



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0036973

(51)⁷ A61K 36/18; A61K 36/81; A61Q 17/04; (13) B
A61P 17/00; A61P 17/16; A61P 43/00;
A61K 36/48; A61K 8/97

-
- (21) 1-2017-03946 (22) 04/03/2016
(86) PCT/JP2016/056704 04/03/2016 (87) WO 2016/143680 15/09/2016
(30) 2015-044851 06/03/2015 JP; 2015-185298 18/09/2015 JP
(45) 25/09/2023 426 (43) 26/03/2018 360A
(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan
(72) KITAGAWA, Sayuri (JP); IINO, Taeko (JP); OKADA, Asako (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) CHẤT ỨC CHẾ QUÁ TRÌNH SẢN SINH ENZYM PHÁ HỦY CẤU TRÚC NỀN (MMP), CHẾ PHẨM NGOÀI DA CHỨA CHẤT ỨC CHẾ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ DA

(57) Sáng chế đề xuất chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất chiết thực vật được chọn từ nhóm gồm *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata* và *Robinia pseudoacacia* làm thành phần hoạt tính. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm ngoài da chứa chất ức chế này và phương pháp xử lý da không phải là phương pháp điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất ức chế quá trình sản sinh enzym phá hủy cấu trúc nền (matrix metalloproteinase-MMP) mới và chế phẩm ngoài da chứa chất ức chế này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Da bao gồm, theo thứ tự từ ngoài vào, lớp sừng, biểu bì, màng đáy và hạ bì. Hạ bì chứa đầy thành phần tế bào và cái gọi là chất nền ngoại bào, mà là cấu trúc nền phân tử lớn, được sản sinh bởi các tế bào này. Đã biết rằng các thành phần tế bào bao gồm nguyên bào sợi, đại thực bào, tế bào mỡ, tế bào mạch máu, và tế bào thần kinh. Còn biết rằng chất nền ngoại bào gồm các protein dạng sợi như collagen và elastin và các polysacarit như axit hyaluronic và proteoglycan. Sợi collagen, ở dạng chất nền ngoại bào, được cho là chiếm khoảng 70% trọng lượng khô của hạ bì và đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì độ săn chắc và tính đàn hồi của da. Mặc dù phân tử collagen có 20 kiểu phụ khác nhau nhưng phần lớn các sợi collagen có trong hạ bì là collagen typ I.

Enzym phá hủy cấu trúc nền (matrix metalloproteinase) (sau đây gọi là "MMP") là proteinaza liên quan đến quá trình thoái hóa và chuyển hóa của chất nền ngoại bào. Các MMP được phân loại thành một vài kiểu phụ theo cấu trúc phân tử và tính đặc hiệu cơ chất của chúng. Ví dụ, MMP-1 liên quan đến sự thoái hóa cấu trúc xoắn ba của collagen typ I, và MMP-2 và MMP-9 liên quan đến sự thoái hóa của collagen typ IV và gelatin cấu thành màng đáy. Các MMP không chỉ kiểm soát sự chuyển hóa chất nền ngoại bào trong hạ bì, mà còn liên quan mật thiết đến việc làm ẩm các tế bào và/hoặc hoạt hóa các phân tử có hoạt tính sinh học như xytokin. Cũng đã được báo cáo rằng các MMP liên quan đến nhiều bệnh khác nhau. Đối với da, cụ thể là, việc tiếp xúc với tia UV và/hoặc nhiều tình trạng viêm khác nhau sẽ dẫn đến việc sản sinh quá mức MMP. MMP này xúc tác sự thoái hóa và sự biến tính của collagen và elastin, mà được thấy là gây ra các nếp nhăn ở da và/hoặc làm da chảy xệ.

Dựa trên bối cảnh này, nhiều xét nghiệm khác nhau đã được tiến hành liên quan đến việc điều tiết MMP. Nhiều báo cáo bộc lộ, ví dụ, chất chiết thực vật ức chế hoạt tính

của MMP (tài liệu sáng chế 1 và 2). Ngoài ra, tài liệu sáng chế 3 bộc lộ chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa dung dịch nuôi cấy nấm men làm thành phần hoạt tính và được chỉ định để ức chế quá trình tự sản sinh enzym và do đó ngăn chặn triệt để tác dụng của MMP. Tài liệu sáng chế 4 báo cáo rằng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa hợp chất có nhóm sulfhydryl và hợp chất có liên kết disulfua làm thành phần hoạt tính. Trong khi đó, gần đây đã được gợi ý rằng chất chủ vận của PPAR δ , kiểu phụ của thụ thể được hoạt hóa bởi chất tăng sinh peroxisom (sau đây gọi là "PPAR"), thụ thể nhân điều tiết sự biểu hiện của một nhóm các gen liên quan đến việc duy trì sự chuyển hóa lipid và đường, ức chế quá trình sản sinh MMP-1 gây ra do sự tiếp xúc với UVB của nguyên bào sợi (tài liệu phi sáng chế 1).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn sáng chế Nhật Bản số 07-196526

Tài liệu sáng chế 2: Đơn sáng chế Nhật Bản số 07-291873

Tài liệu sáng chế 3: Đơn sáng chế Nhật Bản số 2009-24638

Tài liệu sáng chế 4: Đơn sáng chế Nhật Bản số 2002-47178

Tài liệu sáng chế phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: SA Ham et al.: Journal of Investigative Dermatology 133, 2593-2600 (2013)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong bản mô tả này, được biết rằng "tia UV với bước sóng ngắn hơn cho đến bước sóng của UVB khó xuyên qua hoặc đến được hạ bì, do đó UVA là tia UV chính tác động đến hạ bì" (Kotaro Imagawa et al., "The effects of light on skin", The Journal of Japan Society for Laser Surgery and Medicine (JJSLSM), vol. 32, no. 4 (2012), p.448, lines 22 to 24). Theo đó, phần lớn tia UV ngoại trừ UVA được cho là không thể đến được hạ bì ngay cả khi da được tiếp xúc với tia UV trong điều kiện môi trường thông thường. Do đó, quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da trong điều kiện môi trường thông thường có vẻ là được điều biến bởi tác dụng trực tiếp của UVA lên

nguyên bào sợi của da hoặc tác dụng gián tiếp của các xytokin viêm và/hoặc các gốc oxy phản ứng (reactive oxygen species-ROS) sinh ra bởi các tế bào da tiếp xúc với UVB. Trong tài liệu phi sáng chế 1, các nguyên bào sợi có nguồn gốc từ hạ bì được chiếu trực tiếp tia UVB, khác với môi trường mà trong đó da được tiếp xúc với UVB. Cụ thể là, việc phối tử PPAR δ ức chế quá trình sản sinh MMP-1 mà có thể xảy ra trong điều kiện môi trường thông thường là chưa biết. Mục đích của sáng chế là đề xuất chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1.

