



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810842.6

[43] 公开日 2004 年 8 月 4 日

[11] 公开号 CN 1518604A

[22] 申请日 2002.5.9 [21] 申请号 02810842.6

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 9 [33] US [31] 60/289,680

[86] 国际申请 PCT/US2002/014884 2002.5.9

[87] 国际公布 WO2002/090934 英 2002.11.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.28

[71] 申请人 克利夫兰大学医院

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 B·C·琼斯 C·伯斯克

K·库奥伯 T·麦科考米克

[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 程 泳

权利要求书 12 页 说明书 29 页 附图 6 页

[54] 发明名称 用新型基因标记、与之相关的方法和
和组合物来评测皮肤的紫外辐射损伤

理试剂以及营养补充物作为具有抗光损伤和/或抗光
老化特性的材料的潜在益处。

[57] 摘要

本发明描述了用于治疗 and/或评测由于受到太阳
紫外(UV)辐射所造成的皮肤的光损伤和/或光老
化。 该方法使用一组独特的标记基因, 新近发现
这些基因的表达会在皮肤受到 UV 辐射之后而改
变。 本发明提供了一种有利的系统, 该系统用于
鉴定和评估能够调节(例如减弱)UV 辐射引起的
至少一个新近提供的皮肤中标记基因表达的改变或
变化的物质, 这种表达的改变或变化是相对于没有
受到 UV 辐射的皮肤中的基因表达水平来说的。 本
发明还提供了含有当施用于皮肤时能够在皮肤受
到 UV 辐射之后调节标记基因组中至少一个基因
的基因表达的材料组合物, 因此提供了对于光损
伤和光老化的保护和医疗效用以及治疗。 可以
用本方法来评估例如皮肤护理、头发护理、美容
和个人护

1. 包含至少一个基因的标记基因组, 所述基因是通过受到紫外辐射之后其表达水平相对于未受到紫外辐射的表达水平发生改变而鉴定的, 该标记基因组选自 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A); 移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B); Ephrin 受体; 上皮细胞激酶 (ECK); shb 原癌基因; MAD 转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2); β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3)); α 1 抗胰蛋白酶前体; Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子 (IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白); 载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白 (LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS (MRP); EB1 微管伴随蛋白; 其独特的片段; 和其组合。

2. 根据权利要求 1 所述的标记基因组, 其中在受到紫外辐射之后至少一个基因表达发生的改变包括: (i) 与对照表达水平相比较至少大约 1.5 倍的表达水平, (ii) 与对照相比较离平均值 2 个标准偏差或更多标准偏差。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的标记基因组, 其中对照包括下列中的一种或多种: (i) 在未受到紫外辐射的情况下所述至少一个标记基因的基因表达水平; 或 (ii) 在紫外辐射被阻断或减弱的情况下所述至少一个标记基因的基因表达水平。

4. 评测化合物或材料的紫外辐射保护、修复和/或医疗效用的方法, 其包括:

(a) 将皮肤或皮肤替代物与待评测的测试化合物或材料接触;

(b) 将经接触的皮肤或皮肤替代物暴露于紫外辐射源；和

(c) 与对照的基因表达水平相比较来评估在经接触的皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射之后测试化合物或材料是否能够调节一组标记基因中至少一个基因的基因表达；其中所述一个或多个标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7；Corneodesmosin；双调蛋白；粒细胞趋化蛋白；移动抑制因子 MRP8（钙粒蛋白 A）；移动抑制因子 MRP14（钙粒蛋白 B）；Ephrin 受体；上皮细胞激酶（ECK）；shb 原癌基因；MAD 转录阻抑蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂（单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂）；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂（PAI-2）； β -防卫素（人 β -防卫素 2（HBD2）和人 β -防卫素 3（HBD3））； $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子（IFR 家族）；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白（TTR）（前白蛋白）；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白（LAR）；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS（MRP）；EB1 微管伴随蛋白；和其组合；

其中测试化合物或材料相对于对照调节一组标记基因中至少一个基因的基因表达的能力表明该化合物或材料具有紫外辐射保护、修复和/或医疗效用。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中皮肤替代物选自人和非人器官型皮肤模型或者人和非人培养细胞。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其中对照包括下列中的一种或多种：(i) 未受到紫外辐射的相同或不同的皮肤或皮肤替代物；(ii) 相同或不同的皮肤或皮肤替代物，其中紫外辐射被阻断或减弱；或 (iii) 在无该化合物或材料的情况下受到紫外辐射的相同或不同的皮肤或皮肤替代物。

7. 根据权利要求 4 所述的方法，其中 (a) 的接触步骤包括将测试

化合物或材料局部施用到皮肤或皮肤替代物或者其区域上。

8. 根据权利要求4所述的方法,其中在受到紫外辐射之后皮肤或皮肤替代物的一组标记基因中至少一个基因的表达水平选自:(i)与对照表达水平相比较至少大约1.5倍,或(ii)与对照表达水平相比较离平均值大约2个标准偏差或更多标准偏差。

9. 根据权利要求4所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射的时间选自:大约5分钟至大约96小时;大约1小时至大约72小时;大约4小时至大约32小时,大约5分钟至大约48小时,或大约5分钟至大约1小时。

10. 根据权利要求4所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物暴露于最小红斑剂量(MED)的紫外辐射源中。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物暴露于大约1MED至大约4MED的最小红斑剂量(MED)的紫外辐射源。

12. 根据权利要求4所述的方法,其中评估通过选自下列的检验方法来进行:微阵列、Northern印迹法、聚合酶链反应、反向聚合酶链反应、基因表达的系列分析和差异展示。

13. 根据权利要求4所述的方法,其中按照以下条件重复这些步骤:(i)延长暴露于紫外辐射源的时间,或(ii)以不同时间暴露于紫外辐射源。

14. 通过根据权利要求4所述的方法确定的具有紫外辐射保护、修复或医疗效用的化合物或材料。

15. 具有紫外辐射保护、修复或医疗效用的化合物或材料,其中与对照的基因表达相比较该化合物或材料可在皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射之后调节一组标记基因中至少一个基因的基因表达的改变;其中一个或多个标记基因选自:Ras相关蛋白RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子MRP8(钙粒蛋白A); 移动抑制因子MRP14(钙粒蛋白B); Ephrin受体; 上皮细胞激酶(ECK); shb原癌基因; MAD转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂(单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活

物抑制剂 (PAI-2); β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3)); α 1 抗胰蛋白酶前体; Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子 (IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白); 载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白 (LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS (MRP); EB1 微管伴随蛋白; 和其组合; 并且, 其中测试化合物或材料相对于对照调节一组标记基因中所述至少一个基因的基因表达改变的能力表明该化合物或材料具有紫外辐射保护、修复和/或医疗效用。

16. 根据权利要求 14 或权利要求 15 所述的化合物或材料, 其为营养补充物。

17. 改善和/或治疗光损伤或光老化的皮肤的方法, 其包括:
将含有有效剂量的可调节一组标记基因中至少一个基因表达的材料组合物施用于皮肤或其区域并保持一段有效的时间, 其中所述标记基因的表达在皮肤受到紫外辐射之后发生改变; 以可调节一组标记基因中至少一个基因表达的有效剂量施用该组合物, 其中所述标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A); 移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B); Ephrin 受体; 上皮细胞激酶 (ECK); shb 原癌基因; MAD 转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2); β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3)); α 1 抗胰蛋白酶前体; Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子 (IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白);

载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白 (LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS (MRP); EB1 微管伴随蛋白; 和其组合。

18. 恢复和/或修复光损伤或光老化的皮肤的方法, 其包括:
将含有有效剂量的可调节一组标记基因中至少一个基因表达的材料组合物施用于皮肤或其区域并保持一段有效的时间, 其中所述标记基因的表达在皮肤受到紫外辐射之后会发生改变; 在受到紫外辐射之后以可调节一组标记基因中所述至少一个基因表达的有效剂量施用该组合物, 所述标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A); 移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B); Ephrin 受体; 上皮细胞激酶 (ECK); shb 原癌基因; MAD 转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2); β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3)); α 1 抗胰蛋白酶前体; Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子 (IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白); 载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白 (LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS (MRP); EB1 微管伴随蛋白; 和其组合。

19. 根据权利要求 17 或权利要求 18 所述的方法, 其中每天施用该组合物。

20. 根据权利要求 17 或权利要求 18 所述的方法, 其中施用该组合物 2-4 个星期。

21. 评测一种物质是否能够修复或恢复与受到紫外辐射有关的光损伤或光老化效应的方法, 其包括:

(a) 将选自皮肤或皮肤替代物的测试材料暴露于紫外辐射源，其中暴露于紫外辐射源会导致与对照相比较在受到紫外辐射之后测试材料的一组标记基因中至少一个基因的表达水平发生改变；该标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7；Corneodesmosin；双调蛋白；粒细胞趋化蛋白；移动抑制因子 MRP8(钙粒蛋白 A)；移动抑制因子 MRP14(钙粒蛋白 B)；Ephrin 受体；上皮细胞激酶 (ECK)；shb 原癌基因；MAD 转录阻抑蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2)； β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3))； α 1 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子 (IFR 家族)；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白)；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白 (LAR)；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS (MRP)；EB1 微管伴随蛋白；所述标记基因的独特亚片段；和其组合；

(b) 将待测的物质与已经暴露于紫外辐射源的测试材料接触；和

(c) 评估待测的物质是否能够调节受到紫外辐射的测试材料的一组标记基因中所述至少一个基因的表达水平，从而导致受到紫外辐射的测试材料的基因表达水平能够反映或达到对照的基因表达水平；

其中该物质调节受到紫外辐射的测试材料的一组标记基因中至少一个基因的表达水平的能力表明该物质能够在测试材料上修复或恢复紫外辐射的影响，因此可修复或恢复与受到紫外辐射相关的皮肤光损伤或光老化效应。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中皮肤替代物选自人和非人器官型皮肤模型或者人和非人培养细胞。

23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中对照包括下列中的一种或多种：(i) 未受到紫外辐射的相同或不同的皮肤或皮肤替代物；(ii)

相同或不同的皮肤或皮肤替代物,其中紫外辐射被阻断或减弱;或(iii)在无所述物质的情况下受到紫外辐射的相同或不同的皮肤或皮肤替代物。

24. 根据权利要求 21 所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射的时间选自:大约 5 分钟至大约 96 小时;大约 1 小时至大约 72 小时;大约 4 小时至大约 32 小时,大约 5 分钟至大约 48 小时,或大约 5 分钟至大约 1 小时。

25. 根据权利要求 21 所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物暴露于最小红斑剂量(MED)的紫外辐射源。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物暴露于大约 1MED 至大约 4MED 的最小红斑剂量(MED)的紫外辐射源。

27. 根据权利要求 21 所述的方法,其中皮肤或皮肤替代物暴露于大约 1MED 至大约 4MED 的最小红斑剂量(MED)的紫外辐射源,并持续大约 5 分钟至大约 48 小时。

28. 根据权利要求 21 所述的方法,其中评估通过选自下列的检验方法来进行:微阵列、Northern 印迹法、聚合酶链反应、反向聚合酶链反应、基因表达的系列分析和差异展示。

29. 根据权利要求 21 所述的方法,其中按照以下条件重复所述步骤:(i)延长暴露于紫外辐射源的时间,或(ii)以不同时间暴露于紫外辐射源。

30. 通过根据权利要求 21 所述的方法确定的具有皮肤光损伤或光老化修复或恢复效用的物质或材料。

31. 具有皮肤光损伤或光老化修复或恢复效用的物质或材料,其中该物质或材料可调节受到紫外辐射的皮肤的一组标记基因中至少一个基因的基因表达水平改变,从而导致受到紫外辐射的皮肤的基因表达水平能够反映或达到未受到紫外辐射或者阻断或减弱了所受紫外辐射的对照的基因表达水平,因此可修复或恢复与受到紫外辐射相关的皮肤光损伤或光老化效应,该组标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8(钙

粒蛋白 A)；移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B)；Ephrin 受体；上皮细胞激酶 (ECK)；shb 原癌基因；MAD 转录阻抑蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂(单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2)； β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3))； $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子 (IFR 家族)；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白)；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白 (LAR)；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS (MRP)；EB1 微管伴随蛋白；和其组合。

