(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113365602 A
(43)申请公布日 2021.09.07

(21)申请号 201980087529.2
(22)申请日 2019.11.01
(30)优先权数据
62/754,995 2018.11.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/059553 2019.11.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/093022 EN 2020.05.07
(71)申请人 范德生物公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 S·米特拉约特里 E·施彭格勒 D·莱文森 D·R·沃古斯
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 林彦
(51)Int.Cl.
A61K 8/73(2006.01)
A61K 8/81(2006.01)
A61K 31/145(2006.01)
A61K 31/728(2006.01)
A61K 47/50(2006.01)

权利要求书7页 说明书39页 附图14页

(54)发明名称

交联材料

(57)摘要

本申请描述了可交联实体和交联材料的合成、调配和用途。

CN 113365602 A

1.一种系统,其包括:

第一和第二可交联实体,其特征在于:

(i)所述第一可交联实体包括缀合到第一交联部分的聚合物,其中所述聚合物任选地经由第一连接体缀合到所述第一交联部分;并且

(ii)所述第二可交联实体包括第二交联部分中的一或多个。

2.根据权利要求1所述的系统,其中所述聚合物是透明质酸HA聚合物。

3.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一交联部分选自由以下组成的群组:氰基苯并噻唑(CBT)及其类似物和衍生物。

4.根据权利要求1所述的系统,其中所述第二交联部分是二价或多价氨基硫醇或其衍生物。

5.根据权利要求4所述的系统,其中所述氨基硫醇选自由以下组成的群组:D-半胱氨酸、L-半胱氨酸及其类似物和衍生物。

6.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一连接体是氨基酸。

7.根据权利要求6所述的系统,其中所述氨基酸是甘氨酸。

8.根据权利要求1所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到一或多个聚合物部分、疏水性部分或其组合的所述第二交联部分。

9.根据权利要求8所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到聚合物的所述第二交联部分。

10.根据权利要求9所述的系统,其中所述聚合物选自由以下组成的群组:PEG、PEG-二胺、聚丙烯酸、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、聚己内酯(PCL)和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。

11.根据权利要求10所述的系统,其中所述聚合物是PEG。

12.根据权利要求1所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到多肽的所述第二交联部分。

13.根据权利要求1所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到小分子或氨基酸的所述第二交联部分。

14.根据权利要求13所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到乙二胺或其衍生物或类似物的所述第二交联部分。

15.根据权利要求13所述的系统,其中所述第二可交联实体包括缀合到赖氨酸或其衍生物或类似物的所述第二交联部分。

16.一种系统,其包括:

(i)聚合物,其缀合到选自由以下组成的群组的一或多个交联部分:CBT及其衍生物和类似物;和

(ii)二价或多价氨基硫醇。

17.根据权利要求16所述的系统,其中所述聚合物是HA。

18.根据权利要求16所述的系统,其中所述氨基硫醇选自由以下组成的群组:D-半胱氨酸、L-半胱氨酸及其类似物和衍生物。

19.根据权利要求16所述的系统,其中所述聚合物经由连接体缀合到所述一或多个交联部分。

20.根据权利要求19所述的系统,其中所述连接体是氨基酸。

21.根据权利要求20所述的系统,其中所述氨基酸是甘氨酸。

22.根据权利要求16所述的系统,其中所述氨基硫醇缀合到聚合物。

23.根据权利要求22所述的系统,其中所述聚合物是PEG。

24.根据权利要求16所述的系统,其中所述氨基硫醇缀合到多肽。

25.根据权利要求16所述的系统,其中所述氨基硫醇缀合到小分子或氨基酸。

26.根据权利要求25所述的系统,其中所述氨基硫醇缀合到乙二胺或其衍生物或类似物。

27.根据权利要求25所述的系统,其中所述氨基硫醇缀合到赖氨酸或其衍生物或类似物。

28.一种系统,其包括:

第一和第二可交联实体,其特征在于:

(i)每个实体:

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现渗透到皮肤中至少50微米;

(ii)当在生理条件下体外组合时,所述第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应,以形成交联材料,所述交联材料的特征在于:

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内;

(iii)当将所述可交联实体各自施用于皮肤表面上的部位时,在24小时、3天、7天、30天、60天或90天内观察到皮肤属性的统计学显著改善,所述皮肤属性选自由以下组成的群组:厚度、美感、水分含量、光滑度、弹性、光泽度、细纹皱纹、皮肤颜色、皮肤半透明度及其组合。

29.一种系统,其包括:

第一和第二可交联实体,其中:

(i)每个实体:

(a)其特征在于,当将其离体应用于完整皮肤时,其渗透到角质层中和/或其下方;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现渗透到皮肤中至少50微米;

(ii)当在生理条件下体外组合时,所述第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应,以形成交联材料,所述交联材料的特征在于:

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内;或

(b)分子量大于每个个别可交联实体的分子量的总和;并且

(iii)当将所述可交联实体各自施用于皮肤表面上的部位时,在24小时、3天、7天、30天、60天或90天内观察到皮肤属性的统计学显著改善,所述皮肤属性选自由以下组成的群组:厚度、美感、水分含量、光滑度、弹性、光泽度、细纹皱纹、皮肤颜色、皮肤半透明度及其组合。

30.一种系统,其包括:

彼此分开保持的第一和第二可交联实体,其中:

至少所述第一可交联实体:

包括缀合到交联部分的聚合物部分;并且

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现渗透到皮肤中至少50微米。

31.一种系统,其包括:

彼此分开保持的第一和第二可交联实体,其中:

至少所述第一可交联实体:

包括缀合到交联部分的聚合物部分;并且

(a)其特征在于,当将其离体应用于完整皮肤时,其渗透到角质层中和/或其下方;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现渗透到皮肤中至少50微米。

32.根据权利要求30所述的系统,其中所述第一和第二可交联实体的特征在于:

(i)当在生理条件下体外组合时,其在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应,以形成交联材料,所述交联材料的特征在于:

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内;并且

(ii)当将每一个施用于皮肤表面上的部位时,在24小时、3天、7天、30天、60天或90天内观察到皮肤属性的统计学显著改善,所述皮肤属性选自由以下组成的群组:厚度、视觉美感(即,光泽度、皱纹、皮肤颜色等)、水分含量、触觉美感(即,光滑度、丰满度等)、弹性及其组合。

33.根据权利要求30所述的系统,其中所述第一和第二可交联实体的特征在于:

(i)当在生理条件下体外组合时,其在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应,以形成交联材料,所述交联材料的特征在于:

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内;或

(b)分子量大于每个个别可交联实体的分子量的总和;并且

(ii)当将每一个施用于皮肤表面上的部位时,在24小时、3天、7天、30天、60天或90天内观察到皮肤属性的统计学显著改善,所述皮肤属性选自由以下组成的群组:厚度、视觉美感(即,光泽度、皱纹、皮肤颜色等)、水分含量、触觉美感(即,光滑度、丰满度等)、弹性及其组合。

34.根据权利要求30或权利要求32所述的系统,其包括具有分开的容器或隔室的器皿,其中所述第一和第二可交联实体中的每一个设置在所述分开的容器或隔室中的一个中。

35.根据权利要求34所述的系统,其中所述器皿包括盒,所述盒中设置有至少两个分开的容器。

36.根据权利要求34所述的系统,其中所述器皿包括其中具有至少两个分开的隔室的容器。

37.根据权利要求36所述的系统,其中所述容器被布置和构造成使得所述第一和第二可交联实体在递送期间组合。

38.根据权利要求36所述的系统,其中所述注射器被布置和构造成使得所述第一和第二可交联实体在递送期间保持分开。

39.根据权利要求29或32所述的系统,其中所述交联材料的特征进一步在于,在生理缓冲液中经3天的降解质量损失小于20%。

40.根据权利要求29或32所述的系统,其中所述交联材料的特征进一步在于,与在没有交联的情况下的一或两种可交联实体的降解相比,所述交联材料在暴露于模拟生理学降解

条件的体外条件下降解得更慢。

41.根据权利要求29所述的系统，其中所述可交联实体中的至少一个包括缀合到交联部分的聚合物部分。

42.根据权利要求41所述的系统，其中仅所述可交联实体中的一个包括聚合物部分。

43.根据权利要求30或权利要求41所述的系统，其中所述聚合物部分包括透明质酸部分。

44.根据权利要求43所述的系统，其中所述聚合物部分包括透明质酸部分，并且进一步包括提供增加的亲脂性的另外的部分。

45.根据权利要求29所述的系统，其中所述可交联实体中的每一个包括缀合到交联部分的聚合物部分。

46.根据权利要求45所述的系统，其中所述可交联实体中的每一个包括相同的聚合物部分。

47.根据权利要求45所述的系统，其中所述可交联实体中的每一个包括不同的聚合物部分。

48.根据权利要求29所述的系统，其中所述交联部分是或包括选自由以下组成的群组的部分：氰基苯并噻唑(CBT)、D-半胱氨酸、L-半胱氨酸及其类似物、衍生物及组合。

49.根据权利要求29所述的系统，其中所述交联部分是或包括选自由以下组成的群组的部分：二胺、肽、二硫醇、二酰肼及其组合。

50.根据权利要求29或权利要求32所述的系统，其中所述皮肤属性是厚度。

51.根据权利要求29或权利要求32所述的系统，其中所述皮肤属性是水分含量。

52.根据权利要求51所述的系统，其中与未经治疗的皮肤相比，在施用所述第一和第二可交联实体和水之后的所述皮肤的水分含量更高。

53.根据权利要求52所述的系统，其中所述水分含量高>20％。

54.根据权利要求53所述的系统，其中所述水分含量高>10％。

55.根据权利要求29或权利要求32所述的系统，其中所述皮肤属性得到改善，如通过整体美感改善量表所确定。

56.根据权利要求55所述的系统，其中所述皮肤属性在GAIS上的改善>1。

57.根据权利要求56所述的系统，其中所述皮肤属性在GAIS上的改善为约1到约3。

58.根据权利要求29或权利要求32所述的系统，其中所述皮肤属性是水分含量。

59.根据权利要求58所述的系统，其中与未经治疗的皮肤相比，所述皮肤的水分含量更高。

60.根据权利要求29所述的系统，其中每个实体的特征在于亲脂性足以实现皮肤渗透，所述亲脂性大于缺少所述交联部分的所述可交联实体。

61.根据权利要求29所述的系统，其中每个实体的特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其体外渗透到表皮中和/或其下方。

62.根据权利要求29所述的系统，其中每个实体的特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其体外渗透到真皮中和/或其下方。

63.根据权利要求29所述的系统，其中每个实体的特征在于，当将其离体应用于受损皮肤时，其体外渗透到表皮中和/或其下方。

64.根据权利要求29所述的系统，其中每一个的特征在于，当将其离体应用于受损皮肤时，其体外渗透到真皮中和/或其下方。

65.根据权利要求29所述的系统，其中每个实体的特征在于，其能够渗透所述皮肤到至少50微米的深度。

66.根据权利要求65所述的系统，其中每个实体的特征在于，其能够渗透所述皮肤到至少一个细胞层的深度。

67.一种改善皮肤属性的方法，所述方法包括以下步骤：

分别向皮肤施用第一和第二可交联实体，其特征在于：

(i)至少所述第一可交联实体包括缀合到交联部分的聚合物部分，并且：

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；或

(ii)所述第一和第二可交联实体中的每一个：

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透

使得在所述皮肤内生成交联材料。

68.一种改善皮肤属性的方法，所述方法包括以下步骤：

分别向皮肤施用第一和第二可交联实体，其特征在于：

(i)至少所述第一可交联实体包括缀合到交联部分的聚合物部分，并且：

(a)其特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；或

(ii)所述第一和第二可交联实体中的每一个：

(a)其特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透

使得在所述皮肤内生成交联材料。

69.一种改善皮肤属性的方法，所述方法包括以下步骤：

分别向皮肤施用第一和第二可交联实体，其特征在于：

(i)至少所述第一可交联实体包括缀合到交联部分的聚合物部分，并且：

(a)其特征在于，当将其离体应用于受损皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；或

(ii)所述第一和第二可交联实体中的每一个：

(a)其特征在于，当将其离体应用于受损皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透

使得在所述皮肤内生成交联材料。

70.根据权利要求67到69中任一权利要求所述的方法，其中所述方法进一步包括用增加皮肤渗透性的试剂或装置对所述皮肤进行预治疗或同时治疗。

71.根据权利要求70所述的方法，其中所述试剂或装置是或包括微针。

72.根据权利要求71所述的方法，其中所述微针含有所述第一可交联实体或所述第二可交联实体。

73.根据权利要求72所述的方法，其中所述可交联实体设置在所述微针的管腔内。

74.根据权利要求72或73所述的方法,其中所述可交联实体通过由所述微针注射来施用。

75.根据权利要求74所述的方法,其中所述微针由在应用之后溶解或降解的材料形成。

76.根据权利要求75所述的方法,其中所述可交联实体在所述微针溶解或降解时被释放。

77.一种改善皮肤属性的方法,所述方法包括以下步骤:

向皮肤部位施用第一可交联实体,其特征在于:

(i)所述第一实体:

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透

等待一段时间

向所述部位施用与所述第一可交联实体反应的第二可交联实体,使得在所述皮肤内生成交联材料。

78.一种改善皮肤属性的方法,所述方法包括以下步骤:

向皮肤部位施用第一可交联实体,其特征在于:

(i)所述第一实体:

(a)其特征在于,当将其离体应用于完整皮肤时,其渗透到角质层中和/或其下方;或

(b)其特征在于,亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透

等待一段时间

向所述部位施用与所述第一可交联实体反应的第二可交联实体,使得在所述皮肤内生成交联材料。

79.根据权利要求67到69中任一权利要求所述的方法,其中所述分别施用包括在不同的时间点施用,使得所述第一可交联实体的施用和所述第二可交联实体的施用相隔一段时间。

80.根据权利要求67或77所述的方法,其中所述皮肤属性选自由以下组成的群组:厚度、美感、水分含量和光滑度。

81.根据权利要求77或权利要求79所述的方法,其中所述时间段小于20分钟。

82.根据权利要求81所述的方法,其中所述时间段小于10分钟。

83.根据权利要求82所述的方法,其中所述时间段小于1分钟。

84.根据权利要求77所述的方法,其中所述第一可交联实体包括聚合物部分和交联部分。

85.根据权利要求67或权利要求84所述的方法,其中所述聚合物部分是或包括糖胺聚糖或多糖。

86.根据权利要求67或权利要求84所述的方法,其中所述聚合物部分包括合成聚合物。

87.根据权利要求67所述的方法,其中所述聚合物部分是或包括多肽。

88.根据权利要求67或权利要求84所述的方法,其中所述聚合部分具有约10-250kDa的大小。

89.根据权利要求67到69或权利要求77中任一权利要求所述的方法,其进一步包括以下步骤:

在施用所述第一和第二可交联实体之后向所述皮肤施用水。

90.根据权利要求77、78或79中任一权利要求所述的方法，其进一步包括以下步骤：

在施用所述第一和第二可交联实体之后评估所述皮肤属性。

91.根据权利要求66到90中任一权利要求所述的方法，其中所述步骤被重复至少一次。

92.根据权利要求91所述的方法，其中所述步骤每天重复一次，持续数天。

93.根据权利要求91所述的方法，其中所述步骤每三天重复一次。

94.根据权利要求91所述的方法，其中所述步骤每7天重复一次。

95.一种改善皮肤属性的方法，其包括以下步骤：

a.注射包括第一可交联和第二可交联实体的系统，其特征在于：

(i)每个实体：

(a)包括Log(P)在0-6的范围内的交联部分；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；

(ii)当在生理条件下体外组合时，所述第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应，以形成交联材料，所述交联材料的特征在于：

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内；

(b)在生理中经3天的降解质量损失小于20％。

96.一种改善皮肤属性的方法，其包括以下步骤：

a.注射包括第一可交联和第二可交联实体的系统，其特征在于：

(i)每个实体：

(a)其特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；

(ii)当在生理条件下体外组合时，所述第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应，以形成交联材料，所述交联材料的特征在于：

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内；

(b)在生理中经3天的降解质量损失小于20％。

97.一种改善皮肤属性的方法，其包括以下步骤：

a.注射包括第一可交联和第二可交联实体的系统，其特征在于：

(i)每个实体：

(a)其特征在于，当将其离体应用于完整皮肤时，其渗透到角质层中和/或其下方；或

(b)其特征在于，亲脂性足以实现至少50微米的皮肤渗透；

(ii)当在生理条件下体外组合时，所述第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应，以形成交联材料，所述交联材料的特征在于：

(a)储能模量在50Pa-10kPa的范围内；

(b)与在没有交联的情况下的所述第一和/或第二可交联实体的降解相比，

所述交联材料在生理条件下经过3天的降解更慢。

98.根据权利要求97所述的方法，其中所述系统使用双孔针注射。

99.根据权利要求98所述的方法，其中所述系统使用微针注射。

交联材料

背景技术

[0001] 已经开发出各种系统用于在特定目标部位处或其上(例如,手术性或创伤性破坏部位(例如,器官、结缔组织、肌肉、肌腱和/或膜的部位(参见例如,希尔(Seal)等人,材料科学与工程(Mater Sci.Eng),34:147,2001))处)安装或生成交联材料;。一些此类材料已经表现出在例如有效地密封内部伤口和/或实现组织近似以改善伤口愈合(参见例如,鲁埃尔-加里比(Ruel-Gariepy)等人,欧洲药剂学和生物药剂学杂志(Eur.J.Pharm.Biopharm),58:409,2004)方面的前景。

发明内容

[0002] 本公开提供了多种与目标靶部位中或其上(例如,原位)提供交联材料(例如,凝胶或其它高分子量材料)有关的见解。

[0003] 除了其它方面,本公开提供了一种见解,即可交联实体(例如,包括聚合物部分和交联部分)的亲脂性可以被调节以在应用于部位(例如,应用于皮肤表面上或以其它方式应用于目标靶部位上方的皮肤部位)之后实现期望的渗透速率和/或程度。

[0004] 可替代地或另外地,本公开提供了一种见解,即可交联实体的低粘度制剂对于某些实施例具有期望的特性,例如允许它们所生成的一或多种交联材料更好地填充其中的空间和/或结构(例如,表面上的微腔)和/或在其上与组织和/或结构进行更好的接触。

[0005] 可替代地或另外地,本公开提供了一种见解,即本公开提供的交联材料相对于其初始可交联实体(例如,彼此分开和/或在其交联以生成相关的交联材料之前)可以在相关的生物系统中表现出改善的耐久性/持久性。

[0006] 更进一步,本公开提供了一种见解,即在某些实施例中,确保第一和第二可交联实体在施用之时(例如,在施用时)是分开的(即,在化学上、物理上和/或空间上)可能是有益的和/或期望的。

[0007] 除了其它方面,本公开提供了实施例,其中通过彼此交联而生成交联材料的一组可交联实体中的一或多个的特征在于本文所述的亲脂性的程度。本公开还提供了实施例,其中一或多个可交联实体被用作低粘度制剂。本公开还提供了实施例,其中各个可交联实体在施用之时(例如,在施用之前和/或在施用期间)保持彼此分开。本发明进一步提供了此类实施例的组合以及关于其中一或多个此类实施例可能特别有用或有效的一或多个特定环境的见解。

[0008] 除了其它方面,所提供的见解允许选择和/或利用先前未考虑或未用于原位交联系统的可交联实体或其组分(例如,聚合物和/或交联部分)或组合,和/或提供了用于施用可交联实体以实现原位交联材料的新方法。

[0009] 在一些实施例中,本公开提供了系统,其包括可以一起用于提供原位交联材料的组分。在一些实施例中,所提供的系统包括第一和第二可交联实体,其中至少一个(并且在多个实施例中为两个)具有本文所述的亲脂性,所述第一和第二实体彼此交联以在目标部位处或其上(例如,原位)形成具有本文所述的材料和/或功能特性的交联材料(例如,凝

胶)。

[0010] 在一些实施例中,本公开提供了制造和/或使用此类所提供的系统和/或其组分的方法。

[0011] 在一些所提供的方法中,将第一和第二可交联实体分别并依次施用于部位(例如,在皮肤表面上);在一些此类实施例中,首先施用第一可交联实体,并且在一段时间之后施用第二可交联实体。

[0012] 还提供了用于储存和/或施用第一和/或第二可交联实体的各种装置和技术。在一些实施例中,所提供的装置将第一和第二可交联实体保持在物理上分开的位置、隔室和/或容器中。

附图说明

[0013] 图1示出了包含表皮和真皮的人类皮肤的各个部分。

[0014] 图2示出了来自实例1的HA-gly-CBT的D_2O溶液的^1H NMR。

[0015] 图3示出了经修饰的HA的凝胶渗透色谱(GPC)分析。缀合之前的未经修饰的HA(平均分子量为10、50和250kDa)的折射率读数在图3A中示出,并且经修饰的HA(HA-gly-CBT,平均分子量为10、50和250kDa)的UV吸光度读数(326nm)在图3B中示出。

[0016] 图4示出了CBT和HA的某些衍生物(分别为A和B)的化学结构。

[0017] 图5示出了来自实例1的Cys-PEG-Cys的氘代丙酮溶液的^1H NMR。

[0018] 图6示出了来自实例1的Cys-EDA-Cys的氘代丙酮溶液的^1H NMR。

[0019] 图7呈现了第一和第二可交联实体的示范性包装,它们在使用时被动态地调合。所示包装表明,在配制之前,两个实体在腔室中混合

[0020] 图8呈现了可以单独配制的第一和第二可交联实体的示范性包装。

[0021] 图9示出了交联HA-gly-CBT的对透明质酸酶的降解的抗性。图9A中的图描绘了针对交联和未交联材料的HA-gly-CBT在与透明质酸酶一起温育之后仍保持为不溶性凝胶和高分子量聚合物的部分。图9B是与透明质酸酶一起温育24小时之后的交联HA-gly-CBT凝胶的图像。

[0022] 图10示出了在将PBS(A)和HA-gly-CBT(B)局部应用于完整猪皮肤以及将HA-gly-CBT(C)局部应用于胶带剥离猪皮肤之后的猪皮肤切片的明场和荧光(DAPI滤光片)图像。

[0023] 图11示出了在局部应用HA-gly-CBT之后的皮肤提取物的GPC分析。图11A示出了来自HA-gly-CBT的GPC信号与针对角质层(SC)提取物和表皮/真皮提取物测量的GPC信号(六个样本的平均值)的比较。图11B示出了具有相关误差条的SC提取物的平均GPC信号。图11C示出了具有相关误差条的表皮/真皮提取物的平均GPC信号。

[0024] 图12示出了在注射HA-gly-CBT(A)或HA-gly-CBT并随后注射Cys-PEG-Cys(B)之后的猪皮肤切片的明场和荧光(DAPI滤光片)图像。在切片之后直接以及在洗涤以提取可溶性HA-gly-CBT之后对切片进行成像。

[0025] 图13呈现了相较于基线以及安慰剂的应用的在应用所提供的系统之后两天的皮肤的照片,这示出了皮肤光滑度的改善。

[0026] 图14示出了在向破坏人类皮肤局部应用PBS(A)和用AlexaFluor 647(B和C)标记的HA-gly-CBT之后的人类皮肤切片的明场和荧光(Cy5滤光片)图像。在一个样本(B)中,在

