(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107814853 A
(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201711123324.4

(22)申请日 2011.05.04

(30)优先权数据
2703532 2010.05.10 CA

(62)分案原申请数据
201180034053.X 2011.05.04

(71)申请人 伦敦保健科学研究中心股份公司
地址 加拿大安大略省

(72)发明人 伊娃·特利

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭慧 杨思捷

(51)Int.Cl.
C08B 37/00(2006.01)
A61K 8/73(2006.01)
A61Q 19/08(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)
A61K 47/36(2006.01)
A61K 47/24(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 17/18(2006.01)
A61P 17/16(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)

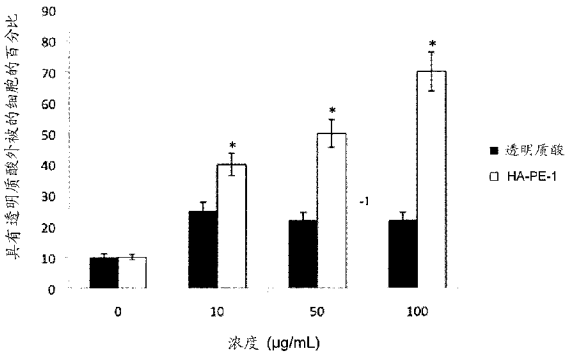
权利要求书2页 说明书31页 附图17页

(54)发明名称

适合用于美容和药物用途的外用透皮糖胺聚糖制剂

(57)摘要

本发明涉及适合用于美容和药物用途的外用透皮糖胺聚糖制剂。本发明涉及外用糖胺聚糖组合物，特别是透明质酸组合物，所述组合物促进修饰的糖胺聚糖穿透皮肤屏障进入皮肤的表皮层和真皮层，从而允许诸如透明质酸的糖胺聚糖的真皮施用，而无需注射。通过它们将透明质酸递送至表皮层和真皮层的能力，本制剂因此适合用于真皮年轻化、增强、透明质酸补充和保护治疗。所述糖胺聚糖组合物也可用作递送装置，以促进美容和药学活性物质(包括药物、多肽、蛋白和类似大小的生物大分子)穿过皮肤屏障的真皮和透皮递送。



CN 107814853 A

1.一种非微粒糖胺聚糖组合物，所述组合物包含通过脂质部分与糖胺聚糖的1-15%的重复二糖单体单元的共价连接而修饰的糖胺聚糖，其中：

所述待修饰的糖胺聚糖是透明质酸、透明质酸衍生物、包含与己糖胺连接的糖醛酸或己糖的重复二糖单元的多糖、或它们的衍生物；

所述待修饰的糖胺聚糖具有在50 kDa至约2,500kDa范围内的分子量；

所述脂质部分包含一种或多种天然存在的或合成地衍生的脂肪酸、甘油脂、磷脂、鞘脂、甾醇脂质、异戊烯醇脂质或它们的衍生物，条件是，所述脂质部分含有在它的极性首基上的官能团，以允许所述脂质与所述糖胺聚糖的共价连接；

且所述被修饰的糖胺聚糖在应用于皮肤屏障或粘膜时能够穿透所述皮肤屏障或粘膜并包被真皮成纤维细胞，

由此，通过所述糖胺聚糖与所述脂质部分的反应，形成所述被修饰的糖胺聚糖。

2.根据权利要求1所述的非微粒糖胺聚糖组合物，其中通过脂质部分与糖胺聚糖的2-6%的重复二糖单体单元的共价连接，修饰所述糖胺聚糖。

3.根据权利要求1所述的非微粒糖胺聚糖组合物，其中所述脂质部分含有在它的极性首基上的氨基，且通过与糖胺聚糖上的羧酸基团形成酰胺键而与糖胺聚糖共价地结合。

4.根据权利要求1-3中的任一项所述的非微粒糖胺聚糖组合物，其中所述糖胺聚糖具有在350 kDa至1,500 kDa范围内的分子量。

5.根据权利要求1-3中的任一项所述的非微粒糖胺聚糖组合物，其中所述待修饰的糖胺聚糖是透明质酸。

6.根据权利要求1-3中的任一项所述的非微粒糖胺聚糖组合物，其中所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺或磷脂酰丝氨酸。

7.一种适合施用于皮肤或粘膜的制剂，所述制剂包含与一种或多种美容或药学可接受的赋形剂或载体相混合的权利要求1-3中的任一项所述的非微粒糖胺聚糖组合物。

8.根据权利要求7所述的制剂，所述制剂另外包含由所述的非微粒糖胺聚糖组合物运输穿过皮肤屏障或粘膜的一种或多种成分。

9.在权利要求1-3中的任一项中描述的非微粒糖胺聚糖组合物在补充皮肤中天然存在的糖胺聚糖水平中的非治疗性用途，或用作美容活性成分的真皮或透皮递送媒介物的非治疗性用途。

10.在权利要求1-3中的任一项中描述的非微粒糖胺聚糖组合物在制备用于逆转皮肤上的瘢痕形成外观、减轻与光化性角化病有关的炎症、促进血管生成、再生性创伤修复、增强未受伤的但是受损的皮肤的外观、减轻皮肤创伤效应、或者减轻瘢痕形成、牵拉痕、烧伤收缩、纤维化病变、酒渣鼻、皮炎或皮肤萎缩的外观的药物中的用途。

11.一种用于生产在权利要求1-3中的任一项中描述的非微粒糖胺聚糖组合物的方法，所述方法包括下述步骤：

用活化剂处理所述待修饰的糖胺聚糖，以促进所述糖胺聚糖与脂质部分的共价连接；

混合所述被活化的糖胺聚糖和脂质部分；和

使所述脂质部分与所述被活化的糖胺聚糖反应，以共价地连接所述脂质部分和所述糖胺聚糖，

其中所述活化剂是反应中的限制试剂，所述脂质部分在反应中相对于使用的活化剂的

量摩尔过量并且所述活化剂以足以促进所述脂质部分与所述糖胺聚糖的1-15%的二糖单体单元的共价连接的量加入。

适合用于美容和药物用途的外用透皮糖胺聚糖制剂

[0001] 本申请是申请日为2011年5月4日、申请号为201180034053.X、发明名称为“适合用于美容和药物用途的外用透皮糖胺聚糖制剂”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及外用(topical)糖胺聚糖制剂,所述制剂促进糖胺聚糖(其通过脂质部分与1-10%的二糖单体单元的共价连接而修饰)穿透皮肤屏障进入皮肤的表皮层和真皮层中,由此无需注射地实现糖胺聚糖的真皮施用。具体地,通过它们的将透明质酸(hyaluronan)递送至表皮层和真皮层的能力(所述透明质酸在皮肤中保留比外部地递送的透明质酸更长时间段),本制剂因此适合用于真皮年轻化、增强、透明质酸补充和保护疗法。所述组合物也可以用作治疗化合物(包括多肽、蛋白和其它类似大小的生物大分子)的递送装置,从而促进它们穿过皮肤屏障。也提供了一种产生所述组合物的方法,其中通过使用活化剂作为限制试剂来控制脂质部分与糖胺聚糖的共价连接程度。

背景技术

[0003] 面部老化过程发生在一系列可预测的事件中,表现为皮肤体积和弹性(elastic tone)的损失。皮肤体积损失(其源自许多因素,包括胶原分解)导致皮肤的皮下脂肪层、基础肌肉层和筋膜层的萎缩,促进鼻唇沟、下巴线清晰度损失和皮肤粗化。皮肤弹性损失导致松弛的、下垂的面部组织。为了抵抗这些效应,年轻化手术尝试修正体积损失和组织品质,以导致处理过的皮肤的天然外观。这些手术可能涉及组织填充剂的使用(例如,胶原注射)、或由“提升”外科手术提供的紧绷以及其它选择,它们单独使用或联合使用。

[0004] 许多暂时性的组织填充剂(诸如胶原、透明质酸和羟磷灰石)目前是可得到的,但是,这些填充剂通过一系列注射来施用,且仅提供暂时效应,在胶原和透明质酸的情况下,通常不能延续超过12个月。更长期的解决方案诸如羟磷灰石(其可以持续2-5年)也包括脂肪自身移植术(持续1-3年),其使用皮下脂肪细胞来修正面部体积损失和下垂,以恢复面部皮肤的更年轻的外观[1,2,3]。注射处理的后效应(其可以持续多达1周)可以包括:肿胀、发红、疼痛、伤痕和压痛。另外,所述处理需要通过多次注射来熟练地应用,并带来在注射部位处感染的风险。

[0005] 在提供皮肤的年轻外观中,角质形成细胞可能是最重要的细胞类型。因而,它们是维持皮肤水合所必需的,且对环境因素(诸如紫外线辐射)的老化效应特别敏感,因为它们比其它皮肤细胞类型更经常地暴露于这些因素。此外,新近的证据提示,遗传上确定的角质形成细胞因子也可以促进固有的老化过程。因为角质形成细胞产生影响成纤维细胞和其它真皮细胞的健康/功能的旁分泌因子,因此,对角质形成细胞功能有害的因子对真皮细胞功能也是有害的[6]。

[0006] 透明质酸(也称作透明质酸盐和透明质酸)是一种大的、带负电荷的糖胺聚糖多糖,其普遍存在于体内,且以特别大的量存在于皮肤中[4]。真皮和表皮皮肤层都富含透明质酸,所述透明质酸作为包围的细胞外基质(其也含有胶原和其它蛋白)的一部分存在,在所

述细胞外基质处，它包围细胞(例如，表皮的角质形成细胞和真皮的成纤维细胞)[5]。尽管年轻皮肤在角质形成细胞层和真皮层中都富含细胞外周透明质酸，在老化皮肤的这2个层中的量减少，其中角质形成细胞层中的透明质酸损失比在真皮层中的损失远远更显著[6]。

[0007] 在年轻皮肤中，透明质酸有效地包围表皮中的角质形成细胞和真皮中的成纤维细胞，呈胶冻样被膜(细胞外被)，其为细胞提供适当的生长因子和营养因子，所述因子促进年轻外观皮肤特有的胶原和弹性蛋白产生。除了透明质酸以外，细胞被膜或外被的主要组分也发现是细胞外蛋白和其它物质，诸如胶原、蛋白聚糖(PG)诸如TSG-6和其它糖胺聚糖。透明质酸的三维结构是可以缠绕自身的浅螺旋(高分子量形式可检测为长直链)，从而提供在细胞周围装配基质的理想模板。这些被膜或外被通常通过透明质酸与细胞受体(例如，CD44、RHAMM、LYVE 1和其它受体)的结合而保持在细胞周围。随着皮肤老化，真皮成纤维细胞和角质形成细胞的维持它们的透明质酸被膜的能力减少，从而导致老化皮肤的脱水的和下垂的外观[5,7]。另外，当皮肤受到创伤(例如，通过暴露于过量的紫外线辐射(晒伤))时，真皮中细胞的透明质酸产生减少，从而导致透明质酸降解的增加和透明质酸降解产物在皮肤中的增加的存在。

[0008] 透明质酸被膜含有：水合和保护细胞的结构基质蛋白，以及维持细胞最佳代谢和分化状态所必需的营养物、细胞因子、激素和生长因子。提供结构基质的能力是透明质酸用于促进年轻皮肤的用途的一个重要基础因素。第二个因素是透明质酸的粘弹性性质，该性质影响营养物从血管供给的扩散和皮肤弹性；这些效应共同地提供年轻皮肤特有的纹理和光滑。第三个因素是，细胞外周的透明质酸提供针对活性氧(ROS)的靶标的能力，所述活性氧可以在暴露于UVA/B辐射以后生成，可以攻击和片段化透明质酸，进而保护其它细胞因子免于ROS诱发的损伤。最后一个因素与透明质酸对角质形成细胞和成纤维细胞的直接生物学效应有关。透明质酸促进角质形成细胞的增殖和分化。例如，增强角质形成细胞分化的因子(诸如视黄酸)也增加细胞外周的透明质酸外被。此外，在体外或在体内添加至角质形成细胞的透明质酸促进角质形成细胞层的厚度，并增强角质形成细胞分化，如通过CD44和角蛋白表达检测[5]。透明质酸也通过阻断转分化成肌成纤维细胞而影响成纤维细胞分化，所述肌成纤维细胞是产生高水平胶原I的真皮细胞，且具有固有的收缩性质，这二者都促进皱纹形成。

[0009] 细胞的透明质酸外被随着时间而降解(片段化)，并逐渐被细胞吸收，作为老化过程的一部分。该降解部分地归因于：随着时间产生的氧自由基的积累，和改变遗传调节的发育程序(例如，老化)，所述改变促进透明质酸酶的释放，所述透明质酸酶分解或片段化透明质酸外被。形成的片段刺激细胞的吸收机制，从而导致细胞溶菌酶对透明质酸外被的分解和破坏。除了从老化皮肤(特别是从角质形成细胞周围)逐渐减少以外，还已经发现，由于暴露于UVA/UVB辐射、类固醇使用或炎症，透明质酸从年轻的皱纹皮肤区域中减少[5,6,8,9]。

[0010] 透明质酸受体CD44在皮肤中的角质形成细胞和其它细胞上组成性地表达，且被认为是称作“细胞外被”的层中的细胞周围的透明质酸保留所必需的，和皮肤中的适当的透明质酸代谢所必需的[5,10,11,12]。在老化过程中，和在暴露于老化因素诸如紫外线辐射或造成皮肤萎缩的疾病/因素之后，皮肤损失CD44受体[5,9]。相比而言，在暴露于UVA/B和其它损伤因素以后，RHAMM(即另一种透明质酸受体，其在正常皮肤中通常不高度表达)的表达增加。认为RHAMM促进CD44内化/代谢透明质酸的能力。在包围真皮细胞的透明质酸细胞外被的产生和

保留中，不完整的细胞外透明质酸结合蛋白诸如TSG-6也是重要的[13]。

[0011] 尽管已知透明质酸在年轻皮肤性质的恢复中具有用作组织填充剂的理想性质，唯一目前可利用的产品(其在皮肤屏障下面发挥它们的作用，而不是在皮肤表面上)是交联形式的透明质酸，它们被注射以使面部皱纹光滑和增加面部区域诸如唇的体积。尽管透明质酸的交联确实增强它在注射部位处的保留，这些注射不是持久性的，如果要保持年轻效果，必须定期(6-12个月)重复。但是，认为透明质酸与自身的交联减少它的结合细胞-表面受体蛋白的能力，该能力是透明质酸外被包围细胞所必需的一种关键性质。遇到的另一个困难包括：难以在皮肤下面均匀地局部化或“光滑”注射的透明质酸。因而，尽管可以使用可注射的透明质酸作为有效的暂时填充剂，不能以与天然透明质酸相同的方式起作用来提供细胞包被效应。尽管可以想象交联的可注射的透明质酸填充剂的降解来充当透明质酸来源，没有期望透明质酸的保留，这是由于已知的真皮细胞表面上的透明质酸受体的减少和在皮肤内的透明质酸降解的高速率。

[0012] 由于含有交联透明质酸的注射填充剂仅施用在皱纹部位或鼻唇沟处，这些处理不通过补充邻近区域中减少的透明质酸水平来“年轻化”皮肤；相反，注射处理通过填充缺乏区来提供年轻化外观。结果，使用可注射的真皮填充剂的处理既不帮助预防或延迟邻近的未处理区域中的新皱纹出现，也不解决透明质酸缺乏和由此导致的皮肤水合减少的根本问题。

[0013] 由于它在皮肤中的天然存在和它在老化、暴露于紫外线辐射(晒伤和光老化)和其它皮肤创伤过程中的减少，除了它用作可注射的填充剂以外，透明质酸也被包括在许多皮肤产品中。外用的透明质酸必须穿过覆盖角质形成细胞外层的神经酰胺/角蛋白疏水层才能进入。但是，由于透明质酸是一种聚阴离子，不预期它有效地穿过皮肤的角质形成细胞层。因此，外用透明质酸要么保持表面处理(例如，传统的含有透明质酸的皮肤乳膏)，要么如果需要明显渗透入皮肤中的话，必须注射(例如，在注射交联的透明质酸的情况下，用于处理皱纹)。

[0014] 在本领域中已经报道，某些分子量的透明质酸能够在某种程度上穿过皮肤屏障。Brown等人[14]指出，具有250-400 kDa的分子量的透明质酸(用已知的穿透促进剂聚乙二醇和苯甲醇配制)穿过皮肤屏障。尽管一些其它的报道已经指出，据称含有40-400 kDa透明质酸的不确定级分可以穿过小鼠和人皮肤[5]，还已经指出，>400 kDa的天然透明质酸当外用时不穿过皮肤[5,15]。此外，尽管Brown等人能够证实，透明质酸能够穿过皮肤屏障，还清楚的是，穿透皮肤的透明质酸的比例低，并且透明质酸快速地传入血流中以及也表现出快速的降解。Kaya等人[5]还已经证实，外用的透明质酸较差地保留在表皮层中，在真皮层中的保留是短暂的，应用的透明质酸被真皮细胞和角质形成细胞吸收。因此，仅仅使透明质酸能够穿过皮肤屏障不一定提供有用效果；对于许多应用而言，还必须使透明质酸具有延长的停留时间才能观察到效果。这通过Schultz等人(US 4,808,576)使用透皮载体来通过外部施用递送透明质酸而强调。尽管这样的应用成功地促进透明质酸穿过皮肤屏障，透明质酸不保留在皮肤内，而是继续到达下面的关节和腱。另外，对透皮载体(其中最有效的是DMSO)的需求通常与长时间使用不相容。

[0015] Schwach-Abdellaoui和Malle(WO 2008/000260)描述了具有补水和抗皱纹性质的组合物，所述组合物包含2种分子量级分的透明质酸。第一种低分子量级分(50 kDa)据称能

够穿过皮肤屏障，而第二种较高分子量级分(300 kDa)据称在降低皮肤粗糙度中通过优先积累在皮肤表面处提供它的更显著的作用。透明质酸的这种用途(常见于美容制剂中)依赖于透明质酸作为短效外用填充剂的应用，因为当洗脸时除去了透明质酸的水溶性质。如关于Brown等人所指出的，能够穿过皮肤屏障的透明质酸的比例低，且能够穿过皮肤屏障的透明质酸在皮肤本身内具有低保留率。结果，不是依赖于外用的透明质酸，目前的生物年轻化操作诸如美塑疗法(mesotherapy)[16]利用注射的、未交联的透明质酸，无论单独的还是与其它活性成分一起。

[0016] 因而，本领域仍然需要开发无需注射地递送较高分子量透明质酸级分穿过皮肤屏障的方法。预期较高分子量透明质酸级分(例如，>100 kDa)是更有生物弹性的，且能够更好地模仿在皮肤中天然地存在的较高分子量透明质酸。

[0017] 最近已经显示，透明质酸片段对创伤修复和正常皮肤的生理学具有治疗效果。尽管这些片段比较高分子量透明质酸更好地穿透皮肤，它们不保留在皮肤的细胞外隔室中[5]。

[0018] 迄今为止，已经存在透明质酸和其它糖胺聚糖的许多实例，它们为了多种目的而通过脂质的连接进行修饰。Sakurai等人(US 5,464,942)描述了脂质化的糖胺聚糖(包括透明质酸)的制备，其中将单个脂质侧链添加至糖胺聚糖的末端位置或单个随机的内部位置。据称这些组合物能够抑制癌细胞向血管内皮细胞和它们的细胞外基质的附着。

[0019] Yerushalmi等人(WO 2006/050246)描述了脂质化的糖胺聚糖(包括透明质酸)微粒载体的制备，所述载体用于水溶性差的药物的靶向药物递送。在脂质化以后，所述修饰的糖胺聚糖据称自装配，从而形成球，其中所述糖胺聚糖的亲水部分是在外表面上，疏水的脂质部分位于被遮蔽的内表面内。Margarlit和Peer(WO 03/015755)也已经描述了类似的自装配的纳米球和微球，其中教导，取决于与透明质酸结合的磷脂的量，可以形成纳米颗粒(约20%的连接部位被占据)或微粒(约33% 的连接部位被占据)。

[0020] Scott(EP 0295 092 B1)描述了用于外用的、包含7-50个单糖单元的透明质酸片段的制剂，他强调了使透明质酸穿过皮肤的困难。通过向所述制剂中加入活性促进剂、使用从磷脂酰胆碱形成的脂质体作为递送媒介物、或使用用电池操作的离子电渗疗法贴剂，帮助穿过皮肤屏障的穿透。但是，如选择的透明质酸范围(由于递送透明质酸穿过皮肤屏障的困难，优选7-25个单糖单元(大约1,300-4,700 Da))所指出的，这些制剂不适合使较高分子量透明质酸穿过皮肤屏障。

[0021] Della Valle和Romeo(US 4,851,521)描述了用于多种用途的透明质酸酯的制备，所述用途包括美容和作为组织填充剂，以及用于膜和线的制备。尽管指示了多种用途，其中没有教导，修饰的透明质酸组合物能够运输透明质酸穿过皮肤屏障；相反，指示了皮下和皮内施用。

[0022] 通常，当分子量超过700 Da时，物质穿过上皮屏障的扩散急剧下降。尽管Pinsky(WO 2009/086504)描述了使用脂质体将低分子量胶原片段(8.5 kDa)和任选的透明质酸递送进皮肤中的皮肤护理组合物，仍然需要能够真皮递送大分子量胶原和弹性蛋白、以及治疗有用的肽和蛋白的方法，特别当这些方法不需要使用和制备脂质体时。Antosava等人最近综述了肽和蛋白的上皮递送技术，包括透皮递送[7]，他们指出，尽管由于它的高生物利用度、长作用持续时间和无痛应用，透皮递送是一项吸引人的开发方案，它遇到了下述阻碍：皮肤屏障在阻止穿透中的有效性，阻止长期应用的局部刺激。

[0023] 尽管有报道描述了基于磷脂的脂质体用于跨皮肤屏障转移透明质酸的用途，许多问题与它们的应用有关，最值得注意的是，贮存时缺乏稳定性。另外，在用于美容制剂中所需的规模上制备和纯化基于磷脂的脂质体是昂贵的。

[0024] 尽管含有透明质酸的外用美容用组合物的专利文献中的众多报道宣称促进透明质酸穿过皮肤屏障进入表皮层和真皮层中，仍然没有商购可得的实现这些承诺的美容产品。具体地，目前没有使用允许透明质酸保留在皮肤内的外用美容制剂将足够量的较高分子量透明质酸(例如，>250,000 Da)有效地递送至皮肤的表皮层和真皮层的可行方法。相反，就美容目的而言，仍然需要开发与可注射的透明质酸填充剂有关的新填充剂产品，诸如Hyal-System™，或透明质酸作为暂时停留在皮肤表面上的表面填充剂的用途。

