

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 7/42

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98805763.8

[43]公开日 2000 年 7 月 5 日

[11]公开号 CN 1259040A

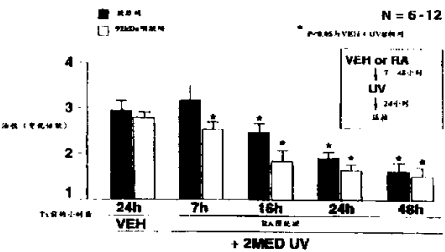
[22]申请日 1998.6.3 [21]申请号 98805763.8
[30]优先权
[32]1997.6.4 [33]US[31]60/048,520
[32]1997.9.5 [33]US[31]60/057,976
[86]国际申请 PCT/US98/11453 1998.6.3
[87]国际公布 WO98/55075 英 1998.12.10
[85]进入国家阶段日期 1999.12.3
[71]申请人 密执安州立大学董事会
地址 美国密执安州
[72]发明人 G·J·费希尔 J·J·沃里斯
S·康

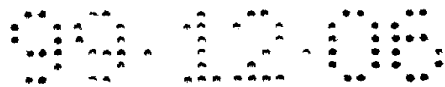
[74]专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图页数 19 页

[54]发明名称 抑制皮肤光老化的组合物和方法
[57]摘要

本发明提供了改善日光中 UVA 和 UVB 辐射的不同效果的组合物和方法。组合物包括防止 MED 和亚 MED 辐射的光老化作用的组分,如类维生素 A、其它某些化合物(如 N-乙酰半胱氨酸、2-糠偶酰二肼和维生素 C),以及任选的其它 MMP 抑制剂,如四环素和/或抑制 P-450 介导类维生素 A 代谢的化合物(如酮康唑和其它吡咯化合物。在方法中,组合物在受阳光辐照前施用;根据组合物中采用的成分,施用应在辐照前 7—48 小时。防止红斑(皮肤发红、晒斑)的化合物不一定能保护皮肤抵抗 UV 介导 MMP 水平和活性的升高,类似地,防止 UV 介导的 MMP 水平和活性升高的化合物不一定能有效地抵抗 UV 诱导的红斑。





权 利 要 求 书

1. 一种抑制人皮肤光老化的组合物，该组合物包含在外用可接受载体中的 UVA 阻断剂、UVB 阻断剂以及 MMP 抑制剂的组合。
- 5 2. 一种抑制人皮肤光老化的方法，该方法包括每日给皮肤施用权利要求 1 所述的组合物。
 3. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中 MMP 抑制剂是类维生素 A。
 4. 根据权利要求 1 所述的组合物，它还包含选自 N-乙酰半胱氨酸、FDO、维生素 C 的化合物，及其混合物。
- 10 5. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中 UVA 阻断剂是 4-叔丁基-4'-甲氧基二苯甲酰甲烷或其衍生物。
 6. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中 UVB 阻断剂是羟苯甲酮或甲氧基肉桂酸酯。
 7. 根据权利要求 1 所述的组合物，它被配制成洗液、乳膏、油膏、以水为基的
- 15 液体、以油为基的液体或可喷雾的液体。
 8. 根据权利要求 3 所述的组合物，其中类维生素 A 是视黄酸或视黄醇。
 9. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物还包含至少一种选自四环素及其衍生物、皮肤病学上可接受的三唑类及其衍生物、抑制细胞色素 P-450 介导的视黄酸代谢的化合物的附加化合物，以及它们的相容性混合物。
- 20 10. 一种通过抑制人皮肤中 UV 诱导 MMP 形成的诱生作用来抑制人皮肤光老化的方法，该方法包括在 UV 辐照前至少 8 小时给皮肤施用一种组合物，该组合物包含在外用可接受载体中的 UVA 阻断剂、UVB 阻断剂、选自 NAC、FDO、维生素 C 的 MMP 抑制剂或其混合物的组合。
 11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中施用所述组合物在 UV 辐照前至少
- 25 小时。
 12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中 UVA 阻断剂是 4-叔丁基-4'-甲氧基二苯甲酰甲烷或其衍生物。
 13. 根据权利要求 10 所述的方法，其中 UVB 阻断剂是羟苯甲酮或甲氧基肉桂酸酯。
- 30 14. 根据权利要求 10 所述的方法，其中组合物还包含类维生素 A。
 15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述组合物还包含至少一种选自四环素及其衍生物、皮肤病学上可接受的三唑类及其衍生物、抑制细胞色素 P-450 介导的



视黄酸代谢的化合物的附加化合物，以及它们的相容性混合物。

16. 一种透明或半透明的窗结构，其中改进之处包含其上的涂层是或其中分散了 UVA 阻断剂和 UVB 阻断剂。

17. 一种用于运送人的交通工具或其它装置，所述装置具有一个窗结构，其改进包括使用了权利要求 16 所述的窗结构。

18. 一种抑制人皮肤中亚 MED 剂量 UV 诱导 MMP 的组合物，该组合物包含在皮肤病学上可接受的载体中的有效量的至少一种选自类维生素 A、N-乙酰半胱氨酸、2-糠偶酰二肼、维生素 C 的化合物及它们的混合物。

19. 根据权利要求 18 所述的组合物，它还包含 UVA 阻断剂和 UVB 阻断剂。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物，其中 UVA 阻断剂是 4-叔丁基-4'-甲氧基二苯甲酰甲烷或其衍生物。

21. 根据权利要求 19 所述的组合物，其中 UVB 阻断剂是羟苯甲酮或甲氧基肉桂酸酯。

22. 根据权利要求 19 所述的组合物，其中组合物包含类维生素 A，该类维生素 A 是视黄醇、视黄酸或它们的混合物。

23. 一种抑制人皮肤中亚 MED 剂量 UV 诱导 MMP 的方法，该方法包括有效量的至少一种选自类维生素 A、N-乙酰半胱氨酸、谷胱苷肽、2-糠偶酰二肼、维生素 C 的组分或它们的混合物，将所述至少一种组分配制在皮肤病学上可接受的载体中，并将该配方施加到皮肤上。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，该方法还包含提供 UVA 阻断剂和 UVB 阻断剂。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中 UVA 阻断剂是 4-叔丁基-4'-甲氧基二苯甲酰甲烷或其衍生物，UVB 阻断剂是羟苯甲酮或甲氧基肉桂酸酯。

26. 根据权利要求 23 所述的方法，其中每日给皮肤施用所述配方至少一次。

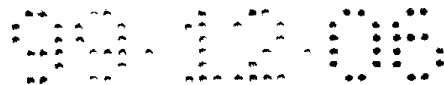
27. 根据权利要求 23 所述的方法，其中在 UV 辐照前施用所述配方。

28. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述配方是洗液、乳膏、油膏、以水为基的液体或以油为基的液体。

29. 根据权利要求 23 所述的方法，其中配方是可喷雾的。

30. 一种抑制人皮肤因紫外辐射偶然性光老化的方法，该方法包括提供一种皮肤病学上可接受的包含有效量类维生素 A 的配方，并至少每天将所述配方施用到定期习惯性地直接或间接暴露于紫外辐射源的皮肤上。

31. 根据权利要求 29 所述的方法，其中类维生素 A 是视黄醇或视黄酸。



32. 一种抑制人皮肤中 UV 介导的红斑的方法，该方法包括提供一种皮肤病学上可接受的组合物，该组合物含有至少一种选自褪黑素、维生素 E、维生素 C、乙酰水杨酸、2-糠偶酰二脲的组分或它们的混合物，在 UV 辐射照射前将所述组合物施加到人皮肤上。



说明书

抑制皮肤光老化的组合物和方法

5 技术领域

本发明涉及人皮肤光保护领域。更具体地说, 本发明涉及一种外用组合物以及用该组合物抑制皮肤光老化(尤其是日常发生的由于暴露于偶然和/或直接辐射照射而引起的光老化)的方法。另外, 本发明提供了减少 UV 诱导的红斑(皮肤发红)的新的方法和组合物。

10

背景技术

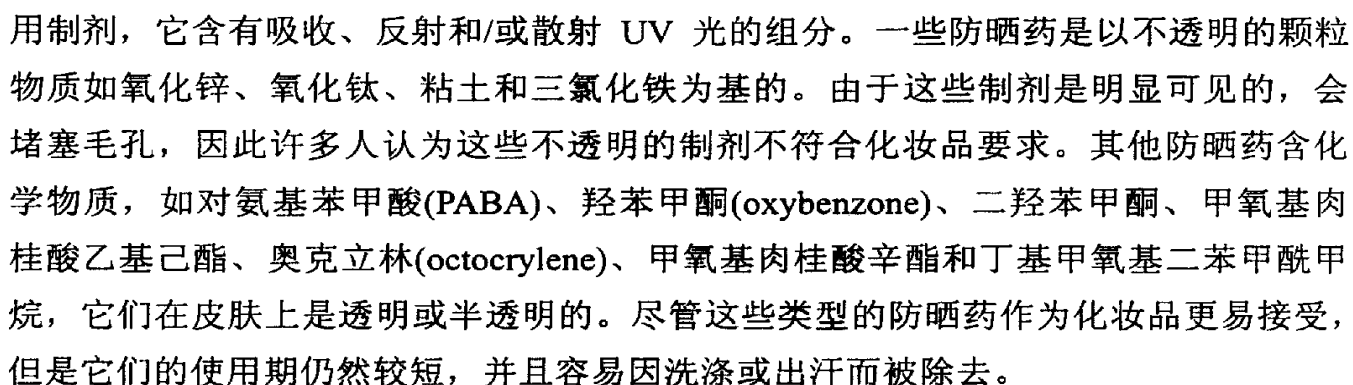
光老化一词现在用来描述人皮肤因反复暴露于阳光后其外观和/或功能的变化, 尤其是起皱或皮肤外观上的其它改变。

到达地球表面、影响并给予各种动物(包括人)能量的太阳辐射包括紫外线
15 (UV)($\lambda < 400\text{nm}$)、可见光($400\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$)和红外光(IR)($\lambda > 700\text{nm}$)。UV 辐射通常分为 UVA($320\text{-}400\text{nm}$)、UVB($290\text{-}320\text{nm}$)和 UVC($< 290\text{nm}$); UVC 辐射被平流层臭氧阻挡而不能到达地球表面。据信, 日光中的紫外线(UV)组分、尤其是 UVB, 通常是导致光老化的主要因素。

目前尚不知引起光老化所需的 UV 照射程度, 但是引起人皮肤红斑(发红, 通常
20 视为晒斑)所需的量却是已知的, 根据经验从给定的 UV 来源可定量测定为“最小红斑剂量”(“MED”)。290-300nm 的 UVB 波长是最具致红斑性(erythmogenic)的。随着紫外线波长增加超过大约 300nm, 紫外辐射引起红斑的作用迅速下降; 与约 298nm 的波长相比, 320nm 和 340nm 的波长引起皮肤发红的效率分别低 100 和 1000 倍。然而, 反复暴露于引起红斑和皮肤晒黑水平的日光常与光老化相关。有人提出, UVB
25 产生的红斑与总辐照量(而不是辐照强度)成函数关系。根据 L.A.Goldsmith 等人编辑的《皮肤生理学、生物化学和分子生物学》第 2 版(New York: Oxford Univ. Press, 1991), 认为 UVA 既有致黑色素作用, 又有致红斑作用, UVA 照射诱导人皮肤中合成 32kDa 的应激蛋白以及 UVB 照射后不明显的直接的红斑。

人皮肤光老化的临床特征是皮肤粗糙、起皱、混杂色素沉着、呈病黄色、松弛、
30 最终呈癌前期变化和恶性肿瘤。光老化一般出现在习惯上暴露于阳光的皮肤部位, 如脸、耳、头皮的光秃区域、颈、前臂和手上。

防晒药(sunscreen)一般被用来预防暴露于阳光的皮肤部位光老化。防晒药是外



已有报道，日光紫外辐射诱生了皮肤内的活性氧物质(ROS)。Rieger, M.M. *Cosmetics and Toiletries*(1993) 108:43-56 中回顾了将已知抗氧化剂外用于皮肤以减少 ROS 的存在。

基质金属蛋白酶(MMP)是在结缔组织、尤其是胶原的生理性和病理性破坏中起主要作用的酶家族。各类胶原和胶原酶(MMP 类型)是本领域中已知的,进一步的描述可在我们的待批美国专利申请 No. 08/588,771(1996 年 1 月 19 日提交)中找到,该专利公开内容全部纳入本文作为参考。MMP 的抑制剂(即蛋白酶的直接抑制剂)以及影响 MMP 表达的分子通道的抑制剂(即 AP-1 的抑制剂)是其它领域中已知的,同样在前述专利申请 588,771 中有所描述。

总之，现有技术认为，光损伤主要是由 UVB 辐射引起的，目前可获得的防晒药足以防止光损伤。“Ceilley 博士[美国皮肤学学院的现任院长]认为，避开日光并使用防晒药能预防他实践中所治疗的许多皮肤癌，以及患者所关注的早期起皱” *Shin SAVVY, Amer. Acad. Dermat. supp.to USA Today*, 1997 年 5 月。

发明概述

本发明所根据的是我们在一个较佳实例中的发现，即亚红斑(suberythema)剂量的 UV 辐射诱导了使皮肤结缔组织退化从而可能导致光老化的 MMP。即，我们已经发现，暴露在不足以引起红斑但却会诱导使皮肤结缔组织(如胶原和弹性蛋白)退化的 MMP 的 UV 辐射可能会引起光损伤。也就是说，不足以引起红斑的 UV 照射(用 UVA 和/或 UVB)却足以通过诱导 MMP 而引起光损伤。因此，在本领域中，术语“光损伤”应重新定义成不要求产生红斑。因此，UVA 和/或 UVB 联合辐射可能会显著地损伤皮肤。我们的发明总地包括预防 UVA 和/或 UVB 辐射引起的光损伤，尤其在光损伤的临床症状出现之前。

在我们的较佳实例中，用类维生素 A 预防光损伤。在本发明的另一个实例中，我们发现，可用其它各种化合物通过抑制 MMP 的产生和/或活性来预防光损伤。尽管这些化合物中有一些被称为“抗氧化剂”并能预防红斑，但是它们还能减少 UV 照射的人皮肤中 MMP 的浓度。另外，我们测试这些化合物的结果表明，预防红斑与抑制 UV 介导的 MMP 的增加无关。

在本发明还有一个实例中，我们发现，类维生素 A 抑制了由于人皮肤受 UV 照射而升高的 MMP 水平。尽管已有知识指出类维生素 A 可用来治疗和修复光损伤的皮肤，但是我们发现，类维生素 A 能干扰 UV 诱导的 MMP 水平的升高，因此类维生素 A 可预防性地用于防止发生光损伤。

总之，我们发明的一个实例包含一种组合物，尤其是用于日常使用的组合物，该组合物包含在外用可接受的载体中的 UVA 阻断剂(blocker)、UVB 阻断剂和 MMP 抑制剂。

本发明还包括一种预防偶然性光损伤的方法(当偶然受 UV 照射不产生红斑时抵抗光损伤的预防方法)，该方法是将包含 UVA 阻断剂、UVB 阻断剂和 MMP 抑制剂的组合物外用到受正常照射的皮肤(如脸、头、手和前臂)上。

本发明还有一个实例是一种组合物，尤其是用于抵抗光损伤的预防性用途的组合物，该组合物包含红斑抑制剂和 MMP 抑制剂。

本发明的另一个实例涉及其上涂覆有 UVA 阻断剂和 UVB 阻断剂或它们的混合物的窗结构。如本文所用的，阻断剂在广义上是指通过吸收、反射特定光或将其调节至无害波长来阻断辐射对皮肤的直接作用的化合物。

在本发明的还有一个实例中，在含有类维生素 A 的那些组合物中，组合物宜还包含抑制皮肤内类维生素 A 分解的化合物。这些化合物是抑制细胞色素 P-450 介导类维生素 A 分解的那些化合物。

附图简述

图 1 显示了根据我们的发现认为由于 UV 照射引起皮肤损伤的总的通道。

图 2 表明亚红斑剂量的 UVB/UVA 辐射诱导产生胶原酶、溶基质素-1 和 92kDa 的明胶酶(均为 MMP); 矩形图定量地代表了这些蛋白各自的放射性印迹测试结果。

图 3 表明定期重复 UVB/UVA 亚红斑剂量照射人皮肤诱导 92kD 明胶酶和胶原酶 MMP 的水平恒定地增加。

图 4 显示了照明装置发射的未经滤色以及通过 5 种不同滤片的光谱, 用于图 5 显示的结果。

图 5 显示了人皮肤内胶原酶的诱导与 UV 波长(通过图 4 所示不同滤片)成函数关系, 其中输送了恒定量的能量。

图 6 显示了用于本文试验的照明装置发射的光谱(除了图 5 显示的结果外)。

图 7 显示了外用商品防晒药对于 2MED UVB/UVA 照射人皮肤后的红斑诱导作用的效果。

图 8A 和 8B 显示了 UVA 阻断剂的 UV 吸收量和用这些阻断剂进行预处理对 UV 照射的人皮肤中的红斑的效果。

图 9 显示了褪黑素、维生素 E、N-乙酰半胱氨酸(NAC)和 2-糠偶酰二肼(FDO)预防 2MED 辐照产生的红斑的效果, 以及乙酰水杨酸(ASA)和维生素 C 预防 1MED 辐照人皮肤产生的红斑的效果。

