(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109416355 A
(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780034018.5

(22)申请日 2017.03.30

(30)优先权数据
62/315556 2016.03.30 US
62/315546 2016.03.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2017/000442 2017.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/168249 EN 2017.10.05

(71)申请人 定性酶诊断有限责任两合公司
地址 奥地利格拉茨
申请人 维也纳自然资源和生命科学大学
奥地利工业生物技术中心有限责任公司

(72)发明人 M.伯内特 A.海茵茨尔 E.西格尔 D.卢施尼特 C.加默里特 G.特格尔 G.居比茨

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 初明明 林毅斌

(51)Int.Cl.
G01N 33/52(2006.01)
G01N 21/78(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

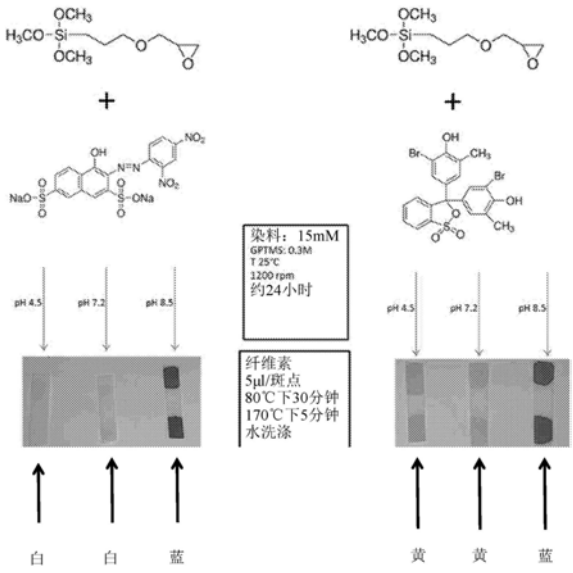
权利要求书5页 说明书68页 附图10页

(54)发明名称

检测伤口微生物感染

(57)摘要

所公开的技术涉及用于检测伤口，例如慢性伤口或感染伤口的化学实体，所述化学实体包含组合物、底物、试剂盒、敷料材料和制品，以及含有这类化合物的系统。所公开的技术进一步涉及在诊断测定中以及基于对特定部分和/或反应位点的酶促作用诊断和/或检测慢性或感染伤口中，使用这些组合物、试剂盒和系统的方法。额外的公开涉及基于多种标记物的表达表征伤口并使用这种信息治疗、管理和跟踪患有慢性或感染伤口的患者的方法。



CN 109416355 A

1.一种化学实体,其包括式I化合物:

A-I

式I

其中

A是锚;

I是指示剂区域。

2.根据权利要求1所述的化学实体,其中所述锚A通过共价相互作用与所述指示剂I共价关联以形成识别位点S。

3.根据权利要求2所述的化学实体,其中所述S对伤口特异性水解酶具有特异性。

4.根据权利要求1所述的化学实体,其中A包括多糖、纤维素、聚丙烯酸酯、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺、肽聚糖、或壳聚糖、或其单体、其低聚物、其衍生物、其混合物或组合。

5.根据权利要求4所述的化学实体,其中所述锚A包括壳聚糖、或其单体、其低聚物、其衍生物、其混合物或组合。

6.根据权利要求5所述的化学实体,其中所述壳聚糖的单体包括D-葡萄糖胺和N-乙酰基-D-葡萄糖胺、其低聚物、或其组合。

7.根据权利要求5所述的化学实体,其中所述壳聚糖包括至少两个单元的D-葡萄糖胺、N-乙酰基-D-葡萄糖胺或其组合。

8.根据权利要求5所述的化学实体,其中所述壳聚糖衍生物包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖、壳聚糖寡糖、羧甲基壳聚糖或羟烷基壳聚糖。

9.根据权利要求8所述的化学实体,其中所述壳聚糖衍生物包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖。

10.根据权利要求9所述的化学实体,其中所述壳聚糖衍生物是乙酰化壳聚糖,所述乙酰化壳聚糖包括约40%到约90%之间的乙酰化度(DA)。

11.根据权利要求9所述的化学实体,其中所述壳聚糖衍生物是乙酰化壳聚糖,所述乙酰化壳聚糖包括大于50%的乙酰化度(DA)。

12.根据权利要求9所述的化学实体,其中所述壳聚糖衍生物是卤代的。

13.根据权利要求5所述的化学实体,其中所述锚A包括壳聚糖化合物或其衍生物,所述衍生物选自由以下组成的组:壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖;寡-β-D-1,4-葡萄糖胺;乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷;N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc);葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$;乙酰基壳聚糖;壳二糖八乙酸酯;包括结构$(GlcNAc)_n$的壳寡糖,其中n=4、5或6;壳寡糖;2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷;2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷;其低聚物;或其组合。