[0025] 因此，本发明的一个目的是，提供这样的组合物：所述组合物允许修饰的透明质酸穿过皮肤屏障到达皮肤的表皮层和真皮层，无需使用注射剂、脂质体或其它穿透促进剂。

[0026] 本发明的另一个目的是，提供修饰的透明质酸组合物，其适合用于真皮增强、透明质酸补充和/或针对皮肤老化迹象和各种形式的皮肤萎缩的保护处理。

[0027] 本发明的另一个目的是，提供修饰的透明质酸组合物，其适合用于减少瘢痕形成。

[0028] 本发明的另一个目的是，提供修饰的透明质酸，其可以增加真皮细胞的细胞外外被中的透明质酸保留程度，尽管减少或缺失透明质酸受体诸如CD44和RHAMM，所述受体被认为是透明质酸保留所必需的，且已知在老化的和损伤的皮肤中减少。

[0029] 本发明的另一个目的是，提供修饰的透明质酸组合物，其可以用作外用载体来递送美容和药学活性的治疗物质穿过皮肤屏障。

[0030] 本发明的另一个目的是，提供修饰的透明质酸组合物，其可以用于外部地递送蛋白、多肽和其它大型生物大分子(分子量为700 Da至约400-500 kDa)穿过皮肤屏障。

[0031] 本发明的另一个目的是，提供能够穿透皮肤屏障的修饰的糖胺聚糖组合物，其用于：补充皮肤内的糖胺聚糖水平，充当透明质酸模拟物，递送美容和治疗活性物质，和递送多肽、蛋白和其它大生物分子。

[0032] 本发明的另一个目的是，提供产生上述的修饰的糖胺聚糖组合物的方法，其中使用活化剂作为限制试剂来控制与糖胺聚糖共价地结合的脂质的量。

[0033] 从下述发明内容、本发明的讨论及其实施方案和实施例中可以实现本发明的进一步和其它目的。

发明内容

[0034] 在本发明中，提供了这样的组合物：其能够外部递送修饰的透明质酸穿过皮肤屏障，由此提供可注射的基于透明质酸的填充剂的替代递送模式。通过促进真皮递送，本发明的组合物允许遍及减少的施用该组合物的皮肤面积来补充透明质酸，由此为皮肤提供年轻化效果，其一种后果是皱纹外观的减少，且无需注射。

[0035] 此外，本发明提供了制造、恢复或补充与年轻细胞有关的、细胞周围微环境(细胞外被)的方法，由此增强老化的皮肤的年轻外观，或修复遭受创伤的皮肤的损伤。

[0036] 本发明也提供了这样的组合物：其包含通过两亲脂质部分(包括磷脂、甘油磷脂、糖脂、类固醇、鞘脂、鞘糖脂和脂肪酸)与约1%至约15%的二糖单体单元的共价键形成而修饰的透明质酸和其它糖胺聚糖，从而提供实现修饰的糖胺聚糖的真皮穿透的组合物，以及用

于这样的修饰的方法。

[0037] 本发明也提供了修饰的透明质酸穿过皮肤屏障的透过，这通过包含与透明质酸共价连接的磷脂的组合物来实现。

[0038] 本发明也提供了一种能够穿过皮肤屏障的无毒的修饰的透明质酸，其适合用于真皮增强、透明质酸补充和/或保护(例如老化的或萎缩的皮肤的保湿层)处理。

[0039] 本发明也提供了修饰的透明质酸的组合物，所述组合物可用于：真皮和透皮递送治疗物质(例如，前列腺素)，所述治疗物质抑制炎症、提高皮肤的光滑和柔软性、和加速创伤修复；递送pepducins(含有具有脂质尾的氨基酸的治疗物质)，所述pepducins可以调节细胞生长以及发挥它们的其它功能；透明质酸酶抑制剂，其将辅助减少皮肤中的透明质酸的分解；RHAMM抑制剂，其已经被证实具有抗皱纹效果；和其它肽、肽模拟物和蛋白，诸如肉毒杆菌毒素，例如，A型(BOTOX™)、胶原、弹性蛋白或透明质酸合酶。

[0040] 本发明也提供了一种方法，所述方法用于增加皮肤内的透明质酸水平，由此在表皮细胞和真皮细胞周围形成更“年轻的”微环境，并导致细胞功能的控制(例如，真皮细胞的胶原和弹性蛋白产生；阻断真皮成纤维细胞转分化成肌成纤维细胞，所述肌成纤维细胞产生疤痕型胶原I、收缩真皮且被认为促进皱纹形成；和角质形成细胞活化以产生促进真皮细胞功能的细胞因子和生长因子)、角质形成细胞的多层化/增殖、抗氧自由基的保护、和水的保留，它们共同地增强皮肤的年轻外观。

[0041] 本发明也提供了包含修饰的透明质酸的无毒组合物，所述组合物适合外部地施用于皮肤以减少下述外观：瘢痕形成、牵拉痕、烧伤收缩、纤维化病变、酒渣鼻、皮炎和皮肤萎缩，它们由暴露于UVA/B辐射、老化、化学疗法、辐射疗法或类固醇使用导致。

[0042] 本发明也提供了包含修饰的透明质酸片段的无毒组合物，所述组合物适合外部地施用于皮肤，其刺激先天性免疫系统以保护皮肤免于细菌和病毒感染，且适用于促进角质形成细胞对大创伤(例如烧伤)的快速恢复。

[0043] 本发明也提供了一种无毒的修饰的透明质酸组合物，所述组合物能够跨过表皮屏障，并因而适合用于增强再生型创伤修复，且适合用于通过促进血管生成而增强未受伤的、但是受损的皮肤(例如吸烟者的皮肤)的外观。

[0044] 本发明也提供了这样的组合物：所述组合物使其它修饰的糖胺聚糖(诸如硫酸皮肤素、硫酸角蛋白和硫酸软骨素)能够穿过，所述修饰的糖胺聚糖处于它们的多糖或蛋白聚糖形式，如上面关于透明质酸所述。应当理解，要使用的糖胺聚糖的选择将取决于要实现的处理。

[0045] 本发明也提供了这样的组合物：所述组合物包含允许多肽(诸如胶原和弹性蛋白)穿过真皮的修饰的透明质酸或其它糖胺聚糖，其用于美容用途中，用于减少皱纹出现。

[0046] 在本发明的第一方面，提供了一种糖胺聚糖组合物，所述组合物包含通过脂质部分与糖胺聚糖的约1-15%的重复二糖单体单元的共价连接而修饰的糖胺聚糖，其中：

所述待修饰的糖胺聚糖是透明质酸、透明质酸衍生物、包含与己糖胺连接的糖醛酸或己糖的重复二糖单元的多糖、或它们的衍生物；

所述待修饰的糖胺聚糖具有在约2 kDa至约2,500 kDa范围内的分子量；

所述脂质部分包含一种或多种天然存在的或合成地衍生的脂肪酸、甘油脂、磷脂、鞘脂、甾醇脂质、异戊烯醇脂质或它们的衍生物，条件是，所述脂质部分含有在它的极性首基

上的官能团，以允许所述脂质与所述糖胺聚糖的共价连接；且

所述修饰的糖胺聚糖在应用于皮肤屏障或粘膜时能够穿透所述皮肤屏障或粘膜，

由此，通过所述糖胺聚糖与所述脂质部分的反应，形成所述修饰的糖胺聚糖。

[0047] 在该方面，优选地，通过脂质部分与糖胺聚糖的约1-12% 的重复二糖单体单元；更优选地，与约1-10% 的重复二糖单体单元；再更优选地，与约1-7.5% 的重复二糖单体单元；最优选地，与2-6% 的重复二糖单体单元的共价连接，修饰所述糖胺聚糖。本发明的示例组合物包括这样的组合物：其中约5.5%或约6% 的重复二糖单体单元已经被修饰。优选地，所述待修饰的糖胺聚糖具有在下述范围内的分子量：约50 kDa至约2,500 kDa；更优选约100 kDa至约2,000 kDa；甚至更优选约350 kDa至约1,500 kDa；和最优选约500 kDa至约1,500 kDa。优选地，所述待修饰的糖胺聚糖是透明质酸或透明质酸衍生物；更优选地，所述糖胺聚糖是透明质酸。优选地，所述脂质部分含有在它的极性首基上的氨基，且通过与糖胺聚糖上的羧酸基团形成酰胺键而与糖胺聚糖共价地结合；更优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺或磷脂酰丝氨酸；最优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺。优选地，所述修饰的糖胺聚糖能够穿透皮肤屏障。更优选地，当真皮地递送时，所述修饰的糖胺聚糖在皮肤内具有比未修饰的糖胺聚糖更长的停留时间；最优选地，该糖胺聚糖是透明质酸。

[0048] 在本发明的第二方面，提供了适合施用于皮肤或粘膜的制剂，所述制剂包含与一种或多种美容或药学可接受的赋形剂或载体相混合的糖胺聚糖组合物，其中所述糖胺聚糖组合物包含：

通过脂质部分与糖胺聚糖的1-15% 的重复二糖单元单体单元的共价连接而修饰的糖胺聚糖；

所述糖胺聚糖包括透明质酸、透明质酸衍生物、包含与己糖胺连接的糖醛酸或己糖的重复二糖单元的多糖、或它们的衍生物；

所述待修饰的糖胺聚糖具有在约2 kDa至约2,500 kDa范围内的分子量；

所述脂质部分包含一种或多种天然存在的或合成地衍生的脂肪酸、甘油脂、磷脂、鞘脂、甾醇脂质、异戊烯醇脂质或它们的衍生物，条件是，所述脂质部分含有在它的极性首基上的官能团，以允许所述脂质与所述糖胺聚糖的共价连接；且

所述修饰的糖胺聚糖在应用于皮肤屏障或粘膜时能够穿透所述皮肤屏障或粘膜，

由此，通过所述糖胺聚糖与所述脂质部分的反应，形成所述待修饰的糖胺聚糖。

[0049] 在该方面，优选地，通过脂质部分与糖胺聚糖的约1-12% 的重复二糖单体单元；更优选地，与约1-10% 的重复二糖单体单元；再更优选地，与约1-7.5% 的重复二糖单体单元；再更优选地，与约2-6% 的重复二糖单体单元的共价连接，修饰所述糖胺聚糖。本发明的示例修饰包括这样的修饰：其中糖胺聚糖的约5.5%或约6% 的重复二糖单体单元已经被修饰。优选地，所述待修饰的糖胺聚糖具有在下述范围内的分子量：约50 kDa至约2,500 kDa；更优选约100 kDa至约2,000 kDa；甚至更优选约350 kDa至约1,500 kDa；和最优选约500 kDa至约1,500 kDa。优选地，所述待修饰的糖胺聚糖是透明质酸或透明质酸衍生物；更优选地，所述糖胺聚糖是透明质酸。优选地，所述脂质部分含有在它的极性首基上的氨基，且通过与糖胺聚糖上的羧酸基团形成酰胺键而与糖胺聚糖共价地结合；更优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺或磷脂酰丝氨酸；最优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷

脂酰乙醇胺。优选地，所述修饰的糖胺聚糖能够穿透皮肤屏障。更优选地，当真皮地递送时，所述修饰的糖胺聚糖在皮肤内具有比未修饰的糖胺聚糖更长的停留时间。

[0050] 本发明的该方面的制剂可以另外包含一种或多种成分，所述成分被糖胺聚糖组合物运输穿过皮肤屏障或粘膜；优选地穿过皮肤屏障。在本发明的该方面内可以考虑的其它一种或多种成分包括，抗氧化剂、维生素、精油、紫外线阻断剂或已知其施用为皮肤的健康或外观提供有益效果的其它营养物。

[0051] 在本发明的该方面内可以考虑的其它一种或多种成分还包括药物；优选适合用于治疗炎症(诸如前列腺素)、皮肤癌或皮肤病症的治疗剂，所述治疗剂穿过皮肤屏障来递送。

[0052] 在本发明的该方面内可以考虑的其它一种或多种成分还包括蛋白、肽、肽模拟物、pepducins、多核苷酸或其它生物分子；优选地，这些一种或多种成分具有700 Da至500 kDa的分子量。穿过皮肤屏障递送的其它成分可以包括胶原或弹性蛋白。另外，所述一种或多种其它成分可以是蛋白；优选穿过皮肤屏障递送的肉毒杆菌毒素；更优选肉毒杆菌毒素A型。穿过皮肤屏障递送的另一种优选蛋白是透明质酸合酶。所述其它一种或多种成分还可以包括pepducin。

[0053] 在本发明的该方面内可以考虑的其它一种或多种成分还包括穿过皮肤屏障递送的透明质酸酶抑制剂或穿过皮肤屏障递送的RHAMM抑制剂。

[0054] 在本发明的第三方面，提供了上述第一方面的糖胺聚糖组合物在补充皮肤中天然存在的糖胺聚糖水平中的用途；优选地，该糖胺聚糖是透明质酸。这方面包括所述组合物的下述用途：减少皱纹出现，提供增加的皮肤水合水平，减少皮肤老化迹象，反转皮肤萎缩的外观或预防皮肤萎缩，反转皮肤上的瘢痕形成外观或预防皮肤上的瘢痕形成，减轻与光化性角化病(actinic keratinoses)有关的炎症，促进血管生成(例如，在再生性创伤修复中，或在增强未受伤的、但是受损的皮肤的外观中)，减轻皮肤创伤效应。可以考虑的皮肤创伤效应包括：瘢痕形成、牵拉痕、烧伤收缩、纤维化病变、酒渣鼻、皮炎或皮肤萎缩的外观的减轻。这些创伤的原因包括紫外线辐射、烧伤、药物外用和类固醇的使用的效应。

[0055] 在本发明的第四方面，提供了上述第一方面的糖胺聚糖组合物作为美容和治疗活性成分的真皮或透皮递送媒介物的用途。根据本发明的该方面可以递送的美容和治疗活性成分包括：透明质酸酶抑制剂、RHAMM抑制剂、胶原或弹性蛋白。根据本发明的该方面可以递送的美容和治疗活性成分也包括：白、肽、肽模拟物、pepducins、多核苷酸或其它生物分子；优选地用于递送蛋白。在可以递送的蛋白类型中，优选的是，肉毒杆菌毒素(优选地肉毒杆菌毒素A型)和透明质酸合酶。根据本发明的该方面可以递送的美容和治疗活性成分也包括药物，诸如抗炎剂(例如，前列腺素)。优选的是药物的真皮递送。在真皮递送的优选用途中，包括这样的药物的递送：所述药物可用于治疗皮肤炎症、皮肤癌、皮肤变态反应或其它皮肤病症；最优选地用于治疗皮肤癌。

[0056] 在本发明的第五方面，提供了一种用于制备本发明的上述第一方面的糖胺聚糖组合物的方法，所述方法包括下述步骤：

用活化剂处理所述待修饰的糖胺聚糖，以促进所述糖胺聚糖与脂质部分的共价连接；

混合所述被活化的糖胺聚糖和脂质部分；和

使所述脂质部分与所述被活化的糖胺聚糖反应，以共价地连接所述脂质部分和所述糖胺聚糖，

其中所述活化剂是反应中的限制试剂，并以足以促进所述脂质部分与所述糖胺聚糖的约1至约15%的二糖单体单元的共价连接的量加入。

[0057] 在该方面，优选地，所述活化剂以足以促进所述脂质部分与所述糖胺聚糖的约1-12%的二糖单体单元；更优选地，与约1-10%的二糖单体单元；再更优选地，与约1-7.5%的二糖单体单元；最优选地，与2-6%的二糖单体单元的共价连接的量加入。本发明的示例方法包括这样的方法：其中约5.5%或约6% 的重复二糖单体单元已经被修饰。

[0058] 根据本发明的该方面，优选地，要形成的共价连接是，糖胺聚糖的羧酸基团和含有在极性首基上的胺官能团的脂质部分之间的酰胺键。优选地，所述连接剂是碳二亚胺；更优选地，所述碳二亚胺是1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺。

[0059] 根据本发明的该方面，优选的待修饰的糖胺聚糖是透明质酸。

[0060] 根据本发明的该方面，优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸；更优选地，所述脂质部分包含一种或多种磷脂酰乙醇胺。

[0061] 因而，在一个方面，在本申请中包括促进大透明质酸与大(>10kDa)蛋白一起穿透进入皮肤的发明。

[0062] 不受任何作用理论的约束，发明人认为，本文所述的透明质酸-磷脂制剂以独立于受体的方式促进皮肤周围的透明质酸包被的形成，并阻止脂质体/纳米颗粒形成。作为它向细胞膜中直接整合和它的非微粒性质(例如不是脂质体或纳米颗粒)的结果，它逃避细胞的内吞或胞饮吸收的检测/促进，并因此逃避它的快速破坏。该逃避导致在皮肤内作为完整的透明质酸-磷脂的停留时间的增加。

附图说明

[0063] 下述图图解了本发明的各个方面和优选的和替代性的实施方案。

[0064] 图1．人真皮成纤维细胞的显微照片图像，其解释了与未修饰的透明质酸和PBS对照相比，施用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)以后，透明质酸细胞外被的增加。在每个图像中，用箭头指示代表性的透明质酸细胞外被。

[0065] 图2．该图解释了与仅用透明质酸处理的成纤维细胞和未处理的细胞相比，本发明的修饰的透明质酸组合物(HA-PE-1)对具有细胞外被的人成纤维细胞的百分比的影响。

[0066] 图3．该图解释了与用未修饰的透明质酸处理的细胞相比，本发明的修饰的透明质酸组合物(HA-PE-1)对透明质酸细胞外被的大小的影响。

[0067] 图4．该图解释了工程化成不具有透明质酸受体(RHAMM-/-、CD44-/-或RHAMM-/-:CD44-/-)的小鼠胚胎成纤维细胞的数目的差异，所述细胞在用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)、未修饰的透明质酸和盐水溶液(对照)处理以后，具有透明质酸外被。得自处理过的成纤维细胞的代表性显微照片图像如图5所示。

[0068] 图5．工程化成不具有透明质酸受体(RHAMM-/-、CD44-/-或RHAMM-/-:CD44-/-)的小鼠胚胎成纤维细胞的代表性显微照片图像，所述细胞在用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)、未修饰的透明质酸和盐水溶液(对照)处理以后，具有透明质酸外被。

[0069] 图6．用SKL过氧化氢酶、透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)以及SKL过氧化氢酶和HA-PE-1的组合处理过的人成纤维细胞的显微照片，其证实，本发明的修饰的透明

质酸组合物在联合使用时增强SKL过氧化氢酶的效果。

[0070] 图7．从用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)处理4天的小鼠得到的皮肤的显微照片图像，其解释了本发明的组合物在外用以后穿透皮肤屏障的能力。图像71(HA-PE-1)和73(对照)解释了在20倍放大率时的皮肤层，其中用“[”表示角质形成细胞层。图像72(处理)和74(对照)解释了在40倍放大率时的皮肤层，其中用箭头突显代表性的角质形成细胞。

[0071] 图8．该图量化了在处理4天以后，含有本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)的乳膏穿透小鼠皮肤屏障并保留在角质形成细胞层中的能力。该图量化了图7所示的显微照片图像。

[0072] 图9．所述显微照片图像对比了使用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)、与卵磷脂混合的透明质酸(HA +PE)或单独的透明质酸的4天处理方案以后的小鼠皮肤。用箭头指示每个图像中的角质形成细胞层。也呈现了在第4天停止处理以后，在第7天得到的皮肤样品的显微照片。

[0073] 图10．该图量化了与用透明质酸和卵磷脂的混合物(HA +PE)和单独的透明质酸处理过的小鼠相比，能够穿透小鼠皮肤的本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)的量。该图量化了图9所示的显微照片图像。

[0074] 图11．所述显微照片图像证实，本发明的修饰的透明质酸组合物的施用保持局部化在施用部位处的表皮内。单独的透明质酸的施用不导致透明质酸在表皮中的任何积累。用箭头标记施用边缘，用虚线箭头指示施用区域。

[0075] 图12．该图量化了在得自图11的小鼠皮肤的处理过的和未处理的区域中存在的透明质酸水平。

[0076] 图13．所述显微照片图像和量化图指示，在繁殖成不具有RHAMM透明质酸受体的小鼠(RHAMM-/- 小鼠)中，本发明的透明质酸组合物(HA-PE-2)能够穿透皮肤屏障并保留在表皮内。用箭头指示每个图像中的角质形成细胞层。

[0077] 图14．所述显微照片图像和量化图指示，在繁殖成不具有RHAMM或CD44透明质酸受体的小鼠(RHAMM-/-:CD44-/- 小鼠)中，本发明的透明质酸组合物(HA-PE-2)能够穿透皮肤屏障并保留在表皮内。用箭头指示每个图像中的角质形成细胞层。

[0078] 图15．本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)和使用现有技术方法制备的微粒脂质化糖胺聚糖的显微照片图像。

[0079] 图16．所述显微照片图像证实了给小鼠外部施用以后，本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)的递送84 kDa蛋白(GST-标记的RHAMM)和26 kDa蛋白(GST)穿过皮肤屏障的能力。用“^”表示角质形成细胞层，并用箭头表示下面的肌肉层。

[0080] 图17．该图量化了图16的、在给小鼠外部施用本发明的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)以后递送GST-RHAMM(一种84 kDa蛋白)穿过皮肤屏障的显微照片图像。

具体实施方式

[0081] 本发明提供了这样的组合物：其在外部施用以后使修饰的糖胺聚糖能够穿过皮肤屏障，从而使它们适合用于美容制剂中和用作美容和药学活性治疗剂的真皮和透皮递送的媒介物。这些糖胺聚糖组合物通过脂质部分与糖胺聚糖的共价连接而形成，其中将连接程

