



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 06 134 T2** 2007.04.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 496 951 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 06 134.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB03/01738**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 718 951.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/090800**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.04.2003**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **06.11.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.01.2005**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.04.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61L 15/38** (2006.01)  
**A61F 13/15** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

<b>02252895</b>	<b>24.04.2002</b>	<b>EP</b>
<b>0211504</b>	<b>18.05.2002</b>	<b>GB</b>

(73) Patentinhaber:

**Insense Ltd., Sharnbrook, Bedfordshire, GB**

(74) Vertreter:

**Meissner, Bolte & Partner GbR, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR**

(72) Erfinder:

**Davis, Paul James, Felpersham, Bedford MK43  
7EX, GB; Austin, Andrew John, Irchester,  
Northants NN29 7DJ, GB**

(54) Bezeichnung: **WUNDAUFLAGE ENTHALTEND EIN OXIDOREDUKTASE-ENZYM IN HYDRATIERTEM ZUSTAND**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich auf Hautverbände zur Applizierung auf einen Teil eines menschlichen oder tierischen Körpers zur Behandlung der Haut und bezieht sich insbesondere (aber nicht ausschließlich) auf Wundverbände zur Behandlung von beeinträchtigter oder geschwächter Haut, insbesondere von Hautläsionen, d.h. einer Unterbrechung in der Oberfläche der Haut, die entweder durch Verletzung oder Krankheit verursacht wurde, einschließlich Hautgeschwüre, Verbrennungen, Schnitte, Punkturen, Laxerationen, stumpfe Traumata, Akneläsionen, Beulen usw..

## Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Wunden werden häufig infiziert. Wundverbände können antiseptische Substanzen tragen und der physikalische Schutz, den sie bereitstellen, verhindert ein Eindringen von zusätzlichen infizierenden Mikroben, obgleich dieser mikrobielle Ausschluss selten absolut ist. Antiseptische Substanzen, die auf dem Verbandskissen getragen werden, sind üblicherweise nicht sehr wirksam, möglicherweise, weil sie nicht leicht mit konstanter Rate in die Wunde diffundieren. Darüber hinaus sind die wirksamsten Substanzen, Antibiotika, wegen der immer präsenten Probleme einer Entwicklung von Arzneimittelresistenz für eine routinemäßige Verwendung nicht verfügbar.

**[0003]** Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ist eine bekannte antimikrobielle Substanz mit vielen Vorteilen. Es wird natürlicherweise im Körper durch Leukozyten als Teil der Immunabwehraktivitäten als Reaktion auf eine Infektion produziert. Es gibt keine bekannten mikrobiellen Fluchtmechanismen, durch welchen Mikroben seinen Wirkungen entgehen können, und es hat eine kurze Lebenszeit, zerfällt schnell zu Wasser und Sauerstoff in den Geweben. Daher akkumuliert es nicht zu gefährlichen Konzentrationen. Wenn es topisch anzuwenden ist (z.B. zur Behandlung von Akne), wird seine Wirksamkeit durch die Tatsache erhöht, dass es die Hautoberfläche leicht durchdringt, um die darunter liegenden Stellen einer Infektion zu erreichen.

**[0004]** Da Wasserstoffperoxid derart nützlich ist, wird es seit vielen Jahren als antimikrobielle Substanz zur Reinigung von Wunden aller Arten und als biologisch kompatibles allgemeines Antiseptikum verwendet. Wasserstoffperoxid enthaltende Salben wurden insbesondere zum Beispiel für eine Behandlung von Beingeschwüren, Druckgeschwüren, kleineren Wunden und Infektion verwendet. Es gibt allerdings Probleme, die mit der Verwendung von Wasserstoffperoxid verbunden sind. Wasserstoffperoxidlösung ist sehr instabil und wird leicht zu Wasser und Sauerstoff oxidiert; außerdem kann Wasserstoffperoxid bei hoher Konzentration für normale Haut und Zellen, die für die Heilung im Wundbett verantwortlich sind, schädigend sein. Es ist sehr schwierig oder sogar unmöglich, Wasserstoffperoxid als Teil eines vordosierten Wundverbands zu verwenden: Seine Instabilität würde für ein Produkt eine inakzeptabel kurze Haltbarkeit bedeuten und eine Dosierung zum Zeitpunkt der Applizierung würde keine anhaltende Abgabe über einen einsetzbar längeren Zeitraum bereitstellen. Bei Verwendung in der Wundbehandlung (wie z.B. in der britischen Pharmacopöe beschrieben) werden sehr hohe Konzentrationen (typischerweise 3%) benötigt, um einen starken antimikrobiellen Effekt über einen sehr kurzen Zeitraum zu erreichen. Selbst dieser Typ eines kurzen Stoßes kann wirksam sein, und zwar wegen der großen Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid, allerdings gibt es noch den weiteren Nachteil, dass solche hohen Konzentrationen für Wirtszellen relativ schädlich sein können und den Heilungsprozess behindern können. Aus diesem Grund gibt es die Tendenz, die Verwendung von Wasserstoffperoxid auf eine anfängliche Reinigung und Sterilisierung von Wunden zu beschränken. Dennoch ist es eine natürliche Abwehrsubstanz, die von körpereigenen Zellen (in niedrigeren Konzentrationen) produziert wird, und es wird in steigendem Maße als interzelluläres und intrazelluläres Messengermolekül anerkannt, das in der molekularen Signalübertragung und Regulierung von Zelle zu Zelle involviert ist. Zweifellos ist Wasserstoffperoxid möglicherweise ein sehr nützliches Molekül, wenn es in den richtigen Konzentrationen und in geeignetem Zeitverlauf verwendet werden kann.

**[0005]** US 4 576 817 schlägt einen bakteriostatischen faserigen Wundverband vor, der trockene Enzyme wie Glucoseoxidase und Lactoperoxidase eingearbeitet hat, um z.B. Wasserstoffperoxid und Hypoidit bei Kontakt mit Serum zu erzeugen.

**[0006]** WO 01/28600 offenbart einen Wundverband, der trockene Glucoseoxidase, trockene Lactoperoxidase und ein Iodidsalz in einer Polymermatrix enthält. Die Glucoseoxidase katalysiert eine Oxidationsreaktion von Glucose, die in Körperflüssigkeiten einer Wundstelle vorliegt, unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Die Wirkung von Lactoperoxidase auf Wasserstoffperoxid und Iodid erzeugt elementares Iod, das ein kräftiges antiin-

fektiöses Mittel ist.

**[0007]** Eine wirksame Wundheilung wird durch verschiedene Faktoren, einschließlich einer feuchten Umgebung und der Entfernung von Wundexsudat durch Absorption, begünstigt. Es wurden oft trockene superabsorbierende Materialien verwendet, um den Nutzen einer Exsudatentfernung zu erzielen, da diese mit großer Wirksamkeit Substanzen leicht aufnehmen und Flüssigkeiten halten, die aus Wunden exsudieren. Allerdings kann ein hocheffizientes trockenes absorbierendes Material zu einem nicht hilfreichen Fehlen von Feuchtigkeit führen, und ein Wundverband, der aus einem solchen Material aufgebaut ist, wird mit antimikrobiellen Enzymsystemen nicht gut arbeiten, zumindest nicht, bis der Verband gründlich mit Wundflüssigkeit benetzt wurde.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0008]** Die vorliegende Erfindung stellt einen Hautverband, in einer Verpackung versiegelt, bereit, wobei der Verband Oxidoreduktase-Enzym und gegebenenfalls Peroxidase-Enzym umfasst, wobei das Enzym (die Enzyme) in hydratisiertem Zustand vorliegt (vorliegen). Das Enzym (Die Enzyme) sind demnach im Verband vor Verwendung des Verbands, d.h. vor Applizierung des Verbands auf die Haut, in hydratisiertem Zustand.

**[0009]** Indem das Enzym (die Enzyme) in hydratisiertem Zustand bereitgestellt wird (werden), ist das Enzym in einem nassen, aktiven Zustand im Verband und kann unmittelbar, wenn es mit dem geeigneten Substrat bei Verwendung des Verbands in Kontakt gebracht wird, wirken. Dies steht im Gegensatz zu den Verbänden des Standes der Technik, in denen Enzyme in trockenem Zustand sind und eine anfängliche Hydratisierung bei Verwendung erfordern, was das Wirken des Enzyms verzögert und demnach auch die antimikrobiellen Effekte. Der hydratisierte Zustand des Enzyms kann auch ermöglichen, dass es zu einem feuchten Hydrogel oder einem anderen feuchten Verbandsmaterial formuliert wird, so dass der Verband Feuchtigkeit an eine trockene Wunde abgeben kann.

**[0010]** Der Verband wird verwendet, indem er auf die Haut eines Menschen oder eines Tiers, z.B. über eine Wunde oder eine Hautregion, die zu kosmetischen oder therapeutischen Zwecken zu behandeln ist, z.B. zur Behandlung von Akne oder anderen Hautzuständen, gebracht wird. Das Oxidoreduktase-Enzym katalysiert eine Reaktion eines geeigneten Substrats mit Sauerstoff unter Erzeugung von Wasserstoffperoxid. Das Substrat kann entweder natürlich in Körperflüssigkeiten vorliegen und/oder getrennt zugeführt werden und/oder im Verband eingearbeitet sein. Oxidoreduktase-Enzyme, die zur Verwendung in der Erfindung geeignet sind, und die entsprechenden Substrate (die in Blut und Gewebeflüssigkeiten vorhanden sind), umfassen die folgenden:

Enzym	Substrat
Glucoseoxidase	$\beta$ -D-Glucose
Hexoseoxidase	Hexose
Cholesterinoxidase	Cholesterin
Galactoseoxidase	D-Galactose
Pyranoseoxidase	Pyranose
Cholinoxidase	Cholin
Pyruvatoxidase	Pyruvat
Glycollatoxidase	Glycolat
Aminosäureoxidase	Aminosäure

**[0011]** Das derzeit bevorzugte Oxidoreduktase-Enzym ist Glucoseoxidase. Dieses katalysiert die Umsetzung von  $\beta$ -D-Glucosesubstrat unter Erhalt von Wasserstoffperoxid und Gluconsäure.

**[0012]** Es kann ein Gemisch aus Oxidoreduktase-Enzymen verwendet werden.

**[0013]** Wenn die Reaktion auf oder in der Nachbarschaft der Haut erfolgt, kann das so produzierte Wasserstoffperoxid eine lokalisierte antibakterielle Wirkung haben.

**[0014]** Alternativ oder zusätzlich kann das auf diese Weise erzeugte Wasserstoffperoxid in einer Zweistufen-Anordnung eingesetzt werden, wobei das Wasserstoffperoxid eine Reaktion eingeht, die durch ein Peroxidase-Enzym katalysiert wird, wodurch eine Vielzahl von Spezies produziert wird, einschließlich reaktiver Sauerstoffintermediate, die antimikrobielle Eigenschaften haben und die daher eine Förderung der Wundheilung unterstützen können. Für solche Ausführungsformen enthält der Verband ein Peroxidase-Enzym, das vorzugsweise in hydratisiertem Zustand vorliegt. Als weitere Möglichkeit kann das Wasserstoffperoxid direkt in nicht-katalysierter Art mit Substanzen, z.B. Iodidionen, unter Erzeugung von molekularem Iod reagieren.

**[0015]** Peroxidase-Enzyme, die in der Erfindung einsetzbar sind, umfassen Lactoperoxidase, Meerrettichperoxidase, Iodidperoxidase, Chloridperoxidase und Myeloperoxidase, wobei Lactoperoxidase derzeit begünstigt wird.

**[0016]** Es kann ein Gemisch von Peroxidase-Enzymen eingesetzt werden.

**[0017]** Die aktiven Spezies, die durch die Wirkung von Peroxidase produziert werden, sind schwer zu definieren und werden zu einem gewissen Grad von der bestimmten in Frage kommenden Peroxidase abhängen. Beispielsweise wirkt Meerrettichperoxidase ganz anders als Lactoperoxidase. Die detaillierte Chemie ist durch die Tatsache kompliziert, dass die Produkte so reaktiv sind, dass sie schnell zu anderen, mit ihnen in Verbindung stehenden Produkten werden, die auch sehr reaktiv sind. Es wird angenommen, dass Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff und Peroxid produziert werden, genau wie in den „oxidativen Burst“-Reaktionen, die in Neutrophilen- und Makrophagen-Leukozyten des menschlichen Körpers identifiziert wurden, und in der gut bekannten „Fenton“-Reaktion, die auf den katalytischen Effekten von Eisen (III)-Ionen basiert.

**[0018]** Der Verband enthält eine Quelle für Wasser, so dass das Enzym oder die Enzyme in hydratisiertem Zustand vorliegen. Der Verband kann in der Form z.B. eines feuchten Baumwollverbands sein, oder kann ein strukturiertes Dochtmaterial mit feuchten Ingredienzien sein. Vorzugsweise enthält der Verband allerdings ein oder mehrere Gele auf Wasserbasis oder wässrige Gele, auch als hydratisierte Hydrogele bezeichnet. Solche Gele können aus einer Vielzahl von Materialien geformt werden und können eine Vielzahl von Reagenzien enthalten, wie es unten diskutiert wird.

**[0019]** Ein hydratisiertes Hydrogel stellt eine Wasserquelle zum Hydratisieren des Enzyms oder der Enzyme, zur Förderung einer schnellen Reaktion und anschließenden Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen bereit. Das Gel kann auch wirken, um Wasser und andere Materialien, die von einer Wundstelle exsudiert werden, zu absorbieren, was es möglich macht, dass der Verband eine wertvolle und nützliche Funktion erfüllt, indem solche Materialien von einer Wundstelle entfernt werden. Das hydratisierte Hydrogel stellt auch eine Quelle für Feuchtigkeit bereit, die die Funktion haben kann, das Enzym oder die Enzyme im Verband in hydratisiertem Zustand zu halten, und die bei Verwendung wirken kann, um eine Wundstelle feucht zu halten, was eine Heilung unterstützt.