14.根据权利要求1所述的化学实体,其中所述指示剂(I)或其中附着到所述锚的基序是糖苷酶的底物。

15.根据权利要求12所述的化学实体,其中所述指示剂(I)或其中附着到所述锚的基序是糖苷酶的底物,所述糖苷酶是溶菌酶。

16.根据权利要求15所述的化学实体,其中所述指示剂(I)或其中的基序附着到壳聚糖或其单体、其低聚物或其衍生物的1α-碳。

17.根据权利要求1所述的化学实体,其中所述指示剂包括含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的染料或含有二氯三嗪反应性基团的染料。

18.根据权利要求17所述的化学实体，其中含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的所述染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16或其组合。

19.根据权利要求17所述的化学实体，其中含有二氯三嗪反应性基团的所述染料是反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19或反应性棕10或其组合。

20.根据权利要求1所述的化学实体，其中所述指示剂包括选自由以下组成的组的可检测标记：发光分子、化学发光分子、荧光染料、荧光猝灭剂、脂质、有色分子、放射性同位素、闪烁剂、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、蛋白质A、蛋白质G、抗体或其片段、多组氨酸、Ni2+、Flag标签、myc标签、重金属和酶。

21.根据权利要求1所述的化学实体，其中所述锚A通过糖苷键直接与所述指示剂I缀合。

22.根据权利要求21所述的化学实体，其中所述锚包括选自由以下组成的组的化合物：壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖；寡-β-D-1,4-葡萄糖胺；乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)；葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$；乙酰基壳聚糖；壳二糖八乙酸酯；包括结构(GlcNAc)n的壳寡糖，其中n＝4、5或6；壳寡糖；2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷；2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；或其组合。

23.根据权利要求21所述的化学实体，其中所述指示剂选自由以下组成的组：反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16、反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10、或其组合。

24.根据权利要求1所述的化学实体，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉(Trichoderma reesei))的亲水性结合模块(CBM)或来自聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌(Alcaligenes faecalis))的疏水性结合模块(PDB)或其嵌合变体。

25.根据权利要求24所述的化学实体，其中所述锚包括纤维素或其衍生物或聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物。

26.根据权利要求25所述的化学实体，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性结合模块(CBM)，并且所述锚包括纤维素或其衍生物，，其中所述指示剂与所述锚亲水缔合。

27.根据权利要求24所述的化学实体，其中所述指示剂包括聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)，并且所述锚包括聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物，其中所述指示剂与所述锚疏水缔合。

28.一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分。

29.根据权利要求28所述的嵌合构建体，其中所述多核苷酸包括trxA基因。

30.根据权利要求28所述的嵌合构建体，其中所述间隔子包括多组氨酸标签。

31.根据权利要求28所述的嵌合构建体，其中所述间隔子包括六聚组氨酸(His6)标签。

32.根据权利要求28所述的嵌合构建体，所述嵌合构建体包括肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)。

33.根据权利要求28所述的嵌合构建体，所述嵌合构建体进一步包括elasub1序列。

34.根据权利要求28所述的嵌合构建体，其中所述elasub1序列位于所述肠激酶切割位点之后。

35.根据权利要求28所述的嵌合构建体,其中所述elasub1序列编码选自由以下组成的组的功能性氨基酸:半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸。

36.根据权利要求33所述的嵌合构建体,其进一步包括编码直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM)的核酸。

37.根据权利要求33所述的嵌合构建体,其进一步包括编码直接位于所述elasub1序列下游的疏水性粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)的核酸。

38.根据权利要求36所述的嵌合构建体,其进一步包括编码所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别的核酸。

39.根据权利要求37所述的嵌合构建体,其进一步包括编码所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别的核酸。

40.一种载体,其包括表达控制序列和根据权利要求37所述的嵌合构建体。

41.一种载体,其包括表达控制序列和根据权利要求38所述的嵌合构建体。

42.一种宿主细胞,其包括根据权利要求40所述的载体。

43.一种宿主细胞,其包括根据权利要求41所述的载体。

44.根据权利要求42所述的宿主细胞,其为细菌细胞或昆虫细胞。

45.根据权利要求43所述的宿主细胞,其为细菌细胞或昆虫细胞。

46.一种制备由嵌合构建体编码的蛋白质的方法,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码:

a.trxA(硫氧还蛋白)或其部分;

b.编码组氨酸标签的间隔子序列;

c.肠激酶切割位点或其部分;

d.所述肠激酶切割位点之后的elasub1序列;

e.直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM);以及

f.所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE识别位点和CatG识别位点,

包括在足以诱导所述嵌合构建体的表达的条件下培养根据权利要求42所述的宿主细胞并从所述细胞培养物中获得所述嵌合蛋白;并任选地通过His-标签亲和纯化法纯化所述构建体。

