本發明之組成物可為任何化粧品學上適當的形式，較佳者為塗劑或乳膏，但亦可為軟膏或油質，及可噴灑的液體形式(例如“頭髮”噴劑能保護頭髮及頭皮免於受 U V 損害，在化粧品學上可接受的乾燥基礎上，塗劑或軟膏運用在頭髮上應無油膩之外觀)。此外，本發明預期的組成物包括一種或多種化粧品學上可接受的常用之相容輔劑，例如：著色劑、芳香劑、潤膚劑、濕潤劑等，及植物性藥物例如：蘆薈、洋甘菊等。

局部使用時，類視網醇之最佳濃度介於大約 0 . 0 5 % 至大約 5 % 之間，更佳者介於 0 . 1 % 至 1 % 之間。上述類視網醇及各種抗氧化劑亦可全身使用，較佳者為口服使用。類視網醇口服之劑量較佳者介於大約 0 . 1 m g /

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

k g (體重) 至大約 1 m g / k g 或更多，超過此劑量則可能有毒性；較佳之抗氧化劑劑量為”大劑量”(例如：至少 1 g / d 之維生素 C，至少 1 0 0 0 I . U . 之一種或多種生育酚)。

從以上之實驗結果可知，單靠離體的實驗無法測定化合物是否為 M M P 抑制劑及是否適於作為活體的抑制劑。據此，必須使用描述於此的方法測試化合物的治療效應。

從本發現可知引起次紅斑 U V 輻射劑量可造成皮膚損害。因此玻璃處方及大多數的太陽眼鏡應包括 U V -反射或-吸收物質或塗層，本發明之另一特色是提供 U V -塗層，尤其是抗 U V A 之放射光，其中一種玻璃不但包括可用於太陽眼鏡之處方，亦可用於居家、辦公室或車輛之窗戶。此外因為噴射客機之飛行高度非常高，靠窗的乘客可能曝曬於 U V A 及 U V B 輻射，但亦可能曝曬於更具損害性的 U V C 輻射。尋常之窗戶塗層專業人士能以本發明之描述運用於 U V A 隔絕劑，並併入可形成膜或固化膜(例如：油漆類)的塗膜或塗層中，以彼此結合或形成薄層的方式併入窗戶之構造中。

本發明另一具體實施例包括透明的及半透明的聚合構造，其上具 U V 反射及/或吸收的塗膜(尤其是 U V A -隔絕劑)。此構造包括窗形及窗罩裝置，例如：嬰兒車的塑膠涼篷及太陽斜照時商店窗戶懸掛的塑膠遮陽物(典型者為彩色或淺色)。同理的，尋常之此種布科專業人士可輕易的將 U V A 隔絕劑加入，與成膜聚合物質(例如：塑化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (18)

的聚乙烷基丙烯酸酯) 併合而形成透明的或半透明的窗戶構造來隔絕 U V A 輻射之穿透。

至於 U V A -隔絕的窗戶，重要的是隨著天空中太陽高度而變異的 U V A 及 U V B 相對量。高度較高時(即“正午”太陽，西能(zenith)角度為 0°)，U V A 之相對量為 14%，而 U V B 為 84%，比例大約為 0.2。高度較低時(西能(zenith)角度為 66°)，U V A 增至大約 34% 而 U V B 增至 65%，其比例大約為 0.5。高度較低時，U V A 對 U V B 之相對量可大於兩倍。因此和目前的假設不同(正午的太陽造成最大的損害，因為較大的西能(zenith)角度下有較多之 U V B 照射，故較易引起不利的曬斑)，我們發現次紅斑 U V B 加上 U V A 輻射會引起光照損害，顯示在其他的時段保護皮膚避免光照損害同樣非常重要。

總之，本發明的觀點在於針對預防受光照老化，預防 U V 曝曬曬傷後 M M P 活性之增加。本發明以一種或多種模式來預防受光照老化：提供 U V A / B 隔絕防曬劑以隔絕皮膚所承受的 U V A / B 輻射；局部施用抗氧化劑以隔絕 U V 輻射對皮膚產生反應性氧分子而啟動了 M A P 磷激酶連鎖反應及 M M P 之產生；局部的施用類視網醇或 M M P 抑制劑(如本文廣義之定義)以隔絕 U V 曝曬後轉錄因子之引發而導致 M M P 活性之增加；局部的施用抑制劑直接抑制 M M P 活性；及/或藉著在窗戶結構中加入 U V A 隔絕劑或一層結構塗層以隔絕 U V A 穿透過結構而

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

輻射到人類皮膚上。

以下實施例中使用四個 F 3 6 T 1 2 E R E - V H O U V 燈泡照射人類皮膚。同時用 Kodocel T A 4 0 1 / 4 0 7 濾器在燈泡前 4 c m 移除 U V C 輻射 (< 290 n a r y)。輻射強度用 I L 4 4 3 光治療輻射計及 S E D 2 4 0 / U V B / W 光偵測器 (Internitonal Light , Newbury , MA) 監測。用 Optronic Labroatories OL 7 5 4 系統進行光輻射分析。此四個燈泡光源前大約 4 3 c m (1 7 i n .) 處之總發光 (2 9 0 - 8 0 0 n m) 量大約是 $1.5 \text{ mJ} / \text{cm}^2 * \text{s}$ ($1.49 \times 10^{-3} \text{ W} / \text{cm}^2$)。此燈泡之輻射輸出用分光輻射分析法測定，大約是 4 7 % U V B 及大約 2 7 % U V A (含大約 9 % U V A₁ (3 4 0 - 4 0 0 n m) 及大約 1 8 % U V A₂ (3 2 0 - 3 4 0 n m))，其餘為可見光及 I R 輻射。在此組燈泡下曝曬大約 1 6 0 秒即相當於一個 M E D 之曝曬。與天然日光 (含 0 . 5 % U V B 及 6 . 5 % U V A) 比較，此燈泡組之 U V A 輻射遠少於日光，而 U V B 則等於日光之曝曬。

以下實施例中使用 3 0 % P E G (聚二醇) 之 7 0 % 乙醇 (含 0 . 0 5 % B H T 作為保存劑) 作為“標準賦形劑”。U V - 引發的皮膚膠原降解用溶解交聯之末端胜肽放射免疫檢定法加以評估。M M P s 之 m R N A 及蛋白質含量及各內生性抑制劑 (T I M P s) 用北方及西方分析分別測定。M M P 之活性用酵素測量法測量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (20)

實施例 1 -- A P - 1 引發的次紅斑

將九個白人成人之臀部區域（即不常曝曬日光的皮膚）用上述之燈泡組，在不同的時間下曝曬於 U V 輻射，然後取出組織樣品分析。如圖 2，用上述之 2 分鐘 40 秒（- 1 6 0 s）作為一個 M E D，用燈泡照射曝曬志願者各部分的皮膚，其時間分別為 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、及 2 M E D。測定曝曬（及 0 M E D，未曝曬）皮膚切片的皮膚組織樣品中出現之 A P - I（圖 2 之 A）及編碼之 A P - 1 結合至 D N A 增加的倍數（圖 2 之 B）。如描述於 Angel, P., et al., Cell (1 9 8 7) 4 9 : 7 2 9 - 7 3 9 及 Sato, H. and Seiki, M., Oncogene (1 9 9 3) 8 : 3 9 5 - 4 0 5，M M P s 是經轉錄因子 A P - 1 中介後所產生。

圖 2 之切片結果令人驚異。次紅斑劑量下降至大約至少 0.01 M E D 時，引發之 A P - 1 明顯的大於未曝曬的皮膚。此結果使我們相信人類皮膚之光照損害可經次紅斑 M E D 輻射劑量（包括 U V B 及 U V A）引發，據此日常至少施用防曬劑隔絕 U V A 以及 U V B（視需要）可保護人類避免受光照老化。

實施例 2 -- 類視網醇預防引發次紅斑膠原酶

如共同申請案 5 8 8，7 7 1（如前述，全文在此并入參考文獻）中所描述，類視網醇能抑制紅斑劑量之照射後各種 M M P S（包括膠原酶）之引發。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (21)

使用十位志願者的臀部皮膚，進行上述之一般程序後，各志願者分別用以下藥品作預處理：只有賦形劑、含 0 . 1 % 視網酸 (R A) 、或含 1 % 視網醇 (R O L) 。

預治療後無曝曬及用四個燈泡組曝曬後，用切片取得各志願者之組織樣品。

切面樣品的結果示於圖 3，該圖說明十位志願者在預治療及曝曬後活體中第 I 型膠原酶倍增的情況。結果顯示，人類皮膚用類視網醇預治療能抑制次紅斑 U V - 引發膠原酶活性。與實施例 1 之圖 2 一致，次紅斑 U V 曝曬能引起膠原酶活性顯著的增加。

實施例 1 及 2 的結果令人意外與振奮，使我們對目前保護皮膚及日光引起皮膚損害的原理發出疑問。經過不同的年代，不同的文化，深棕色的戶外形像均不符審美的訴求，例如：伊利沙白女皇時代的英國及許多東方人種（例如：日本，韓國），各種化合物及組成物曾被嚐試過預防日光對皮膚之損害及／或引發”保護性”棕褐皮膚。因此我們決定測試各種新舊之化合物及組成物對 U V - 曝曬的皮膚真正的活體效應。

實施例 3 -- U V 曝曬後局部的抗氧化劑預治療 I 之效應

抗黑變激素是一種由日夜的光-暗循環中介的荷爾蒙。近年來曾有報導指出抗黑變激素可作為抗氧化劑。

我們評估六位志願者用上述一般的程序測試抗黑變激素對 U V - 引發之紅斑的局部效應。各志願者曝曬各種 U V

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (22)

劑量 5 分鐘後及其紅斑的反應示於圖 4。各志願者之未曝曬的皮膚先單獨用載體或用 5 % 抗黑變激素進行預處理。結果示於圖 4，大約 $30 - 40 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ (大約 1 MED) 能在載體處理的皮膚上引發紅斑，而經抗黑變激素處理過的皮膚直到大約 2 MED 才出現紅斑。即使抗黑變激素處理的皮膚出現紅斑，其程度亦較載體處理過且 UV 照射的皮膚低。

然而必須記住，無紅斑並不代表沒有光照損害。

在另一組實驗中，志願者未曝曬的皮膚區域在 UV 曝曬前 7 小時用載體或 5 % 抗黑變激素或 5 % 維生素 E 保護。然後此區域用 UV 輻射曝曬約 2 MED，然後用色度計讀取測定紅斑的程度，取樣品測定第 I 型膠原酶及 92 kDa 凝膠酶之活性。結果示於圖 4 B，和載體處理 UV - 曝曬的皮膚比較後，抗黑變激素及維生素 E 能顯著的降低紅斑。因此，抗黑變激素及維生素 E 可視為抗氧化劑，並具優異的抗曬傷防曬劑效應。如圖 4 C 及 4 D，抗黑變激素及維生素 E 並無抑制 UV - 曝曬的人類皮膚之 MMP 活性的功能。

實施例 4 -- UV 曝曬後局部的抗氧化劑預治療 I I 之效應

另一個引起光照損害之理論係關於 UV 輻射後反應性氧分子 (ROS) 及其他自由基之產生，因為 UV 輻射能產生自由基。因此我們研究是否抗氧化劑，例如：維生素

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

C (抗壞血酸) 、 N - 乙 醯 基 半 胱 胺 酸 (N A C) 、 2 - 聯 麩 醯 基 二 脲 (F D O) 、 及 綠 茶 萃 取 物 (G T E) 、 和 阿 斯 匹 靈 (乙 醯 基 水 楊 酸 , A S A) 對 於 M M P 引 發 之 紅 斑 或 光 照 損 害 有 任 何 效 應 。 志 願 者 在 曝 曬 前 1 6 小 時 進 行 預 處 理 , 曝 曬 及 切 片 取 樣 則 如 前 述 之 實 施 例 。 其 中 一 個 實 驗 將 志 願 者 的 皮 膚 用 載 體 或 5 % A S A 或 3 . 5 % 維 生 素 C 進 行 預 處 理 , 並 用 色 度 計 測 試 紅 斑 , 用 酵 素 測 量 法 測 試 膠 原 酶 活 性 。 一 個 (1) M E D 曝 曬 後 , 圖 5 A 顯 示 用 阿 斯 匹 靈 或 維 生 素 C 進 行 預 處 理 的 皮 膚 與 未 經 處 理 (只 用 載 體 處 理) 的 皮 膚 比 較 下 , 在 一 個 (1) M E D 曝 曬 下 能 降 低 U V - 引 發 之 紅 斑 , 阿 斯 匹 靈 之 處 理 比 維 生 素 C 之 處 理 較 能 降 低 3 0 % 之 紅 斑 , 維 生 素 C 處 理 比 未 處 理 之 皮 膚 較 約 降 低 3 0 % 之 紅 斑 。 當 評 估 取 樣 之 膠 原 酶 活 性 時 , 結 果 示 於 圖 5 B , 阿 斯 匹 靈 - 處 理 的 皮 膚 比 未 處 理 的 皮 膚 有 較 高 的 膠 原 酶 活 性 , 維 生 素 C 與 未 處 理 之 皮 膚 相 較 下 大 約 降 低 2 5 % 之 膠 原 酶 活 性 。 再 次 令 人 驚 異 的 發 現 , 紅 斑 和 由 M M P - 中 介 的 U V - 引 發 人 類 皮 膚 之 光 照 損 害 無 關 。 事 實 上 阿 斯 匹 靈 可 用 於 紅 斑 , 但 結 果 顯 示 阿 斯 匹 靈 對 於 第 I 型 膠 原 酶 中 介 的 皮 膚 光 降 解 無 保 護 功 能 。

同 樣 的 實 驗 使 用 載 體 、 或 2 0 % N A C 、 或 5 % F D O 、 或 2 % G T E 作 為 抗 氧 化 劑 , 二 個 (2) M E D 曝 曬 , 抗 氧 化 劑 亦 可 在 曝 曬 前 施 用 。 圖 5 C 說 明 此 類 化 合 物 紅 斑 分 析 的 結 果 , F D O 能 完 全 抑 制 紅 斑 、 N A C 則 無 效 果 (及 與 載 體 處 理 的 皮 膚 相 同) , G T E 的 抑 制 紅 斑 效

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (24)

應大約是 F D O 的一半。令人意外地，在分析相同程度曝曬之第 I 型膠原酶活性時（如圖 5 D）顯示 N A C 能顯著的保護膠原酶活性，F D O 具有某種程度的保護效用，而 G T E（例如阿斯匹靈）則無保護受光照老化之效用。

實施例 5 -時間相關的預治療

除了測定給定的化合物是否會抑制 U V 輻射曝曬後皮膚之紅斑及／或 M M P -中介的降解之外，我們亦發現與時間相關的保護效應。

將志願者的皮膚用四燈泡組曝曬一個（1）M E D，以及用載體、或 2 0 % N A C、或 0 . 0 4 % 薑黃色素（C U R C）在曝曬前 4 小時或 7 小時進行預處理。曝曬後用色度計及酵素測量法進行前述之分析。

圖 6 A 說明各種預治療對紅斑之效應。不論預治療之長短，N A C 及 C U R C 對 U V 曝曬的皮膚無抗紅斑效應，雖然用薑黃色素進行 7 小時的預治療能降低均勻曝曬皮膚的紅斑（但可能是化合物的慢性效應）。

與圖 6 A 比較之下，圖 6 B 顯示用 N A C 及 C U R C 預治療以及 1 M E D 曝曬對第 I 型膠原酶之效應。用 N A C 進行 7 小時之預治療對紅斑有最小的效應，與未處理的皮膚比較下膠原酶之活性至少倍增（膠原酶活性增加超過 1 5 0 %）。相反的，C U R C 處理的皮膚在 U V 曝曬後其膠原酶活性與未處理的皮膚相同。

分析樣品之凝膠酶（9 2 k D a）活性；凝膠酶是另

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (25)

一種 M M P 。如圖 6 C ， 4 小時之 N A C 預治療後以 U V 曝曬無法對凝膠酶活性提供保護，然而 7 小時之預治療後將其與未曝曬及未處理的皮膚相較下，對凝膠酶活性之增加降低一半。C U R C 處理的皮膚能稍微降低凝膠酶活性，且無時間變化效應（4 至 7 小時的測試）。

實施例 6 -- 市售防曬劑之效能

我們亦評估市售防曬劑對 U V 引發的紅斑及膠原酶活性的效用。志願者的皮膚用以下物質進行預處理：標準載體；及三種防曬劑（於皮膚不同的區域）：S P F（日光保護因子）15 成份，包括乙基己基 - p - 甲氧基亞桂皮酸酯及酚酮；S P F 30 成份，其包裝說明書說明能保護 U V A 及 U V B，內含辛克林（10%）、辛基甲氧基亞桂皮酸酯（7.5%）、及酚酮（6%）；及 S P F 50 成份，其包裝說明書說明能保護 U V A 及 U V B，內含較高量之 S P F 30 成份。

載體和防曬劑在皮膚之不同區域預治療後用 2 M E D 曝曬，再評估志願者皮膚的紅斑。如圖 7 A 所示，所有的市售防曬劑均能優異的保護 U V 引發的紅斑；和未曝曬的皮膚相比較下並無紅斑。

實施例 7 -- 一般次紅斑 U V 曝曬的生理效應

我們重覆檢測次紅斑 U V 劑量在活體中引發 M M P s 之效應，尤其是第 I 型膠原酶及 92 k D a 凝膠酶。將志

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (26)

