

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824011.4

A61K 7/48

A61K 31/12

A61K 31/35

A61K 31/40

A61K 31/475

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1688285A

[22] 申请日 2003.9.5 [21] 申请号 03824011.4

[30] 优先权

[32] 2002.9.6 [33] AU [31] 2002951271

[86] 国际申请 PCT/AU2003/001152 2003.9.5

[87] 国际公布 WO2004/022023 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.8

[71] 申请人 诺沃根研究有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72] 发明人 G·E·凯利 A·哈斯班德

C·沃尔克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 5 页 说明书 13 页

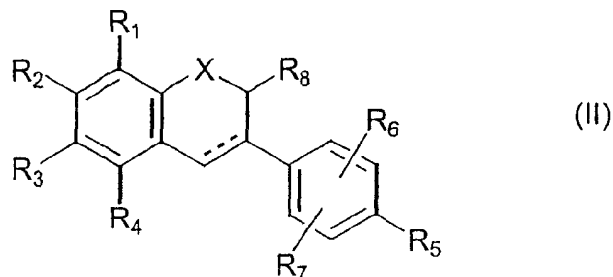
[54] 发明名称 DNA 诱变损伤的修复

[57] 摘要

本发明描述了用于保护皮肤免受 UV - 诱导的 DNA 诱变损伤的方法, 包括给予混合皮肤可接受载体的牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯和异黄烷化合物中的一种或多种。本发明还描述了用于预防皮肤癌形成的方法。

ISSN 1008-4274

1. 一种用于保护皮肤免受 UV 诱导的 DNA 诱变损伤的方法，其包括给皮肤局部施用含有混合皮肤病学可接受载体的一种或多种通式 (II) 的化合物或其药学可接受的盐或衍生物的组合：



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $OC(O)R_{10}$ 、 $OS(O)R_{10}$ 、 CHO 、 $C(O)R_{10}$ 、 $COOH$ 、 CO_2R_{10} 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷氧芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基、或卤素，或

R_3 和 R_4 是如前面所定义的，且 R_1 和 R_2 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：



R_1 和 R_2 是如前面所定义的，且 R_3 和 R_4 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：



或

R_1 和 R_2 是如前面所定义的，且 R_3 和 R_4 与和它们相连的碳原子共同形成五元环：



且

其中

R_5 、 R_6 和 R_7 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $OC(O)R_{10}$ 、 $OS(O)R_{10}$ 、 CHO 、 $C(O)R_{10}$ 、 $COOH$ 、 CO_2R_{10} 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基、或卤素，

R_8 是氢、羟基、烷基、芳基、氨基、硫代、 $NR_{11}R_{12}$ 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、 $C(O)R_{13}$ ，其中 R_{13} 是氢、烷基、芳基、芳烷基或氨基酸，或 CO_2R_{14} ，其中 R_{14} 是氢、烷基、卤代烷基、芳基或芳烷基，

R_9 是烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基、 $C(O)R_{13}$ ，其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 $Si(R_{15})_3$ ，其中每个 R_{15} 独立地是氢、烷基或芳基，

R_{10} 是氢、烷基、卤代烷基、氨基、芳基、芳烷基、氨基酸、烷氨基或二烷氨基，

R_{11} 是氢、烷基、芳烷基、烯基、芳基、氨基酸、 $C(O)R_{13}$ ，其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 CO_2R_{14} ，其中 R_{14} 是如前面所定义的，

R_{12} 是氢、烷基或芳基，或

R_{11} 和 R_{12} 与和它们相连的氮原子共同形成吡咯烷基或哌啶基，

图 “——” 代表单键或双键，优选双键，

T 独立地是氢、烷基或芳基，且

X 是 O 、 NR_{12} 或 S ，优选 O 。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述一种或多种通式 (II) 化合物包括牛尿酚和脱氢牛尿酚。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其是用于预防皮肤癌形成的方法。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中皮肤癌选自基底细胞癌、鳞状上皮细胞癌及恶性黑素瘤。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中通过增加环丁烷-嘧啶二聚物的修复率、促进金属硫蛋白的形成、和降低 p53 表达中的一种或多种来保护皮肤免受 UV-诱导的诱变损伤。

