



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106663 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580053958.X

凯特琳·伊丽莎白·雷莉

(22)申请日 2015.10.08

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

(30)优先权数据

代理人 董科

14/511,912 2014.10.10 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/47(2006.01)

2017.04.05

A61P 17/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/054682 2015.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/057788 EN 2016.04.14

(71)申请人 罗查尔工业有限责任公司

地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 约瑟夫·查尔斯·萨拉蒙

X·C·凯利·梁

安·比尔·萨拉蒙

权利要求书3页 说明书27页 附图2页

(54)发明名称

用于酶清创的组合物和试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明描述了一种坏死组织的清创酶,其不依赖于蛋白水解酶的活性,而利用了酶的淀粉酶家族。本发明注意到淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶, $\beta$ -淀粉酶, $\gamma$ -淀粉酶)可用于切断多糖的 $\alpha$ -糖苷键,产生较低分子量的碳水化合物/糖片段。本发明已经发现 $\alpha$ -淀粉酶在失活组织的清创中是有效的。

1. 一种清创组合物,其包含:  
以所述清组合物的总重量计,0.001至60wt%的非蛋白水解酶清创组分;  
其中,以所述非蛋白水解酶清创组分的重量计,所述非蛋白水解酶清创组分包含至少80wt%的淀粉酶。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包含选自人、动物、细菌、植物、真菌和通过基因重组的淀粉酶。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述淀粉酶包含至少80wt%的 $\alpha$ -淀粉酶。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述淀粉酶包含多达20wt%的选自 $\beta$ -淀粉酶、 $\gamma$ -淀粉酶及其组合的淀粉酶。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包含药学上可接受的载体或赋形剂。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述非蛋白水解酶清创组分包含多达20wt%的其他水解酶,所述其他水解酶选自蛋白酶,软骨素酶,透明质酸酶,脂肪酶,糖苷酶,乙酰肝素酶,皮肤素酶,支链淀粉酶,N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,乳糖酶,磷脂酶,转糖苷酶,酯酶,硫酸酯水解酶,硫酸酯酶,焦痂酶,核酸酶,磷酸酶,磷酸二酯酶,甘露聚糖酶,甘露糖苷酶,异淀粉酶,裂解酶,菊粉酶,角蛋白酶,鞣酸酶,戊聚糖酶,葡聚糖酶,阿拉伯糖苷酶,果胶酶,纤维素酶,几丁质酶,木聚糖酶,角质酶,果胶裂解酶,半纤维素酶及其组合。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,包含选自人胰腺,动物胰腺和细菌的 $\alpha$ -淀粉酶。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述非蛋白水解酶清创组分包含多达20wt%的酶,所述酶选自氧化酶,过氧化物酶,葡萄糖氧化酶,过氧化氢酶,氧化还原酶,酚氧化酶,漆酶,脂肪氧合酶,异构酶和木质素酶。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含至少一种聚合双胍,以所述清组合物的重量计,所述聚合双胍的量为至少0.01wt% (100ppm) 至1.0wt% (10,000ppm)。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在于,所述聚合双胍包括聚(六亚甲基双胍)及其盐。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含水溶性聚合物,以所述清创组合物重量计,所述水溶性聚合物的浓度为0.01wt%至50wt%;其中,所述水溶性聚合物选自由以下组成的组:甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羧甲基纤维素,瓜尔豆胶,羟乙基瓜尔胶,羟丙基瓜尔胶,羟丙基甲基瓜尔胶,羧甲基瓜尔胶,羧甲基壳聚糖,刺槐豆胶,角叉菜胶,黄原胶,结冷胶,芦荟凝胶,硬葡聚糖,裂褶菌多糖,阿拉伯胶,罗望子胶,聚(乙烯醇),聚(环氧乙烷),聚(乙二醇),聚(甲基乙基醚),卡波姆及其盐,聚(丙烯酸)及其盐,聚(甲基丙烯酸)及其盐,聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸)钠,聚丙烯酰胺,聚(N,N-二甲基丙烯酰胺),聚(N-乙基乙酰胺),聚(N-乙基甲酰胺),聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯),聚(甘油基甲基丙烯酸酯),聚(N-乙基吡咯烷酮),聚(N-异丙基丙烯酰胺)和聚(N-乙基己内酰胺)及其组合。
12. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含螯合剂,以所述清创组合物重量计,所述螯合剂的浓度0.01wt%至1wt%;其中,所述螯合剂选自由以下组成的组:乙二

胺四乙酸(EDTA),次氨基三乙酸,次氨基三丙酸,二乙三胺五乙酸,N-(2-羟乙基)乙二胺三乙酸,1,6-二氨基六亚甲基四乙酸,1,2-环己二胺四乙酸,0,0'-双(2-氨基乙基)乙二醇四乙酸,1,3-丙二胺四乙酸,N,N'-双(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二丙酸,三乙四胺六乙酸,乙二胺-N,N'-双(亚甲基膦酸),亚氨基二乙酸,N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠,月桂亚氨基二丙酸钠,N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸,1,3-二氨基-2-羟基丙四乙酸,1,2-丙二胺四乙酸,乙二胺四(亚甲基膦酸),N-(2-羟乙基)亚胺二乙酸,二膦酸盐,依替膦酸盐,及其盐。

13. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含单烷基二醇,所述单烷基二醇选自自由以下组成的组:1,2-丙二醇(丙二醇),1,2-丁二醇,1,2-戊二醇,1,2-己二醇,1,2-庚二醇,1,2-辛二醇(辛二醇),1,2-壬二醇,1,2-癸二醇,1,2-十一烷二醇,1,2-十二烷二醇,1,2-十三烷二醇,1,2-十四烷二醇,1,2-十五烷二醇,1,2-十六烷二醇,1,2-十七烷二醇,1,2-十八烷二醇,2-甲基-2,4-戊二醇,1,3-丁二醇,二甘醇,三甘醇,二缩三乙二醇及其组合。

14. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含甘油烷基醚,所述甘油烷基醚选自自由以下组成的组:1-0-庚基甘油,1-0-辛基甘油,1-0-壬基甘油,1-0-癸基甘油,1-0-十一烷基甘油,1-0-十二烷基甘油,1-0-十三烷基甘油,1-0-十四烷基甘油,1-0-十五烷基甘油,1-0-十六烷基甘油(鲛肝醇),1-0-十七烷基甘油,1-0-十八烷基甘油(鲨肝醇),1-0-十八碳-9-烯丙基甘油(沙油醇),1-(2-乙基己基)甘油醚,2-乙基己基甘油醚,1-庚基甘油醚,1-辛基甘油醚,1-癸基甘油醚,1-十二烷基甘油醚,1-十三烷基甘油醚,1-十四烷基甘油醚,1-十五烷基甘油醚,1-十六烷基甘油醚,1-十八烷基甘油醚及其组合。

15. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含:

至少一种聚合双胍,其含量为至少0.01wt%;

螯合剂,其浓度为0.01wt%至1wt%;

以及选自单烷基二醇和单烷基甘油的邻二醇组分;以所述清创组合物的重量计,所述邻二醇组分的浓度为0.05wt%至4wt%。

16. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含至少一种止痛剂,麻醉剂,神经性疼痛剂或其组合。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其特征在于,所述至少一种止痛剂,麻醉剂或神经性疼痛剂选自自由以下组成的组:利多卡因,辣椒素,苯佐卡因,丁卡因,丙胺卡因,布比卡因,左布比卡因,普鲁卡因,卡波卡因,依替卡因,甲哌卡因,去甲替林,阿米替林,普瑞巴林,双氯芬酸,芬太尼,加巴喷丁,非甾体抗炎剂,水杨酸盐及其组合。

18. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述清创组合物具有一种形式,所述形式选自自由以下组成的组:粉末,水溶液,有机液体溶液,硅胶,凝胶,乳膏,膜,乳胶,气溶胶,浆液,糊剂,软膏和泡沫。

19. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述清创组合物吸附在敷料,或天然或合成的纤维、网状物、水胶体、藻酸盐、水凝胶、半透膜、渗透膜,或天然或合成的聚合物上或吸附于其中。

20. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,进一步包含缓冲剂。

21. 一种试剂盒,其包含:

根据权利要求1所述的清创组合物;以及  
使用所述清创组合物清创失活组织的说明书。

22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其特征在于,所述说明书包括使所述清创组合物与需要清创的皮肤区域接触的说明。

23. 一种清创失活组织的方法,其包括:

将根据权利要求1所述的清创组合物与需要清创的皮肤区域接触。

24. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,所述接触步骤每天至少重复一次。

25. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,进一步包括从所述皮肤区域移除清创组织。

## 用于酶清创的组合物和试剂盒及其使用方法

### 技术领域

[0001] 当外科手术清创不可用或不理想时,常常使用酶对伤口中坏死组织进行清创。本发明一般涉及通过使用酶来清除失活的组织,特别是在多糖中打开碳水化合物 $\alpha$ -1,4-糖苷键的酶,例如淀粉酶家族的那些酶,其与打开蛋白质中的肽键相反。

### 背景技术

[0002] 伤口愈合受到坏死组织的损害,坏死组织在二度烧伤(深II度)和三度烧伤(III度)烧伤(焦痂)和慢性溃疡(例如糖尿病性溃疡)中含有死细胞和碎片。坏死组织是失活的组织,其积累可导致伤口收缩过程中延长的炎症反应和机械性阻塞,阻止表皮再生,阻止伤口愈合,以及必要时,阻碍伤口床进行皮肤移植。坏死组织易受细菌感染,此会进一步阻碍伤口愈合,并可能在严重的情况下诱发败血症。当坏死组织是黄色或棕褐色,外观上质地浓厚时,此通常称之为脱水,当组织干燥并形成厚实和似皮革的质地时,称为焦痂。需要清创(去除)失活的组织以增强伤口闭合。因此,本发明的清创组合物可用于治疗伤口。

[0003] 去除坏死组织有助于恢复伤口部位的循环,因为足够的氧气输送到伤口对愈合至关重要。清创坏死组织的方法包括外科手术清创、酶清创、自溶清创,生物清创和机械清创,外科手术清创和酶清创最为普遍。外科手术清创是最快的、最有效的清创方法,其由经过培训的医务人员/外科医生执行。然而,由于坏死组织和活体组织之间缺乏明确的分界,可能无意中会去除活体组织,导致伤口面积增大和失血量增加。酶清创使用较少的训练,通常由护理/临床工作人员执行,通常需要更长的治疗坏死组织去除的持续时间。酶清创涉及使用从体外获得的酶来去除非活体组织。清创酶将生物材料的大部分,特别是将生物大分子打开(切割、消化、水解)生成较小分子,该较小分子可以被溶解和去除。大多数清创酶具有通过打开蛋白质聚合物链的蛋白酶的作用,并且在这方面研究了各种各样的蛋白酶。清创酶是引起坏死组织脱皮的快速作用的催化剂。纤溶酶是一种血浆酶,其在被激活后会在血块和渗出物中攻击丝心蛋白成分。脱氧核糖核酸酶是特异性攻击脓性渗出物的核蛋白成分的胰酶。胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶是非特异性胰腺酶,但可以在特定氨基酸残基处切断蛋白质主链。来自其他动物的酶包括磷虾酶,一种来自南极磷虾的蛋白酶。热带产果实植物提供了清创酶的主要来源。菠萝蛋白酶是菠萝植物茎中的一组蛋白水解酶,其中包括三种半胱氨酸蛋白酶。木瓜蛋白酶是番木瓜胶乳中非特异性的半胱氨酸蛋白酶,其切断坏死组织中的各种物质,包括丝心蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白。无花果蛋白酶是类似pH特性操作中的非特异性半胱氨酸蛋白酶,其来自榕属于(无花果)植物的植物胶乳。细菌也是清创酶的来源。衍生自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的枯草杆菌蛋白酶是降解坏死组织的非特异性水溶性丝氨酸蛋白酶的混合物。作为金属肽酶的胶原酶是降解胶原并来源于溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)的蛋白水解酶。弧菌溶血素是另一种具有胶原蛋白攻击性的金属肽酶,它来源于弧菌属细菌(*Vibrio proteolyticus*)的蛋白水解酶。嗜热菌蛋白酶是一种来自嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermoproteolyticus*)的细菌清创酶,即使在高温下也能以非特异的方式起作用。链激酶,来自链球菌属(*Streptococcus* spp.)的纤维蛋白原激

活蛋白酶,以及来自溶血性链球菌(hemolytic streptococci)的脱氧核糖核酸酶,链球菌脱氧核糖核酸酶也被用于清创(美国专利申请号2008/0044459)。

[0004] 一些非FDA调节的外用蛋白水解酶产品在2009年之前被投入市场用于酶清创,但由于不良过敏事件和/或缺乏功效,其制造和分销被FDA叫停,所述外用蛋白水解酶产品包括木瓜蛋白酶(番木瓜),胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶(胰腺)酶)和枯草芽孢杆菌蛋白酶。目前,美国有两种可用的蛋白水解酶清创产品,FDA批准的Santyl®软膏(Smith&Nephew),其是一种衍生自溶组织梭菌的胶原酶,可选择性消化三螺旋胶原蛋白,每克白凡士林中使用时使用250个胶原酶单位;以及Debrase®凝胶敷料(NexoBrid),其为来自凤梨(菠萝)的菠萝蛋白酶的混合物。重要的是,Santyl®软膏不能与含银和含碘的抗微生物剂结合使用,因为它们会使胶原酶失活。Debrase®(MediWound有限公司)最近已经获得了用于焦痂清创的FDA孤儿药物状态。

[0005] 美国专利US 4,668,228公开了一种在非凝胶、非生物降解、生物相容性的封闭或半封闭的背衬上含有粘合剂物质的清创带,其中有效量的干粉状形式的清创蛋白水解酶位于粘合剂表面上。当粉末与伤口渗出液接触时,酶的全部负荷立即释放。

[0006] 美国专利US 5,206,026公开了一种用于将蛋白水解酶瞬时递送至伤口的膜。当其暴露于水性液体时,膜迅速溶解,从而同时释放其酶的含量。

[0007] 美国专利US 2002/0114798公开了一种使用蛋白水解酶和无水亲水性泊洛沙姆载体的组合的酶促创伤清创剂。

[0008] 在美国专利US 5,120,656中,提供了一种用于清创具有骨膜完整的采集骨的方法,该方法包括在酶活性促进条件下,使骨膜与酶溶液接触,以松动来自下面的骨表面的骨膜并从骨头去除松动的骨膜,所述酶溶液选自自由以下组成的组:水解胶原蛋白消化酶及其混合物。

[0009] 在美国专利US 7,368,128中,描述了一种用于清创伤口中坏死组织和非活体组织的敷料,其中敷料包含有效量的一种或多种结合在可降解聚合物材料中的蛋白水解酶。本发明中的敷料能够在长时间内有效地清创坏死的伤口,因为酶可随时间释放。

