

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480026084.0

[51] Int. Cl.

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 10 月 18 日

[11] 公开号 CN 1849114A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

[22] 申请日 2004.8.13

[21] 申请号 200480026084.0

[30] 优先权

[32] 2003.9.10 [33] US [31] 10/660,101

[86] 国际申请 PCT/US2004/026218 2004.8.13

[87] 国际公布 WO2005/025548 英 2005.3.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.10

[71] 申请人 陶氏康宁公司

地址 美国密执安

共同申请人 金克克国际有限公司

[72] 发明人 R・R・博特 M・S・格伯特

P・C・克雷凯恩 I・马佐

X・J-P・托马斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 刘明海

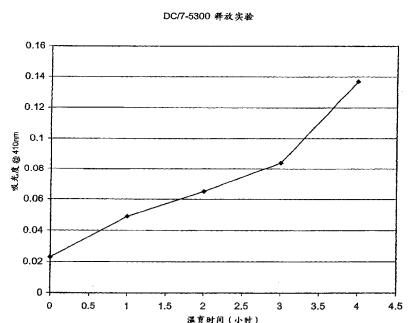
权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 13 页

[54] 发明名称

含有亲水性载体和硅氧烷基质的局部用制剂

[57] 摘要

本发明提供局部用制剂，用于释放能够去除坏死组织的活性剂，本发明还提供该局部用制剂的制造方法和使用方法。制剂可以具有分散在外相中的内相。内相可以是亲水性载体和活性剂。外相可以是硅氧烷基质。



1、一种局部用制剂，包括内相和外相；其中，所述内相分散在所述外相中；所述内相包含有至少一种亲水性载体和至少一种活性剂，所述活性剂可从所述外相释放，以去除坏死组织；所述外相包含硅氧烷基质；并且其中所述局部用制剂对流体是吸留性的，以当施用于皮肤上时促进产生潮湿的环境。

2、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种活性剂是亲水性的。

3、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述内相包含分散在所述外相中的液滴，并且其中所述液滴的直径为约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $2000 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $1000 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $500 \mu\text{m}$ 。

4、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述液滴的直径为约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $200 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $100 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $50 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 或约 $0.1 \mu\text{m}$ 至约 $5 \mu\text{m}$ 。

5、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性载体选自丙二醇、聚乙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物、甘油、醇、多元醇和水、及其组合。

6、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性载体包括聚丙二醇。

7、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性载体占所述局部用制剂的最多约 50wt%。

8、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种活性剂包括选自以下的至少一种酶：水解酶，角质酶，氧化酶，转移酶，还原酶，半纤维素酶，酯酶，异构酶，果胶酶，乳糖酶，过氧化酶，漆酶，触酶，多肽，抗体，肽，激素，细胞因子和生长因子，及其组合。

9、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述至少一种活性剂包括至少一种水解酶。

10、权利要求 9 的局部用制剂，其中所述水解酶选自脂肪酶和蛋白

酶。

11、权利要求 10 的局部用制剂，其中所述蛋白酶选自枯草溶菌素蛋白酶、蛋白酶 A、蛋白酶 B 或 LG12。

12、权利要求 9 的局部用制剂，其中所述水解酶包括脂肪酶，并且其中所述脂肪酶占所述硅氧烷基质的约 0.0001wt%至约 0.2wt%。

13、权利要求 9 的局部用制剂，其中所述水解酶包括蛋白酶，并且其中所述蛋白酶的浓度为所述局部用制剂的约 0.1mg/g 至约 5.0 mg/g.

14、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述内相还含有至少一种亲水性组分。

15、权利要求 14 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性组分选自聚乙二醇和聚乙烯基吡咯烷酮及其组合。

16、权利要求 15 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性组分占所述内相的最多约 50wt%，或所述内相的最多约 35wt%。

17、权利要求 14 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性组分占所述局部用制剂的约 5wt%至约 40wt%，或约 10wt%至约 35wt%，或约 15wt%至约 35wt%。

18、权利要求 14 的局部用制剂，其中所述至少一种亲水性组分包括水-增稠剂。

19、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述硅氧烷基质选自高分子量聚二甲基硅氧、松散或轻度交联的硅氧烷弹性体、无填料的弹性体、多孔弹性体、硅氧烷橡胶、硅氧烷压敏粘合剂及其组合。

20、权利要求 1 的局部用制剂，其中所述外相还含有硅氧烷基表面活性剂。

21、权利要求 1 的局部用制剂，其中选择所述内相和所述外相，以使所述局部用制剂包括局部用敷料，并且其中所述局部用敷料包括贴剂。

22、权利要求 21 的局部用制剂，其中所述贴剂最多约 25 μm 厚。

23、权利要求 21 的局部用制剂，其中所述外相包含松散或轻度交联的硅氧烷弹性体。

24、权利要求 23 的局部用制剂，其中所述内相包含丙二醇和蛋白酶。

25、权利要求 24 的局部用制剂，其中所述内相还包含选自聚乙烯醇和聚乙烯基丙烯的亲水性组分。

26、权利要求 1 的局部用制剂，其中选择所述内相和所述外相，以使所述局部用制剂包括局部用敷料，并且其中所述局部用敷料包括铺展膜。

27、权利要求 26 的局部用制剂，其中所述外相包含硅氧烷橡胶。

28、权利要求 1 的局部用制剂，其中选择所述内相和所述外相，以使所述局部用制剂包括软膏。

29、权利要求 28 的局部用制剂，其中所述外相包含至少一种硅氧烷弹性体和至少一种硅氧烷表面活性剂。

30、权利要求 29 的局部用制剂，其中所述内相包含活性剂和丙二醇。

31、权利要求 30 的局部用制剂，其中所述内相还包含聚乙烯醇。

32、一种局部地提供活性剂的方法，包括：

提供流体吸留性的局部用制剂，其中所述局部用制剂包括内相和外相；其中：所述内相分散在所述外相中；所述内相包含至少一种亲水性载体和至少一种活性剂，所述活性剂可从所述外相中释放，以去除坏死组织；和所述外相包含硅氧烷基质；

使所述局部用制剂与患者的皮肤接触，以使所述活性剂从所述硅氧烷基质中局部释放到所述患者的所述皮肤上。

33、权利要求 32 的方法，其中所述内相还包含亲水性组分，并且其中选择所述亲水性组分，以使所述活性剂以合意的速率从所述硅氧烷基质中释放。

34、权利要求 32 的方法，其中所述局部用制剂包括具有一定厚度的贴剂，并且其中选择所述贴剂的所述厚度，以使所述活性剂以合意的速率从所述硅氧烷基质中释放。

35、权利要求 32 的方法，其中：所述对流体的吸留性促进产生潮

湿环境，以允许被所述局部用制剂覆盖的坏死组织溶胀，致使所述坏死组织变得溶胀；并且从所述硅氧烷基质中释放的所述活性剂选择性地除去所述溶胀的坏死组织。

36、权利要求 35 的方法，还包括：

提供包括内相和外相的第二局部用制剂，其中：所述内相分散在所述外相中；所述内相包含至少一种亲水性载体和至少一种第二活性剂，选择所述第二活性剂，致使所述第二活性剂抑制所选择的用于除去坏死组织的活性剂；所述外相包含硅氧烷基质；并且所述硅氧烷基质包含硅氧烷粘合剂；

将所述第二局部用制剂置于所述患者的所述皮肤上伤口周围的所述皮肤上；并且

通过使局部用制剂与所述第二局部用制剂接触，而将所述局部用制剂粘附在所述伤口上面，其中所述患者的所述伤口周围的所述皮肤得到保护，免受所选择的用于除去坏死组织的活性剂的影响。

含有亲水性载体和硅氧烷基质的局部用制剂

本发明总的来说涉及用于局部皮肤处理的制剂，更具体说，本发明涉及含有硅氧烷基质和亲水性载体的制剂，该制剂提供活性剂的缓释。

硅氧烷是以烷基硅氧烷或有机硅氧烷化学结构为基础的化合物，并且包括已在药物应用中用作赋形剂和加工助剂的聚二甲基硅氧烷物质。这些物质的一些已取得药典化合物的资格。本领域已知在受控药物传递系统、特别是在其中特定性能的关联对满足产品设计需求(即，生物相容性和多用性)来说是关键的应用中使用这种硅氧烷化合物。新的长效药物传递应用，包括植入、插入、粘液粘连、经皮和局部形式，体现出硅氧烷的独特和固有特性。这些传递系统允许用生物学适宜的动力学将活性分子控制释放至定向区域，并且防止不利效果，例如传统口服和肠胃外药疗法中常见的峰剂量、低顺应性和药物降解。

经皮药物传递系统由含药物的粘合性贴剂组成，将其粘附在完整无伤的皮肤上最多7天。贴剂设计控制活性剂的释放，然后通过循环系统被携带至生物体成为全身活性。使用皮肤作为进入点，由粘合性硬膏剂或成膜和实体(*substantive*)物料(例如乳膏或凝胶)组成的局部形式被用来局部治疗(肌肉或皮肤疾病)。然而，这些经皮药物传递系统从没有被掺入局部敷料应用中，如伤口敷料和软膏，其中将分散在硅氧烷基质中的生物化学试剂释放至皮肤或伤口上，以加速愈合。

因此，相关领域中仍然需要能够有利利用硅氧烷的有益特性、并且可以提供活性剂缓释的制剂。

本发明提供局部用制剂来满足这种需要，其中所述局部用制剂含有硅氧烷基质、亲水性载体和至少一种欲从该制剂中释放的活性剂。活性剂可以是蛋白质，特别是酶，如水解酶和葡萄糖氧化酶。硅氧烷基质可包括高Mw的聚二甲基硅氧烷，松散或轻度交联的硅氧烷弹性

体，交联的硅氧烷弹性体，如凝胶(无填料弹性体)，二氧化硅补强的橡胶或泡沫体，其中交联通过使用加成和缩合固化系统来实现，硅氧烷压敏型粘合剂和硅氧烷-有机共聚物，如硅氧烷聚酰胺。制剂可以用来形成敷料、软膏等等。

根据本发明的一个方面，本发明的制剂可以包括薄膜敷料，其可以施用在皮肤上，包括受损组织，根据本发明的另一个方面，本发明的制剂包括贴剂敷料。根据本发明的再一个方面，本发明的制剂包括铺展型绷带敷料。根据本发明的另一个方面，本发明的制剂包括软膏。薄膜、贴剂、铺展型绷带和软膏全部可以施用于皮肤，施用于手术切口、伤口或其它皮肤损伤、擦伤、刮伤、抓伤或其它受损组织上。本发明的制剂对液体是吸留性的，并且在阻止微生物引起皮肤表面感染方面是有效的。在一个实施方案中，诸如蛋白酶的活性剂，可以从制剂中释放在伤口的位置，以便进行酶性清创、凝固形成和凝块去除，以及就地产生过氧化物和/或过酸，以便加速在不同阶段的伤口愈合。

在一个优选的实施方案中，局部用制剂含有含活性剂的亲水性载体的混合物，其遍布分散在硅氧烷基质中。该混合物与硅氧烷基质一起形成本发明的这个实施方案的局部用制剂。亲水性载体例如是丙二醇的溶液，可以将其与水溶性或亲水性组分例如聚乙烯醇("PVA")或聚乙烯基吡咯烷酮("PVP")混合。亲水性载体和活性剂混合物可以形成呈乳液或分散液形式的内相，并且此内相被散布在硅氧烷基质(外相)内。所以，可以添加硅氧烷基表面活性剂，以便将内相分散或乳化成非常小的液滴并且增强活性剂的释放。

因此，本发明的特征是提供局部用制剂，其可有效地向皮肤提供活性剂的控制释放。本发明的这个和其它特征和优点将通过以下对本发明的详细描述而变得显而易见。

当结合下列附图进行阅读时，以下对本发明优选实施方案的详细描述将会得到最好地理解，其中：

图 1 是根据本发明的一个实施方案蛋白酶从制剂中缓释的示意图。

图 2A 和 2B 是根据本发明的一个实施方案蛋白酶和脂肪酶从制剂中释放/传递的示意图。

图 3A-3C 是蛋白酶从具有不同量亲水性组分的制剂中释放的示意图。

图 4 是蛋白酶从具有不同硅氧烷基质的制剂中的释放速率的示意图。

图 5 是蛋白酶从具有不同贴剂厚度的制剂中的释放速率的示意图。

图 6 是根据本发明的一个实施方案蛋白酶从软膏制剂中的释放的示意图。

图 7 是根据本发明的一个实施方案蛋白酶在制剂中的稳定性的示意图。

图 8 是根据本发明的另一个实施方案蛋白酶在制剂中的稳定性的示意图。

图 9 是根据本发明的又一个实施方案蛋白酶在制剂中的稳定性的示意图。

图 10 是根据本发明的一个实施方案蛋白酶在制剂中的稳定性的示意图。

根据本发明的一个方面，本发明提供一种掺有硅氧烷基质的局部用制剂。该制剂可有效地提供活性剂从硅氧烷基质中的控释和缓释。将活性剂与亲水性载体共混，形成分散在硅氧烷基质内的混合物。活性剂在硅氧烷基质内保持稳定并且可受控制地和自由地从基质中释放。

为定义和描述本发明的实施方案，以下术语应当按照本文下面给出的定义来理解。

活性剂应当理解为是指蛋白质，特别是酶。

表面活性剂应当理解为是指表面-活性试剂，将其添加至悬浮介质中，以促进多种不溶混性液体或液体与极细固体颗粒(经常是胶体大小的)的均匀和最大程度的分离。表面活性剂可促进不溶混性液体、液滴

或细固体颗粒在液体分散介质中的润湿、有效分布及稳定化以防止颗粒聚集。表面活性剂通常以足以给颗粒表面提供完全表面覆盖的量添加至分散介质中。

敷料应当理解为是指各种类型的适于直接施用于皮肤、受伤组织或患病组织的任何覆盖物，以便用于吸收分泌物、保护组织不受创伤、组织给药、保护组织不受环境影响，从而达到止血、保持或提供湿润环境及其的组合。例如敷料可以是以膜、贴剂、绷带、凝胶等的形式。

乳液应当理解为是指一种液相在第二种液相内的暂时或持久的分散液。通常，液体之一是水或水溶液，并且另一种是油或其它水-不溶混性液体。第二种液体通常被称作连续相或外相。乳液可以进一步分类成简单乳液，其中分散的液相或内相是简单的均相液体，或者分类成较复杂乳液，其中分散的液相是液相或固相的多相组合，如双相乳液或多相乳液。

亲水性载体应当理解为是指本发明制剂的相中的至少一种组分，其起活性剂溶剂的作用。亲水性载体有助于活性剂从本发明实施方案中所用的硅氧烷基质中释放。

亲水性组分应当理解为是指添加至本发明实施方案中亲水性载体和活性剂的混合物中的至少一种组分。亲水性组分可以有助于活性剂从本发明实施方案中所用的硅氧烷基质中释放。

蛋白质应当理解为是指天然、合成和工程酶，如氧化还原酶、转移酶、异构酶、连接酶、水解酶；抗体；多肽；肽；激素；细胞因子；生长因子和其它生物学调制剂。

软膏应当理解为是指用于外涂，如外涂于皮肤、受伤组织和患病组织的任何适宜的半固体制剂。

根据本发明，制剂可以在各种各样的可以施用于皮肤、受伤组织和患病组织的局域用敷料中使用。局部用敷料允许活性剂释放并且施用于下层皮肤、受伤组织和患病组织。此外，制剂可以用于形成软膏，并且软膏允许活性剂释放并且施用于下层皮肤、受伤或患病组织。