6. 根据权利要求 1-5 所述的方法，其中在 UV 照射之前、之中和/或

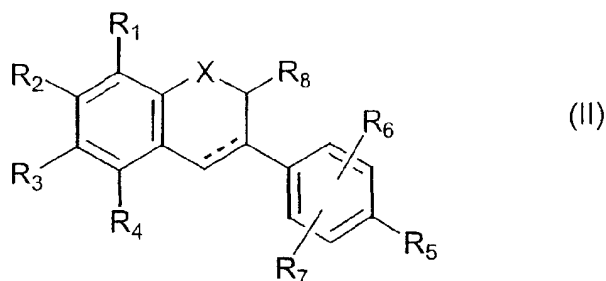
之后给予所述组合物。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中在 UV 照射之前给予所述组合物。

8. 根据权利要求 6 所述的方法，其中在 UV 照射之前和之后给予所述组合物。

9. 根据权利要求 1-8 所述的方法，其中所述组合物包含 $20\mu\text{m}$ - 500mmol 的通式 (II) 化合物。

10. 混合皮肤病学可接受载体的一种或多种通式 (II) 化合物或其药学可接受的盐或衍生物用于制备保护皮肤免受与 UV 照射有关的 DNA 诱变损伤的局部组合物的用途，



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $\text{OC(O)}R_{10}$ 、 $\text{OS(O)}R_{10}$ 、 CHO 、 $\text{C(O)}R_{10}$ 、 COOH 、 CO_2R_{10} 、 $\text{CONR}_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷氧芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基或卤素，或

R_3 和 R_4 是如前面所定义的，且 R_1 和 R_2 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：



R_1 和 R_4 是如前面所定义的，且 R_2 和 R_3 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：



或

R_1 和 R_2 是如前面所定义的, 且 R_3 和 R_4 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环:



且

其中

R_5 、 R_6 和 R_7 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $OC(O)R_{10}$ 、 $OS(O)R_{10}$ 、 CHO 、 $C(O)R_{10}$ 、 $COOH$ 、 CO_2R_{10} 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基或卤素,

R_8 是氢、羟基、烷基、芳基、氨基、硫代、 $NR_{11}R_{12}$ 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是氢、烷基、芳基、芳烷基或氨基酸, 或 CO_2R_{14} , 其中 R_{14} 是氢、烷基、卤代烷基、芳基或芳烷基,

R_9 是烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 $Si(R_{15})_3$, 其中每个 R_{15} 独立地是氢、烷基或芳基,

R_{10} 是氢、烷基、卤代烷基、氨基、芳基、芳烷基、氨基酸、烷氨基或二烷氨基,

R_{11} 是氢、烷基、芳烷基、烯基、芳基、氨基酸、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 CO_2R_{14} , 其中 R_{14} 是如前面所定义的,

R_{12} 是氢、烷基或芳基, 或

R_{11} 和 R_{12} 与和它们相连的氮原子共同形成吡咯烷基或哌啶基,

图 “---” 代表单键或双键, 优选双键,

T 独立地是氢、烷基或芳基, 且

X 是 O 、 NR_{12} 或 S , 优选 O 。

11. 根据权利要求 10 所述的用途, 其中所述一种或多种通式 (II) 化合物包括牛尿酚和脱氢牛尿酚。

12. 根据权利要求 10 所述的用途, 其是用于预防皮肤癌形成的方法。

13. 根据权利要求 12 所述的用途, 其中皮肤癌选自基底细胞癌、鳞

状上皮细胞癌及恶性黑素瘤。

14. 根据权利要求 10 所述的用途，其中通过增加环丁烷-嘧啶二聚物的修复率、促进金属硫蛋白的形成、和降低 p53 表达中的一种或多种来保护皮肤免受 DNA 诱变损伤。