47.一种制备由嵌合构建体编码的蛋白质的方法,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码:

a.trxA(硫氧还蛋白)或其部分;

b.编码组氨酸标签的间隔子序列;

c.肠激酶切割位点或其部分;

d.所述肠激酶切割位点之后的elasub1序列;

e.直接位于所述elasub1序列下游的疏水性粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列;以及

f.所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE识别位点和CatG识别位点，

包括在足以诱导所述嵌合构建体的表达的条件下培养根据权利要求43所述的宿主细胞并从所述细胞培养物获得所述嵌合蛋白;并任选地通过His-标签亲和纯化法纯化所述构建体。

48.一种由根据权利要求37所述的嵌合构建体编码的多肽。

49.一种由根据权利要求38所述的嵌合构建体编码的多肽。

50.一种组合物,其包括根据权利要求48所述的多肽以及染料或标记。

51.一种组合物,其包括根据权利要求49所述的多肽以及染料或标记。

52.一种化学实体,其包括锚和根据权利要求48所述的多肽。

53.一种化学实体,其包括锚和根据权利要求49所述的多肽。

54.根据权利要求52所述的化学实体,其包括亲水锚,所述亲水锚包括纤维素或其衍生物。

55.根据权利要求53所述的化学实体,其包括疏水锚,所述疏水锚包括聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物。

56.一种用于确定生物样品中存在或不存在选自由HLE和CatG组成的组的酶的方法,所述方法包括使所述样品与根据权利要求50所述的组合物或根据权利要求52所述的化学实体接触;以及检测所述标记。

57.一种用于确定生物样品中存在或不存在选自由HLE和CatG组成的组的酶的方法,所述方法包括使所述样品与根据权利要求51所述的组合物或根据权利要求53所述的化学实体接触;以及检测所述标记。

58.一种用于诊断感染或慢性伤口的方法,所述方法包括使所述伤口与根据权利要求50所述的组合物或根据权利要求52所述的化学实体接触;以及检测所述标记。

59.一种用于诊断感染或慢性伤口的方法,所述方法包括使所述伤口与根据权利要求51所述的组合物或根据权利要求53所述的化学实体接触;以及检测所述标记。

60.根据权利要求58所述的方法,其包括通过视觉检查原位检测所述伤口。

61.根据权利要求59所述的方法,包括通过视觉检查原位检测所述伤口。

62.一种多肽,其包括以下列出的序列:

(a) X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)，

(b) X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)，

(c) X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3),或

(d) X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，

其中每个X独立地是任何氨基酸，

y各自独立地是0与200之间的整数，

L是连接部分,并且

Z包括可检测标记。

63.根据权利要求62所述的多肽,其中y各自独立地是1到50的整数。

64.根据权利要求62所述的多肽,其中y各自独立地是1到10的整数。

65.根据权利要求62所述的多肽,其中y各自独立地是1到6的整数。

66.根据权利要求62所述的多肽，其中所述多肽中的每一种包括所述序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，各自单独地对弹性蛋白酶不稳定。

67.根据权利要求62所述的多肽，其进一步包括胺保护基。

68.根据权利要求62所述的多肽，其进一步包括胺保护基，所述胺保护基是芴基甲氧基羰基(Fmoc)。

69.一种组合物，其包括根据权利要求62所述的多肽和载剂。

70.一种化学实体，其包括锚区域(A)和指示剂区域(I)，所述指示剂区域包括权利要求62的肽。

71.一种多肽序列，其包括

(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)，或

(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)中列出的氨基酸序列，

其中

X各自独立地是任何氨基酸；

y各自独立地是选自0到6的数字；

N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺；

N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸；

N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸；

N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸；并且

L是连接部分；并且

Z包括可检测标记。

72.根据权利要求71所述的多肽，其中y各自独立地是1到3的整数。

73.根据权利要求71所述的多肽，其中包括所述序列(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)的所述肽中的每个肽各自单独地对组织蛋白酶G不稳定。

74.根据权利要求71所述的多肽，其进一步包括胺保护基。

75.根据权利要求71所述的多肽，其进一步包括胺保护基，所述胺保护基是芴基甲氧基羰基(Fmoc)。

76.一种组合物，其包括根据权利要求71所述的多肽和载剂。

77.一种化学实体，其包括锚区域(A)和指示剂区域(I)，所述指示剂区域(I)包括权利要求71的肽。

检测伤口微生物感染

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年3月30日提交的美国临时申请号62/315,546和于2016年3月30日提交的美国62/315,556的权益,所述公开通过引用以其整体并入本文并成为其一部分。