图 10 显示了褪黑素、维生素 E、N-乙酰半胱氨酸(NAC)和 2-糠偶酰二肼(FDO)防止 2MED 辐照而增高的胶原酶活性的效果, 以及乙酰水杨酸(ASA)和维生素 C 防止因 1MED 辐照人皮肤而增高的胶原酶活性的效果。

图 11A-11B 显示了用 NAC 预处理皮肤的时间对 NAC 抑制 UV 诱导的胶原酶和明胶酶效果的影响。

图 12 显示了特定的 UVA 阻断剂抑制 UV 诱导的人皮肤内 92kDa 明胶酶的效果。

图 13A 显示了类维生素 A 的预处理对 2MED 辐照后人皮肤内 UV 诱导的胶原酶、92kD 明胶酶和溶基质素-1 的增加的影响。

图 13B 显示了两种不同的类维生素 A 对亚 MED 剂量 UV 诱导的 I 型胶原酶活性增加的影响。

图 14A-14D 显示了 UV 辐照后人皮肤内各种 MMP(分别为胶原酶、溶基质



素、92kDa 明胶酶和 72kDa 明胶酶)升高的时间历程。

图 15A-15B 显示了预处理时间对于类维生素抑制 UV 诱导的胶原酶和 92kDa 明胶酶和 c-JUN 蛋白的效果的影响。

5 较佳实例详述

本发明涉及抑制(即减少或预防)皮肤、尤其是人皮肤光老化的方法。本发明的治疗方法宜在通常每日习惯上暴露于日光下的皮肤(如头、颈、手和手臂)上进行。由于反复暴露于低于引起红斑的 UV 剂量下会导致光老化,因此本发明应在受这些低剂量照射的皮肤上进行。

10 UVB 剂量在 $30\text{-}50\text{mJ/cm}^2$ 皮肤范围内会在大多数皮肤好的人中引起红斑。因此,本发明将防止受低于此范围剂量照射的皮肤光老化(通常高于约 5mJ/cm^2 , 其等价于日光照射几分钟)。当太阳基本上在头顶上方时,到达地球表面的日光提供了如下辐射量: 0.5% UVB; 6.5% UVA; 38.9%可见光和 54.0% IR。这些辐射类型提供了下列能量通量: UVB 为 $2.11\text{mJ/cm}^2\cdot\text{s}$ (21.1 W/m^2); UVA 为 8.57
15 $\text{mJ/cm}^2\cdot\text{s}$ (85.7 W/m^2);可见光为 $53.2\text{ mJ/cm}^2\cdot\text{s}$ (532 W/m^2);和 IR 为 $72.2\text{ mJ/cm}^2\cdot\text{s}$ (722 W/m^2)。

尽管不希望受特定理论的限制,参照图 1 将能更好地了解下列实施例,该图显示了一些 UV 诱导的生物化学通道导致皮肤变化的综述。如图所示,UV 辐射诱导了 MAP 激酶级联反应,该级联反应导致的两个通道如下:一个通道导致诱导产生白细胞介素从而导致红斑;另一个通道导致诱导产生 MMP 从而导致结缔
20 组织退化。尽管本领域中认为这些结果是由于 UVB 辐射引起的,但是我们在一系列试验中已经证明,即使当 UV 照射的皮肤没有提供任何可见的光损伤的迹象,UVA 仍无疑是光损伤的原因。然而,结合本申请后应当理解,UVA 和 UVB 对于太阳辐照后人皮肤内 UV 介导诱导产生 MMP 均有作用,甚至其作用是独立
25 的。

在本领域中,UV 辐照量通常参照最小红斑剂量(MED)来衡量,该剂量定义成足以引起皮肤发红的 UV 辐照量。1 MED 通常等价于 30mJ/cm^2 日光辐射。现有技术的理论是受到足以引起发红(晒斑、红斑)的自然日光照射引发了光老化。利用下述发射 UVA 和 UVB 辐射(UVA/UVB 的比例低于自然日光中所发现的比例)
30 的 UV 源,我们已确认,如果诱导皮肤发红,则也会诱生 MMP。因此,本领域目前的原理是应当使用防晒药,因为它们防止了发红,进而防止了光老化。

我们相信我们否定了一些目前的原理,并且还出人意料地发现各种 UV 照射

对人皮肤的影响以及在照射前采用各种化合物的用途。这些出人意料的结果之一是：不足以引起皮肤发红的 UV 照射却能诱导人皮肤中的 MMP 活性(和光老化)增加。因此，常规的防晒药可能防止了发红，但是可能没有防止 UV 照射后因 MMP 活性增加而引起的光老化。我们还鉴定了预防发红的化合物，这不仅对于防止红
5 斑引起的疼痛和不适很重要，而且通过将抑制光老化的红斑抑制剂包括在组合物内可能对顺应性也很重要(因为如果患者在使用了吹捧为预防光损伤的组合物后仍出现红斑，那么患者可能会认为该组合物的抗光老化组分没有效果)。

另一出人意料的发现是预防性地阻断 UVA 辐射抑制了 UV 照射的人皮肤中 MMP 活性的增加以及 cJUN 蛋白浓度的增加，因此预防了光老化。结合我们的
10 亚红斑剂量 UV 照射引起光老化的发现，本发明的一个方面打算将 UVA 阻断剂用作日常的抗光老化预防剂。由于 UVB 也诱导 MMP，因此一种更佳的组合物应包括 UVA 和 UVB 阻断剂。

还有一个出人意料的发现是用类维生素 A 预处理皮肤减轻了 UV 照射后通常发生的 MMP 活性的增加。因此，我们的发明考虑了在 UV 照射前使用的外用
15 组合物，该组合物应含有类维生素 A 作为抗光老化预防剂。

我们的研究中还有一个出人意料的发现是，某些化合物(报道为具有抗氧化剂性质的一些化合物)提供了良好的抗红斑防晒效果，但是它们似乎不能抑制 UV 照射后 MMP 活性的增加。

现在参照附图描述本发明。下面描述获得图中所示结果的试验细节、用来辐
20 照自愿受试验者的装置以及免疫组织学方法。志愿者的受试皮肤区域通常是在其一生中大部分时间隐蔽的或生理上受到保护未受太阳照射的区域(例如臀部皮肤)。从我们的研究结果注意到，不能单独依靠体外试验来确定化合物是否是 MMP 抑制剂并且还适合用作体内抑制剂。因此，必须用本文所述的方法来测试这些化合物，以确定这些化合物是否提供了所需的治疗效果。

图 2 显示了亚红斑剂量的 UV 照射诱导产生胶原酶、溶基质素-1 和 92kDa 明胶酶 MMP 的证据。将志愿者皮肤部分暴露于以 1 MED 分数表示的下列剂量的 UV 辐射之下：0.01,0.05,0.1,0.5,1 和 2。组织活检和随后的放射性试验表明(如
25 图中放射性印迹所示，用矩形图来定量表示)，0.5 MED 足以诱导产生 MMP；甚至 0.1 MED 都足以使 MMP 的产生显著高于基线水平；而 0.01 MED 足以使胶原酶高于基线水平。因此，图 2 表明亚红斑剂量 UV 辐射导致产生 MMP。然而，
30 可以估计，特别在受低剂量 UV 辐照后，人皮肤将返回 MMP 水平没有提高的基线水平。



图 3 显示的进一步证据表明, 亚红斑 UV 辐射反复照射产生了 MMP, 且这些 MMP 的水平在整个时间内保持升高。当每隔两天用 0.5MED 照射人体时, MMP 的水平保持升高, 因此胶原因亚 MED 剂量 UV 辐射的反复照射而不断破坏。图 3 结合图 2 所示的非常少的 UV 剂量确能诱导 MMP 的信息暗示, 日常亚 MED 剂量的慢性 UV 辐照会导致人皮肤内 MMP 水平升高, 因此人的皮肤从来不会从慢性亚 MED 剂量 UV 照射完全复原。

图 4 显示了从照明装置发射的未经滤色和经不同常规滤片(WG320 1; F1 3mm; UV34 2.5; SF12 2; 和 WG360 2.5)滤色的光谱。从该装置中发出通过不同滤片的光谱用不同类型的线条表示。WG320 1 滤片可被认为是接近具有 UVB、UVA2 和 UVA1 射线的日光, 而 WG360 2.5 滤片只允许 UVA1 射线通过。该装置包括 UVB 灯(Philips TL40W/12/RS 型, 购自 Ultraviolet Resources Inc., Lakewood OH)和 UVA 灯(O-Panel UVA-351, 购自 O-Panel Lab Products, Cleveland, OH)。

当用恒定能量照射人体时, 我们测试了胶原酶的诱导与波长的函数关系。根据图 4 所示的曲线, 志愿者在给定滤片下照射的相对期间可通过每一曲线下面积积分比值(与发射波长成函数关系)来确定; 因此, 尽管给予对象的能量相同, 但是在 WG360 2.5 滤片下的照射时间比 WG320 1 滤片长。图 5 所示结果暗示, UVB 和 UVA 的组合诱导了胶原酶(滤片 WG320 1), 单用 UVA1(滤片 WG360 2.5)也足以诱导胶原酶。在太阳距离地平线很低的早上和晚上, UVA 和 UVB 的比例实际上是增加的, 因此皮肤受 UVA 射线的照射比在中午时多。因此, 图 5 所示结果(即在太阳照射不引起红斑的早上和晚上, UVA1 足以引起 MMP 升高)表明, 在每天的这些时间内仍会发生光损伤, 即使没有红斑出现。另外, 与一般人所认为的每天能在日光下外出的“安全”时间(因为不可能产生晒斑)相反, 这些时间仍是不安全的, 因为太阳的 UV 射线仍能诱生 MMP。

红斑反应在临床上是很重要的，因为至少产生明显的疼痛和不适。各种出售的防晒药确实提供了抵抗红斑的保护作用，如图 7 所示。通常这些防晒药只含有 UVB 阻断剂，但是现在许多标出有“UVA”阻断剂。图 8A 中显示了商业上可获得的 UVA 阻断剂 PARSOL 1789 的阻断光谱：右侧纵坐标与阻断剂的吸收特性相关，左侧纵坐标与阻断剂防止在波长通常大于约 300nm 时产生的红斑的效果相关。该 UVA 阻断剂提供了抵抗来自我们标准源 2MED 剂量的一些保护作用(图 8B)。

已用其它各种化合物来防止红斑。我们测试了许多不同的化合物，在 UV 照射前大约 7 小时施加到皮肤上，随后活检它们防止 UV 诱导皮肤发红的效果。褪

黑素看来在辐射剂量高于约 2MED 时能防止红斑。维生素 E 稍差一些，但是能非常有效地防止了红斑。当照射前 16 小时施加时，乙酰水杨酸(SAS)和维生素 C 也提供了抵抗 1MED 诱导红斑的保护作用。FDO 也能有效地防止红斑。NAC 显然对红斑没有效果。

5 根据图 9 显示的结果，我们的一个发明是一种防止红斑产生的方法，该方法是向待暴露于 UV 辐射的皮肤(i)在暴露前至少约 7 小时施加褪黑素和/或维生素 E(或任一者的衍生物)，和/或(ii) 在暴露前至少约 16 小时施加乙酰水杨酸、维生素 C 和/或 FDO(或任一者的衍生物)。

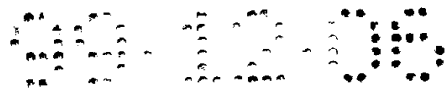
10 在调查和描述了各种抗红斑化合物(图 9)后，测试这些化合物以确定红斑的防止是否表明防止 MMP 水平升高，其结果显示在图 10 中。褪黑素和维生素 E 尽管能很好地防止晒斑，却均不能防止 2MED 照射后诱导产生 MMP(如 92kDa 明胶酶和胶原酶)(预处理也不行)。同样，尽管 ASA 可用来防止晒斑，但是它却不能有效地防止胶原酶活性升高。出人意料的是，NAC 虽不能有效地防止红斑，却能有效地阻止 2MED 照射后的 MMP 活性上升。我们还发现，用 NAC 来防止
15 MMP(如 92kDa 明胶酶和胶原酶)水平的增加需要预处理 4 小时以上，较佳的为照射前至少约 7 小时(1MED: 图 11A 和 11B)。

回想起来，阻止红斑反应的化合物(褪黑素、维生素 C 和 E、FDO 和 ASA)不一定也能有效地防止 UV 诱导的胶原酶活性的增加(比较图 9 和图 10)。另一方面，显然不能有效防止红斑的化合物(如 NAC)却能用来防止 UV 介导的 MMP 的
20 增加。因此，另一个发明是在照射前至少 7 小时施加 NAC、FDO 或维生素 C(或任一衍生物)来防止 UV 诱导的 MMP(92kDa 明胶酶和胶原酶)水平的升高。

在上文显示了 UVA1 诱导 MMP 水平上升，UVA1 阻断剂也可用来防止这种升高(图 12)。这些阻断剂可阻止导致 MMP 水平和/或活性增加的通道被引发，还可阻止诱导产生 c-JUN 蛋白(数据未显示)。

25 对于 UV 诱导的 MMP 水平和/或活性增加，类维生素 A 是较佳的抑制剂。当维生素 A 酸在照射前 48 小时施加时，它减少了 2MED UVB 所介导的 MMP 胶原酶、92kDa 明胶酶和溶基质素-1 的水平和活性的诱导及其转录(经 mRNA 测定)(图 13A)。在防止 UV-诱导的 I 型胶原酶活性增高方面，甚至在亚红斑辐射剂量时，约 10 倍浓度的维生素 A 与维生素 A 酸一样有效(图 13)。

30 一次性 2MED UV 照射导致 MMP 水平增加，通常在照射后约 24 小时达到最大(图 14A-14A；与我们的待批申请 588,771 中的图 2a-2d 相同)。如同发现的能有效防御红斑或 UV 诱导 MMP 活性的各种化合物一样，当采用类维生素 A 时，



预处理是较佳的，照射前预处理越早，效果越佳(图 15A)。较长时间的处理阻止了 UV 介导的 c-JUN 蛋白水平随时间而增加(推测也导致 MMP 水平增加)。实际上，当在照射前约 48 小时采用类维生素 A 时，c-JUN 蛋白水平的上升似乎是非常有限的(图 15B)。尽管可以预计 c-JUN 蛋白水平的的时间历程可反映 UV 照射诱生的 MMP 水平的时间历程，但是当用类维生素 A 作为 MMP 抑制剂时，该水平保持恒定或只是稍有升高(与基线相比，但是显著低于未经处理的未受保护的皮肤中诱生的水平)。c-JUN 蛋白水平的降低表明，在研究的整个时间历程内，类维生素 A 减少了 MMP 的产生，而不是改变了 UV 介导的皮肤反应的动力学。

本发明包括防止皮肤光老化的方法，该方法是每日外用含有 MMP 抑制剂和 UVA/B 阻断剂的组合物。如本文所述的，与本医学领域现有原理相反，亚红斑 UV 照射导致产生破坏性的蛋白酶。大多数人每天有一些时间在日光下(遛狗或走着去上班)，由于这不是常规的“日光浴”，因此预计这种每天照日光的亚红斑剂量照射不会因 UV 介导 MMP 活性增加而引起光损伤。尽管可以提供古生物学解释为什么人皮肤在亚红斑剂量 UV 照射时会起反应产生 MMP，但是本发明的防止(或至少是抑制)至少这类光老化的方法可通过每日外用(i)UVA/B 阻断剂(即广义上讲通过吸收、反射或将光调节至无害波长来阻断 UVA/UVB 辐射对皮肤直接作用的一种或多种化合物)，(ii)在预防上能有效抑制或减少 UV 诱导的 MMP 活性增加的化合物和/或 MMP 的直接抑制剂，和(iii)一种或多种这些组分的相容的混合物。鉴于这些试验，本发明的一个较佳实例是一种改进的防晒药组合物，该组合物还包含 MMP 抑制剂(较佳的是类维生素 A)，以及 UVA 阻断剂和 UVB 阻断剂两种。

如本文所用的，MMP 的“抑制剂”抑制导致产生 MMP 的自然生理性通道中的一个或多个步骤，和/或直接抑制这些蛋白酶中的一种或多种。因此，MMP 抑制剂能抑制一种或多种不同的信号传导化合物和/或天然产生 MMP 的转录因子(例如 cJUN 和 cFOS，它们均导致产生 MMP)。

