

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-506749

(P2022-506749A)

(43)公表日 令和4年1月17日(2022.1.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	8/73 (2006.01)	A 6 1 K	8/73	4 C 0 8 3
A 6 1 K	8/86 (2006.01)	A 6 1 K	8/86	
A 6 1 K	8/85 (2006.01)	A 6 1 K	8/85	
A 6 1 K	8/81 (2006.01)	A 6 1 K	8/81	
A 6 1 K	8/64 (2006.01)	A 6 1 K	8/64	
		審査請求	未請求	予備審査請求 未請求 (全71頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-524328(P2021-524328)	(71)出願人	521190200	
(86)(22)出願日	令和1年11月1日(2019.11.1)		ファウント バイオ, インコーポレイテ	
(85)翻訳文提出日	令和3年6月29日(2021.6.29)		ッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/059553		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1	
(87)国際公開番号	WO2020/093022		7 7 0, シャーボーン, レイク スト	
(87)国際公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)		リート 9 1	
(31)優先権主張番号	62/754,995	(74)代理人	100078282	
(32)優先日	平成30年11月2日(2018.11.2)		弁理士 山本 秀策	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 森下 夏樹	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(74)代理人	100181674	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 飯田 貴敏	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100181641	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 石川 大輔	
	最終頁に続く	(74)代理人	230113332	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 架橋される材料

(57)【要約】

本出願は、架橋可能な実体および架橋された材料の合成、製剤化および使用を記載する。本開示は、目的の標的部位中またはその上（例えば、*in situ*）に、架橋される材料（例えば、ゲルまたは他の高分子量材料）を提供することに関する様々な見識を提供する。とりわけ本開示は、架橋可能な実体（*entity*：例えば、ポリマー部分および架橋部分を含む）の親油性が、部位への（例えば、皮膚表面上、またはそうでなければ目的の標的部位の上の皮膚部位への）付与後に、所望の浸透速度および／または程度を達成するように調節され得るという見識を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムであって、

(i) 前記第 1 の架橋可能な実体が、第 1 の架橋部分にコンジュゲートしているポリマーを含み、前記ポリマーが、第 1 のリンカーを介して前記第 1 の架橋部分に必要な応じてコンジュゲートされていること、および

(i i) 前記第 2 の架橋可能な実体が、第 2 の架橋部分の 1 つまたは複数を含むことで特徴付けられる、システム。

【請求項 2】

前記ポリマーが、ヒアルロン酸 (H A) ポリマーである、請求項 1 に記載のシステム。

10

【請求項 3】

前記第 1 の架橋部分が、シアノベンゾチアゾール (C B T) 、ならびにそのアナログおよび誘導体からなる群から選択される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記第 2 の架橋部分が、二価もしくは多価のアミノチオール、またはその誘導体である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 5】

前記アミノチオールが、D-システイン、L-システイン、ならびにそのアナログおよび誘導体からなる群から選択される、請求項 4 に記載のシステム。

20

【請求項 6】

前記第 1 のリンカーが、アミノ酸である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記アミノ酸が、グリシンである、請求項 6 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記第 2 の架橋可能な実体が、1 つまたは複数のポリマー部分にコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分、疎水性部分、またはそれらの組合せを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記第 2 の架橋可能な実体が、ポリマーにコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分を含む、請求項 8 に記載のシステム。

30

【請求項 10】

前記ポリマーが、PEG、PEG-ジアミン、ポリアクリル酸、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド (H P M A) 、ポリカプロラクトン (P C L) 、およびポリ(乳酸-c-グリコール酸) (P L G A) からなる群から選択される、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記ポリマーが、PEGである、請求項 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記第 2 の架橋可能な実体が、ポリペプチドにコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分を含む、請求項 1 に記載のシステム。

40

【請求項 13】

前記第 2 の架橋可能な実体が、小分子またはアミノ酸にコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記第 2 の架橋可能な実体が、エチレンジアミン、またはその誘導体もしくはアナログにコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分を含む、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記第 2 の架橋可能な実体が、リシン、またはその誘導体もしくはアナログにコンジュゲートしている前記第 2 の架橋部分を含む、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 16】

50

(i) C B T、ならびにその誘導体およびアナログからなる群から選択される 1 つまたは複数の架橋部分にコンジュゲートしているポリマー、ならびに

(i i) 二価または多価のアミノチオールを含む、システム。

【請求項 17】

前記ポリマーが、H A である、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 18】

前記アミノチオールが、D - システイン、L - システイン、ならびにその誘導体およびアナログからなる群から選択される、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 19】

前記ポリマーが、リンカーを介して前記 1 つまたは複数の架橋部分にコンジュゲートしている、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 20】

前記リンカーが、アミノ酸である、請求項 19 に記載のシステム。

【請求項 21】

前記アミノ酸が、グリシンである、請求項 20 に記載のシステム。

【請求項 22】

前記アミノチオールが、ポリマーにコンジュゲートしている、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 23】

前記ポリマーが、P E G である、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 24】

前記アミノチオールが、ポリペプチドにコンジュゲートしている、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 25】

前記アミノチオールが、小分子またはアミノ酸にコンジュゲートしている、請求項 16 に記載のシステム。

【請求項 26】

前記アミノチオールが、エチレンジアミン、またはその誘導体もしくはアナログにコンジュゲートしている、請求項 25 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記アミノチオールが、リシン、またはその誘導体もしくはアナログにコンジュゲートしている、請求項 25 に記載のシステム。

【請求項 28】

第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムであって、

(i) 各実体が、

(a) 0 ~ 6 の範囲内の L o g (P) を有する架橋部分を含むこと、または

(b) 皮膚内への少なくとも 50 ミクロンの浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、

(i i) 前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体が、i n v i t r o に
おいて生理条件下で組み合わされる場合、37℃で約 60 分未満の期間内で互いに反応し
て、

(a) 50 P a ~ 10 k P a の範囲内の貯蔵弾性率
によって特徴付けられる架橋された材料を形成し、

(i i i) 前記架橋可能な実体が、それぞれ、皮膚表面上の部位に投与される場合、厚さ、
審美性、含水量、滑らかさ、弾性、輝度、小皺、皮膚色、皮膚透明感およびそれらの組
合せからなる群から選択される皮膚特質の統計的に有意な改善が、24 時間、3 日、7 日、
30 日、60 日、または 90 日以内に観察されることで特徴付けられる、システム。

【請求項 29】

第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムであって、

(i) 各実体が、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 皮膚内への少なくとも 50 ミクロンの浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、

(ii) 前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体が、*in vitro* において生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約 60 分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50 Pa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率、または

(b) それぞれ個々の架橋可能な実体の分子量の合計よりも高い分子量によって特徴付けられる架橋された材料を形成し、

(iii) 前記架橋可能な実体が、それぞれ、皮膚表面上の部位に投与される場合、厚さ、審美性、含水量、滑らかさ、弾性、輝度、小皺、皮膚色、皮膚透明感およびそれらの組合せからなる群から選択される皮膚特質の統計的に有意な改善が、24 時間、3 日、7 日、30 日、60 日、または 90 日以内に観察される、システム。

【請求項 30】

互いに別々に維持される第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムであって、

少なくとも前記第 1 の架橋可能な実体が、

架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含み、

(a) 0 ~ 6 の範囲内の $\log(P)$ を有する架橋部分を含むか、または

(b) 皮膚内への少なくとも 50 ミクロンの浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられる、システム。

【請求項 31】

互いに別々に維持される第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムであって、

少なくとも前記第 1 の架橋可能な実体が、

架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含み、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 皮膚内への少なくとも 50 ミクロンの浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられる、システム。

【請求項 32】

前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体が、

(i) *in vitro* において生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約 60 分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50 Pa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率によって特徴付けられる架橋された材料を形成し、

(ii) それぞれが、皮膚表面上の部位に投与される場合、厚さ、目に見える審美性（すなわち、輝度、皺、皮膚色など）、含水量、触覚的審美性（すなわち、滑らかさ、ふくらした張りなど）、弾性およびそれらの組合せからなる群から選択される皮膚特質の統計的に有意な改善が、24 時間、3 日、7 日、30 日、60 日、または 90 日以内に観察されることで特徴付けられる、請求項 30 に記載のシステム。

【請求項 33】

前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体が、

(i) *in vitro* において生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約 60 分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50 Pa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率、または

(b) それぞれ個々の架橋可能な実体の分子量の合計よりも高い分子量によって特徴付けられる架橋された材料を形成し、

10

20

30

40

50

(i i) それぞれが、皮膚表面上の部位に投与される場合、厚さ、目に見える審美性（すなわち、輝度、皺、皮膚色など）、含水量、触覚的審美性（すなわち、滑らかさ、ふっくらした張りなど）、弾性およびそれらの組合せからなる群から選択される皮膚特質の統計的に有意な改善が、24時間、3日、7日、30日、60日、または90日以内に観察されることで特徴付けられる、請求項30に記載のシステム。

【請求項34】

別々の入れ物または区画を有する容器を含み、前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体のそれぞれが、前記別々の入れ物または区画の1つの中に配置される、請求項30または請求項32に記載のシステム。

【請求項35】

前記容器が、少なくとも2つの別々の入れ物がその中に配置されている箱を含む、請求項34に記載のシステム。

【請求項36】

前記容器が、少なくとも2つの別々の区画がその中にある入れ物を含む、請求項34に記載のシステム。

【請求項37】

送達中に前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が組み合わされるように、前記入れ物が配列され、構築される、請求項36に記載のシステム。

【請求項38】

送達中に前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が別々に維持されるように、シリンジが配列され、構築される、請求項36に記載のシステム。

【請求項39】

前記架橋された材料が、生理緩衝剤中3日にわたる分解による質量喪失が20%未満であることによってさらに特徴付けられる、請求項29または32に記載のシステム。

【請求項40】

前記架橋された材料が、生理的分解のための条件をシミュレートする *in vitro* 条件に曝露される場合、架橋がない状態の一方または両方の架橋可能な実体の分解と比較して、前記架橋された材料のより緩慢な分解によってさらに特徴付けられる、請求項29または32に記載のシステム。

【請求項41】

前記架橋可能な実体の少なくとも1つが、架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含む、請求項29に記載のシステム。

【請求項42】

前記架橋可能な実体の一方だけが、ポリマー部分を含む、請求項41に記載のシステム。

【請求項43】

前記ポリマー部分が、ヒアルロン酸部分を含む、請求項30または請求項41に記載のシステム。

【請求項44】

前記ポリマー部分が、ヒアルロン酸部分を含み、親油性を増大する追加部分をさらに含む、請求項43に記載のシステム。

【請求項45】

前記架橋可能な実体のそれぞれが、架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含む、請求項29に記載のシステム。

【請求項46】

前記架橋可能な実体のそれぞれが、同じポリマー部分を含む、請求項45に記載のシステム。

【請求項47】

前記架橋可能な実体のそれぞれが、異なるポリマー部分を含む、請求項45に記載のシステム。

【請求項48】

10

20

30

40

50

前記架橋部分が、シアノベンゾチアゾール（C B T）、D－システイン、L－システイン、ならびにそれらのアナログ、誘導体および組合せからなる群から選択される部分であるか、またはそれらを含む、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 49】

前記架橋部分が、ジアミン、ペプチド、ジチオール、ジヒドラジド、およびそれらの組合せからなる群から選択される部分であるか、またはそれを含む、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 50】

前記皮膚特質が、厚さである、請求項 29 または請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 51】

前記皮膚特質が、含水量である、請求項 29 または請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 52】

前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体ならびに水の投与後の皮膚の含水量が、未処置皮膚と比較してより高い、請求項 51 に記載のシステム。

【請求項 53】

前記含水量が、> 20 %、より高い、請求項 52 に記載のシステム。

【請求項 54】

前記含水量が、> 10 %、より高い、請求項 53 に記載のシステム。

【請求項 55】

前記皮膚特質が、グローバル審美的改善尺度によって決定される通り改善される、請求項 29 または請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 56】

前記皮膚特質が、前記 G A I S で > 1、改善される、請求項 55 に記載のシステム。

【請求項 57】

前記皮膚特質が、前記 G A I S で約 1～約 3、改善される、請求項 56 に記載のシステム。

【請求項 58】

前記皮膚特質が、含水量である、請求項 29 または請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 59】

前記皮膚の含水量が、未処置皮膚と比較してより高い、請求項 58 に記載のシステム。

【請求項 60】

各実体が、前記架橋部分がない架橋可能な実体よりも大きい、皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 61】

各実体が、無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、表皮内および／またはその下に *in vitro* で浸透することで特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 62】

各実体が、無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、真皮内および／またはその下に *in vitro* で浸透することで特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 63】

各実体が、損傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、表皮内および／またはその下に *in vitro* で浸透することで特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 64】

それぞれが、損傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、真皮内および／またはその下に *in vitro* で浸透することで特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 65】

各実体が、少なくとも 50 ミクロンの深度まで皮膚に浸透する能力によって特徴付けられる、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 66】

各実体が、少なくとも 1 つの細胞層の深度まで皮膚に浸透する能力によって特徴付けられ

10

20

30

40

50

る、請求項 65 に記載のシステム。

【請求項 67】

皮膚特質を改善する方法であって、

架橋された材料が皮膚内で産生されるように、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を、皮膚に別々に投与するステップを含み、

(i) 少なくとも前記第 1 の架橋可能な実体が、架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含み、

(a) 0～6 の範囲内の $\text{Log}(P)$ を有する架橋部分を含むか、もしくは

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、または

(ii) 前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体のそれぞれが、

(a) 0～6 の範囲内の $\text{Log}(P)$ を有する架橋部分を含むこと、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられることで特徴付けられる、方法。

【請求項 68】

皮膚特質を改善する方法であって、

架橋された材料が皮膚内で産生されるように、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を、皮膚に別々に投与するステップを含み、

(i) 少なくとも前記第 1 の架橋可能な実体が、架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含み、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、あるいは

(ii) 前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体のそれぞれが、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられることで特徴付けられる、方法。

【請求項 69】

皮膚特質を改善する方法であって、

架橋された材料が皮膚内で産生されるように、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を、皮膚に別々に投与するステップを含み、

(i) 少なくとも前記第 1 の架橋可能な実体が、架橋部分にコンジュゲートしているポリマー部分を含み、

(a) 損傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、あるいは

(ii) 前記第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体のそれぞれが、

(a) 損傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられることで特徴付けられる、方法。

【請求項 70】

皮膚透過性を増大する薬剤またはデバイスを用いて、前記皮膚を事前処置または同時処置するステップをさらに含む、請求項 67 から 69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記薬剤またはデバイスが、マイクロニードルであるか、またはそれを含む、請求項 70 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

前記マイクロニードルが、前記第 1 または前記第 2 の架橋可能な実体を含有する、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記架橋可能な実体が、前記マイクロニードルのルーメン内に配置される、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記架橋可能な実体が、前記マイクロニードルを介する注射によって投与される、請求項 7 2 または 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記マイクロニードルが、付与後に溶解または分解する材料から形成される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記架橋可能な実体が、前記マイクロニードルの溶解または分解時に放出される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

皮膚特質を改善する方法であって、
架橋された材料が皮膚内で産生されるように、第 1 の架橋可能な実体を皮膚部位に投与するステップであって、

(i) 前記第 1 の実体が、

(a) 0 ～ 6 の範囲内の $\text{Log} (P)$ を有する架橋部分を含むか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられることで特徴付けられるステップと、

一定期間待つステップと、

前記第 1 の架橋可能な実体と反応性の第 2 の架橋可能な実体を、前記部位に投与するステップと

を含む、方法。

【請求項 7 8】

皮膚特質を改善する方法であって、
架橋された材料が皮膚内で産生されるように、第 1 の架橋可能な実体を皮膚部位に投与するステップであって、

(i) 前記第 1 の実体が、

(a) 無傷皮膚に ex vivo で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも 50 ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられることで特徴付けられるステップと、

一定期間待つステップと、

前記第 1 の架橋可能な実体と反応性の第 2 の架橋可能な実体を、前記部位に投与するステップと

を含む、方法。

【請求項 7 9】

前記別々に投与するステップが、異なる時点で投与することを含み、したがって一定期間が、前記第 1 の架橋可能な実体の投与と前記第 2 の架橋可能な実体の投与を隔てる、請求項 6 7 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記皮膚特質が、厚さ、審美性、含水量、および滑らかさからなる群から選択される、請求項 6 7 または 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記一定期間が、20 分未満である、請求項 7 7 または請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記一定期間が、10分未満である、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記一定期間が、1分未満である、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

前記第1の架橋可能な実体が、ポリマー部分および架橋部分を含む、請求項77に記載の方法。

【請求項85】

前記ポリマー部分が、グリコサミノグリカンまたは多糖体であるか、またはそれを含む、請求項67または請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記ポリマー部分が、合成ポリマーを含む、請求項67または請求項84に記載の方法。

【請求項87】

前記ポリマー部分が、ポリペプチドであるか、またはそれを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項88】

前記ポリマー部分が、約10～250kDaのサイズを有する、請求項67または請求項84に記載の方法。

【請求項89】

前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を投与した後、前記皮膚に水を投与するステップをさらに含む、請求項67から69または請求項77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項90】

前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を投与した後、前記皮膚特質をアセスメントするステップをさらに含む、請求項77、78または79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項91】

列挙された前記ステップが、少なくとも1回反復される、請求項66から90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

前記ステップが、1日1回、数日間反復される、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

前記ステップが、3日ごとに反復される、請求項91に記載の方法。

【請求項94】

前記ステップが、7日ごとに反復される、請求項91に記載の方法。

【請求項95】

皮膚特質を改善する方法であって、

a. 第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含むシステムを注射するステップを含み、

(i) 各実体が、

(a) 0～6の範囲内のLog(P)を有する架橋性部分を含むか、または

(b) 少なくとも50ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、

ii) 前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が、in vitroにおいて生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約60分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50Pa～10kPaの範囲内の貯蔵弾性率、

(b) 生理条件下3日にわたる分解による質量喪失が20%未満であること

によって特徴付けられる架橋された材料を形成することで特徴付けられる、方法。

【請求項96】

皮膚特質を改善する方法であって、

10

20

30

40

50

a. 第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含むシステムを注射するステップを含み、

(i) 各実体が、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも50ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、

ii) 前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が、*in vitro* において生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約60分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50 Pa～10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率、

(b) 生理条件下3日にわたる分解による質量喪失が20%未満であること

によって特徴付けられる架橋された材料を形成することで特徴付けられる、方法。

【請求項97】

皮膚特質を改善する方法であって、

a. 第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含むシステムを注射するステップを含み、

(i) 各実体が、

(a) 無傷皮膚に *ex vivo* で付与される場合、角質層内および／もしくはその下に浸透することで特徴付けられるか、または

(b) 少なくとも50ミクロンの皮膚浸透を達成するのに十分な親油性によって特徴付けられ、

ii) 前記第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が、*in vitro* において生理条件下で組み合わせられる場合、37℃で約60分未満の期間内で互いに反応して、

(a) 50 Pa～10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率、

(b) 生理条件で3日にわたる架橋された材料の分解が、架橋がない状態の前記第1および／または第2の架橋可能な実体の分解よりも緩慢であること

によって特徴付けられる架橋された材料を形成することで特徴付けられる、方法。

【請求項98】

前記システムが、二重穿孔針を使用して注射される、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

前記システムが、マイクロニードルを使用して注射される、請求項98に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

目的の特定部位におけるまたはその上、例えば外科的または外傷的破壊部位（例えば、臓器、結合組織、筋肉、腱および／または膜の部位。例えば、Seal et al. Mater Sci. Eng 34:147, 2001を参照されたい）における架橋された材料の導入または産生のための様々なシステムが開発されてきた。このような一部の材料は、例えば効果的に内部創傷を封着し、かつ／または創傷治癒の改善のために組織接合を達成する見込みがあることが示されている（例えば、Ruel-Gariepy et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58:409, 2004を参照されたい）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0002】

【非特許文献1】 Seal et al. Mater Sci. Eng 34:147, 2001

【非特許文献2】 Ruel-Gariepy et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58:409, 2004

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0003】

要旨

本開示は、目的の標的部位中またはその上（例えば、*in situ*）に、架橋される材料（例えば、ゲルまたは他の高分子量材料）を提供することに関する様々な見識を提供する。

とりわけ本開示は、架橋可能な実体（*entity*：例えば、ポリマー部分および架橋部分を含む）の親油性が、部位への（例えば、皮膚表面上、またはそうでなければ目的の標的部位の上の皮膚部位への）付与後に、所望の浸透速度および／または程度を達成するように調節され得るという見識を提供する。

10

【0004】

代替としてまたは追加として、本開示は、架橋可能な実体の低粘度調製物が、ある特定の実施形態にとって望ましい特徴を有しており、例えば、それらの調製物が産生する架橋された材料が、その中の空間および／もしくは構造（例えば、表面上の微小空洞）をより良好に充填し、かつ／またはその上の組織および／もしくは構造とより良好に接触することを可能にするという見識を提供する。

【0005】

代替としてまたは追加として、本開示は、本開示によって提供される通りの架橋される材料が、関連性のある生物システムにおけるその初期の架橋可能な実体（例えば、関連性のある架橋された材料を産生するためのそれらの架橋とは互いに別々の、かつ／またはそれらの架橋の前の）と比べて、改善された耐久性／持続性を示し得るという見識を提供する。

20

【0006】

またさらに、本開示は、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が、投与に際し（例えば投与中）に別々にされる（すなわち、化学的、物理的および／または空間的に）ようにすることが、ある特定の実施形態では有益であり、および／またはそうでなければ望ましい場合があるという見識を提供する。

【0007】

とりわけ本開示は、互いに架橋することによって架橋された材料を産生する、一組の架橋可能な実体の1つまたは複数が、本明細書に記載される通りの親油性の度合いによって特徴付けられる実施形態を提供する。本開示はまた、1つまたは複数の架橋可能な実体が、低粘度調製物として利用される実施形態を提供する。本開示はまた、個々の架橋可能な実体が、投与に際し（例えば投与までおよび／または投与中）に互いに別々に維持される実施形態を提供する。本開示はさらに、このような実施形態の組合せ、および1つまたは複数のこのような実施形態が特に有用または有効であると思われる、特定の状況に関する見識を提供する。

30

【0008】

とりわけ、提供される見識は、以前は*in situ*での架橋システムのために企図されても利用されてもいなかった架橋可能な実体もしくは構成成分（例えば、ポリマーおよび／または架橋部分）、またはそれらの組合せの選択および／または利用を可能にし、かつ／あるいは*in situ*で架橋された材料を達成するために架橋可能な実体を投与するための新しい方法論を提供する。

40

【0009】

一部の実施形態では、本開示は、*in situ*で架橋された材料を提供するために一緒に使用することができる構成成分を含むシステムを提供する。一部の実施形態では、提供されるシステムは、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含み、その少なくとも一方（多くの実施形態では、その両方）は、本明細書に記載される通りの親油性を有し、その第1および第2の実体は互いに架橋して、目的の部位においてまたはその上で（例えば、*in situ*）、本明細書に記載される通りの材料および／または機能的特徴を有する架橋された材料（例えばゲル）を形成する。