技术领域

[0003] 本文描述的实施例总体上涉及伤口愈合,并且特别涉及用于检测和治疗伤口的组合物和方法。

背景技术

[0004] 在哺乳动物中,皮肤损伤引发有组织的复杂级联的细胞和生化事件,导致伤口愈合。伤口愈合是复杂的动态过程,可以恢复解剖学的连续性和功能:理想的愈合伤口是已经恢复正常解剖结构、功能和外观的伤口。典型的伤口通过由四个阶段组成的模型愈合-"渗出"阶段、增殖阶段、修复阶段和上皮成熟(Hatz等人,《伤口愈合和伤口管理(Wound Healing and Wound Management)》,斯普林格出版社,慕尼黑,1994年)或止血、炎症、增殖和重塑阶段(Nwomeh等人,《整形外科临床(Clin.Plast.Surg.)》1998,25,341)。炎症阶段对伤口愈合过程特别重要,其中伤口部位处的生化反应促进愈合,但也由于产生过量的蛋白酶而导致组织破坏。

[0005] 伤口感染导致愈合过程缓慢或停止。例如,伤口中的病原体可以产生毒素(例如,梭菌属物种),生成有害的代谢物,像提高pH的氨(例如,变形杆菌物种),激活或产生组织裂解酶如蛋白酶,或促进组织侵入,从而导致增加伤口的大小或严重程度。在最坏的情况下,病原体可能会离开伤口并导致脓毒症。

[0006] 为了保持对伤口慢性的检查,在临床和兽医环境中采用各种评估技术和/或工具。目前评估感染伤口的方法主要基于测定与伤口相关联的各种参数。例如,可以在视觉上评估伤口,可以进行长度和深度测量,可以在可用的情况下使用数字摄影以跟踪伤口的视觉状况和大小(Krasner等人,同上)。在临床实践中,感染的诊断基于对次要参数,如气味、局部疼痛的存在、热、肿胀、流出物和发红的测量。许多这些临床指标,如炎症和流出物,对伤口感染具有低预测价值。在其它情况下,可以使用实验室和/或临床诊断程序确定伤口部位处的致病菌群的一个或多个数量和一种或多种类型。在医院实验室擦拭伤口然后进行微生物学测试是确认细菌定植和鉴定与感染相关联的菌株的一种选择,从而允许处方正确的抗生素疗程。然而,此过程耗时且劳动强度大。感染诊断的延迟可以延迟抗生素的使用,并可能增加脓毒症的发生风险。

[0007] 与现有临床诊断相关联的最大缺点之一是与感染发作和检测时间相关联的滞后。例如,使用擦拭程序对感染的阳性鉴定通常取决于在伤口部位处获得微生物的"临界质量",并且因此在达到可检测水平之前不能进行早期检测。而且,拭子可能被周围组织的菌群污染,从而使诊断程序复杂化。其它缺点包含例如抽样误差、拭子传输的延迟、分析程序

中的错误和/或报告中的错误。参见Bowler等人的评论《临床微生物学评论(Clin Microbiol Rev.)》14(2):244-269,2001。

[0008] 因此,对于能够早期诊断临床感染的诊断试剂和方法存在迫切但未满足的需求,优选地,其允许在表现出感染的临床症状之前进行临床诊断。还存在对将有助于在临床症状出现之前预测伤口的临床感染的组合物和方法的需求。这种预兆辅助将允许在伤口恶化之前通过适当的治疗(例如,抗微生物治疗)进行早期干预,并且需要手术或其它剧烈干预以预防进一步感染。此外,如果临床医生能够尽可能早地对伤口感染做出反应,那么也可以用最少的抗生素使用来治疗感染。这将减少住院治疗的需要,并且例如由于与其它患病受试者接触而降低继发感染的风险。

发明内容

[0009] 本文所公开的技术提供了用于检测感染和/或慢性伤口的组合物和方法。所公开的技术通过以下方式改进现有测定:增加感染伤口检测的灵敏度、精确度和特异性;提供用于定性和定量测量的能力;以及,提高原位和实时检测感染伤口的速度。本文所描述的测定和方法部分地基于使用检测存在于感染或慢性伤口中的生物标记物和/或探针的具体试剂。检测过程可以涉及使用对感染伤口中,而不是非感染或非慢性伤口中存在的标记物特异性的试剂,并且检测步骤可以涉及当探针被标记物作用时生成的一个或多个信号的定性或定量测量。在其中检测方法涉及检测伤口中存在的酶的实施例中,探针包括对酶特异的修饰酶底物,所述修饰酶底物生成可以被任选地放大的信号。这极大地提高了检测的效率和特异性。此外,可以使用多种检测探针,每种检测探针特异于一种或多种靶标,例如对伤口特异的酶。这极大地有助于最大化诊断测定的效率和准确性,同时最小化假阳性的发生率(例如,由于非特异性相互作用和/或目标冗余)。更进一步,本文所公开的实验结果证实,新型探针和基于其的测定技术能够检测和表征各种类型的伤口。最后,所公开的技术的试剂可以与治疗分子如抗生素、抗真菌剂等一起使用,以监测和评估慢性伤口的治疗和管理。