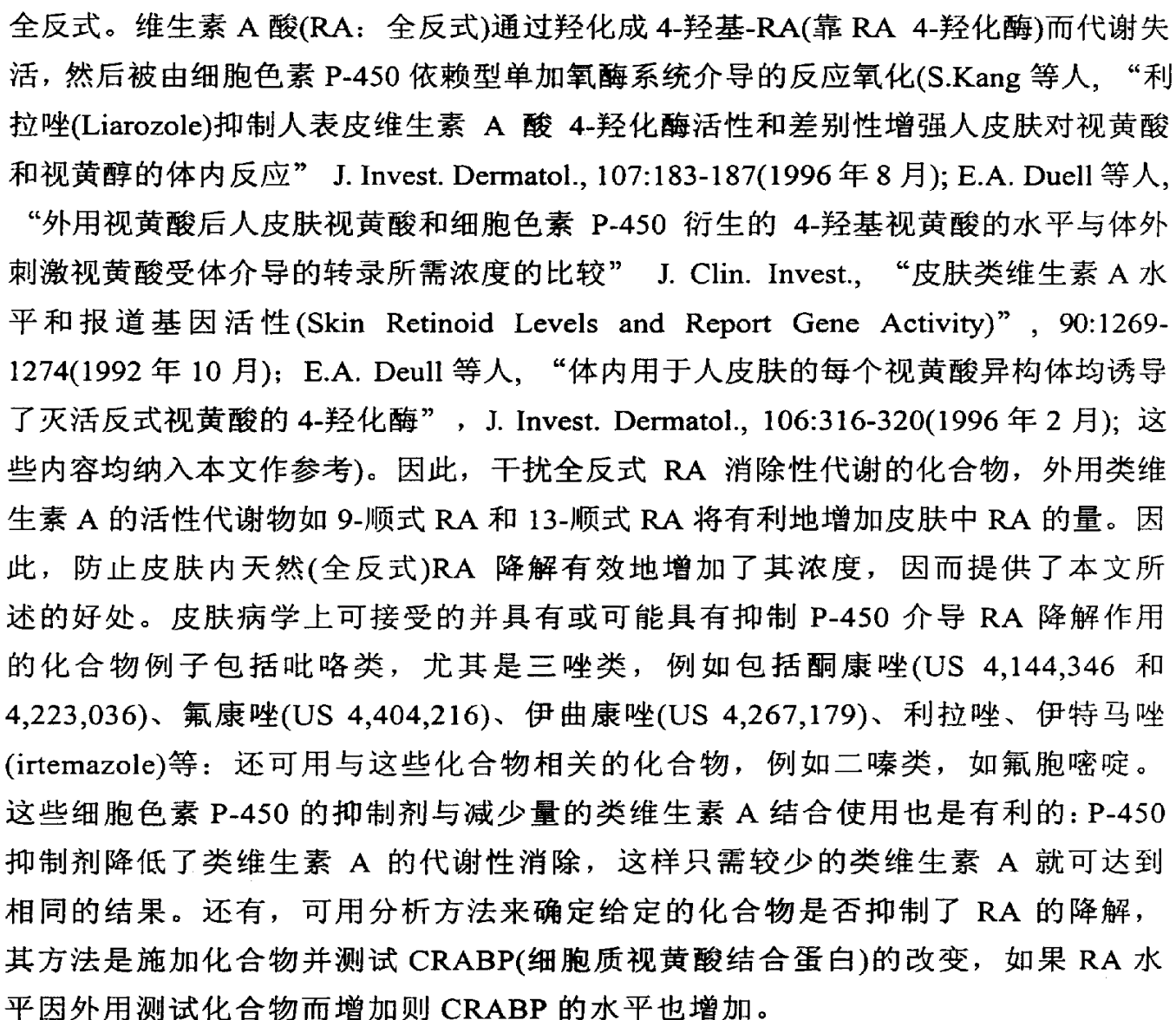
类维生素 A 是一类 MMP 抑制剂。MMP 抑制剂可直接作用于 MMP 和/或自然产生 MMP 的转录因子 AP-1 和 NF- κ B。E5510 已被描述成能抑制 NF- κ B 的活化(Fujimori, T.等人, Jpn. J. Pharmacol (1991) 55(1):81-91)。类维生素 A 例如是美国专利 No. 4,877,805 中描述的那些，解离的类维生素 A 是对 AP-1 拮抗作用(如 Fanjul 等人在 Nature(1994) 372:104-110 中描述的那些)、促糖皮质激素和维生素 D₃ 靶 AP-1 有特异性的那些。增强维生素 D₃ 治疗效果的化合物可能也会增强维生素 D₃ 的 MMP 抑制效果，这些在 1997 年 4 月 4 日提交的待批申请 08/832,865(J.

Voorhees 等人, "评价 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在皮肤内活性和增强 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 治疗用途的方法")中有所描述, 该专利被纳入本文作参考。除了维生素 A 外, 其它类维生素 A 包括维生素 A(视黄醇)、维生素 A 醛(视黄醛)、维生素 A 酸(视黄酸(RA), 包括全反式、9-顺式和 13-顺式视黄酸)、苯壬四烯酯的天然和合成类似物, 以及 EP-A2-0 379367、US 4,887,805 和 US 4, 888, 342 中描述的其它化合物(这些专利全部纳入本文作参考)。各种合成的类维生素 A 和具有类维生素 A 活性的化合物预计可用于本发明直至在体内表现出类维生素 A 活性的程度, 这些在下列各美国专利中有所描述, 这些专利已转让给 Allergan Inc., 它们是: 5,514,825; 5,698,700; 5,696,162; 5,688,957; 5,677,451; 5,677,323; 5,677,320; 5,675,033; 5,675,024; 5,672,710; 5,688,175; 5,663,367; 5,663,357; 5,663,347; 5,648,514; 5,648,503; 5,618,943; 5,618,931; 5,618,836; 5,605,915; 5,602,130。具有类维生素 A 活性的其它化合物在其它美国专利中有所描述, 它们是: 5,648,563; 5,648,385; 5,618,839; 5,559,248; 5,616,712; 5,616,597; 5,602,135; 5,599,819; 5,556,996; 5,534,516; 5,516,904; 5,498,755; 5,470,999; 5,468,879; 5,455,265; 5,451,605; 5,343,173; 5,426,118; 5,414,007; 5,407,937; 5,399,586; 5,399,561; 5,391,753 等, 所有前述和下述专利和参考文献均纳入本文作参考。

MMP 还可被 BB2284(Gearing, A.J.H 等人, Nature(1994) 370:555-557)、GI129471(McGeehan G.M., 等人, Nature (1994) 370:558-561)和 TIMP(金属蛋白酶类的组织抑制剂, 它抑制脊椎动物胶原酶和其它金属蛋白酶, 包括明胶酶和溶基质素)。用于本发明的还有其它化合物包括异羟肟酸(hydroxamate)和羟基-尿素衍生物, 如格拉丁(Galardin)、巴马斯塔(Batimastat)和马利马斯塔(Marimastat), 以及公开在 EP-A1-0 558635 和 EP-A1-0 558648 中的那些化合物(在治疗其它病因、皮肤溃疡、皮肤癌和大疱性表皮松解症中用来抑制 MMP)。Goldsmith, L.A. 已经报道(《皮肤生理学、生物化学和分子生物学》第 2 版(New York: Oxford Univ. Press, 1991)17 章), 类维生素 A 引起 TIMP mRNA 稳态水平增加, 这暗示转录控制; 但是, 根据我们的发现, 在人体皮肤内并非如此。

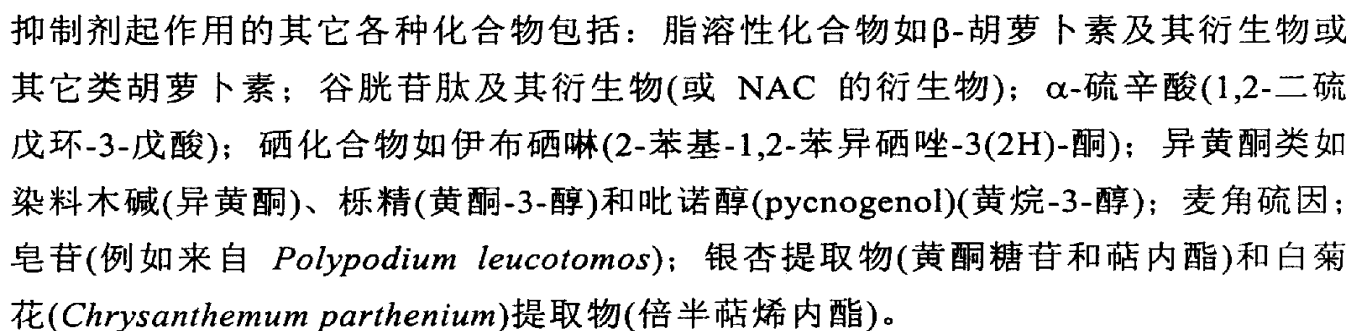
其它 MMP 抑制剂包括染料木碱和栲精(如 US 5637703、US5665367 和 FR-A-2,671,724 中所述, 其公开内容纳入本文作参考)和相关化合物, 以及其它抗氧化剂如 NAC(N-乙酰半胱氨酸)及其它。

除了类维生素 A 可作为用于本发明的一类化合物外, 抑制代谢维生素 A 酸的细胞色素 P-450 酶的药物也可用来实施本发明。在皮肤中, 类维生素 A 被转换成活性形式的维生素 A 酸(RA)。在皮肤中起作用的天然类维生素 A 是全反式的或被代谢成



还有其它可外用并可用于实施本发明的 MMP 抑制剂包括四环素类及其衍生物, 如米诺环素、吡甲四环素(roliteracycline)、氯四环素、甲烯土霉素、土霉素、强力霉素、去甲金霉素及其各种盐。由于可能有过敏或致敏反应, 外用四环素时应对这些不良反应作仔细监控。

称为“抗氧化剂”的各种化合物也可作为 MMP 抑制剂。尽管不希望受任何特定原理或操作的的限制，这些化合物可抑制或减少可能引发或导致 MMP 诱导(例如通过 MAP 激酶级联反应)的自由基和活性氧物质。这些化合物包括谷胱苷肽及其前体，如 N-乙酰半胱氨酸(NAC)或谷胱苷肽乙酯、更广泛的定义是 $\text{N-CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}$ 半胱氨酸(其中 n 是 0 至 8 的整数，更佳的不超过 4)，以及美国专利 No. 5,296,500 中描述的相关化合物及其衍生物(该专利纳入本文作参考)。其它这些 MMP 抑制剂包括水溶性化合物如维生素 C 和 NAC 和 FDO。可作为 MMP



在涂料和染料工业中, 已知各种 UV 阻断剂可防止汽车、房屋和衣服的颜料或颜色分解。用于人皮肤的一种特别佳的 UVA_{1/2} 阻断剂是 PARSOL®1789 (Schering-Plough), 以及在前述美国专利 No. 4,387,089 中的那些阻断剂(该专利描述了这种 UVA 阻断剂的制备)。我们已经发现 UVA 阻断剂实际上抑制了 cJUN mRNA 以及胶原酶和明胶酶的诱导。

本发 明 的 组 合 物 可 以 任 何 适 合 美 容 的 形 式 提 供， 较 佳 的 是 洗 液 或 乳 膏， 但 也 可 以 是 油 膏 或 以 油 为 基 剂 的 以 及 可 喷 雾 的 液 体 形 式 (例 如 保 护 头 发 和 头 皮 免 受 UV 损 伤 的 基 剂 中 的 “头 发” 喷 雾 剂， 该 基 剂 以 美 容 上 可 接 受 的 方 式 干 燥 没 有 洗 液 或 油 膏 在 施 加 到 头 发 上 时 会 留 下 的 油 腻 外 表)。 另 外， 本 发 明 考 虑 的 组 合 物 可 包 括 一 种 或 多 种 相 容 的 美 容 上 可 接 受 的 常 用 佐 剂， 例 如 着 色 剂、 芳 香 剂、 润 肤 剂、 保 湿 剂 等， 以 及 药 材 如 芦 荟、 甘 菊 等。 在 外 用 时， 类 维 生 素 A 的 使 用 浓 度 宜 在 约 0.05-5%之 间， 更 佳 的 在 0.1-1%之 间。 上 述 类 维 生 素 A 和 各 种 抗 氧 化 剂 也 可 全 身 性 给 予， 最 好 是 口 服。 在 口 服 给 予 时， 类 维 生 素 A 给 予 的 量 宜 为 约 0.1 毫 克/千 克 (体 重)至 约 1 毫 克/千 克 或 甚 至 更 多， 所 有 剂 量 均 低 于 可 能 有 毒 性 的 剂 量； 抗 氧 化 剂 宜 大 剂 量 服 用 (例 如 至 少 1 克/天 维 生 素 C， 至 少 1000 I.U.的 一 种 或 多 种 生 育 酚)。

总之，本发明广泛上讲是将防止“光老化”的概念从防止晒斑方面重新集中到防止 UV 照射后 MMP 活性增加方面。我们的发明通过一种或多种方式提供了抗光老化的预防方法：在皮肤水平用 UVA/B 阻断性防晒药阻断 UVA/B 辐射；凭借外用抗氧化剂阻断 UV 辐射在皮肤内产生引发 MAP 激酶级联反应和 MMP 诱导作用的活性氧物质；凭借外用类维生素 A 或 MMP 抑制剂(如本文所广泛定义的)阻断 UV 照射后导致 MMP 活性增加的转录因子的诱导；通过外用 MMP 抑制剂直接抑制 MMP 活性；和/或通过在窗结构中或该结构上提供 UVA 阻断剂涂层来阻断 UVA 辐射通过该窗结构传递到人皮肤上。

根据我们的发现，亚红斑剂量的 UV 辐射显然会引起皮肤损伤。因此，尽管药瓶和大多数太阳眼镜含有反射或吸收 UV 的材料或涂层，本发明的另一方面是

在所有类型的玻璃(不仅包括药瓶和太阳眼镜,还包括房屋、办公室和汽车的窗玻璃)上提供 UV 涂层,尤其是抵抗 UVA 传递的 UV 涂层。另外,由于喷气机在大气高空飞行,靠窗的乘客可能不仅会受 UVA 和 UVB 辐射的照射,而且还可能会受更有损伤性的 UVC 辐射照射。在读了本发明的描述后,窗涂层相关领域的普通技术人员很容易确定一种 UVA 阻断剂并将其配制成可成膜的、或可固化(例如类似涂料)的涂层用来连接或层压到窗结构上。因此,在另一个实例中,本发明包括了其中具有反射性和/或吸收性涂层(尤其是 UVA 阻断剂)和/或化合物的透明和半透明聚合结构。这些结构包括类似窗玻璃的和覆盖窗玻璃的装置,如童车的塑料遮阳篷以及当太阳斜射时挂在商店窗子上的塑料遮光篷(通常有颜色或浅色)。再一次指出,制造这类结构的本领域普通技术人员现在很容易提供一种 UVA 阻断剂,将其掺入成膜聚合材料(如可塑的聚乙烯丙烯酸酯),并提供阻断 UVA 辐射传递的透明或半透明窗结构。在阻断 UVA 的窗玻璃方面,如上所述,UVA 和 UVB 的相对量随天空中太阳的仰角而变。当太阳的仰角较小时(即早晨或傍晚的太阳,与顶角为 0°的“中午”的太阳相反),UVA:UVB 的相对量高于一天中其它时间(如正午)的相对量。在这些较小的仰角时,UVA 比 UVB 的相对量可大于两倍。因此,与目前正午太阳引起最大损伤的推测(该推测可能是因为在较高天顶时更大量的 UVB 光更容易引起严重的晒斑)相反,我们的发现是亚红斑剂量的 UVB 加上 UVA 辐射的组合会引起光损伤,表明在一天其它时间防护避免光损伤的重要性。因此,宽光谱的 UVA/B 窗涂层可用来在每天早晨和/或傍晚上下班时保护司机。

在下列实施例中,用 4 只 F36T12 ERE-VHO UV 电灯泡照射人皮肤。在所有时间时,在灯泡前 4 厘米安装一个 Kodocel TA401/407 滤片以除去 UVC 辐射(<290nm)。照射强度用 IL443 光治疗辐射计和 SED240/UVB/W 光电探测器(International Light, NewBury, MA)进行监测。用 Optronics Laboratories OL 754 系统进行辐射分光法。在离四个灯泡约 43cm(17 英寸)处的总辐射(290-800nm)为 1.5mJ/cm²·s(1.49×10⁻³ W/cm²)。用分光辐射法确定该灯泡的辐射输出提供了约 47%的 UVB 和约 27%的 UVA(由约 9%的 UVA1(340-400nm)和约 18%的 UVA2(320-340nm)组成),其余为可见光和 IR 辐射。在此组四个灯泡下照射约 160 秒等价于受 1 MED 照射。因此,当与有 0.5%UVB 和 6.5%UVA 的自然日光相比,可以看出这些试验中所用的一组四个灯泡所提供的 UVA 辐射远远少于等价值 UVB 的日光所照射的量。

在下列实施例中,采用的“标准载体”是以 70%乙醇(有 0.05%BHT 作为防



腐剂)配的 30%PEG(聚乙二醇)。用可溶性交联端肽进行放射免疫测定来评价 UV 诱导皮肤胶原的降解。MMP 和内源性抑制剂(TIMP)的 mRNA 和蛋白水平分别用 Northern 和 Western 分析来测定。胶原酶活性用 I 型^[3H]胶原酶的降解来测定。MMP 活性用酶谱法(zymography)来测定。

5

实施例 1--AP-1 的亚红斑诱导

使 19 位白种人的臀部区域(即通常不受日光照射的皮肤)受前述灯泡系列的 UV 辐射照射不同时间, 然后取组织样品进行分析。如图 2 和 3 所示, 用前述的 2 分钟 40 秒(160 秒)作为 1 个 MED, 使这些志愿者的皮肤不同部分受灯泡辐射 0.01,0.05,0.1,0.5,1 和 2 MED。测定受照射皮肤和 0MED(即未受照射)皮肤的活检皮肤组织样品中 AP-1 的存在以及与编码 AP-1 的 DNA 结合的增加倍数。如 Angel, P.等人在 Cell(1987)49:729-739 中以及 Sato,H.和 Seiki,M.在 Oncogene(1993)8:395-405 中所述的, 某些 MMP 的产生由转录因子 AP-1 所介导。

