

(19)



(10)

LT 4515 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

- (11) Patent numeris: **4515**
- (51) Int. Cl.⁶: **A61K 7/40**
A61K 7/42
A61K 31/59
- (21) Paraiškos numeris: **98-091**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1998 07 09**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 02 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1999 06 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US97/00791**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1997 01 17**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 07 09**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **588771, 1996 01 19, US**
- (72) Išradėjas:
John J. Voorhees, US
Gary J. Fisher, US
- (73) Patent savininkas:
The Regents of the University of Michigan, Wolverine Tower,
3003 South State Street, Ann Arbor, Michigan 48109, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Ramunė Garšvienė, 30, Dūkštų g. 28-20, 2010 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Būdas apsaugoti odą nuo senėjimo veikiant šviesai
- (57) Referatas:

Apsaugoti nuo senėjimo veikiant šviesai dėl apspinduliavimo UVB iradiacija dar nepakenktą žmogaus odą galima naudojant agentą, kuris inhibuoja bent jau vieną iš (1) UVB iradiacijos indukuojamų metaloproteinazių (MMPs) aktyvumą odoje, (2) vieną arba du transkripcijos faktorius AP-1 ir NF-kB arba (3) mažiausiai bent jau vieną iš GTP surišimo baltymų arba kinazių, įtrauktų į jun arba fos baltymų, kurie apima AP-1, aktyvumą ir/arba gamybą; ir vietiškai vartojant minėtą inhibitorių ant odos prieš tokį apšvitinimą.

5

Technikos sritis

Šis išradimas priskiriamas apsaugos nuo šviesos sričiai. Tiksliau, išradimas
10 liečia būdą apsaugoti nepakenktą odą nuo senėjimo šviesos poveikyje naudojant
tarpląstelinės biologinės medžiagos metaloproteinazės (MMP) inhibitorių gamybą
ir/arba aktyvaciją.

15

Technikos lygis

Senėjimas šviesos poveikyje yra terminas, naudojamas nusakyti odos
išvaizdos ir funkcijos pasikeitimus kaip pasikartojančio saulės šviesos apšvitinimo
rezultatą. Saulės šviesos ultravioleto (UV) komponentas, dalinai vidurinis UV
20 (vadinamas UVB, 290-320 nm bangos ilgio) yra svarbiausias senėjimo veikiant
šviesai agentas. UVB apšvitinimo mastas, reikalingas sukelti senėjimą šviesos
poveikyje nėra tiksliai žinomas. Pakartotinas UVB apšvitinimas tokiu laipsniu, kuris
sukelia eritemą ir nugairinimą, be abejo asocijuojasi su senėjimu šviesos
poveikyje. Kliniškai, senėjimas šviesos poveikyje yra charakterizuojamas
25 sugrubimu, susiraukšlėjimu, padidėjusia pigmentacija, pageltimu, suglebimu,
telangiektazija, strazdanomis, rožiniu išbėrimu, greitu mėlynių atsiradimu, atrofija,
depigmentuotų plotelių atsiradimu, ir ypatingai ikipiktybiniais ir piktybiniais
navikais. Šviesos poveikyje dažniausiai senėja tokia oda, kuri dažniausiai yra
apšviesta saulės, tokia kaip veido, ausų, nuplikusių viršugalvio vietų, sprando ir
30 rankų.

Apsaugoti nuo senėjimo nepakenktą odą ir prižiūrėti jau paveiktą šviesos odą tinka procedūros. Paprastai užtvaros nuo saulės (užtepai) yra vietinio naudojimo preparatai, absorbuojantys, atspindintys ar išskleidantys UV. Kai kurių pagrindą sudaro dengiančiosios iš dalelių sudarytos medžiagos, tokios kaip cinko oksidas, titano oksidas, dumblas ir geležies chloridas. Kadangi šie preparatai yra matomi ir užakinantys, tai daug žmonių laiko šias dengiančiąsias kompozicijas kosmetiškai netinkamomis. Kiti užtepai nuo saulės apima chemines medžiagas, tokias kaip p-aminobenzoinė rūgštis (PABA), oksibenzonas, dioksibenzonas, etilheksil-metoksi cinamidas ir butilmetoksidibenzoilmetanas, kurios yra nedengiančiosios ir bespalvės, kadangi jos nesugeria šviesos spektro matomų bangų ilgio. Kadangi šie užtepai nuo saulės yra nedengiantys, tai jie kosmetiškai labiau tinkami, jie yra santykinai trumpalaikiai, nutrinami prausiantis ir prakaituojant. Be to, visi užtepai nuo saulės sumažina vitamino D gamybą.

Rieger, M.M., *Cosmetics and Toiletries* (1993), 108:43-56 aprašo reaktyviojo deguonies (ROS) vaidmenį UV-sukeltame odos senėjime. Šiame straipsnyje nurodoma, kad žinomų antioksidantų vietinis naudojimas gali sumažinti ROS kiekį odoje ir tuo sumažina šviesos žalą.

Retinoidai buvo panaudoti sulėtinti saulės paveiktos odos senėjimą veikiant šviesai. JAV patente Nr. 4 877 805 aprašyta, kaip šviesos poveikyje senėjančios odos priežiūrai panaudojama intervencinė terapija, kuri sumažina senėjimo dėl šviesos proceso greitį. Patente nurodyta, kad pradedamas toks gydymas iki tada, kai senėjimo procesai pradeda ryškėti. Pateikiamo išradimo pareiškėjai nežino srities, kurioje retinoidai panaudojami nepakenktos odos apsaugojimui nuo senėjimo šviesos poveikyje.

25 Metalų proteinazės (MMPs) yra fermentų šeima, kuri atlieka pagrindinį vaidmenį fiziologiškai ir patologiškai suardant jungiamąjį audinį. Virš 10 šios šeimos narių yra identifikuoti. Jie yra sužymėti numeriais (MMP-1, MMP-2 ir t.t.), o taip pat ir įprastais pavadinimais. Pasirodo, kad dalis jų struktūrinių ir funkcinių savybių yra artimos, bet skiriasi savo audinio substrato specifiškumu. Ji apima tarpaudininę kolagenazę (MMP-1) ir PMN-kolagenazę (MMP-8), kurios skaldo I, II, 30 III, VII, IX kolageno tipus ir želatiną; 72kDa (MMP-2) ir 92kDa (MMP-9) rūšies IV

kolagenazes/želatinazes, kurios skaldo IV, V, VII, X, XI kolageno tipus, želatiną, elastiną ir fibronektiną; stromeliziną-1 (MMP-3), stromeliziną-2 (MMP-10) ir stromeliziną-3 (MMP-11), kurie skaldo fibronektiną, PG pagrindo baltymą; ir metaloelastazę, kuri skaldo elastiną ir fibronektiną.

5 MMP genų ekspresija yra indukuotata transkripcijos faktorių AP-1 ir NF-B. (Angel, P. ir kt., Cell (1987), 49:729-739 ir Sato, H. ir Seiki, M., Oncogene (1993), 8:395-405). AP-1 ir NF- kB aktyvumas perduodamas per citokinus (pvz., interleukinus IL-1, IL-6 ir TNF α), augimo faktorius (TGF α , bFGF) ir aplinkos veiksnius, tokius kaip oksidantai, karštis ir ultravioletinis spinduliavimas. AP-1
10 indukcija ir jun baltymų (C-jun, jun-B ir jun-D) ir fos baltymų (C-fos, fos-B, fra-1 ir fra-2) gamyba papildo AP-1, kuris yra perduodamas per molekules-šeimininkes (pvz. RAC, CDC42, MEKK, JNKK, JNK, RAS, RAF, MEK ir ERK). Yra žinoma, kad AP-1 ir NF- B yra aktyvuoti žinduolių ląstelėse, apšviestose UV šviesa. Devary, Y., ir kt., Science (1993), 261:1442-1445. Wlashek, M., ir kt., Photochemistry and
15 Photobiology (1994), 59(5):550-556, taip pat nurodo, kad fibroblastų UV iradiacija, sąlygojama IL-1 ir IL-6-perduotos MMP-1 indukcijos ir kad tokia indukcija gali sumažinti kolageno senėjimą veikiant šviesai.