15. 根据权利要求 10-14 所述的用途，其中在 UV 照射之前、之中和/或之后给予所述组合物。

16. 根据权利要求 15 所述的用途，其中在 UV 照射之前给予所述组合物。

17. 根据权利要求 15 所述的用途，其中在 UV 照射之前和之后给予所述组合物。

18. 根据权利要求 10-17 所述的用途，其中所述组合物包含 20 μ m-500mmol 的通式(II)化合物。

19. 通式(II)的化合物用于保护皮肤免受与 UV 照射有关的 DNA 诱变损伤的用途。

20. 根据权利要求 1-9 所述的方法，其中所述组合物包括化妆或防晒组合物。

21. 根据权利要求 10-19 所述的用途，其中所述组合物包括化妆或防晒组合物。

22. 一种化妆或防晒组合物，其包含与一种或多种皮肤可接受的载体或赋形剂相结合的如上文所定义的一种或多种通式(II)化合物。

23. 根据权利要求 22 所述的化妆组合物，其包含化妆或粉底组合物。

DNA 诱变损伤的修复

本发明涉及牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯和异黄烷化合物在促进 DNA 诱变损伤的修复方面的用途。

金属硫蛋白 (MT) 是应答于 DNA 损伤剂, 例如 UVR 而合成或过量表达的蛋白 (Hansen 等人, 1997)。在绝大多数动物和组织培养物的研究中, 较高剂量的辐射用于诱导 MT, 且因此, 很难推知人暴露于较低水平的 UVR 下或反复照射 UVR 的结果 (Cai 等人, 1999)。MT 的诱导合成被认为是涉及对低剂量 UVR 照射的适应反应的机理之一, 且 MT 水平的升高似乎与对 UVR 的防护有关, 很可能是通过清除皮肤中的 ROS 而介导的 (Hanada 等人, 1992)。同样, 正如在 MT-I 和 II 敲除小鼠中证实的那样, MT 涉及防止 UVR 对细胞介导的应答的免疫抑制作用 (Reeve 等人, 2000)。UVR 在角质形成细胞和皮肤成纤维细胞中诱导免疫组织化学可检测的 MT, 同时伴有 p53 的光电导, 其表明这些蛋白系统在功能方面是保护性的且有益的。UV 照射后 2 小时, 可在皮肤成纤维细胞中检测到 MT (Anstey 等人, 1996)。

牛尿酚、脱氢牛尿酚、isoflavan-3-ene 和异黄烷化合物以及用于生产它们的方法在相关的国际专利申请 PCT/AU03/00427 和 W098/08503 中描述, 它们引入此处作为参考。

UV 照射皮肤引起 DNA 损伤, 进而导致癌发生。人类最普遍的肿瘤是基底细胞癌 (BCC), 其次是鳞状上皮细胞癌 (SCC), 更少见恶性黑色素瘤。

现在本申请人已经发现, 当把本发明的化合物施用于皮肤上时, 导致皮肤、特别是被辐射皮肤的基底层中产生的金属硫蛋白升高。

如上所述, 金属硫蛋白可影响并促进 UV 照射过的被试者皮肤的 DNA 诱变损伤的修复。

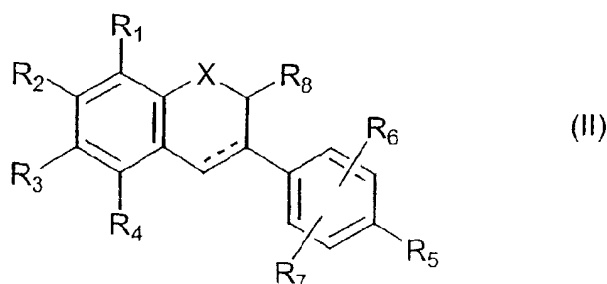
根据本发明, 提供牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯或异黄烷结构用

于保护皮肤免受与 UV 照射有关的 DNA 诱变损伤的用途。

另一方面，本发明提供牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯或异黄烷结构用于在皮肤，特别是皮肤基底层中过量表达金属硫蛋白的用途。

根据本发明另一方面，提供一种保护皮肤免受 UV 诱导的 DNA 诱变损伤的方法，其包括给皮肤施用含有混合皮肤可接受载体的牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯或异黄烷化合物中的一种或多种的组合物。

异黄 3 烯和异黄烷化合物，包括其药学可接受的盐和衍生物可由通式 (II) 代表



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $OC(O)R_{10}$ 、 $OS(O)R_{10}$ 、 CHO 、 $C(O)R_{10}$ 、 $COOH$ 、 CO_2R_{10} 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷氧芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基或卤素，或

R_3 和 R_4 是如前面所定义的，且 R_1 和 R_2 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：