显示在这些图中的活检结果令人惊讶。在至少约 0.01 MED 的亚红斑剂量下, 诱导出的 AP-1 水平显然高于未照射皮肤中的 AP-1 水平。这些出人意料的结果使得我们相信, 人皮肤光损伤可由亚红斑剂量的 MED 辐射(包括 UVB 和 UVA)来诱导, 因此通过日常使用至少阻断 UVA 以及还任选地阻断 UVB 的防晒药可保护人在任何地方免受光老化。

20 实施例 2——亚红斑性胶原酶诱生的类维生素 A 预防法

如我们的待审查申请 588,771(如上所述并纳入本文作参考)中所述的, 已经表明, 类维生素 A 抑制了红斑剂量辐射后的各种 MMP(包括胶原酶)的诱生作用。

用 10 位志愿者的臀部皮肤, 采用上述相同的总体程序, 每位志愿者用标准载体(单独)、有 0.1%视黄酸(RA)的载体或有 1%视黄醇(ROL)的载体预处理。在 25 预处理、未经照射、和经四个灯泡组的 0.5 MED 照射后, 对这些志愿者的组织样品进行活检。

这些活检的结果显示在图 13B 中, 该图显示了预处理和照射方案中 10 位志愿者体内 I 型胶原酶的增加倍数。如该图中的结果所示, 用视黄酸预处理人皮肤能抑制亚红斑剂量 UV 诱导的胶原酶活性。亚红斑剂量 UV 照射导致胶原酶活性 30 显著增加, 这与图 2 所示结果一致。

实施例 1 和 2 的结果是出人意料的, 从而促使我们对目前的皮肤保护和日光引起皮肤损伤的原理提出疑问。在很早以前, 在晒黑的“户外”外表不被认为具

有美学吸引力的不同文明社会(例如伊丽莎白时代的英国以及许多东方文明(如日本、朝鲜))中,就已尝试用各种化合物和组合物来防止皮肤受太阳损伤和/或诱导“保护性的”黄褐色。我们决定测试各种新的和老的化合物和组合物对于 UV 照射皮肤的真实体内效果。

5

实施例 3——外用预处理 I 后对 UV 照射的效果

褪黑素是一种明显由白天-黑夜的光-暗循环介导的激素。最近已提出,褪黑素可能作为抗氧化剂起作用。

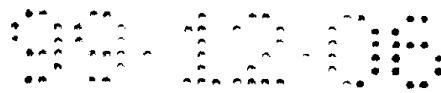
用上述大致相同的程序,我们对 6 位志愿者进行评价来确定外用褪黑素对 UV 诱导的红斑的效果(如果有的话)。图 9 中显示了不同的 UV 剂量照射以及照射 5 分钟后这些志愿者每位的红斑反应。用标准载体(单独)或有 5%褪黑素的载体预处理每位志愿者以前未受照射的皮肤。图 9 结果表明,在 2 MED 照射后,经载体处理的皮肤中诱导出红斑,而经褪黑素处理的皮肤没有诱导出红斑。即使经褪黑素处理的皮肤诱导产生红斑,其程度也明显低于经载体处理并经 UV 辐射的皮肤。然而,应当记住,如上所述,红斑的缺乏不一定与缺少光损伤有关。

在另一组实验中,在 UV 照射前约 7 小时单用载体、或有 5%褪黑素的载体或有 5%维生素 E 的载体预处理志愿者未受照射的皮肤区域。然后使这些区域受约 2MED 的 UV 辐射照射,然后读取比色(chromameter)读数以确定红斑程度,取活检样品以确定 I 型胶原酶和 92kDa 明胶酶的活性。图 9 结果表明,与经载体处理、经 UV 照射的皮肤相比,褪黑素和维生素 E 均显著地减少了红斑。因此,尽管可以认为褪黑素和维生素 E 可能是抗氧化剂,我们已经发现他们提供了良好的防晒斑防晒效果。另外,如图 10 结果所示,褪黑素和维生素 E 没有抑制 UV 照射的人皮肤中 MMP 活性增加的功能。

实施例 4——外用预处理 II 后对 UV 照射的效果

引起光损伤的另一个理论与 UV 辐生活性氧物质(ROS)和其它自由基有关,因为已经知道 UV 辐射能产生自由基。因此,我们研究了这些“抗氧化剂”(如维生素 C(抗坏血酸)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)和 2-糠偶酰二肟(FDO)以及阿斯匹林(乙酰水杨酸, ASA))是否对通过 MMP 诱导的红斑或光损伤有作用。

在照射前 16 小时对志愿者进行预处理,照射和活检按前述实施例中所述那样进行。在一个实验中,单用载体、有 5%ASA 的载体、有 3.5%维生素 C 的载体预处理志愿者皮肤,用比色计测定红斑,用酶谱法测定胶原酶活性。在 1 MED



照射后，图 9 表明用阿斯匹林或维生素 C 预处理使 1 MED 照射时 UV 诱导的红斑少于未经处理(仅经载体处理)的皮肤，阿斯匹林使红斑比用维生素 C 的减少约 30%，而维生素 C 比未经处理的皮肤少约 30%。然而，在评价活检样品的胶原酶活性时，如图 10 的结果所示，经阿斯匹林处理的皮肤表现出高于未经处理皮肤的胶原酶活性，而维生素 C 的胶原酶活性比未经处理的皮肤减少约 25%。这些令人惊奇的结果再次表明，红斑与 MMP 介导的 UV 诱导的人皮肤光损伤没有关联。实际上，只从红斑角度来看，人们可能会采用阿斯匹林，但是这些结果表明，阿斯匹林对于 I 型胶原酶介导的皮肤光退化没有保护效果。

在 2 MED 照射下，单用载体、或有 20%NAC 的载体、或有 5% FDO 的载体(这些化合物在照射前很早就施加于志愿者)，重复大致相同的实验程序。图 9 显示了这些化合物的红斑分析结果，并表明 FDO 完全抑制了红斑，而 NAC 没有效果(即，与经载体处理的皮肤相同)。然而，再次出乎意料的是，在这些相同的照射水平分析 I 型胶原酶活性却表明(如图 10 所示)，NAC 提供了明显的抵抗胶原酶活性的保护作用，而 FDO 提供了一些抵抗 MMP 诱生的保护作用。

实施例 5——预处理的时间依赖性

除了通常不能预知给定化合物是否会抑制 UV 照射后皮肤产生红斑和/或 MMP 介导的皮肤退化外，我们还发现保护作用可能有时间依赖性。

用四个灯泡对志愿者皮肤进行 1 MED 照射，并在照射前 4 小时或 7 小时单用载体、或有 20%NAC 的载体对皮肤进行预处理。在照射后，如上所述进行比色计和酶谱法的分析。

不管预处理时间如何，NAC 没有提供 UV 照射皮肤的抗发红效果。图 11A 和 11B 显示了与图 9 所示结果相比较的 NAC 预处理和 1 MED 照射后对 I 型胶原酶的出人意料的效果。用 NAC 预处理 7 小时提供了对 UV 诱导的 92kDa 明胶酶(图 11A)和胶原酶(图 11B)增加的抑制作用(与未经处理的皮肤(显示出胶原酶活性增加超过 150%)相比)，而四小时的预处理是无效的。

实施例 6——商用防晒药的效果

我们也评价了商业上可获得的防晒药对于 UV 诱导的红斑和胶原酶活性的效果。用标准载体以及含有以下三种防晒药的载体预处理志愿者皮肤：SPF(太阳保护因子)15 组合物，包括对甲氧基肉桂酸乙基己酯和羟苯甲酮；SPF30 组合物，(包装上称可提供对 UVA 和 UVB 的保护作用)，它包含奥克立林(10%)、甲氧基肉桂

酸辛酯(7.5%)和羟苯甲酮(6%); 和 SPF50 组合物(包装上称能提供对 UVA 和 UVB 的保护作用), 它包含较高含量的 SPF30 组合物中的相同组分。

用载体和防晒药预处理皮肤的不同区域, 然后用 2 MED 照射志愿者的皮肤并评价红斑。如图 7 结果所示, 所有的商业上可获得的防晒药均提供优异的抵抗 UV 诱导的红斑的保护作用; 与未经照射的皮肤相比, 基本上没有发红。

实施例 7——定期亚红斑性 UV 照射的生理性效果

我们检查了反复性亚红斑 UV 剂量照射对于体内诱导产生 MMP(具体是 I 型胶原酶和 92kDa 明胶酶)的作用。用 0.5 MED 照射志愿者的四处分开的部位, 每一部位接受 1、2、3 或 4 次 UV 照射, 照射间隔 48 小时。在最后一次照射后 24 小时从每位志愿者活检取下皮肤(包括未受照射区域的皮肤(用作对照)), 分析 MMP 活性。如图 3 所示, 在一次 UV 照射后, 胶原酶和明胶酶活性分别升高 2.2 倍和 4.4 倍, 并每隔一天重复照射四天时以基本相同的水平保持升高。

尽管我们已证明, 施加类维生素 A(尤其是反式视黄酸、tRA)能在 UV 照射后减少皮肤中的 MMP 活性, 我们还研究了在照射前用 tRA 进行预处理的效果。用 tRA 处理皮肤没有改变胶原酶、92kDa 明胶酶或溶基质素的低基础水平, 随后用 UV 辐照导致类维生素 A 预处理的皮肤中这三种 MMP 的水平与未经处理的皮肤相比有显著下降。使志愿者受不同 UV 剂量(从 0.01-2 MED)照射, 在这些区域以及未经照射区域取活检样品。如图 2、3 和 14A-14D 所示, 在相当低的亚红斑辐照水平下照射后 8 小时内, 诱生了溶基质素-1; 诱导作用在 0.1 MED 时非常明显。在这些辐照后, 每日给照射区域施用 0.1% tRA 3 天, 再次取活检样品。如图 13B 所示, tRA 确实使溶基质素-1 蛋白明显减少。

实施例 8——UV 波长对 MMP 诱生作用的影响

我们研究了用已知的 UVA 阻断剂预处理皮肤对 2 MED UV 辐照后的红斑和 MMP 活性的影响。特别是, 我们采用了 PARSOL®1789(也称为 PARSOL A)品牌(4-叔丁基-4'-甲氧基二苯甲酰甲烷), 其在美国专利 No. 4,387,089 中有所描述(该专利纳入本文作参考)。(PARSOL MCX 和 PARSOL MOX 是对甲氧基肉桂酸 2-乙基己酯的商标, 它是一种常用于商用防晒药的 UVB 阻断剂, 并且公开在美国专利 No. 4,713,473 中, 该专利纳入本文作参考)。在图 8A 中, PARSOL®1789 对 UVA₁、UVA₂ 和 UVB 波长的吸收特性用虚线表示。如图所示, 该化合物特别适用于阻断 UVA₂ 辐射, 并且在阻断 UVA₁ 辐射上一定程度地有效。带阴影线显示

了天然的致红斑性 UV 辐射的波长；如图所示，红斑主要由 UVB 辐射引起。

在一组实验中，单用载体、或具有 5%PARSOL® 1789UVA 阻断剂的载体预处理志愿者未经辐照的皮肤区域。使这些预处理区域曝光于约 2 MED UV 辐照，然后测试红斑并活检测试 92kDa 明胶酶的活性以及 cJUN 蛋白的存在。

图 8B 显示了辐照后测试晒斑的结果，其中经 PARSOL®1789 预处理的皮肤没有得到免受 UV 辐照诱导产生晒斑的保护作用。根据 PARSOL®1789 明显阻断了 UVA 辐射，这些结果确认了 UVB 辐射是引起晒斑的主要原因。。

图 12 显示了志愿者皮肤中明胶酶的体内活性测定结果，与经 UV 辐照、经载体处理的皮肤相比，经 UV 辐照、经 PARSOL®1789 预处理的皮肤中的明胶酶活性显著减少。实际上，经 UVA 阻断剂处理的皮肤中明胶酶活性与载体处理的未受辐照的皮肤没有明显不同。这些结果表明，UVA 显然是导致受 UV 照射皮肤中 UV 介导的 MMP 诱导的原因。因此，只有某些波长的 UV 辐射易引起皮肤光老化和光退化。因此，我们的发明包括用阻断 UVA 的防晒药防止光老化。

实施例 9

如上所述，可能在向皮肤施加活性组分与它能够在体内抑制 MMP 或其前体之间有一个延迟期。图 15A 中显示了外用 RA 的时间历程的研究结果及其对 UV 辐照后抑制胶原酶、明胶酶和 cJUN 蛋白的效果。

在受 2 ME 的 UV 辐射照射前 7、16、24 和 48 小时，单用载体、或载体加上 0.1% RA 对志愿者进行预处理，辐照 24 小时后对志愿者皮肤受辐照部分进行活检。如图 18A 所示，辐照前 24 小时单用载体进行预处理胶原酶和明胶酶提供了一个基线活性。辐照前 7 小时用 RA 进行预处理没有产生与单用载体明显不同的胶原酶或明胶酶活性。在预处理 16 小时时，胶原酶活性与单用载体预处理的活性相差不大，但是明胶酶活性明显降低。在预处理 24 小时时，胶原酶和明胶酶活性均明显低于仅用载体时的活性。在预处理 48 小时时，胶原酶和明胶酶活性进一步减少。

还进行了研究来确定受 UV 辐照皮肤中 cJUN 蛋白量的改变是否取决于(1)皮肤在辐照前 48 小时用(a)单单载体或(b)载体中含有的 RA 预处理、和(2)在辐照前 8 小时用分散在载体中的 RA 预处理。从图 15B 可以看出，在辐照前 8 小时用 RA 进行预处理没有引起皮肤中 cJUN 的量发生任何变化(与照射前 48 小时单用载体的预处理相比)。另一方面，在辐照前 48 小时用 RA 进行预处理使得皮肤中的 cJUN 蛋白量明显减少。参看图 1 所示的通道，预计皮肤中 cJUN 的量的增加将导致 AP-1

浓度增加，从而不可避免地导致 MMP 伴随组织降解的增加。

根据这些结果，当用类维生素 A 作为活性组分来抑制光老化时，类维生素 A 施与皮肤的时间宜在 UV 辐射照射前 8 小时以上，较佳的至少 16 小时，更佳的至少 24 小时，甚至高达 48 小时。如我们以前的申请 588,771 中所显示的，胶原酶和明胶酶活性在 UV 辐照后从其基准水平增高将花费大量时间，达到 48 小时。现在，本实施例中显示的结果表明，外用类维生素 A 可能也要花费不可忽略的时间来下调 MMP 通道。因此，抑制光老化的一种较佳的方法是在需要保护作用该天的前一天使用本文的组合物，最佳的是每日使用本文的组合物，这样就能始终抑制光老化(正如我们已经证明的，尤其当偶然的亚红斑 UV 剂量照射会上调 MMP 活性时)。

实施例中采用的方法

本部分中指出的文献被纳入本文作参考。

用于生化分析的皮肤上清液的制备。在液氮下用研钵和杵磨碎皮肤样品，在 Dounce 组织研磨机中在缓冲液中制成匀浆，该缓冲液含有 10mM N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(Hepes), 1mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 5mM 乙二醇双乙胺醚-N-N'四乙酸(EGTA), 10mM MgCl₂, 50mM 甘油磷酸盐, 5mM NaVO₄, 2mM 二硫芳糖醇(DTT), 0.5mM 苯甲基磺酰氟(PMSF), 10 μg/ml 抑蛋白酶肽, 10 μg/ml 亮抑蛋白酶肽, 和 10 μg/ml 抑胃酶肽和 0.5% 乙基苯聚乙二醇(NP-40)。匀浆物 14,000g 离心 15 分钟，收集上清液，用于本文所述的生化测定。

基质金属蛋白酶测定。活检后立即将组织切片冷冻在液氮中，在 20mM Tris HCl (pH 7.6)+5mM CaCl₂ 中制成匀浆，于 3000×g 离心 10 分钟，除去颗粒物。用从 3H-标记的纤维状 I 型胶原中释放可溶性放射活性片段的能力(Fisher, G. J. 等, Nature, 379, 335-339 (1996)和 Hu, C-L 等, Analytic. Biochem., 88, 638-643 (1978) 所述)作为胶原分解活性的衡量指标。组织抽提物用 1mM 氨基苯基乙酸汞(aminophenyl mercuric acetate, APMA)培育 3 小时，将失活形式的基质金属蛋白酶转变成活性形式。接着将 0.2 μCi 胶原底物(NEN-DuPont, Boston, MA)与 50μl 组织抽提物一起培育 24 小时。24 小时培育期末，使样品于 12,000×g 离心 10 分钟，沉淀完整的蛋白质。然后测定保留在上清液中的放射活性，由此测得水解的底物的百分率。

用明胶酶谱法(Varani 等, op. cit.)评价 MMP-2(72-kD 明胶酶; 明胶酶 A)和 MMP9(92-kD 明胶酶; 明胶酶 B)活性。将组织抽提物在含 1mg/ml 明胶的 8.5% SDS-

聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳后，以 1% Triton X-100 连续洗涤 3 次除去 SDS。前两次洗涤各 20 分钟，最后一次洗涤过夜。用激光密度测定法对水解区带的宽度进行定量测定。

C-JUN 激酶活性测定。用固相激酶试验测定皮肤上清液中 c-Jun 的活性(如 M. Hibi 等, “结合和增强 c-Jun 活化结构域的癌基因蛋白和 UV 反应性蛋白激酶的鉴定”, Genes Dev., 7: 2135-2148 (1993)所述)。