**[0020]** Das oder jedes Hydrogel umfasst zweckdienlicherweise hydrophiles Polymermaterial. Geeignete hydrophile Polymermaterialien umfassen Polyacrylate und -methacrylate, z.B. wie sie von First Water Ltd in Form von eigenen Hydrogelen geliefert werden, einschließlich Poly-2-acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (poly-AMPS) oder Salze davon (z.B. wie in WO 01/96422 beschrieben); Polysaccharide, z.B. Polysaccharid-Gummi, insbesondere Xanthangummi (z.B. erhältlich unter der Marke Keltrol); verschiedene Zucker; Polycarbonsäuren (z.B. erhältlich unter der Marke Gantrez AN-169 BF von ISP Europe); Poly(methylvinylether-co-maleinsäureanhydrid) (z.B. erhältlich unter der Marke Gantrez AN 139, mit einem Molekulargewicht im Bereich von 20.000 bis 40.000); Polyvinylpyrrolidon (z.B. in der Form von handelsüblichen Qualitäten, die als PVP K-30 und PVP K-90 bekannt sind); Polyethylenoxid (z.B. erhältlich unter der Marke Polyox WSR-301); Polyvinylalkohol (z.B. erhältlich unter der Marke Elvanol), vernetztes Polyacrylpolymer (z.B. erhältlich unter der Marke Carbopol EZ-1), Cellulosen und modifizierte Cellulosen, einschließlich Hydroxypropylcellulose (z.B. erhältlich unter der Marke Klucel EEF), Natriumcarboxymethylcellulose (z.B. erhältlich unter der Marke Cellulose Gum 7LF) und Hydroxyethylcellulose (z.B. erhältlich unter der Marke Natrosol 250 LR).

**[0021]** In einem Gel können Gemische von hydrophilen Polymermaterialien eingesetzt werden.

**[0022]** In einem hydratisierten Hydrogel aus hydrophilem Polymermaterial ist das hydrophile Polymermaterial wünschenswert in einer Konzentration von wenigstens 1 Gew.-%, vorzugsweise wenigstens 2 Gew.-%, bevorzugter wenigstens 5 Gew.-%, möglicherweise wenigstens 10 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Gels, vorhanden.

**[0023]** Durch Verwendung eines Gels, das eine relativ hohe Konzentration (wenigstens 2 Gew.-%) an hydrophilem Polymermaterial enthält, kann das Gel besonders wirksam zur Wasseraufnahme bei Verwendung des Verbands, z.B. aus Serumexsudaten beim Kontakt mit einer Wunde, fungieren. Da das Gel ein wässriges System ist, hat eine Verwendung des Verbandes keinen Effekt eines Induzierens einer Gesamttrockenheit der Wunde, was unerwünscht wäre. Der Grund ist, dass ein Wasserdampfdruck in der geschlossenen Umgebung, die die Haut bei Verwendung des Verbandes umgibt, aufrechterhalten wird. Das Gel fungiert somit als absorbierende Einheit zur Entfernung von Feuchtigkeit, z.B. Wundexsudat, die auch einen hilfreichen Untergrundlevel an Feuchtigkeit liefert.

**[0024]** Das Wasseraufnahmevermögen eines hydratisierten Hydrogels, einschließlich eines Hochkonzentrationsgels, ermöglicht es dem Verband, die Wundheilung durch Entfernung von wesentlichen Mengen an Exsudaten zu unterstützen, wobei er aufquillt, wenn er es tut. Durch Verwendung eines sorgfältig formulierten, bereits hydratisierten Gels wird verhindert, dass die Wunde einen Zustand wenig dienlicher Trockenheit erreicht. Eine fertige Hydratisierung stellt auch die schnelle Bildung einer flüssigen Grenzfläche zwischen dem Verband und der Wunde sicher, wodurch eine Adhäsion verhindert wird, die andernfalls ein einfaches Abheben des Verbands, wenn er zu wechseln ist, stören würde. Eine gute flüssige Grenzfläche zwischen der Wunde und dem Verband ist auch dahingehend wichtig, dass die antimikrobiellen Produkte der Enzyme durch die gesamte verfügbare Oberfläche in die Wunde eintreten können.

**[0025]** Das Gel oder jedes Gel kann verschiedene Reagenzien, einschließlich eines oder mehrerer der folgenden, enthalten:

ein Oxidoreduktase-Enzym oder mehrerer Oxidoreduktase-Enzyme;

ein Peroxidase-Enzym oder mehrere Peroxidase-Enzyme;

Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym (unten zu diskutieren);

eine Quelle für Iodidionen (unten zu diskutieren);

Glycerin (das als Netzmittel und Feuchthaltemittel wirkt), typischerweise in einer Menge von bis zu 20 Gew.-%, bezogen auf das Gewicht des Gels.

**[0026]** Das Enzym oder die Enzyme können insbesondere in einem oder in mehreren hydratisierten Hydrogelen vorliegen.

**[0027]** Zum Beispiel kann eines der Enzyme, das Oxidoreduktase-Enzym oder das Peroxidase-Enzym, in einem Gel vorliegen, z.B. in einem wässrigen, hydrophilen Hochkonzentrationspolymermaterialgel. Als weitere Möglichkeit können beide Enzyme in einem Gel vorliegen, z.B. in einem Hochkonzentrationsgel. Eine weitere Option ist, dass jedes Enzym in einem entsprechenden Gel vorliegt, z.B. einem wässrigen hydrophilen Hochkonzentrationsgel.

**[0028]** Als weitere Möglichkeit kann der Verband ein einzelnes hydratisiertes Hydrogel (z.B. aus Poly-AMPS) umfassen, das keine Enzyme enthält, aber möglicherweise Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym enthält (z.B. eine Glucosequelle für Glucoseoxidase), das zusätzlich oder alternativ eine Zufuhr von Iodidionen (z.B. in Form eines oder mehrerer Iodidsalze) enthält und gegebenenfalls auch Glycerin enthält.

**[0029]** Das Gel oder jedes Gel kann vernetzt sein. Zum Beispiel kann das Gel ein Alginatgel, z.B. aus Alginsäure geformt, die in bekannter Weise z.B. durch Verwendung von Calciumchlorid vernetzt wurde, umfassen. Vernetzte Gele bilden eine einschließende Biopolymermatrix, die das Enzym innerhalb des Gels zurückhalten kann, wenn der Vernetzungsgrad ausreichend dicht ist, was die Freisetzung des Enzyms in das Wundbett bei Verwendung des Verbands verhindert. Das Gel kann in Form von Kügelchen, Perlen, Platten oder extrudierten Fäden usw. sein.

**[0030]** Das hydratisierte Hydrogel, insbesondere ein vernetztes Gel, kann um eine mechanische Verstärkungsstruktur, z.B. ein Blatt aus Baumwollgaze oder ein inertes flexibles Sieb, gegossen werden, beispielsweise, um eine strukturell verstärkte Hydrogelschicht oder -platte bereitzustellen.

**[0031]** Das hydratisierte Hydrogel kann alternativ in Form eines nicht-vernetzten, sich durch Scherung verdünnenden Gels sein, z.B. aus geeigneten Gummen, wie Xanthangummi (z.B. erhältlich unter der Marke Keltrol); in diesem Fall allerdings ohne eine mechanische Verstärkungsstruktur. Solche Gummen sind flüssig, wenn sie einer Scherbeanspruchung unterworfen werden (z.B. wenn sie gegossen oder durch eine Düse gequetscht werden), härten aber, wenn sie statisch sind. Demnach kann das Gel in Form einer gießbaren Komponente sein, was die Herstellung von Gelen im Verband erleichtert. Ein derartiges sich durch Scherung verdünnendes Gel kann auch in Kombination mit einem vorgeformten, mechanisch verstärkten Gel verwendet werden, wie es oben diskutiert wurde.

**[0032]** Das wasserabsorbierende Gel kann eine erhöhte Konzentration an hydrophiler Substanz verwenden, welche das tatsächliche Gel-bildende Polymermaterial, z.B. Polysaccharid, selbst sein kann oder es kann eine zusätzliche Substanz allein zum Zwecke der Wasserabsorption in das Gemisch gegeben werden. Ein Beispiel dieses Typs eines funktionellen Gemisches ist das, das durch eine Kombination von vernetztem Alginat mit etwa 2 Gew.-% und Xanthangummi mit etwa 5 bis 10 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Gels, gebildet wird. Eine besonders begünstigte Version ist die eines kovalent gebundenen polymeren Hydrogels, z.B. Poly-AMPS, das stark wasserabsorbierend ist, das fähig ist, große Volumina an Wasser oder wässrigen Lö-

sungen aufzunehmen.

**[0033]** Das Enzym oder die Enzyme können in einem Gel in einer Reihe von möglichen Formen, einschließlich in Lösung als freie Moleküle, vorliegen. Um die Retentionswirksamkeit der Enzyme in Gel zu verbessern, können die Enzyme chemisch aneinander konjugiert sein, chemisch an andere Moleküle (z.B. Polyethylenchinin) konjugiert sein oder in einem festen Träger, z.B. Perlen, eingebaut sein.

**[0034]** Gele verschiedenen Typs, z.B. vernetztes Alginat und sich durch Scherung verdünnend, können zusammen in einem einzelnen Verband verwendet werden. Gute Resultate wurden mit einem sich durch Scherung verdünnenden Gel, das bei Verwendung der Haut am nächsten kommt, und einem vernetzten strukturell verstärkten Gel von der Haut entfernt erhalten.

**[0035]** Das Enzym oder die Enzyme können immobilisiert sein, so dass verhindert wird, dass sie in die Wunde freigesetzt werden, wo sie das Potential hätten, unerwünschte allergische Reaktionen auszulösen (sie stammen im Allgemeinen von nicht-menschlichen Quellen, z.B. stammt die im Handel am meisten verfügbare Glucoseoxidase von dem Pilz *Aspergillus niger* und Lactoperoxidase wird typischerweise aus Kuhmilch extrahiert), und auch für einen Abbau durch die Wirkung von Proteasen, die in einer Wunde vorhanden sind, anfällig sein.

**[0036]** Ein Enzym kann in bekannter Art immobilisiert werden, z.B. indem es irreversibel an einen festen Träger, z.B. ein Partikel, eine Perle oder eine Faser, z.B. aus Cellulose, Siliziumdioxid, Polymer usw., gebunden wird, wobei dem Fachmann bekannte Kopplungsverfahren verwendet werden. Ein Einbau eines Enzyms in ein vernetztes Alginatgel, wie es oben diskutiert wurde, z.B. in Form von Kügelchen, Platten oder extrudierten Fäden, hat ebenfalls den Effekt, die Enzyme zu immobilisieren. Bekannte Einkapselungstechniken unter Verwendung von Polyamid sind ebenfalls geeignet.

**[0037]** In Ausführungsformen, die Oxidoreduktase-Enzym und Peroxidase-Enzym verwenden, können die zwei Enzyme in getrennten hydratisierten Hydrogelen lokalisiert sein, wobei das Oxidoreduktase-Enzym in einem ersten hydratisierten Gel lokalisiert ist und die Peroxidase in einem zweiten hydratisierten Gel lokalisiert ist. Das erste und das zweite hydratisierte Gel können, wenn es erforderlich ist, in verschiedenen Bereichen des Verbands lokalisiert sein. Der Verband hat wünschenswerterweise einen geschichteten, gefächerten (stratified) Aufbau, der z.B. eine obere (äußere) Schicht aus einem Gel und eine untere (innere) Schicht aus einem anderen Gel umfasst.

**[0038]** Beispielsweise kann das erste Gel (mit Oxidoreduktase-Enzym) in der Nähe der äußeren Teile des Verbands, d. h. von der Haut entfernt bei Verwendung, lokalisiert sein, wo die Sauerstoffkonzentrationen am höchsten sind, während das zweite Gel (mit Peroxidase-Enzym) in der Nähe der inneren Teile des Verbands, d.h. bei Verwendung der Haut benachbart, lokalisiert ist, so dass die antimikrobielle Spezies (von denen wenigstens einige infolge ihrer extremen Reaktivität sehr kurzlebig sind), die dadurch produziert werden, sehr nahe an der Haut sind und nicht verbraucht werden, bevor sie die gewünschte Wirkstelle erreichen. In diesem Fall hat der Verband einen geschichteten, gefächerten Aufbau, der eine obere (äußere) Schicht aus dem ersten Gel und eine untere (innere) Schicht aus dem zweiten Gel umfasst. Allerdings legen Experimente nahe, dass die relative Lokalisierung der zwei Enzyme nicht kritisch ist.

**[0039]** Einige Verbandstypen enthalten wünschenswerterweise eine Schicht aus Barrierematerial, die bei Verwendung an der Grenzfläche mit der Haut ist, z.B. angrenzend an das zweite Gel (mit Peroxidase-Enzym) in der obigen Anordnung, um ein unerwünschtes Eintreten von Catalase aus der Haut in den Verband, z.B. aus Wundflüssigkeit oder aus Mikroben, die den Bereich besiedeln, zu verhindern. Ein Eindringen von Catalase in den Verband ist unerwünscht, da dieses Enzym mit der Peroxidase zur Reaktion mit Wasserstoffperoxid in Wettbewerb treten würde und somit die Wirksamkeit reduzieren würde. Geeignetes Barrierematerial umfasst z.B. eine semipermeable Folie oder Membran mit einer relativ niedrigen Molekulargewichts-Ausschlussgrenze, die für die antimikrobielle Spezies, die durch die peroxidative Peroxidase produziert wird, permeabel ist, für Catalase aber nicht durchlässig ist. Geeignete Materialien sind dem Fachmann bekannt und umfassen Celluloseacetatfilm, z.B. der, der zur Herstellung von Dialysemembranen verwendet wird, mit einer Molekulargewichts-Ausschlussgrenze von etwa 15 kD.

**[0040]** Wie oben erwähnt wurde, enthält der Verband wünschenswerterweise eine Quelle für Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym, z.B. Glucose für Glucoseoxidase. Vorzugsweise ist die Glucose in der Form von reinem Material mit pharmazeutischer Qualität. Glucose kann auch in Form von Honig zugeführt werden, der natürlicherweise andere Vorzüge liefert, z.B. Heilung und antimikrobielle Faktoren. Das Substrat wird vor Verwen-

derung des Verbandes wünschenswerterweise physikalisch von dem Oxidoreduktase-Enzym getrennt, um eine vorzeitige Reaktion zu verhindern, obgleich, da Sauerstoff für eine Reaktion erforderlich ist, unter der Voraussetzung, dass die Sauerstoffzufuhr begrenzt ist, nur eine geringe Reaktion auftreten kann. Dies wird unten diskutiert werden. Das Substrat kann in einem Einschluss aus einem semipermeablen Membranmaterial, z.B. Material wie solches, das als Dialysemembran verwendet wird, beispielsweise Celluloseacetat (das oft auch als „Visking Tubing“ bekannt ist), oder in einer Gelplatte oder einem Gelkissen, z.B. aus Agarose, enthalten sein. Eine solche Gelplatte oder ein Gelkissen ist wünschenswerterweise um eine mechanische Verstärkungsstruktur, z.B. ein Blatt aus Baumwollgaze usw., wie es oben diskutiert wurde, gegossen. Das Substrat kann zweckdienlicher Weise in Form eines sich durch Scherung verdünnenden Gels, beispielsweise eines geeigneten Gummis wie Xanthangummi, was oben diskutiert wurde, vorzugsweise ohne mechanische Verstärkungsstruktur für eine gießbare Produktion, sein. Das Substrat kann alternativ in einem hydratisierten Gel, z.B. aus einem hydrophilen Polymermaterial, wie es oben diskutiert wurde, vorliegen. Das Substrat, z.B. Glucose, ist typischerweise in einer Menge bis zu etwa 25 Gew.-% des Gewichts des Verbandes vorhanden.