根据优选的实施方案，提供的制剂含有存在于外相或连续相内的

内相或不溶混性分散相。外相通常含有硅氧烷基质，并且内相通常含有含至少一种活性剂的亲水性载体。此外，内相还可以含有任何适宜的亲水性组分。内相和外相可以用任何适宜于形成本发明制剂的方式来混合。例如可以使用高剪切混合器来将内相和外相混合，形成本发明的制剂。此外，可以手动混合内相和外相。内相的液滴大小可以改变。例如液滴大小可以是约 0.1μm 至约 2000μm, 约 0.1μm 至约 1000μm, 约 0.1μm 至约 500μm, 约 0.1μm 至约 200μm, 或者约 0.1μm 至约 100μm。

内相可以含有任何适宜的亲水性载体，所述亲水性载体中含至少一种活性剂。在本发明的一个实施方案中，亲水性载体是高温下的液体，和也可以使用溶于适宜溶剂中的固体物料(例如山梨糖醇、甘露糖醇、乳糖、氯化钠和柠檬酸)。例如活性剂可以包含在丙二醇(PPG)、聚乙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物(poloxamer)、甘油、醇、多元醇、水或其它适宜亲水性载体的溶液中。

内相还可以含有水溶性和亲水性组分。亲水性组分通常不起活性剂溶剂的作用。亲水性组分可以增强活性剂从硅氧烷基质中释放的速度并且可以包括聚乙烯醇(PVA 或 PVOH)(例如 Mowiol®3-83, 可获得自 Cariant Corporation, Charlotte, N.C.)或聚乙烯基吡咯烷酮(PVP), 例如 Luviskol®K-30, 可获得自 BASF Corporation, Mount Olive, N.J. 内相溶液可以包括最多约 35 wt.% 的 PVA 水溶液或最多约 50 wt.% 的 PVP 水溶液。在本发明的一个实施方案中，亲水性组分也可以是用水稀释的水-增稠剂，如纤维素衍生物(如，羧甲基纤维素，甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，羟丙基纤维素，羟丙基甲基纤维素)，聚丙烯酸，藻酸盐衍生物，脱乙酰壳多糖衍生物，明胶，果胶，聚乙二醇，丙二醇，甘油和其它适宜的亲水性分子和大分子，其中活性剂可以是或可以不是可溶性的。这种分子包括亲水性大分子。

不指望被任何特定理论束缚，据认为亲水性组分可以在硅氧烷基质中产生孔、裂缝、裂纹或缝隙，从而有助于活性剂的释放。在形成内相时向亲水性载体添加增加量的 PVA 或 PVP 可以增加被释放的活性

剂的百分比。除此之外，增加内相中的亲水性载体的量可以增加被释放的活性剂的百分比。

此外，可以使用赋形剂来稳定活性剂或增加其相容性，以及有助于它们从硅氧烷基质中释放。用于本发明的硅氧烷赋形剂可以包括硅氧烷聚醚、硅氧烷流体、二甲聚硅氧烷、二甲聚硅氧烷共聚醇、二甲聚硅氧烷醇、硅氧烷烷基蜡、硅氧烷聚酰胺等等。其它可能的赋形剂包括但不限于亲水性有机物，如(多)糖衍生物、丙烯酸酯衍生物、PVA衍生物、二醇、三醇、甘油酯衍生物、丙二醇(PPG)、聚乙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物、甘油、醇、纤维素衍生物、聚丙烯酸、藻酸盐衍生物、脱乙酰壳多糖衍生物、明胶、果胶和多元醇。

本发明的硅氧烷基质可以包括高分子量的聚二甲基硅氧烷(12,500 cSt 至树胶型材料)，如 EP 966972A1、WO 01/19190 A1 和 WO 200122923 中所描述的那些。

硅氧烷基质可以包括松散或轻度交联的硅氧烷弹性体，例如 Dow Corning®9040 硅氧烷弹性体共混物(可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)。松散或轻度交联的硅氧烷弹性体在以下US专利中有所描述，其描述了布置在挥发性硅氧烷溶剂(D5)中的松散交联的聚二甲基硅氧烷：US专利 6,200,581, 6,238,657, 6,177,071, 6,168,782 和 6,207,717。随着挥发性硅氧烷溶剂蒸发，轻度或松散交联的硅氧烷弹性体从糊状稠度增稠至弹性体硅氧烷凝胶。

硅氧烷基质也可以包括无填料的弹性体，如 US 专利 5,145,937 和 4,991,574 及 EP 0955347 中描述的那些。这些专利讲述了使用硅氧烷凝胶，例如 Dow Corning®7-9800 SSA KIT(可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)。

或者，硅氧烷基质可以包括多孔弹性体(无填料的或二氧化硅补强的)，如 EP 0425164、EP 0506241 和 US 5,010,115 中描述的那些。这些专利教导使用硅氧烷泡沫体，例如 Dow Corning®7-0192 FOAM PART A 和 PART B(可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)。此外，硅氧烷基质可以包括硅氧烷橡胶，如加成固化橡胶(类似

于凝胶，但用二氧化硅补强)或缩合固化橡胶，例如 Dow Corning® 7-5300 FILM-IN-PLACE COATING 或 Dow Corning® 7-FC4210 FILM FORMING BASE AND CURE AGENT (可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)。

最后，硅氧烷基质可以包括硅氧烷压敏粘合剂(硅氧烷 PSA)，如为硅氧烷聚合物形式的硅酸酯树脂，其可以是溶剂基的或热熔体，如 US 专利 2,736,721、2,814,601、2,857,356、3,528,940 和 6,337,086 中描述的那些。这些专利教导使用硅氧烷 PSAs，例如 Dow Corning® PSA 7-4402 (可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)。

本发明的硅氧烷基质还可以含有硅氧烷基表面活性剂，例如 Dow Corning® 9011 硅氧烷弹性体共混物(可获得自 Dow Corning Corporation, Midland, MI)，其有助于亲水性载体和活性剂分散或乳化成小的液滴并且防止这些较小的液滴聚结成较大的液滴。例如当使用硅氧烷基表面活性剂时，内相的液滴可以是约 0.1-500 μm 。在形成本发明的局部用敷料中，也可使用硅氧烷基表面活性剂以产生稳定的乳液。除此之外，本发明的外相可以含有稀释剂，用于传递硅氧烷基质，如挥发性硅氧烷(即，D5 (Dow Corning® 245 流体)、MDM (Dow Corning® 200 流体 1 cSt))或有机溶剂(即，庚烷或乙酸乙酯)。

本发明的活性剂通常是蛋白质，如酶，将其掺入亲水性载体中。活性剂可以是亲水性的。适宜于掺入敷料中的酶可以是任何酶或酶混合物。酶包括但不限于可商购获得类型、改性类型、重组体类型、野生类型、自然界中不存在的变体及其混合物。例如适宜的酶包括水解酶、角质酶、氧化酶、转移酶、还原酶、半纤维素酶、酯酶、异构酶、果胶酶、乳糖酶、过氧化酶、漆酶、触酶及其混合物。水解酶包括但不限于蛋白酶(细菌性、真菌性、酸性、中性或碱性)，淀粉酶(α 或 β)，脂肪酶，甘露聚糖酶，纤维素酶，胶原酶及其混合物。

被认为可以适宜于包含在本发明制剂中的脂肪酶包括假单胞菌属 (Pseudomonas)微生物生产的那些酶，其中所述微生物如施氏假单胞菌

(*Pseudomonas stutzeri*) ATCC 19.154, 如英国专利 1,372,034 中所公开的; 门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*), 如 US 专利 5,389,536 中所描述的, 及类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*), 如 US 专利 5,153,135 中所公开的。脂肪酶还包括对脂肪酶的抗体显示阳性免疫交叉反应的那些酶, 由微生物荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) IAM 1057 生产。这种脂肪酶可按商标名称 Lipase P "Amano" 获得自 Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Nagoya, 日本。脂肪酶包括 M1 Lipase® 和 Lipomax® (Gist-Brocades NV, Delft, 荷兰) 和 Lipase® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, 丹麦)。正常情况下, 脂肪酶在硅氧烷基质中的掺加量为硅氧烷基质重量的约 0.0001 % 至约 2% 活性酶, 或者约 0.001 mg/g 至约 20mg/g。

蛋白酶是羧基水解酶, 其通常裂解蛋白质或肽的肽键。本文中"蛋白酶"意指天然存在的蛋白酶或重组蛋白酶。天然存在的蛋白酶包括 α -氨基酰基肽水解酶, 肽基氨基酸水解酶, 酰基氨基水解酶, 丝氨酸羧基肽酶, 金属羧基肽酶, 疏基蛋白酶, 羧基蛋白酶和金属蛋白酶。丝氨酸、金属、巯基和酸性蛋白酶以及内切和外切-蛋白酶包括在内。

蛋白酶可以是动物、植物或微生物来源的。例如蛋白酶可以是细菌来源的丝氨酸蛋白水解酶。可以使用纯化或非纯化形式的酶。定义中包括通过化学或基因改性突变体产生的蛋白酶, 也包括近亲结构酶变体。特别优选的蛋白酶是细菌丝氨酸蛋白水解酶, 特别是枯草杆菌蛋白酶 (subtilases), 其由芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 和 / 或地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 获得。被认为可以包含在本发明组合物中的适宜的市售蛋白水解酶包括 Alcalase®、Esperase®、Durazym®、Everlase®、Kannase®、Relase®、Savinase®、Maxatase®、Maxacal® 和 Maxapem®15 (蛋白质工程 Maxacal); Purafect®、Properase® (蛋白质工程 Purafect) 及枯草溶菌素 BPN 和 BPN'。

蛋白酶还包括具有自然界所不存在的氨基酸序列的蛋白酶变体,

其可从前体蛋白酶中通过替代自然界中不存在的不同氨基酸序列来获得，即从前体蛋白酶中通过用不同氨基酸替代所述蛋白酶中相当于以下位置的氨基酸残基来获得，其中按照解淀粉芽孢杆菌枯草溶菌素 (*Bacillus amyloliquefaciens subtilisin*) 的编码，所述位置相当于选自 +76, +87, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 和/或 +274 的那些，如 US 专利 RE 34,606; 5,700,676; 5,972,682 和/或 6,482,628 中所描述的。

示例性的蛋白酶变体包括得自于迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentinus*) 的枯草溶菌素变体，如 US 专利 RE 34,606 中所描述的，以下称作蛋白酶 A。另一种适宜的蛋白酶是得自于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的 Y217L 变体，如 US 专利 5,700,676 中所描述的，以下称作蛋白酶 B。适宜的还有本文所称的蛋白酶 C，其是 US 专利 6,482,628 中描述的改性细菌丝氨酸蛋白水解酶；及蛋白酶 D，其是 US 专利 5,972,682 中描述的改性细菌丝氨酸蛋白水解酶。适宜的还有 US 专利 5,677,163 中描述的 LG12 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。

其它可在本发明的实践中使用的蛋白酶可以选自 Savinase®、Esperase®、Maxacal®、Purafect®、BPN'、蛋白酶 A、蛋白酶 B、蛋白酶 C、蛋白酶 D 及其混合物。蛋白酶在本发明制剂中的存在量通常为硅氧烷基质重量的约 0.01 % 至约 0.5% 或者约 0.1 mg/g 至约 10.0 mg/g，并且优选约 0.1 mg/g 至约 5.0 mg/g。

本领域技术人员能够理解，本发明不限于上述所列的酶。本领域技术人员还应当理解，本发明的局部用制剂中可以使用一种或多种活性剂。

活性剂可以发挥各种各样的功能。例如基质可以释放蛋白酶和其它酶清除剂，用于局部性除去坏死组织和一般的伤口清洁，凝固形成和凝块除去酶，产生过氧化物、过酸、活化氧物质和抗粘连催化拮抗物(用于自身灭菌、抗感染和加速愈合)的试剂及用于皮肤治疗的试剂

等等。

本发明的制剂可以具有任何适宜量的组分。例如外相可以占局部用制剂的约 50.000%至约 99.999%。内相可以含有约 0.001 %至约 2.000%的活性剂和约 0.001 %至约 49.999% 亲水性载体。当向制剂中添加表面活性剂时，表面活性剂可以占约 0.001 %至约 60.000%，更通常占约 0.100%至约 50.000%。当添加亲水性组分时，亲水性组分可以占制剂的约 0.001 %至约 50.000%，并且亲水性组分可以更通常占局部用制剂的约 5.000%至约 40.000%。在另一个实施方案中，亲水性组分可以占制剂的约 10.000%至约 35.000%。在另一个实施方案中，亲水性组分可以占制剂的约 15.000%至约 35.000%。

本发明的制剂可以通过如下过程来产生，通过将含活性剂的亲水性载体溶液如丙二醇溶液与亲水性组分溶液一起在旋转混合器上于约 30 rpm 下混合约 15 分钟来制备内相。将外相的成分，如硅氧烷基质和硅氧烷基表面活性剂，预先混合获得均相混合物。

待内相和外相各自制成之后，可以进行乳化或分散的机械操作。优选，用高剪切的实验室混合器，即，具有正方形孔高剪切筛网的 Silverson L4R(可获得自 Silverson Machines, Inc., East Longmeadow, MA)，将内相添加至外相中并且剧烈搅拌。这种高剪切混合导致产生具有约 0.1-50 μm , 约 0.1-10 μm 和约 0.1-5 μm 直径的液滴，并且该液滴具有非常窄的尺寸分布。混合物的搅拌可以在约 5400 rpm 下进行约 90 秒。然后，可以将所得的混合物转移至适宜的容器中进行固化。设计容器的大小和/或形状以提供合意的贴剂。

或者，可以通过手动混合来制备敷料。根据本发明的另一个实施方案，如上所述制备内相和外相，并且将内相添加至外相中。然后在容器中通过用小刮勺施加环形运动来剧烈搅拌混合物约 30 秒，形成敷料。内相和外相的手动混合可以导致产生具有约 10 至约 1000 μm 直径的内相液滴。

在施用给皮肤之前，可以将本发明的制剂浇铸成膜，或者直接施用于皮肤，让它们在皮肤上就地聚合。根据本发明，当施用于皮肤时，

"铺展型"薄膜聚合，并且可以来自软管中的乳膏或软膏、小香包、滚球、喷剂、贴剂、绷带等形式传递。可以通过将硅氧烷橡胶，例如加成固化物(类似于凝胶，但用二氧化硅补强)或缩合固化物，例如可获得自 Dow Corning Corporation (Midland, MI) 的 Dow Corning® 7-5300 FILM-IN-PLACE COATING，掺入外相中来获得薄膜。当与内相混合时，所得的乳液被允许固化并且提供"铺展型"薄膜、贴剂或绷带，当施用于皮肤上时，乳液聚合并且有效地释放诸如蛋白酶的活性剂。可以将乳液铺展在基底上达到合意的厚度。本领域技术人员能够理解，本发明的敷料可以通过任何适宜的方法来制备并且制备方法不限于本文所述的那些方法。