[0010] 在国际专利W0 2012/155027中,公开了一种伤口清创组合物,其含有蛋白水解酶-蜂蜜曲霉蛋白酶(也称为蛋白酶S,来自真菌曲霉属(Aspergillus melleus)。蜂蜜曲霉蛋白酶中的主要酶是分子量约31kDa的半碱性蛋白酶。伤口清创组合物还可以含有其他酶,如淀粉酶,一种分解碳水化合物化合物的水解酶。

[0011] 在国际专利W01984/002846中,描述了一种用于皮肤表面伤口的外用软膏,其包括伤口愈合量的木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰酶、脂肪酶、淀粉酶、芦荟提取物以及配制在载体混合物中的有机收敛剂、渗透性和非渗透性的润肤油、多元醇润肤剂,其具有多种蛋白酶。据报道该软膏可以减轻皮肤表面伤口部位的炎症,并增强身体正常的抗炎活性。

[0012] 在美国专利US 6,548,556中,报道了一种具有部分或总体水解肽酰胺键能力的蛋白水解酶,并且这些酶也可具有与蛋白水解活性相关的一些固有的脂肪分解和/或淀粉分解活性,优选的蛋白水解酶是木瓜蛋白酶。其他合适的蛋白水解酶包括胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,链激酶,链球菌去氧核糖核酸酶,无花果蛋白酶,胃蛋白酶,羧肽酶,氨基肽酶,木瓜凝乳蛋白酶,菠萝蛋白酶,以及其它合适的酶,例如胰酶,胰蛋白酶,胶原酶,角蛋白酶,羧化

酶,氨基肽酶,弹性蛋白酶和曲霉肽酶。胰酶含有肽水解酶/蛋白酶(胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,弹性蛋白酶,羧肽酶A,羧肽酶B)、脂肪分解酶(脂肪酶,磷脂酶A2,磷脂酶B,胆碱酯酶,胆固醇酯酶)、糖苷酶( $\alpha$ -淀粉酶,葡萄糖苷酶)以及核酸酶(脱氧核糖核酸酶I,脱氧核糖核酸酶II,核糖核酸酶)的混合物。

[0013] 在美国专利US 3,409,719中,描述了来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的混合清创剂酶。据报道,该酶产品表现出对酪蛋白(磷蛋白)的蛋白水解活性,以及对血红蛋白(金属蛋白)相似的蛋白水解活性。它还表现出对糊化淀粉的淀粉分解活性。它能够快速溶解纤维蛋白、变性胶原蛋白、弹性蛋白和渗出物,据报道溶解纤维蛋白、变性胶原蛋白、弹性蛋白和渗出物是伤口中的主要组织蛋白质成分。混合酶组合物显示在美国专利US 3,409,719的表I中,其含有最小的淀粉酶至蛋白酶,范围为6.3%淀粉酶和93.7%蛋白酶至18.2%淀粉酶和81.8%蛋白酶。

[0014] 严重烧伤的伤口需要外科手术清创,以便快速施用抗微生物剂和敷料以降低感染的风险(例如,绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)败血症,美国专利US 4,772,465),并制备伤口床用于愈合或随后的皮肤移植。由于活体组织去除存在增强出血的可能性,酶清创可被优选用于去除坏死组织。由于心血管功能不全和神经病变,糖尿病患者的伤口愈合也很困难;因此,由外科手术清创造成的扩大糖尿病溃疡尺寸可能是不期望的,并且对于改善糖尿病性溃疡的清创是至关重要的需求。

[0015] 在国际专利W0 1999046368中,讨论了一种用于治疗伤口的方法,该方法包括施用有效量的碳水化合物-活性酶的步骤,其被报道具有用于清创烧伤和其它伤口的广泛特异性。由于皮肤中高浓度的糖胺聚糖(GAGs),在烧伤患者中,降解糖胺聚糖的酶被认为是烧伤创伤清创的有用辅助剂。糖胺聚糖是由酸性多糖的重复聚合物组成的糖链,由以下组成的各种组合构建的糖:半乳糖,葡萄糖,N-乙酰葡萄糖胺,N-乙酰半乳糖胺,葡萄糖醛酸,半乳糖醛酸和艾杜糖醛酸。已知碳水化合物在生物体的功能中具有重要作用。除了它们的代谢作用之外,碳水化合物是人体的结构成分,共价连接到许多其他实体,如蛋白质(即,作为糖蛋白)。由于人类皮肤含有10wt%的糖胺聚糖(其中包括肝素,硫酸乙酰肝素,硫酸软骨素,透明质酸(玻尿酸),硫酸皮肤素和硫酸角质素)。硫酸软骨素是最常见的糖胺聚糖。硫酸软骨素也具有主要单体单元之间的 $\beta$ -1,3-键和 $\beta$ -1,4-键。术语“碳水化合物活性酶”用于具体包括碳水化合物还原酶,其中这些酶的实例包括葡糖胺聚糖还原酶,如透明质酸酶,软骨素酶,皮肤素酶,乙酰肝素酶,肝素酶和角质素酶,其中优选的碳水化合物-活性酶为软骨素酶和透明质酸酶。

[0016] 感染控制也是清创中重要的未解决的需求。烧伤焦痂通常为干性坏死组织,不易感染,但脓毒症可发生于二度和三度烧伤;因此,在焦痂(坏死组织)去除的早期阶段在焦痂和伤口床中具有抗微生物剂是非常需要的。与烧焦焦痂相比,慢性伤口(糖尿病性溃疡)坏死组织似乎促进细菌定植,其由死细胞和碎片的水和营养源的存在支持。伤口中的坏死组织可能与感染相关,而大多数慢性伤口被微生物菌膜感染。

[0017] 除了潜在的难治的不良过敏事件,超敏反应和/或缺乏疗效外,使用蛋白水解酶来清除坏死组织的困难在于:蛋白水解酶在水溶液中的自身消化能力。因此,需要确定一种清创组合物,其对于坏死组织具有高度的清创功效,临床使用简单,显示出适合的保质期,并且是非过敏性的。

## 附图说明

[0018] 图1是用不同酶处理之前和之后的胶原蛋白凝胶的频率-模量的曲线图。

[0019] 图2是用不同酶处理之前和之后的胶原蛋白凝胶的频率-复合模量的曲线图。

[0020] 图3是在室温下1小时后经煮沸的猪皮消耗的重量百分数- $\alpha$ -淀粉酶浓度的曲线图。

## 具体实施方式

[0021] 在这项研究中,考虑一种用于酶清创的新的组合物和进行酶清创的新方法,通过推测在糖胺聚糖多糖和胶原原纤内和/或两者之间切断糖苷键,而不是通过蛋白酶切断胶原蛋白的肽键来考虑,如先前的酶清创产品。意外地发现淀粉酶,一种用于切断 $\alpha$ -1,4-糖苷键的酶,例如将淀粉催化水解成低分子量糖,其在清除失活组织或坏死组织中是有效的。这些独特的组合物提供高效率的酶清创组合物,具有合适的保质期,没有过敏反应。

[0022] 本文所述的清创制剂含有各种类型的淀粉酶。淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶, $\beta$ -淀粉酶, $\gamma$ -淀粉酶)是优先水解多糖的 $\alpha$ -糖苷键的酶家族,产生较低分子量的碳水化合物/糖片段。在一些实施例中,使用 $\alpha$ -淀粉酶作为淀粉酶。淀粉酶天然存在于人类和其他哺乳动物中,并且也存在于植物、细菌和真菌中。

[0023] 皮肤组织的物理行为主要由大量的细胞外基质(ECM)决定。ECM由纤维蛋白和糖胺聚糖(GAG)的互相咬合的网状结构构成。GAG是碳水化合物聚合物,通常与ECM蛋白结合,形成蛋白聚糖。在皮肤中,I型胶原蛋白是ECM的主要的蛋白质组分,主要的蛋白多糖组分是核心蛋白聚糖和多功能蛋白聚糖。假定这些核心蛋白结合到I型胶原纤维的表面,这为皮肤提供机械强度。蛋白聚糖的结合是ECM中胶原纤维的合适组装所必需的,并且通过基质金属蛋白酶抑制胶原纤维的切断。蛋白聚糖由一个或多个GAG链共价结合的糖蛋白核心组成。四种不同类型的糖胺聚糖,硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素和硫酸乙酰肝素/肝素存在于脊椎动物中。透明质酸(玻尿酸)是细胞外基质的主要成分之一,对细胞增殖和迁移有重要作用。然而,与其他糖胺聚糖不同,透明质酸不结合至蛋白质以形成蛋白聚糖,而是结合并保留水分子并填充胶原纤维之间的间隙。

[0024] GAG通过糖苷 $\beta$ -1,4-键(主要通过硫酸软骨素,硫酸皮肤素)和 $\alpha$ -1,4-键(主要通过硫酸乙酰肝素/肝素)连接在核心蛋白的丝氨酸残基上,其主要的GAG是硫酸软骨素。对于内部连接,透明质酸和硫酸软骨素主要由 $\beta$ -1,3-键和 $\beta$ -1,4-键组成,硫酸皮肤素主要具有 $\alpha$ -1,3-和 $\beta$ -1,4键,肝素/硫酸乙酰肝素具有 $\beta$ -1,4-和 $\alpha$ -1,4-键的混合物;其中,主要重复单元不含有通过 $\alpha$ -淀粉酶切断所需的3个或更多个 $\alpha$ -1,4-键(糖胺聚糖和蛋白多糖, [sigma.com/glycobiology](http://sigma.com/glycobiology))。

[0025] 以前的研究讨论了一种治疗伤口的的方法,其包括施用有效量的碳水化合物-活性酶的步骤,其中这些酶优先是软骨素酶,该酶催化在蛋白聚糖上的软骨素链的水解,该蛋白聚糖含有(1-4)- $\beta$ -D-键和(1-3)- $\beta$ -D键和透明质酸酶,该酶切断含有 $\beta$ -1,4-糖苷键和 $\beta$ -1,3-糖苷键的透明质酸,该酶具有有限能力以降解软骨素和硫酸软骨素(国际专利公开号W01999046368)。

[0026] 本文描述的组合物和方法涉及使用非蛋白酶水解酶用于坏死组织的清创,其中意



外地发现包括 $\alpha$ -淀粉酶, $\beta$ -淀粉酶和 $\gamma$ -淀粉酶的淀粉酶家族能够消化和分解神经组织类似物:煮沸的猪皮(美国专利US 8,119,124)以及新鲜切除的大鼠皮肤。

[0027] 淀粉酶是一种消化酶,其有助于多糖中糖残基内的键的切断。在人体中发现两种主要类型:唾液淀粉酶和胰淀粉酶。在唾液中,唾液淀粉酶负责将淀粉和糖原分解成葡萄糖、麦芽糖和糊精。胰淀粉酶进一步降解消化系统中的淀粉。

[0028] 在一些实施例中,非蛋白水解组分大于清创组合物中的蛋白水解组分。在一些实施例中,在清创组合物非蛋白水解酶和蛋白水解酶的比例至少是4:1,至少是5:1,或至少是10:1,至少是20:1,至少是40:1,至少是60:1,至少是80:1,或者至少是100:1。其中,蛋白水解酶的含量为0,非蛋白水解酶的含量大于0,其比值为 $\infty:0$ 。在一些实施例中,所述清创组合物包括少于0.01wt%的蛋白水解酶,或小于0.001wt%的蛋白水解酶,基于所述清创组合物的重量。在一些实施例中,所述清创组合物包括高达20wt%的蛋白水解酶,或高达15wt%的蛋白水解酶,或高达10wt%的蛋白水解酶。

[0029] 相对于三种形式的淀粉酶, $\alpha$ -淀粉酶(又称1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖葡萄糖水解酶)是一个内切酶,其存在于所有生物体中。 $\alpha$ -淀粉酶的功能为一个随机的方式通过对淀粉、糖原、相关的多糖以及具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键的低聚糖的多攻击机制,其最终产生葡萄糖和麦芽糖,以及较大的低聚糖,其中没有一个出现在人的皮肤中。 $\alpha$ -淀粉酶在含有3个或更多个 $\alpha$ -1,4-糖苷键的D-葡萄糖单元的多糖中水解1,4- $\alpha$ -D-糖苷键(Sigma Aldrich,<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html>)。然而, $\alpha$ -淀粉酶不能水解糖原和支链淀粉中的 $\alpha$ -1,6键。

[0030]  $\beta$ -淀粉酶(也称为1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖麦芽糖水解酶)和 $\gamma$ -淀粉酶(也称为(淀粉转葡萄糖苷酶,葡聚糖1,4- $\alpha$ -葡萄糖苷酶和葡糖淀粉酶))是仅在植物和微生物中发现的外消旋酶。像 $\alpha$ -淀粉酶一样, $\beta$ -淀粉酶不能水解1,6- $\alpha$ 键。 $\beta$ -淀粉酶与 $\alpha$ -淀粉酶作用在相同的底物上,但从非还原末端去除连续的麦芽糖单元。 $\gamma$ -淀粉酶依次从多糖链的非还原端连续释放 $\beta$ -D-葡萄糖。当该序列中的下一个键为1,4-键时,各种形式的 $\gamma$ -淀粉酶可水解1,6- $\alpha$ -D-糖苷键,而一些制剂可以水解其他多糖中的1,6-糖苷键和1,3- $\alpha$ -D-糖苷键。淀粉酶的组合用于各种制剂,如食品生产,甜味剂,淀粉糖化、酿造和蒸馏工业。

[0031] 钙离子和氯离子对于 $\alpha$ -淀粉酶的活性至关重要。一个 $\text{Ca}^{2+}$ 被每个酶分子紧密结合,促进了对于水解活性的适当构象,氯离子被认为是酶的天然活化剂。过量的钙会使 $\alpha$ -淀粉酶向热稳定。催化活性在40°C和45°C之间的温度范围内,在pH 7.0-7.5内是最佳的。

[0032] 在本研究中,考虑了一种用于酶清创的新的组合物和进行酶清创的新方法,其通过淀粉酶在糖胺聚糖多糖和胶原原纤内和/或两者之间切断糖苷键,而不是通过蛋白酶切断胶原蛋白的肽键。清创制剂含有各种类型的淀粉酶。所有淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶, $\beta$ -淀粉酶, $\gamma$ -淀粉酶)都是优先水解多糖的 $\alpha$ -糖苷键的酶家族,其产生较低分子量的碳水化合物/糖片段。 $\alpha$ -淀粉酶随机切断淀粉的线性直链淀粉链中相邻葡萄糖单元之间的1,4- $\alpha$ -D-糖苷键。 $\alpha$ -淀粉酶的显著益处在于其在人和其他哺乳动物中天然存在,并且也存在于植物,细菌和真菌中。在一些实施例中,淀粉酶包含微生物淀粉酶。植物和动物来源可能含有比微生物基的淀粉酶更多的有害物质,包括酚类化合物(来自植物)、内源性酶抑制剂和蛋白酶。