Giải pháp kỹ thuật

Dựa vào những điều nêu trên, các tác giả sáng chế đã sàng lọc nhiều nguyên liệu khác nhau để tìm ra loại nguyên liệu có hoạt tính ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Kết quả là, chất chiết thực vật thu được từ các loài thực vật cụ thể được thấy là ức chế hiệu quả quá trình sản sinh MMP-1. Sáng chế được hoàn thành dựa trên phát hiện này.

Sáng chế đề xuất những khía cạnh sau:

(1) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất chiết thực vật được chọn từ nhóm gồm *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata* và *Robinia pseudoacacia* làm thành phần hoạt tính.

(2) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục (1), trong đó chất chiết thực vật là chất chiết thực vật được chiết bằng dung môi.

(3) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục (2), trong đó dung môi là dung môi chứa rượu.

(4) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó chất ức chế được sử dụng trước hoặc sau khi bắt đầu quá trình sản sinh MMP-1.

(5) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó MMP-1 được sản sinh bởi các tế bào cấu thành da.

(6) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục (5), trong đó tế bào là các nguyên bào sợi của da.

(7) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó quá trình sản sinh MMP-1 là do sự tiếp xúc với tia UV hoặc tình

trạng viêm gây ra.

(8) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục (7), trong đó tia UV là UVB.

(9) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), trong đó chất ức chế được sử dụng trên biểu bì.

(10) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), trong đó chất ức chế được sử dụng dưới da.

(11) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10), trong đó chất ức chế được sử dụng để ngăn ngừa hoặc cải thiện tình trạng lão hóa da.

(12) Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục (11), trong đó quá trình lão hóa da được biểu hiện ở việc da có nếp nhăn hoặc bị chảy xệ.

(13) Chế phẩm ngoài da chứa chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (9).

(14) Sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo mục bất kỳ trong số các điểm từ (1) đến (9) để sản xuất chế phẩm ngoài da.

(15) Phương pháp xử lý da không phải là phương pháp điều trị bệnh, bao gồm việc sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (12) hoặc chế phẩm ngoài da theo mục (13).

Tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, việc sử dụng chất chiết thu được từ loài thực vật cụ thể như *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata*, hoặc *Robinia pseudoacacia* làm cho có thể ức chế rõ rệt quá trình sản sinh MMP-1. Tác dụng ức chế này tác động hiệu quả đến việc cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1, mà đã được phát hiện bởi các tác giả sáng chế, trong điều kiện môi trường bình thường như tiếp xúc với tia UV và/hoặc tình trạng viêm. Theo sáng chế, sự thoái hóa của chất nền ngoại bào trong hạ bì, cụ thể là collagen, do quá trình sản sinh MMP-1 có thể bị ức chế và do đó sáng chế thể hiện tác dụng chống lão hóa tuyệt vời. Cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm ngoài da có tác dụng chống lão hóa tuyệt vời. Khi chất chiết được kết hợp với chất khác, như chất làm trắng, chất chống oxy hóa,

chất chống viêm, chất hoạt hóa tế bào, chất làm ẩm, chất ức chế UV, có thể mong đợi có được tác dụng chống lão hóa cao hơn nhiều. Tác dụng rất tốt nêu trên không thể dự đoán được từ tình trạng kỹ thuật trước đó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị minh họa quá trình sản sinh IL-1 β bởi tế bào sừng biểu bì được chiếu tia UVB. Các tế bào sừng biểu bì hợp dòng của người được chiếu UVB trong từ 0 đến 60 giây. Nồng độ của IL-1 β trong môi trường nuôi cấy sau 24 giờ (◆) hoặc 72 giờ (■) được định lượng.

Fig. 2 là đồ thị minh họa quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da với sự có mặt của IL-1 β . Nguyên bào sợi hợp dòng của da người được xử lý bằng IL-1 β trong 24 giờ. Sau đó, lượng tiền MMP-1 trong môi trường nuôi cấy được định lượng để thu được lượng MMP-1 sinh ra.

Fig. 3 là đồ thị minh họa tác dụng của mỗi chất chiết thực vật đến việc ức chế quá trình sản sinh các gốc oxy phản ứng (ROS) gây ra bởi hydro peroxit. AG: chất chiết từ *Withania somnifera*; PF: chất chiết từ *Passiflora incarnata*; và NAC: N-acetylxystein. **: P < 0,01 so với đối chứng; #: P < 0,05 so với chỉ bổ sung hydro peroxit; và ##: P < 0,01 so với chỉ bổ sung hydro peroxit.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1

Sáng chế đề xuất chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa chất chiết thực vật làm thành phần hoạt tính.

Như được sử dụng trong bản mô tả, chất chiết thực vật nghĩa là chất chiết có nguồn gốc thực vật mà có thể ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Thực vật dùng làm nguyên liệu thô cho chất chiết thực vật được phát hiện bằng cách sàng lọc nhiều loài cây khác nhau và có thể là một hoặc hai hoặc nhiều loài cây được chọn từ nhóm gồm *Withania somnifera* (sâm Ấn Độ), *Passiflora incarnata*, và *Robinia pseudoacacia* (bồ kết ba gai). Từng loài cây sẽ được mô tả dưới đây.

Withania somnifera là cây trong họ Solanaceae, và lá hoặc rễ của nó từ lâu đã được sử dụng như một loại thuốc kéo dài tuổi thọ "Sarayan" ở Ayurveda (thuốc cổ truyền

của Ấn Độ). Theo sáng chế, tốt hơn nếu rễ có thể được sử dụng. *Passiflora incarnata* là cây trong họ Passifloraceae, và phần nằm trên mặt đất của nó được gọi là "hoa lạc tiên" (passion flower) và là cây thuốc được sử dụng cho chứng loạn thần kinh lo âu và/hoặc chứng mất ngủ ở châu Âu. Theo sáng chế, tốt hơn nếu phần nằm trên mặt đất này có thể được sử dụng. *Robinia pseudoacacia* là cây trong họ Leguminosae và còn được gọi là "cây dương hòe" (false acacia). Theo sáng chế, tốt hơn nếu hoa của nó được sử dụng.

Tốt hơn nếu sử dụng các phần của mỗi cây nêu trên làm nguyên liệu thô của chất chiết thực vật được sử dụng trong bản mô tả này, nhưng không giới hạn ở các phần này. Tất cả các phần như chồi, hoa, quả, vỏ quả, hạt, lá, cành, thân, vỏ cây, rễ, vỏ rễ, các phần nằm trên mặt đất, và toàn bộ cây cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô. Ngoài các phần ưu tiên nêu trên, một hoặc hai hoặc nhiều hơn hai phần được chọn từ tất cả các phần nêu trên có thể được sử dụng cùng nhau.