50

【0010】

一部の実施形態では、本開示は、このような提供されるシステムおよび／またはその構成成分を作成および／または使用方法を提供する。

【0011】

提供される一部の方法において、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、部位（例えば、皮膚表面上の）に別々に連続的に投与され、このような一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体が最初に投与され、第2の架橋可能な実体は一定期間後に投与される。

【0012】

また、第1および／または第2の架橋可能な実体を貯蔵および／または投与するための様々なデバイスおよび技術が提供される。一部の実施形態では、提供されるデバイスは、物理的に別々の位置、区画、および／または入れ物内に、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を維持する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、表皮および真皮を含むヒト皮膚の一部を示す。

【0014】

【図2】図2は、実施例1のD₂O中でのHA-gly-CBTの¹H NMRを示す。

【0015】

【図3】図3は、修飾HAのゲル透過クロマトグラフィー（GPC）分析を示す。コンジュゲーションの前の非修飾HA（10 kDa、50 kDa、および250 kDaの平均分子量を有する）の屈折率の読取りは、図3Aに示されており、修飾HA（HA-gly-CBT、10 kDa、50 kDa、および250 kDaの平均分子量を有する）のUV吸光度の読取り（326 nm）は、図3Bに示されている。

【0016】

【図4】図4は、CBTおよびHAのある特定の誘導体の化学構造（それぞれAおよびB）を示す。

【0017】

【図5】図5は、実施例1の重水素化アセトン中でのCys-PEG-Cysの¹H NMRを示す。

【0018】

【図6】図6は、実施例1の重水素化アセトン中でのCys-EDA-Cysの¹H NMRを示す。

【0019】

【図7】図7は、使用時に動力学的にブレンドされる第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の、例示的なパッケージングを表す。示されているパッケージングは、2つの実体が、調剤直前にチャンバ内で混合されることを示す。

【0020】

【図8】図8は、個々に調剤することができる第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の、例示的なパッケージングを表す。

【0021】

【図9】図9は、ヒアルロニダーゼによる架橋HA-gly-CBTの分解に対する抵抗性を示す。図9Aのプロットは、架橋された材料および架橋されていない材料の両方について、ヒアルロニダーゼとインキュベーションした後に不溶性ゲルおよび高分子量ポリマーとして残存するHA-gly-CBTの分率を図示している。図9Bは、ヒアルロニダーゼと24時間インキュベーションした後の、架橋されたHA-gly-CBTゲルの画像である。

【0022】

【図10】図10は、PBS（A）およびHA-gly-CBT（B）を無傷ブタ皮膚に局所的に付与し、HA-gly-CBT（C）をテープストリッピングしたブタ皮膚に局

10

20

30

40

50

所的に付与した後の、ブタ皮膚切片の明視野および蛍光（DAPIフィルタ）画像を示す。

【0023】

【図11】図11は、HA-gly-CBTの局所的付与後の皮膚抽出物のGPC分析を示す。図11Aは、6つの試料で平均した、HA-gly-CBTからのGPCシグナルと角質層（SC）抽出物および表皮／真皮抽出物について測定されたGPCシグナルの比較を示す。図11Bは、関連エラーバー付きのSC抽出物についての平均GPCシグナルを示す。図11Cは、関連エラーバー付きの表皮／真皮抽出物についての平均GPCシグナルを示す。

【0024】

【図12】図12は、HA-gly-CBT（A）を注射するか、またはHA-gly-CBTに続いてCys-PEG-Cys（B）を注射した後の、ブタ皮膚切片の明視野および蛍光（DAPIフィルタ）画像を示す。切片は共に、薄片にし、可溶性HA-gly-CBTを抽出するために洗浄した後に、直接的に画像化した。

【0025】

【図13】図13は、ベースラインおよびプラセボの付与と比較した、提供されるシステムを付与して2日後の皮膚の写真を表し、皮膚の滑らかさが改善されていることを示している。

【0026】

【図14】図14は、破壊したヒト皮膚に、PBS（A）およびAlexaFluor 647でタグを付けたHA-gly-CBT（BおよびC）を局所的に付与した後の、ヒト皮膚切片の明視野および蛍光（Cy5フィルタ）画像を示す。皮膚は、1つの試料（B）では付与前にテープストリッピングし、別の（C）では500 μm針を含有するダーマローラーを用いて処置した。

【0027】

【図15】図15は、実施例6の例示的な投与部位を表す。

【0028】

【図16】図16は、実施例6に記載される通りの、システムの投与後の時点における画像を表す。

【0029】

【図17】図17は、実施例7に記載される通りの、システムの投与後の生検画像を表す。

【0030】

【図18】図18は、500 μm針を含有するダーマローラーで処置したヒト皮膚内へのHA-gly-CBT（50 kDa、IR色素でタグを付けた）の局所送達を示す。図18Aは、Cy5フィルタを用いて得られた皮膚試料の蛍光顕微鏡鏡画像を表す。図18Bは、SC、表皮、および真皮に対するHA-gly-CBTの量的データを表す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義

約：「約」という用語は、ある値に言及して本明細書で使用される場合、言及される値の状況において類似している値を指す。一般に、その状況に精通している当業者は、その状況において「約」によって包含される、関連性のある変動度合いを認識されよう。例えば一部の実施形態では、「約」という用語は、言及される値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満以内の範囲の値を包含し得る。

【0032】

アナログ：本明細書で使用される場合、「アナログ」という用語は、1つまたは複数の特定の構造的な特色、要素、構成成分、または部分を、参照物質と共有する物質を指す。代表

10

20

30

40

50

的には、「アナログ」は、参照物質との著しい構造的類似性を示し、例えばコアまたはコンセンサス構造を共有するが、ある特定の別個の点では異なってもいる。一部の実施形態では、アナログは、例えば、参照物質の化学的操作によって参照物質から産生され得る物質である。一部の実施形態では、アナログは、参照物質を産生する方法に実質的に類似の（例えば、その方法と複数のステップを共有している）合成方法を実施することにより産生され得る物質である。一部の実施形態では、アナログは、参照物質を産生するために使用される方法とは異なる合成方法を実施することにより産生されるか、または産生され得る。

【0033】

関連：「関連」という用語が本明細書で使用される場合、2つの事象または実体は、一方の存在、レベルおよび／または形態が、他方の存在、レベルおよび／または形態と相関している場合には、互いに「関連」している。例えば、特定の实体（例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャー、代謝産物、微生物など）は、その存在、レベルおよび／または形態が、特定の疾患、障害、または状態（例えば、関連性のある集団にわたる）の発生率および／またはそれらに対する感受性と相関している場合には、その疾患、障害、または状態と関連しているとみなされる。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多い実体は、それらが直接的または間接的に相互作用し、したがって互いに物理的に近接し、かつ／または近接したままにされる場合には、互いに物理的に「関連」している。一部の実施形態では、互いに物理的に関連している2つまたはそれよりも多い実体は、互いに共有結合により連結しており、一部の実施形態では、互いに物理的に関連している2つまたはそれよりも多い実体は、互いに共有結合によっては連結しないが、非共有結合的に、例えば水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互反応、磁性、およびそれらの組合せを用いることによって関連している。

【0034】

生体適合性：「生体適合性」という用語は、本明細書で使用される場合、生存組織と、例えば *in vivo* で接触して置かれる場合に、このような組織に対して著しい害を引き起こさない材料を指す。ある特定の実施形態では、材料は、細胞に対して毒性でない場合には「生体適合性」である。ある特定の実施形態では、材料は、*in vitro* の細胞へのそれらの添加が、20%またはそれ未満の細胞死をもたらし、かつ／または *in vivo* のそれらの投与が、著しい炎症もしくはこのような他の有害効果を誘導しない場合には「生体適合性」である。

【0035】

同等：本明細書で使用される場合、「同等」という用語は、互いに同一ではあり得ないが、それらの間で比較を可能にするのに十分類似している、2つまたはそれよりも多い薬剤、実体、状況、条件の組などを指し、したがって当業者は、観察される差異または類似性に基づいて、結論を合理的に引き出せることを認識されよう。一部の実施形態では、条件、環境、個体、または集団の同等の組は、実質的に同一の複数の特色および変化した1つのまたは少数の特色によって特徴付けられる。当業者は、状況に応じて、2つまたはそれよりも多いこのような薬剤、実体、状況、条件の組などについて、どのくらいの独自性の度合いが任意の所与の環境において同等とみなされる必要があるかを理解されよう。例えば当業者は、環境、個体、または集団の異なる組の下で、またはその組を用いて得られた結果または観察された現象の差異が、変化している特色における変動によって引き起こされているか、またはその変動を示しているという妥当な結論を保証するのに十分な数およびタイプの、実質的に同一の特色によって特徴付けられる場合には、環境、個体、または集団の組が互いに同等であることを認識されよう。

【0036】

に対応する：ポリペプチド、核酸、および化合物の状況において本明細書で使用される場合、「に対応する」という用語は、適切な参照化合物または組成物との比較による、化合物または組成物における構造的要素、例えばアミノ酸残基、ヌクレオチド残基、または化学的部分の位置／独自性を指定する。例えば一部の実施形態では、ポリマーにおけるモノ

10

20

30

40

50

マー残基（例えば、ポリペプチドにおけるアミノ酸残基またはポリヌクレオチドにおける核酸残基）は、適切な参照ポリマーにおける残基「に対応する」ものとして特定され得る。例えば当業者は、簡略化する目的で、ポリマーにおける残基を、関係する参照ポリマーに基づいて標準の付番システムを使用して指定することができ、したがって、例えば参照ポリマーの190位における残基「に対応する」残基は、実際に目的のポリマーにおける190番目の残基である必要はなく、むしろ、参照ポリマーにおける190位において見出された残基に相当する残基を指すことを認識されよう。当業者には、ポリマーにおける「対応する」残基をどのように特定するかについて容易に認識される（例えば、ポリペプチドおよび核酸ポリマーのための商業的に入手可能な配列比較ソフトウェアを使用し、他のポリマーについては必要に応じて手動で）。

10

【0037】

設計された：本明細書で使用される場合、「設計された」という用語は、（i）その構造が、人の手によって選択されるか、もしくは選択されており、（ii）人の手を必要とする方法によって生成され、かつ／または（iii）自然物質および他の公知の薬剤とは別個の薬剤を指す。

【0038】

剤形：当業者は、「剤形」という用語が、対象に投与するための薬剤（例えば、治療剤、診断用薬剤または化粧的薬剤）の物理的に別個の単位を指すために使用され得ることを認識されよう。代表的には、このような各単位は、所定量の薬剤を含有する。一部の実施形態では、このような量は、関連性のある集団に投与される（すなわち、治療投薬レジメンを用いて）場合、所望のまたは有益な（例えば、治療的および／または化粧的）成果と相関することが決定されている投薬レジメンに従って投与するのに適した単位投薬量（またはその全分率）である。一部の実施形態では、このような量は、関連性のある集団に投与される場合、所望のまたは有益な化粧的成果（例えば、目に見える、および／または触覚的な改善を皮膚に提供する）と相関することが決定されているレジメンに従って投与するのに適した単位投薬量（またはその全分率）である。当業者には、特定の対象に投与される組成物または薬剤の全量が、担当する1人または複数の専門家（例えば、医師、看護師、または他の有資格専門家）によって決定され、複数の剤形の投与を含み得ることが認識される。一部の実施形態では、剤形は、クリーム、ゲル、液体、ローション、ミスト、マスク、マトリックス、粒子、ペースト、パッチ、粉末、セラム(serum)、固体、スプレー（またはその捕集）、またはそれらの組合せであるか、またはそれを含む製剤で提供され得る。

20

30

【0039】

投薬レジメン：当業者は、「投薬レジメン」という用語が、対象に個々に投与される、代表的には一定期間によって隔てられる一組の単位用量（代表的には2つ以上）を指すために使用され得ることを認識されよう。一部の実施形態では、所与の薬剤は、1つまたは複数の用量を含むことができる推奨投薬レジメンを有する。一部の実施形態では、投薬レジメンは、それぞれが他の用量から時間を隔てられる複数の用量を含む。一部の実施形態では、個々の用量は、同じ長さの期間によって互いに隔てられ、一部の実施形態では、投薬レジメンは、複数の用量、および個々の用量を隔てる少なくとも2つの異なる期間を含む。一部の実施形態では、投薬レジメン内のすべての用量は、同じ単位投薬量の用量である。一部の実施形態では、投薬レジメン内の異なる用量は、異なる量の用量である。一部の実施形態では、投薬レジメンは、第1の投薬量の第1の用量に続いて、第1の投薬量とは異なる第2の投薬量の1つまたは複数の追加の用量を含む。一部の実施形態では、投薬レジメンは、第1の投薬量の第1の用量に続いて、第1の投薬量と同じ第2の投薬量の1つまたは複数の追加の用量を含む。一部の実施形態では、投薬レジメンは、関連性のある集団にわたって投与される場合、所望のまたは有益な成果と相関する。

40

【0040】

賦形剤：賦形剤とは、本明細書で使用される場合、例えば、所望の粘稠度または安定化効果を提供するか、またはそれに寄与するために医薬組成物に含まれ得る、不活性薬剤を指

50

す（例えば、化粧的活性剤などの治療活性剤でない）。

【0041】

「改善する」、「増大する」、「阻害する」または「低減する」：本明細書で使用される場合、「改善する」、「増大する」、「阻害する」または「低減する」という用語、またはその文法的等価物は、ベースラインまたは他の参照測定値に対する値を示す。一部の実施形態では、適切な参照測定値は、特定の薬剤もしくは処置が存在しない状態で（例えば、その前および／または後）、または適切な同等の参照薬剤の存在下で、それ以外は同等の条件下での特定のシステムにおける（例えば、単一個体における）測定値であってもよく、またはそれを含むことができる。一部の実施形態では、適切な参照測定値は、関連性のある薬剤または処置の存在下で、特定のやり方で応答することが公知であるか、または応答すると予測される同等のシステムにおける測定値であってもよく、またはそれを含むことができる。

10

【0042】

in situ：本明細書で使用される場合、「*in situ*」という用語は、標的部位における、その中、またはその上の位置を指す。例えば一部の実施形態では、架橋可能な実体が、目的の標的部位において、その中またはその上で、例えば組織表面上でまたは組織内で反応して架橋された材料を形成する場合、架橋可能な実体は *in situ* で架橋し、多くの実施形態では、関連性のある組織は、皮膚である。

【0043】

単離された：単離されたとは、本明細書で使用される場合、（１）最初に生成されたとき（自然においておよび／または実験設定においてであるかを問わず）、関連していた構成成分の少なくとも一部から分離されており、かつ／または（２）人の手によって設計、生成、調製、および／もしくは製造されている、物質および／または実体を指す。単離された物質および／または実体は、それらが最初に関連していた、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超のその他の構成成分から分離され得る。一部の実施形態では、単離された薬剤は、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９％超純粋である。本明細書で使用される場合、物質は、他の構成成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。一部の実施形態では、当業者によって理解される通り、物質は、ある特定の他の構成成分、例えば１つまたは複数の担体または賦形剤（例えば、緩衝剤、溶媒、水など）などと組み合わされた後でも、「単離された」またはさらには「純粋」であるとみなすことができ、このような実施形態では、物質の単離または純度パーセントは、このような担体または賦形剤を含まずに計算される。

20

30

【0044】

リンカー：リンカーとは、本明細書で使用される場合、互いに異なる要素を接続する、複数要素の薬剤のまさにその部分を指すために使用される。

【0045】

マーカー：マーカーとは、本明細書で使用される場合、その存在またはレベルが特定の状態または事象に特徴的である、実体または部分を指す。一部の実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、疾患、障害、または状態の存在、状態、または段階に特徴的であり得る。

40

【0046】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、提供されるシステムが、例えば実験、診断、予防、化粧、および／または治療目的で投与されるか、または投与することができる任意の生物を指す。典型的な対象には、動物（例えば、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、および／またはヒト）が含まれる。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、１つまたは複数の障害または状態に罹患しているか、または罹患しやすい。一部の実施形態では、対象は、障害または

50

状態の1つまたは複数の症状を示している。一部の実施形態では、対象は、1つまたは複数の障害または状態を有すると診断されている。一部の実施形態では、障害または状態は、がん、または1つもしくは複数の腫瘍の存在であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態を診断および／または処置するための特定の治療を受けているか、または受けたことがある。一部の実施形態では、対象は、化粧的利益および／または改善、例えば皮膚の外観および／または感触の改善を求めているヒトを指す。

【0047】

生理条件：生理条件とは、本明細書で使用される場合、細胞または生物が生存し、かつ／または再生する条件に言及する、当技術分野で理解されているその意味を有する。一部の
10 実施形態では、その用語は、生物または細胞システムについて自然に生じ得る外部または内部環境の条件を指す。一部の実施形態では、生理条件は、ヒトまたは非ヒト動物の体内に存在する条件、特に目的の標的部位においてかつ／またはその中に存在する条件である。生理条件は、代表的には、例えば、20～40℃の範囲内の温度（具体的には約37℃）、大気圧1、pH6～8、1～20mMのグルコース濃度、大気レベルでの酸素濃度、および地上で遭遇するような重力の1つまたは複数を含む。

【0048】

参照：参照とは、本明細書で使用される場合、比較を実施して比べるための標準または対
20 照を説明する。例えば一部の実施形態では、目的の薬剤、動物、個体、集団、試料、配列または値は、参照または対照となる薬剤、動物、個体、集団、試料、配列または値と比較される。一部の実施形態では、参照または対照は、目的の試験または決定と実質的に同時に試験および／または決定される。一部の実施形態では、参照または対照は、必要に応じて有形培地に組み入れられた歴史的参照または対照である。代表的には、当業者によって理解され得る通り、参照または対照は、アセスメント下のものと同等の条件または環境下で決定されるか、または特徴付けられる。当業者は、特定の可能な参照または対照への依存および／またはそれとの比較を正当化するのに十分な類似性が存在する場合を認識されよう。

【0049】

試料：本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、代表的には、目的の供給源から得られるか、または誘導された、一定分量の材料を指す。一部の実施形態では、目的の
30 供給源は、生物学的または環境的な供給源である。一部の実施形態では、目的の供給源は、細胞、または生物、例えば微生物、植物もしくは動物（例えば、ヒト）であってもよく、またはそれを含むことができる。一部の実施形態では、目的の供給源は、生体組織または流体であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、試料は、任意の適切な手段によって、目的の供給源から直接的に得られた「一次試料」である。一部の実施形態では、状況から明らかになる通り、「試料」という用語は、一次試料を処理することによって（例えば、一次試料の1つもしくは複数の構成成分を除去することによって、および／または一次試料に1つまたは複数の薬剤を添加することによって）得られる調製物を指す。このような「処理された試料」は、例えば、試料から抽出された材料、または一次試料を1
40 つもしくは複数の技術、例えばクロマトグラフィー、抽出、沈殿などに晒すことによって得られた材料を含むことができる。

【0050】

実質的な構造的類似性：本明細書で使用される場合、「実質的な構造的類似性」という用語は、特定の位置において共有された構造的特色的存在を指す。一部の実施形態では、「
50 実質的な構造的類似性」という用語は、構造的要素、例えばループ、シート、ヘリックス、H結合ドナー、H結合アクセプター、グリコシル化パターン、塩橋、ジスルフィド結合、およびそれらの組合せなどの存在および／または独自性を指す。一部の実施形態では、「実質的な構造的類似性」という用語は、互いに対する原子または部分の三次元配置および／または配向（例えば、目的の薬剤と参照薬剤の間のまたはそれらの中の距離および／または角度）を指す。

10

20

30

40

50

【0051】

治療剤：本明細書で使用される場合、「治療剤」という句は、一般に、生物に投与される場合に所望の薬理学的効果（一部の実施形態では、化粧的効果であってもよく、または化粧的効果を含むことができる）を誘発する、任意の薬剤を指す。一部の実施形態では、薬剤は、適切な集団にわたって統計的に有意な効果を実証する場合、効果を示す（すなわち、治療剤である）とみなされる。一部の実施形態では、適切な集団は、モデル生物の集団であり得る。一部の実施形態では、適切な集団は、特定の基準、例えばある特定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床状態など、またはそれらの組合せによって定義され得る。一部の実施形態では、治療剤は、疾患、障害、および／または状態の1つまたは複数の症状または特色を、軽減する、寛解させる、緩和する、阻害する、防止する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、かつ／または発生率を低減するために使用することができる物質である。一部の実施形態では、治療剤は、化粧的効果を達成する治療剤である（すなわち、化粧的薬剤である）。一部の実施形態では、治療剤は、皮膚の外観および／もしくは感触の改善、ならびに／または別の化粧的利益を達成するために使用することができる。

10

【0052】

処置する：本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」または「処置すること」という用語は、疾患、障害、および／もしくは状態の1つもしくは複数の症状もしくは特色の部分的もしくは完全な軽減、寛解、発症の遅延、阻害、防止、緩和、ならびに／または発症率および／もしくは重症度の低減、あるいは別の所望の生理的効果（例えば、所望の化粧的効果、例えば皮膚の外観および／または感触の改善、例えば皮膚内への目に見えるおよび／または触覚的な改善）の達成を指す。一部の実施形態では、処置は、生理的効果をもたらす薬剤の投与を含む。一部の実施形態では、処置は、投与に際し、本明細書に記載される方式で身体的外観を改善する、化粧的処置を含む。一部の実施形態では、処置は、疾患、障害、および／または状態の徴候または特色を示していない対象に投与することができる（例えば、予防的であり得る）。一部の実施形態では、処置は、例えば、疾患、障害、および／または状態と関連する病理を発症するリスクを低減する目的で、その疾患、障害、および／または状態のごく初期のまたは軽度の徴候または特色を示す対象に投与することができる。一部の実施形態では、処置は、疾患、障害、または状態の確立された、重症の、および／または最終段階の徴候を示す対象に投与することができる。

20

30

【0053】

ある特定の実施形態の詳細な説明

架橋可能な実体

本開示は、対象への架橋可能な実体の投与に関し、特に、例えば皮膚の中または上の、例えば表皮、真皮または下層皮下組織の上、それにおける、その中、またはその下の部位であり得る標的部位における、その中、またはその上での、このような架橋可能な実体の *in situ*での架橋に関する、ある特定の技術を提供する。

【0054】

一部の実施形態では、本開示は、*in situ*で架橋された材料の形成を達成するように選択および／または設計された、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含むシステムを投与するための技術を提供する。本開示を読まれる当業者は、このような架橋された材料が、その親である架橋可能な実体と比べて、代表的には1つまたは複数の異なる物理的特性、例えばレオロジー、および／または化学特性、例えば分子量によって特徴付けられることを認識されよう。一部の実施形態では、このような異なる特性は、例えば *in situ*における、および／またはそうでなければ関連性のある生物システムにおける改善された耐久性／持続性であってもよく、またはそれを含むことができる。

40

【0055】

本明細書に記載される通り、このような第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、互いに接触させられる場合、例えば触媒または他の非関与性薬剤の投与なしに互いに反応して、架橋された材料を *in situ*で形成する能力によって特徴付けられる。

50

【0056】

多くの実施形態では、架橋可能な実体の少なくとも1つは、架橋部分で連結したポリマー部分を含む。一部の実施形態では、架橋可能な実体の少なくとも1つは、ポリマー部分を含まない。一部の実施形態では、互いに反応する（例えば、触媒または他の非関与性薬剤の投与なしに）一対の架橋可能な実体は、それぞれ、架橋部分で連結したポリマー部分を含む。一部の実施形態では、互いに反応する（例えば、触媒または他の非関与性薬剤の投与なしに）一対の架橋可能な実体は、架橋部分で連結したポリマー部分を含む第1の架橋可能な実体およびポリマー部分を含まない第2の架橋可能な実体を含む。