願者的四個不同的位置照射 0 . 5 M E D , 各位置分別接受一、二、三、或四次之 U V 曝曬, 各曝曬之間相隔 4 8 小時。最後一次曝曬後 2 4 小時, 從志願者曝曬之位置及皮膚未曝曬之位置 (作為控制組) 取出皮膚切片, 並分析 M M P 活性。如圖 8 A 所示, 單一 U V 曝曬後膠原酶及凝膠酶活性分別上升兩 2 . 2 倍及 4 . 4 倍。並在每隔一天便重覆曝曬一次, 持續四天, 以保持此上升量。

因為 U V 曝曬後施用類視網醇 (尤其是反 - 類視網酸, t R A) 能降低皮膚之 M M P 活性, 所以我們亦研究 t R A 預治療後對曝曬之效應。如 Fisher 等人所述 (見附件), 用 t R A 預治療皮膚無法改變低量之膠原酶、9 2 k D a 凝膠酶、或基質細胞溶解素 (stromelysin), 和未處理的皮膚相較下, 用 U V 照射後會引起此三種 M M P s 大量降低。T I M P s 及 M M P s 能協同調控, 我們因此研究 U V 是否能引發內生性 T I M P s , 以及引發之 T I M P s 是否能被抑制。將志願者曝曬於各種 U V 劑量 (其範圍介於 0 . 0 1 至 2 M E D) 並從未曝曬的區域取樣。如圖 8 B 及 8 C 所示, T I M P - 1 及基質細胞溶解素 - 1 (stromelysin-1) 能在相當低的次紅斑曝曬量下曝曬 8 小時後引發; 在 0 . 1 M E D 下引發則頗為顯著。在此曝曬後, 曝曬的區域每日施用 0 . 1 % t R A , 為期三天後取樣。如圖 8 D 及 8 E , t R A 無法降低 T I M P 量, 但顯著的降低基質細胞溶解素 (stromelysin) - 1 蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (27)

實施例 8 -活體中抑制 U V 引發的 R O S

如上述所提，各種光照損害的理論均假設 U V 照射皮膚後能產生自由基，尤其是氧自由基。

首先我們先測試志願者皮膚曝曬 2 M E D 之 U V 輻射後超氧化物陰離子（可造成超氧化去突變酶，繼而形成過氧化氫，一種強力的氧化劑）及過氧化氫是否存在於皮膚。如圖 9 A 所示，雖然含量少（大約 1 0 picograms/milligram 樣品溼重），經可引發紅斑的 UV 輻射曝曬後人類皮膚之過氧化氫量上升。其中一種體內之天然抗氧化劑是谷胱甘肽，所以測試未曝曬的及 2 M E D 曝曬的志願者皮膚其還原的谷胱甘肽（G S H）及氧化的谷胱甘肽（G S S G，雙體）含量；若谷胱甘肽被氧化，則是控制還原皮膚之自由基濃度。如圖 9 B 所示，G S H 存在於未曝曬的皮膚，曝曬的皮膚上含有顯著量之氧化的抗氧化劑，此代表谷胱甘肽正在作用中。

因為許多自由基存在時間短所以很難在活體中分析，我們亦研究自由基之抑制，抑制引發信號分子 c J U N 及其 m R N A，及抑制引發 A - T F - 2 磷激酶活性。從志願者取樣，分離及培養樣品中之角質細胞（K C s）。在 N A C 存在或不存在下，將培養的 K C s 樣品曝曬於 U V 輻射下，測定超氧化物陰離子（ $O_2^{\cdot -}$ ）及相關的過氧化氫之含量。如圖 9 C 所示，谷胱甘肽前驅物質明顯的降低了培養的 K C s 中超氧化物陰離子自由基的濃度。

於相關的實驗中，將人類 K C s 曝曬於 U V 輻射，在

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (28)

N A C 存在或不存在下測定 c J U N m R N A 及 c J U N 磷激酶之活性。如圖 9 D 所示，和未處理的 K C s 比較下，N A C 能顯著的降低 c J U N m R N A 之引發。如圖 9 E 所示，N A C 亦能抑制 c J U N 磷激酶之活性。我們亦發現 N A C 能抑制人類 K C s 中 A T F - 2 磷激酶活性之引發，如圖 9 F。

實施例 9 -- U V 波長對引發 M M P 之效應

我們研究皮膚經 U V 輻射曝曬 2 M E D s 後用已知之 U V A 隔絕劑預治療紅斑及 M M P 活性之效應。尤其是用 PARSOL® 1 7 8 9 (即為 PARSOL®A) 品牌之 4 - t - 丁基 - 4' - 甲氧基二苄醯基甲烷，該產品已描述於 U . S . P a t . N o . 4 , 3 8 7 , 0 8 9 (此揭示全文在此并入參考文獻)。(PARSOL®MCX及PARSOL®MOX是 2 - 乙基己基 - p - 甲氧基亞桂皮酸酯的商標，一種 U V B - 隔絕劑常用之市售防曬劑，揭示於 U . S . P a t . N o . 4 , 7 1 3 , 4 7 3 , 此揭示全文在此并入參考文獻)。

PARSOL®1 7 8 9 對 U V A₁、U V A₂、及 U V B 波長之吸收特性示於圖 1 0 A 之點線。此化合物尤其能隔絕 U V A₂ 輻射及在某種程度上隔絕 U V A₁ 輻射。陰影線是產生紅斑之天然 U V 輻射的波長；如圖所示，紅斑主要由 U V B 輻射造成。

在一組實驗中，志願者未曝曬的皮膚用載體或 5 % 之 PARSOL®1 7 8 9 U V A 隔絕劑進行預處理。此預處理之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (29)

區域用大約 2 M E D 之 U V 輻射曝曬後，測試紅斑，並測試切片的 9 2 k D a 凝膠酶活性及 c J U N 蛋白質之存在。

圖 1 0 B 是測試曬斑曝曬後的結果，其中 PARSOL® 1 7 8 9 預處理的皮膚無法保護 U V 之曝曬會引發曬傷。因為 PARSOL® 1 7 8 9 能顯著的隔絕 U V A 輻射，因此本結果証實 U V B 輻射是造成曬斑的主因。

圖 1 0 C 是志願者的皮膚凝膠酶活體活性測試的結果，其中經 PARSOL® 1 7 8 9 預處理的皮膚經 U V -曝曬後活性下降（相較於載體處理的皮膚經 U V -曝曬）。事實上，U V A 隔絕劑-處理的皮膚其凝膠酶活性和載體處理的未曝曬皮膚並無顯著不同。此結果顯示 U V A 確能引起 U V -曝曬的皮膚之 U V -中介的 M M P。據此，只有某些波長之 U V 輻射易於引起受光照老化及皮膚之光降解。因此本發明包括使用 U V A 隔絕防曬劑預防受光照之老化。

圖 1 0 D 是兩位志願者經 PARSOL® 1 7 8 9 處理、U V -曝曬後 8 小時其皮膚樣品之 c J U N 蛋白質西方點墨分析。比較點墨之左右邊可發現 U V A 隔絕劑預治療後經 U V 曝曬（2 M E D）並無典型增高 c J U N 蛋白質濃度之現象（和載體處理 U V -曝曬的皮膚相比較）。

實施例 1 0

以上之結果顯示，皮膚施用活性成分和活體中抑制 M M P s 或其前驅物之能力之間有一段延滯時間。圖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (30)

1 1 A 及 1 1 B 是局部的施用 R A 於 U V 輻射曝曬後其抑制膠原酶、凝膠酶、及 c J U N 蛋白質的時間進程之研究結果。

志願者用載體、或載體與 0.1 % R A 在皮膚曝曬 2 M E D 之 U V 輻射前 7、16、24、及 48 小時前進行預處理，曝曬後 24 小時從志願者皮膚曝曬的部分取樣。如圖 1 1 A，以曝曬前 24 小時進行載體預治療之膠原酶及凝膠酶的活性作為基線。曝曬前 7 小時之 R A 預治療與載體相較之下無法使膠原酶或凝膠酶活性產生顯著的不同。16 小時之預治療，膠原酶活性與載體之預治療亦無不同；但凝膠酶活性則明顯的降低。於 24 小時之治療，膠原酶及凝膠酶之活性均低於使用載體之控制組。於 48 小時之預治療，膠原酶及凝膠酶活性則進一步的降低。

皮膚曝曬 U V 輻射是否會改變 c J U N 蛋白質則視是否 (1) 皮膚在曝曬前 48 小時用 (a) 載體或 (b) 含 R A 之載體預處理，及 (2) 曝曬前 8 小時將 R A 分散於載體。如圖 1 1 B，曝曬前 8 小時用 R A 進行預治療和曝曬前 48 小時用載體進行預治療相較之下不會引起皮膚中 c J U N 含量之任何變化。此外，曝曬前 48 小時用 R A 進行預治療會顯著的降低皮膚內 c J U N 蛋白質之含量。

回顧圖 1 之反應路徑，增加皮膚內之 c J U N 量，預期會增加 A P - 1 之濃度，必然的會增加降解組織之 M M P s。

回顧上述之結果，當用類視網醇作活性成分抑制受光照

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (31)

老化時，較佳者是在 8 小時前對皮膚施用類視網醇，更佳者至少 16 小時，最佳者至少 24 小時，甚至是 UV 輻射曝曬前 48 小時。如我們先前之申請案 588,771 所示，UV-輻射曝曬後膠原酶及凝膠酶之活性從基本量上升須要一段時間，多至 48 小時。本實施例之結果顯示局部施用類視網醇抑制 MMP 路徑則不須要如此長的時間。因此，在須要保護的前一天施用本組成物是抑制受光照老化之較佳方法，而每日施用本組成物則是永遠抑制受光照老化的最佳方法（尤其是本文已顯示次紅斑 UV 劑量能促進 MMP 之活性）。

前述之描述是用以說明而非限制本發明。對於熟悉此技藝之專業人士而言，各種變化、改良及潤飾是顯而易見的，因此均應包含在本發明申請專利範圍的精神之內。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

四、中文發明摘要（發明之名稱： 抑制皮膚受光照老化之組成物與方法）

本發明提供可改善日光中之 U V A 及 U V B 輻射之各種效應的組成物及方法。此組成物包括預防 M E D 及次 M E D 輻射引發光照老化之成分，例如：類視網醇、某些抗氧化劑化合物（例如：N-乙醯基半胱胺酸）、及 2-聯麩醯基二肟，及視情況可含其他 M M P 抑制劑，例如：四環素及／或抑制 P-450-中介的類視網醇代謝之化合物，例如：酮共氮雜茂（ketoconazole）及其他氮雜茂化合物。此方法中，組成物於日曬前施用；視使用之組成物成分而異，可於曝曬前 7 至 48 小時施用。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

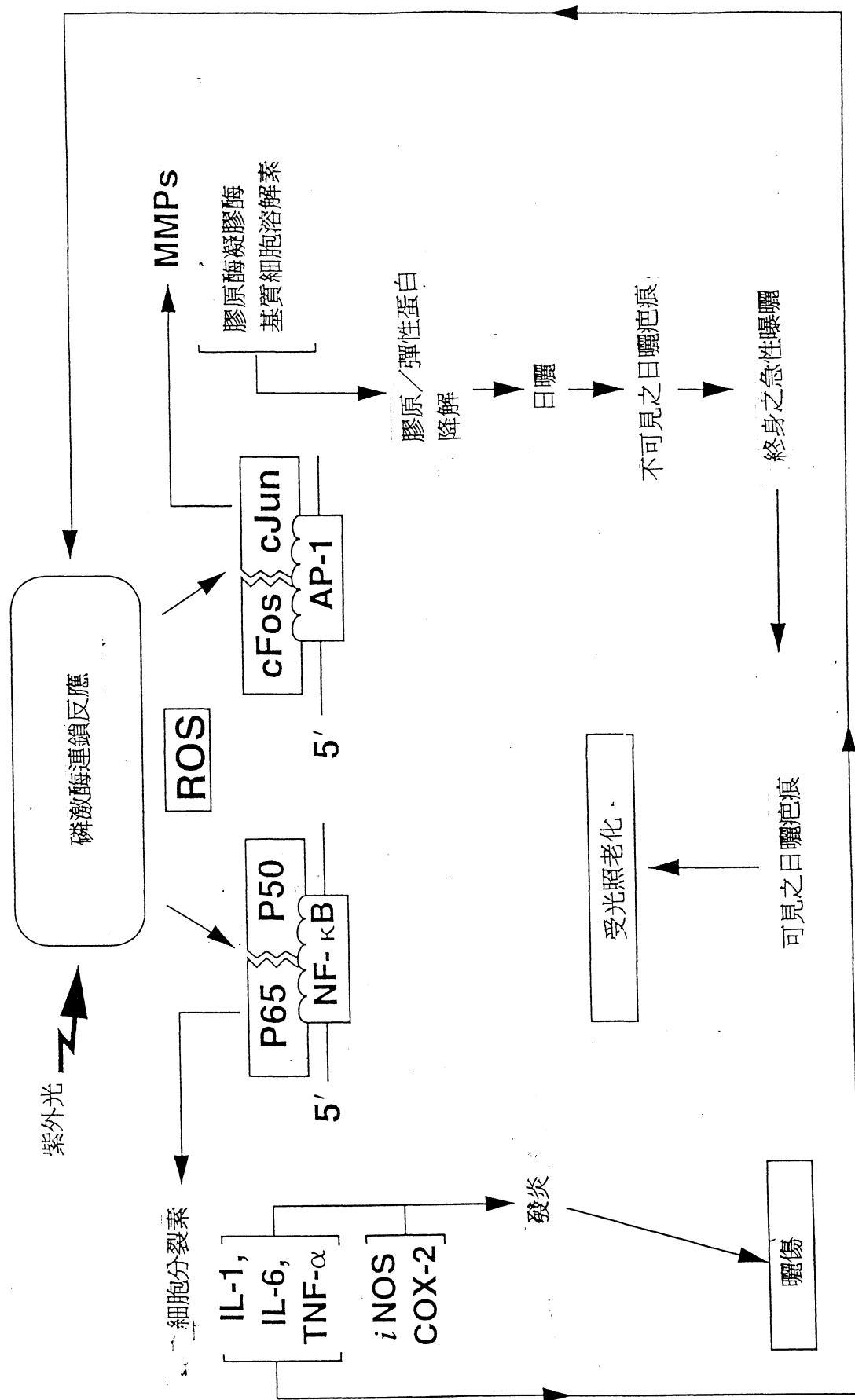
英文發明摘要（發明之名稱： COMPOSITIONS FOR INHIBITING PHOTOAGING OF SKIN）

Compositions and methods are provided for ameliorating various effects of UVA and UVB radiation from the sun. The compositions including an ingredient that prevents photoaging from MED and subMED radiation, such as a retinoid, certain antioxidant compounds (such as N-acetylcysteine), and 2-furildioxime, and optionally other MMP inhibitors such as tetracyclines and/or compounds that inhibit the P-450-mediated metabolism of retinoids such as ketoconazole and other azole compounds. In the method, the composition is applied prior to exposure to the sun; depending upon the ingredients used in the composition, application should be from 7 to 48 hours prior to exposure.