Thân cây làm nguyên liệu thô có thể được sử dụng ở trạng thái tươi hoặc khô và có thể được xử lý (ví dụ, đem đi nghiền, cắt vụn, tạo thành bột), nếu cần, để sử dụng. Ngoài ra, nếu thân cây có sẵn dưới dạng thuốc chưa qua xử lý, thuốc chưa qua xử lý này có thể được sử dụng trực tiếp.

Chất chiết thực vật có thể thu được bằng cách chiết trực tiếp sử dụng dung môi từ thực vật làm nguyên liệu thô. Ví dụ về dung môi chiết bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nước, rượu, rượu polyhydric lỏng (ví dụ, 1,3-butylen glycol, propylen glycol, glyxerin), keton (ví dụ, axeton, metyl etyl keton), và este (ví dụ, etyl axetat, butyl axetat). Trong bản mô tả này, rượu thấp chứa 1 đến 4 nguyên tử cacbon tốt hơn nếu là các rượu. Ví dụ về rượu này gồm metanol, etanol, propanol và butanol. Dung môi chiết này có thể được sử dụng một mình hoặc bằng cách trộn hai hoặc nhiều dung môi. Ngoài ra, dung môi sử dụng trong sáng chế có thể chứa các thành phần khác bất kỳ miễn là hiệu quả chiết và tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1 của chất chiết thực vật thu được không bị giảm đáng kể.

Theo phương án về quy trình tạo ra chất chiết thực vật bằng cách sử dụng dung môi, thực vật làm nguyên liệu thô được đem đi xử lý bằng cách sử dụng dung môi chứa rượu để thu được chất chiết thực vật. Nồng độ rượu không bị giới hạn cụ thể miễn là chất chiết thực vật thu được có thể thể hiện tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Nồng độ rượu trong dung môi chiết nằm trong khoảng từ 10 đến 100% theo thể tích và

tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 70% theo thể tích. Tốt hơn là, dung dịch rượu chứa nước có thể được sử dụng làm dung môi chứa rượu. Theo sáng chế, tốt hơn là etanol được sử dụng làm rượu xét về khía cạnh an toàn.

Phương pháp chiết đối với nguyên liệu thô thực vật không bị giới hạn cụ thể và có thể được thiết lập một cách thích hợp, nếu muốn, theo một quy trình đã biết. Ví dụ, nguyên liệu thô thực vật được ngâm trong dung môi sao cho dung môi được tiếp xúc với nguyên liệu thô của cây, và hỗn hợp này có thể, nếu cần, được để yên, được khuấy, hoặc gia nhiệt trong điều kiện hồi lưu. Nhiệt độ chiết không bị giới hạn cụ thể và có thể được xác định thích hợp tùy vào nhiệt độ dung môi, nhưng có thể được đặt ở nhiệt độ thấp hơn điểm sôi của dung môi xét về khía cạnh xử lý. Ngoài ra, có thể thiết lập các điều kiện như áp suất tăng hoặc giảm nếu cần.

Thời gian chiết có thể được thiết lập thích hợp tùy vào loại nguyên liệu thô thực vật được sử dụng và loại và lượng dung môi chiết. Lượng này thường có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 phần trọng lượng, tốt hơn là từ 1 đến 100 phần trọng lượng, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 phần trọng lượng, với mỗi phần trọng lượng của nguyên liệu thô thực vật. Thời gian chiết thường có thể nằm trong khoảng từ 10 phút đến 1 tháng và tốt hơn là từ 10 phút đến khoảng 7 ngày. Ngoài ra, khi nước nóng được sử dụng làm dung môi, lượng dung môi này thường có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 phần trọng lượng, tốt hơn là từ 1 đến 100 phần trọng lượng, và tốt hơn nữa là từ 1 đến 10 phần trọng lượng, với mỗi phần trọng lượng của nguyên liệu thô. Thời gian chiết thường có thể nằm trong khoảng từ 10 phút đến 7 ngày, tốt hơn là từ 10 phút đến khoảng 1 ngày, và tốt hơn nữa là từ 10 phút đến khoảng 1 giờ.

Đối với chất chiết thực vật theo sáng chế, sau thao tác chiết ở trên là bước tách phần bã của chất chiết để thu được chất chiết ở dạng lỏng. Dùng làm phương pháp tách này, quy trình đã biết, như quy trình lọc và ly tâm có thể được sử dụng. Theo sáng chế, chất chiết lỏng nêu trên được sử dụng trực tiếp. Theo cách khác, từ nhiều quan điểm khác nhau về việc điều chỉnh tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1, thuận tiện trong vận chuyển, hoặc thuận tiện trong việc bảo quản, v.v., sản phẩm cô hoặc sản phẩm khô (nguyên liệu khô được cô) của chất chiết lỏng nêu trên có thể thu được và sử dụng nếu cần thiết. Việc cô đặc có thể được thực hiện trong điều kiện áp suất thường hoặc áp suất giảm, và thể tích của chất lỏng cô thu được có thể được điều chỉnh đến khoảng

10 đến 50% thể tích và tốt hơn là khoảng từ 10 đến 30% thể tích của thể tích chất chiết lỏng trước khi cô. Nguyên liệu rắn khô có thể thu được bằng cách làm khô chất chiết lỏng trong điều kiện áp suất giảm để loại bỏ dung môi.

Ngoài ra, chất chiết thực vật có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp ngoài phương pháp sử dụng dung môi nêu trên. Ví dụ, sản phẩm thu được bằng cách chưng cất hơi nước; sản phẩm thu được bằng cách chiết cacbon dioxide sử dụng quy trình chiết siêu tới hạn; chất chiết thu được bằng cách bổ sung dung môi vào chất lỏng (nước ép) và/hoặc phần bã, mà thu được bằng cách ép; và bản thân chất lỏng; được bao gồm trong chất chiết thực vật được xác định theo sáng chế. Ngoài ra, chất chiết thực vật theo sáng chế có thể, nếu cần, được tách chiết và được tinh chế bằng, ví dụ, sắc ký cột.

Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng cho đối tượng bất kỳ, mà sản sinh ra MMP-1, và do đó ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Ở đây, sự ức chế quá trình sản sinh MMP-1 không bị giới hạn ở việc ức chế hoàn toàn quá trình sản sinh MMP-1, và bao gồm cả việc ức chế sự sản sinh quá mức MMP-1. Như vậy, chỉ cần ức chế một phần quá trình sản sinh MMP-1 là đủ. Như được sử dụng trong bản mô tả, "đối tượng" nghĩa là động vật có vú, tốt hơn nếu là người.