度限制为约1至约15%的二糖单体单元，以便给糖胺聚糖提供足够的亲脂性以促进它穿过皮肤屏障，与此同时，允许维持它的糖胺聚糖特性，特别是它的细胞相互作用。优选地，所述连接程度是约1-12%、更优选约1-10%、甚至更优选约1-7.5%、和甚至更优选约2-6%（例如约5.5%和约6%）的二糖单体单元。导入脂质部分的一种有效方式是，通过键合在羧酸基团处，所述羧酸基团遍布于糖胺聚糖位于它的糖残基上。当在本组合物的制备中使脂质部分与糖胺聚糖相连时，重要的是，考虑使用的可利用连接部位的百分比。如Margarlit和Peer(WO 03/015755)所教导的，磷脂酰乙醇胺在20-33%的可利用羧酸位点处的共价连接，提供这样的组合物：所述组合物自装配以形成微粒纳米球或微球，它们可以充当不溶性的或难溶性的化合物的载体。因而，为了避免这些不希望的微粒结构的形成，已经发现，当制备本发明组合物时必须使用更低的连接程度。

[0082] 当制备本发明的修饰的糖胺聚糖组合物时，使用任何已知的方式，可以使脂质部分与糖胺聚糖共价地连接，所述方式可以包括，例如，与现有官能团（例如，羧酸和羟基）或与暴露的官能团（例如，通过*N*-乙酰基的部分水解，以提供伯胺）连接。尽管在糖胺聚糖和脂质部分之间可以使用任意形式的共价连接，通常优选地，所述连接在体内可水解，例如，酰胺键和酯键，使得修饰的糖胺聚糖可以恢复至它的天然形式，从而促进它的最终生物吸收，并在使用天然地存在于皮肤中的糖胺聚糖和脂质时，减少毒性反应和/或变应原性反应的可能性。

[0083] 本发明的糖胺聚糖组合物优选地使用透明质酸来制备，尽管也可以使用其它糖胺聚糖，特别是透明质酸衍生物，包括部分地*N*-脱乙酰化的透明质酸。尽管除了透明质酸以外，天然存在的糖胺聚糖与蛋白结合，在本发明范围内使用的术语糖胺聚糖表示，糖胺聚糖的仅多糖部分。适合用于本发明的组合物中的糖胺聚糖包括主要包含重复二糖单元的任何长的无支链多糖，所述重复二糖单元包含与己糖胺连接的糖醛酸或己糖，只要满足下述的大小要求即可。

[0084] 透明质酸以高水平存在于皮肤中，且当使用本发明的组合物作为美容和药物治疗剂（包括蛋白和类似地调节大小的生物大分子）的递送装置时，可以得到双重作用，包括治疗剂的递送和治疗区中的透明质酸细胞外被的增强。当以前已经将治疗剂的外用递送与施用部位处的皮肤损伤（例如，使用糖皮质激素的外用治疗时可能观察到，已知所述糖皮质激素降低真皮透明质酸水平[18]）相关联时，该双重作用可以具有特殊的优点。在皮肤中相对于其它天然存在的糖胺聚糖（例如，硫酸肝素、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白或硫酸软骨素）优先使用透明质酸的另一个原因是，使用细菌通过生物合成方式容易达到高（>100 kDa）分子量，因而使得它的供给独立于动物源，并因此不易于发生与动物衍生物质有关的变应原问题。

[0085] 在本发明中使用的糖胺聚糖通常具有约50 kDa至约2,500 kDa的分子量，优选地是在约100 kDa至约2,000 kDa的范围内。更优选地，所述糖胺聚糖具有约350-1,500 kDa的分子量，最优选地约500-1,500 kDa。但是，就在伤口中的特殊医药用途（诸如促进先天性免疫、血管生成和伤口表面再建）而言，最佳的透明质酸尺寸更小，因为片段化的透明质酸比天然的透明质酸具有更高的生物反应性，且可以是在约2至约100 kDa的范围内。

[0086] 本组合物的脂质部分可以包含一种或多种脂质，优选地选自下述类别的那些：脂肪酸、甘油脂、磷脂、鞘脂、甾醇脂质和异戊烯醇脂质。尽管本发明的一项要求是，所述脂质部分与糖胺聚糖共价地结合，本发明的组合物可以包括脂质化的糖胺聚糖以及非共价地结

合的其它脂质。

[0087] 给定的脂质在修饰糖胺聚糖中的应用的唯一要求是，它具有通过它的极性首基与糖胺聚糖共价地结合的能力。尽管优选地使用在要治疗的人或动物中天然地存在的脂质，也可以使用天然存在的脂质的衍生化形式，条件是，它们的脂质特性得到维持。当在脂质的极性首基上的可利用官能团不允许脂质与糖胺聚糖的连接时，可能需要这样的衍生化。衍生化的脂质的实例包括这样的脂质：它们被修饰以促进脂质与糖胺聚糖的键合，例如，通过伯胺向脂质的极性首基的添加。其它实例包括：对脂质的疏水尾的修饰，条件是，该区域的亲脂特性得到保留。另外，也可以使用天然存在的脂质的立体异构体，如果必要的话，进一步衍生化以促进与糖胺聚糖的键合。对脂质进行任何需要的修饰的方法，是本领域技术人员熟知的。

[0088] 一般而言，在本发明的组合物中可以使用任意脂肪酸，无论是单独的，还是作为脂肪酸或其它脂质的基团的一部分，其中具有大于12个碳原子的那些是优选的，且包括饱和的、单不饱和的和多不饱和的脂肪酸。尽管优选地使用在人类中天然存在的脂肪酸，该优选是在组合物的生物吸收、它们的低毒性和/或变应原性副作用潜力方面，而不是在它们的穿过皮肤屏障的能力方面。优选地，使用的脂肪酸(单独的或作为更大脂质的组分)含有12-24个碳原子。下述是在本发明的组合物中可以使用的脂肪酸(单独的或作为更大脂质的一部分)的非限制性实例：肉豆蔻酸(12:0，十四烷酸)、棕榈酸(16:0，十六烷酸)、硬脂酸(18:0，十八烷酸)、花生酸(20:0，二十烷酸)和山嵛酸(22:0，二十二烷酸)饱和脂肪酸；棕榈油酸(16:1(*n*-7)，*顺式*-9-十六碳烯酸)、岩芹酸(18:1(*n*-12)，*顺式*-6-十八碳烯酸)、油酸(18:1(*n*-9)，*顺式*-十八碳烯酸，*顺式*-异油酸(*cis*-vaccenic)(18:1(*n*-7)，*顺式*-11-十八碳烯酸)、芥酸(22:1(*n*-9)，*顺式*-13-二十二碳烯酸)单不饱和脂肪酸；和亚油酸(18:2(*n*-6)，9,12-十八碳二烯酸)、γ-亚麻酸(18:3(*n*-6)，6,9,12-十八碳三烯酸)、α-亚麻酸(18:3(*n*-3)，9,12,15-辛三烯酸)、花生四烯酸(20:4(*n*-6)，5,8,11,14,17-二十碳四烯酸)、EPA(20:5(*n*-3)，5,8,11,14,17-二十碳五烯酸)和DHA(22:6(*n*-3)，4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸)多不饱和酸。除了以它们的天然形式使用以外，可以修饰上述脂肪酸，以更好地促进与糖胺聚糖的共价或非共价结合，例如，通过将酸首基转化成醇或胺、进一步衍生化为离去基团的醇、或离去基团。同样，可以如下衍生化脂肪酸：通过添加短的间隔物，例如，与2-氨基乙醇、乙二醇或具有希望的官能团的其它乙醇衍生物形成酯。认为制备这样的修饰的脂肪酸所需的所有化学方法是常规的，且是有机合成领域的熟练化学家已知的。显而易见，必需脂肪酸(即，在人组织中不生成、必须从饮食中获取的那些脂肪酸，诸如花生四烯酸、亚油酸和亚麻酸和它们的代谢物诸如EPA和DHA，以及其它)的使用，除了它们在本发明中的功能以外，还可以在它们用于递送透明质酸穿过皮肤屏障以后，随着本发明的组合物的生物降解，提供这些营养物的不同于饮食的额外来源。必需脂肪酸的使用可以是单独的，作为更大脂质的一部分，或作为未与脂质化的糖胺聚糖共价地结合、而是相反由脂质化的糖胺聚糖真皮地或透皮地递送的辅助脂质。在本发明中也可以使用沿着碳链具有取代基或支链的脂肪酸衍生物，条件是，衍生化的脂肪酸的脂质特性得到保留。

[0089] 可用于本发明的组合物中的其它脂肪酸包括：具有10-30个碳原子的支链脂肪酸。支链可以包括沿着饱和的或不饱和的脂肪酸链在任意位置处取代的一个或多个甲基，或包括更大的烷基。其它有用的脂肪酸包括：沿着脂肪酸主链或在末端位置处具有一个或多个

脂环族环的那些。其它有用的脂肪酸也包括羟基脂肪酸，其中所述羟基是在羧酸(α-和β-羟基脂肪酸)的2个碳之间。也可以如下进一步衍生化羟基脂肪酸的α-或β-羟基：通过形成醚或酯，以将第二个脂肪酸链添加至脂质上，从而增加它的亲脂特性。

[0090] 前述脂肪酸的讨论也适用于它们在下述类型的脂质中的应用，其中所述脂质含有脂肪酸组分。

[0091] 除了使用脂肪酸以外，适合用于本发明中的脂质也包括脂肪酰胺，即脂肪酸的酰胺类似物。优选的脂肪酰胺是这样的：其中脂肪酸被转化成酰胺，例如，通过用2-氨基乙醇处理，由此得到在必要时可以进一步修饰的醇。类似地，可以使用二胺(诸如1,2-二氨基乙烷)来形成脂肪酰胺，由此得到伯胺，用于促进与糖胺聚糖的连接。还可以使用脂肪酸和氨基酸来形成合适的脂肪酰胺，其在必要时然后可以进一步衍生化。优选的脂肪酰胺包括N-花生四烯酰基乙醇胺(其已知表现出抗炎和抗癌性质)、*N*-花生四烯酰基甘氨酸和*N*-棕榈酰乙醇酰胺(anandamide)(其也可以用于治疗炎症)。这样的脂肪酰胺以及具有治疗效果的其它脂肪酰胺的使用能提供双重作用，例如，促进糖胺聚糖穿过皮肤屏障的运输，并在体内从脂质化的糖胺聚糖水解以后提供它们的已知治疗效果。

[0092] 可以用于本发明中的甘油脂包括单酰基甘油脂和二酰基甘油脂。优选的甘油脂是单酰基甘油和二酰基甘油和糖基甘油。更优选的是这样的甘油脂：它们具有选自上述优选组的脂肪酸。也优选的是，可以作为三酰基甘油和其它脂质的生物合成的中间体的甘油脂；但是，这优选是基于它们在从本发明的脂质化的糖胺聚糖水解以后提供其它效应的能力，而不是基于它们的促进穿透皮肤屏障的能力。取决于希望与糖胺聚糖形成的键的类型，还可以进一步衍生化甘油脂，例如，通过使用间隔物，或直接衍生化，以提供伯氨基，从而允许与糖胺聚糖的羧酸基团形成酰胺。

[0093] 适合用于本发明的组合物中的磷脂包括：磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰-L-苏氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸、双磷脂酰甘油(心磷脂)和磷酸糖脂。在磷脂类型中，优选的是：磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸。更优选的是磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸。最优选的是磷脂酰乙醇胺。尽管天然存在的磷脂是优选的(这是由于考虑到生物吸收而不是促进皮肤穿透)，也可以使用非天然存在的磷脂。非天然存在的磷脂包括这样的磷脂：它们是不适合用于与糖胺聚糖连接的磷脂(诸如磷脂酰胆碱)的衍生化形式，其中所述衍生化提供实现脂质与糖胺聚糖的共价连接的官能团。除了处于它们的传统的二酰基形式以外，合适的磷脂还可以包括醚磷脂，例如，烷基酰基磷脂和烯基酰基磷脂。也适合用于本发明中的是，任意上述磷脂的溶血磷脂，其中脂肪酸链之一已经被水解，以得到单酰基、单烷基或单烯基磷脂。合适的磷脂还可以在它们的首基处修饰，条件是，这增强或不阻碍磷脂与糖胺聚糖的共价连接。

[0094] 适合用于本发明的组合物中的鞘脂包括鞘氨醇和其它鞘氨基醇基质、神经酰胺、神经酰胺磷脂和鞘糖脂。就本发明的目的而言，神经酰胺磷脂表示除了鞘磷脂以外的那些鞘脂：其中神经酰胺与磷酸酯基团结合，且包括鞘脂诸如神经酰胺磷酰基乙醇胺、神经酰胺磷酰基甘油、神经酰胺肌醇和类似的类型。合适的鞘氨基醇基质(单独用作鞘脂，或用作神经酰胺、神经酰胺磷脂、鞘磷脂、鞘糖脂或其它鞘脂的组分)还可以包括具有不同碳链(长度、不饱和、羟基化)的鞘氨基醇基质的类似物，但是优选具有14-24个碳原子的那些。优选的鞘氨基醇基质(单独用作鞘脂，或用作神经酰胺、神经酰胺磷脂、鞘糖脂或其它鞘脂的组

分)包括鞘氨醇(d18:1, d18:1$^{\Delta 4t}$, 4*E*-d18:1或它的*顺式*异构体: d18:1$^{\Delta 4c}$, 4*Z*-d18:1)二氢鞘氨醇(d18:0,二氢神经鞘氨醇)、植物鞘氨醇(t18:0)和脱氢植物鞘氨醇(t18:1, t18:1$^{\Delta 8t}$, 8*E*-t18:1,或它的顺式异构体: t18:1$^{\Delta 8c}$, 8*Z*-t18:1)和eicosasphingosine(d20:1, 4*E*-d20:1, d20:1$^{\Delta 4t}$)。关于上述脂质的类别,优选的鞘脂是天然存在的那些。优选的鞘脂类型包括:神经酰胺磷酰基乙醇胺、神经酰胺磷酰基肌醇和单鞘糖脂。合适的鞘脂还可以包括这样的鞘脂:其中乙醇胺、丝氨酸或其它合适的基团与神经酰胺直接结合。其它优选的鞘脂包括鞘糖脂,它们在糖基上修饰成也包括磷酰基乙醇胺、磷酰基丝氨酸、膦酰基乙醇胺、丝氨酸或乙醇胺。由于在性质上已知鞘脂具有不同于基于甘油的脂质(诸如上述的那些)的脂肪酸,在鞘脂中的优选脂肪酸可能不同于上面提供的脂肪酸的一般描述。因而,就鞘脂而言,优选的脂肪酸可以具有最多28个碳,且具有偶数或奇数个碳。在这些饱和的、单不饱和的或多不饱和的脂肪酸中,饱和的或单不饱和的具有16-24个碳的那些是优选的。

[0095] 除了上述的基于磷脂酸的磷脂和鞘脂以外,本发明的组合物也可以使用类似的膦酰基脂质,诸如膦酰基乙醇胺和膦酰基-1-羟基-2-氨基乙烷;优选的膦酰基脂质是膦酰基乙醇胺。

[0096] 由于神经酰胺是皮肤的天然组分,它们随着年龄或疾病的减少导致皮肤脱水、皱纹/下垂和对疾病的易感性,神经酰胺和可以在皮肤中水解成神经酰胺的基于神经酰胺的脂质的应用,提供双重益处。可以在皮肤中水解成神经酰胺的基于神经酰胺的脂质在本发明的组合物中的应用既辅助递送透明质酸穿过皮肤屏障,又在组合物降解以后提供来源来辅助补充神经酰胺水平。

[0097] 适合用于本发明的组合物中的甾醇脂质包括甾醇和氧化固醇,其中胆固醇的A或B环被氧化,而不是烷基链,诸如7β-羟基胆固醇或4β-羟基胆固醇。其中烷基侧链已经被羟基化且任选地转化成胺的氧化固醇也适合使用,条件是,胆固醇骨架的A和B环是处于还原形式,即,去羟基化的形式。也可以使用具有被氧化成羧酸的伯羟基的氧化固醇,特别当用2-氨基乙醇酯化时,以提供末端氨基,从而促进与糖胺聚糖的结合。除了在哺乳动物中常见的甾醇以外,来自其它来源的甾醇,诸如基于植物的甾醇(植物甾醇),也可以用于本发明的组合物中。有用的植物甾醇包括、但不限于:菜油甾醇、谷甾醇、菜籽甾醇、豆甾醇、燕麦甾醇。还可以衍生化甾醇,例如,通过将2-氨基乙醇、肌醇、丝氨酸、糖苷、磷酰基乙醇胺、膦酰基乙醇胺、磷酰基丝氨酸、磷酰基肌醇、磷酰基糖苷或用2-氨基乙醇、丝氨酸、磷酰基乙醇胺衍生化的糖苷或膦酰基乙醇胺添加到任一种上述甾醇或氧化固醇的A-环的3-羟基取代基或烷基侧链的羟基取代基上。另外,可以与氨基酸形成酯,以提供氨基,从而促进与糖胺聚糖的结合。

[0098] 7-脱氢胆固醇的使用可以提供下述额外益处:在它穿透进入皮肤的表皮层中以后,在紫外线暴露下,转化成维生素D_3(胆骨化醇)。可替换地,胆骨化醇或它的前体维生素原D_3可以直接地用作脂质。通过使用麦角固醇、麦角骨化醇或麦角钙化醇(维生素D_2)或sitocalciferol(维生素D_5)(其在紫外线辐照以后从7-脱氢谷甾醇生成),也可以得到类似的益处。结果,随着修饰的糖胺聚糖在体内的降解(假定使用可水解的连接,其允许在生理条件下释放脂质),在修饰本发明的糖胺聚糖中使用的脂质部分也可以用作生物学上重要的脂质的递送媒介物。当任一种上述脂质用于本发明的组合物中时,根据在它从糖胺聚糖水解以后希望补充的维生素D的量,其相对于其它脂质的用量可以变化。

[0099] 除了甾醇-衍生的维生素D以外，本发明的组合物还可以使用其它脂溶性的维生素(诸如维生素A和E)和其它异戊烯醇脂质，包括具有促进与糖胺聚糖的连接的官能团的其它生育酚、生育三烯酚、视黄酸、多萜醇和聚异戊烯醇。这样的脂质也可以被进一步衍生化，例如，通过将2-氨基乙醇、肌醇、丝氨酸、糖苷、磷酰基乙醇胺、膦酰基乙醇胺、磷酰基丝氨酸、磷酰基肌醇、磷酰基糖苷或用2-氨基乙醇、丝氨酸、磷酰基乙醇胺衍生化的糖苷或膦酰基乙醇胺添加到可利用的羟基取代基上。另外，可以与氨基酸形成酯，以提供氨基，从而促进与糖胺聚糖的结合。在从糖胺聚糖裂解以后能够提供生物应答的任何脂质的应用也是如此，在任何制剂中使用的量取决于希望提供的脂质的量。也有用的是异戊烯醇的二磷酸酯衍生物，诸如焦磷酸法呢酯和二磷酸前角鲨烯，它们用于甾醇的生物合成中。优选的异戊烯醇脂质包括生育酚(其包括维生素E)和生育三烯酚(它们在穿过皮肤屏障以后另外能够起抗氧化剂的作用)以及维生素A或更优选的它的氧化形式、视黄酸(其已知刺激皮肤中的胶原产生)、以及法尼醇脂质(其已知促进表皮的脂质外层)。抗氧化剂在皮肤中的存在，可以进一步辅助预防透明质酸(无论是天然存在的，还是通过本发明的组合物提供的)的分解。

[0100] 如上所述，最优选的脂质是天然存在于人类中的脂质，但是，该优选是基于它们的容易生物吸收能力和它们的更低毒性和/或变应原性副作用可能性，而不是基于它们的促进糖胺聚糖穿透皮肤屏障的能力。本发明的组合物意图用于美容和治疗用途，因此希望所述组合物不随着脂质在体内逐渐水解而表现出显著的毒性。所以，在使用特定脂质之前，必须进行试验以确定特定脂质当在皮肤内释放时是否与毒性效应、变应原型应答或刺激有关。因为已知许多可用于本发明组合物中的脂质在人类中具有生物学效应，可以修改使用的任何特定脂质的量，以利用或避免这样的效应，这取决于所述组合物所应用的任何基准集。

[0101] 更优选的脂质类别是选自下述的磷脂或鞘脂：磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘氨醇、神经酰胺和基于神经酰胺的脂质。最优选的是，使用磷脂酰乙醇胺。

[0102] 除了通过添加一类脂质而修饰的糖胺聚糖以外，本发明的糖胺聚糖组合物也包括这样的糖胺聚糖：其中添加了2类或更多不同类的脂质。这可以包括，例如，在亲脂尾部分中添加具有不同脂肪酸的磷脂酰乙醇胺，或向同一糖胺聚糖添加磷脂酰乙醇胺和基于神经酰胺的脂质，即，不同类别的脂质。

[0103] 优选地，要与糖胺聚糖共价地连接的脂质具有伯氨基，以促进与存在于糖胺聚糖的单糖单元上的羧酸基团形成酰胺。可替换地，其它优选的脂质类别可以具有：能够与糖胺聚糖的羧基形成酯键的羟基，或能够与糖胺聚糖的羟基形成酯键、或能够与糖胺聚糖上的氨基(作为部分地脱乙酰化的或未乙酰化的糖胺聚糖的一部分存在)形成酰胺键的羧酸基团。除了上面讨论的脂质与糖胺聚糖的优选连接形式以外，通过技术人员已知的其它已知方法，也可以实现键合；但是，这些形式是次优选的。

[0104] 在糖胺聚糖的羧酸基团和脂质的氨基之间通过酰胺键形成优选连接。使用本领域关于类似的共价结合的脂质/糖胺聚糖系统所教导的碳二亚胺方案(例如，Sakurai等人在US 5,464,942中，Yerushalmi等人在WO 2006/050246中，或Margarlit和Peer在WO 03/015755中)，可以容易地形成这样的键。该碳二亚胺方案在制备本组合物中的应用与本领域以前使用的那些方案的主要差异在于：简化的操作，使用更少量的连接剂，且不需要使用有机溶剂，尽管如果需要的话也可以使用它们。据信，在没有有机溶剂存在下，或在有减少量

的有机溶剂存在下，使用更少量的连接剂，在水溶液中进行偶联反应，限制脂质部分与糖胺聚糖结合的程度，从而阻止不希望的高阶微粒纳米球和微球的形成(>20%取代率)，以及减少可能残留在终产物中的潜在变应原性组分(例如，分解的连接剂和得自连接反应的副产物)的量。