本发明的软膏可以通过如下过程来产生，将硅氧烷弹性体和硅氧烷表面活性剂一起搅拌，形成外相，其中所述硅氧烷弹性体如 Dow Corning® 9041 SILICONE ELASTOMER BLEND，所述硅氧烷表面活性剂如 Dow Corning® 5200 FORMULATION AID，其可获得自 Dow Corning Corporation (Midland, MI)。内相可以通过将活性剂溶液和诸如 PVA 的亲水性载体混合在一起制备。可以通过将内相缓慢添加至外相中，同时进行恒定搅拌，而将内相掺入外相中。

本领域技术人员应当理解，可以将本发明的制剂制备成使活性剂的释放速率达到最佳，以便适于给定的用途。例如可以选择硅氧烷基质，以便提供增加或降低的活性剂释放速率。活性剂的释放速率可以通过向硅氧烷基质添加亲水性组分如 PVA 和 PVP 来增加。类似地，添加增加量的亲水性载体可以增加活性剂的释放速率，例如可以使用最高约 50%重量的亲水性载体来形成制剂。或者，可以选择硅氧烷基质，以便增加活性剂的释放速率。例如具有低交联密度的硅氧烷基质比具有高交联密度的硅氧烷基质能够提供更快的活性剂释放速率。

也可以改变敷料贴剂的厚度来影响活性剂的释放速率。为增加活性剂的释放速率，可以将贴剂的厚度向下调整。此外，可以将敷料制备成能够吸留更多的空气。随着敷料的吸留性增加，活性剂的释放速率可以增加。

类似地，伤口床的参数可以引起活性剂释放速率增加或降低。例如随着伤口床的含水量增加，活性剂的释放速率也可以增加。或者，随着伤口床的温度增加，活性剂的释放速率可以增加。由此，可以选择制剂的各种参数，以便针对给定的伤口床和敷料或软膏条件，以合意的释放速率最佳地传递活性剂。

通常来说，应当将制剂配制成为能够提供可以储存规定期限的敷料或软膏，而不会丧失显著比例的活性剂活性。例如敷料或软膏可以在室温下稳定最长至六个月的期限，而不丧失超过有效比例活性的活性。

如上所讨论的，制剂可以制备成致使活性剂或试剂从硅氧烷基质中释放，从而可以去除坏死组织。制剂可以是流体吸留性的，并且这种吸留性可以促进产生在制剂所覆盖的区域内的潮湿的伤口环境。这种潮湿的伤口环境可以允许制剂所覆盖的坏死组织溶胀，并且这种溶胀可以允许活性剂更有效地和有选择性地除去溶胀的坏死组织。

根据本发明的一个实施方案，具有坏死组织的伤口周围的区域可以具有涂敷在其上的粘合剂，并且粘合剂可以用来将制剂粘附在伤口上面。粘合剂可以包括硅氧烷基质，其包括如本文所述的硅氧烷压敏粘合剂(如 Dow Corning® PSA 7-4402)、亲水性载体(如 PVA)和活性剂，其是经过选择的，以抑制所选择的用于去除坏死组织的活性剂，以便健康的组织受到保护。活性剂可以如本文所述从粘合剂中释放。例如如果在伤口上面的制剂中的活性剂包括蛋白酶，则粘合剂中的活性剂可以是蛋白酶抑制剂。适宜的蛋白酶抑制剂的实例包括但不限于丝氨酸蛋白酶抑制剂，如在丝氨酸蛋白酶抑制剂、Kunitz、Kazal 和白细胞蛋白酶类抑制剂中所发现的那些抑制剂。这种适宜的抑制剂可见 R. M. Roberts, 等, *Regulation and Regulatory Role of Proteinase Inhibitors*, Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 5 (3-4) 385-436 (1995)。

为使本发明更容易理解，参考以下实施例，这些实施例旨在对本发明进行举例说明，但不限制本发明的范围。

实施例 1

进行第一个实验来评价蛋白酶从硅氧烷基质中的缓释。使用松散或轻度交联的硅氧烷弹性体组合物 (Dow Corning® 9040) 和硅氧烷基表面活性剂 (Dow Corning® 9011)，二者均可商购获得自 Dow Corning Corporation (Midland, MI)，形成 Dow Corning® 9040 和 Dow Corning® 9040/9011 硅氧烷弹性体制剂。将 1.1 mg/ml 蛋白酶 A(得自于迟缓芽孢杆菌 (B. lentus)) 溶解于丙二醇的储备溶液添加至这两种 Dow Corning® 组合物中。将 5ml 储备溶液样品添加至 20 克的 9040 制剂中并且还添加至 20 克的 9040/9011 制剂中，其中所述 9040/9011 制剂含有 10 克的 9040 制剂和 10 克的 9011 制剂。制备含有 9040 和 9040/9011 以及水代替储备酶溶液的对照。除此之外，为测定硅氧烷基质的任何组分是否抑制蛋白酶，制备另一种样品，其具有等量的 Dow Corning® 9040 和 9040/9011 酶制剂，和不含蛋白酶的含水对照。这些抑制对照通过从不含蛋白酶的样品中取等分部分，并且将它们添加至等量的酶制剂样品的等分部分中来制备，以便观察对蛋白酶活性的抑制。然后将样品材料在通风厨中风干两周。

将 Dow Corning® 9040/9011 制剂干燥成薄膜并且将 Dow Corning® 9040 组合物干燥成饼块形式燥。使用标准分析蛋白酶试验来分析样品，使用 N-琥珀酰-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-对硝基酰苯胺 (SAAPPpNA)，如 Delmar 等 (1979) Anal. Biochem. 94, 316-320; Achtstetter, Arch. Biochem. Biophys 207: 445-54 (1981) (pH 6.5, 25°C) 中所描述的。分析试验使用 Hewlett Packard 8451A 二极管测定分光光度计在 410 纳米下测定释放的蛋白酶，以 mAbs/min 为单位计。此第一个实施例的结果示于下表 1:

表 1. 蛋白酶的释放

时间 (小时)	1	2	3	5
9040+蛋白酶	3.21	3.58	3.71	4.04
9040(抑制)	2.95	3.24	3.33	4.04
9040/9011+蛋白酶	0.995	0.175	0.205	0.294
9040/9011(抑制)	0.912	0.163	0.197	0.256
9040/水对照	0.000	0.000	0.000	0.000
9040/9011 水对照	0.000	0.000	0.000	0.000

* 表达单位是 mAbs/min 释放的蛋白酶。

这些数据说明，在 5 小时的期限内，蛋白酶从硅氧烷基质中得到有效释放。数据来自于储存干燥两周以上的物料。将不含蛋白酶的硅氧烷制剂对照和抑制对照按相同的容积温育并且温育与含蛋白酶的硅氧烷基质相同的时间。抑制样品显示相当一致值的蛋白酶活性，其低于酶制剂的蛋白酶活性。结果说明，当将附加的制剂添加至酶样品中时，可能存在一些轻度抑制性化合物。

实施例 2

进行另一个实验来评价蛋白酶从硅氧烷基质中的缓释。将 0.81mg/ml 蛋白酶 A 的聚乙二醇储备溶液的 0.5 ml 等分部分转移至小的聚丙烯称重船中。接下来，将 5.0 ml 硅氧烷橡胶组合物 (Dow Corning® 7-5300, Dow Corning Corporation, Midland, MI) 添加至蛋白酶溶液中并且在其添加的 15 秒钟内混合。据认为，Dow Corning® 7-5300 组合物具有作为"铺展型"薄膜、贴剂或绷带的用途。然后，让混合物固化 30 分钟。固化后，使用 1.0 ml 蒸馏水将混合物洗涤三次。将各洗液如上所述地使用 SAAPFpNA 分析试验在等分部分上进行分析，并且测定洗液中的酶的量。然后将组合物在其侧面上干燥 15 分钟，接着附加 15 分钟放平。最后，将 5.0 ml 蒸馏水添加至称重船并且轻轻涡旋几秒。从零时间点取 200μl 等分部分。继续涡旋称重船，每小时时间点取 200μl。

本实验的结果示于图 1 中。在洗液中回收了 9% 的蛋白酶活性，并且在 4 小时间，有 3.8% 的蛋白酶从硅氧烷基质中释放。

进一步检测 Dow Corning® 7-5300 硅氧烷橡胶组合物的脂肪酶释放，使用获得自 *P. mendocina* 的脂肪酶，通过上面直接描述的方法。本实验的结果以 mAbs/min 为单位计示于下表 2 中：

表 2. 脂肪酶释放

时间 (h)	0	1	2	3	6.5	9
脂肪酶活性	.0268	.0264	.0387	.0476	.0624	.0787
%总共	.073	.073	1.06	1.3	1.71	2.16

洗液中回收了 18% 的脂肪酶活性，并且在 9 小时期间，有 2.2% 的脂肪酶释放。

图 2A 显示了蛋白酶 A 的释放/传递，图 2B 显示了脂肪酶从 Dow Corning® 7-5300 硅氧烷橡胶溶液中的释放/传递。附图说明，随时间，有 ~2-4% 的添加酶从硅氧烷基质中线性释放。

实施例 3

进行另一个实验来评价亲水性添加剂对蛋白酶 A 从硅氧烷基质中缓释的影响。首先，将测试用敷料或更具体说是含有蛋白酶的贴剂浇铸至小的平皿(大约 3 cm 直径)中，致使贴剂的总重量是恒定的(约 2 克)并且贴剂中的酶浓度也是恒定的(约 0.6 mg 酶/克贴剂)。贴剂包括松散或轻度交联的硅氧烷弹性体组合物 (Dow Corning® 9040) 和硅氧烷基表面活性剂 (Dow Corning® 9011)，二者均可商购获得自 Dow Corning Corporation (Midland, MI)。除此之外，还测试 Dow Corning® 7-5300 (硅氧烷橡胶组合物)。此外，制剂中含有不同量的 PVA、高丙二醇含量 PVA、或 PVP，通过搅拌来添加它们。

使用两种方法来评价酶的释放。在第一种方法中，将贴剂洗涤，以除去任何可能存在于贴剂表面上和非常接近贴剂表面的酶。将约 1 ml 的溶解缓冲液 (10 mM Tris、10 mM CaCl₂ 和 0.005% Tween 80, pH 5.4) 添加至平皿测试贴剂的顶部。然后将缓冲液涡旋 20 秒并且将缓冲液滗倒至 Eppendorf 管中进行分析。重复洗涤步骤三次并且测定每次洗液的酶活性。将结果汇总，得到洗涤过程期间释放的酶的总量。包括图 3A-3C 中的零时间点的酶的量。

另一种方法不包括洗涤步骤。将约 5 ml 的溶解缓冲液吸移至测试贴剂的顶部并且将平皿盖上盖子以便消除蒸发。然后，将含有测试贴剂和溶解缓冲液的平皿在椭圆混合器上于约 75 rpm 下涡旋，并且以 1 小时为增量，取出 10 μl 等分部分的溶解缓冲液进行酶活性分析。将等分部分直接吸移至含有测定缓冲液 (100 mM Tris 和 0.005% Tween 80,

pH 8.6)的比色杯中并且在 UV/可见光分光计上测定酶活性，得到溶解缓冲液中的酶的浓度，以 mg/ml 计。

图 3A 显示了具有不同量 PVA 和高 PG(丙二醇)含量 PVA 的酶从 Dow Corning® 9040/9011 硅氧烷基质中的释放。正如图 3A 中所看到的，向硅氧烷基质中添加较大量的亲水性 PVA 增加了酶的释放速率。同样，图 3B 显示了蛋白酶 A 从各种含量 PVA 的 Dow Corning® 7-5300 制剂中的释放百分率。正如从图中所看到的，释放速率随 PVA 增加而增加。图 3C 显示了酶从具有不同量 PVP 的 Dow Corning® 9040/9011 硅氧烷基质中的释放。正如从图 3C 中看到的，向硅氧烷基质中添加亲水性 PVP 增加了酶的释放速率。

实施例 4

进行实验来评价硅氧烷基质对蛋白酶 B 从硅氧烷基质中缓释的影响。首先，将测试用敷料或更具体说是含有蛋白酶的贴剂浇铸至小的平皿(大约 3 cm 直径)中，致使贴剂的总重量是恒定的(约 2 克)并且贴剂中的酶浓度也是恒定的(约 0.6 mg 试剂/克贴剂)。贴剂包括松散或轻度交联的硅氧烷弹性体组合物(Dow Corning® 9040)和硅氧烷基表面活性剂(Dow Corning® 9011)，二者均可商购获得自 Dow Corning Corporation(Midland, MI)。或者，贴剂包括 Dow Corning® PSA 7-4402 压敏粘合剂或 Dow Corning® 7-FC-4210 多孔弹性体，二者均可获得自 Dow Corning Corporation(Midland, MI)。此外，制剂含有 0% 或 20% PVA。

使用两种方法来评价酶的释放。在第一种方法中，将贴剂洗涤，以除去任何可能存在于贴剂表面上和非常接近贴剂表面的酶。将约 1 ml 的溶解缓冲液(10 mM Tris、10 mM CaCl₂ 和 0.005% Tween 80, pH 5.4)添加至平皿测试贴剂的顶部。然后将缓冲液涡旋 20 秒并且将缓冲液滗倒至 Eppendorf 管中进行分析。重复洗涤步骤三次并且测定每次洗液的酶活性。将结果汇总，得到洗涤过程期间释放的酶的总量。包括图 4 中的零时间点的酶的量。

另一种方法不包括洗涤步骤。将约 5ml 的溶解缓冲液吸移至测试贴剂的顶部并且将平皿盖上盖子以便消除蒸发。然后，将含有测试贴剂和溶解缓冲液的平皿在椭圆混合器上于约 75 rpm 下涡旋，并且以 1 小时为增量，取出 10 μ l 等分部分的溶解缓冲液进行酶活性分析。将等分部分直接吸移至含有测定缓冲液 (100 mM Tris 和 0.005% Tween80, pH 8.6) 的比色杯中并且在 UV/可见光分光计上测定酶活性，得到溶解缓冲液中的酶的浓度，以 mg/ml 计。

图 4 显示了该酶释放研究的结果。正如从图中看到的，PSA 7-4402 基质具有最大的释放速率。酶的释放速率受硅氧烷基质交联密度的影响。

实施例 5

进行实验来观察贴剂厚度对酶释放速率的影响。将含有蛋白酶 B、7-5300 硅氧烷和其它组分例如 PVA 的测试制剂乳化。使用刮膜器 (UV Process Supply, Inc., Chicago)，将制剂铺展在 Mylar® 片材上。通过调整刀片和 Mylar® 片材之间的缝隙来控制涂敷涂层的厚度。分别涂敷 13 和 25 μ m 厚的涂层。允许涂层干燥或完全固化之后，从 Mylar® 片材上切出 25 mm 直径的测试圆片。使用数字涂层厚度计 (Elcometer, Manchester, UK) 测定涂层的最终干厚度。还测定测试样品圆片的最终干重，以便酶的有效载荷是精确已知的。测定 Mylar® 的单独的重量和厚度并且从 Mylar® 上的样品的重量和厚度中减去，得到样品单独的重量的厚度。