32. 根据权利要求 30 或权利要求 31 所述的物质或材料，其为营养补充物。

33. 含有根据权利要求 30 或权利要求 31 所述的物质或材料的组合物或制剂。

34. 光保护性或治疗性抗光损伤或抗光老化制剂，其含有通过根据权利要求 4 所述的方法确定的化合物或材料。

35. 评测在受到紫外辐射之后紫外辐射引起的皮肤或皮肤替代物损伤的方法，其包括：

(a) 评估在皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射之后一组标记基因中至少一个基因的基因表达水平，其中该标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7；Corneodesmosin；双调蛋白；粒细胞趋化蛋白；移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A)；移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B)；Ephrin 受体；上皮细胞激酶 (ECK)；shb 原癌基因；MAD 转录阻抑蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂(单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2)； β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3))； $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶前体；

Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子(IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白(TTR)(前白蛋白); 载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白(LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS(MRP); EB1 微管伴随蛋白; 这些标记基因的独特亚片段; 和其组合; 和

(b) 比较来自(a)的至少一个标记基因的表达水平和对照的表达水平, 该对照是: (i) 未受到紫外辐射, 或(ii) 其中对照所受的紫外辐射被阻断或减弱, 从而确定与对照的基因表达水平相比较至少一个标记基因的基因表达水平是否发生了改变; 其中标记基因组中所述至少一个标记基因相对于对照的表达水平改变选自: (i) 与对照表达水平相比较至少大约 1.5 倍, 或(ii) 与对照表达水平相比较偏离平均值大约 2 个标准偏差或更多标准偏差, 接着使其与紫外辐射引起的皮肤或皮肤替代物的损伤相关联。

36. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中皮肤替代物选自人和非人器官型皮肤模型或者人和非人培养细胞。

37. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中皮肤或皮肤替代物受到紫外辐射的时间选自: 大约 5 分钟至大约 96 小时; 大约 1 小时至大约 72 小时; 大约 4 小时至大约 32 小时, 大约 5 分钟至大约 48 小时, 或大约 5 分钟至大约 1 小时。

38. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中皮肤或皮肤替代物暴露于最小红斑剂量(MED) 的紫外辐射源。

39. 根据权利要求 38 所述的方法, 其中皮肤或皮肤替代物暴露于大约 1MED 至大约 4MED 的最小红斑剂量(MED) 的紫外辐射源。

40. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中皮肤或皮肤替代物暴露于大约 1MED 至大约 4MED 的最小红斑剂量(MED) 的紫外辐射源, 并持续大约 5 分钟至大约 48 小时。

41. 根据权利要求 35 所述的方法，其中该方法通过选自下列的检验方法来进行：微阵列、Northern 印迹法、聚合酶链反应、反向聚合酶链反应、基因表达的系列分析和差异展示。

42. 根据权利要求 35 所述的方法，其中按照以下条件重复所述步骤：(i) 延长暴露于紫外辐射源的时间，或(ii) 以不同时间暴露于紫外辐射源。

43. 预防光老化和/或光损伤的皮肤的方法，其包括将一种或多种成分以对于调节一组标记基因中至少一个基因的表达水平改变有效的浓度施用于皮肤，所述标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7；Corneodesmosin；双调蛋白；粒细胞趋化蛋白；移动抑制因子 MRP8(钙粒蛋白 A)；移动抑制因子 MRP14(钙粒蛋白 B)；Ephrin 受体；上皮细胞激酶(ECK)；shb 原癌基因；MAD 转录阻抑蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂(单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-2)； β -防卫素(人 β -防卫素 2(HBD2) 和人 β -防卫素 3(HBD3))； α 1 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子(IFR 家族)；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白(TTR)(前白蛋白)；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白(LAR)；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS(MRP)；和 EB1 微管伴随蛋白，其中将所述一种或多种成分以有效的一段时间施用于皮肤。

44. 根据权利要求 43 所述的方法，其中所述一段时间选自每天或者大约 1-4 个星期。

45. 根据权利要求 43 所述的方法，其中治疗、预防或改善皮肤的光老化。

46. 根据权利要求 43 所述的方法，其中治疗、预防或改善皮肤的光损伤。

47. 鉴定或筛选那些在受到紫外辐射之后容易造成皮肤光损伤或光老化或者对于皮肤光损伤或光老化高度敏感的个体的方法, 其包括:

(a) 将来自待测试或待筛选的个体的皮肤样品暴露于 UV 辐射; 和

(b) 确定与对照相比较受到 UV 辐射的皮肤内的一组标记基因中至少一个基因的表达是否发生了改变, 该对照是: (i) 未受到紫外辐射, 或 (ii) 其所受的紫外辐射被阻断或减弱; 该标记基因选自 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A); 移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B); Ephrin 受体; 上皮细胞激酶 (ECK); shb 原癌基因; MAD 转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2); β -防卫素 (人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3)); α 1 抗胰蛋白酶前体; Tristetraproline; 生长因子诱导型核蛋白 475; 干扰素调节因子 (IFR 家族); 核因子 1; hSNF2 转录激活剂; 胸腺素原; GATA3 转录因子; 组氨酸脱羧酶; 乙酰辅酶 A 结合蛋白; 核心蛋白聚糖; CD44 抗原; B94 蛋白; 运甲状腺素蛋白 (TTR) (前白蛋白); 载脂蛋白 E; 上皮网柄菌素受体; 凝血酶受体; 丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶; 白细胞抗原相关蛋白 (LAR); 细胞色素 p450 IVB1; 硫氧还蛋白过氧化物酶; 豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物, MacMARCKS (MRP); EB1 微管伴随蛋白; 所述至少一个标记基因的独特序列; 和其组合; 其中至少一个标记基因的基因表达改变的确定可将个体鉴定为容易形成皮肤的光损伤或光老化或者对于皮肤的光损伤或光老化高度敏感。

48. 用于评估物质的抗光损伤或抗光老化特性的试剂盒, 其包括: 含有选自下列至少一个的标记基因组的支持材料, 所述标记基因为 Ras 相关蛋白 RAB-7; Corneodesmosin; 双调蛋白; 粒细胞趋化蛋白; 移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A); 移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B); Ephrin 受体; 上皮细胞激酶 (ECK); shb 原癌基因; MAD 转录阻抑蛋白; 钙蛋白酶; 白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂); 胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2); β -防卫

素（人 β -防卫素 2（HBD2）和人 β -防卫素 3（HBD3））； $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子（IFR 家族）；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白（TTR）（前白蛋白）；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白（LAR）；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS（MRP）；EB1 微管伴随蛋白；所述至少一个标记基因的独特序列；和其组合；其中所述至少一个标记基因固定在支持材料上；并且所述试剂盒可选地含有核酸探针、检测标记、缓冲液、对照和使用说明。

49. 根据权利要求 48 所述的试剂盒，其中支持材料选自硝酸纤维素膜、尼龙膜、塑料薄膜或载玻片。

50. 根据权利要求 49 所述的试剂盒，其中用该试剂盒进行的检验为微阵列。

用新型基因标记、与之相关的方法和组合物 来评测皮肤的紫外辐射损伤

发明领域

本发明主要涉及人皮肤光损伤和光老化的治疗和保护。更特别地，本发明涉及使用新型基因标记来预防、治疗、改善和修复由于受到紫外（UV）辐射而引起的皮肤损伤（光损伤）。本发明进一步涉及通过使用影响一组先前未鉴定的标记基因的材料来预防、治疗、改善和恢复光老化皮肤的方法，新近发现所述标记基因的表达与皮肤受到 UV 辐射有关。本发明进一步涉及通过提供一组先前未鉴定的标记基因来评测和评估皮肤的 UV 辐射损伤的方法，新近发现所述标记基因的表达与皮肤受到 UV 辐射有关。另外，本发明涉及用于保护、改善、预防、抑制、阻滞、减少、治疗或恢复皮肤光损伤和光老化的组合物（优选地用于局部施用），尤其是由急性和慢性地受到偶然和/或直接的 UV 辐射所引起的皮肤光损伤和光老化，例如日常和长时间发生的 UV 辐射。

发明背景

日光（尤其是紫外线）损伤人的皮肤，除了带来其他不希望的效应外，还会引起光老化、免疫抑制和皮肤癌。

人的皮肤含有两个部分：浅层的外部部分（表皮）和深层的部分（真皮）。虽然最外部的表皮皮肤层一般提供了一定程度的对于身体的保护，但是表皮和真皮承受着上面所说的光损伤有害效应的冲击。天然的人的表皮主要由三种细胞类型组成，即角质细胞（最多）、黑色素细胞和朗格汉斯细胞。这些细胞类型的功能是提供人体中皮肤的基本保护作用。真皮对于表皮提供固体的和营养的支持，其主要含有成纤维细胞和主要由胶原蛋白、弹性蛋白和基质所组成的细胞外基质，这些组成细胞外基质的物质是由成纤维细胞合成的。另外，真皮含有白细胞、肥大细胞、组织巨噬细胞、血管和神经纤维。

已知太阳辐射包含紫外(UV)辐射($\lambda < 400\text{nm}$)、可见辐射($400\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$)和红外(IR)辐射($\lambda > 700\text{nm}$)。UV辐射一般分为UVA($320\text{--}400\text{nm}$)、UVB($290\text{--}320\text{nm}$)和UVC($< 290\text{nm}$)。UVC辐射一般被平流层的臭氧阻断而不能到达地球表面。正是日光的紫外(UV)成分(特别是UVA和UVB)一般被认为是光老化和光损伤的主要病因。对于人体来说,皮肤表皮是太阳辐射(尤其是UV辐射)到达的第一个目标。

对于引起人皮肤光老化和/或光损伤所需的UV辐射辐照的程度目前还不是非常的明确,虽然对于在人皮肤中引起红斑(变红)(通常以晒斑来表示)所需的数量是已知的,并可根据经验从给出的UV源以“最小红斑剂量”(MED)来定量。

皮肤受到太阳辐射(尤其是UV辐射)可能导致皮肤和皮肤内某些化合物含量的变化,由此加速了天然的皮肤老化过程。由于UV辐射而引起的加速的或过早的皮肤老化过程一般称为光老化(也称为光化性老化或皮肤日射病(dermatoheliosis))。

光老化是由于外在因素对于皮肤的作用而产生的,包括太阳辐射,尤其是UV辐射。皮肤上光老化的表型效应在临床上一般表现为弹性丧失、粗糙、斑点状色素沉着、苍白、松弛、干燥、与弹性丧失相关的粗糙外观、皮肤毛孔的变化和浅层与深层皱纹(特别是眼周围)。前恶性和恶性肿瘤常常与反复的太阳辐照和光老化相关。光老化通常发生在平常暴露在日光下的皮肤中,如脸、耳、头皮的光秃区域、颈、躯干、臂(例如前臂)、腿、足和手。

遮光剂一般用于预防暴露于日光下的皮肤区域的光损伤和光老化。遮光剂是含有吸收、反射和/或分散UV射线的成分的局部制剂。一些遮光剂基于不透明的颗粒材料,例如无机材料或者无机和有机材料的联合物,包括氧化锌、氧化钛、粘土和氯化铁,它们产生可见的保护层。其他遮光剂含有可在皮肤上产生透明的或半透明的产物的组分。含有遮光剂的化合物包括氧苯酮、磺基苯酮、二氧苯酮、邻氨基苯甲酸薄荷酯、对氨基苯甲酸(PABA)、甲氧基肉桂酸辛酯、氰双苯

丙烯酸辛酯、drometrizole trisiloxane、水杨酸辛酯、水杨酸高薄荷酯、二甲基 PABA 辛酯、TEA 水杨酸酯、二氧化钛、氧化锌、丁基甲氧基二苯甲酰甲烷、4-甲基亚苄基樟脑、辛基三嗪酮、terephthalydiene dicamphor sulfonic acid、PABA 乙酯、羟基甲基苯基苯并三唑、亚甲基双-苯并三嗪酮基四甲基丁基苯酚、双-乙基己基氧基苯酚甲氧基苯酚三嗪和上述物质的混和物，但是并不局限于此。其他合适的和有用的遮光剂活性物质包括 J.F. Grollier 等人的 U.S. 专利 5,000,937 中所公开的那些。

UV 辐射对于皮肤的外在影响的发展依赖于许多复杂的基因相互作用和反馈机制，这些通常会导致令人不愉快的或更严重的病理性表型变化，例如过早的皱纹形成和/或皮肤癌。由于技术的限制和现有方法的劳动密集性特性，先前难以确定和了解这种复杂的基因相互作用。

当前的几个用于评测 UV 引起的皮肤损伤的方法是依靠红斑（即皮肤发红）的产生和测量。从一个个体到另一个个体红斑反应具有相当大的变化，因为其依赖于个体的基因组成，包括皮肤类型、人种背景等等。此外，终点是非常主观的，并且重要的损伤如细胞损伤能够在没有可见红斑的情况下发生。