[0105] 如在实施例2和实施例3中关于透明质酸进一步例证的，通过形成酰胺键来制备脂质化的糖胺聚糖所使用的简化的一般规程包括：

(i)将含有糖胺聚糖的水溶液与脂质或含有脂质的混合物(溶解在水或水可混溶的半混溶的溶剂中)一起混合，任选地加热；

(ii)以使它成为控制脂质连接量的限制试剂的量，加入连接剂，例如，碳二亚胺；和

(iii)在混合下进行偶联，历时30分钟至3小时。

[0106] 在下述实施例使用的方法中，连接剂(用于促进酰胺形成的碳二亚胺)是限制试剂，其加入量是基于要与每个链相连的脂质分子的希望百分比。所述脂质通常相对于使用的连接剂的量摩尔过量地加入，优选地大幅过量，使得脂质连接程度由使用的连接剂的量控制。因而，使用的连接剂的量代表将与糖胺聚糖共价地结合的脂质的理论最大量。所以，当制备本发明组合物时，希望使用新近购买的、新鲜纯化的、和/或新近测定的连接剂，以更准确地控制在给定制剂中可以与糖胺聚糖键合的脂质的最大量。

[0107] 另外，使用连接剂(例如，用于酰胺形成的碳二亚胺)作为试剂中的限制试剂，以及最少化或消除有机溶剂的使用，可以有用地减少当所述组合物施用于皮肤时变应原性应答的可能性。在脂质部分与糖胺聚糖连接以后，如果需要的话，可以使用任何方便的方法任选地纯化所述组合物，以除去残余的连接剂、分解产物和/或得自连接反应的副产物。预期连接的组合物的纯化进一步减少对外用本发明的组合物的预期的低变应原性应答可能性。如果需要的话，可以使纯化的组合物在其它脂质连接步骤中与一种或多种脂质进一步反应，以提供具有多种脂质的修饰的糖胺聚糖和/或通过不同方法与糖胺聚糖结合的脂质。还可能希望制备这样的组合物，所述组合物另外包括非共价地结合的脂质，以辅助所述组合物穿过皮肤屏障的运输。

[0108] 使在糖胺聚糖的糖单元中存在的羧酸基团与脂质相连的一种替代方法可以包括：使用任何传统的酯形成方法，包括与della Valle在US 4,851,521中所教导的类似的方案，形成酯键。该方案的应用适合使用含有在脂质的亲水部分上的离去基团的衍生化脂质，例如，可以用糖胺聚糖的羧酸酯基团的氧置换碘代以形成酯。关于前面讨论的碳二亚胺酰胺键的应用，对della Valle的规程的主要修改包括糖胺聚糖与使用的脂质之比。

[0109] 除了上述方法以外，可以使用任意其它合适的方法来共价地连接所述脂质部分和所述糖胺聚糖。基于糖胺聚糖的可利用官能团、脂质的可利用官能团、和希望形成的共价键的类型，确定合适的方法。

[0110] 使用下述物质，可以制备本发明的组合物：(1)与糖胺聚糖共价地连接的单一类型的脂质；(2)与糖胺聚糖结合的多类脂质，即，在一个或多个反应中使用多种脂质制备组合物，使得糖胺聚糖具有与其相连的多类脂质；(3)脂质化的糖胺聚糖的混合物，即，含有与脂质A相连的糖胺聚糖、与脂质B相连的糖胺聚糖等的混合物；或(4)使用超过一类糖胺聚糖。

[0111] 尽管本发明的优选方面涉及透明质酸的应用，如下面所解释的，以类似的方式使用其它糖胺聚糖也可以进行类似的配制。

[0112] 本发明的组合物可以用于许多不同的用途，当使用透明质酸作为糖胺聚糖时，包括下述用途：

(a)作为美容，通过提供透明质酸用于补充透明质酸细胞外被，年轻化表皮和真皮皮肤细胞。这些层中存在增加的透明质酸水平的后果是，在细胞水平对皮肤层的再水合效应，和对细胞的“逆转老化”效应，这产生看起来更年轻的皮肤的外观。通过该再水合效应，所述组合物可以用作处理，以减少皱纹出现以及补充年轻皮肤特有的光度和湿润。

[0113] (b)作为皮肤穿透剂/保留系统，其中所述修饰的透明质酸当外用时能够穿透皮肤屏障，且在皮肤内具有比固有的透明质酸更长的半衰期，即，本发明的组合物在皮肤层内比天然存在的透明质酸相对更慢地降解。

[0114] (c)用于减少瘢痕形成，促进具有皮肤萎缩(例如，由免疫问题或类固醇使用导致的萎缩，这可以在癌症患者中见到)的患者的皮肤再生，减少外科手术以后的瘢痕形成，以及一般疤痕去除，例如，一般瘢痕形成、蜂窝组织相关的瘢痕形成、牵拉痕等。

[0115] (d)用于治疗光化性角化病，以减轻与光化性角化病有关的炎症，和保护受损的皮肤免于进一步UVA/B损伤。还可以配制修饰的透明质酸组合物，以递送生物活性剂，所述生物活性剂减少受光化性角化病影响的角质形成细胞层的增殖。

[0116] (e)作为递送系统，其中蛋白、多肽或其它类似大小的生物大分子可以外用地递送穿过皮肤屏障。

[0117] (f)作为药物递送系统，其中将药学活性成分与本发明的脂质化的透明质酸组合物相混合，以促进它的真皮递送。这样的系统提供双重作用，真皮地递送药物成分和透明质酸；在真皮递送药物以后，所述系统的透明质酸部分随后将作为真皮和表皮细胞的年轻化试剂，如上所述。

[0118] 本发明的药物递送系统的具体治疗用途包括：

1．靶向基质细胞缺乏，用于治疗炎性疾病、癌症、皮肤再生/创伤修复、化学烧伤和热灼伤；

2．治疗皮肤癌；

3．治疗皮肤病症，诸如痤疮、接触性皮炎、银屑病和湿疹；

4．通过减少瘢痕形成和促进组织再生，治疗毁损面容的皮肤疾病；和

5．治疗难以注射的关节(特别是指或趾)的关节炎。

[0119] 因此，本发明的组合物可以用于美容、药物(例如，治疗烧伤和已知透明质酸有益的其它病症)、粘膜润滑剂中，和用作药物的外用微环境药物递送系统。美容用途包括：减少皱纹出现，增强皮肤的年轻外观，增加皮肤内的胶原产生，再水合老化的或干燥的皮肤，增加皮肤的营养，和治疗与光化性角化病有关的斑点。药物递送施用包括：药物的外部施用，所述药物诸如用于关节炎的全身或局部治疗的NSAID、用于皮肤癌的全身或局部治疗的化疗剂，和用作贴剂的替代物或作为贴剂的一部分(例如，将本发明的组合物嵌入贴剂中和应用于皮肤，由此允许随时间逐渐吸收)，所述贴剂用于施用雌激素、烟碱或其它物质。优选的非美容用途是，针对局部治疗而不是全身治疗的那些，由此使药物的全身性暴露最小化，并从而减少归因于全身性暴露的副作用的强度。

[0120] 本发明的组合物也可以用于与组织工程有关的用途，通过如下促进组织恢复进行：通过吸引干细胞(已知透明质酸吸引干细胞)，保护固有的干细胞免于凋亡(已知透明质

酸保护干细胞)，和减少瘢痕形成(皮肤中的高透明质酸水平减少纤维化修复)。还预期本发明的组合物在减少瘢痕形成中的应用辅助从麻痹中恢复，所述麻痹是由于神经细胞不能沿着它们的最初轨迹再生长，例如，在中风或头损伤以后，因为纤维化基本上充当神经途径上的道路障碍。因此，纤维化瘢痕形成的减少导致被迫绕开纤维化组织且不能重新恢复它们的最初路径的神经细胞的量的减少，从而减轻或暂时缓解这些形式的麻痹。

[0121] 使用除了透明质酸以外的糖胺聚糖(最特别地，硫酸软骨素，其与透明质酸密切相关)的组合物也可以用于许多不同的用途，包括：

(a)作为美容，其通过提供糖胺聚糖而年轻化表皮和真皮皮肤细胞，所述糖胺聚糖能够替代透明质酸增强皮肤的保留水和/或结合细胞表面的能力。

[0122] (b)作为皮肤穿透剂/保留系统，其中所述糖胺聚糖当外用时能够穿透皮肤屏障。

[0123] (c)作为递送系统，其中蛋白、多肽或其它类似大小的大生物大分子可以外用地递送穿过皮肤屏障。

[0124] (d)作为药物递送系统，其中将药学活性成分与本发明的脂质化的糖胺聚糖组合物相混合，以促进它的真皮递送。

[0125] 本发明的药物递送系统的具体治疗用途包括：

1．靶向基质细胞缺乏，用于治疗炎性疾病、癌症、皮肤再生/创伤修复、化学烧伤和热灼伤。

[0126] 2．皮肤癌。

[0127] 3．皮肤病症，诸如接触性皮炎、银屑病和湿疹。

[0128] 4．通过减少瘢痕形成和促进组织再生，用于毁损面容的皮肤疾病；

5．难以注射的关节(特别是指或趾)的关节炎。

[0129] 包含递送任选地添加的治疗活性物质的糖胺聚糖组合物的应用，主要指向皮肤相关病症的治疗。但是，当任选地添加的治疗活性物质在它递送穿过皮肤屏障以后能够迁移穿过表皮层和真皮层进入全身循环中时，所述组合物可以更一般地用作提供透皮递送的系统。

[0130] 尽管本发明组合物的主要用途是在外用制剂中，本发明的用途也包括：促进糖胺聚糖和药物(其中修饰的透明质酸用作药物递送系统)的经口摄入，以及促进透明质酸和透明质酸药物-递送系统在皮下、真皮内或其它形式注射以后的沉积。由于它们的穿透皮肤屏障的能力，本文所述的组合物也可以用于促进粘膜穿透，且因此可以用于通过这些额外途径来促进糖胺聚糖组合物以及任何任选地添加的治疗物质的递送。因而，本发明的组合物也可以用于这样的制剂中：所述制剂适合施用于口腔的、食管、胃的、肠的、鼻的、嗅觉器官的、口的、支气管的、子宫的或阴茎的粘膜。另外，本发明的组合物可以配制成将脂质化的糖胺聚糖和/或其它治疗剂递送至眼内，无需注射，通过外部施用软膏剂、滴眼液或其它合适的制剂实施。

[0131] 根据美容和/或药物产品制备领域的技术人员已知的任何方法，本发明的组合物可以用于制备这样的制剂：所述制剂适合用于希望的施用方法。这样的方法参见，例如，*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* or *Cosmetic and Toiletry Formulations*，以及众多其它的教科书。优选的制剂包括可以外用于皮肤的那些，诸如乳膏、软膏剂、凝胶、洗剂或糊剂。另外，本发明的组合物也可以用于通常用于药物的透皮递送

的贴剂中，无论是它们自己，还是作为治疗物质（诸如药物或蛋白）的递送媒介物。

[0132] 除了使用标准方法和赋形剂制备制剂以外，本发明的组合物也可以与标准的、商购可得的美容乳膏相混合，无需加入任何其它的或专门的穿透促进剂。当与标准类型的美容乳膏一起施用时，本组合物的穿透皮肤的能力也不需要使用其它水分屏障（诸如覆层）、不透性塑料膜或其它类型屏障通过阻止或减少皮肤损失表面水的能力来促进皮肤屏障穿透。

[0133] 含有本发明的糖胺聚糖组合物的制剂也可以包括诸如抗氧化剂等其它组分，以辅助预防透明质酸和其它糖胺聚糖（无论天然地存在的，还是作为本发明组合物的一部分递送的）的分解。制剂还可以包括维生素、精油和已知其施用为皮肤的健康和/或外观提供有益效果的其它营养物。另外，制剂也可以包含用于减少或预防紫外线辐射对皮肤的损伤效应的成分，诸如在晒黑洗剂和防晒剂中常见的那些。

[0134] 为了辅助在本发明内的理解和制备，提供了下述示例性的、非限制性的实施例。在下述的实施例中，从Jackson Laboratories（Bar Harbor, Maine）得到CD44-/-小鼠，根据Tolg等人所述的方法[19]，使用从Charles River Laboratories得到的C57-BL6野生型小鼠在内部制备RHAMM-/-小鼠，根据Tolg等人所述的方法[20]，在内部制备CD44-/-:RHAMM-/-小鼠，也使用Tolg等人所述的方法得到细胞。

[0135] 实施例1. 非共价连接的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物（HA +PE）的制备

通过在掺合机中在异丙醇（10 mL）（以促进混合）中将透明质酸水溶液（78.5 mL, 12 mg/mL; Baxyl®, Cogent Solutions Group, Lexington, KY, 美国）与大豆卵磷脂（78.5 mL；含有13% 磷脂酰乙醇胺的Soya Lecithin GT Non-GM IP；Imperial-Oel-Import）一起在室温混合30分钟，制备缔合的（非共价连接的）透明质酸-磷脂酰乙醇胺复合物（HA +PE）。然后将该混合物在4℃温育48小时，再用于制备外用乳膏，如在实施例4中关于本发明的连接的组合物所述。

[0136] 在该实施例和本文所述的其它实施例中使用的卵磷脂含有：15% 磷脂酰胆碱、13% 磷脂酰乙醇胺、10% 磷脂酰肌醇、19% 其它脂质、5% 碳水化合物和38% 大豆油。这些磷脂主要含有C_{14}-C_{22}脂肪酸作为疏水组分，大部分是硬脂酸和棕榈酸，含有较小量的油酸、棕榈油酸和肉豆蔻酸。

[0137] 该非共价地结合的物质（在本发明的范围之外）在一些下述实施例中用于对比目的，以证实共价连接对本发明组合物的穿透皮肤屏障的能力的影响。

[0138] 还使用类似的非共价连接的缀合物（用约350 kDa透明质酸制备）进行了实验，但是，与上述的约500 kDa缀合物相比，得到的结果没有差异。

[0139] 实施例2. 连接的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物（HA-PE-1）的制备

通过在手动掺合机中快速搅拌下，将透明质酸溶液（5 mL, 10 mg/mL去离子水, 50 mg；约350 kDa（Life Core, MN, 美国）、约1.3 x 10^{-4} mol -CO_2H基团）与磷脂酰乙醇胺（PE）（250 mg; Sigma-Aldrich®, 目录号60648；在约50%测得500 mg）一起预混合，制备共价地连接的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物（HA-PE-1）。在将磷脂酰乙醇胺加入透明质酸中之前，首先将它溶解于氯仿（0.5 mL）中，然后蒸发出氯仿，用异丙醇（0.5 mL）替代，并用手工振动探针制成悬浮液。加入1-乙基-3-（3-二甲氨基丙基）碳二亚胺（EDC）（1.2 mg, 7.7 x 10^{-6} mol；将含有120 mg EDC的10μL新鲜制备的储备溶液溶解于去离子水（1 mL）中），并彻

底混合30分钟，然后在室温放置2小时。

[0140] 将HA-PE-1用于细胞测定(实施例5、实施例6、实施例7和实施例8)中。

[0141] 基于用作连接剂的EDC的量，并预期新鲜制备的EDC溶液(如上所用的)将实现几乎定量连接，预期的实施例2的连接程度是，透明质酸的约6% (上限最大值)的二糖单元已经被共价地连接的磷脂酰乙醇胺基团修饰。预见到，在EDC预先暴露于水的情况下，连接效率降低。

[0142] 实施例3. 连接的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)的制备

除了使用纯的磷脂酰乙醇胺(诸如在实施例2中)以外，也可以使用含有磷脂酰乙醇胺的脂质的混合物。例如，液体大豆卵磷脂(Soya Lecithin GT Non-GM IP, Imperial-Oel-Import)含有大约15% 磷脂酰胆碱、13% 磷脂酰乙醇胺、10% 磷脂酰肌醇、19%其它磷脂和脂质、5% 碳水化合物和38% 大豆油。这是每汤匙(14.79 mL)大约330 mg磷脂酰乙醇胺(使用EDC作为连接剂，预期大量反应的唯一脂质)。

[0143] 通过手动掺合机，在快速搅拌下，将未精制的液体大豆卵磷脂(78.5 mL; Soya Lecithin GT Non-GM IP, Imperial-Oel-Import)与透明质酸(78.5 mL, 12 mg/mL, 942 mg，约2.5 x 10^{-3} mol $-CO_2H$基团；500-2,500 kDa, 多分散的Baxyl HA, Cogent Solutions Group, Lexington, KY)和异丙醇(10 mL)在室温混合10-15分钟。加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)(22 mg, 1.4 x 10^{-4} mol; 100μL新鲜制备的、220 mg EDC在1 mL冰冷的去离子水中的储备溶液)，混合另外10-15分钟，然后在室温静置2小时。可替换地，当反应规模允许准确称重EDC时，也可以如下制备组合物：其中直接地加入EDC，即，无需制备储备溶液。在4℃保存得到的HA-PE-2，且不经进一步纯化地用于制备美容制剂(参见实施例4)，用于小鼠(参见实施例9、实施例10、实施例11和实施例13)和人(参见实施例14、实施例15、实施例16、实施例17、实施例18和实施例19)研究。

[0144] 基于用作连接剂的EDC的量，并预期新鲜制备的EDC溶液(如上所用的)将实现几乎定量连接，预期的实施例3的连接程度是，透明质酸的约5.5% (上限最大值)的二糖单元已经被共价地连接的磷脂酰乙醇胺基团修饰。预见到，在EDC预先暴露于水的情况下，连接效率降低。

[0145] 实施例4. 外用乳膏的制备

通过本领域常用于制备外用美容用和药用乳膏的合适规程，可以制备在实施例2或实施例3中制备的修饰的透明质酸的外用乳膏。下述的制备应当视作非限制性实施例。

[0146] 在掺合机中，以1:1(v/v)比例，将在实施例3中得到的凝胶HA-PE-2与商购可得的乳膏基质(NIVEA Creme；成分：水、矿物油、微晶蜡、甘油、羊毛脂醇、石蜡、泛醇、油酸癸酯、辛基十二烷醇、硬脂酸铝、柠檬酸、硫酸镁、硬脂酸镁、甲基氯代异噻唑啉酮、芳香剂)混合，并在4℃保存备用。因为没有向所述乳膏中加入额外添加剂(例如，抗微生物剂)来预防透明质酸的潜在降解，该贮存温度用作预防措施，不应视作对制剂本身的限制。

[0147] 替代性的乳膏基质，例如，OIL OF OLAY®(OLAY®Classic Moisturizing Crème；成分：水、甘油、鲸蜡醇、矿脂、环五硅氧烷、硬脂醇、棕榈酸异丙酯、聚二甲基硅氧烷、卡波姆、PEG-100硬脂酸酯、硬脂酸、氢氧化钠、DMDM乙内酰脲、碘丙炔醇丁基氨甲酸酯、EDTA、芳香剂、二氧化钛、Red 4)或L'ORÉAL®(Dermo-expertise防皱纹抗老化乳膏；成分：水、环五硅氧烷、氢化聚异丁烯、鲸蜡醇、甘油、甘油基硬脂酸酯、PEG-40硬脂酸酯、肉豆蔻基肉豆蔻酸酯、

乙基己基棕榈酸酯、奶油树奶油、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、甘氨酸大豆蛋白、对羟基苯甲酸甲酯、重氮烷基咪唑脲、生育酚乙酸酯、丙烯酸酯共聚物、对羟基苯甲酸丙酯、柠檬烯、EDTA二钠、羟基香茅醛、芳樟醇、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丁苯基甲基丙醛、鸟苷、α-异甲基紫罗兰酮、柠檬醛、丁香酚、氯苯甘醚、脱氢醋酸钠、芳香剂、FIL K29371/2)，在下述实施例中的应用，不导致修饰的透明质酸的生物活性或作用的任何差异。

[0148] 除了使用上述的或其它商购可得的乳膏以外，还可以使用通常已知的方法来制备适合外用的制剂。除了修饰的糖胺聚糖以外，还可以向所述制剂中加入其它组分，无论为了芳香，还是为了任意其它美容的、皮肤病学的或医药的性质。

[0149] 实施例5. 修饰的透明质酸(HA-PE-1)在人真皮成纤维细胞上形成增加的细胞外被

通过确定它的包围/围绕培养的真皮成纤维细胞(从人皮肤的穿孔活组织检查样品生长)的能力，评估了本组合物的适合性。将穿孔活组织检查样品放入无菌的组织培养皿(35 x 10 mm，组织培养皿)中，并用小(例如，19G)无菌针切成小片段。使所述片段在组织培养皿底部短暂地干燥(例如，不超过10分钟)，以促进组织片段的附着。然后轻轻加入补充了10% 胎牛血清(FCS)的Dulbecco氏改良的伊格尔培养基(DMEM)，再将所述培养物放入补充了5% CO_2的加湿37℃培养箱中大约1周。然后从组织培养板中取出已经长出外植块的成纤维细胞放入无菌0.025% 胰蛋白酶/EDTA混合物中，并在1.1x g轻轻离心3分钟，此后除去胰蛋白酶，并以1:5稀释度，以约50,000/孔的密度，将所述细胞铺板于在灭菌的玻璃盖玻片上的新无菌组织培养板(24孔板)中，在加湿5% CO_2气氛下，在1 mL补充了10% 胎牛血清的DMEM中。18小时以后，将细胞暴露于透明质酸溶液(500μg/mL，350 kDa)或修饰的透明质酸(HA-PE-1)(25μg/mL)1小时。将30-40 nm荧光黄聚苯乙烯纳米球(Corpuscular Inc.，Cold Spring，NY)加入孔中，并允许沉降至粘附细胞上在37℃保持30分钟。然后在新鲜制备的低聚甲醛中固定培养物，并固定在含有中空孔的载玻片上。在配有Hoffman Optics和表面荧光的Nikon Eclipse TE300倒置显微镜上，拍摄细胞的照片(参见图1)。在另一种用于检测透明质酸外被的方法(在下面用于实施例7中)中，将低聚甲醛固定的绵羊成熟红细胞加入孔中，并允许如上沉降。使用Hoffman optics，用上述的Nikon倒置显微镜，对通过该方法揭示的细胞外被拍摄照片(参见图5)。

[0150] 在图1所示的图像中，将透明质酸细胞外被观察为暗间隙，因为小荧光珠子被所述外被排除，如图像中的箭头所示。没有外被的细胞通过该测定法不可检测到，因为它们被荧光珠子完全覆盖。从图1可见，与PBS对照(图像11)相比，单独的透明质酸向培养基中的加入(图像12)，对透明质酸外被的大小几乎没有额外影响。HA-PE-1向培养基中的加入(图像13)，导致透明质酸外被的可明显观察到的增加，这通过细胞周围的荧光珠子的排除而检测到，从而产生环晕效应。