使用 Franz 渗滤池 (Amie Systems, Riegelsville, PA) 研究酶的释放。将测试样品安装在渗滤池顶部并且给池填充预热至 37°C 的 13.7 毫升溶解缓冲液 (10 mM MES，含 10 mM NaCl 和 0.005% Tween 80, pH 5.5)。小心除去渗滤池内存在的任何空气泡。

将池的搅拌速率预设至 50 rpms。以定期的时间间隔，从渗滤池中取出 0.1 ml 的样品等分部分并且分析酶活性，得到活性酶浓度，以单位 mg/ml 计。还计算释放的酶的百分率。

正如参考图 5 所看到的，发现释放速率与贴剂厚度呈反比。因此，从最薄的贴剂中可达到 100% 的酶的释放。

实施例 6

进行实验来研究蛋白酶从软膏制剂中的释放。如下制备测试软膏制剂，通过制备含有硅氧烷弹性体 Dow Corning 9041 和硅氧烷表面活性剂 Dow Corning 5200 制剂助剂（二者均可获得自 Dow Corning Corporation (Midland, MI)）的外相。制备含有蛋白酶 B 储备溶液的内相。此外，将内相制备成含有 0 或 20% 的 40% PVA 溶液。蛋白酶 B 储备溶液中含有活性酶、甲酸钠、氯化钙、水和 PG。使用机械搅拌器将内相和外相混合。软膏具有约 3 毫克酶/克软膏。

制得软膏制剂之后，使用 Hansen 软膏池 (Hansen, Chatworth, CA) 测定它们的释放速率，以便测定制剂的稳定性。将大约 0.5 克软膏装入软膏池的软膏剂量区。将 0.45 μm HT Tuffrym® 膜 (Pall Corp., Ann Arbor, MI) 放在软膏剂量的顶部并且将软膏池密封关闭。然后将软膏池放入软膏池烧瓶中，并且给烧瓶填充 25 毫升 pH 5.5 缓冲溶液 (10mM MES, 10mM CaCl₂, 0.005% Tween)，使软膏池浸没在缓冲溶液中。试验在 30°C 下进行并且使用桨叶将缓冲液在恒定的 50 rpms 下搅拌。10min、1 hr、2 hrs、4 hrs、8hrs、16 hrs 和 24 hrs 之后，借助自动取样器取出 0.5ml 等分部分。在 UV/可见光分光计上测定酶活性，得到溶解缓冲液中的酶活性，以 mg/ml 计。该溶解试验平行进行 6 次并且汇报平均值。

参看图 6，添加 PVA 溶液使得酶在 24 小时的期间部分地从软膏中释放。从图 6 中看出，软膏提供了可以用于局部处理皮肤用的制剂。

实施例 7

进行稳定性研究来测定室温下储存的干贴剂内的酶的稳定性。经过储存后的酶的释放与上述实施例所汇报的初始释放数据相当，说明酶在储存期间保持稳定。将干贴剂储存 0 至 6 个月的时间，并且在合

适的时间点测定酶的释放。将含有蛋白酶 A、9040/9011 硅氧烷和其它组分的测试制剂乳化。测试制剂含有 3.1250g 千重的 DC-9040 硅氧烷、3.2500g 千重的 DC-9011 硅氧烷表面活性剂、2.5 mg/g 蛋白酶 A 和 4.2000g 千重的 PVA。使用刮膜器 (UV Process Supply, Inc., Chicago) 将制剂铺展在 Mylar® 片材上。通过调整刀片和 Mylar® 片材之间的缝隙来控制涂敷涂层的厚度。允许涂层干燥或完全固化之后，从 Mylar® 片材上切出 25 mm 直径圆片。使用数字涂层厚度计 (Elcometer, Manchester, UK) 测定涂层的最终干厚度，并且样品大约 100 μm 厚。还测定测试样品圆片的最终干重，以便酶的有效载荷是精确已知的。测定 Mylar® 的单独的重量和厚度并且从 Mylar® 上的样品的重量和厚度中减去，得到样品单独的重量的厚度。

制备含有存在于 50% 丙二醇中的蛋白酶 A 储备溶液 (含有 400 ppm 氯化钙的 50% 甲酸钠缓冲液, pH 5.5) 的对照。将对照室温下储存，并且在不同时间点测试保留的酶活性。据预计，蛋白酶 A 酶在对照溶液中是稳定的。

使用 Hanson (Hanson, Chatsworth, CA) 溶解测试仪进行酶释放研究，其中所述溶解测试仪装配有自动取样附件和小体积溶解试剂盒。使用橡胶胶粘剂，将测试样品固定于 3/16" 厚的直径与样品相同 (25mm) 的玻璃圆盘上。然后将样品装入溶解容器中，有测试样品的侧面朝上。将 25 毫升溶解缓冲液 (10 mM MES, 含 10 mM NaCl 和 0.005% Tween80, pH 5.5) 倾在各样品的顶部并且立即将搅拌浆叶连同自动取样器管一起降低至缓冲液中。给溶解容器封盖，以便最大程度地减少蒸发并且在 50 rpm 下开始搅拌。自动取样器按规定时间点取出 0.5 ml 或 1 ml 等分部分，并且使用上述的 SAAPFpNA 蛋白酶测定方法来分析这些样品的酶活性，得到活性酶浓度，以 mg/ml 计。在一些情形中，通过测定 280 nm 下的吸光度并且采用合适的消光系数，还在各时间点测定总蛋白质。

参看图 7，显示了储存 0、1、3 和 6 个月的 9040/9011 干贴剂中的蛋白酶 A 的酶稳定性。数据点是各个时间点的 6 次平行测定的平均。

对照溶液中的活性的损失大于硅氧烷贴剂中。因此，硅氧烷贴剂可为储存和随后的酶释放提供更稳定的方式。

实施例 8

进行稳定性研究来测定室温下储存的具有 PSA 7-4402 的干贴剂内的酶的稳定性。经过储存后的酶的释放与上述实施例所汇报的初始释放数据相当，说明酶在储存期间保持稳定。将干贴剂储存 0 至 6 个月的时间，并且在合适的时间点测定酶的释放。将含有蛋白酶 B、PSA 7-4402 硅氧烷和其它组分的测试制剂乳化。测试制剂含有 33.7500g 干重的 PSA 7-4402 硅氧烷、2.3500g 干重的 DC-193 流体(可获得自 Dow Corning Corp., Midland, MI)、3.8612 mg/g 蛋白酶 B 和 9.4100g 干重的 PVA。使用刮膜器(UV Process Supply, Inc., Chicago)将制剂铺展在 Mylar® 片材上。通过调整刀片和 Mylar® 片材之间的缝隙来控制涂敷涂层的厚度。允许涂层干燥或完全固化之后，从 Mylar® 片材上切出 25 mm 直径圆片。使用数字涂层厚度计(Elcometer, Manchester, UK)测定涂层的最终干厚度，并且样品大约 100 μm 厚。还测定测试样品圆片的最终干重，以便酶的有效载荷是精确已知的。测定 Mylar® 的单独的重量和厚度并且从 Mylar® 上的样品的重量和厚度中减去，得到样品单独的重量的厚度。

制备含有存在于 50% 丙二醇中的蛋白酶 B 的储备溶液(含有 400ppm 氯化钙的 50% 甲酸钠缓冲液, pH 5.5)的对照。将对照室温下储存，并且在不同时间点测试保留的酶活性。据预计，蛋白酶 B 酶在对照溶液中是稳定的。

使用 Hanson (Hanson, Chatsworth, CA) 溶解测试仪进行酶释放研究，其中所述溶解测试仪装配有自动取样附件和小体积溶解试剂盒。使用橡胶胶粘剂，将测试样品固定于 3/16" 厚的直径与样品相同 (25mm) 的玻璃圆盘上。然后将样品装入溶解容器中，有测试样品的侧面朝上。将 25 毫升溶解缓冲液 (10 mM MES, 含 10 mM NaCl 和 0.005% Tween80, pH 5.5) 倾在各样品的顶部并且立即将搅拌桨叶连同自动取样器管一

起降低至缓冲液中。给溶解容器封盖，以便最大程度地减少蒸发并且在 50 rpm 下开始搅拌。自动取样器按规定时间点取出 0.5 ml 或 1 ml 等分部分，并且使用上述的 SAAPPpNA 蛋白酶测定方法来分析这些样品的酶活性，得到活性酶浓度，以 mg/ml 计。在一些情形中，通过测定 280 nm 下的吸光度并且采用合适的消光系数，还在各时间点测定总蛋白质。

参看图 8，显示了储存 0、1、3 和 6 个月的 PSA 7-4402 干贴剂中的蛋白酶 B 的酶稳定性。数据点是各个时间点的 6 次平行测定的平均。硅氧烷贴剂可为储存和随后的酶释放提供更稳定的方式。然而，释放的蛋白酶 B 百分率小于保留在蛋白酶 B 对照溶液中的活性的百分率。

实施例 9

进行稳定性研究来测定室温下储存的具有 PSA 7-4401 干贴剂内的酶的稳定性。经过储存后的酶的释放与上述实施例所汇报的初始释放数据相当，说明酶在储存期间保持稳定。将干贴剂储存 0 至 3 个月的时间，并且在合适的时间点测定酶的释放。将含有蛋白酶 B、PSA 7-4401 硅氧烷和其它组分的测试制剂乳化。测试制剂含有 33.9088 千重的 PSA 7-4401 硅氧烷、2.3500g 千重的 DC-193 流体、3.8723 mg/g 蛋白酶 B 和 9.6170g 千重的 PVA。使用刮膜器 (UV Process Supply, Inc., Chicago) 将制剂铺展在 Mylar® 片材上。通过调整刀片和 Mylar® 片材之间的缝隙来控制涂敷涂层的厚度。允许涂层干燥或完全固化之后，从 Mylar® 片材上切出 25 mm 直径圆片。使用数字涂层厚度计 (Elcometer, Manchester, UK) 测定涂层的最终干厚度，并且样品大约 100 μm 厚。还测定测试样品圆片的最终干重，以便酶的有效载荷是精确已知的。测定 Mylar® 的单独的重量和厚度并且从 Mylar® 上的样品的重量和厚度中减去，得到样品单独的重量的厚度。

制备含有存在于 50% 丙二醇中的蛋白酶 B 的储备溶液 (含有 400 ppm 氯化钙的 50% 甲酸钠缓冲液，pH 5.5) 的对照。将对照室温下储存，并且在不同时间点测试保留的酶活性。

使用 Hanson (Hanson, Chatsworth, CA) 溶解测试仪进行酶释放研究，其中所述溶解测试仪装配有自动取样附件和小体积溶解试剂盒。使用橡胶胶粘剂，将测试样品固定于 3/16" 厚的直径与样品相同 (25mm) 的玻璃圆盘上。然后将样品装入溶解容器中，有测试样品的侧面朝上。将 25 毫升溶解缓冲液 (10 mM MES, 含 10 mM NaCl 和 0.005% Tween80, pH 5.5) 倾在各样品的顶部并且立即将搅拌桨叶连同自动取样器管一起降低至缓冲液中。给溶解容器封盖，以便最大程度地减少蒸发并且在 50 rpm 下开始搅拌。自动取样器按规定时间点取出 0.5 ml 或 1 ml 等分部分，并且使用上述的 SAAPPpNA 蛋白酶测定方法来分析这些样品的酶活性，得到活性酶浓度，以 mg/ml 计。在一些情形中，通过测定 280 nm 下的吸光度并且采用合适的消光系数，还在各时间点测定总蛋白质。

参看图 9，显示了储存 0、1 和 3 个月的 PSA 7-4401 干贴剂中的蛋白酶 B 的酶稳定性。数据点是各个时间点的 6 次平行测定的平均。硅氧烷贴剂可为储存和随后的酶释放提供更稳定的方式。然而，释放的蛋白酶 B 百分率小于保留在蛋白酶 B 对照溶液中的活性的百分率。

实施例 10

进行稳定性研究来测定室温下储存的具有 7-FC 4210 的干贴剂内的酶的稳定性。经过储存后的酶的释放与上述实施例所汇报的初始释放数据相当，说明酶在储存期间保持稳定。将干贴剂储存 0 至 1 个月的时间，并且在合适的时间点测定酶的释放。将含有蛋白酶 B、7-FC 4210 基料和固体剂硅氧烷和其它组分的测试制剂乳化。测试制剂含有 36.0000g 干重的 7-FC 4210 基料硅氧烷、7.2000g 干重的 7-FC 4210 固化剂、4.08000g 干重的 DC 225 二甲聚硅氧烷流体(可获得自 Dow Corning Corp., Midland, MI)、4.2006 mg/g 蛋白酶 B 和 12.2880g 干重的 PVA。使用刮膜器 (UV Process Supply, Inc., Chicago) 将制剂铺展在 Mylar® 片材上。通过调整刀片和 Mylar® 片材之间的缝隙来控制涂敷涂层的厚度。允许涂层干燥或完全固化之后，从 Mylar® 片材上

切出 25 mm 直径的测试圆片。使用数字涂层厚度计 (Elcometer, Manchester, UK) 测定涂层的最终干厚度，并且样品大约 100 μm 厚。还测定测试样品圆片的最终干重，以便酶的有效载荷是精确已知的。测定 Mylar® 的单独的重量和厚度并且从 Mylar® 上的样品的重量和厚度中减去，得到样品单独的重量的厚度。

制备含有存在于 50% 丙二醇中的蛋白酶 B 的储备溶液(含有 400 ppm 氯化钙的 50% 甲酸钠缓冲液, pH 5.5)的对照。将对照室温下储存，并且在不同时间点测试保留的酶活性。

使用 Hanson (Hanson, Chatsworth, CA) 溶解测试仪进行酶释放研究，其中所述溶解测试仪装配有自动取样附件和小体积溶解试剂盒。使用橡胶胶粘剂，将测试样品固定于 3/16" 厚的直径与样品相同 (25mm) 的玻璃圆盘上。然后将样品装入溶解容器中，有测试样品的侧面朝上。将 25 毫升溶解缓冲液 (10 mM MES, 含 10 mM NaCl 和 0.005% Tween80, pH 5.5) 倾在各样品的顶部并且立即将搅拌片连同自动取样器管一起降低至缓冲液中。给溶解容器封盖，以便最大程度地减少蒸发并且在 50 rpm 下开始搅拌。自动取样器按规定时间点取出 0.5 ml 或 1 ml 等分部分，并且使用上述的 SAAPFpNA 蛋白酶测定方法来分析这些样品的酶活性，得到活性酶浓度，以 mg/ml 计。在一些情形中，通过测定 280 nm 下的吸光度并且采用合适的消光系数，还在各时间点测定总蛋白质。

参看图 10，显示了储存 0 和 1 个月的 7-FC 4210 干贴剂中的蛋白酶 B 的酶稳定性。数据点是各个时间点的 6 次平行测定的平均。硅氧烷贴剂可为储存和随后的酶释放提供稳定的方式。然而，释放的蛋白酶 B 百分率小于保留在蛋白酶 B 对照溶液中的活性的百分率。