其他用于测定 UV 引起的皮肤损伤或老化的方法没有能够如本发明这样利用分子程序来鉴定和评估 UV 辐射引起的一组新近发现的基因的表达改变。另外，新近发现的基因在体内的人皮肤中显示出 UV 损伤效应，这些基因先前没有被其他方法如此进行鉴定。例如，Bernstein 等人的 U.S. 专利 6,018,098 公开了皮肤光老化的体内和体外模型，在这些模型中使用弹性蛋白启动子的报道基因来评估当受到 UV 辐射时弹性蛋白启动子报道基因的活化。Fisher 等人的 U.S. 专利 6,130,254 公开了涉及基质金属蛋白酶（MMP）的酶活化方法，从而来评估受到 UV 辐射之后的损伤。Bernerd 等人的 U.S. 专利 6,079,415 公开了用于评测在受到 A 型紫外辐射之后的皮肤损伤的方法，其中在体外皮肤等效物中测量对于 A 型 UV 引起的皮肤损伤特异的标记的变体。这种标记变体包括 I 型（或间质）胶原酶、波形蛋白分析以及细胞、核酸、蛋

白质、离子、细胞器、脂质和多糖的非特异变体。Reece 等人的 U. S. 专利 5,691,158 公开了一种组织模型即人工皮肤培养物，从而通过炎性介质（例如白细胞介素-1- α ）的诱导来测定遮光剂制剂的效能，或者通过细胞毒性检验（例如 MTT）来测定存活力。

随着分子生物学工具（尤其是微阵列分析）的出现，已经可以开始阐明复杂的基因变化和相互作用。本发明使用可以通过方便的分子工具和参数（优选地通过核酸阵列技术）来测量的新型基因标记，从而来评测由于受到 UV 辐射而产生的皮肤光损伤和/或光老化。正如此处所描述的，本发明提供了新型和有利的方法和组合物。

发明概述

本发明提供了用于评测由于太阳/UV 辐射引起的皮肤损伤（即光损伤）的方法。当在此处使用时，“UV 辐射”包括“太阳辐射”。该方法包括在受到 UV 辐射之后评估一个或多个此处鉴定和描述的基因或者其组合的基因表达和/或活性的变化或改变。根据本发明，已经确定出一组独特的和料想不到的基因以用于该方法之中，这是由于在皮肤受到 UV 辐射之后一个或多个这些基因的表达会发生改变。该方法的一个特殊的方面包括从受到 UV 辐射的皮肤源获得核酸例如 RNA，和分析检验 RNA 以确定相对于未受到 UV 辐射的皮肤是否存在有 UV 辐射引起的一个基因标记或者基因标记组合的表达改变，其中所述基因标记在受到 UV 辐射之后显示出表达改变。在本发明的这一特殊方面，RNA 的微阵列分析是优选的。

本发明的另一个方面是提供了一种方法来评测能够调节（例如减弱）或者修饰与皮肤受到 UV 辐射相关的基因表达的组合物。这种组合物包括局部施用的遮光剂、抗氧化剂、抗炎剂、美容剂（包括化妆品、营养补充物和其他内吸收的口服试剂）、抗老化制剂（例如用于细纹和/或皱纹的霜剂）、局部用试剂、皮肤渗透剂等等，但不局限于此。同样地根据本发明，对于以各种产品形式（例如经皮肤的形式，如贴剂等）配制在这种组合物中的成分、组分或化合物评测它们的光保护效用，这是通过评估它们调节或防止与皮肤受到 UV 辐射相关的基因

表达的能力来进行的。计划将这种组合物、成分、组分、化合物和/或产品用于局部和口服施用。该评测方法使用一组新型基因标记中的一个或多个基因，正如此处所描述的，发现这些基因标记在皮肤受到UV辐射之后表达会改变。

本发明的另一个方面是提供了用于测试和评测物质例如抗老化或抗光损伤制剂（如遮光剂制剂或产品，或者营养补充物）的组分或成分的新方法，从而鉴定那些具有下列性质的物质，即这些物质能够改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少或修复UV辐射引起的皮肤损伤，和/或提供对于UV辐射损伤的光保护，和/或改善、治疗和/或恢复光老化的皮肤。根据本发明，这种能够改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少、修复或恢复UV辐射引起的皮肤损伤的物质适合于用作美容剂、遮光剂、抗老化产品或皮肤学营养补充物中的成分，从而例如对于使用者（优选地对于使用者的皮肤）产生光保护和/或抗老化保护（即抗UV辐射引起的损伤的保护）。

本发明的另外一个方面是提供了一种新方法来确定正在开发的产品例如遮光剂制剂或其试制型（prototype）是否具有对于UV辐射辐照的所希望的防护水平。因此，本发明提供了一种方法来筛选用于遮光剂或抗老化组合物的所希望的阳光保护因子或其水平，这是通过测定该因子或其水平相对于对照是否能够调节包含新型标记基因组的基因中至少一个基因的表达来进行的，其中新型标记基因组的表达会由于受到UV辐射而改变。

本发明的另一个方面是提供了能够在无保护的皮肤中调节基因表达和/或恢复一组标记基因中至少一个基因的表达水平的材料，其中该组标记基因的表达在皮肤受到紫外辐射之后与对照（例如未受辐射的皮肤）相比较发生了改变。受到UV辐射会导致皮肤的光损伤和/或光老化。本发明涉及能够改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少、修复和/或恢复皮肤的光损伤，和/或能够改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少、修复或恢复皮肤的光老化的材料。在与之相关的方面，本发明也提供了含有一种或多种上面所描述的材料组合物和制剂，特

别是这些材料以能够调节或恢复至少一个此处描述的标记基因的表达的有效剂量存在。这种组合物和制剂以及其中的材料可用于针对皮肤的光损伤和光老化的治疗剂或保护剂，此处的皮肤包括无保护的皮肤、皮肤组织、其他皮肤等效物或角蛋白形成细胞。

在其另一个方面，本发明提供了用于评测化合物或组分对于皮肤的光损伤或光老化的紫外辐射保护、医疗和/或治疗效用。该方法包括将正进行评测的化合物或组分与选自皮肤或皮肤替代物（例如皮肤等效物、皮肤细胞或角蛋白形成细胞）的测试材料接触，和将测试材料暴露于紫外辐射源。其后，用本领域常用的方法来评估与对照（例如未受到 UV 辐射的测试材料）相比较，在受到紫外辐射之后化合物或组分是否能够调节测试材料的一组标记基因中至少一个基因的表达水平。

在另一个方面，本发明提供了改善或治疗光损伤或光老化皮肤的方法。特别地，本发明提供了修复光损伤皮肤或者恢复光老化皮肤的方法。该方法包括将含有调节一组标记基因中至少一个基因表达的材料组合物施用于皮肤或其区域，其中这些标记基因的表达在皮肤受到紫外辐射之后会发生改变。组合物优选地以一定的数量和时间进行局部施用，该数量和时间足以有效地在受到紫外辐射之后调节本发明的新型标记基因组中至少一个基因的表达。

根据本发明的方法，组合物和/或其中配制的活性材料当施用于皮肤并在 UV 辐射之后调节至少一个标记基因的表达水平的能力表明该组合物能够改善、治疗、修复或恢复受到 UV 辐射的光损伤或光老化皮肤。一般将组合物对于标记基因组中至少一个基因的表达的调节与至少一个对照进行比较，例如未受到 UV 辐射的皮肤或皮肤替代物中基因的表达。

本发明的另一个方面提供了含有一种或多种光保护、光治疗和/或抗光老化组分、材料或物质的组合物（优选的为美容组合物），其中一种或多种组分、材料或物质已被证明提供了光保护、光治疗或抗光老化效用，这是通过改善、抑制、阻滞、减少、预防、修复、治疗或

恢复 UV 辐射引起的皮肤损伤或老化来达到的，这些用这种组分、材料或物质调节一个或多个新近发现与受到 UV 辐射相关的标记基因的表达改变的能力进行了评估。优选地，组分、材料或物质进行的调节导致一个或多个标记基因的表达反映出或类似于未受到 UV 辐射的对照中的基因表达水平。

本发明的另外一个方面提供了包含支持物或支持材料（例如膜，更特别的为硝酸纤维素或尼龙膜）的试剂盒，这些支持物或支持材料含有一组以一定形式存在的新型基因，其中这些基因的表达在皮肤受到 UV 辐射时发生改变，并且所述一定形式对于专业人员来说适合用于鉴定具有光保护效用和/或能够改善、修复、预防、抑制、阻滞、减少、治疗或恢复由于皮肤、皮肤替代物、皮肤细胞或角蛋白形成细胞受到 UV 辐射而引起的光损伤和/或光老化的化合物、材料、试剂、成分、药剂等等。除了可以提供经鉴定的目标基因标记组来确定那些能够克服或影响 UV 辐射引起的损伤和/或老化的试剂之外，该试剂盒可包含其他对于进行该检验方法所必需的材料，包括标记探针、缓冲液、对照和使用说明，但是并不局限于此。

在另外一个方面，本发明提供了对于 UV 引起的基因表达作出响应的个体即个体亚群的鉴定，这是通过具有此处新近描述的 UV 辐射诱导的标记基因组中一个或多个标记基因的表达改变来进行鉴定的。这样的个体更容易在受到 UV 辐射后造成光损伤和光老化。这些个体可以通过用本发明的方法进行筛选而进行鉴定，它们尤其易接受包括能够调节此处描述的标记基因组中一个或多个基因表达改变的材料、成分、化合物、制剂和组合物的治疗或医疗。鉴定出的个体特别适合于 UV 辐射引起的光损伤和光老化的改善、还原、治疗、预防、修复、减少和/或恢复。

根据每一个上述的本发明的方面，标记基因组包含至少一个其表达在受到 UV 辐射之后会发生改变的基因，该标记基因组包括 Ras 相关蛋白 RAB-7；Corneodesmosin；双调蛋白；粒细胞趋化蛋白；移动抑制因子 MRP8(钙粒蛋白 A)；移动抑制因子 MRP14(钙粒蛋白 B)；Ephrin

受体；上皮细胞激酶（ECK）；shb 原癌基因；MAD 转录抑制蛋白；钙蛋白酶；白细胞弹性蛋白酶抑制剂（单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂）；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂（PAI-2）； β 防卫素（人 β -防卫素 2（HBD2）和人 β -防卫素 3（HBD3））； α 1 抗胰蛋白酶前体；Tristetraproline；生长因子诱导型核蛋白 475；干扰素调节因子（IFR 家族）；核因子 1；hSNF2 转录激活剂；胸腺素原；GATA3 转录因子；组氨酸脱羧酶；乙酰辅酶 A 结合蛋白；核心蛋白聚糖；CD44 抗原；B94 蛋白；运甲状腺素蛋白（TTR）（前白蛋白）；载脂蛋白 E；上皮网柄菌素受体；凝血酶受体；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶；白细胞抗原相关蛋白（LAR）；细胞色素 p450 IVB1；硫氧还蛋白过氧化物酶；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，MacMARCKS（MRP）；EB1 微管伴随蛋白；标记基因的独特亚片段；和其组合。

材料、化合物、组分、成分、物质或组合物相对于对照（例如未受到 UV 辐射的皮肤或者所受到的 UV 辐射已被阻断或减弱的皮肤）调节上面列出的标记基因组中至少一个基因表达水平的能力与该材料改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少和/或修复皮肤的光损伤，和/或改善、治疗、预防、抑制、阻滞、减少和/或恢复皮肤的光老化的光保护和医疗能力有关。

当连同附随的附图一起考虑时，在阅读本发明的详述之后将会更好地意识到本发明进一步的方面、特征和优点。

附图简述

图 1A 和 1B 分别表示在正常对照皮肤（图 1A）和受到 4 个最小红斑剂量单位（4MED）的 UV 辐射之后 32 小时的受到太阳刺激性辐射（SSR）的皮肤（图 1B）中的基因表达模式的 cDNA 阵列图谱。

图 2A 和 2B 显示了 log-转化的基因表达数据的散布图分析，这些数据是来自同样皮肤样品的两个不同实验的数据。每个点代表单个基因的标准化表达水平。直线表明最佳拟合回归。

图 3 表示 long-转化的基因表达数据的散布图分析，这些数据是受辐射的皮肤对正常（未受辐射的）对照的数据。每个点代表来自四

个实验的单个基因标准化表达水平的平均值。直线表明等于两个标准偏差 (± 0.35) 的置信区间。

图 4A 和 4B 显示了逆转录 PCR (RT-PCR) 的结果, 进行逆转录 PCR 是为了确认本发明所描述的基因标记人 β -防卫素 2 (HBD2) 和人 β -防卫素 3 (HBD3) 中的一个的正调节。图 4A: 人皮肤受到 SSR 之后的 HBD2 基因表达 (RNA 的 RT-PCR)。图 4B: 人皮肤受到 SSR 之后的 HBD3 基因表达 (RNA 的 RT-PCR)。