[0033] 由于淀粉酶不是水解蛋白的,因此在水中不会自我消化,并且与蛋白水解酶相比,

其在类似水溶液条件下更稳定。淀粉酶的高稳定性有助于其在亲水性制剂中的储存,其可以容易地清创后的坏死伤口除去,而不像凡士林的蛋白水解清创软膏。

[0034] 已报道了在蛋白水解酶清创中淀粉酶的存在,根本上在这些方法中淀粉酶的数量比蛋白酶低得多,并且通常是胰蛋白酶中的杂质(US 3,409,719;美国专利US 8,540,983)。据报道,基于软骨素酶和透明质酸酶的碳水化合物-活性酶制剂用于清创烧伤和其它伤口(国际专利W01999046368)。可预期的是,这些酶可能对皮肤中与胶原蛋白相关的蛋白聚糖具有活性,例如硫酸软骨素的主要蛋白聚糖。没有报道讨论基于淀粉酶作为主要的酶清创剂的坏死组织的酶清创,因为推测淀粉酶仅降解 $\alpha$ -1,4-糖苷键,例如在淀粉中,淀粉为不参与细胞外基质的碳水化合物。

[0035] 淀粉分子是由 $\alpha$ -1,4-糖苷键和 $\alpha$ -1,6-糖苷键连接在一起的葡萄糖聚合物,其由直链淀粉和支链淀粉组分组成。为了利用存储在淀粉中的碳和能量,淀粉酶作为人类消化系统的一部分,在多个点切断淀粉,将淀粉转化成较小的糖,最终转化成葡萄糖单位。由于存在两种类型的连接, $\alpha$ -1,4-糖苷键和 $\alpha$ -1,6-糖苷键,不同的结构对淀粉分子是可能的。仅具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键的无支链的单链单链聚合物称为直链淀粉。另一方面, $\alpha$ -1,6-糖苷键的存在导致支链淀粉的支链葡萄糖聚合物。作为储存在人和动物细胞中的葡萄糖的另一个紧密相关的化合物称为糖原。糖原具有类似于支链淀粉的结构,除了糖原中的分支趋于更短和更多。无论是直链淀粉、支链淀粉,还是糖原都被认为存在于人或动物皮肤中,其作为稳定或与细胞外基质的胶原相互作用的组分。

[0036] 由 $\alpha$ -淀粉酶攻击的键的特异性取决于酶的来源。目前,两种主要类型的 $\alpha$ -淀粉酶是通过微生物发酵商业生产的。基于在葡萄糖聚合物链中发生切断的位置,淀粉随机解聚的初始步骤是将大链分裂成各种较小尺寸的片段。大片段的分解显著降低糊化淀粉溶液的粘度,因为溶液的粘度降低,导致液化。解聚的最后阶段是糖化,其主要是形成单糖、二糖和三糖。

[0037] 因为细菌 $\alpha$ -淀粉酶只能随机攻击 $\alpha$ -1,4键,属于液化类。另一方面,真菌 $\alpha$ -淀粉酶属于糖化类,并且从直链段的非还原末端(即C4末端)攻击第二连接键,导致两次葡萄糖单位的一次分离,得到二糖麦芽糖。因此,糖化酶中的键断裂比在液化酶中更广泛。淀粉链逐渐地被切成小块和碎片。最后, $\gamma$ -淀粉酶选择性地攻击非还原末端的最后一个键,并以1:20的相对速率作用于 $\alpha$ -1,4-糖苷键和 $\alpha$ -1,6-糖苷键,导致简单葡萄糖单元的分裂进入溶液。 $\alpha$ -淀粉酶和 $\gamma$ -淀粉酶可以一起使用以将淀粉转化为简单的糖。

[0038] 淀粉酶也用于清洁硬表面和织物,如国际专利W0 2007/144856中所述,其包括多用途的或“重型的”洗涤剂,特别是洗衣洗涤剂;液体、凝胶或糊状形式的多用途洗涤剂,特别是所谓的重型液体类型;液体精细织物洗涤剂;手洗洗碗剂或轻型洗碗剂,特别是高泡型洗碗剂;机洗洗碗剂,包括用于家庭和机构使用的各种片剂、颗粒、液体和冲洗助剂类型;液体清洁消毒剂,包括抗菌洗手类、洗衣条、漱口水、假牙清洁剂、汽车或地毯洗涤剂、浴室清洁剂;洗发水和护发素;沐浴露和泡沫浴液和金属清洁剂;以及清洁助剂,如漂白添加剂和“染色棒”或预处理型式。

[0039] 淀粉酶是工业中使用的主要酶之一。淀粉酶在注入食品、发酵和制药行业的众多工业过程中具有潜在的应用。尽管 $\alpha$ -淀粉酶可以从植物、动物和微生物获得,但来自真菌源和细菌源的酶在工业中占主导地位,包括芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)和曲霉属

(*Aspergillus spp.*)的微生物。大多数市售的淀粉酶由细菌源生产,如地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)。

[0040] 本文所述的清创组合物可以制备成液体、凝胶、粉末、糊剂、软膏、洗剂、乳剂或微乳剂,其可以泡沫、喷雾、敷料、网布、绷带或膜的形式被转送至坏死或失活组织,其中后者可包含成膜聚合物、半渗透或渗透性聚合物、或可降解或不可降解的底物,如敷料、绷带、或发泡材料。清创组合物可包括一个或多个药物或化妆品上可接受的载体,其与酶清创组合物是兼容的。药物或化妆品上可接受的载体的例子包括,但不限于,水、生理盐水(等渗盐水)、杜尔贝科(Dulbecco)的磷酸盐缓冲盐水(DPBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、含有附加的氯化钙的盐溶液、林格氏液(Ringer)、甘油、丙二醇、乙醇、异丙醇、1,3-丁二醇、液体聚(亚烷基二醇)(例如,聚(乙二醇)、甲基醚封端的聚(乙二醇),聚(乙二醇-嵌段-丙二醇-嵌段-乙二醇)),以及水溶性的液态硅氧烷聚醚、水不溶性的媒介(例如肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、矿物油、二甲聚硅氧烷、凡士林)。在一些实施例,赋形剂的重量在0%~99.9wt%范围之间存在,基于清创组合物的重量。

[0041] 清创组合物还可包括润湿剂、缓冲剂、凝胶剂、表面活性剂、螯合剂和乳化剂。其他辅料包括pH值范围从5.0~7.5的各种水性缓冲液、聚硅胶、聚醚共聚物、蔬菜和植物脂肪和油、精油、亲水性和疏水性醇、维生素、单酸甘油酯和渗透性增强酯类(如月桂酸酯、肉豆蔻酯、棕榈酸酯和硬脂酸酯)。在一些实施例中,所述清创组合物为一种形式,所述形式选自液体、凝胶、糊剂、乳膏、乳剂及其组合等。

[0042] 在一些实施例中,酶清创组合物被冻干至干粉。冻干酶清创组合物可以粉末状使用,或粉末可进一步加工成溶液、乳膏、洗剂、凝胶、喷雾剂、泡沫、气溶胶剂、薄膜或其它制剂。

[0043] 在一些实施例中,表面活性乳化剂可用于形成乳液,其有利于与有机溶剂的增容作用。有机溶剂的实例包括但不限于,非刺激性溶剂,例如挥发性硅氧烷溶剂和挥发性烷烃,以形成油包水或水包油乳液、反相乳液、细乳液(纳米乳液),微乳液、和反相微乳液。非刺激性挥发性硅氧烷溶剂包括但不限于,低分子量聚二甲基硅氧烷,如六甲基二硅氧烷或八甲基三硅氧烷;低分子量环硅氧烷,如六甲基环三硅氧烷或八甲基环四硅氧烷;直链、支链或环烷烃,如丙烷、丁烷和异丁烷(压力下的气溶胶)、戊烷、己烷、庚烷、辛烷、异辛烷及其异构体、石油馏分和环己烷;以及氯氟烃,如三氯一氟甲烷、二氯二氟甲烷和二氯四氟乙烷;碳氟化合物,如四氟乙烷、七氟丙烷、1,1-二氟乙烷、五氟丙烷、全氟庚烷、全氟甲基环己烷;氢氟烷烃,如1,1,1,2-四氟乙烷和1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷的气溶胶及其组合等;和压力下的挥发性气体,如空气、一氧化二氮和液态二氧化碳;或其混合物。需理解的是,当在高压下储存时,二氧化碳可以在室温下以液体的形式存在。在一些实施例中,挥发性溶剂可以是六甲基二硅氧烷,异辛烷及其混合物。在一些实施例中,挥发性溶剂可以是六甲基二硅氧烷。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,溶剂可以0至99.9wt%的量存在。

[0044] 可用于本发明的水溶性粘度构建剂包括但不限于,甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羧甲基纤维素,瓜尔豆胶,羟乙基瓜尔胶,羟丙基瓜尔胶,羟丙基甲基瓜尔胶,羧甲基瓜尔胶,羧甲基壳聚糖,刺槐豆胶,角叉菜胶,黄原胶,结冷胶,芦荟凝胶,硬葡聚糖,裂褶菌多糖,阿拉伯胶,罗望子胶,聚(乙烯醇),聚(环氧乙烷),聚(乙二

醇),聚(甲基乙烯基醚),卡波姆及其盐,聚(丙烯酸)及其盐,聚(甲基丙烯酸)及其盐,聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸)钠,聚丙烯酰胺,聚(N,N-二甲基丙烯酰胺),聚(N-乙基乙酰胺),聚(N-乙基甲酰胺),聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯),聚(甘油基甲基丙烯酸酯),聚(N-乙基吡咯烷酮),聚(N-异丙基丙烯酰胺)和聚(N-乙基己内酰胺),和其类似物,及其组合,后两者在低于其临界溶液温度下发生水合作用。

[0045] 在一些实施例中,水溶性聚合物被用作粘度构建剂,所述水溶性聚合物为电荷中性的并且不能通过淀粉酶被酶促降解。这种粘度构建剂的实例包括但不限于,聚(环氧乙烷),聚(乙二醇),聚(乙醇醇)和聚(N-乙基吡咯烷酮)。可用于本文所述的清创组合物的其它粘度构建剂包括但不限于在单糖单元之间具有 $\beta$ -键的中性多糖,例如甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素。可用于本文所述的清创组合物的其它粘度构建剂包括但不限于带负电荷的那些,例如卡波姆及其盐,聚(丙烯酸)及其盐,以及聚(甲基丙烯酸)及其盐。其它粘度构建剂是在单糖单元之间具有 $\beta$ -键的阴离子多糖,例如在羧甲基纤维素中。这种粘度构建剂可以0.01至约50.0wt%的量应用于制备粘性凝胶或糊剂的清创组合物。粘度构建剂可以0.1至45wt%的量存在,可以0.5至25wt%或1.0至10.0wt%的量存在。

[0046] 精油也可作为香料或芳香剂和/或作为抗微生物剂加入制剂中。可用于本文所述的清创组合物的精油的实例包括但不限于,百里香酚,薄荷醇,檀香,樟脑,豆蔻,肉桂,茉莉,薰衣草,天竺葵,杜松子,薄荷醇,松树,柠檬,玫瑰,桉树,丁香,橙子,牛至,薄荷,芳樟醇,绿薄荷,胡椒薄荷,柠檬草,佛手柑,香茅,柏树,肉豆蔻,云杉,茶树,冬青(水杨酸甲酯),香草等。在一些实施例中,精油可以选自百里香酚,檀香油,冬青油,桉油,松油以及它们的组合。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,精油可以0%至5wt%的量存在。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,精油可以至少0.1w%,或至少0.25w%,或至少0.5w%的量存在。

[0047] 在一些实施例中,叶绿酸,一种叶绿素的水溶性半合成衍生物,也可用于控制伤口气味并提供抗炎性能。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,叶绿酸可以0%至5wt%的量存在。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,叶绿酸可以至少0.1wt%,或至少0.25wt%,或至少0.5wt%的量存在。

[0048] 还可以将角质软化剂加入到清创组合物中以有助于消化焦痂组织。例如,角质软化剂可以促进表皮的软化和剥离。用于本文所述的清创组合物中的角质软化剂包括但不限于尿素,水杨酸和 $\alpha$ -羟基酸,例如乳酸,乙醇酸和柠檬酸。例如,尿素可用于帮助去除坏死伤口中的死组织以帮助伤口愈合(美国专利US 8,754,045)。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,角质软化剂可以0%至15wt%的量存在。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,角质软化剂可以至少0.1wt%,或至少0.25wt%,或至少0.5wt%的量存在。

[0049] 在一些实施例中,基于清创组合物的总重量,能够清创失活或坏死组织的清创组合物中的非蛋白水解酶的总量可以为至少0.001wt%至60wt%。在一些实施例中,非蛋白水解酶的总量可以为至少1wt%至50wt%,或至少2wt%至40wt%,或至少5wt%至35wt%,或至少10wt%至30wt%。在一些实施例中,非蛋白水解酶是淀粉酶。在一些实施例中,非蛋白水解酶是 $\alpha$ -淀粉酶。

[0050] 在一些实施例中,能够清创失活或坏死组织的清创组合物中的非蛋白水解酶清创

组分的量可以为100wt%，或至少为99.5wt%，或至少为99wt%，或至少为95wt%，或至少为90wt%，或至少为85wt%，或至少为80wt%。在一些实施例中，能够清创失活或坏死组织的清创组合物中的非蛋白水解酶清创组分的量可高达100wt%，或高达99.5wt%，或高达99wt%，或高达95wt%，或高达90wt%，或高达85wt%，或高达80wt%。在一些实施例中，能够清创失活或坏死组织的清创组合物中的非蛋白水解酶清创组分的量可至少为0.001wt%，或至少为0.01wt%，或至少为0.05wt%，或至少为0.075wt%，或至少为0.1wt%，或至少为0.15wt%。

[0051] 在一些实施例中，清创组合物中淀粉酶的量可为100wt%，至少99.5wt%，至少为99wt%，至少为95wt%，至少为90wt%，至少为85wt%，或至少为80wt%。在一些实施例中，非蛋白水解酶清创组分中淀粉酶的量可为100wt%，至少为99.5wt%，至少为99wt%，至少为95wt%，至少为90wt%，至少为85wt%，或至少为80wt%，其余非蛋白水解酶清创组分是其他非蛋白水解酶。 $\alpha$ -淀粉酶的量在淀粉酶的含量中可至少为10wt%，至少为20wt%，至少为30wt%，至少为40wt%，至少为50wt%，至少为60wt%，至少为70wt%，至少为80wt%，至少为90wt%或100wt%。在一些实施例中，非蛋白水解酶清创组分的剩余部分(20wt%或更少，15wt%或更少，10wt%或更少，5wt%或更少，1wt%或更少，0.5wt%或更少)可以是但不限于，水解酶、溶解酶和氧化/还原酶，包括但不限于，所述水解酶、溶解酶和氧化/还原酶选自自由以下组成的组：脂肪酶，透明质酸酶，软骨素酶，乙酰肝素酶，肝素酶，过氧化物酶，木聚糖酶，核酸酶，磷脂酶，酯酶，磷酸酶，异淀粉酶，麦芽糖酶，糖苷酶，半乳糖苷酶，角质酶，乳糖酶，菊粉酶，果胶酶，甘露聚糖酶，葡糖苷酶，转化酶，果胶裂解酶，还原酶，氧化酶，酚氧化酶，脂氧合酶，木质素酶，支链淀粉酶，鞣酸酶，戊聚糖酶，葡聚糖酶，阿拉伯糖苷酶，硫酸酯酶，纤维素酶，半纤维素酶，漆酶及其混合物等。可存在于清创组合物中的蛋白水解酶的实例包括但不限于蛋白酶和角蛋白酶。