RNA 的 Northern 分析。通过盐酸胍裂解和超离心从皮肤样品中分离总 RNA(如 c-Jun 的)(如 G. J. Fisher 等, “局部视黄酸处理的人皮肤的细胞、免疫和生化特征”, J. Investig. Dermatol., 96: 699-707 (1991)所述)。按 G. J. Fisher 等 (“全反式视黄酸体内诱导人皮肤中细胞视黄醇结合蛋白”, J. Investig. Dermatol., 105:80-86 (1995))所描述的方法, 用针对待测的特定 mRNA 的随机引导的 ³²P 标记 cDNA 探针进行总 mRNA 的 Northern 分析(40 μg/泳道)。

蛋白质的 Western 分析。用 G. J. Fisher 等 (“人皮肤中视黄酸和类维生素 A X 受体蛋白的免疫学鉴定和功能定量测定”, J. Biol. Chem., 269:20629-20635 (1994))所描述的 Western 分析法检测人皮肤核提取物中的 Jun 蛋白。免疫反应性蛋白用强化化学发光检测法显影, 并用激光密度测定法定量测定, 或用强化化学荧光检测法显影, 用 Storm 图象仪(Molecular Dynamics, Palo Alto, CA)定量测定。

比色法: 在辐照 24 小时后用商业上可获得的 Minolta 比色计(比色计 CR200, 94401085 型)测定红斑(皮肤发红)。

前述描述是描述性质的, 没有限制目的。本领域技术人员显然能在阅读了本说明书后作各种变化、改动和增补, 这些均视为在权利要求所确定的本发明范围和精神之内。

说明书附图

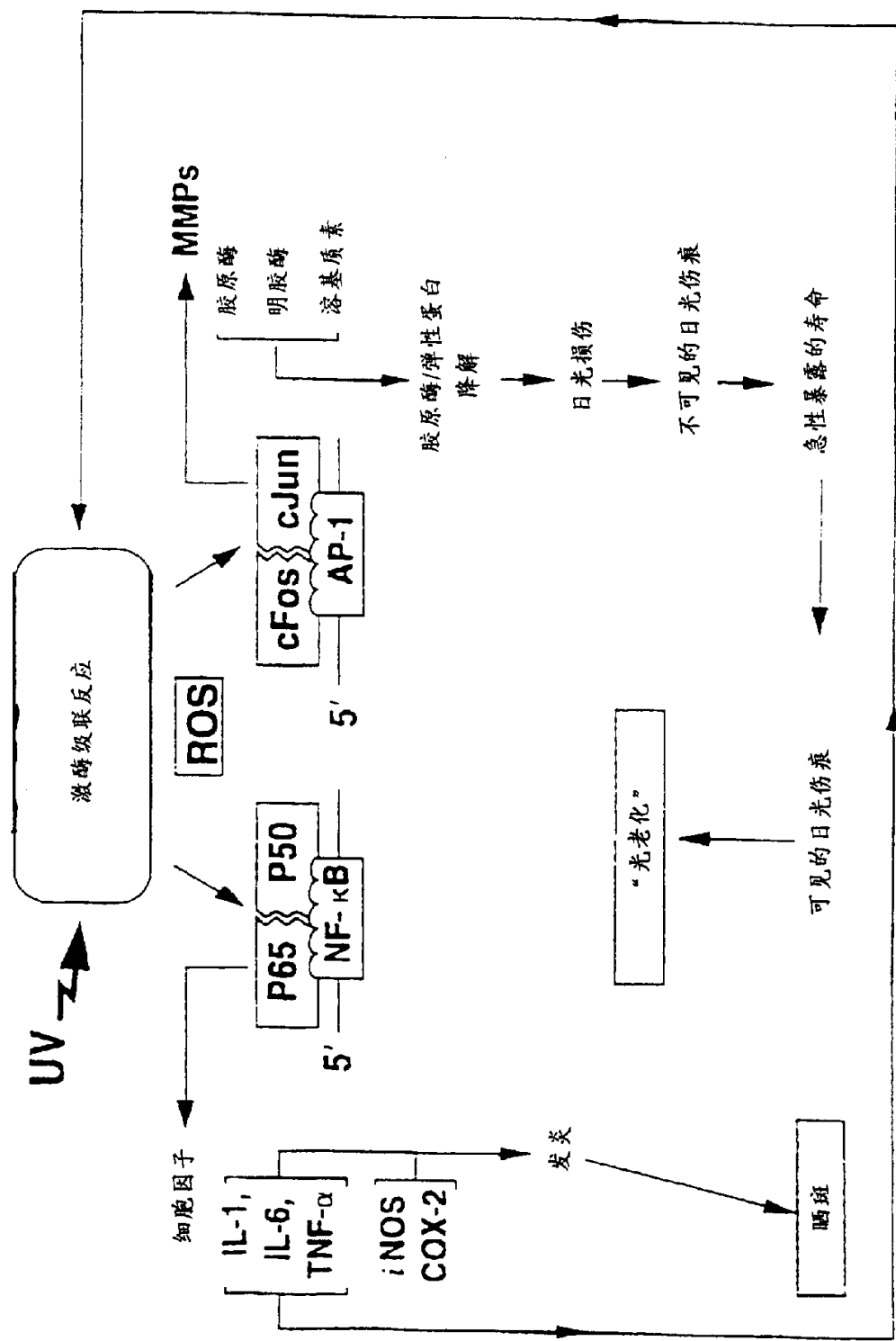


图 1

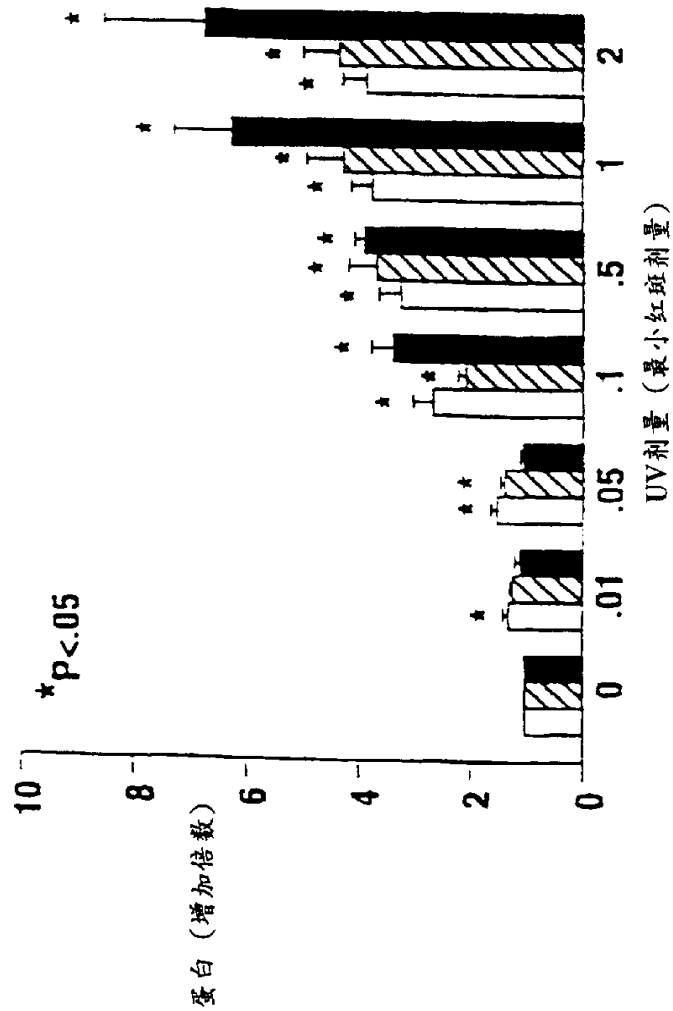
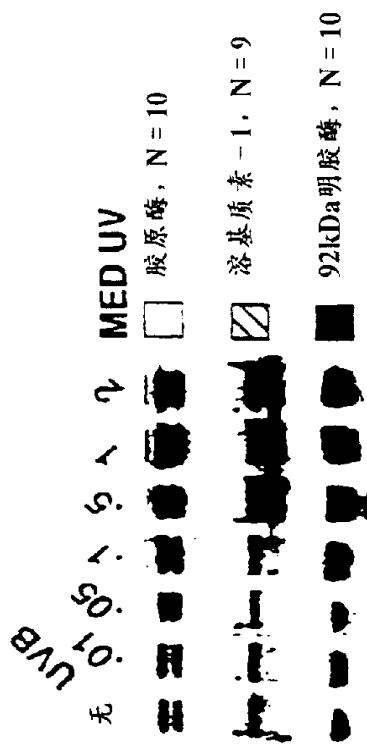