[0151] 实施例6. 修饰的透明质酸(HA-PE-1)对具有透明质酸外被的细胞的百分比和透明质酸外被大小的影响

将根据实施例2制备的修饰的透明质酸(HA-PE-1)或单独的透明质酸(350 kDA；10 mg/mL的在盐水中的储备溶液)以递增浓度(0-100μg/mL)加给衰老的人成纤维细胞。与加入单独的透明质酸不同，表现出透明质酸外被的细胞的百分比(参见图2)随着HA-PE-1浓度而增加。单独的未修饰的透明质酸的使用，导致更少的具有透明质酸外被的细胞，具有外被的

细胞的百分比在10μg/mL的浓度达到平稳状态。相比而言，修饰的透明质酸(HA-PE-1)的加入导致具有透明质酸外被的细胞的百分比的剂量依赖性增加，所以在有100μg/mL HA-PE-1存在下具有外被的细胞的百分比显著大于50μg/mL HA-PE-1(Student氏“t”检验，$p<0.01$)。在所有浓度，与单独的未修饰的透明质酸的加入相比，HA-PE-1的加入导致明显更多的具有透明质酸外被的细胞(Student氏“t”检验，$p<0.0001$)。

[0152] 使用图像分析(Elements 3.1, Nikon)，定量修饰的透明质酸(HA-PE-1; 50μg/mL)相对于单独的透明质酸(50μg/mL)的加入对细胞的细胞外被面积的影响。在这些浓度，与单独的HA相比，修饰的透明质酸(HA-PE-1)的施用显著增加了平均透明质酸外被大小/细胞(Student氏“t”检验，$p<0.05$)(参见图3)。值是10个样品的平均值和标准误。

[0153] 实施例7. 修饰的透明质酸(HA-PE-1)的包被没有透明质酸受体的小鼠胚胎成纤维细胞的能力

透明质酸通常通过与透明质酸受体(诸如CD44、RHAMM、LYVE-1和Toll-样受体2、4)的相互作用而结合细胞。小鼠胚胎成纤维细胞选择性地表达CD44和RHAMM，这2种受体负责这些细胞的结合透明质酸和产生透明质酸外被的能力。

[0154] 从CD44-/-、RHAMM-/-和CD44-/-:RHAMM-/- 胚胎(第14天)，即，分别没有CD44、RHAMM、以及CD44和RHAMM透明质酸受体的胚胎，分别纯化小鼠胚胎成纤维细胞，并通过有限稀释，获得永生化的克隆。将根据实施例2制备的修饰的透明质酸(HA-PE-1)或单独的透明质酸加入在实施例5中描述的培养基中。与使用荧光纳米球观察细胞外被的实施例5不同，使用固定的绵羊红细胞观察透明质酸细胞外被，所述绵羊红细胞用作颗粒，且从培养皿底部排除，无论细胞在哪里形成透明质酸外被，使用Hoffman optics而不是表面荧光观察它们。没有形成外被的细胞被埋在红细胞下面，在检测条件下不可见。缺少红细胞的区域代表含有小鼠胚胎成纤维细胞的细胞，其含有透明质酸外被。为图4中的图所得到的值是每种处理和基因型的10个样品的平均值和标准误。

[0155] 如图5所观察的，与用单独的透明质酸处理的细胞(图像54(RHAMM-/-细胞)、55(CD44-/-细胞)、56(RHAMM-/-:CD44-/-细胞))相比，修饰的透明质酸(HA-PE-1)的加入(图像51(RHAMM-/-细胞)、52(CD44-/-细胞)、53(RHAMM-/-:CD44-/-细胞))增加了透明质酸外被的大小和含有透明质酸外被的细胞的数目。本发明的修饰的透明质酸(HA-PE-1)的能力没有表现出对成纤维细胞共有的透明质酸受体的表达的依赖性，因为CD44或RHAMM受体(2种最普遍的透明质酸受体)中的任一种或两种的丢失没有显著地影响具有透明质酸外被的细胞的数目(参见图像51(RHAMM-/-细胞)、52(CD44-/-细胞)、53(RHAMM-/-:CD44-/-细胞)和图4)。此外，与加入盐水(图像未显示，结果被包括在图4中)或透明质酸(500μg/mL; 350kDa)相比，修饰的透明质酸(HA-PE-1)的施用，显著地增加了所有基因型中具有透明质酸外被的细胞的百分比(Student氏“t”检验，$p<0.001$)。

[0156] 上述体外试验(实施例5、实施例6和实施例7)指示，共价地连接的透明质酸磷脂衍生物(例如，HA-PE-1)能够比未修饰的透明质酸更好地提供细胞外被。HA-PE-1的结合不表达透明质酸受体的小鼠胚胎成纤维细胞的能力，提示本发明的修饰的透明质酸不需要与透明质酸受体的相互作用来与细胞膜结合，并可能将它的脂质尾直接插入细胞膜的磷脂层中。这不排除修饰的透明质酸与透明质酸受体(如果它们被细胞表达的话)的结合。在缺少CD44和RHAMM表达的细胞中观察到的大细胞外被进一步提示，修饰的透明质酸-细胞相互作

用是稳定的。

[0157] 实施例8. 使用修饰的透明质酸组合物增强SKL-过氧化氢酶功能

SKL-过氧化氢酶是一种遗传修饰的酶，其比未修饰的内源过氧化氢酶更有效地还原细胞内的活性氧(ROS)。为了减少由ROS(其促进老化)导致的毒性，过氧化氢酶是必需的。SKL-过氧化氢酶的一种功能是，减少由ROS导致的透明质酸的片段化。通过使用本发明的组合物，已经发现，本文所述的磷脂酰乙醇胺-透明质酸缀合物能够增强SKL-过氧化氢酶的功能。

[0158] 使用SKL衍生化过氧化氢酶重组蛋白(人红细胞, 10μg/mL, Sigma)，以允许进入细胞中[21]。将形成的SKL-过氧化氢酶与HA-PE-1混合，并加给衰老的人成纤维细胞培养物。得到的图像(参见图6)指示，就用实施例2的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-1)和SKL-过氧化氢酶处理过的细胞(图像63)而言，细胞外被大于仅加入SKL-过氧化氢酶(图像61)或HA-PE-1(图像62)时形成的那些。这些结果指示，本发明的透明质酸组合物增强SKL-过氧化氢酶对ROS产生的影响，这基于增加的细胞外被大小的观察结果。这些结果提示，本发明的透明质酸衍生物能够捕获多种蛋白并将它们保留在细胞表面处，这与本发明的组合物通过分子网-型机制起作用相一致。

[0159] 下述实施例(实施例9、实施例10、实施例11和实施例12)证实，本发明的组合物在外部施用以后能够穿过小鼠的皮肤屏障。据信，该模型足以合理地预测本发明的组合物类似地穿过人类皮肤屏障的能力。

[0160] 实施例9. 将HA-PE-2外部地施用给小鼠

用在实施例4中所述的NIVEACreme乳膏基质配制(1:1 v/v)HA-PE-2(如在实施例3中所述制备)。然后将所述乳膏施用(0.18 g HA-PE-2/施用)于9-月龄雌性小鼠(BL6品系，40 x 30 mm的剃毛皮肤区域)的剃毛后背，每天1次，持续4天。施用与大豆卵磷脂混合(1:1)的乳膏基质作为对照。在第15天，将小鼠安乐死，使用8 mm活组织检查穿孔机，获取处理过的皮肤，在新鲜制备的4% 低聚甲醛/磷酸盐缓冲盐水中固定。将固定的组织埋入石蜡中，切片，并使用Echelon®试剂盒(透明质酸ELISA试验试剂盒, Echelon)进行透明质酸染色。与仅施用乳膏的皮肤中的那些相比($p<0.00001$, Student氏"t"检验)，施用HA-PE-2的皮肤中的角质形成细胞的透明质酸被染成更深色，且具有比对照小鼠中更厚的表皮层。使用图像分析(Elements 3.1, Nikon)，定量透明质酸染色的密度。图7提供了处理(图像71和72)和对照(图像73和74)的皮肤切片的图像。通过计算图像像素密度(如图8中的附图所示)，证实角质形成细胞中的透明质酸存在的增加。在HA-PE处理过的和对照动物中，小鼠的基础真皮层含有高水平的透明质酸(参见图8)。这些结果指示，本发明的修饰的透明质酸穿透皮肤屏障，并结合在至少真皮角质形成细胞层内。值是每种处理的4只小鼠的平均值和标准误。

[0161] 实施例10. HA-PE-2和透明质酸的穿透小鼠皮肤屏障的能力的对比。

[0162] 如实施例3所述制备的HA-PE-2，与实施例3呈现的卵磷脂中的脂质相混合、但是没有共价地连接的透明质酸(参见实施例1)，和单独的透明质酸(没有额外的磷脂)，各自用在实施例4中描述的NIVEA Creme美容乳膏基质(1:1, v/v)进行配制。然后将所述乳膏施用(0.18 g HA-PE-2/施用，40 x 30 mm剃毛区域)于9-月龄雌性BL6野生型小鼠的剃毛后背，每天1次，持续4天。该时间以后，将一组动物安乐死，并根据在实施例9中描述的规程进行处理。第二组动物不经进一步处理地放置另外2天，并在第7天如在实施例9中所述安乐死/处

理。在图9和量化能够穿透皮肤屏障的透明质酸的量的附图(图10)中的图像指示,与使用透明质酸和磷脂酰乙醇胺的混合物(图像92)或单独的透明质酸(图像93)相比,用HA-PE-2处理的小鼠具有显著更强的透明质酸染色(图像91),前二者表现出与HA-PE-2相比可忽略的量的穿透皮肤屏障的透明质酸(Student氏"t"检验,$p<0.000001$)。在处理停止以后,在角质形成细胞中存在的透明质酸的量逐渐下降,如在用HA-PE-2处理的小鼠中的透明质酸染色的减少所示(参见图像94和图10)。如预期的,在其它小鼠中的透明质酸染色的量(参见图像95和96和图10)仍然是可忽略的。

[0163] 这些结果证实了,在美容乳膏基质中,与使用透明质酸和存在于大豆卵磷脂中的脂质(包括磷脂酰乙醇胺)的混合物相比,或与单独的透明质酸相比,本发明的修饰的透明质酸组合物的穿透皮肤屏障能力的增强。更重要的是,能够穿透皮肤屏障的修饰的透明质酸被保留在角质形成细胞层内,与本发明的修饰的透明质酸组合物与细胞结合的能力增加一致,正如在实施例5中所证实的。如上所述,Brown等人[14]在以前已经报道了类似大小的透明质酸片段对皮肤屏障的穿过,但是,该透明质酸可容易地进入全身循环中,并从体内消除。Kaya等人[5]已经报道了类似的发现,他们同样示出,50-400 kDa透明质酸可以穿过表皮以及也增加角质形成细胞层厚度,但是施用的透明质酸(使用标签化的透明质酸)不保留在表皮内,迅速地从真皮流失,且需要细胞的CD44表达而发挥功能效应。本结果进一步证实,如果未修饰的透明质酸确实发生皮肤穿透,它不在可察觉的程度上保留在皮肤内,因此不能以补充皮肤内的透明质酸水平的方式起作用。

[0164] 由于皮肤内的内源透明质酸的量可以随位置而变化,开发了用于评价处理过的皮肤和对照皮肤的透明质酸染色的内部对照,以证实处理过的相对于未处理的皮肤区域之间的差异。如以前所述,将HA-PE-2和对照乳膏(仅透明质酸)施用于小鼠的剃毛后背上。标记处理的区域(用Nair™除去在未处理的边缘附近的毛,并对齐穿孔机,以包括处理过的和未处理的区域;组织穿孔机朝向小组织放置篮,以保持组织在整个处理中的正确定向,并用组织学标记笔进行标记),并如前(实施例9)所述收获/处理组织。形成的样品指示(参见图11;用箭头指示施用边缘,用虚线指示施用区域),当施用单独的透明质酸时,没有观察到明显的染色边缘(图像111),这证实,施用的透明质酸非常少地(如果有的话)穿透/保留在施用区域中。相比而言,在HA-PE-2施用边缘处,观察到明显的染色边界(图像112),在处理过的相对于未处理的皮肤区域中明显更高(Student氏"t"检验,$p<0.000001$)。如图12中的附图所量化的,这些结果证实,本发明的修饰的透明质酸组合物在施用部位处穿透和积累在表皮内,并提示,这保持局部化在最初的施用区域。

[0165] 实施例11. 在没有透明质酸受体的小鼠中,使用HA-PE-2替代透明质酸细胞外被

将含有HA-PE-2的乳膏(0.18 g HA-PE-2,如以前所述制备)每天施用(40 x 30 mm剃毛面积)于9月龄雌性RHAMM-/-小鼠(表达CD44透明质酸受体、但是不表达RHAMM透明质酸受体的小鼠)的剃毛后背,持续4天。在处理后第5天,将动物安乐死,并如在实施例9中所述,收获处理过的皮肤。施用单独的乳膏基质的小鼠皮肤用作对照。如图13、图像131和132和附图所示,HA-PE-2处理过的表皮(图像131)以比对照皮肤(图像132)明显更大的程度保留透明质酸(Student氏"t"检验,$p<0.000001$),所述对照皮肤表现出可忽略的透明质酸水平。值代表4只小鼠的平均值和标准误。

[0166] 还如上所述,将HA-PE-2施用于9月龄雌性CD44-/-:RHAMM-/-小鼠(其既不表达

CD44也不表达RHAMM透明质酸受体;如Tolg等人[22]所述开发)的剃毛后背,并使用类似的对照。如图14、图像141和142和附图所示,处理过的皮肤(图像141)与对照皮肤(图像142)相比在表皮层中积累明显更多的透明质酸。值代表4只小鼠平均值和标准误。这指示,本发明的修饰的透明质酸组合物不需要透明质酸受体(CD44和RHAMM,它们是皮肤中的主要受体)以便与角质形成细胞结合。这些结果与已知的磷脂酰乙醇胺插入细胞膜中的能力一起指示,修饰的透明质酸直接嵌入细胞膜中,无需透明质酸受体的辅助。RHAMM-/- (CD44 +)小鼠(图13)与透明质酸受体阴性的(CD44-/-:RHAMM-/-)小鼠(图14)之间的表皮层内源透明质酸和HA-PE-2染色对比表明,与两种透明质酸受体都缺失时相比,当表达CD44时,内源透明质酸(图像132和142)和HA-PE-2(图像131和141)处理过的表皮的染色更大。这些结果提示,CD44受体的存在稳定化内源的和透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)外被,这与已知的CD44受体参与促进培养的细胞中的内源透明质酸外被相一致。

[0167] 实施例12. 本发明组合物与WO 2003/015755所述的微粒磷脂酰乙醇胺-透明质酸材料的对比

使用Margalit在WO 2003/015755中描述的方法,制备了微粒(纳米球和微球)磷脂酰乙醇胺-透明质酸缀合物。

[0168] 用2 mL大豆卵磷脂涂布烧杯。通过降低pH至4.5和然后加入EDC(2.5 mg, 1.6 x 10^{-5} mol;得自新鲜制备的储备溶液),活化透明质酸(2 mL, 12 mg/mL, 6.3 x 10^{-5} mol -CO_2H基团;500-2,500 kDa多分散的, Baxyl™, Cogent Solutions Group),此后将被活化的透明质酸加入卵磷脂涂布的烧杯中,然后加入去离子水(1 mL),并用NaOH调节pH至8.6。在37℃温育形成的混合物,并翻转摇动过夜,此后,将pH调至7.2,并将该混合物声处理10分钟,在1.2 x 10^5 g力在40℃离心2次40分钟,以分离出微粒物。基于使用的新鲜制备的EDC储备溶液的量,估测磷脂酰乙醇胺和透明质酸之间的预期理论最大连接量是约25%。将得到的材料直接加至载玻片,并以与本发明所述的相同方式与乳膏基质混合,此后将它应用于载玻片。

[0169] 将使用Margalit以前在专利文献中描述的方法制备的微粒样品与本发明的组合物进行了对比。将在实施例3中描述的透明质酸-磷脂酰乙醇胺缀合物(HA-PE-2)直接施用于制备的载玻片,作为与也施用于载玻片上的实施例4所述的乳膏基质(NIVEA Creme乳膏基质)的1:1混合物。

[0170] 用盖玻片覆盖所有样品,并在Nikon TE300倒置显微镜上在40X使用Hoffman optics进行检查,得到的图像如图15所示。在图像153(直接施用)和154(乳膏制剂)中明显地观察到根据Margalit在WO 2003/015755中描述的方法制备的微粒组合物的囊泡或微粒性质。但是,如图像151和152所示,本发明的组合物没有指示类似地自装配的物质的存在。

[0171] 本发明的主要用途是,作为将透明质酸递送至皮肤的表皮层和真皮层的媒介物,其中它可以用于补充缺少存在的透明质酸量的皮肤区域。

[0172] 在制备本发明的修饰的透明质酸(例如,如实施例2或实施例3所述)以后,可以按照本领域已知的方法和规程,或通过使用如实施例4所述的商业的或其它储备美容乳膏,制备制剂。除了包括本发明的修饰的透明质酸组合物以外,制剂还可以包括其它美容活性成分,诸如在商业的皮肤乳膏内常见的那些,包括已知辅助年轻化皮肤外观的那些,例如,维生素、氨基酸、辅酶、β-葡聚糖、多核苷酸、自由基清除剂、生长因子、雌激素和脂肪形成因子

以及其它。制剂还可以包括：透明质酸酶抑制剂的加入[23]以降低皮肤内的透明质酸分解速率，或RHAMM抑制剂的加入，已经证实其诱导在老化过程中丢失的皮下脂肪细胞的产生[22]。另外，制剂可以包括药学活性成分，特别是用于治疗皮肤病症(诸如皮肤癌、接触性皮炎、银屑病和湿疹)的活性成分。因此，本发明提供了一种用于实现局部化的外用治疗的方法，其用于递送药物，而不是通过口服或静脉内剂型进行全身给药，也不需要注射来提供皮下或真皮内给药。

[0173] 在本发明的另一个方面，还可以使用衍生化的糖胺聚糖来运输蛋白穿过皮肤屏障。该运输能力是意外的，且被认为足以实现小(700 Da)至大(400-500 kDa)蛋白向至少皮肤的真皮层和表皮层以及下面肌肉的靶向递送。因而，本发明的组合物可以用于通过外部施用另外提供美容上重要的大蛋白，诸如Botox™，由此消除对一系列注射的需求。本发明的真皮递送蛋白的能力，也允许外部地施用：治疗蛋白，诸如透明质酸酶和RHAMM抑制剂；干扰素或抗炎蛋白/细胞因子；抗-皮肤癌治疗，诸如抗体、重组蛋白、蛋白片段和肽；和使用肽/蛋白的疫苗接种，由此提供对局部区域的治疗，而不是通过全身或注射给药途径，预期这减少或消除通常与全身性治疗有关的副作用的发生。同样，本发明的组合物可以用于递送酶，诸如透明质酸合酶，以辅助皮肤内的透明质酸产生。另外，通过该方法，可以外部地施用其它大分子，诸如DNA、RNA或cDNA。

[0174] 尽管以前已经描述了脂质化的糖胺聚糖用作蛋白的递送媒介物的用途(例如，Margarlit和Peer在WO 03/015755中)，这些实施例包括将蛋白包埋在自装配的微粒结构内。基于本发明的组合物的作用和迄今为止已经进行的实验的结果(如在前述实施例中所述)，据信，不同于本领域已知的蛋白递送的现有描述，本文所述的组合物不依赖于包囊机理，因为本组合物没有表现出机化方式的自装配。相反，据信，本发明的组合物能够通过在蛋白周围和在蛋白内的脂质化糖胺聚糖的未机化的缠结机理而促进蛋白穿过皮肤屏障递送。在下述实施例中描述了本发明的提供真皮蛋白递送的能力。

[0175] 实施例13．使用修饰的糖胺聚糖(HA-PE-2)运输RHAMM蛋白穿过皮肤屏障

以与在实施例4中所述相同的方式，在NIVEA Creme乳膏基质中，将鼠GST-RHAMM(35μg，得自1 mg/mL储备溶液)、84 kDa标记的蛋白、或单独的鼠GST(26 kDa)(35μg，得自3 mg/mL储备溶液)与HA-PE-2(0.18 g)相混合。使用透明质酸在含有蛋白的NIVEACreme乳膏基质中的制剂作为对照。每天将0.18 g处理(含有35μg蛋白)和对照乳膏施用于9-月龄雌性BL6野生型小鼠背上的40 x 30 mm的剃毛皮肤区域，持续5天，在第6天将小鼠安乐死。使用8 mm活组织检查穿孔机，收获皮肤块，并将该组织在新鲜制备的4% 低聚甲醛中固定，然后用石蜡处理。与活组织检查组织垂直地切割8μm切片，并使用在山羊中制备的抗-GST抗体将切片进行GST染色。使用生物素化的山羊抗-兔抗体、链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶和Dab，使结合的抗体显影，当抗-GST抗体与载玻片结合时，这生成褐色染色。还使用GST而不是RHAMM抗体来检测GST-RHAMM，因为皮肤通常不表达GST。样品的显影(参见图16)指示，当用本发明的组合物递送时，GST-RHAMM被携带穿过小鼠皮肤屏障，并到达下面肌肉层(图像161)，而在含有未修饰的透明质酸的对照样品中，在角质形成细胞层中几乎没有检测到GST-RHAMM(图像163)。在图17中的附图中量化了到达角质形成细胞层和下面肌肉的GST-RHAMM的相对量，所述量代表5只小鼠的平均值。对于更小的GST蛋白(26 kDa)，观察到类似的结果(参见图16、图像162，用HA-PE-2递送，和图像164，用未修饰的透明质酸递送)。