Các ví dụ về mô, mà sản sinh MMP-1, có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, da. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 ở da. Ở đây, da gồm có lớp sừng, biểu bì, màng đáy, và hạ bì. MMP-1 chủ yếu được sinh ra ở hạ bì. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 ở hạ bì. Ngoài ra, MMP-1 ở da được sản sinh bởi các tế bào có mặt trong hạ bì. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 bởi các tế bào có mặt trong hạ bì. Ngoài ra, ở hạ bì, các tế bào sản sinh MMP-1 thường là nguyên bào sợi. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi có mặt trong hạ bì.

Ở da, MMP-1 được sản sinh liên tục và liên quan đến việc điều tiết quá trình chuyển hóa ở da. Trong khi đó, đã biết rằng MMP-1 được sản sinh quá mức bởi tác nhân kích thích và liên quan đến nhiều loại bệnh khác nhau. Ở đây, các ví dụ về tác nhân kích thích bao gồm tia UV và tình trạng viêm, đối với da. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 ở hạ bì

gây ra do sự tiếp xúc với tia UV của da hoặc tình trạng viêm da. Ở đây, tia UV đã biết là gồm UVA và UVB, có các bước sóng khác nhau. UVA xuyên qua biểu bì để đến được hạ bì và có vẻ là tác động lên nguyên bào sợi của da để cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1. Ngược lại, UVB được cho là khó đến được hạ bì và do đó có vẻ là không thể tác động trực tiếp lên nguyên bào sợi của da để cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1. Tức là, nếu UVB tiếp xúc với da cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1 trong hạ bì, được cho là yếu tố khác có liên quan. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế tốt hơn nếu có thể sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 ở da được cảm ứng bởi sự tiếp xúc với UVB của da.

Tài liệu phi sáng chế 1 báo cáo rằng sự tiếp xúc với UVB tác động đến quá trình sản sinh MMP-1. Trong báo cáo này, việc xét nghiệm được thực hiện trong đó nguyên bào sợi của da được chiếu trực tiếp tia UVB. Tuy nhiên, như đã mô tả ở trên, ngay cả khi da được chiếu tia UVB, tia UVB cũng khó đến được hạ bì. Do đó, báo cáo của tài liệu phi sáng chế 1 không thể được cho là phản ánh điều kiện trong đó da được tiếp xúc với tia UVB ở điều kiện môi trường bình thường. Trong khi đó, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng việc tiếp xúc với UVB làm cho các tế bào biểu bì da (ví dụ, tế bào sừng biểu bì) sản sinh IL-1 β và ROS. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng nhận thấy rằng IL-1 β ngoại sinh kích thích quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da. Cũng đã biết rằng khi ROS xuất hiện trong da, tháp dẫn truyền tín hiệu (MAPK) mà cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1 có thể được hoạt hóa (Hyeon Ho Kim et al., Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (2005)). Các vấn đề này gợi ý rằng việc tiếp xúc với tia UVB của da làm cho các tế bào biểu bì sản sinh IL-1 β và/hoặc ROS, mà có thể cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da. Do đó, chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế quá trình sản sinh MMP-1 ở da được điều biến bởi IL-1 β và/hoặc ROS sinh ra do việc tiếp xúc với tia UVB của da. Ở đây, IL-1 β và/hoặc ROS được sản sinh bởi các tế bào biểu bì. Các ví dụ của các tế bào biểu bì gồm tế bào sừng biểu bì.

Thời điểm để sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, khi chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế được sử dụng trước khi bắt đầu quá trình sản sinh MMP-1, quá trình sản sinh MMP-1 có thể được ức chế theo cách phòng ngừa. Trường hợp khác, khi chất ức chế quá trình

sản sinh MMP-1 theo sáng chế được sử dụng sau khi bắt đầu quá trình sản sinh MMP-1, lượng MMP-1 sinh ra có thể được giảm. Tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1 này làm cho có thể ngăn chặn sự thoái hóa của collagen, cụ thể là collagen typ I.

Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể được sử dụng theo cách bất kỳ miễn là hiệu quả ức chế quá trình sản sinh MMP-1 có thể được thể hiện. Tốt hơn là, ví dụ, chất ức chế có thể được sử dụng bằng cách bôi, dán, hoặc xịt, v.v. Ví dụ ưu tiên khác là, chất ức chế có thể được sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Tuy nhiên, cách thức sử dụng không bị giới hạn ở các ví dụ trên. Liều dùng chất ức chế có thể là lượng cho hiệu quả ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Chất ức chế có thể được sử dụng một lần một ngày hoặc thành nhiều liều. Khoảng thời gian sử dụng có thể là một hoặc nhiều ngày. Lượng liều dùng thích hợp, số lượng liều, và khoảng thời gian sử dụng chất ức chế có thể được xác định theo các tình trạng (ví dụ, độ tuổi, giới tính, triệu chứng) của đối tượng (ví dụ, người) nhận chất ức chế, và các điều kiện khác.

Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể sử dụng để, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa hoặc cải thiện tình trạng lão hóa da. MMP-1 phân hủy collagen typ I ở da và do đó liên quan đến sự thoái hóa hoặc sự suy biến chất nền ngoại bào. Sự thoái hóa và suy biến chất nền ngoại bào ở da gây ra tình trạng da có nếp nhăn hoặc bị chảy xệ. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo sáng chế có thể ức chế quá trình sản sinh MMP-1 và do đó có thể sử dụng để, ví dụ, ngăn ngừa hoặc cải thiện tình trạng da có nếp nhăn hoặc bị chảy xệ.

Chế phẩm ngoài da

Theo sáng chế, chế phẩm ngoài da chứa chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 mô tả ở trên được đề xuất. Chế phẩm ngoài da có thể được sử dụng để, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa hoặc cải thiện tình trạng lão hóa da và ngăn ngừa hoặc cải thiện việc da có nếp nhăn hoặc bị chảy xệ.

Chế phẩm ngoài da theo sáng chế có thể được sử dụng bằng phương pháp bất kỳ miễn là có thể biểu hiện tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Tốt hơn là, ví dụ, chế phẩm ngoài da có thể được sử dụng bằng cách bôi, dán, hoặc xịt lên da, v.v. Ví dụ ưu tiên khác là, chế phẩm ngoài da có thể được sử dụng bằng cách tiêm dưới da. Tuy nhiên, phương pháp sử dụng không bị giới hạn ở các ví dụ này. Liều dùng chế phẩm ngoài da có thể là lượng cho hiệu quả ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Chế phẩm ngoài

da có thể được sử dụng một lần một ngày hoặc thành nhiều liều. Ngoài ra, khoảng thời gian sử dụng có thể là một hoặc nhiều ngày. Lượng liều dùng thích hợp, số lượng liều, và khoảng thời gian sử dụng của chế phẩm ngoài da có thể được xác định theo các tình trạng (ví dụ, độ tuổi, giới tính, triệu chứng) của đối tượng (ví dụ, người) nhận chế phẩm ngoài da, và các điều kiện khác.