图 5A 和 5B 显示了在人皮肤受到 SSR 之后 HBD2 和 HBD3 的 RT-PCR 时间过程分析。在这些分析中, 从未受照射的皮肤和受到 4MED SSR 之后 8、24、32 或 48 小时的皮肤中取出角膜刀。从角膜刀样品中提取 RNA; 对于 HBD2 和 HBD3 进行 RT-PCR。(图 5A), (也可见实施例 1)。图 5B 中显示了标准化相对倍数增加。

发明详述

因为 UV 辐射引起的皮肤损伤的有害结果, 例如免疫抑制、光致癌作用 (例如黑素瘤) 和由于光老化造成的皱纹与弹性丧失, 所以需要在受到 UV 辐射之前以及之后预防、抑制、阻滞、减少、治疗、改善、修复和/或恢复这些结果。

本发明总体上提供了在体内太阳刺激性辐射 (SSR) (即 UV 辐射) 激发下人皮肤或皮肤细胞的独特的基因表达/调节特性。本发明已经鉴定了一组新的和料想不到的基因, 即标记基因系列, 其表达会在受到 UV 辐射之后发生改变。新近发现的基因标记组包括含有几个不同类别蛋白质分子的基因, 即细胞信号转导和细胞外通信蛋白; 细胞表面抗原和粘着受体蛋白; 生长因子, 细胞因子, 趋化因子和受体; 细胞内转导物, 效应物和调节剂; 癌基因和肿瘤抑制因子; 蛋白质抑制剂和蛋白质修饰分子; 异生素代谢和转运蛋白; 转录激活蛋白和阻抑蛋白; 基本转录因子; 细胞周期调节剂; 细胞外通信蛋白和转运蛋白; 和激酶激活剂和抑制剂。相对于至少一个未受到 UV 辐射的对照 (如皮肤、皮肤替代物或皮肤等效物) 中的基因表达, 测定该组标记基因中至少一个基因的表达改变。

特别地，基因标记组包含上述类型基因中的 35 个基因（和 Clontech Laboratories, Palo Alto, CA 提供的用于商购可得的 Clontech 微阵列的 GenBank 编号），它们的表达受到 UV 辐射辐照的影响。这 35 个基因包括下列的基因：Ras 相关蛋白 RAB-7（GenBank 编号 X93499）；Corneodesmosin（GenBank 编号 L20814）；双调蛋白（GenBank 编号 M30704）；粒细胞趋化蛋白（GenBank 编号 X78686）；移动抑制因子 MRP8（钙粒蛋白 A）（GenBank 编号 X06233）；移动抑制因子 MRP14（钙粒蛋白 B）（GenBank 编号 X06234）；Ephrin 受体（GenBank 编号 M59371）；上皮细胞激酶（ECK）（GenBank 编号 X74979）；shb 原癌基因（GenBank 编号 X75342）；MAD 转录阻抑蛋白（GenBank 编号 L06895）；钙蛋白酶（GenBank 编号 M23254）；白细胞弹性蛋白酶抑制剂（单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂）（GenBank 编号 M93056）；胎盘纤溶酶原激活物抑制剂（PAI-2）（GenBank 编号 M18082；J02685）； β 防卫素（人 β -防卫素 2（HBD2）和人 β -防卫素 3（HBD3））（GenBank 编号 Z71389）（HBD3 编号 M18661）； α 1 抗胰蛋白酶前体（GenBank 编号 X02920）；Tristetraproline（生长因子诱导型核蛋白 475）（GenBank 编号 M92843）；干扰素调节因子（IFR 家族）（GenBank 编号 U73036）；核因子 1（GenBank 编号 L31881）；hSNF2 转录激活剂（GenBank 编号 D26155）；胸腺素原（GenBank 编号 M26708）；GATA3 转录因子（GenBank 编号 X55122）；组氨酸脱羧酶（GenBank 编号 X54297）；乙酰辅酶 A 结合蛋白（GenBank 编号 M14200）；核心蛋白聚糖（GenBank 编号 M14219）；CD44 抗原（GenBank 编号 M59040）；B94 蛋白（GenBank 编号 M92357）；运甲状腺素蛋白（TTR）（前白蛋白）（GenBank 编号 K02091）；载脂蛋白 E（GenBank 编号 M12529）；上皮网柄菌素受体（GenBank 编号 X74979）；凝血酶受体（GenBank 编号 M62424）；丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶（GenBank 编号 X12646）；白细胞抗原相关蛋白（LAR）（GenBank 编号 Y00815）；细胞色素 p450 IVB1（GenBank 编号 J02871）；硫氧还蛋白过氧化物酶（GenBank 编号 U25182）；豆蔻基化的富含丙氨酸的 C 激酶底物，

MacMARCKS (MRP) (GenBank 编号 X70326); 和 EB1 微管伴随蛋白 (GenBank 编号 U24166)。

包含基因标记组的基因呈现在表 1 中, 并以其中的一般类别进行了鉴定。根据本发明, 可以使用这些基因中的一个、全部或者组合作为用于 UV 辐射引起的皮肤损伤或光老化的独特的标记或基因标记组, 这是由于在受到 UV 辐射之后它们的基因表达发生改变或变化。“改变”表示相对于未受到 UV 辐射的对照或者所受到的 UV 辐射已被阻断或减弱的对照的基因表达变化, 该变化可包括例如在受到 UV 辐射之后基因表达的正调节或负调节。如果相对于对照此处给出的基因中一个或多个基因的表达改变为至少大约 1.5 倍, 优选地为大约 2 倍, 更优选地为大约 2 倍或更大, 或者离平均值大约 2 个标准偏差 (SD) 或更大, 那么认为这种改变相对于对照是显著的。

表 1

基因类别; 基因标记	UV 辐射引起的基因 表达的变化/改变	倍数变 化
<u>细胞信号转导和细胞外通信蛋白</u>		
Ras 相关蛋白 RAB-7 (编号 X93499)	正调节	2.6
组氨酸脱羧酶 (编号 X54297)	负调节	2.8
乙酰辅酶 A 结合蛋白 (编号 M14200)	负调节	3.3
<u>细胞表面抗原和粘着受体</u>		
Corneodesmosin (编号 L20814)	正调节	2.4
核心蛋白聚糖 (编号 M14219)	负调节	3.2
CD44 抗原 (编号 M59040)	负调节	2.5
<u>生长因子, 细胞因子, 趋化因子, 受体</u>		
双调蛋白 (编号 M30704)	正调节	5.0
移动抑制因子 MRP8 (钙粒蛋白 A) (编号 X06233)	正调节	2.8
移动抑制因子 MRP14 (钙粒蛋白 B) (编号 X06234)	正调节	2.6
粒细胞趋化蛋白 (编号 X78686)	正调节	3.9
<u>细胞内转导物, 效应物, 调节剂</u>		
Ephrin 受体 (上皮细胞激酶 (ECK)) (编号 M59371)	正调节	3.5
上皮网柄菌素受体 (编号 X74979)	负调节	2.6
凝血酶受体 (编号 M62424)	负调节	3.2
<u>癌基因和肿瘤抑制因子</u>		
shb 原癌基因 (编号 X75342)	正调节	2.3
MAD 蛋白 (编号 L06895)	正调节	2.4
EB1 蛋白 (编号 U24166)	正调节	2.3
<u>蛋白质抑制剂和蛋白质修饰分子</u>		
钙蛋白酶 (编号 M23254)	正调节	2.8
白细胞弹性蛋白酶抑制剂 (单核细胞/嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂) (编号 M93056)	正调节	6.9
胎盘纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-2) (编号 M18082, J02685)	正调节	5.1
α 1 抗胰蛋白酶前体 (编号 X02920)	正调节	2.3
丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶 (编号 X12646)	负调节	2.4
白细胞抗原相关蛋白 (LAR) (编号 Y00815)	负调节	3.3
<u>异生素代谢和转运蛋白</u>		
β 防卫素 (HBD2; HBD3) (编号 Z71389)	正调节	21.4
细胞色素 p450 IVB1 (编号 J02871)	负调节	3.5
硫氧还蛋白过氧化物酶 (编号 U25182)	负调节	3.7

<u>转录激活蛋白和阻抑蛋白</u>		
Tristetraproline(生长因子诱导型核蛋白475)(编号 M92843)	正调节	2.7
干扰素调节因子(IRF家族)(编号 U73036)	正调节	2.3
<u>基本转录因子</u>		
核因子1(编号 L31881)	负调节	2.3
hSNF2 转录激活剂(编号 D26155)	负调节	2.5
<u>细胞周期调节剂</u>		
胸腺素原(编号 M26708)	负调节	2.5
GATA3 转录因子(编号 X55122)	负调节	3.6
<u>细胞外通信蛋白和转运蛋白</u>		
B94 蛋白(编号 M92357)	负调节	2.3
运甲状腺素蛋白(TTR)(前白蛋白)(编号 K02091)	负调节	3.2
载脂蛋白 E(编号 M12529)	负调节	5.0
<u>激酶激活剂和抑制剂</u>		
MacMARCKS(MRP)(编号 X70326)	正调节	2.1

本发明的一个实施方案包含评测皮肤所受 UV 辐射的损伤的方法。该方法包括用紫外线照射皮肤、器官型皮肤模型(包括人和非人的动物皮肤)、皮肤等效物、人或非人的培育细胞或者角蛋白形成细胞(例如来自皮肤、头发和甲的细胞);用本领域已知和常用的方法分离核酸(优选的为 RNA);和评测分离出的核酸(优选的为 RNA)以确定一个或多个表 1 中给出的基因的表达水平是否发生了变化或改变(见实施例 1)。

根据本发明方法,将皮肤(例如皮肤活检组织或皮肤角膜刀)、器官型皮肤模型或培养细胞暴露于 UV 辐射或 UV 辐射源并保持给定的时间。受到 UV 辐射的时间由专业人员根据正经受辐照的个体的 MED 值

来确定。一般而言，对于细胞和组织等效物的 UV 辐照小于或大约为 6 J/cm^2 。在其中的一个方面，体内皮肤源的使用有利地提供了一种样品，该样品含有有助于皮肤中 UV 引起的基因表达的那些皮肤组分，如脉管系统和在体内迁移入皮肤中的全套真皮细胞与炎性细胞。

适合于在该方法中使用的培养皮肤细胞的非限制性例子包括初级分离细胞和所建立的表皮和真皮类型细胞系，如角质细胞、真皮成纤维细胞、朗格汉斯细胞、黑色素细胞、肥大细胞、内皮细胞、sebocyte、毛乳头与基质细胞以及甲基质细胞，但是并不局限于此。这样的细胞的来源包括美国典型培养物保藏中心（ATCC）（Manassas, VA）；和细胞/组织库，如 Clonetics/BioWhittaker（San Diego, CA）或 Cascade Biologics 公司（Portland, OR），但是并不局限于此。组织等效物可从组织工程公司获得，如 Organogenesis 公司（Canton, MA）、MatTek 公司（Ashland, MA）和 Skinethic 公司（Nice, 法国）。新鲜的细胞可从人皮肤或者其他哺乳动物的活检组织获得。其他的皮肤细胞系也可从上述来源的其他哺乳动物获得。

在受到 UV 辐射之后，基因表达可以用多种分子程序评测一次或多次，这些分子程序用于分析从皮肤、皮肤替代物、皮肤等效物、角蛋白形成细胞或培养细胞分离出的核酸或多核苷酸，例如 DNA、RNA、cDNA。作为指导，UV 辐射对于一个或多个基因标记的影响的评测可以在受到 UV 辐射之后几分钟至几小时至几天进行，其包括大约 5 分钟至大约 96 小时，优选地为大约 1 小时至大约 72 小时，更优选地为大约 4 小时至大约 32 小时，但是并不局限于此。

在皮肤、皮肤替代物或培养细胞受到 UV 辐射之后，相对于此处所描述的一个或多个对照（未受到 UV 辐射），UV 辐射引起的新近提供的基因标记中一个或多于一个基因（即组合）的表达改变可以用许多本领域技术人员常用的合适的分子技术和程序来测量。例如，基因表达可以通过测定受到 UV 照射的皮肤、皮肤替代物或培养细胞的 RNA 水平来测量，RNA 水平的测定可用本领域常用的技术来进行，例如 Northern 印迹技术和 PCR，如“实时”PCR 和逆转录 PCR（RT PCR）。