【0057】

一部の実施形態では、架橋可能な実体は、ポリマー部分および同じでも異なってもよい複数の架橋部分を含む。とりわけ本開示は、皮膚中の（例えば、表皮、真皮または下層皮下組織の上、それにおける、その中、またはその下の）標的部位への架橋可能な実体の浸透を達成することに関連性のある見識および技術を提供する。例えば一部の実施形態では、本開示は、特定の範囲内の親油性が、架橋可能な実体、特にポリマー部分および架橋可能な部分を含む架橋可能な実体の望ましい（例えば、増強された）浸透を可能にし得ることを教示する。

10

【0058】

図1に示される通り、ヒト皮膚は、外部表皮（それ自体が、角質層、透明層、顆粒層、有棘層、および基底層を含む層状構造である）、真皮、および下層皮下組織を含む多層状である。皮膚は、その環境から身体を分離し、保護するためのバリアとして作用する。化粧的および皮膚科学的分野における主な困難は、皮膚にわたって目的の化合物または薬剤の浸透を促進するための技術の開発である。例えば、Ng (2015) Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In: Dragicevic N., Maibach H. (eds) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer, Berlin, Heidelbergを参照されたい。

20

【0059】

当技術分野では、ヒト皮膚が、約500ダルトンを上回る分子量（例えば、数平均分子量）を有する化合物の輸送を制限し（Bos and Meinardi, Experimental Dermatology, 9:165, 2000）、このような小さい化合物についても、有効な輸送には、化学的もしくは物理的な剥離剤もしくは破壊剤、および／または電流もしくは磁場などの投与などの追加の操作がしばしば必要であることが理解されている。

30

【0060】

本開示はとりわけ、皮膚層にわたるまたは皮膚層を介する浸透に関する技術を提供し、具体的には、反応して標的部位に存在する架橋された材料を産生する架橋可能な実体によるこのような浸透に関する。多くの実施形態では、標的部位は、表皮、真皮または下層皮下組織の上、それにおいて、その中またはその下に存在し得る。とりわけ本開示は、改善された皮膚浸透特徴を有する架橋可能な実体が、親油性をモジュレートすることによって設計および／または調製され得るという教示を提供する。例えば一部の実施形態では、本開示は、特定の薬剤による（具体的には、ポリマー部分であるかもしくはそれを含む、および／またはそうでなければ、例えば500ダルトンを上回る、さらには10～500kDの範囲内の数分子量（例えば、数平均分子量）を有する薬剤による）皮膚浸透の速度および／または程度が、薬剤の親油性を増大することによって、例えば1つまたは複数の疎水性部分を薬剤に結合させることによって増強され得ることを教示する。当業者は、一部の実施形態では、親油性を増大する疎水性部分が、架橋部分であってもよく、またはそれを含むことができ、代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、このような疎水性部分が、必ずしも架橋部分でなくても、それを含まなくてもよく、かつ／または必ずしも架橋（例えば、本明細書に記載される通りの架橋された材料に存在する、および／またはそれを産生する一助になる）に関与しなくてもよいことを認識されよう。

40

【0061】

代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、本開示は、材料と標的部位表面の接

50

触が最大限にされるように、組織の中またはその上（特に、皮膚の中またはその上）の標的部位に架橋された材料を提供することに関する技術を提供する。一部の実施形態では、このような表面は、1つまたは複数の空洞または不規則性を含むことができ、これらは、一部の実施形態では、マイクロスケールまたはさらにはナノスケール構造であってもよい。一部の実施形態では、本開示は、このような接触を促進する流れ特徴を有する架橋可能な部分の調製物を提供する。

【0062】

一部の特定の実施形態では、本開示に従って使用するための架橋可能な実体は、架橋部分で連結したポリマー部分を含み、その架橋部分は、ポリマー部分単独と比較して、コンジュゲート（すなわち、架橋可能な実体）に増大した親油性を付与し、本明細書に記載される通り、一部の実施形態では、このような架橋部分は、ポリマー部分単独の皮膚浸透と比較して、架橋可能な実体によって皮膚浸透を改善することもできる。

10

【0063】

一部の実施形態では、架橋可能な実体の浸透深度は、皮膚表面の下の絶対的距離（例えば、ミクロン）に関してアセスメントされ、かつ／または記載される。一部の実施形態では、架橋可能な実体の浸透深度は、皮膚表面の下の細胞の数に関してアセスメントされ、かつ／または記載される。

【0064】

一部の実施形態では、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体は、例えばある特定期間以内に、皮膚に特定深度まで浸透することができ、および／または実際に浸透する（例えば、本明細書に記載される通り投与される場合）。一部の実施形態では、このような特定深度は、例えば、少なくとも50ミクロン、少なくとも100ミクロン、少なくとも200ミクロンもしくはそれよりも大きくてもよく、代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、このような特定深度は、少なくとも2個の細胞層、少なくとも3個の細胞層、少なくとも4個の細胞層、少なくとも5個の細胞層、少なくとも6個の細胞層、少なくとも7個の細胞層、少なくとも8個の細胞層、少なくとも9個の細胞層、少なくとも10個の細胞層もしくはそれよりも多い細胞層であってもよく、かつ／またはこのような期間は、例えば、1日以内、18時間以内、12時間以内、11時間以内、10時間以内、9時間以内、8時間以内、7時間以内、6時間以内、5時間以内、4時間以内、3時間以内、2時間以内、1時間以内もしくはそれ未満以内であってもよい。

20

30

【0065】

一部の実施形態では、皮膚表面に投与された架橋可能な実体の少なくとも1%は、例えば1日の期間以内に表皮、真皮または下層皮下組織の上、それにおける、その中、またはその下の標的部位に浸透する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体の皮膚浸透の特徴は、任意の化学的もしくは物理的な剥離剤もしくは破壊剤、および／または電流もしくは磁場などなしに（例えば、当技術分野において理解されているような浸透増強剤なしに）観察される。

【0066】

一部の実施形態では、架橋可能な実体は、約-4～約2の範囲内の親油性（log P）によって特徴付けられる。一部の実施形態では、本明細書に記載される架橋可能な実体は、親油性である架橋可能な部分を含む。一部の実施形態では、架橋可能な部分の親油性は、ポリマー部分の親油性、ならびに／またはポリマー部分および1つもしくは複数の架橋可能な部分を含む架橋可能な実体の親油性とは独立に決定することができる。一部の実施形態では、架橋可能な部分は、約0～約6の範囲内の親油性（log P）によって特徴付けられる。例えば一部の実施形態では、架橋可能な部分の親油性は、架橋可能な実体を形成するための分子ポリマー部分との関連および／または連結の前に、架橋可能な部分の検査によって試験される。

40

【0067】

一部の実施形態では、特定の実体または部分についての親油性は、標準溶媒（例えば、オクタノール）および水またはその溶液と比べた、その分配係数（P）によって決定される

50

。

【数 1】

$$\log P = \log \frac{[\text{オクタノール中でアセスメントされる実体または部分}]}{[\text{PBS中でアセスメントされる架橋可能な実体または部分}]}$$

【0068】

一部の実施形態では、本開示に従って有用な実体または部分の（例えば、架橋可能な実体の、および／または架橋部分もしくは他の疎水性部分の） $\log P$ は、0超である。

【0069】

一部の実施形態では、架橋可能な実体（例えば、本明細書に記載される通りの親油性を有する架橋可能な実体）は、500ダルトンを上回る分子量（例えば、数平均分子量）を有する。一部の実施形態では、架橋可能な実体は、1～1000kDaの範囲内の分子量（例えば、数平均分子量）を有する。一部の実施形態では、システムは、約10～250kDaである架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約10～150kDaの範囲内の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約10～100kDaの範囲内の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約10～40kDaの範囲内の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約10kDaの分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約20kDaの分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約30kDaの分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約40kDaの分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、約50kDaの分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、10kDa未満の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、100kDa未満の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、250kDa未満の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、システムは、500kDa未満の分子量（例えば、数平均分子量）を有する架橋可能な実体を含む。

【0070】

ポリマー部分および架橋部分を含む架橋可能な実体の一部の実施形態では、架橋部分は、架橋可能な実体に親油性を与える。一部の実施形態では、架橋可能な実体における特定のポリマー部分に連結した架橋部分の独自性および／または数および／または密度は、架橋可能な部分が、本明細書に記載される通りの特徴を有するように選択される。例えば一部の実施形態では、ポリマー部分が、特に親水性であり、特に長く、かつ／または特にその非連結状態での皮膚浸透の低さによって特徴付けられる場合、より親油性が高い架橋部分（および／またはより大きい数／より高い密度の親油性架橋部分）が、そのポリマー部分に連結する。

【0071】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、本発明者らは、一部の実施形態では、例えば1つまたは複数の皮膚構造または層を介する輸送を促進することができる（例えば、架橋可能な実体を、通過するのに十分に「易滑性」にして）、架橋可能な実体の三次元充填をある特定の体積以内に達成するように、ポリマー部分および架橋部分（ならびに／またはその数および／または密度）の特定の組合せを選択することが望ましい場合があることを提唱する。一部の実施形態では、分子内および／または分子間相互作用は、架橋可能な実体の三次元充填に寄与することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りの特定の架橋可能な実体の三次元充填は、少なくともある特定の環境条件（例

10

20

30

40

50

えば、生理条件) 下で、自己集合によって生じる (例えば、別の薬剤の添加を必要とすることなく)。

【0072】

代表的には、架橋可能な実体は、生体適合性である。例えば一部の実施形態では、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体の投与は、著しい刺激および／または炎症を引き起こさない (例えば、投与部位および／または標的部位において)。

【0073】

一部の実施形態では、架橋可能な実体は、局所的付与に適した粘度を有し、例えばただ単に滴るよりはむしろ、標的部位への浸透を可能にするおよび／またはそうでなければ分布を可能にするのに十分長時間、付与された架橋可能な実体を投与部位に接触させたままにするのに十分な粘度を有する形態または調製物で、本発明に従って利用され、このような一部の実施形態では、粘度は、付与された架橋可能な実体が皮膚表面上の微細構造内に流れることを可能にする範囲内である。一部の実施形態では、架橋可能な実体は、注射による投与に適した粘度を有する形態または調製物で、本発明に従って利用される。一部の実施形態では、適切な粘度は、架橋可能な実体を、急速に流れ落ちることなく局所投与することができ、かつ／または皮膚に擦り込むことができる粘度である。

10

【0074】

一部の実施形態では、本開示は、互いに相互作用して架橋された材料を形成する (例えば、表皮、真皮または下層皮下組織上、それにおける、その中またはその下の標的部位において、架橋された材料を *in situ* で提供する)、2つまたはそれよりも多い架橋可能な実体を含むシステムを提供する。

20

【0075】

一部の実施形態では、提供されるシステムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、架橋部分で連結したポリマー部分を含む。このような一部の実施形態では、システムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、架橋部分で連結したポリマー部分を含まず (すなわち、架橋部分を含むまたはそれからなるが、ポリマー部分を含まない)、このような一部の実施形態では、提供されるシステムの一方の架橋可能な実体だけが、架橋部分で連結したポリマー部分を含む。あるいは一部の実施形態では、提供されるシステムの架橋可能な各実体は、架橋部分で連結したポリマー部分を含み、このような一部の実施形態では、提供されるシステムの架橋可能な各実体は、同じポリマー部分を含む。

30

【0076】

提供されるシステムの異なる架橋可能な実体は、架橋可能な実体が反応して架橋された材料を形成するように、相補的な架橋部分を含み、一部の実施形態では、このような架橋は、任意の触媒を添加することなく生じる。

【0077】

一部の実施形態では、提供されるシステムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、本明細書に記載される通り500ダルトンを上回る分子量 (例えば、数平均分子量) を有する (例えば、1~1000 kDa の範囲内の分子量 (例えば、数平均分子量) を有する)。一部の実施形態では、提供されるシステムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、本明細書に記載される通り1~10,000 kDa の範囲内の分子量 (例えば、数平均分子量) を有する。このような一部の実施形態では、システムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、本明細書に記載される通りの500ダルトンを上回る分子量 (例えば、数平均分子量) を有しておらず (例えば、1~400ダルトンの範囲内)、このような一部の実施形態では、提供されるシステムの一方の架橋可能な実体だけが、このような高分子量 (例えば、数平均分子量) を有する。あるいは一部の実施形態では、提供されるシステムの架橋可能な各実体が、このような高分子量 (例えば、数平均分子量) を有する。

40

【0078】

ポリマー部分

一部の実施形態では、本発明は、ポリマー部分および架橋部分を含む架橋可能な実体を包含する。一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、グリコサミノグリカン

50

または多糖類である。一部の実施形態では、「多糖類」には、デキストラン、デンプンまたはペクチンが含まれる。一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、デキストランである。一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、デンプンである。一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、ペクチンである。一部の実施形態では、「グリコサミノグリカン」には、ヒアルロン酸（HA）、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸およびケラチン硫酸が含まれる。一部の実施形態では、ポリマーは、ヒアルロン酸である。

【0079】

一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、合成ポリマーである。一部の実施形態では、「合成ポリマー」には、PEG、PEG-ジアミン、ポリアクリル酸、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド（HPMA）、ポリカプロラクトン（PCL）またはポリ（乳酸- α -グリコール酸）（PLGA）が含まれる。一部の実施形態では、合成ポリマーは、PEGである。一部の実施形態では、合成ポリマーは、PEG-ジアミンである。一部の実施形態では、合成ポリマーは、ポリアクリル酸である。一部の実施形態では、合成ポリマーは、HPMAである。一部の実施形態では、合成ポリマーは、PCLである。一部の実施形態では、合成ポリマーは、PLGAである。

10

【0080】

一部の実施形態では、ポリマー部分の1つまたは複数は、ポリペプチド（例えば、タンパク質）である。一部の実施形態では、有用なポリペプチドは、コラーゲン、ゼラチン、エラスチン、またはその機能的断片であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、コラーゲンまたはその機能的断片であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ゼラチンである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、エラスチンである。

20

【0081】

一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムに含まれる1つまたは複数のポリマー部分は、HAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムに含まれる1つまたは複数のポリマー部分は、グリコサミノグリカンであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムに含まれる1つまたは複数のポリマー部分は、ポリペプチド（例えば、非天然ポリペプチドおよび／または合成もしくは組換えポリペプチド）であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、提供されるシステムは、ポリマー部分を含む複数の異なる架橋可能な実体を含み、このような一部の実施形態では、ポリマー部分は、HA、プロテオグリカン、ポリペプチド、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0082】

架橋部分

本明細書に記載される通り、本開示は、反応して *in situ* で架橋された材料を形成するという点で互いに適合性のある、2つまたはそれよりも多い架橋可能な実体を含むシステムを提供する。

【0083】

当業者は、様々な化学的架橋システムを承知している。多くの実施形態では、本開示は、触媒の添加を必要としない架橋化学を利用する。

40

【0084】

一部の実施形態では、システムの架橋可能な実体の1つまたは複数は、架橋部分を含む。一部の実施形態では、「架橋部分」は、クリック反応に関与することができる。

【0085】

当業者は、クリック反応が、2つまたはそれよりも多い基質と一緒にし、生理的 pH 下で生じる、2つまたはそれよりも多い部分の反応であってもよいことを認識されよう。一部の実施形態では、クリック反応は、適切な動態を示す（例えば、二次速度定数（ k_2 ）は、約 $9\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ である）。

【0086】

50

例えば一部の実施形態では、架橋化学には、それに限定されるものではないが、環化付加、求核置換反応、縮合反応および求核性付加反応が含まれ得る。一部の実施形態では、クリック反応は、 $[3+2]$ 環化付加、 $[4+2]$ 環化付加または $[4+1]$ 環化付加である。一部の実施形態では、クリック反応は、アジド-アルキン環化付加、ニトロ-オレフィン環化付加またはディールス-アルダー反応である。一部の実施形態では、クリック反応は、シッフ反応、マイケル型付加、ハロアセテート上の求核置換反応、ジスルフィド連結の形成、フリーラジカル重合、ヒュスゲン (Huysgen) 反応、カテコールへの酵素的酸化後に自発的に架橋するフェノール (チラミン)、またはシアノベンゾチアゾール (CBT) と D-システイン (CYS) の間の反応である。一部の実施形態では、クリック反応は、CBT と D-システインの間の反応である。一部の実施形態では、クリック反応は、CBT と L-システインの間の反応である。一部の実施形態では、CBT には、CBT のアナログ、例えば、同位体標識された CBT が含まれ得る。一部の実施形態では、CBT には、CBT の置換アナログが含まれる。一部の実施形態では、CYS は、CYS のアナログ、例えば、同位体標識された CYS が含まれ得る。一部の実施形態では、CYS には、CYS の置換アナログが含まれる。

10

【0087】

一部の実施形態では、本開示は、ある特定の架橋部分が、本明細書に記載される通りの *in situ* での架橋状況において特に有用となり得ることを認識している。

【0088】

例えば一部の実施形態では、本開示は、例えば、特定のポリマー部分と連結する場合、所望の度合いの親油性によって特徴付けられる1つまたは複数の架橋部分を利用する。一例に過ぎないが、CBT は、本明細書に記載される通り有用な架橋可能な実体において、ポリマー部分と連結することができる架橋可能な部分の代表である。本開示を読まれる当業者は、一部の実施形態では、特定のポリマー部分を含む架橋可能な実体の親油性が、同じでも異なってもよい (すべてが架橋部分である必要はない) 複数の疎水性部分 (例えば、疎水性架橋部分) の連結を介して調整され得ることを認識されよう。

20

【0089】

さらに一部の実施形態では、架橋部分は、アジド、アルキン、ニトロ、オレフィン、ジエン、テトラジン、イソシアネート、マイケルアクセプター、エノン、アルデヒド、アミン、 α -ハロカルボニル部分、マレイミド、チオール、CBT、D-システイン、アクリル残基、フェノール、チラミンまたはカテコールであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、架橋部分は、D-システインであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、架橋部分は、L-システインであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、反応性部分は、CBT であるか、またはそれを含む。

30

【0090】

一部の実施形態では、提供されるシステム内に含まれる少なくとも1つの架橋部分は、ポリマー部分との連結なしに利用することができる。すなわち一部の実施形態では、提供されるシステム内に含まれる少なくとも1つの架橋可能な実体は、架橋部分からなることができ、または架橋部分およびポリマー部分ではない少なくとも1つの他の部分を含むことができる (他の部分は、本開示から明らかになる通り、一部の実施形態では疎水性部分であってもよく、またはそれを含むことができる)。

40

【0091】

一部の実施形態では、提供されるシステムは、例えば、ジアミン、ペプチド、ジチオールまたはジヒドラジドであるか、またはそれを含む架橋部分を利用することができる。このような一部の実施形態では、ジアミンは、エチレンジアミン、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) ジアミンなどであってもよく、このような一部の実施形態では、ジヒドラジドは、シュウ酸ジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジドまたはピメリン酸ジヒドラジドなどであってもよい。意味論に拘るものではないが、ある特定のこのような化合物は、架橋部分からなるものとして、または1つもしくは複数の架橋部分 (例えば、そのそれぞれが、単一反

50

応性原子または少数の原子であってもよい）、および非常に少数（例えば 2 個または 3 個）の「モノマー」だけを含むことができるポリマー部分（ある場合には、このような各「モノマー」は、ごく少数の原子からなっているとしてもよい）を含むものとして説明され得ることが分かっている。それにもかかわらず本開示を読まれる当業者は、これらの化合物が、様々な実施形態では、本明細書に記載される通りの相補的な架橋性部分を有する他の架橋性実体と一緒に利用され得ることを認識されよう。

【0092】

他の部分

一部の実施形態では、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体は、ポリマー部分または架橋部分以外の 1 つまたは複数の部分を含むことができ、それらの他の部分は、一部の
10 実施形態では、ポリマー部分および／または架橋部分と共有結合によって関連することができる。一部の実施形態では、「他の」部分は、架橋可能な実体と放出可能に関連することができる（例えば、切断可能な結合を介して。このような一部の実施形態では、このような切断可能な結合は、標的部位において切断することができる）。

【0093】

例えば一部の実施形態では、架橋可能な実体は、薬物部分（一部の実施形態では、それ自体がプロドラッグ形態であってもよい）を含むことができる。

【0094】

一部の実施形態では、薬物部分は、合成または自然の小分子または生体分子（例えば、炭水化物、脂質、核酸、ポリペプチドもしくはアナログ、またはそれらの組合せ）であるか
20 、またはそれを含む。

【0095】

一部の実施形態では、薬物部分は、1 つまたは複数のやり方で皮膚の外観を改善する薬物部分であってもよい。例えば、このような一部の実施形態では、薬物部分は、皮膚を明るくし、吹出物をきれいにし、引き締め、皮膚内の細胞活性を改善し、コラーゲン合成を改善し、創傷の治癒プロファイルを改善し、色素沈着を改善し、皮膚バリア機能を改善し、局所的プレバイオティクスを介して健康なマイクロフローラ（microflora）を正常にし、損傷（例えば、UV 曝露に起因する）を防止し、瘢痕の外観を低減し、炎症を低減し、そう痒を低減し、発赤を低減し、創傷を治癒し、滑らかにし、もしくは熱傷を処置し、またはそれらの組合せをもたらすことができる。
30

【0096】

一部の実施形態では、薬物部分は、アルファーヒドロキシ酸（例えば、乳酸、酒石酸、またはクエン酸）、抗酸化剤（例えば、グルタチオン、イソフラボン、ポリフェノール（例えば、レスベラトロール）、またはセレン）、ベーターヒドロキシ酸（例えば、サリチル酸）、ポリヒドロキシ酸（例えば、グルコノラクトンまたはラクトビオン酸）、ヒドロキノン、自然な皮膚美白剤（例えば、コウジ酸）、レチノイド（例えば、レチノイン酸、レチノール、トレチノインまたはそれらの誘導体）、セラミド、ペプチド、アミノ酸、クルクミノイド、ビタミン（およびその誘導体）（例えば、L-アスコルビン酸、ビタミン B、ナイアシンイミド、およびビタミン K）、日焼け止め剤（例えば、オキシベンゾン、アボベンゾン、オクチサレート、オクトクリレン、ホモサレート、オクチノキサート、M
40 e r o x y l（S X および X L）または金属酸化物）、着色剤、顔料もしくは自然植物、またはそれらの組合せもしくはプロドラッグを含むことができる。

【0097】

一部の実施形態では、薬物部分は、抗炎症薬（例えば、コルチコステロイド、非ステロイドシステム抗炎症薬剤（クリサボロール））、抗生物質（例えば、クリンダマイシンまたはケトコナゾール）、抗真菌薬（例えば、クロトリマゾールまたはケトコナゾール）、抗座瘡剤（例えば、レチノイドまたはサリチル酸）、鎮痛薬、抗がん剤もしくは抗増殖剤、紅斑症を処置する薬剤（例えば、オキシメタゾリン塩酸塩）、皮下脂肪を低減する薬剤（例えば、デオキシコール酸塩）、育毛剤（例えば、フィナステリド）、またはそれらの組合せもしくはプロドラッグを含むことができる。
50