应用之前，对皮肤进行胶带剥离，而另一个样本(C)中，用含有500μm针的微针滚轮(dermaroller)进行治疗。

[0027] 图15呈现了来自实例6的示范性施用部位。

[0028] 图16呈现了在施用实例6中所述的系统之后的时间点的图像。

[0029] 图17呈现了在施用实例7中所述的系统之后的活检的图像。

[0030] 图18示出了HA-gly-CBT(50kDa，用IR染料标记)在用含有500μm针的微针滚轮治疗的人类皮肤中的局部递送。图18A呈现了用Cy5滤光片获得的皮肤样本的荧光显微镜图像。图18B呈现了HA-gly-CBT相对于SC、表皮和真皮的定量数据。

[0031] 定义

[0032] 约：当在本文中参考值使用时，术语“约”是指在上下文中与所参考的值相似的值。通常，熟悉上下文的本领域技术人员将理解在所述上下文中“约”所涵盖的相关变化程度。例如，在某些实施例中，术语“约”可能涵盖所参考的值的25％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％或更少之内的一系列值。

[0033] 类似物：如本文使用，术语“类似物”是指与参考物质共享一或多个特定结构特征、元素、组分或部分的物质。通常，“类似物”表现出与参考物质的显著结构相似性，例如共享核心或共有结构，但也以某些离散方式有所不同。在一些实施例中，类似物是可以从参考物质(例如，通过参考物质的化学操纵)生成的物质。在一些实施例中，类似物是可以通过进行与生成参考物质的合成过程基本上相似(例如，与其共享多个步骤)的合成过程而生成的物质。在一些实施例中，类似物通过或可以通过与用于生成参考物质的合成过程不同的合成过程生成。

[0034] 相关联：如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一事件或实体的存在、水平和/或形式相关，则两个事件或实体彼此“相关联”，如本文使用所述术语。例如，如果特定实体(例如，多肽、遗传标记、代谢物、微生物等)的存在、水平和/或形式与特定疾病、病症或病状的发生率和/或易感性相关(例如，在相关群体中)，则认为所述特定实体与所述疾病、病症或病状相关联。在一些实施例中，如果两个或超过两个实体直接或间接相互作用，则它们在物理上彼此“相关联”，使得它们彼此物理接近和/或保持彼此物理接近。在一些实施例中，物理上彼此相关联的两个或超过两个实体彼此共价连接；在一些实施例中，物理上彼此相关联的两个或超过两个实体不是彼此共价连接，而是非共价缔合，例如借助氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁性及其组合。

[0035] 生物相容性：如本文使用，术语“生物相容性”是指当例如在体内与活组织接触放置时不会对此组织造成显著伤害的材料。在某些实施例中，如果材料对细胞无毒，则它们具有“生物相容性”。在某些实施例中，如果在体外将材料加入细胞会导致小于或等于20％的细胞死亡，和/或材料的体内施用不会诱发显著的炎症或其它此类不利影响，则它们具有“生物相容性”。

[0036] 可比性：如本文使用，术语“可比性”是指可能彼此不相同但是足够相似以允许在它们之间进行比较的两个或超过两个试剂、实体、情况、条件集合等，使得本领域技术人员将理解，可以基于观察到的差异或相似性合理地得出结论。在一些实施例中，可比性条件、环境、个体或群体的集合的特征在于多个基本上相同的特征和一个或少数几个有所变化的

特征。在上下文中，所属领域的技术人员将理解，在两个或超过两个此类试剂、实体、情况、条件集合等的任何给定环境中需要的什么样的相同程度被认为是具有可比性的。例如，所属领域的技术人员将理解，当其特征在于足够数量和类型的基本上相同的特征以保证得出合理的结论(即，在不同的环境、个体或群体的集合下或用其得到的结果或观察到的现象中的差异指示有所不同的那些特征中的变化或是由其引起的)时，环境、个体或群体的集合彼此具有可比性。

[0037] 对应：如本文在多肽、核酸和化学化合物的上下文中使用，术语“对应”表示化合物或组合物中的结构元件(例如，氨基酸残基、核苷酸残基或化学部分)的位置/同一性(通过与适当的参考化合物或组合物进行比较)。例如，在一些实施例中，可以将聚合物中的单体残基(例如，多肽中的氨基酸残基或多核苷酸中的核酸残基)标识为“对应于”适当参考聚合物中的残基。例如，所属领域的技术人员将理解，为简单起见，可以使用基于参考相关聚合物的规范编号系统来表示聚合物中的残基，使得与参考聚合物的位置190的残基“相对应”的残基例如实际上不一定是目标聚合物中的第190个残基，而是指与在参考聚合物中的位置190发现的残基相对应的残基；所属领域的技术人员容易理解如何标识聚合物中的“相对应”残基(例如，使用用于多肽和核酸聚合物的市售序列比较软件；任选地针对其它聚合物人工标识)。

[0038] 设计：如本文使用，术语“设计”是指以下试剂：(i)其结构是或曾是人工选择的；(ii)其通过需要人工的过程而产生；和/或(iii)其与天然物质和其它已知制剂不同。

[0039] 剂型：本领域技术人员将理解，术语“剂型”可以用于是指施用于受试者的试剂(例如，治疗剂、诊断剂或美容剂)的物理上离散的单元。通常，每个此类单元含有预定量的试剂。在一些实施例中，此量是适合于根据给药方案进行施用的单位剂量(或其整个部分)，所述给药方案已被确定为与向相关群体施用时(即采用治疗性给药方案)的期望或有益(例如，治疗和/或美容)结果相关。在一些实施例中，此量是适合于根据方案进行施用的单位剂量(或其整个部分)，所述方案已被确定为与向相关群体施用时的期望或有益(例如，提供皮肤的视觉和/或触觉改善)结果相关。所属领域的技术人员理解，施用于特定受试者的组合物或试剂的总量由一或多个主治专业人员(例如，医师、护士或其它有执照的专业人员)确定，并且可能涉及多种剂型的施用。在一些实施例中，剂型可以以调配物的形式提供，所述调配物是或包括乳霜、凝胶、液体、爽肤水、喷雾、面膜、基质、颗粒、糊剂、贴剂、粉剂、精华、固体、喷雾剂(或其集合)或其组合。

[0040] 给药方案：本领域技术人员将理解，术语“给药方案”可以用于是指单独向受试者施用(通常间隔一段时间)的一组单位剂量(通常多于一个剂量)。在一些实施例中，给定试剂具有推荐的给药方案，其可能涉及一或多个剂量。在一些实施例中，给药方案包括多个剂量，其中每个剂量在时间上与其它剂量分开。在一些实施例中，各个剂量彼此之间以相同长度的时间间隔；在一些实施例中，给药方案包括多个剂量和将各个剂量分开的至少两个不同的时间段。在一些实施例中，给药方案中的所有剂量均具有相同的单位剂量量。在一些实施例中，给药方案中的不同剂量具有不同的量。在一些实施例中，给药方案包括第一剂量量的第一剂量，随后是与第一剂量量不同的第二剂量量的一或多个另外的剂量。在一些实施例中，给药方案包括第一剂量量的第一剂量，随后是与第一剂量量相同的第二剂量量的一或多个另外的剂量。在一些实施例中，给药方案与在相关群体中施用时的期望或有益结果

相关。

[0041] 赋形剂:如本文使用,其是指可以包含在药物组合物中的非活性(例如,非治疗活性,例如美容活性)试剂,例如以提供或有助于期望的一致性或稳定作用。

[0042] “改善”、“增加”、“抑制”或“减少”:如本文使用,术语“改善”、“增加”、“抑制”、“减少”或其语法等同词指示相对于基线或其它参考测量的值。在一些实施例中,适当的参考测量可以是或包括在不存在特定试剂或治疗(例如,在其之前和/或之后)的其它可比条件下或在存在适当的可比参考试剂的情况下的特定系统中(例如,单个个体中)的测量。在一些实施例中,适当的参考测量可以是或包括在存在相关试剂或治疗下已知或预期以特定方式响应的可比系统中的测量。

[0043] 原位:如本文使用,术语“原位”是指在靶部位处、其中或其上的位置。例如,在一些实施例中,当可交联实体在目标靶部位处、其中或其上(例如,在组织表面上或在组织内)反应以形成交联材料时,它们原位交联;在多个实施例中,相关组织是皮肤。

[0044] 分离:如本文使用,其是指一种物质和/或实体,其(1)已在最初产生(无论是在自然界中和/或在实验环境中)时与其所相关联的至少一些组分分离,和/或(2)是由人工设计、产生、制备和/或制造的。分离物质和/或实体可以与最初与其所相关联的其它组分的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%分开。在一些实施例中,分离试剂为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%纯。如本文所用,如果物质基本上不含其它组分,则它是“纯的”。在一些实施例中,如本领域技术人员所理解,在与某些其它组分(诸如例如一或多种载体或赋形剂(例如,缓冲液、溶剂、水等))组合后,物质仍被认为是“分离的”或甚至是“纯的”;在此类实施例中,在不包含此类载体或赋形剂的情况下计算物质的分离百分比或纯度。

[0045] 连接子:如本文使用,其用于是指多元素试剂将不同元素相互连接的所述部分。

[0046] 标志物:如本文使用,标志物是指其存在或水平是特定状态或事件的特性的实体或部分。在一些实施例中,特定标志物的存在或水平可以是疾病、病症或病状的存在、状态或阶段的特性。

[0047] 受试者:如本文使用,术语“受试者”是指例如或出于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的而向其或可以向其施用所提供的系统的任何生物体。典型的受试者包含动物(例如,哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔子、非人灵长类动物和/或人类)。在一些实施例中,受试者是人类。在一些实施例中,受试者患有或易患一或多种病症或病状。在一些实施例中,受试者表现出病症或病状的一或多种症状。在一些实施例中,受试者已被诊断出患有一或多种病症或病状。在一些实施例中,病症或病状是或包含癌症或一或多个肿瘤的存在。在一些实施例中,受试者正在接受或已经接受某些疗法以诊断和/或治疗疾病、病症或病状。在一些实施例中,受试者是指寻求美容益处和/或改善(例如,皮肤外观和/或感觉改善)的人类。

[0048] 生理条件:如本文使用,其具有本领域所理解的含义,涉及细胞或生物体生存和/或繁殖的条件。在一些实施例中,所述术语是指自然界中生物体或细胞系统可能存在的外部或内部环境的条件。在一些实施例中,生理条件是指人类或非人类动物的身体内存在的那些条件,尤其是目标靶部位处和/或其内存在的那些条件。生理条件通常包含以下中的一

或多种:例如,20-40℃的范围内(特别是约37℃)的温度、大气压1、pH 6-8、葡萄糖浓度1-20mM、大气水平的氧气浓度以及地球上遇到的重力。

[0049] 参考:如本文使用,其描述了相对于其进行比较的标准或对照。例如,在一些实施例中,将目标试剂、动物、个体、群体、样本、序列或值与参考或对照试剂、动物、个体、群体、样本、序列或值进行比较。在一些实施例中,参考或对照的测试和/或确定与目标测试或确定基本上同时进行。在一些实施例中,参考或控制是历史参考或控制,任选地体现在有形介质中。通常,如本领域技术人员将理解,在与进行评估的条件或环境具有可比性的条件或环境下确定或表征参考或对照。本领域技术人员将理解何时存在足够的相似性以证明对特定可能的参考或对照的依赖和/或比较。

[0050] 样本:如本文使用,术语"样本"通常是指从目标源获得或衍生的材料的等分试样。在一些实施例中,目标源是生物或环境源。在一些实施例中,目标源可以是或包括细胞或生物体,例如微生物、植物或动物(例如,人类)。在一些实施例中,目标源是或包括生物组织或流体。在一些实施例中,样本是通过任何适当手段直接从目标源获得的"原始样本"。在一些实施例中,如从上下文将清楚地看出,术语"样本"是指通过处理原始样本(例如,通过去除其中的一或多种组分和/或通过向其加入一或多种试剂)而获得的制剂。此类"经处理的样本"可以包括例如从样本提取的材料或通过使原始样本进行一或多种技术(例如,色谱、提取、沉淀等)而获得的材料。

[0051] 基本结构相似性:如本文使用,术语"基本结构相似性"是指在特定位置处存在共享的结构特征。在一些实施例中,术语"基本结构相似性"是指结构元件(例如:环、片、螺旋、H键供体、H键受体、糖基化模式、盐桥、二硫键及其组合)的存在和/或同一性。在一些实施例中,术语"基本结构相似性"是指原子或部分相对于彼此的三维排列和/或定向(例如,:它们之间或它们在目标试剂和参考试剂之间的距离和/或角度)。

[0052] 治疗剂:如本文使用,短语"治疗剂"通常是指当施用于生物体时引起期望的药理作用(在一些实施例中可以是或包括美容作用)的任何药剂。在一些实施例中,如果试剂在适当的群体中表现出统计学上显著的作用,则它被认为表现出作用(即,是治疗剂)。在一些实施例中,适当的群体可以是模型生物体群体。在一些实施例中,适当的群体可以通过特定标准(例如,某个年龄段、性别、遗传背景、既往临床病状等或其组合)来限定。在一些实施例中,治疗剂是可以用于减轻、改善、缓解、抑制、预防疾病、病症和/或病状的一或多种症状或特征、延迟其发作、降低其严重程度和/或减少其发生的物质。在一些实施例中,治疗剂是实现美容作用的治疗剂(即,是美容剂)。在一些实施例中,可以使用治疗剂来实现皮肤外观和/或感觉改善和/或另一种美容益处。

[0053] 治疗:如本文使用,术语"治疗(treat/treatment/treating)"是指部分或完全减轻、改善、抑制、预防、缓解疾病、病症和/或病状的一或多种症状或特征和/或延迟其发作、减少其发生和/或降低其严重程度,或实现另一种期望的生理作用(例如,期望的美容作用,例如皮肤外观和/或感觉改善,例如皮肤的视觉和/或触觉改善)。在一些实施例中,治疗包括施用具有生理作用的试剂。在一些实施例中,治疗包括美容治疗,其在施用后以本文所述的方式改善身体外观。在一些实施例中,治疗可以施用于未表现出疾病、病症和/或症状的迹象或特征的受试者(例如,可以是预防性的)。在一些实施例中,治疗可以施用于仅表现出疾病、病症和/或症状的早期或轻度迹象或特征的受试者,例如以降低发生与所述疾病、病

症和/或症状相关联的病理的风险。在一些实施例中，治疗可以施用于表现出所述疾病、病症或症状的已建立、重度和/或晚期迹象的受试者。

具体实施方式

[0054] 可交联实体

[0055] 本公开提供了某些技术，所述技术涉及向受试者施用可交联实体，特别涉及此类可交联实体在靶部位处、其中或其上的原位交联，所述靶部位例如可以是皮肤中或其上(例如，表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方)的部位。

[0056] 在一些实施例中，本公开提供了用于施用包括第一和第二可交联实体的系统的技术，所述第一和第二可交联实体被选择和/或设计成实现原位交联材料的形成。阅读本公开的本领域技术人员将理解，相对于其母体可交联实体，此类交联材料通常将以一或多种不同的物理性质(例如，流变学和/或化学性质(例如，分子量))为特征。在一些实施例中，此类不同的性质可以是或包含例如在相关生物系统中原位和/或以其它方式改善的耐久性/持久性。

[0057] 如本文所述，此类第一和第二可交联实体的特征在于当彼此接触时能够相互反应以形成原位交联材料的能力(例如，在不施用催化剂或其它非参与剂的情况下)。

[0058] 在多个实施例中，可交联实体中的至少一个将包括与交联部分连接的聚合物部分。在一些实施例中，可交联实体中的至少一个将不包括聚合物部分。在一些实施例中，相互反应(例如，在不施用催化剂或其它非参与剂的情况下)的一对可交联实体各自包括与交联部分连接的聚合物部分。在一些实施例中，相互反应的一对可交联实体(例如，在不施用催化剂或其它非参与剂的情况下)包括第一可交联实体和第二可交联实体，所述第一可交联实体包括与交联部分连接的聚合物部分，所述第二可交联实体不包括聚合物部分。

[0059] 在一些实施例中，可交联实体包括聚合物部分和可以相同或不同的多个交联部分。除了其它方面，本公开提供了与实现可交联实体渗透到皮肤中(例如，表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方)的靶部位有关的见解和技术。例如，在一些实施例中，本公开教导，特定范围内的亲脂性可以允许可交联实体(特别是包括聚合物部分和可交联部分的可交联实体)的期望的(例如，增强的)渗透。

[0060] 如图1中所示，人类皮肤是多层的，包括外部表皮(其本身是包括角质层、透明层、颗粒层、有棘层和基底层的分层结构)、真皮和下面的下皮。皮肤是将身体与环境分开并保护身体免受环境影响的屏障。化妆品和皮肤病学领域的主要挑战是促进目标化合物或试剂在皮肤中的渗透的技术的发展。参见例如吴(Ng)(2015)，皮肤深层:人类皮肤结构和药物渗透的基础(Skin Deep:The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration)，Dragicevic N.(德拉吉塞维奇N.)、Maibach H.(梅巴克H.)(编)，渗透增强中的经皮渗透增强剂化学方法(Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement)，施普林格，柏林，海德堡

[0061] 在本领域中应理解，人类皮肤限制了分子量(例如，数均分子量)高于约500道尔顿的化合物的运输(博斯(Bos)和梅纳尔迪(Meinardi)，实验皮肤学(Experimental Dermatology)，9:165,2000)，甚至对于此类小化合物，有效的运输通常需要进行另外的操纵，例如化学或物理磨削或破坏剂和/或电流或磁场等的施用。

[0062] 除了其它方面，本公开提供了涉及跨或通过一或多个皮肤层的渗透的技术，并且具体地涉及可交联实体的这种渗透，所述可交联实体反应以生成存在于靶部位处的交联材料。在多个实施例中，靶部位可能在表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方。除了其它方面，本公开提供了一种教导，即可以通过调节亲脂性来设计和/或制备具有一或多种改善的皮肤渗透特性的可交联实体。例如，在一些实施例中，本公开教导，特定试剂(特别是是或包括聚合物部分和/或数分子量(例如，数均分子量)高于500道尔顿(甚至在10-500kDa的范围内)的试剂)的皮肤渗透的速率和/或程度可以通过增加试剂的亲脂性(例如，通过将一或多个疏水性部分附接到试剂)来增强。所属领域的技术人员将理解，在一些实施例中，增加亲脂性的疏水性部分可以是或包括交联部分；可替代地或另外地，在一些实施例中，此类疏水性部分可以不必是或包括交联部分和/或可以不必参与交联(例如，存在于本文所述的交联材料中和/或帮助生成本文所述的交联材料)

[0063] 可替代地或另外地，在一些实施例中，本公开提供了与在组织中或其上(特别是皮肤中或其上)的靶部位中提供交联材料有关的技术，使得材料和靶部位的表面之间的接触最大化。在一些实施例中，此类表面可以包含一或多个腔或不规则结构(在一些实施例中，其可以是微米或甚至纳米级结构)。在一些实施例中，本公开提供了具有有助于这种接触的流动特性的可交联部分的制剂。

[0064] 在一些特定实施例中，根据本公开使用的可交联实体包括与交联部分连接的聚合物部分，其中与单独的聚合物部分相比，所述交联部分使缀合物(即，可交联实体)具有增加的亲脂性；如本文所述，在一些实施例中，与单独的聚合物部分相比，这种交联部分还可以改善可交联实体的皮肤渗透。

[0065] 在一些实施例中，将根据皮肤表面下方的绝对距离(例如，以微米为单位)来评估和/或描述可交联实体的渗透深度。在一些实施例中，将根据皮肤表面下方的细胞数量来评估和/或描述可交联实体的渗透深度。

[0066] 在一些实施例中，本文所述的可交联实体例如在特定时间段内可以和/或确实(例如，当如本文所述施用时)渗透到皮肤中指定深度。在一些实施例中，此指定深度可以是例如至少50微米、至少100微米、至少200微米或更大的深度；可替代地或另外地，在一些实施例中，此指定深度可以是至少2个细胞层、至少3个细胞层、至少4个细胞层、至少5个细胞层、至少6个细胞层、至少7个细胞层、至少8个细胞层、至少9个细胞层、至少10个细胞层或更多个细胞层，和/或此时间段可以是例如1天内、18小时内、12小时内、11小时内、10小时内、9小时内、8小时内、7小时内、6小时内、5小时内、4小时内、3小时内、2小时内、1小时内或更短的时间。

[0067] 在一些实施例中，施用于皮肤表面的至少1％的可交联实体例如在1天的时间段内渗透到表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方的靶部位。在一些实施例中，在不存在任何化学或物理磨削或破坏剂和/或电流或磁场等的情况下(例如，在不存在本领域理解的渗透促进剂的情况下)，观察到本文所述的可交联实体的一或多种皮肤渗透特性。

[0068] 在一些实施例中，可交联实体的特征在于亲脂性(log P)在约-4和约2的范围内。在一些实施例中，本文所述的可交联实体包括亲脂性的可交联部分。在一些实施例中，可交联部分的亲脂性可以独立于聚合物部分和/或包括聚合物部分和一或多个可交联部分的可交联实体的亲脂性来确定。在一些实施例中，可交联部分的特征在于亲脂性(log P)在约0

和约6的范围内。例如，在一些实施例中，可交联部分的亲脂性是通过在与分子聚合物部分缔合和/或连接以形成可交联实体之前检查可交联部分来测试的。

[0069] 在一些实施例中，特定实体或部分的亲脂性由其相对于标准溶剂(例如，辛醇)和水或其溶液的分配系数(P)确定：

[0070] $$\log P = \log \frac{[\text{在辛醇中进行评估的实体或部分}]}{[\text{在 PBS 中进行评估的可交联实体或部分}]}$$

[0071] 在一些实施例中，根据本公开可用的实体或部分(例如，可交联实体和/或交联部分或其它疏水性部分)的log P大于0。

[0072] 在一些实施例中，可交联实体(例如，具有本文所述的亲脂性的可交联实体)的分子量(例如，数均分子量)高于500道尔顿。在一些实施例中，可交联实体的分子量(例如，数均分子量)在1-1000kDa的范围内。在一些实施例中，系统包括约10-250kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)在约10-150kDa的范围内的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)在约10-100kDa的范围内的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)在约10-40kDa的范围内的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为约10kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为约20kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为约30kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为约40kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为约50kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)为小于10kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)小于100kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)小于250kDa的可交联实体。在一些实施例中，系统包括分子量(例如，数均分子量)小于500kDa的可交联实体。

[0073] 在包括聚合物部分和交联部分的可交联实体的一些实施例中，交联部分为可交联实体贡献亲脂性。在一些实施例中，选择可交联实体中的与特定聚合物部分连接的交联部分的同一性和/或数量和/或密度，使得可交联部分具有本文所述的一或多种特性。例如，在一些实施例中，当聚合物部分特别亲水，特别长和/或特征在于在未连接状态下的特别差的皮肤渗透时，亲脂性更高的交联部分(和/或更大数量/更高密度的亲脂性交联部分)将与聚合物部分连接。

[0074] 不希望受任何特定理论束缚，我们提出，在一些实施例中，可能期望选择聚合物部分和交联部分的特定组合(和/或其数量和/或密度)以实现可交联实体在一定体积内的三维堆积，例如，这可以促进通过一或多个皮肤结构或层的转移(例如，使可交联实体足够“滑”以通过)。在一些实施例中，分子内和/或分子间相互作用可能有助于可交联实体的三维堆积。在一些实施例中，至少在某些环境条件(例如，生理条件)下，通过自组装(例如，不需要加入另一种试剂)来进行特定的可交联实体的三维堆积。