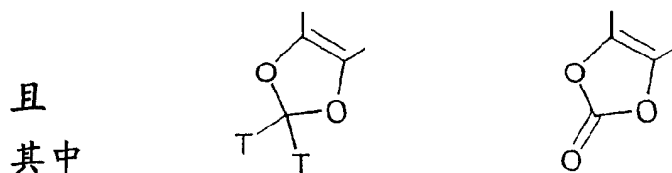


R_1 和 R_4 是如前面所定义的，且 R_2 和 R_3 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环：



或

R_1 和 R_2 是如前面所定义的, 且 R_3 和 R_4 与和它们相连的碳原子共同形成选自以下的五元环:



R_5 、 R_6 和 R_7 独立地是氢、羟基、 OR_9 、 $OC(O)R_{10}$ 、 $OS(O)R_{10}$ 、 CHO 、 $C(O)R_{10}$ 、 $COOH$ 、 CO_2R_{10} 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、烷基、卤代烷基、芳烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、硫代、烷基硫代、氨基、烷氨基、二烷氨基、硝基或卤素,

R_8 是氢、羟基、烷基、芳基、氨基、硫代、 $NR_{11}R_{12}$ 、 $CONR_{11}R_{12}$ 、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是氢、烷基、芳基、芳烷基或氨基酸、或 CO_2R_{14} , 其中 R_{14} 是氢、烷基、卤代烷基、芳基或芳烷基,

R_9 是烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 $Si(R_{15})_3$, 其中每个 R_{15} 独立地是氢、烷基或芳基,

R_{10} 是氢、烷基、卤代烷基、氨基、芳基、芳烷基、氨基酸、烷氨基或二烷氨基,

R_{11} 是氢、烷基、芳烷基、烯基、芳基、氨基酸、 $C(O)R_{13}$, 其中 R_{13} 是如前面所定义的、或 CO_2R_{14} , 其中 R_{14} 是如前面所定义的,

R_{12} 是氢、烷基或芳基, 或

R_{11} 和 R_{12} 与和它们相连的氮原子共同形成吡咯烷基或哌啶基,

图 “——” 代表单键或双键, 优选双键,

T 独立地是氢、烷基或芳基, 且

X 是 O、 NR_{12} 或 S, 优选 O。

牛尿酚与通式(II)相对应, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是氢, R_5 是羟基, X 是 O, 且 “——” 是单键。脱氢牛尿酚与通式(II)相对应, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 和 R_8 是氢, R_5 是羟基, X 是 O, 且 “——” 是双键。

皮肤可接受的载体和洗剂是本领域熟知的, 且在下列文献中描述, 例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gennaro A. 第 18 版, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, pp. 1492-1517。任何皮肤

可接受的载体均可用于本发明的组合物中。此处所用的“皮肤病学可接受的载体”是指赋形剂、稀释剂、载体，其可包括已知用于皮肤病学组合物中的助剂、添加剂、或赋形剂。本发明的组合物包括，但不限于，霜剂、软膏剂、溶液、棒状物、拭纸、洁面剂和/或凝胶。本发明的化合物可简单混合，与适宜的载体混合或掺在一起，从而产生适合施用于皮肤上的组合物。皮肤可接受的载体可包括一种或多种防晒剂。防晒剂包括通常用于阻断紫外线的那些物质。举例性的化合物包括桂皮酸盐的衍生物、PABA、和水杨酸盐。例如，可使用辛基甲氧基桂皮酸盐和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮（也称作羟苯甲酮）。辛基甲氧基桂皮酸盐和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮可商业获得，商标分别为 Parsol MCX 和 Benzophenone-3。所用防晒剂的准确量可根据所需的防止阳光中 UV 辐射的程度而定。

在优选的实施方案中，将通式(II)的一种或多种化合物配制成化妆品。化妆品的例子包括霜剂、凝胶、粉剂、糊剂、饼状物等。通常，这种化妆品可被称作“化妆品”和/或粉底（通常用于提供平滑、均一外观的皮肤并作为彩妆的基础）。

通式(II)的化合物可以 0.001%-100%、优选 0.1%-20%、最优选 0.1%-10% w/w 的量用于组合物中。例如，组合物可含有 1 μ m-500mmol、如 20 μ m-400 μ m 牛尿酚或通式(II)的其它化合物。组合物的其余部分可包含一种或多种本领域熟知的皮肤病学可接受的载体和赋形剂。组合物中可使用一种或多种化合物，特别优选牛尿酚和脱氢牛尿酚。可在阳光照射之前、之中和/或之后局部给予皮肤所述组合物。通常，剂量约 1-500mg/天，优选 2-100mg/天的剂量。