Chế phẩm ngoài da theo sáng chế có thể còn chứa chất nền công thức chấp nhận được. Ở đây, các ví dụ về chất nền công thức chấp nhận được, ưu tiên bao gồm các thành phần được chấp nhận để sử dụng cho người hoặc động vật. Chất nền công thức bất kỳ có thể được cho phép miễn là tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1 không bị giảm đáng kể. Các ví dụ gồm vitamin như vitamin E và vitamin C, nước, rượu, đường, tá dược, chất gây rã, chất gắn kết, chất làm trơn, chất nhũ hóa, chất trương lực (chất bổ), chất đệm, chất trợ tan, chất bảo quản, chất thúc đẩy hấp thụ, chất làm ổn định, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất che vị, hương liệu, chất làm đông, chất biến đổi pH, chất làm đặc, chất chiết dạng bột, thuốc chưa qua xử lý, nhiều loại mỹ phẩm khác nhau, chất chelat, muối vô cơ, dung dịch dầu, chất hoạt động bề mặt, chất tăng cường tuần hoàn máu, chất kháng khuẩn và chất khử vi trùng, và chất chiết từ nhiều loài động vật, thực vật, và vi sinh vật khác nhau. Có thể lựa chọn, từ các chất nền công thức này, và sử dụng chất phù hợp với mục đích sử dụng. Ví dụ, khi chế phẩm ngoài da theo sáng chế được sử dụng làm mỹ phẩm, có thể chọn, từ các chất nền công thức ở trên, và kết hợp các chất mà có thể được sử dụng cho mỹ phẩm và/hoặc thuốc dùng không cần theo chỉ dẫn của bác sĩ. Ví dụ, khi chế phẩm ngoài da theo sáng chế được sử dụng làm dược chất, có thể chọn, từ các chất nền công thức, và kết hợp các chất mà có thể được sử dụng cho các dược chất dùng bên ngoài.

Chế phẩm ngoài da theo sáng chế có thể ở dạng thích hợp tùy vào mục đích sử dụng. Khi chế phẩm ngoài da được sử dụng làm mỹ phẩm, các ví dụ dạng chế phẩm này gồm nhũ tương, kem, nước dưỡng da, gói, màng, chất làm sạch, kem nền, thuốc mỡ, và sol khí. Theo trường hợp khác, khi chế phẩm ngoài da theo sáng chế được sử dụng làm dược chất, chế phẩm này có thể ở dạng bất kỳ như nhũ tương, kem, dung dịch nước, bột nhão, màng, chất làm sạch, thuốc mỡ, và sol khí.

Chế phẩm ngoài da theo sáng chế có thể được kết hợp với thành phần khác có tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Các ví dụ về thành phần khác này bao gồm

chất làm trắng, chất chống oxy hóa, chất chống viêm, chất hoạt hóa tế bào, chất làm ẩm, và chất ức chế UV. Ở đây, việc kết hợp không chỉ là trộn thành phần khác với chế phẩm ngoài da theo sáng chế, mà còn là sử dụng thành phần khác này riêng rẽ với chế phẩm ngoài da theo sáng chế, trước, sau, hoặc cùng thời điểm sử dụng chế phẩm ngoài da theo sáng chế.

Các vấn đề khác

Sáng chế đưa ra việc sử dụng chất chiết thực vật để sản xuất chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Sáng chế còn đưa ra việc sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 để sản xuất chế phẩm ngoài da. Sáng chế đề xuất phương pháp xử lý da không nhằm điều trị bệnh, bao gồm việc sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo phương án của sáng chế cho da của đối tượng cần sử dụng. Ở đây, các phương án về chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1, chất chiết thực vật, chế phẩm ngoài da, và đối tượng là như đã được mô tả ở trên. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "không nhằm điều trị bệnh" không nhắm đến các điều trị trong y tế như điều trị bệnh hoặc rối loạn, mà nhằm đến việc xử lý bằng mỹ phẩm hoặc làm đẹp để đem lại vẻ đẹp cho làn da và duy trì vẻ đẹp đó bằng cách ngăn ngừa hoặc cải thiện tình trạng lão hóa da (ví dụ, các nếp nhăn hoặc tình trạng da chảy xệ).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, sáng chế còn được mô tả bằng cách tham khảo các ví dụ cụ thể. Các ví dụ không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thử nghiệm 1. Chiếu tia UVB làm cho tế bào sừng biểu bì sản sinh ra IL-1 β

Tế bào sừng biểu bì của người trưởng thành bình thường (NHEK-AD; được mua từ KURABO INDUSTRIES LTD.) được dùng để đánh giá việc sản sinh IL-1 β ở các tế bào sừng biểu bì do việc tiếp xúc với tia UVB. Các tế bào được gieo lên các đĩa nuôi cấy 35 mm và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường khí 5% thể tích CO₂ cho đến khi các tế bào hợp dòng. Các tế bào được chiếu tia UVB ở 0,130 mJ/cm² trong từ 0 đến 60 giây. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được gom lại từ môi trường nuôi cấy ở thời điểm 24 và 72 giờ sau khi chiếu tia UVB, và IL-1 β tiết vào môi trường nuôi cấy được định lượng. Kit ELISA định lượng IL-1 β (sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được dùng để định lượng IL-1 β theo tờ hướng dẫn đính kèm (Fig.

1).

Khi thời gian chiếu UVB lâu hơn, lượng IL-1 β sinh ra bởi tế bào sừng biểu bì được thấy là tăng lên. Khi thời gian chiếu UVB vượt quá 20 giây, cụ thể, lượng IL-1 β sinh ra tăng lên rõ rệt. Xu hướng này được quan sát thấy ở cả hai thời điểm 24 giờ và 72 giờ sau khi chiếu UVB. Ngoài ra, ở thời điểm 72 giờ sau khi chiếu UVB, IL-1 β được thấy là tích tụ nhiều hơn.

Ví dụ thử nghiệm 2. IL- β khiến cho nguyên bào sợi của da sản sinh MMP-1

Nguyên bào sợi ở da người mới sinh bình thường (NHDF-NB; được mua từ KURABO INDUSTRIES LTD.) được dùng làm nguyên bào sợi của da và được kiểm tra bằng cách sử dụng lượng MMP-1 sinh ra làm chỉ số. Nguyên bào sợi của da được gieo lên đĩa 24 giếng và được nuôi cấy ở 37°C và trong môi trường khí 5% thể tích CO₂ cho đến khi các tế bào hợp dòng. Bổ sung IL-1 β ở nồng độ cuối 0, 30, 100, 300, hoặc 1000 pg/mL vào môi trường nuôi cấy và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau khi nuôi cấy, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được gom lại để định lượng tiền MMP-1 đã tiết vào môi trường nuôi cấy. Kit ELISA định lượng (sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được dùng để định lượng tiền MMP-1 theo tờ hướng dẫn đính kèm (Fig. 2) để tính toán lượng MMP-1 sinh ra.