(见例如 J. Sambrook 等人, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约; R. Higuchi 等人, 1992, *Biotechnology*, 10:413-417; R. Higuchi 等人, 1993, *Biotechnology*, 11:1026-1030; E. S. Kawasaki, 1990, “RNA 的扩增”(Amplification of RNA), *RNA Protocols: A Guide to Methods & Applications*, M. A. Innis 等人, Academic 出版社, San Diego, CA, pp. 21-27)。另外, 皮肤、皮肤替代物或培养细胞中的基因表达可以用下列方法进行评测, 即基因 (cDNA) 阵列 (含有膜、玻璃或塑料支持材料的微阵列或核酸基因芯片测试阵列)、基因表达系列分析 (SAGE) (例如由 V.E. Velculescu 等人, 1995, *Science*, 270(5235):484-487; A. Lal 等人, 1999, *Cancer Res.* 59(21):5403-5407 所描述的) 或者差异展示技术。

优选的是基因阵列方法学, 其可以容易地和可靠地用于根据本发明的筛选和评测方法中。许多基因阵列 (微阵列或基因芯片阵列) 是商购可得的以便专业人员使用, 例如 Clontech Laboratories (Palo Alto, CA); Affymetrix (Santa Clara, CA); Operon Technologies (Alameda, CA); Perkin-Elmer/NEN (Boston, MA); 和 Sigma-Genosys (The Woodlands, TX), 但是并不局限于此。更特别地, 核酸微阵列分析使得能够从多种基因中建立基因表达模式, 和有助于了解在受试者或样品中由选择性干涉 (如根据本发明受到 UV 辐射) 引起的复杂的相互作用。微阵列程序使得能够在体内干涉 (如受到 UV 辐射) 之后测定一组基因中的选择性特性修饰以及基因表达或活性的新的和特异的变化。作为进一步的指导并且无任何限制的, 微阵列可以根据下列文献中描述的方法来制备和使用: WO 95/11995 (Chee 等人); D. J. Lockhart 等人, 1996, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680; 和 M. Schena 等人, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10614-10619。微阵列在 P. Lal 等人的 U.S. 专利 6,015,702 的公开内容中作了进一步的描述。另外, 正如本领域技术人员将会意识到的, 包括了高通量分析作为分析微阵列和/或基因芯片技术的结果的手

段。

在本发明之前，本领域中还未认识到使用基因阵列技术来评测和评估 UV 辐射辐照或鉴定能够调节由于受到 UV 辐射而产生的基因表达的材料，这些材料可用于治疗、改善、预防、减少、修复或恢复皮肤的光损伤或光老化。此外，根据本发明鉴定出了在 UV 辐照之后其表达发生改变的新基因（见表 1），以前并不知道这些基因与皮肤受到 UV 辐射之后的光损伤和光老化有关。

当根据本发明的方法评测基因表达的改变时，测定对照（例如无 UV 辐射辐照或阻断了 UV 辐射辐照）和测试样品（例如受到 UV 辐射之后）之间的基因表达水平的差异。如上文中所提到的，根据本发明的方法，基因表达的显著差异（即与对照相比构成显著的改变或变化）为至少大约 1.5 倍的差异，优选地为大约 2 倍，更优选地为大约 2 倍或更大。作为另一种选择，在该方法中当比较对照和测试样品时认为离平均值大约 2 个标准偏差或更大的统计学差异是显著的。

在本发明所包括的另一个实施方案中，使用评测一个或多个此处提供的基因标记的基因表达改变的方法来鉴定和/或评估能够调节（优选地减弱）UV 辐射引起的皮肤光损伤或光老化的成分、组分、试剂、材料等等。在这一方面，可以评估皮肤护理和/或美容产品的特殊成分，从而确定它们在受到 UV 辐射的皮肤、皮肤替代物、皮肤细胞或角蛋白形成细胞中调节此处描述的一个或多个基因标记的表达改变的能力。这种由所述成分或产品进行的调节可以导致预防、抑制、阻滞、还原、治疗、改善和/或恢复光损伤和光老化的皮肤。

更特别地，将待测试的成分、组分、材料或物质或者产品（如遮光剂制剂，或者抗老化制剂或组合物）以有效浓度和有效时段（例如每天、每星期或者每 2 至 4 星期）与皮肤或皮肤替代物或其区域进行接触，或者施用于皮肤或皮肤替代物或其区域。另外，如果需要或期望，在这些时段内可以进行多次施用。作为非限制性指导，施用于测试皮肤上的位点的测试材料的浓度为（优选的）每天大约 $0.5\text{--}5\text{ mg/cm}^2$ ，优选地为大约 $1\text{--}2\text{ mg/cm}^2$ ，并持续大约 1、2 或 4 星期。

在本发明的评测方法中，将测试皮肤暴露于 UV 辐射源，例如最小红斑剂量（MED），从大约 0.5MED 至大约 5MED，优选地大约 1MED 至大约 4MED，并持续大约 5 分钟至大约 48 小时，优选地大约 5 分钟至大约 1 小时。作为对照，从另一个未受到 UV 辐射的皮肤样品中检查新型基因标记组中一个或多个基因的基因表达水平。没有施用测试材料的皮肤或皮肤替代物可以暴露于 UV 辐射并且也可作为对照来进行评估，即皮肤或皮肤替代物在缺乏测试材料的情况下也暴露于 UV 辐射而作为对照。

在根据本发明的优选的微阵列系统中，从有和没有施用测试材料并受到 UV 辐射的皮肤以及未经历 UV 辐射辐照的皮肤样品中制备和分离 RNA。用特异的基因阵列引物将 RNA 进行反转录从而形成互补核苷酸序列（cDNA），同时例如掺入放射性 ^{32}P 标记以用作阵列的探针。然后将标记的 cDNA 与含有成百或成千基因（包括此处描述的 35 个基因）的人基因阵列（例如膜基质）进行杂交（例如实施例 1）。

作为另一种选择，标记的 cDNA 优选地与一个阵列（例如尼龙或硝酸纤维素膜，或塑料薄膜，或基因芯片）杂交，该阵列含有 35 个基因中的至少一个、组合或全部或者其核酸部分（例如寡聚体），该核酸部分可特异地或独特地鉴定本发明所新近描述的标记基因，以便进行该独特性标记基因组的更特异的表达分析。因此，可以使用此处描述的基因标记组中的至少一个、或全部、或组合来制备专用的微阵列。优选地，将包含一组大约 35 个基因中的一个或多个或全部基因或者其特异性序列的标记基因组用于阵列中，如用于例如同位素印迹杂交的基因（核酸）芯片或微阵列。用于阵列的支持物的非限制性例子包括基于尼龙或硝酸纤维素膜、玻璃（例如用于荧光检测的载玻片）或塑料薄膜支持物的微阵列，该微阵列用于确定产品、成分或材料是否具有光保护性或者是否能够改善、预防、减少、修复、抑制、阻滞、减弱、压制、治疗或恢复与（优选地为皮肤的）UV 辐射辐照相关的光损伤和/或光老化的方法之中。这就是说，该方法使得能够确定，相对于对照，产品、成分或材料是否能够在受到 UV 辐射之后调节标记基因组

中一个或多个基因的表达或表达改变。熟练的专业人员将会意识到，在微阵列程序中可以使用放射性（例如 ^{32}P ）或非放射性材料如荧光标记、化学发光标记、酶标记、生物素-抗生物素蛋白标记等等来标记核酸（例如从皮肤或皮肤替代物中分离和制备得到的 cDNA），或者可以适当地使用标记探针。将各种标记探针与基因微阵列接触。通过从微阵列上特异基因位置的标记探针获得的信号（例如放射性、荧光、化学发光等等信号）数量来证实表达数量。探针与微阵列上特异基因位置的结合的数量越大，该基因的表达就越多。

在适当的杂交间隔（例如从几个小时至过夜或稍微更长）之后，洗涤阵列（例如膜）以除去未结合的材料（例如根据膜供应厂商的说明），并将其置于磷成像屏上以便能够进行基因表达水平的显影。基因诱导用强度值表示，并用本领域中常用的合适的软件（例如实施例 1 中所描述的）进行分析。用此处描述的标记探针和微阵列分析的检测程序来评估标记基因中一个或多于一个（例如 2 个或更多，3 个或更多，4 个或更多）基因、全部基因或者其组合的基因表达水平的改变，其中这些标记基因的表达可由 UV 辐射诱导并与对照基因表达水平相比较发生了改变（见例如实施例 1）。

如果发现测试材料能够相对于未受到 UV 辐射的对照在皮肤受到 UV 辐射之后调节本发明的标记基因组中一个或多个基因的基因表达改变或变化，那么可以确定该材料为改善、预防、减少、抑制、阻滞、压制、修复、恢复或治疗光损伤和/或光老化皮肤的候选物。也可以进行时间过程实验来确定，在暴露于 UV 射线的延长或不同时间内，测试物质作为光损伤和/或光老化保护剂或者作为光损伤和/或光老化修复或治疗试剂的效用。本发明也设想了用于评估物质是否能够恢复由于受到 UV 辐射而引起的皮肤光损伤和/或光老化的方法，这是通过在发生光损伤或光老化之后施用所描述的方法来实现的。

如果发现待测试的成分、物质、材料或产品在受到 UV 辐射的皮肤或测试材料中可以影响或调节此处描述的一组标记基因中一个或多个基因的基因表达，那么可以认为该成分为用于皮肤护理产品或美容制

剂之中的候选物，所述产品或制剂可用于局部和/或口服使用以预防、抑制、阻滞、减少、治疗、改善、修复或恢复由于受到 UV 辐射而造成 的光损伤和/或光老化。使皮肤护理产品和制剂包含上面所鉴定的成分。这样的皮肤护理产品和制剂包括遮光剂、抗氧化剂制剂、经皮肤的装置（如贴剂等等）、头发护理产品、化妆品和美容产品（例如口红、面霜和手霜、粉底、体霜、洗液、保湿剂、抗皱纹制剂等等），但是并不局限于此。正如熟练的专业人员将会意识到的，这样的材料和成分优选地以对于调节标记基因组中至少一个基因的表达有效（更优选地相对于至少一个未受到 UV 辐射的对照的基因表达）的数量用于组合物和制剂之中。

本发明提供了有利和有用的方法来筛选和评测皮肤护理、颜料、个人护理和头发护理产品的潜在益处。由于上面的描述，将可以了解到本发明进一步包括一种方法或检测系统来鉴定提供光保护（例如用于预防用途）的新材料，这些材料可修复、改善、减少或治疗光损伤或光老化的皮肤或者可恢复先前的受到 UV 辐射的皮肤光损伤（例如，为了治疗目的）。

本发明所包括的组合物可以任何适合于美容的形式提供，优选地作为洗液或霜剂，也可在软膏或油基底中，以及可喷雾的液体形式（例如可保护头发和头皮抗 UV 辐射引起的损伤的“头发”喷雾剂，该喷雾剂可存在于以美容上可接受的方式进行干燥的基底之中，而不会有将洗液或软膏施用于头发而通常具有的油腻的外观）。另外，本发明所设想的组合物可以包括一种或多种熟练的专业人员通常使用和已知的并且美容上可接受的辅剂，例如着色剂、芳香剂、润滑剂、湿润剂、防腐剂、维生素、螯合剂、增稠剂等等，以及植物制剂如芦荟、春黄菊等等。如果应当包括类视黄醇，它们优选地进行局部使用，其浓度为大约 0.001%至大约 5%，更优选地为大约 0.1%至大约 1%。

在本发明的另一个方面，其设想了一种方法来鉴定和评测能够最终作为经口服摄取的光保护、光治疗和光修复试剂的营养补充物。在这一方面，采用本发明的方法来鉴定和评测营养补充物，在该方法中

对于补充物或潜在补充物进行评估以确定在受到 UV 辐射之后其调节根据本发明的至少一个基因标记的基因表达改变的能力。这样的调节可以是例如减弱、预防、抑制、阻滞、减少、改善、修复和/或恢复 UV 引起的光损伤或光老化。因此，本发明提供了一种新型和有利的程序来评测营养补充物的光保护和/或医疗效用，这些营养补充物例如能够提供抗 UV 引起的细胞和组织损伤的内在保护和医疗，或者内在地改善、修复、抑制、减少或治疗 UV 引起的细胞和组织损伤。（例如 Chakrabaty 等人，1994, *Free Radical Biol. Med.*, 16:417）。