根据本发明另一方面，提供一种用于治疗、改善或预防皮肤癌，如基底细胞癌(BCC)、鳞状上皮细胞癌(SCC)及恶性黑素瘤的方法，其包括将含有通式(II)的牛尿酚、脱氢牛尿酚、或异黄 3 烯或异黄烷化合物中的一种或多种的组合物施用于被试者的皮肤上。

本发明另一方面提供一种增加皮肤中，如皮肤基底层中金属硫蛋白产生的方法，其包括将牛尿酚、脱氢牛尿酚、异黄 3 烯或异黄烷化合物

中的一种或多种结合皮肤可接受的载体施用于皮肤上。

申请人还发现本发明的化合物可促进 DNA 修复。促进 DNA 修复可以通过增加环丁烷嘧啶二聚物 (CPD) 的修复率、通过降低 p53 表达而促进 DNA 修复、和/或通过促进金属硫蛋白 (MT) 形成中的一种或多种实现的。

CPD 的形成被认为是 UV 照射的重要的致命和诱变结果 (Mitchell 等人, 1989; Liardet 等人, 2000)。动物模型已经证实了表皮 CPD 修复与皮肤癌发生之间的反函数关系 (Young 等人, 1996)。P53 蛋白 (TP53) 是在 UV 辐射导致 DNA 损伤之后表达。P53 是一种转录因子, 其阻断 G1-S 期的细胞进程, 由此防止受损 DNA 复制 (Campbell 等人, 1993)。P53 蛋白可起肿瘤促进剂的作用 (Murphey 等人, 2001)。

将参考下列非限制性实施例描述本发明。

实施例 1

牛尿酚对 CPD 诱导的作用是在受到与模拟日光的紫外线辐射 (SSUV) 的没有毛发的小鼠 (人皮肤病学研究的标准模型) 皮肤中检测的。在 SSUV 后的各个时间点, 切下背部皮肤, 在标准固定介质 (HistoChoice™, Amersco Inc, Solon, Ohio, USA) 中固定 6 小时, 处理并用石蜡包埋。嘧啶二聚物是用柠檬酸抗原恢复和 H3 抗-嘧啶二聚物抗体进行免疫组织化学检测的。以 40x 的放大倍率, 在每只小鼠的 30 个视野中人工计算二聚物-阳性细胞数。

在用 1x3MED 的 SSUV 辐射前以及辐射后, 每天施用牛尿酚洗剂 (含 20 μ M 牛尿酚) 共 7 天, 牛尿酚的作用可降低二聚物的初始诱导, 并提高它们的修复率, 这是由 24 小时时的二聚物数的降低加以证实的 (表 1)。

表 1: UV 辐射后表皮 CPD-阳性细胞的诱导

收集时间	处理	CPD+ve 细胞/线性的 cm
	正常皮肤	0
SSUV 后 1 小时	赋形剂+SSUV	300±18
	牛尿酚+SSUV	238±22
SSUV 后 24 小时	赋形剂+SSUV	340±55
	牛尿酚+SSUV	167±17

在 SSUV 照射后立即施用牛尿酚（且持续 5 天）导致辐射后第 1 天（显著降低 23%）和第二天（显著降低 42%—没有给出数据）二聚物显著降低。

在 SSUV 照射之前 7 天和之后 5 天施用牛尿酚洗剂（20 μM）时，与对照组（单独的赋形剂）相比，在照射后的第 1、24 和 48 小时，CPD 数立即显著降低（ $p < 0.05$ ；CPD 数分别降低 54%、50% 和 26%）。

实施例 2

在 UV 辐射后立即，和 4 小时和 6 小时后，将牛尿酚施用于 5 名人类志愿者的皮肤上。还使用了不含牛尿酚的对照洗剂。UV 辐射后 24 小时，采集皮肤活检样品并利用免疫组织化学测量 MT 的产生。