MMPs inhibitoriai arba transkripcijos faktoriai, kurie veikia jų ekspresiją, taip pat yra žinomi. Hill, P. A. ir kt., Biochem. J. (1995), 308: 167-175 aprašo du MMP
20 inhibitorius, CT1166 ir R031-7467. Gowravaram, M. R. ir kt., J. Med. Chem. (1995), 38:2570-2581 aprašo eilės hidroksamatų tobulinimą, kurie inhibuoja MMPs ir minėtus tiolius, fosfonatus, fosfinatus, fosforamidatus ir N-karboksialkilus, kaip žinomus MMP inhibitorius. Šis straipsnis nurodo, kad MMP inhibitoriai apima tas liekanas, kuriose cinko ir peptidinio fragmento chelatai suriša specifiskumą
25 apsprendžiančias MMPs nišas. Hodgson, J. Biotechnology (1995), 13:554-557 apžvelgia atskirų MMP inhibitorių, tame tarpe Galardin'o, Batimastat'o ir Marimastat'o, klinikinį būvį. Kiti MMP inhibitoriai apima butandiamidą (Conway, J.G. ir kt., J. Exp. Med. (1995), 182:449-457), TIMPs (Mauch C., ir kt., Arch. Dermatol. Res. (1994), 287:107-114), ir retinoidus (Fanjul, A. ir kt., Nature (1994),
30 372:107-111, Nicholson, R. C. ir kt., EMBO Journal (1990), 9(13) 4443-4454; ir Bailly, C. ir kt., J. Investig. Derm. (1990), 94(1:47-51).

Išradimo esmė

Siūlomas išradimas yra pagrįstas pareiškėjų atradimu, kad apšvitinimas UVB sparčiai padidina transkripcijos faktorius AP-1 ir NF- κ B neuždengtoje odoje ir skatina MMP indukciją. Padidinti MMPs lygiai, atsiradę nuo UVB apšvitinimo, ardo odos jungiamųjų audinių baltymus. Toks pakenkimas, jei nėra nukenksminamas, sąlygoja randus nuo saulės, kurie sukeliami pakartotiniu UVB apšvitinimu ir taip pat sąlygoja senėjimą šviesos poveikyje.

10 Taigi, pareiškėjai užkerta kelią nepakenktos žmogaus odos senėjimui šviesos poveikyje, kai oda apšvitinama UVB, naudojant žmogui iš anksto UVB spinduliavimo indukuojamą MMP inhibitorių, kai minima ekspozicija yra tokio kiekio, kuri gali inhibuoti ir/arba aktyvuoti UVB spinduliavimo indukuojamą MMPs. Nuostabu, kad tai atsitinka prie UVB dozių, mažesnių už tas, kurios sukelia eritemą (raudonumą), taip kaip ir prie tokių dozių, kurios sukelia eritemą.

15 Kitas išradimo aspektas yra UVB spinduliavimo indukuojamos MMP inhibitoriaus panaudojimas gamyboje medikamentų, apsaugančių nuo senėjimo šviesos poveikyje nepakenktą odą, dėl pakartotino UVB šviesos poveikio.

20

Trumpas brėžinių aprašymas

Brėžiniuose pateikta:

Fig. 1 yra schema rodanti kelius, kuriais UVB indukuoja MMP gamybą.

25 Fig. 2a-d, 3a-b, 4a-d ir 5a-e yra bandymų rezultatų grafikai, aprašyti pavyzdžiuose, infra.

Būdai, įgyvendinantys šį išradimą

30

Pateikiamas išradimas yra naudojamas sulaikyti (t.y. sumažinti ar užkirsti kelią) nepakenktos žmogaus odos senėjimą šviesos poveikyje. Šis išradimas pritaikomas prižiūrėti galvos, sprando, plaštakų ir rankų odą, kuri paprastai kiekvieną dieną būna prieinama saulės šviesai, prieš tai, kai tokia oda parodo ženklus, išduodančius senėjimą veikiant šviesai. Kadangi pakartotinas švitinimas UVB dozėmis, mažesnėmis už tas, kurios sukelia eritemą (raudonę), gali sukelti odos senėjimą, išradimas ir būtų taikomas odai su tokia nedidele apspinduliavimo doze. Tuo remiantis, UVB dozės 30-50 mJ/cm² odos intervale sąlygoja eritemą daugumai žmonių su šviesia oda. Pagal šį išradimą bus sustabdytas odos senėjimas šviesos poveikyje, kai dozės mažesnės už šį intervalą (paprastai apie 5 mJ/cm², tai yra ekvivalentiška buvimui saulėje keletą minučių).

Senėjimas veikiant šviesai yra apsaugomas arba inhibuojamas pagal šį išradimą inhibuojant UVB indukuojamą odos tarpląstelinio biologinio audinio skaldymą metalų proteinazėmis (MMPs). Tai yra pasiekama naudojant MMP inhibitorių odai, kuri yra neprisidengta nuo saulės. Ryšium su tuo, terminas "MMP inhibitorius" turi omenyje tokius agentus, kurie tiesiogiai ar netiesiogiai inhibuoja (t.y. žymiai sumažina arba eliminuoja) UVB indukuojamų MMPs ekspresijos poveikį tokioje odoje arba inhibuoja tokių MMPs fermentinį aktyvumą. "Netiesioginė inhibicija" turi omenyje arba abiejų transkripcijos faktorių AP-1 ir NF-kB tarpusavio sąveiką, ir/arba vienos ar daugiau molekulių, įtrauktų į tris kinazės kaskadas sąveiką, kuri sąlygoja jun ir fos baltymų indukciją odoje taip, kad sumažina arba eliminuoja UVB indukuojamų MMPs ekspresiją.

Fig. 1 schematiškai pavaizduota trajektorija UVB-indukuojamos MMP ekspresiją. Kaip parodyta Fig. 1, UVB buvimas generuoja reaktyviojo deguonies tarpininkus (ROI), kurie stimuliuoja AP-1 ir NF-kB aktyvumą, kurie savo ruožtu indukuoja citokinus ir augimo faktorius. Šių citokinių ir faktorių sąveika su jų receptoriais paleidžia nedidelius GTP surištus RAC/CDC42 ir RAS baltymus. Šie baltymai aktyvuoja tris kinazės kaskadas, kurios yra būtinos pagaminti jun ir fos baltymus, kurie papildo AP-1. AP-1 indukuoja tam tikrų MMPs ekspresiją. Agentai, kurie apsaugo odą nuo senėjimo šviesos poveikyje, gali veikti į MMPs, transkripcijos faktorius AP-1 ir NF-kB ir/arba viena ar daugiau molekulių, įtrauktų į

tris kinazės kaskadas, parodytas Fig. 1. Aspirinas ir E5510 (aprašytas Fujimori, T.,
 ir kt., Jpn. J. Pharmacol. (1991), 55(1):81-91) inhibuoja NF- κ B aktyvaciją.
 Farnesilo transferazės inhibitoriai, tokie kaip B-581 (aprašytas Garcia A. M., ir kt.,
 J. Biol. Chem. (1993), 268 (25): 18415-18), BZA-5B (aprašytas Dalton M. B. ir kt.,
 5 Cancer Res. (1995), 55(15): 3295-3304), farnezilo acetatas ir (α -hidroksifarnezil)
 fosfato rūgštis veikia į RAS ir inhibuoja ERK kaskados aktyvumą; taip pat geranilo-
 geraniltransferazės inhibitoriai ir lizofilinas inhibuoja JNK kaskados aktyvumą.
 Junginiai, tokie kaip SB202190 (aprašyti Lee, J. C. ir kt., Nature (1994), 372:739-
 746) ir PD98059 (aprašytas Dudley, D. T., ir kt., PNAS (USA) (1995), 92:7686-
 10 7689) inhibuoja specifines kinazes kaskadose. Retinoidai, tokie kaip aprašyti JAV
 patente Nr 4 877 805 ir disociuojantys retinoidai, kurie yra specifiški AP-1
 antagonizmui, tokie kaip aprašyti Fanjul, ir kt., Nature (1994), 372:104-110),
 gliukokortikoidai ir vitamino D3 taikiny AP-1. Kiti retinoidai, be retinolio, apima
 natūralius ir sintetinius vitamino A (retinolio) analogus, vitamino A aldehydą
 15 (retinalį), vitamino A rūgštį (retinoinę rūgštį, tame tarpe ir visas trans ir 13-cis
 retinoines rūgštis) ir kitus, aprašytus EP 379367 A2. Galų gale, MMPs gali būti
 inhibuojamos su BB2284 (aprašyta Gearing A. J. H., ir kt., Nature (1994), 370:555-
 557), GI129471 (aprašyta McGeehan G. M., ir kt., Nature (1994), 370:558-561),
 TIMPS, Galardin'u, Batimastat'u ir Marimastat'u ir hidroksamatais ir kitais
 20 žinomais inhibitoriais.