**[0041]** Es ist hilfreich, die relativen Mengen an Enzym und Substrat so gegeneinander abzuwägen, dass es einen Überschuss an Wasserstoffperoxid gibt, der, obgleich weniger wirksam als die Produkte der Lactoperoxidasewirkung, über eine längere Zeit wirken kann als reaktivere Spezies. Es wird auch angenommen, dass Wasserstoffperoxid die Bildung von neuen Blutgefäßen bei der Wundheilung (Angiogenese oder neovaskuläres Wachstum) stimulieren kann, die Proliferation von neues Gewebe bildenden Zellen stimulieren kann und Enzyme (Proteasen) aktivieren kann, die zur Unterstützung der Neuformung des sich entwickelnden neuen Gewebes verantwortlich sind.

**[0042]** Das Substrat, z.B. Glucose, kann in verschiedenen Formen vorliegen, einschließlich gelöst innerhalb einer hydratisierten Hydrogelstruktur, kann als sich langsam auflösender Feststoff vorliegen oder in einer anderen Struktur zur langsamen Freisetzung eingekapselt vorliegen.

**[0043]** In der Ausführungsform eines Verbandes mit geschichtetem Aufbau, wie er oben erwähnt wurde, kann die Substratquelle (bei Verwendung des Verbandes) zwischen der oberen Schicht aus dem ersten Gel, das Oxidoreduktase-Enzym enthält, und der unteren Schicht aus dem zweiten Gel, das Peroxidase-Enzym enthält, lokalisiert sein. In diesem Fall kann Oxidoreduktase-Enzym gegebenenfalls auch im zweiten Gel enthalten sein, um Substrat zu oxidieren, das wahrscheinlich zu dem zweiten Gel diffundiert. Eine derartige Oxidation ist vom Vorliegen von Wasserstoff abhängig, der an dieser Stelle beschränkt zugeführt wird, da die Oxidationsreaktion proportional zu dem verfügbaren Sauerstoff ist.

**[0044]** Ein einer anderen alternativen Anordnung sind das Peroxidase-Enzym und das Substrat beide im zweiten hydratisierten Gel. In diesem Fall ist das erste hydratisierte Gel (mit Oxidoreduktase-Enzym) wünschenswerterweise über und/oder unter dem zweiten Gel in einer geschichteten Anordnung lokalisiert.

**[0045]** Noch eine andere Option besteht in einer vierschichtigen Struktur mit einer oberen Schicht (von der Haut entfernt) aus dem ersten hydratisierten Gel, die über einer Substratschicht angeordnet ist, die wiederum über einer weiteren Schicht aus erstem hydratisiertem Gel liegt, die wiederum über einer Schicht aus zweitem hydratisiertem Gel am Boden (bei Verwendung nahe der Haut) liegt.

**[0046]** Indem ein Substratüberschuss bereitgestellt wird, ist der Verband fähig, bei Verwendung zur Erzeugung antimikrobieller Spezies über einen ausgedehnten Zeitraum, typischerweise wenigstens zwei Tage, zu wirken, wobei Substrat enthaltendes hydratisiertes Gel oder Substrat enthaltende hydratisierte Gele so formuliert ist/sind, dass sie einen Substratfluss zu den Enzymen verzögern, z.B. durch ausgedehnte Wasserstoffbindung, um eine Diffusion durch das Hydrogel oder aus dem Hydrogel, in dem sie ursprünglich zugeführt wurden, zu verhindern.

**[0047]** Die mikrobielle Wirksamkeit des Systems kann weiter durch den Einschluss von Iodidionen verstärkt werden, die durch die Wirkung von Wasserstoffperoxid mit oder ohne katalytische Wirkung zu elementarem Iod oxidiert werden können (welches ein bekanntes kräftiges antimikrobielles Mittel ist, z.B. wie es in WO 01/28600 offenbart ist). Somit enthält der Verband wünschenswerterweise eine Quelle für Iodidionen, z.B. Kaliumiodid oder Natriumiodid. Da Iod für Wirtszellen in der Wunde (z.B. Epithelzellen, Keratinocyten, Leukozyten) relativ toxisch ist, kann es nicht günstig sei, Iod kontinuierlich bei hoher Konzentration während der Zeit, in der die Formulierung bei Verwendung in Kontakt mit der Haut ist, zu erzeugen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird demnach die Quelle für Iodidionen, z.B. Iodidsalz, in einer Form mit relativ schneller Freisetzung, entweder im Substratgel oder in einer zusätzlichen Membran oder in Gaze oder einer anderen geeigneten Schicht bereitgestellt. Auf diese Weise wird das Wasserstoffperoxid, das zuerst in einer ersten Aktivitäts-

phase produziert wird, im Wesentlichen in einer Iod-erzeugenden Reaktion verbraucht, indem die Haut (z.B. die Wunde) einem Iodschwall ausgesetzt wird, dessen Dauer durch die Menge, Freisetzungsrates und Position der Iodidquelle kontrolliert werden kann. Ein derartiger Iodschwall kann bei einer schnellen Befreiung einer Wunde von einer mikrobiellen Last sehr nützlich sein und seine relativ kurze Dauer erlaubt eine Heilung, indem eine Schädigung an wachsenden Zellen und ihre Reparaturaktivität minimiert wird. Sobald das Iodid verbraucht ist, kehrt das System in einer anschließenden Aktivitätsphase automatisch zur Produktion von Wasserstoffperoxid und verwandter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurück, was die Sterilität aufrecht erhält und eindringende Bakterien nahe der Haut, z.B. an der Wundoberfläche, abtötet. In anderen Ausführungsformen kann es allerdings erwünscht sein, dass die Quelle für Iodidionen bei Verwendung einen anhaltenden Iodfluss (und/oder Hypiodsäure) zur Freisetzung in die Wunde zusätzlich (und im Verhältnis) zu Wasserstoffperoxid aufrechterhält. Die Iodidquelle kann alternativ zusammen mit der Substratquelle für das Oxidoreduktase-Enzym, wie es oben diskutiert wurde, z.B. in einem hydratisierten Gel, lokalisiert sein. Das Iodid kann in verschiedenen Formen vorliegen, einschließlich gelöst in einer hydratisierten Gelstruktur, kann als ein sich langsam auflösender Feststoff vorliegen oder kann innerhalb einer anderen Struktur zur langsamen Freisetzung eingekapselt sein. Iodidsalz kann z.B. in einer Menge von bis zu etwa 2 Gew.-% vorliegen. Allerdings werden selbst in Abwesenheit von Iodid noch antimikrobielle aktive Intermediate gebildet, wie es oben diskutiert wurde.

**[0048]** In Ausführungsformen, in denen das Enzym oder die Enzyme nicht in einem oder mehreren hydratisierten Gelen vorliegen, ist das Enzym oder sind die Enzyme zweckmäßigerweise irreversibel an einen inerten Träger oder Trägerstoff gebunden. Der Träger umfasst geeigneterweise eine Gaze, z.B. aus gewebtem Material wie Baumwolle, oder eine andere geeignete Form von Cellulose usw. Der Träger kann in bekannter Weise aktiviert werden, so dass er fähig ist, mit Protein (Enzym) unter Bildung stabiler Imin-Bindungen zu reagieren, so dass das Enzym an dem Träger zurückgehalten wird. Das befestigte Enzym kann gegebenenfalls mit einem Konservierungsmittel, z.B. Polyvinylalkohol (PVA), z.B. mit 5%, Saccharose, z.B. mit 10%, Gelatine, z.B. mit 2%, und/oder Glycerin beschichtet sein, um die Erhaltung der Enzymaktivität zu unterstützen. Der Verband ist so konzipiert, dass das Enzym oder die Enzyme im Verband in hydratisiertem Zustand vorliegt/vorliegen.

**[0049]** Kovalent vernetzte Gele, z.B. Poly-AMPS, können in einfacher Weise so hergestellt werden, dass sie Enzymmoleküle ausschließen, während sie für Wasserstoffperoxid und Iod permeabel sind. In Gelen mit dieser Natur kann das Enzym oder können die Enzyme eingearbeitet werden, indem sie oben auf die Oberfläche eines Substrat enthaltenden Hydrogels als wässrige Lösung dosiert werden und die Flüssigkeit in das Gel einsickern gelassen wird. Obgleich das Wasser das Gel durchdringt, werden die Enzymmoleküle an der oberen Oberfläche zurückgehalten. Wenn die Enzymlösung PVA (z.B. 6% W/V) enthält, bildet das Enzym/PVA-Gemisch eine dünne hydratisierte Membran, da das Wasser in das Gel gezogen wird. Außerdem stabilisiert die PVA-Matrix das Enzym, mit dem es assoziiert ist.

**[0050]** Es wurde gefunden, dass Verbände gemäß der Erfindung als effiziente Transportmittel für Sauerstoff aus der Umgebungsatmosphäre zu einer Wundstelle wirken, was für die Wundheilung Vorteile hat. Die Rate an Sauerstoff, die durch einen Verband gemäß der Erfindung transportiert wird, ist insbesondere größer als die eines ähnlichen Verbands ohne Oxidoreduktase-Enzym. Der Grund dafür und die resultierenden Vorteile werden unten beschrieben.

**[0051]** Wenn ein herkömmlicher Verband auf die Oberfläche einer Wunde aufgebracht wird, ist die Zufuhr von Sauerstoff aus der Atmosphäre im Allgemeinen inhibiert und die Wunde verarmt relativ an Sauerstoff (hypoxisch oder sogar anoxisch). Hypoxie oder schlimmer Anoxie sind häufig anzutreffende Bedingungen, von denen bekannt ist, dass sie für eine Wundheilung sehr schlecht sind, da die für die Heilung verantwortlichen Zellen (Keratinocyten und Epithelzellen) und die Leukozyten, die eine Infektion bekämpfen und den Prozess kontrollieren, alle Sauerstoff benötigen, wenn sie Erfolg haben sollen. Phagozytische Leukozyten benötigen reichlich Sauerstoff, wenn sie ihre „respiratory burst“-Biochemie betreiben sollen, mit der sie Bakterien abtöten. Collagen ist für die Neubildung der geschädigten Gewebe und für die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) essentiell, welche Collagen-Fasern benötigen, mit denen sie Kapillarwände aufbauen. Die Collagen-Synthese kann nur erfolgen, wenn Hydroxylaseenzyme Lysin und Prolin hydroxylieren können, wodurch Hydroxyl-Lysin und Hydroxylprolin erhalten werden, die beide essentielle Baublöcke von Collagen sind. Hydroxylaseenzyme brauchen eine reichliche Sauerstoffzufuhr für ihr effizientes Funktionieren. Aus diesen Gründen ist es weithin anerkannt, dass Wunden gut mit Sauerstoff versorgt werden müssen, wenn sie wirksam heilen, und es wird oft beansprucht, dass die Sauerstoffzufuhr der geschwindigkeitslimitierende Faktor bei der Wundheilung sein kann. Es wird angenommen, dass mangelnde Heilung oft durch das Fehlen von adäquater Sauerstoff verursacht wird. Darüber hinaus inhibiert eine hohe Sauerstoffspannung in einer Wunde das Wachstum von pathogenen anaeroben Bakterien, die auch für die Erzeugung von schlechtem Geruch verantwortlich sind.

**[0052]** Aus diesen Gründen sind bestimmte sekundäre Verbände, z.B. Tegaderm von 3M Healthcare Ltd oder OpSite von Smith & Nephew (Tegaderm und OpSite sind Marken) aus dünnem Polyurethanfilm, der an einer Seite mit einer Klebstoffschicht beschichtet ist, hergestellt. Diese werden als für Sauerstoff (und Wasserdampf) als relativ permeabel vermarktet, und zwar infolge ihrer besonderen Molekülstruktur und ihres dünnen Querschnitts. Dies ist ein rein passiver Effekt und die Effizienz der Sauerstoffpermeation steht in umgekehrter Beziehung zu der Dicke des Films.

**[0053]** Hydrogele sind für Sauerstoff nicht sehr permeabel, da die in erster Linie aus Wasser bestehen und Sauerstoff in Wasser nicht sehr löslich ist. Ihre Permeabilität für Sauerstoff wird auch in umgekehrter Beziehung zu der Dicke des Verbandes stehen. Bis zum Auftreten der vorliegenden Erfindung bestand der einzige Weg zur Erhöhung der Sauerstoffkonzentrationen in einer Wunde in der Verabreichung von Sauerstoff an den Patienten, entweder durch Erhöhung der Menge im Blut (z.B. indem veranlasst wird, dass der Patient Sauerstoff-angereicherte Luft atmet oder Patient in eine hyperbarische Sauerstoffumgebung gebracht wird, z.B. wie sie in einer Druckkammer verfügbar ist) oder indem gasförmiger Sauerstoff auf die Wunde selbst angewendet wird.

**[0054]** Wie oben betont wurde, haben Verbände gemäß der Erfindung die Fähigkeit, Sauerstoff effizient von der Umgebungsatmosphäre außerhalb der Wunde in das Wundbett zu transportieren, und zwar speziell in Fällen, in denen der Verband eine Schicht aus Oxidoreduktase-Enzym, z.B. Glucoseoxidase, an der äußeren Oberfläche in Kontakt mit der Umgebungsatmosphäre umfasst. Sauerstoff aus der Umgebungsatmosphäre wird in Wasserstoffperoxid umgewandelt (katalysiert durch das Oxidoreduktase-Enzym). Wasserstoffperoxid ist in Wasser viel mehr löslich als molekularer Sauerstoff, so ist der Wasserstoffperoxidtransport durch den Verband (typischerweise durch ein oder mehrere hydratisierte Hydrogele) im Allgemeinen viel effizienter und schneller als der von molekularem Sauerstoff ist. Wasserstoffperoxid diffundiert somit rasch durch den Verband. Wenn das Wasserstoffperoxid auf Catalase trifft (die natürlicherweise in einer Wunde vorliegt oder die als eine Komponente des Verbandes enthalten sein kann), zerfällt es in Sauerstoff und Wasser. Auf diese Weise wird Sauerstoff in Form von Wasserstoffperoxid weitaus effizienter durch den Verband transportiert, als es der Transport von molekularem Sauerstoff ist. Experimente haben gezeigt, dass die Rate des Sauerstofftransports in Verbänden gemäß der Erfindung im Vergleich zu ähnlichen Verbänden ohne Oxidoreduktase-Enzym mehr als verdoppelt werden kann. Die resultierenden erhöhten Sauerstofflevel verstärken den Heilungsprozess, wie es oben beschrieben wurde.