[0075] 通常，可交联实体具有生物相容性。例如，在一些实施例中，本文所述的可交联实体的施用不会引起显著的刺激和/或炎症(例如，在施用部位处和/或靶部位处)。

[0076] 在一些实施例中，可交联实体根据本发明以具有适合局部应用的粘度的形式或制剂来使用，例如具有足够的粘度以保持所应用的可交联实体与施用部位接触足够长的时间

以允许渗透和/或以其它方式允许将其分发到靶部位，而不是简单地滴下；在一些此类实施例中，粘度在允许所应用的可交联实体流入皮肤表面上的微结构的范围内。在一些实施例中，可交联实体根据本发明以具有适合通过注射施用的粘度的形式或制剂来使用。在一些实施例中，合适的粘度是其中可交联实体可以局部应用而不会迅速流失和/或可以被擦入皮肤中的粘度。

[0077] 在一些实施例中，本公开提供了一种包括两个或超过两个可交联实体的系统，所述可交联实体彼此相互作用以形成交联材料(例如，以在表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方的靶部位处原位提供交联材料)。

[0078] 在一些实施例中，所提供的系统的至少一个可交联实体包括与交联部分连接的聚合物部分。在一些实施例中，系统的至少一个可交联实体不包括与交联部分连接的聚合物部分(即，包括交联部分而非聚合物部分或由其组成)；在一些此类实施例中，所提供的系统的仅一个可交联实体包括与交联部分连接的聚合物部分。可替代地，在一些实施例中，所提供的系统的每个可交联实体包括与交联部分连接的聚合物部分；在一些此类实施例中，所提供的系统的每个可交联实体包括相同的聚合物部分。

[0079] 所提供的系统的不同可交联实体包括互补的交联部分，使得可交联实体反应形成交联材料；在一些实施例中，这种交联在没有加入任何催化剂的情况下进行。

[0080] 在一些实施例中，所提供的系统的至少一个可交联实体的分子量(例如，数均分子量)如本文所述高于500道尔顿(例如，分子量(例如，数均分子量)在1-1000kDa的范围内)。在一些实施例中，所提供的系统的至少一个可交联实体的分子量(例如，数均分子量)在本文所述的1-10,000kDa的范围内。在一些此类实施例中，所述系统的至少一个可交联实体的分子量(例如，数均分子量)并非如本文所述高于500道尔顿(例如，在1-400道尔顿的范围内)；在一些此类实施例中，所提供的系统的仅一个可交联实体具有这种高分子量(例如，数均分子量)。可替代地，在一些实施例中，所提供的系统的每个可交联实体具有这种高分子量(例如，数均分子量)。

[0081] 聚合物部分

[0082] 在一些实施例中，本发明涵盖一种可交联实体，其包括聚合物部分和交联部分。在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是糖胺聚糖或多糖。在一些实施例中，“多糖”包含葡聚糖、淀粉或果胶。在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是葡聚糖。在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是淀粉。在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是果胶。在一些实施例中，“糖胺聚糖”包括透明质酸(HA)、硫酸肝素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素和硫酸角质素。在一些实施例中，聚合物是透明质酸。

[0083] 在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是合成聚合物。在一些实施例中，“合成聚合物”包含PEG、PEG-二胺、聚丙烯酸、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、聚己内酯(PCL)或聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。在一些实施例中，合成聚合物是PEG。在一些实施例中，合成聚合物是PEG-二胺。在一些实施例中，合成聚合物是聚丙烯酸。在一些实施例中，合成聚合物是HPMA。在一些实施例中，合成聚合物中是PCL。在一些实施例中，合成聚合物中是PLGA。

[0084] 在一些实施例中，聚合物部分中的一或多个是多肽(例如，蛋白质)。在一些实施例中，有用的多肽是或包括胶原蛋白、明胶、弹性蛋白或其功能片段。在一些实施例中，多肽是

或包括胶原蛋白或其功能片段。在一些实施例中，多肽是明胶。在一些实施例中，多肽是弹性蛋白。

[0085] 在一些实施例中，本文所述的系统中包含的一或多个聚合物部分是或包括HA。在一些实施例中，本文所述的系统中包含的一或多个聚合物部分是或包括糖胺聚糖。在一些实施例中，本文所述的系统中包含的一或多个聚合物部分是或包括多肽(例如，非天然多肽和/或合成或重组多肽)。在一些实施例中，所提供的系统包含多个不同的可交联实体，其包括聚合物部分；在一些此类实施例中，聚合物部分选自由以下组成的群组：HA、蛋白聚糖、多肽及其组合。

[0086] 交联部分

[0087] 如本文所述，本公开提供了包含两个或超过两个可交联实体的系统，所述可交联实体彼此相容，因为它们反应以原位形成交联材料。

[0088] 本领域技术人员知道各种化学交联系统。在多个实施例中，本公开利用不需要加入催化剂的交联化学。

[0089] 在一些实施例中，系统的可交联实体中的一或多个包括交联部分。在一些实施例中，“交联部分”能够参与点击反应。

[0090] 所属领域的技术人员将理解，点击反应可以是两个或超过两个部分的反应，其将两种或超过两种底物聚集在一起并在生理pH下进行。在一些实施例中，点击反应表现出合适的动力学(例如，二级速率常数(k_2)为约$9M^{-1}s^{-1}$)。

[0091] 例如，在一些实施例中，交联化学可以包含但不限于环加成、亲核取代反应、缩合反应和亲核加成反应。在一些实施例中，点击反应是[3+2]环加成、[4+2]环加成或[4+1]环加成。在一些实施例中，点击反应是叠氮化物-炔烃环加成、硝酮-烯烃环加成或狄尔斯-阿尔德反应。在一些实施例中，点击反应是席夫反应、迈克尔型加成反应、卤代乙酸盐上的亲核取代反应、二硫键的形成、自由基聚合、惠更斯反应、酚(酪胺)在酶催氧化为儿茶酚之后自发交联或氰基苯并噻唑(CBT)和D-半胱氨酸(CYS)之间的反应。在一些实施例中，点击反应是CBT和D-半胱氨酸之间的反应。在一些实施例中，点击反应是CBT和L-半胱氨酸之间的反应。在一些实施例中，CBT可以包含CBT的类似物，例如同位素标记的CBT。在一些实施例中，CBT包含CBT的经取代的类似物。在一些实施例中，CYS可以包含CYS的类似物，例如同位素标记的CYS。在一些实施例中，CYS包含CYS的经取代的类似物。

[0092] 在一些实施例中，本公开认识到，某些交联部分在本文所述的原位交联环境中可能特别有用。

[0093] 例如，在一些实施例中，本公开利用了一或多个交联部分，其特征在于例如当与特定的聚合物部分连接时具有期望的亲脂性的程度。仅举一个实例，CBT代表可交联部分，其可以与本文所述的有用的可交联实体中的聚合物部分连接。阅读本公开的本领域技术人员将理解，在一些实施例中，可以通过多个疏水性部分(例如，疏水性交联部分)的连接来调节包括特定聚合物部分的可交联实体的亲脂性，所述疏水性部分可以相同或不同(并且不必全部都是交联部分)。

[0094] 另外，在一些实施例中，交联部分是或包括叠氮化物、炔烃、硝酮、烯烃、二烯、四嗪、异氰酸酯、迈克尔受体、烯酮、醛、胺、α-卤代羰基部分、马来酰亚胺、硫醇、CBT、D-半胱氨酸、丙烯酸残基、酚、酪胺或儿茶酚。在一些实施例中，交联部分是或包括D-半胱氨酸。在一

些实施例中，交联部分是或包括L-半胱氨酸。在一些实施例中，反应性部分是或包括CBT。

[0095] 在一些实施例中，可以在不与聚合物部分连接的情况下利用所提供的系统内包含的至少一个交联部分。也就是说，在一些实施例中，所提供的系统内包含的至少一个可交联实体可以由交联部分组成，或者可以包括交联部分和不是聚合物部分的至少一个其它部分(在一些实施例中，如从本公开将清楚地看出，所述其它部分可以是或包括疏水性部分)。

[0096] 在一些实施例中，所提供的系统可以利用交联部分，所述交联部分是或包括例如二胺、肽、二硫醇或二酰肼。在一些此类实施例中，二胺可以是乙二胺，例如聚乙二醇(PEG)二胺等；在一些此类实施例中，二酰肼可以是草酸二酰肼、丙二酸二酰肼、琥珀酸二酰肼、戊二酸二酰肼、己二酸二酰肼或庚二酸二酰肼等。不希望沉迷于语义，应当注意，某些此类化合物可以描述为由交联部分组成，或描述为包括一或多个交联部分(例如，其中每一个可以是单个反应性原子或少量原子)以及可能仅包含非常少量的(例如，2或3个)“单体”的聚合物部分(并且在一些情况下，每个此类“单体”可能仅由几个原子组成)。无论如何，阅读本公开的所属领域的技术人员将理解，在各个实施例中，这些化合物可以与具有本文所述的互补交联部分的其它交联实体一起利用。

[0097] 其它部分

[0098] 在一些实施例中，本文所述的可交联实体可以包括除聚合物部分或交联部分以外的一或多个部分，在一些实施例中，所述一或多个其它部分可以与聚合物部分和/或交联部分共价缔合。在一些实施例中，“其它”部分可以与可交联实体可释放地缔合(例如，经由可裂解的键；在一些此类实施例中，这种可裂解的键可以在靶部位处裂解)。

[0099] 例如，在一些实施例中，可交联实体可以包括药物部分(在一些实施例中，其本身可以为前药形式)。

[0100] 在一些实施例中，药物部分是或包括合成或天然小分子或生物分子(例如，碳水化合物、脂质、核酸、多肽或其类似物或组合)。

[0101] 在一些实施例中，药物部分可以是以一或多种方式改善皮肤外观的部分。例如，在一些此类实施例中，药物部分可能会使皮肤变白；清除粉刺；实现紧致效果；改善皮肤内的细胞活性；改善胶原蛋白合成；改善伤口的愈合情况；改善色素沉着；改善皮肤屏障功能；经由局部益生元使健康微生物群正常化；防止损伤(例如，由于UV暴露)；减少疤痕的出现；减少炎症；减少瘙痒；减少发红；愈合伤口；使皮肤光滑或治疗灼伤或其组合。

[0102] 在一些实施例中，药物部分可以包括α-羟基酸(例如，乳酸、酒石酸或柠檬酸)、抗氧化剂(例如，谷胱甘肽、异黄酮、多酚(例如，白藜芦醇)或硒)、β-羟基酸(例如，水杨酸)、多羟基酸(例如，葡糖酸内酯或乳糖酸)、氢醌、天然皮肤美白剂(例如，曲酸)、类维生素A(例如，视黄酸、视黄醇、维甲酸或其衍生物)、神经酰胺、肽、氨基酸、类姜黄素、维生素(及其衍生物)(例如，L-抗坏血酸、维生素B、烟酰胺和维生素K)、防晒剂(例如，氧苯酮、阿伏苯宗、水杨酸辛酯、奥克立林、胡莫柳酯、奥西诺酯、Meroxyl(SX和XL)或金属氧化物)、着色剂、色素或天然植物药或其组合或前药。

[0103] 在一些实施例中，药物部分可以包括抗炎药(例如，皮质类固醇、非甾体类抗炎药(克立硼罗))、抗生素(例如，克林霉素或酮康唑)、抗真菌药(例如，克霉唑或酮康唑)和抗粉刺剂(例如，类维生素A或水杨酸)、止痛药、抗癌或抗增殖剂、治疗红斑的试剂(例如，盐酸羟甲唑啉)、减少皮下脂肪的试剂(例如，脱氧胆酸盐)、毛发生长剂(例如，非那雄胺)或其组合

或前药。

[0104] 靶部位

[0105] 本文所述的技术可用于在靶部位处原位提供交联材料。在一些实施例中，靶部位是包括身体组织(例如，在其上或其内)。本文描述了用于将材料应用于应用部位的技术，使得在靶部位处提供(例如，形成)交联材料。

[0106] 例如，在一些实施例中，身体组织是或包括上皮组织。在一些实施例中，身体组织是或包括结缔组织。在一些实施例中，身体组织是或包括神经组织。在一些实施例中，身体组织是或包括肌肉组织。在一些实施例中，身体组织是或包括眼睛的组织、皮肤的组织或皮下组织。在一些实施例中，身体组织是或包括皮下脂肪、角膜上皮或粘膜。

[0107] 如本文所述，在多个实施例中，将材料(即，一或多个可交联实体)施用于应用部位，使得可交联材料在靶部位处原位提供(例如，在靶部位处形成)。在多个实施例中，靶部位是在应用于表面(例如，组织表面)之后到达的部位。在一些实施例中，组织表面是暴露在生物体的表面上的组织(例如，皮肤、眼睛或某些粘膜)的表面。在一些实施例中，组织表面是内部组织的表面，所述内部组织例如可以通过进行程序(例如，医学程序，例如手术程序，包含例如无畸变程序)或应用于生物体的过程来触及或暴露。

[0108] 在一些实施例中，靶部位是角质层处、其上、其中或其下方的靶部位。在一些实施例中，靶部位是表皮处、其上、其中或其下方的部位。在一些实施例中，靶部位是真皮处、其上、其中或其下方的靶部位。

[0109] 在一些实施例中，靶部位可以被选择为或包括已经受损的皮肤(例如，由于疾病、病症或病状，或由于手术、美容或皮肤病学治疗)。在一些实施例中，受损的皮肤可以是或包括经激光(例如，点阵激光)治疗的皮肤、经强脉冲光治疗的皮肤、经微针治疗的皮肤、经过化学剥离治疗的皮肤、暴露于皮肤磨削的皮肤、创伤性受损皮肤(包含通过手术)、患有诸如皮肤萎缩、极端干燥等医学病状的皮肤。

[0110] 可替代地或另外地，在一些实施例中，靶部位可以被选择以治疗皮肤，所述皮肤起皱纹(例如，鱼尾纹或其它面部皱纹)或以其它方式表现出衰老迹象，或者可以是针对其期望另外的丰满度和/或弹性的皮肤。

[0111] 在一些特定实施例中，目标皮肤可以是或包括某一部位处的皮肤，所述部位选自由以下组成的群组：嘴唇、下唇、上唇、泪槽或眼睛周围的其它部位(例如，鱼尾纹)、鼻唇沟、前额、脸颊、手背、耳垂、膝盖、颈部、前胸、手臂、腿、躯干、臀部、脚及其组合，包含例如全脸等。

[0112] 在一些实施例中，靶部位可以是或包括脂肪组织(例如，皮下脂肪组织)。可替代地或另外地，在一些实施例中，靶部位可以是或包括腺体，例如皮脂腺和/或浆液(例如，汗)腺，和/或靶部位可以是或包括脉管(例如，血管)或导管(例如，汗管)。更进一步可替代地或另外地，在一些实施例中，靶部位可以是或包括一或多个特定细胞群，例如，其可以位于一或多个皮肤层内；例如，在一些此类实施例中，相关细胞群可以是或包括与疾病或损伤的状态相关联的特定干细胞或细胞群。在一些特定实施例中，靶部位可以是或包括色素产生细胞。在一些特定实施例中，靶部位可以是或包括一或多个毛囊。在一些特定实施例中，靶部位可以是或包括一或多个神经细胞或神经。

[0113] 所提供的系统的施用

[0114] 如本文所述，本公开提供了包含至少第一和第二可交联实体的系统，所述系统被施用于皮肤部位。在一些实施例中，两个可交联实体都被施用于相同的部位；在一些实施例中，每一个可以被施用于不同的部位，只要两者都最终到达目标靶部位，使得在靶部位处原位形成或以其它方式提供由第一和第二可交联实体的反应生成的交联材料。

[0115] 在一些实施例中，至少一个可交联实体是局部施用的(即，施用于皮肤表面)。在一些实施例中，至少一个可交联实体是肠胃外施用的(例如，通过注射到靶部位中或注射到从其渗透入靶部位的位置)。

[0116] 在一些实施例中，将所提供的系统施用于受试者的脸部(例如，受试者的脸部的全脸和/或特定靶标，例如嘴唇、下唇、上唇、泪槽、鱼尾纹、鼻唇沟、前额、脸颊或其组合)。在一些实施例中，将所提供的系统施用于非面部部位(例如，膝盖、颈部、前胸、腿、手臂、躯干、臀部或脚)。在一些实施例中，将所提供的系统施用于手(例如，手背)。在一些实施例中，将所提供的系统施用于耳垂。

[0117] 在一些实施例中，第一和第二可交联实体同时施用。例如，在一些实施例中，第一和第二可交联实体可以在施用前或施用时组合。在一些实施例中，这种组合可以被称为预混合物，并且可以在施用前一段时间制备；通常，这种预混合物是在施用约1分钟内制备的。

[0118] 在一些实施例中，在施用可交联实体之前准备施用部位。在一些实施例中，施用部位是通过用温水和肥皂洗涤部位来准备的。在一些实施例中，施用部位是通过胶带剥离来准备的。在一些实施例中，胶带剥离包括将思高(Scotch)半透明胶带应用于施用部位。在一些胶带中，胶带剥离进一步包括从施用部位去除先前应用的思高半透明胶带。在一些实施例中，重复胶带剥离直至施用部位闪亮(glisten)。在一些实施例中，重复胶带剥离至少40次。

[0119] 在一些实施例中，第一和第二可交联实体是顺序施用的；在一些此类实施例中，第一和第二可交联实体的施用相隔一段时间。在一些实施例中，此时间段是约30秒、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约10分钟、约30分钟、约1小时、约6小时、约12小时或更长时间。在一些实施例中，此时间段是约2小时。在一些实施例中，此时间段小于约12小时、小于约6小时、小于约1小时、小于约20分钟、小于约10分钟、小于约5分钟、小于约2分钟或小于1分钟。

[0120] 在一些实施例中，在应用可交联实体之后，覆盖应用部位。在一些实施例中，在应用可交联实体之后，用Tegaderm™型膜覆盖应用部位。

[0121] 在一些实施例中，施用第一和第二可交联实体之间的时间段足以允许第一施用可交联实体在施用第二可交联实体之前的基本上的渗透。在一些实施例中，所述时间段足以使得第一施用可交联实体的至少约1％、至少约2％、至少约5％、至少约10％或至少约20％在施用第二施用可交联实体之前已经渗透。在一些实施例中，所述时间段足以使得第一试剂没有降解和/或被从皮肤清除。特定可交联实体的动力学和/或渗透程度可以例如如本文所述确定，包含通过使用模型系统(例如，猪皮肤)；可以根据这种确定来选择相关的时间段。

[0122] 在一些实施例中，在施用系统之后，将用水处理皮肤。

[0123] 在一些实施例中，每天施用系统。在一些实施例中，施用系统，每天至少一次。在一些实施例中，施用系统，每天至少两次。在一些实施例中，施用系统，每天1-5次。在一些实施

例中，施用系统，每天3-5次。在一些实施例中，每3天施用系统。在一些实施例中，每7天施用系统。在一些实施例中，约每15天施用系统。在一些实施例中，约每30天施用系统。在一些实施例中，约每60天施用系统。在一些实施例中，约每90天施用系统。

[0124] 在一些实施例中，所提供的系统包含化学实体，所述化学实体改善了可交联实体的皮肤渗透。在一些实施例中，化学实体与可交联实体同时施用。在一些实施例中，化学实体和可交联实体以不同时间施用。

[0125] 在一些实施例中，所提供的系统包括渗透抑制剂(例如，其可以与可交联实体相互作用和/或以其它方式阻碍可交联实体的渗透)和交联抑制剂(例如，其可以阻断可交联实体或交联部分的一或多个特征或以其它方式干扰交联部分的反应以生成交联)中的一或两种；在一些此类实施例中，可以在施用可交联实体之前、期间、之时或之后去除(例如，经由扩散、洗涤、降解)此抑制剂。

[0126] 在一些实施例中，一或多个可交联实体作为持续释放调配物或以持续释放调配物的形式施用。在一些实施例中，一或多个可交联实体被包封在基质或颗粒(例如，纳米颗粒)内。在一些实施例中，一或多个可交联实体作为乳液或分散液或以乳液或分散液的形式提供。

[0127] 在一些实施例中，其交联部分相互作用以在交联材料中形成交联的可交联实体以相对量施用(例如，本调配成以相对量施用)，使得互补的交联部分以化学计量量存在。可替代地，在一些实施例中，此类可交联实体以相对量施用，使得一对互补的交联部分中的一个相对于另一个以摩尔过量存在；在一些此类实施例中，这种摩尔过量在1.1:1-10,000:1的范围内。在一些实施例中，可交联实体的相对量的摩尔过量在1.1:1-2:1的范围内。在一些实施例中，可交联实体的相对量的摩尔过量在1.1:1-10:1的范围内。在一些实施例中，可交联实体的相对量的摩尔过量在1.1:1-100:1的范围内。在一些实施例中，可交联实体的相对量的摩尔过量在1.1:1-1,000:1的范围内。

[0128] 在一些实施例中，调配物包括约0.001％w/w到约5.00％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括约0.01％w/w到约5.00％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括约0.1％w/w到约5.00％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括约1％w/w到约5.00％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括约1％w/w到约3％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括约2％w/w的可交联实体。在一些实施例中，调配物包括PBS和约2％w/w的可交联实体。

[0129] 局部应用

[0130] 在一些实施例中，所提供的系统的至少一个可交联实体局部提供，例如提供到皮肤上(例如，皮肤表面上)的部位。

[0131] 在一些实施例中，用于局部施用的调配物可以是或包括乳霜、凝胶、液体、爽肤水、面膜、基质、喷雾颗粒、糊剂、贴剂、粉剂、精华、固体、喷雾剂(或其集合)或其组合。在一些实施例中，用于局部施用的调配物可以是或包括面膜或精华。

[0132] 在一些实施例中，用于局部施用的调配物可以包括抗氧化剂、缓冲液、螯合剂、净度增强剂、润肤剂、乳化剂、胶凝剂、保湿剂、润滑剂、滋润剂、pH调节剂、防腐剂、保护剂、益生元、益生菌、流变改性剂、感官改性剂、舒缓剂(例如，舒缓植物精华)、稳定剂、防晒剂(例如，无机广谱防晒剂)或增稠剂。

[0133] 在一些实施例中，局部应用不涉及渗透增强剂(例如，化学或物理磨削或破坏剂和/或电流和/或电场或磁场等)的施用或应用。

[0134] 在一些实施例中，第一和第二可交联实体通过化学手段分开。在一些此类实施例中，可交联实体被包封在例如胶束、脂质体等中。

[0135] 在一些实施例中，施用系统，并在一段时间内释放可交联实体。

[0136] 在一些实施例中，系统包括被调配成促进可交联实体的时间释放的透皮贴剂。本领域技术人员将理解，透皮贴剂可以是单层试剂贴剂、多层试剂贴剂、贮药剂或基质。如下所讨论，在一些实施例中，贴剂可以包括一或多个微针(如本领域中已知，其中的一些或全部在一些实施例中可以是固体突起，并且如本领域中已知，其中的一些或全部在一些实施例中可以是空心的)。

[0137] 阅读本公开的本领域技术人员将理解，在一些实施例中，可以通过局部施用于受损或已经受损的部位来实现或增强递送，例如通过暴露于以下中的一或多种：激光(例如，点阵激光)治疗、强脉冲光治疗、微针治疗、化学剥离治疗、皮肤磨削等(在一些实施例中，其中的每一种可以或可能已经在局部应用本文所述的系统之前、期间或之后施用)。

[0138] 注射

[0139] 在一些实施例中，通过注射施用至少一个可交联实体。在一些实施例中，注射是在皮肤表面下方。在一些实施例中，注射是进入靶部位中。在一些实施例中，注射剂是注入所注射的可交联实体从其渗透到靶部位的部位。