[0052] 清创组合物可包括水性介质。在一些实施例中，水性介质可具有3.0-10.0或4.5-8.0或5.5-7.5的pH。在一些实施例中，清创组合物可以具有10-340mOsm/kg的渗透度。当清创组合物为水性溶液、凝胶或糊剂时，可以加入水溶性聚合物以增加溶液粘度并延长酶组合物在坏死组织、伤口表面或伤口中的皮下组织上的停留时间。

[0053] 酶清创组合物可根据需要施用于失活组织，以将伤口中和伤口周围的坏死碎片溶解。例如，在一些实施例中，在清除前，酶清创组合物可与失活组织接触约1至48小时，1至24小时，1至12小时，1至8小时，1至4小时或1至2小时。

[0054] 在一些实施例中，淀粉酶制剂可以通过擦拭或用盐水或水冲洗从伤口中除去。可以根据需要重复这些步骤。可以用本文所述的清创组合物治疗各种伤口，包括III度烧伤和深II度烧伤伤口、糖尿病性溃疡、溃疡性损伤、压力性(褥疮)溃疡、静脉性溃疡、营养性溃疡、外科伤口(如截肢、切口、创伤性和化脓性伤口)、微生物感染的伤口、供体和受体皮肤移植伤口、恶性肿瘤、囊肿、放射性伤口、晒伤和冻伤。

[0055] 在一些实施例中，酶清创组合物可以注射到失活组织中。渗透增强剂也可被采用以增强溶液、凝胶、乳膏剂、洗剂、气溶胶和喷雾剂的经皮给药。可用于本文所述的清创组合物的渗透增强剂包括但不限于，脂肪酸，如支链和直链C6-C18饱和酸，不饱和酸，如C14至C22，油酸，顺式-9-十八烯酸，亚油酸，亚麻酸，脂肪醇，如饱和的C8-C18萜烯，如d-柠檬烯， $\alpha$ -蒎烯，3-蒎烯，薄荷酮，葑酮，长叶薄荷酮，胡椒酮，桉油，土荆芥油，香芹酮，薄荷醇， $\alpha$ -

萜品醇,萜品烯-4-醇,香茅醇,柠檬烯氧化物,蒎烯氧化物,环戊烷氧化物,甘油三乙酸酯,环己烷氧化物,驱蛔萜,7-氧杂双环[2,2,1]庚烷,1,8-桉叶素,甘油单醚,甘油单月桂酸酯,甘油单油酸酯,异硬脂酸异硬脂酸酯,肉豆蔻酸异丙酯,棕榈酸异丙酯,羊毛脂酸异丙酯,吡咯烷酮,如N-甲基-2-吡咯烷酮,1-乙基-2-吡咯烷酮,5-甲基-2-吡咯烷酮,1,5-二甲基-2-吡咯烷酮,2-吡咯烷酮-5-羧酸,N-己基-2-吡咯烷酮,N-十二烷基-2-吡咯烷酮,1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮,4-癸基恶唑烷-2-酮,N-十二烷基己内酰胺和1-甲基-3-十二烷基-2-吡咯烷酮,N-n-丁基-N-n-十二烷基乙酰胺,N,N-二-n-十二烷基乙酰胺,N-环庚基-N-n-十二烷基乙酰胺和N,N-二-n-丙基十二烷基酰胺,尿素,1-十二烷基脲,1,3-二癸基脲,1,3-二苯基脲,二甲亚砜,癸基甲基亚砜,十四烷基甲基亚砜,环糊精及其组合。有效的渗透增强剂还包括1-烷基-2-哌啶酮,1-烷基-2-氮杂环庚酮,如1-十二烷基环庚烷-2-酮,1,2,3-亚烷基三醇,如1,2,3-壬三醇,1,2-链烷二醇,n-,2-(1-烷基)-2-甲基-1,3-二氧戊环,恶唑烷酮,如4-癸基恶唑烷-2-酮,N,N-二甲基链烷酰胺,1,2-二羟丙基链烷酸酯,例如1,2-二羟丙基癸酸酯,1,2-二羟丙基辛酸酯,脱氧胆酸钠,反式-3-烯-1-醇,顺式-3-链烯-1-醇和反式-羟基脯氨酸-N-烷酰胺-C-乙酰胺,及其组合。在一些实施例中,渗透增强剂可包括疏水酯肉豆蔻酸异丙酯,棕榈酸异丙酯或其组合。

[0056] 由于在失活的坏死组织中感染的可能性,清创组合物可包括足以阻碍或根除微生物的量的生物制剂。此类生物制剂包括但不限于抗生素,防腐剂,抗感染剂,抗微生物剂,抗菌剂,抗真菌剂,抗病毒剂,抗原生动物剂,杀芽孢剂,抗寄生虫剂。在一些实施例中,生物试剂对人和动物细胞是可生物降解的和非细胞毒性的。有用的杀生物剂包括但不限于双胍,例如聚(六亚甲基双胍盐酸盐)(PHMB),低分子量的合成聚阳离子,氯己定及其盐,如氯己定二葡萄糖酸盐(CHG),阿来西定及其盐,后两者是二(双胍)。

[0057] 在一些实施例中,双胍是PHMB,因为其对微生物具有高的杀生物活性,加上其具有生物降解性和低细胞毒性。PHMB主要活性针对革兰氏阴性和革兰氏阳性菌、真菌和病毒,并且还用作防腐剂。抗生素被认为是可以发生细菌耐药性的调节药物,与抗生素相比,PHMB不会发生这种抗药性。通常,抗微生物剂被定义为杀死微生物或抑制其生长或复制的物质,而抗感染剂被定义为通过杀死诸如微生物的致病原或防止致病原传播而抵抗感染的物质。通常这两个术语可互换使用。如本文所用,PHMB被认为是抗微生物剂。

[0058] 在一些实施例中,清创组合物是水性清创组合物。在一些实施例中,本文所述的水性清创组合物可包括杀生物剂PHMB,其浓度范围为0.01wt%(100ppm)至1wt%(10,000ppm),或0.05wt%(500ppm)至0.5wt%ppm),或0.1wt%(1,000ppm)至0.15wt%(1500ppm),基于清创组合物的总重量。也可以将二(双胍)加入抗微生物组合物中,其浓度为0.001wt%(10ppm)至4.0wt%(40,000ppm),所述二(双胍)例如阿来西定及其盐和氯己定及其盐。

[0059] 在生理pH下,低分子量PHMB聚阳离子(分子量~2,400道尔顿)与淀粉酶的相互作用可以产生PHMB与淀粉酶离子键相互作用的蛋白质-聚电解质络合物,所述淀粉酶为带负电荷的高分子量淀粉酶(分子量55,000道尔顿)。在伤口中,PHMB可以以连续释放方式从蛋白质-聚电解质络合物中释放,作为体液(如钠、钾、钙和镁离子)中低分子量阳离子的量的函数,置换与阴离子淀粉酶位点的离子相互作用的阳离子PHMB。

[0060] 施用治疗性淀粉酶组合物的剂量取决于淀粉酶的来源、活性(即所涉及的数量

量)、坏死组织的尺寸、患者的年龄、临床护理的可用性以及感染的发生率。可以每天施用两次的治疗淀粉酶的可施用量的范围为粉末(100wt%)到稀释溶液(约0.001wt%)。在一些实施例中,1克清创组合中淀粉酶的活性范围可为250单位至250,000单位/克酶。

[0061] 坏死组织上的清创组合可以由临床医生执行,使得患者不再存在医疗困难。清创的淀粉酶方法可以与其他已知的清创方法组合进行。

[0062] 如本文所使用的,“清创”具有其标准含义,且包括从伤口床去除撕裂的、失活的、死亡的、损伤的、感染的或污染的组织、异物和其他碎片,以暴露健康组织。非活体的或坏死的组织可能是焦痂或腐肉。

[0063] 如本文所用,“坏死组织”具有其标准含义,并包括死细胞和碎片的死组织,这是垂死细胞破碎的结果。坏死组织的颜色从红色变为棕色或黑色或紫色,因为它变得更加脱水,最终导致黑色的、干燥的、粗糙的和似皮革的焦痂结构,其可以发生在各种各样的伤口类型,包括烧伤和所有类型的慢性伤口。

[0064] 如本文所用,“焦痂”具有其标准含义,并包括坏死组织的形式。其在皮肤表面的伤口上是皮革般的覆盖物,它可以是硬的或柔软的。

[0065] 如本文所用,“腐肉”具有其标准含义,并包括湿性坏死组织。这种型式的失活组织是柔软的、潮湿的,并且通常是线性粘稠的,并且通常是黄色的、白色的或灰色的。

[0066] 如本文所用,“失活组织”具有其标准含义,并包括没有活力或生命力的组织,即死组织。

[0067] 如本文所用,“蛋白水解酶”具有其标准含义,并包括酶,该酶将蛋白质的长链状聚合物分子独立地切断(消化、断裂、水解)为多肽类的较短片段,并最终成为其氨基酸的基本组成。

[0068] 如本文所用,“切除”具有其标准含义,并包括需要切口的外壳手术,所述切口利用解剖刀或其他尖锐器械穿过深层真皮(包括皮下和深层组织)。

[0069] 如本文所用,在碳水化合物分子和另一分子之间,特别是两个单糖部分之间形成的共价键是“糖苷键”或“糖键”。

[0070] 如本文所用,“ $\alpha$ -1,4-糖苷键”是通常在一糖上的碳-1与多糖中另一糖部分上的碳-4之间形成的键。当碳-1上的-OH基团位于葡萄糖环平面的下方时,形成 $\alpha$ -糖苷键。另一方面,当其在平面的上方时,形成 $\beta$ -糖苷键。例如,纤维素由1-4个 $\beta$ -糖苷键连接的葡萄糖分子形成,而淀粉由1-4个 $\alpha$ -糖苷键组成。

[0071] 如本文所用,“ $\alpha$ -淀粉酶”包括天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶以及重组 $\alpha$ -淀粉酶,其中重组 $\alpha$ -淀粉酶是指一种 $\alpha$ -淀粉酶,在其中编码天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶的DNA基因序列被修饰以产生DNA序列突变体,与天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶相比,该突变体编码 $\alpha$ -淀粉酶序列中一个或多个氨基酸的取代、插入或缺失。

[0072] 如本文所用,“淀粉分解”的特征是或其能够将淀粉酶促消化成糊精和糖,特别是淀粉酶。

[0073] 如本文所用,所用酶的量以重量百分数表示,其活性以每克活性单位给出,其中“单位”定义为每分钟催化1微摩尔底物转化的酶的量。

[0074] 如本文所用,“表面活性剂”具有其标准含义,并包括降低两种液体之间或液体和固体之间的表面张力(或界面张力)的化合物,所述化合物包括乳化剂、交联剂、洗涤剂、润

湿剂和表面活性剂。

[0075] 如本文所用,“微乳液”具有其标准含义,并包括包含油、水(和/或亲水性化合物)和表面活性剂的热力学稳定的混合物。微乳液包括三种基本类型:直接型(分散在水中的油,o/w),反向型(分散在油中的水分,w/o)和双连续型。微乳液是光学透明的,因为分散的胶束具有的直径小于可见光的波长的直径(例如,小于380纳米,小于200纳米,或小于100纳米)。在没有遮光剂的情况下,微乳液是光学透明的、各向同性的液体。

[0076] 如本文所用,“反相微乳液”具有其标准含义,并包括包含悬浮在连续油相中的亲水相的微乳液。反相微乳液可以包括通过反相乳液表面活性剂在油相中稳定的亲水相(例如水、醇或二者的混合物)的液滴。在这种情况下,亲水性活性剂可以溶解在液滴中。然而,在其他情况下,反相微乳液可以不含水和/或醇,并且亲水性活性剂可以通过反相乳液表面活性剂直接溶解在油相中。

[0077] 如本文所用,“亲水性”具有其标准含义,并包括对水具有亲和力的化合物,该化合物可以是离子或中性的或具有吸引水的结构中的极性基团。例如,亲水性化合物可混溶、溶胀或溶于水。

[0078] 如本文所用,“水性”组合物是指一系列水性溶液,包括但不限于具有溶解组分的水中的均匀溶液,通过表面活性剂或亲水性聚合物稳定的水中的乳化溶液,以及水中的粘稠或胶凝均匀或乳化的溶液。

[0079] 如本文所用,如果溶剂体系中存在的酶的量溶解在溶剂体系中,而酶不会在溶液中形成沉淀物或可见的溶胀凝胶颗粒,则酶是“可溶的”或“溶解的”。

[0080] 如本文所用,“非刺激”是指由于与生物表面的接触,该制剂不会引起强烈的、刺激性的灼热或剧烈疼痛。

[0081] 如本文所用,“挥发性”具有其标准含义,即它可以在常温和高压下快速蒸发。例如,如果一滴(0.05mL)的溶剂在20-25°C之间,在5分钟内或在4分钟内或在3分钟内,或在2分钟内或在1分钟内,或在30秒内,或在15秒内完全蒸发,则该溶剂是挥发性的,。

[0082] 如本文所用,“抗微生物剂”被定义为杀死微生物或抑制其生长或复制的物质,而抗感染剂被定义为通过杀死诸如微生物的致病原或防止致病原传播而抵抗感染的物质。通常这两个术语可互换使用。抗生素被认为是最初由微生物产生或由活性特性合成的具有杀死或阻止另一种微生物生长的物质。术语抗生素通常用于指试图消除感染的几乎所有的处方药。抗微生物剂不会引起杀生物抗性,例如此可发生于抗生素,其中可能发生对药物的抗生素抗性。抗微生物剂对细菌、真菌、病毒、原生动物和朊病毒均具有广谱活性。抗菌剂的实例包括双胍,如聚(六亚甲基双胍盐酸盐)(PHMB),氯己定及其盐,阿来西定及其盐,聚乙烯吡咯烷酮/碘,卡地姆碘,磺胺嘧啶银盐,纳米晶体银,银离子,蜂蜜,稀释漂白剂(例如,次氯酸钠和次氯酸),过氧化氢,有机过氧化物(例如,过氧化苯甲酰),醇(例如,乙醇和异丙醇),苯胺(例如,三氯卡班),双酚(例如,三氯生),氯化物(例如,二氧化氯)以及N-氯胺,季铵化合物(例如,苯扎氯铵,苄索氯铵,十六烷基三甲基氯化铵,氯化十六烷基吡啶和烷基三甲基溴化铵),以及咪康唑,克霉唑,酮康唑,氟康唑,结晶紫,两性霉素B,茶树油等。双胍类,如PHMB,可用于本文所述的清创组合物。