Kết quả chứng minh rằng sự có mặt của IL-1 β làm cho nguyên bào sợi của da sản sinh ra MMP-1. Lượng MMP-1 sinh ra tăng theo sự tăng nồng độ IL-1 β . Kết quả này cùng với các kết quả từ ví dụ thử nghiệm 1 gợi ý một loạt các quy trình trong đó việc tiếp xúc với tia UVB của da làm cho tế bào sừng biểu bì sản sinh IL-1 β ; IL-1 β cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da; và MMP-1 xúc tác sự thoái hóa collagen.

Ví dụ điều chế 1. Chuẩn bị chất chiết có nguồn gốc thực vật

Đầu tiên, 8 cây khác nhau được chọn bằng cách sàng lọc nhiều đối tượng thực vật khác nhau được đem đi chiết bằng etanol để tạo ra từng chất chiết. Một phần của từng nguyên liệu đã nghiền của *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata*, *Robinia pseudoacacia*, *Peucedanum japonicum*, *Calluna vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Adinandra nitida*, và *Sambucus nigra* được ngâm trong 10 phần (trọng lượng/thể tích) của etanol 70% thể tích. Hỗn hợp được khuấy một lần một ngày ở nhiệt độ trong phòng

và được đem đi chiết trong 7 ngày. Sau đó, hỗn hợp được lọc và phần còn lại được loại bỏ để thu được chất chiết. Chất chiết này được cô, sau đó làm đông khô để thu được chất chiết etanol của từng cây. Chất chiết thực vật được sử dụng trong các ví dụ.

Ví dụ thử nghiệm 3. Hiệu quả ức chế quá trình sản sinh MMP-1

Hiệu quả ức chế quá trình sản sinh MMP-1 của mỗi chất chiết có nguồn gốc thực vật được kiểm tra. Phôi tử PPAR δ được dùng làm đối chứng dương và hiệu quả này được kiểm tra tương tự. Nguyên bào sợi của da người mới sinh bình thường (NHDF-NB; được mua từ KURABO INDUSTRIES LTD.) được dùng làm nguyên bào sợi của da để kiểm tra lượng MMP-1 sinh ra dưới dạng chỉ số.

Nguyên bào sợi của da được gieo lên đĩa 24 giếng và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường khí 5% thể tích CO₂ cho đến khi các tế bào hợp dòng. Sau đó, các thành phần sau được bổ sung:

- Phôi tử PPAR δ GW501516 (sản xuất bởi EnzoLife Sciences, Inc.) được hòa tan trong DMSO;

- Chất chiết thực vật (xem trong ví dụ điều chế 1) thu được từ mỗi trong số 8 cây khác nhau được hòa tan trong DMSO; hoặc

- Không bổ sung thêm (chỉ dung dịch DMSO).

Đối với nồng độ của mỗi thành phần được bổ sung vào dung dịch nuôi cấy, nồng độ của GW501516 là 25nM, nồng độ của mỗi chất chiết thực vật là 10 μ g/mL, và nồng độ của DMSO là 0,1%. Sau 24 giờ nuôi cấy, bổ sung IL-1 β ở nồng độ cuối là 100 pg/mL vào môi trường nuôi cấy. Ở đây, một số giếng chỉ chứa dung dịch DMSO không được bổ sung IL-1 β và các giếng này được dùng làm đối chứng. Sau 48 giờ nuôi cấy, chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được gom lại để định lượng tiền MMP-1 tiết vào môi trường nuôi cấy để tính toán lượng MMP-1 sinh ra. Tiền MMP-1 được định lượng bằng cách sử dụng kit ELISA định lượng (sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) theo tờ hướng dẫn đính kèm. Các kết quả định lượng được biểu diễn dưới dạng giá trị tương đối (%) so với lượng MMP-1 sinh ra trong đối chứng (100%) (Bảng 1).

Bảng 1

	Nồng độ của chất chiết thực vật được bổ sung ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ của IL-1 β được bổ sung (pg/ml)	Lượng MMP-1 sinh ra (giá trị tương đối)
Đối chứng	0	0	$100 \pm 12,2$
Chỉ bổ sung IL-1 β	0	100	$220,0 \pm 9,2$
GW501516 25nM	0	100	$165,2 \pm 6,8$
<i>Withania somnifera</i>	10	100	$147,1 \pm 1,5$
<i>Passiflora incarnata</i>	10	100	$200,2 \pm 1,3$
<i>Robinia pseudoacacia</i>	10	100	$205,6 \pm 1,8$
<i>Peucedanum japonicum</i>	10	100	$240,2 \pm 1,2$
<i>Calluna vulgaris</i>	10	100	$256,4 \pm 1,4$
<i>Pimpinella anisum</i>	10	100	$256,1 \pm 9,4$
<i>Adinandra nitida</i>	10	100	$281,8 \pm 3,4$
<i>Sambucus nigra</i>	10	100	$417,6 \pm 9,5$

Khi chỉ bổ sung IL-1 β vào nguyên bào sợi của da, lượng MMP-1 sinh ra là khoảng 220% (bằng 2,2 lần lượng đối chứng). Khi các tế bào được xử lý bằng GW501516 trước khi bổ sung IL-1 β , lượng MMP-1 sinh ra là $165,2 \pm 6,8\%$. Kết quả này chứng minh rằng quá trình sản sinh MMP-1 gây ra do IL-1 β bị ức chế bởi GW501516.

Trong khi đó, khi tám loại chất chiết có nguồn gốc thực vật khác nhau được đem đi thử nghiệm, năm chất chiết thực vật khác nhau thu được từ *Peucedanum japonicum*, *Calluna vulgaris*, *Pimpinella anisum*, *Adinandra nitida*, và *Sambucus nigra* được dùng để xử lý các tế bào, lượng MMP-1 sinh ra cao hơn khá nhiều so với khi chỉ bổ sung IL-1 β . Ngược lại, khi ba loại chất chiết thực vật thu được từ *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata*, và *Robinia pseudoacacia* được dùng để xử lý các tế bào, quá trình sản sinh MMP-1 gây ra do IL-1 β bị ức chế mạnh. Lượng MMP-1 sinh ra, khi ba chất

chiết thực vật khác nhau này được sử dụng trong việc xử lý, lần lượt là $147,1 \pm 1,5\%$, $200,2 \pm 1,3\%$, và $205,6 \pm 1,8\%$, thấp hơn đáng kể so với khi chỉ bổ sung IL-1 β . Được chứng minh rằng tác dụng ức chế của chất chiết thực vật thu được từ *Withania somnifera* đến quá trình sản sinh MMP-1 là vượt trội so với tác dụng này của GW501516. Hoàn toàn bất ngờ là, trong số các chất chiết thực vật được đem đi thử nghiệm, chỉ ba chất chiết thực vật khác nhau thu được từ *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata*, và *Robinia pseudoacacia* ức chế mạnh quá trình sản sinh MMP-1.