[0140] 在一些实施例中，注射可以包括施加力或压力(例如，经由注射器)，使得例如通过针、套管或其它通道来实现递送。

[0141] 在一些实施例中，注射可以经由微针(例如，其可以与贴剂相关联)。例如，在一些实施例中，可以通过微针施用一或多个可交联实体或其组合(例如，作为液体)；可替代地或另外地，在一些实施例中，一或多个可交联实体或其组合可以被设置于一或多个微针内，其可以在应用之时或之后溶解或降解。本领域技术人员将理解，一或多个溶解或降解微针的使用对于递送相对粘稠的材料(例如，本文所述的部分或完全形成的交联材料)可能是特别有用或期望的。在一些实施例中，一或多个可交联实体可以被设置于微针中；例如，在其管腔(例如，孔)中；在一些此类实施例中，一或多个可交联实体(或由其形成的交联材料)可以通过通过管腔注射和/或通过微针(例如，其壁的溶解或降解)而释放。在一些此类实施例中，一或多个可交联实体可以与微针一体形成；在一些此类实施例中，微针可以由在应用之时或之后溶解或降解从而释放一或多个可交联实体或由其形成的交联材料的材料形成。

[0142] 在一些实施例中，注射可以通过双孔注射器或针进行。在一些此类实施例中，第一和第二可交联实体至少在施用之前被保持在注射器或针的分开的隔室中。在一些实施例中，它们在施用期间组合；在其它实施例中，它们在施用期间分开保持(即，每一个分开施用，任选地相隔本文所述的时间段)。

[0143] 在一些实施例中，注射经由孔大小为约26径规到约30径规的针进行。

[0144] 在一些实施例中，皮肤在施用系统之前(例如，临施用系统之前)已进行预治疗。在一些实施例中，皮肤预治疗是通过施用或应用增透剂或装置来完成的。在一些实施例中，皮肤预治疗包括以下中的一或多种：磨削清洁剂或化学剥离的应用、皮肤磨削、电穿孔、离子电渗、低频超声促渗、微针治疗。在一些实施例中，在施用系统之前磨削皮肤；在一些此类实

施例中，在施用系统之前，用微针对和/或点阵激光磨削皮肤。在一些实施例中，可交联实体将在用微针对皮肤进行预治疗之后(例如，在其后立即)施用。

[0145] 试剂盒

[0146] 在一些实施例中，本公开提供了包括本文所述的系统的试剂盒。

[0147] 在一些实施例中，所提供的试剂盒包括多个容器或器皿，包含分别容纳第一和第二可交联实体的容器。

[0148] 在一些实施例中，所提供的试剂盒包括至少一个容器或器皿，其包含多个分开的隔室(例如，双孔注射器或针——或具有配制之前的混合腔室的双腔室包装)；在一些实施例中，第一和第二可交联实体中分别容纳在此类隔室中。

[0149] 在一些实施例中，本公开提供了一或多个容器、器皿或隔室，其中设置有第一或第二可交联实体。在一些此类实施例中，所设置的可交联实体以干燥形式存在；在一些此类实施例中，可交联实体以液体形式存在。在一些实施例中，所设置的可交联实体已储存一段时间(例如，至少1天、1周、1个月、3个月、6个月或更长时间)；在一些此类实施例中，所储存的组合物在储存时间段内是稳定的，因为至少约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或更多的可交联实体保持未降解。在一些实施例中，所储存的组合物在储存时间段内是稳定的，因为至少约50％、65％、70％、75％或更多的可交联实体保持未降解。

[0150] 表征

[0151] 阅读本说明书的本领域技术人员将理解，例如在设计(例如，选择其中的适当组分)或生产所提供的系统时和/或在监测或评估其制剂时，可能期望表征可交联实体和/或其组分或组合和/或它们所产生的一或多种交联材料的一或多个特征。可替代地或另外地，可能期望评估施用时所提供的系统的一或多个特征，例如以便监测受试者或其治疗。

[0152] 在一些实施例中，当系统的第一和第二可交联实体在生理条件下体外组合时，第一和第二可交联实体在37℃下在少于约60分钟的时间内相互反应，以形成交联材料。这种交联材料的性质可以通过选择生成其的可交联实体来调节，并且可以代表本发明提供的特定交联材料的特点。在一些实施例中，交联材料的储能模量在50Pa-10kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在50Pa-1kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在50Pa-500 Pa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在50Pa-100 Pa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在100Pa-10kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在500Pa-10kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在1kPa-10kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在5kPa-10kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在500Pa-5kPa的范围内。在一些实施例中，交联材料的储能模量在500Pa-1kPa的范围内。

[0153] 在一些实施例中，交联材料在生理缓冲液中降解3天而引起的质量损失小于20％。在一些实施例中，交联材料在生理缓冲液中降解3天而引起的质量损失小于10％。在一些实施例中，交联材料在生理缓冲液中降解3天而引起的质量损失小于5％。

[0154] 在一些实施例中，水合后交联材料膨胀的程度是交联材料的特性。在一些实施例中，将基于干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料(其已与外部水性缓冲液达到平衡)之间的质量比来测量交联材料膨胀的程度($Q=m_{swollen}/m_{dry}$)。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在50-1000的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材

料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在100-1000的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在500-1000的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在750-1000的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在50-100的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在50-250的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在50-500的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在50-750的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在250-750的范围内。在一些实施例中，干燥的交联材料和完全膨胀的交联材料之间的比率将在400-600的范围内。

[0155] 在一些实施例中，形成交联材料的时间将由从系统的第一和第二可交联实体组合到动态储能模量(G')大于损耗模量(G")的时间确定。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在1秒内形成交联材料。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在10秒内形成交联材料。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在1分钟内形成交联材料。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在10分钟内形成交联材料。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在30分钟内形成交联材料。在一些实施例中，第一和第二可点击实体将在60分钟内形成交联材料。

[0156] 体外表征

[0157] 在一些实施例中，表征可以涉及将所提供的系统应用于模型皮肤系统(例如，猪皮肤)。

[0158] 在一些实施例中，表征可以涉及监测皮肤渗透的一或多个特征。在一些实施例中，例如在使用酶和/或其它增溶剂使皮肤增溶之后，将量化局部应用在猪皮肤上后0.5-2天的渗透皮肤的可交联实体的量。在一些实施例中，在使用酶和/或其它增溶剂使皮肤增溶之后，将量化局部应用在猪皮肤上后至少0.5天的渗透皮肤的可交联实体的量。在一些实施例中，在使用酶和/或其它增溶剂使皮肤增溶之后，将量化局部应用在猪皮肤上后少于2天的渗透皮肤的可交联实体的量。在一些实施例中，包括聚合物部分和在局部应用在猪皮肤上后渗透的交联部分的可交联实体的量超过了包括相同聚合物部分且不包括交联部分的实体的量。在一些实施例中，可交联实体包括HA，并且在局部应用在猪皮肤上后渗透的可交联实体的量将超过渗透皮肤的相同分子量(例如，数均分子量)的天然HA的量。优选地，在一些实施例中，在局部应用在猪皮肤上后渗透的包括HA的可交联实体的量将超过皮肤中已经发现的HA的天然量(猪皮肤中已经发现的HA的天然量＝～100-800ug/g干组织)。

[0159] 在一些实施例中，交联材料在猪皮肤内的渗透深度是通过在靶部位上照射紫外光来测量的。在一些实施例中，猪皮肤中的交联材料的存在将通过在靶部位上照射紫外光后观察到荧光来确定。

[0160] 在一些实施例中，在一段时间(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30或更多天)之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约3.5天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约9天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。

[0161] 体内表征

[0162] 在施用本文所述的系统后，将针对相较于施用系统之前的皮肤属性的改善在适当

的时间段对靶部位和/或施用部位(即,皮肤)进行评价。在一些实施例中,皮肤属性包含皱纹、光泽度、紧致度、水分含量、皮肤厚度、弹性和皮肤光滑度。在一些实施例中,改善包含对萎缩性皮肤或疤痕的修复。在一些实施例中,系统的施用导致皮肤的靶部位内的成纤维细胞激活和/或胶原蛋白合成增强。

[0163] 在一些实施例中,皮肤的改善将通过整体美感改善量表(GAIS)进行测量。本领域技术人员将理解,可以使用以下评级量表来确定GAIS:

[0164] • 1=极大改善

[0165] • 2=大大改善

[0166] • 3=改善

[0167] • 4=无变化

[0168] • 5=变差

[0169] 在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上>1的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上>2的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上>3的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上约1到约2的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上约1到约3的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上约1的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上约2的改善。在一些实施例中,大多数受试者将会观察到GAIS上约3的改善。

[0170] 在一些实施例中,皮肤的改善将使用改良的菲茨帕特里克皱纹量表(MFWS)进行测量。本领域技术人员将理解,可以使用以下评级量表来确定MFWS:

[0171] • 0级-无皱纹。没有可见的皱纹;连续的皮肤线。

[0172] • 0.5级-非常浅但可见的皱纹。

[0173] • 1级-细皱纹。可见的皱纹和轻微的压痕。

[0174] • 1.5级-可见的皱纹和清晰的压痕。o1 mm皱纹深度。

[0175] • 2级-中度的皱纹。清晰可见的皱纹,1到2mm皱纹深度。

[0176] • 2.5级-明显且可见的皱纹。大于2mm且小于3mm皱纹深度。

[0177] • 3级-深皱纹。深而呈沟状(furrow)的皱纹;大于3mm皱纹深度。

[0178] 在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少0.5。在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少1至0.5。在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少1.5至0.5。在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少2至0.5。在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少2.5至0.5。在一些实施例中,受试者的皱纹将在MFWS上减少至少3至0.5。

[0179] 在一些实施例中,将针对光滑度、光泽度或紧致度的改善对受试者的皮肤进行评估。

[0180] 在一些实施例中,可以监测皮肤的水分含量。在一些实施例中,与未经治疗的皮肤相比,皮肤的水分含量将更高,如通过本领域已知的方法所确定。在一些实施例中,皮肤的水分含量将由皮肤水分测试仪(Corneometer)CM 825确定。在一些实施例中,在第7天施用系统之后,皮肤的水分含量将高出>20%。

[0181] 在一些实施例中,所提供的系统用于治疗表现出异常经表皮水分流失(TEWL)的人。本领域技术人员将理解,异常TEWL可以是由例如灼伤、某些化学物质、病理状况(例如,

湿疹)、物理磨损、胶带剥离、紫外辐射或其组合引起的皮肤损伤的结果。在一些实施例中，与未经治疗的皮肤相比，经治疗的皮肤的TEWL水平将更低，如通过本领域已知的方法所确定。在一些实施例中，与本领域已知方法所理解的基线水平相比，经治疗的皮肤的TEWL水平在统计学上将更低。在一些实施例中，TEWL将通过经表皮水分流失测试仪(Tewameter)TM 300仪器(Courage-Khazaka Electronics)进行测量。在一些实施例中，TEWL将通过经表皮水分流失测试仪TM Nano(Courage-Khazaka Electronics)进行测量。在一些实施例中，TEWL将通过经表皮水分流失测试仪Triple TM330T(Courage-Khazaka Electronics)进行测量。在一些实施例中，TEWL将通过体外经表皮水分流失测试仪VT310(Courage-Khazaka Electronics)进行测量。在一些实施例中，在第7天施用系统之后，经治疗的皮肤的TEWL将降低>10％。

[0182] 在一些实施例中，将针对皮肤光滑度的改善对皮肤进行评估。在一些实施例中，施用系统之后的皮肤将比施用系统之前的皮肤更光滑。在一些实施例中，将使用活皮肤表面评价(SELS)对皮肤进行评估。在一些实施例中，将使用相移快速体内皮肤测量(PRIMOS)对皮肤进行评估。在一些实施例中，将经由Canfield Primos通过3D皮肤轮廓术对皮肤进行评估。在一些实施例中，将使用兰姆勒(Lemperle)皱纹量表对皮肤进行评估。在一些实施例中，将使用7分受试者满意度量表对皮肤进行评估。在一些实施例中，将使用口角(Oral commissure)对皮肤进行评估。在一些实施例中，将使用艾尔建(Allergan)皮肤粗糙度量表对皮肤进行评估。

[0183] 在一些实施例中，将对皮肤进行评估，以确定皮肤内的交联材料的存在和/或程度。在一些实施例中，皮肤内的交联材料的存在和/或将使用近红外(NIR)光谱、共聚焦显微术、积分球分光光度计测量，或者将使用粘弹性变形(VED,mm)、弹性变形(ED,mm)，极限变形(UD,mm)和压力变形比方法确定。在一些实施例中，皮肤内的交联材料的存在和/或通过在靶部位上照射紫外光测量。在一些实施例中，皮肤内的交联材料的存在和/或将通过在靶部位上照射紫外光后观察荧光确定。

[0184] 在一些实施例中，在一段时间(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30或更多天)之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约2天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约9天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约11天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约20天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。在一些实施例中，在约30天之后，将可观察到靶部位处的交联材料的存在。

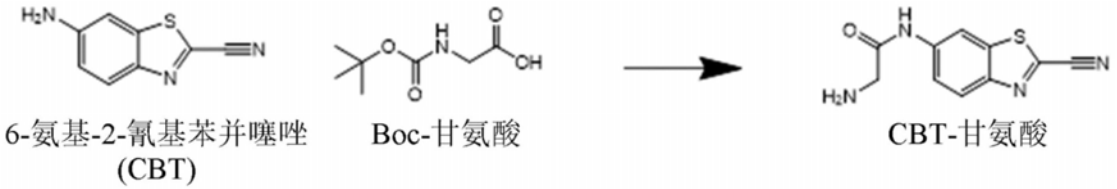
[0185] 实例

[0186] 除了其它方面，本实例描述了可以用于表征和/或评估本文所述的可交联实体(和/或其组分和/或组合)和/或通过其反应形成的交联材料的某些策略。这种策略(或阅读本公开的本领域技术人员将理解的等同策略)可以用于评估潜在的可交联实体、其组分(例如，部分)或组合和/或它们所形成的交联材料(例如，凝胶)以适合根据本公开使用。因此，在一些实施例中，本公开提供了用于表征和/或选择有用的部分、可交联实体和/或其组合的技术。

[0187] 实例1.可交联实体的合成

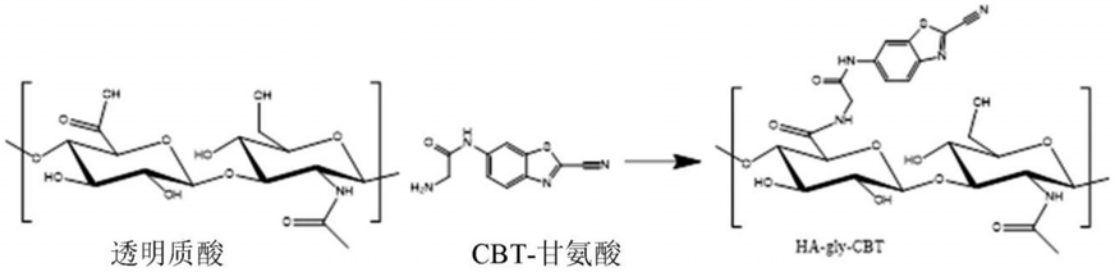
[0188] 第一可交联实体合成:HA-gly-CBT

[0189] 步骤1-CBT-甘氨酸：

[0190] 

[0191] 在室温下，将Boc-甘氨酸(1.4当量)、DIPEA(2.1当量)和TBTU(1.4当量)在无水DMF中的混合物(～40mg Boc-甘氨酸/mL)搅拌30分钟。将CBT(1当量)的无水DMF溶液(～100mg CBT/mL)和DIPEA(1.4当量)加入到混合物中。将反应物在室温下在氮气下搅拌4小时。经由旋转蒸发去除溶剂，并且将粗产物溶解在乙酸乙酯中，并依次用水、饱和碳酸氢钠水溶液、然后用盐水洗涤有机层。然后，用3:1到1:1的己烷:乙酸乙酯通过快速色谱进一步分离Boc-gly-CBT。通过将Boc-gly-CBT在1:1TFA:DCM中搅拌1小时来完成Boc脱保护。然后，经由旋转蒸发去除溶剂。

[0192] 步骤2-HA-gly-CBT：

[0193] 

[0194] 在将HA(1当量)溶解在1:1DMSO:DI水(10mg/mL)之后，将N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐(磺基-NHS，0.18当量)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC，0.18当量)和gly-CBT(0.18当量)依次加入到反应混合物中。在室温下反应24小时之后，通过重复进行从乙醇沉淀并随后透析24小时来纯化HA-gly-CBT。然后，经由冻干干燥HA-gly-CBT。HA-gly-CBT的质子NMR光谱在图2中描绘。

[0195] 不同分子量的HA-gly-CBT的合成

[0196] 通过改变反应剂的化学计量，以不同程度的CBT官能化合成HA-gly-CBT。此外，以不同分子量的HA(～10、50和250kDa，从Creative PEG works购买)开始，使用本文所述的两步合成合成不同分子量的HA-gly-CBT。使用凝胶渗透色谱(GPC)来验证具有不同分子量的可交联实体的合成。使用串联的DAD和RI检测器，在Agilent 1100HPLC上，通过Agilent PL aquagel-OH MIXED-M柱(8um 300x 7.5mm)进行GPC分析。使用0.2M $NaNO_3$在水中的流动相，流速为1mL/分。使用10、50和250kDA HA制备的三种可交联实体的GPC分析在图3中描绘。

[0197] HA-CBT的不同变体的合成

[0198] 在一些实施例中，第一交联实体可以是用CBT衍生物官能化的HA衍生物。例如，在一些实施例中，CBT衍生物(除6-氨基-2-氰基苯并噻唑外)可以缀合到HA，例如6-羟基苯并噻唑-2-腈或图4a中示出的结构的另一种化学衍生物。在一些实施例中，本CBT衍生物可以在通过化学连接子缀合到HA之前进一步衍生化，以促进与HA的缀合。在一些实施例中，本化学连接子可以是氨基酸以及其它化学基团。在一些实施例中，CBT衍生物可以缀合到羧酸(R1)、醇(R2)或HA上的另一个化学基团，如图4b中所示。

[0199] 在一些实施例中，HA-CBT衍生物的亲脂性和/或皮肤渗透可以通过将一或多个其

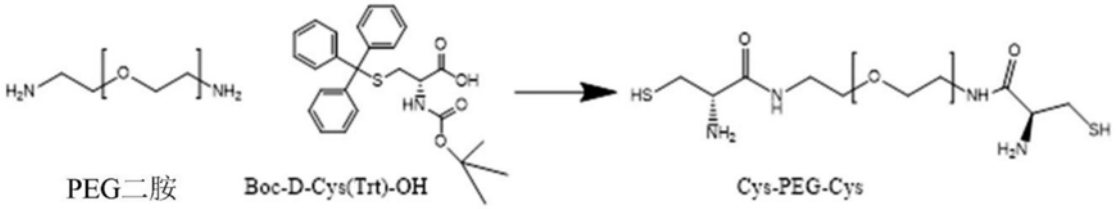
它化学部分缀合到HA主链来增加,例如使用比CBT本身(和/或比HA本身)疏水性更大的一或多种CBT衍生物以及其它化学修饰。在一些实施例中,HA-CBT包括一或多个化学部分(例如,一或多个疏水性部分),诸如例如脂肪酸(例如,与其缀合)。

[0200] 在一些实施例中,一或多个部分(例如,疏水性部分,例如CBT衍生物和/或脂肪酸部分)可以缀合到HA的主链上的醇(R2)。在一些实施例中,在这种缀合之前或之后,HA可以被氧化,从而将一部分醇(R2)转化为醛。

[0201] 在一些实施例中,部分与HA(例如,与HA主链上的醇)的缀合可以经由连接子;在一些此类实施例中,连接子可以是疏水性氨基酸或其它疏水性化学部分。

[0202] 在一些实施例中,可以在这种缀合之前或之后修饰(例如,官能化)本文所述的缀合到HA(或其它聚合物部分)的一或多个部分。仅给出一个特定的实施例,在一些实施例中,例如通过使腈基团与疏水性半胱氨酸衍生物或另一种氨基硫醇(例如,半胱胺)反应,可以使缀合到HA的CBT或CBT衍生物部分中的一些或全部(例如,一部分)进一步官能化。

[0203] 第二可交联实体合成:Cys-PEG-Cys

[0204] 

[0205] 通过将半胱氨酸(Cys)上的羧酸缀合到PEG二胺上的胺来合成Cys-PEG-Cys。在室温下,将N-Boc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸(2.4当量)和1,1'-羰基二咪唑(CDI,3.0当量)在无水DMF中的混合物(～55mg N-Boc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸/mL)搅拌30分钟。然后,将PEG二胺(～2000Da;1当量)的无水DMF溶液(～125mg PEG二胺/mL)加入到反应混合物中。在室温下反应4小时后,通过旋转蒸发去除DMF,并将聚合物沉淀2次到1:1的乙醚:正己烷中。通过在室温下将聚合物加入到0.85:0.10:0.05TFA:三异丙基硅烷:DI水(～50mg/mL)溶液中,完成Boc和三苯甲基脱保护。然后,通过在1:1冰冷乙醚:正己烷中沉淀2次来纯化Cys-PEG-Cys。通过将聚合物溶解在0.1M HCl中并通过旋转蒸发去除溶剂,可以进一步去除TFA。然而,在将聚合物冻干之后,得到Cys-PEG-Cys。

[0206] 第三可交联实体合成:Cys-EDA-Cys

[0207] 可以使用乙二胺作为连接子来制备基于较低分子量Cys的可交联实体(Cys-EDA-Cys)。在上述Cys-PEG-Cys的类似程序中制备这种材料。在室温下,将N-Boc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸(2.8当量)和1,1'-羰基二咪唑(CDI,2.8当量)在无水DMF中的混合物(～55mg N-Boc-S-三苯甲基-D-半胱氨酸/mL)搅拌30分钟。然后,将EDA直接加入到反应混合物中。在室温下反应3.5小时之后,通过旋转蒸发去除DMF,并将聚合物萃取到DCM中,先用水然后再用盐水进行洗涤。然后,使用含有0.05%三乙胺的1.5:1乙酸乙酯:己烷,通过快速色谱分离受保护的产物。通过在室温下将聚合物加入到0.85:0.10:0.05TFA:三异丙基硅烷:DI水(～50mg/mL)溶液中并搅拌4小时,完成Boc和三苯甲基脱保护。然后,通过经由旋转蒸发去除溶剂并用DI水从DCM萃取产物(2次)来纯化Cys-EDA-Cys。通过将聚合物溶解在0.1M HCl中并通过旋转蒸发去除溶剂来进一步去除TFA。在将聚合物冻干之后,得到Cys-EDA-Cys。Cys-EDA-Cys的质子NMR光谱在图6中描绘。

[0208] Cys交联部分的不同变体的合成

[0209] 在一些实施例中,第二交联实体含有2个或超过2个氨基硫醇(即,2个或超过2个氨基硫醇可交联的部分),在至少一些实施例中,其中每一个可以经由连接子部分缀合。

[0210] 在一些实施例中,这种氨基硫醇是1,2-、1,3-或1,4-氨基硫醇或其组合。在一些实施例中,氨基硫醇是D-半胱氨酸、L-半胱氨酸、半胱氨酸衍生物或其组合。在一些实施例中,氨基硫醇以另一个化学部分封端,所述化学部分例如可以在生理条件下被释放以暴露氨基硫醇。