【0098】

標的部位

本明細書に記載される通りの技術は、標的部位において *in situ* で架橋された材料を提供するのに有用である。一部の実施形態では、標的部位は、体組織であるか、またはそれを含む（例えば、体組織の上またはその中にある）。本明細書では、架橋された材料が標的部位に提供される（例えば、形成される）ように、付与部位に材料を付与するための技術が記載される。

【0099】

例えば一部の実施形態では、体組織は、上皮組織であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、体組織は、結合組織であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、体組織は、神経組織であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、体組織は、筋組織であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、体組織は、目の組織、皮膚の組織または皮下組織であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、体組織は、皮下脂肪、角膜上皮または粘膜であるか、またはそれを含む。

10

【0100】

本明細書に記載される通り、多くの実施形態では、材料（すなわち、1つまたは複数の架橋可能な実体）は、標的部位において *in situ* で架橋可能な材料が提供される（例えば、標的部位において形成される）ように、付与部位に投与される。多くの実施形態では、標的部位は、表面、例えば組織表面への付与後に到達される部位である。一部の実施形態では、組織表面は、生物の表面上に曝露される組織（例えば、皮膚、目、またはある特定の粘膜）の表面である。一部の実施形態では、組織表面は、例えば、生物に付与される手順（例えば医学的手順、例えばオルソスコープ手順を含む外科手順など）またはプロセスを実施することによって接近または曝露することができる内部組織の表面である。

20

【0101】

一部の実施形態では、標的部位は、角質層の上、それにおける、その中、またはその下の標的部位である。一部の実施形態では、標的部位は、表皮の上、それにおける、その中、またはその下の部位である。一部の実施形態では、標的部位は、真皮の上、それにおける、その中、またはその下の標的部位である。

【0102】

一部の実施形態では、標的部位は、損傷を受けた（例えば、疾患、障害もしくは状態、または外科的、化粧的もしくは皮膚科学的処置に起因する）皮膚であるか、またはそれを含むように選択することができる。一部の実施形態では、損傷皮膚は、レーザー（例えば、フラクショナルレーザー）で処置した皮膚、インテンスーパルスーライトで処置した皮膚、マイクロニードル処理した皮膚、ケミカルピーリング処置を受けた皮膚、皮膚剥離術に曝露した皮膚、外傷により傷害を受けた皮膚（外科手術によるものを含む）、病状、例えば皮膚萎縮症に罹患している皮膚、極度の乾燥などであってもよく、またはそれを含むことができる。

30

【0103】

代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、標的部位は、皺（例えば、目じりの皺または顔の他の皺）があるか、もしくはそうでなければ高齢化の徴候を示している皮膚を処置するために選択することができ、またはさらなるふっくらした張り（*plumpness*）および／もしくはレジリエンスが望まれる皮膚であってもよい。

40

【0104】

一部の特定の実施形態では、目的の皮膚は、両唇、下唇、上唇、目の下の隈または目の周りの他の部位（例えば、目じりの皺）、ほうれい線、前頭部、頬、手の甲、耳たぶ、膝、頸部、デコルテ、腕、脚、胴体、殿部、足、および例えば顔全体などを含めたそれらの組合せからなる群から選択される部位における皮膚であってもよく、またはそれを含むことができる。

【0105】

一部の実施形態では、標的部位は、脂肪組織（例えば、皮下脂肪組織）であってもよく、

50

またはそれを含むことができる。代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、標的部位は、皮脂腺および／もしくは漿液腺（例えば、汗腺）などの腺であってもよく、もしくはそれを含むことができ、かつ／または標的部位は、脈管（例えば、血管）もしくは管（例えば、汗管）であってもよく、もしくはそれを含むことができる。またさらに代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、標的部位は、例えば、1つまたは複数の皮膚層内に局在し得る1つまたは複数の特異的な細胞集団であってもよく、またはそれを含むことができ、例えば、このような一部の実施形態では、関連性のある細胞集団は、疾患または傷害の状態と関連する特定の幹細胞または細胞集団であってもよく、またはそれを含むことができる。一部の特定の実施形態では、標的部位は、色素生成細胞であってもよく、またはそれを含むことができる。一部の特定の実施形態では、標的部位は、1つまたは複数の毛包であってもよく、またはそれを含むことができる。一部の特定の実施形態では、標的部位は、1つまたは複数の神経細胞または神経であってもよく、またはそれを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0106】

提供されるシステムの投与

本明細書に記載される通り、本開示は、少なくとも第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を含む、皮膚部位に投与されるシステムを提供する。一部の実施形態では、両方の架橋可能な実体と同じ部位に投与され、一部の実施形態では、両方が最終的に目的の標的部位に到達し、したがって、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の反応によって産生された架橋された材料が、標的部位において *in situ* で形成され、またはそうでなければ提供される限り、それぞれを異なる部位に投与することができる。

【0107】

一部の実施形態では、少なくとも1つの架橋可能な実体は、局所的に（すなわち、皮膚表面に）投与される。一部の実施形態では、少なくとも1つの架橋可能な実体は、例えば、標的部位に、またはその実体がそこから標的部位に浸透する位置に注射することによって、非経口的に投与される。

【0108】

一部の実施形態では、提供されるシステムは、対象の顔（例えば、顔全体および／または対象の顔の具体的な標的、例えば両唇、下唇、上唇、目の下の隈、目じりの皺、ほうれい線、前頭部、頬またはそれらの組合せ）に投与される。一部の実施形態では、提供されるシステムは、顔以外の部位（例えば、膝、頸部、デコルテ、脚、腕、胴体、殿部または足）に投与される。一部の実施形態では、提供されるシステムは、手（例えば、手の甲）に投与される。一部の実施形態では、提供されるシステムは、耳たぶに投与される。

【0109】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、同時に投与される。例えば一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、それらが投与される前または投与されるときに組み合わせることができる。一部の実施形態では、このような組合せは、プレミックスと呼ぶことができ、投与前の一定期間に調製することができ、代表的にはこのようなプレミックスは、投与前の約1分以内に調製される。

【0110】

一部の実施形態では、投与部位は、架橋可能な実体の投与の前に準備される。一部の実施形態では、投与部位は、ぬるま湯および石けんで部位を洗浄することによって準備される。一部の実施形態では、投与部位は、テープストリッピングにより準備される。一部の実施形態では、テープストリッピングは、投与部位に半透明 *Scotch* テープを付与することを含む。一部の実施形態では、テープストリッピングは、既に付与された半透明 *Scotch* テープを投与部位から除去することをさらに含む。一部の実施形態では、テープストリッピングは、投与部位が光沢を放つまで反復される。一部の実施形態では、テープストリッピングは、少なくとも40回反復される。

【0111】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、逐次的に投与され、このような一部の実施形態では、一定期間は、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の投与を隔てる。一部の実施形態では、このような一定期間は、約30秒、約1分、約2分、約3分、約4分、約5分、約10分、約30分、約1時間、約6時間、約12時間、またはそれよりも長時間である。一部の実施形態では、このような一定期間は、約2時間である。一部の実施形態では、このような一定期間は、約12時間未満、約6時間未満、約1時間未満、約20分未満、約10分未満、約5分未満、約2分未満、または約1分未満である。

【0112】

一部の実施形態では、付与部位は、架橋可能な実体の付与後に被覆される。一部の実施形態では、付与部位は、架橋可能な実体の付与後に Tegaderm (商標) タイプのフィルムで被覆される。

【0113】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の投与の間の一定期間は、第2の架橋可能な実体が投与される前に、最初に投与された架橋可能な実体の実質的な浸透を可能にするのに十分な期間である。一部の実施形態では、一定期間は、2番目に投与される架橋可能な実体の投与の前に、最初に投与された架橋可能な実体の少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約5%、少なくとも約10%、または少なくとも約20%が浸透するのに十分な期間である。一部の実施形態では、一定期間は、第1の薬剤が分解されず、かつ／または皮膚から取り除かれるのに十分な期間である。特定の架橋可能な実体についての動態および／または浸透の程度は、例えば、モデルシステム（例えば、ブタ皮膚）の使用によるものを含めて本明細書に記載される通りに決定することができ、関連性のある期間は、このような決定に照らして選択することができる。

【0114】

一部の実施形態では、皮膚は、システムの投与後に水で処置される。

【0115】

一部の実施形態では、システムは、毎日投与される。一部の実施形態では、システムは、1日少なくとも1回投与される。一部の実施形態では、システムは、少なくとも1日2回投与される。一部の実施形態では、システムは、1日1～5回投与される。一部の実施形態では、システムは、1日3～5回投与される。一部の実施形態では、システムは、3日ごとに投与される。一部の実施形態では、システムは、7日ごとに投与される。一部の実施形態では、システムは、約15日ごとに投与される。一部の実施形態では、システムは、約30日ごとに投与される。一部の実施形態では、システムは、約60日ごとに投与される。一部の実施形態では、システムは、約90日ごとに投与される。

【0116】

一部の実施形態では、提供されるシステムは、架橋可能な実体のために皮膚浸透を改善する化学実体を含む。一部の実施形態では、化学実体は、架橋可能な実体と同時に投与される。一部の実施形態では、化学実体および架橋可能な実体は、異なる時間に投与される。

【0117】

一部の実施形態では、提供されるシステムは、浸透阻害剤（例えば、架橋可能な実体と相互作用し得るおよび／またはそうでなければ浸透を遅延させることができる）および架橋阻害剤（例えば、架橋可能な実体もしくは架橋部分の1つもしくは複数の特色を阻止する、またはそうでなければ架橋を産生するための架橋部分の反応を妨害することができる）の一方または両方を含み、このような一部の実施形態では、このような阻害剤は、架橋可能な実体の投与の前、その間、その際またはその後に除去することができる（例えば、拡散、洗浄、分解により）。

【0118】

一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体は、持続放出製剤として、または持続放出製剤で投与される。一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体は、

10

20

30

40

50

マトリックスまたは粒子（例えば、ナノ粒子）内にカプセル化される。一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体は、エマルションもしくは分散液として、またはエマルションもしくは分散液で提供される。

【0119】

一部の実施形態では、その架橋部分が相互作用して、架橋された材料において架橋を形成する、架橋可能な実体は、相補的な架橋部分が化学量論量で存在するように、相対量で投与される（例えば、相対量で投与するために製剤化される）。あるいは一部の実施形態では、このような架橋可能な実体は、一对の相補的な架橋部分の一方が、他方に対してモル過剰で存在するように、相対量で投与され、このような一部の実施形態では、このようなモル過剰は、1.1:1~10,000:1の範囲内である。一部の実施形態では、架橋可能な実体の相対量のモル過剰は、1.1:1~2:1の範囲内である。一部の実施形態では、架橋可能な実体の相対量のモル過剰は、1.1:1~10:1の範囲内である。一部の実施形態では、架橋可能な実体の相対量のモル過剰は、1.1:1~100:1の範囲内である。一部の実施形態では、架橋可能な実体の相対量のモル過剰は、1.1:1~1,000:1の範囲内である。

10

【0120】

一部の実施形態では、製剤は、約0.001%w/w~約5.00%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、約0.01%w/w~約5.00%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、約0.1%w/w~約5.00%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、約1%w/w~約5.00%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、約1%w/w~約3%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、約2%w/wの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、製剤は、PBSおよび約2%w/wの架橋可能な実体を含む。

20

【0121】

局所的付与

一部の実施形態では、提供されるシステムの少なくとも1つの架橋可能な実体は、局所的に、例えば皮膚上の部位に、例えば皮膚表面上に提供される。

【0122】

一部の実施形態では、局所投与のための製剤は、クリーム、ゲル、液体、ローション、マスク、マトリックス、ミスト粒子、ペースト、パッチ、粉末、セラム、固体、スプレー（またはその捕集）、またはそれらの組合せであってもよく、またはそれを含むことができる。一部の実施形態では、局所投与のための製剤は、マスクまたはセラムであってもよく、またはそれを含むことができる。

30

【0123】

一部の実施形態では、局所投与のための製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、キレート剤、透明感増強剤、エモリエント、乳化剤、ゲル化剤、保湿剤、潤滑剤、モイスチャライザー、pH調整剤、防腐剤、保護剤、プレバイオティクス、プロバイオティクス、レオロジー変性剤、感覚変性剤（sensory modifier）、スージング剤（soothing agent）（例えば、スージング植物セラム）、安定剤、日焼け止め（例えば、広域スペクトルの無機日焼け止め）、または増粘剤を含むことができる。

40

【0124】

一部の実施形態では、局所的付与は、浸透増強剤（例えば、化学的もしくは物理的な剥離剤もしくは破壊剤、および／または電流、および／または電場もしくは磁場など）の投与または付与を含まない。

【0125】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、化学的手段によって分離される。このような一部の実施形態では、架橋可能な実体は、例えばミセル、リポソームなどにカプセル化される。

【0126】

50

一部の実施形態では、システムが投与され、架橋可能な実体が一定期間にわたって放出される。

【0127】

一部の実施形態では、システムは、架橋可能な実体の徐放を促進するように製剤化された経皮パッチを含む。当業者は、経皮パッチが、単層薬剤型パッチ、多層薬剤型パッチ、リザーバー、またはマトリックスであってもよいことを認識されよう。以下に論じられる通り、一部の実施形態では、パッチは、マイクロニードルを含むことができる（その一部またはすべては、一部の実施形態では当技術分野で公知の通り、固体突出物であってもよく、その一部またはすべては、一部の実施形態では当技術分野で公知の通り、中空であってもよい）。

10

【0128】

本開示を読まれる当業者は、一部の実施形態では、送達が、例えばレーザー（例えば、フラクショナルレーザー）処置、インテンスーパルスーライト処置、マイクロニードル処理、ケミカルピーリング処置、皮膚剥離術などの1つまたは複数への曝露により損傷を受けているまたは受けたことがある部位に局所投与することによって達成または増強することができ、それらの処置のそれぞれは、一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムの局所投与の前、その間、またはその後に投与されてもよく、または投与されていてもよいことを認識されよう。

【0129】

注射

20

一部の実施形態では、少なくとも1つの架橋可能な実体は、注射によって投与される。一部の実施形態では、注射は、皮膚表面の下に行われる。一部の実施形態では、注射は、標的部位の中に行われる。一部の実施形態では、注射は、注射された架橋可能な実体がそこから標的部位に浸透する部位の中に行われる。

【0130】

一部の実施形態では、注射は、送達が、例えば針、カニューレ、または他の通路を介して達成されるように、力または圧力（例えば、シリンジによる）の付与を含むことができる。

【0131】

一部の実施形態では、注射は、マイクロニードル（例えば、パッチに関連していてもよい）を介して行うことができる。例えば一部の実施形態では、1つもしくは複数の架橋可能な実体、またはそれらの組合せは、マイクロニードルを介して投与することができ（例えば、液体として）、代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、1つもしくは複数の架橋可能な実体、またはそれらの組合せは、付与の際またはその後に溶解または分解することができる1つまたは複数のマイクロニードル内に配置することができる。当業者は、溶解性または分解性マイクロニードルの使用が、相対的に粘性の材料（例えば、部分的にまたは完全に形成された、本明細書に記載される通り架橋された材料）を送達するのに特に有用なまたは望ましい場合があることを認識されよう。一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体は、マイクロニードル内、例えば、そのルーメン（例えば、穿孔）内に配置されてもよく、このような一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体（またはそれから形成された架橋された材料）は、ルーメンを介する注射により、および／またはマイクロニードル（例えば、その壁）の溶解もしくは分解により、放出することができる。一部の実施形態では、1つまたは複数の架橋可能な実体は、マイクロニードルを用いて一体的に形成することができ、そうでなければこのような一部の実施形態では、マイクロニードルは、付与の際またはその後に溶解または分解し、それによって1つもしくは複数の架橋可能な実体、またはそれから形成された架橋された材料を放出する材料から形成されていてもよい。

30

40

【0132】

一部の実施形態では、注射は、二重穿孔（dual bore）シリンジまたは針によって行うことができる。このような一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋

50

可能な実体は、少なくとも投与まで、シリンジまたは針の別々の区画内に維持される。一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、投与中に組み合わされ、他の実施形態では、投与中に別々に維持される（すなわちそれぞれが、本明細書に記載される通り、必要に応じてある期間によって隔てられた時間において、別々に投与される）。

【0133】

一部の実施形態では、注射は、約26ゲージ～約30ゲージの穿孔サイズを有する針によって行われる。

【0134】

一部の実施形態では、皮膚は、システムの投与の前に（例えば、投与の前に迅速にまたは直前に）事前処置されている。一部の実施形態では、皮膚の事前処置は、透過剤またはデバイスを投与または付与することによって達成される。一部の実施形態では、皮膚の事前処置は、剥離用クレンザーまたはケミカルピーリングの付与、皮膚剥離術、電気穿孔、イオン導入、低周波ソノフォレーション、マイクロニードル処理の1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、皮膚は、システムの投与前に剥離される。一部のこのような実施形態では、皮膚は、システムを投与する前に、マイクロニードルおよび／またはフラクショナルレーザーで剥離される。一部の実施形態では、架橋可能な実体は、マイクロニードルを用いる皮膚の事前処置の後に（例えば、事前処置の後に迅速にまたは直後に）投与される。

10

【0135】

キット

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるシステムを含むキットを提供する。

20

【0136】

一部の実施形態では、提供されるキットは、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を別々に収容する入れ物を含めた、複数の入れ物または容器を含む。

【0137】

一部の実施形態では、提供されるキットは、複数の別々の区画（例えば、二重穿孔シリンジもしくは針、または調剤前に混合するチャンバを有する二重チャンバパッケージ）を含む少なくとも1つの入れ物または容器を含み、一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、このような区画に別々に収容される。

30

【0138】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される通りの第1または第2の架橋可能な実体の中に配置される、1つまたは複数の入れ物、容器、または区画を提供する。このような一部の実施形態では、配置される架橋可能な実体は、乾燥形態で存在し、このような一部の実施形態では、架橋可能な実体は、液体形態で存在する。一部の実施形態では、配置される架橋可能な実体は、一定期間（例えば、少なくとも1日、1週、1カ月、3カ月、6カ月またはそれよりも長期間）貯蔵されており、このような一部の実施形態では、貯蔵された組成物は、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える架橋可能な実体が未分解のままである貯蔵期間にわたって安定にされている。一部の実施形態では、貯蔵された組成物は、少なくとも約50%、65%、70%、75%またはそれを超える架橋可能な実体が未分解のままである貯蔵期間にわたって安定にされている。

40

【0139】

特徴付け

本明細書を読まれる当業者は、例えば、提供されるシステムを設計（例えば、その適切な構成成分を選択）もしくは生成する場合、および／またはその調製物をモニタリングもしくはアセスメントする場合、架橋可能な実体の、および／またはそれらの構成成分もしくは組合せの、および／またはそれらが生成する架橋された材料の1つまたは複数の特色を特徴付けることが望ましい場合があることを認識されよう。代替としてまたは追加として

50

、一部の実施形態では、例えば、対象またはその処置をモニタリングするために投与される場合に、提供されるシステムの1つまたは複数の特色をアセスメントすることが望ましい場合がある。

【0140】

一部の実施形態では、システムの第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体において、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、*in vitro*において生理条件下で組み合わされる場合、37℃で約60分未満の期間内で互いに反応して、架橋された材料を形成する。このような架橋された材料の特性は、その架橋された材料を産生する架橋可能な実体の選択によってモジュレートすることができ、本発明によって提供される特定の架橋された材料の特徴的形質となることができる。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、50 Pa～10 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、50 Pa～1 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、50 Pa～500 Paの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、50 Pa～100 Paの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、100 Pa～10 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、500 Pa～10 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、1 kPa～10 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、5 kPa～10 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、500 Pa～5 kPaの範囲内である。一部の実施形態では、架橋された材料の貯蔵弾性率は、500 Pa～1 kPaの範囲内である。

10

20

【0141】

一部の実施形態では、分解による架橋された材料の質量喪失は、生理緩衝剤中3日にわたって20%未満である。一部の実施形態では、分解による架橋された材料の質量喪失は、生理緩衝剤中3日にわたって10%未満である。一部の実施形態では、分解による架橋された材料の質量喪失は、生理緩衝剤中3日にわたって5%未満である。

【0142】

一部の実施形態では、水和の際の架橋された材料の膨潤度は、架橋された材料の特徴的性質である。一部の実施形態では、架橋された材料の膨潤度は、架橋された乾燥材料と、外部の水性緩衝剤と平衡に達している架橋された完全に膨潤した材料の質量比 ($Q = m_{swollen} / m_{dry}$) に基づいて測定される。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、50～1000の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、100～1000の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、500～1000の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、750～1000の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、50～1000の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、50～250の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、50～500の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、50～750の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、250～750の範囲内である。一部の実施形態では、架橋された乾燥材料と架橋された完全に膨潤した材料の比は、400～600の範囲内である。

30

40

【0143】

一部の実施形態では、架橋された材料の形成が生じる時間は、システムの第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体が合わされるときから、動的貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') よりも大きくなるまでの時間によって決定される。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、1秒以内に架橋された材料を形成する。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、10秒以内に架橋された材料

50

を形成する。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、1分以内に架橋された材料を形成する。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、10分以内に架橋された材料を形成する。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、30分以内に架橋された材料を形成する。一部の実施形態では、第1および第2のクリック可能な実体は、60分以内に架橋された材料を形成する。

【0144】

in vitro 特徴付け

一部の実施形態では、特徴付けは、提供されるシステムを、モデル皮膚システム（例えば、ブタ皮膚）に付与することを含み得る。

【0145】

一部の実施形態では、特徴付けは、皮膚浸透の1つまたは複数の特色のモニタリングを含むことができる。一部の実施形態では、ブタ皮膚内への局所的付与の0.5～2日後に皮膚に浸透する架橋可能な実体の量が、例えば、酵素および／または他の可溶化剤を使用して皮膚を可溶化した後に定量化される。一部の実施形態では、ブタ皮膚内への局所的付与の少なくとも0.5日後に皮膚に浸透する架橋可能な実体の量が、酵素および／または他の可溶化剤を使用して皮膚を可溶化した後に定量化される。一部の実施形態では、ブタ皮膚内への局所的付与後2日未満に皮膚に浸透する架橋可能な実体の量が、酵素および／または他の可溶化剤を使用して皮膚を可溶化した後に定量化される。一部の実施形態では、ブタ皮膚内への局所的付与後に浸透する、ポリマー部分および架橋部分を含む架橋可能な実体の量は、同じポリマー部分を含み、架橋部分を含まない実体の量を上回る。一部の実施形態では、架橋可能な実体は、HAを含み、ブタ皮膚内への局所的付与後に浸透する架橋可能な実体の量は、皮膚に浸透する同じ分子量（例えば、数平均分子量）の自然HAの量を上回る。好ましくは、一部の実施形態では、ブタ皮膚内への局所的付与後に浸透するHAを含む架橋可能な実体の量は、皮膚に既に見出されているHAの自然量を上回る（ブタ皮膚に既に見出されているHAの自然量＝乾燥組織1g当たり約100～800ug）。