实施例 11

使用丢弃的焦痂作为体外模型，用于测试适宜于清创术的酶的效能。将焦痂从受伤或坏疽的死组织中蜕掉。酶可为局限于或没机会使用器具进行快速清创的患者提供另一种可供选择的创伤快速清创方

式，其中所述器具是利用手术解剖刀或其它锋利手术工具。抛弃的焦痂获得自人糖尿病患者中存在的足溃疡的快速清创术。

在清创的同一天，获得两块大的焦痂，并且分成两块。将这两块各自进一步分成三小块。在 6 个平皿的每个平皿中放置一 3X3 细网眼的网垫并且将平皿称重。在各个网垫上放一小块焦痂，并且将平皿再次称重。通过从平皿、网垫和焦痂的重量中减去平皿和网垫的重量，获得焦痂的干重。将 20 ml 可商购获得的磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 添加至各平皿中。6 个平皿中的 2 个平皿是对照，仅具有 PBS 和得自两个初始焦痂片的每一个焦痂样品。6 个平皿中的接下来的 2 个平皿中的 PBS 各自含有 250 μ g/20ml PBS 的蛋白水解胶原酶，该酶得自溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) (Sigma)。最后两个平皿中的 PBS 溶液各自含有 250 μ g/20 ml PBS 的蛋白酶 B 枯草溶菌素酶(得自 Genencor International, Inc.)。

然后将网垫和焦痂保持浸入 PBS 溶液中 48 小时。48 小时之后，检查样品并且将第二 20 ml 量的 PBS 添加至各平皿中，包括向四个酶样品平皿中各自添加相同的 250 μ g/20 ml PBS 酶样品。浸泡另外 48 小时之后，将各平皿中的焦痂转移至新平皿中的新 3X3 网垫中。将平皿称重。

表 3 显示了 6 个样品重量的变化。在 96 小时结束时所有样品都变重，据推测是因为焦痂吸收液体而溶胀。胶原酶样品具有较低的百分比重量增重，据推测是由于焦痂的降解。蛋白酶样品也具有较低的百分比重量增重，据推测是由于焦痂的降解。

表 3：焦痂重量的变化

样品重量	起始重量	结束重量	差	%变化
空白 1	1.3 g	1.9 g	0.6 g	50%
空白 2	0.6 g	1.0 g	0.4 g	66%
胶原酶 1	1.0 g	1.4 g	0.4 g	40%
胶原酶 2	2.2	2.7	0.5	23%
蛋白酶 B 1	2.0	2.1	0.1	5%
蛋白酶 B 2	1.5	1.7	0.2	13%

96 小时时视觉观察焦痂结构完整性的变化并且证实发生降解。在用蛋白酶处理的样品中，焦痂变得多少有些胶凝状，并且在一些情形中，当用 PBS 洗涤时焦痂完全崩解。对照和胶原酶焦痂处理的样品没有变成胶凝状并且当用 PBS 洗涤时不崩解。

对本领域技术人员显而易见的是，在不背离本发明的范围的前提下可以做出各种改变，本发明的范围不能认为限于说明书所描述的内容。

实施例 12

进行体外实验来比较许多适宜于清创术的酶的效能。使用糖尿病患者足溃疡焦痂和模拟灌溉来模仿伤口状况。按照以下方案进行实验。

标记并且称重小的带盖平皿。然后将 2-平方英寸的网垫添加至各平皿并且将平皿再称重。然后用实验刀或剪子，将糖尿病患者足溃疡焦痂分离成视觉上相同的部分。将样品在平皿中的网垫上称重测试。如果样品彼此在 10% 或 0.1 g 内，则进行下一步骤。如果样品彼此不在 10% 或 0.1 g 内，则将它们按重量的基础重分配，直至在 10% 或 0.1 g 内。

然后，将焦痂放在平皿的网垫上称重。将合适体积的存在于 PBS 溶液 (Dulbecco's 磷酸盐缓冲的盐水，Mediatech, Inc.，含 0.002% 添加的叠氮化钠) 中的酶添加至网垫中，以便引入 250 微克酶。立即加入 10 ml PBS 溶液。将平皿盖上盖儿并且转移至无菌通风橱。理想地，应当将 10 ml PBS 钠添加至酶被吸入网垫中的斑点处，以确保充分混合。允许平皿在无菌通风橱中室温下温育 48 小时。

48 小时之后，将网垫沥干(让网垫接触平皿的侧面，以沥掉多余的液体)后转移至无菌过滤烧瓶中的 0.22 微米滤器，所述烧瓶连接有一真空器并且具有开口。网垫干燥并且贴附于滤器。取出 1ml 平皿中的残余反应混合物并且放入 eppendorf 管中进行 48 小时时的 A_{280} 分析。

A_{280} 分析通过以下过程来进行：将样品在 eppendorf 管中用 PBS 溶

液稀释直至样品的吸光度在 0.0-2.0 吸收单位的线性范围内。分析在 Amersham Bioscience Ultrospec 3100pro UV/VIS 分光光度计上于 280nm 下进行。A₂₈₀ 分析用来测定酶是否水解焦痂并且从水解的焦痂中释放游离的氨基酸或可溶性肽至残余的反应混合物中。

将 30ml PBS 溶液倾倒在焦痂样品上面，倾倒的方式应当致使样品不被从网垫上洗掉。从过滤烧瓶中取出网垫和焦痂样品并且放入第二个标记的平皿中。将洗液收集至瓶中，并且将瓶用螺旋盖盖住。将滤器单元丢弃。此洗涤步骤模仿酶施用后伤口的灌溉。

提供第二次酶的施用。将合适体积的酶添加至网垫中，以便引入 250 微克酶。在酶被吸入网垫中的斑点处附近，立即加入 10 ml PBS 溶液。给平皿盖上盖并且转移至无菌通风橱。将平皿温育另外 48 小时。

48 小时之后，将网垫沥干(让网垫接触平皿的侧面，以沥掉多余的液体)后转移至无菌过滤烧瓶中的 0.22 微米滤器，所述烧瓶连接有一真空器并且具有开口。网垫干燥并且贴附于滤器。取出 1ml 平皿中的残余反应混合物并且放入 eppendorf 管中进行 96 小时时的 A₂₈₀ 分析。

将 30ml PBS 溶液倾倒在焦痂样品上面，倾倒的方式应当致使样品不被从网垫上洗掉。从过滤烧瓶中取出网垫和焦痂样品，并且放入第三个标记的平皿中并且称重平皿。将洗液收集至瓶中，并且将瓶用螺旋盖盖住。将滤器单元丢弃。

将具有网垫的平皿放置在通风橱中过夜并且随后称重。计算网垫加焦痂的重量。再过 24 小时之后，将网垫加焦痂重新称重。

用仅有 PBS 和焦痂样品的空白进行实验。使用得自溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) (Sigma) 的蛋白水解胶原酶。此外，使用蛋白酶 B 枯草溶菌素酶(得自 Genencor International, Inc.)。

表 4 显示了焦痂样品在进行酶处理和洗涤之前和之后的重量，从表中可以看出，蛋白酶 B 对焦痂的降解似乎最有效。

表 4: 焦痂重量的变化

样品	起始重量	结束重量	差
空白	0.05g	0.06g	0.01g
胶原酶	0.07g	0.08g	0.01g
蛋白酶 B	0.06g	0.04g	-0.02g

表 5 显示了残余反应混合物的 48 小时时和 96 小时时的 A_{280} 分析结果。从表中可以看出，更多游离的氨基酸存在于蛋白酶 B 样品中。由此，看上去蛋白酶 B 在降解焦痂方面更有效。

表 5: A_{280} 分析

酶	48 小时时的吸光度	与空白之间的差	96 小时时的吸光度	与空白之间的差
空白	1.647		0.241	
胶原酶	1.51	0	0.360	0.119
蛋白酶 B	2.12	0.473	0.615	0.374

实施例 13

按实施例 12 所述的情况进行另一个实验。用仅有 PBS 和焦痂样品的空白进行实验。使用得自溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) (Sigma) 的蛋白水解胶原酶。此外，使用蛋白酶 B 枯草溶菌素酶(得自 Genencor International, Inc.)。

表 6 显示了残余反应混合物的 48 小时时和 96 小时时的 A_{280} 分析结果。从表中可以看出，更多游离的氨基酸存在于蛋白酶 B 样品中。由此，看上去蛋白酶 B 在降解焦痂方面更有效。

表 6: A_{280} 分析

酶	48 小时时的吸光度	与空白之间的差	96 小时时的吸光度	与空白之间的差
空白	0.505		0.069	
胶原酶	0.51	0.005	0.107	0.042
蛋白酶 B	1.135	0.630	0.182	0.113

实施例 14

按实施例 12 所述的情况进行另一个实验。用仅有 PBS 和焦痂样品的空白进行实验。使用蛋白酶 B 枯草溶菌素酶(得自 Genencor International, Inc.)。此外，使用 US 专利 5,677,163 中所述的 LG12 B. subtilis，该专利引入本文作为参考。

表 7 显示了残余反应混合物的 48 小时时和 96 小时时的 A_{280} 分析结果。从表中可以看出，更多游离的氨基酸存在于 LG12 溶液中。由此，看上去 LG12 在降解焦痂方面更有效。

表 7: A_{280} 分析

酶	48 小时时的吸光度	与空白之间的差	96 小时时的吸光度	与空白之间的差
空白	0.868		0.109	
胶原酶	0.794	0	0.122	0.013
蛋白酶 B	1.007	0.139	0.167	0.058
LG12	1.064	0.196	0.179	0.070

实施例 15

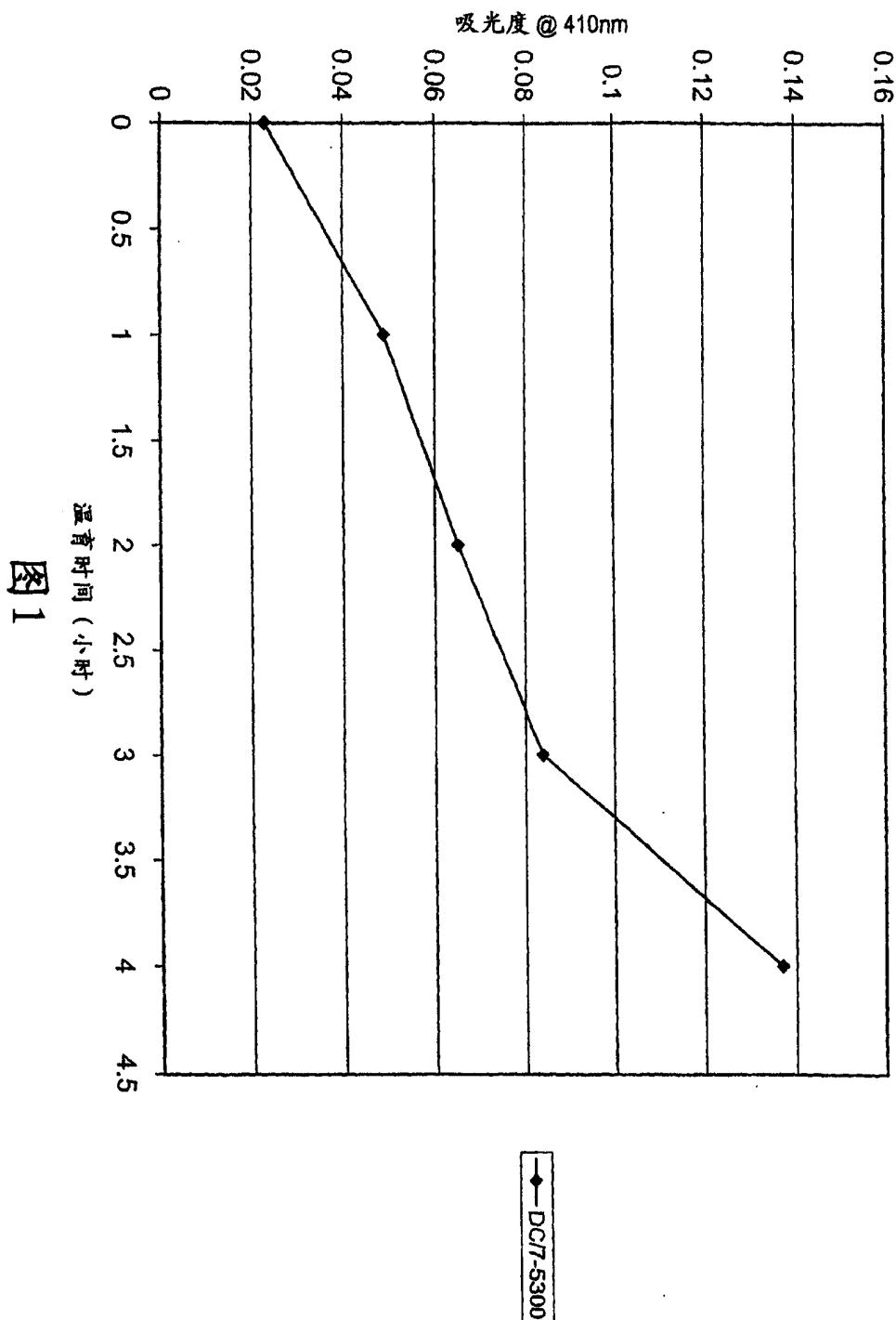
按实施例 5 制备含有蛋白酶 B 和 7-5300 硅氧烷的干胶片。此外，制备含有 7-5300 硅氧烷的对照干胶片。将干胶片放在 1.6% 酪蛋白琼脂培养基平板上并且在 37°C 下温育 1 小时。含有蛋白酶 B 的干胶片水解脱脂乳，得到琼脂透明区 (clearing)。对照干胶片不能溶解脱

脂乳得到透明区。

实施例 16

按实施例 8 制备含有蛋白酶 B 和 PSA 7-4402 硅氧烷的贴剂。将贴剂室温下储存 13 个月。将贴剂放在 1.6% 酪蛋白琼脂培养基平板上并且在 37℃ 下温育 1 小时。贴剂水解脱脂乳，得到少量琼脂透明区。然后将平板在 37℃ 下温育过夜，贴剂进一步水解脱脂乳，得到与实施例 15 的 7-5300 蛋白酶 B 贴剂相同量的透明区。