[0083] 可用于本文所述的清创组合物的聚合双胍是聚(六亚甲基双胍),可从Arch Chemicals, Inc., Smyrna, GA以商标Cosmocil™ CQ商购获得。聚(六亚甲基双胍)聚合物也



称为聚(六亚甲基双胍)(PHMB),聚(六亚甲基二双胍)(PHMB),聚(六亚甲基胍)(PHMB),聚(氨基丙基双胍)(PAPB),聚[氨基丙基二(双胍)](PAPB),聚己酰胺和聚(亚氨基酰亚胺羰基)亚氨基六亚甲基盐酸盐;然而,PHMB是首选的缩写。PHMB是一种广谱抗菌药物,已被用于隐形眼镜的多用途溶液、伤口冲洗液、伤口敷料、围手术期清洁产品、漱口水、表面消毒剂、食品消毒剂、兽医应用、化妆品防腐剂、纸防腐剂、二次油回收消毒剂、工业水处理剂和游泳池清洁剂。通常通过以在水中的盐酸盐形式商购获得。还可以加入其它抗微生物聚合物,例如聚季铵盐1、聚季铵盐6、聚季铵盐10、阳离子瓜尔胶和壳聚糖的水溶性衍生物。

[0084] 如本文所用,“抗生素”是通常规定的药物或药物,例如通常由各种微生物产生的青霉素、链霉素、氯霉素和四环素,其抑制或破坏微生物的生长,其主要用于治疗感染性疾病。抗生素被认为是最初由微生物产生或相关活性特性合成的具有杀死或阻止另一微生物生长的那些物质。术语抗生素通常用于指试图消除感染的几乎所有的处方药。

[0085] 如本文所用,“抗生素抗性”是细菌和其他微生物抵抗它们曾经易受影响的抗生素效果的能力。

[0086] 本文所述的清创组合物可以包含杀生物单烷基二醇、甘油烷基醚和单酰基甘油,其组合浓度为0.05wt%(500ppm)至4wt%(4,000ppm),或0.1wt%(1,000ppm)至1wt%(10,000ppm),或0.4wt%(4,000ppm)至0.6wt%(6,000ppm),基于清创组合物的重量。单烷基二醇、甘油烷基醚和单酰基甘油可为疏水性的。

[0087] 可用于本文所述的清创组合物中的单烷基二醇的实例包括但不限于1,2-丙二醇(丙二醇),1,2-丁二醇,1,2-戊二醇,1,2-己二醇,1,2-庚二醇,1,2-辛二醇(辛二醇),1,2-壬二醇,1,2-癸二醇,1,2-十一烷二醇,1,2-十二烷二醇,1,2-十三烷二醇,1,2-十四烷二醇,1,2-十五烷二醇,1,2-十六烷二醇,1,2-十七烷二醇和1,2-十八烷二醇。还可以加入非连位二醇以提高杀生物活性。示例性的非连位二醇包括但不限于2-甲基-2,4-戊二醇,1,3-丁二醇,二甘醇,三甘醇和乙二醇二(羟乙基)醚。

[0088] 可用于本文所述的清创组合物的甘油烷基醚的实例包括但不限于:1-0-庚基甘油,1-0-辛基甘油,1-0-壬基甘油,1-0-癸基甘油,1-0-十一烷基甘油,1-0-十二烷基甘油,1-0-十三烷基甘油,1-0-十四烷基甘油,1-0-十五烷基甘油,1-0-十六烷基甘油(鲛肝醇),1-0-十七烷基甘油,1-0-十八烷基甘油(鲨肝醇),1-0-十八碳-9-烯丙基甘油(沙油醇),1-(2-乙基己基)甘油醚(也称为辛氧基甘油,2-乙基己基甘油,3-(2-乙基己氧基)丙烷-1,2-二醇和Sensiva SC 50),1-庚基甘油醚,1-辛基甘油醚,1-癸基甘油醚,1-十二烷基甘油醚,1-十三烷基甘油醚,1-十四烷基甘油醚,1-十五烷基甘油醚,1-十六烷基甘油醚,1-十八烷基甘油醚。

[0089] 可用于本文所述的清创组合物中的单酰基甘油的实例包括但不限于1-0-癸酰甘油(癸酸单甘酯),1-0-十一烷酰甘油,1-0-十一碳烯酰甘油,1-0-十二烷酰甘油,1-0-十二烷酰甘油(单月桂酸甘油酯,又称月桂酸单甘油酯和Lauricidin®),1-0-十三烷酰甘油,1-0-十四烷酰甘油(单肉豆蔻),1-0-十五酰基甘油,1-0-十六烷酰甘油,1-0-十七烷酰甘油和1-0-十八酰甘油(单辛酸酯)。通常,在1-0-位取代的甘油优于在2-0-位被取代的或在1-0和2-0位上被二取代的那些甘油。

[0090] 如本文所用,“疏水性”是指排斥水、不溶于或相对不溶于水,并且对水不具有亲和力。具有亲水取代基的疏水性化合物,例如邻二醇,可以在添加或不添加表面活性剂的情况

在水中形成乳液。

[0091] 如本文所用,“两性”是指分子或聚合物上的阳离子和阴离子电荷的混合物,其中总电荷是局部pH依赖性的,而“两性”在宽的pH范围内具有相等数量的阳离子和阴离子电荷。

[0092] 如本文所用,“赋形剂”通常是形成例如液体,流体或凝胶的载体的惰性物质,其溶解或分散酶或其它添加剂成分。

[0093] 淀粉组合物可以包括一种或多种附加的表面活性剂以增强坏死组织的去除。合适的表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子,非离子,两性和两性表面活性剂。在一些实施例中,表面活性剂是非离子的两性表面活性剂。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,表面活性剂可以以0%至10wt%的量存在。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,表面活性剂可以以至少0.01wt%,或至少0.1wt%,或至少0.25wt%,或至少0.5wt%,或至少1wt%的量存在。表面活性剂可具有18-30的HLB(亲水-亲油平衡)值,以便在溶液中保持酶的催化结构,并且不妨碍任何添加的抗微生物剂的杀生物活性,同时促进非细胞毒性溶液。HLB的高值表示表面活性剂比HLB值较低的表面活性剂具有更好的亲水性。

[0094] 合适的非离子表面活性剂包括但不限于泊洛沙姆、反泊洛沙姆、泊洛沙胺和反泊洛沙胺的环氧乙烷/环氧丙烷嵌段共聚物。优选泊洛沙姆和泊洛沙胺,最优选泊洛沙姆。泊洛沙姆和泊洛沙胺可从BASF Corp.以各自的商品名Pluronic<sup>®</sup>和Tetronic<sup>®</sup>获得。合适的Pluronic表面活性剂包括但不限于具有HLB为31的Pluronic F38,HLB为29的Pluronic F68,HLB为26的Pluronic 68LF,HLB为25的Pluronic F77,HLB为24的Pluronic F87,HLB为28的Pluronic F88,HLB为28的Pluronic F98,HLB为27的Pluronic F108,HLB为18-23的Pluronic F127(也称为泊洛沙姆407),以及HLB为19的Pluronic L35。这种类型的示例性泊洛沙胺表面活性剂是具有HLB为24的Tetronic 1107(也称为泊洛沙胺1107)。

[0095] 除了上述之外,可以加入其它中性表面活性剂,例如脂肪酸的聚乙二醇酯,例如椰子、聚山梨醇酯、高级烷烃(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)的聚氧乙烯或聚氧丙烯醚,商标为吐温20的聚山梨醇酯20,商标为Brij 35获得的聚氧乙烯(23)月桂基醚,商标为Myrj 52获得的聚氧乙烯(40)硬脂酸酯,商品为Atlas G 2612的聚氧乙烯(25)丙二醇硬脂酸酯,上述均可购自Akzo Nobel, Chicago, IL公司。其它中性表面活性剂包括壬基酚聚氧丙烯醚,如Triton X-100,聚氧乙烯植物基脂肪醚的Brij表面活性剂,吐温80,癸基葡糖苷和月桂基葡糖苷。

[0096] 适用于根据本发明的抗微生物组合物的两性表面活性剂包括以商标Miranol (Rhodia)市售提供的类型的物质。另外有用的一类两性表面活性剂的实例是甜菜碱,包括椰油酰胺丙基甜菜碱,十一碳烯酰氨基烷基甜菜碱和月桂酰氨基烷基甜菜碱和椰油酰两性基乙酸钠。两性表面活性剂非常温和,具有优异的皮肤病学特性,特别适用于个人护理用途。

[0097] 清创组合物还可以包含浓度为0.01wt%至1wt%的螯合剂。例如,螯合剂可以以至少0.01wt%,或至少0.03wt%,或至少0.05wt%,或至少0.1wt%,或至少0.50wt%,或至少0.75wt%,或至少1.0wt%。螯合剂可以选自包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA),次氨基三乙酸,次氨基三丙酸,二乙三胺五乙酸,N-(2-羟乙基)乙二胺三乙酸,1,6-二氨基六亚甲基四乙酸,1,2-环己二胺四乙酸,0,0'-双(2-氨基乙基)乙二醇四乙酸,1,3-丙二胺四乙酸,N,N'-双(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二丙酸,三乙

四胺六乙酸,乙二胺-N,N'-双(亚甲基膦酸),亚氨基二乙酸,N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠(月桂亚氨基二丙酸钠,Dericat 160C),N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸,1,3-二氨基-2-羟基丙四乙酸,1,2-丙二胺四乙酸,乙二胺四(亚甲基膦酸),N-(2-羟乙基)亚胺二乙酸,二膦酸盐,依替膦酸盐,及其盐。

[0098] 清创组合物还可以含有叶绿酸及其水溶性衍生物,以减少局部炎症,促进愈合和控制气味。据报道,在治疗需要清创的伤口时,蛋白水解的一些最终产物是粘蛋白,其通常对与所述最终产品接触的组织产生刺激作用和其它有害作用。为了控制这种不良反应,水溶性叶绿素衍生物的并入已经掺入蛋白水解清创制剂中,通常以总组合物的0.05-1wt%的量掺入,优选为0.1wt%至0.5wt%(美国专利US 2,917,433)。可用于上述目的的水溶性叶绿素由美国专利US 2,120,667中公开的那些进行举例,特别包括叶绿酸铜钠或叶绿酸铜钾,叶绿酸镁钠或叶绿酸镁钾,以及叶绿酸铁钠或叶绿酸铁钾。为此目的,优选的水溶性叶绿素是叶绿酸铜钠和叶绿酸铜钾的混合物,主要是钾盐。

[0099] 在伤口治疗中的其它应用例子是国际专利WO 2008/063229,其中蛋白酶清创组合物是一种亲水性软膏,其还包含使由死细胞释放的化合物对健康正常细胞的损伤最小化的补充剂,其中该补充剂是任选的叶绿酸铜钠,其中施用的叶绿素的摩尔数与所施用的清创酶的摩尔数的化学计量比范围,任选为0.1至10.0,0.3至3.0或1.0。

[0100] 叶绿酸铜钠也是食用着色剂,被称为天然绿色3。除了清创产品之外,还添加了着色剂,这有助于肉眼观察清创组合物的清除。

[0101] 如果在清创过程中需要减轻疼痛,该制剂可进一步包含止痛剂、麻醉剂和神经性疼痛剂,例如利多卡因,辣椒素,苯佐卡因,丁卡因,丙胺卡因,布比卡因,左布比卡因,普鲁卡因,卡波卡因,依替卡因,甲哌卡因,去甲替林,阿米替林,普瑞巴林,双氯芬酸,芬太尼,加巴喷丁,非甾体抗炎剂,水杨酸盐及其组合等。

[0102] 而α-淀粉酶催化葡萄糖聚合物的内部α-(1-4)-键的水解作用作为主要反应,但是除了水解作用外,一些α-淀粉酶,特别是糖化淀粉酶催化转移反应(美国专利US 8,486,664;国际专利申请号WO 2012/013646)。这些α-淀粉酶能够将糖苷残基转移到低分子量醇以及水中,其性质与糖苷酶的转移酶活性相关。并不知道这种转糖基化方法是否在与本发明相关的坏死组织的清创中起作用。

[0103] 在一些实施例中,描述了包含含有根据本文所述的任何变体的清创组合物的容器以及使用清创组合物清创失活组织的说明书的试剂盒。说明书包括将清创组合物与需要清创的皮肤区域接触。说明书包括以定期的间隔重复接触步骤的说明。定期的间隔可以至少每天一次,或至少每天两次(每12小时)一次,或至少每天三次(每8小时一次)。说明书包括在溶剂或其它载体液体中混合和/或稀释清创组合物的说明。说明书包括通过擦拭和通过溶剂冲洗去除坏死组织处治疗的清创组合物。

[0104] 本发明还描述了一种清创失活组织的方法。该方法包括根据本文所述的任何变化形式的清创组合物与需要清创的皮肤区域的接触,所述形式例如粉末,液体,凝胶,水凝胶,泡沫,糊剂,喷雾剂或膜。在一些实施例中,将清创组合物施用于伤口敷料,例如纱布,织物,纤维,藻酸盐,水胶体,复合材料或膜。在一些实施例中,伤口敷料由天然组分或合成组分或其组合组成。该方法还可以包括在给定时间段之后研磨和/或除去清创组合物。该方法包括以定期的间隔重复接触步骤。在一些实施例中,期的间隔可以是每天至少一次,或每天至少

两次(每12小时),或每天至少三次(每8小时)一次)。在一些实施例中,该方法还包括从皮肤区域移除清创组织。

[0105] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的目的是提供坏死碎片和焦痂的酶清创。

[0106] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的目的是提供慢性伤口,急性伤口和烧伤伤口的酶清创治疗。

[0107] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供坏死组织的酶清创,其主要不基于蛋白酶的肽切断/水解。

[0108] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于清创的酶,其切断多糖内的碳水化合物 $\alpha$ -1,4-糖苷键或与蛋白质连接的糖苷键。

[0109] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是用于酶清创的碳水化合物水解酶,其基于酶的淀粉酶家族。

[0110] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是治疗坏死性伤口,其包括施用有效量的淀粉酶的步骤。

[0111] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于酶清创的碳水化合物水解酶,其基于 $\alpha$ -淀粉酶。

[0112] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于酶清创的碳水化合物水解酶,其基于 $\beta$ -淀粉酶。

[0113] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于酶清创的碳水化合物水解酶,其基于 $\gamma$ -淀粉酶与 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶的组合。

[0114] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于酶清创的碳水化合物水解酶,其基于淀粉酶家族,其选自 $\alpha$ -淀粉酶, $\beta$ -淀粉酶和 $\gamma$ -淀粉酶的组合。

[0115] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供酶组织清创,其主要基于 $\alpha$ -淀粉酶,其中其他家族的酶最少(20wt%或更少)。