[0176] 以前，认为使用穿透促进剂对蛋白的透皮递送限于小于10,000 Da。已经提出大量方法来尝试促进蛋白和肽的外部和透皮递送，诸如脂质体、促进剂诸如醇、DMSO、单萜烯和脂肪酸酯、前体药物的物理修饰、和物理方法用于增加皮肤渗透的用途(例如，乙醇-水水合、剥离外角质形成细胞层)和化学递送方式(例如，皮肤的电和热处理)，它们证实了透皮递送的困难和对有效的且实用的递送方法的需求。这样的方法由例如，Sugino等人，[24] Skountzou和Kang，[25]和Antosova等人，[17]以及其它所述。因此，使用本发明组合物的蛋白递送方法代表递送蛋白穿过皮肤屏障的能力的显著提高。尽管根据本发明可以修饰任意糖胺聚糖以便用作蛋白和/或其它药学上或美容上需要的材料穿过皮肤屏障的载体，通常优选地使用透明质酸作为糖胺聚糖，这是由于它在皮肤中的天然存在和以高分子量的容易可用性。

[0177] 除了它们在递送蛋白穿过皮肤屏障中的用途以外，本发明的糖胺聚糖组合物还可以用于递送其它生物大分子穿过皮肤屏障。其它生物大分子包括，例如多肽(包括酶)、蛋白聚糖、碳水化合物/多糖、核酸链、蛋白和肽治疗剂、反义治疗剂、生物活性的人工聚合物和生物活性的脂质聚合物。

[0178] 尽管在实施例13中运输穿过皮肤屏障的蛋白是84 kDa，这被认为是限制尺寸(已知RHAMM二聚化和三聚化，而也自结合的GST促进RHAMM与它自身的聚集；因而运输的蛋白的实际大小可以最高达255 kDa(GST-RHAMM三聚体))，选择它是因为它的可用性和与Botox™(150 kDa)的大小相似性，所述Botox™是在本发明的美容用途中的一种感兴趣的蛋白。预期在合适的生物大分子的选择中的主要限制因素不是大小，而是它们的被缠结在分子网(认为其由本发明的糖胺聚糖组合物形成)内的能力。因而，随着大小的增加，预期基本上直链的生物大分子(例如，胶原片段)比类似大小的非直链生物大分子(例如，蛋白)更不易更大程度地运输。

[0179] 下述实施例(它们无意限制本发明的范围)证实了当用于外用治疗遭受多种皮肤相关病症的人受试者时，上述修饰的透明质酸(HA-PE-2)的有效性。

[0180] 实施例14．皱纹的治疗

手上的皮肤通常比任意其它皮肤位置更快速地老化，这部分地归因于皮下脂肪层的缺乏，所述皮下脂肪层在为真皮成纤维细胞提供细胞因子和生长因子方面是重要的。手皮肤也比例如脸上的皮肤更薄。

[0181] 用根据实施例4制备的、与NIVEA Creme乳膏基质相混合的2.5 mL HA-PE-2治疗59-岁女性的手，每天2次，持续10天。在开始治疗期之前，手皮肤具有小纤维化疤痕或皱纹和干燥的/鳞片状的外观；在治疗以后，手皮肤更发光，已经失去干燥的鳞片状外观，且纤维化瘢痕形成已经急剧减少。在停止治疗2周内，治疗区域已经恢复至干燥的外观，但是小疤痕没有再次出现。

[0182] 实施例15．与光化性角化病有关的炎症的治疗

以前用液氮治疗过光化性角化病病变的受试者用与根据实施例4的NIVEA Creme乳膏基质相混合的含有HA-PE-2的乳膏治疗。所述治疗如下构成：将约2.5 mL乳膏施用于它的头皮的一侧，每天1次，持续7-10天，然后用氮处理，以除去病变。在治疗过程中，炎症显著地减轻，与除去病变的皮肤科医师提供的皮肤乳膏相比，在治疗区中的病变的治愈率增加。该发现与下述证据相一致：天然的或高分子量的透明质酸具有抗炎性质，这是皮肤内的天然存

在的透明质酸的功能之一[6]。

[0183] 实施例16．干燥的面部皮肤的处理

对易生痤疮的25岁女性执行全身性维A酸方案。该处理与每天在氯化池中游泳一起，导致非常干燥的且疼痛的面部皮肤，尤其是在嘴周围的破裂的且鳞状的皮肤。用根据实施例4制备的、与OIL OF OLAY™乳膏基质相混合的HA-PE-2处理该受试者，持续1周。在治疗期结束时，面部皮肤的干燥外观和有关的疼痛已经消失。所述处理没有积极地或消极地影响下面的痤疮。

[0184] 实施例17．瘢痕皮肤的治疗

为由于多年演奏中提琴而在他的肩上具有纤维化瘢痕形成的专业音乐家施用根据实施例4制备的、含有HA-PE-2的乳膏，通过将约2.5 mL乳膏揉搓进瘢痕皮肤中实施，每天1次，持续30天。在治疗期结束时，已经存在多年的瘢痕形成已经消失。

[0185] 实施例18．手指上的破裂皮肤的治疗

用根据实施例4制备的、含有HA-PE-2的组合物，治疗许多音乐家(演奏大提琴、小提琴、中提琴和钢琴)的手指上的破裂皮肤。在弦乐器音乐家中，拇指皮肤在冬季特别破裂，这是由于在干燥的寒冷季节中演奏乐器时对弓弦施加的压力。在钢琴家中，特别是在老年音乐家中，破裂经常出现在指尖皮肤处，这可能部分地归因于在实践过程中施加在指尖上的压力。

[0186] 将用HA-PE-2和NIVEA Creme乳膏基质制备的乳膏(约1 mL)(根据实施例4制备)施用于3位弦乐器音乐家和2位钢琴家的破裂的指尖，导致破裂皮肤在3-4天内消失。在过去使用其它乳膏，包括在实施例4中使用的NIVEA Creme乳膏基质，对破裂皮肤的愈合没有效果。

[0187] 实施例19．足跟上的破裂皮肤的治疗

随着年龄的增长，足跟上的皮肤经常变厚且易于破裂，特别是在寒冷的干燥的冬季期间。3个年龄在55-65岁的个体具有严重破裂的足跟，造成行走时疼痛，每天晚上，将约2.5 mL根据实施例4制备的含有HA-PE-2的乳膏与NIVEA Creme乳膏基质一起施用于他们的足跟，持续5-7天。每个个体在2-3天内注意到他们的状况的改善，包括无痛行走能力。在治疗停止以后，治疗益处在5-7天内消失。重新施用乳膏2-3天，再次减轻了每个个体的破裂和疼痛的严重性。单独的乳膏基质的使用不提供对任何个体的缓解。

[0188] 实施例20．面部皮肤的治疗

将根据实施例4制备的含有HA-PE-2的乳膏与NIVEA Creme乳膏基质一起给3个个体施用于面部皮肤，每天1-2次。在开始治疗1周内，观察到皮肤光度和光滑的增加。在该时间期间，皮肤表现出增加的水合(在冬季施用，这时较低温度导致更干燥的皮肤)，且眼周围的小皱纹已经消失。在继续治疗1个月以后，最初观察到的效果得到增强，且皮肤具有较厚的外观，特别是在眼周围，且在唇周围的皱纹外观减轻。在治疗期终止以后，治疗区恢复至它们以前的干燥状态，在眼和唇周围的皱纹逐渐重新出现。

[0189] 由于可以对上述的实施方案做出许多变化而不脱离本发明的范围，在本文中包含的所有材料意图解释为本发明的示例，且不具有限制含义。

[0190] 在前面的描述中引用的文件如下：

HBdocs - 10232853v1

[1] Fisher, G. J.; Varani, J.; Voorhees, J. J. *Archives of Dermatology.* **2008**, *14495)*, 666-6672.

[2] Verdier-Sérvrain, S.; Bonté, F. *Journal of Cosmetic Dermatology* **2007**, *6(2)*, 75-82.

[3] Baumann, L. *Journal of Pathology* **2007**, *211(2)*, 241-251.

[4] Tammi, M. I.; Day, A. J.; Turley, E. A. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277(7)*, 4581-4584.

[5] Kaya, G.; Tran, C.; Sorg, O.; Hotz, R.; Grand, D.; Carraux, P.; Didierjean, L.; Stamenkovic, I.; Saurat, J.-H. *PLoS Medicine* **2006**, *3*, e493 (2291-2303).

[6] Stern, R.; Maibach, H. I. *Clinics in Dermatology* **2008**, *26*, 106-122.

[7] Wiest, L.; Kerscher, M. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (JDDG)* **2008**, *6(3)*, 176-180.

[8] Masferrer, J. P.; Mejía, M. M.; Fernández, M. V.; Astudillo, A. A.; Armenteros; A. L. H.; Hernández, V. M.; Pérez, R. S.; Ferre, A. M. *Clinical & Translational Oncology.* **2010**, *12*, 43-48.

[9] Tzellos, T. G.; Klagas, I.; Vahtsevanos, K.; Triaridis, S.; Printza, A.; Kyrgidis, A.; Karakiulakis, G.; Zouboulis, C. C.; Papakonstantinou, E. *Experimental Dermatology* **2009**, *18*, 1028-1035.

[10] Yu, Q.; Banerjee, S. D.; Toole, B. P. *Developmental. Dynamics.* **1992**, *193(2)*, 145-151.

[11] Rilla, K.; Tolhonen, R.; Kultti, A.; Tammi, M.; Tammi, R. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2008**, *56(10)*, 901-910.

[12] Buchanan, E. P.; Longaker, M. T.; Lorenz, H. P. *Advances in Clinical Chemistry* **2009**, *48*, 137-161.

[13] Webber, J.; Meran, S.; Steadman, R.; Phillips, A. The *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284(14)*, 9083-9092.

[14] Brown, T. J.; Alcorn, D.; Fraser, J. R. E. *The Journal of Investigative Dermatology* **1999**, *113*, 740-76.

[15] Zhang, L.-S.; Greyner, H. J.; Mummert, M. E. *Journal of Dermatological Science* **2009**, *55*, 56-59.

[16] Iorizzo, M.; De Padova, M. P.; Tosti, A. *Clinics in Dermatology* **2008**, *26*, 177-181.

[17] Antosova, A.; Mackova, M.; Kral, V.; Macek, T. *Trends in Biotechnology* **2009**, *27*, 628-635.

[18] Gebhardt, C.; Averbeck, M.; Diedenhofen, N.; Willenberg, A.; Anderegg, U.; Sleeman, J. P.; Simon, J. C. *Journal of Investigative Dermatology* **2010**, *130*, 141-149.

[19] Tolg, C.; Poon, R.; Foode. E.; Turley, E. A.; Alman, B. A. *Oncogene* **2003**, *22*, 6873-6882.

[20] Tolg, C.; Hamilton, S. R.; Nakrieko, K.-A.; Kooshesh, F.; Walton, P.; McCarthy, J. B.; Bissell, M. J.; Turley, E. A. *Journal of Cell Biology* **2006**, *175(6)*, 1017-1028.

[21] Koepke, J. I.; Nakrieko, K.-A.; Wood, C. S.; Boucher, K. K.; Terlecky, L. J.; Walton, P. A.; Terlecky, S. R. *Traffic* **2007**, *8*, 1590-1600.

[22] Tolg, C.; Hamilton, S. R.; Nakrieko, K.-A.; Kooshesh, F.; Wlaton, P.; McCarthy, J. B.; Bissell, M. J.; Turley, E. A. *Journal of Cell Biology* **2006**, *175(6)*, 1017-1028.

[23] Girish, K. S.; Kemparaju, K.; Nagaraju, S.; Vishwanath, B. S. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 2261-2288.

[24] Sugino, M.; Todo, H.; Sugibayashi, K. *Yakugaku Zasshi* **2009**, *129(12)*, 1453-1458 (abstract).

[25] Skountzou, I.; Kang, S.-M. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **2009**, *333*, 347-368.

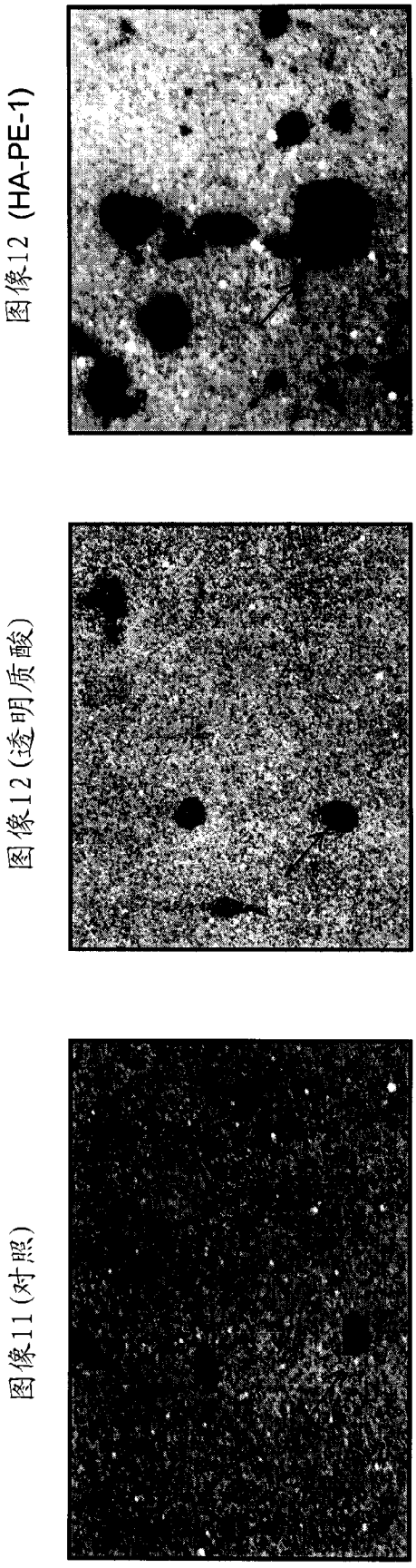


图 1

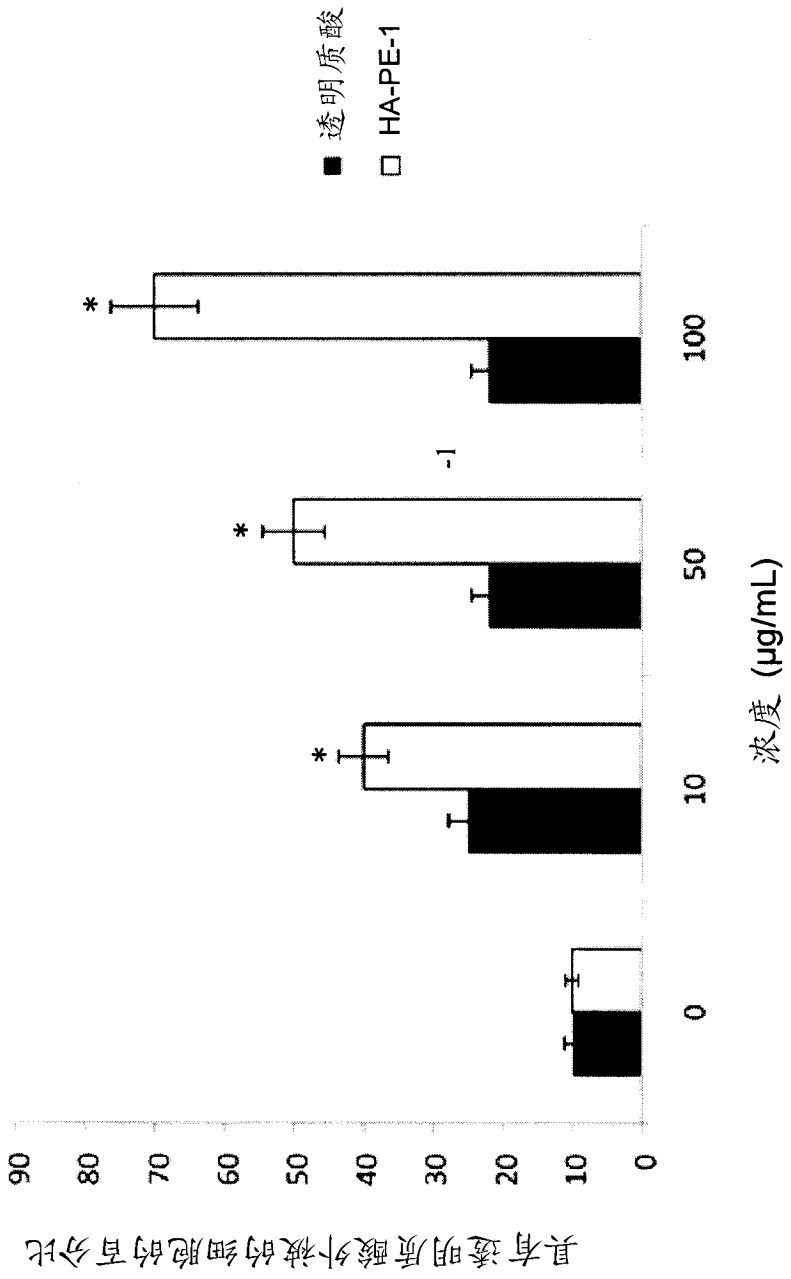

透明质酸
HA-PE-1
*
*
*
0
10
50
100
浓度 (μg/mL)
具有透明质酸外被的细胞的百分比
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

图 2

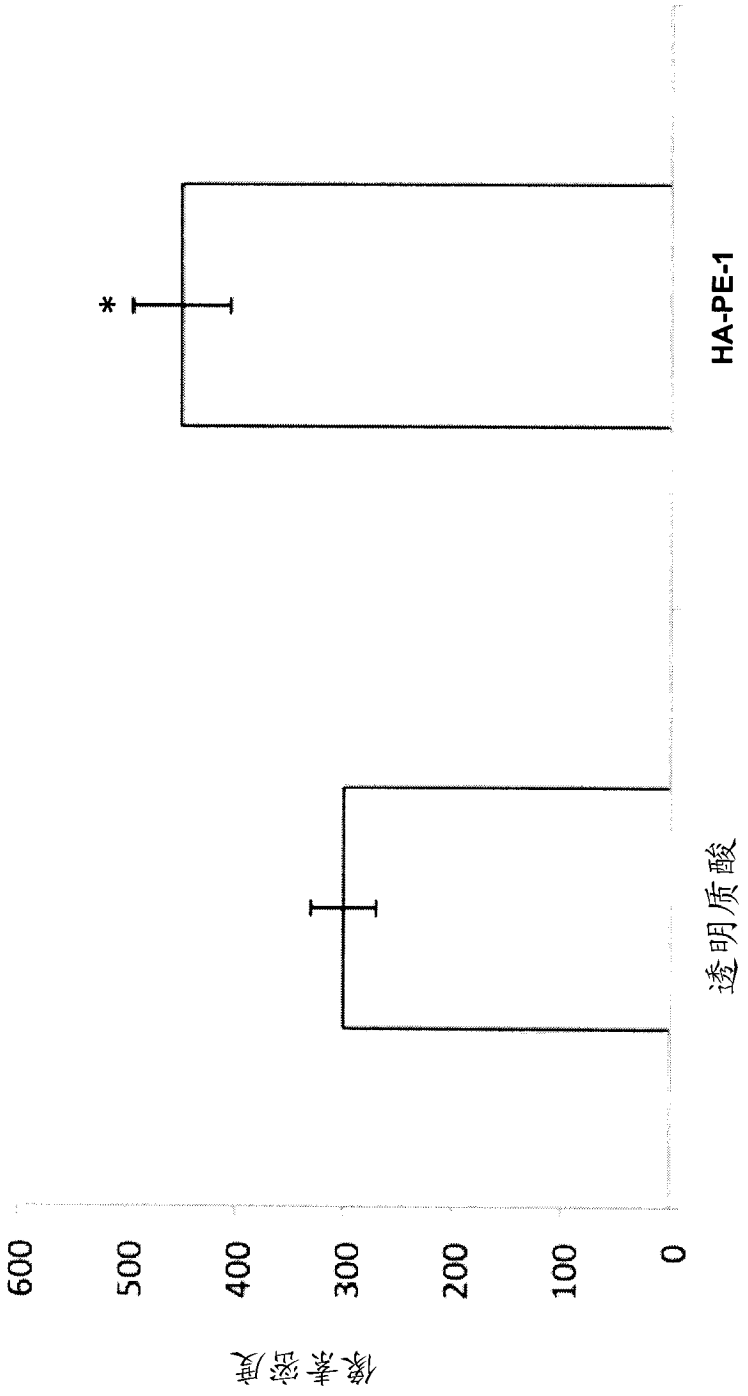


图 3

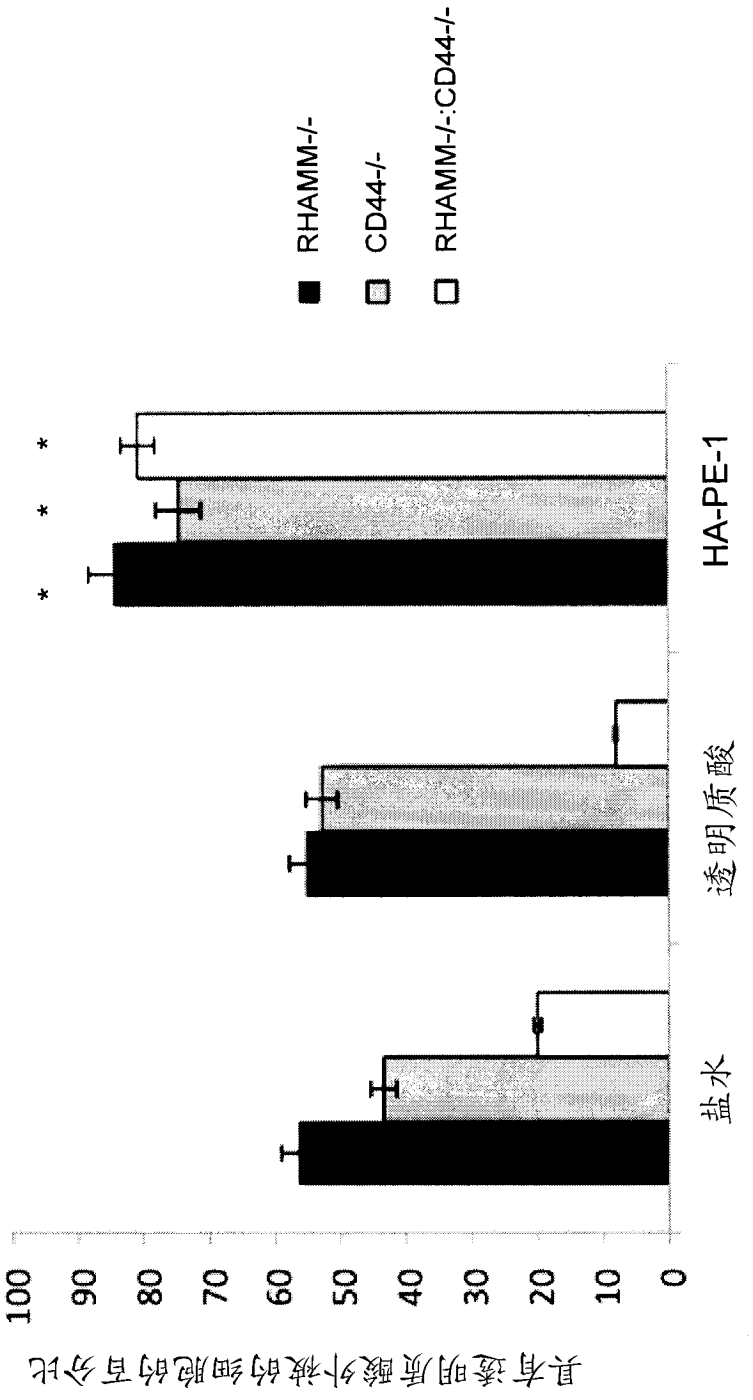

RHAMM-/-
CD44-/-
RHAMM-/-:CD44-/-
HA-PE-1
透明质酸
盐水
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
具有透明质酸外被的细胞的百分比
*
*
*