仅仅作为一个例子，类视黄醇如视黄酸、视黄醇相关物质、抗氧化剂以及本发明所包括和鉴定的光保护和/或医疗组分也可以系统吸收的方式进行摄取，优选地通过口服施用。当口服给药时，类视黄醇和其他被摄取的光保护剂组分优选地以大约 0.1 mg/kg（体重）至大约 1 mg/kg 乃至更高的数量进行施用，所有的剂量均低于可能出现毒性的数量。作为另一个例子，抗氧化剂常常以“大剂量”进行摄取（例如至少 1 g/d 的维生素 C，至少 1000 I.U. 的一种或多种生育酚）。

对于非局部的施用如系统吸收或口服施用，本发明所鉴定和包括的组分或材料一般配制在生理上可接受的组合物中，优选的为药物上可接受的组合物，包括生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。该组合物可以单独施用或者与至少一种其他试剂（如稳定化化合物）一起施用，其可以任何无菌的、生物适合的药物载体进行施用，包括盐水、缓冲盐水、葡聚糖和水，但是并不局限于此。该组合物可以单独施用于患者，或者与其他试剂、药物、激素或生物反应调节物一起施用于患者。该组合物可以下列形式（只是举例而非限制）进行摄取、施用、应用或引入，即凝胶胶囊、片剂、粉剂、悬浮液、液体、胶囊形片剂、杆状物、摇动剂（shakes）、饮料等等，如下面将作进一步的描述。

在本发明中使用的药物组合物可以通过许多途径进行施用，包括口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、经皮肤、皮下、腹膜内、鼻内、肠、局部、舌下、阴道或直肠的方式，但是并不局限于此。

本发明包括经皮肤的递送方式如贴剂等等，其含有或没有合适的渗透增强剂。本发明所包括的方法和组合物提供了一种方式，通过这种方式一种或多种光保护、光治疗或光修复药物或者药剂可以在经皮肤的系统中有效地进行施用。具有弱的局部吸收或者需要高剂量水平的化合物常常经皮肤进行递送。因此，向皮肤递送药物组合物（通常与渗透增强组合物一起）的经皮肤的方式为经皮肤的贴剂或者本领域中已知和已描述的类似装置。在 U.S. 专利 5,146,846、5,223,262、4,820,724、4,379,454 和 4,956,171 中公开了这种装置的例子；但并不限于这些。向皮肤贮存与递送组合物并形成活性组合物的经皮肤的方式是方便的，并且非常适合于本发明实施方案的目的。

除了活性成分（包括如此处鉴定出的光保护、光修复和/或光治疗化合物或成分）之外，生理上可接受的和药用的组合物可以包含合适的、药物上可接受的和含有辅助剂的载体、稀释剂或赋形剂，所述辅助剂有助于将活性化合物加工成药学上可用的制剂。在最新版的 *Remington's Pharmaceutical Sciences*（Mack 出版公司；Easton, PA）中提供了关于配制和施用技术的进一步的细节。

用于口服施用的药物组合物可用本领域中熟知的药物上可接受的载体以对于口服施用合适的剂量来进行配制。这样的载体使得能够将药物组合物配制成用于患者摄取的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、结晶浆液、悬浮液等等。

用于口服使用的药物组合物可以通过下列步骤来获得，即将活性化合物和固体赋形剂组合，可选择地磨碎结果所得的混和物，和（如果需要）在加入合适的辅助剂之后加工颗粒的混和物，从而获得药片或糖衣丸核心。合适的赋形剂为碳水化合物或蛋白质填充物，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；来自玉米、小麦、稻米、马铃薯或其他植物的淀粉；纤维素，如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；树胶，包括阿拉伯胶和西黄蓍胶；和蛋白质，如明胶和胶原蛋白。如果需要，可以加入分解剂或稳定剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、褐藻酸或其生理上可接受的盐如褐藻酸钠。

糖衣丸核心可与生理上合适的包衣材料结合使用，如浓缩的糖溶液，其也可以含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯（carbopol）凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛；漆溶液（lacquer solutions）；和合适的有机溶剂或溶剂混和物。染料或色素可以加入到药片或糖衣丸包衣之中以易于识别或者表征活性化合物的数量即剂量。

可口服使用的药物制剂包括明胶制成的推入配合式（push-fit）胶囊以及明胶和包衣（如甘油或山梨糖醇）制成的软性有刻度的胶囊。推入配合式胶囊可以含有与填充物或粘合物如乳糖或淀粉、润滑剂如滑石或硬脂酸镁和（可选择的）稳定剂混和的活性成分。在软胶囊中，活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体中，例如有或没有稳定剂的脂肪油、液体或者液体聚乙二醇。

适合于肠胃外施用的药物制剂可以在水溶液中进行配制，优选地在生理相容的缓冲液中进行配制，例如 Hanks' 溶液、Ringer's 溶液或生理缓冲溶液。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外，活性化合物的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或赋形剂包括脂肪油如芝麻油，或者合成的脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯，或者脂质体。可选择地，悬浮液也可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的试剂从而使得能够制备高浓缩的溶液。正如本领域技术人员将会意识到的，将药物制剂制备成各种形式不会不利地影响制剂中活性材料的功能或活性。

对于局部或鼻部施用，在制剂中使用适合于特殊渗透障碍的渗透剂或渗透试剂或增强剂。这样的渗透剂在本领域中通常是已知的。

本发明的药物组合物可以本领域中已知的方式进行制造，例如通过传统的混和、溶解、颗粒化、制成糖衣丸、磨碎、乳化、装入胶囊、截留或冻干程序。

如果适用，药物组合物可以盐的形式来提供，并可用许多酸来形成，这些酸包括盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸

等等，但是并不局限于此。盐倾向于比相应的游离碱形式在水性溶剂或其他质子性溶剂中更加可溶。在其他情况下，制剂可以为可包含下列任一或全部物质的冻干粉：1-50 mM 组氨酸，0.1%-2%蔗糖和 2-7%甘露醇，其 pH 为 4.5-5.5，使用前与缓冲液结合。

在制备了光保护、光修复和/或光治疗的药物组合物之后，可将它们置于合适的容器中，并标注用于指定条件的治疗。对于光保护、光修复和/或光治疗产品的施用，这种标注包括施用的数量、频率和施用方法。

适合于在本发明中使用的药物组合物包括这样的组合物，即在该组合物中以对于获得预期目的有效的剂量含有活性成分或材料。有效剂量或数量的确定完全在本领域技术人员的能力之内。对于任何化合物，治疗有效剂量或浓度范围最初可在细胞培养检验中进行估计，例如使用赘生性细胞。治疗有效剂量是指活性成分（例如根据本发明所鉴定的光保护、光修复和/或光治疗化合物或组分）的数量，这些数量例如可预防、改善、减少、治疗、恢复、压制、修复或消除症状或病症。剂量一般在上述的范围内变化，其依赖于所使用的剂型、患者的敏感性和施用途径。专业人员将会考虑与需要治疗的个体相关的因素并确定正确的剂量。

调整剂量和施用以提供活性部分的足够水平或保持所希望的效果。一般要考虑的因素包括个体特殊需要的严重性，患者的总体健康状况，患者的年龄、体重和性别，饮食，施用的时间和频率，药物组合，反应敏感性，和对于治疗的耐受/响应。作为一般性的指导，长期作用的药物组合物可以每 3-4 天、每星期或每 2 个星期一次进行施用，这依赖于特定制剂的半寿期和清除率。这些剂量水平的变化可使用用于优化的标准经验程序来调整，这在本领域中是非常熟悉的。

作为非限制性指导，正常的剂量可于 0.1-100,000 微克 (μg) 变化，直至大约 1 克 (g) 的总剂量，这依赖于施用的途径。文献中提供了对于特殊的递送剂量和方法的指导，这对于本领域的专业人员来说是可用的。本领域技术人员会根据光保护和/或光治疗化合物的性质如

结构、组成来使用不同的制剂。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种筛选方法从而使得能够鉴定对于 UV 引起的基因表达作出响应的个体或个体亚群，这是通过具有此处新近描述的 UV 辐射诱导的标记基因组中一个或多个标记基因的表达改变来进行鉴定的。这样的个体由于具有 UV 辐射诱导的标记基因组中一个或多个基因的表达改变，因而它们可能会在受到 UV 辐射之后比正常个体更容易造成光损伤和光老化或者对于光损伤和光老化具有更高的敏感性，它们能够通过使用本发明的方法来筛选鉴定。例如，该实施方案的筛选方法包括例如按实施例 1 中的描述从正进行测试的个体中获得皮肤样品如皮肤活检组织或皮肤角膜刀样品；将样品暴露于 UV 辐射；从受到 UV 辐射的样品中分离核酸；和使用检验方法（例如此处描述的微阵列系统和新近鉴定的标记基因）来评测相对于对照个体内 UV 辐射诱导的基因中至少一个基因的基因表达是否发生了改变。筛选方法进一步使得能够确定那些特别易受治疗或医疗影响的个体，所述治疗或医疗包括能够调节此处描述的 UV 辐射诱导的标记基因组中一个或多个基因的表达改变或者修饰基因表达的材料、成分、化合物、制剂和组合物。鉴定或筛选出的个体会特别适合于根据本发明来改善、还原、治疗、预防、修复、减少和/或恢复 UV 辐射引起的光损伤和光老化。

本发明的另外一个实施方案涉及含有支持物或支持材料（例如尼龙或硝酸纤维素膜，或塑料薄膜，或玻璃，或微阵列，但不局限于此）的试剂盒，这些支持物或支持材料以一定的形式含有此处描述的一组新型基因，该形式对于专业人员来说适合用于鉴定能够改善、预防、抑制、阻滞、压制、减少、修复、治疗或恢复由于皮肤受到 UV 辐射而引起的光损伤和/或光老化的化合物、试剂、成分、物质、药剂等等。该试剂盒可以在合适的基质或微阵列上含有新型基因标记组或者这些基因的亚群或者这些基因的独特核酸部分，其提供了经鉴定的目标基因标记组来鉴定能够调节（即减弱、修饰或克服）UV 辐射引起的皮肤光损伤和/或光老化的试剂。另外，该试剂盒可包含其他对于进行该

检验方法所必需的材料, 包括标记的或未标记的核酸探针、检测标记、缓冲液、对照和使用说明, 但是并不局限于此。

实施例

下面的实施例描述了本发明的特殊方面从而来举例说明本发明, 并对于本领域的技术人员提供了本方法的描述。这些实施例不应构成本发明的限制, 它们仅仅提供了用于理解和实施本发明和其各种方面的特殊方法学。

实施例 1

细胞通过细胞功能中基因组和非基因组的变化来对刺激作出响应。按传统在个别(单个)基因基础上进行了解细胞和组织如何在基因组(RNA)水平上作出响应。随着基因阵列技术的使用, 可以在单个实验中研究成百的甚至成千的基因。

该实施例中描述的实验的目的是使用基因阵列技术和人皮肤来鉴定导致对于紫外辐射(UVR)引起的光损伤作出响应的变化。因为UVR是造成皮肤光损伤和光老化的病原物质, 所以使用受到UV照射的皮肤作为用于检查与光损伤相关的急性和慢性变化的模型系统。使用该基于人皮肤样品的模型系统作为一种方法来筛选能够改善以及减少、治疗、修复、恢复或预防急性和慢性UVR辐照造成的光损伤效应的材料。

为了进行该实验, 从5名正常志愿者的臀部区域收集大约2cm × 5cm大小并含有表皮和真皮细胞的皮肤角膜刀。在受到4MED的UVR辐照(太阳刺激性辐射, SSR)之后32小时收集角膜刀。对照角膜刀没有受到UVR辐照。快速冷冻组织以便进行随后的总RNA分离。

为了RNA的分离, 在Trizol试剂(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)中用polytron将组织匀浆, 汇集, 并按照Trizol试剂的说明分离出总RNA。一旦分离, 将总RNA用特异基因阵列引物组(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)反转录从而形成互补的核苷酸序列, 同时掺入放射性³²P标记。将标记的cDNA与含有1176个人类基因的人Atlas 1.2 I Array(Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)杂交。杂交过夜之后, 将膜根据膜供应厂商的说明进行洗

涂,并将其置于磷成像屏上大约 10 天以便能够进行基因表达水平的显影。通过磷成像分析仪用 AtlasImage 软件 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 获得用强度值表示的基因诱导并进行分析。在用磷成像分析定量基因表达之后,用 ImageQuaNT™软件将基因表达标准化至膜上所有基因的平均强度并对背景杂交进行校正。

全部的 RNA 提取、标记、杂交和基因变化的计算重复 4 次并进行平均。在该实施例中,相对于对照大约 2-2.5 倍的基因表达变化,或者在基线(对照)之上或之下 2 个标准偏差(SD)可认为是显著的。那些在皮肤受到 UV 辐射之后显示出显著的表达变化(正调节或负调节)的基因于此处进行了描述并呈现在表 1 中。