[0116] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供酶组织清创,其中除淀粉酶之外的水解切断酶的家族包括20wt%或更少的蛋白酶,软骨素酶,透明质酸酶,脂肪酶,糖苷酶,乙酰肝素酶,皮肤素酶,支链淀粉酶,N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,乳糖酶,磷脂酶,转糖基酶,酯酶,硫酸酯水解酶,硫酸酯酶,焦痂酶,核酸酶,磷酸酶,磷酸二酯酶,甘露聚糖酶,甘露糖苷酶,异淀粉酶,裂解酶,菊粉酶,角蛋白酶,鞣酸酶,戊聚糖酶,葡聚糖酶,阿拉伯糖苷酶,果胶酶,纤维素酶,几丁质酶,木聚糖酶,角质酶,果胶裂解酶,半纤维素酶及其组合。

[0117] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供酶组织清创,其中除淀粉酶以外的酶的家族包括20wt%或更少的氧化酶,过氧化物酶,葡萄糖氧化酶,过氧化氢酶,氧化还原酶,酚氧化酶,漆酶,脂肪氧合酶,异构酶和木质素酶及其组合等。

[0118] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供基于 $\alpha$ -淀粉酶的清创,其中所述 $\alpha$ -淀粉酶以粉末,凝胶,糊剂,液体,软膏,泡沫,绷带,网状物或网状物敷料的形式执行。

[0119] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供基于 $\alpha$ -淀粉酶的清创,其为外用或皮下给予。

[0120] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供基于 $\alpha$ -淀粉酶的清创,其中 $\alpha$ -淀粉酶应用于亲水性或水性介质中。

- [0121] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是为清创组合物提供令人愉悦的香味。
- [0122] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是将叶绿酸施用于伤口以减少局部炎症,促进愈合和控制气味。
- [0123] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于淀粉酶治疗的伤口敷料,包括纱布,网状物,织物,纤维,泡沫或膜。
- [0124] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供保藏的淀粉酶制剂。
- [0125] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供淀粉酶的抗微生物制剂。
- [0126] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供淀粉酶的抗微生物制剂,其减少或消除伤口和生物学表面中的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌。
- [0127] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供淀粉酶的抗微生物制剂,其减少或消除伤口和生物表面中的酵母菌。
- [0128] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供抗微生物淀粉酶制剂,其包含抗微生物精油以增强组合物的抗微生物活性。
- [0129] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供基于 $\alpha$ -淀粉酶的清创,其通过表面活性剂能够增溶、膨胀或湿润失活组织或焦痂。
- [0130] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供基于 $\alpha$ -淀粉酶的清创,其通过亲水性聚合物能够增加制剂的粘度或引起凝胶化。
- [0131] 本文所述的组合物,试剂盒和方法的另一个目的是提供用于治疗伤口和坏死组织的试剂盒形式的淀粉酶。
- [0132] 实施例
- [0133] 本发明采用以下成分及其缩写:
- [0134] 酶:
- [0135]  $\alpha$ -淀粉酶#1,猪胰腺,30U/mg,Sigma Aldrich,A3176-500KU,批号SLBF3831V。
- [0136]  $\alpha$ -淀粉酶#2,猪胰腺(含有0.2%蛋白酶),230U/mg, Lee BioSolutions,批号M60404。
- [0137]  $\alpha$ -淀粉酶#3,猪胰腺(含有0.05%蛋白酶),210U/mg, Lee BioSolutions,批号P70442。
- [0138]  $\alpha$ -淀粉酶#4,人唾液,117.5U/mg,Sigma Aldrich,批号SLBB8953V。
- [0139]  $\alpha$ -淀粉酶#5,地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),500-1500U/mg,Sigma Aldrich,批号SLBG8595V。
- [0140]  $\alpha$ -淀粉酶#6,枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* spp.),粉末,7278U/mg, Dyadic International,批号ADY4001。
- [0141]  $\alpha$ -淀粉酶#7,枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* spp.),溶液,1269U/mg, Dyadic International,批号ASP3001。
- [0142]  $\beta$ -淀粉酶,大麦,41.6U/mg,Sigma Aldrich,批号SLBC2932V。
- [0143]  $\gamma$ -淀粉酶#1,黑曲霉(*Aspergillus niger*),129.2U/mg,Sigma Aldrich,批号BCBD1453V。
- [0144]  $\gamma$ -淀粉酶#2,根霉属(*Rhizopus* spp.),MyBiosource Inc.,批号22200303。

- [0145] 菠萝蛋白酶,菠萝茎,3-7U/mg,Sigma Aldrich,批号SLBG2202V。
- [0146] 胶原酶,I型,溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*),125U/mg,Sigma Aldrich,C0130-100UG,批号SLBH5757V。
- [0147] 脂肪酶#1,猪胰腺,30-90U/mg,Sigma Aldrich,批号SLBH6427V。
- [0148] 脂肪酶#2,猪胰腺(含<0.05%蛋白酶),360U/mg, Lee BioSolutions,400-10,批号R24160。
- [0149] 其他成分:
- [0150] AC,抗微生物组合物,水:95.5wt%,PHMB:0.1wt%,EDTA:0.065wt%,P407:2wt%,HPMC:2wt%,SC50:0.3wt%,SC10:0.1wt%,pH:5.5。
- [0151] CHG,葡萄糖酸氯己定,Spectrum Chemicals,批号ZQ1023。
- [0152] 胶原蛋白,I型,大鼠尾巴,Corning Inc.,354236,批号3298599。
- [0153] DC 193,PEG-12聚二甲基硅氧烷,Dow Corning,批号0002250697
- [0154] Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水,DPBS,pH 7.1,Sigma Aldrich,D8537,批号RNBC1143。
- [0155] EDTA,乙二胺四乙酸二钠盐,乙二胺四乙酸三钠盐,Spectrum Chemicals,批号1AE0430,YL0044。
- [0156] 甘油,质量选择,批号519675。
- [0157] 羟丙基甲基纤维素(HPMC),Amerchol Corp.,批号WF15012N01。
- [0158] 矿物油,CVS,批号5BF0201。
- [0159] PEG 400,聚(乙二醇),400M<sub>n</sub>,Sigma-Aldrich,批号MKBD2642V。
- [0160] 凡士林,Vaseline,批号02011HU00。
- [0161] PHMB,聚(六亚甲基双胍盐酸盐),Cosmocil TM CQ,Arch Chemical,批号11RC116995。
- [0162] P407,泊洛沙姆407,Pluronic F127,Spectrum Chemicals,批号1AD0265。
- [0163] 聚合物JR-30M,Amerchol,批号XL2850GRXA。
- [0164] SC10,Sensiva SC 10,1,2-二羟基辛烷),Schülke&Mayr,批号1178933。
- [0165] SC50,Sensiva SC 50,甘油1-(2-乙基己基)醚),Schülke&Mayr,批号1179743。
- [0166] 氢氧化钠,Puritan 50%NaOH,UN1824,批号011043。
- [0167] 尿素,Sigma Aldrich,批号SLBF4607V。
- [0168] 水,去离子,调节至pH 7。
- [0169] 胶原蛋白凝胶消化
- [0170] 为了确定 $\alpha$ -淀粉酶是否含有蛋白酶,蛋白酶能够切断胶原蛋白凝胶(即,基于蛋白质的凝胶),通过在不同频率条件下的流变学来研究胶原蛋白凝胶消化,其使用 $\alpha$ -淀粉酶和胶原酶作为潜在的消化酶。如果 $\alpha$ -淀粉酶没有消化胶原蛋白凝胶,那么其组织的清创活性不会基于由蛋白酶引起的任何污染,因此不会水解胶原聚合物链的肽键。
- [0171] 使用胶原I制备胶原蛋白凝胶2.0mg/mL。通过混合500 $\mu$ L胶原( $\sim$ 4.1mg/mL)、500 $\mu$ L Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和10 $\mu$ L 1N NaOH(从Puritan稀释50%NaOH)来制备凝胶。在37 $^{\circ}$ C培养箱中30分钟后,形成固体胶原蛋白水凝胶。将凝胶在37 $^{\circ}$ C下用以下酶孵育24小时:
- [0172] 2mg (250U) 胶原酶

[0173] 8mg (250U)  $\alpha$ -淀粉酶#1

[0174] 使用25mm平行板(固体凝胶)和25mm锥形板(用于完全液化的凝胶,即用胶原酶处理的胶原蛋白凝胶),在Anton Paar MCR 302流变仪上进行流变测试。所有频率扫描在37°C和1%应变(通过应变幅度扫描确定的线性粘弹性区域)下进行。数据如图1所示,其用于指示存储的和损耗的模量与频率的关系,以及图2示出了未处理胶原蛋白凝胶、淀粉酶处理的胶原蛋白凝胶和胶原酶处理胶原蛋白凝胶的复合模量。

[0175] 在图1中,对于未处理的胶原蛋白凝胶对照、用250单位胶原酶处理的胶原蛋白凝胶和用250单位 $\alpha$ -淀粉酶#1处理的胶原蛋白凝胶,以存储( $G'$ )和损耗( $G''$ )模量-频率表示。存储模量代表粘弹性胶原蛋白凝胶的固体状特性,损耗模量表示粘弹性胶原蛋白凝胶的液体状特性。未处理的胶原蛋白凝胶与用 $\alpha$ -淀粉酶#1处理的凝胶之间的存储模量和损耗模量之间没有显著的差异,表明 $\alpha$ -淀粉酶没有消化胶原蛋白凝胶。蛋白酶胶原酶完全液化胶原蛋白凝胶,这通过显著降低的存储模量和损耗模量证明。

[0176] 在图2中,对于未处理的胶原蛋白凝胶对照,用250单位胶原酶处理的胶原蛋白凝胶和用250单位 $\alpha$ -淀粉酶#1处理的胶原蛋白凝胶,绘制复合模量( $G^*$ )-频率的曲线图。复合模量说明储存模量(固体状态)和损耗模量(液体状态),这与凝胶的刚度有关。与未处理的胶原蛋白凝胶对照相比, $\alpha$ -淀粉酶#1不消化胶原蛋白凝胶(复合模量无统计学差异)。

[0177] 这些图表明,与未处理的胶原蛋白凝胶对照相比(储存模量,损失模量或复合模量无统计学差异),胶原酶,一种蛋白酶,在24小时内完全液化了胶原蛋白凝胶,而 $\alpha$ -淀粉酶#1是一种用于切断多糖(如淀粉和糖原) $\alpha$ -键的蛋白质酶,其不消化胶原蛋白凝胶。从这些图中,由于测试的聚合物(胶原)的粘弹性,观察到模量随频率增加。在高频率下,胶原聚合物链没有时间松弛,其导致观察到的更坚硬的粘弹性行为。用胶原酶处理的胶原蛋白凝胶的数据由于胶原蛋白凝胶消化的液体性质而显得很杂乱。胶原酶完全降解和液化胶原蛋白凝胶,所得到的酶促降解溶液必须使用流变仪上的锥形和平板几何结构进行评估。当凝胶完成液化时,由于溶液中残留的胶原和多肽的性质,所得溶液仍然是粘弹性的。

[0178] 流变学数据支持 $\alpha$ -淀粉酶对失活组织的清创活性,不依赖于蛋白酶的污染。

[0179] 评价各种酶体外消化功效的方法

[0180] 在美国专利US 8,119,124中,报道了使用年幼猪皮的体内(体外)烧伤伤口模型,因为年幼猪皮与人类相似。在我们的调查中,从德克萨斯州圣安东尼奥市的Culebra Meat Market获得了几个冷冻猪皮样本,并用作清创模型。对于每次消化实验,将猪皮在水中煮沸1分钟,然后切成小方块。在应用清创制剂之前,立即称量煮沸的猪皮。然后将其与1克每一清创制剂在34°C在pH7的水中孵育16小时,并用一块纸巾轻轻擦拭以除去任何消化的组织。然后称量剩余的组织。作为对照,煮沸的猪皮采用同样的步骤经过无活性酶处理。猪皮的消化百分比采用下式计算:

$$[0181] \quad \% \text{ 消化的猪皮} = \frac{W2 \text{ enz}}{W1 \text{ enz} + \frac{W2 \text{ veh}}{W1 \text{ veh}}} * 100\%$$

[0182] 其中:

[0183]  $W1 \text{ enz}$ :在含有一种或多种活性酶的制剂中消化之前猪皮重量。

[0184]  $W1 \text{ veh}$ :除了没有任何活性酶,在相同制剂中消化之前猪皮重量。

[0185]  $W2 \text{ enz}$ :在含有一种或多种活性酶的制剂中消化后的猪皮重量。

[0186] W2 veh:除了没有任何活性酶,在相同制剂中消化后的猪皮重量。

[0187] 猪皮的消化结果

[0188] 不同来源的淀粉酶,或以单位(U)表示的不同活性水平的淀粉酶,显示不同水平的体外清创活性(表1)。来自Sigma Aldrich( $\alpha$ -淀粉酶#1)和Lee BioSolutions( $\alpha$ -淀粉酶#2, $\alpha$ -淀粉酶#3)的猪胰腺的 $\alpha$ -淀粉酶显示高清创功效,其中1克制剂含有250U酶。令人吃惊的是,含有较高量的蛋白酶杂质( $\alpha$ -淀粉酶#2)的 $\alpha$ -淀粉酶(Lee BioSolutions,0.2%蛋白酶)比含有少量蛋白酶杂质的 $\alpha$ -淀粉酶具有略低的清创功效(Lee BioSolutions,0.05%蛋白酶)( $\alpha$ -淀粉酶#3),此进一步支持如下结论:淀粉酶清创活性不是蛋白酶污染的结果。在研究的浓度下,人唾液( $\alpha$ -淀粉酶#4)的 $\alpha$ -淀粉酶在消化猪皮中是无效的。来自细菌的 $\alpha$ -淀粉酶的活性根据细菌菌株和供应商是高度可变的。来自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶#5)显示非常弱的清创功效,而来自枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis* spp.)的 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶#6, $\alpha$ -淀粉酶#7)显示高清创功效,特别是在1克制剂中的活性为250,000单位的酶。基于 $\beta$ -淀粉酶作用于与 $\alpha$ -淀粉酶相同的底物但具有不同催化机制的能力,其在消化猪皮中显示出一些活性,而 $\gamma$ -淀粉酶#1和 $\gamma$ -淀粉酶#2在该清创模型中无效。

[0189] 表1.来自各种来源的淀粉酶在水中煮沸猪皮的体外清创功效

[0190]