表 2 表示基底真皮和表面真皮中的显示 MT 阳性染色的细胞数。基底真皮中大约一半的细胞以基线水平组成型表达 MT，而在更表面的真皮层中，几乎没有细胞表达 MT。照射 2.5MED SSUV 后 24 小时，在用牛尿酚处理过的切片和用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 处理过的那些之间，MT 在真皮基层层中的表达有明显差异。在所有 5 名参与者中，MT 在用牛尿酚处理过的皮肤中的表达水平更高，差异的大小在 +4%—+21% 之间。

表 2: 治疗组 5 名人类志愿者的表皮中 MT 阳性染色的细胞比例

受试者	处理	总真皮			上层真皮			基底真皮		
		阴性	阳性	%	阴性	阳性	%	阴性	阳性	%
NO1DWH	基线	303	201	40	99	0	0	204	201	50
	10 mins	255	179	41	72	0	0	183	179	49
	DMSO	282	185	40	70	0	0	212	185	47
	牛尿酚	303	382	56	185	2	1	118	380	76
NO3PPA	基线	227	109	32	97	0	0	130	109	46
	10 mins	231	237	51	77	4	5	154	233	60
	DMSO	317	236	43	96	4	4	221	232	51
	牛尿酚	270	271	50	82	0	0	188	271	59
NO6MED	基线	420	413	50	169	0	0	251	413	62
	10 mins	437	565	56	168	1	1	269	564	68
	DMSO	440	442	50	130	6	4	310	436	58
	牛尿酚	315	539	63	76	8	10	239	531	69
N13PDO	基线	267	217	45	112	0	0	155	217	58
	10 mins	468	703	60	270	10	4	198	693	78
	DMSO	465	405	47	144	0	0	321	405	56
	牛尿酚	323	527	62	169	5	3	154	522	77
N14GBO	基线	270	127	32	113	0	0	157	127	45
	10 mins	381	242	39	247	0	0	134	242	64
	DMSO	276	217	44	111	4	3	165	213	56
	牛尿酚	225	234	51	68	1	1	157	233	60

注释: “基线”是指在照射 2.5MED SSUV 前采集的刺取活检样品的皮肤切片。

“10 分钟”是指在照射 2.5MED SSUV 后 10 分钟采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤没有用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 或 200 μ M 牛尿酚处理过。

“DMSO”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 处理过的格栅。

“牛尿酚”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用 200 μ M 牛尿酚处理过的格栅。

刚刚照射过 UV 的个体的基底和基底上角质形成细胞中 MT 免疫反应性的增加在已用牛尿酚处理过的皮肤中是最高的。

实施例 3

利用免疫组织化学测试实施例 2 中 5 名人类志愿者的皮肤活检样品的环丁烷嘧啶二聚物的形成。

表 3 给出用 CPD 抗体阳性染色的细胞数和百分比。这些数据证实了，正如所预期的，在用 2.5MED 辐射前，表皮中基本没有 CPD-阳性细胞。然而，从 UV 照射后 10 分钟的所有参与者采集的皮肤切片显示出高水平的 DNA 损伤，阳性染色的细胞比例为 36 %（参与者 N01DWH 和 N03PPA）-87 %（参与者 N14GBO）。

UV 照射后 24 小时所采集的皮肤切片显示出在所有被试者中，CPD 损伤水平均显著降低。对于 5 名参与者中的 4 名而言，与用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 处理过的皮肤切片相比，用牛尿酚洗剂处理过的皮肤切片中的 CPD-阳性细胞成比例地减少。

表 3: 治疗组 5 名人类志愿者的表皮中 CPD 阳性染色的细胞比例

受试者	处理	总真皮			上层真皮			基底真皮		
		阴性	阳性	%	阴性	阳性	%	阴性	阳性	%
N01DWH	基线	345	0	0	134	0	0	211	0	0
	10 mins	162	107	40	64	51	44	98	56	36
	DMSO	231	105	31	81	47	37	150	58	28
	牛尿酚	164	39	19	70	23	25	94	16	15
N03PPA	基线	309	0	0	104	0	0	205	0	0
	10 mins	204	191	48	56	106	65	148	85	36
	DMSO	179	25	12	55	20	27	124	5	4
	牛尿酚	349	18	5	70	17	20	279	1	0
N06MED	基线	309	0	0	90	0	0	219	0	0
	10 mins	136	364	73	19	198	91	117	166	59
	DMSO	339	65	16	112	59	35	227	6	3
	牛尿酚	279	92	25	98	71	42	181	21	10
N13PDO	基线	205	0	0	60	0	0	145	0	0
	10 mins	69	195	74	20	94	82	49	101	67
	DMSO	105	68	39	78	51	40	27	17	39
	牛尿酚	213	94	31	79	50	39	134	44	25
N14GBO	基线	255	0	0	98	0	0	157	0	0
	10 mins	34	389	92	0	157	100	34	232	87
	DMSO	240	131	35	93	69	43	147	62	30
	牛尿酚	188	85	31	63	44	41	125	41	25