[0010] 本文所描述的实施例部分地基于发现:免疫系统的细胞,包含由此生成的酶,可以在伤口的早期诊断中用作标记物。这些细胞,例如嗜中性粒细胞,在伤口部位处募集以对抗感染,通过吞噬细菌(和其它病原体)和/或用酶中和它们来实现。一些酶对蛋白质具有特异性(例如,弹性蛋白酶、组织蛋白酶G),其它酶对细胞壁组分(例如,溶菌酶)具有特异性,而其它酶则介导蛋白质变性(例如,NADPH氧化酶、黄嘌呤氧化酶、髓过氧化物酶(MPO)和其它过氧化物酶)。这些细胞,例如嗜中性粒细胞,通常只是短暂存活的,并且当它们在感染区域裂解时,它们释放其包含酶的溶酶体的内容物,然后可以检测所述酶以提供对伤口状态的可靠测量。

[0011] 因此,本文所描述的各种实施例利用酶标记物的检测,所述酶标记物指示在相关生物样品例如伤口组织中存在骨髓细胞和特别是嗜中性粒细胞。因此,这种酶在伤口流体中增加的水平或活性与增强的细菌挑战和有利于侵入性细菌的受干扰的宿主/细菌平衡的表现相对应。

[0012] 在一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚;并且I是指示剂区域。

[0013] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实

体，其中所述锚A通过共价相互作用与所述指示剂I共价关联以形成识别位点S。

[0014] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中所述锚A通过共价相互作用与所述指示剂I共价关联以形成识别位点S，并且其中所述识别位点(S)对伤口特异性水解酶是特异性的。在此实施例下，所述水解酶是糖苷酶或蛋白酶。特别是在此实施例下，所述蛋白酶是弹性蛋白酶、组织蛋白酶G或髓过氧化物酶。

[0015] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括多糖、纤维素、聚丙烯酸酯、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺、肽聚糖、或壳聚糖、或其单体、其低聚物、其衍生物、其混合物或组合。

[0016] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括壳聚糖、或其单体、其低聚物、其衍生物、其混合物或组合。

[0017] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括壳聚糖的单体，所述壳聚糖的单体包括D-葡萄糖胺或N-乙酰基-D-葡萄糖胺、其低聚物、或其组合。

[0018] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括至少两个单元的D-葡萄糖胺、N-乙酰基-D-葡萄糖胺或其组合。

[0019] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖、壳聚糖寡糖、羧甲基壳聚糖或羟烷基壳聚糖或其衍生物。

[0020] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖。

[0021] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖，其中所述乙酰化壳聚糖包括约40％到约90％之间的乙酰化度(DA)。

[0022] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖，其中所述乙酰化壳聚糖包括大于50％的乙酰化度(DA)。

[0023] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖，其中所述壳聚糖是卤代的。

[0024] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括壳聚糖、或其单体、其低聚物、其衍生物、其混合物或组合。

[0025] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚；并且I是指示剂区域，其中所述锚A包括壳聚糖化合物或其衍生物，所述衍生物选自由以下组成的组：壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖；寡-β-D-1,4葡萄糖胺；乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)；葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$；乙酰基壳聚糖；壳二糖八

乙酸酯;包括结构(GlcNAc)$_n$的壳寡糖,其中n＝4、5或6;壳寡糖;2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷;2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷;其低聚物;或其组合。

[0026] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)或其中的基序与所述锚缀合,并且所述缀合物是糖苷酶的底物。

[0027] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)或其中的基序与所述锚缀合,并且所述缀合物是糖苷酶的底物。

[0028] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)或其中的基序与所述锚缀合,并且所述缀合物是溶菌酶的底物。

[0029] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)或其中的基序通过壳聚糖或其单体、其低聚物或其衍生物的1α-碳处的糖苷键缀合到所述锚。

[0030] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)进一步包括含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的染料或含有二氯三嗪反应性基团的染料。

[0031] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)进一步包括染料,所述染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16或其组合。

[0032] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)进一步包括染料,所述染料是反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19或反应性棕10或其组合。

[0033] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,其中所述指示剂(I)包括选自由以下组成的组的可检测标记:发光分子、化学发光分子、荧光染料、荧光猝灭剂、脂质、有色分子、放射性同位素、闪烁剂、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、蛋白质A、蛋白质G、抗体或其片段、多组氨酸、Ni2+、Flag标签、myc标签、重金属和酶。

[0034] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,并且所述锚通过糖苷键直接与所述指示剂缀合。

[0035] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,并且所述锚通过糖苷键直接与所述指示剂缀合,其中所述锚包括选自由以下组成的组的化合物:壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖;寡-β-D-1,4葡萄糖胺;乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷;N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc);葡萄糖胺二聚体(GlcNAc)$_2$;乙酰基壳聚糖;壳二糖八乙酸酯;包括结构(GlcNAc)n的壳寡糖,其中n＝4、5或6;壳寡糖;2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷;2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷;或其组合。