訂

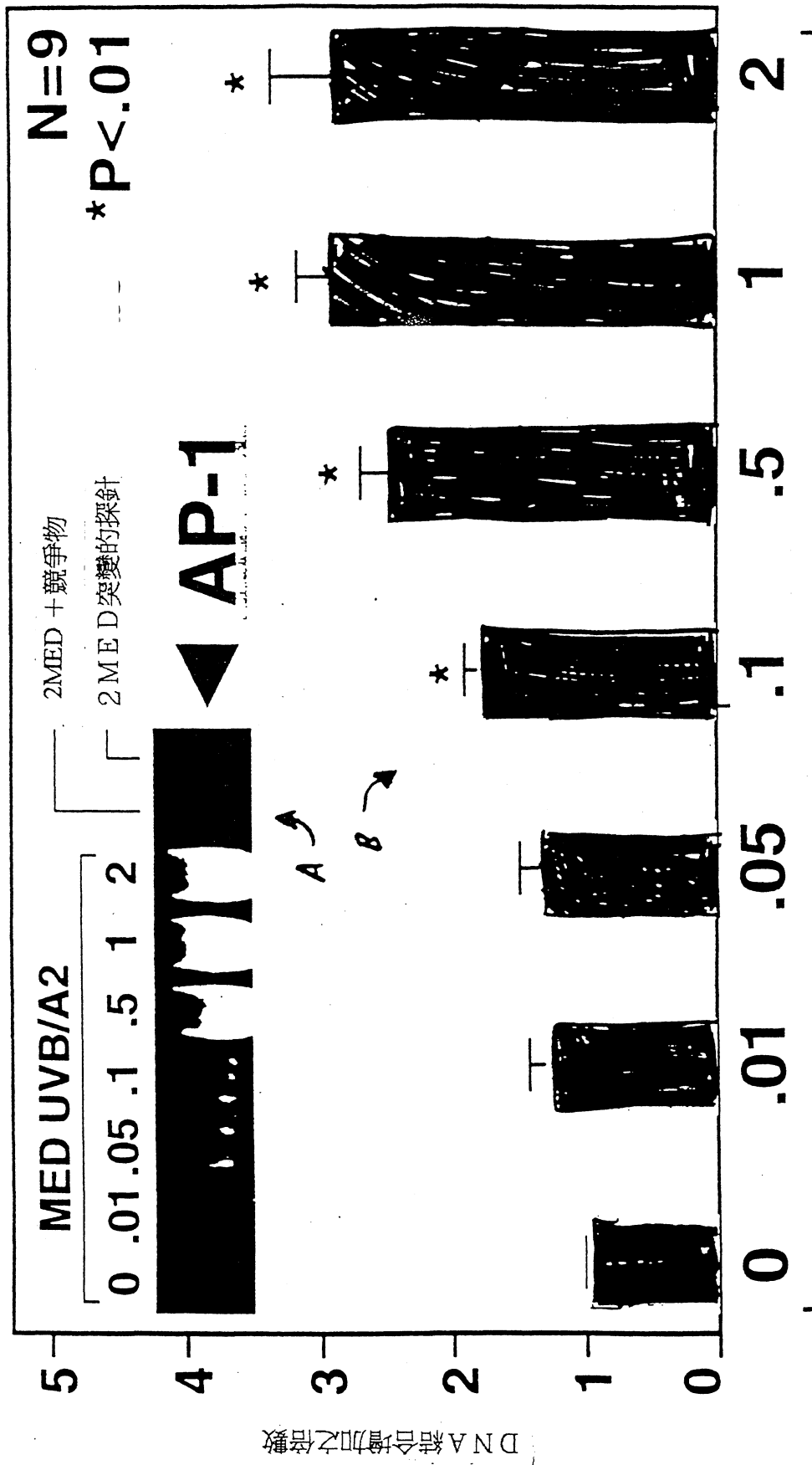
錄

圖 1



2/28

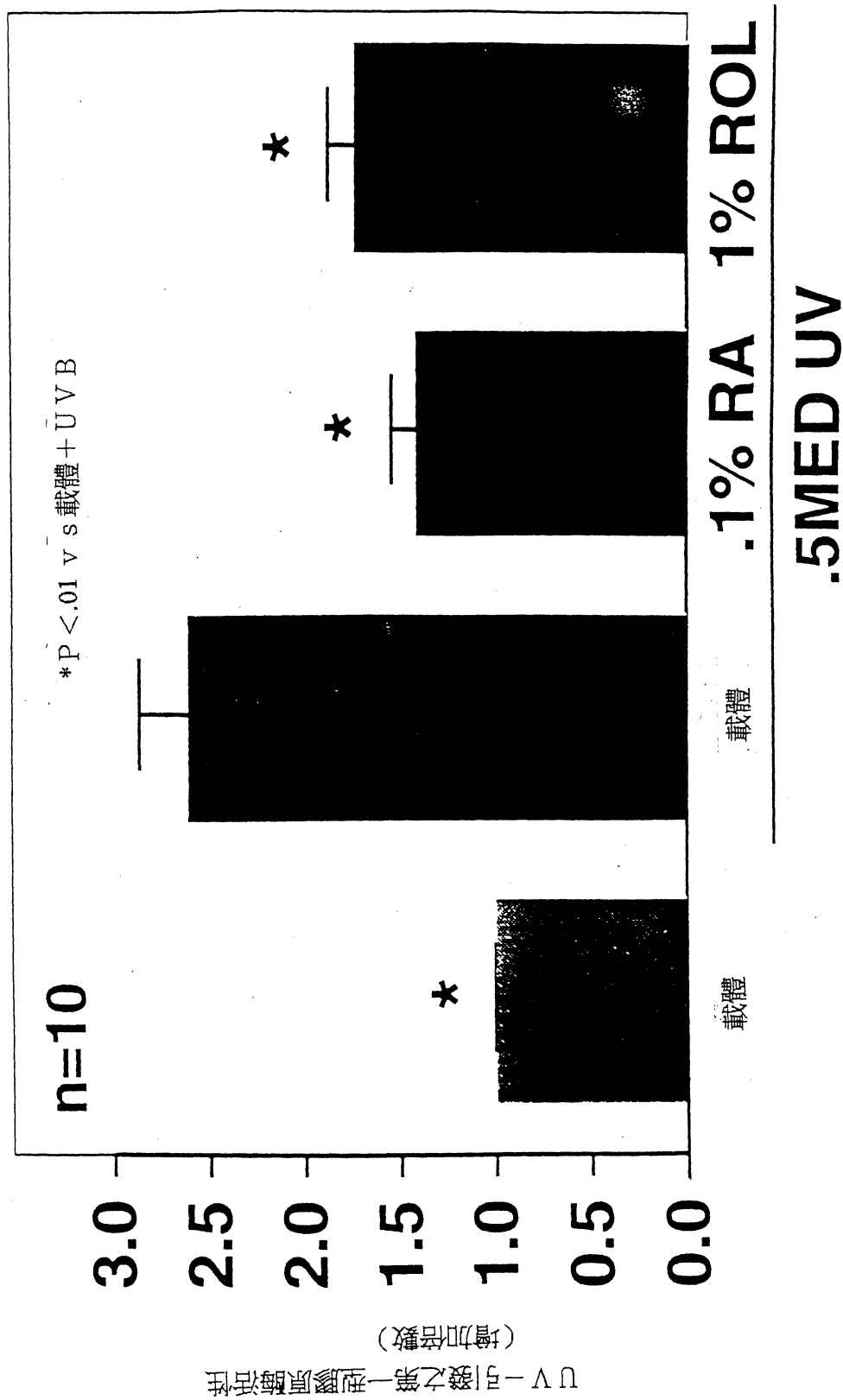
圖 2



MED UVB/A2

圖 3

在活體中RA及ROL抑制人類皮膚經(0.5MED)引證之第一型膠原酶活性



4/28

圖 4A

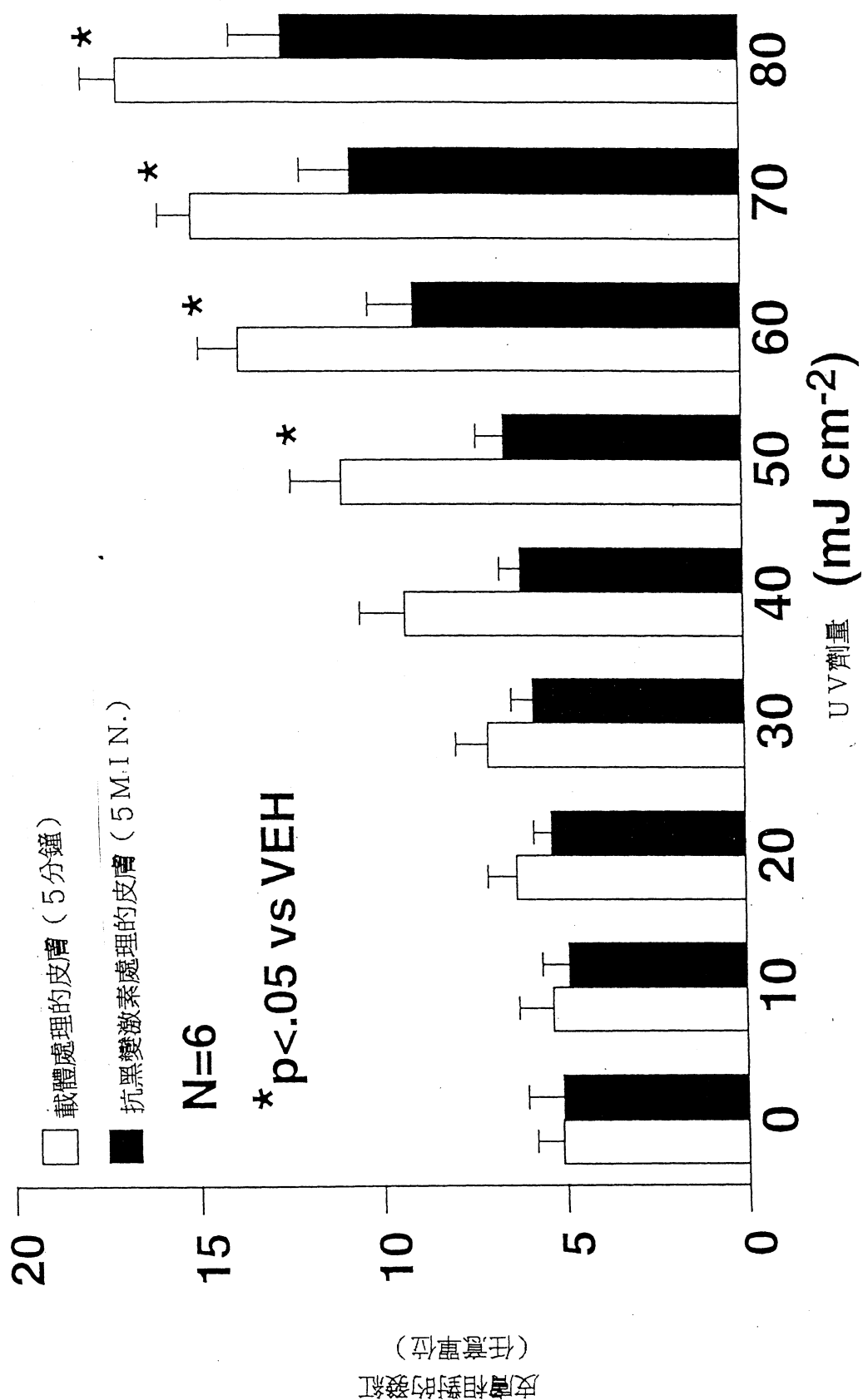
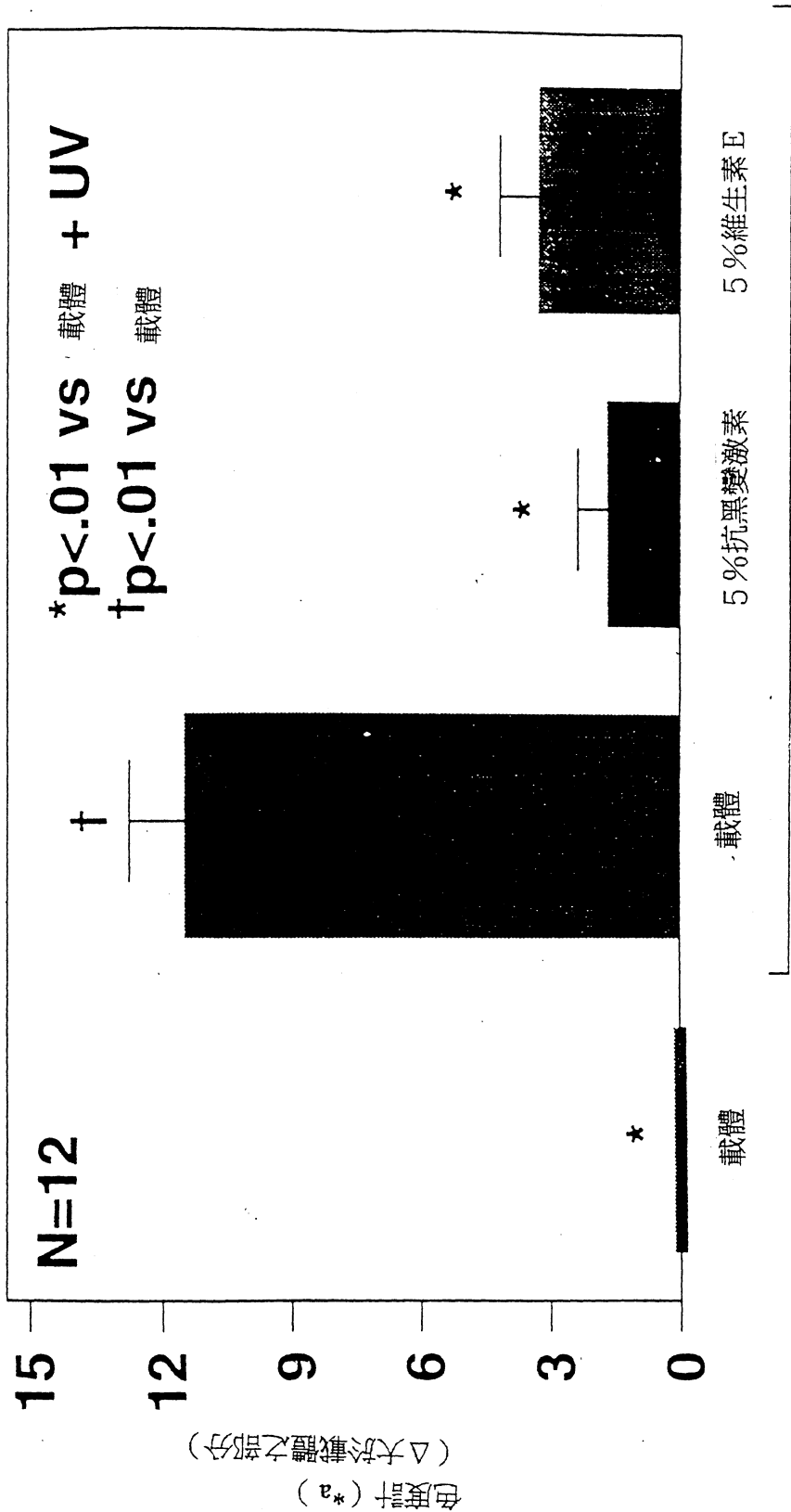


圖 4B

人類皮膚對UV (2MED) 之紅斑反應：使用或不使用抗氧化劑預處理
(7小時)



+ UV (2MED)