[0211] 在一些实施例中,连接子可以是或包括聚合物,例如PEG、二胺或多肽。在一些实施例中,连接子可以是或包括小分子或氨基酸,例如乙二胺或赖氨酸。

[0212] 实例2.评估可交联实体、其组分和/或组合和/或它们所离体生成的一或多种可交联材料的特性

[0213] 本实例描述了可以用于表征或评估本文所述的可交联实体(和/或其组分和/或组合)某些离体策略,和/或通过它们的反应形成的交联材料。

[0214] 粘度

[0215] 在一些实施例中,可能期望分别评估一或两个可交联实体的制剂的粘度(例如,在它们已经彼此接触和/或被允许交联之前)。

[0216] 本领域技术人员将知道用于评估粘度的技术。仅举一个实例,本领域技术人员将知道用于粘度评估的多种程序,例如,利用流变仪(例如,具有同心柱、锥板或平行板几何形状)。

[0217] 如本文所述,在一些实施例中,如本文所述使用的各个可交联部分的制剂可以具有足够低的粘度以允许通过注射(例如,经由微针)递送。

[0218] 流变性质

[0219] 因此,在一些实施例中,针对本文所述的它们的有用性,可以全部或部分地基于它们所生成的交联材料的一或多种流变性质对可交联实体(和/或其组分和/或组合)进行评估。在一些实施例中,可以基于聚合物部分和/或交联部分分子量(例如,数均分子量)、浓度、取代度以及材料内的交联密度和/或长度等来调节交联材料的一或多种流变性质。

[0220] 本领域技术人员将熟悉用于评估本文所述的交联材料的流变性质的技术。例如,在一些实施例中,可以用流变仪AR-G2进行流变评估。可以使用库艾特几何形状(杯直径=30.42mm,间隙=0.5mm,并且锤直径和长度分别为27.95mm和42.15mm)进行流变流和/或振荡分析。在一些实施例中,可能期望最小化防止溶剂蒸发,例如通过热分离待评估的(溶剂捕集)材料并在实验之前和之后检查其重量(期望重量差应小于1%)。通常,分析将在恒温(37℃)下进行。在一些实施例中,可以通过时间扫描测试来监测胶凝动力学,并且可以例如随时间以10弧度/秒的频率和1%的应力应变测量储能模量(G')和损耗模量(G")。

[0221] 在一些实施例中,可以在测试温度下将第一和第二可交联实体预混合(例如,短时间,例如~5分钟)、负载并测量。在它们之间发生交联之后,可以进行频率扫描和流动扫描测试中的一或两种。在一些实施例中,频率扫描测试可以等温地进行,例如在0.01<ω<100弧度/秒的频率范围内,同时保持应力应变(例如,保持为1%)。期望地,法向力也可以保持为恒定值。在一些实施例中,将期望的是,注意确保减轻由于负载引起的残余应力。在一些实施例中,可以给予交联材料一定的浸泡时间以在测试温度下平衡。在一些实施例中,流动

扫描实验可以在剪切速率范围0.0005<γ<100s^{-1}中等温地进行，以确定零剪切粘度和/或强化剪切稀化方案。在一些实施例中，数据点可以每100秒收集一次。

[0222] 在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有50Pa-10kPa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有10Pa-100 Pa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有100Pa-300 Pa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有300Pa-1000 Pa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有1kPa-10kPa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有5kPa-10kPa的范围内的储能模量。在一些实施例中，本文所述的交联材料将期望地具有大于10kPa的储能模量。

[0223] 胶凝动力学

[0224] 在一些实施例中，期望的可交联实体彼此相互作用，以在生理相关条件下(例如，在37℃下和/或在存在生理相关盐和/或其它试剂的情况下)生成本文所述的具有适当动力学的交联材料。在一些实施例中，体外评估胶凝动力学可能是有用的，例如通过在此类生理相关条件下将第一和第二可交联实体组合在一起并监测其相互作用(例如，通过评估动态储能模量(G')和损耗模量(G"))。如所属领域技术人员将理解，动态储能模量变得大于损耗模量的时间可以被认为是胶凝时间。

[0225] 在一些实施例中，将第一和第二可交联实体在器皿(例如，试管)中混合；经过一段时间；将试管倒置，所得混合物不会从器皿流出。在一些此类实施例中，所述时间段是10、30、60、90或360秒。

[0226] 在一些实施例中，期望的可交联实体(或其组分/部分或组合)是其在离体结合时的胶凝时间(如本文所述测定)小于约30分钟的那些。

[0227] 在一些实施例中，适当或期望的胶凝时间将取决于施用模式或方式。例如，如果第一和第二可交联部分在靶胶凝部位以外的部位(例如，在注射器内或在施用部位)组合或以其它方式彼此接触，则通常期望的是，胶凝时间应足够长，以确保远离靶胶凝部位不会发生显著的交联。

[0228] 膨胀

[0229] 在一些实施例中，针对根据本公开的有用性，可以通过确定它们所产生的交联材料的一或多种膨胀属性对可交联实体、其组分或组合进行评估。在一些实施例中，可以基于干燥形式的交联材料与完全膨胀形式(例如，其已经与外部水性缓冲液达到平衡：Q-$M_{swollen}/M_{dry}$)之间的质量比来测量膨胀程度。在一些实施例中，可以基于聚合物部分和/或交联部分分子量(例如，数均分子量)、浓度、取代度以及材料内的交联密度和/或长度等来调节交联材料的一或多种膨胀属性。在一些实施例中，本文所述的交联材料可以具有50-1000的范围内的膨胀比。

[0230] 透明质酸酶抗性

[0231] 本领域技术人员将理解，交联可以增加生物聚合物的对降解的抗性，从而导致原位耐久性增加。为了证明这一点，离体形成HA凝胶并将其暴露于透明质酸酶(其是一种降解HA的体内天然存在的酶)。

[0232] 将HA-gly-CBT(50μL，15mg/mL，PBS)与PBS(20μL)或Cys-PEG-Cys(20μL，20mg/mL)混合，并在37℃下温育1.5小时。HA-gly-CBT和PBS的混合物仍为粘性液体，而HA-gly-CBT和

Cys-PEG-Cys的混合物形成透明凝胶。向每种调配物加入牛睾丸透明质酸酶(5μL)，并将混合物轻轻涡旋以获得100单位/mL的最终酶浓度。在限定时间点，将样本离心以去除不溶的凝胶组分，并分析每个上清液的等分试样。通过将剩余的具有高分子量的可溶性HA的部分(通过上清液的GPC分析确定)和剩余的不溶性HA的部分(通过用读板器对上清液的GPC分析确定)求和来评估对降解的抗性。

[0233] 与PBS混合的HA-gly-CBT的降解显著快于交联HA-gly-CBT(与Cys-PEG-Cys混合的HA-gly-CBT)的降解。在24小时之后，在未交联的样本中，少于15％的HA-gly-CBT保持为高分子量，而>50％的交联HA-gly-CBT保持为凝胶。24小时温育之后的凝胶的图像在图9中示出，并且其记录了所表现出的对透明质酸酶的降解的抗性。

[0234] 在一些实施例中，交联材料中的交联程度足以赋予原位耐久性。在一些此类实施例中，相对于适当参考(例如，相对应的未交联的材料)，交联材料表现出增加的耐久性。

[0235] 实例3:可交联实体的调配物

[0236] 以下各小节(即，第3.1-3.11节)提供了示范性调配物，其中每一种包括至少一个可交联实体。在一些实施例中，可以用被标记为“可交联实体”的组分取代本文提供的不同的合适的可交联实体。在一些实施例中，系统包括第3.1-3.11节的第一调配物和第二调配物，它们配对在一起，只要第一调配物的可交联实体可以与第二调配物的可交联实体反应以形成交联材料。

[0237] 3.1.示范性精华

[0238] 通过组合表3.1中概述的部分A和B并随后加入部分C直至精华的pH为约5.0-约5.5来制备精华(例如，其可以用作例如抗衰老精华)。

[0239] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的精华制剂。

[0240] 表3.1

[0241]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	足量至100.00	
	Dissolvine® NA2-S	AkzoNobel	EDTA 二钠	0.15	螯合物
		Aldrich	焦亚硫酸钠	0.05	稳定剂
	Structure XL	AkzoNobel	羟丙基淀粉磷酸酯	4.00	舒缓/感官剂
			甘油	3.00	
	Recentia® CS	AkzoNobel	野茶树花/叶/茎汁	0.50	舒缓植物精华部分
			HA-gly-CBT	0.001--5.00	可交联实体
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
B			柠檬酸	0.23	pH 调节剂
			二水柠檬酸三钠	0.82	缓冲液

[0242]

C			柠檬酸	足量	

[0243] 3.2.示范性爽肤水

[0244] 如本文概述制备爽肤水调配物(例如，其可以用作舒缓和/或滋润爽肤水)。通过组

合表3.2中概括的成分并边混合边加热至75℃来制备部分A。分开地，通过组合表3.2中概括的成分并边混合边加热至75℃来制备部分B。使用高剪切搅拌，将部分B加入到部分A中，并在75℃下混合。使调配物在适度混合下冷却。在35℃下，混合部分C直至均匀。将pH调整为5.0±0.5，并加入部分D。

[0245] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的爽肤水制剂。

[0246] 表3.2

[0247]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A			水	足量至 100.00	保湿剂
			甘油	3.00	流变改性剂
			黄原胶	0.30	防腐剂
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
			山梨酸钾	0.20	保湿剂
B	ARLACEL™ LC	Croda	失水山梨醇硬脂酸酯、山梨醇月桂酸酯	3.00	乳化剂
	NATRAGEM E145		聚甘油-4 月桂酸酯/琥珀酸酯	2.80	乳化剂
			硬脂酸	3.50	乳化剂
			乳木果油(牛油果油)	5.00	润肤剂
	CRODAMOL ISIS	Croda	异硬脂醇异硬脂酸酯	10.00	润肤剂
C			水	30.00	
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	可交联实体
	AQUALANCE		水、赤藓糖醇、龙虾肌碱 HCl	3.00	滋润剂
D			柠檬酸	足量	

[0248] 3.3.示范性爽肤水

[0249] 如本文概述制备爽肤水调配物(例如，其可以用作天然防晒面部爽肤水)。通过组合表3.3中概括的成分并加热85℃来制备部分A。通过组合表3.2中概括的成分并加热至85℃来制备部分B。在搅拌下将部分C加入到部分A中并保持温度。在高剪切搅拌下，将部分B缓慢加入到部分A/C中。将混合物均质化。将调配物搅拌并冷却至室温，在低于40℃的温度下加入部分D。

[0250] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的爽肤水制剂。

[0251] 表3.3

[0252]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	Crodamol™ GTCC	Croda	辛酸/癸酸甘油三酯	5.00	
	Crodamol ISIS	Croda	异硬脂醇异硬脂酸酯	5.00	润肤剂
	Arlacel 1690	Croda	失水山梨醇异硬脂酸酯、聚甘油-3 聚蓖麻醇酸酯	3.50	润肤剂
	Prisorine™ 3515	Croda	异硬脂醇	2.00	乳化剂
	Pripure™ 3759	Croda	角鲨烷	2.00	润肤剂
			乳木果(牛油果)油	1.00	润肤剂
B			水	足量	
			甘油	4.00	保湿剂
			NaCl	0.70	
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
	Keltrol CG-T	Kelco	黄原胶	0.1	稳定剂
C	Solaveil XT-300	Croda	二氧化钛、辛酸/癸酸甘油三酯、聚羟基硬脂酸、硬脂酸、氧化铝	24.00	无机广谱防晒剂
			水	20.00	
D	Fruitliquid Blueberry EC	Croda	水、甘油、欧洲越橘果提取物	2.00	抗氧化剂及保护剂
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	可交联实体

[0253] 3.4.示范性W/O乳液

[0254] 如本文概述制备乳液调配物(例如,其可以用作舒缓w/o乳霜)。通过混合直至溶解表3.4中概括的成分来制备部分A。然后,将来自部分B的成分以高剪切加入到部分A中以得到调配物。

[0255] 不希望受任何特定理论束缚,申请人注意到,示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的乳液制剂。

[0256] 表3.4

[0257]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A			水	足量至 100.00	
			氯化钠	1.00	盐
			山梨酸钾	0.30	防腐剂
			苯甲酸钠	0.30	防腐剂
			乳酸	0.05	pH 调节
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	可交联实体
B	Crodamol™ GTCC	Croda	辛酸/癸酸甘油三酯	9.00	润肤剂
	Solaveil™ XT-300	Croda	二氧化钛、辛酸/癸酸甘油三酯、聚羟基硬脂酸、硬脂酸(和)氧化铝	5.00	防晒剂
	SP Arlacel™ 1690 MBAL	Croda	失水山梨醇异硬脂酸酯(和)聚甘油-3 聚蓖麻醇酸酯	3.00	W/O 乳化剂
	Pripure™ 3759	Croda	角鲨烷	3.00	润肤剂
	Crodamol™ ISIS	Croda	异硬脂醇异硬脂酸酯	2.00	润肤剂
	SpanTM 80	Croda	失水山梨醇油酸酯	1.00	助乳化剂
			生育酚(和)向日葵(葵花)籽油	0.20	抗氧化剂

[0258] 3.5.示范性水凝胶面膜

[0259] 如本文概述制备水凝胶面膜调配物(例如,其可以用作含浸有精华的固体纤维面膜)。通过在螺桨混合下将EDTA四钠溶解在水中来制备部分A。将胶预先分散在甘油中以制成浆液。将浆液在螺桨混合下加入到EDTA四钠溶液中,混合至均匀且无结块。将部分A加热至85-90℃以使胶水合。趁部分A较热时,边混合边加入表3.5中概括的部分B。

[0260] 将表3.5中概括的部分C成分进行预混合,加入到部分A和B中。将热溶液立即倒入模具中,并使其不受干扰。一旦凝胶冷却并凝固,就适当地包装调配物。

[0261] 不希望受任何特定理论束缚,申请人注意到,示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的水凝胶面膜制剂。

[0262] 表3.5

[0263]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A			水	足量	
			库拉索芦荟叶汁	5.00	
			EDTA 四钠	0.10	舒缓
		Kelco	卡拉胶	0.80	螯合剂
		Kelco	槐豆胶	0.60	胶凝剂
			甘油	14.00	胶凝剂
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	可交联实体

[0264]

			生育酚	0.05	化妆品活性
B			NaCl	0.80	稳定剂
			水	3.20	
C	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂

[0265] 3.6.示范性粉末至乳霜精华

[0266] 如本文概述制备精华调配物(例如,其可以用作BB(遮瑕膏)粉末至乳霜舒缓精

华)。程序:加入表3.6中概括的部分A的所有成分,并在高剪切下混合,直至获得均质的混合物。加入表3.6中概括的部分B粉末成分,并混合直至获得自由流动的粉末。

[0267] 不希望受任何特定理论束缚,申请人注意到,示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的精华制剂。

[0268] 表3.5

[0269]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	足量 100.00	
			甘油	30%	保湿剂
			透明质酸-CBT 聚合物	0.001-5.00	可交联实体
	TEGOSOFT® TN	Evonik	C12–C15 烷醇苯甲酸酯	2.00	润肤剂
			乳木果油(牛油果油)	2.00	润肤剂
			生育酚		抗氧化剂
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
B	AEROSIL® R 812 S		甲硅烷基化硅石	10.0	稳定剂
	SIPERNAT® 11 PC		水合硅石	1.00	感官改性剂
			色素	足量	任选

[0270] 3.7.示范性固体调配物

[0271] 如本文概述制备固体调配物(例如,其可用作靶向深皱纹实心棒)。程序:将表3.7中所述的部分A加热至95℃并混合直至溶解,然后加入加热至95℃的表3.7中所述的相B,冷却至75℃并加入相C。混合至均匀并倒入模具或容器中。

[0272] 凝固点:70℃

[0273] 外观:明亮的琥珀色透明至半透明凝胶

[0274] 不希望受任何特定理论束缚,申请人注意到,示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的固体制剂。

[0275] 表3.7

[0276]

部分	商品名称	供应商	INCI 名称	% w/w	功能
A	AJK OD2046*	Ajinomoto NA	辛基十二烷醇、二丁基月桂酰谷氨酰胺、二丁基乙基己酰基谷氨酰胺	足量 100.00	胶凝混合物
B	Floramac 澳洲坚果油	Floratech	全缘叶澳洲坚果籽油	20.00	天然润肤剂
	Florasun 90	Floratech	向日葵(葵花)籽油	23.65	天然润肤剂/滋润剂
	夜来香油	Hallstar	月见草(夜来香)油	5.00	天然润肤剂
	Sensolene	Hallstar	橄榄油酸乙基己酯	5.00	轻润肤剂
	ELDEW SL-205	Ajinomoto NA	月桂酰肌氨酸异丙酯	5.00	轻润肤剂
	Schercemol DISM 酯	Lubrizol	二异硬脂醇苹果酸酯	5.00	稳定性改善
	Schercemol DISD	Lubrizol	二异硬脂醇二聚亚油酸酯	5.00	稳定性改善
	Schercemol 185	Lubrizol	异硬脂醇新戊酸酯	5.00	润肤剂
	Liponate NEB	Lipo Chemicals	C12-15 烷醇苯甲酸酯	5.00	净度增强
	ELDEW PS-306	Ajinomoto NA	植物固醇/山嵛醇 辛基十二烷醇月桂酰谷氨酸酯	1.00	凝胶稳定性
	Oryza 生育三烯酚	Oryza Oil & Fat Co	水稻(米)糠油(和)生育三烯酚(和)生育酚	0.30	天然抗氧化剂
	Astaxanthin – 5C	Oryza Oil & Fat Co	辛酸/癸酸甘油三酯、雨生红球藻提取物、虾青素、生育酚	0.05	抗氧化剂
C			HA-gly-CBT	0.001-5.00	可交联实体

[0277] 3.8.示范性喷雾

[0278] 如本文概述制备喷雾调配物(例如,其可以用作具有pH 5抗氧化剂的焕肤喷雾)。组合表3.8中概括的成分以得到部分A。组合表3.8中概括的成分以得到部分B。将部分A加入到部分B中,同时混合直至均匀。将部分C加入到部分A和B的混合物中。将所得混合物混合直至均匀。将pH调节至pH 4.0-5.0以保持稳定性。调配物包装在喷雾瓶中。

[0279] 表3.8

[0280]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	足量至 100.00	
			甘油	6.00	

[0281]

B	ProdhyFluid®	Prod'Hyg	失水山梨醇油酸酯、聚山梨酯 80、辛酸/癸酸甘油三酯、角鲨烷、甜扁桃油、聚山梨酯 20、生育酚	5.00	乳化剂
			生育酚	0.20	
	PhytoTrace 米	Inolex	水稻(米)种子提取物/甘油/水	1.00	舒缓皮肤感觉
	PhytoTrace 无花果	Inolex	无花果果实提取物/甘油/水	1.00	舒缓皮肤感觉
	葡萄柚花露水		柚(葡萄柚)花水	0.50	赋能
	罗马洋甘菊水		白花春黄菊(罗马洋甘菊)水	0.50	赋能
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
			谷胱甘肽	0.20	稳定剂
C			Cys-PEG-Cys	0.001-5.00	可交联实体
D			柠檬酸	足量至 pH 4-5	稳定剂

[0282] 3.9.示范性精华

[0283] 组合表3.9中概括的部分A的成分并混合直至均匀。组合表3.9中概括的部分B的成分并加入到部分A中，混合直至均质。加入部分C。加入部分D直至用25％柠檬酸溶液(按需)将pH调节至5.0-5.5。

[0284] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的精华制剂。

[0285] 表3.9

[0286]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	足量 100.00	
	Dissolvine® NA2-S	AkzoNobel	EDTA 二钠	0.15	螯合物
		Aldrich	焦亚硫酸钠	0.05	
	Structure XL	AkzoNobel	羟丙基淀粉磷酸酯	4.00	舒缓
			甘油	3.00	
	Recentia® CS	AkzoNobel	野茶树花/叶/茎汁	0.50	植物精华部分
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
B			柠檬酸	0.23	
			二水柠檬酸三钠	0.82	
C			水	50.00	
			HA-Cys	0.001-5.00	可交联实体

[0287]

D			柠檬酸	足量	

[0288] 3.10.示范性粉末

[0289] 如本文概述制备粉末调配物(例如，其可以用作具有抑制剂的粉末至乳霜调配物，以减缓/防止产品中直至皮肤内的交联)。组合表3.10中概括的部分A的成分，并在高剪切下混合，直至获得均质的混合物。加入部分B粉末成分并混合直至获得自由流动的粉末。将部

分C折叠并混合直至均匀。

[0290] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的精华制剂。

[0291] 表3.10

[0292]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	足量 100.00	
			甘油	30%	保湿剂
			Cys-PEG-Cys	0.001-5.00	连接子
			谷胱甘肽	0.20	抗氧化剂
			生育酚	0.20	抗氧化剂
	TEGOSOFT® TN	Evonik	C12–C15 烷醇苯甲酸酯	2.00	润肤剂
			乳木果油(牛油果油)	2.00	润肤剂
	Optiphen Plus	Ashland	苯氧乙醇、辛甘醇、山梨酸	足量	防腐剂
B	AEROSIL® R 812 S		甲硅烷基化硅石	10.0	稳定剂
	SIPERNAT® 11 PC		水合硅石	1.00	感官改性剂
			色素	1.00	皮肤颜色、光泽度改性剂
C			透明质酸-CBT	0.001-5.00	可交联实体

[0293] 3.11.示范性爽肤水

[0294] 如本文概述制备爽肤水(例如，其可以用作液晶固体纳米颗粒双重作用爽肤水)。将表3.11中概括的部分A中的组分混合，并加热至50℃。加入部分B的组分，并将混合物加热至65℃-70℃。在室温下混合表3.11中概括的相C的组分。然后，将部分A和B的加热组分在层流条件下的器皿中混合在一起，从而形成平均大小为150nm的溶致液晶混合相(AB)。然后，将溶致液晶混合部分A和B与部分C混合以形成分散液。一旦均匀，就加入相D，通过在轻轻混合下加入相E来调节pH，然后冷却至室温。

[0295] 不希望受任何特定理论束缚，申请人注意到，示范性组分在一些实施例中可以在功能上参与如下所示的精华制剂。

[0296] 表3.11

[0297]

部分	商品名称	供应商	INCI/成分名称	% w/w	功能
A	水		水	3.00	
			Cys-PEG-Cys	0.001-5.00	连接子
		Tri-K	月桂酰乳酰乳酸钠	0.50	乳化剂
		Kelco	黄原胶	0.10	增稠剂
			谷胱甘肽	0.10	抗氧化剂
B			鲸蜡醇棕榈酸酯	20.00	乳化剂
	Biobase S	Tri-K	甘油硬脂酸酯、硬脂酰乳酰乳酸钠、鲸蜡硬脂醇	0.50	乳化剂
C			水	足量至100.00.00	
D			水	40.00	
			HA-gly-CBT	0.10-5.00	可交联实体
			防腐剂	足量	防腐剂
E			柠檬酸	足量 pH 4-5	

[0298] 实例4:在猪皮肤中评估可交联实体、其组分或组合和/或它们所生成的交联材料的特性

[0299] 本实例描述了使用猪皮肤研究来表征或评估本文所述的可交联实体(和/或其组分和/或组合)和/或通过它们的反应而形成的交联材料。

[0300] 在一些实施例中,将包括第一和第二可交联实体的系统应用于猪皮肤。在一些此类实施例中,第一可交联实体的应用在时间上与第二可交联实体的应用分开(即,相隔一段时间)。在一些实施例中,可以评估多个不同的相隔时间段。本领域技术人员将理解,所述时间段可以取决于期望渗透深度、皮肤类型和靶位置。在一些此类实施例中,可以评估随期望渗透深度、皮肤类型和靶位置而变化的多个不同的相隔时间段。