Ví dụ thử nghiệm 4. Tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1 của chất chiết thực vật

Ba chất chiết thực vật khác nhau, đã được chứng minh là ức chế quá trình sản sinh MMP-1 trong ví dụ thử nghiệm 3, được kiểm tra thêm.

Cùng điều kiện như trong ví dụ thử nghiệm 3 được sử dụng trong thử nghiệm này ngoại trừ việc nồng độ của mỗi chất chiết thực vật trong môi trường nuôi cấy được thiết lập là 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ và 10 $\mu\text{g/mL}$. Lượng MMP-1 sinh ra được biểu diễn dưới dạng giá trị tương đối (%) so với lượng MMP-1 sinh ra trong đối chứng (100%) (bảng 2).

Bảng 2

	Nồng độ của chất chiết thực vật được bổ sung ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ của IL-1 β được bổ sung (pg/ml)	Lượng MMP-1 sinh ra (giá trị tương đối)
Đối chứng	0	0	$100 \pm 4,4$
Chỉ bổ sung IL-1 β	0	100	$445,8 \pm 12,2$
<i>Withania somnifera</i>	2,5	100	$233,2 \pm 8,2$
	5	100	$185,5 \pm 6,7$
	10	100	$122,2 \pm 3,2$
<i>Passiflora incarnata</i>	2,5	100	$265,7 \pm 14,2$
	5	100	$309,7 \pm 9,3$
	10	100	$321,3 \pm 12,4$
	2,5	100	$287,7 \pm 3,7$

Robinia pseudoacacia	5	100	309,1 ± 11,6
	10	100	322,7 ± 10,5

Khi chỉ bổ sung IL-1 β vào nguyên bào sợi của da, lượng MMP-1 sinh ra là khoảng 446% (bằng 4,5 lần lượng đối chứng). Ở tất cả các nồng độ kiểm tra, bất kỳ chất chiết nào trong số ba chất chiết thực vật khác nhau này mà được đem đi kiểm tra đều ức chế rõ rệt quá trình sản sinh MMP-1. Các kết quả này chứng tỏ rằng các chất chiết thực vật thu được từ *Withania somnifera*, *Passiflora incarnata*, và *Robinia pseudoacacia* thể hiện tác dụng ức chế quá trình sản sinh MMP-1 rất tốt.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng sáng chế ức chế hiệu quả quá trình sản sinh MMP-1 bởi nguyên bào sợi của da, quá trình sản sinh nó được điều biến bởi xytokin viêm sinh ra trong các tế bào da tiếp xúc với UVB, khi da tiếp xúc với tia UV trong điều kiện môi trường bình thường.

Ví dụ thử nghiệm 5. Tác dụng của chất chiết thực vật đến việc ức chế quá trình sản sinh các gốc oxy phản ứng (ROS) gây ra do Hydro Peroxit (H₂O₂)

Đã được biết rằng khi da người được tiếp xúc với UVB, hydro peroxit (H₂O₂) được sinh ra (Hyeon Ho Kim et al., Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (2005)). Thử nghiệm này kiểm tra xem liệu sự kích thích hydro peroxit có làm sản sinh các gốc oxy phản ứng (ROS) hay không và mỗi chất chiết thực vật có ức chế quá trình sản sinh ROS không.

Nguyên bào sợi của da được gieo lên đĩa 24 giếng và được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường khí 5% thể tích CO₂ cho đến khi các tế bào hợp dòng.

Sau đó, các thành phần sau được bổ sung:

- Chất chống oxy hóa N-acetylxystein (sản xuất bởi Nacalai Tesque, Inc.) được hòa tan trong DMSO;
 - Phối tử PPAR δ GW501516 (sản xuất bởi EnzoLife Sciences, Inc.) được hòa tan trong DMSO;
 - Chất chiết thực vật (xem trong ví dụ điều chế 1) được hòa tan trong DMSO;
- hoặc

- Không bổ sung thêm (chỉ có dung dịch DMSO).

Đối với nồng độ của mỗi thành phần bổ sung vào dung dịch nuôi cấy, nồng độ của N-acetylxystein là 30 μ M hoặc 300 μ M, nồng độ của GW501516 là 25 nM, nồng độ của mỗi chất chiết thực vật là 10 μ g/mL hoặc 20 μ g/mL, và nồng độ của DMSO là 0,1%. Sau khi nuôi cấy trong 24 giờ, môi trường nuôi cấy được thay bằng môi trường nuôi cấy mới. Tiếp theo, hydro peroxit được bổ sung ở nồng độ cuối 10 μ M vào môi trường nuôi cấy. Sau đó, hàm lượng các gốc oxy phản ứng nội bào sau 10 phút được định lượng để tính toán lượng ROS sinh ra. ROS được định lượng bằng cách sử dụng kit thử nghiệm DCFDA (sản xuất bởi Abcam Inc.) theo tờ hướng dẫn đính kèm. Ở đây, một số giếng chỉ chứa dung dịch DMSO không có sự bổ sung H_2O_2 vào và các giếng này được dùng làm đối chứng. Các kết quả định lượng được biểu diễn dưới dạng giá trị tương đối (%) so với lượng ROS sinh ra trong đối chứng (100%) (Fig. 3).

Kết quả của đối chứng và kết quả của các tế bào không được bổ sung thành phần nào và chỉ bổ sung hydro peroxit chứng tỏ rằng khi các tế bào được kích thích bởi hydro peroxit, quá trình sản sinh ROS được gây ra. So với kết quả của các tế bào không được bổ sung thành phần nào và chỉ được bổ sung hydro peroxit, các vấn đề sau được chỉ ra:

- Chất chiết từ *Withania somnifera* và chất chiết từ *Passiflora incarnata* ức chế quá trình sản xuất ROS. Khi được bổ sung ở 20 μ g/ml, cả hai chất chiết đều ức chế đáng kể quá trình sản xuất ROS; và

- N-acetylxystein, được biết là chất chống oxy hóa, cũng ức chế quá trình sản xuất ROS. Khi được bổ sung ở 300 μ M, N-acetylxystein ức chế đáng kể quá trình sản xuất ROS. Lưu ý rằng GW501516 không thể hiện tác dụng ức chế quá trình sản xuất ROS.

Các kết quả nêu trên chỉ ra rằng chất chiết từ *Withania somnifera* và chất chiết từ *Passiflora incarnata* ức chế quá trình sản xuất ROS gây ra do sự kích thích hydro peroxit. Tác dụng này là ngang bằng với hoặc lớn hơn tác dụng của N-acetylxystein được biết là chất chống oxy hóa.