Vienas ar daugiau iš šių MMP inhibitorių yra pageidautinai vartojamas
 vietiskai ant odos, kuri yra apšviečiama saulės šviesos. Tam tinka kremai,
 drebučiai, tepalai, pulverizuojami skysčiai ar losjonai. Įprasti farmaciniai ir
 kosmetiniu požiūriu tinkami tirpikliai gali būti naudojami kaip inhibitoriai. Tokių
 25 tirpiklių pavyzdžiai yra aprašyti JAV patente Nr. 4 877 805 ir EP Pub. Nr.0586106
 A1. Kaip parodyta, vienas ar daugiau inhibitorių gali būti pritaikyti duotoje
 kompozicijoje. Pavyzdžiui, gali būti naudojama inhibitorių kombinacija, kuri
 paveikia dvi ar daugiau skirtingų molekulių, įtrauktų į odos MMP įrimą.
 Kompozicijos gali taip pat turėti priedų, tokių kaip minkštinančių medžiagų, odos
 30 pralaidumo padidinimo medžiagų, pigmentų ir kvepalų. Priedo, kompozicijos gali
 turėti ingredientų, tokių kaip absorbentų dalelės (pvz., polimerų granulės), kurios

leidžia nepertraukiamai paskleisti inhibitorius ant odos. Inhibitoriaus(-ių) masės koncentracija kompozicijoje paprastai būna nuo 0,01 % iki 10 %, dažniau nuo 0,1 % iki 1 %. Paprastai apie 50 mg šio mišinio bus sunaudota odos cm^2 .

Inhibitoriai paprastai naudojami dar nepakenktai odai apsaugoti prieš
5 apspinduliuojant saulės šviesą. Pritaikymo režimas (dienai, savaitei ir t. t.) svarbiausia priklauso nuo inhibitoriaus(-ių) ilgaamžiškumo (pvz. medžiagų apykaitos, pusperiodžio odoje) ir jų poveikio molekulėms-taikiniams. Taip pat gali būti sąlygojama maudymosi dažnumo, prakaitavimo ir buvimo saulėje trukmės. Paprastai jie naudojami kasdien.

10 Išradimas toliau iliustruojamas sekančiais pavyzdžiais. Tie pavyzdžiai nėra skirti apriboti išradimą jokia prasme.

Pavyzdžiai

15

UVB-indukuojamo senėjimo veikiant šviesai didelė UVB doze, MMPs indukcija, nustatymas molekuliniam lygį

Laikas, sąlygojantis MMP-1, MMP-3, MMP-9 ir MMP-2 mRNR, baltymo ir
20 fermentinio aktyvumo lygių pasikeitimus, po UVB apspinduliavimo, buvo nustatomas taip.

Subjektai buvo suaugę kaukaziečiai (apytikriai lygūs skaičius vyrų ir moterų) su lengva ir nedidele pigmentacija. UVB dozė, reikalinga sukelti apčiuopiamą rezultatą - odos paraudimą (minimalią eritemos dozę, arba "MED")
25 kiekvienam subjektui buvo nustatyta po 24 valandų po spinduliavimo. Vienas (1) MED visiems subjektams svyruoja nuo 30-50 mJ/cm^2 . Subjektų sėdmenys buvo apspinduliuoti 2 MED UVB su "Ultralite Panelite" lempa, sudaryta iš keturių F36T12 ERE-VHO UVB lempučių. Spinduliavimo intensyvumas buvo kontroliuojamas su IL443 Fototerapijos Radiometru ir SED240/UVB/W
30 fotodetektoriumi. UVB išėjime, išmatuotame 48 cm nuo šaltinio buvo 0,5 mW/cm^2 . Kiekvieno subjekto oda buvo atskirta keratomu nuo keturių vietų (vienos

neapspinduliuotos, trijų apspinduliuotų) po 8, 16, 24, 48 ir 72 valandų po apspinduliuavimo. Audinys buvo staigiai užšaldytas ir visa RNR izoliuota ir analizuota "Northern blot", kaip aprašyta Fisher, G. J. ir kt., J. Invest. Dermatol. (1991), 96:699-707. Juostos intensyvumai buvo nustatyti fosforiniu vaizduokliu. MMP transkriptų reikšmės buvo sunormuotos iki 36B4 kontrolinio geno. Šių bandymų rezultatai yra parodyti Fig. 2a (MMP-1), 2b (MMP-3), 2c (MMP-9) ir 2d (MMP-2). Rezultatai reiškia $\pm$ SEM ($n=6$, esant 8, 16, 48 ir 72 valandoms ir $n=17$, kai nėra UVB kontrolės ir esant 24 valandoms) ir yra pateikti kaip normalizuotų dydžių santykių su neapspinduliuota oda kompaktiškumo didėjimas. Grupės, atvaizduotos figūrose yra sudarytos iš atskirų individų.

Kaip parodyta Fig. 2a-d, MMP-1, MMP-3 ir MMP-9 mRNRs poveikis buvo maksimalus (6-60 klostės) nuo 16 iki 24 valandos ir grįžo į artimą bazinei 48-72 valandomis. MMP-2 mRNR buvo aptikta, bet tik 24 valandos po apspinduliuavimo pasiekė 1,6 klostės. Laiko sąnaudos indukuoti MMP-1 ir MMP-9 baltymus ir veikimą 2 MED UVB pagalba yra analogiškos apžvelgtoms su jų mRNRs. Nebuvo indukuotas nei MMP-2 baltymas nei aktyvumas.

UVB-paveiktos odos "Northern analizės" su MMP-3 (stromelizinas I) - specialiu zonu gauti rezultatai yra identiški tiems, kurie gauti su pilno ilgio MMP-3 zonu (Fig. 2b), tuo tarpu, kai hibridizacija su MMP-10 (stromelizinas II)-specialiu zonu neduoda jokio signalo. Tai parodo, kad iš stromelizinų UVB indukuoja daugiausia stromeliziną 1.

Žemos UVB dozės indukuojamos MMPs

Subjektai buvo spinduliuojami UVB dozėmis nuo 0,01 iki 2 MED intervale, kaip aprašyta anksčiau. Pilno odos storio pavyzdžiai (6 mm cilindrai) buvo paimti po 24 valandų po iradiacijos nuo prižiūrėtų vietų ir ne. Pavyzdžiai buvo homogenizuoti 20-tyje mM TRIS HCl (pH 7,6), 5 mM CaCl_2 , ir centrifuguoti prie 3000 x g 10 minučių. Supernatantai buvo naudojami išmatuoti MMP-1 ir MMP-9 baltymus "Western blot" metodu (100 μg /bandiniui), naudojant chemiliuminescensinį būdą ir ^3H fibrilių (plaušelių) kolageno (100 μg /bandiniui)

hidrolizės aktyvumą pagal Hu, C. L., ir kt., Anal. Biochem. (1978), 88:638-643 ir želatinos fermentografiją (20 µg/bandiniui) pagal Hibbs, M. S. ir kt., J. Biol. Chem. (1985), 260:2493-2500, atitinkamai. Panaudoti MMP-1 ir MMP-9 antikūnai yra aprašyti Werb, Z. ir kt., J. Cell. Biol. (1989), 109:877-899 ir Murphy, G. ir kt., Biochem. J. (1989), 258:463-472, atitinkamai. Šių bandymų rezultatai yra parodyti Fig. 3a ir 3b.

Fig. 3a MMP-1 baltymo reikšmės parodytos tuščia juosta, tuo tarpu MMP-1 aktyvumo reikšmės parodytos įstrižai užbrūkšniuota juosta. Fig. 3a pridėti dviejų subjektų "Western blot" atvaizdai. Didesnė 54 KDa juosta yra nepaliesiama MMP-1 ir mažesnė 45 KDa juosta yra proteolitiškai sukurta aktyvuotos MMP-1 formos.

Fig. 3b MMP-9 baltymo reikšmės parodytos tuščia juosta, kur MMP-9 aktyvumo reikšmės yra parodytos įstrižai užbrūkšniuota juosta. Fig. 3b priedas parodo "Western blot" (kairysis panelis) atvaizdą ir fermentogramos (dešinysis panelis) atvaizdą. Daugkartinės juostos fermentogramoje yra proteolitiškai sukurtos aktyvios MMP-9 formos.