注释：“基线”是指在照射 2.5MED SSUV 前采集的刺取活检样品的皮肤切片。

“10 分钟”是指在照射 2.5MED SSUV 后 10 分钟采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤没用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 或 200 μ M 牛尿酚处理过。

“DMSO”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 处理过的格栅。

“牛尿酚”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用含 200 μ M 牛尿酚的洗剂处理过的格栅。

当把所有参与者的数据汇集在一起时，可以看出用牛尿酚处理过的皮肤切片在第 24 小时的 CPD 损伤水平适度降低。

实施例 4

在 UV 辐射后，测试实施例 2 中 5 名人类志愿者的皮肤活检样品的 P53 染色。结果在表 4 中给出。

表 4：治疗组 5 名人类志愿者的表皮中 p53 阳性染色的细胞比例

受试者	处理	总真皮			上层真皮			基底真皮		
		阴性	阳性	%	阴性	阳性	%	阴性	阳性	%
NO1DWH	基线	261	0	0	115	0	0	146	0	0
	10 mins	343	1	0	154	1	1	189	0	0
	DMSO	187	12	6	79	4	5	108	8	7
	牛尿酚	270	94	26	109	48	31	161	46	22
NO3PPA	基线	274	2	1	112	1	1	162	1	1
	10 mins	316	2	1	114	2	2	202	0	0
	DMSO	223	55	20	81	31	28	142	24	14
	牛尿酚	337	87	21	165	72	30	172	15	8
NO6MED	基线	412	1	0	134	0	0	278	1	0
	10 mins	402	3	1	153	1	1	249	2	1
	DMSO	462	133	22	165	77	32	297	56	16
	牛尿酚	500	50	9	250	19	7	250	31	11
N13PDO	基线	325	0	0	141	0	0	184	0	0
	10 mins	304	0	0	140	0	0	164	0	0
	DMSO	222	45	17	109	8	7	113	37	25
	牛尿酚	287	13	4	147	4	3	140	9	6
N14GBO	基线	321	0	0	149	0	0	172	0	0
	10 mins	292	4	1	185	2	1	107	2	2
	DMSO	217	190	47	106	106	50	111	84	43
	牛尿酚	227	76	25	109	35	24	118	41	26

注释：“基线”是指在照射 2.5MED SSUV 前采集的刺取活检样品的皮肤切片。

“10 分钟”是指在照射 2.5MED SSUV 后 10 分钟采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤没用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 或 200 μ M 牛尿酚处理过。

“DMSO”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用基础洗剂（赋形剂）中的 DMSO 处理过的格栅。

“牛尿酚”是指在照射 2.5MED SSUV 后 24 小时采集的刺取活检样品的皮肤切片。该皮肤来源于用 200 μ M 牛尿酚处理过的格栅。

正如所预期的，在用 2.5MED 辐射前，在所有参与者的表皮中均基本上没有表达 p53 的细胞。类似的，与文献所述一致的是，在 UV 照射后 10 分钟，从参与者采集的皮肤切片显示可忽略不计的 p53 表达水平。

与 UV 照射后 24 小时采集的皮肤切片在所有被试者中显示明显更高的 p53 表达水平。在 5 名用牛尿酚处理过的被试者中的 4 名中，上层和/或基底表皮中的 p53 表达百分比降低。例如，与赋形剂对照组相比，在被试者 N13PD0 和 N14GB0 中，p53 染色的百分比显著降低（通常高于 50%）。