【0146】

一部の実施形態では、ブタ皮膚内の架橋された材料の浸透深度は、標的部位上に紫外線を当てることによって測定される。一部の実施形態では、ブタ皮膚における架橋された材料の存在は、標的部位上に紫外線を当てる際に蛍光を観察することによって決定される。

【0147】

一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、一定期間（例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、20日、25日、30日またはそれよりも多い日数）後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約3.5日後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約9日後に観察可能になる。

【0148】

in vivo 特徴付け

本明細書に記載されるシステムの投与の際の、標的部位および／または投与部位、すなわち皮膚の寄与は、システムを投与する前の皮膚特質と比較される改善について、適切な時間に評価される。一部の実施形態では、皮膚特質には、皺、輝度、硬さ、含水量、皮膚の厚さ、弾性、および皮膚の滑らかさが含まれる。一部の実施形態では、改善には、萎縮皮膚または瘢痕の修復が含まれる。一部の実施形態では、システムの投与は、皮膚の標的部位内の線維芽細胞の活性化および／またはコラーゲン合成の増強をもたらす。

【0149】

一部の実施形態では、皮膚の改善は、グローバル審美的改善尺度（Global Aesthetic Improvement Scale）（GAIS）によって測定される。当業者は、GAISが、以下の評定スケールを使用して決定され得ることを認識されよう。

・1＝著しく改善された

10

20

30

40

50

- ・ 2 = かなり改善された
- ・ 3 = 改善された
- ・ 4 = 変化なし
- ・ 5 = 悪化

【0150】

一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで>1の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで>2の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで>3の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで約1～約2の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで約1～約3の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで約1の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで約2の改善を観察する。一部の実施形態では、対象の大部分は、GAISで約3の改善を観察する。

10

【0151】

一部の実施形態では、皮膚の改善は、Modified Fitzpatrick Wrinkle Scale (MFWS) を使用して測定される。当業者は、MFWSが、以下の評定スケールを使用して決定され得ることを認識されよう。

- ・ クラス0 – 皺なし。皺、連続的な皮膚の線は目に見えず。
- ・ クラス0.5 – 非常に浅いが、目に見える皺。
- ・ クラス1 – 細かい皺。目に見える皺およびわずかなくぼみ。
- ・ クラス1.5 – 目に見える皺および明らかなくぼみ。0～1mmの皺深度。
- ・ クラス2 – 中程度の皺。明確に目に見える皺。1～2mmの皺深度。
- ・ クラス2.5 – 顕著であり、目に見える皺。2mm超および3mm未満の皺深度。
- ・ クラス3 – 深い皺。深く溝のような皺。3mm超の皺深度。

20

【0152】

一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで少なくとも0.5低減する。一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで1～0.5の間低減する。一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで1.5～0.5の間低減する。一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで2～0.5の間低減する。一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで2.5～0.5の間低減する。一部の実施形態では、対象の皺は、MFWSで3～0.5の間低減する。

30

【0153】

一部の実施形態では、対象の皮膚は、滑らかさ、輝度または硬さの改善についてアセスメントされる。

【0154】

一部の実施形態では、皮膚の含水量をモニタリングすることができる。一部の実施形態では、皮膚の含水量は、当技術分野で公知の方法によって決定される通り、未処置皮膚と比較してより高い。一部の実施形態では、皮膚の含水量は、Corneometer CM 825によって決定される。一部の実施形態では、皮膚の含水量は、システムの投与後7日目に、>20%、より高くなる。

【0155】

一部の実施形態では、提供されるシステムは、異常な経表皮水分喪失 (TEWL) を示しているヒトを処置するために使用される。当業者は、異常なTEWLが、例えば、熱傷、ある特定の化学物質、病理的状态 (例えば、湿疹)、物理的剥離、テープストリッピング、紫外線放射、またはそれらの組合せによって引き起こされた皮膚損傷の結果であり得ることを理解されよう。一部の実施形態では、処置された皮膚のTEWLのレベルは、当技術分野で公知の方法によって決定される通り、未処置皮膚と比較して低くなる。一部の実施形態では、処置された皮膚のTEWLのレベルは、当技術分野で公知の方法によって理解される通り、ベースラインレベルと比較して統計的に低くなる。一部の実施形態では、TEWLは、Tewameter TM 300メーター (Courage-Khazaka Electronics) によって測定される。一部の実施形態では、TEWLは

40

50

、Tewameter TM Nano (Courage-Khazaka Electronics) によって測定される。一部の実施形態では、TEWLは、Tewameter Triple TM 330T (Courage-Khazaka Electronics) によって測定される。一部の実施形態では、TEWLは、Invitro Tewameter VT310 (Courage-Khazaka Electronics) によって測定される。一部の実施形態では、処置された皮膚のTEWLは、システムの投与後7日目に、>10%、より低くなる。

【0156】

一部の実施形態では、皮膚は、皮膚の滑らかさの改善についてアセスメントされる。一部の実施形態では、システムの投与後の皮膚は、システムの投与の前の皮膚よりも滑らかになる。一部の実施形態では、皮膚の滑らかさは、生存皮膚の表面評価 (Surface Evaluation of Living Skin) (SELS) を使用してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、皮膚の *in vivo* での急速な位相シフトの測定 (phaseshift rapid *in vivo* measurement of skin) (PRIMOS) を使用してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、3D皮膚プロフィロメトリーによってCanfield Primosを介してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、Lempere皺スケールを使用してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、7点対象満足度スケールを使用してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、口角を使用してアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚は、Allergan皮膚粗さスケール (SkinRoughness scale) を使用してアセスメントされる。

【0157】

一部の実施形態では、皮膚は、皮膚内の架橋された材料の存在および／または程度を決定するためにアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚内の架橋性材料の存在および／または程度は、近赤外線 (NIR) 分光法、共焦点顕微鏡、積分球分光光度計を使用して測定されるか、または粘弾性変形 (VED、mm)、弾性変形 (ED、mm)、限界変形 (UD、mm)、および圧力-変形比法を使用して決定される。一部の実施形態では、皮膚内の架橋された材料の存在および／または程度は、標的部位に紫外線を当てることによって測定される。一部の実施形態では、皮膚内の架橋された材料の存在および／または程度は、標的部位に紫外線を当てる際に蛍光を観察することによって決定される。

【0158】

一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、一定期間 (例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、20日、25日、30日またはそれよりも多い日数) 後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約2日後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約9日後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約11日後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約20日後に観察可能になる。一部の実施形態では、標的部位における架橋された材料の存在は、約30日後に観察可能になる。

【実施例】

【0159】

本発明の実施例は、とりわけ、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体 (ならびに／またはそれらの構成成分および／もしくは組合せ)、および／またはそれらの反応によって形成された架橋された材料を特徴付け、かつ／またはアセスメントするために使用することができる、ある特定の戦略を記載する。このような戦略 (または本開示を読まれる当業者によって認識される通り、それらの等価物) は、本開示に従って使用するための適切性について、潜在的な架橋可能な実体、それらの構成成分 (例えば、部分) もしくは組合せ、および／またはそれらが形成する架橋された材料 (例えば、ゲル) をアセスメントするために使用することができる。したがって一部の実施形態では、本開示は、有用な部分、架橋可能な実体、および／またはそれらの組合せを特徴付け、かつ／または選択するた

10

20

30

40

50

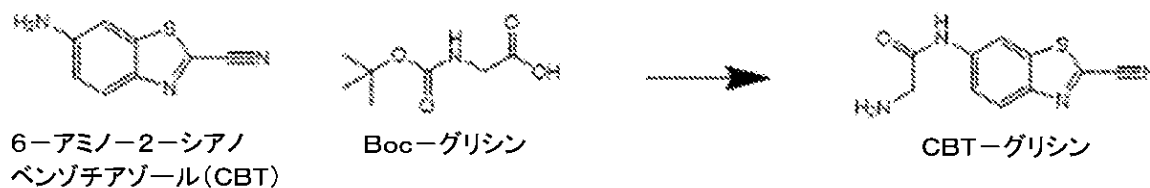
めの技術を提供する。

(実施例 1) 架橋可能な実体の合成

第 1 の架橋可能な実体の合成: $HA-gly-CBT$

ステップ 1 - $CBT-gly$

【化 1】



10

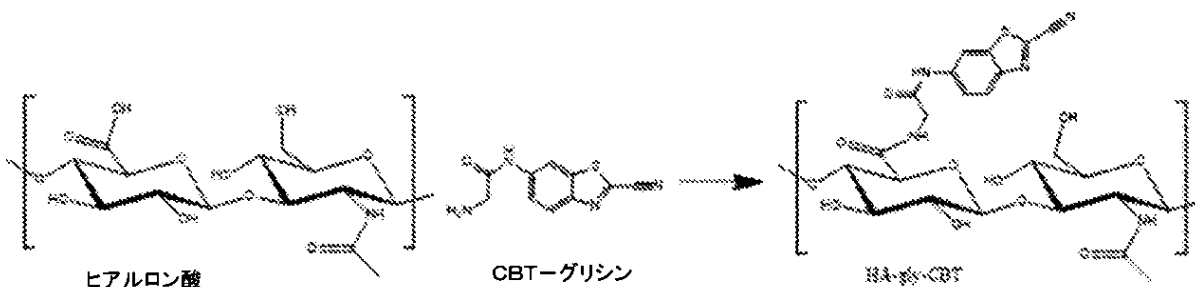
【0160】

無水DMF (約40mgのBoc-グリシン/mL) 中のBoc-グリシン (1.4当量)、DIPEA (2.1当量)、およびTBTU (1.4当量) の混合物を、室温で30分間攪拌する。CBT (1当量) の無水DMF (約100mgのCBT/mL) およびDIPEA (1.4当量) 溶液を、混合物に添加する。反応物を、窒素下で室温において4時間攪拌する。溶媒を、回転蒸発によって除去し、粗製生成物を酢酸エチルに溶解し、有機層を、水、飽和重炭酸ナトリウム水溶液、次にブラインで逐次的に洗浄する。次に、Boc-gly-CBTを、フラッシュクロマトグラフィーで、3:1~1:1のヘキサン:酢酸エチルを用いてさらに単離する。Boc脱保護を、1:1のTFA:DCM中でBoc-gly-CBTを1時間攪拌することによって達成する。次に、溶媒を回転蒸発によって除去する。

20

ステップ 2 - $HA-gly-CBT$

【化 2】



30

【0161】

HA (1当量) を1:1のDMSO:DI水 (10mg/mL) に溶解した後、N-ヒドロキシスルホスクシンイミドナトリウム塩 (スルホ-NHS、0.18当量)、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドヒドロクロリド (EDC、0.18当量)、およびgly-CBT (0.18当量) を、反応混合物に逐次的に添加する。室温で24時間反応させた後、 $HA-gly-CBT$ を、エタノールからの沈殿を反復することによって精製し、続いて24時間透析する。次に、 $HA-gly-CBT$ を凍結乾燥によって乾燥させる。 $HA-gly-CBT$ のプロトンNMRスペクトルは、図2に図示される。

40

【0162】

異なる分子量を有する $HA-gly-CBT$ の合成

$HA-gly-CBT$ を、反応物の化学量論量を変化させることによって、CBTの異なる官能度で合成した。さらに、異なる分子量の $HA-gly-CBT$ を、本明細書に記載される2ステップ合成を使用し、異なる分子量のHA (Creative PEG worksから購入した約10kDa、50kDa、および250kDa) で開始することによって合成した。異なる分子量を有する架橋可能な実体の合成を検証するために、ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) を使用した。GPC分析は、Agilent 1100

50

HPLCで、Agilent PLアクアゲル-OH MIXED-Mカラム (8 μ m 300 $\times$ 7.5 mm) と直列させたDADおよびRI検出器を使用して実施した。水中0.2 MのNaNO₃の移動相を、1 mL / 分の流速で使用した。10 kDa、50 kDa、および250 kDaのHAを使用して調製した3つの架橋可能な実体のGPC分析は、図3に図示される。

【0163】

HA-CBTの異なるバリエーションの合成

一部の実施形態では、第1の架橋性実体は、CBT誘導体で官能化したHA誘導体であってもよい。例えば一部の実施形態では、6-ヒドロキシベンゾチアゾール-2-カルボニトリルまたは図4aに示される構造の別の化学的誘導体などのCBT誘導体 (6-アミノ-2-シアノベンゾチアゾール以外) を、HAにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、このCBT誘導体は、HAとのコンジュゲーションの前に、HAとのコンジュゲーションを促進するための化学的リンカーを用いてさらに誘導体化することができる。一部の実施形態では、この化学的リンカーは、他の化学基の中でもアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、CBT誘導体は、図4bに示される通り、HA上のカルボン酸 (R1)、アルコール (R2)、または別の化学基にコンジュゲートすることができる。

10

【0164】

一部の実施形態では、HA-CBT誘導体の親油性および／または皮膚浸透は、他の化学修飾の中でも、例えば、CBT自体よりも (かつ／またはHA自体よりも) 高い疎水性であり得る1つまたは複数のCBT誘導体を使用して、HA骨格に1つまたは複数の他の化学的部分をコンジュゲートすることによって増大することができる。一部の実施形態では、HA-CBTは、例えば脂肪酸などの1つまたは複数の化学的部分 (例えば、1つまたは複数の疎水性部分) を含む (例えば、それとコンジュゲートする)。

20

【0165】

一部の実施形態では、1つまたは複数の部分 (例えば、疎水性部分、例えば、CBT誘導体および／または脂肪酸部分) は、HAの骨格上のアルコール (R2) にコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、このようなコンジュゲーションの前または後に、HAを酸化して、ある分率のアルコール (R2) をアルデヒドに変換することができる。

30

【0166】

一部の実施形態では、HA (例えば、HA骨格上のアルコール) とある部分のコンジュゲーションは、リンカーを介して行うことができ、このような一部の実施形態では、リンカーは、疎水性アミノ酸または他の疎水性化学的部分であってもよい。

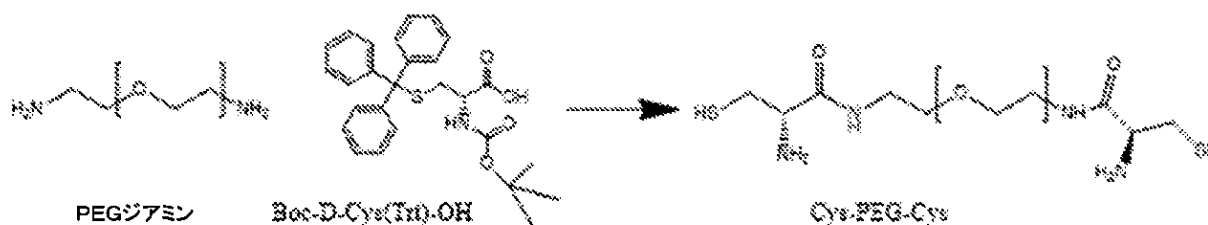
【0167】

一部の実施形態では、本明細書に記載される通りHA (または他のポリマー部分) にコンジュゲートしている1つまたは複数の部分は、このようなコンジュゲーションの前または後に、修飾 (例えば官能化) されてもよい。特定の実施形態に過ぎないが、一部の実施形態では、HAにコンジュゲートしているCBTまたはCBT誘導体部分の一部またはすべて (例えば、ある分率) は、例えば、ニトリル基を疎水性システイン誘導体または別のアミノチオール、例えばシステアミンと反応させることによってさらに官能化することができる。

40

第2の架橋可能な実体の合成: Cys-PEG-Cys

【化 3】



【0168】

Cys-PEG-Cysは、システイン(Cys)上のカルボン酸を、PEGジアミン上のアミンにコンジュゲートすることによって合成される。無水DMF(約55mgのN-Boc-S-トリチル-D-システイン/mL)中のN-Boc-S-トリチル-D-システイン(2.4当量)および1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI、3.0当量)の混合物を、室温で30分間攪拌する。次に、PEGジアミン(約2000Da、1当量)の無水DMF溶液(約125mgのPEGジアミン/mL)を、反応混合物に添加する。室温で4時間反応させた後、DMFを回転蒸発によって除去し、ポリマーを、1:1のジエチルエーテル:n-ヘキサン中に2回沈殿させる。Bocおよびトリチルの脱保護を、ポリマーを0.85:0.10:0.05のTFA:トリイソプロピルシラン:DI水の溶液(約50mg/mL)に室温で添加することによって達成する。次に、Cys-PEG-Cysを、1:1の氷冷ジエチルエーテル:n-ヘキサン中に2回沈殿させることによって精製する。ポリマーを0.1MのHClに溶解させ、溶媒を回転蒸発によって除去することによって、TFAをさらに除去する。次に、ポリマーを凍結乾燥させた後、Cys-PEG-Cysを得る。

10

20

【0169】

第3の架橋可能な実体の合成: Cys-EDA-Cys

より低い分子量のCysベースの架橋可能な実体は、エチレンジアミンをリンカーとして使用して調製することができる(Cys-EDA-Cys)。このような材料を、前述のCys-PEG-Cysに類似の手順で調製した。無水DMF(約55mgのN-Boc-S-トリチル-D-システイン/mL)中のN-Boc-S-トリチル-D-システイン(2.8当量)および1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI、2.8当量)の混合物を、室温で30分間攪拌した。次に、EDAを反応混合物に直接的に添加した。室温で3.5時間反応させた後、DMFを回転蒸発で除去し、ポリマーをDCM中に抽出し、最初に水で、次にブラインで洗浄した。次に、保護された生成物を、フラッシュクロマトグラフィーで、1.5:1の酢酸エチル:0.05%トリエチルアミンを含有するヘキサンを使用して単離した。Bocおよびトリチルの脱保護を、ポリマーを0.85:0.10:0.05のTFA:トリイソプロピルシラン:DI水の溶液(約50mg/mL)に室温で添加することによって達成し、4時間攪拌した。次に、Cys-EDA-Cysを、回転蒸発により溶媒を除去し、生成物をDI水でDCMから抽出する(2回)ことによって精製した。ポリマーを0.1MのHClに溶解させ、溶媒を回転蒸発によって除去することによって、TFAをさらに除去した。次に、ポリマーを凍結乾燥させた後、Cys-EDA-Cysを得た。Cys-EDA-CysのプロトンNMRスペクトルは、図6に図示される。

30

40

【0170】

Cys架橋部分の異なるバリエーションの合成

一部の実施形態では、第2の架橋性実体は、2つまたはそれよりも多いアミノチオール(すなわち、2つまたはそれよりも多い架橋可能なアミノチオール部分)を含有し、それぞれは、少なくともいくつかの実施形態では、リンカー部分を介してコンジュゲートすることができる。

【0171】

一部の実施形態では、このようなアミノチオールは、1,2-、1,3-もしくは1,4

50

ーアミノチオール、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、アミノチオールは、D-システイン、L-システイン、システインの誘導体、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、アミノチオールは、例えば生理条件下でアミノチオールを曝露するように放出され得る別の化学的部分でキャップされる。

【0172】

一部の実施形態では、リンカーは、ポリマー、例えばPEG、ジアミンまたはポリペプチドであってもよく、またはそれを含むことができる。一部の実施形態では、リンカーは、小分子またはアミノ酸、例えばエチレンジアミンまたはリシンであってもよく、またはそれを含むことができる。

(実施例2) 架橋可能な実体、それらの構成成分および／もしくは組合せ、ならびに／またはそれらが *ex vivo* で産生する架橋された材料の特徴のアセスメント

【0173】

本発明の実施例は、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体（ならびに／またはそれらの構成成分および／もしくは組合せ）、および／またはそれらの反応によって形成された架橋された材料を特徴付けるか、またはアセスメントするために使用することができる、ある特定の *ex vivo* 戦略を記載する。

【0174】

粘度

一部の実施形態では、一方のまたは両方の架橋可能な実体の調製物の粘度を別々にアセスメントすることが望ましい場合がある（例えば、架橋可能な実体が互いに接触させられ、かつ／または架橋を可能にされる前に）。

【0175】

当業者は、粘度をアセスメントするための技術を承知されよう。一例に過ぎないが、当業者は、例えば、レオメータ（例えば、同心円状シリンダー、コーンおよびプレート、または並行プレート幾何構造を有する）を利用して粘度をアセスメントするための様々な手順を承知されよう。

【0176】

本明細書に記載される通り、一部の実施形態では、本明細書に記載される通り使用するための個々の架橋可能な部分の調製物は、注射（例えば、マイクロニードルを介する）による送達を可能にするのに十分低い粘度を有することができる。

【0177】

レオロジー特性

したがって一部の実施形態では、架橋可能な実体（ならびに／またはそれらの構成成分および／もしくは組合せ）は、架橋可能な実態が産生する架橋された材料の1つまたは複数のレオロジー特性に、全体的または部分的に基づいて、本明細書に記載される通りそれらの有用性についてアセスメントすることができる。一部の実施形態では、架橋された材料の1つまたは複数のレオロジー特性は、ポリマー部分および／または架橋部分の分子量（例えば、数平均分子量）、濃度、置換度、ならびに材料内の架橋の密度および／または長さなどに基づいて調整することができる。

【0178】

当業者は、本明細書に記載される通り架橋された材料のレオロジー特性をアセスメントするための技術を熟知されよう。例えば一部の実施形態では、レオロジーのアセスメントは、レオメータAR-G2を用いて実施することができる。レオロジー的フローおよび／または振動分析は、Couette幾何構造（カップの直径=30.42mm、ギャップ=0.5mm、ならびにそれぞれ27.95mmおよび42.15mmのボブ直径および長さ）を使用して実施することができる。一部の実施形態では、例えば、アセスメントされる材料を熱的に単離し（溶媒捕捉）、実験前および実験後のその重量をチェックする（重量差は、望ましくは1%未満であるべきである）ことによって、溶媒蒸発を最小限に抑えるまたは防止することが望ましい場合がある。代表的には、分析は、一定温度（37℃）下で実施される。一部の実施形態では、ゲル化動態は、時間掃引試験を介してモニタリン

10

20

30

40

50

グすることができ、貯蔵 (G') および喪失 (G'') 弾性率は、例えば 10 ラジアン／秒の周波数および 1 % 応力歪みにおける時間関数として測定することができる。

【0179】

一部の実施形態では、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体は、事前に混合し（例えば短時間、例えば約 5 分間）、ロードし、試験温度で測定することができる。周波数およびフロー掃引試験のいずれかまたはその両方を、架橋可能な実体の間で架橋が生じた後に実施することができる。一部の実施形態では、周波数掃引試験は、例えば 1 % の応力歪みを維持しながら、例えば $0.01 < \omega < 100$ ラジアン／秒の周波数範囲内で、等温で実施することができる。望ましくは、垂直抗力も同様に、一定値に維持され得る。一部の実施形態では、負荷に起因する残留応力が緩和されるように注意することが望ましい。一部の実施形態では、架橋された材料に、試験温度で平衡化するための浸漬時間を与えることができる。一部の実施形態では、フロー掃引実験は、 $0.0005 < \gamma < 100$ 秒⁻¹ のせん断速度範囲内で等温で行って、ゼロせん断粘度および／または集約せん断減粘レジメンを決定することができる。一部の実施形態では、データ点は、100 秒ごとに 1 回収集することができる。

10

【0180】

一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 50 Pa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 10 Pa ~ 100 Pa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 100 Pa ~ 300 Pa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 300 Pa ~ 1000 Pa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 1 kPa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 5 kPa ~ 10 kPa の範囲内の貯蔵弾性率を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、望ましくは 10 kPa 超の貯蔵弾性率を有する。