圖 4C

抗氧化劑對於活體的人類皮膚UV-引發膠原酶活性的效應

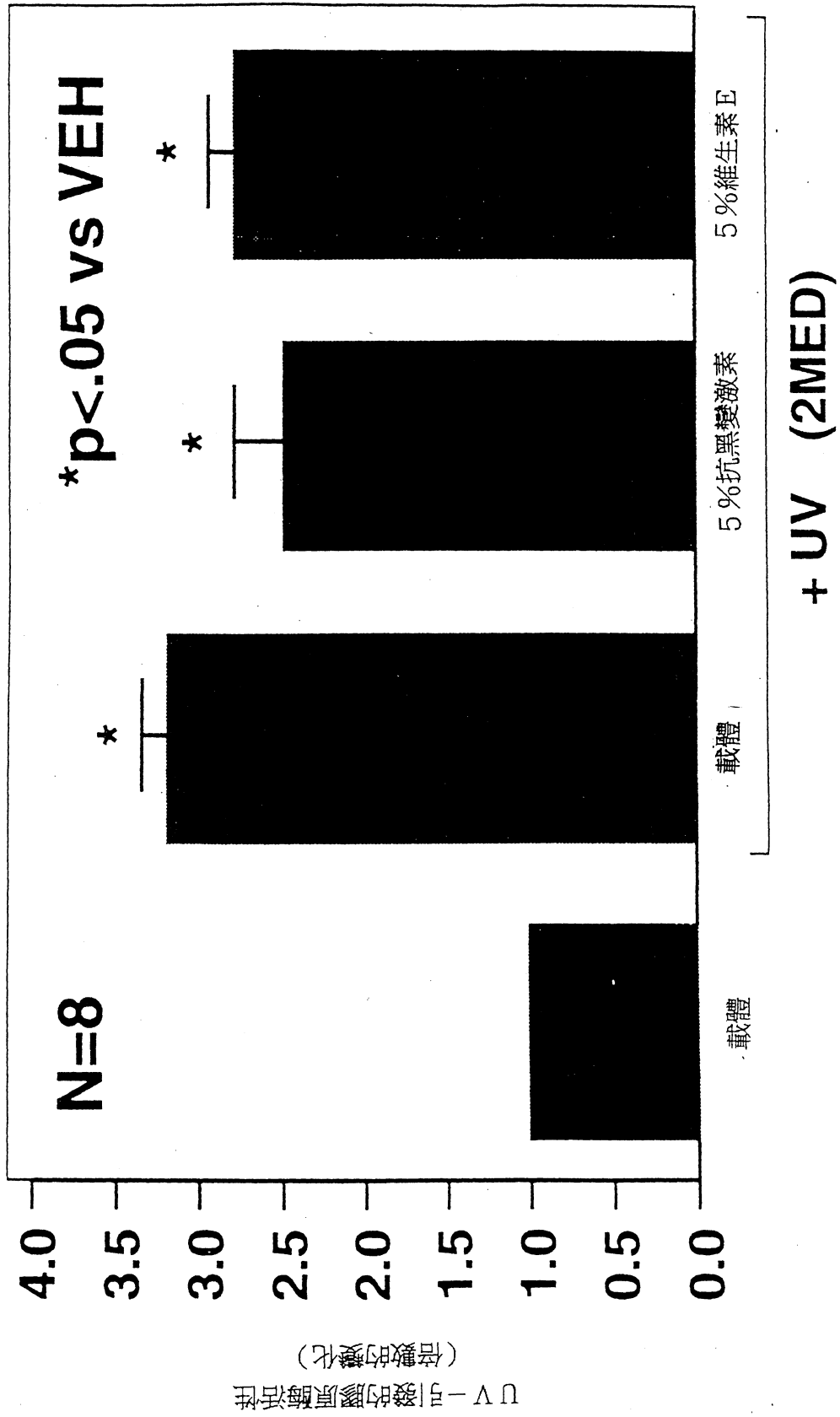


圖 4D

抗氧化劑對於活體人類的皮膚經UV(2MED)引發92kDa凝膠酶活性的效應

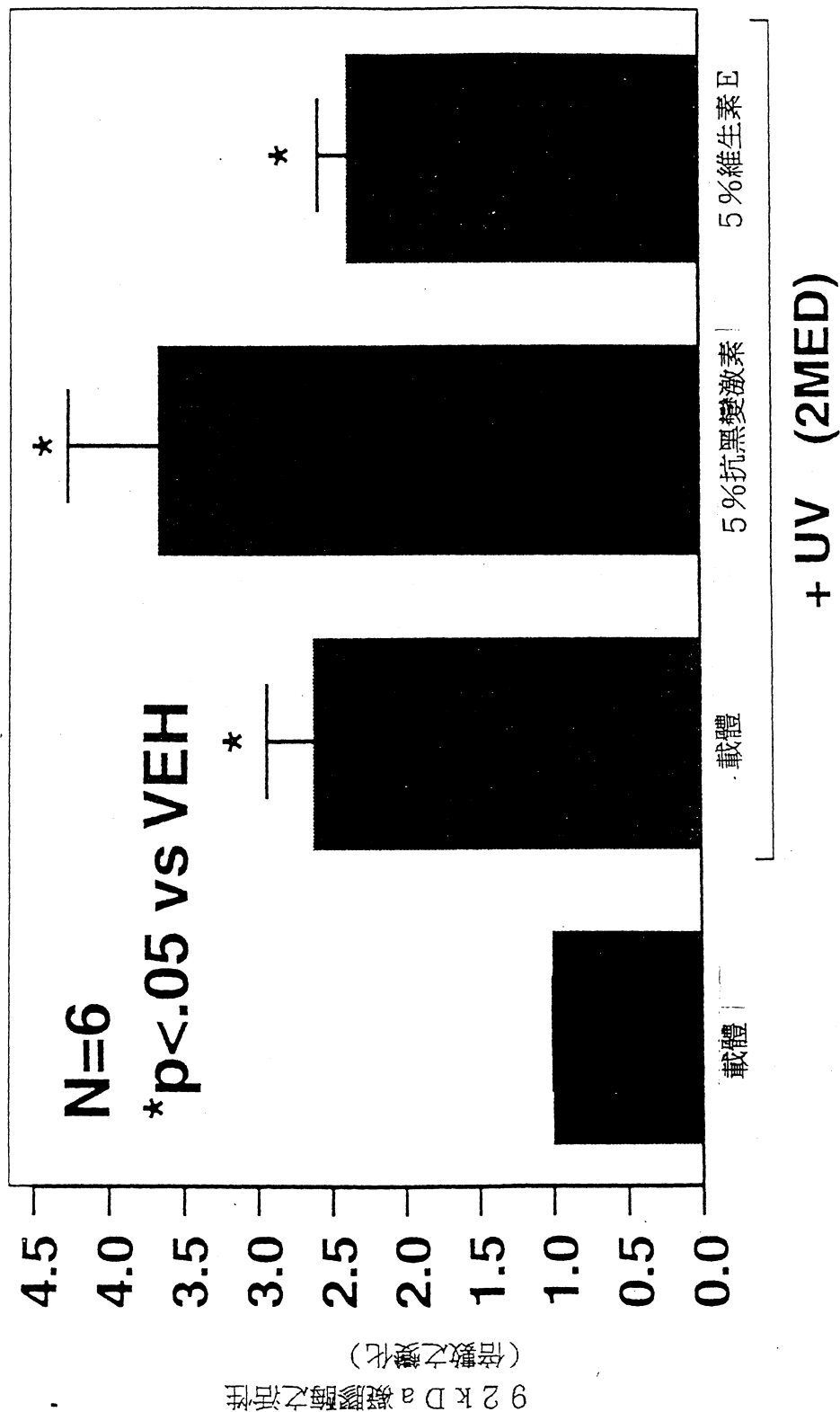


圖 5A

人類皮膚對於UV (1MED) 的紅斑反應：
使用及不使用ASA及維生素C前處理 (16小時)

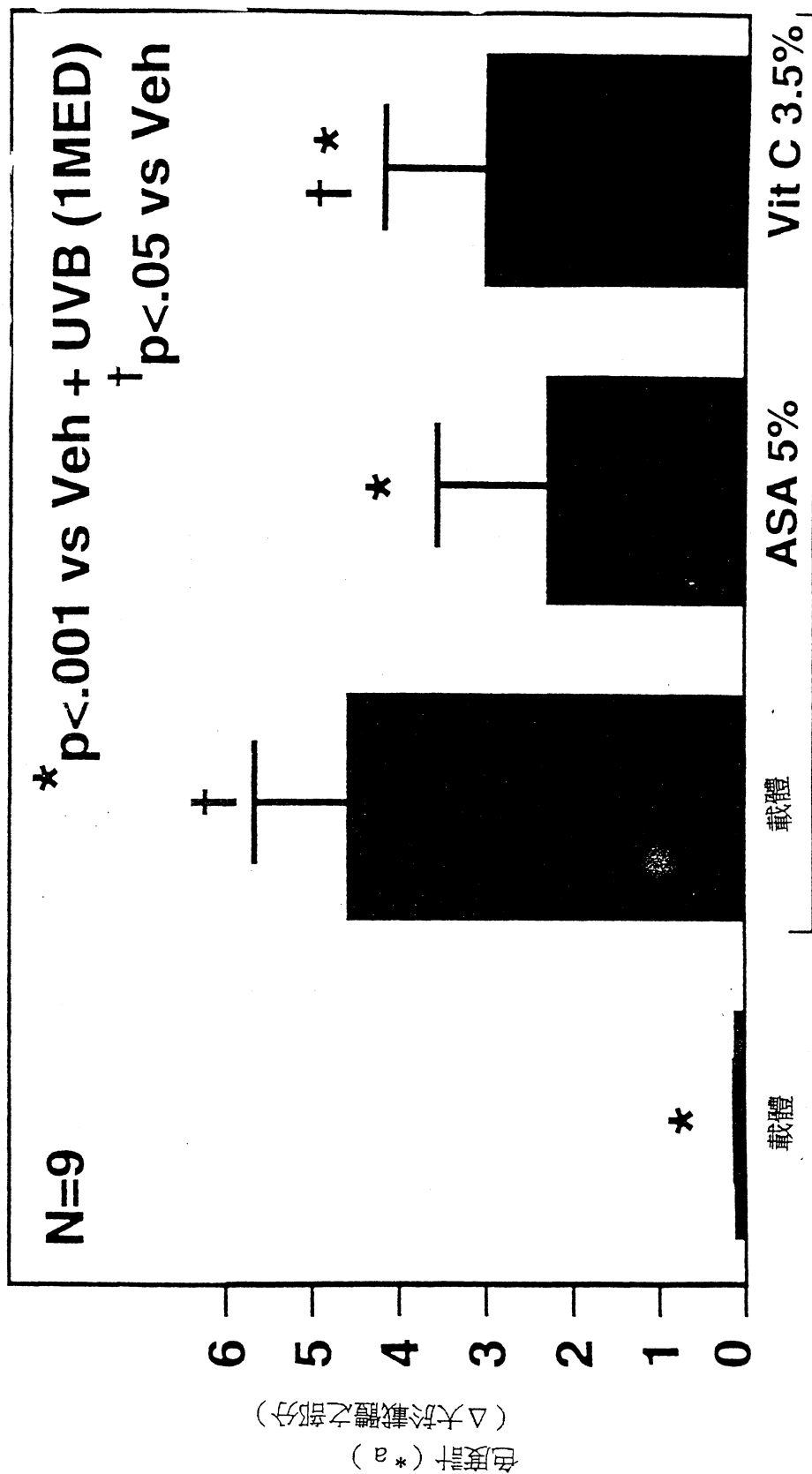


圖. 5B

抗氧化劑對於活體人類的皮膚經 UV(1MED) 引發第 I 型膠原酶活性之效應

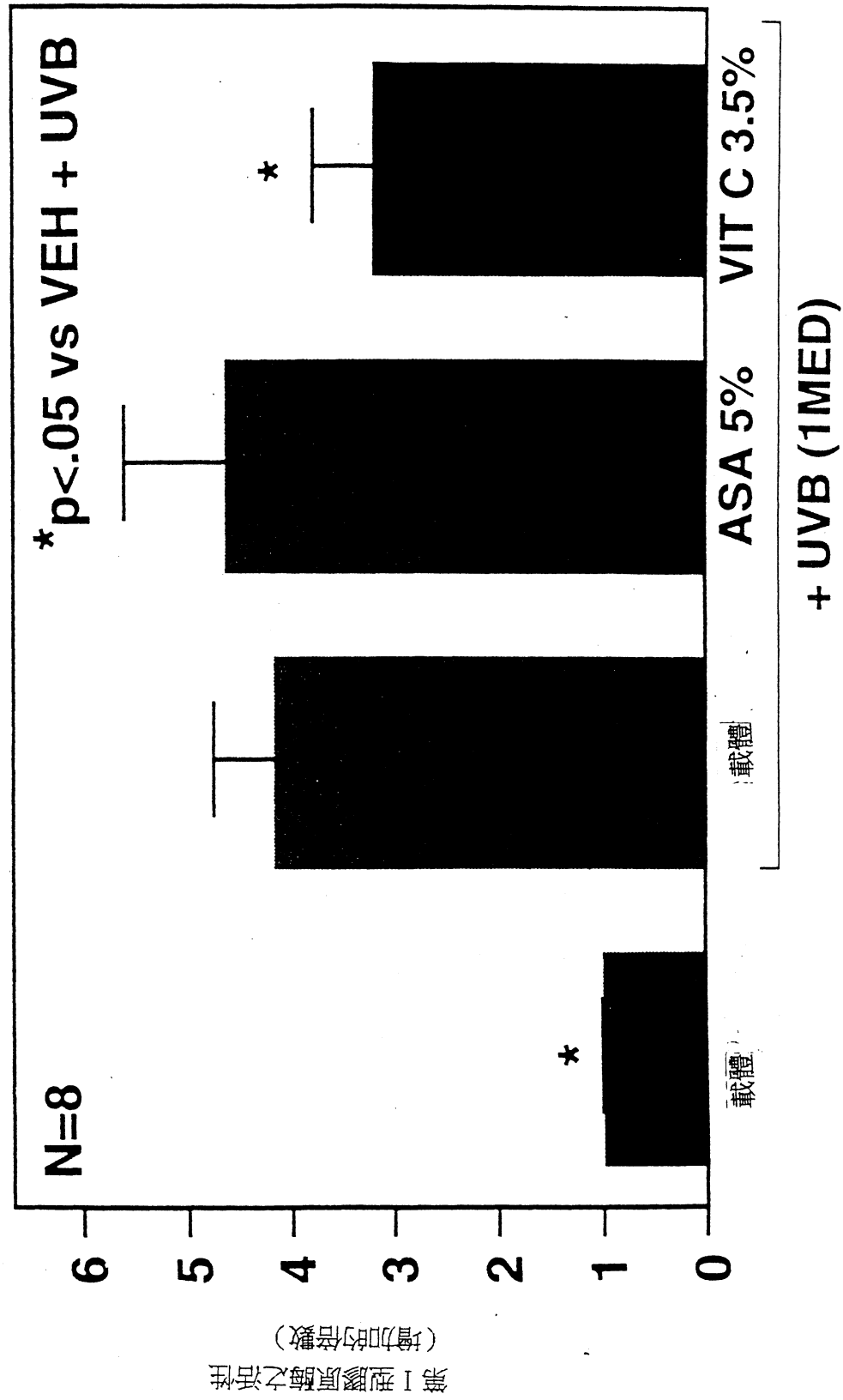


圖 5C

抗氧化劑對於活體的人類皮膚經UV(2MED)引發紅斑反應的效應

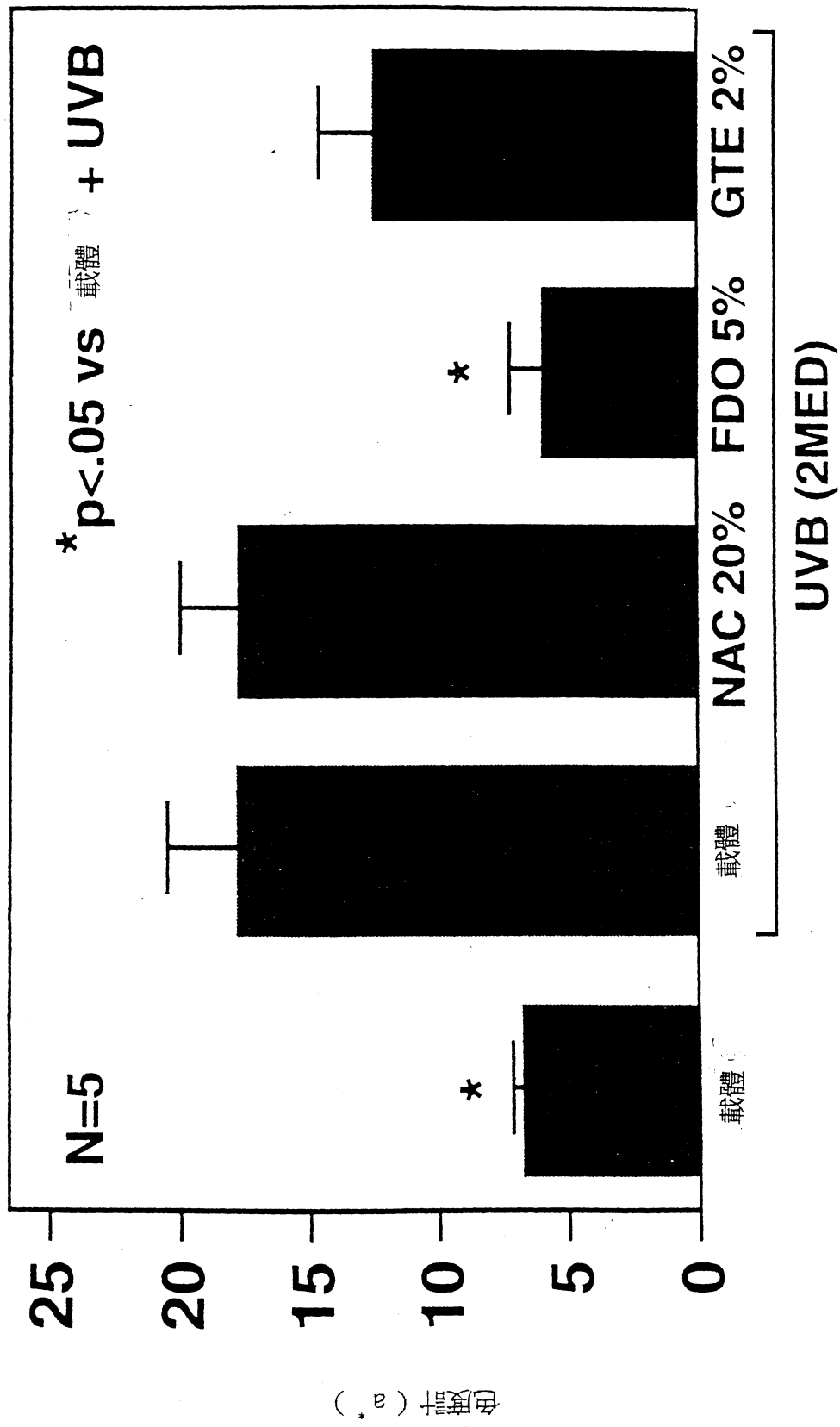
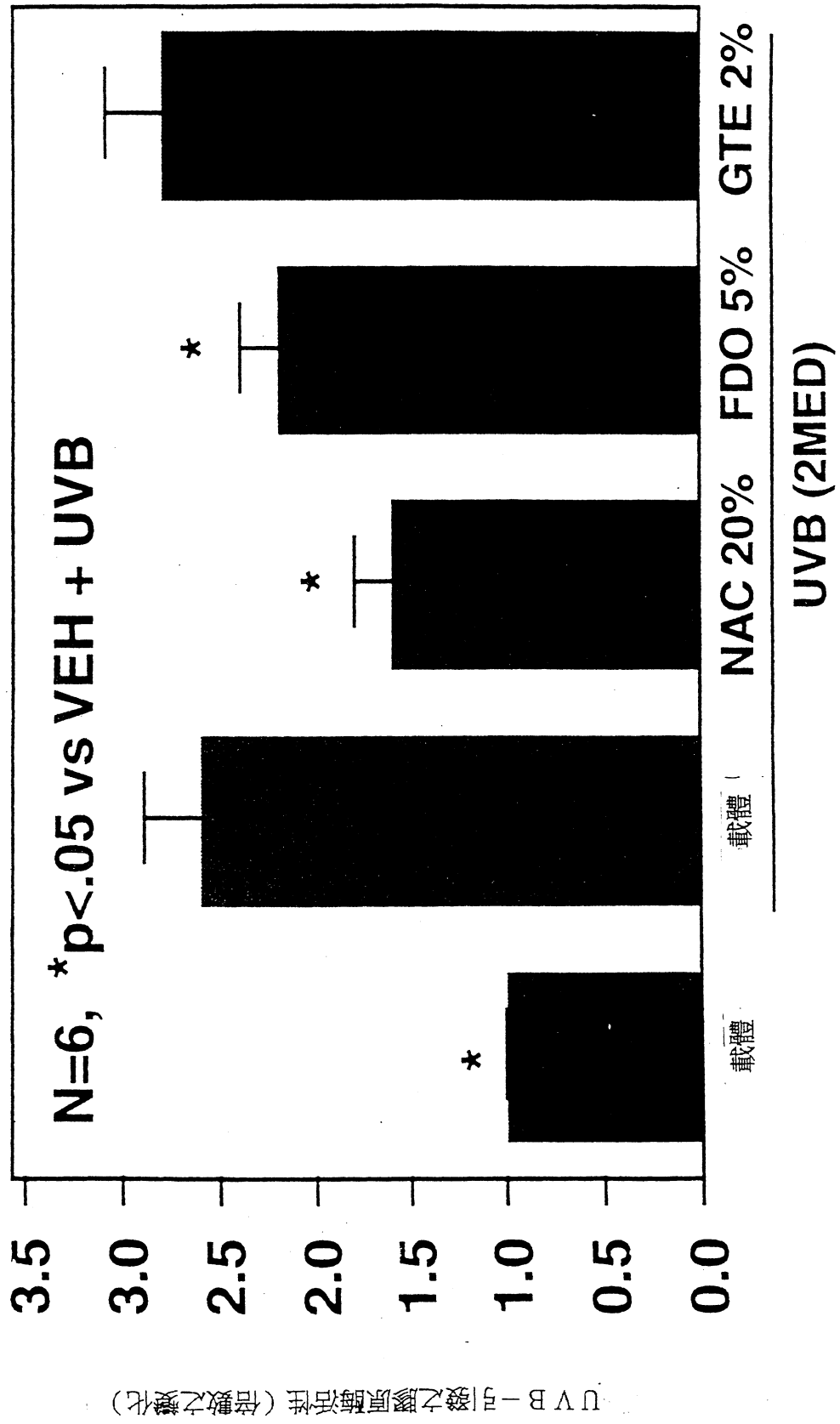