Ruožo intensyvumai buvo matuoti lazeriniu densitometru. Rezultatai pateikti kaip $\pm$ SEM reikšmės, kai $n=10$.

Kaip parodyta Fig. 3a ir 3b MMP-1 ir MMP-9 baltymų indukcija ir aktyvumai dalinai buvo priklausomi, ir abiemis MMPs pokyčiai baltyme ir aktyvumas atspindi vienas kitą. MMP-1 buvo indukuota visų UVB matuotų dozių, tuo tarpu kai MMP-9 buvo indukuota $\geq 0,1$ MED dozių. Indukcija buvo maksimali esant vienai (1) MED ir apytikriai pusiau maksimali prie 0,1 MED. 0,1 MED yra ekvivalentas dviem ar trim minutėms saulės iradiacijos vasaros dieną, kas sukelia nežymų odos paraudimą.

Žemos UVB dozės indukuoti AP-1 ir NF- κ B

Subjektai buvo apšvitinti ir audinių pavyzdžiai paimti kaip aprašyta anksčiau. Branduolio ekstraktai buvo pagaminti iš pavyzdžių, kaip aprašyta Fisher, G. J., ir kt., J. Biol. Chem. (1994), 269:20629-20635. Mėginys (apytikriai 200 mg skysčio masės), turintis $\sim 10^{-8}$ ląstelių, vidutiniškai duodančių 500 µg baltymo

branduolio ekstrakto. Elektroforezinis judrumo poslinkio bandinys (8 μ g baltymo branduolio ekstrakto) buvo stebėtas panaudojant 32 P-žymėtas DNR probes, turinčias AP-1 ir NF- κ B dermę ir pakeistas DNR-surištas sekas, kaip aprašyta Fisher, G. J. ir kt., supra. Antikūnai superposlinkiams buvo gauti iš Santa Cruz Biotechnology. Jun ir fos antikūnai pasižymėjo plačiu reakingumu visiems jun ir fos šeimos nariams, atitinkamai. NF- κ B antikūnas buvo specifinis p65/Rel A. Šių bandymų rezultatai yra parodyti Fig. 4a, 4b, 4c ir 4d (NS žymi nespecifinius pavyzdžius). Šių figūrų įdėklai parodo AP-1 ir NF- κ B prailginto veikimo kompleksus. +Compet žymi 100-klosčių viršijantį perteklių nepažymėtos probės; Mut žymi pakitusią 32 P probę.

Fig. 4a atvaizduoja AP-1 ir NF- κ B surišimą neapspinduliuotoje ir apspinduliuotoje odoje (keturios valandos po 2 MED UVB). Kaip parodyta Fig. 4a surišimas abiejų transkripcijos faktorių su jų DNR svarbiais elementais buvo specifinis kaip pademonstruota netekus prailginto veikimo kompleksų su pakitusiomis žymėtomis probėmis. Antikūno superposlinkiai pademonstravo, kad specifiniai AP-1 ir NF- κ B prailginti kompleksai stebimi odos bandinyje nuo UVB apspinduliuotos odos, turinčios jun ir fos baltymus, ir Rel A baltymą, atitinkamai.

Figūros 4b ir 4c parodo AP-1 ir NF- κ B DNR surišimo indukcijos laiką, atitinkamai, naudojant 2 MED UVB. Pateikti rezultatai yra $\pm$ SEM reikšmės, kai $n=9$. Kaip parodyta, abiejų faktorių indukcija atsirado per 15 minučių.

Fig. 4d parodo AP-1 (pavaizduota atvira juosta) ir NF- κ B (pavaizduota įstrižai subrūkšniuota juosta) indukcijos priklausomybę nuo dozės. DNR surišimas buvo matuojamas 30 minučių po apspinduliuavimo. Kaip parodyta, abiejų veiksmų pusė maksimalios indukcijos įvyko prie vieno (1) MED. UVB dozės priklausomybė nuo šių faktorių indukcijos yra tamsiai susijusios su tomis, kurios aprašytos anksčiau dėl MMP-1 ir MMP-9 indukcijos, atitinkamai, su šių transkripcijos faktorių dalyvavimu UVB-indukuotame padidėjime šiose dviejose MMPs.

UVB indukcijos AP-1, MMP-1 ir MMP-9 inhibicija

0,1 % visos trans-retinoinės rūgšties (t-RA) ir jos tirpiklio (70 % etanolio ir 30 % propilenglikolio) arba 0,05 % gliukokortikoido (GC) klobetasolpropionato ir jų tirpiklio (2 % propilenglikolio plius 2 % sorbitanseskvioleato baltame petrolatume) buvo panaudota (300 mg mišinio/6 cm² odos) subjektams 48 valandas, kaip
5 aprašyta Fisher, G. J. ir kt., J. Invest. Dermatol. (1991), 96: 699-707. Paveiktos odos vietos tada buvo apspinduliuotos su 2 MED UVB. Oda buvo gaunama kaip aprašyta aukščiau, 30 minučių po apspinduliavimo išmatuotas AP-1 arba 24 valandos po apspinduliavimo, išmatuota MMP. AP-1 matavimai ir MMP-1 ir MMP-9 matavimai atlikti kaip aprašyta anksčiau. Nustatyti, ar t-RA pakeitė UVB-sukeltus
10 odos paraudimus, subjektai buvo paveikti 0,1 % t-RA ir jos tirpikliu 24 valandoms. Paveiktos vietos buvo apspinduliuotos 10-80 mJ/cm² UVB ir odos paraudimas nustatytas po 24 valandų Minolta chronometru. Šių bandymų rezultatai parodyti Fig. 5a, 5b, 5c, 5d, 5e.

Fig. 5a atspindi AP-1 matavimus. Kaip parodyta, išankstinis odos
15 patepimas t-RA sumažino t-RA UVB indukuojamą AP-1 DNR surišimą apytikriai 70 %.

Fig. 5b ir 5c atspindi MMP-1 ir MMP-9 matavimus. Kaip parodyta, prieš tai paveikus t-RA, sumažėjo UVB indukuojami MMP-1 ir MMP-9 mRNAs, baltymai ir aktyvumas 50-80 %.

20 Fig. 5d atvaizduoja t-RA bandymų rezultatus, kai oda prieš paraudimą buvo iš anksto patepta. Kaip parodyta, net jei t-RA absorbcija iš dalies uždengia UVB intervalą (t-RA λ_{max} =351 nm), t-RA nesumažina UVB indukuojamo odos paraudimo. Tai parodo, kad stebimi sumažėjimai AP-likučiuose, MMP indukcija buvo daug specifiškesnė negu UVB absorbcijos sąlygotos t-RA.

25 Fig. 5e atvaizduoja pasėkas, kai oda iš anksto patepama su GC. Kaip rodo toks poveikimas GC, tai sumažina MMP-1 ir MMP-9 aktyvumus, panašiai kaip apžvelgtame priešlaikiniame poveikime su t-RA.

Publikacijos, nukreiptos į ankstesnį aprašymą tik iliustruoja nuorodas.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

- 5 1. Būdas apsaugoti nuo senėjimo veikiant šviesai dar nepakenktą žmogaus odą dėl apspinduliavimo ultravioleto B iradiacija (UVB), b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja bent vieną iš inhibitorių a) UVB iradiacijos indukuojamų metaloproteinazių (MMPs) aktyvumą odje, b) vieną arba abu transkripcijos faktorius AP-1 ir NF-kB ir c) bent jau vieną iš GTP surišimo baltymų arba kinazių, 10 įtrauktų į jun ar fos baltymų aktyvavimą ir/arba gamybą, turinčių AP-1; ir vietiškai naudoja minėtą inhibitorių ant odos prieš apšvitinimą kiekiu, tinkamu inhibuoti UVB-indukuojamų MMPs gamybą arba aktyvumą, vieną arba abu AP-1 ir NF-kB, bent jau vieną iš GTP surišimo baltymų arba kinazių, įtrauktų į jun ir fos baltymų aktyvaciją ir/arba gamybą.
- 15 2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas būdas inhibuoja senėjimą veikiant šviesai sukeltai spinduliuojant UVB doze, mažesne už minimalią dozę, galinčią sukelti odos paraudimą.
- 20 3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta UVB dozė viršija 5 mJ/cm².
4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius inhibuoja bent vieno iš AP-1 ir NF-kB aktyvumą.
- 25 5. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius inhibuoja UVB-indukuojamų MMPs aktyvumą.
6. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius 30 inhibuoja GTP surišimo baltymą arba kinazę, įprastą jun ar fos baltymų gamyboje.

7. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius inhibuoja AP-1 ir yra retinoidas, gliukokortikoidas arba vitaminas D3.

8. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius
5 inhibuoja NF-kB ir yra gliukokortikoidas, aspirinas arba E5510.

9. Būdas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius yra TIMP, Galardin'as, Batimastat'as, Marimastat'as arba hidroksamatas.

10 10. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad inhibitorius yra farnezil-transferazės inhibitorius, geranil-geraniltransferazės inhibitorius, SB202190, arba PD93059.

11. Ultravioleto B spinduliavimo indukuojamos tarpląstelinės audinio
15 medžiagos metaloproteinazės inhibitoriaus panaudojimas gamyboje vaistų, skirtų apsaugoti dar nepakenktą žmogaus odą nuo senėjimo veikiant šviesai.

Fig. 1

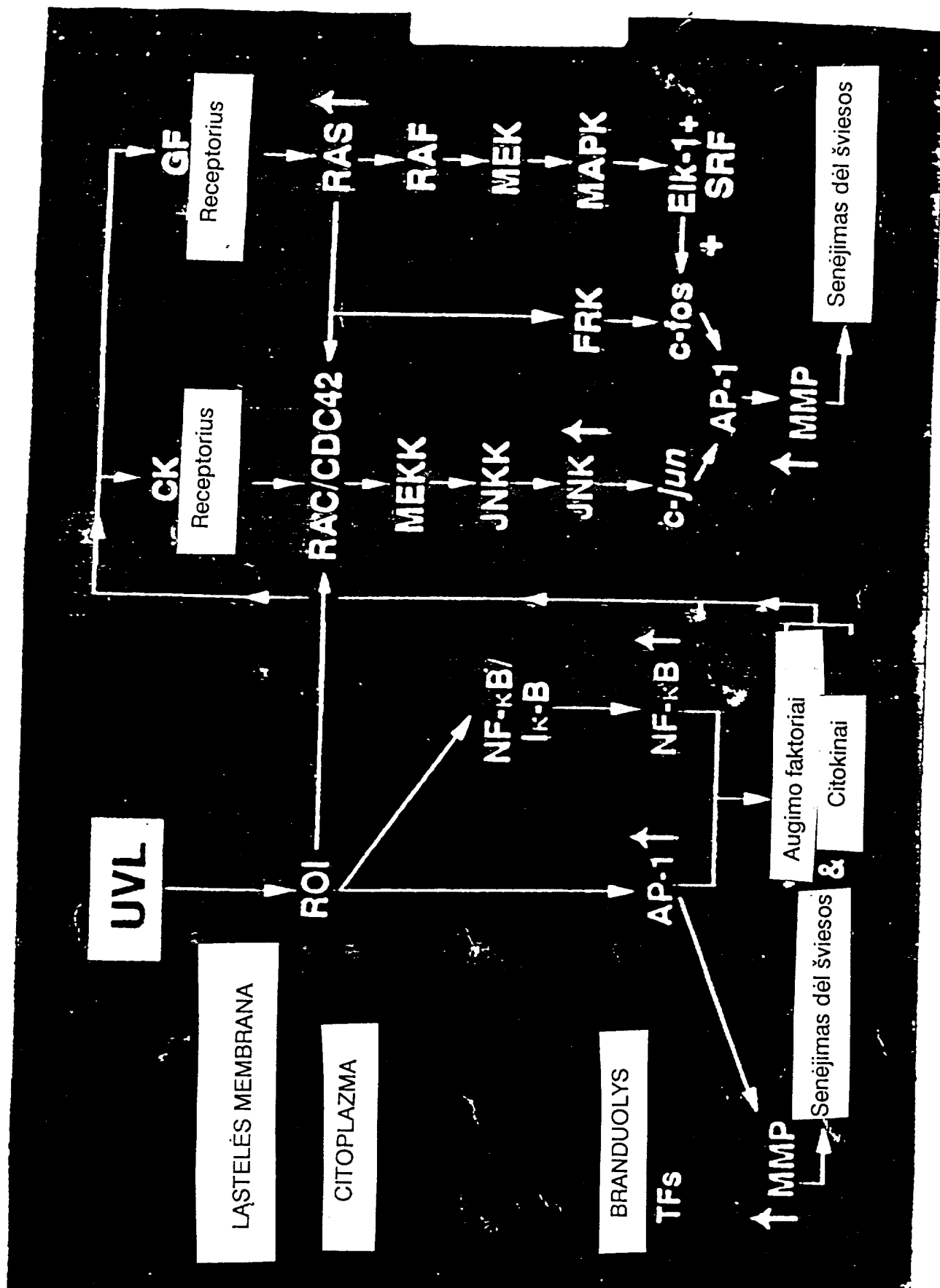
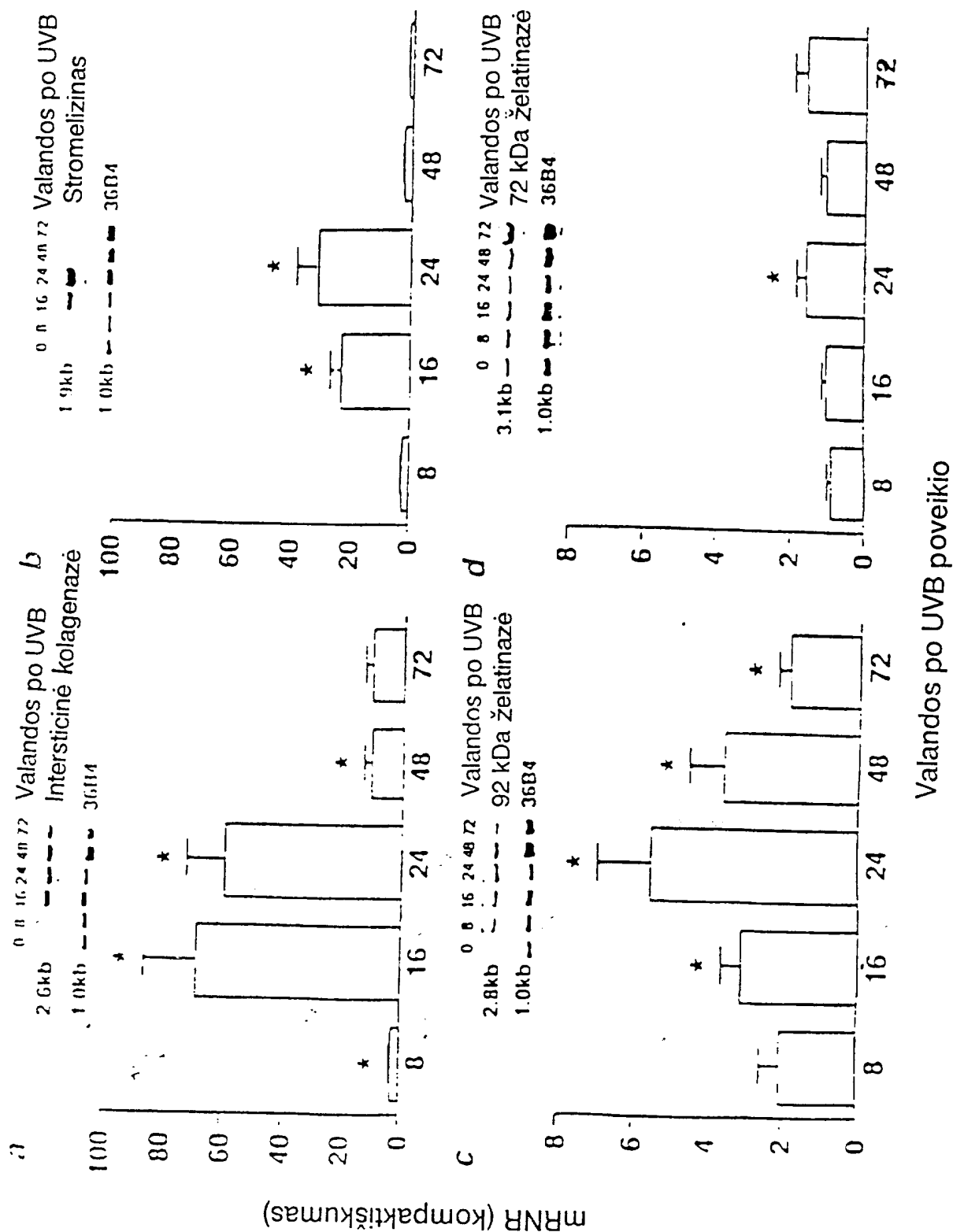