20

【0181】

ゲル化動態

一部の実施形態では、望ましい架橋可能な実体は、互いに相互作用して、生理的に関連性のある条件下で（例えば、37℃において、かつ／または生理的に関連性のある塩および／もしくは他の薬剤の存在下で）、本明細書に記載される通り適切な動態を有する架橋された材料を産生する。一部の実施形態では、例えば、このような生理的に関連性のある条件下で第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を一緒に合わせ、それらの相互作用をモニタリングし、例えば動的貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率（例えば、 G'' ）をアセスメントすることによって、ゲル化動態を *in vitro* でアセスメントすることが有用となり得る。当業者によって認識される通り、動的貯蔵弾性率が損失弾性率を超える時点は、ゲル化時間とみなすことができる。

30

【0182】

一部の実施形態では、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体は、容器（例えば、試験管）内で混合され、一定期間が経過したら試験管は反転されるが、得られる混合物は容器から流れ出ない。このような一部の実施形態では、一定期間は、10 秒、30 秒、60 秒、90 秒または 360 秒である。

40

【0183】

一部の実施形態では、望ましい架橋可能な実体（またはそれらの構成成分／部分もしくは組合せ）は、それらが *ex vivo* で組み合わされる場合、本明細書に記載される通り決定されたゲル化時間が約 30 分未満となるようなものである。

【0184】

一部の実施形態では、適切なまたは所望のゲル化時間は、投与方法または方式に依存して決まる。例えば、第 1 および第 2 の架橋可能な部分が、標的ゲル化部位以外の部位にお

50

いて（例えば、シリンジ内で、または投与部位において）組み合わせられ、またはそうでなければ互いに接触させられる場合、代表的にはゲル化時間は、標的ゲル化部位から離れて著しい架橋が生じないようにするのに十分長いことが望ましい。

【0185】

膨潤

一部の実施形態では、架橋可能な実体、それらの構成成分または組合せは、それらが產生する架橋された材料の1つまたは複数の膨潤特質を決定することによって、有用性について本開示に従ってアセスメントすることができる。一部の実施形態では、膨潤度は、乾燥形態の架橋された材料と、完全に膨潤した形態の架橋された材料（例えば、外部水性緩衝剤と平衡に達している：Q-M swollen / M dry）の間の質量比に基づいて測定することができる。一部の実施形態では、架橋された材料の1つまたは複数の膨潤特質は、ポリマー部分および／または架橋部分の分子量（例えば、数平均分子量）、濃度、置換度、ならびに材料内の架橋の密度および／または長さなどに基づいて調整することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される通り架橋された材料は、50～1000の範囲内の膨潤比を有することができる。

10

【0186】

ヒアルロニダーゼ抵抗性

当業者は、架橋が、バイオポリマーの分解に対する抵抗性を増大して、in situにおける耐久性を増大し得ることを認識されよう。このことを実証するために、HAゲルをex vivoで形成し、HAを分解する、体内に自然に存在する酵素であるヒアルロニダーゼに曝露した。

20

【0187】

HA-gly-CBT（50 μL、15 mg / mL、PBS）を、PBS（20 μL）またはCys-PEG-Cys（20 μL、20 mg / mL）のいずれかと混合し、37℃で1.5時間インキュベートした。HA-gly-CBTおよびPBSの混合物は、粘性の液体のままであった一方、HA-gly-CBTおよびCys-PEG-Cysの混合物は、透明なゲルを形成した。各製剤に、ウシ精巢ヒアルロニダーゼ（5 μL）を添加し、混合物を穏やかにボルテックスして、100単位 / mLの最終酵素濃度を得た。規定された時点において、試料を遠心分離して不溶性ゲル構成成分を除去し、一定分量の上清のそれぞれを分析した。分解に対する抵抗性は、高分子量を有する残存する可溶性HAの分率（上清のGPC分析によって決定した）と、残存する不溶性HAの分率（上清のGPC分析によってプレートリーダーを用いて決定した）を合計することによってアセスメントした。

30

【0188】

PBSと混合したHA-gly-CBTの分解は、架橋されたHA-gly-CBT（Cys-PEG-Cysと混合したHA-gly-CBT）の分解よりも著しく急速であった。24時間後、HA-gly-CBTの15%未満が、未架橋試料に高分子量として残存した一方、架橋されたHA-gly-CBTの>50%が、ゲルとして残存した。24時間インキュベートした後のゲルの画像は、図9に示されており、ヒアルロニダーゼによる分解に対して実証された抵抗性を立証している。

40

【0189】

一部の実施形態では、架橋された材料における架橋の程度は、in situでの耐久性を付与するのに十分である。このような一部の実施形態では、架橋された材料は、対応する未架橋の材料などの適切な参照と比べて耐久性の増大を示す。

（実施例3）架橋可能な実体の製剤

【0190】

以下のサブセクション（すなわち、セクション3.1～3.11）は、例示的な製剤を提供し、そのそれぞれは、少なくとも1つの架橋可能な実体を含む。一部の実施形態では、「架橋可能な実体」と標識された構成成分は、本明細書で提供される通り、適切な異なる架橋可能な実体のために置換することができる。一部の実施形態では、システムは、セク

50

ション 3. 1 ～ 3. 1 1 の第 1 の製剤および第 2 の製剤を含み、それらは、第 1 の製剤の架橋可能な実体が、第 2 の製剤の架橋可能な実体と反応して、架橋された材料を形成することができる限り、一緒になって対にされる。

【 0 1 9 1 】

3. 1. 例示的なセラム

セラム（例えば、老化防止セラムとして利用することができる）を、表 3. 1 に概説される通りのパート A および B を合わせ、その後、セラム（serus）の pH が約 5. 0 ～ 約 5. 5 になるまでパート C を添加することによって調製する。

【 0 1 9 2 】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りセラム調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

10

【表 1】

表 3.1

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	100.00 までの 適量	
	Dissolvine (登録商標) NA2-S	AkzoNobel	EDTA二ナトリウム	0.15	キレート
		Aldrich	メタ重亜硫酸ナトリウム	0.05	安定剤 (Stablizer)
	Structure XL	AkzoNobel	ヒドロキシプロピルデ ンブリン酸	4.00	スージング/ 感触付与剤 (sensory feel agent)
			グリセリン	3.00	
	Recentia(登 録商標) CS	AkzoNobel	カメリアシネンシスの 花/葉/茎の汁	0.50	スージング植 物セラム画分
			HA-gly-CBT	0.001-- 5.00	架橋可能な 実体
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、 カプリリルグリコー ル、ソルビン酸	適量	防腐剤
B			クエン酸	0.23	pH調整剤
			クエン酸三ナトリウム 二水和物	0.82	緩衝剤
C			クエン酸	適量	

20

30

40

【 0 1 9 3 】

3. 2. 例示的ローション

ローション製剤（例えば、スージングおよび／またはモイスチャライジングローションとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。パート A を、表

50

3.2に概説されている成分を合わせ、混合しながら75℃に加熱することによって調製する。別個に、パートBを、表3.2に概説されている成分を合わせ、混合しながら75℃に加熱することによって調製する。高せん断かき混ぜを使用し、パートBをパートAに添加し、75℃で混合する。製剤を、中程度の混合と共に冷却する。35℃において、均一になるまでパートCを混合する。パートDを添加してpHを 5.0 ± 0.5 に調整する。

【0194】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りローション調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 3.2

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A			水	100.00 までの 適量	保湿剤
			グリセリン	3.00	レオロジー変 性剤
			キサンタンガム	0.30	防腐剤
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、 カプリリルグリコー ル、ソルビン酸	適量	防腐剤
			ソルビン酸カリウム	0.20	保湿剤
B	ARLACEL(商 標) LC	Croda	ステアリン酸ソルビタ ン、ラウリン酸ソルビ チル	3.00	乳化剤
	NATRAGEM E145		ラウリン酸/コハク酸 ポリグリセリル-4	2.80	乳化剤
			ステアリン酸	3.50	乳化剤
			ブチロスパーマム・パ ーキー (Butyrospermum Parkii)(シアバター)	5.00	エモリエント
	CRODAMOL ISIS	Croda	イソステアリン酸イソ ステアリル	10.00	エモリエント
C			水	30.00	
			HA-gly-CBT	0.001- 5.00	架橋可能な 実体
	AQUALANCE		水、エリスリトール、ホ マリンHCl	3.00	モイスチャラ イザー
D			クエン酸	適量	

【0195】

3.3. 例示的ローション

ローション製剤（例えば、顔用の自然日焼け防止ローションとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。パートAを、表3.3に概説されている成分を合わせ、85℃に加熱することによって調製する。パートBを、表3.2に概説されている成分を合わせ、85℃に加熱することによって調製する。パートCを、攪拌しながらパートAに添加し、温度を維持する。パートBを、高せん断攪拌を用いてパートA/Cにゆっくり添加する。混合物をホモジナイズする。製剤を攪拌し、室温に冷却し、40℃未満でパートDを添加する。

【 0 1 9 6 】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りローション調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 3】

表 3.3

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	Crodamol(商標) GTCC	Croda	カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド	5.00	
	Crodamol ISIS	Croda	イソステアリン酸イソステアリル	5.00	エモリエント
	Arlacel 1690	Croda	イソステアリン酸ソルビタン、ポリリシノレイン酸ポリグリセリル-3	3.50	エモリエント
	Prisorine(商標) 3515	Croda	イソステアリルアルコール	2.00	乳化剤
	Pripure(商標) 3759	Croda	スクアラン	2.00	エモリエント
			ブチロスパーマム・パーキー(シア)バター	1.00	エモリエント
B			水	適量	
			グリセリン	4.00	保湿剤
			NaCl	0.70	
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、カプリルグリコール、ソルビン酸	適量	防腐剤
	Keltrol CG-T	Kelco	キサンタンガム	0.1	安定剤
C	Solaveil XT-300	Croda	二酸化チタン、カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド、ポリヒドロキシステアリン (Polhydroxystearic) 酸、ステアリン酸、アルミナ	24.00	広域スペクトルの無機日焼け止め
D			水	20.00	
	Fruitliquid Blueberry EC	Croda	水、グリセリン、ビルベリー(Vaccinium Myrtillus)果実エキス	2.00	抗酸化剤および保護
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	架橋可能な実体

【 0 1 9 7 】

3.4. 例示的 W/O エマルション

エマルション製剤（例えば、スージング w/o クリームとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。パート A を、表 3.4 に概説されている成分を溶解するまで混合することによって調製する。次に、パート B の成分を、高せん断を用い

てパート A に添加して、製剤を得る。

【 0 1 9 8 】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りエマルジョン調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 4】

表 3.4

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A			水	100.00 までの 適量	
			塩化ナトリウム	1.00	塩
			ソルビン酸カリウム	0.30	防腐剤
			安息香酸ナトリウム	0.30	防腐剤
			乳酸	0.05	pH調整剤
			HA-gly-CBT	0.001- 5.00	架橋可能な実 体
B	Crodamol(商 標) GTCC	Croda	カプリル酸/カプリン酸 トリグリセリド	9.00	エモリエント
	Solaveil(商 標) XT-300	Croda	二酸化チタン、カプリ ル酸/カプリン酸トリグ リセリド、ポリヒドロキ システアリン酸、ステ アリン酸(および)アル ミナ	5.00	サンスクリーン
	SP Arlacel (商標) 1690 MBAL	Croda	イソステアリン酸ソル ビタン(および)ポリリシ ノレイン酸ポリグリセリ ル-3	3.00	W/O乳化剤
	Pripure(商 標) 3759	Croda	スクアラン	3.00	エモリエント
	Crodamol(商 標) ISIS	Croda	イソステアリン酸イソ ステアリル	2.00	エモリエント
	SpanTM 80	Croda	オレイン酸ソルビタン	1.00	共乳化剤
			トコフェロール(および) ヒマワリ(Helianthus Annuus)(サンフラワ ー)種子油	0.20	抗酸化剤

【 0 1 9 9 】

3. 5. 例示的ヒドロゲルマスク

ヒドロゲルマスク製剤（例えば、含浸セラムを含む固体繊維マスクとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。パート A を、プロペラ混合下で水に

E D T A 四ナトリウムを溶解させることによって調製する。ガムを、グリセリン中で事前に分散させて、スラリーを作成する。スラリーを、プロペラ混合下で E D T A 四ナトリウム溶液に添加し、均一になり、塊がなくなるまで混合する。パート A を、85～90℃に加熱して、ガムを水和する。パート A が温かい間に、表 3.5 に概説される通りのパート B を、混合しながら添加する。

【0200】

表 3.5 に概説される通りのパート C の成分を、事前に混合し、パート A および B に添加する。温かい溶液を、すぐに金型に入れ、静置してそのままにした。ゲルが冷却し、落ち着いたら、製剤を適切に包装する。

【0201】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りヒドロゲルマスク調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 5】

表 3.5

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A			水	適量	
			アロエ・バルバデンシス(Aloe barbadensis) 葉果汁	5.00	
			EDTA四ナトリウム	0.10	スージング
		Kelco	カラゲニン	0.80	キレート (Chealating) 剤
		Kelco	ローカストビーンガム	0.60	ゲル化剤
			グリセリン	14.00	ゲル化剤
			HA-gly-CBT	0.001-5.00	架橋可能な実体
			トコフェロール	0.05	化粧活性剤
抗酸化剤					
B			NaCl	0.80	安定剤
			水	3.20	
C	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、カプリリルグリコール、ソルビン酸	適量	防腐剤

【0202】

3.6. セラムをクリーム状にするための例示的粉末

セラム製剤（例えば、スージングセラムをクリーム状にするための B B（美容バーム）粉末として使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。手順：表 3.6 に概説される通りのパート A のすべての成分を添加し、均質混合物が得られるまで高せん断で混合する。表 3.6 に概説される通りのパート B を添加し、成分を粉末化し、自由流動性粉末が得られるまで混合する。

【0203】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部

の実施形態では、以下に示唆される通りセラム調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 6】

表 3.5

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	100.00 までの 適量	
			グリセリン	30%	保湿剤
			ヒアルロン酸-CBTポリマー	0.001- 5.00	架橋可能な実 体
	TEGOSOFT (登録商標) TN	Evonik	安息香酸C12~C15アルキル	2.00	エモリエント
			ブチロスパーマム・パーキー(シアバター)	2.00	エモリエント
			トコフェロール		抗酸化剤
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、 カプリリルグリコール、 ソルビン酸	適量	防腐剤
B	AEROSIL(登録商標) R 812 S		シリル化シリカ	10.0	安定剤
	SIPERNAT (登録商標) 11 PC		水和シリカ	1.00	感覚変性剤
			顔料	適量	必要に応じて

【0204】

3.7. 例示的固体製剤

固体製剤（例えば、深い皺を標的とする固体スティックとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。手順：表3.7に記載される通りのパートAを95℃に加熱し、溶解するまで混合し、次に、表3.7に記載される通りの相Bに添加し、95℃に加熱し、75℃に冷却し、相Cを添加する。均一になるまで混合し、金型または入れ物に注ぐ。

【0205】

凝固点：70℃

【0206】

外観：明るい琥珀色の透明から半透明のゲル

【0207】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通り固体調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 3.7

パート	商標	供給社	INCI名	% w/w	機能
A	AJK OD2046*	Ajinomoto NA	オクチルドデカノール、ジブチル라우ロイルグルタミド、ジブチルエチルヘキサノイルグルタミド	100.00までの適量	ゲル化混合物
B	Floramac Macadamia oil	Floritech	マカダミア(Macadamia Integrifolia)種子油	20.00	自然エモリエント
	Florasun 90	Floritech	ヒマワリ(サンフラワー)種子油	23.65	自然エモリエント/モイスチャライゼーション

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

	Evening Primrose oil	Hallstar	メマツヨイグサ (Oenothera Biennis)(イブニングプリムローズ)油	5.00	自然エモリエント
	Sensolene	Hallstar	オリーブ油脂脂肪酸エチルヘキシル	5.00	軽いタッチの (light)エモリエント
	ELDEW SL-205	Ajinomoto NA	ラウロイルサルコシイソプロピル	5.00	軽いタッチの (light)エモリエント
	Schercemol DISM Ester	Lubrizol	リンゴ酸ジイソステアリル	5.00	安定性改善
	Schercemol DISD	Lubrizol	ダイマージリノール酸ジイソステアリル	5.00	安定性改善
	Schercemol 185	Lubrizol	ネオペンタン酸イソステアリル	5.00	エモリエント
	Liponate NEB	Lipo Chemicals	安息香酸C12~15アルキル	5.00	透明性増強,
	ELDEW PS-306	Ajinomoto NA	ラウロイルグルタミン酸フィトステリル/ベヘニルオクチルドデシル	1.00	ゲル安定化
	Oryza Tocotrienol	Oryza Oil & Fat Co	イネ(Oryza Sativa)(コメ)ブラン油(および)トコリエノール(および)トコフェロール	0.30	自然抗酸化剤
	Astaxanthin - 5C	Oryza Oil & Fat Co	カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド、ヘマトコッカス・プルビアリス (Haematococcus Pluvialis)エキス、アスタキサンチン、トコフェロール	0.05	抗酸化剤
C			HA-gly-CBT	0.001-5.00	架橋可能な実体

10

20

30

40

【0208】

3. 8. 例示的ミスト

ミスト製剤（例えば、pH 5 の抗酸化剤を含む再活性化 (revitalizing) ミストとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。表 3. 8 に概説される通りの成分を合わせて、パート A を得る。表 3. 8 に概説される通りの成分を合わせて、パート B を得る。パート A を、均一になるまで混合しながらパート B に添加する。パート C を、パート A および B の混合物に添加する。得られた混合物を、均一になるまで混合する。pH を、安定性のために 4. 0 ~ 5. 0 の pH に調整する。製剤を、スプレーボトルにパッケージする。

50

【表 8】

表 3.8

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	100.00までの適量	
			グリセリン	6.00	
B	ProdhyFluid (登録商標)	Prod' Hyg	オレイン酸ソルビタン、ポリソルベート80、カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド、スクアラン、アーモンド油、ポリソルベート20、トコフェロール	5.00	乳化剤
			トコフェロール	0.20	
	PhytoTrace Rice	Inolex	イネ(コメ)種子エキス/グリセリン/水	1.00	皮膚感触をスーzing
	PhytoTrace Fig	Inolex	フィカス・カリカ(Ficus Carica)(イチジク)果実エキス/グリセリン/水	1.00	皮膚感触をスーzing
	Grapefruit Floral Water		シトラス・グランディス(Citrus Grandis)(グレープフルーツ)フラワーウォーター	0.50	栄養補給(Energizing)
	Roman Chamomille Water		アンテミス・ノビリス(Anthemis Nobilis)(ローマンカモミール(Chamomille))ウォーター	0.50	栄養補給(Energizing)
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、カプリリル(Captylyl)グリコール、ソルビン酸	適量	防腐剤
			グルタチオン	0.20	安定剤
C			Cys-PEG-Cys	0.001-5.00	架橋可能な実体
D			クエン酸	pH4~5までの適量	安定剤

10

20

30

40

【0209】

3.9. 例示的セラム

表3.9に概説される通りのパートAの成分を合わせ、均質になるまで混合する。表3.9に概説される通りのパートBの成分を合わせ、パートAに添加し、均質になるまで混合する。パートCを添加する。必要に応じて、25%クエン酸溶液でpHを5.0~5.5に調整するまで、パートDを添加する。

【0210】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りセラム調製物に機能的に関与し得ることに注目す

50

る。

【表 9】

表 3.9

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	100.00 までの 適量	
	Dissolvine (登録商標) NA2-S	AkzoNobel	EDTA二ナトリウム	0.15	キレート
		Aldrich	メタ重亜硫酸ナトリウム	0.05	
	Structure XL	AkzoNobel	ヒドロキシプロピルデ ンフリン酸	4.00	スージング
			グリセリン	3.00	
	Recentia(登 録商標) CS	AkzoNobel	カメリアシネンシスの 花/葉/茎の汁	0.50	植物セラム画 分
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、 カプリリルグリコー ル、ソルビン酸	適量	防腐剤
B			クエン酸	0.23	
			クエン酸三ナトリウム 二水和物	0.82	
C			水	50.00	
			HA-Cys	0.001- 5.00	架橋可能な 実体
D			クエン酸	適量	

10

20

30

40

50

【0211】

3.10. 例示的粉末

粉末製剤（例えば、生成物における架橋を、皮膚内に入るまで緩慢にする／防止するための阻害剤を含む製剤をクリーム状にするための粉末として使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。表3.10に概説される通りのパートAの成分を合わせ、均質混合物が得られるまで高せん断で混合する。パートBの粉末成分を添加し、自由流動性粉末が得られるまで混合する。パートCを混ぜ合わせ、均一になるまで混合する。

【0212】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りセラム調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 10】

表 3.10

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	100.00 までの 適量	
			グリセリン	30%	保湿剤
			Cys-PEG-Cys	0.001- 5.00	リンカー
			グルタチオン	0.20	抗酸化剤
			トコフェロール	0.20	抗酸化剤
	TEGOSOFT (登録商標) TN	Evonik	安息香酸C12~C15アルキル	2.00	エモリエント
			ブチロスパーマム・パーキー(シアバター)	2.00	エモリエント
	Optiphen Plus	Ashland	フェノキシエタノール、 カプリリルグリコール、 ソルビン酸	適量	防腐剤
B	AEROSIL(登録商標) R 812 S		シリル化シリカ	10.0	安定剤
	SIPERNAT (登録商標) 11 PC		水和シリカ	1.00	感覚変性剤
			顔料	1.00	皮膚色、輝度 変性剤
C			ヒアルロン酸-CBT	0.001- 5.00	架橋可能な実 体

【0213】

3.11 例示的ローション

ローション（例えば、液晶固体ナノ粒子の二重作用ローションとして使用することができる）を、本明細書に概説される通りに調製する。表3.11に概説される通りのパートAの構成成分を混合し、50℃に加熱する。パートBの構成成分を添加し、混合物を65℃～70℃に加熱する。表3.11に概説される通りの相Cの構成成分を、室温で混合する。次に、パートAおよびBの加熱した構成成分を、容器内で、層流条件下で一緒に混合し、それによって平均粒径150nmを有するリオトロピック液晶性混合相（AB）を創出する。次に、リオトロピック液晶性混合パートAおよびBを、パートCと混合して、分散液を形成する。均一になったら、相Dを添加し、穏やかに混合しながら相Eを添加することによりpHを調整し、次に室温に冷却する。

【0214】

いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、出願人は、例示的な構成成分が、一部の実施形態では、以下に示唆される通りセラム調製物に機能的に関与し得ることに注目する。

【表 1 1】

表 3.11

パート	商標	供給社	INCI/成分名	% w/w	機能
A	水		水	3.00	
			Cys-PEG-Cys	0.001-5.00	リンカー
		Tri-K	ラウロイル乳酸ナトリウム	0.50	乳化剤
		Kelco	キサンタンガム	0.10	増粘剤
			グルタチオン	0.10	抗酸化剤
B			パルミチン酸セチル	20.00	乳化剤
	Biobase S	Tri-K	ステアリン酸グリセリル、ステアロイル乳酸ナトリウム、セテアリルアルコール	0.50	乳化剤
C			水	100.00 までの 適量	
D			水	40.00	
			HA-gly-CBT	0.10-5.00	架橋可能な実体
			防腐剤	適量	防腐剤
E			クエン酸	pH4~5 までの適量	