圖 50

2MED UV引發活體的人類皮膚之膠原酶活性



11/28

薑黃色素及 NAC(4 及 7 小時)對於 UV (1 MED)
引發之紅斑的效應

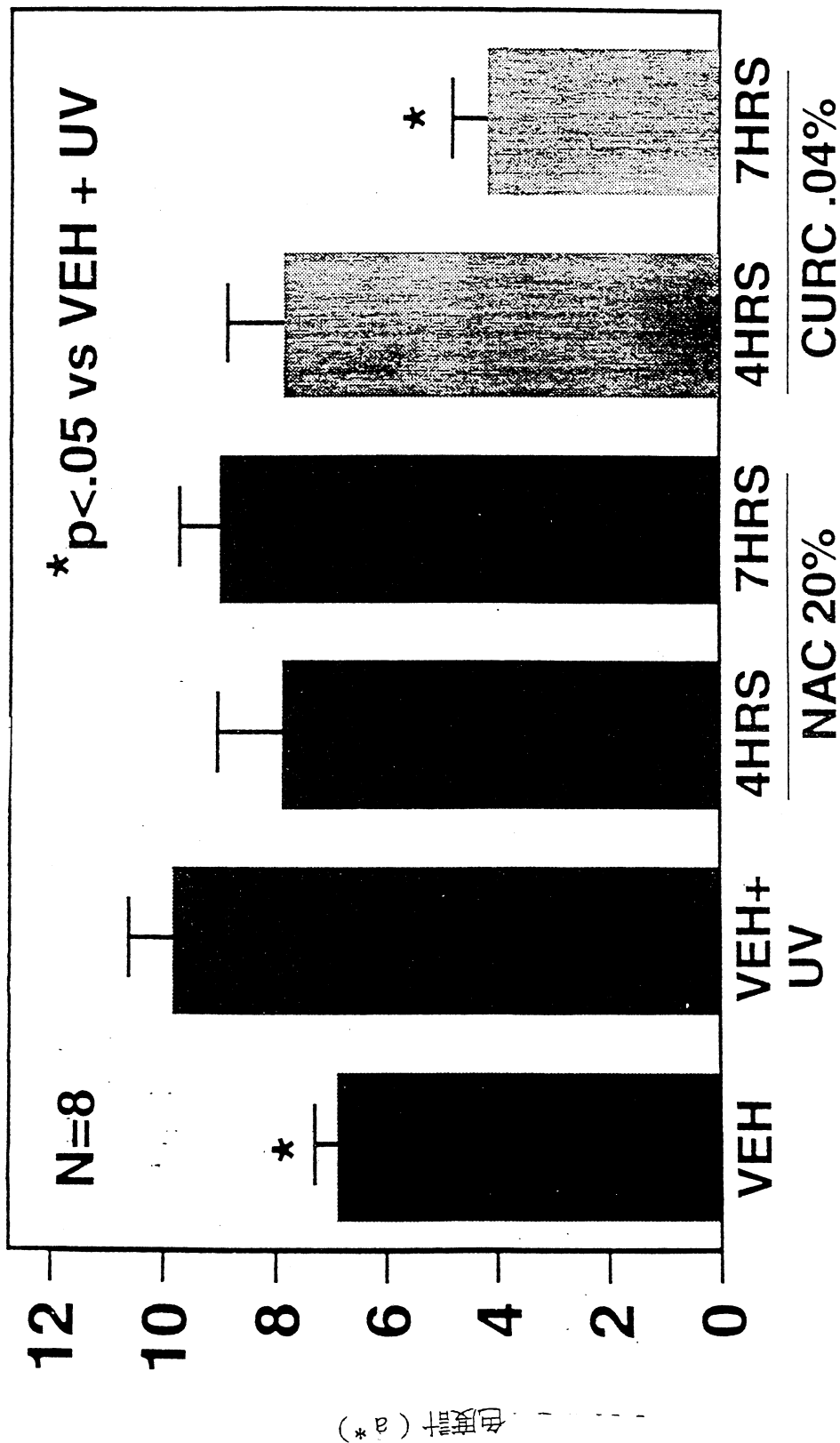


圖 6B

活體人類皮膚經1MED UV引發之膠原酶活性

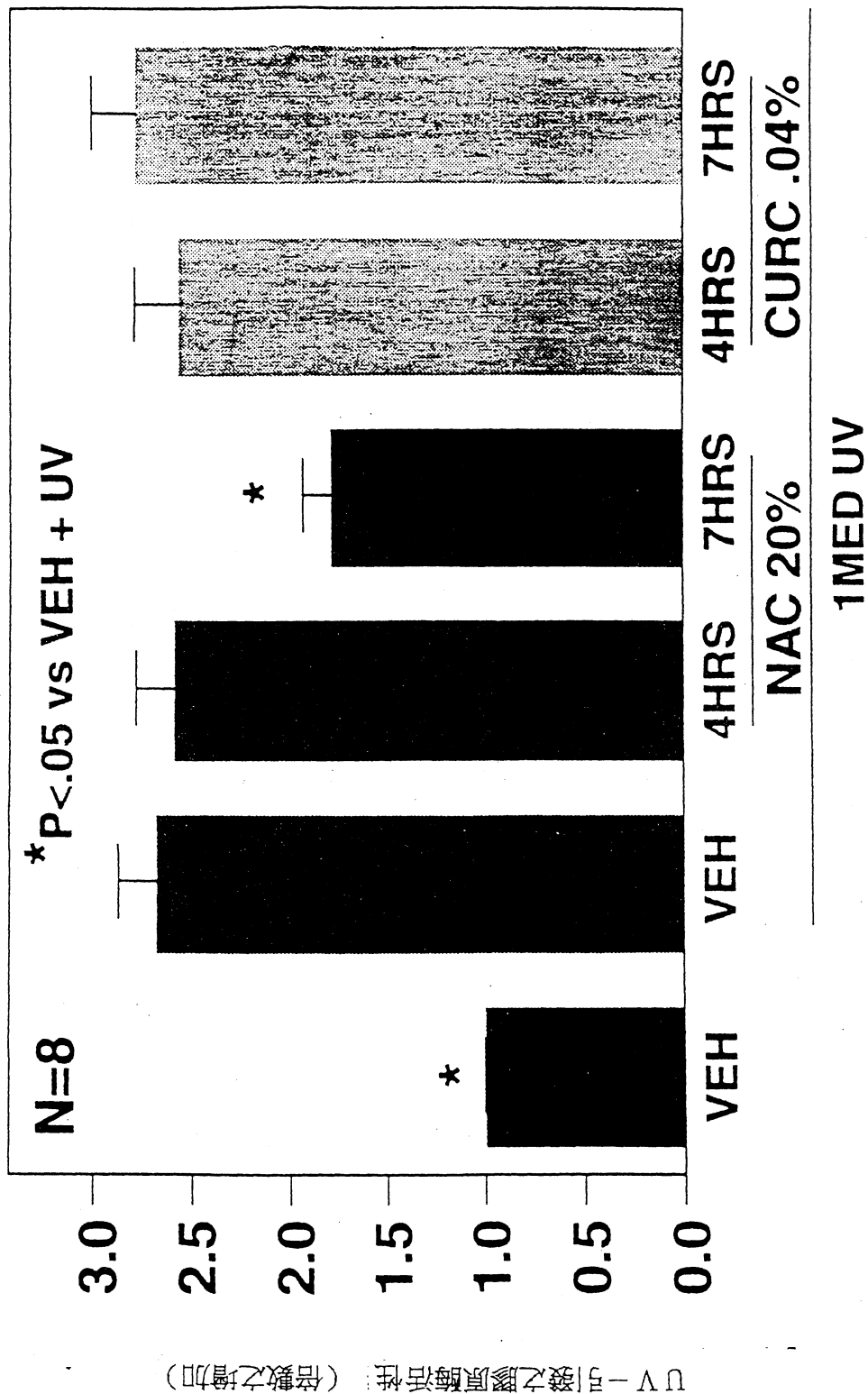
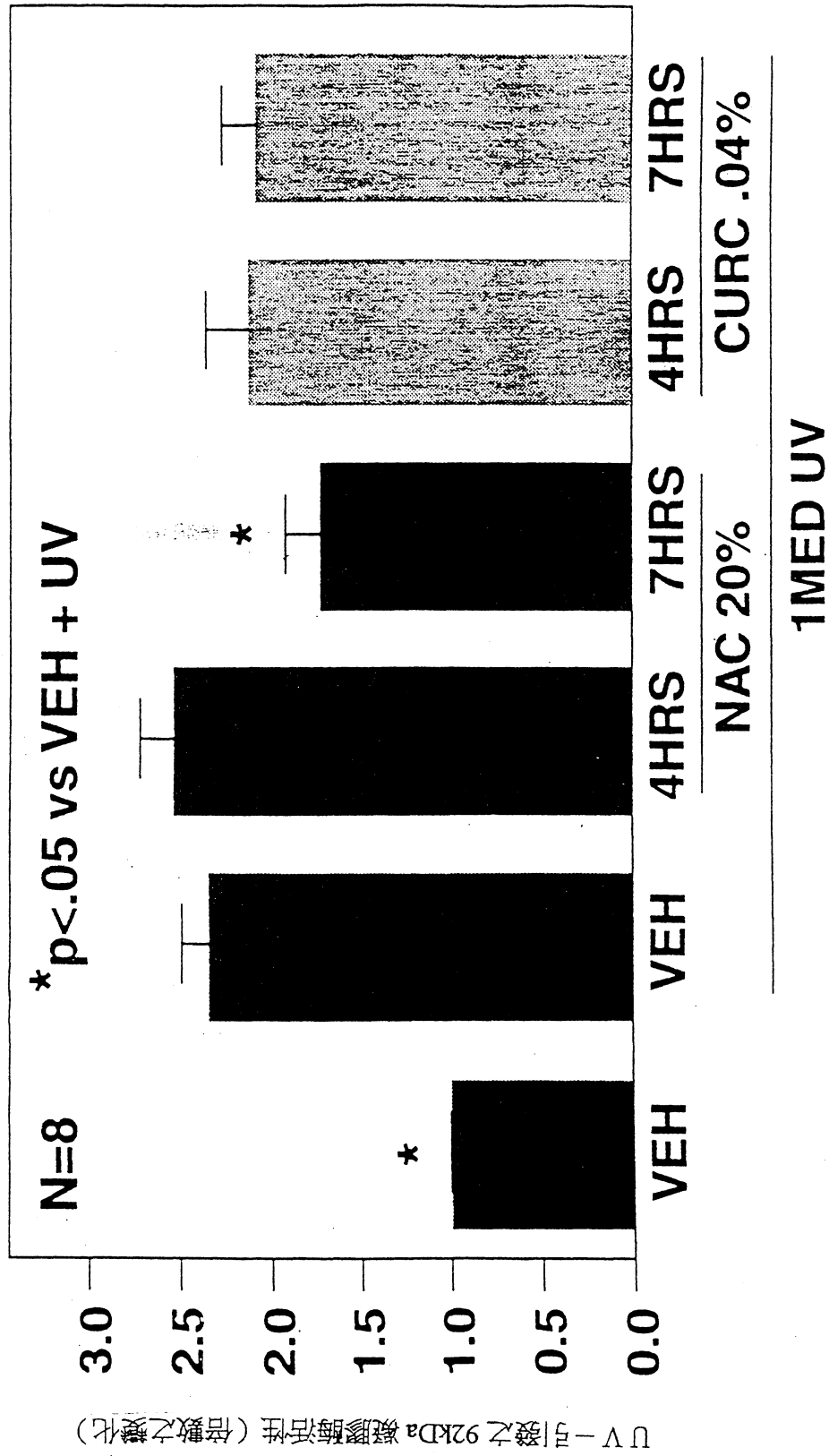


圖 6C

活體人類皮膚對於 1MED-UV 引發之 92kDa 凝膠酶之活性



各種日曬保護因子對於2MED UV引發之紅斑的效應

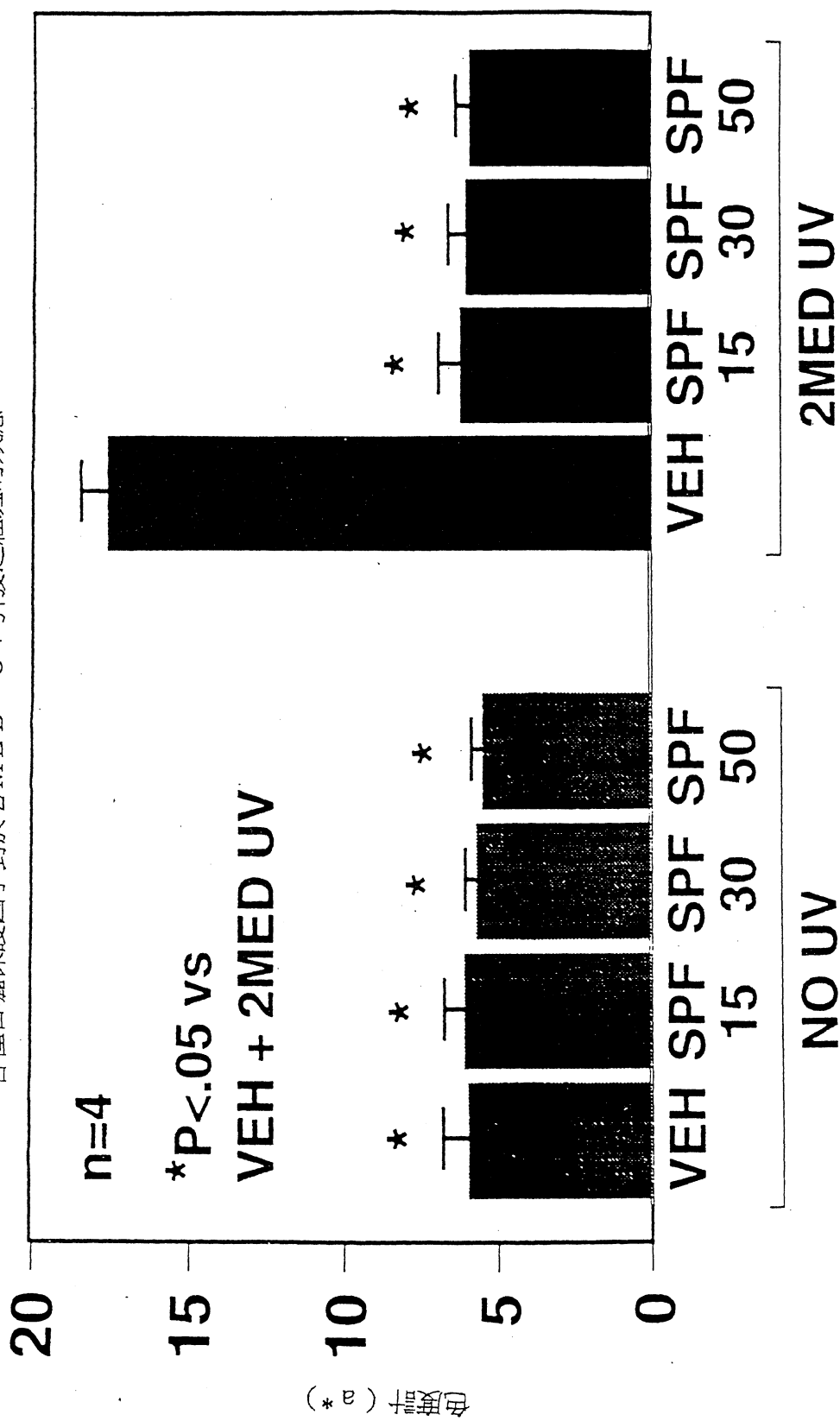
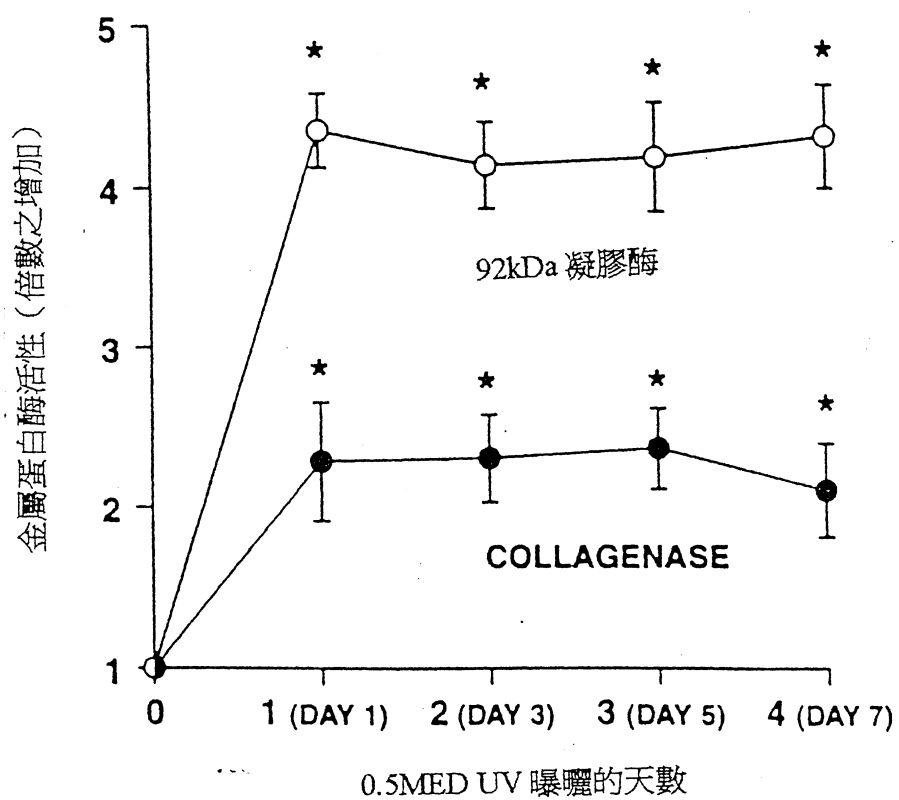