实施例 2

微阵列

为了产生对于微阵列中的基因特异的寡核苷酸,使用开始于核苷酸序列 3' 末端的计算机算法来检查特异的基因序列。该算法可鉴定出指定长度的寡聚体,这些寡聚体对于基因是独特的,并具有在适合于杂交的范围内的 GC 含量,和没有预测的将会干扰杂交的二级结构。该算法可鉴定出特殊长度的特异性寡核苷酸,例如 20-100 个核苷酸,如 20 聚体、30 聚体、50 聚体、80 聚体、100 聚体。形成一组匹配的寡核苷酸,其中在每个序列中心的一个核苷酸发生了改变。对于微阵列中的每个基因重复这一程序,并在荧光或放射性核苷酸存在下合成双组寡核苷酸并将其排列在基质表面。当基质是硅芯片时,使用光指导的化学处理以进行沉积(见例如 WO 95/11995, M. Chee 等人)。

可选择地,使用化学偶联程序和墨水喷射装置来在基质的表面合成寡聚体。(见例如 WO 95/25116, J.D. Baldeschweiler 等人)。作为另一个选择,可使用与点(或缝)印迹类似的“栅格化”的阵列来将 cDNA 片段或寡核苷酸排列在基质表面上和将其与基质表面连接,这是通过例如真空系统或者热、UV、机械或化学结合技术来进行的。

一般的阵列可以通过手工或通过使用可用的材料和装置来生产,其可以含有多个点的栅格。在杂交之后,洗涤微阵列以除去未杂交的

探针，并使用检测装置来确定放射性或荧光的水平和模式。检测装置可与 X-射线胶片一样简单，或者与光扫描仪一样复杂。检查扫描出的荧光图像来确定微阵列中每个寡核苷酸序列的互补性程度和相对丰度/表达水平或者表达水平变化，这优选地通过比较对照和测试样品或材料来进行。

实施例 3

对于体外组织模型或单层培养物的两种类型基因阵列方法学的使用

在测试辐照之前 24 小时用新鲜的培养基饲喂置于 100 mm 组织培养皿（70-80%汇合）中的体外人表皮组织（0.63cm² 大小）或单层培养物。将测试成分样品在 UV 辐照之前 1 小时在培养基中稀释，或者对于组织局部施用于模型。

对于单层培养物的辐照，在即将进行 UV 辐照之前（例如大约 5 分钟）从培养皿中倾出可用的细胞培养基。在组织中，通过盐水（生理的）洗涤从局部施用部分中去除任何过量的材料以避免与 UV 射线的直接相互作用。在受到 UV 辐射之后，对于每一次处理使用三个组织/单层培养物，包括未处理的对照（只含有培养基）、经 UV 处理的（UV 对照）和未处理的/非 UV 对照（基线）。将组织于 -80℃ 冷冻贮存直至 RNA 的分离。

使用 Clontech Nucleospin RNA II 纯化试剂盒（Clontech Laboratories 公司，Palo Alto, CA）从细胞培养物或组织（组织模型）中分离总 RNA。将组织模型用商业匀浆器进行匀浆或者在液氮存在的情况下用研钵和研杵进行研磨。经匀浆的组织模型或单层细胞培养物用试剂盒的供应厂商所提供的裂解缓冲液进行细胞裂解，然后将结果所得的经裂解的材料移液至均质的悬浮液中。（如果细胞悬浮液由于存在一些剩余的完整细胞或颗粒而混浊，或者由于基因组 DNA 而非常粘稠，可用 Nucleospin 过滤单元（Clontech Laboratories 公司，Palo Alto, CA）过滤该样品）。将制备好的 DNA 酶 I 反应混和物加入到 Nucleospin 柱上，并于室温温育 15 分钟。在用所提供的缓冲液进行几次洗涤之后，将 Nucleospin 过滤管置于 1.5-ml 管中，并同时用

不含核酸酶的水洗脱 RNA。使用 UV 光谱法测量 RNA 的纯度和收率，并测定 260nm/280nm 的吸光度比率。也要用本领域中通常已知的变性琼脂糖凝胶电泳来检查 RNA 的纯度和完整性。

对于每一个测量的终点，使用 10-20 μg 的总 RNA 用于杂交。总 RNA 可用 Clontech Atlas 荧光标记试剂盒 (Clontech Laboratories) 和 Cy3 与 Cy5 标记 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行标记，或者使用 Atlas cDNA 表达阵列试剂盒 (Clontech Laboratories) 并根据厂商提供的试剂盒说明书用 ^{33}P 或 ^{32}P dATP (Amersham Pharmacia) 进行放射性标记。

将标记的 RNA 涂布在用于杂交的载玻片 (荧光标记的 RNA) 或尼龙膜 (放射性标记的 RNA) 上，这是通过用试剂盒中所提供的相应数量的杂交溶液稀释 RNA 从而覆盖载玻片或尼龙膜来进行的。在温育 (大约 16 小时) 之后，根据厂商的说明用多种浓度的 SSC 缓冲液洗涤载玻片或膜。对于 CY3/CY5 标记的载玻片，用干燥的氮气干燥载玻片并将其置于荧光基因阵列阅读器 (Axon Instruments, Foster CA., Genepix 4000B) 中，该阅读器含有用于激发/发射 Cy3 和 Cy5 荧光标记的激光。

对于放射性标记的尼龙膜，在用磷成像仪 (Molecular Dynamics 公司, Sunnyvale, CA, STORM 840) 进行显影之前将膜暴露于磷成像屏大约 6-14 天。使用 Genepix 4000B 扫描仪 (Axon Instruments) 提供的 Genepix Pro 3.0 软件在荧光标记的载玻片上进行阵列分析，或者对于放射性标记的尼龙膜使用 AtlasImage 1.5 (Clontech Laboratories) 来进行分析，并随后用 AtlasNavigator 1.0 软件 (Clontech Laboratories) 进行附加的分析。例如，Genepix Pro 3.0 使得能够定量分析和比较来自载玻片微阵列的信号强度；AtlasImage 1.5 使得能够定量分析和比较来自 Atlas 尼龙阵列的信号强度；使用 Atlas Navigator 用于基因簇分析，阵列数据的全面标准化，在线基因注释，通过线形图、条形图、散布图和规则的列表来呈现基因。

此处引用的所有专利、专利申请、发表的文章、摘要、书、参考

手册和摘要、GenBank 序列编号被整体引用作为参考，从而更充分地描述本发明所属领域的状况。

由于在不背离本发明的范围和精神的情况下可以在上述主题中作出多种变化，因此意图将上面的描述中包含的或者附加的权利要求中定义的所有主题解释为本发明的描述性和说明性部分。根据上面的教导，对本发明的许多修饰和变化是可能的。