制剂	制剂比例(wt%)	制剂(Units)	%消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	96.30%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#2	99.891/0.109	1g/250U	96.60%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#3	99.88/0.12	1g/250U	97.90%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#4	99.8/0.2	1g/250U	4.30%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#5	99.95g/0.05	1g/250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#5	99.9/0.1	1g/500U	13.50%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.9966/0.0033	1g/250U	17.50%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.966/0.034	1g/2,500U	70.80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	96.6/3.4	1g/250,000U	100%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#7	99.9803/0.0197	1g/250U	15.00%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#7	99.803/0.197	1g/2,500U	77.60%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#7	80.3/19.7	1g/250,000U	100%
H <sub>2</sub> O/ $\beta$ -淀粉酶	99.4/0.6	1g/250U	18.60%
H <sub>2</sub> O/ $\beta$ -淀粉酶	94/6	1g/2500U	38.90%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -淀粉酶#1	99.8/0.2	1g/250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -淀粉酶#1	99/1	1g/1,250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -淀粉酶#1	98/2	1g/2,500U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -淀粉酶#2	99.4/0.6	1g/250U	0%

[0191] 在表2中列出了各种添加剂和赋形剂对 $\alpha$ -淀粉酶#1与煮沸猪皮的清创功效的影响。包括DPBS缓冲溶液,矿物油制剂,亲水性制剂,增加粘度的聚合物制剂,HPMC/DPBS,以及具有增加粘度的阳离子聚合物Polymer JR(阳离子羟乙基纤维素)制剂。将其结果与在pH=



7的水中的 $\alpha$ -淀粉酶#1进行比较。每种制剂含有相同量的 $\alpha$ -淀粉酶#1,即250单位。可以看出,制剂一致地均影响了淀粉酶清创功效。与水中的 $\alpha$ -淀粉酶相比,添加DPBS缓冲液似乎增强了清创功效,而矿物油大大降低了清创功效,大概是因为缺乏水的酶溶解度和活性;在DPBS中添加的中性纤维素基HPMC的水溶性聚合物和阳离子纤维素基聚合物Polymer JR在水中稍微降低了清创功效,这可能是因为与 $\alpha$ -淀粉酶#1本身相比,其制剂中的水含量较低。

[0192] 表2. 在各种制剂中的 $\alpha$ -淀粉酶#1对煮沸猪皮的体外清创功效

[0193]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	% 消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	96.30%
DPBS/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	100%
Mineral oil/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	62.90%
HPMC/DPBS/ $\alpha$ -淀粉酶#1	5/94.2g/0.8	0.05g/0.95g/250U	80.10%
Polymer JR-30M/H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	5/94.2g/0.8	0.05g/0.95g/250U	84.30%

[0194] 在表3中,描述了 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶的组合,其结合使用来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的细菌 $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -淀粉酶#6)与来自植物的 $\beta$ -淀粉酶。在该模型中,较大量的 $\beta$ -淀粉酶似乎阻碍了煮沸的猪皮的整体消化。

[0195] 表3. $\alpha$ -淀粉酶#6与 $\beta$ -淀粉酶在水中煮沸猪皮的体外清创功效

[0196]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	% 消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/250U	79.20%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6/ $\beta$ -淀粉酶	96.6/0.34/3.16	1g/250U/131U	53.70%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6/ $\beta$ -淀粉酶	99.32/0.34/0.34	1g/250U/14U	72.30%

[0197] 在表4中,向煮沸猪皮的消化中向 $\alpha$ -淀粉酶#3中加入另外的非蛋白水解酶水解酶,脂肪酶,相对于脂肪酶其使用的淀粉酶含量为100wt%,90wt%和80wt%。已知脂肪酶能够催化脂类(甘油三酯、脂肪和油)中酯键的水解作用。有多种脂肪酶来源,其由胰腺、肝、肠、舌头、胃和许多其他细胞、以及植物种子产生。在 $\alpha$ -淀粉酶中添加脂肪酶可能是清创中的主要辅助物质,其中涉及脂肪组织。在研究的猪模型中,对于所研究的三个样品,%消化的煮沸猪皮相对恒定,其使用总酶浓度为0.2wt%,即使淀粉酶#3的量随着脂肪酶含量的增加而降低,结果显示两种非蛋白水解酶均有助于煮沸的猪皮的消化。

[0198] 表4. $\alpha$ 淀粉酶#3与脂肪酶#2在水中煮沸猪皮的体外清创功效

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	% 消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶 #3	99.8/0.2	1g/420U	83.90%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#3/lipase #2	99.8/0.18/0.02	1g/378U/72U	84.10%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#3/lipase #2	99.8/0.16/0.04	1g/336U/144U	81.20%

[0201] 在表5中给出了由 $\alpha$ -淀粉酶#1与角质分解剂尿素、 $\alpha$ -淀粉酶#1与叶绿酸、 $\alpha$ -淀粉酶#1与尿素和叶绿酸的组合在水中消化的猪皮的结果,叶绿酸用于减少局部炎症,促进愈合和控制气味。叶绿酸的所有溶液都是绿色的。可以看出,与表1相比,在类似条件下进行的不同来源的猪皮具有降低的消化水平。加入尿素似乎增加了 $\alpha$ -淀粉酶的消化功效,而添加

两种浓度的叶绿酸则似乎降低了淀粉酶的功效。三种成分的组合使得消化功效大于叶绿酸和 $\alpha$ -淀粉酶,小于尿素和淀粉酶或 $\alpha$ -淀粉酶其自身。

[0202] 表5. $\alpha$ -淀粉酶#1与尿素和叶绿酸在水中煮沸猪皮的体外清创功效

[0203]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	78.60%
H <sub>2</sub> O/urea/ $\alpha$ -淀粉酶#1	89.2/10/0.8	1g/250U	84.90%
H <sub>2</sub> O/chlorophyllin/ $\alpha$ -淀粉酶#1	98.7/0.5/0.8	1g/250U	54.80%
H <sub>2</sub> O/chlorophyllin/ $\alpha$ -淀粉酶#1	98.2/1/0.8	1g/250U	59.30%
H <sub>2</sub> O/urea/chlorophyllin/ $\alpha$ -淀粉酶#1	88.7/10/0.5/0.8	1g/250U	67.20%

[0204] 坏死组织易受细菌感染,此进一步阻碍伤口愈合,并可能在严重的情况下诱发败血症。由于坏死伤口、损伤和刺激性组织感染的可能性,需要添加阻碍或消除微生物的生物制剂。在这方面,我们研究了在伤口护理中使用的两种抗菌双胍类,聚(六亚甲基双胍盐酸盐)(PHMB)和氯己定二葡萄糖酸盐(CHG)。表6是PHMB与 $\alpha$ -淀粉酶#6和CHG与 $\alpha$ -淀粉酶#6的水溶液的三种配方与相同重量百分比的 $\alpha$ -淀粉酶#6的比较。对于基于PHMB的溶液,这些活性本身类似或略高于 $\alpha$ -淀粉酶其自身,尽管较高的PHBM浓度0.15wt% (1500ppm)可能略微降低了淀粉酶的活性。然而,CHG的使用似乎显著降低了淀粉酶的消化能力。

[0205] 表6.用 $\alpha$ -淀粉酶#6PHMB和CHG在水中煮沸猪皮的体外清创

[0206]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/25,000U	83.90%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.51/0.15/0.34	1g/25,000U	81.30%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.56/0.1/0.34	1g/25,000U	84.90%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.61/0.05/0.34	1g/25,000U	86.80%
H <sub>2</sub> O/CHG/ $\alpha$ -淀粉酶#6	97.66/2/0.34	1g/25,000U	60.50%

[0207] 大鼠皮肤的消化结果

[0208] 根据IACUC批准的草案,从得克萨斯大学圣安东尼奥分校的实验动物资源中心的9个月龄和11个月龄的两只成年大鼠上获得新鲜切除的大鼠皮肤组织。从每只雄性Sprague-Dawley大鼠的背部取出大块皮肤。将一半的皮肤切割并在水中煮沸60秒。将煮沸和未沸腾的两半皮肤切割成较小的碎片并修剪,使每个小碎片重0.23g至0.25g。将一块小碎片皮肤浸泡在1克每一清创制剂中,并在34℃下孵育24小时。在24小时孵育后,从清创制剂中移走皮肤。将清创后的皮肤(柔软和糊状的组织)用纸巾轻轻擦拭,并称量剩余的非清创皮肤。然后根据清创步骤前后的重量计算清创皮肤的百分比。

[0209] 表7和8显示了将新鲜切除的大鼠皮肤与在未煮沸和煮沸条件下清创的清创结果,其分别使用淀粉分解酶 $\alpha$ -淀粉酶#1和 $\alpha$ -淀粉酶#6以及蛋白酶菠萝蛋白酶和胶原酶,其全部在pH=7的水中。对于未煮沸的大鼠皮肤(表7),可以看出两种蛋白酶比淀粉酶更有效,胶原酶对大鼠皮肤的消化最有效,其效率为79%。然而,对于煮沸的大鼠皮肤(表8),其更类似于失活的坏死组织,淀粉分解酶在大鼠皮肤的消化能力方面与蛋白水解酶相当。

[0210] 表7. $\alpha$ -淀粉酶、菠萝蛋白酶和胶原酶在水中煮沸大鼠皮肤的体外清创

[0211]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	31.80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/25,000U	29.80%
H <sub>2</sub> O/菠萝蛋白酶	90/10	1g/250U	51.90%
H <sub>2</sub> O/胶原酶	99.8/0.2	1g/250U	79%

[0212] 表8.  $\alpha$ -淀粉酶、菠萝蛋白酶和胶原酶在水中煮沸的大鼠皮肤的体外清创

[0213]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	86.80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/25,000U	90.40%
H <sub>2</sub> O/菠萝蛋白酶	90/10	1g/250U	92.90%
H <sub>2</sub> O/胶原酶	99.8/0.2	1g/250U	86%

[0214] 如果坏死组织被微生物菌膜感染,则可能进一步用额外的多糖(细胞外聚合物质的一种成分,有时称为粘液)覆盖坏死组织,该额外的多糖来微生物菌膜,微生物菌膜在源头可能是细菌性的,菌膜的去除或减少可加速坏死组织或失活组织的去除。表9和表10给出了在pH=5.5下使用已显示出降低菌膜功效的水性抗微生物组合物(AC)的结果(美国专利US 8,829,053)。抗微生物组合物包括PHMB的聚合双胍抗微生物剂,作为螯合剂和pH稳定剂的EDTA,作为增稠聚合物的HPMC,用于清洁的中性表面活性剂P407,以及用于润肤和抗菌性能的2-乙基己基甘油和1,2-辛二醇的组合。与在水中采用所列相同酶的未煮沸的大鼠皮肤(表7)相比,在抗微生物组合物(表9)中,无论 $\alpha$ -淀粉酶#1还是 $\alpha$ -淀粉酶#6在煮沸状态下的大鼠皮肤中均具有有效的消化。对未煮沸的大鼠皮肤,尽管抗微生物组合物中的菠萝蛋白酶比淀粉酶更有效(表9),但其消化功效小于所示的在水中大鼠皮肤的消化(表7)。虽然胶原酶对于水中的未煮沸和煮沸的大鼠皮肤消化(表7和8)均非常有效,但是在水性抗微生物组合物地存在下,对于未煮沸的大鼠皮肤,其在消化功效可忽略不计(表9)。在抗微生物组合物中,此效果也表现于胶原酶在煮沸的大鼠皮肤中的效果(表10),而 $\alpha$ -淀粉酶#1、 $\alpha$ -淀粉酶#6和菠萝蛋白酶是非常有效的(表10)。由于抗微生物组合物含有金属离子螯合剂EDTA,所以其具有灭活的胶原酶,其是金属蛋白酶(锌内肽酶)。淀粉酶的钙络合物似乎不受EDTA螯合剂的影响, $\alpha$ -淀粉酶的抗微生物组合物将是对微生物菌膜感染的坏死组织有效的非蛋白水解治疗剂。 $\alpha$ -淀粉酶#1和 $\alpha$ -淀粉酶#6对抗微生物组合物中未煮沸的、新鲜切除的大鼠皮肤的低清创功效(表9)也支持了淀粉分解的清创组合物对失活组织的高度特异性,而不是向周围的活体组织。

[0215] 表9.  $\alpha$ -淀粉酶、菠萝蛋白酶和胶原酶在抗微生物组合物中对未煮沸的大鼠皮肤的清创

[0216]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
AC/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	6.00%
AC/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/250U	0%
AC/菠萝蛋白酶	90/10	1g/250U	18.20%

AC/胶原酶	99.8/0.2	1g/250U	4.70%
--------	----------	---------	-------

[0217] 表10.  $\alpha$ -淀粉酶、菠萝蛋白酶和胶原酶在抗微生物组合物中对煮沸的大鼠皮肤的清创

[0218]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)	%消化
AC/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U	96.50%
AC/ $\alpha$ -淀粉酶#6	99.66/0.34	1g/250U	100%
AC/菠萝蛋白酶	90/10	1g/250U	100%
AC/胶原酶	99.8/0.2	1g/250U	0%

[0219] 赋形剂

[0220] 除了水和缓冲溶液(表2)以及以粉末形式使用之外,淀粉酶可以与几种赋形剂混合,包括凡士林和矿物油的疏水性碳氢化合物,包含甘油和PEG400醇类的亲水性-OH,和两亲性液体PEG-12聚二甲基硅氧烷,硅氧烷聚醚。在各种情况下, $\alpha$ -淀粉酶#1可以分散在赋形剂中(表11)。其他赋形剂可包括各种水性缓冲剂,其pH值范围为5.0-7.5,表面活性剂,硅氧烷,聚醚共聚物,聚氧乙烯醚,蔬菜和植物油脂和脂肪油,精油,亲水性和疏水性醇,维生素,单酸甘油酯,月桂酸酯,肉豆蔻酸酯,棕榈酸酯和硬脂酸酯,优选液体、凝胶或糊剂形式,及其组合等。在一些实施例中,基于清创组合物的重量,赋形剂可以0至99.9wt%的量存在。

[0221] 表11.  $\alpha$ -淀粉酶#1的赋形剂

[0222]

制剂	制剂比例 (wt%)	制剂 (Units)
凡士林/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U
精油/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U
甘油/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U
PEG 400/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U
DC 193/ $\alpha$ -淀粉酶#1	99.2/0.8	1g/250U

[0223] 有效的 $\alpha$ -淀粉酶的浓度

[0224] 为了确定坏死组织清创所需的 $\alpha$ -淀粉酶的量,进行了与 $\alpha$ -淀粉酶浓度相关的清创功效(例如,wt%消化)的研究。图3中的结果显示了 $\alpha$ -淀粉酶#6的浓度与在室温下1小时内消化的煮沸猪皮的重量百分比。钟形曲线显示,清创活性发生于范围为13.6-27.2wt%的最大淀粉酶浓度,虽然疗效是在10wt%或在大于3.4wt%到54.5wt%的整个范围。

[0225] 具体实施例

[0226] 第一具体实施例涉及一种清创组合物,其包括基于清创组合物的总重量的0.001至60wt%的非蛋白水解酶清创组分,其中所述非蛋白水解酶清创组分包含基于所述非蛋白水解酶清除组分的重量的至少80wt%的淀粉酶。

[0227] 第二具体实施例涉及一种具体实施例1所述的清创组合物,其包含选自人、动物、细菌、植物、真菌和通过基因重组的淀粉酶。

[0228] 第三具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例的清创组合物,其中所述淀粉酶包含至少80wt%的 $\alpha$ -淀粉酶。