Fig. 2



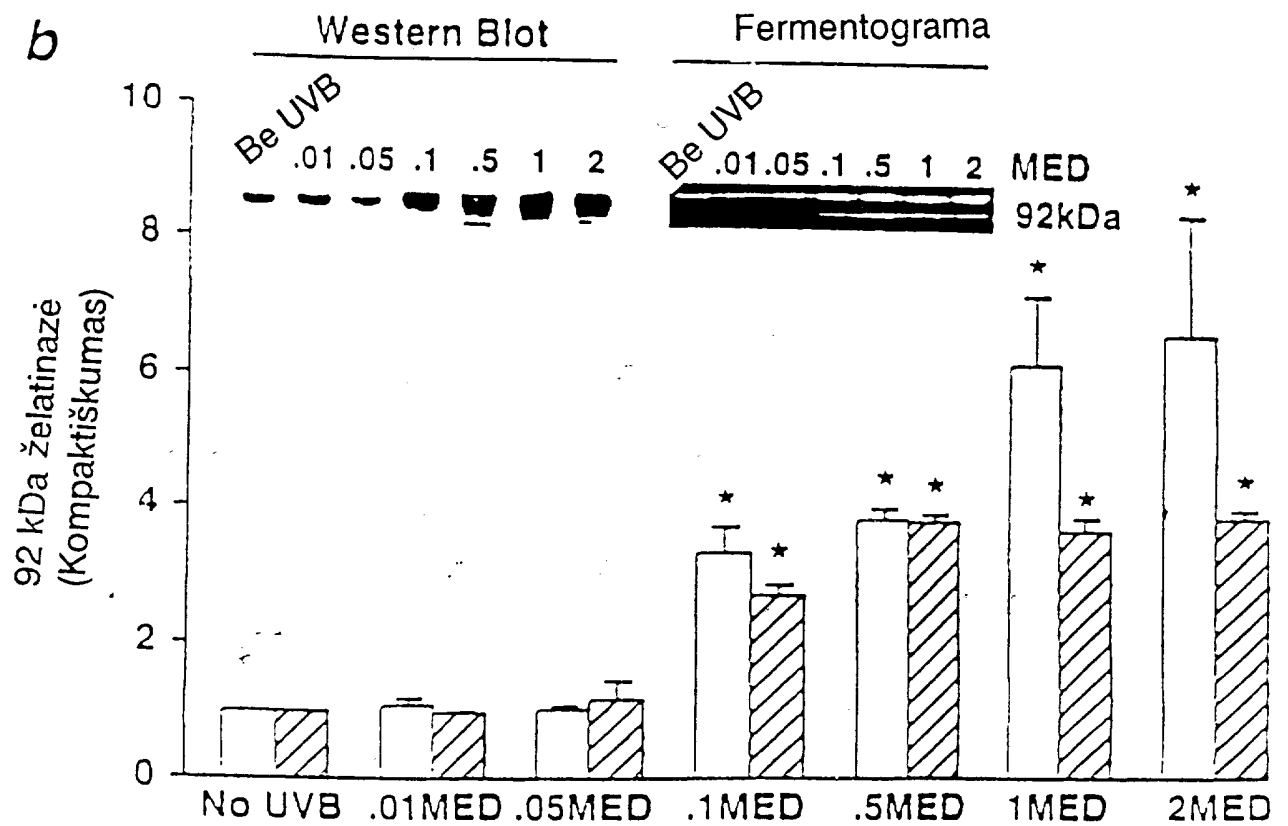
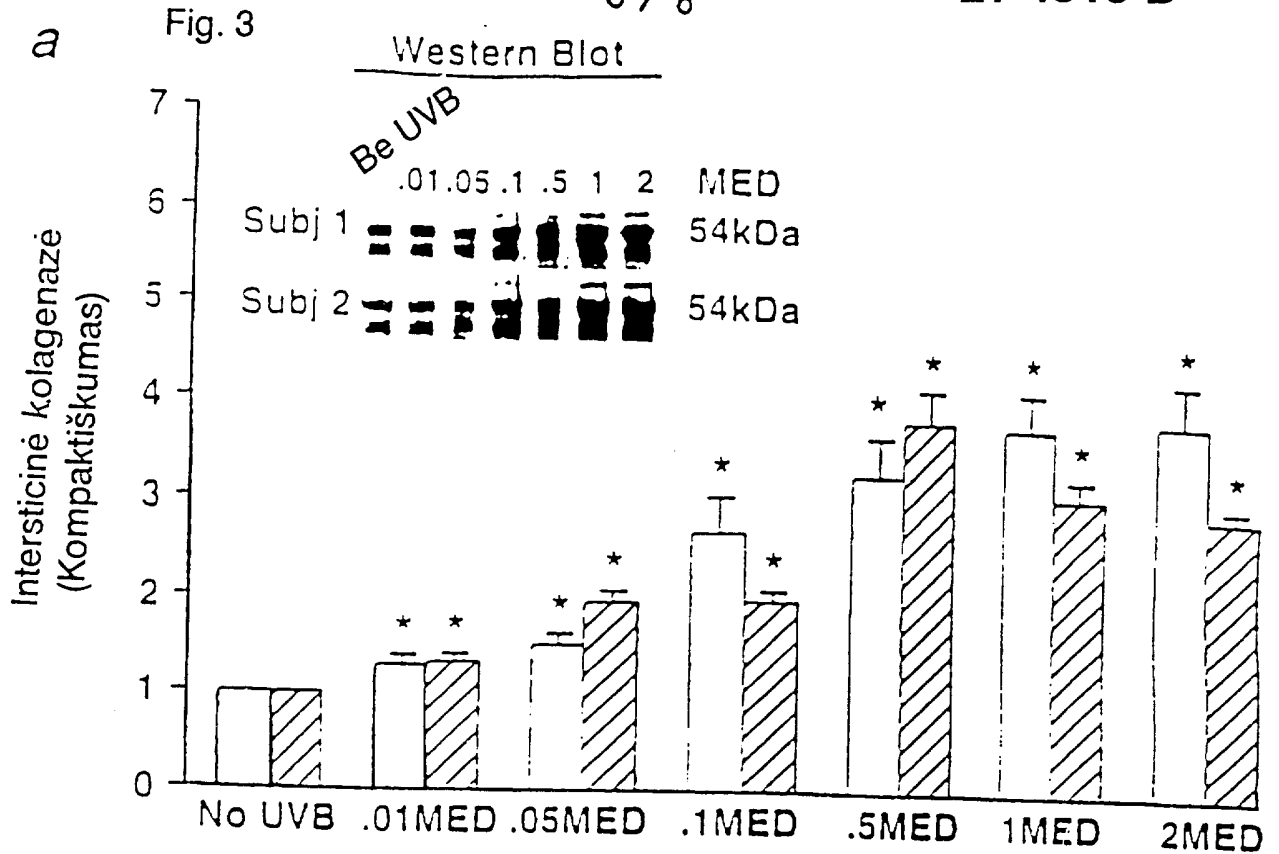