圖 7A

16/8

圖 8A



11/28

圖 8B

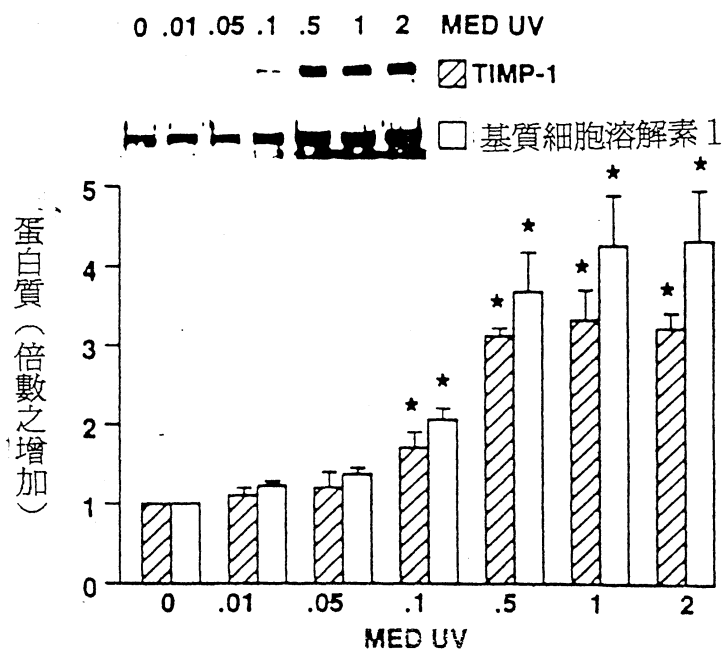


圖 8C

圖 8D

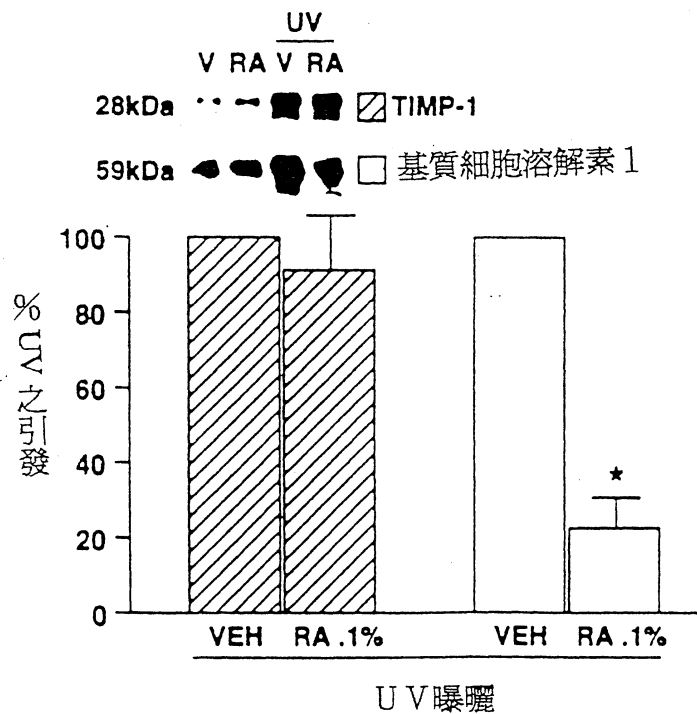


圖 8E

圖 9A

2 MED UV 曝曬後表皮中 H_2O_2 之含量

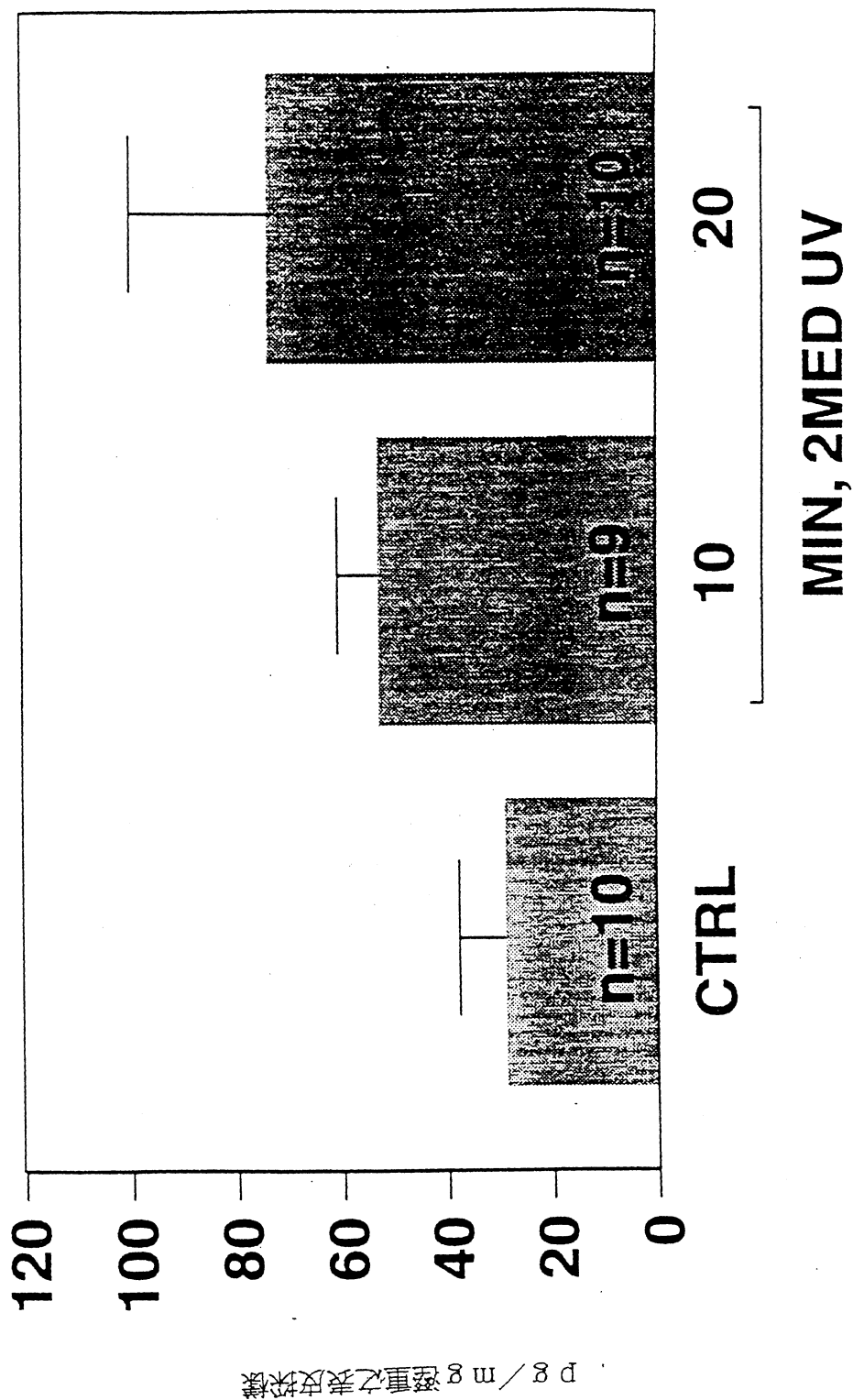


圖 9B

2MED UV曝曬後表皮中還原及氧化之谷胱甘肽含量

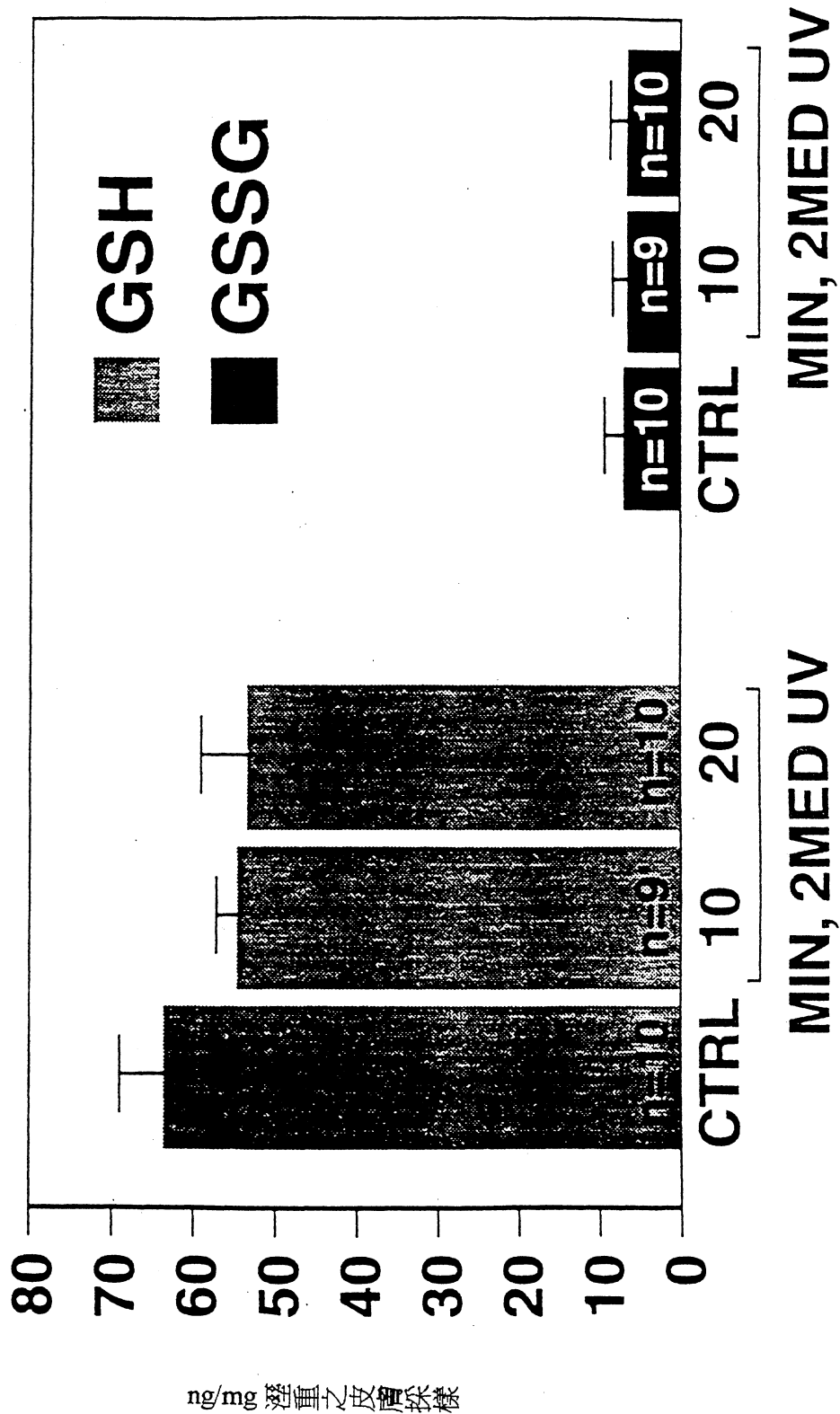


圖 9C

在培養的人類K C C中N A C抑制U V引|發之 $0.2/H_2O_2$