图 2

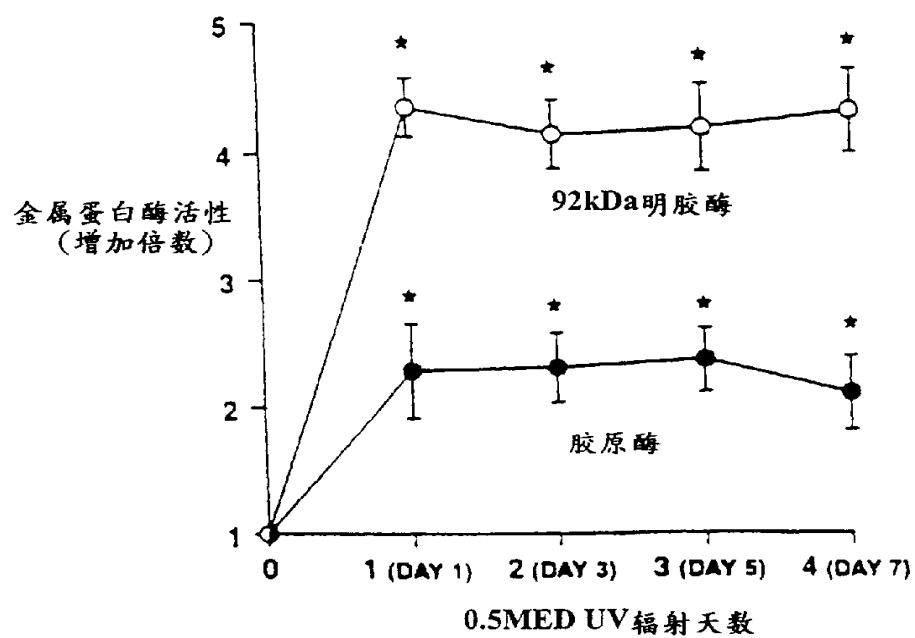


图 3

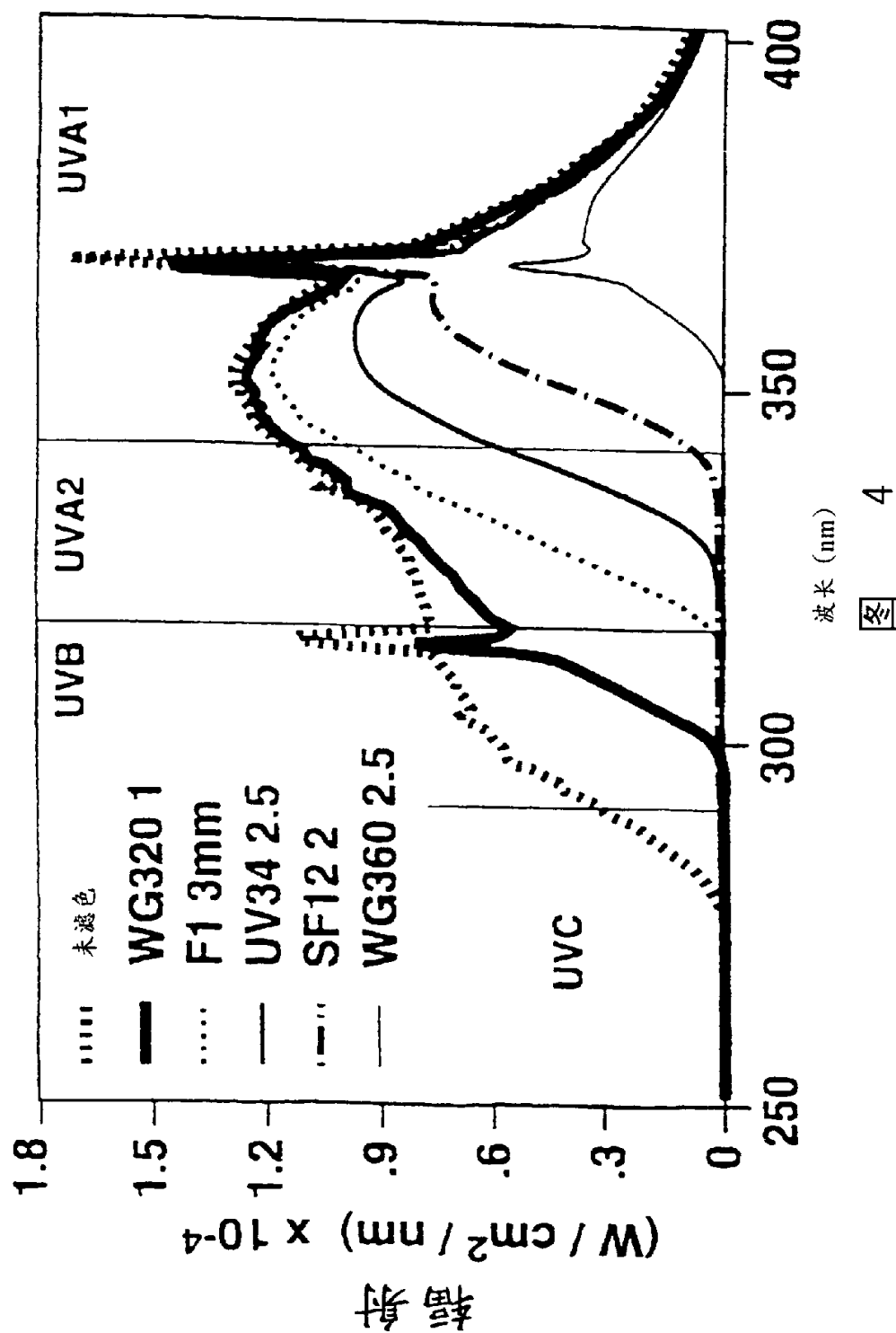


图 4

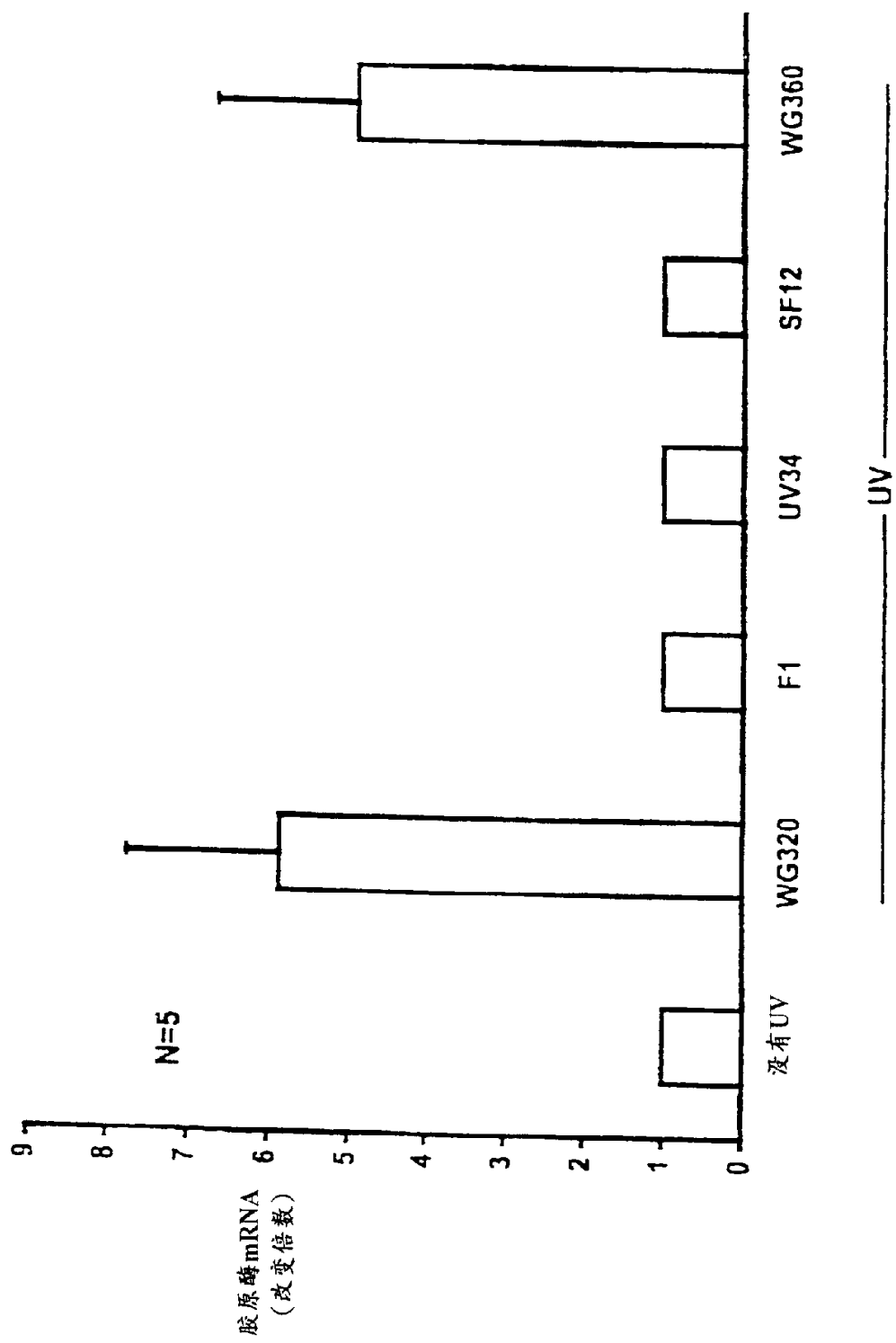


图 5

FS36T12-UVB-VHO: 光谱特性

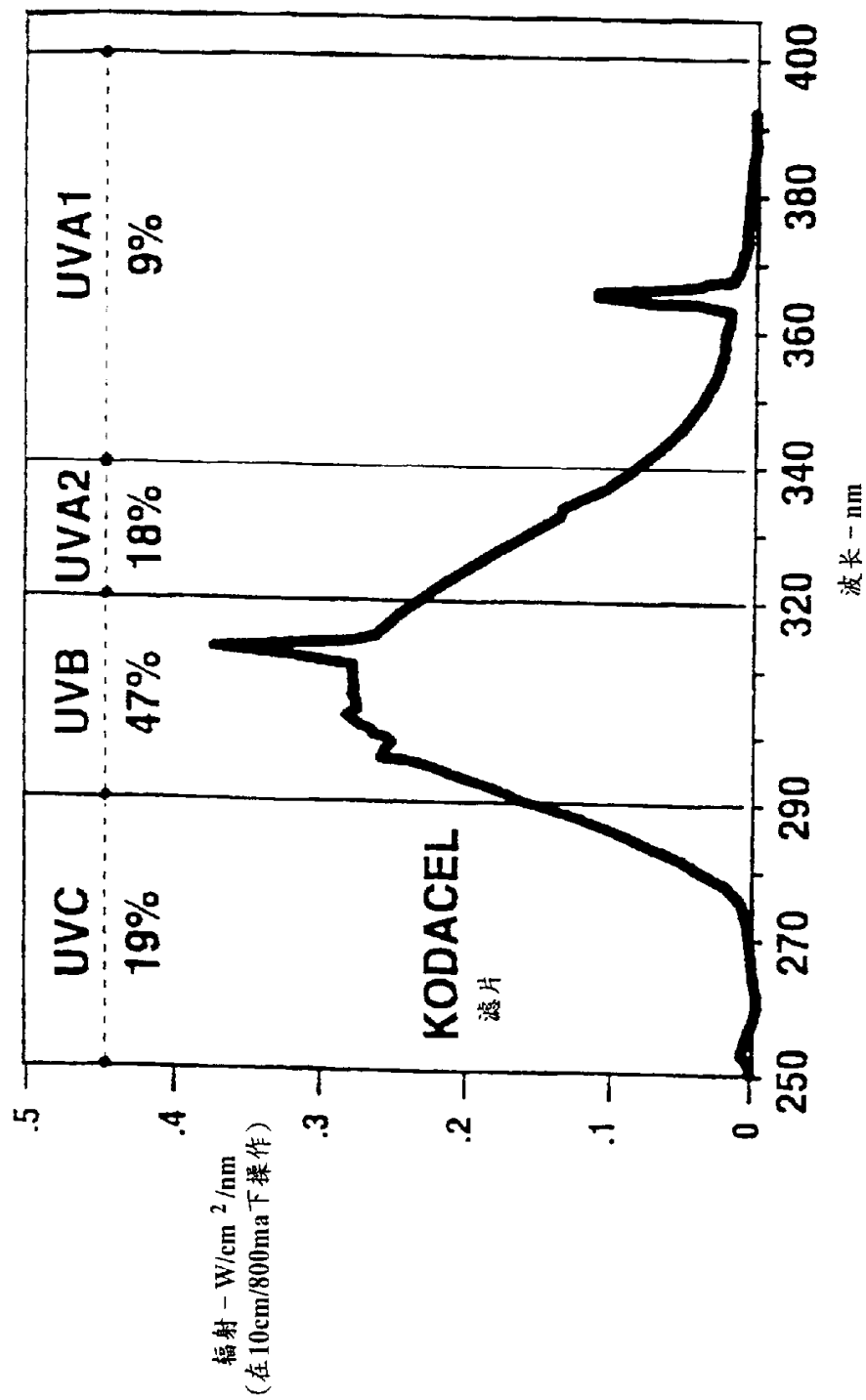


图 6

不同日光保护因子对2MED UV诱导的发红的效果

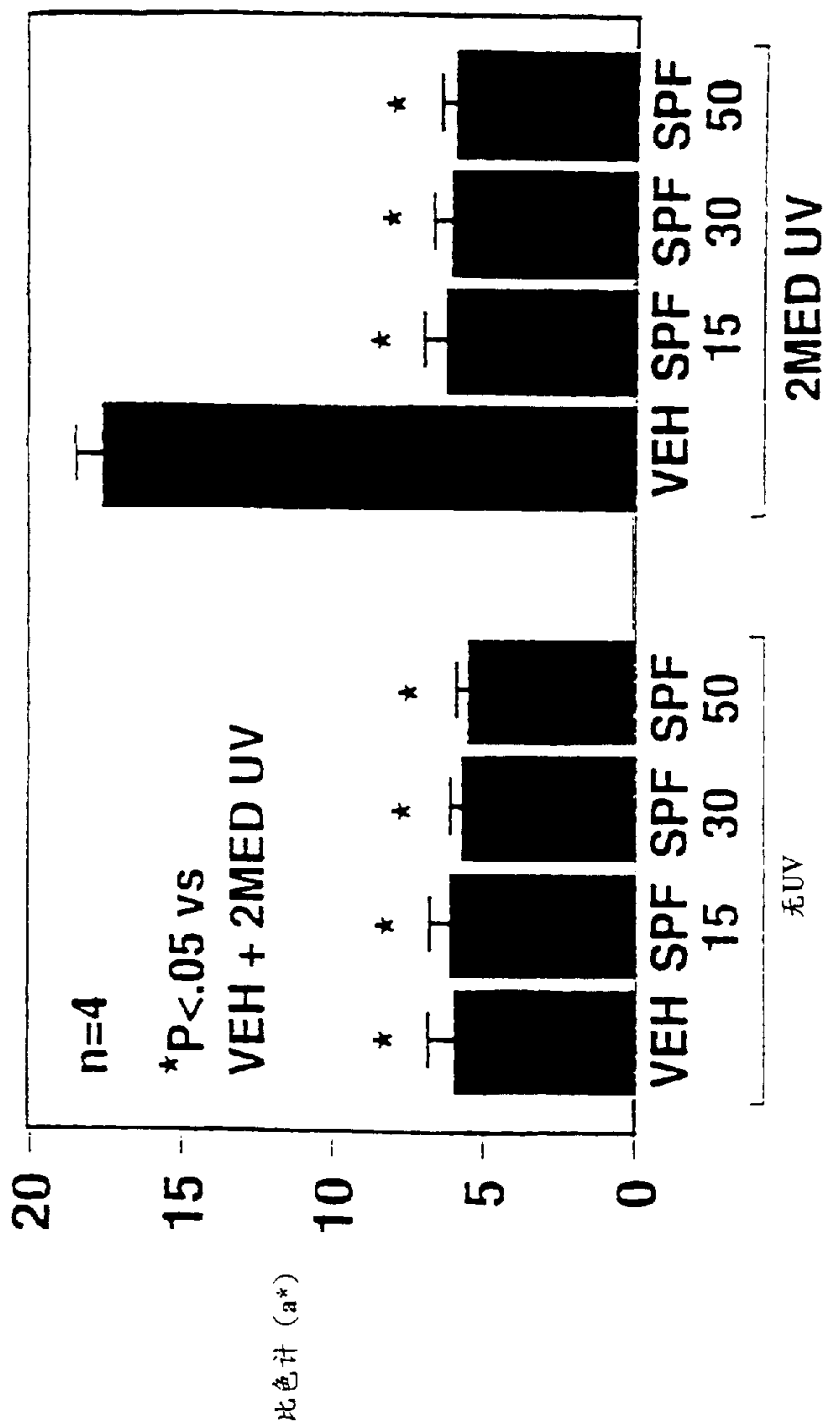


图 7

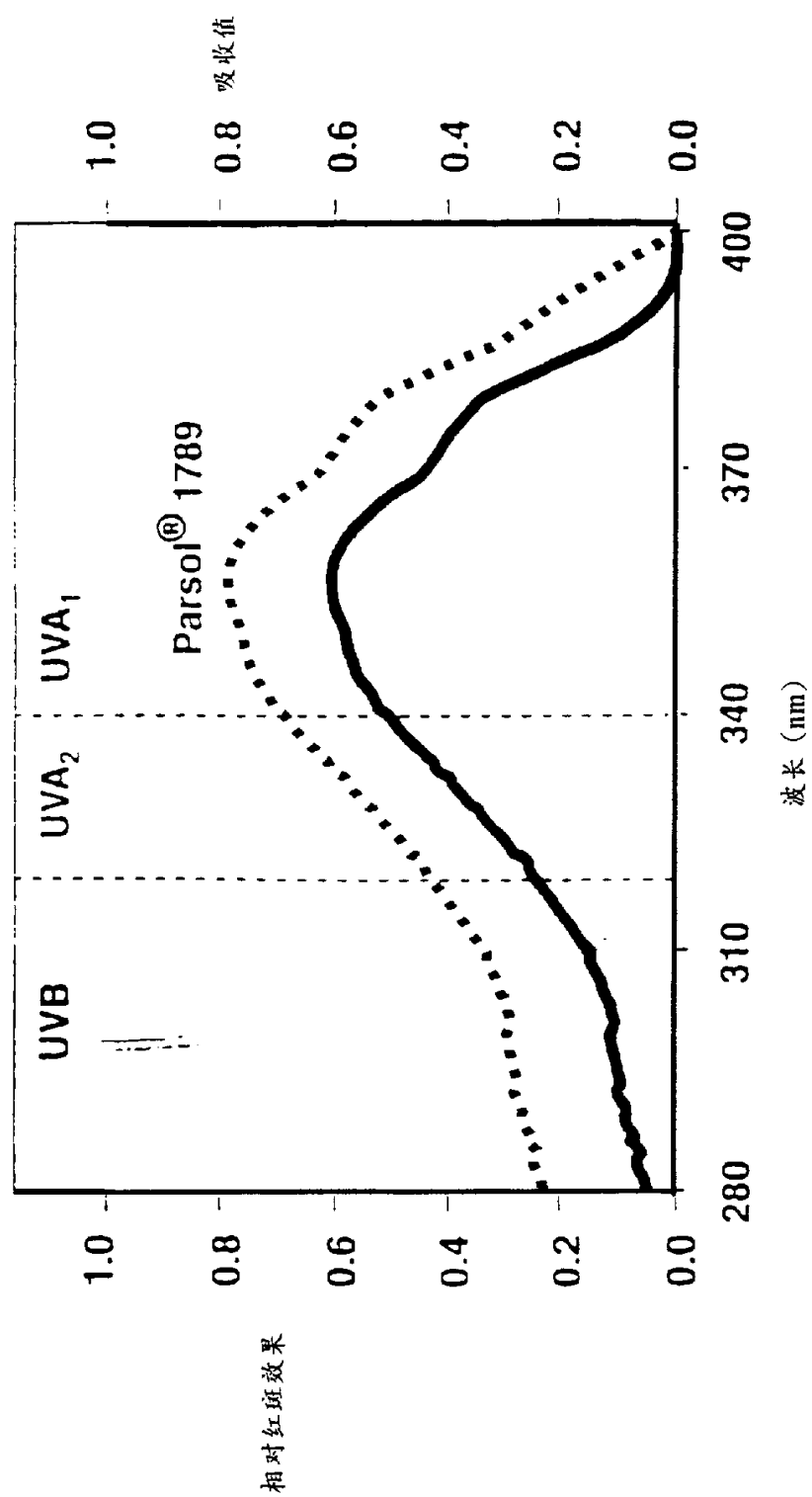