图 4

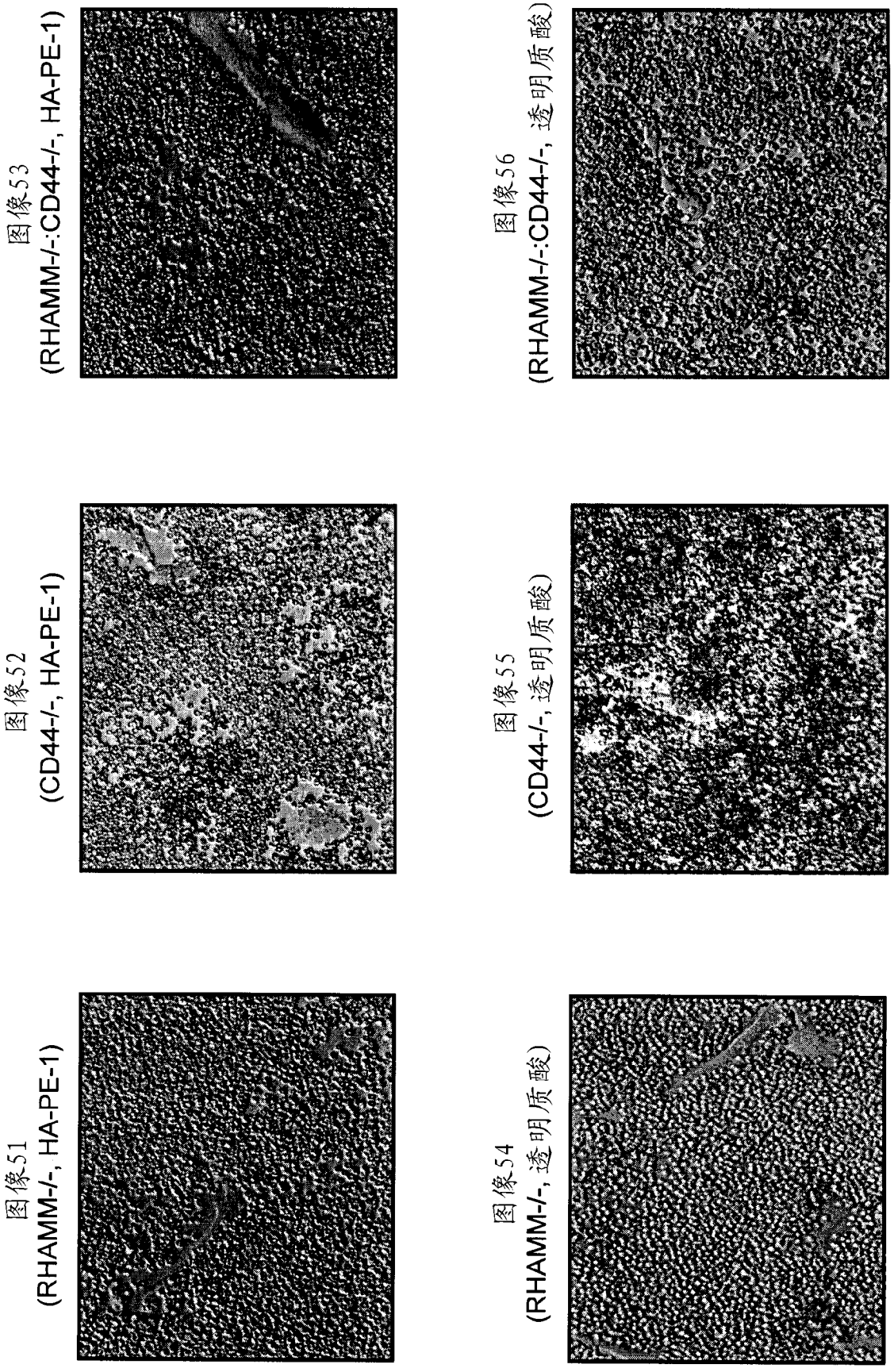

图像51
(RHAMM-/-, HA-PE-1)
图像52
(CD44-/-, HA-PE-1)
图像53
(RHAMM-/-:CD44-/-, HA-PE-1)
图像54
(RHAMM-/-, 透明质酸)
图像55
(CD44-/-, 透明质酸)
图像56
(RHAMM-/-:CD44-/-, 透明质酸)

图 5

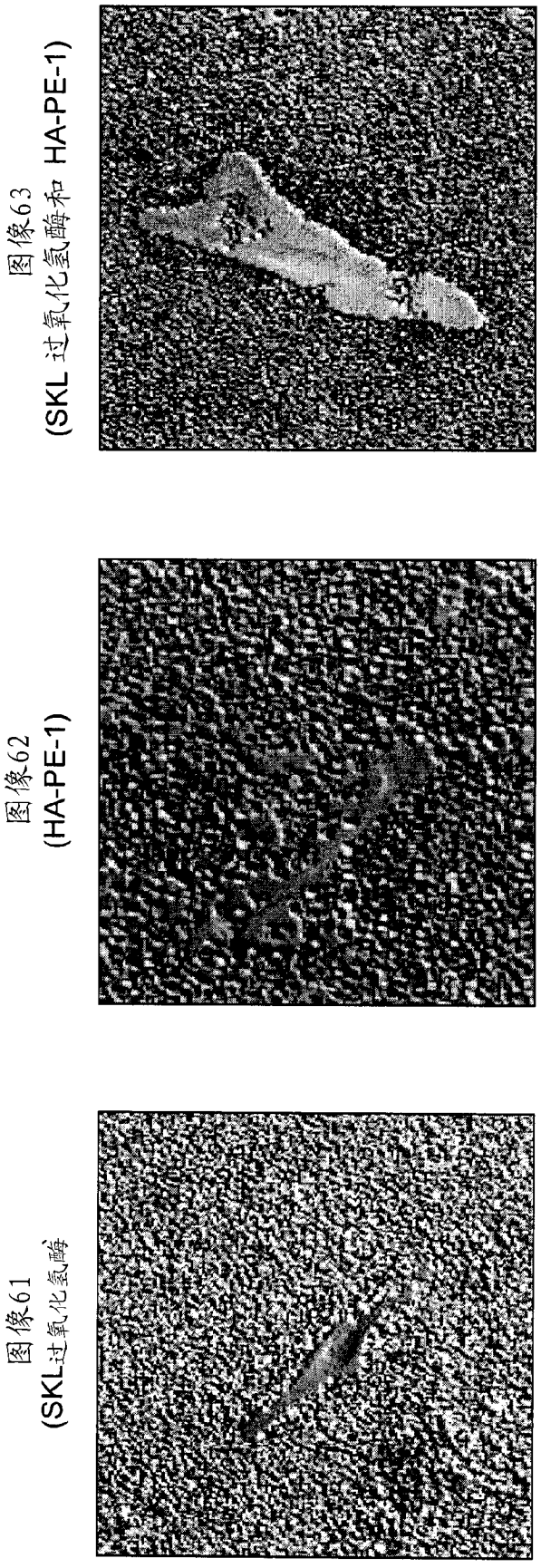


图 6

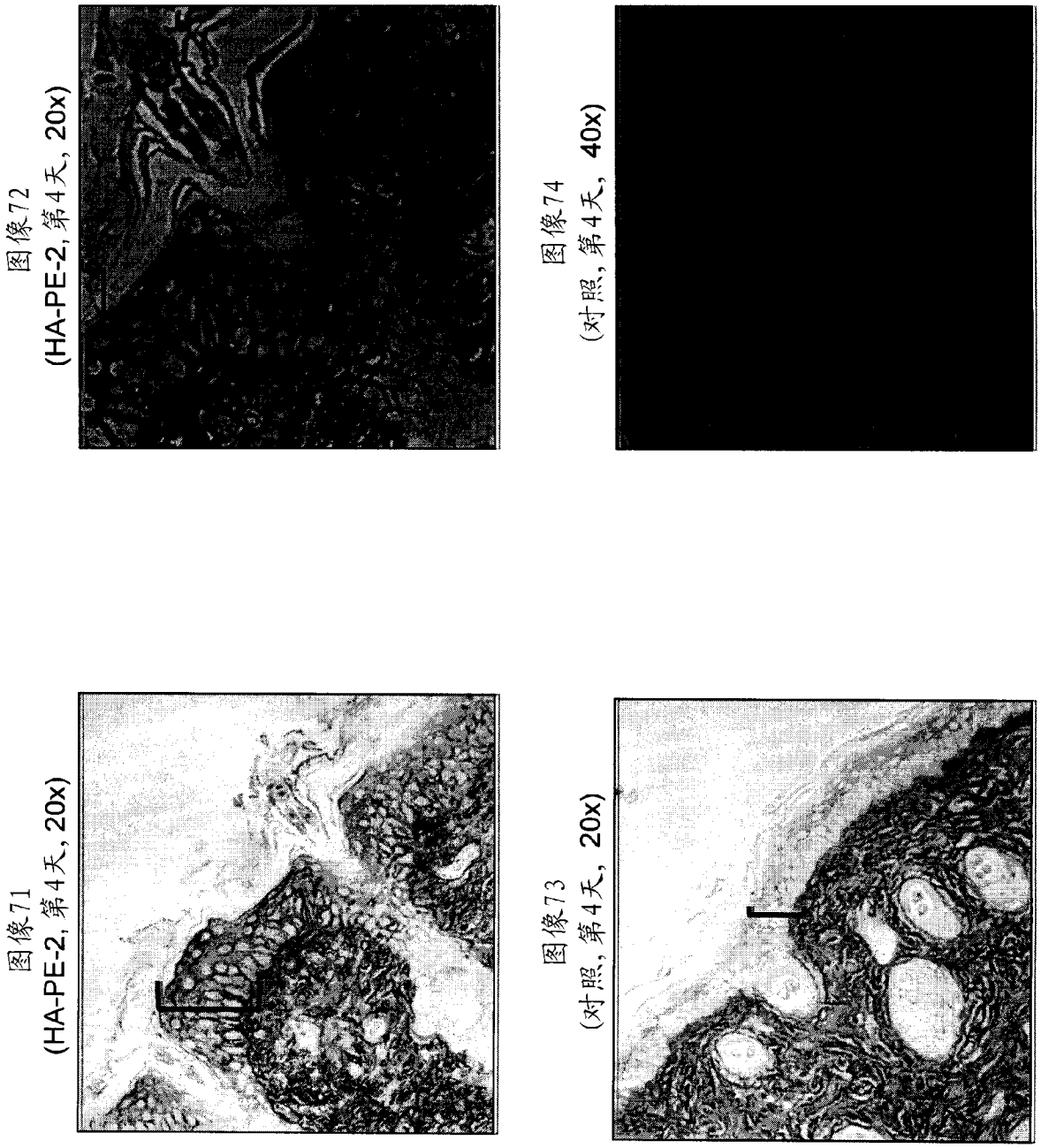

图像72
(HA-PE-2, 第4天, 20x)
图像74
(对照, 第4天, 40x)
图像71
(HA-PE-2, 第4天, 20x)
图像73
(对照, 第4天, 20x)

图 7

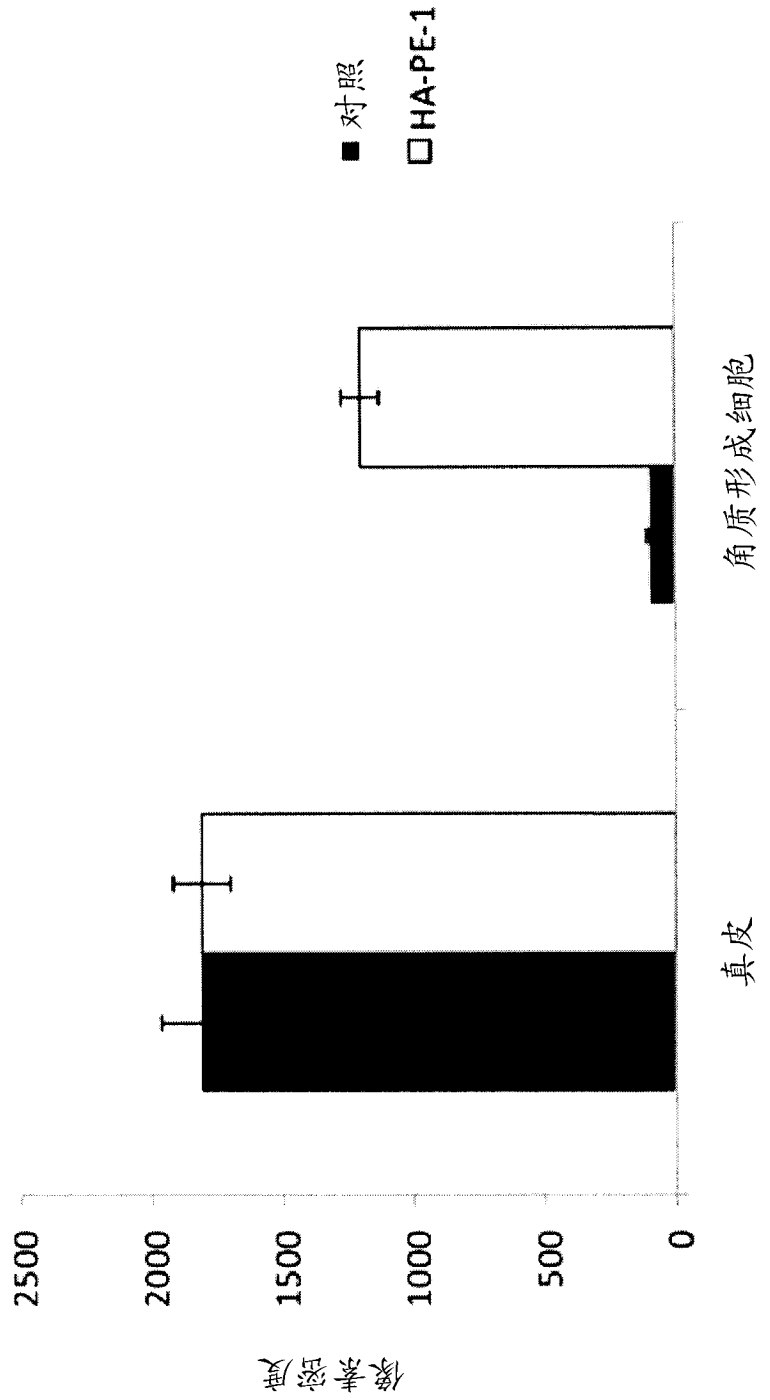


图 8

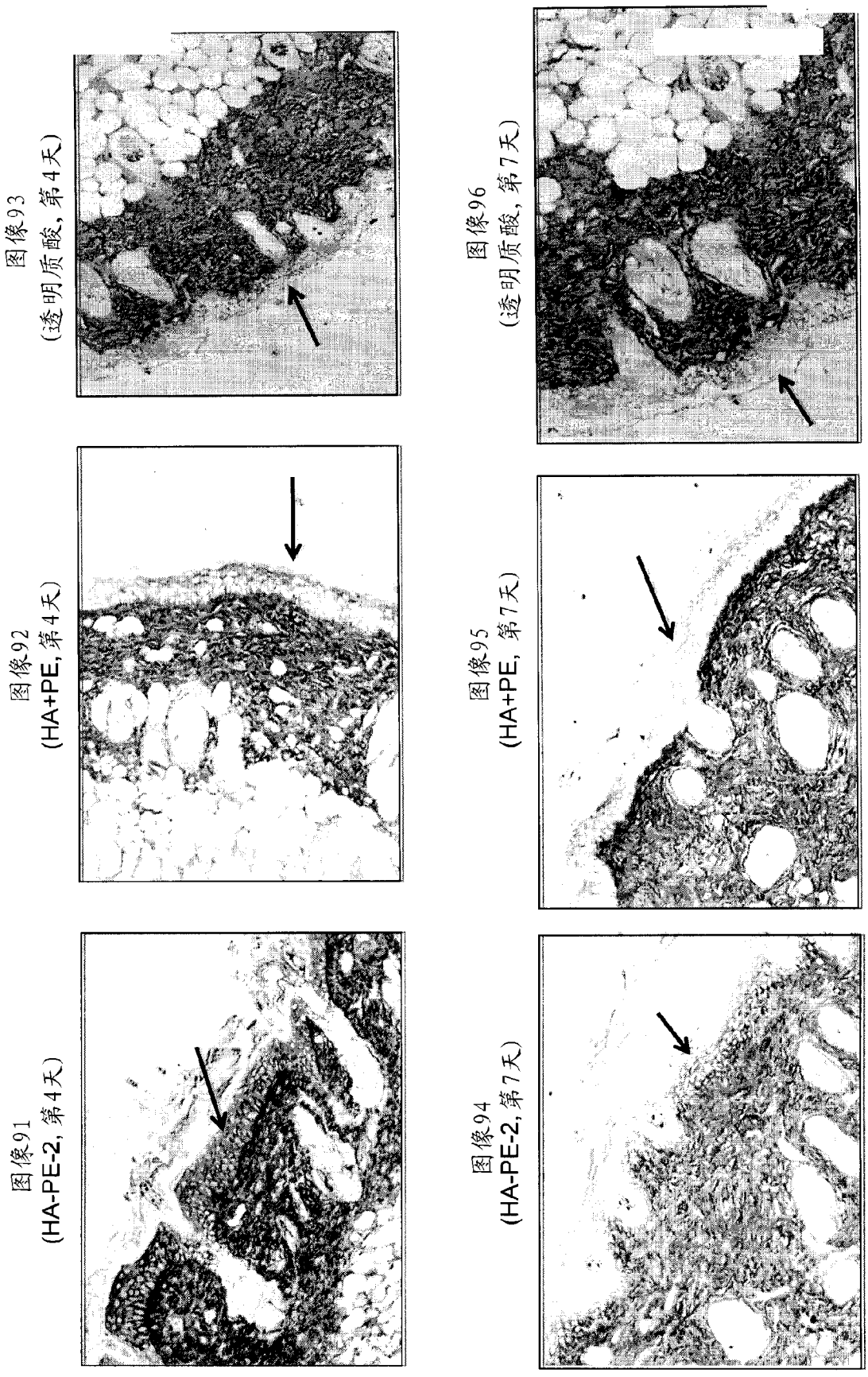

图像91
(HA-PE-2, 第4天)
图像92
(HA+PE, 第4天)
图像93
(透明质酸, 第4天)
图像94
(HA-PE-2, 第7天)
图像95
(HA+PE, 第7天)
图像96
(透明质酸, 第7天)

图 9

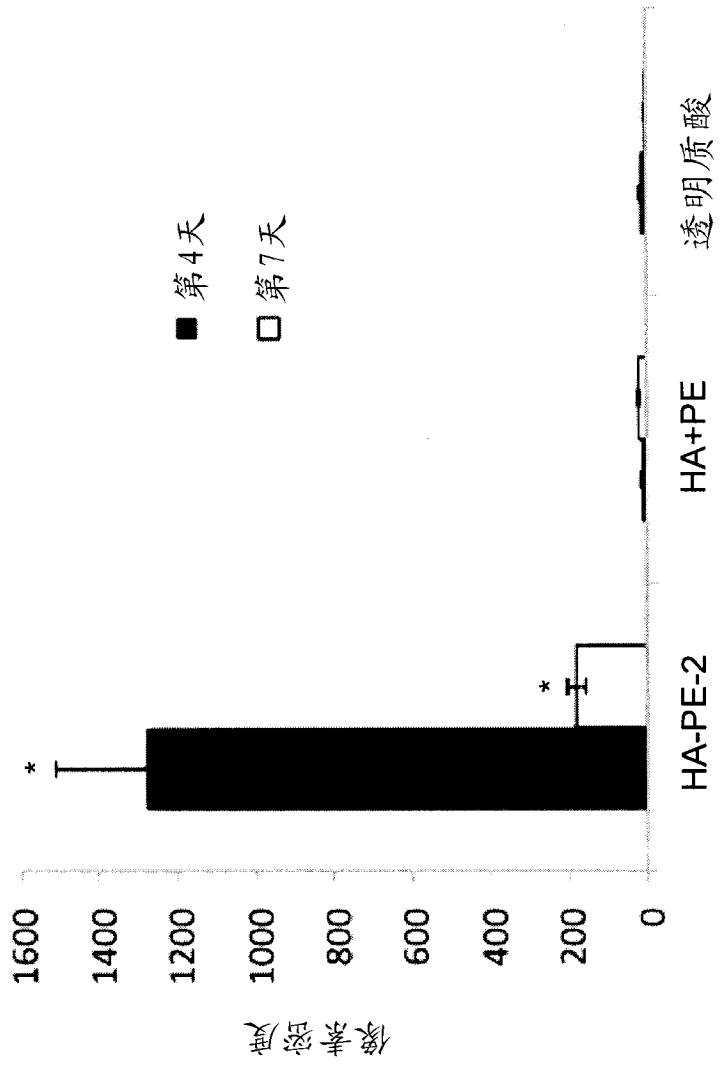
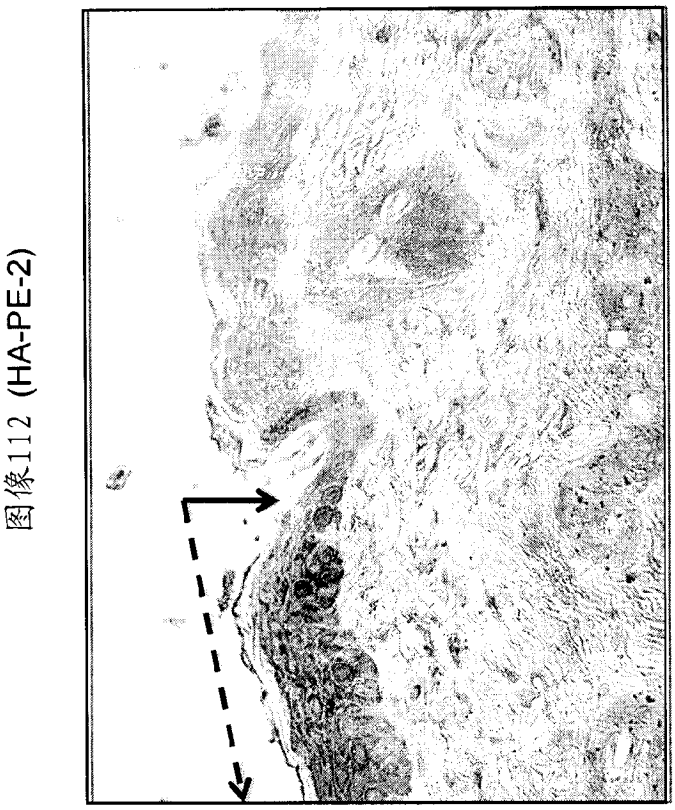