DC/7-5300 释放实验



在DC/7-5300贴剂中的蛋白酶A的释放

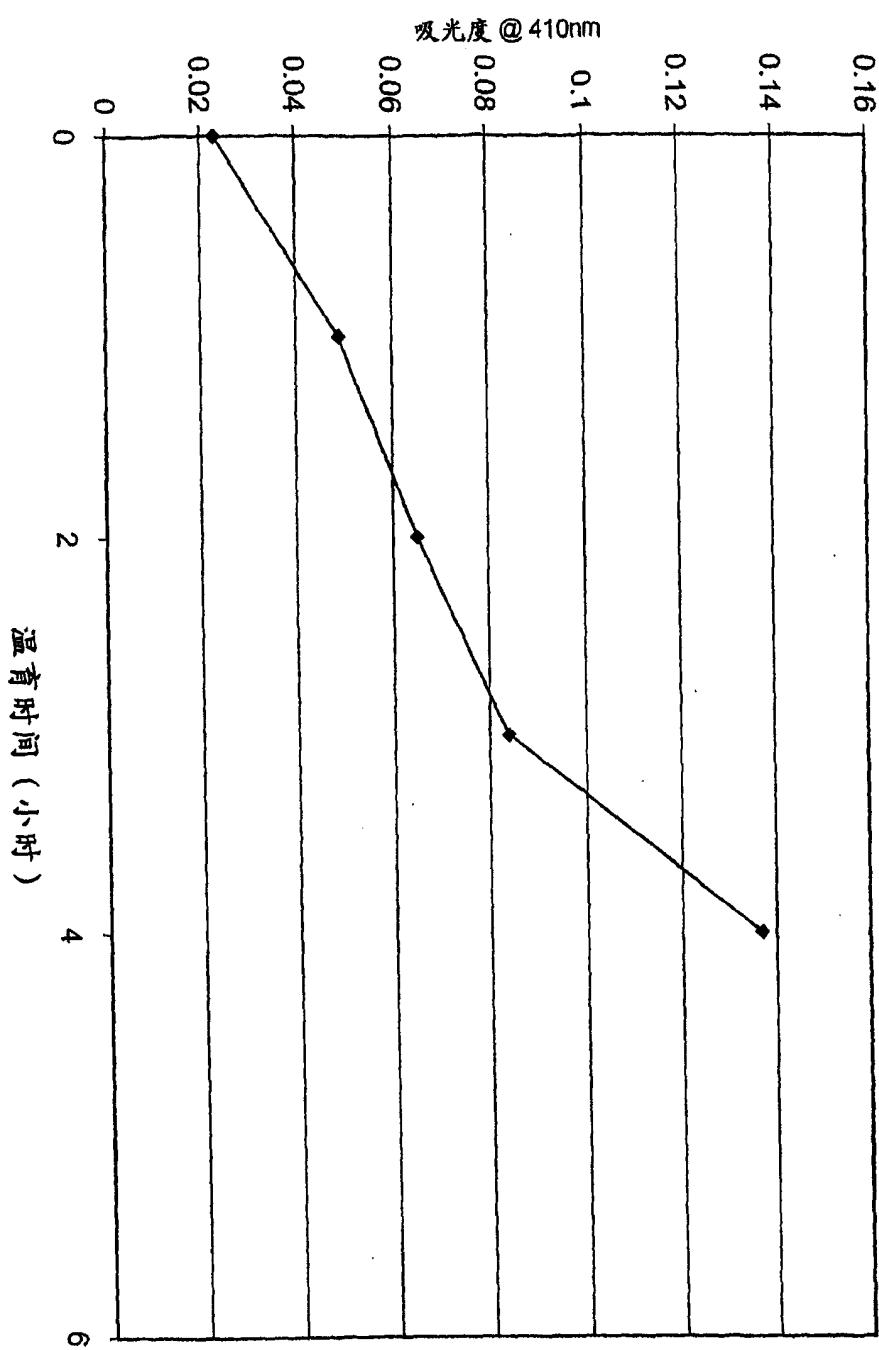


图 2A

在DC/7-5300贴剂中聚酯酶的释放

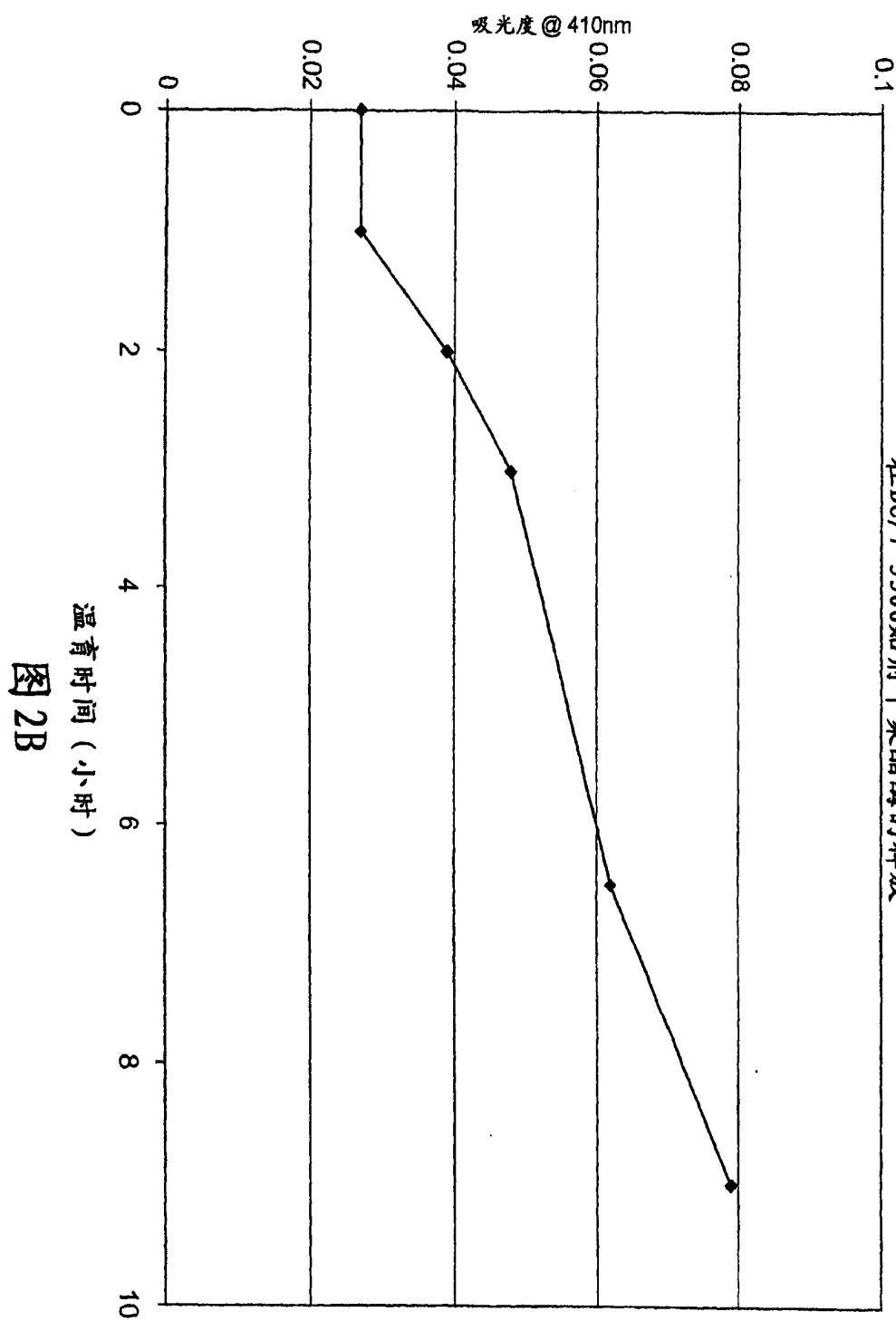


图 2B

在不同量PVA下从9040/9011中释放的蛋白酶A(包括洗液)的百分率

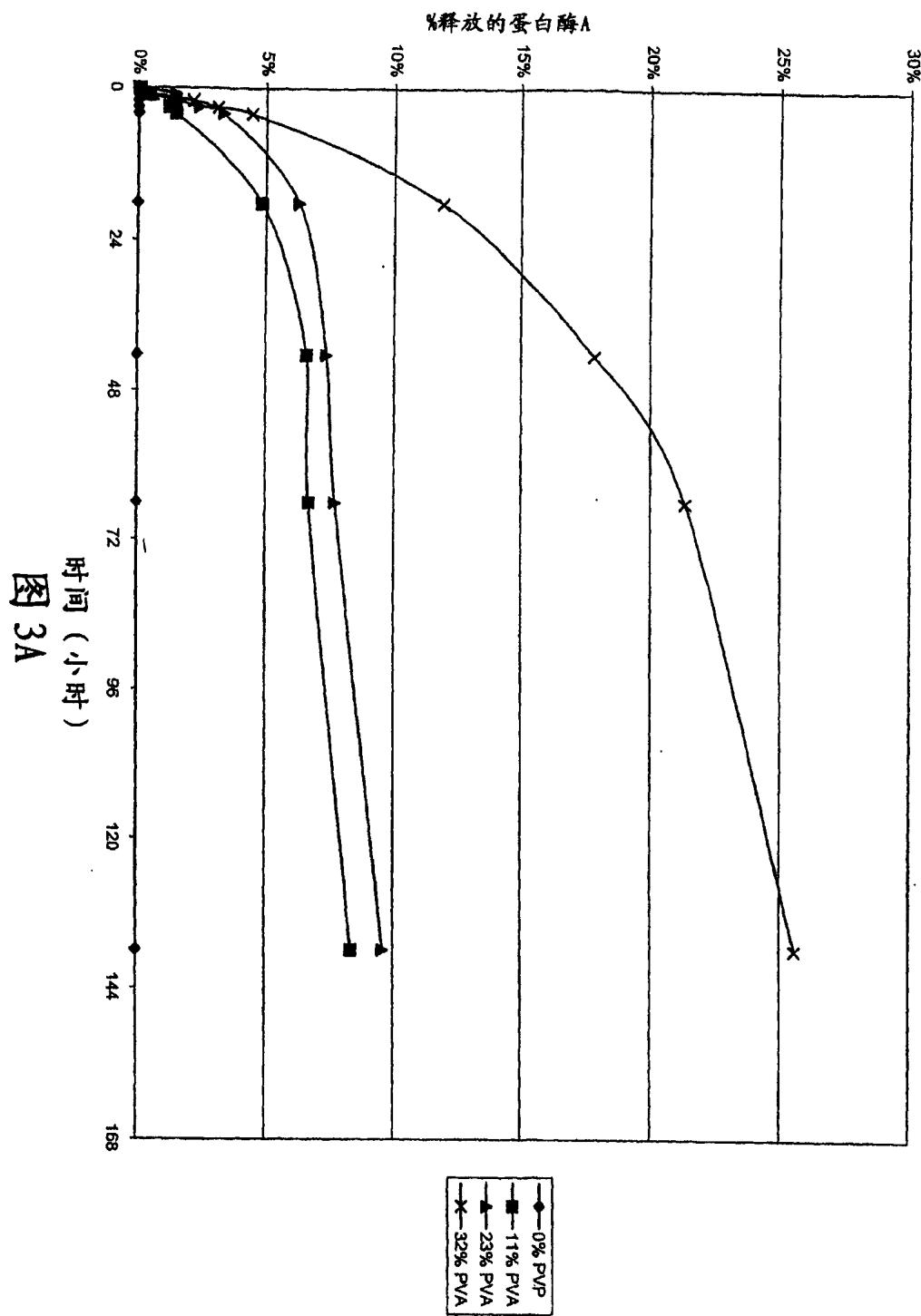


图 3A

在不同量PVP下从7-5300中释放的蛋白酶A(包括洗液)的百分率