图 8A

PARSOL® 1789 对2MED UV诱导的发红的影

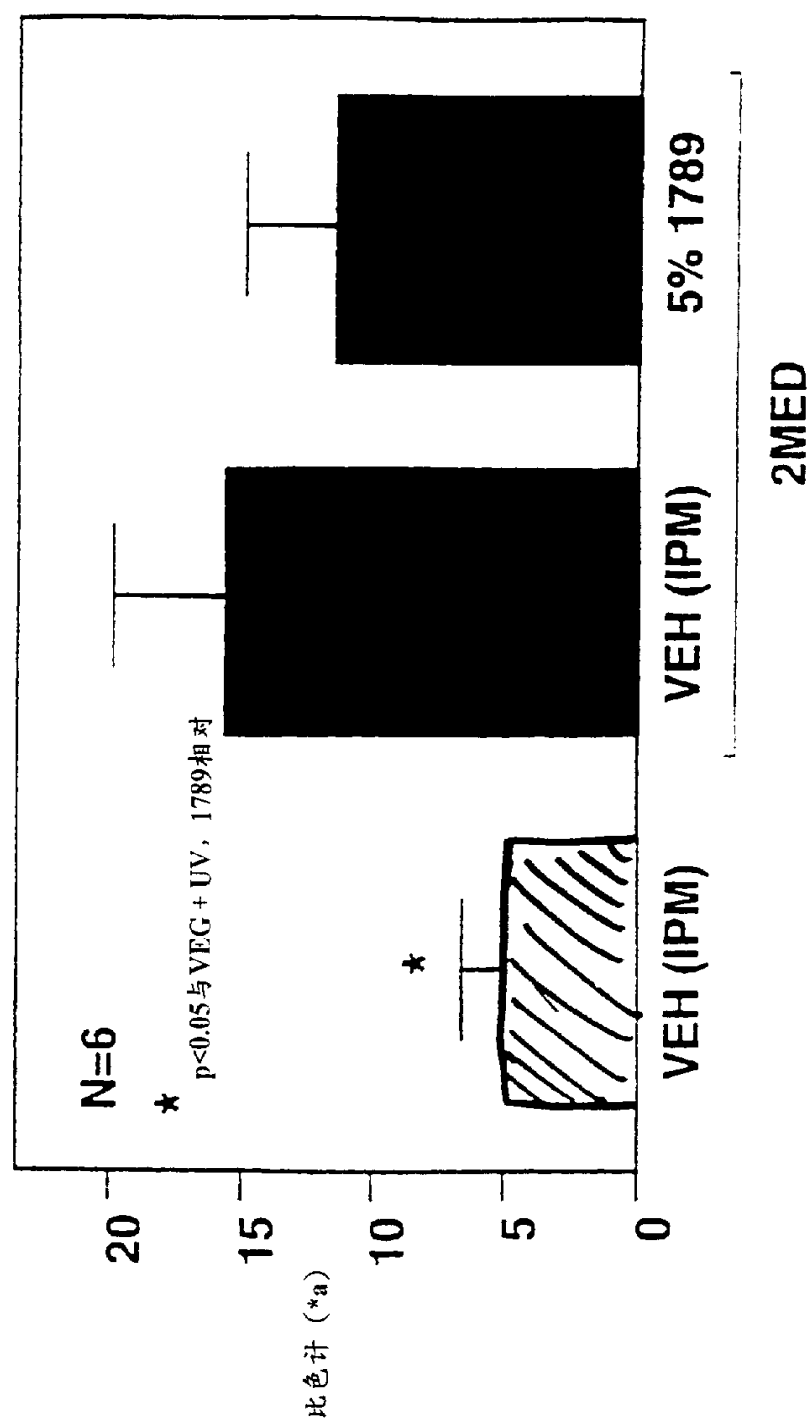


图 8B

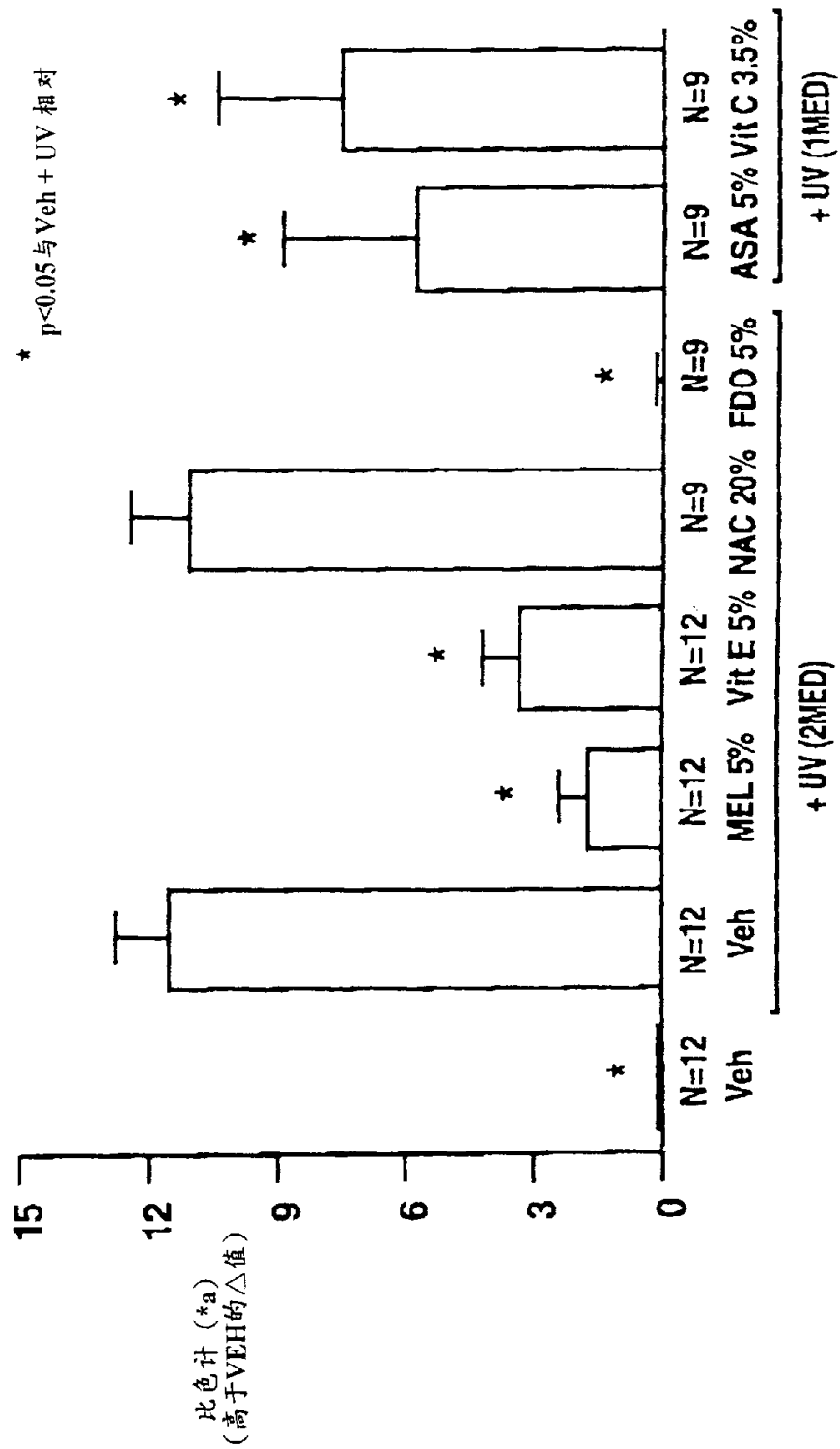
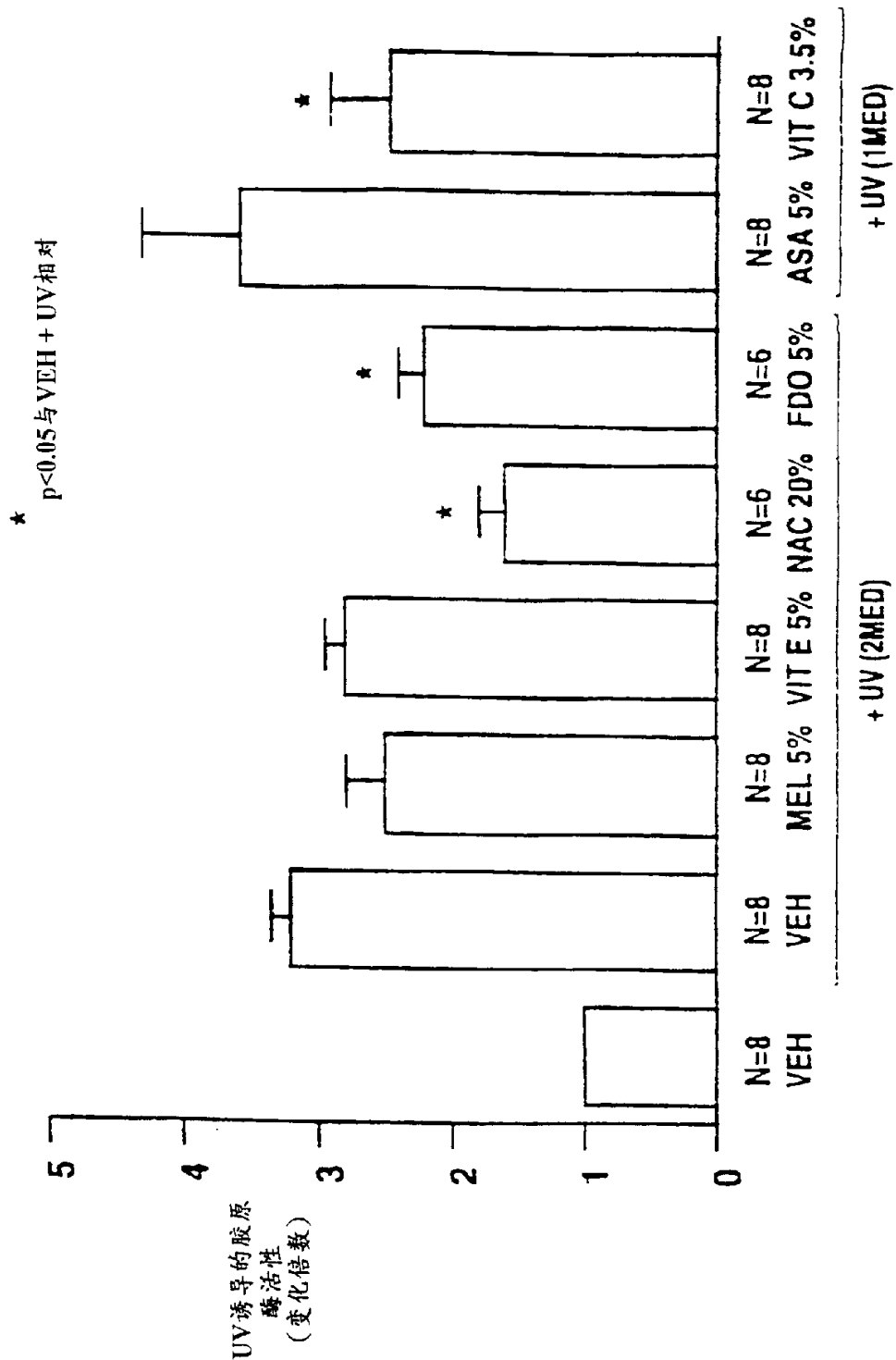
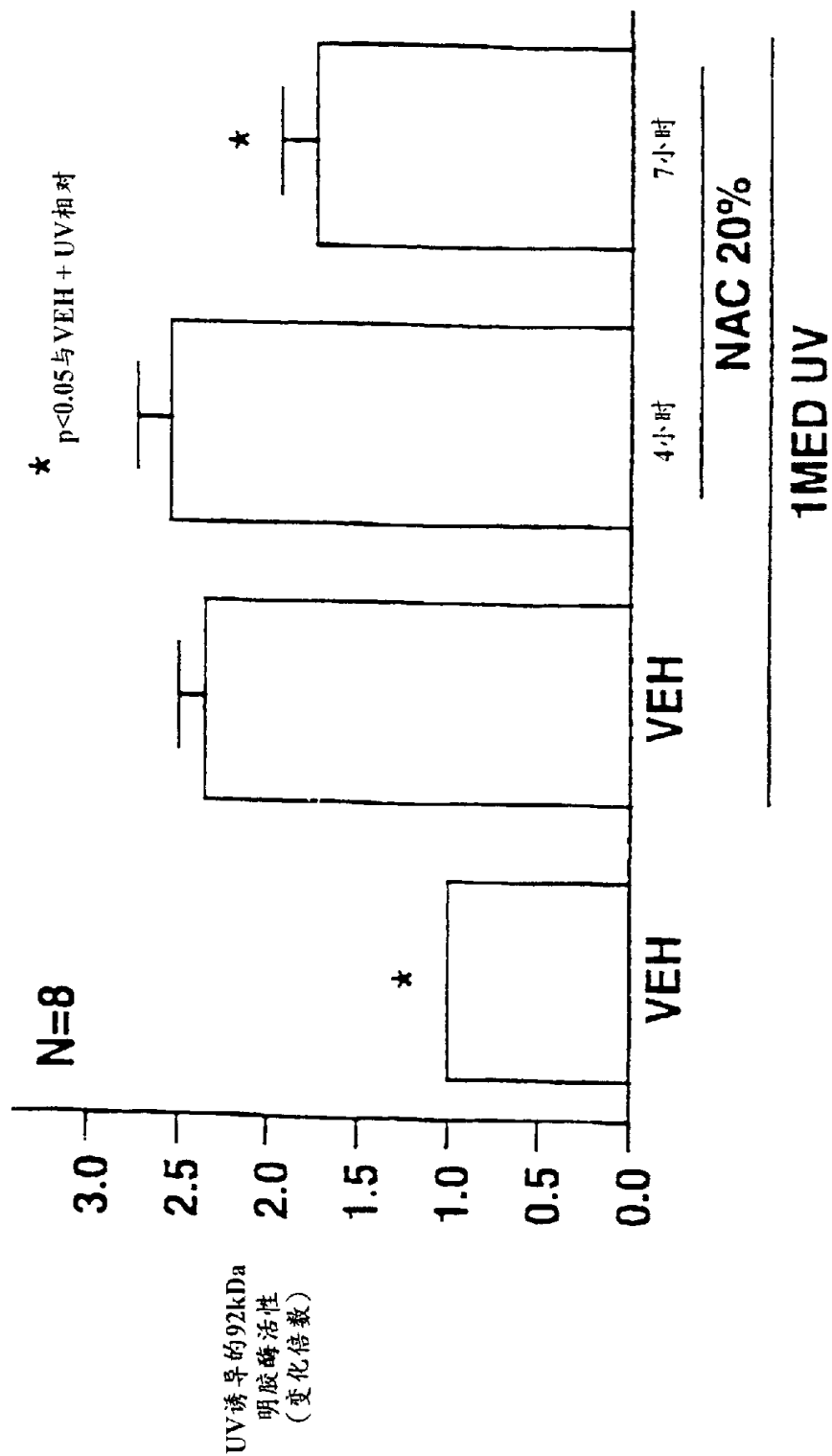


图 9





11A

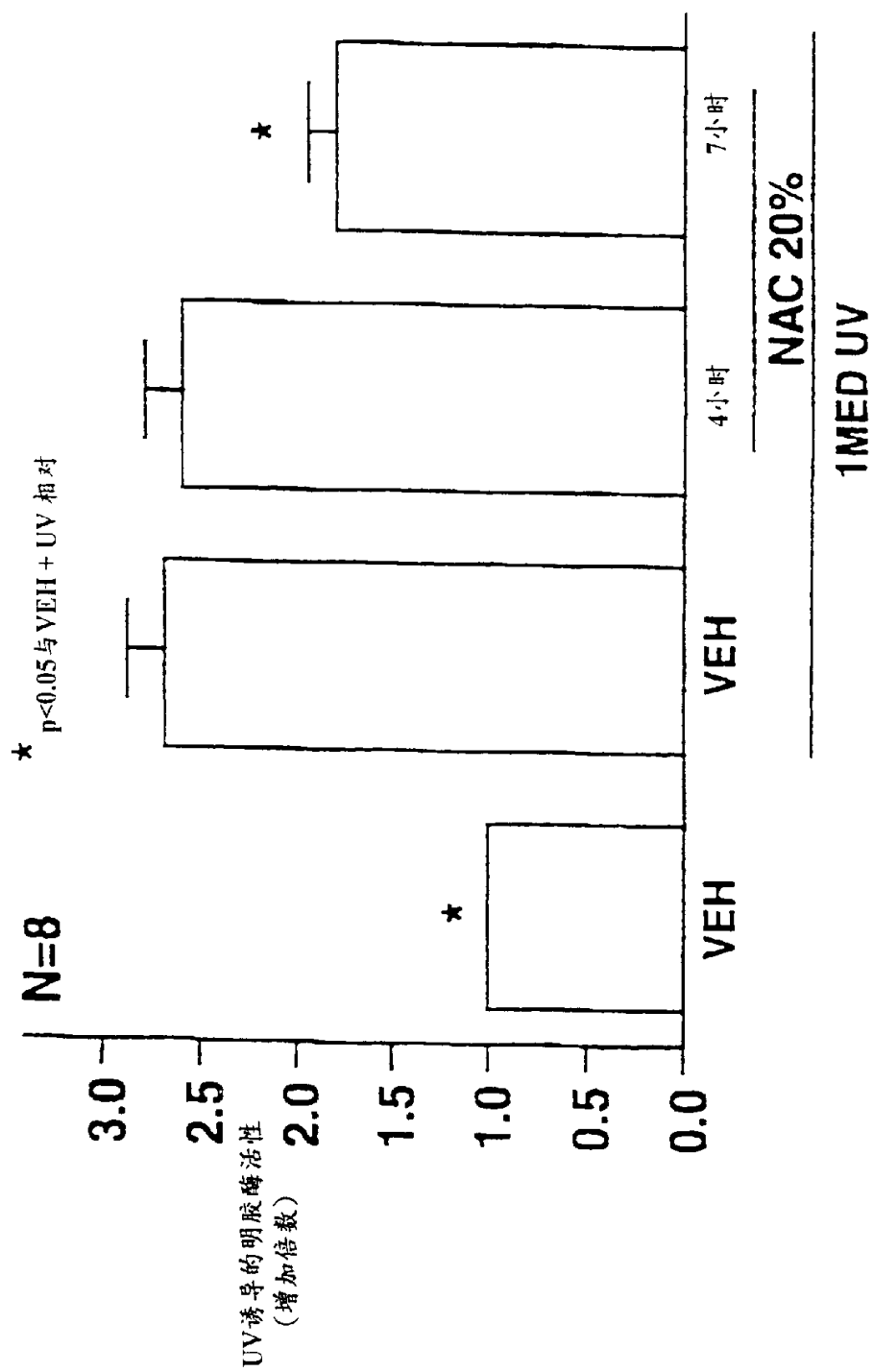
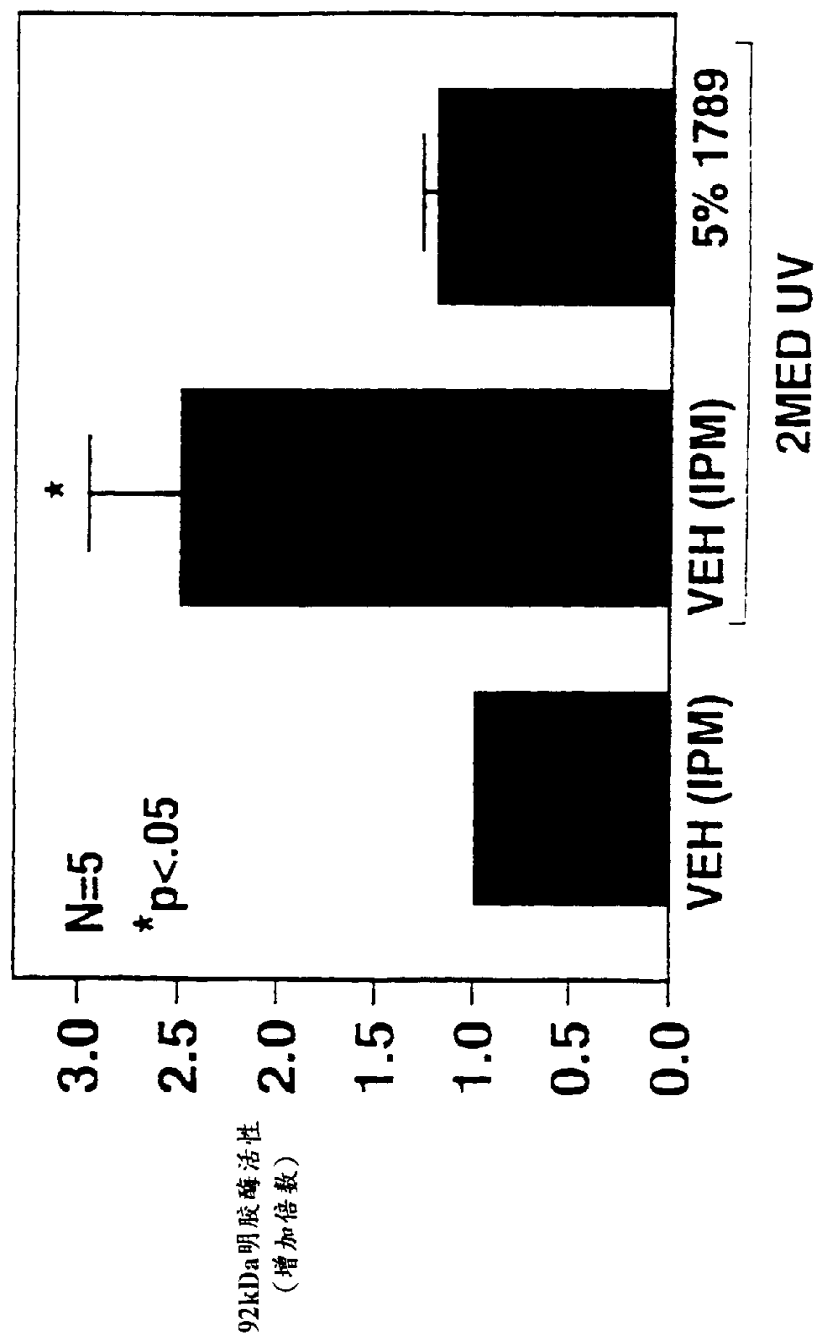