【0 2 1 5】

(実施例 4) ブタ皮膚における架橋可能な実体、それらの構成成分もしくは組合せ、および／またはそれらが産生する架橋された材料の特徴のアセスメント

【0 2 1 6】

本発明の実施例は、本明細書に記載される通りの架橋可能な実体（ならびに／またはそれらの構成成分および／もしくは組合せ）および／またはそれらの反応によって形成された架橋された材料を特徴付けるか、またはアセスメントするためにブタ皮膚による研究を使用することを記載する。

【0 2 1 7】

一部の実施形態では、第 1 の架橋可能な実体および第 2 の架橋可能な実体を含むシステムを、ブタ皮膚に付与する。このような一部の実施形態では、第 1 の架橋可能な実体の付与

は、第2の架橋可能な実体の付与から時間を（すなわち、一定期間）隔てられる。一部の実施形態では、隔てられた複数の異なる期間をアセスメントすることができる。当業者は、一定期間が、所望の浸透深度、皮膚タイプおよび標的位置に依存して決まり得ることを認識されよう。このような一部の実施形態では、隔てられた複数の異なる期間を、所望の浸透深度、皮膚タイプおよび標的位置の関数としてアセスメントすることができる。

【0218】

一部の実施形態では、ブタ皮膚における第1および／または第2の架橋可能な実体の浸透度は、架橋可能な実体の一方または両方の投与後の1つまたは複数の時点においてアセスメントされる。例えば一部の実施形態では、このようなアセスメントは、1時間、4時間、12時間、24時間および48時間からなる群から選択される1つまたは複数の時点で行うことができる。

10

【0219】

一部の実施形態では、1つまたは複数のブタ皮膚試料は、使用前に、例えば室温で解凍することができる（例えば、30分間またはそれよりも長時間）。一部の実施形態では、このような試料から毛髪を刈り取ることができ（例えばハサミを使用する）、例えば、0.9%生理食塩水を使用して試料をすすぐことができる。

【0220】

一部の実施形態では、皮下の *in situ* でのゲル化は、試料の上またはその中の1つまたは複数の部位に第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体を投与することによってアセスメントすることができる。例えば一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の溶液を、試料に注射することができる（例えば、別々にまたは混合物として、必要に応じてプレミックス期間の後、および必要に応じて1つまたは複数の異なる濃度比で）。代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、ブタ皮膚試料を、それらの下層の真皮層に達するまで切除することができ、第1および第2の架橋可能な部分を投与して、隙間を充填することができる。

20

【0221】

一部の実施形態では、第1および第2の架橋可能な部分を投与した皮膚試料は、架橋（例えば、ゲル化）を *in situ* で生じさせるために、安定条件下で一定期間維持する（例えば、ペトリ皿内で室温において貯蔵する）ことができる。

【0222】

一部の実施形態では、架橋度は、投与後（例えば、混合物の注射後、または第1の架橋可能な部分の注射後、またはより可能性が高いのは第2の架橋可能な部分の注射後）の1つまたは複数の時点において、例えば試料を薄片にすることによって（例えば、メスを使用して）アセスメントすることができる。一部の実施形態では、このような薄片化は、小さい（例えば、約0.4 cm × 0.4 cm）正方形を調製することを含み、それらの正方形は、凍結し（例えば、イソペンタン／ドライアイス浴に浸漬させることによって）、例えば−80℃で貯蔵することができる。

30

【0223】

このような貯蔵が行われたかどうかに関わらず、薄い（例えば、約20 μm）皮膚切片を得ることができ（例えば、クリオスタットを使用する）、画像化することができる（例えば、共焦点顕微鏡を使用する）。

40

【0224】

ブタ皮膚内へのHA-gly-CBTの浸透

凍結したブタ皮膚を、室温に平衡化し、約1.5 × 1.5 cmの正方形にカットした。インキュベーションの前に、1つの皮膚試料を20回テープストリッピングして、角質層（SC）を除去した。すべての皮膚片をPBSで洗浄し、次に37℃において5分間、フラックス拡散セル（1 cm²）に入れた。PBSまたはHA-gly-CBT（約250 kDa、10 mg/mL、PBS）（150 μL）を、ドナー区画内に付与し、ドナー区画をパラフィルムで封止し、セルを加湿オープン内で37℃において18時間インキュベートした。

50

【0225】

皮膚表面を、フランチセル内でPBSを用いて3回洗浄し、次に、付与領域の中心の小領域を、外科用メスで切除した。皮膚組織を、生検用金型内のOCTに入れ、その金型をメチルペンタン／ドライアイススラリーに入れることによって急速凍結した。凍結した皮膚を、クリオスタットミクロトーム上で20 μ m切片の薄片にした。一滴のProLong Goldを、各切片上に置き、イメージングの前にカバースリップで被覆した。蛍光画像を、ZeissAxioPlan2で、DAPIフィルタ（Zeissフィルタ49）を使用して10倍対物レンズを用いて撮影して、HA-gly-CBTの位置を可視化した。

【0226】

PBSだけで処置した皮膚と比較して、HA-gly-CBTで処置した皮膚は、表皮においてより著しく高い蛍光を示したが、このことは、SCを通過したHA-gly-CBTの皮膚浸透を示している（図10）。HA-gly-CBTの局所的付与の前にテープストリッピングした皮膚において、より強力な蛍光が観察されたが、このことは、皮膚の最上部バリアが破壊された後に浸透が増大することを示している。

【0227】

無傷HA-gly-CBTの浸透の検証を、ゲル透過クロマトグラフィー（GPC）を使用してアセスメントした。HA-gly-CBT（15mg/mL、300 μ L、0.5%Tween20を含有するDI水）を、フランチ拡散セル内で6つの別々のブタ皮膚片に局所的に付与した。試料を、封止したドナー区画内で37 $^{\circ}$ Cにおいて18時間インキュベートし、皮膚表面をPBSで3回洗浄した。角質層を、テープストリップを使用して試料から単離し、次に、表皮を真皮から削り取り、真皮を小片にカットした。HA-gly-CBTを、1:1のPBS:メタノール中で37 $^{\circ}$ Cにおいて一晩インキュベートすることによって、皮膚切片のそれぞれ（SCの最上部の8層、SCの最下部の8層、表皮、および真皮）から抽出した。抽出物の体積を、回転蒸発を用いて低減し、濃縮した溶液をGPCによって分析した（実施例1に記載される条件と同じ条件、9:1のDI:MeOHの移動相、0.2MのNaNO₃を使用する）。

【0228】

試料の各層（角質層、表皮、真皮）からのGPCシグナルを、すべての6つの試料で平均した（図11）。角質層および表皮／真皮抽出物の両方において、HA-gly-CBTに対応するシグナルが観察されたが、このことは、無傷HA-gly-CBTが、皮膚のそれぞれの層に送達されたことを示している。結果の再現性を実証するために、SCおよび表皮／真皮抽出物についてのエラーバーが、それぞれ図11bおよび11cに含まれている。

【0229】

ブタ皮膚における*in situ*での架橋

2つの架橋可能な実体間の架橋反応の生体適合性をアセスメントするために、2つの構成成分をブタ皮膚に直接導入した。HA-gly-CBT（30 μ L、5mg/mL、PBS）を、2つのブタ皮膚試料に、31ゲージインスリンシリンジを用いて皮膚表面のすぐ下に注射した。次に、HA-gly-CBTを注射してから1時間後に、皮膚試料の一方にCys-PEG-Cys（20mg/mL、PBS）を注射した（同じ技術を使用する）。両方の皮膚試料を、加湿オープン中で37 $^{\circ}$ Cにおいて一晩インキュベートした。インキュベーション後に、前述の通り試料を凍結し、薄片にした。

【0230】

各群からの切片の半分を、DI水で37 $^{\circ}$ Cにおいて1.5時間洗浄して、遊離HA-gly-CBTを除去した。スライドを、前述の通り蛍光顕微鏡を使用して画像化した。HA-gly-CBT単独を注射した皮膚の洗浄した切片における皮膚蛍光強度は、洗浄しなかった切片と比較して著しく低かった（図12A）。しかし、両方の架橋可能な実体を注射した皮膚試料は、洗浄した切片および洗浄しなかった切片の両方において類似の皮膚蛍光強度を示した（図12B）。これらの結果は、2つの架橋可能な実体が皮膚内で反応し

10

20

30

40

50

て、不溶性ゲルを形成し、そのゲルがスライドの洗浄ステップ中に除去されなかったことを示唆している。

(実施例 5) ヒトへの投与

【0231】

本発明の実施例は、本明細書に記載される通りのシステムのヒトへの投与、およびこのような投与に照らして1つまたは複数の皮膚特徴をアセスメントすることを記載する。

【0232】

本明細書に記載される通り、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体は、皮膚部位に投与される。一部の実施形態では、両方の架橋可能な実体と同じ部位に投与され、一部の実施形態では、両方が最終的に目的の標的部位に到達し、したがって、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の反応によって形成された架橋された材料が、標的部位において *in situ* で形成され、またはそうでなければ提供される限り、それぞれを異なる部位に投与することができる。

【0233】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の一方または両方が、標的部位に投与される（例えば、注射によって）。一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体および第2の架橋可能な実体の一方または両方は、架橋可能な実体が、標的部位に到達するために皮膚組織に必ず浸透するように、標的部位の上の部位（すなわち外部）に投与される。とりわけ本開示は、このような浸透を促進する特定の特徴（例えば、親油性および／または分子量（例えば、数平均分子量）など）を有する架橋可能な実体を提供する。

【0234】

一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体の投与は、第2の架橋可能な実体の投与から時間を（すなわち、一定期間）隔てられる。このような一部の実施形態では、一定期間は、2番目に投与される架橋可能な実体が投与される前に、最初に投与された架橋可能な実体の標的部位へのかつ／またはその中への実質的な浸透を可能にするのに十分な期間である。

【0235】

一部の実施形態では、架橋可能な実体の少なくとも1つについて、複数回投与が実施され、一部の実施形態では、複数回投与は、架橋可能な実体のそれぞれについて実施される。一部の実施形態では、両方の架橋可能な部分の投与は、提供されるシステムの「用量」とみなされる。一部の実施形態では、一方の架橋可能な実体の投与を既に受けた対象への、他方の架橋可能な実体の投与は、提供されるシステムの「用量」とみなされる。一部の実施形態では、複数用量が投与される。

【0236】

一部の実施形態では、架橋可能な実体は、実施例3の製剤である。一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体の製剤および第2の架橋可能な実体の製剤は、同じである。一部の実施形態では、第1の架橋可能な実体の製剤および第2の架橋可能な実体の製剤は、異なる。

【0237】

皮膚改善のアセスメント

一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の特徴（例えば、標的部位におけるかつ／またはその上の皮膚）は、システムを投与した後にアセスメントされる（例えば投与後、例えば任意の特定用量または完全な投薬レジメンの投与後、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日および31日またはそれよりも長期間からなる群から選択される1つまたは複数の時点において）。一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の特徴（例えば、標的部位におけるかつ／またはその上の皮膚）は、システムを投与した後にアセスメントされる（例えば、投与後、例えば任意の特定用量または完全な投薬レ

10

20

30

40

50

ジメンの投与後、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月および12カ月またはそれよりも長期間からなる群から選択される1つまたは複数の時点において）。一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の特徴（例えば、標的部位におけるかつ／またはその上の皮膚）は、システムを投与した約3.5日後にアセスメントされる。一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の特徴（例えば、標的部位におけるかつ／またはその上の皮膚）は、システムを投与した約9日後にアセスメントされる。

【0238】

例えば一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の視覚的特色を、システムの投与後に（例えば、このような投与の前と比較して）アセスメントする。一部の実施形態では、視覚的特色は、1人または複数の専門採点者によって、グローバル審美的改善尺度（GAIS）を参照してアセスメントされ、GAISは、当技術分野で公知の通り、化粧的手順への応答を測定するための妥当性が検証された標準化5点スケールであり、これは良好な評定者内および評定者間の信頼性、ならびに一般に0.85～0.95の範囲の級内相関係数を有することが示されている（例えば、Carruthers & Carruthers, J. Cosmet Laser Therp. 12:235, 2010を参照されたい）。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムの投与は、GAISスケールの少なくとも1グレードの改善を達成する。

【0239】

代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、1つまたは複数の皮膚の特色は、確立されたスケール、例えば、Lemperle皺スケール、対象満足度スケール（代表的には7点）、Allergan皮膚粗さスケール、または任意の他の適切なスケールなどを用いてアセスメントすることができる。一部の実施形態では、皮膚の1つまたは複数の物理的、機能的、または視覚的特質（例えば、滑らかさ、輝度、硬さ、弾性、体積など）の主観的および／または客観的アセスメントを含む、妥当性を検証された任意のスケールを利用することができる。

【0240】

一部の実施形態では、1つまたは複数の皮膚の特色は、皮膚細胞外マトリックスの増強された機械的支持、線維芽細胞の伸長および／もしくは伸展、II型TGF-β受容体もしくはその下流標的（例えば、I型コラーゲン合成）の上方調節、結合組織の増殖因子の上方調節、ならびに／またはそれらの組合せであってもよく、またはそれらに関するものであってもよい（例えば、Quan et al., J Invest Dermatol. 133:658, 2013を参照されたい）。当業者は、ヒト皮膚内への注射後を含む（損傷を受けた、例えば光損傷を受けたヒト皮膚を含む）、このような特色をアセスメントするための戦略を承知している（例えば、Wanget al Arch Dermatol. 143:155. 2-7）。

【0241】

一部の実施形態では、皮膚水分補給を、提供されるシステムの投与後にアセスメントすることができる。このような一部の実施形態では、皮膚水分補給は、例えば、コルネオメーター（例えば、皮膚内の相対的含水量のコンダクタンス尺度を提供するコルネオメーターCM825）を用いて測定される。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムの投与は、皮膚水分補給の統計的に有意な改善を達成し、このような一部の実施形態では、このような改善は、例えば、本明細書に記載される通り、投与の12時間、24時間、36時間または48時間後の時点で測定される場合、少なくとも10%、15%、20%、25%またはそれよりも高い。例えば、架橋された材料（HA-gly-CBT + Cys-PEG-Cys）を試料に投与した場合、材料の付与直後に、皮膚水分補給の26%の改善が観察された。さらに、清潔な未損傷皮膚では、72時間を超えて長続きする皮膚水分補給が観察された（Courage+Kazaka Corneometer（登録商標）CM825を用いてアセスメントされる通り）。

【0242】

20mg/mlのHA-gly-CBT溶液を、脱イオン水、ポリソルベート20および

10

20

30

40

50

グリセリン中で調製した。第2のCys-PEG-CysのPBS溶液(20mg/mL)を調製し、pHをNaOHで5.5~6.5に調整した。HA-gly-CBT溶液(20μl)およびベンチマークである市販のHAセラム溶液(20μl)を、ベースライン読取りの直後に、前腕内側上の3cm×3cmの領域に付与した。さらなるCorneometer読取り値を、0.5時間および6時間において測定した。6時間後、Cys-PEG-Cys溶液(20μl)をHA-gly-CBT試験部位に付与し、リン酸緩衝液(20μl)をベンチマークである市販のHAセラム部位に付与した。次に、さらなるCorneometer読取り値を、12時間、24時間、48時間、72時間および96時間において測定した。結果は、表3.12に作表されている。

【0243】

ベンチマークである市販のHA(ヒアルロン酸)セラムは、水分を補給してふっくらした若いしなやかな皮膚をもたらすことができるものとして製造者によって説明されている、1.5%の純粋ヒアルロン酸を含む高分子量および低分子量のヒアルロン酸とのブレンドであった。ベンチマークである市販のHAセラムについての成分一覧には、水、グリセリン、ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、PEG-60水素化ヒマシ油、ライムギ(cereale)種子エキス/ライ麦(rye)種子エキス、パントテン酸カルシウム、二酢酸ジペプチドジアミノブチロイルベンジルアミド、アスコルビルグルコシド、EDTA二ナトリウム、ペンチレングリコール、フェノキシエタノール、およびクロルフェネシンが含まれる。

【表12】

表 3.12

時間(時)	HA-gly-CBT/Cys-PEG-Cys		市販の HA セラム	
	ベースラインに対する変化%	標準偏差	ベースラインに対する変化%	標準偏差
ベースライン	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

【0244】

一部の実施形態では、皮膚の滑らかさを、提供されるシステムの投与後にアセスメントすることができる。このような一部の実施形態では、皮膚の滑らかさは、例えば3D皮膚プロフィロメトリーによって、例えばCanfield Promosデバイスを使用し、かつ/またはケイ素/エポキシキャスト走査によって測定される。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムの投与は、統計的に有意な皮膚の滑らかさの増大、および/または経時的な滑らかさの増大(さらなる投与を伴って、または伴わずに)を達成する。例えば、提供されるシステムの投与後の皮膚の滑らかさの視覚的改善を、7点の皮膚滑らかさ改善スケールを使用して実証した。図13に図示される通り、システムの付与の2日後に、2グレードの改善が認められた。

【0245】

一部の実施形態では、皮膚の厚さを、提供されるシステムの投与後にアセスメントすることができる。このような一部の実施形態では、皮膚の厚さは、例えば、超音波プロファイリングによってアセスメントすることができる（例えば、Van Mulder et al. Vaccine 35:1810, 2017を参照されたい）。一部の実施形態では、本明細書に記載される通りのシステムの投与は、統計的に有意な皮膚の厚さの増大を達成する。

【0246】

一部の実施形態では、関連性のある皮膚は、損傷を受けていてもよく（例えば、疾患、障害もしくは状態、または外科的、化粧的もしくは皮膚科学的処置に起因する）、このような損傷皮膚に対する改善がアセスメントされる。一部の実施形態では、損傷皮膚は、レーザー（例えば、フラクショナルレーザー）で処置した皮膚、インテンスーパルスーライトで処置した皮膚、マイクロニードル処理した皮膚、ケミカルピーリング処置を受けた皮膚、皮膚剥離術に曝露した皮膚、外傷により傷害を受けた皮膚（外科手術によるものを含む）、病状、例えば皮膚萎縮症、極度の乾燥などに罹患している皮膚であってもよく、またはそれを含むことができる。

10

【0247】

代替としてまたは追加として、一部の実施形態では、関連性のある皮膚は、皺があるか、もしくはそうでなければ高齢化の徴候を示している皮膚であってもよく、またはさらなるふっくらした張りおよび／もしくはレジリエンスが望まれる皮膚であってもよい。

【0248】

一部の特定の実施形態では、目的の皮膚は、対象の顔の顔全体および／または具体的な標的、例えば両唇、下唇、上唇、目の下の隈または目の周りの他の部位（例えば、目じりの皺）、ほうれい線、前頭部、頬、手の甲、耳たぶ、膝、頸部、デコルテ、腕、脚、胴体、殿部、足、および例えば顔全体などを含めたそれらの組合せからなる群から選択される部位における皮膚であってもよく、またはそれを含むことができる。

20

【0249】

浸透のアセスメント

一部の実施形態では、本明細書に記載される通りヒトに投与された一方または両方の架橋可能な実体の浸透をアセスメントすることが望ましい場合がある。

【0250】

一部の実施形態では、提供されるシステムが投与または送達されている部位の生検が得られ、浸透の度合い（例えば量）および／または深度をアセスメントするために、生検の組織学的検査が実施される。一部の実施形態では、架橋可能な実体および／または架橋された材料は、表皮、真皮または下層皮下組織の中もしくはその下で検出される。一部の実施形態では、ある量の架橋可能な実体、すなわち、投与された（例えば、皮膚表面に、かつ／または標的部位の外部の部位に）実体のうち意味のある（例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれを超える）パーセンテージが、生検の皮膚内に（例えば、表皮、真皮もしくは下層皮下組織の上、それにおいて、その中もしくはその下、および／またはそうでなければ標的部位において）検出される。

30

【0251】

破壊したヒト皮膚内へのHA-gly-CBTの浸透

一部の実施形態では、ヒト皮膚内への架橋性実体の浸透は、皮膚バリア破壊技術によって増大することができる。例えば、様々な技術を用いて事前処置したヒト皮膚内へのHA-gly-CBT（AlexaFluor 647ヒドラジドでタグを付けた）のex vivo浸透を、顕微鏡でアセスメントした。材料の付与の前に、1つの皮膚試料を25回テープストリッピングして、角質層の大部分を除去した。第2の試料において、HA-gly-CBTを皮膚表面に付与し、次に、生成物上にダーマローラー（500 μm針）を40回転がして皮膚を処置した。両方の試料を、局所的に付与した後に、フランツセル内で加湿オープン中37℃において20時間インキュベートした。試料を、前述の通り20

40

50

μm の薄片にし、蛍光顕微鏡でCy5フィルタを使用して画像化した（図14）。

【0252】

HA-gly-CBTを局所的に付与する前にテープストリッピングしたヒト皮膚の表皮および真皮において、著しい蛍光シグナルが観察された。HA-gly-CBTおよびダーマローラーで処置した試料では、表皮において著しい蛍光シグナルが観察されたが、真皮においてはわずかなシグナルが観察されただけであった。それらの例は共に、ヒト皮膚のバリアをどの程度破壊すると、ヒト皮膚内へのHA-gly-CBTの深い浸透を促進できるかについて例示している。

【0253】

HA-gly-CBTの局所的浸透を促進するためのダーマローラー処理能力を、HA-gly-CBTの50kDaのバリエーションを付与することにより、さらに調べた。HA-gly-CBT（50kDa、AlexaFluor 647ヒドラジドでタグを付けた）をヒト皮膚に局所的に付与し、ダーマローラー（500 μm 針）を20回転がした。皮膚をフランチセルに移し、37℃において20時間インキュベートした。皮膚を凍結し、薄片にし、蛍光顕微鏡でCy5フィルタを用いて画像化して、浸透深度を観察した（図18A）。2つのさらなるヒト皮膚試料も同様に処置した。角質層を、テープストリッピング（20回）で試料から除去し、メスで表皮および真皮を単離した。各皮膚層からHA-gly-CBTを1:1のPBS:メタノールに抽出した（37℃で一晩）後、HA-gly-CBTの濃度を、各抽出液中のAlexaFluor色素の蛍光をプレートリーダーで測定することによって定量した（図18B）。

【0254】

ダーマローラーで処置した後の表皮および真皮の両方において、著しい量のHA-gly-CBT（50kDa）が検出された。観察されたHA-gly-CBTの透過は、後の、同時のまたは事前のシステインベースの架橋可能な実体の局所送達と組み合わせられる場合、真皮深部への安定なHAベースの架橋された材料の局所送達を実現可能であることを示唆している。

（実施例6）例示的なシステム

【0255】

対象の左前腕内側の皮膚上の投与部位（図15を参照されたい）を、架橋可能な実体の投与のために準備した。部位を、低刺激性石けんおよびぬるま湯で30秒間清浄にし、部位をぬるま湯でさらに30秒間すすぎ、部位を軽く拭いて乾燥させることによって準備した。部位のそれぞれがわずかに光沢を放つまで、半透明Scotchテープを各部位に反復して付与し、除去した（約40サイクル）。