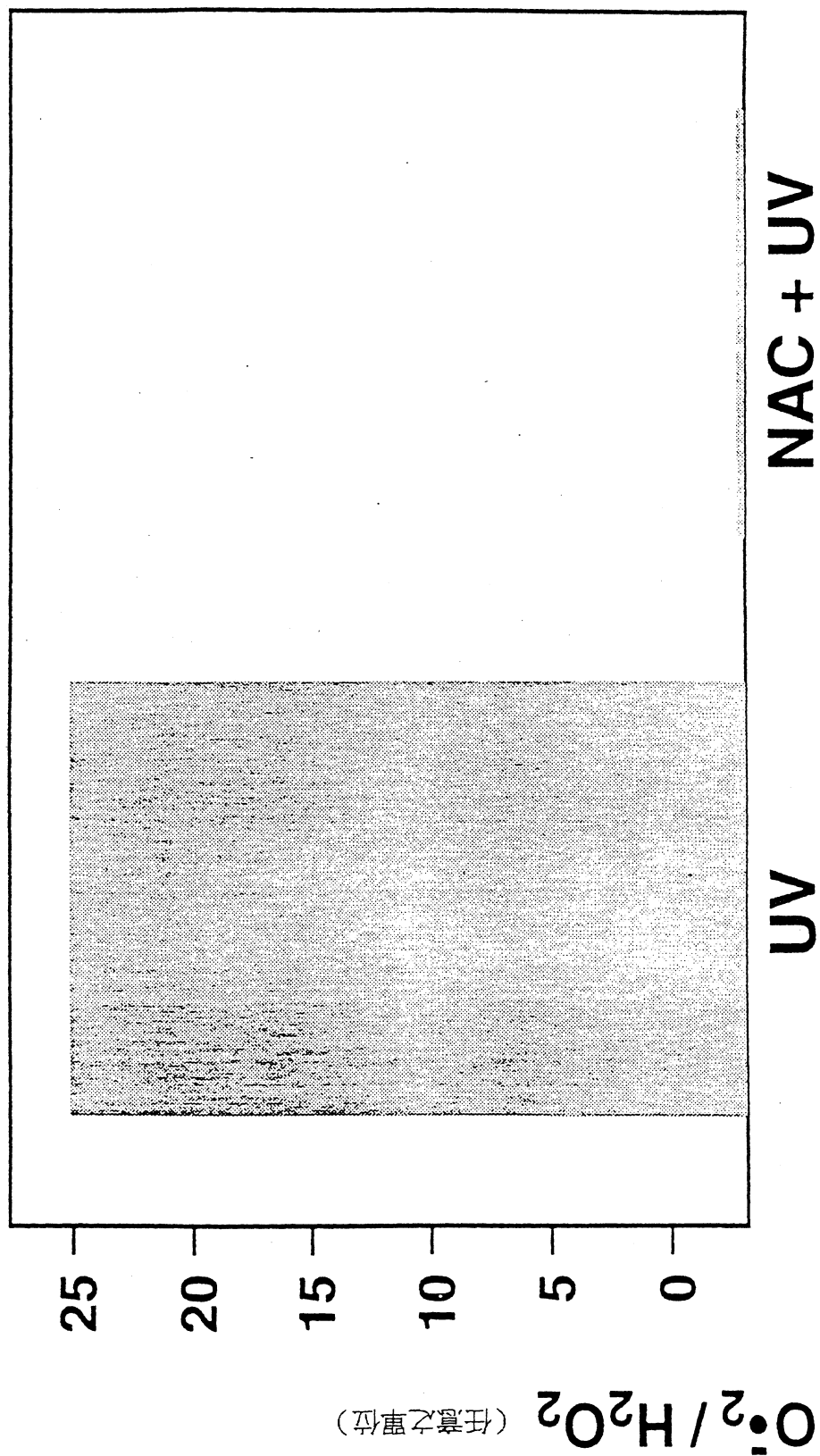


圖 9D

I234467

人類表皮細胞中 NAC 抑制 UV 引|發之 c-JUN mRNA

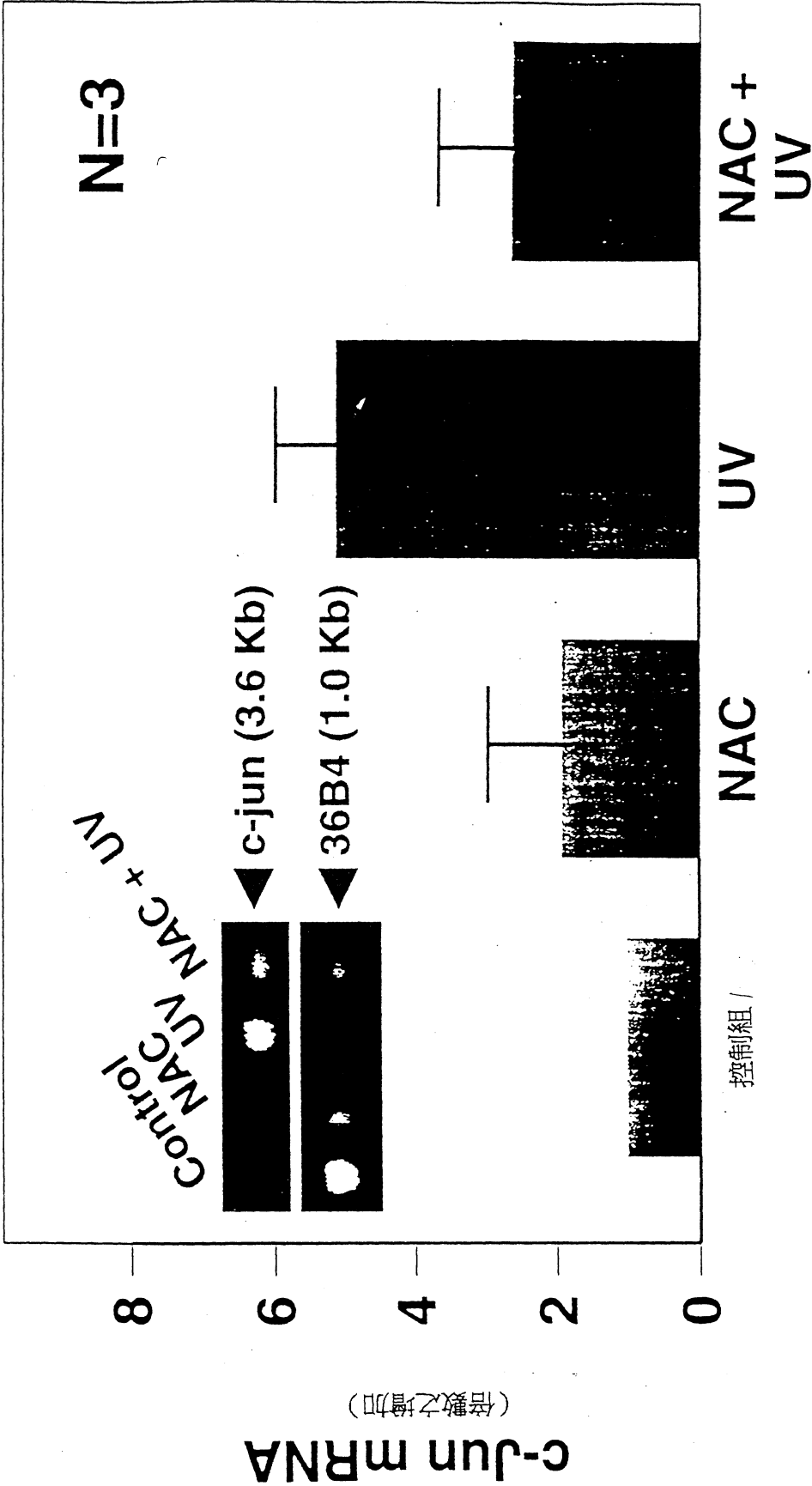
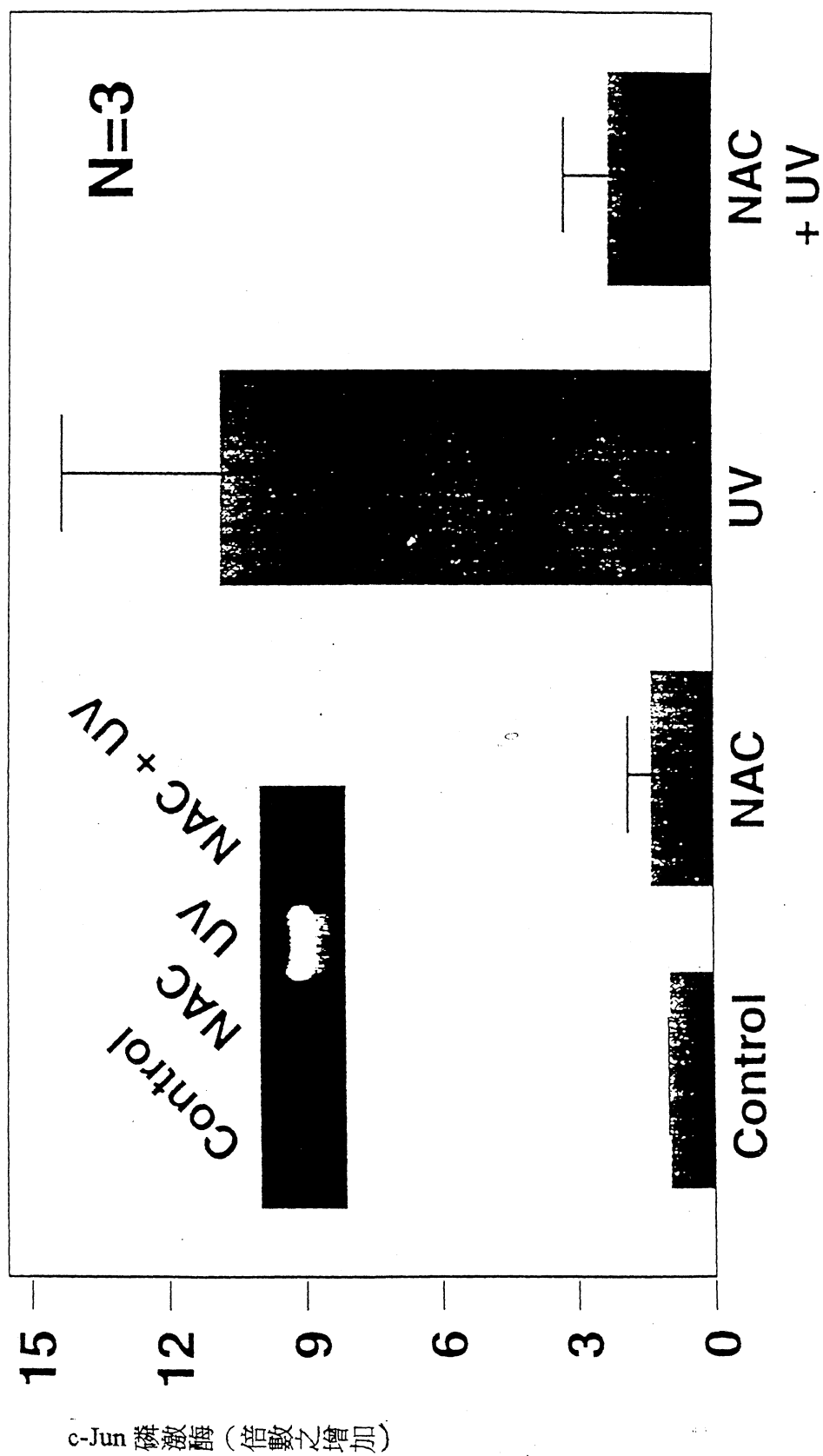


圖 9E

人類表皮細胞中 NAC 抑制 UV 引發之 c-JUN 磷酸酶活性



23/28

圖 10A

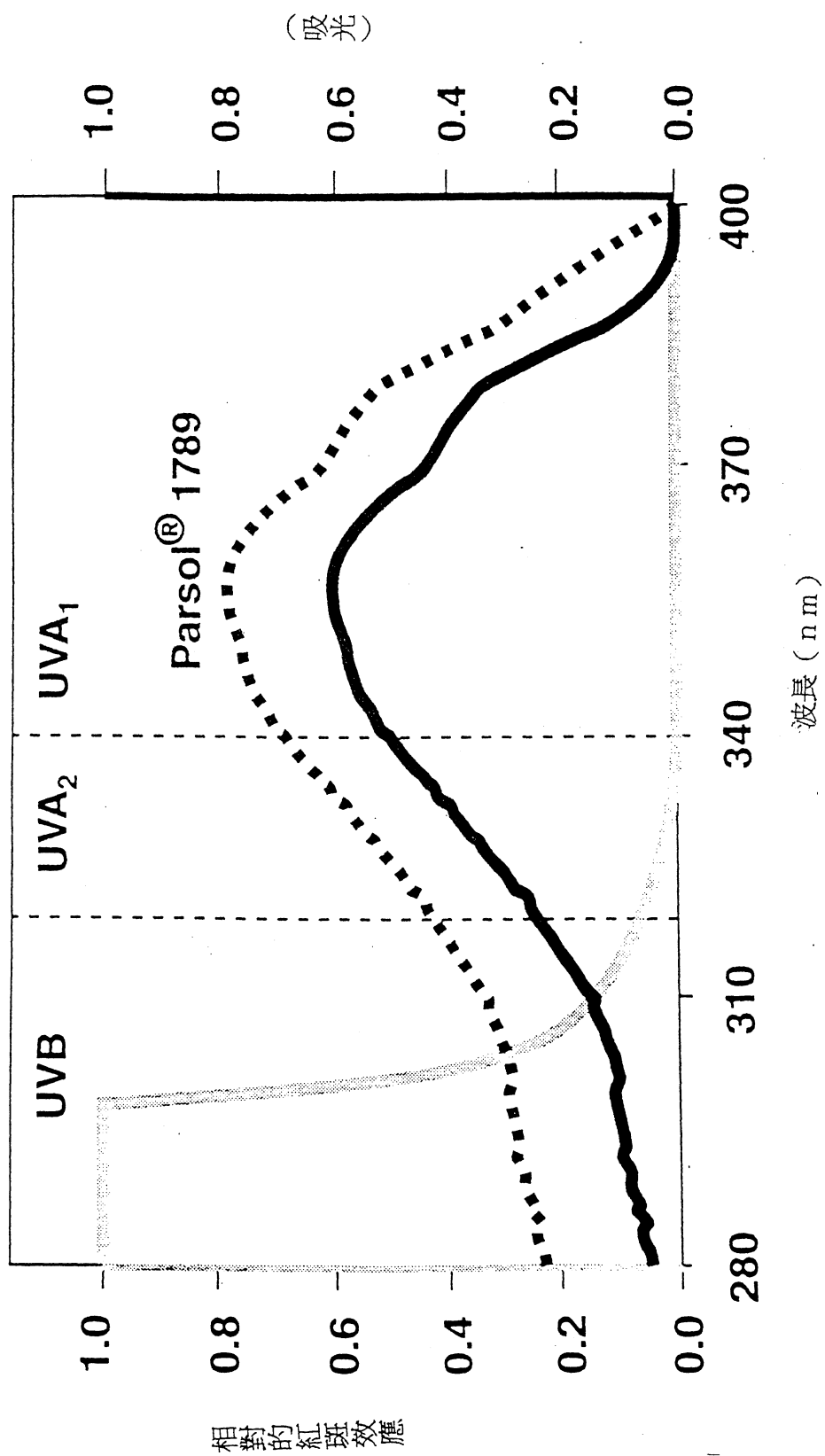
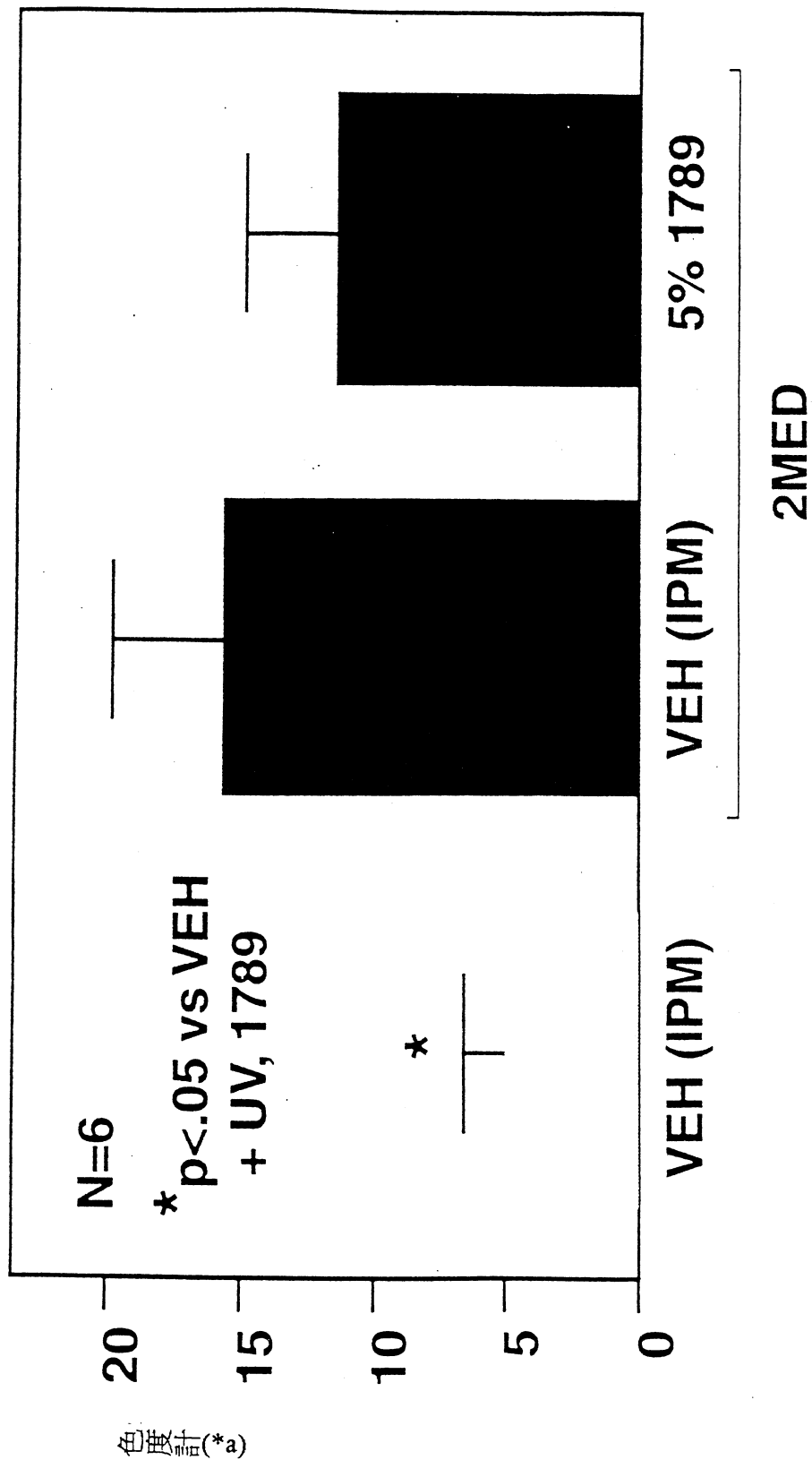