**[0055]** Der Verband enthält zweckmäßigerweise eine Deckschicht oder eine äußere Schicht zum Ankleben des Verbandes an die Haut eines Menschen oder eines Tiers (in bekannter Weise) oder wird damit verwendet. Wenigstens ein Teil der Abdeckung sollte aus Sauerstoff-permeablem Material sein, um zu ermöglichen, dass Sauerstoff aus der Umgebungsluft durch die Deckschicht geht und in den Körper des Verbandes bei Verwendung eintritt, wo er als Cosubstrat der durch Oxidoreduktase katalysierten Reaktion benötigt wird. Das Sauerstoff-permeable Material kann in Form eines „Fensters“ sein, das in einer ansonsten relativ Sauerstoff-undurchlässigen Deckschicht, die beispielsweise aus robusterem Material besteht, eingesetzt ist.

**[0056]** Optional enthält die Deckschicht ein Fenster (oder ein weiteres Fenster), in dem oder durch das Indikatormittel gesehen werden können, z.B. eine Indikatorfolie oder eine ähnliche Struktur, die anzeigt (z.B. durch Farbänderung), wenn die Verbandschemie aktiv ist. Gegebenenfalls kann ein weiterer Indikator bereitgestellt werden, der anzeigt (z.B. durch Farbänderung), wenn die Verbandschemie aufgehört hat.

**[0057]** Eine weitere nützliche Option ist die Bereitstellung von immobilisiertem Catalase-Enzym an der inneren Oberfläche der Deckschicht (z.B. sichergestellt, dass sie dafür adhäsiv ist). Dieses wird schnell zur Zersetzung von überschüssigem Wasserstoffperoxid, das aus einem Wundbereich entweichen kann, wirken. Dieses Merkmal wird wirksam einen schädigenden Aufbau von Wasserstoffperoxid in Bereichen normaler unbeschädigter Haut verhindern.

**[0058]** Der Verband kann als ein Mehrkomponentensystem mit verschiedenen getrennt verpackten Elementen zum Zusammenbau und zur Verwendung durch einen Endverbraucher gemäß den gelieferten Instruktionen geliefert werden. In Ausführungsformen, die eine Substratquelle enthalten, z.B. Glucose, kann diese insbesondere getrennt verpackt von anderen Komponenten, insbesondere dem Oxidoreduktase-Enzym, geliefert werden, um eine vorzeitige Oxidationsreaktion zu verhindern. Alternativ kann der Verband faltbar sein. Eine typische Ausführungsform dieser Art umfasst eine lineare Anordnung von verbundenen Platten oder Plättchen, die eine Platte aus dem ersten hydratisierten Gel, eine Platte aus dem zweiten hydratisierten Gel und eine Platte aus Substrat umfassen, wobei benachbarte Platten durch ein entsprechendes Scharnierteil verbunden sind. Hydrophobes Barrierematerial, z.B. Wachs, ist wünschenswerterweise in die Scharnierteile imprägniert, um

eine laterale Diffusion zu verhindern. Gute Resultate wurden mit einer Ausführungsform erzielt, die in Sequenz eine Platte aus Substrat, eine Platte aus zweitem hydratisiertem Hydrogel (enthaltend Peroxidase-Enzym) und eine Platte aus erstem hydratisiertem Hydrogel (enthaltend Oxidoreduktase-Enzym) umfasst, wobei benachbarte Platten durch einen entsprechenden faltbaren Scharnierteil verknüpft sind. Um einen solchen Verband zur Verwendung vorzubereiten, werden die zwei äußeren Platten gefaltet, um die Substratplatte über die Platte aus zweitem Gel zu bringen und die Platte aus erstem Gel über die Substratplatte zu bringen, wodurch eine geschichtete Anordnung gebildet wird, wie sie oben beschrieben wurde. Die resultierende geschichtete Anordnung wird auf die Haut, z.B. eine Wunde, mit der Platte aus zweitem Gel in Kontakt mit der Haut gelegt und kann z.B. durch Verwendung einer Klebstoffdeckschicht an Ort und Stelle gehalten werden.

**[0059]** Eine Komponente oder mehrere Komponenten des Verbands können in einem Einschluss, z.B. einem Sack oder Beutel aus Barrierematerial enthalten sein, der/das für Sauerstoff, Wasser und Wasserstoffperoxid permeabel ist, aber eine unerwünschte Migration von Materialien verhindert. Ein solcher Einschluss hat inter alia den Effekt, möglicherweise störende Substanzen, z.B. Catalase, Eisenionen usw., daran zu hindern, von einer Wundstelle in den Verband aufgenommen werden. Der Einschluss kann auch eine unerwünschte Migration von Enzym(en) in eine Wunde verhindern. Geeignetes Barrierematerial umfasst z.B. eine semipermeable Folie oder Membran, z.B. Celluloseacetat oder Celluloseester, z.B. eine, die nur für Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 350 Da durchlässig ist (möglicherweise mit einer nominalen Gewichtsausgangsgrenze von 500 Da, aber mit einer tatsächlichen Grenze von kleiner als 350 Da). Geeignete Membranen umfassen Celluloseacetatmembran, Code Z368024, geliefert von Sigma, Spectrum SpectraPor-Celluloseestermembran, Code 131054, geliefert von NBS Biologicals, und derzeit begünstigt, insbesondere für eine Antiakneverband, Polyurethan, z.B. Tegaderm-Film von 3M (Spectrum, SpectraPor und Tegaderm sind Marken).

**[0060]** Die Wasser-absorbierenden Komponenten des Verbands können in einfacher Weise auf die Wunde oder die Infektionsstelle appliziert werden, speziell wenn sie in einer verarbeitbaren oder fließfähigen Form formuliert sind. Es gibt viele mögliche Formulierungen, die diesen Effekt erreichen, und diese können durch einfaches Experimentieren in einfacher Weise bestimmt werden. Solche Formulierungen können mit besonderer Leichtigkeit und Bequemlichkeit aus komprimierbaren Tuben oder spritzenartigen Röhren (mit einem Kolben) mit einer Düse mit etwa 3 mm Durchmesser appliziert werden. Es kann speziell hilfreich sein, die Komponenten in einer einfachen Anordnung aus zwei oder mehr Röhren zuzuführen, wenn dies durch die besondere Verwendungsformulierung erforderlich ist, so dass das gewünschte Gemisch aus Gelen durch eine einzelne Betätigung auf eine bestimmte Stelle ausgedrückt werden kann. Solche Mehrröhrenanordnungen sind gut bekannt und werden in der Industrie für andere Anwendungen häufig eingesetzt. Diese Anordnung genügt perfekt und zweckmäßig dem Bedarf, die Gele bis zum Verwendungszeitpunkt getrennt voneinander zu halten. Es wurde auch festgestellt, dass eine Komponente oder mehrere Komponenten aus einem Druckbehälter appliziert werden kann/können, so dass das Gel als Schaum, Spray oder sogar als Aerosol appliziert wird. Innerhalb der hier gegebenen Richtlinien kann die Formulierung, die die bestimmten physikalischen Eigenschaften (Viskosität usw.) liefert, die für diesen Abgabemodus erforderlich sind, durch einfaches Experimentieren leicht bestimmt werden. Verarbeitbare Kunststoffgele aus Tuben oder unter Druck gesetzte Abgabegele können in Kombination mit strukturierten Platten verwendet werden, um eine passende Anordnung der Grundringdichten zu liefern.

**[0061]** Verbände mit geschichtetem Aufbau bzw. Schichtaufbau, die sich durch Scherung verdünnende Gele umfassen, können in einfacher Weise hergestellt werden, z.B. vom Endverbraucher, indem die Gele in geeigneter Reihenfolge aufeinander gegossen oder getropft werden, um eine gewünschte geschichtete Anordnung von Gelen zu erzeugen. So können die verschiedenen Verbandskomponentengele in getrennten Behältern, z.B. Tuben oder Flaschen oder möglicherweise einem Mehrkompartimentbehälter, geliefert werden. Die verschiedenen Gele können zur Identifizierungsvereinfachung mit geeigneterweise gefärbtem Latex farbkodiert sein. Die Gele können direkt auf die Haut eines Verbrauchers appliziert werden. Eine Deckschicht oder eine äußere Schicht braucht bei solchen Ausführungsformen nicht erforderlich zu sein.

**[0062]** Verbände gemäß der Erfindung (oder Komponenten davon) werden geeigneterweise in sterilen, versiegelten, wasserundurchlässigen Verpackungen, z.B. laminierten Aluminiumfolien-Taschen geliefert.

**[0063]** Verbände gemäß der Erfindung können in einem Bereich verschiedener Größen und Formen zur Behandlung von Bereichen der Haut, z.B. Wunden verschiedener Größen und Gestalt, hergestellt werden. Geeignete Mengen an Enzymen und Substraten und Iodid, wenn vorhanden, können für einen bestimmten Verband experimentell leicht bestimmt werden.

**[0064]** Die Erfindung wird durch Erläuterung in den folgenden Beispielen und anhand der beigefügten Zeichnungen näher beschrieben, wobei:

**[0065]** [Fig. 1](#) bis [Fig. 6](#) schematische Querschnittsdarstellungen von 6 verschiedenen Ausführungsformen von Wundverbänden gemäß der Erfindung sind.

#### Detaillierte Beschreibung von Ausführungsformen

**[0066]** Was die Figuren angeht, so stellen die [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#) verschiedene unterschiedliche Ausführungsformen von Wundverbänden gemäß der Erfindung schematisch dar. In all diesen Zeichnungen stellt ein kreuzschraffiertes Element ein Sacht einer semipermeablen Membran, z.B. Celluloseacetat, oder eine Gelplatte, enthaltend eine wässrige Lösung von Glucose und Kaliumiodid, dar; ein Element mit fetten Schraffierungslinien, die sich von oben links nach unten rechts erstrecken, stellt eine hydratisierte Hydrogelplatte dar, die Glucoseoxidase im Gel eingeschlossen enthält; und ein Element mit fetten Schraffierungslinien, die sich von oben rechts nach unten links erstrecken, stellt eine hydratisierte Hydrogelplatte dar, die Lactoseperoxidase im Gel eingeschlossen enthält.

**[0067]** Ausgefüllte Kreise stellen Kügelchen aus Alginatgel (typischerweise etwa 2 mm im Durchmesser) dar, die Glucoseoxidase eingeschlossen enthalten. Alternativ könnten andere Gele (z.B. Agarose) oder Polymere verwendet werden, um Kügelchen zu bilden. Glucose ist fähig, in diese Kügelchen zu diffundieren und Wasserstoffperoxid ist fähig, herauszudiffundieren.

**[0068]** Nicht ausgefüllte Kreise stellen Kügelchen aus Alginatgel (typischerweise etwa 2 mm Durchmesser) dar, die eingeschlossene Lactoperoxidase enthalten. Alternativ könnten andere Gele (z.B. Agarose) oder Polymere verwendet werden, um die Kügelchen zu bilden. Wasserstoffperoxid ist fähig, in diese Kügelchen zu diffundieren, und reaktive Sauerstoffspezies sind fähig, herauszudiffundieren.

**[0069]** Schattierte Kreise stellen Kügelchen aus Alginatgel (typischerweise etwa 2 mm Durchmesser) dar, die eingeschlossene Glucose und Kaliumiodid enthalten. Alternativ könnten andere Gele (z.B. Agarose) oder Polymere verwendet werden, um die Kügelchen zu bilden. Glucose ist fähig, aus diesen Kügelchen zu diffundieren.

**[0070]** [Fig. 1](#) stellt eine bevorzugte Ausführungsform eines Wundverbands gemäß der Erfindung dar. Der Verband hat einen geschichteten Aufbau und umfasst eine äußere Schicht oder eine Deckschicht bzw. Bedeckung **10** in Form eines Sauerstoff-permeablen selbstklebenden Pflasters, das zum Ankleben an die Haut **12** eines Subjekts geeignet ist, so dass es eine Wunde **14** bedeckt. Die Bedeckung **10** schließt Folgendes ein: eine obere Schicht, die ein erstes feuchtes Pad **16** mit immobilisierter Glucoseoxidase umfasst; eine Zwischenschicht, die eine Lösung von Glucose und Kaliumiodid in einem semipermeablen Sacht oder einer semipermeablen Gelplatte **18** umfasst, und eine untere Schicht, die ein zweites feuchtes Pad **20** mit immobilisierter Lactoperoxidase umfasst. Unter Pad **20** ist eine Lage **22** aus Gaze zum Kontakt mit der Wunde **14**. Die Pads und das Sacht können im Allgemeinen wie unten beschrieben sein.

**[0071]** Der Verband wird zunächst als Multikomponentensystem mit den einzelnen Komponenten getrennt verpackt in entsprechenden versiegelten sterilen Verpackungen geliefert. Wenn er zur Verwendung benötigt wird, werden die Verbandskomponenten aus den Verpackungen entfernt und in geeigneter Weise und Reihenfolge zur Herstellung des fertigen Verbands, wie er gezeigt ist, appliziert.

**[0072]** [Fig. 2](#) stellt eine andere bevorzugte Ausführungsform des Wundverbands dar, im Allgemeinen ähnlich der in [Fig. 1](#), mit ähnlichen Komponenten, die durch gleiche Bezugszeichen identifiziert sind. In dieser Ausführungsform umfasst die obere Schicht ein erstes feuchtes Pad **24** mit Calciumalginatperlen, die Glucoseoxidase eingeschlossen enthalten. Die Zwischenschicht umfasst ein Pad **26** mit Gelperlen, die Glucose und Kaliumiodid enthalten. Die untere Schicht umfasst ein zweites feuchtes Pad **28** mit Calciumalginatperlen, die Lactoperoxidase eingeschlossen enthalten.

**[0073]** [Fig. 3](#) veranschaulicht eine weitere im Allgemeinen ähnliche Ausführungsform, die aber eine obere Schicht in Form eines Pads mit Gelperlen, die Glucose und Kaliumiodid enthalten, und eine untere Schicht, die ein feuchtes Pad (oder eine Gelplatte) **32** mit Calciumalginatperlen, die eingeschlossene Glucoseoxidase enthalten, und Calciumalginatperlen, die eingeschlossene Lactoperoxidase enthalten, umfasst.