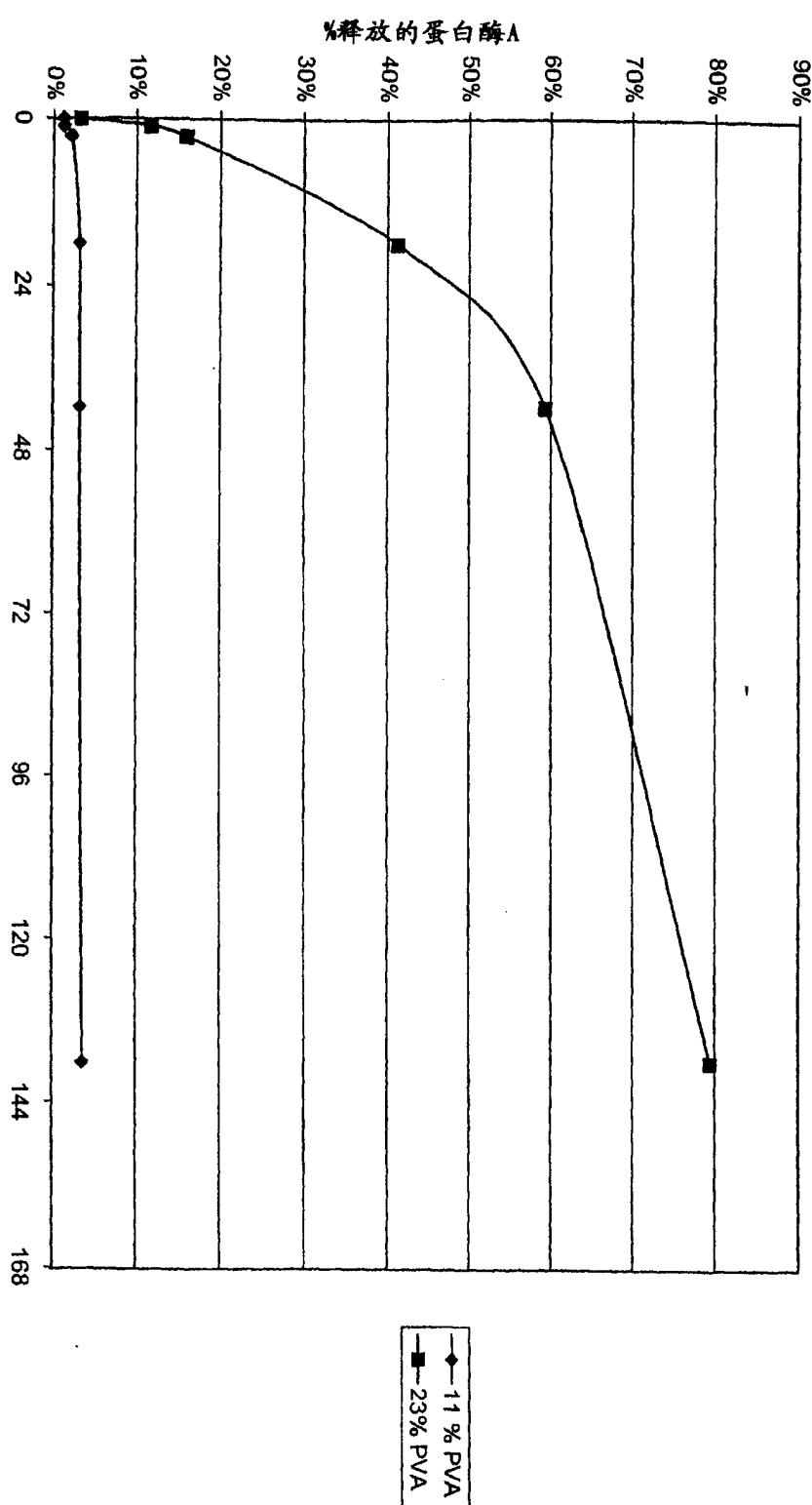


图 3B

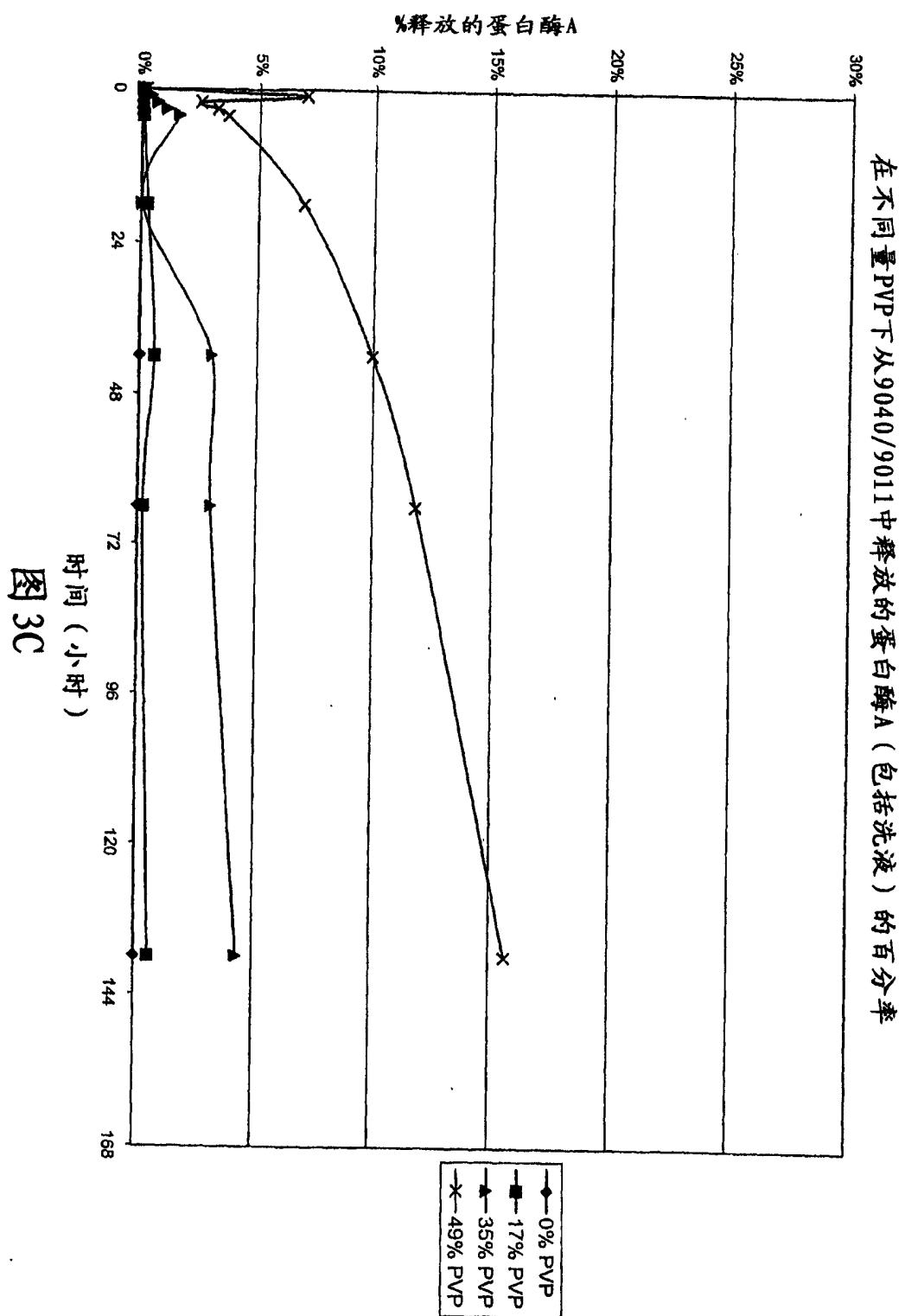


图 3C

从不同的干硅氧烷贴剂中蛋白酶B ($840 \mu\text{g/g}$) 的释放

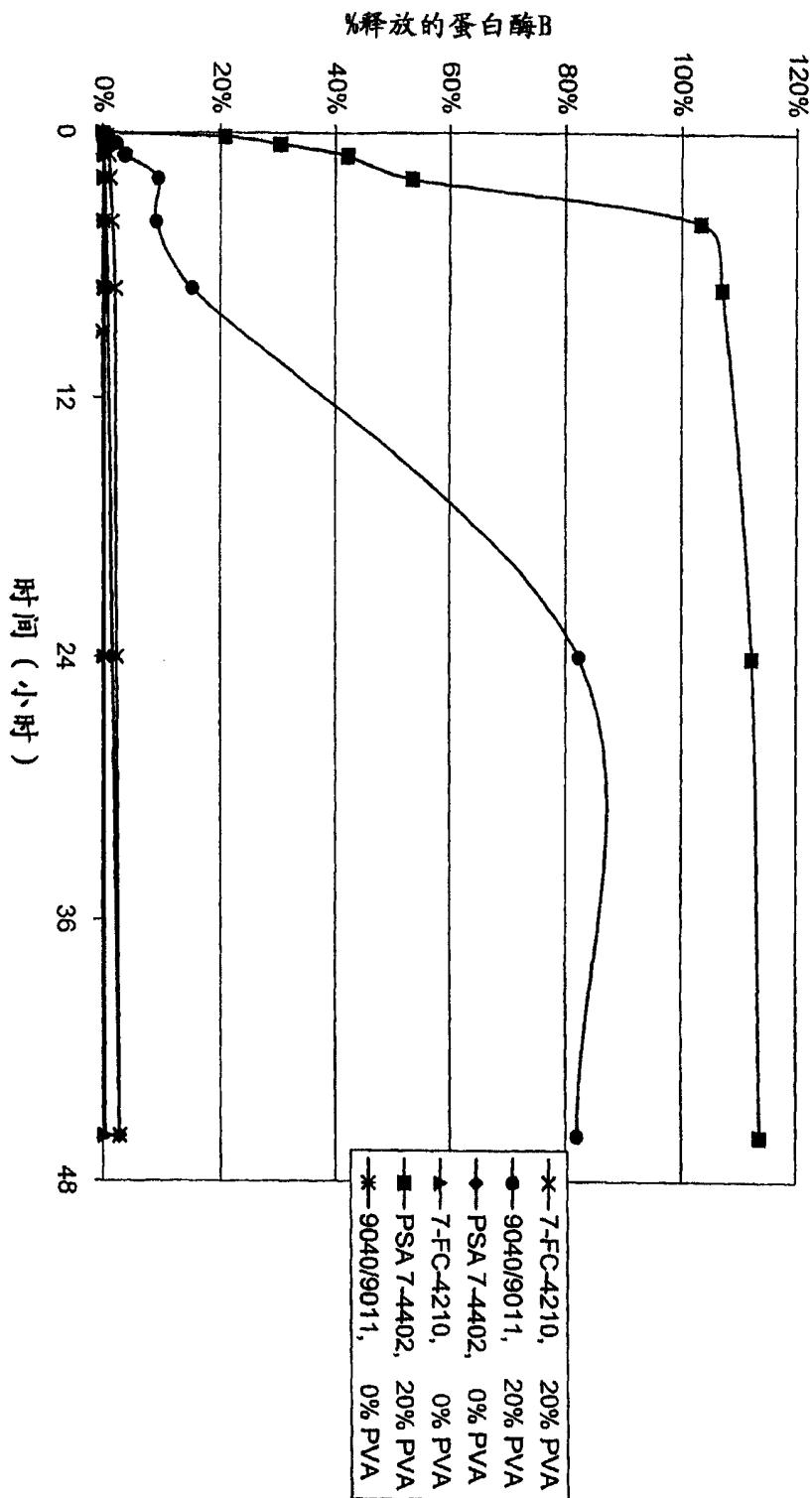
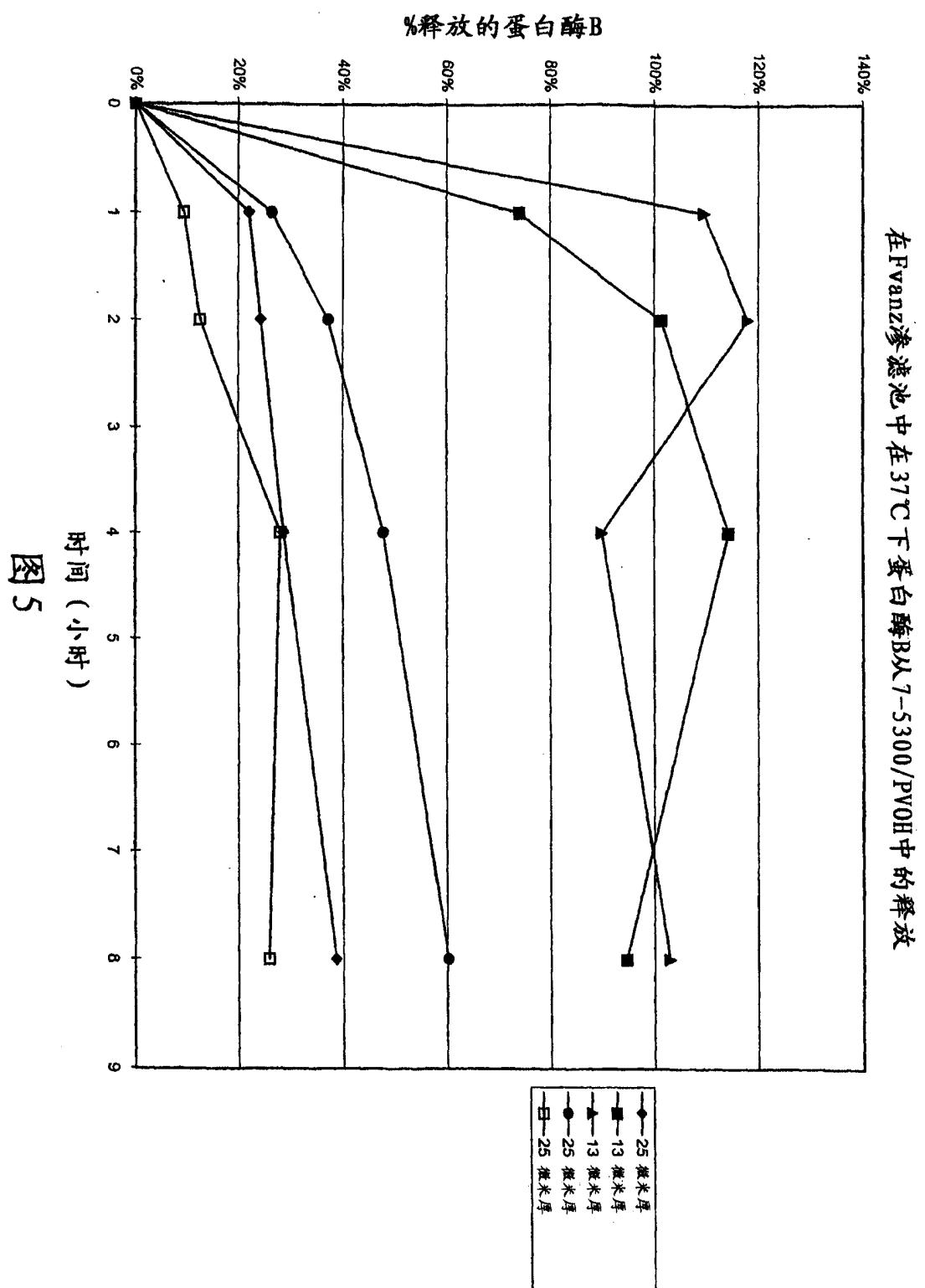
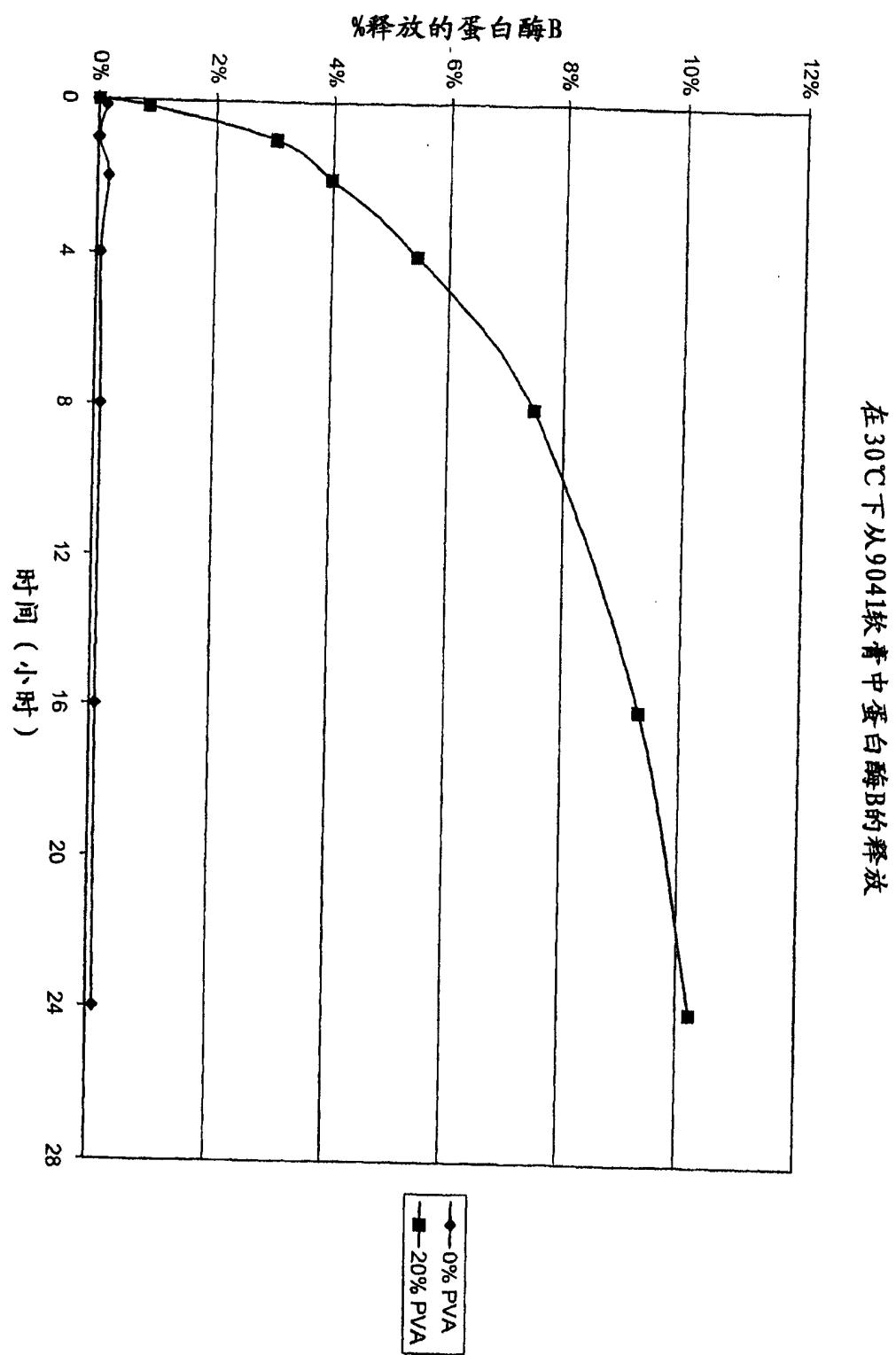