[0036] 在另一个实施例中,本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体,其中A是锚并且I是指示剂区域,并且所述锚通过糖苷键直接与所述指示剂缀合,其中所述指示剂选自由以下组成的组:反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16、反应性

蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10、或其组合。

[0037] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，并且所述锚通过糖苷键直接与所述指示剂缀合，其中所述锚包括选自由以下组成的组的化合物：壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖；寡-β-D-1,4葡萄糖胺；乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)；葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$；乙酰基壳聚糖；壳二糖八乙酸酯；包括结构$(GlcNAc)_n$的壳寡糖，其中n＝4、5或6；壳寡糖；2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷；2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；或其组合；并且其中所述指示剂选自由以下组成的组：反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16、反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10、或其组合。

[0038] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性结合模块(CBM)或来自聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)的疏水性结合模块(PDB)或其嵌合变体。

[0039] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性结合模块(CBM)或来自聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)的疏水性结合模块(PDB)或其嵌合变体，其中所述锚包括纤维素或其衍生物或聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物。

[0040] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性结合模块(CBM)或来自聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)的疏水性结合模块(PDB)或其嵌合变体，其中所述锚包括纤维素或其衍生物或聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物。

[0041] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，其中所述指示剂包括来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性结合模块(CBM)或其嵌合变体，并且所述锚包括纤维素或其衍生物，，其中所述指示剂与所述锚亲水缔合。

[0042] 在另一个实施例中，本文所提供的是包括具有结构A-I(式I)的化合物的化学实体，其中A是锚并且I是指示剂区域，其中所述指示剂包括聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)，并且所述锚包括聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物，其中所述指示剂与所述锚疏水缔合。

[0043] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分。

[0044] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)基因、编码组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分。

[0045] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶

切割位点或其部分。特别是在此实施例下，所述间隔子序列编码六聚组氨酸(His6)标签。

[0046] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)。

[0047] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分的多核苷酸序列、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列。特别是在此实施例下，所述elasub1序列位于所述肠激酶切割位点之后。尤其是在此实施例下，所述elasub1序列编码选自由以下组成的组的功能性氨基酸：半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸。

[0048] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分的多核苷酸序列、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM)。

[0049] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列。

[0050] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM)，其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。

[0051] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分的多核苷酸序列、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列，其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。

[0052] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括表达控制序列的载体和一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分的多核苷酸序列、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM)，其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。

[0053] 在另一个实施例中，本文所提供的是一种包括表达控制序列的载体和一种包括多核苷酸序列的嵌合构建体，所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp

Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列,其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。

[0054] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种包括载体的宿主细胞,所述载体包括表达控制序列和包括多核苷酸序列的嵌合构建体,所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM),其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。特别是在此实施例下,所述宿主细胞是细菌细胞或昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0055] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种包括载体的宿主细胞,所述载体包括表达控制序列和包括多核苷酸序列的嵌合构建体,所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列,其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。特别是在此实施例下,所述宿主细胞是细菌细胞或昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0056] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种制备由嵌合构建体编码的蛋白质的方法,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码(a)trxA(硫氧还蛋白)或其部分;(b)编码组氨酸标签的间隔子序列;(c)肠激酶切割位点或其部分;(d)所述肠激酶切割位点之后的elasub1序列;(e)直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM);以及(f)所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE识别位点和CatG识别位点;包括在足以诱导所述嵌合构建体的表达的条件下培养包括所述嵌合构建体的宿主细胞并从所述细胞培养物获得所述嵌合蛋白;并任选地通过His-标签亲和纯化法纯化所述构建体。

[0057] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种制备由嵌合构建体编码的蛋白质的方法,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码(a)trxA(硫氧还蛋白)或其部分;(b)编码组氨酸标签的间隔子序列;(c)肠激酶切割位点或其部分;(d)所述肠激酶切割位点之后的elasub1序列;(e)直接位于所述elasub1序列下游的疏水性粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列;以及(f)所述elasub1序列中的HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE识别位点和CatG识别位点;包括在足以诱导所述嵌合构建体的表达的条件下培养包括所述嵌合构建体的宿主细胞并从所述细胞培养物获得所述嵌合蛋白;并任选地通过His-标签亲和纯化法纯化所述构建体。

[0058] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种由嵌合构建体编码的多肽,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的亲水性结合模块(CBM),其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。在此实施例下,本文所提供的是一种包括含有多肽

(“CBM多肽”)的CBM序列和染料或标记的组合物。在此实施例下,本文进一步所提供的是一种化学实体,所述化学实体包括锚和指示剂区域,所述指示剂区域包括包括所述CBM多肽和所述染料/标签的所述组合物。尤其是在此实施例下,本文所提供的是一种化学实体,所述化学实体包括锚和所述指示剂区域,所述锚是纤维素或其衍生物,并且所述指示剂区域包括包括所述CBM多肽和所述染料/标签的所述组合物。