**[0074]** [Fig. 4](#) ist eine Variante von [Fig. 3](#), in der die obere Schicht ein semipermeables Sacht oder eine se-

mipmerable Gelplatte **34**, welches/welche Glucose und Kaliumiodid enthält, umfasst.

### Beispiele

#### Konstruktion von Glucoseoxidase- und Lactoperoxidase-Kügelchen

**[0075]** Das Enzym, entweder Lactoperoxidase (LPO) (von Sigma, Kat.-Nr. L2005) oder Glucoseoxidase (GOX) (von Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 105147) wird in reinem Wasser mit einer Rate von 1 Mikrogramm pro ml (LPO) oder 10 Mikrogramm pro Liter (GOX) aufgelöst. Eine Lösung von Alginsäure (Manucol DM (Manucol DM ist eine Marke) von C P Kelco) (1 Gramm pro 100 ml Wasser) wird bei erhöhter Temperatur hergestellt und gekühlt. Enzymlösung wird mit der gekühlten Alginsäure bei geeigneter Rate vermischt. Die resultierende Alginsäure/Enzym-Lösung wird dann durch eine peristaltische Pumpe in eine Röhre gepumpt, welche zu einer Ausgangsdüse führt, die zweckdienlicherweise durch eine Standardlaborglaspasteurpipette gebildet wird, welche über einem Härtebad aus Calciumchloridlösung (10% G/V) platziert ist. Der Fluss der Pumpe und die Höhe der Ausgangsdüsen werden so eingestellt, dass der ausfließende Strom der Alginsäure-Enzym-Lösung zu getrennten Tröpfchen geformt wird, wenn er in die Calciumchloridlösung eintritt. Jedes Tröpfchen beginnt schnell, sich zu verfestigen, wenn das Calcium beginnt, die Alginsäuremoleküle zu vernetzen, und 10 Minuten nach Abgabe des letzten Tröpfchens ist der Herstellungsprozess vollständig. Alle neugebildeten Kügelchen werden aus der Calciumchloridlösung entfernt, indem das Ganze durch ein Sieb geeigneter Maschengröße gegossen wird. Restliches Calciumchlorid wird durch Spülen mit reinem Wasser entfernt. Die Kügelchen werden in Wasser oder in wasserdichten Behältern oder in physiologischer Pufferlösung, z.B. Phosphat-gepufferter Salzlösung, gelagert. Alternativ können sie in Glycerin oder Glycerin-in-Wasser-Lösungen gelegt werden, um den Gehalt an eingeschlossenem Wasser zu verringern. Welche Lagerungsbedingungen auch verwendet werden, sie dürfen kein Austrocknen oder Härten in Abwesenheit von Wasser oder Glycerin zulassen.

#### Aufbau von Glucose-Kügelchen

**[0076]** Es wird dem oben beschriebenen Verfahren gefolgt, außer dass keine Enzyme zugesetzt werden und Glucose mit einer Rate von 12,5 g pro 100 ml sowohl im reinen Wasser als auch im Calciumchlorid-Härtungsbad enthalten ist. Die Gelkügelchen werden mit Calcium-freier Glucoselösung gewaschen, was eine Entfernung von überschüssigem Calcium ohne Verarmung an Glucose erlaubt.

#### Herstellung eines Enzym-Kügelchen enthaltenden Pads

**[0077]** Baumwollmull geeigneter Größe wird auf eine geeignete Oberfläche gelegt, durch die Wasser fließen kann (z.B. ein flaches Kunststoffsieb). Eine Suspension aus Enzymkügelchen wird auf den Baumwollmull dertart gegossen, dass die Kügelchen in dem entstehenden Flor des Gewebes eingeschlossen sind, wenn das suspendierende Wasser abfließt. Ein zweites Stück Mull wird dann über das erste gelegt, so dass die Enzymkügelchen zwischen den zwei Gewebeschichten eingeschlossen sind. Es kann ein Klebstoff oder ein Nähen oder ein Heften verwendet werden, um die obere Schicht an der Bodenschicht zu befestigen. Überschüssige Flüssigkeit wird ablaufen gelassen, allerdings wird das Pad nicht austrocknen gelassen.

**[0078]** Die Zahl der Kügelchen, die pro Pad enthalten ist, sollte auf der Basis bestimmt werden, dass jedes Oxidasepad etwa 100 mg GOX tragen sollte und jedes Peroxidasepad etwa 100 mg LPO tragen sollte.

#### Herstellung eines Pads, das Glucosekügelchen und Iodid enthält

**[0079]** Das oben beschriebene Verfahren wird mit Glucose enthaltenden Kügelchen angewendet, um ein Pad herzustellen, das eingeschlossene Glucose enthält, allerdings mit der Ausnahme, dass ein zusätzlicher Schritt am Ende des Verfahrens eingeschlossen ist, in dem das Pad in eine Kaliumiodidlösung (10 mM) eingeweicht wird.

#### Herstellung eines Glucose/Iodid-enthaltenden Sachets bzw. Briefchens

**[0080]** Glucose wird in einer wässrigen 5 mM-Lösung von Kaliumiodid mit einer Rate von 12,5 g pro 100 ml aufgelöst. Diese Lösung wird dann in einen Dialysebeutel (vorher in siedendes Wasser für 10 Minuten gelegt und gründlich gespült) mit einem zugänglichen Bereich von etwa 40 × 20 mm gegeben und versiegelt.

## Beweis der oxidativen Aktivität eines zusammengesetzten Verbundverbands

**[0081]** Eine 1%-ige wässrige Lösung von Agarose wird hergestellt, Kaliumiodid wird mit einer Konzentration von 10 mM und lösliche Stärke mit einer Konzentration von 1% G/V zugesetzt. Die Lösung wird geschmolzen und in einer Petrischale unter Bildung einer kontinuierlichen Schicht mit etwa 5 mm Dicke ausgebreitet und härten gelassen. Sobald sie gehärtet ist, wird ein Peroxidasepad, wie es oben beschrieben ist, auf die Oberfläche gelegt, anschließend wird ein Glucosepad oder -sachet, wie es oben beschrieben ist, oben auf dieses gelegt und schließlich wird ein Glucoseoxidasepad, wie es oben beschrieben ist, oben auf diese beiden gelegt, um einen dreischichtigen Stapel zu bilden. Die Entwicklung einer blauen Farbe innerhalb des Stärkeagars zeigt die oxidative Aktivität des Verbundverbands an.

## Verwendung des kombinierten Verbundverbands als Wundbehandlung

**[0082]** Die Pads oder Sachets zu diesem Zweck, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, werden in geeignetem passend versiegelt und einer Gamma-Bestrahlung unterworfen, um die mikrobiologische Sterilität sicherzustellen, wobei Techniken eingesetzt werden, die bekannt sind und routinemäßig in der Industrie eingesetzt werden.

**[0083]** Zuerst wird die Wunde mit einer dünnen Lage aus steriler Gaze bedeckt. Als nächstes werden die drei Schichten steriler Pads als dünner Stapel hinzugefügt, wobei das Peroxidasepad das erste ist, gefolgt von dem Glucosepad oder -sachet als nächstes und dem Glucoseoxidasepad als letztes. Die Pads werden zu einer Größe geschnitten, die gerade die offene Wunde bedeckt. Schließlich wird der Verbundverband vorzugsweise durch einen Klebfilm, z.B. als normales „sticking plaster“ oder „Micropore“ chirurgisches Tape, an Ort und Stelle gehalten.

## Andere Ausführungsformen

**[0084]** Die Enzyme können an verschiedenen Partikel- oder Fasertypen immobilisiert werden, wobei Koppelungsverfahren verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Die Partikel können aus Cellulose, Siliziumdioxid oder verschiedenen ungefährlichen Polymeren bestehen. Alginat kann in anderen Formen als Kügelchen, z.B. als Platten oder extrudierte Fäden, verwendet werden, wobei Calcium als Härtungsmittel verwendet wird. Mikrokapseln, z.B. solche, die durch bekannte Techniken mit Polyamid hergestellt werden, können verwendet werden, um jede der Komponenten einzukapseln.

**[0085]** Weitere Verbandskomponenten wurden wie folgt hergestellt.

## Herstellung eines Enzym-enthaltenden Pads

**[0086]** Lose gewebte Baumwollgaze wird in einer Reihe von Stücken mit etwa 100 mm × 100 mm geschnitten und jedes Stück wird in einen entsprechenden geeigneten Behälter mit flachem Boden gelegt. 1% G/V Alginat (auch „Alginat“ genannt; z.B. Manuocol DM (Manuocol DM ist eine Marke) von CP Kelco) wird hergestellt, indem das Gel in einer geeigneten, erhitzten wässrigen Lösung gelöst wird. Nach dem Abkühlen wird Enzym zu dem Alginat gegeben, wodurch eine Endkonzentration von 5 µg/ml Glucoseoxidase (GOX, von Boehringer Mannheim, Kat.-Nr.: 105147) oder 10 µg/ml Lactoperoxidase (LPO, von Sigma, Kat.-Nr.: L2005) erhalten wird. 10 ml jeder Enzym-Alginat-Lösung werden hergestellt und gleichmäßig auf die einzelnen Baumwollgaze-Pads gegossen. Das Gel wird durch Zusatz eines Überschusses an 10% G/V Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) gehärtet und für 10 Minuten stehen gelassen. Die Pads werden dann zweimal für jeweils 5 Minuten in überschüssigem destilliertem/entionisiertem Wasser zur Entfernung des CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Die Pads können dann in feuchter Umgebung gelagert werden, um ein Austrocknen zu verhindern.

## Herstellung von Glucose-enthaltendem Pad

**[0087]** Lose, gewebte Baumwollgaze wird auf etwa 100 mm mal 100 mm geschnitten und in einen geeigneten Behälter mit flachem Boden gelegt. 1% G/V Agarose und 40% G/V-Glucose werden in einer geeigneten wässrigen Lösung aufgelöst und auf die Gaze gegossen, während es noch in geschmolzenem Zustand ist. Das Gel wird durch Abkühlen härten gelassen. Das Gelpad wird dann in einer feuchten Umgebung gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern. Um ein Pad zu produzieren, das Glucose und Kaliumiodid enthält, wird ein ähnliches Verfahren durchgeführt, aber nachdem Glucose und Agarose gelöst wurden, wird Kaliumiodid (KI) zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Die Lösung kann dann wie oben gegossen, härten gelassen und gelagert werden.

## Beweis der antimikrobiellen Eigenschaften eines kombinierten Verbundverbands

## Beispiel 1

**[0088]** Unter Anwendung von Standardpraktiken wird eine mikrobielle Wachstumsplatte mit 1,5% Agarose hergestellt, allerdings wird Glucose durch Fructose als einzige Kohlenstoffquelle ersetzt. Die Platten haben typischerweise eine Dicke im Bereich von 5 mm. *Pseudomonas aeruginosa* wurde auf der Oberfläche der Platte in einem gleichmäßigen „Rasen“ ausgebreitet. Ein Pad, das LPO-Alginat (hergestellt wie unmittelbar oben beschrieben) enthielt, mit etwa 20 mm<sup>2</sup> wurde auf die Oberfläche der Platte gelegt. Direkt auf dieses Pad wird ein 20 mm<sup>2</sup>-Pad gelegt, das Glucose-Agar enthält (hergestellt wie unmittelbar oben beschrieben) (mit oder ohne KI). Schließlich wurde ein 20 mm<sup>2</sup>-Pad, das GOX-Alginat (hergestellt wie unmittelbar oben beschrieben) enthielt, auf das Glucose-Agar-Pad geschichtet. Nach 24 Stunden kann eine Clearance-Zone um den Padstapel deutlich erkannt werden, was die Produktion und Diffusion von aktiven antimikrobiellen Spezies zeigt, die das Wachstum der aufgetragenen Bakterien verhindert. Die Entfernung eines beliebigen der drei Pads (Kontrollexperimente) führte zu keiner Clearance-Zone um den Padstapel, was zeigt, dass beide Enzyme und Glucose vorhanden sein müssen, damit die Kaskade effektiv abläuft.

## Beispiel 2

**[0089]** Um die Produktion von reaktiven oxidativen Spezies durch das gestapelte Enzymsystem zu zeigen, wird alternativ eine Platte mit 1% G/V Agar gegossen, die 1% lösliche Stärke (z.B. ARCOS, Kat.-Nr.: 177132500) und 10 mM KI enthält. Die Platte wird durch Abkühlen härten gelassen. Das LPO-Alginat-Pad, gefolgt vom Glucose-Agar-Pad und schließlich dem GOX-Alginat-Pad können wie oben in Beispiel 1 gestapelt werden. Die Produktion der reaktiven oxidativen Spezies kann dann durch das intensiv blau gefärbte Chromogen sichtbar gemacht werden, das durch die gut dokumentierte Wechselwirkung von elementarem Iod (die oxidative Spezies oxidieren das Iodid zu Iod) und Stärke produziert werden. Diese Verfärbung kann nach 5 Minuten klar gesehen werden, wobei sich Intensität und Ausbreitung über die Zeit aufbauen. Nach 30 Minuten war die Farbintensität so hoch, dass es ein tiefes Blau wurde, was eine fortgesetzte Produktbildung anzeigt. Dies zeigt, dass beide reaktiven oxidativen Spezies und Iod produziert werden, die beide die antimikrobielle Aktivität des Verbundverbands unterstützen.

## Beispiel 3

**[0090]** Eine Variation an Beispiel 2 besteht darin, eine geringe Konzentration an GOX (0,25 µg/ml) in das LPO-Alginat-Pad einzuschließen, um eine anfängliche Produktion von reaktiven oxidativen Spezies zu begünstigen. Diese nutzt Sauerstoff, der im Gel verfügbar ist, und wird durch die Glucose initiiert, die in das LPO-Alginat-Pad diffundiert. Diese Reaktion ist infolge der Verfügbarkeit von Sauerstoff limitiert und wird aufhören, wenn Sauerstoff erschöpft ist. Um die Produktion von reaktiven oxidativen Spezies über das gestapelte Enzymsystem zu zeigen, wird eine 1% G/V-Agarplatte gegossen, die 1% lösliche Stärke (z.B. ARCOS, Kat.-Nr.: 177132500) und 10 mM/KI enthält. Die Platte wird durch Abkühlen härten gelassen. Das kombinierte LPO- und GOX-Alginat-Pad, gefolgt vom dem Glucose-Agar-Pad und schließlich dem GOX-Alginat-Pad, können wie oben beschrieben gestartet werden. Die beschleunigte Produktion der reaktiven oxidativen Spezies kann dann durch das intensiv blau gefärbte Chromogen sichtbar gemacht werden, das durch die wohlbekanntere Wechselwirkung von elementarem Iod (die oxidative Spezies oxidiert das Iodid zu Iod) und Stärke produziert wird. Diese Verfärbung kann nach nur kurzer Zeit wie 1 Minute deutlich gesehen werden, wobei sich Intensität und Ausbreitung mit der Zeit aufbauen. Die Verfärbung wird nach 15 Minuten langsam deutlich abnehmen, wenn das obere GOX-Alginat-Pad nicht verwendet wird. Wenn das GOX-Alginat-Pad wie oben beschrieben verwendet wird, wird die Verfärbung sich stark fortsetzen, wie es in Beispiel 2 oben zu sehen ist. Nach 30 Minuten hat die Farbintensität zugenommen und die Farbe wird dunkelblau, was eine fortgesetzte Produktbildung anzeigt. Dies zeigt, dass beide oxidativen Spezies und Iod produziert werden, welche beide die antimikrobielle Aktivität des Verbundverbands unterstützen.