Hyeon Ho Kim và các đồng nghiệp (Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (2005)) gợi ý rằng khi da người được tiếp xúc với tia UV, hydro peroxit được sinh ra nhanh và đáng kể; và hàm lượng ROS tăng liên quan đến sự hoạt hóa thác dẫn truyền

tín hiệu (MAPK), cảm ứng quá trình sản sinh MMP-1. Nội dung trong bản mô tả này chỉ ra khả năng rằng chất chống oxy hóa như N-acetylxystein bắt giữ ROS và can thiệp vào việc hoạt hóa thác dẫn truyền tín hiệu nêu trên, nhờ đó ức chế quá trình sản sinh MMP-1. Các vấn đề này cùng với kết quả nêu trên gợi ý rằng chất chiết *Withania somnifera* và chất chiết *Passiflora incarnata* ức chế quá trình sản sinh MMP-1 bằng cách ức chế quá trình ROS gây ra bởi hydro peroxit.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 chứa chất chiết thực vật từ *Passiflora incarnata* làm thành phần hoạt tính, trong đó quá trình sản sinh MMP-1 là do biểu bì tiếp xúc với tia UV hoặc sự viêm biểu bì gây ra, và trong đó tia UV là UVB.
2. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm 1, trong đó chất chiết thực vật là chất chiết thực vật được chiết bằng cách sử dụng dung môi.
3. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm 2, trong đó dung môi là dung môi chứa rượu.
4. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chất ức chế được sử dụng trước hoặc sau khi bắt đầu quá trình sản sinh MMP-1.
5. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, ức chế quá trình sản sinh MMP-1 bởi các tế bào cấu thành da.
6. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm 5, trong đó các tế bào là nguyên bào sợi của da.
7. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó chất ức chế này còn chứa chất chiết từ rễ của *Withania somnifera* làm thành phần hoạt tính.
8. Chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó quá trình sản sinh MMP-1 là do IL- β được tạo ra từ việc biểu bì tiếp xúc với tia UV hoặc tình trạng viêm biểu bì gây ra.
9. Chế phẩm ngoài da để ngăn ngừa hoặc cải thiện sự lão hóa da chứa chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm 7, trong đó chế phẩm ngoài da này được dùng trên biểu bì và trong đó biểu bì tiếp xúc với tia UV hoặc ở tình trạng viêm.
10. Phương pháp xử lý da không phải là phương pháp điều trị bệnh, phương pháp này bao gồm bước sử dụng chất ức chế quá trình sản sinh MMP-1 theo điểm 7 hoặc chế phẩm ngoài da theo điểm 9 lên biểu bì, nhờ đó ngăn ngừa hoặc cải thiện sự lão hóa da, trong đó biểu bì tiếp xúc với tia UV hoặc ở tình trạng viêm.

Fig. 1

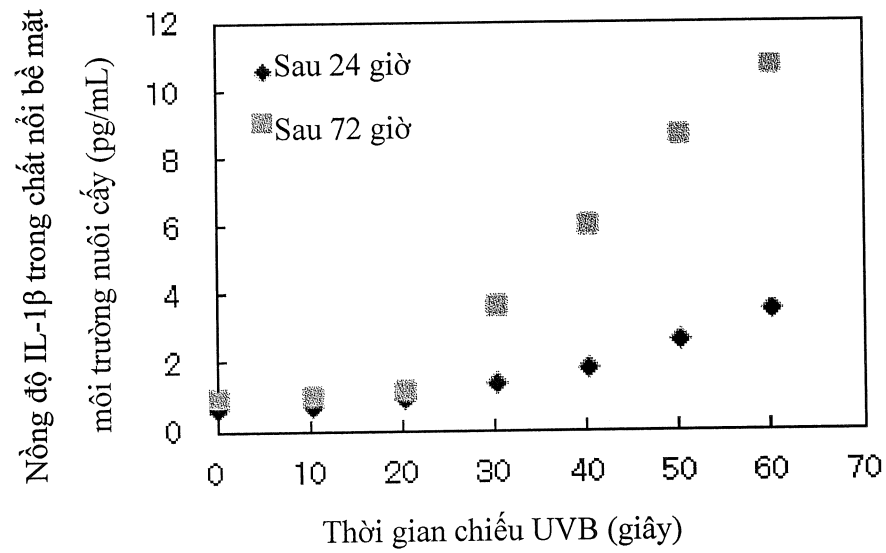


Fig. 2

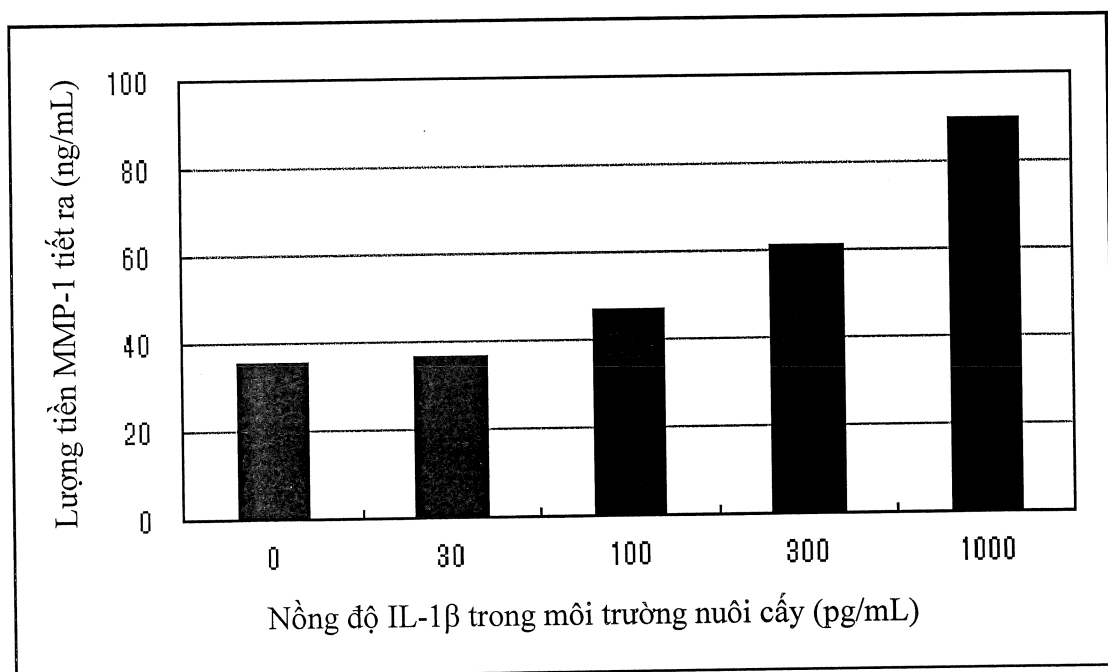


Fig. 3