[0301] 在一些实施例中,在施用一或两个可交联实体之后的一或多个时间点评估第一和/或第二可交联实体向猪皮肤中的渗透程度。例如,在一些实施例中,可以在一或多个时间点进行一或多次这种评估,所述时间点选自由以下组成的群组:1、4、12、24和48小时。

[0302] 在一些实施例中,在使用前,可以例如在室温下解冻一或多个猪皮肤样本(例如,持续30分钟或更长时间)。在一些实施例中,可以从此类样本剪下毛发(例如,使用剪刀),并且可以例如使用0.9%盐水溶液冲洗样本。

[0303] 在一些实施例中,皮下原位胶凝可以通过将第一和第二可交联实体施用于样本上或样本中的一或多个部位来评估。例如,在一些实施例中,可以将第一和第二可交联实体的溶液注射到样本中(例如,分别地或作为混合物,任选地在预混合期之后,并且任选地以一或多种不同的浓度比)。可替代地或另外地,在一些实施例中,可以切除猪皮肤样本,直至到达其下面的真皮层,并且可以施用第一和第二可交联部分以填充空隙。

[0304] 在一些实施例中,已经向其施用了第一和第二可交联部分的皮肤样本可以在稳定的条件下保持(例如,在陪替氏培养皿中在室温下储存)一段时间,以允许原位发生交联(例如,胶凝)。

[0305] 在一些实施例中,可以在施用之后(例如,在注射混合物或第一可交联部分或更可

能的第二可交联部分之后)的一或多个时间点评估交联度,例如通过对一或多个样本切片(例如,使用手术刀)。在一些实施例中,这种切片涉及制备小的(例如,约0.4cm x 0.4cm)方块,其可以被冷冻(例如,通过浸入异戊烷/干冰浴中)并例如在-80℃下储存。

[0306] 不管是否已经进行这种储存,都可以获得薄的(例如,约20μm)皮肤切片(例如,使用低温恒温器),并且可以对其进行成像(例如,使用共聚焦显微镜)。

[0307] HA-gly-CBT猪皮肤渗透

[0308] 将冷冻的猪皮肤平衡至室温,并切成～1.5x 1.5cm的方块。在温育之前,对一个皮肤样本进行胶带剥离二十次以去除角质层(SC)。所有皮肤块均用PBS洗涤,然后置于37℃的弗朗茨扩散池($1cm^2$)中5分钟。在供体隔室中应用PBS或HA-gly-CBT(～250kDa,10mg/mL,PBS)(150μL),将供体隔室用石蜡膜密封,并将细胞在加湿烘箱中于37℃下温育18小时。

[0309] 皮肤表面在弗朗茨池中用PBS洗涤三次,然后用手术刀切除应用区域中心的小区域。将皮肤组织置于活检模具中的OCT中,并通过将模具放入甲基戊烷/干冰浆液中进行速冻。将冷冻的皮肤在恒冷切片机上切成20μm的切片。在每个切片上放一滴ProLong Gold,并在成像前盖上盖玻片。在使用DAPI滤光片(Zeiss滤光片49)的ZeissAxioPlan2上以10倍物镜拍摄荧光图像,以可视化HA-gly-CBT的位置。

[0310] 与仅用PBS治疗的皮肤相比,用HA-gly-CBT治疗的皮肤在表皮中表现出显著更多的荧光,指示HA-gly-CBT穿透SC的皮肤渗透(图10)。在局部应用HA-gly-CBT之前进行胶带剥离的皮肤中观察到较强的荧光,指示在破坏皮肤的顶部屏障之后的渗透增加。

[0311] 使用凝胶渗透色谱(GPC)评估完整的HA-gly-CBT的渗透的验证。将HA-gly-CBT(15mg/mL,300μL,含0.5％吐温$_{20}$的DI水)局部应用于弗朗茨扩散池中的6个单独的猪皮肤块。将样本在密封的供体隔室中于37℃下温育18小时,皮肤表面用PBS洗涤三次。使用胶带条从样本分离角质层,然后将表皮从真皮上刮下,并将真皮切成小块。通过在37℃下1:1PBS:甲醇中温育过夜,从每个皮肤切片提取HA-gly-CBT(SC的顶部8层、SC的底部8层、表皮和真皮)。通过旋转蒸发减少提取物的体积,并通过GPC分析浓缩溶液(使用与实例1中所述相同的条件,流动相为9:1DI:MeOH,0.2M $NaNO_3$)。

[0312] 在所有6个样本中,对来自样本的每个层(角质层、表皮、真皮)的GPC信号求平均(图11)。在角质层和表皮/真皮提取物中,均观察到对应于HA-gly-CBT的信号,指示完整的HA-gly-CBT递送到皮肤的那些相应层。SC和表皮/真皮提取物的误差条分别包含在图11b和11c中,以证明结果的可重复性。

[0313] 猪皮肤中的原位交联

[0314] 为了评估两个可交联实体之间的交联反应的生物相容性,将两种组分直接引入猪皮肤。用31径规胰岛素注射器将HA-gly-CBT(30μL,5mg/mL,PBS)在皮肤表面正下方注射到两个猪皮肤样本中。然后,在注射HA-gly-CBT之后1小时(使用相同的技术)将Cys-PEG-Cys(20mg/mL,PBS)注射到其中一个皮肤样本中。将两个皮肤样本在加湿烘箱中于37℃下温育过夜。在温育后,如上所述将样本进行冷冻和切片。

[0315] 将来自每组的一半切片于37℃下在DI水中洗涤1.5小时,以去除游离的HA-gly-CBT。使用如上所述的荧光显微镜对玻片成像。与未洗涤切片相比,仅注射HA-gly-CBT的皮肤洗涤切片的皮肤荧光强度显著降低(图12A)。然而,注射了两个可交联实体的皮肤样本在洗涤和未洗涤切片中均表现出相似的皮肤荧光强度(图12B)。这些结果表明,两个可交联实

体在皮肤内反应以形成不溶性凝胶,所述不溶性凝胶在玻片洗涤步骤中未被去除。

[0316] 实例5.施用于人类

[0317] 本实例描述了本文所述系统向人类的施用,以及根据这种施用对一或多种皮肤特性的评估。

[0318] 如本文所述,将第一和第二可交联实体施用于皮肤部位。在一些实施例中,两个可交联实体被施用于相同的部位;在一些实施例中,每一个可以被施用于不同的部位,只要两者最终到达目标靶部位,使得通过第一和第二可交联实体的反应形成的交联材料在靶部位处原位形成或以其它方式提供。

[0319] 在一些实施例中,第一和第二可交联实体中的一或两个被施用于靶部位(例如,通过注射)。在一些实施例中,第一和第二可交联实体中的一或两个被施用于靶部位上方(即,外部)的部位,使得一或多个可交联实体必须渗透皮肤组织以便到达靶部位。除了其它方面,本公开提供了具有促进这种渗透的特定特性(例如,亲脂性和/或分子量(例如,数均分子量)等)的可交联实体。

[0320] 在一些实施例中,第一可交联实体的施用在时间上与第二可交联实体的施用分开(即,相隔一段时间)。在一些此类实施例中,所述时间段足以允许第一施用可交联实体在施用第二施用可交联实体之前朝向和/或进入靶部位的大量渗透。

[0321] 在一些实施例中,针对可交联实体中的至少一个进行多次施用;在一些实施例中,针对可交联实体中的每一个进行多次施用。在一些实施例中,两个可交联实体的施用被视为所提供的系统的“剂量”。在一些实施例中,将一个可交联实体施用于先前已接受另一个可交联实体的施用的受试者被视为所提供的系统的“剂量”。在一些实施例中,施用多个剂量。

[0322] 在一些实施例中,可交联实体是实例3的调配物。在一些实施例中,第一可交联实体的调配物和第二可交联实体的调配物相同。在一些实施例中,第一可交联实体的调配物和第二可交联实体的调配物不同。

[0323] 评估皮肤改善

[0324] 在一些实施例中,在已施用系统之后(例如,在选自由以下组成的群组的时间点:在施用之后(例如,在施用任何特定剂量或完整给药方案之后)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31天或更长时间),对皮肤(例如,靶部位处和/或其上方的皮肤)的一或多种特性进行评估。在一些实施例中,在已施用系统之后(例如,在选自由以下组成的群组的时间点:在施用之后(例如,在施用任何特定剂量或完整给药方案之后)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个月或更长时间),对皮肤(例如,靶部位处和/或其上方的皮肤)的一或多种特性进行评估。在一些实施例中,在已施用系统之后约3.5天,对皮肤(例如,靶部位处和/或其上方的皮肤)的一或多种特性进行评估。在一些实施例中,在已施用系统之后约9天,对皮肤(例如,靶部位处和/或其上方的皮肤)的一或多种特性进行评估。

[0325] 例如,在一些实施例中,在系统施用之后评估皮肤的一或多种视觉特征(例如,与这种施用之前进行比较)。在一些实施例中,视觉特征由一或多个专业评分者参考整体美感改善量表(GAIS)进行评估,如本领域所知,整体美感改善量表是一种经过验证的标准化5分量表,用于测量对美容程序的反应,这已被证明具有良好的评定者内和评定者间信度,并且

类别内相关系数通常在0.85-0.95的范围内(例如参见卡拉瑟斯(Carruthers)和卡拉瑟斯(Carruthers),美容与激光疗法杂志(J.Cosmet Laser Therp.),12:235,2010),在一些实施例中,本文所述的系统的施用实现了GAIS量表中的至少1级改善。

[0326] 可替代地或另外地,在一些实施例中,可以用既定量表(诸如例如兰姆勒皱纹量表、受试者满意度量表(通常为7分)、艾尔建皮肤粗糙度量表或任何其它适当量表)评估一或多种皮肤特征。在一些实施例中,还可以使用包含皮肤的一或多种物理、功能或视觉属性(例如,光滑度、光泽度、紧致度、弹性、体积等)的主观和/或客观评估的任何经过验证的量表。

[0327] 在一些实施例中,一或多种皮肤特征可以是或涉及真皮细胞外基质的机械支持增强、成纤维细胞伸长和/或扩散、II型TGF-β受体或其下游靶标(例如,I型胶原蛋白合成)的上调、结缔组织生长因子的上调和/或其组合(参见例如权(Quan)等人,皮肤病研究杂志(J Invest Dermatol.),133:658,2013)。本领域技术人员知道用于评估此类特征的策略,包含在注射到人类皮肤(包含受损(例如,光损伤)人类皮肤)之后(参见例如,王(Wang)等人,皮肤病学档案(Arch Dermotal.),143:155.2-7)。

[0328] 在一些实施例中,可以在施用所提供的系统之后评估皮肤水合。在一些此类实施例中,例如利用皮肤水分测试仪(例如,提供皮肤内的相对水分含量的电导率测量的皮肤水分测试仪CM825)来测量皮肤水合。在一些实施例中,本文所述的系统的施用实现了皮肤水合的统计学显著改善;在一些此类实施例中,例如在本文所述的施用之后12、24、36或48小时的时间测量时,这种改善为至少10%、15%、20%、25%或更多。例如,当将交联材料(HA-gly-CBT+Cys-PEG-Cys)施用于样本时,在施用材料之后立即观察到皮肤水合的26%改善。此外,观察到干净未受损皮肤上的持久皮肤水合,超过72小时(如使用Courage+Khazaka Corneometer®CM825评估)。

[0329] 在去离子水、聚山梨酯20和甘油中制备20mg/ml HA-gly-CBT溶液。制备第二种Cys-PEG-Cys的PBS溶液(20mg/mL),并用NaOH将pH调节至5.5-6.5。在基线读数后,立即将HA-gly-CBT溶液(20μl)和市售HA基准精华溶液(20μl)应用于前臂内侧上3cm x3cm区域。在0.5小时和6小时测量另外的皮肤水分测试仪读数。在6小时之后,将Cys-PEG-Cys溶液(20μl)应用于HA-gly-CBT测试部位,并将磷酸盐缓冲液(20μl)应用于市售HA基准精华部位。然后,在12小时、24小时、48小时、72小时和96小时测量另外的皮肤水分测试仪读数。结果列于表3.12中。

[0330] 基准市售HA(透明质酸)精华是高分子量和低分子量透明质酸与1.5%纯透明质酸的掺合物,制造商称其能够补充水分以产生饱满、年轻、柔软的皮肤。市售HA精华基准的成分列表包含水、甘油、羟乙基哌嗪乙烷磺酸、透明质酸钠、PEG-60氢化蓖麻油、谷类种子提取物/黑麦种子提取物、泛酸钙、二肽二氨基丁酰苄基酰胺二乙酸盐、抗坏血酸葡糖苷、EDTA二钠、戊二醇、苯氧乙醇和氯苯甘醚。

[0331] 表3.12

[0332]

时间(小时)	HA-gly-CBT/Cys-PEG-Cys			市售 HA 精华	
	相对于基线的变化%	标准偏差		相对于基线的变化%	标准偏差
基线	0	-		0	-
0.5	26%	+/- 2.9		17%	+/- 2.2
6	20%	+/- 4.9		6%	+/-4.1
12	21%	+/- 6.0		13%	+/-4.0
24	14%	+/- 9.0		5%	+/-3.9
48	14%	+/- 4.2		0%	+/-4.2
72	6%	+/- 4.0		-5%	+/-3.8
96	5%	+/- 4.9		-5%	+/-2.9

[0333] 在一些实施例中,可以在施用所提供的系统之后评估皮肤光滑度。在一些此类实施例中,例如通过3D皮肤轮廓术,例如使用Canfield Promos装置和/或通过硅/环氧浇铸扫描来测量皮肤光滑度。在一些实施例中,本文所述的系统的施用实现了皮肤光滑度的统计学显著增加,和/或随时间的光滑度增加(在有或没有另外的施用的情况下)。例如,使用7分皮肤光滑度改善量表证明了在施用所提供的系统之后的皮肤光滑度的视觉改善。在应用系统之后两天,注意到两级改进,如图13中所描绘。

[0334] 在一些实施例中,可以在施用所提供的系统之后评估皮肤厚度,在一些此类实施例中,例如可以通过超声轮廓分析来评估皮肤厚度(参见例如范穆德(Van Mulder)等人,疫苗(Vaccine),35:1810,2017)。在一些实施例中,本文所述的系统的施用实现了皮肤厚度的统计学显著增加。

[0335] 在一些实施例中,相关皮肤可能已经受损(例如,由于疾病、病症或病状,或者由于手术、美容或皮肤病学治疗),并且评估这种受损皮肤的改善。在一些实施例中,受损皮肤可以是或包括经激光(例如,点阵激光)治疗的皮肤、经强脉冲光治疗的皮肤、经微针治疗的皮肤、经过化学剥离治疗的皮肤、暴露于皮肤磨削的皮肤、创伤性受损皮肤(包含通过手术)、患有诸如皮肤萎缩、极端干燥等医学病状的皮肤。

[0336] 可替代地或另外地,在一些实施例中,相关皮肤可以是起皱纹或以其它方式表现出衰老迹象的皮肤,或者可以是针对其期望另外的丰满度和/或弹性的皮肤。

[0337] 在一些特定实施例中,目标皮肤可以是或包括某一部位处的皮肤,所述部位选自由以下组成的群组:全脸和/或受试者脸部的特定靶标,例如嘴唇、下唇、上唇、泪槽或眼睛周围的其它部位(例如,鱼尾纹)、鼻唇沟、前额、脸颊、手背、耳垂、膝盖、颈部、前胸、手臂、腿、躯干、臀部、脚及其组合,包含例如全脸等。

[0338] 评估渗透

[0339] 在一些实施例中,可能期望评估如本文所述的施用于人类的一或两个可交联实体的渗透。

[0340] 在一些实施例中,从已经向其施用或递送所提供的系统的部位获得活检,并且对活检进行组织学检测以评估渗透的程度(例如,量)和/或深度。在一些实施例中,在表皮、真皮或下面的下皮中或其下方检测到一或多个可交联实体和/或交联物质。在一些实施例中,在活检中的皮肤内(例如,在表皮、真皮或下面的下皮处、其上、其中或其下方和/或在靶部位处的其它位置)检测到一定量的一或多个可交联实体,所述量是所施用(例如,施用于皮肤表面和/或靶部位外部的部位)的可交联实体的有意义的百分比(例如,至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、

90％、95％或更高的百分比)。

[0341] HA-gly-CBT渗透到受破坏的人类皮肤中

[0342] 在一些实施例中,可以通过皮肤屏障破坏技术来增加交联实体向人类皮肤中的渗透。例如,用显微镜评估HA-gly-CBT(用AlexaFluor 647酰肼标记)向人类皮肤中的体外渗透,所述皮肤已通过不同的技术进行了预治疗。在应用所述材料之前,将一个皮肤样本用胶带剥离二十五次以去除大部分角质层。在第二个样本中,将HA-gly-CBT应用于皮肤的表面,然后用微针滚轮(500μm针)治疗皮肤,滚压产品40次。在局部应用之后,将两个样本在加湿烘箱中在弗朗茨池中于37℃下温育20小时。如上所述,将样本切成20μm的切片,并在使用Cy5滤光片的荧光显微镜上成像(图14)。

[0343] 在人类皮肤的表皮和真皮中观察到显著荧光信号,所述表皮和真皮在局部应用HA-gly-CBT之前进行胶带剥离。在用HA-gly-CBT和微针滚轮进行治疗的样本中,在表皮中观察到显著荧光信号,但在真皮中仅观察到假信号。这两个实例都说明了破坏人类皮肤的屏障如何促进HA-gly-CBT深入人类皮肤的渗透。

[0344] 经由应用HA-gly-CBT的50kDa变体进一步探查了促进HA-gly-CBT的局部渗透的微针滚轮治疗能力。将HA-gly-CBT(50kDa,用AlexaFluor 647酰肼标记)局部应用于人体皮肤,用微针滚轮(500μm针)滚压二十次。将皮肤转移到弗朗茨池,并在37℃下温育20小时。将皮肤冷冻、切片并在具有Cy5滤光片的荧光显微镜上成像以观察渗透深度(图18A)。相似地治疗另外两个人类皮肤样本。通过胶带剥离(20次)从样本去除角质层,并用手术刀分离表皮和真皮。在将HA-gly-CBT从每个皮肤层提取(在37℃过夜)到1:1PBS:甲醇中后,通过测量读板器上的每种提取物中的AlexaFluor染料的荧光来量化HA-gly-CBT的浓度(图18B)。

[0345] 在用微针滚轮进行治疗之后,在表皮和真皮中均检测到大量的HA-gly-CBT(50kDa)。观察到的HA-gly-CBT渗透表明,当与基于半胱氨酸的可交联实体的随后、同时或先前局部递送相结合时,将稳定的基于HA的交联材料局部递送到真皮深处是可行的。

[0346] 实例6:示范性系统

[0347] 准备受试者的左前臂内侧的皮肤上的施用部位(参见图15)以用于可交联实体的施用。通过用温和的肥皂和温水洗涤30秒,再在温水下冲洗所述部位30秒并将所述部位拍干来准备所述部位。将半透明的思高胶带重复地应用于每个部位并去除直至每个部位略微闪亮(约40个循环)。

[0348] 将第一调配物施用于每个部位:

[0349]

施用部位	第一调配物
A	PBS
B	2％HA-gly-CBT的PBS溶液
C	2％HA-gly-CBT的PBS溶液

[0350] 在施用第一组合物后,每个部位均以约3cm^3 Tegaderm™型膜覆盖。经过2小时。去除Tegaderm™纸。使所述部位平衡10分钟。在可见光和紫外光(～365nm)下拍摄部位的视觉外观。

[0351] 将第二可交联调配物施用于每个部位:

[0352]

施用部位	第二调配物
A	2％CYS-PEG-CYS的PBS溶液

B	PBS
C	2%CYS-PEG-CYS的PBS溶液

[0353] 在施用第二组合物后,每个部位均以约3cm^3 Tegaderm™型膜覆盖。所述部位保持覆盖过夜。去除Tegaderm™纸。使所述部位平衡10分钟。此时,使用可见光和紫外光(365nm)检查施用部位。在部位A和B处未观察到可记录的荧光信号。在部位C处清晰可见荧光信号(参见图15),指示交联材料已渗透皮肤。

[0354] 施用部位每天至少用温和的肥皂和水洗涤一次并拍干。施用部位在所有其它时间保持干燥。

[0355] 每天在可见光和紫外光(～365nm)下拍摄部位的视觉外观。在部位A和B处未观察到可记录的荧光信号。在部位C处清晰可见荧光信号,指示交联材料已渗透皮肤并仍然存在(图16)。

[0356] 在施用系统后11天,再次使用紫外光检查所述部位。在部位C处清晰可见荧光信号,指示交联材料已渗透皮肤并在11天之后仍然存在。另外,受试者没有表现出任何耐受性问题的证据。与施用系统前的部位相比,施用后11天的施用部位的皮肤质地得到改善。

[0357] 实例7:组织学测量

[0358] 在3x 3平方厘米区域中向左前臂内侧施用以下可交联实体:

[0359] 1. 75μL 2%HA-gly-CBT,

[0360] 2.经过2小时的时间

[0361] 3. 75μL 2%Cys-PEG-Cys,

[0362] 4.经过3小时的时间

[0363] 5. 75μL 2%HA-gly-CBT

[0364] 6.经过2小时时间

[0365] 7. 75μL 2%Cys-PEG-Cys

[0366] 在可交联实体的每次施用之间以及之后,将Tegaderm™应用于施用部位的顶部。每天重复施用过程,持续2天,共进行4次HA-gly-CBT和Cys-PEG-Cys施用。在第三天早晨,在对所述部位进行洗涤和消毒之后,在应用方块的中心取4mm活检。活检立即在OCT中冷冻。

[0367] 用低温恒温器对活检进行切片,并将切片固定在玻片上的中性缓冲福尔马林中。然后,将玻片用阿尔新蓝染色,以检测透明质酸和作为复染剂的核固红(图17)。在染色之前,还用透明质酸酶对一些玻片进行了预处理,以去除透明质酸。如图17中所见,对于未用透明质酸酶预处理的玻片,在表皮和真皮的上部中有强烈的信号。