图 4





蛋白酶A在9040/9011中的贮存稳定性

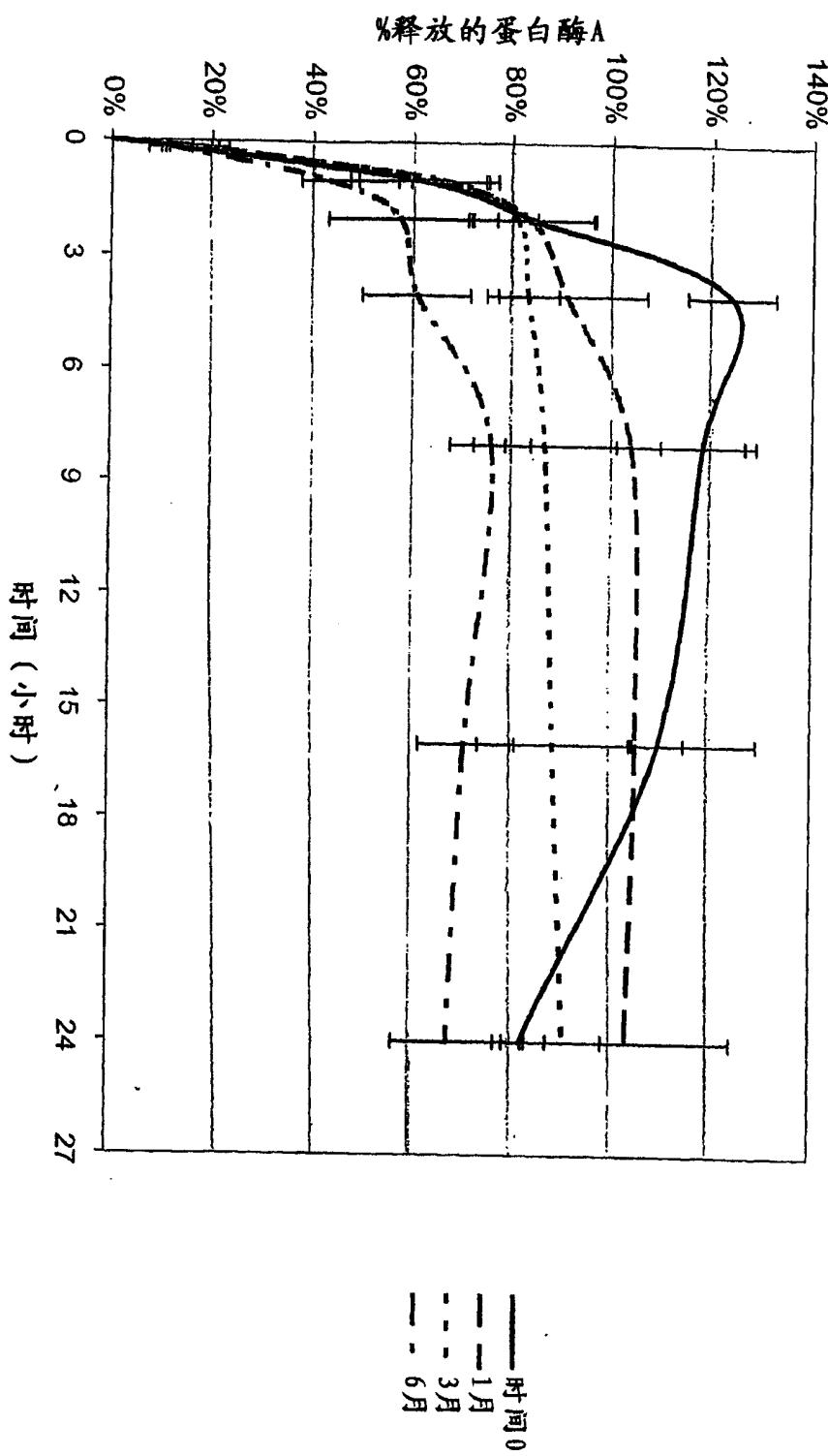


图 7

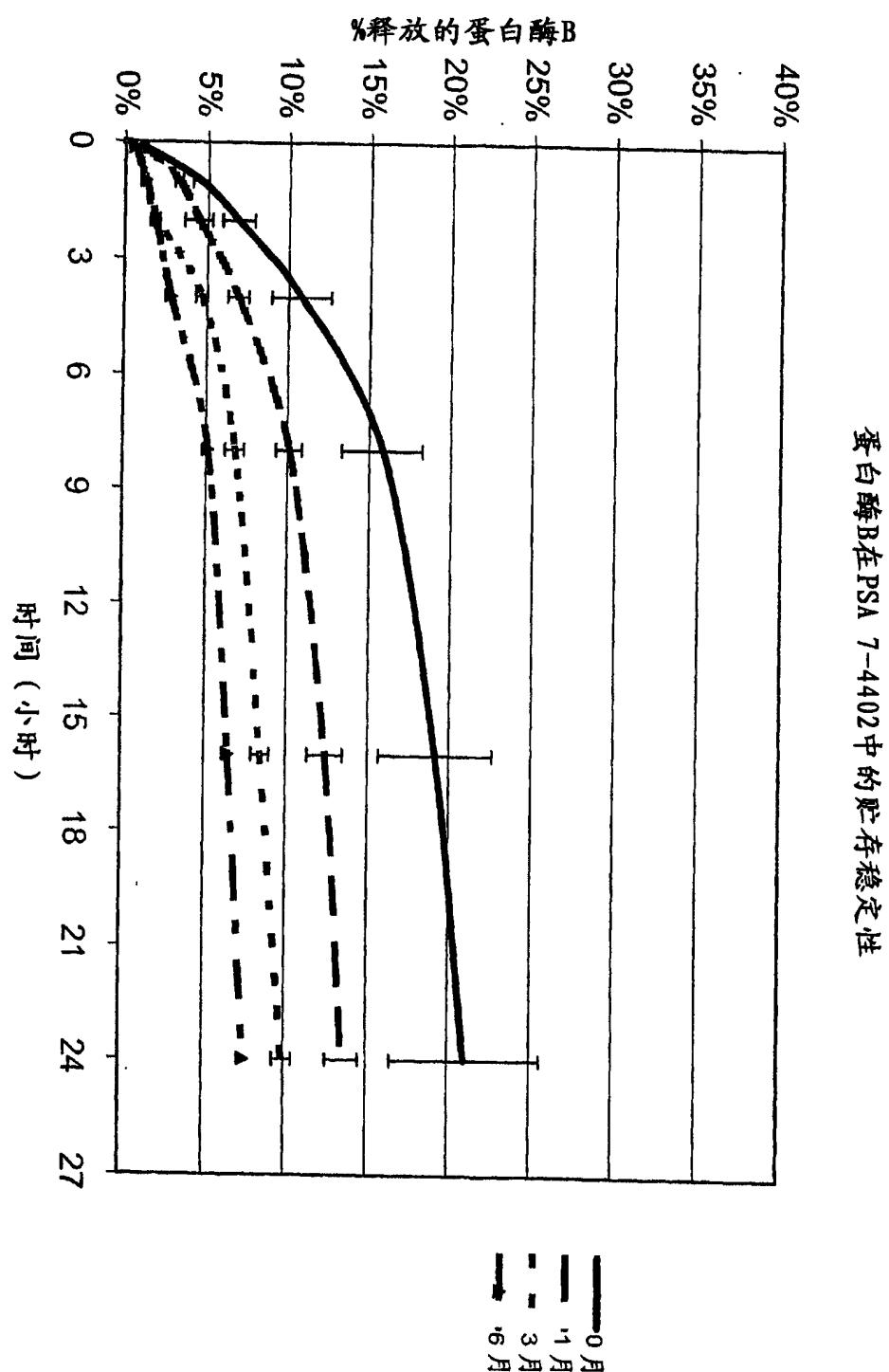


图 8

蛋白酶B在PSA 7-4401, 20wt%PVA中的稳定性

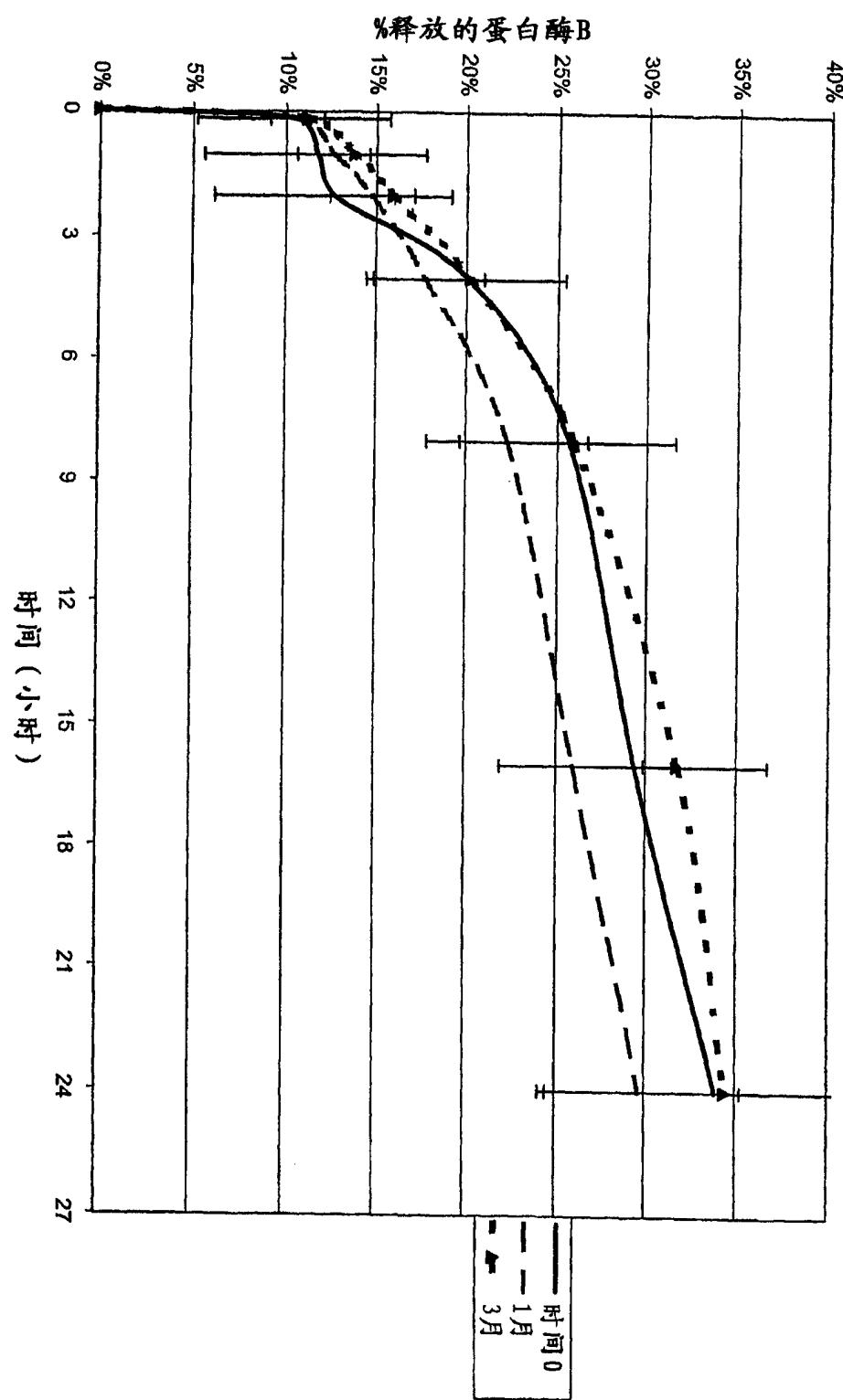


图 9

蛋白酶B在7-FC-410中的稳定性

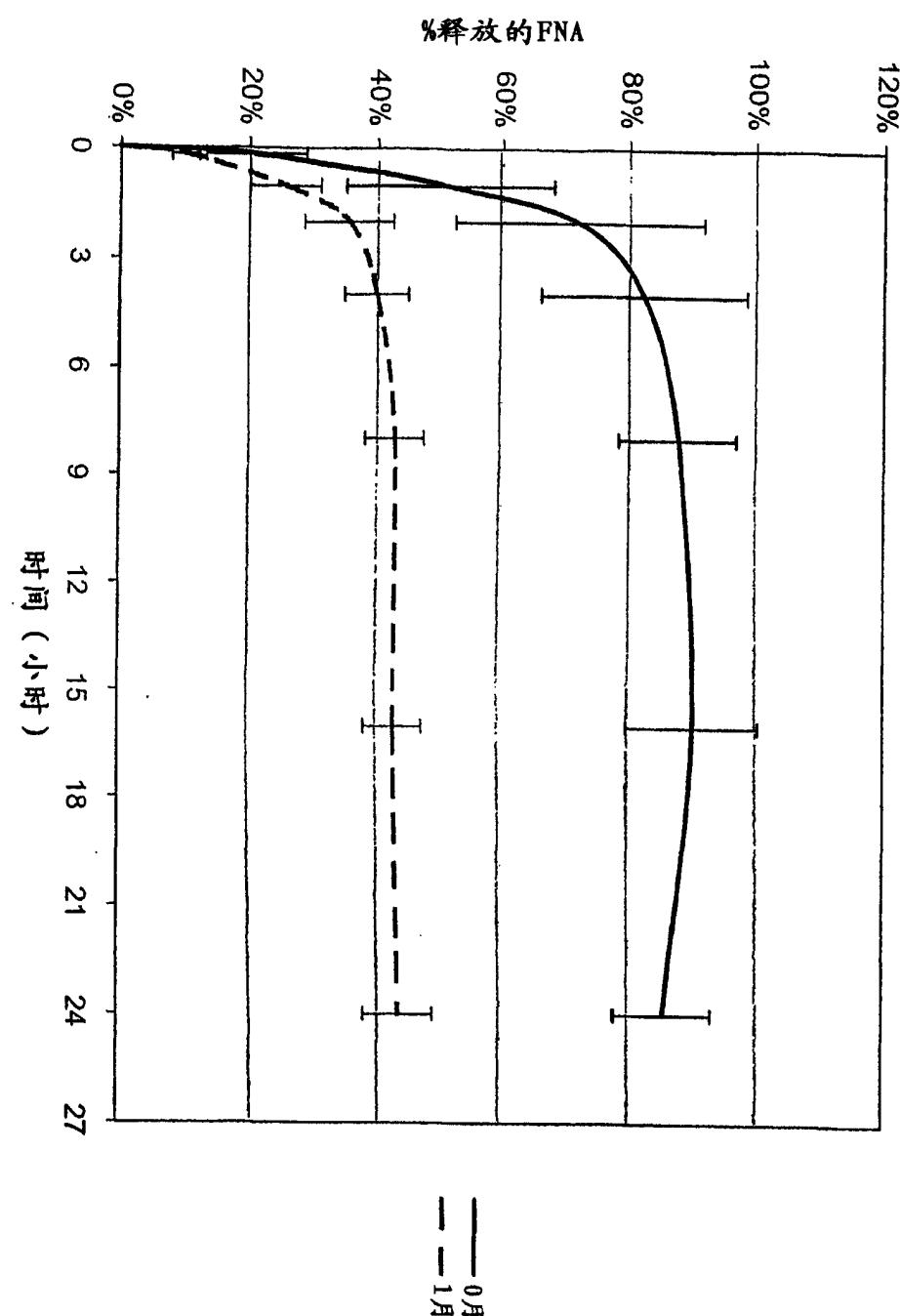


图 10