图 11B

PARSOL® 1789阻断了2 MED UV体内诱导人皮肤中

92kDa明胶酶活性



图

12

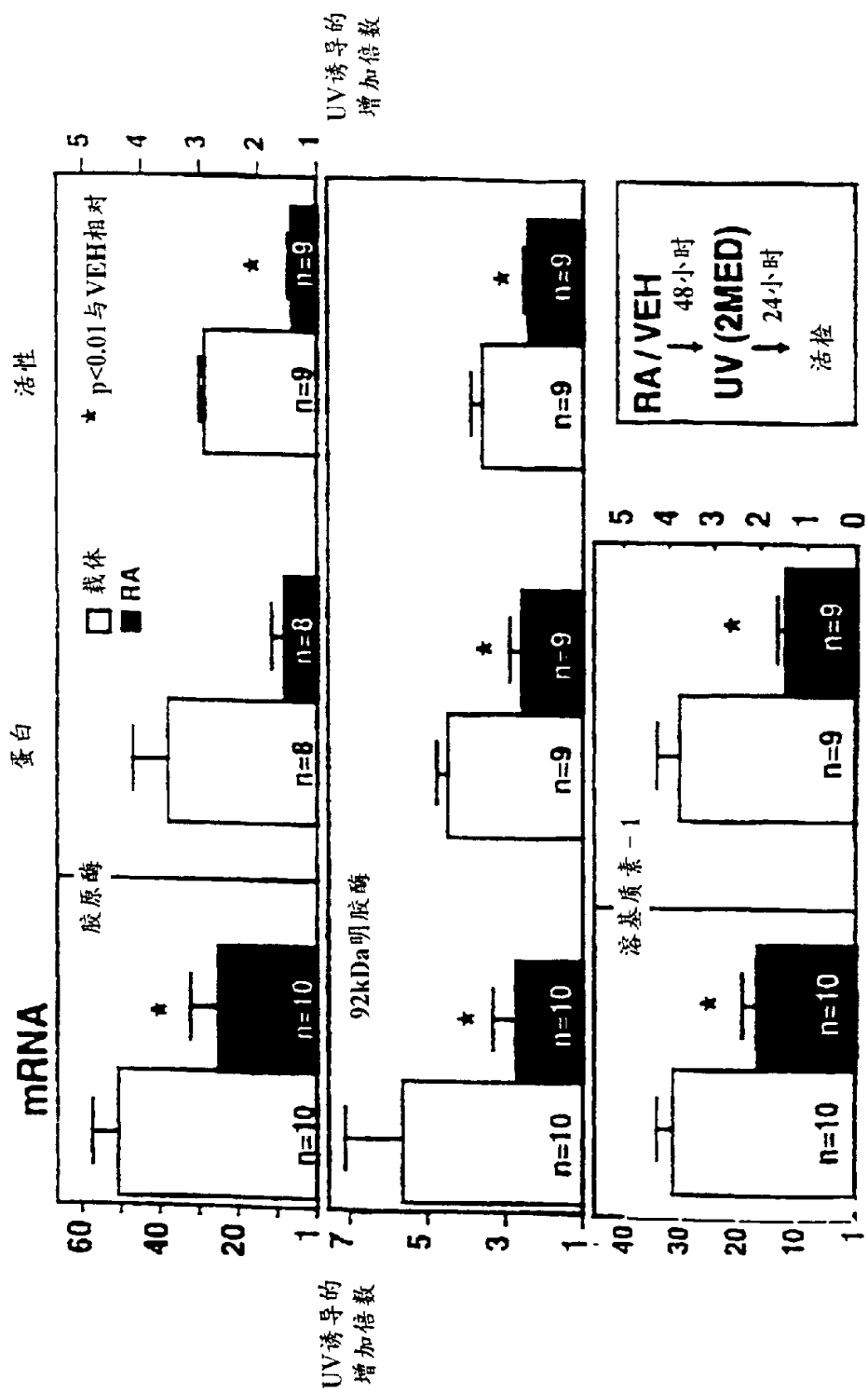


图 13A

RA或ROL抑制UV (0.5MED) 体内诱导人皮肤中I型胶原酶活性

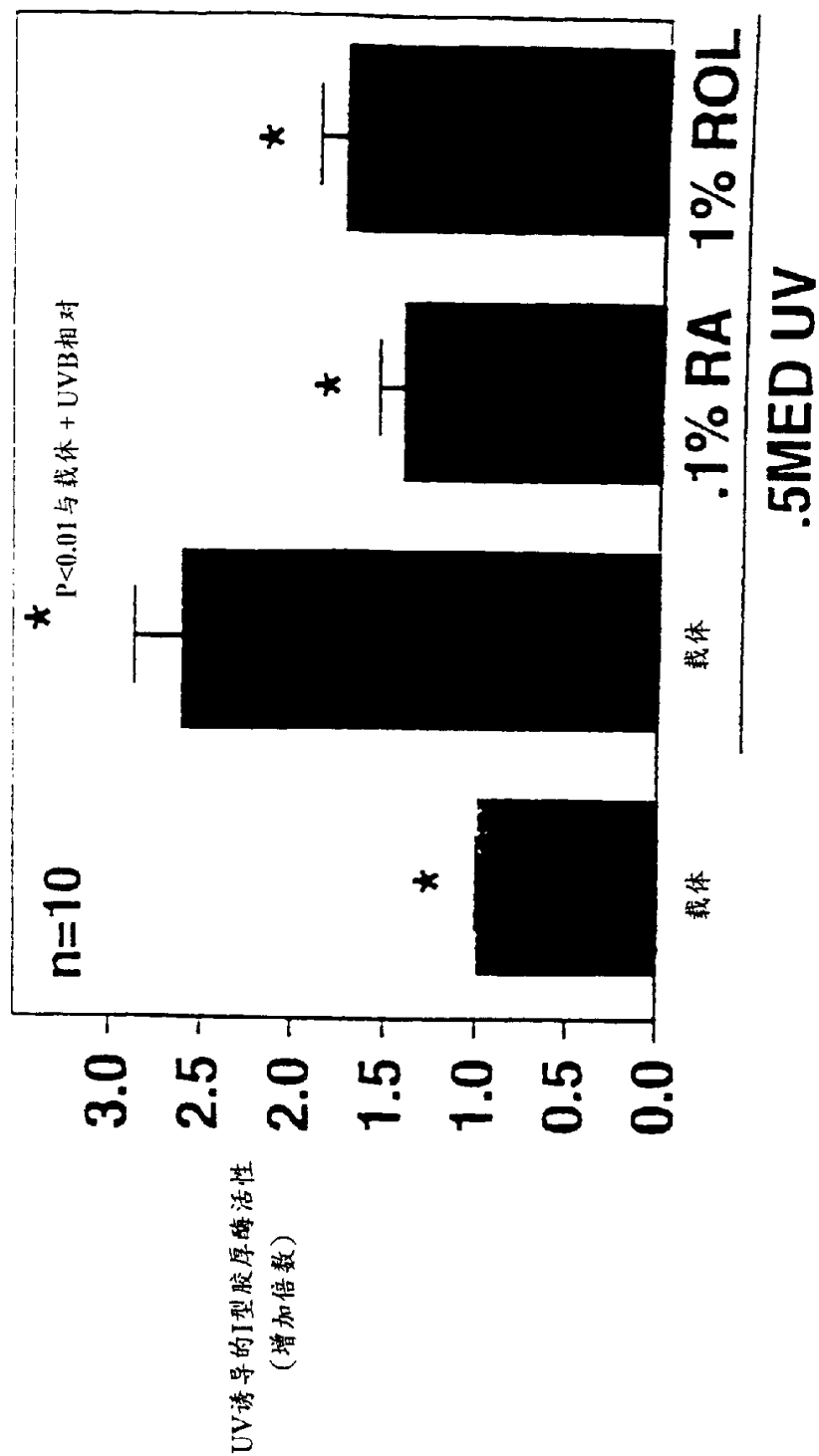


图 13B

图 14A

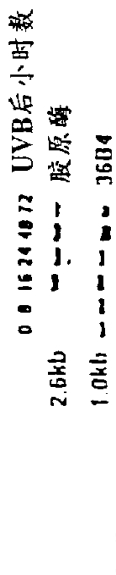
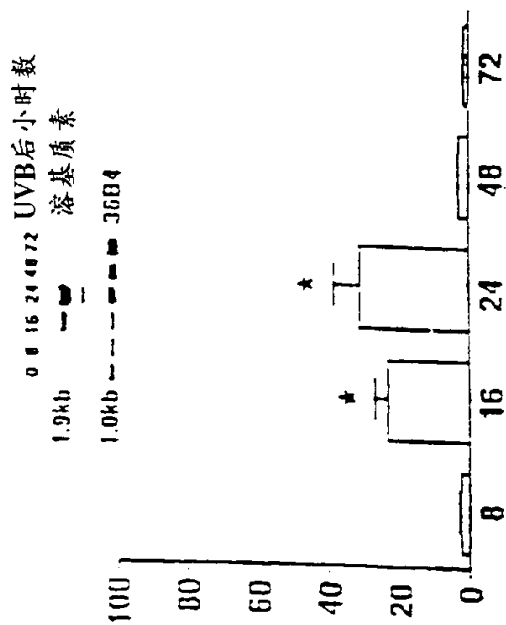


图 14B



mRNA
(增加倍数)

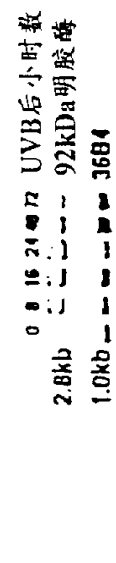
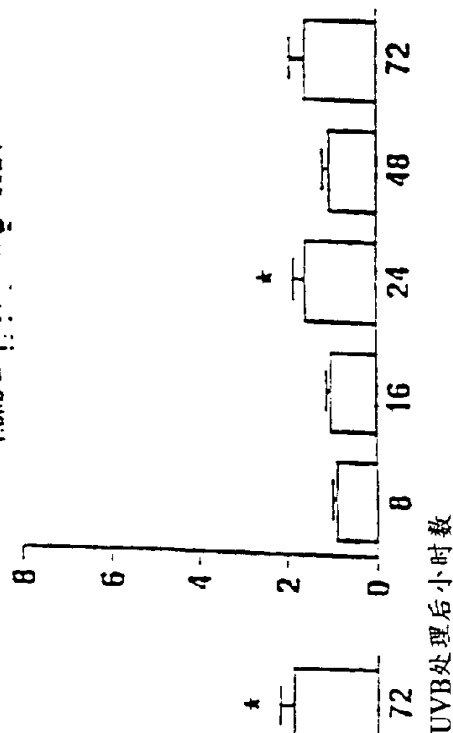


图 14C

14C

图 14D

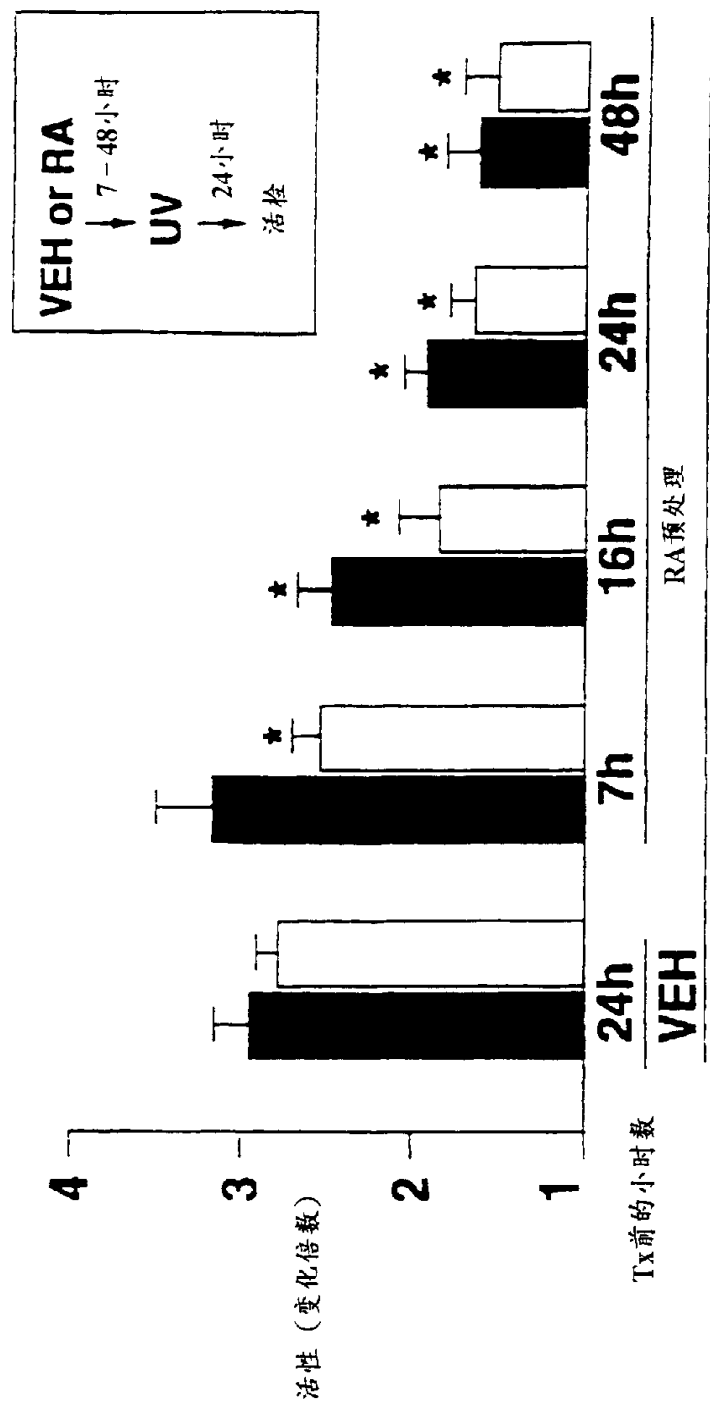
14D



N = 6-12

★ P<0.05 与 VEH + UVB 相对

■ 胶原酶
□ 92kDa 明胶酶



+ 2MED UV

图 15A

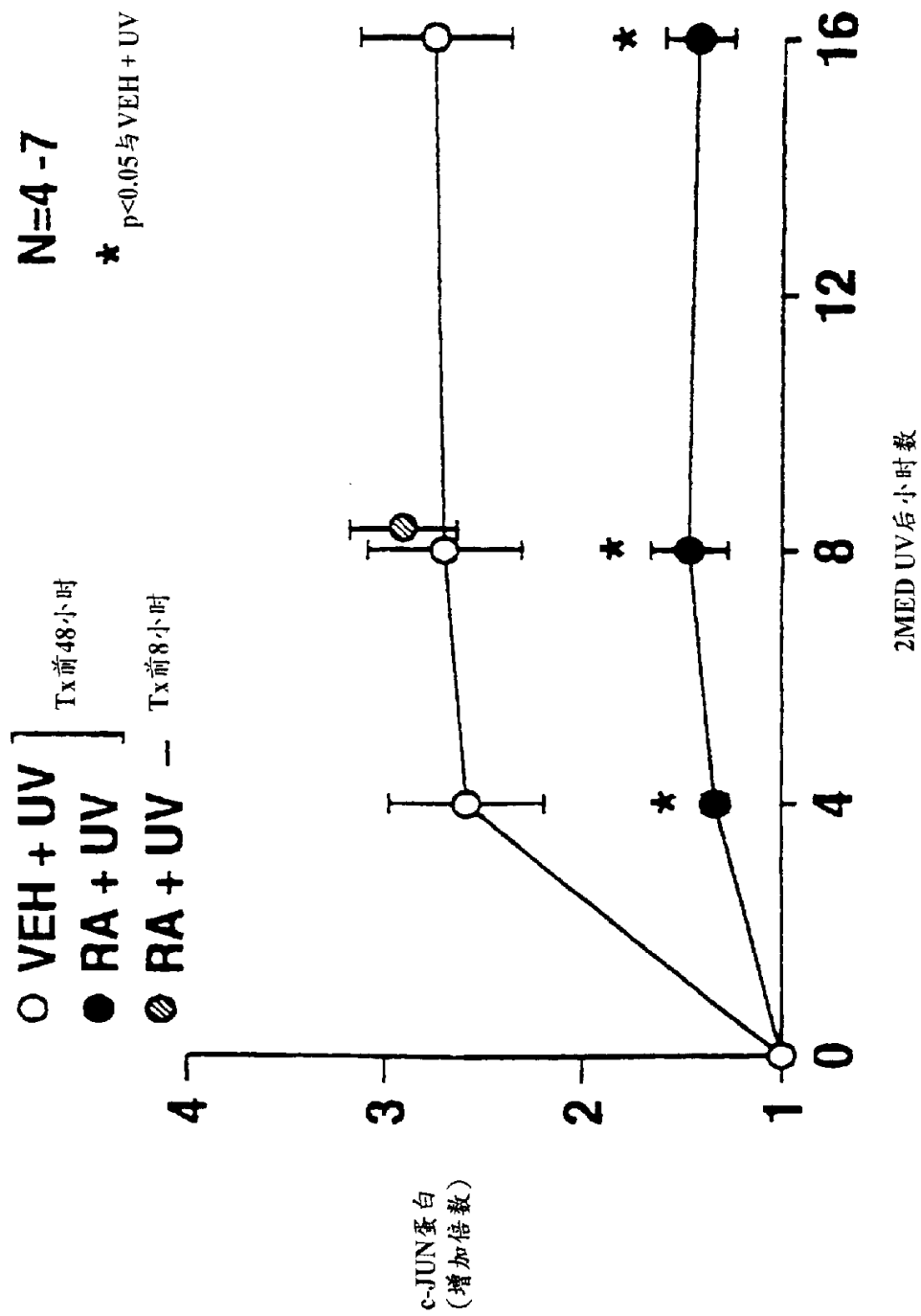


图 15B