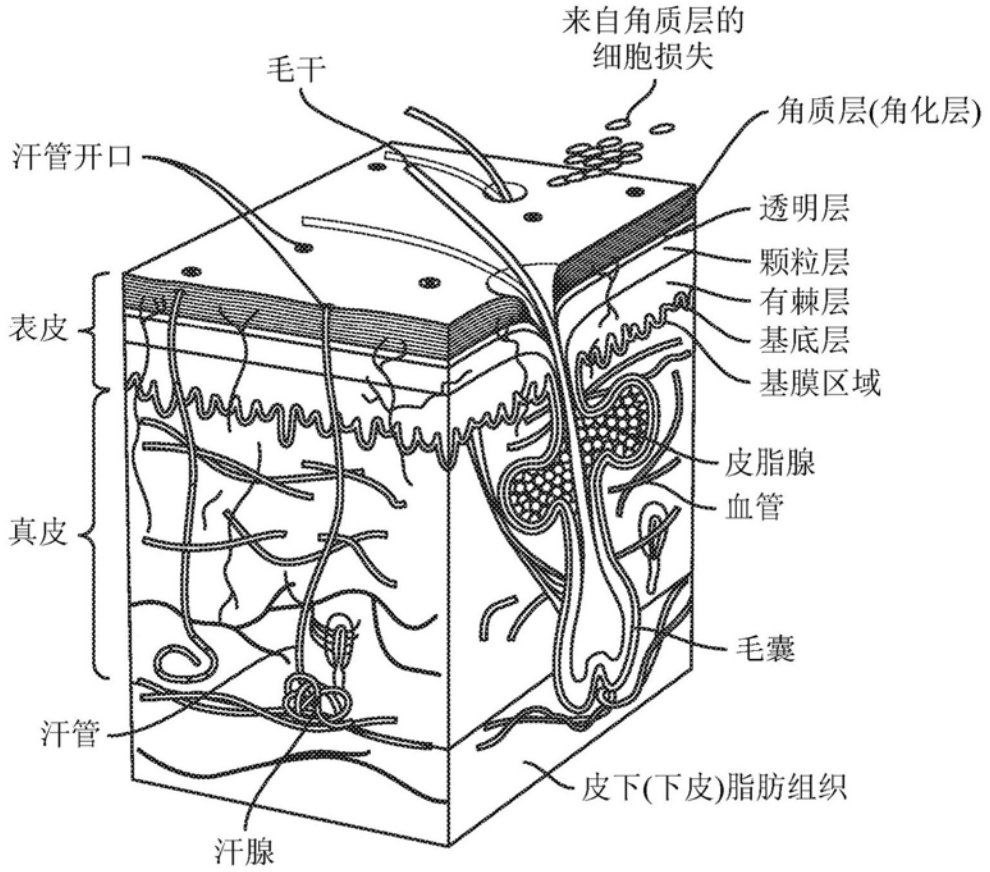

来自角质层的
细胞损失
毛干
角质层(角化层)
汗管开口
透明层
颗粒层
有棘层
基底层
基膜区域
表皮
皮脂腺
血管
真皮
毛囊
汗管
皮下(下皮)脂肪组织
汗腺

图1

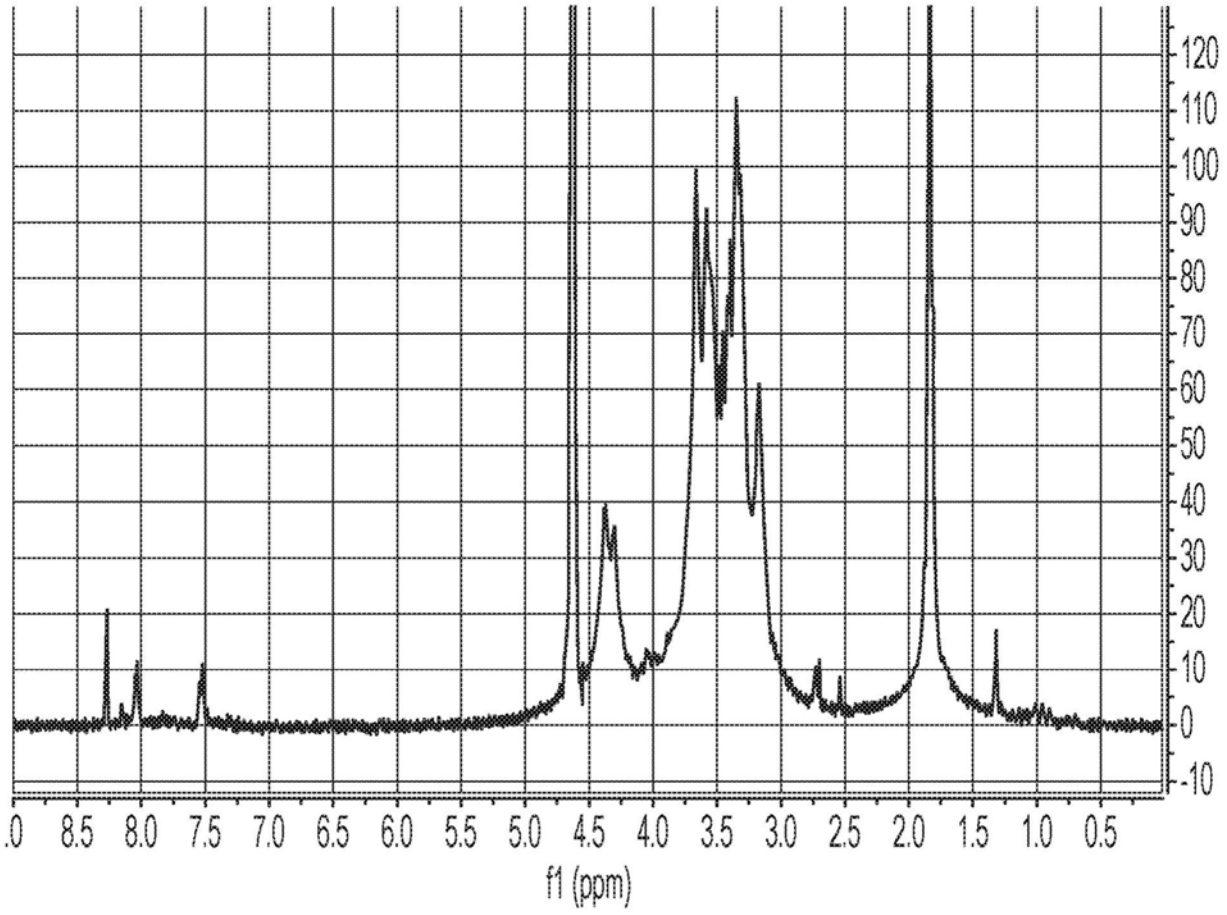

120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
f1 (ppm)

图2

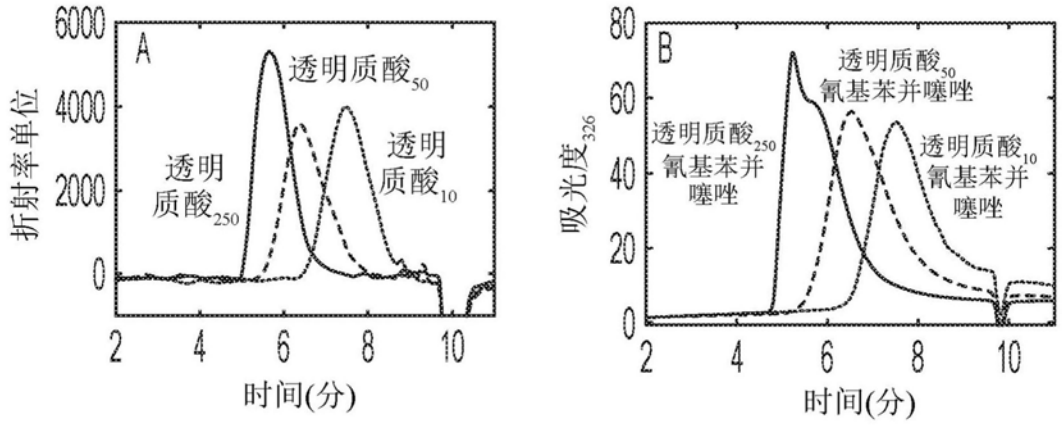

A
透明质酸50
透明质酸250
透明质酸10
折射率单位
6000
4000
2000
0
2 4 6 8 10
时间(分)
B
透明质酸50氰基苯并噻唑
透明质酸250氰基苯并噻唑
透明质酸10氰基苯并噻唑
吸光度326
80
60
40
20
0
2 4 6 8 10
时间(分)

图3

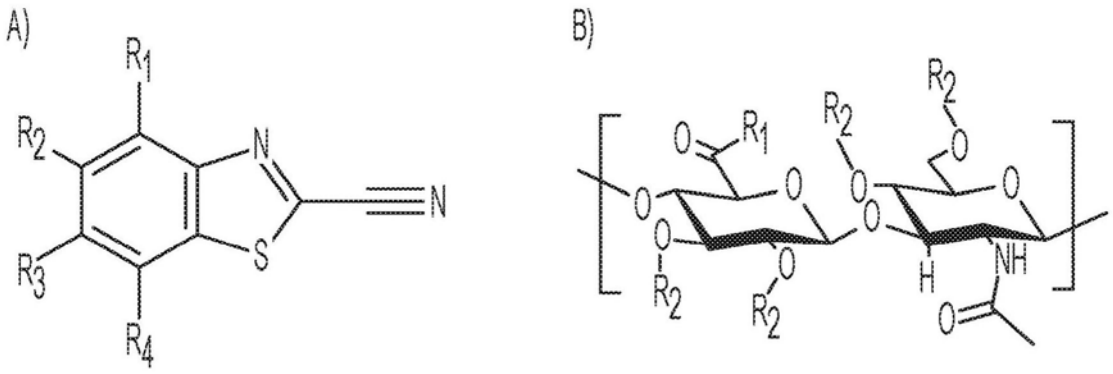

A)
R1
R2
R3
R4
N
S
N
B)
O
R1
R2
O
O
O
O
O
O
O
R2
R2
R2
O
H
NH
O

图4

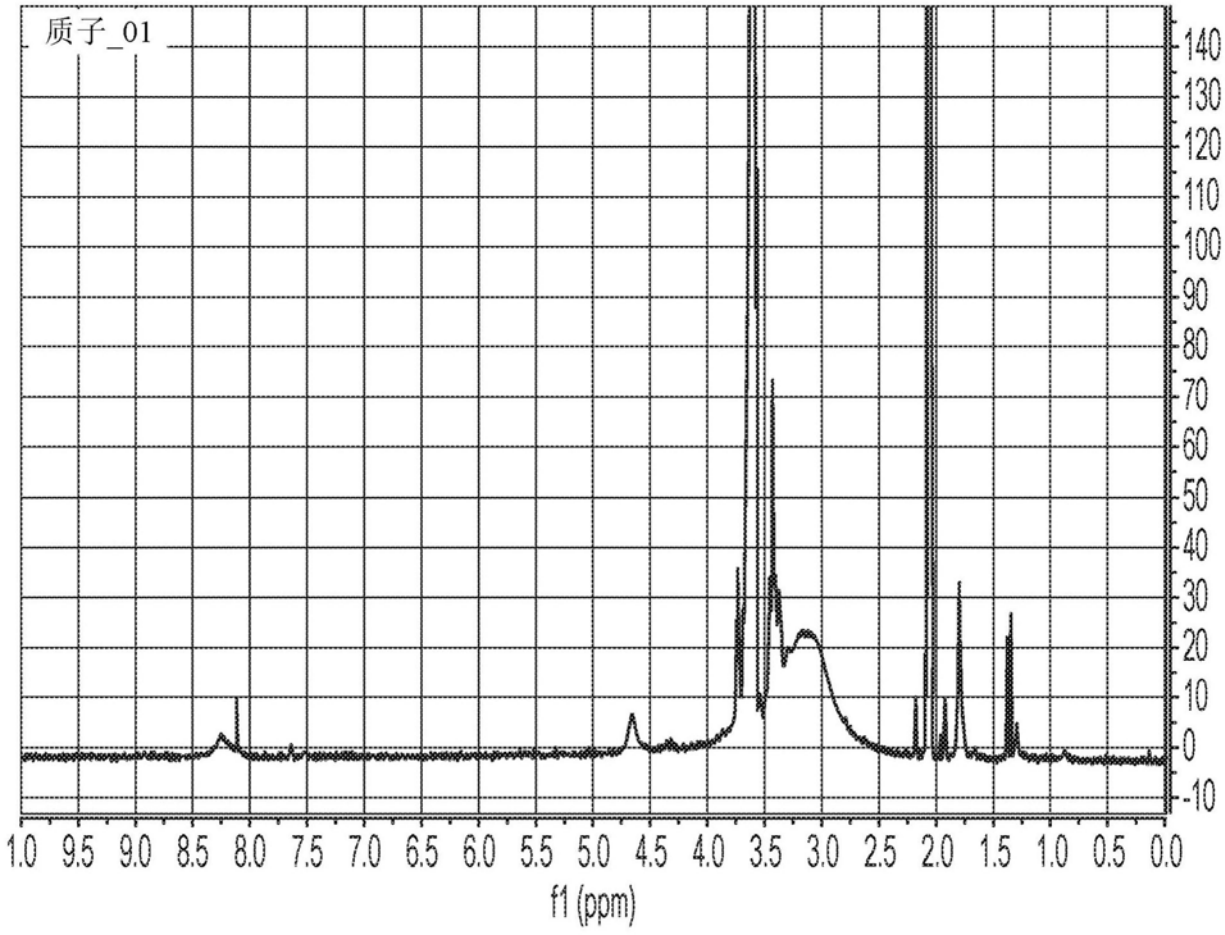

质子_01
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
1.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

图5

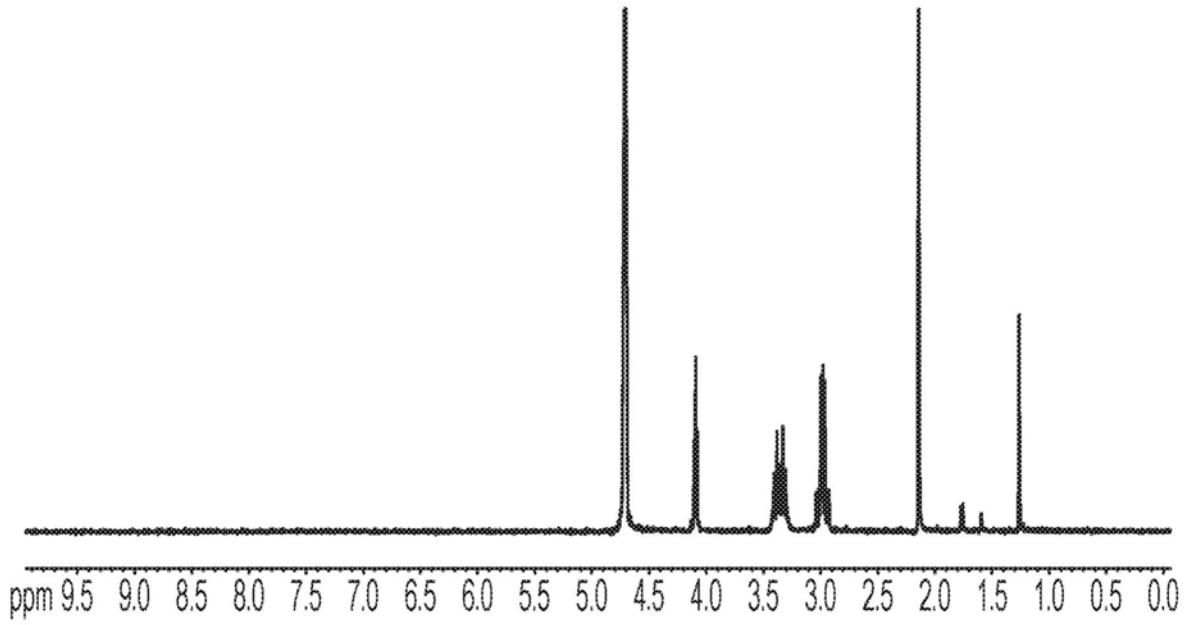


图6

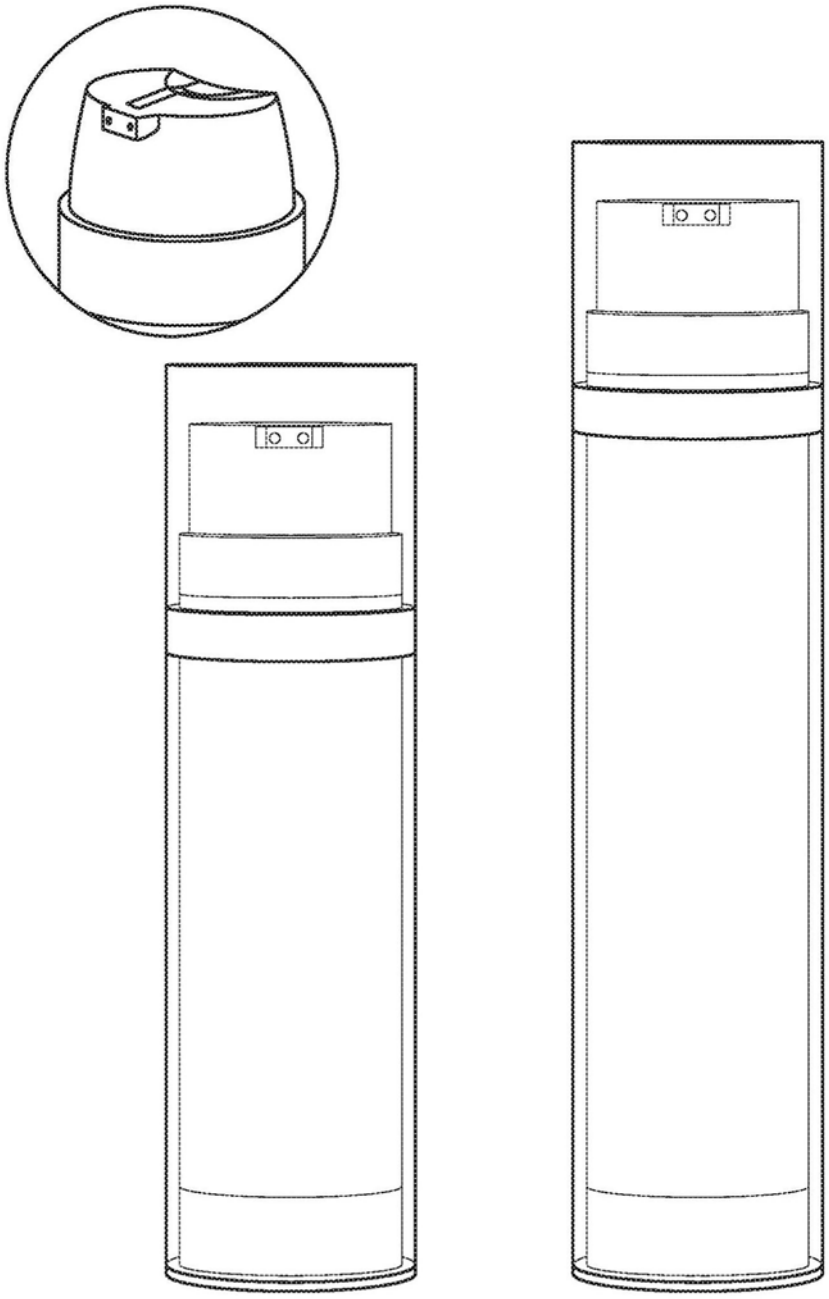


图7

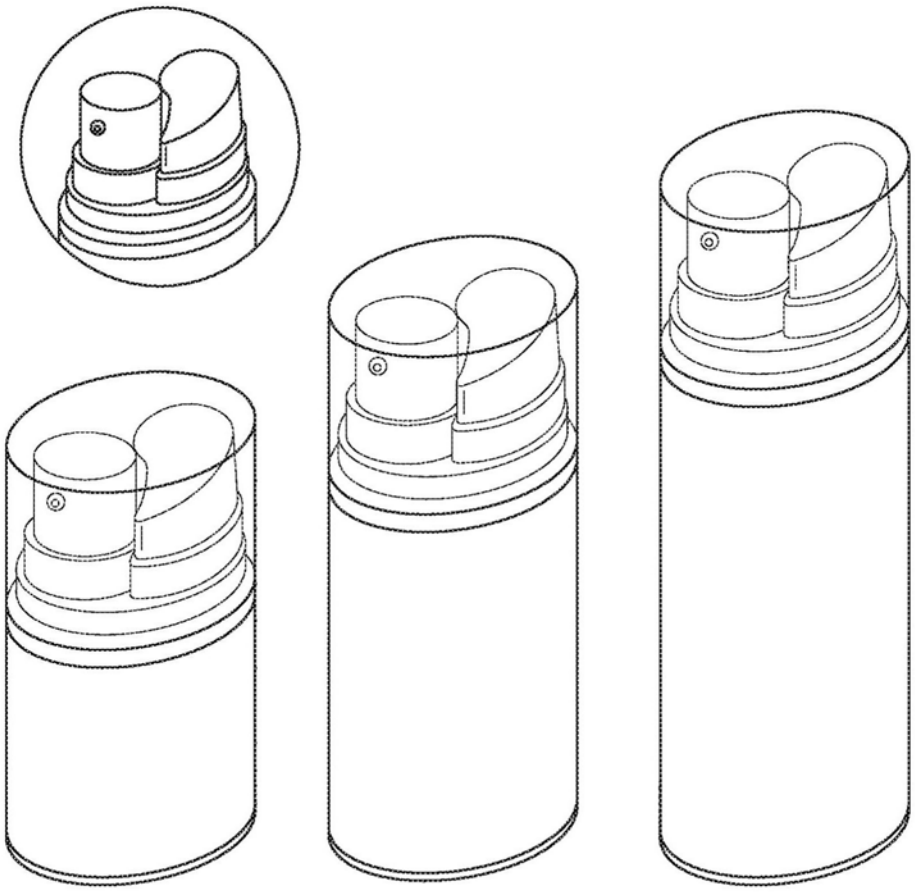


图8

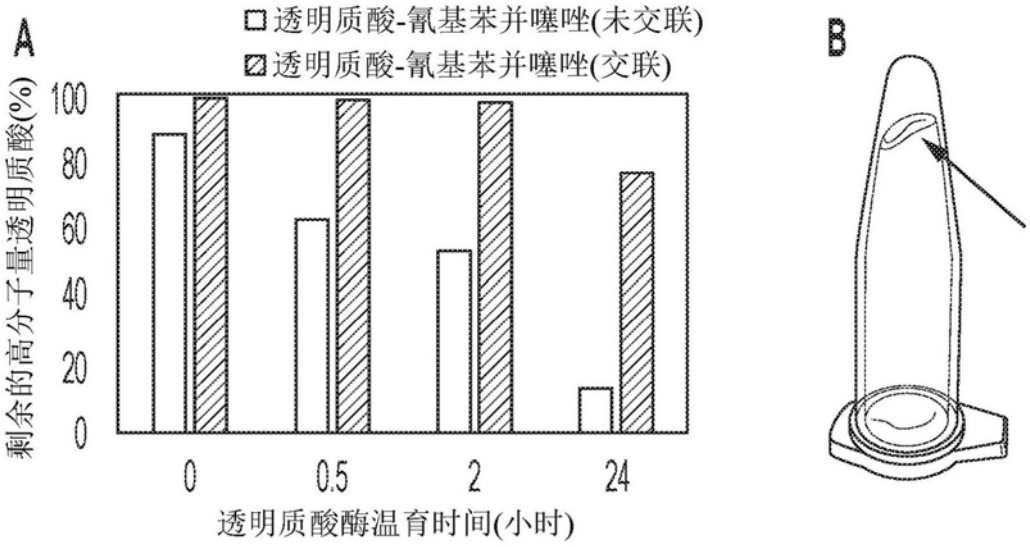

A
□透明质酸-氰基苯并噻唑(未交联)
▨透明质酸-氰基苯并噻唑(交联)
剩余的高分子量透明质酸(%)
100
80
60
40
20
0
0
0.5
2
24
透明质酸酶温育时间(小时)
B