**[0091]** Es wurden weitere Arbeiten durchgeführt, die Gels mit relativ hoher Xanthangummi-Konzentration verwendeten.

## Herstellung von Enzym enthaltenden Xanthangummi/Alginat-Gelen

**[0092]** Es wurde eine Reihe von Xanthangummi (Keltrol)-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen (5 Gew.-%, 10 Gew.-% und 20 Gew.-%) hergestellt, indem geeignete Mengen an Keltrol in destilliertem/entioniertem Wasser mit Raumtemperatur (etwa 20°C) aufgelöst wurden. Eine Reihe von Lösungen von Alginsäure

(Manucol DM (Manucol DM ist eine Marke) von CP Kelco) mit verschiedenen Konzentrationen (2 Gew.-% und 4 Gew.-%) wurden ebenfalls hergestellt, indem geeignete Mengen von Manucol DM in destilliertem/entionisiertem Wasser mit geeigneter erhöhter Temperatur gelöst wurden. Die resultierenden Alginsäurelösungen wurden abgekühlt.

**[0093]** Eine Reihe von Xanthangummi/Alginat-Gelen, die die zwei Materialien in verschiedenen Behältnisanteilen enthielten, wurden hergestellt, indem die Lösungen in geeigneten Mengen vermischt wurden, bis ein homogenes Gemisch erhalten wurde. Beispielsweise wurden Gele hergestellt, deren Gewichtsverhältnis von Xanthangummi zu Alginat von 5:1 (z.B. gleiche Mengen von 5%-iger und 1%-iger Lösung oder 10%-iger und 2%-iger Lösung), 5:2, 10:1 usw., je nach Bedarf, haben, hergestellt.

**[0094]** Enzym enthaltende Gele wurden durch den Zusatz der geeigneten Menge der Enzyme Glucoseoxidase (GOX) oder Lactoperoxidase (LPO) zu den Gelproben hergestellt. Enzymlösung kann entweder zu einer Xanthangummi- oder Alginat-Lösung vor dem Vermischen oder zu einem Xanthangummi/Alginat-Gel nach Vermischen gegeben werden. Experimente wurden unter Verwendung von LPO von Sigma (Katalognummer L2005), gelöst in reinem Wasser mit einer Rate von 1 Mikrogramm pro Milliliter und GOX von Boehringer Mannheim (Katalognummer 105147), gelöst in reinem Wasser mit einer Rate von 10 Mikrogramm pro Milliliter, durchgeführt.

#### Aufbau von vernetzten Xanthangummi/Alginat-Gelpads, getragen von Baumwollgaze

**[0095]** Ein Gelgemisch aus 10% Xanthangummi, 2% Alginsäure wurde hergestellt, indem gleiche Volumina von 20% Xanthangummi-Stammlösung und 4% Alginsäure-Stammlösung, die wie oben beschrieben hergestellt worden waren, vermischt wurden. LPO und GOX wurden zu getrennten Proben dieses Gelgemischs gegeben, um eine LPO-enthaltendes Gel und ein GOX-enthaltendes Gel herzustellen. Die Enzymlevel können entsprechend dem erforderlichen Level an Aktivität variiert werden. In diesem Fall waren die verwendeten Enzymlevel 100 µg/ml für LPO und 50 µg/ml für GOX.

**[0096]** Etwa 5 ml des LPO-enthaltenden Gels wurde auf einen Streifen aus Baumwollgaze mit etwa 40 mm × 50 mm glatt aufgetragen. Eine zweite Gazeschicht gleicher Größe wurde oben auf das LPO-Gel unter leichtem Druck gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung des Gels sicherzustellen. Etwa 5 ml des GOX-enthaltenden Gels wurden dann auf der Oberseite der zweiten Schicht aus Baumwollgaze verteilt, wobei eine dritte Gazeschicht gleicher Größe oben auf das GOX-enthaltende Gel, wiederum mit leichtem Druck, um eine gleichmäßige Verteilung des GOX-enthaltenden Gels sicherzustellen, aufgebracht. Dies produzierte ein Pad oder eine Platte mit sandwichartigem Aufbau, die drei Lagen aus Baumwollgaze umfasste, die durch eine Schicht aus LPO-enthaltendem Gel bzw. eine Schicht aus GOX-enthaltendem Gel getrennt waren.

**[0097]** Die resultierenden Pads wurden für 10 Minuten in ein Bad einer Calciumchloridlösung (10% G/V) gelegt. Die Pads wurden aus dem Bad entfernt und wurden zur Entfernung von restlichem Calciumchlorid durch zwei zehninütige Waschgänge in destilliertem/entionisiertem Wasser gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde durch Trocknen der Pads für mehrere Minuten in Adsorbensgewebe entfernt.

#### Beweis der Aktivität des vernetzten Xanthangummi/Alginat-Gelpads

##### Beispiel 4

**[0098]** Die Stärke/Iod-Komplex-Reaktion wurde verwendet, um die enzymatische Produktion von reaktiven oxidativen Spezies (ROS) in dem vernetzten Xanthangummi/Alginat-Gel-Pad, das wie vorstehend beschrieben hergestellt worden war, sichtbar zu machen. In Gegenwart von ROS wird Iodid unter Herstellung von elementarem Iod oxidiert, welches mit Stärke einen Komplex bildet, wodurch ein intensives blaues Chromogen erzeugt wird.

**[0099]** Experimente wurden unter Verwendung einer Platte mit 1% G/V Agar, das 1% lösliche Stärke (AR-COS, Katalognummer 177132500) und 10 mM Kaliumiodid enthielt, durchgeführt. Eine Scheibe des vernetzten Xanthangummi/Alginat-Pads, wie es oben beschrieben wurde (etwa 20 mm × 10 mm × 4 mm) wurde auf die Stärke/Iodid-Platte mit der GOX als oberster Schicht gelegt. Darauf wurde ein Gelpad, das 40% Glucose in 1% Agar umfasste, gelegt, um die Reaktion zu initiieren. Nach etwa 30 Minuten war das untere Pad gelb geworden, was deutlich die Produktion von elementarem Iod anzeigte (Iodid war infolge einer Diffusion aus der Platte in das Gel vorhanden). Nach ungefähr einer Stunde war unter dem Pad eine blaue Färbung sichtbar, die das Vorliegen von ROS in der Stärke/Iodid-Platte anzeigte. 24 Stunden nach Initiierung war ein großer Bereich

der Platte blau geworden, was eine fortgesetzte Produktion von ROS anzeigte.

#### Beispiel 5

**[0100]** Zwei ähnliche Experimente wurden unter Verwendung einer Anordnung durchgeführt, die allgemein wie die oben in Beispiel 4 beschriebene war, allerdings mit dem Glucosepad unter dem vernetzten Xanthangummi/Alginat-Pad. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, und zwar mit den Xanthangummi/Alginat-Gel-Pads in verschiedenen Orientierungen, in einem Fall mit der GOX-Schicht als oberster und im anderen Fall mit der LPO-Schicht als oberster.

**[0101]** Mit dem Pad, das mit der GOX-Schicht als unterste nahe dem Glucosepad positioniert war, konnte nach etwa einer Stunde eine Blaufärbung unter dem Pad gesehen werden. Bei dem anderen Experiment mit der LPO-Schicht als unterste nahe dem Glucosepad konnte nach etwa 2 Stunden eine Blaufärbung unter dem Pad gesehen werden. Dies zeigt, dass selbst bei einer Anordnung unter Verwendung eines Pads mit nicht optimaler Folge ROS noch in ausreichender Menge produziert werden können, um einen oxidativen Effekt in der Indikatorplatte zu erzeugen.

**[0102]** In beiden Experimenten wurde in beiden Gelen in den LPO-Schichten eine gelbe Verfärbung gesehen, die das Vorliegen von Iodproduktion zeigt. Nach 24 Stunden war in beiden Fällen ein großer Bereich der Iod/Iodid-Platte blau geworden, was wiederum die Erzeugung von ROS zeigt.

#### Beweis der Feuchtigkeitsabsorptionsfähigkeit eines Xanthangummigels

**[0103]** Eine 10 Gew.-%-ige Zubereitung von Keltrol in Wasser wurde wie oben beschrieben hergestellt. 1,06 g des 10%-igen Gels wurden dann zu 10,22 g destilliertem/ionisiertem Wasser gegeben, bei 21°C gehalten und versiegelt, um Verdampfungseffekte zu minimieren. Das Wasser wurde abdekantiert und sein Gewicht wurde gemessen, um den Grad der Absorptionsfähigkeit zu bestimmen.

**[0104]** Nach 15 Minuten waren 8,34 g Wasser zurückgeblieben, nach 45 Minuten waren 7,56 g zurückgeblieben, nach 2 Stunden waren 6,51 g zurückgeblieben; nach 18 Stunden waren 2,1 g zurückgeblieben.

**[0105]** Dieses Experiment zeigt, dass das 10% Keltrol-Gel fähig ist, wenigstens das 8-fache seines Gewichts an Wasser zu absorbieren.

#### Beweis der Feuchtigkeitsabsorptionsfähigkeit eines vernetzten Xanthangummi/Alginat-Gel-Gemisches.

**[0106]** Ein Gemisch aus 5 Gew.-% Keltrol und 1 Gew.-% Alginsäure wurde wie oben beschrieben hergestellt. Zwei Schichten Gel wurden zwischen zwei Schichten aus Baumwollgaze gegossen, um ein Pad herzustellen, das vernetzt war, wobei eine 10% Calciumchloridlösung verwendet wurde, und das zweimal für 10 Minuten in Wasser gewaschen wurde, wie es oben beschrieben ist. Das Pad wurde unter Verwendung von absorbierendem Küchenpapier trocken getupft.

**[0107]** Ein Stück des Pads mit 10 mm × 10 mm × 3 mm wurde zur Bestimmung des Anfangsgewichts gewogen (0,28 g). 1 ml Wasser wurde zu dem Pad gegeben. Das Pad wurde entfernt und nach verschiedenen Zeiten gewogen, um die Gewichtszunahme (durch Wasserabsorption) zu bestimmen. Nach 1 Stunde war das Gewicht des Pads 0,37 g; nach 2 Stunden 0,44 g; nach 3 Stunden 0,49 g und nach 6 Stunden 0,5 g.

**[0108]** Dieses Experiment zeigt, dass das vernetzte Xanthangummi/Alginat-Gel noch fähig ist, Wasser zu absorbieren. Verglichen mit dem obigen Beispiel unter Verwendung von 10% Keltrol resultiert die Verwendung eines geringeren Prozentgehalts an Keltrol und vernetztem Alginat in einer geringeren Wasserabsorptionsfähigkeit.

**[0109]** Vernetzte Xanthangummi/Alginat-Gele, die wie oben beschrieben hergestellt worden waren, wurden in der Herstellung eines Wundverbands gemäß der Erfindung eingesetzt, wie es schematisch in [Fig. 1](#) gezeigt ist. Solche Gele wurden zusammen mit einem Glucose/Iodid-enthaltenden Sacht, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, verwendet. Glucose wurde in einer wässrigen 5 mM-Lösung von Kaliumiodid mit einer Rate von 12,5 g pro 100 ml aufgelöst. Die Lösung wurde in einen Dialysebeutel (vorher in siedendes Wasser für 10 Minuten gelegt und gründlich gespült) mit einer zugänglichen Fläche von etwa 40 × 120 mm gefüllt und versiegelt.

**[0110]** Die Komponenten wurden unter Bildung eines Verbands mit dem in [Fig. 1](#) gezeigten Aufbau kombiniert. Der Verband hat einen geschichteten Aufbau und umfasst eine äußere Schicht oder Abdeckung **10** in Form eines für Sauerstoff durchlässigen selbstklebenden Pflasters, das zum Ankleben an die Haut **12** eines Subjekts, so dass eine Wunde bedeckt ist, geeignet ist. Die Abdeckung **10** schließt eine obere Schicht, die ein Pad aus Glucoseoxidase enthaltendem, vernetztem Xanthangummi/Alginat-Gel, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, umfasst; eine Zwischenschicht, die eine Lösung von Glucose und Kaliumiodid in einem semipermeablen Sacht **18**, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, umfasst; und eine untere Schicht, die eine Platte aus Lactoseperoxidase enthaltendem, vernetztem Xanthangummi/Alginat-Gel, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, umfasst, ein. Unter Pad **20** ist eine Lage **22** aus Gaze zum Kontakt mit der Wunde **14**.

**[0111]** Der Verband wird zunächst als Mehrkomponentensystem geliefert, wobei die einzelnen Komponenten getrennt in entsprechenden versiegelten, sterilen Verpackungen verpackt sind. Wenn eine Verwendung erforderlich ist, werden die Verbandskomponenten aus den Verpackungen entfernt und in geeigneter Weise auf eine Wunde appliziert, um den fertigen Verband, wie er gezeigt wurde, zu produzieren.

**[0112]** [Fig. 5](#) stellt eine weitere Ausführungsform eines Verbands gemäß der Erfindung schematisch dar. Diese Verbandsform ist derzeit bevorzugt. Der Verband hat Hauptabmessungen von 100 mm × 100 mm in Form eines Quadrats.

**[0113]** Der dargestellte Verband umfasst eine weiche, hydratisierte Hydrogelplatte **50**, die aus Poly-AMPS besteht (wie in WO 01/96422 beschrieben, geliefert von First Water Ltd.). Das Hydrogel enthält bis zu 23% Glucose (das als Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym wirkt) und Iodidsalze, z.B. 1,6% G/V Kaliumiodid (das ein Vorläufer für Iod ist). Das Hydrogel kann auch bis zu 20% G/V Glycerin enthalten (das als Feuchthaltemittel und Netzmittel wirkt). Die Hydrogelplatte **50** bildet die untere Schicht des Verbands.