第4天
第7天
透明质酸
HA+PE
HA-PE-2
*
*
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
像素密度

图 10



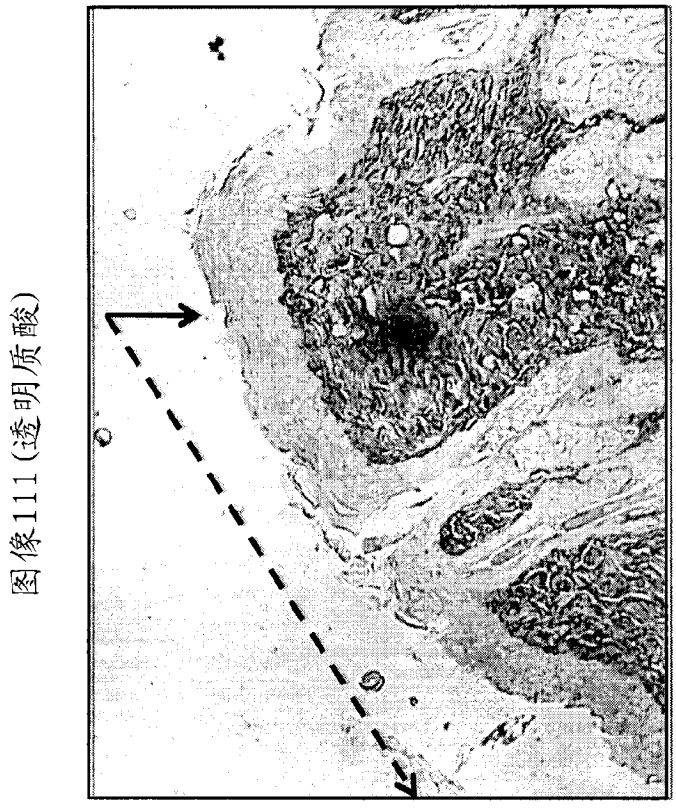


图 11

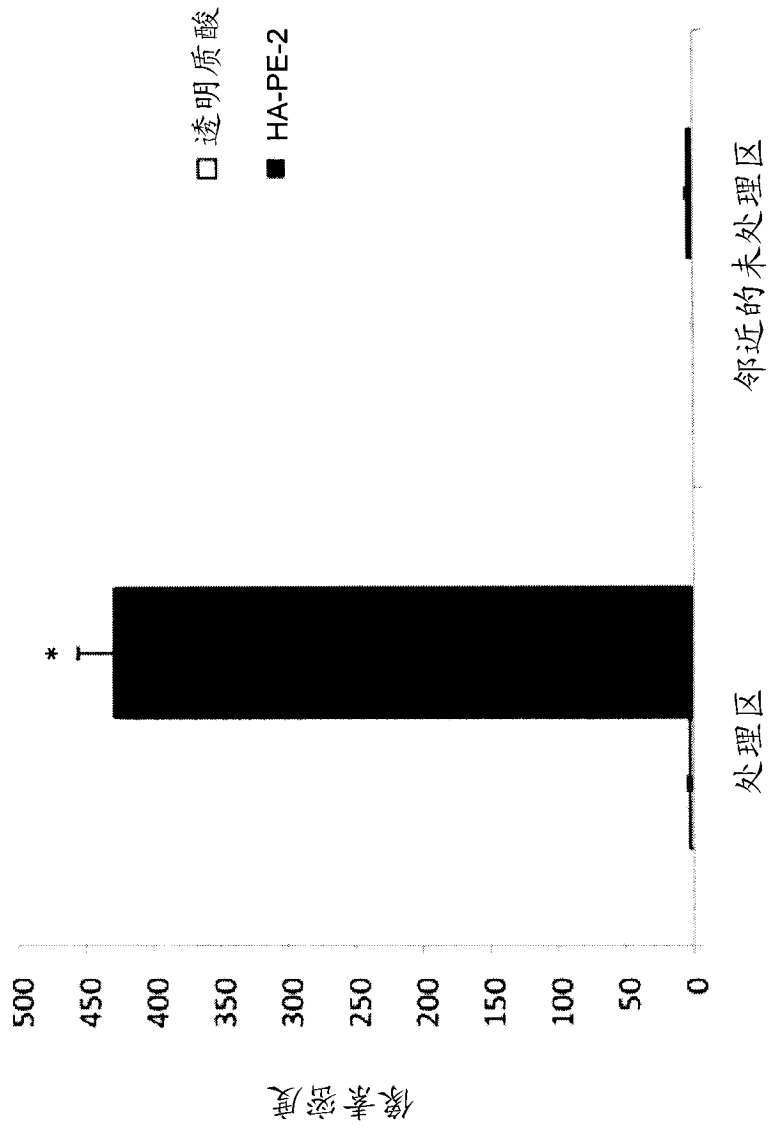

□ 透明质酸
■ HA-PE-2
*
处理区
邻近的未处理区
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
像素密度

图 12

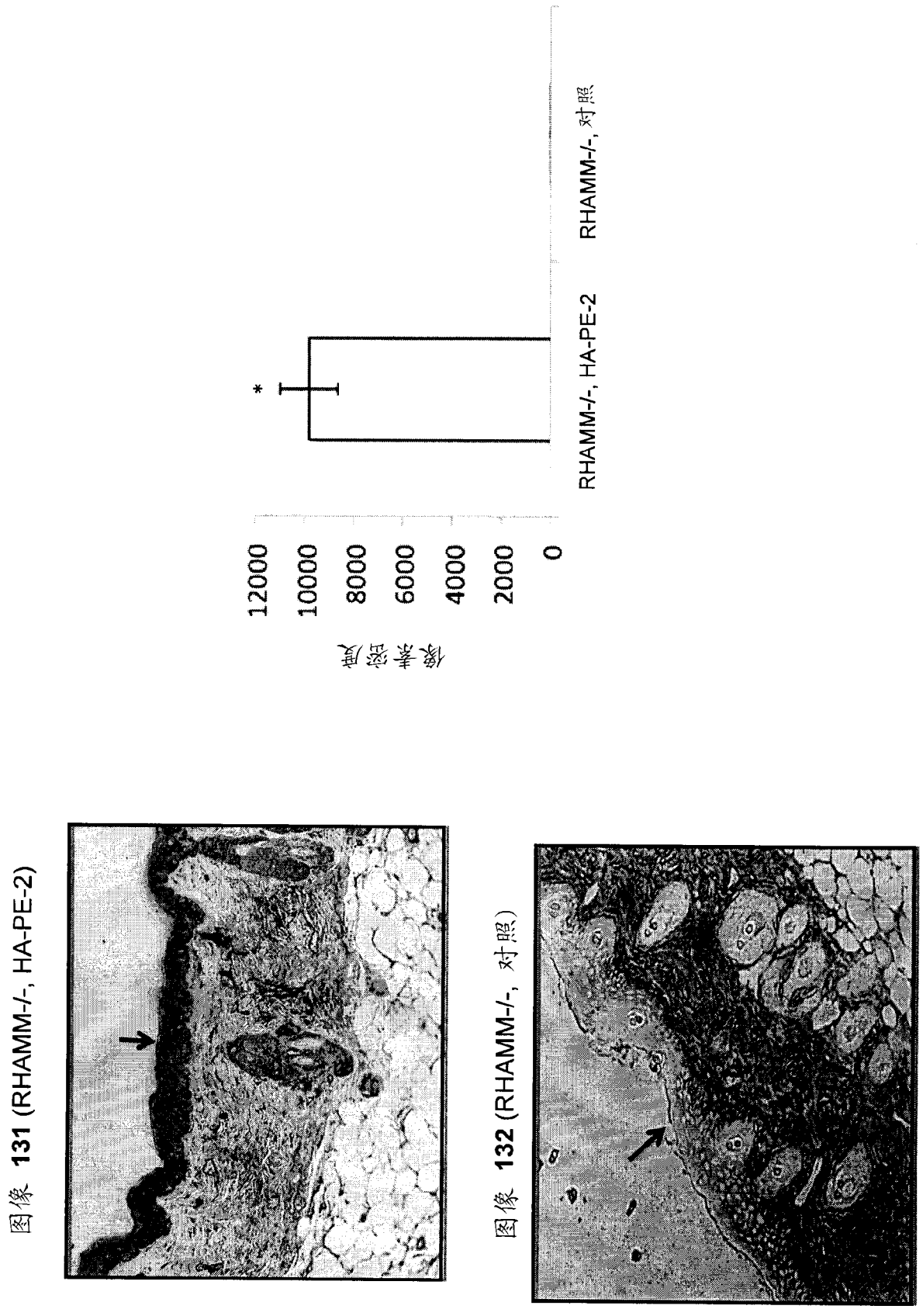
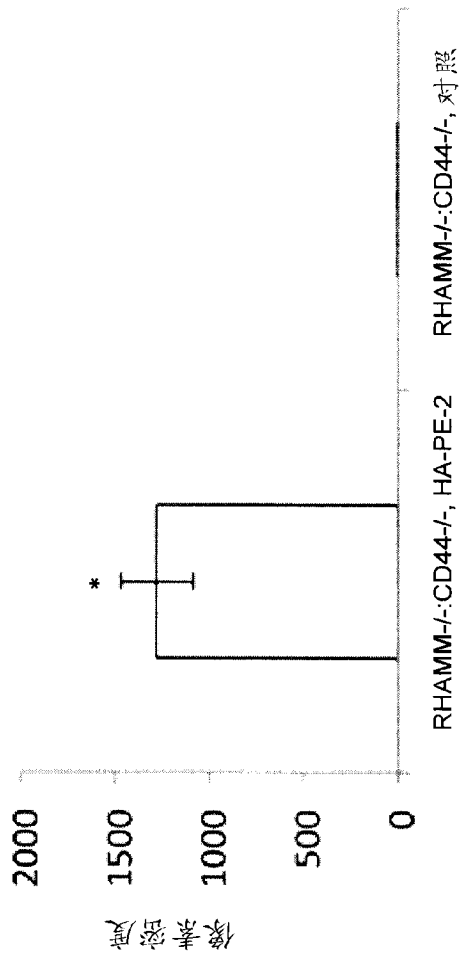

像素密度
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
RHAMM-/-, HA-PE-2
RHAMM-/-, 对照
图像 131 (RHAMM-/-, HA-PE-2)
图像 132 (RHAMM-/-, 对照)

图 13



图像141
(RHAMM-/-:CD44-/-, HA-PE-2)



图像142
(RHAMM-/-:CD44-/-, 对照)

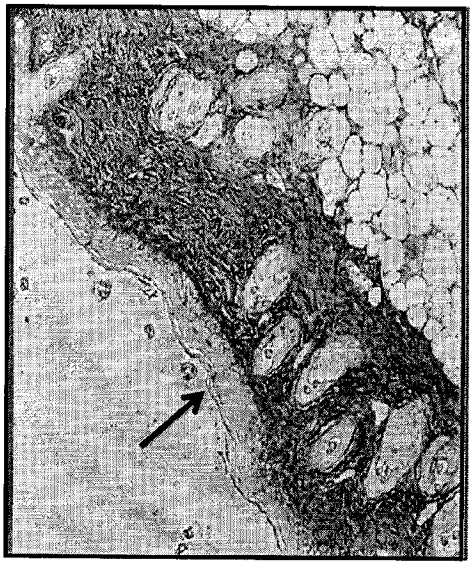
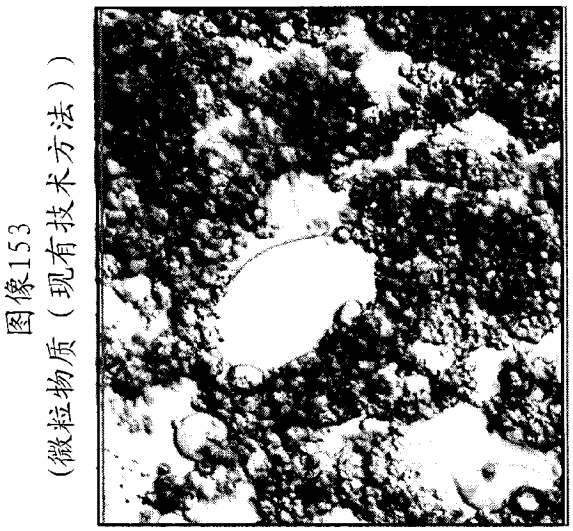


图 14



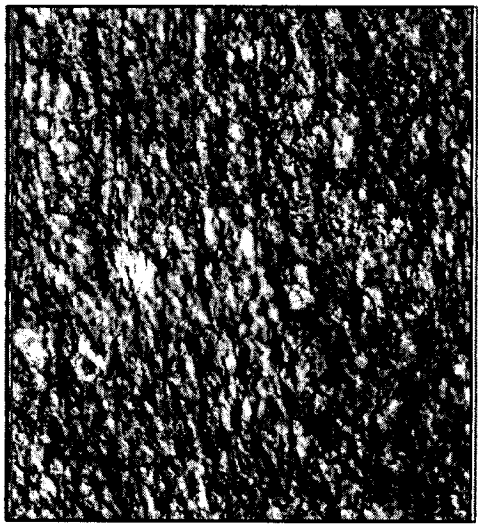
图像153
(微粒物质（现有技术方法）)



图像154
(在乳膏基质中的微粒物质
（现有技术方法）)

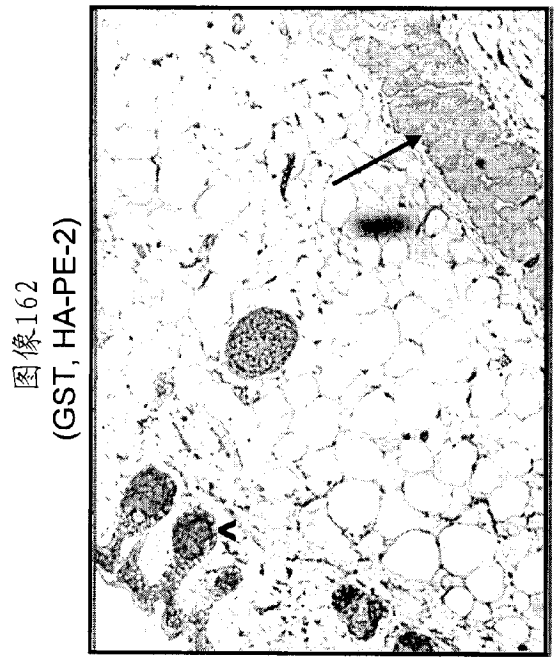


图像151 (HA-PE-2)

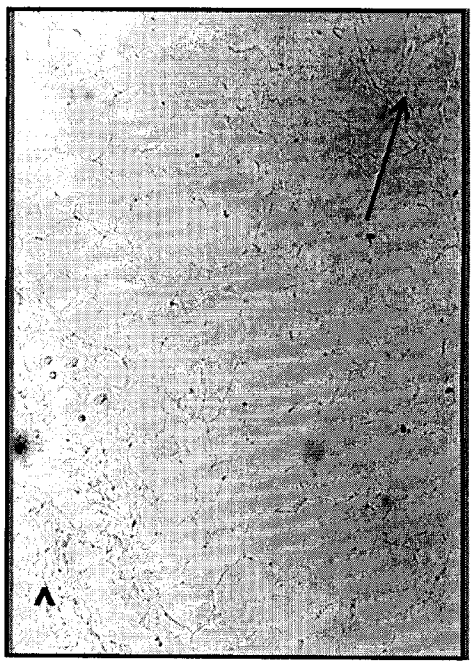


图像152
(在乳膏基质中的HA-PE-2)

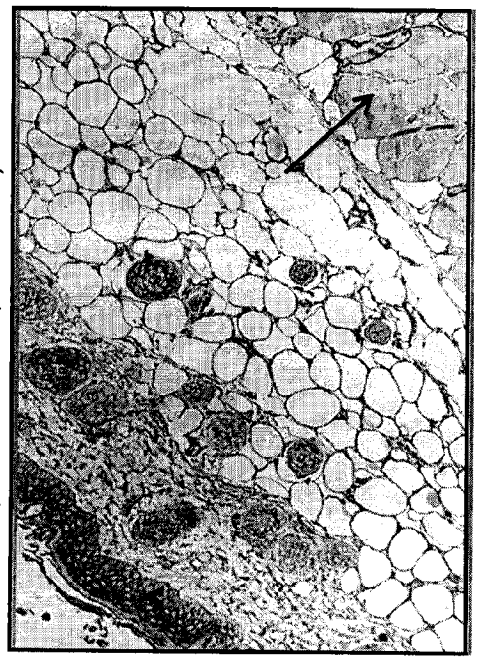
图 15



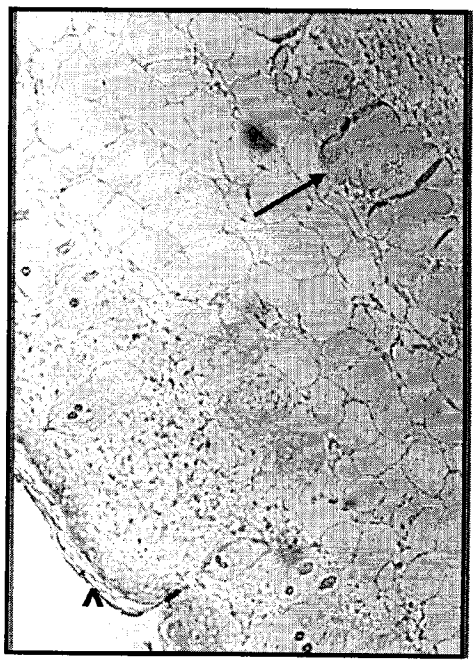
图像162
(GST, HA-PE-2)



图像164
(GST, 透明质酸)



图像161
(GST-RHAMM, HA-PE-2)



图像163
(GST-RHAMM, 透明质酸)

图 16

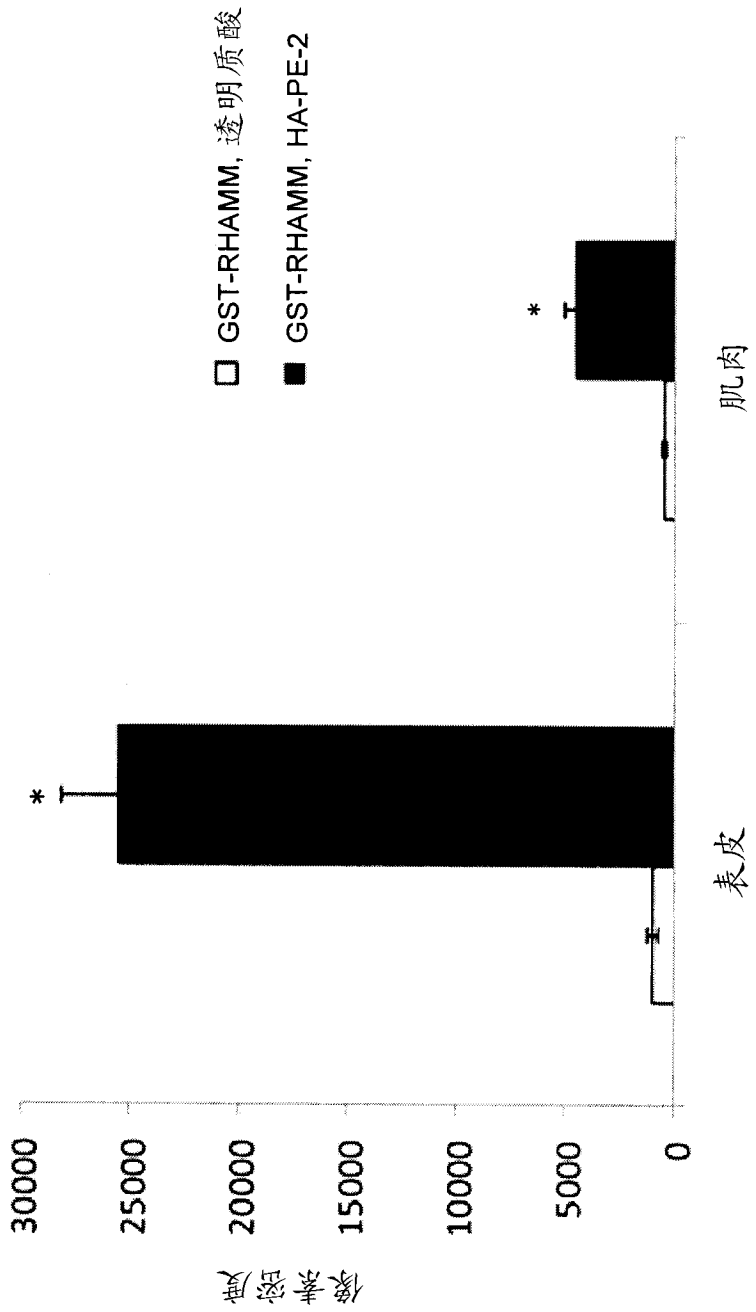

GST-RHAMM, 透明质酸
GST-RHAMM, HA-PE-2
*
*
肌肉
表皮
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
像素密度

图 17