图9

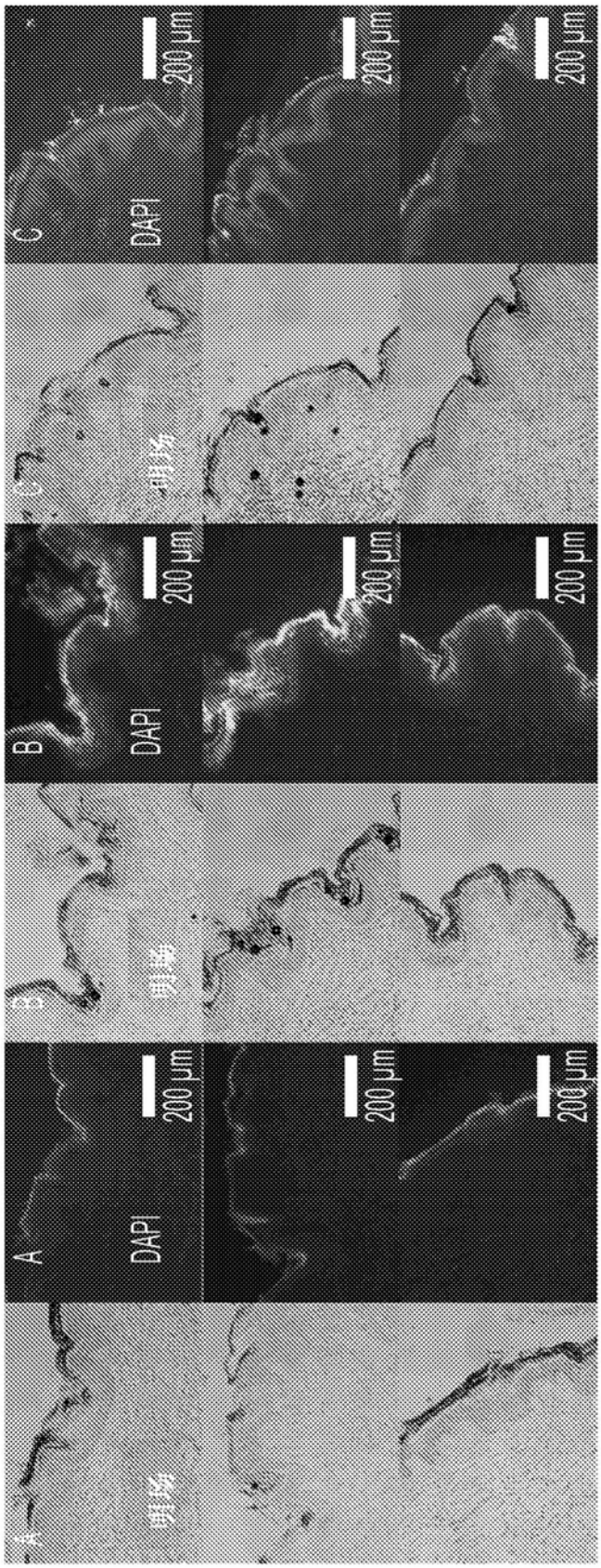


图10

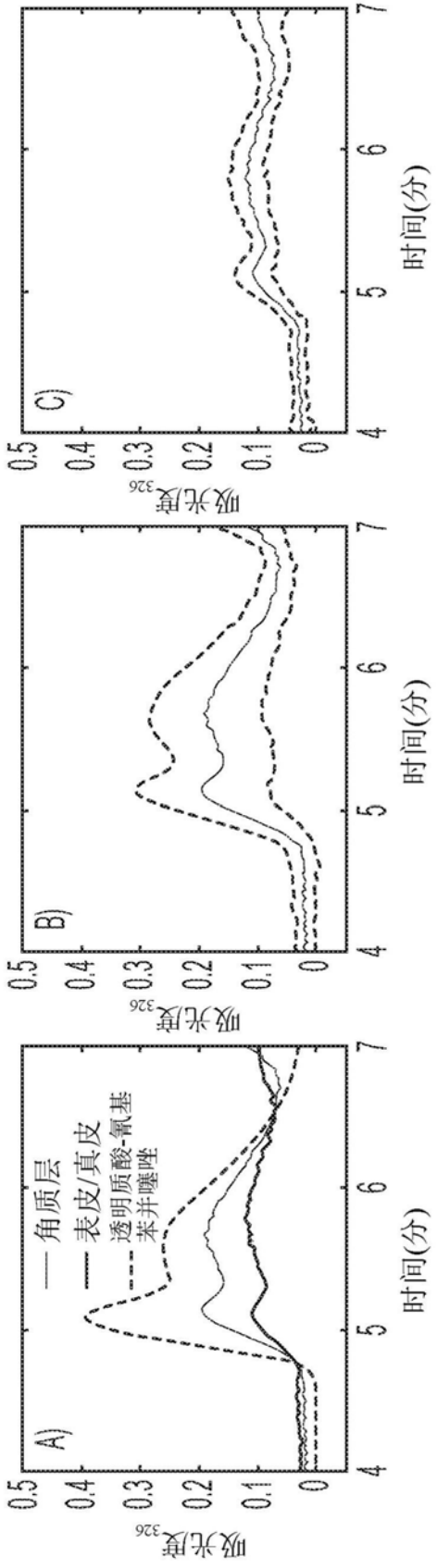


图11

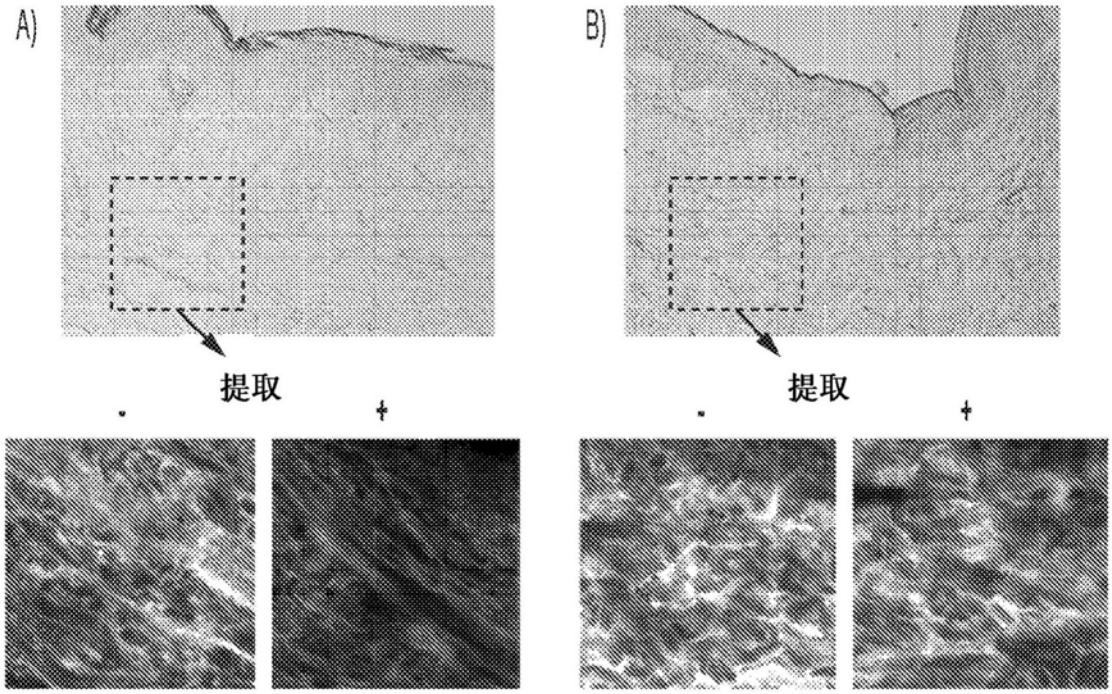


图12

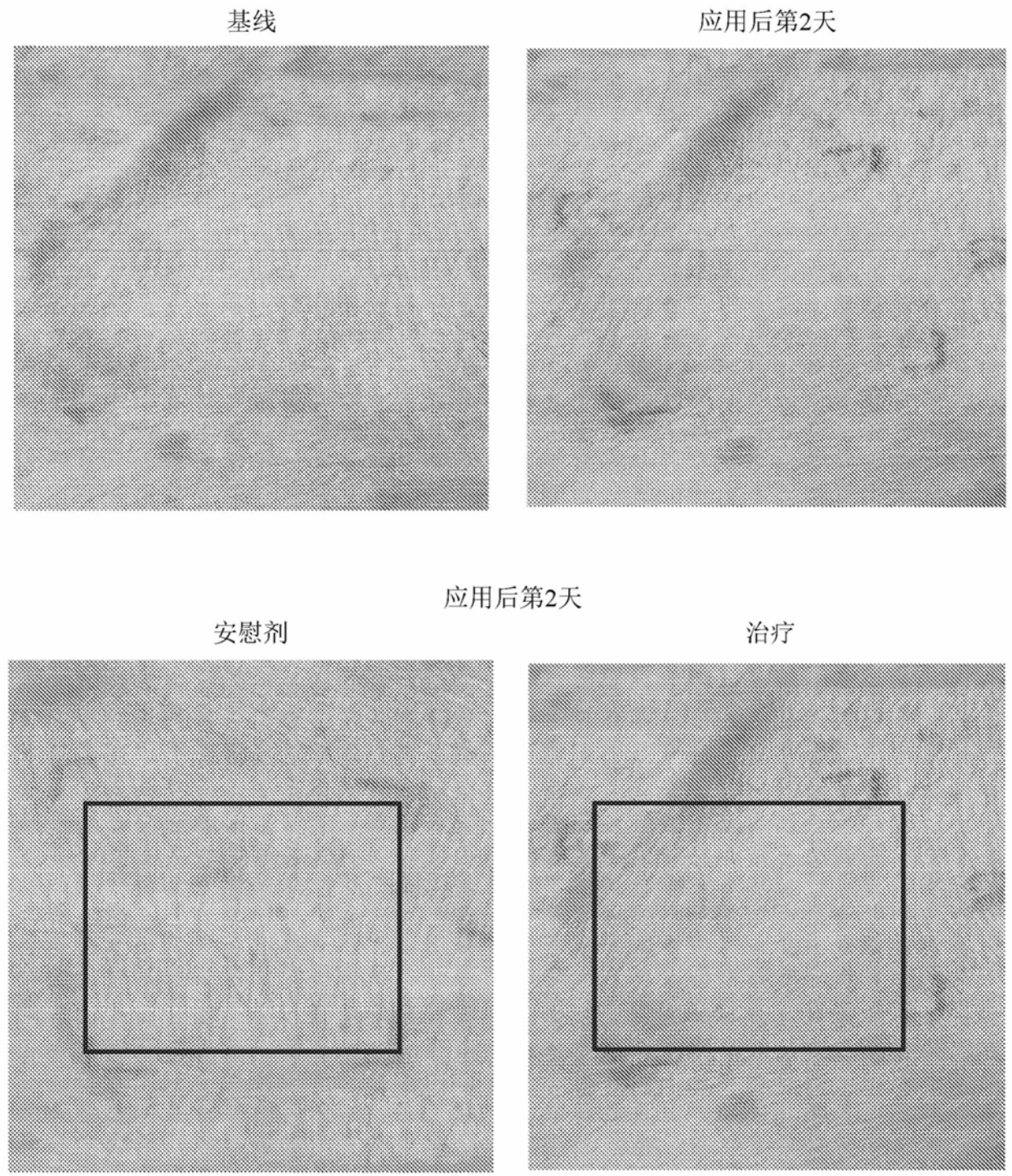


图13

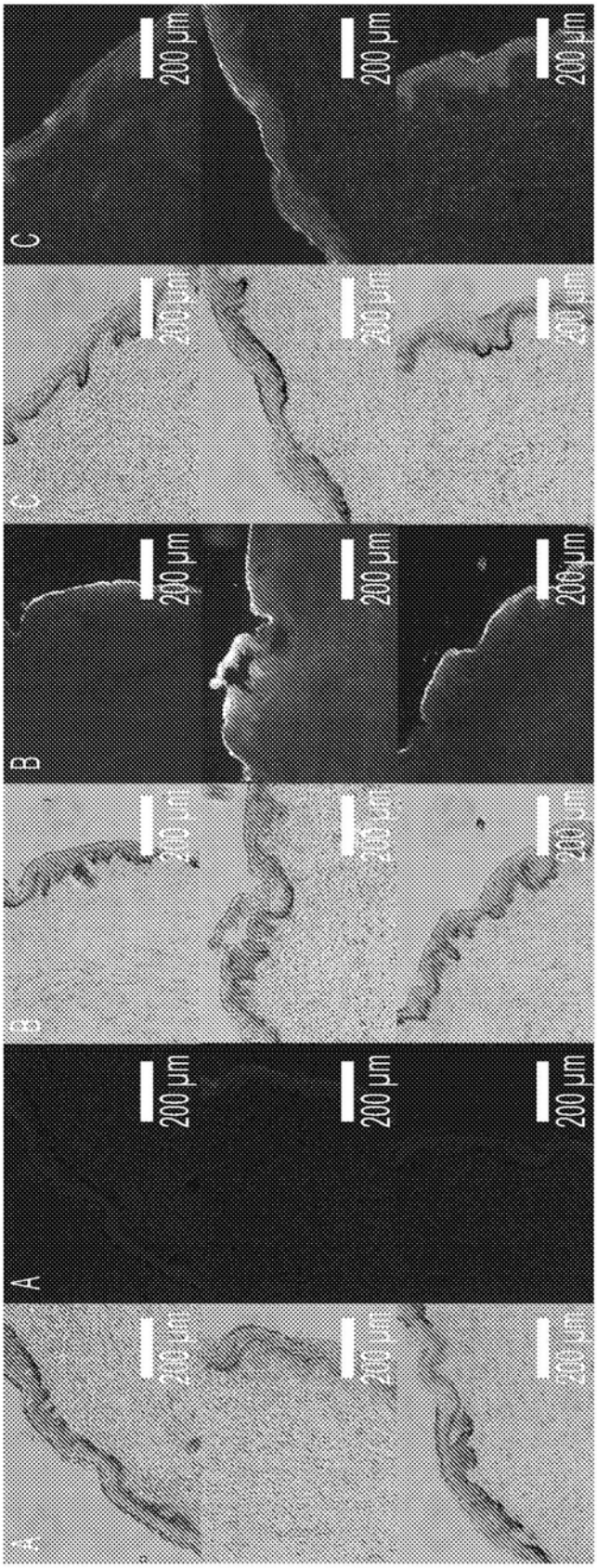


图14

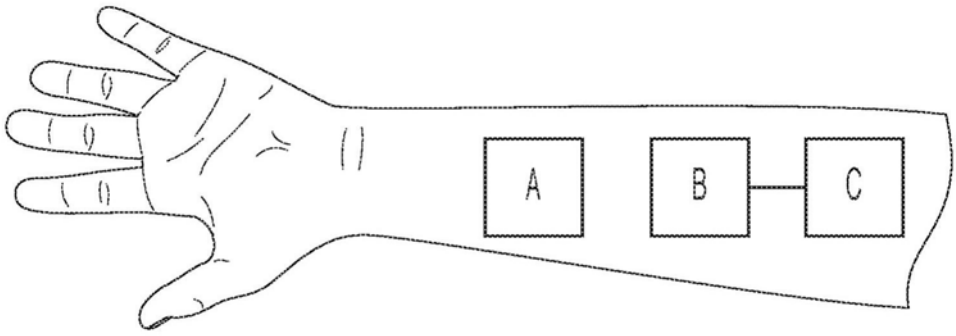

A
B
C

图15

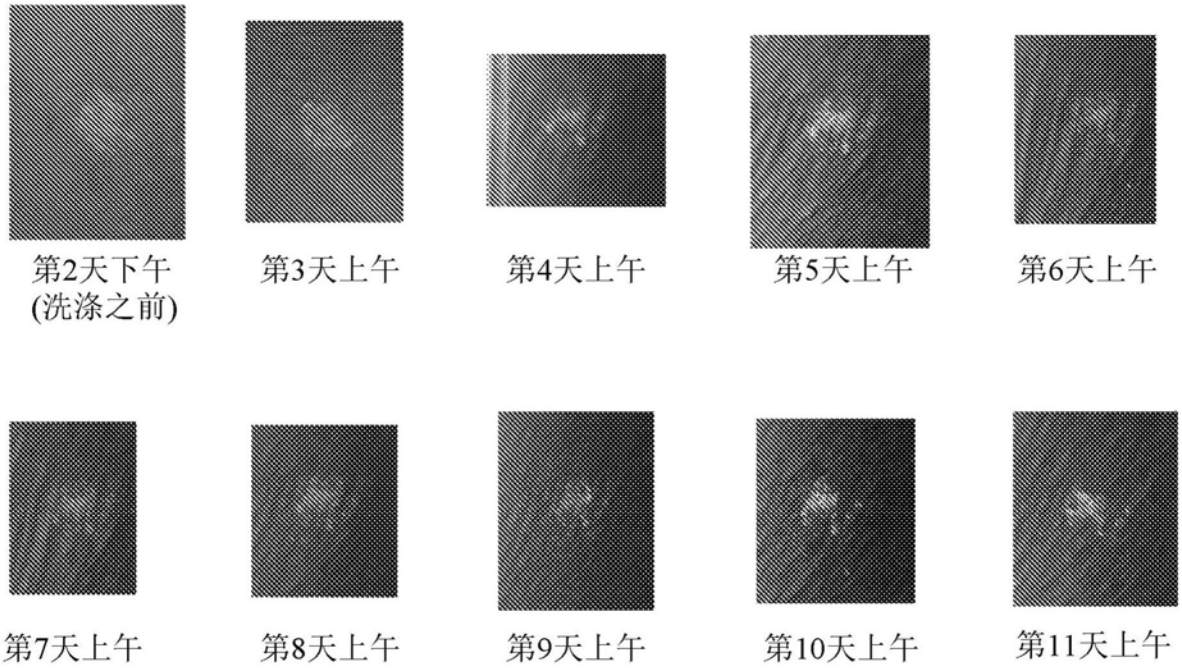

第2天下午
(洗涤之前)
第3天上午
第4天上午
第5天上午
第6天上午
第7天上午
第8天上午
第9天上午
第10天上午
第11天上午

图16

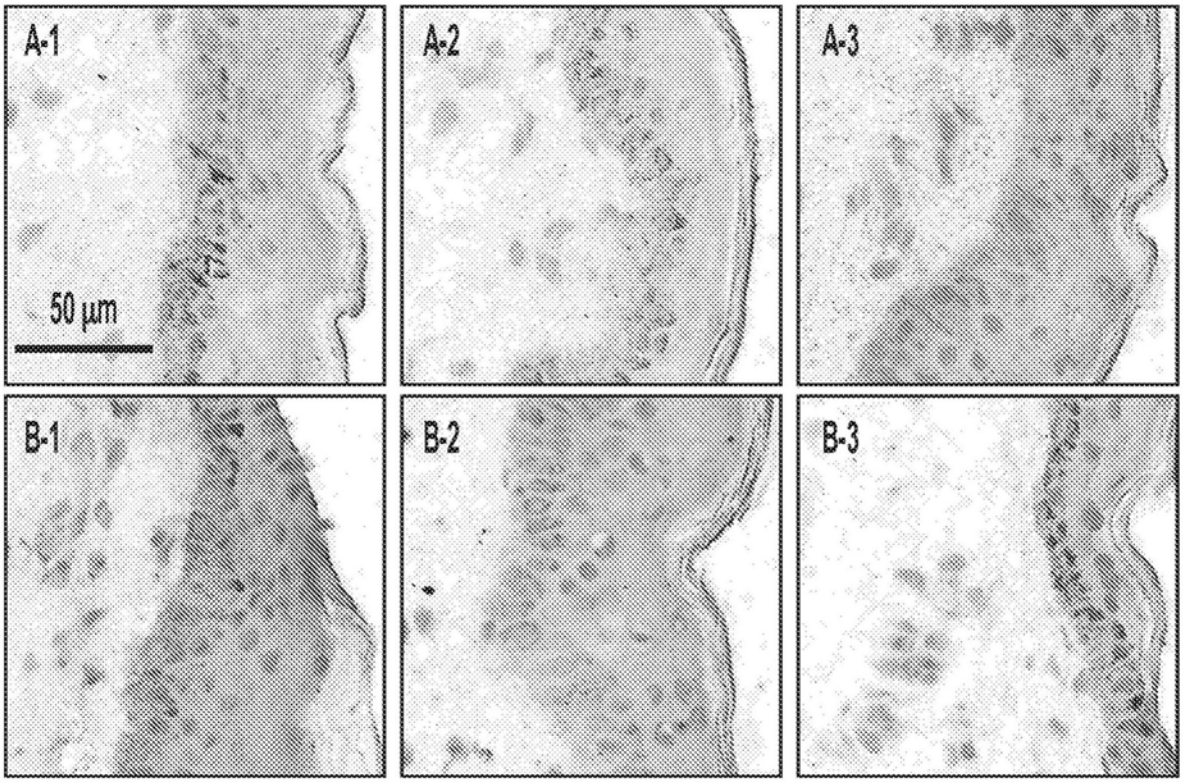


图17

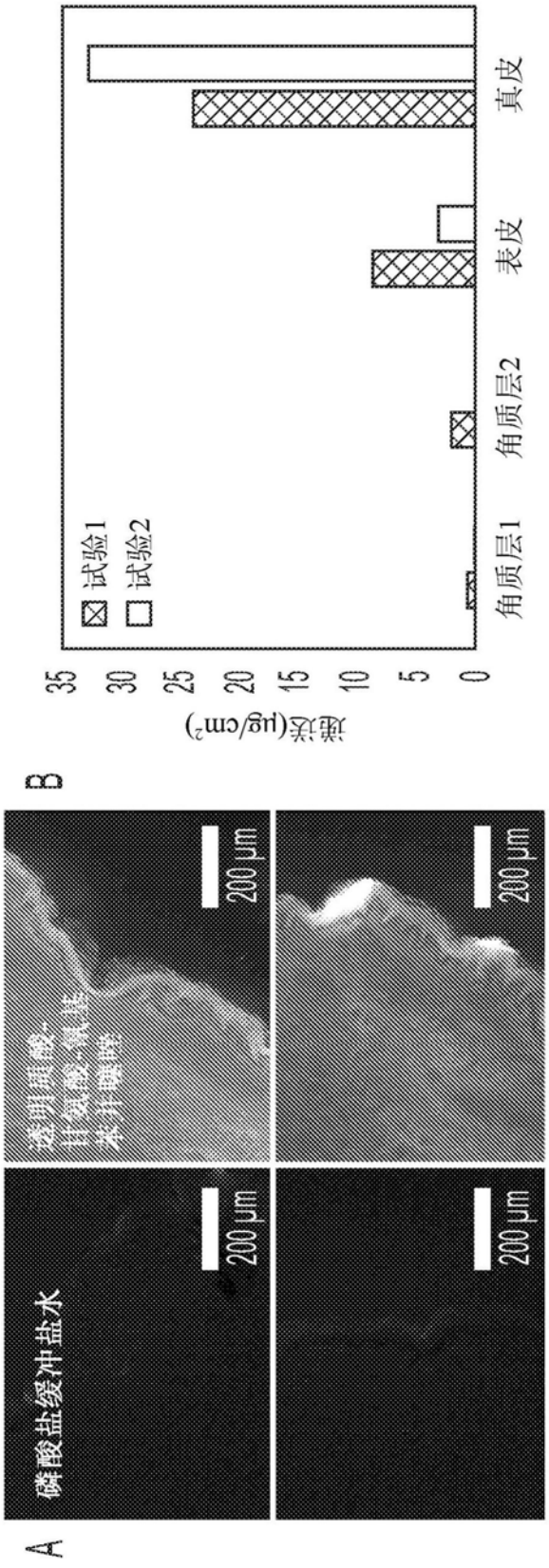

A
磷酸盐缓冲盐水
透明质酸-
甘氨酸-氯化
苯并噻唑
200 μm
200 μm
200 μm
200 μm
B
递送(μg/cm²)
35
30
25
20
15
10
5
0
试验1
试验2
角质层1
角质层2
表皮
真皮

图18