**[0114]** Der Verband umfasst auch eine obere Schicht, die durch ein gewebtes Cellulosegaze **52** gebildet wird, an die Glucoseoxidase und Lactoperoxidase irreversibel (kovalent) gebunden sind. Die Gaze **52** wird wie folgt hergestellt.

**[0115]** Die Gaze wird zu einer geeigneten Größe und Gestalt geschnitten (ein Quadrat 100 mm × 100 mm) und wird zur Entfernung von gelösten Stoffen oder teilchenförmigen Stoffen in Wasser gewaschen. Übermäßige Flüssigkeit wird entfernt. Die Gaze wird dann in eine 10 mM-Lösung von Natriummetaperiodat für 60 Minuten bei 25°C eingeweicht. Nach diesem Oxidationsschritt, in dem reaktive Aldehydgruppen gebildet werden, wird die Gaze ausgiebig in Wasser gewaschen, um das Periodat zu entfernen. Nach dem Waschschrift wird die Gaze in einer Lösung von Glucoseoxidase (Biocatalysts – Code G638P) mit 100 µg Pulver pro 50 ml Natriumhydrogencarbonat mit pH 9,0 eingeweicht. Dies entspricht 7000 U/ml. Lactoperoxidase (DMV International) wird ebenfalls mit 100 µl Pulver pro ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat mit pH 9,0 eingearbeitet. Diese Dosen können reduziert werden, da sie eine überschüssige Aktivitätsmenge darstellen. Die Gaze wird mit der Enzymlösung für 4 Stunden bei etwa 20°C reagieren gelassen, wonach die Gaze entfernt wird und extensiv zwischen einer Lösung mit geringer Ionenstärke (entionisiertes Wasser) und einer Lösung mit hoher Ionenstärke (50 mM NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,0 + 1 M NaCl) gewaschen wird, um lose gebundenes Enzym zu entfernen. Die Gaze wird dann mit einem Konservierungsmittel, z.B. 5% PVA, 10% Saccharose oder 2% Gelatine, überzogen und entweder bei Raumtemperatur (etwa 21°C) oder vorzugsweise bei 40°C getrocknet.

**[0116]** Die untere und obere Schicht werden miteinander in einer Stickstoffatmosphäre (um eine vorzeitige Reaktion zu verhindern) kombiniert und zusammen verpackt, indem sie in einer sauerstoffundurchlässigen Tasche oder einem Einschluss, z.B. hergestellt aus Aluminiumfolientaschen, wie sie von Sigma geliefert werden (Code Z 183407), versiegelt werden. Die Wechselwirkung der Glucose in dem Gel mit der immobilisierten Glucoseoxidase wird durch die Rate limitiert, bei der die Glucose in die immobilisierte Enzymschicht diffundieren kann. Diese Wechselwirkung ist ausreichend, um es zu ermöglichen, dass die Schichten in Gegenwart von Sauerstoff kombiniert werden und dann in eine sauerstofffreie Verpackung gebracht werden, bevor eine wesentliche Reaktion stattfinden kann. Sobald Sauerstoff von dem zusammengebauten bzw. kombinierten Produkt ausgeschlossen ist, stoppt die Reaktion auf jeden Fall und sie kann nur wieder beginnen, wenn die Sauerstoffzufuhr wieder aufgenommen wird (z.B. wenn das Produkt zur Verwendung auf einer Wunde aus der Verpackung entfernt wird). Dieser Sauerstoffmangel innerhalb der Verpackung verhindert, dass die Glucose in einer vorzeitigen Peroxidproduktion verbraucht wird. Die Enzyme, die ursprünglich in trockener Form an der Gaze in der Anordnung sind, werden mit Wasser aus der Hydrogelplatte **52** hydratisiert und werden durch Wasser aus der Hydrogelplatte **52** in hydratisiertem Zustand gehalten, während sie vor einer Verwendung in der Tasche oder in dem Einschluss versiegelt sind.

**[0117]** Bei Verwendung wird der Verband aus der Tasche oder dem Einschluss entfernt und auf die Haut eines Patienten über eine Wundstelle gelegt, wie es schematisch bei **54** gezeigt ist, wobei die untere Hydrogelschicht **50** mit der Haut in Kontakt ist. Eine sauerstoffdurchlässige und feuchtigkeitsdurchlässige Bedeckung oder Deckschicht **56** (die Teil des Verbands sein kann oder nicht) befindet sich über der oberen Schicht **52** und ist mit Hilfe eines geeigneten Klebstoffs, der an der Unterseite der Deckschicht **56** angeordnet ist, an die Haut, die die Wundstelle umgibt, geklebt. Auf diese Weise wird der Verband auf der Haut in Position gehalten und bedeckt die Wundstelle.

**[0118]** Die Glucoseoxidase in der oberen Schicht (die in hydratisiertem Zustand ist) katalysiert eine Reaktion der Glucose in der unteren Schicht mit Sauerstoff, der durch die Deckschicht **56** aus der Umgebung geht, wodurch Wasserstoffperoxid, wie oben diskutiert wurde, produziert wird. Der Wasserstoffperoxid selbst hat vorteilhafte antimikrobielle Wirkungen, wie es oben diskutiert wurde. Der Wasserstoffperoxid kann auch eine weitere Reaktion eingehen, die durch die Lactoperoxidase katalysiert wird, um eine Vielzahl von Spezies mit antimikrobiellen Eigenschaften zu erzeugen, wie es oben diskutiert wurde. Außerdem reagieren die Iodidsalze in der unteren Schicht unter Erzeugung von elementarem Iod und möglicherweise auch Hypoiodsäure, weiteren kräftigen antimikrobiellen Mitteln, wie es oben diskutiert wurde. Der Verband hat somit eine Reihe von sehr wirksamen Mechanismen für die in-situ-Produktion von antimikrobiellen Mitteln, die bei der Förderung der Wundheilung sehr wirksam sein können.

**[0119]** Außerdem ist das Hydrogel der unteren Schicht hoch Flüssigkeit-absorbierend, was die Aufnahme hoher Volumina an Exsudat aus der Wunde ermöglicht. Aus der Wunde exsudierte Flüssigkeit, die möglicherweise gefährliche Bakterien usw. enthält, kann demnach in den Verband absorbiert werden und durch die darin erzeugten antimikrobiellen Spezies abgetötet werden. Der Verband kann somit selbst sterilisierend sein. Das Hydrogel ist auch fähig, Flüssigkeit abzugeben, sollte die Wunde es erfordern, wodurch es möglich gemacht wird, dass die Wundstelle zu jeder Zeit feucht gehalten wird, was den Heilungsprozess fördert.

**[0120]** In einer Modifikation der oben beschriebenen Ausführungsform von [Fig. 5](#) ist keine Lactoperoxidase vorhanden. Obgleich das Wasserstoffperoxid durch die Reaktion erzeugt wird, die durch die Glucoseoxidase katalysiert wird, erfolgt keine durch Lactoperoxidase katalysierte Reaktion. Trotzdem machen nützliche Mengen des Wasserstoffperoxids spontan eine nicht katalysierte Reaktion mit Iodidionen durch, um molekulares Iod zu erzeugen, und es werden dennoch wertvolle antimikrobielle Effekte erzielt.

**[0121]** [Fig. 6](#) stellt noch eine weitere Ausführungsform eines Verbands gemäß der Erfindung schematisch dar. Diese Verbandsform ist derzeit am stärksten favorisiert. Der Verband hat die Hauptabmessungen 100 mm × 100 mm in Form eines Quadrats.

**[0122]** Der dargestellte antibakterielle und antifungale Wundverband umfasst eine Glucose-enthaltende Hydrogelplatte **60** als die untere Schicht des Verbands. Auf die Oberseite der Platte **60** ist ein Film **62** aus PVA (Polyvinylalkohol) gegossen, der Glucoseoxidase eingearbeitet hat.

**[0123]** Die Hydrogelschicht **60** wurde so formuliert, dass sie die folgenden Reagenzien, bezogen auf das Gewicht, enthielt: 20% Natrium-AMPS (2-Acrylamido-2-methylpropan sulfonsäure, Natriumsalz (Lubrizol, Code 2405)), 20% Glucose (Fisher, Analysenqualität), 10% Glycerin (Fisher, Analysenqualität), 50% entionisiertes Wasser, 0,1% Polyethylenglycol 400-Diacrylat (UCB Chemicals) und 0,01% Photoinitiator (1-Hydroxycyclohexylphenylketon (Aldrich)). Das Gemisch wurde in Gusstabletts zu einer Tiefe von 2 bis 3 mm verteilt. Das Hydrogel wurde dann durch Bestrahlung unter einer UV-Lampe für bis zu 60 Sekunden und mit einem Energieranking von etwa 100 mW/cm<sup>2</sup> gehärtet. Das Hydrogel wurde dann auf 30°C oder darunter abkühlen gelassen.

**[0124]** Der Enzym-enthaltende PVA-Film **62** wurde durch Auflösen von PVA mit hohem Molekulargewicht (MG 124.000 bis 186.000, Aldrich) in Wasser durch Erwärmen des Gemisches hergestellt. Der PVA wurde zu einer Endkonzentration von 6% G/V eingearbeitet. Sobald er aufgelöst war, wurde die Lösung auf 30°C oder darunter abkühlen gelassen, bevor Enzym (Glucoseoxidase (GOX, Biocatalysts G638P)) zu einer Konzentration von 100 µg/µl (Gewicht an gefriergetrocknetem Pulver pro Volumen) zugesetzt wurde. 50-100 µl des PVA/GOX-Gemisches wurden dann zu einer 20 mm<sup>2</sup>-Oberfläche des gekühlten Hydrogels gegeben und härten gelassen. Nach etwa 30 Minuten hatte sich ein dünner Film gebildet. Um eine Enzymaktivierung zu verhindern, kann der Zusatz der PVA-GOX-Lösung zu dem Glucosehydrogel in einer sauerstofffreien Atmosphäre (z.B. unter Stickstoff) durchgeführt werden. Wenn Film **62** mit dem Hydrogel **60** in Kontakt kommt, wird das meiste des Wassers aus dem Film in das Hydrogel gezogen, der PVA bleibt als feuchte Membran zurück, die das Enzym in hydratisiertem Zustand enthält. Ausreichend Wasser bleibt in dem Film zurück, damit der PVA hydratisiert wird und flexibel bleibt.

**[0125]** Der resultierende Verband wird in eine für Sauerstoff undurchlässige Tasche oder einen für Sauerstoff undurchlässigen Einschluss, z.B. hergestellt aus laminierten Aluminiumfolientaschen, wie sie von Sigma geliefert werden (Code Z 183407) verpackt. Die Wechselwirkung der Glucose in dem Gel mit der immobilisierten Glucoseoxidase wird durch die Rate limitiert, mit der Glucose in die immobilisierte Enzymschicht diffundieren kann.

**[0126]** Diese Verzögerung ist ausreichend, um zu gestatten, dass die zwei Schichten in Gegenwart von Sauerstoff kombiniert werden und dann in eine sauerstofffreie Verpackung gegeben werden, bevor eine wesentliche Reaktion erfolgen kann. Sobald Sauerstoff aus dem kombinierten Produkt ausgeschlossen ist, wird die Reaktion auf jeden Fall gestoppt und sie kann nur wieder aufgenommen werden, wenn die Sauerstoffzufuhr erneuert wird (z.B. wenn das Produkt zur Verwendung bei einer Wunde aus der Verpackung entfernt wird). Dieser Sauerstoffmangel in der Verpackung verhindert, dass die Glucose in einer vorzeitigen Peroxidproduktion verbraucht wird. Das Enzym wird in hydratisiertem Zustand gehalten, während es in der Tasche oder dem Einschluss vor Verwendung versiegelt ist.

**[0127]** Bei Verwendung wird der Verband aus der Tasche oder dem Einschluss entfernt und auf die Haut eines Patienten über eine Wundstelle gelegt, wie es schematisch bei **64** gezeigt ist, und zwar mit der unteren Hydrogelschicht **60** in Kontakt mit der Haut. Eine für Sauerstoff permeable und für Feuchtigkeit permeable Deckschicht oder Überschicht **66** (die die Form des Verbandes haben kann oder nicht) befindet sich über dem Film **62** und wird mit Hilfe eines geeigneten Klebstoffs, der an der Unterseite der Überschicht **66** angeordnet ist, auf die Haut, die die Wunde umgibt, geklebt. Auf diese Weise wird der Verband auf der Haut in Position gehalten und bedeckt die Wundstelle.

**[0128]** Die Glucoseoxidase in Film **62** (die in hydratisiertem Zustand ist) katalysiert eine Reaktion der Glucose in der unteren Schicht mit Sauerstoff, der durch die Oberschicht **66** aus der Umgebung geht, wodurch Wasserstoffperoxid produziert wird, wie es oben diskutiert ist. Das Wasserstoffperoxid hat günstige antimikrobielle Wirkungen, wie es oben diskutiert wurde, und der Sauerstoff, der freigesetzt wird, wenn es durch endogene Catalase zersetzt wird, unterstützt den Heilungsprozess durch Stützung des Zellmetabolismus, Potenzierung der Aminosäurehydroxylierung und Inhibierung des Wachstums von anaeroben Bakterien.

**[0129]** Um die Erzeugung von oxidativen Spezies zu beweisen, wurde eine Indikatorplatte, bestehend aus 1% Stärke (Aldrich), 100 mM Kaliumiodid (Fisher) und 1% Agar (Sigma) verwendet. Der Verband, der Hydrogel **60** mit PVA/GOX-Film **62** umfasste, wurde auf die Indikatorplatte in Luft gelegt, wobei das GOX durch den verfügbaren Sauerstoff aktiviert wird. Wasserstoffperoxid wird in ausreichender Menge produziert, um fähig zu sein, durch das Hydrogel zu diffundieren und die Indikatorplatte unten zu erreichen. Die oxidative Kraft des Wasserstoffperoxids oxidiert dann Iodid zu Iod, welches mit der Stärke unter Bildung eines intensiven dunkelblauen Komplexes komplexiert. Durch Entfernung des aktivierten Hydrogelverbandes und Legen desselben auf neue Indikatorplatten in 24 Stunden-Intervallen kann eine anhaltende Wasserstoffperoxidfreisetzung über einen Zeitraum von wenigstens 5 Tagen bewiesen werden.

**[0130]** Um außerdem die Stabilität des GOX-Enzyms in dem PVA-Film zu beweisen, wurde der Film zudem aus einem Hydrogel nach viertägiger Verwendung entfernt und auf frisches 20 mm<sup>2</sup> Glucose-Hydrogel gelegt und auf eine Indikatorplatte gelegt. Nach 24 Stunden war der intensive blaue Stärke/Iodid-Komplex deutlich sichtbar, was anzeigt, dass noch Enzymaktivität in dem PVA-Film war.