图1A

暴露于SSR的皮肤

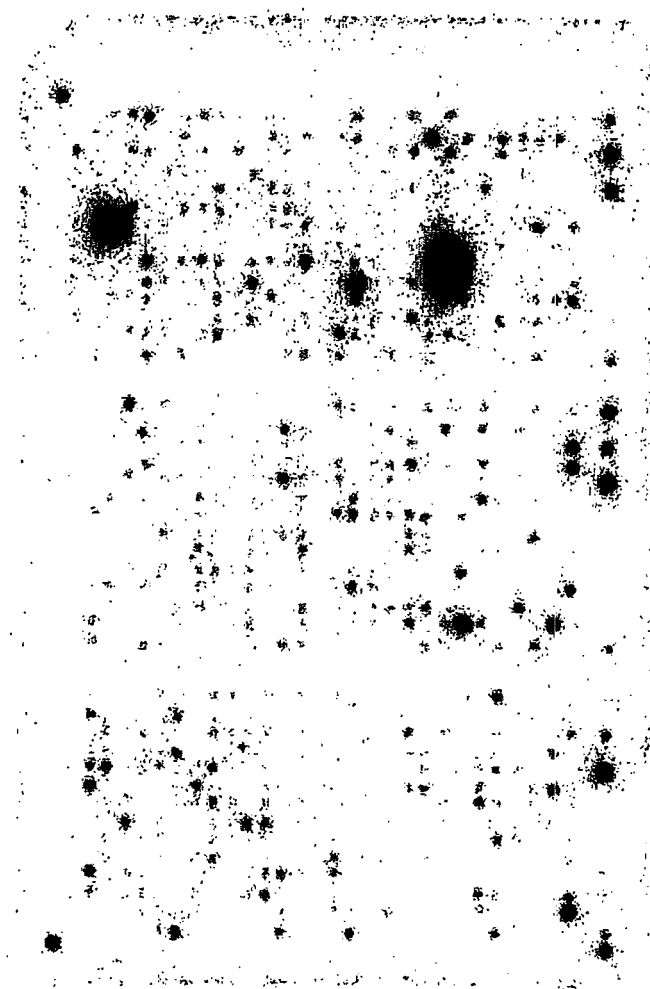


图1B

正常对照

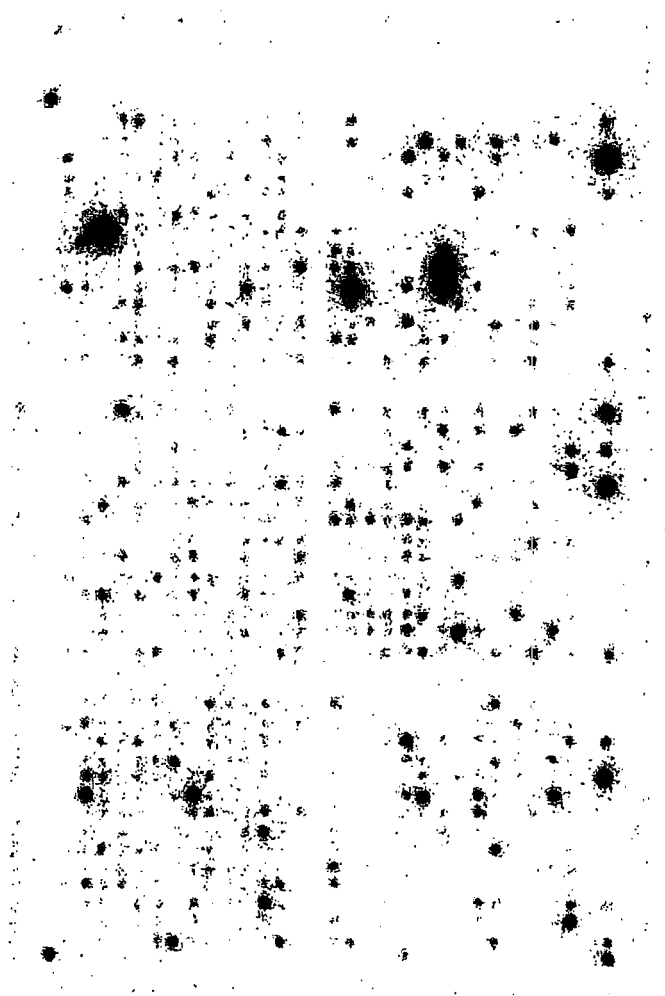


图 2A

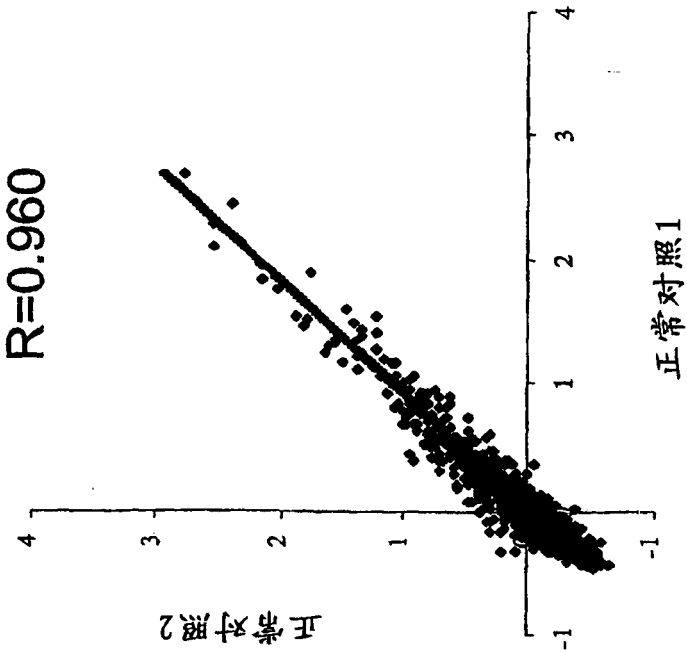


图 2B

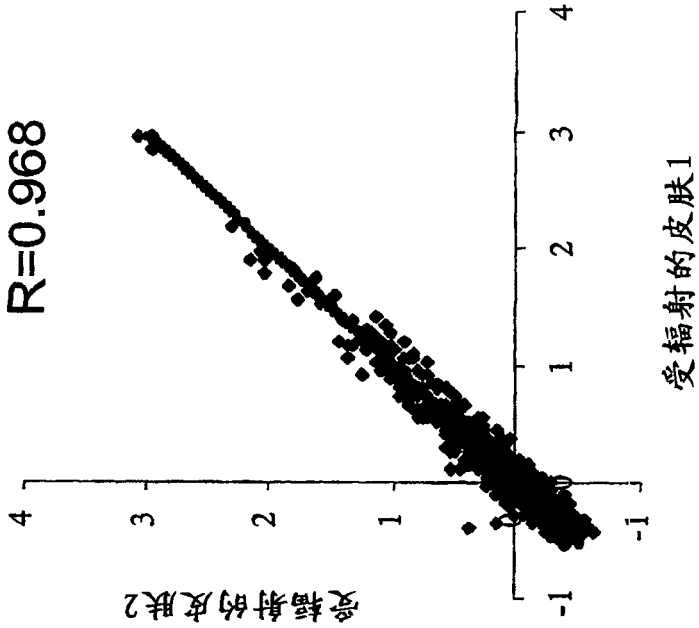
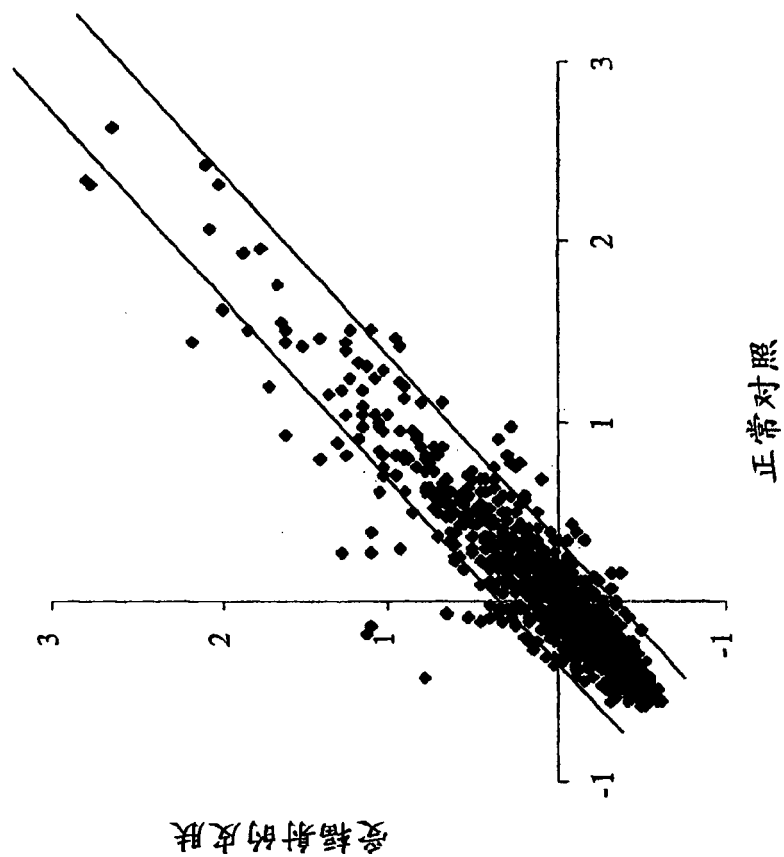
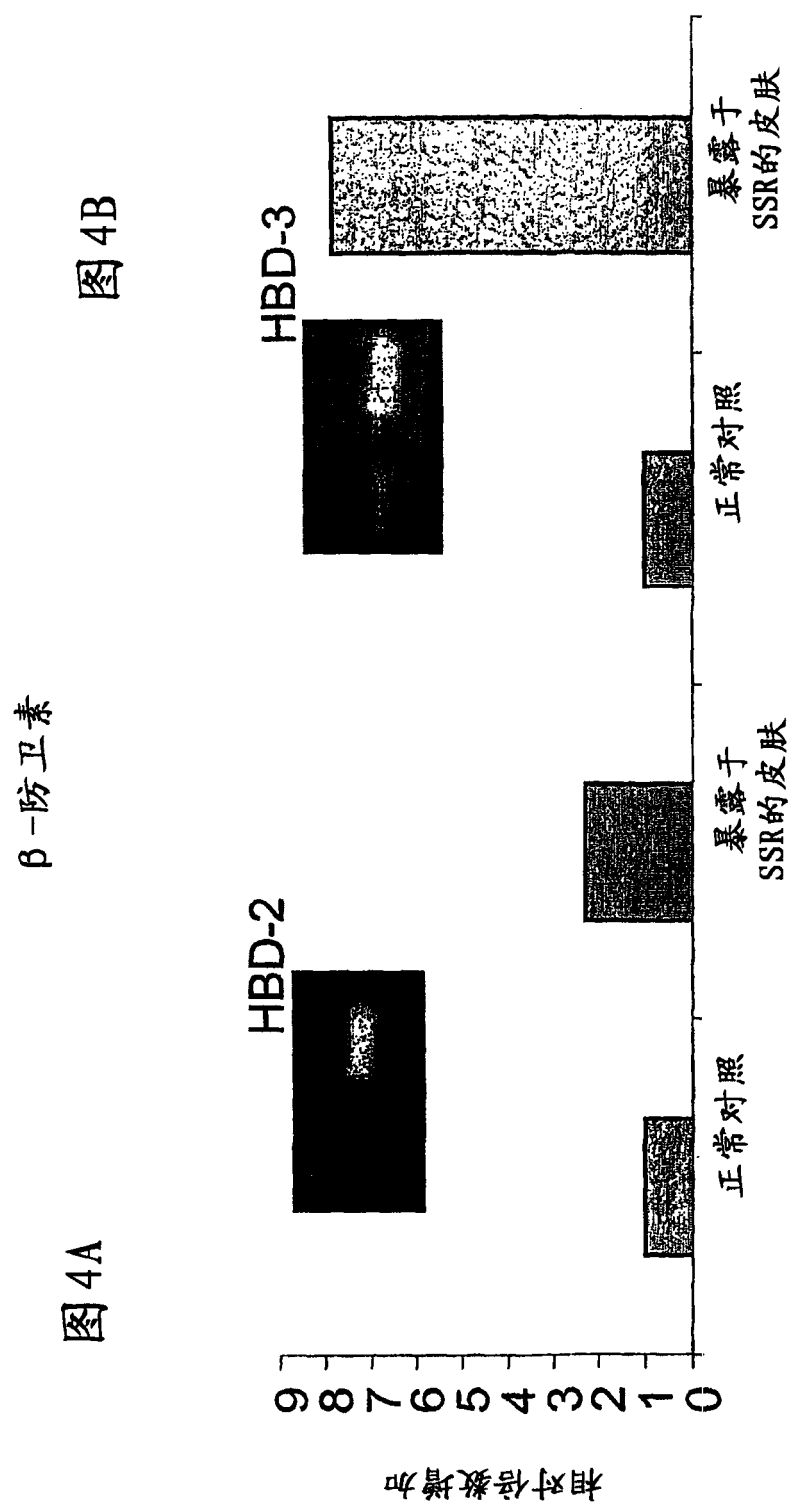


图3





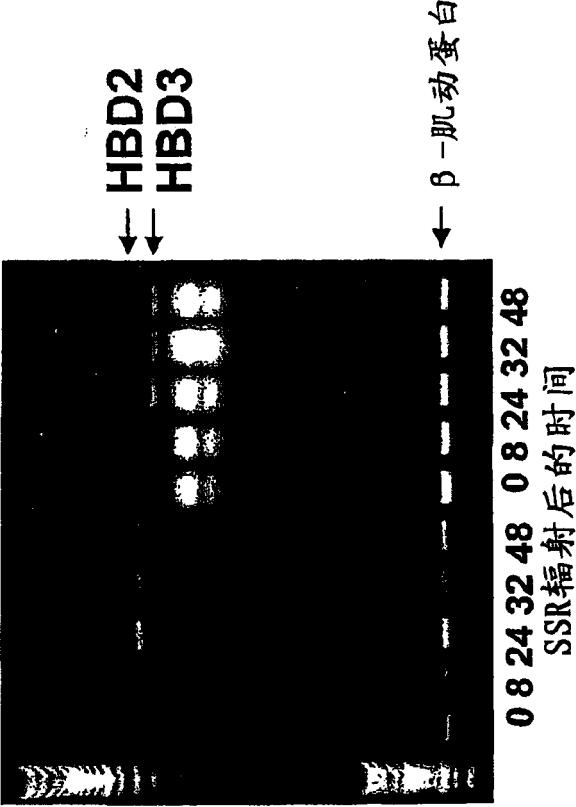


图 5A

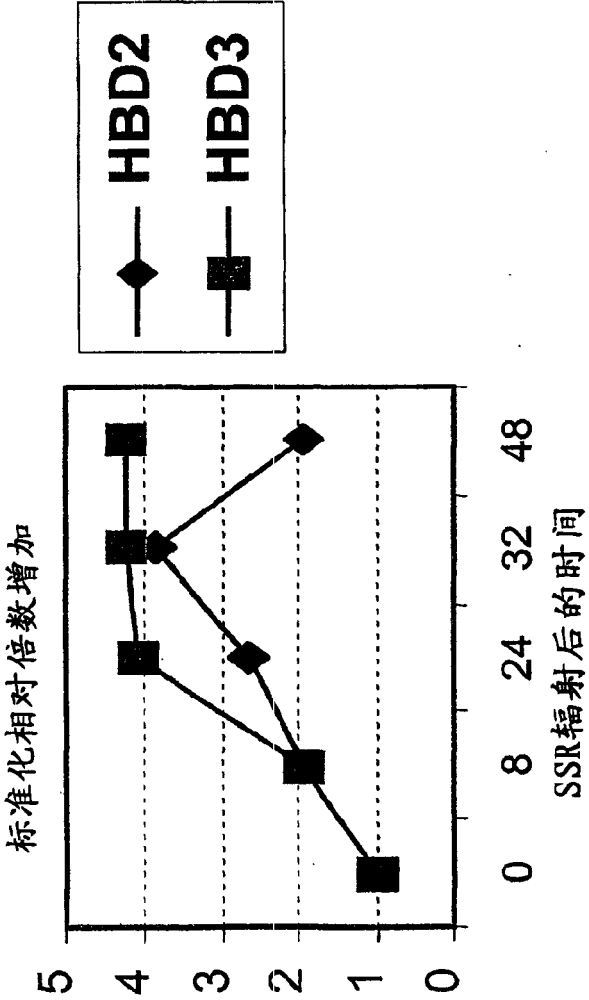


图 5B

专利名称(译)	用新型基因标记、与之相关的方法和组合物来评测皮肤的紫外辐射损伤		
公开(公告)号	CN1518604A	公开(公告)日	2004-08-04
申请号	CN02810842.6	申请日	2002-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	克利夫兰大学医院		
申请(专利权)人(译)	克利夫兰大学医院		
当前申请(专利权)人(译)	克利夫兰大学医院		
[标]发明人	BC琼斯 C伯斯克 K库奥伯 T麦科考米克		
发明人	B·C·琼斯 C·伯斯克 K·库奥伯 T·麦科考米克		
IPC分类号	G01N33/50 A23L33/00 A61K45/00 A61P17/16 C07H21/04 C12N15/01 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 C12Q1/6886 G01N G01N33/15 G01N33/53 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q1/6883 A61P17/16		
代理人(译)	程泳		
优先权	60/289680 2001-05-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了用于治疗 and/或评测由于受到太阳紫外(UV)辐射所造成的皮肤的光损伤和/或光老化。该方法使用一组独特的标记基因，新近发现这些基因的表达会在皮肤受到UV辐射之后而改变。本发明提供了一种有利的系统，该系统用于鉴定和评估能够调节(例如减弱)UV辐射引起的至少一个新近提供的皮肤中标记基因表达的改变或变化的物质，这种表达的改变或变化是相对于没有受到UV辐射的皮肤中的基因表达水平来说的。本发明还提供了含有当施用于皮肤时能够在皮肤受到UV辐射之后调节标记基因组中至少一个基因的基因表达的材料组合物的，因此提供了对于光损伤和光老化的保护和医疗效用以及治疗。可以用本方法来评估例如皮肤护理、头发护理、美容和个人护理试剂以及营养补充物作为具有抗光损伤和/或抗光老化特性的材料的潜在益处。