[0229] 第四具体实施例涉及一种第三具体实施例所述的清创组合物,其中所述淀粉酶包

含多达20wt%的选自 $\beta$ -淀粉酶、 $\gamma$ -淀粉酶及其组合的淀粉酶。

[0230] 第五具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其包含药学上可接受的载体或赋形剂。

[0231] 第六具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其中所述非蛋白水解酶清创组分包含多达20wt%的其他水解酶,所述其他水解酶选自蛋白酶,软骨素酶,透明质酸酶,脂肪酶,糖苷酶,乙酰肝素酶,皮肤素酶,支链淀粉酶,N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶,乳糖酶,磷脂酶,转糖苷酶,酯酶,硫酸酯水解酶,硫酸酯酶,焦痂酶,核酸酶,磷酸酶,磷酸二酯酶,甘露聚糖酶,甘露糖苷酶,异淀粉酶,裂解酶,菊粉酶,角蛋白酶,鞣酸酶,戊聚糖酶,葡聚糖酶,阿拉伯糖苷酶,果胶酶,纤维素酶,几丁质酶,木聚糖酶,角质酶,果胶裂解酶,半纤维素酶及其组合。

[0232] 第七具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其包含选自人胰腺,动物胰腺和细菌的 $\alpha$ -淀粉酶。

[0233] 第八具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其中所述非蛋白水解酶清创组分包含多达20wt%的酶,所述酶选自氧化酶,过氧化物酶,葡萄糖氧化酶,过氧化氢酶,氧化还原酶,酚氧化酶,漆酶,脂肪氧合酶,异构酶和木质素酶。

[0234] 第九具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含至少一种聚合双胍,以所述清创组合物的重量计,所述聚合双胍的量为至少0.01wt% (100ppm) 至1.0wt% (10,000ppm)。

[0235] 第十具体实施例涉及一种第九具体实施例所述的清创组合物,其中所述聚合双胍包括聚(六亚甲基双胍)及其盐。

[0236] 第十一具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含水溶性聚合物,以所述清创组合物重量计,所述水溶性聚合物的浓度为0.01wt%至50wt%;其中,所述水溶性聚合物选自由以下组成的组:甲基纤维素,羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羧甲基纤维素,瓜尔豆胶,羟乙基瓜尔胶,羟丙基瓜尔胶,羟丙基甲基瓜尔胶,羧甲基瓜尔胶,羧甲基壳聚糖,刺槐豆胶,角叉菜胶,黄原胶,结冷胶,芦荟凝胶,硬葡聚糖,裂褶菌多糖,阿拉伯胶,罗望子胶,聚(乙二醇),聚(环氧乙烷),聚(乙二醇),聚(甲基乙烯基醚),卡波姆及其盐,聚(丙烯酸)及其盐,聚(甲基丙烯酸)及其盐,聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸)钠,聚丙烯酰胺,聚(N,N-二甲基丙烯酰胺),聚(N-乙基乙酰胺),聚(N-乙基甲酰胺),聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯),聚(甘油基甲基丙烯酸酯),聚(N-乙基吡咯烷酮),聚(N-异丙基丙烯酰胺)和聚(N-乙基己内酰胺)及其组合。

[0237] 第十二具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含螯合剂,以所述清创组合物重量计,所述螯合剂的浓度0.01wt%至1wt%;其中,所述螯合剂选自由以下组成的组:乙二胺四乙酸(EDTA),次氨基三乙酸,次氨基三丙酸,二乙三胺五乙酸,N-(2-羟乙基)乙二胺三乙酸,1,6-二氨基六亚甲基四乙酸,1,2-环己二胺四乙酸,0,0'-双(2-氨基乙基)乙二醇四乙酸,1,3-丙二胺四乙酸,N,N'-双(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二乙酸,乙二胺-N,N'-二丙酸,三乙四胺六乙酸,乙二胺-N,N'-双(亚甲基膦酸),亚氨基二乙酸,N-月桂基- $\beta$ -亚氨基二丙酸钠,月桂亚氨基二丙酸钠,N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸,1,3-二氨基-2-羟基丙四乙酸,1,2-丙二胺四乙酸,乙二胺四(亚甲基膦酸),N-(2-羟乙基)亚胺二乙酸,二膦酸盐,依替膦酸盐,及其盐。

[0238] 第十三具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含单烷基二醇,所述单烷基二醇选自由以下组成的组:1,2-丙二醇(丙二醇),1,2-丁二醇,1,2-戊二醇,1,2-己二醇,1,2-庚二醇,1,2-辛二醇(辛二醇),1,2-壬二醇,1,2-癸二醇,1,2-十一烷二醇,1,2-十二烷二醇,1,2-十三烷二醇,1,2-十四烷二醇,1,2-十五烷二醇,1,2-十六烷二醇,1,2-十七烷二醇,1,2-十八烷二醇,2-甲基-2,4-戊二醇,1,3-丁二醇,二甘醇,三甘醇,二缩三乙二醇及其组合。

[0239] 第十四具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含甘油烷基醚,所述甘油烷基醚选自由以下组成的组:1-0-庚基甘油,1-0-辛基甘油,1-0-壬基甘油,1-0-癸基甘油,1-0-十一烷基甘油,1-0-十二烷基甘油,1-0-十三烷基甘油,1-0-十四烷基甘油,1-0-十五烷基甘油,1-0-十六烷基甘油(鲛肝醇),1-0-十七烷基甘油,1-0-十八烷基甘油(鲨肝醇),1-0-十八碳-9-烯丙基甘油(沙油醇),1-(2-乙基己基)甘油醚,2-乙基己基甘油醚,1-庚基甘油醚,1-辛基甘油醚,1-癸基甘油醚,1-十二烷基甘油醚,1-十三烷基甘油醚,1-十四烷基甘油醚,1-十五烷基甘油醚,1-十六烷基甘油醚,1-十八烷基甘油醚及其组合。

[0240] 第十五具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含:至少一种聚合双胍,其含量为至少0.01wt%;螯合剂,其浓度为0.01wt%至1wt%;以及选自单烷基二醇和单烷基甘油的邻二醇组分,所述邻二醇组分的浓度为0.05wt%至4wt%,以清创组合物的重量计,。

[0241] 第十六具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含至少一种止痛剂,麻醉剂,神经性疼痛剂或其组合。

[0242] 第十七具体实施例涉及一种第十六具体实施例所述的清创组合物,其中所述至少一种止痛剂,麻醉剂或神经性疼痛剂选自由以下组成的组:利多卡因,辣椒素,苯佐卡因,丁卡因,丙胺卡因,布比卡因,左布比卡因,普鲁卡因,卡波卡因,依替卡因,甲哌卡因,去甲替林,阿米替林,普瑞巴林,双氯芬酸,芬太尼,加巴喷丁,非甾体抗炎剂,水杨酸盐及其组合。

[0243] 第十八具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其中所述清创组合物具有一种形式,所述形式选自由以下组成的组:粉末,水溶液,有机液体溶液,硅胶,凝胶,乳膏,膜,乳胶,气溶胶,浆液,糊剂,软膏和泡沫。

[0244] 第十九具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其中所述清创组合物吸附在敷料,或天然或合成的纤维、网状物、水胶体、藻酸盐、水凝胶、半透膜、渗透膜,或天然或合成的聚合物上或吸附于其中。

[0245] 第二十具体实施例涉及一种任一前述的具体实施例所述的清创组合物,其进一步包含缓冲剂。

[0246] 第二十一具体实施例涉及一种试剂盒,其包含:任一前述具体实施例所述的清创组合物;以及使用清创组合物清创失活组织的说明书。

[0247] 第二十二具体实施例涉及一种第二十一具体实施例所述的试剂盒,其中所述说明书包括使清创组合物与需要清创的皮肤区域接触的说明。

[0248] 第二十三具体实施例涉及一种清创失活组织的方法,其包括:将根据前述第一~第二十具体实施例中任一所述的清创组合物所述的清创组合物与需要清创的皮肤区域接触。

[0249] 第二十四具体实施例涉及一种第二十三具体实施例所述的方法,所述接触步骤每天至少重复一次。

[0250] 第二十五具体实施例涉及一种第二十三具体实施例所述的方法,其进一步包括从所述皮肤区域移除清创组织。

[0251] 虽然上述说明书包含许多细节,但是这些不应被解释为对本发明的保护范围的限制,而是作为其优选实施例的示例。许多其他的变化是可能的。因此,本发明的保护范围不应由所示实施例而是由所附权利要求及其合法等效物来确定。

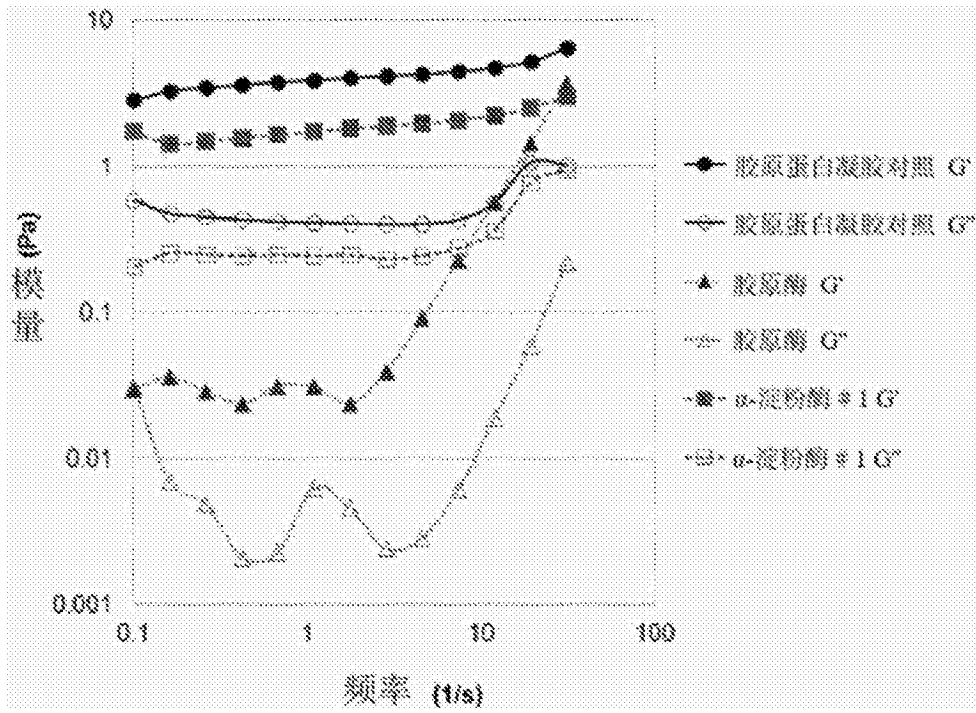


图1

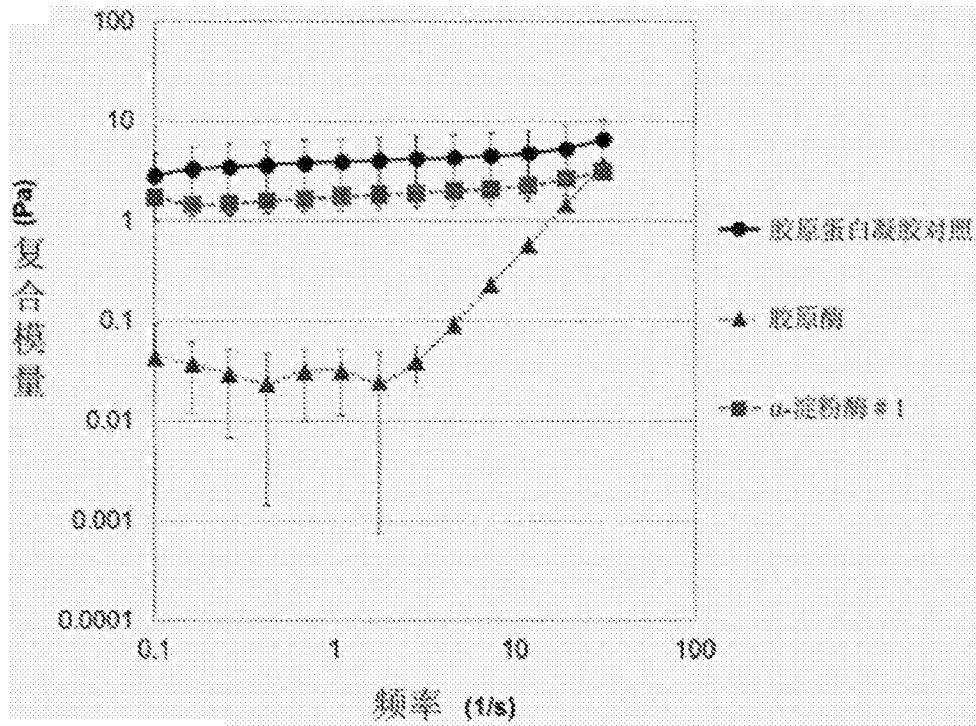


图2



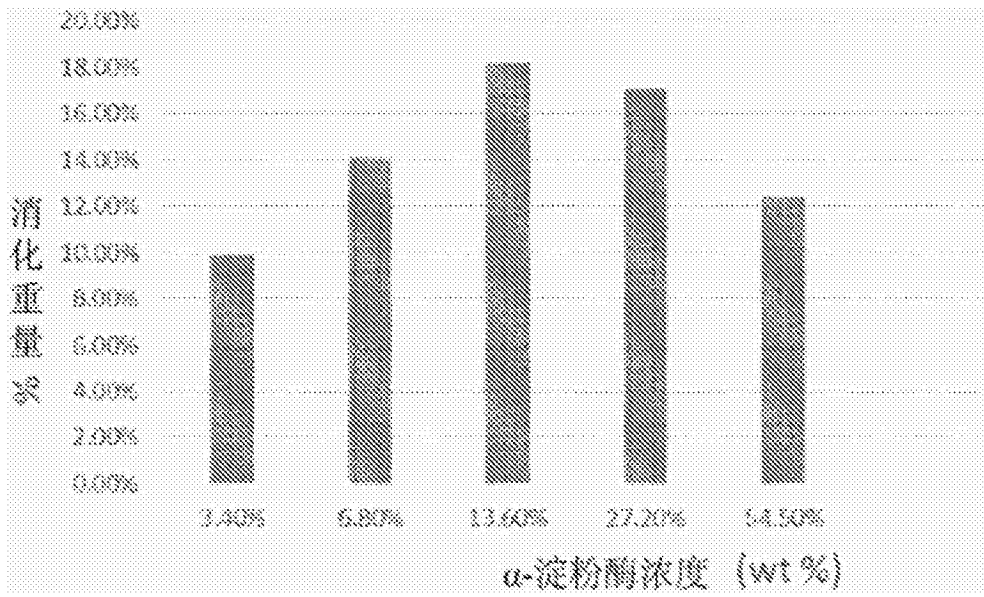


图3