【0256】

第1の製剤を、部位のそれぞれに投与した。

【表13】

投与部位	第1の製剤
A	PBS
B	PBS 中 2%HA-gly-CBT
C	PBS 中 2%HA-gly-CBT

【0257】

第1の組成物の投与に際し、各部位をTegaderm（商標）タイプのフィルム約3cm³で被覆した。2時間経過させた。Tegaderm（商標）紙を除去した。部位を10分間平衡化させた。部位の視覚的外観を、可視光線および紫外線（約365nm）の両方の下で写真撮影した。

【0258】

第2の架橋可能な製剤を、部位のそれぞれに投与した。

【表 1 4】

投与部位	第 2 の製剤
A	PBS 中 2%CYS-PEG-CYS
B	PBS
C	PBS 中 2%CYS-PEG-CYS

10

【0259】

第 2 の組成物の投与に際し、各部位を Tegaderm（商標）タイプのフィルム約 3 cm³ で被覆した。部位を一晩被覆したままにした。Tegaderm（商標）紙を除去した。部位を 10 分間平衡化させた。その時点で、投与部位を、可視光および紫外（約 365 nm）線を使用して検査した。記録可能な蛍光シグナルは、部位 A および B において観察されなかった。部位 C において蛍光シグナルがはっきりと目に見えたが（図 15 を参照されたい）、このことは、架橋された材料が皮膚に浸透したことを示している。

【0260】

投与部位を、低刺激性石けんおよび水を使用して少なくとも 1 日 1 回洗浄し、軽く拭いて乾燥させた。投与部位は、すべての他の時点で乾燥したままにした。

20

【0261】

部位の視覚的外観を、可視光線および紫外線（約 365 nm）の両方の下で毎日写真撮影した。記録可能な蛍光シグナルは、部位 A および B において観察されなかった。部位 C において蛍光シグナルがはっきりと目に見えたが、このことは、架橋された材料が皮膚に浸透し、まだ存在していたことを示している（図 16）。

【0262】

システムの投与の 11 日後に、部位を、紫外線を使用して再び検査した。部位 C において蛍光シグナルがはっきりと目に見えたが、このことは、架橋された材料が皮膚に浸透し、11 日後もまだ存在していたことを示している。さらに対象は、いかなる忍容性の問題の証拠も示さなかった。投与部位は、システムの投与前の部位と比較して、投与の 11 日後に皮膚質感が改善された。

30

（実施例 7）組織学的測定

【0263】

左前腕内側に、3 × 3 cm の正方形で以下の架橋可能な実体を投与した。

1. 75 μL の 2% HA-gly-CBT
2. 2 時間経過
3. 75 μL の 2% Cys-PEG-Cys
4. 3 時間経過
5. 75 μL の 2% HA-gly-CBT
6. 2 時間経過
7. 75 μL の 2% Cys-PEG-Cys

40

【0264】

Tegaderm（商標）を、架橋可能な実体の各投与の間およびその後付与部位の最上部に付与した。投与プロセスを、毎日 2 日間反復し、HA-gly-CBT および Cys-PEG-Cys の両方を合計 4 回投与した。3 日目の朝、部位を洗浄し、滅菌した後、4 mm の生検を付与正方形の中心で得た。生検を、OCT 中ですぐに解凍した。

【0265】

生検をクリオスタットで薄片にし、切片をスライド上で中性緩衝ホルマリンにより固定した。次に、スライドを、ヒアルロン酸を検出するためのアルシアンブルーおよび対比染色液としてのヌクレアファストレッドで染色した（図 17）。また、一部のスライドを染色

50

前にヒアルロニダーゼで事前処置して、ヒアルロン酸を除去した。図 17 から分かる通り、ヒアルロニダーゼで事前処置しなかったスライドについて、表皮および真皮のより上部に強力なシグナルが存在する。

【図面】

【図 1】

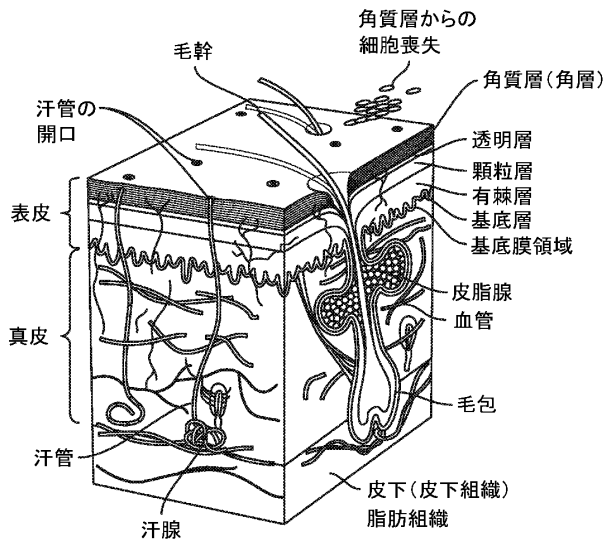


Figure 1

【図 2】

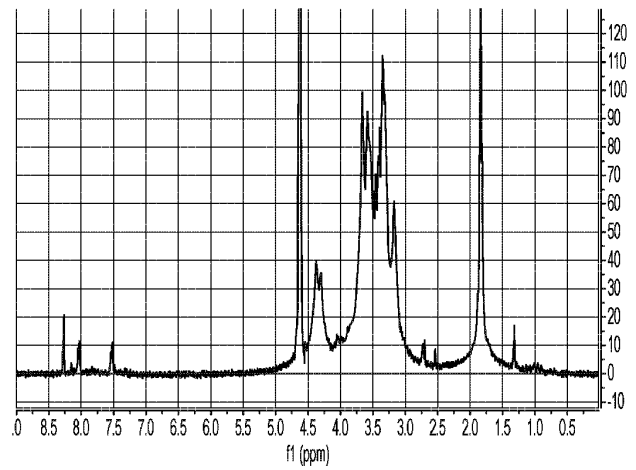


Figure 2

【図 3】

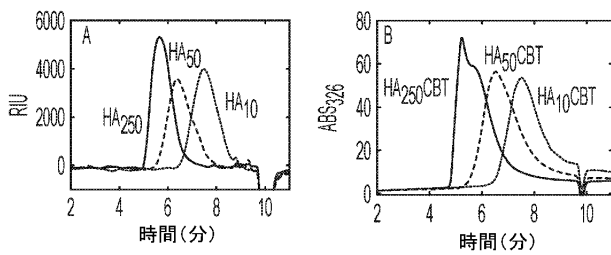
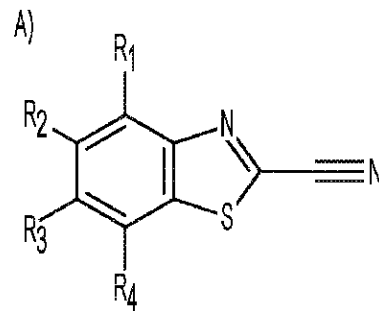


Figure 3

【図 4 A）】



10

20

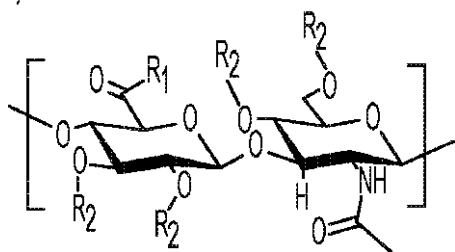
30

40

50

【図 4 B）】

B)



【図 5】

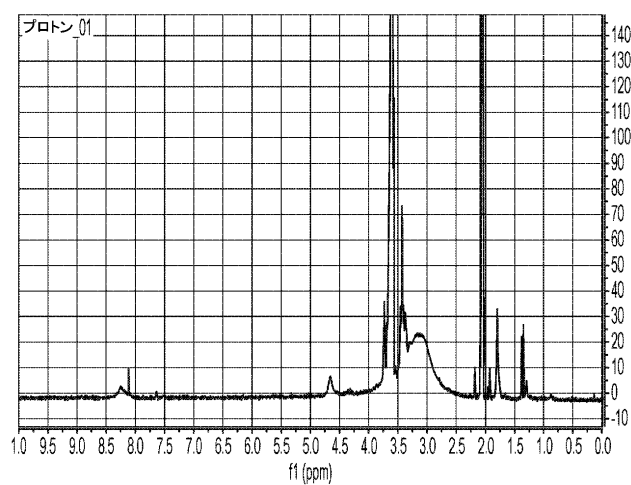


Figure 5

10

【図 6】

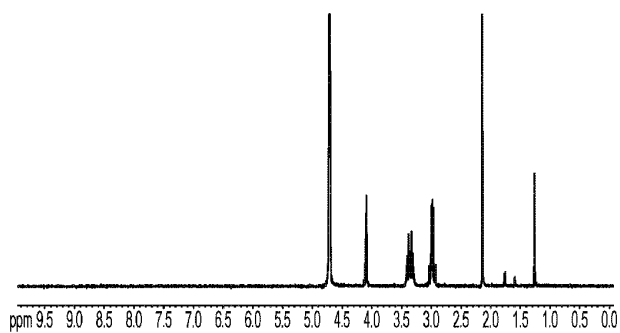


Figure 6

【図 7】

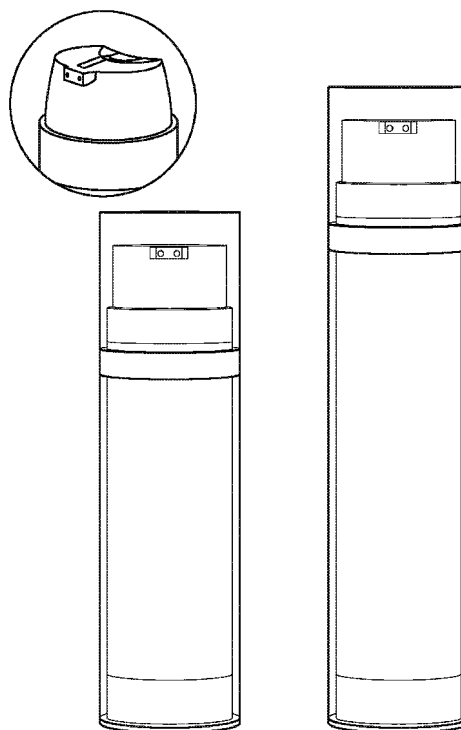


Figure 7

20

30

40

50

【 図 8 】

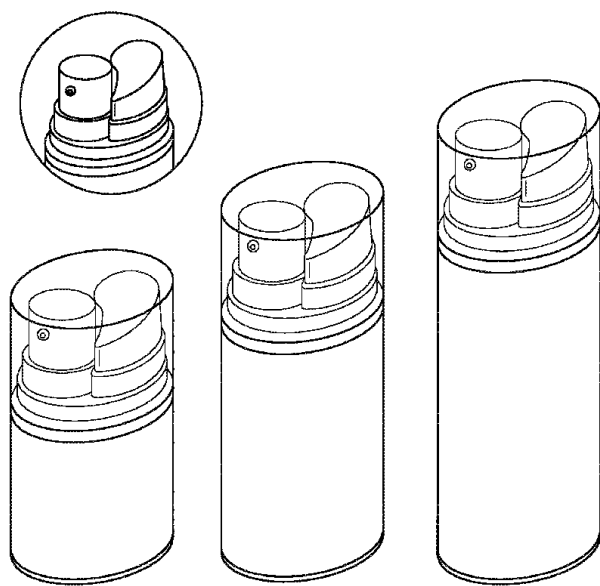


Figure 8

【 図 9 】

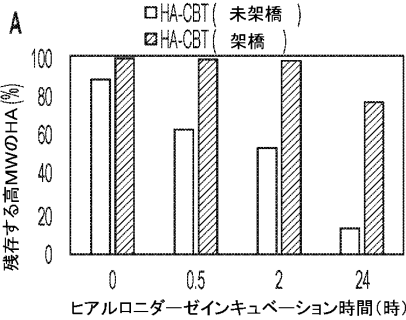


Figure 9

【 図 1 0 】

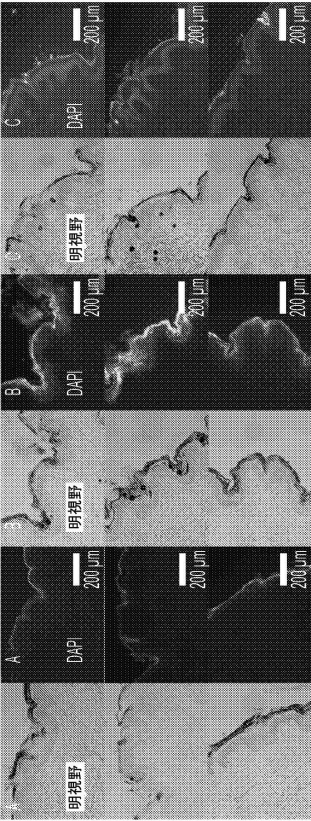


Figure 10

【 図 1 1 】

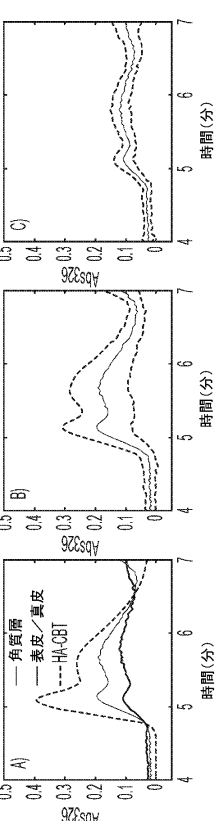


Figure 11

10

20

30

40

50

【図 1 2】

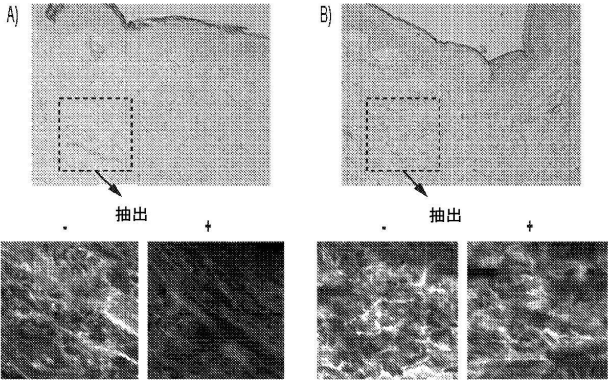


Figure 12

【図 1 3】

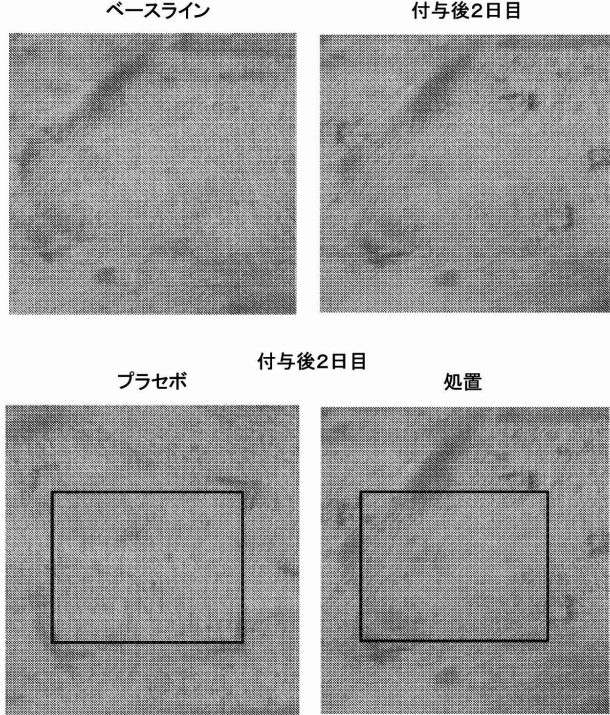


Figure 13

【図 1 4】

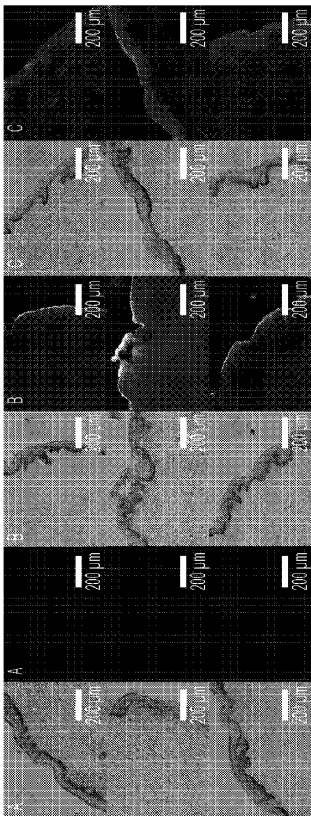


Figure 14

【図 1 5】

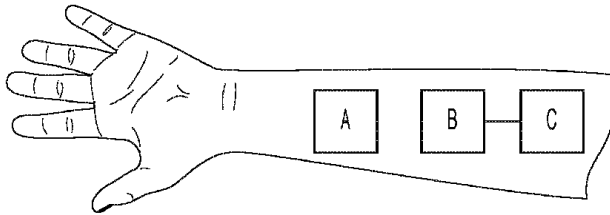


Figure 15

10

20

30

40

50

【図 1 6】

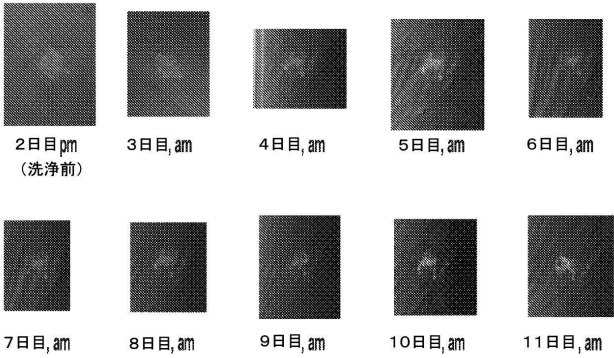


Figure 16

【図 1 7】

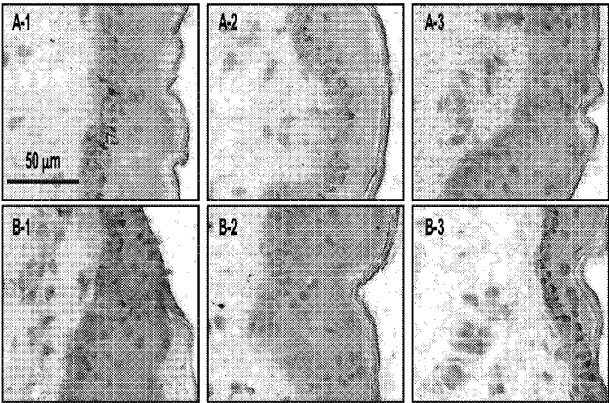


Figure 17

【図 1 8】

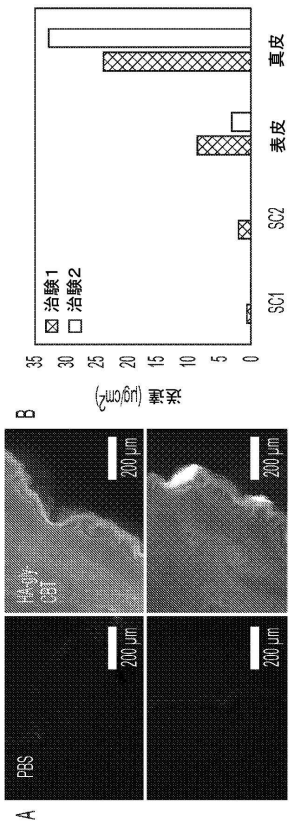


Figure 18

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/059553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K8/73 A61K8/81 A61K31/145 A61K31/728 A61K47/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/201382 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 15 December 2016 (2016-12-15)	1-5, 8-10, 16-19, 22,28-99
Y	page 3, last paragraph - page 9; claims 1-42; examples 1-2	1-99
X	WO 2009/108100 A1 (IPR SYSTEMS SWEDEN AB [SE]; BERGMAN KRISTOFFER [SE] ET AL.) 3 September 2009 (2009-09-03)	1,2,4-9, 12-14, 28-99
Y	page 2 - page 7 page 21 - page 22 page 26 - page 32 page 37 - page 44; claims 1-26	1-99
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 February 2020		Date of mailing of the international search report 21/02/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kling, Isabelle

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/059553

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/016983 A2 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH] ET AL.) 7 February 2008 (2008-02-07)	1,2, 4-11, 13-15, 28-99
Y	page 32 - page 48; claims 1-72 claims 20-27,43-46,66-72; examples 1-26 -----	1-99

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/059553

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016201382 A1	15-12-2016	CA 3027147 A1	15-12-2016
		EP 3307338 A1	18-04-2018
		KR 20180019032 A	22-02-2018
		US 2018186900 A1	05-07-2018
		WO 2016201382 A1	15-12-2016
WO 2009108100 A1	03-09-2009	EP 2254944 A1	01-12-2010
		EP 3456749 A1	20-03-2019
		US 2011008444 A1	13-01-2011
		WO 2009108100 A1	03-09-2009
WO 2008016983 A2	07-02-2008	AR 062178 A1	22-10-2008
		AT 547128 T	15-03-2012
		AU 2007281138 A1	07-02-2008
		BR PI0714655 A2	07-05-2013
		CA 2659369 A1	07-02-2008
		CL 2007002244 A1	04-04-2008
		CN 101594890 A	02-12-2009
		CN 106178085 A	07-12-2016
		CO 6150197 A2	20-04-2010
		DK 2049165 T3	29-05-2012
		EP 2049165 A2	22-04-2009
		EP 2468310 A1	27-06-2012
		EP 3466454 A1	10-04-2019
		ES 2383550 T3	22-06-2012
		ES 2711416 T3	03-05-2019
		HK 1127754 A1	07-12-2012
		JP 5301439 B2	25-09-2013
		JP 2009545405 A	24-12-2009
		JP 2013048936 A	14-03-2013
		KR 20090035620 A	09-04-2009
		MY 154788 A	31-07-2015
		NZ 575077 A	22-12-2011
		PT 2049165 E	25-05-2012
		RU 2009107105 A	10-09-2010
		TW 200824726 A	16-06-2008
		US 2008187591 A1	07-08-2008
		US 2012207813 A1	16-08-2012
		US 2014072614 A1	13-03-2014
		WO 2008016983 A2	07-02-2008
		ZA 200900977 B	30-12-2009

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)

A 6 1 Q 19/00
A 6 1 Q 19/08

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ミトラゴトリ, サミール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 0, レキシントン, タイラー ロード 1 7

(72)発明者 スペングラ, エリック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, コテージ ストリート 2 0

(72)発明者 レビンソン, ダグラス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 0, シャーボーン, レイク ストリート 9 1

(72)発明者 ヴォガス, ダグラス アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, ライス ストリート 9 4, ア
パートメント 1

F ターム (参考)

4C083 AA112 AA122 AB222 AB242 AB332 AB352 AB432 AC022 AC092 AC112
AC122 AC132 AC172 AC212 AC242 AC252 AC302 AC312 AC342 AC352 AC372
AC422 AC442 AC532 AC662 AD041 AD091 AD212 AD242 AD331 AD332 AD352
AD411 AD412 AD492 AD622 AD662 BB21 BB48 CC02 CC04 CC05 CC07
DD01 DD08 DD17 DD21 DD23 DD27 DD32 DD41 EE11 EE12 FF01
FF05