结论

在这些实验中评价的生物标记是以它们和皮肤癌的生物学相关性为基础而选择的（其与 UV-诱导的 DNA 诱变损伤直接相关）。

UV-诱导的氧化损伤现在被认为可能是皮肤癌的重要原因。MT 是具有抗-氧化性的分子，它们应答于 UV 照射而被特异性诱导。本研究发现了一致的证据，即用牛尿酚，且据信用通式(II)的其它化合物处理过的人类皮肤可较之用基础洗剂处理过的皮肤诱导更多的 MT。

CPD 是 UV 辐射后，分子损伤的最早期指示剂，且如果不被修复将导致皮肤细胞 DNA 的固定突变。因此，照射后处理的作用的其中一个机理是增加对这些损伤的修复率。这里进行的实验表明 CPD 修复可由局部施

用牛尿酚组合物及含有一种或多种通式(II)化合物的其它组合物来提高。

很明显 P53 是一种重要的调节基因，其通常在表皮皮肤癌中突变。此外，在正常皮肤细胞中，p53 在 UV 照射后被向上调节，从而防止 DNA 损伤修复前的有丝分裂。对 5 名被试者中的 4 名而言，在引起表达 p53 的上表皮或基底表皮中的细胞数降低的研究中牛尿酚可调节 p53 的表达。

在本说明书和权利要求书中，除非另有说明，词语“包含”，可理解为暗含包括规定的整体或整体的步骤或组或步骤，但不排除任何其它整体或整体的步骤或组或步骤。

本说明书中的任何现有技术的参考文献都不是，且不应被认为是澳大利亚常规知识的现有技术形式的确认或任何形式的暗示。

参考文献

- Anstey, A., R. Marks, C. Long, H. Navabi, A. Pearse, D. Wynford-Thomas and B. e. Jasani (1996). "In vivo photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation." *Journal of Pathology* 178(1): 84-8.
- Berne, B., J. Ponten and F. Ponten (1998). "Decreased p53 expression in chronically sun-exposed human skin after topical photoprotection." *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 14(5-6): 148-53.
- Cai, L., M. Satoh, C. Tohyama and M. G. Cherian (1999). "Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role." *Toxicology* 132(2-3): 85-98.
- Campbell, C., A. G. Quinn, B. Angus, P. M. Farr and J. L. Rees (1993). "Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation." *Cancer Research* 53(12): 2697-9.
- Hanada, K., T. Baba, I. Hashimoto, R. Fukui and S. Watanabe (1992). "Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress--epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals." *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 9(5): 209-13.
- Hansen, C., E. Ablett, A. Green, R. A. Stunn, I. S. Dunn, D. P. Fairlie, M. L. West and P. G. Parsons (1997). "Biphasic response of the metallothionein promoter to ultraviolet radiation in human melanoma cells." *Photochemistry & Photobiology* 65(3): 550-5.
- Liardet, S., C. Scaletta, R. Panizzon, P. Hohlfield and L. Laurent-Applegate (2001). "Protection against pyrimidine dimers, p53, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine expression in ultraviolet-irradiated human skin by sunscreens: Difference between UVB + UVA and UVA alone sunscreens." *Journal of Investigative Dermatology* 117:1437-1441.

- Mitchell, D. L. and R. S. Nairn (1989). "The biology of the (6-4) photoproduct." *Photochemistry & Photobiology* 49(6): 805-19.
- Murphy, G., A. R. Young, H. C. Wulf, D. Kulms and T. Schwarz (2001). "The molecular determinants of sunburn cell formation." *Experimental Dermatology* 10(3): 155-60.
- Ponten, F., B. Berne, Z. P. Ren, M. Nister and J. Ponten (1995). "Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages." *Journal of Investigative Dermatology* 105(3): 402-6.
- Reeve, V. E., N. Nishimura, M. Bosnic. A. E. Michalska and K. H. Choo (2000). "Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice." *Immunology* 100(3): 399-404.
- Rich, T., R. L. Allen and A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." *Nature* 407(6805): 777-83.
- Seite, S., D. Moyal, M. P. Verdier, C. Hourseau and A. Fourtanier (2000). "Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens." *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 16(1): 3-9.
- Vainio, H. and F. Bianchini, Eds. (2001). *Sunscreens*. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Young, A. R., C. A. Chadwick, G. I. Harrison, J. L. Hawk, O. Nikaido and C. S. Potten (1996). "The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II." *Journal of Investigative Dermatology* 106(6): 1307-13.