圖 10B

Parsol® 1789 對於 2MED UV 弓|發之發紅之效應



24/28

圖 10C

Parsol ® 1789 抑制活體中人類皮膚經 2MED UV 引發之
92kDa 凝膠酶活性

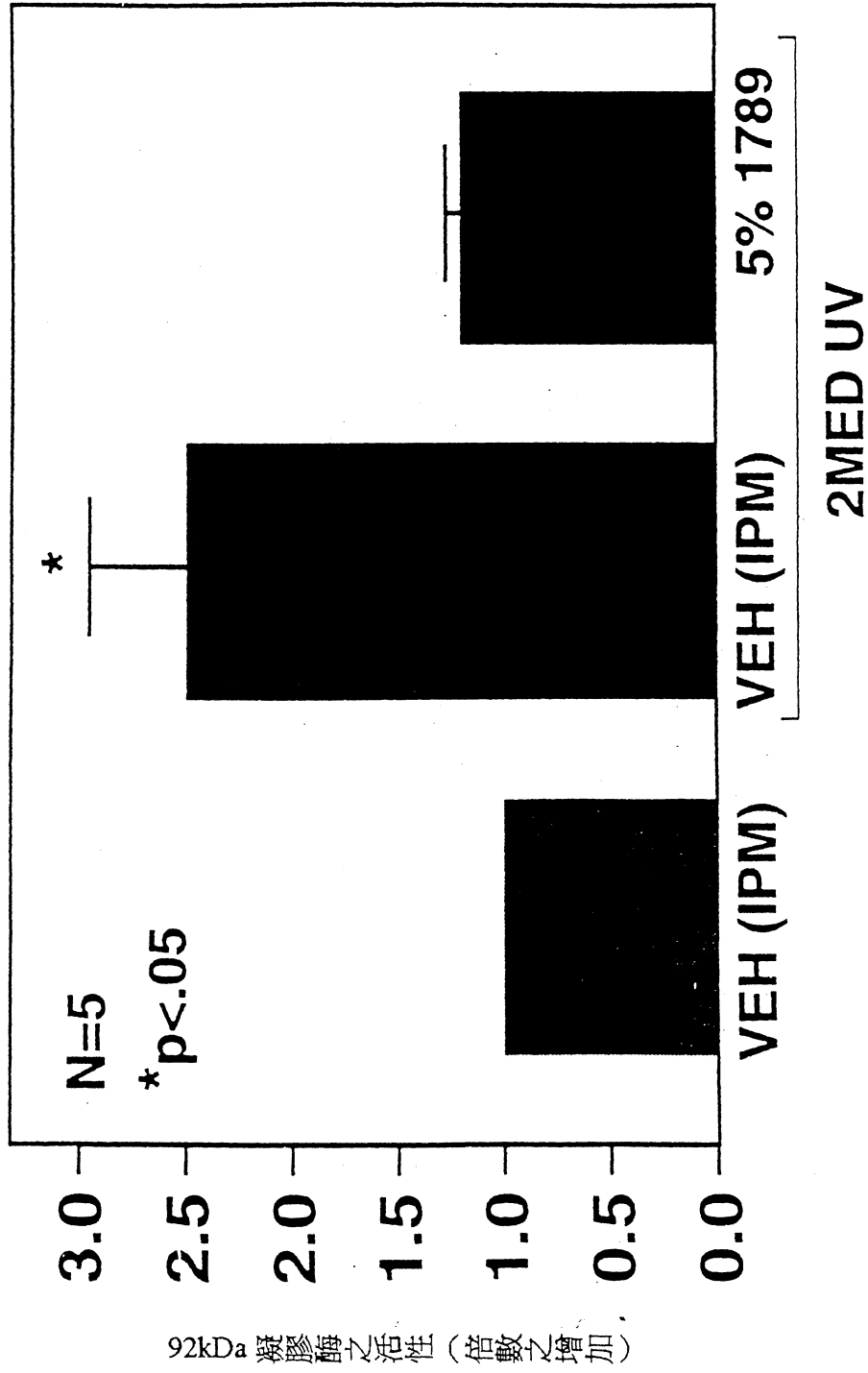


圖. 10D

26/28

Parsol ③ 1789 活體中抑制人類之 2MED UV 引發之 c-Jun 蛋白質

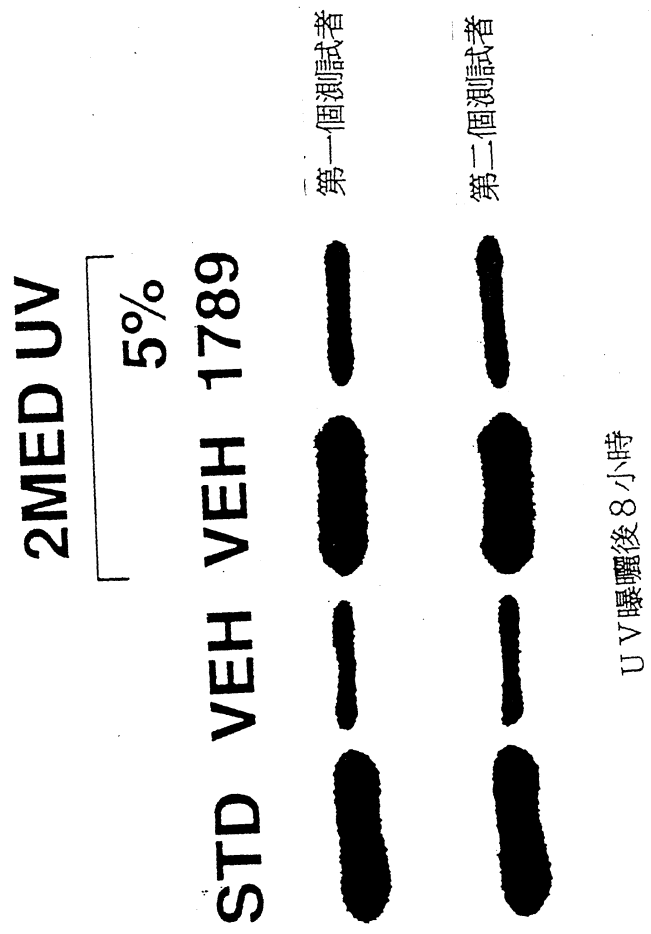
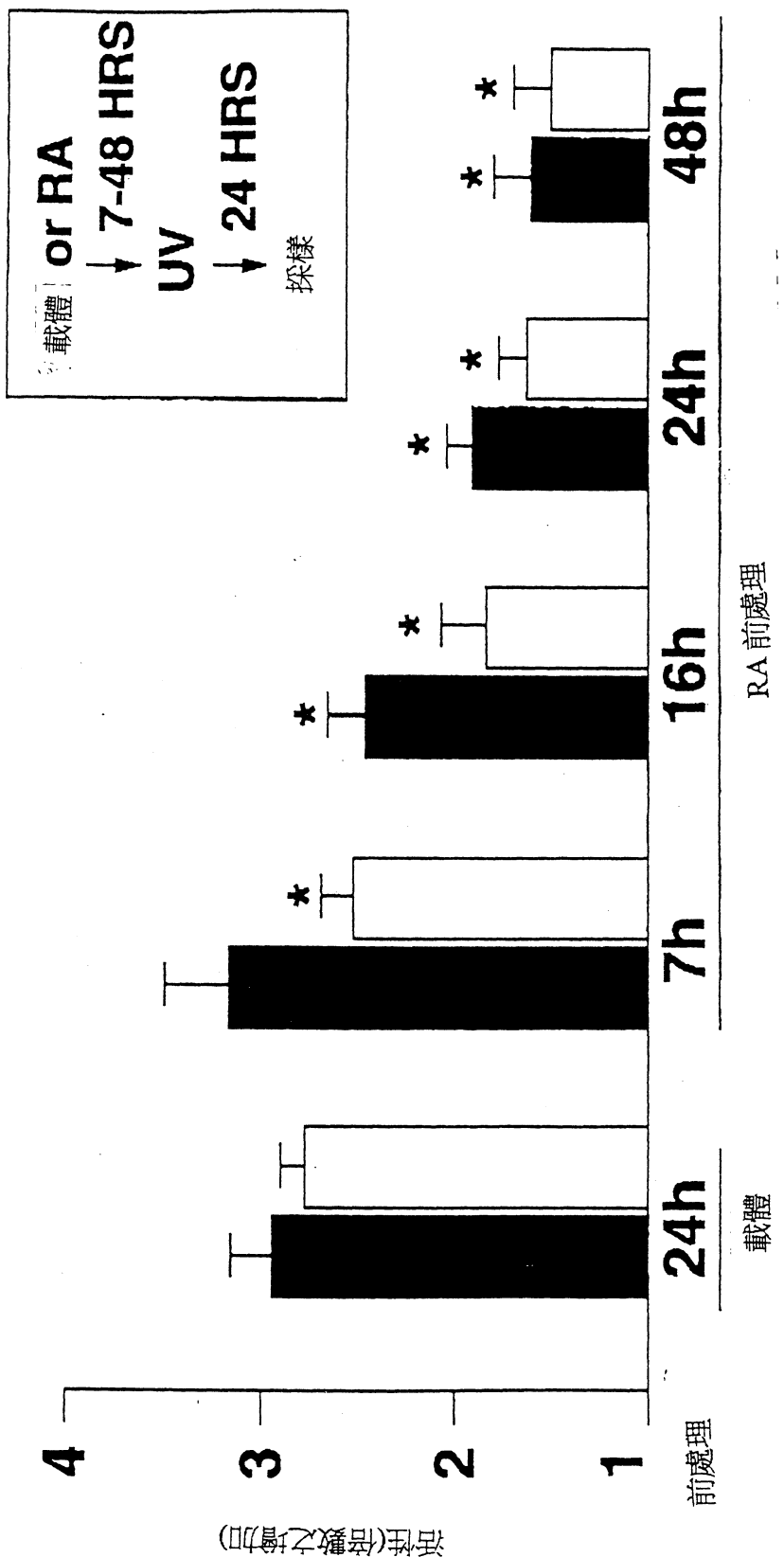


圖 11A

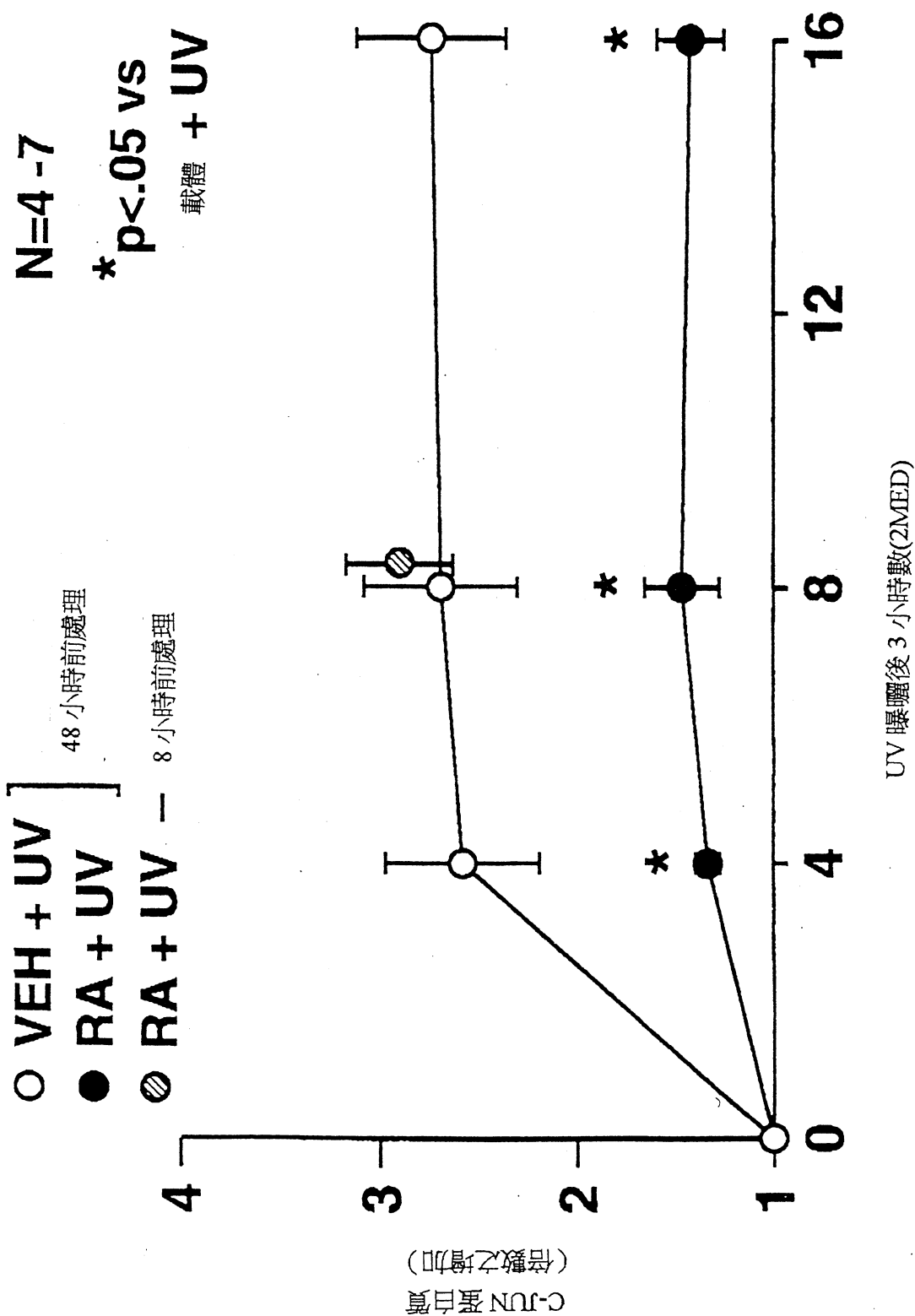
N = 6-12
*P<.05 vs 載體 + UVB

■ 膠原酶
□ 92kDa 凝膠酶



+ 2MED UV

圖 11B



28/28

申請日期	87 年 5 月 26 日
案 號	87108160
類 別	A61K 7/40

A4

C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	抑制皮膚受光照老化之組成物
	英 文	Compositions for inhibiting photoaging of skin
二、發明 創作人	姓 名	(1) 姜世元 Kang, Sewon (2) 約翰 伏希 Voorhees, John J. (3) 蓋瑞 費屈 Fisher, Gary J.
	國 籍	(1) 美國密西根州安亞伯西達布魯克路3080號 3080 Cedarbrook Road, Ann Arbor, Michigan 48105, U.S.A.
	住、居所	(2) 美國密西根州安亞伯瓦丹伍德大道3965號 3965 Waldenwood Drive, Ann Arbor, Michigan 48105, U.S.A.
		(3) 美國密西根州伊斯藍提奧肯蓋茲4876號 4876 Oakengates, Ypsilanti, Michigan 48197 U.S.A.
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 密西根大學董事會 The Regents of the University of Michigan
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國密西根州安亞伯南州三〇〇三街烏爾佛琳塔 Wolverine Tower, 3003 South State Street, Ann Arbor, Michigan 48109, U.S.A.
	代 表 人 姓 名	(1) 瑪文 帕尼斯 Parnes, Marvin G.

裝

訂

線



六、申請專利範圍

附件4A: 第 8 7 1 0 8 1 6 0 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 替 換 本

民 國 94 年 3 月 25 日 修 正

1 . 一 種 抑 制 人 類 皮 膚 受 光 照 老 化 之 組 成 物 ， 包 含 下 述 組 成 : U V A 1 隔 絕 劑 (防 止 波 長 約 3 6 0 n m 至 4 0 0 n m 的 U V 光 穿 透) 、 U V B 隔 絕 劑 (防 止 波 長 約 3 0 0 n m 至 3 2 0 n m 的 U V 光 穿 透) 、 數 量 有 效 於 抑 制 U V - 誘 導 之 基 質 金 屬 蛋 白 酶 (M M P) 活 性 升 高 的 M M P 抑 制 劑 ， 及 作 為 局 部 施 用 時 可 接 受 之 載 劑 。

2 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 組 成 物 ， 其 中 該 M M P 抑 制 劑 為 類 視 網 醇 。

3 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 組 成 物 ， 該 組 成 物 另 外 再 包 括 選 自 以 下 之 化 合 物 : N - 乙 醯 基 半 胱 胺 酸 ， 2 - 聯 麩 醯 基 二 脲 (F D O) ， 維 生 素 C 及 其 混 合 物 。

4 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 組 成 物 ， 其 中 該 U V A 1 隔 絕 劑 是 4 - t - 丁 基 - 4 ' - 甲 氧 基 二 苄 醯 基 甲 烷 或 其 衍 生 物 。

5 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 組 成 物 ， 其 中 該 U V B 隔 絕 劑 是 酚 酮 或 甲 氧 基 桂 皮 酸 酯 。

6 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 組 成 物 ， 其 調 配 成 塗 劑 、 乳 膏 、 軟 膏 、 水 質 液 體 、 油 質 液 體 ， 或 可 噴 灑 液 體 。

7 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 2 項 之 組 成 物 ， 其 中 該 類 視 網 醇 是 視 網 酸 或 視 網 醇 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

8 . 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中該組成物至少再包括一種選自以下化合物之其他化合物：四環素及其衍生物、皮膚學上可接受的三唑及其衍生物、抑制細胞色素 P - 4 5 0 中介代謝視網酸之化合物、及其相容的混合物。

9 . 如申請專利範圍第 1 項之組成物，呈日用與夜用組成物的組合而用於抑制 U V 輻射引起的人類皮膚受光照老化，其包括：

日間用的第一組成物，其包括如申請專利範圍第 1 項之組成物；以及另再包括

夜間用的第二組成物，該第二組成物包括存在於局部施用時可接受載劑中的 M M P 抑制劑；

其中該第一與第二組成物係一起提供但分開包裝，且另再包括使用該第一與第二組成物的說明。

1 0 . 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中於該第一與第二組成物中之該 M M P 抑制劑各獨立地選自存在於局部施用時可接受載劑中的類視網醇，N - 乙醯基半胱胺酸，2 - 聯麩醯基二肟，維生素 C 及其混合物。

1 1 . 如申請專利範圍第 1 0 項之組成物，其中第一組成物、第二組成物或二者中的類視網醇係選自視網酸、視網醇及其混合物。

1 2 . 如申請專利範圍第 1 項之組成物，其中受光照老化係由抑制膠原降解而抑制，且係藉由每天施用該組成物至皮膚而達成，該施用係於該皮膚 U V 輻射曝曬之至少 8

六、申請專利範圍

小時前進行。

1 3 . 如申請專利範圍第 1 2 項之組成物，其中該組成物係於 U V 輻射曝曬前至少 1 6 小時施用。

1 4 . 如申請專利範圍第 1 2 項之組成物，其中該施用每天進行至少兩次，且於夜間至少一次而日間至少一次。

1 5 . 一種抑制人類皮膚由次 M E D U V -誘導 M M P 引起的膠原降解之組成物，包括至少一種有效劑量之成分，選自：可抑制 M M P 之類視網醇，N -乙醯基半胱胺酸，谷胱甘肽，2 -聯麩醯基二肽、維生素 C 及其混合物，以及皮膚學上可接受的載劑，其中該組成物在皮膚曝曬至該次 M E D U V 輻射前至少 8 小時施用至皮膚。

1 6 . 如申請專利範圍第 1 5 項之組成物，更進一步的包含 U V A 隔絕劑及 U V B 隔絕劑。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 6 項之組成物，其中該 U V A 隔絕劑是 4 - t - 丁基 - 4 ' - 甲氧基二苄醯基甲烷或其衍生物，該 U V B 隔絕劑是酚酮或甲氧基桂皮酸酯。

1 8 . 如申請專利範圍第 1 5 項之組成物，其中該組成物係每日在皮膚上至少施用一次。

1 9 . 如申請專利範圍第 1 5 項之組成物，其為塗劑、乳膏、軟膏、水質液體、或油質液體。

2 0 . 如申請專利範圍第 1 5 項之組成物，其為可噴灑之形式。

2 1 . 一種抑制人類皮膚因 U V 輻射光照老化引起的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

膠原降解之組成物，包括有效量之可抑制 M M P 之類視網醇，其中該組成物至少每天施用至習慣性直接或間接曝曬於 U V 輻射源之皮膚，且在曝曬前至少 8 小時前施用。

2 2 . 如申請專利範圍第 2 1 項之方法，其中該類視網醇為視網醇或視網酸。

2 3 . 一種抑制人類皮膚因 U V - 造成的紅斑之組成物，包括至少一選自下列的成分：抗黑變激素、維生素 E、維生素 C、乙醯水楊酸、2 - 聯麩醯基二肽、或其混合物，其中該組成物在人類皮膚曝曬至 U V 輻射前施用至人類皮膚。

2 4 . 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中該第二組成物於該 U V 輻射曝曬前的至少 8 小時前施用；以及該第一組成物在至少 8 小時後才施用至該皮膚。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線