Fig. 4

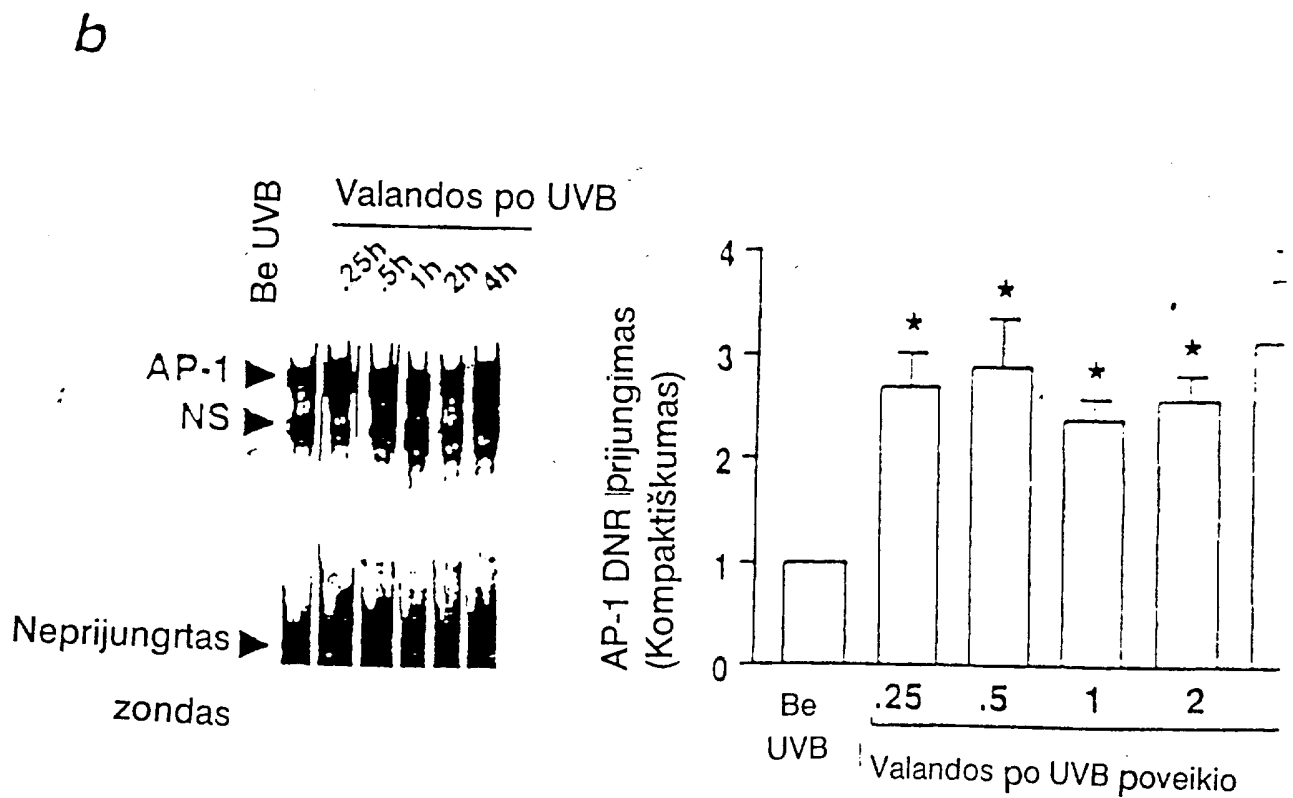
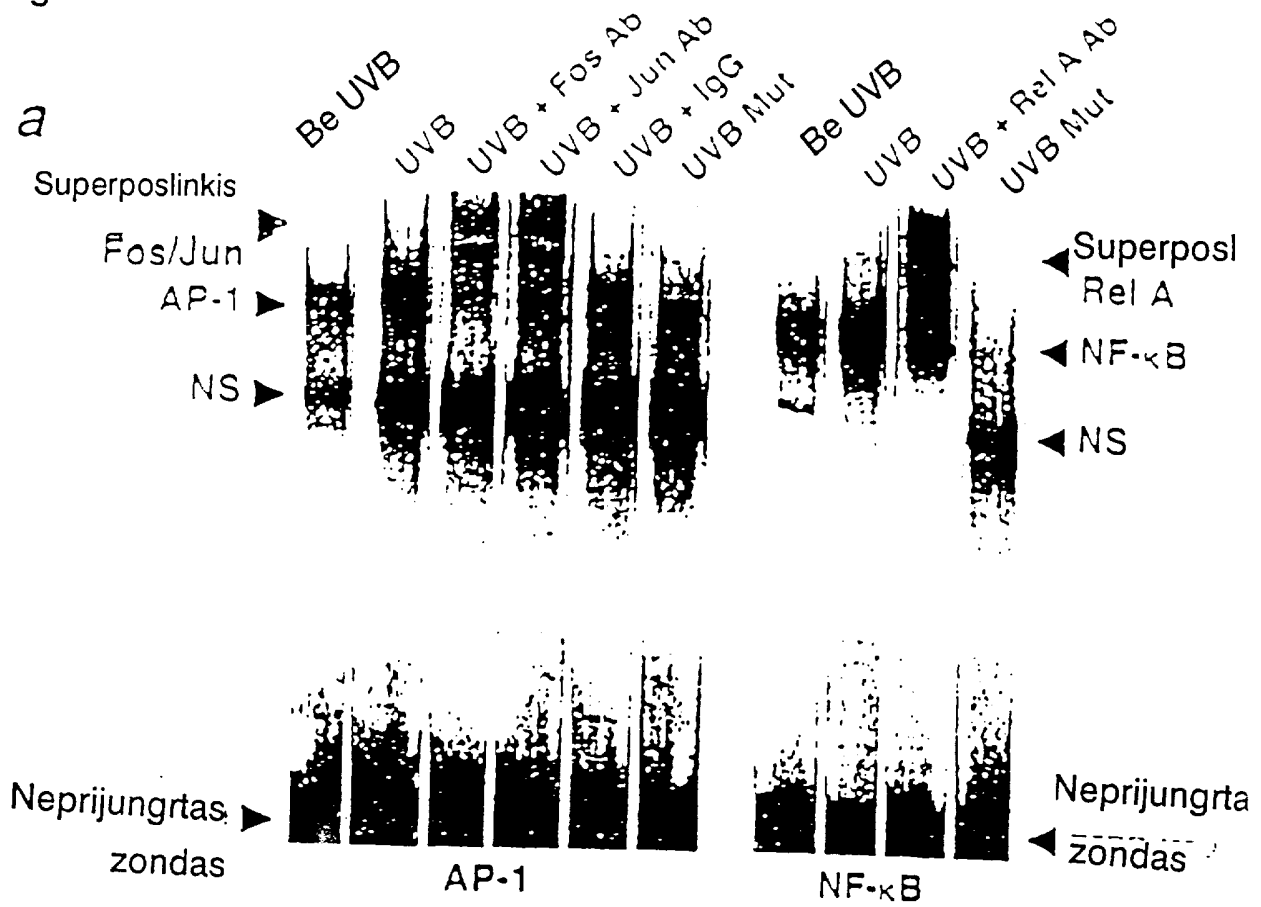