**[0131]** Um die lokalisierte GOX-Aktivität in einem glucosefreien Hydrogel zu beweisen, wurde ein PVA/GOX-Film wie oben beschrieben produziert. Das Hydrogel wurde auf ein Bett aus PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)-gesättigter Baumwollgaze gelegt und langsam über 24 Stunden quellen gelassen. Das Hydrogel wurde dann durch die horizontale Ebene in zwei Scheiben geschnitten und in eine Lösung aus 1% Stärke + 100 mM Kaliumiodid + 1% G/V Glucose + 5 mM EDTA + 50 µg/ml Lactoperoxidase gelegt. Das Vorliegen von GOX kann sehr schnell durch die Detektion von Wasserstoffperoxid lokalisiert werden. Die GOX-Aktivität wird klar auf dem PVA-Film und der Kontaktfläche des Hydrogels, wo der PVA-Film gegossen war, lokalisiert. Darunter gab es keine Farbentwicklung, was zeigt, dass GOX in dem AMPS-Hydrogel selbst in gequollenem Zustand nicht mobil ist.

**[0132]** Die Hydrogelplatte **60** ist stark Flüssigkeits-absorbierend und hat so die Eigenschaften und Vorzüge, die oben in Verbindung mit der Ausführungsform von [Fig. 5](#) beschrieben sind.

**Patentansprüche**

1. Hautverband, in einer Verpackung versiegelt, wobei der Verband Oxidoreduktase-Enzym in hydratisiertem Zustand umfasst.
2. Verband nach Anspruch 1, wobei das Oxidoreduktase-Enzym Glucoseoxidase umfasst.
3. Verband nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Verband außerdem Peroxidase-Enzym umfasst, das in hydratisiertem Zustand ist.
4. Verband nach Anspruch 3, wobei das Peroxidase-Enzym Lactoperoxidase umfasst.
5. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Verband ein hydratisiertes Hydrogel oder mehrere hydratisierte Hydrogele enthält.
6. Verband nach Anspruch 5, wobei das Gel ein hydrophiles Polymermaterial umfasst.
7. Verband nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Enzym oder die Enzyme in einem hydratisierten Hydrogel oder in mehreren hydratisierten Hydrogelen vorliegt/vorliegen.
8. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Enzym oder die Enzyme sich auf einem inerten Träger befindet/befinden.
9. Verband nach Anspruch 8, wobei der inerte Träger eine gewebte Baumwoll- oder Cellulosegaze umfasst, an der das Enzym oder die Enzyme irreversibel befestigt ist/sind.
10. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Verband einen Schichtaufbau hat.
11. Verband nach Anspruch 10, wobei der Verband eine obere Schicht, die bei Verwendung von der Haut entfernt ist, umfasst, die das Oxidoreduktase-Enzym enthält.
12. Verband nach Anspruch 11, wobei der Verband eine untere Schicht unter der oberen Schicht bei Verwendung umfasst, die eine Quelle für Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym enthält.
13. Verband nach Anspruch 12, wobei die untere Schicht außerdem einen Vorrat an Iodidionen enthält.
14. Verband nach Anspruch 10, der eine untere Schicht in Form eines hydratisierten Gels und eine obere Schicht in Form eines inerten Trägers, der Oxidoreduktase-Enzym und gegebenenfalls Peroxidase-Enzym trägt, umfasst.
15. Verband nach Anspruch 11, wobei das Hydrogel eine Quelle für Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym enthält.
16. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, der eine Schicht aus Barrierematerial an der Grenzfläche mit der Haut bei Verwendung enthält.
17. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, der eine Quelle für Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym enthält.
18. Verband nach Anspruch 17, wobei sich das Substrat in einem hydratisierten Hydrogel befindet.
19. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, der außerdem einen Vorrat an Iodid enthält.
20. Verband nach Anspruch 19, wobei sich der Vorrat an einem hydratisierten Hydrogel befindet.
21. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche, der eine Hüllschicht oder Außenschicht zum Kleben des Verbands auf die Haut eines Menschen oder eines Tiers enthält.
22. Verband nach Anspruch 21, wobei die Hüllschicht ein Fenster enthält, in dem oder durch das ein Indikatormittel gesehen werden kann, das anzeigt, wenn die Verbandchemie aktiv ist.

23. Verband nach Anspruch 21 oder 22, wobei immobilisiertes Katalase-Enzym an der Innenseite der Hüllschicht angeordnet ist.

24. Verband nach einem der vorangehenden Ansprüche in Form eines mehrteiligen Systems mit verschiedenen Elementen, die getrennt verpackt sind.

25. Verband nach Anspruch 24, wobei das Oxidoreduktase-Enzym und eine Quelle für Substrat für das Oxidoreduktase-Enzym in getrennten Packungen sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Fig.1.

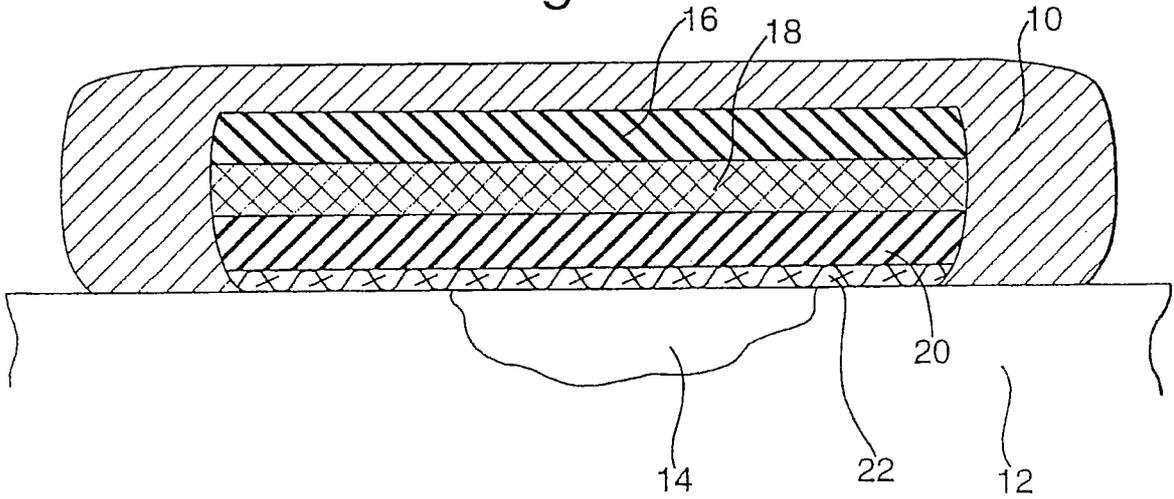
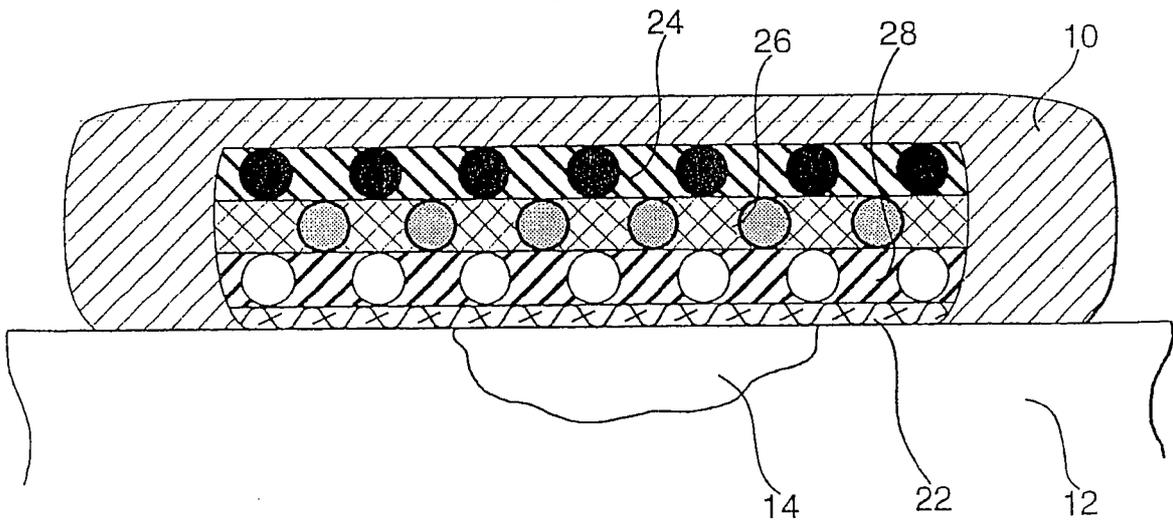


Fig.2.



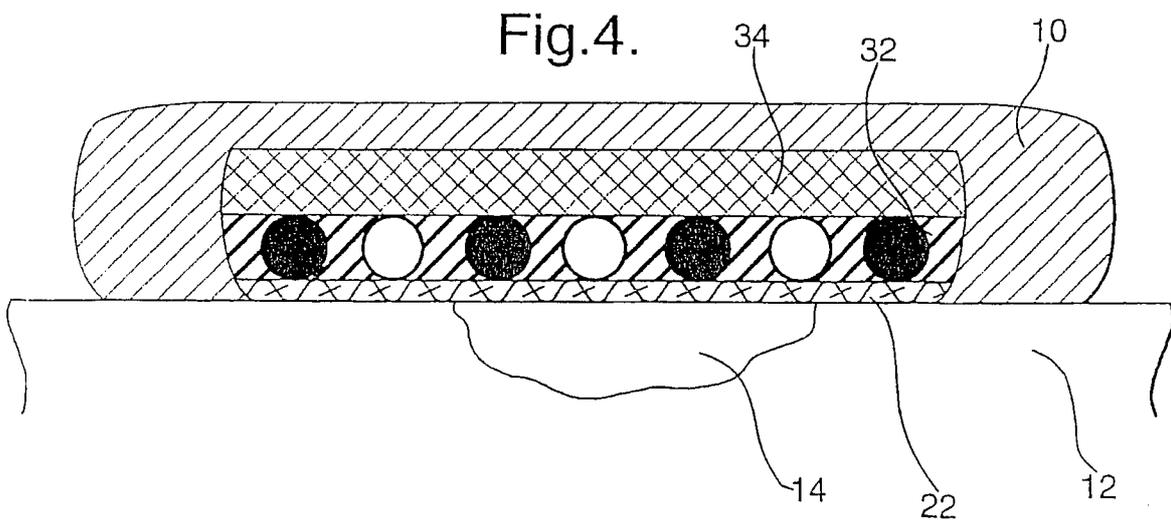
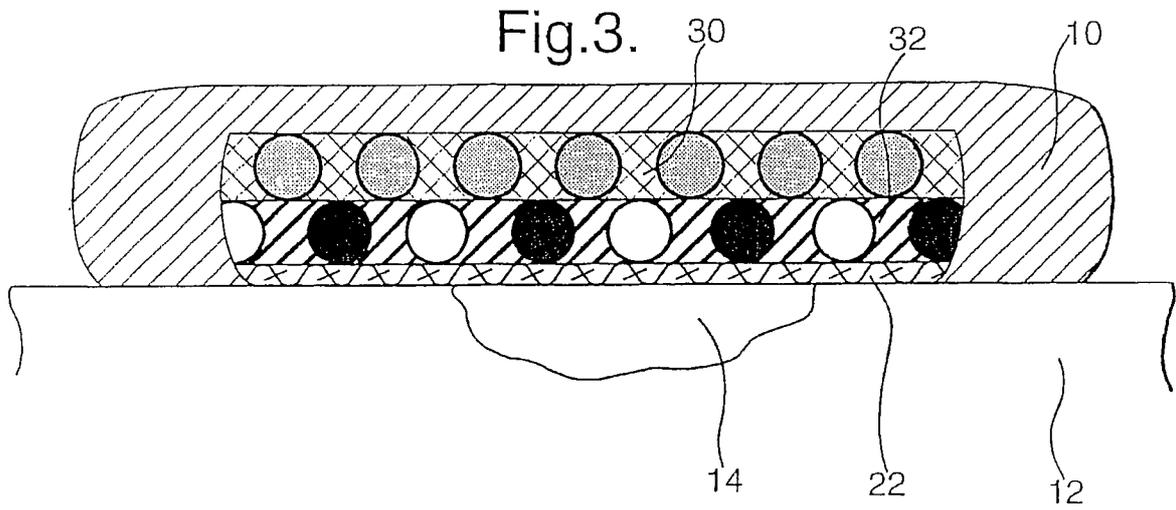


Fig.5.

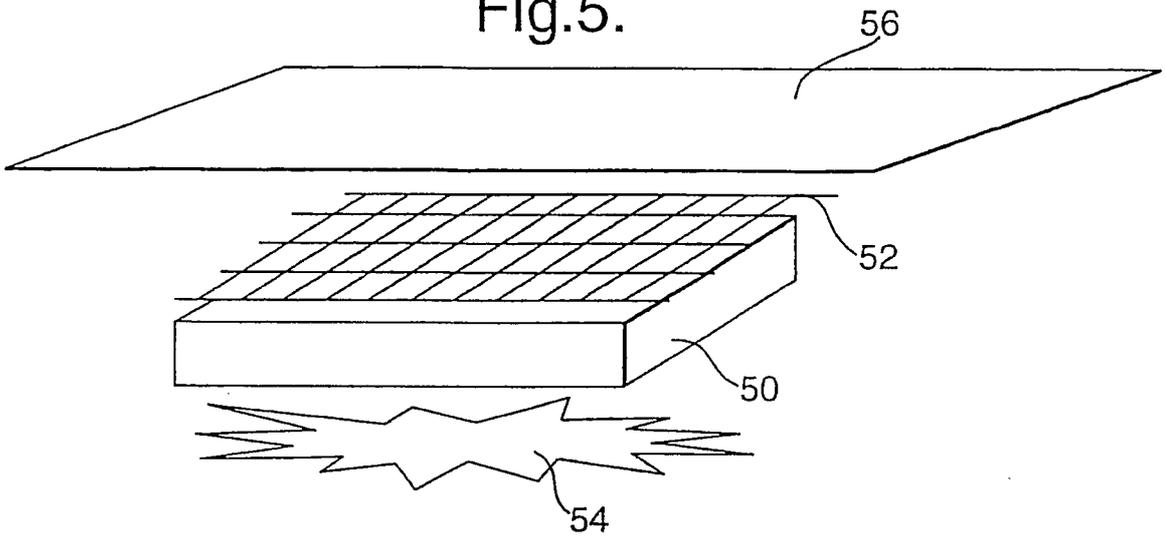


Fig.6.