Fig. 4

5 / 8

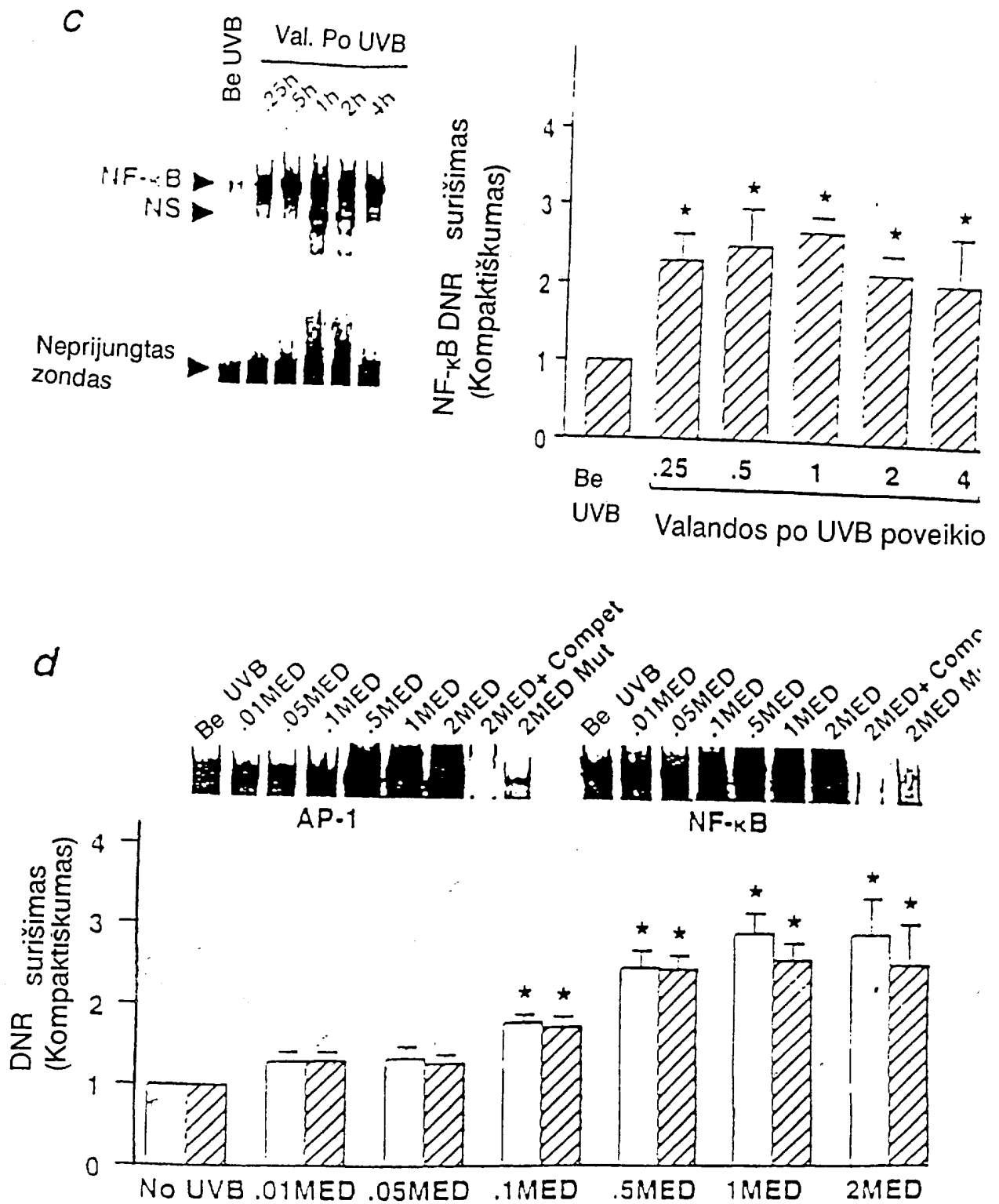


Fig. 5

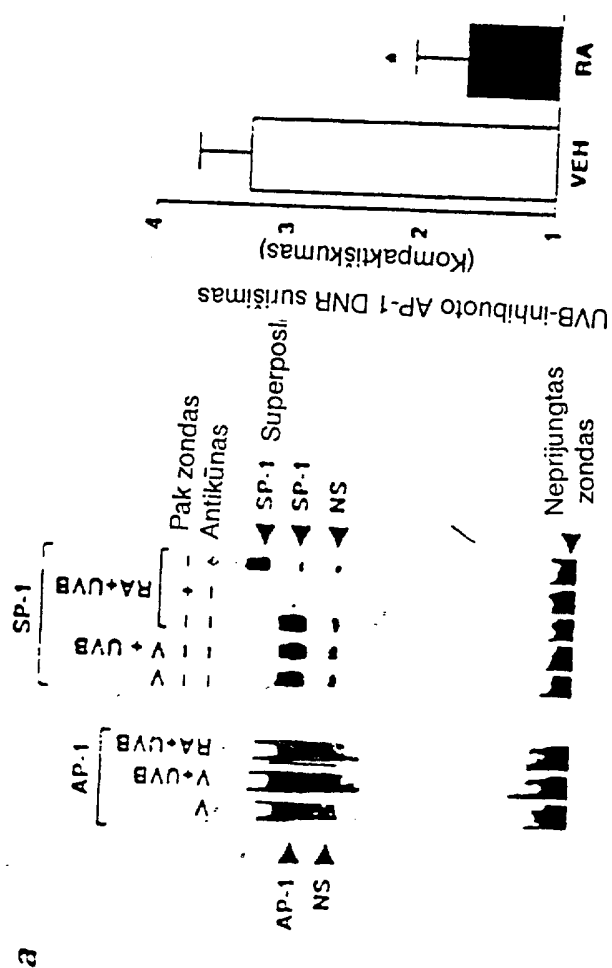


Fig. 5

7 / 8

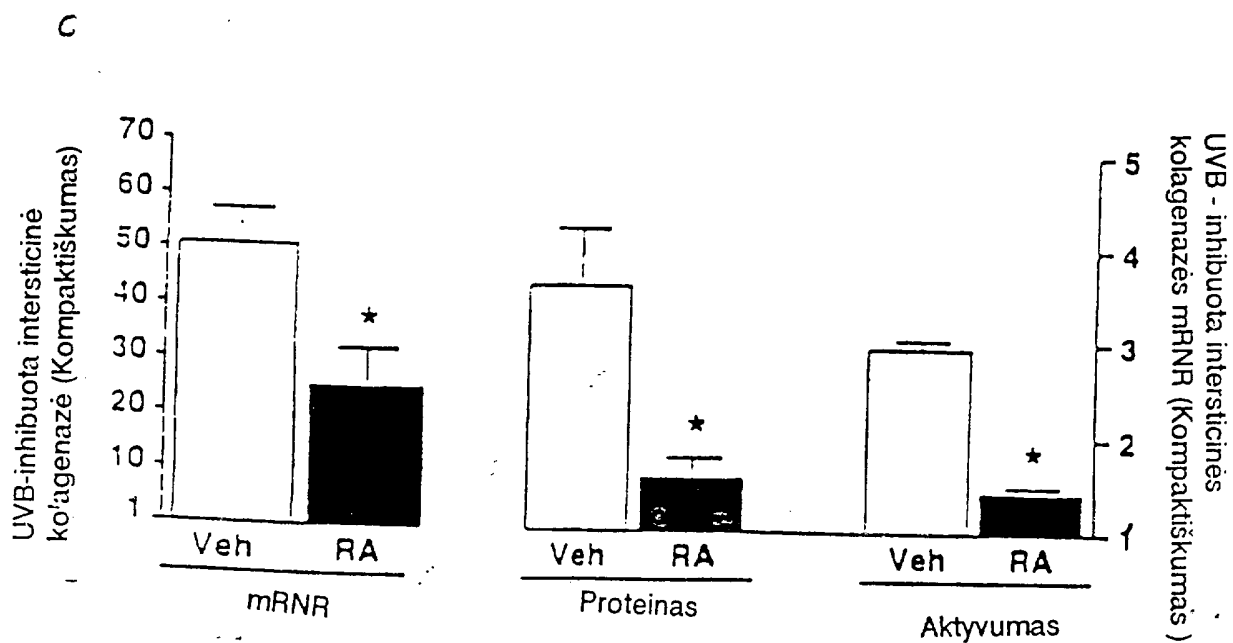
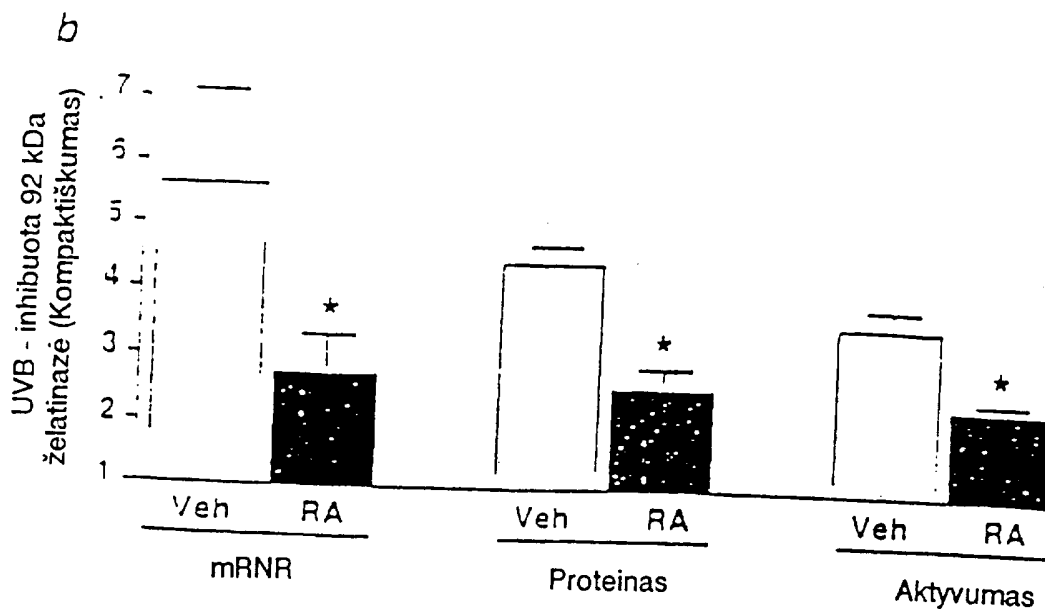


Fig. 5