[0059] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种由嵌合构建体编码的多肽,所述嵌合构建体包括多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码trxA(硫氧还蛋白)或其部分、编码聚组氨酸标签的间隔子序列和肠激酶切割位点或其部分以及肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)以及elasub1序列以及直接位于所述elasub1序列下游的粪产碱菌聚羟基链烷酸酯解聚酶(PDM)序列,其中所述elasub1序列包括编码HLE识别位点(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG识别位点(Ala-Ala-Pro-Phe)或HLE和CatG识别位点的核酸。在此实施例下,本文所提供的是一种包括含有多肽(“PDM多肽”)的PDM序列和染料或标记的组合物。在此实施例下,本文进一步所提供的是一种化学实体,所述化学实体包括锚和指示剂区域,所述指示剂区域包括包括所述PDM多肽和所述染料/标签的所述组合物。尤其是在此实施例下,本文所提供的是一种化学实体,所述化学实体包括锚和所述指示剂区域,所述锚是聚对苯二甲酸乙二醇酯或其衍生物,并且所述指示剂区域包括包括所述PDM多肽和所述染料/标签的所述组合物。

[0060] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种用于确定生物样品中存在或不存在选自由HLE和CatG组成的组的酶的方法,所述方法包括使所述生物样品与含有所述CBM多肽和所述染料/标签的所述组合物或化学实体接触,所述化学实体包括所述锚和包括所述CBM多肽和所述染料/标签的所述指示剂;以及检测所述标记。

[0061] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种用于确定生物样品中存在或不存在选自由HLE和CatG组成的组的酶的方法,所述方法包括使所述生物样品与含有所述PDM多肽和所述染料/标签的所述组合物或化学实体接触,所述化学实体包括所述锚和包括所述PDM多肽和所述染料/标签的所述指示剂;以及检测所述标记。

[0062] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种用于诊断感染或慢性伤口的方法,所述方法包括使所述伤口与含有所述CBM多肽和所述染料/标签的所述组合物或化学实体接触,所述化学实体包括所述锚和包括所述CBM多肽和所述染料/标签的所述指示剂;以及检测所述标记。在此实施例下,所述伤口存在于需要这种诊断的受试者例如人类受试者的组织例如皮肤组织中。特别是在此实施例下,所述检测是原位进行的。尤其是在此实施例下,基于所述染料的视觉和/或电子评估,所述诊断可以在多个时间点进行。

[0063] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种用于诊断感染或慢性伤口的方法,所述方法包括使所述伤口与含有所述PDM多肽和所述染料/标签的所述组合物或化学实体接触,所述化学实体包括所述锚和包括所述CBM多肽和所述染料/标签的所述指示剂;以及检测所述标记。在此实施例下,所述伤口存在于需要这种诊断的受试者例如人类受试者的组织例如皮肤组织中。特别是在此实施例下,所述检测是原位进行的。进一步,在此实施例下,基于所述染料的视觉和/或电子评估,所述诊断可以在多个时间点进行。

[0064] 在另一个实施例中,本文所提供的是一种用于治疗感染或慢性伤口的方法,所述方法包括使所述伤口与任何前述组合物接触,其中所述组合物包括至少一种抗生素和任选地愈合剂一起。在此实施例下,将被治疗的所述伤口存在于需要这种诊断的受试者例如人

类受试者的组织例如皮肤组织中。进一步，在此实施例下，所述伤口在原位治疗，并且可以伴有治疗前或治疗后诊断。

[0065] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是0与200之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0066] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是1与50之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0067] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是1与10之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0068] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是1与6之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0069] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是0与200之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记，其中所述多肽中的每一种包括所述序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，各自单独地对弹性蛋白酶不稳定。在此实施例下，所述多肽中的每种多肽可以任选地用胺保护基保护，例如胺保护基，所述胺保护基是芴基甲氧基羰基(Fmoc)。

[0070] 在一个实施例中，本文所提供的是一种组合物，所述组合物包括多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是0与200之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0071] 在一个实施例中，本文所提供的是一种化学实体，所述化学实体包括锚区域(A)和指示剂区域(I)，所述指示剂区域(I)包括多肽，所述多肽包括在(a)X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、(b)X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、(c)X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或(d)X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中列出的所述序列，其中每个X独立地是任何氨基酸，y各自独立地是0与200之间的整数，L是连接部分，并且Z包括可检测标记。

[0072] 在一个实施例中，本文所提供的是一种多肽，所述多肽包括在(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中列出的所述氨基酸序列，其中X各自独立地是任何氨基酸；y各自独立地是选自0到6的数字；N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷

氨酰胺;N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;L是连接部分;并且Z包括可检测标记。

[0073] 在一个实施例中,本文所提供的是一种多肽,所述多肽包括在(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中列出的所述氨基酸序列,其中X各自独立地是任何氨基酸;y各自独立地是选自1到3的数字;N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;L是连接部分;并且Z包括可检测标记。

[0074] 在一个实施例中,本文所提供的是一种多肽,所述多肽包括在(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中列出的所述氨基酸序列,其中X各自独立地是任何氨基酸;y各自独立地是选自0到6的数字;N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;L是连接部分;并且Z包括可检测标记,其中包括所述序列(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)的所述多肽各自单独地对组织蛋白酶G不稳定。在此实施例下,所述多肽中的每种多肽可以任选地用胺保护基保护,例如胺保护基,所述胺保护基是芴基甲氧基羰基(Fmoc)。

[0075] 在一个实施例中,本文所提供的是一种组合物,所述组合物包括多肽,所述多肽包括在(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中列出的所述氨基酸序列,其中X各自独立地是任何氨基酸;y各自独立地是选自0到6的数字;N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;L是连接部分;并且Z包括可检测标记和载剂。

[0076] 在一个实施例中,本文所提供的是一种化学实体,所述化学实体包括锚区域(A)和指示剂区域(I),所述指示剂区域(I)包括多肽,所述多肽包括在(a)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或(b)$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中列出的所述氨基酸序列,其中X各自独立地是任何氨基酸;y各自独立地是选自0到6的数字;N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;L是连接部分;并且Z包括可检测标记。

[0077] 应当理解,本领域技术人员从以下具体实施方式将容易明白本主题技术的其它实施例和构型,其中通过实例或说明的方式示出和描述了本主题技术的各种构型。应认识到,本主题技术能够具有其它的且不同的构型,并且其若干细节能够在其它不同方面进行修改,而全都不脱离本主题技术的范围。因此,附图和具体实施方式应在性质上被视为说明性的而非限制性的。

附图说明

[0078] 为了理解本公开,现在将参考附图通过实例的方式描述,所述附图中示出了本公开的实施例和实例,并且与下面的描述一起用于解释本公开的原理。

[0079] 图1:实例2的红外光谱。产生具有不同乙酰化度(DA)的壳聚糖衍生物,但仅进一步

使用具有48％的DA的物质。

[0080] 图2:实例2的红外光谱和NMR光谱。产生具有不同DA的壳聚糖衍生物,但仅进一步使用具有48％的DA的物质。

[0081] 图3:实例5的壳寡糖的红外光谱。

[0082] 图4:实例6的壳寡糖的红外光谱。

[0083] 图5:当与5000单位每mL溶菌酶一起孵育时,染料从染料缀合的乙酰基壳聚糖释放的时间过程。

[0084] 图6:(A)当壳聚糖具有不同浓度的染料缀合时,当与磷酸盐缓冲液中5000单位每mL溶菌酶一起孵育时,染料从染料缀合的乙酰基壳聚糖释放的时间过程;(B)当在含有2％蛋白质作为BSA的人造伤口流体的磷酸盐缓冲液中与5000单位每mL溶菌酶一起孵育时,染料从染料缀合的乙酰基壳聚糖释放的时间过程。

[0085] 图7:实例11的固定化硝嗪黄和溴甲酚紫的颜色响应根据制剂干燥的pH而变化。

[0086] 图8:不同染色程度的不同溶菌酶响应性染料释放的比较。

[0087] 图9:活性染料与PG之间比例的影响。

[0088] 图10:弹性蛋白酶响应性染料释放。

[0089] 图11:各种构建体的多序列比对。星号(*)指示身份;分号(:)指示保守取代;以及句号(.)指示半保守取代。

具体实施方式

[0090] 现在将在下文中更全面地描述各个方面。然而,这种方面可以以许多不同的形式实施,并且不应该被解释为限于本文列出的实施例;相反,提供这些实施例使得本公开全面和完整,并且将其范围全面地传达给本领域技术人员。

[0091] 贯穿本公开,引用了各种专利、专利申请和出版物。这些专利、专利申请和出版物的公开通过引用以其整体并入本公开,以便更全面地描述自本公开的日期起本领域技术人员已知的现有技术的状态。本公开将在所引用的专利、专利申请和出版物与本公开之间存在任何不一致的情况下进行管理。

[0092] I.定义

[0093] 在提供一系列值的情况下,旨在所述范围的上限与下限之间的每个中间值以及所述规定的范围中的任何其它规定的或中间值涵盖在本公开内。例如,如果规定了1μm到8μm的范围,则旨在还明确公开了2μm、3μm、4μm、5μm、6μm和7μm,以及大于或等于1μm的值的范围以及小于或等于8μm的值的范围。

[0094] 除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一”、“一个”和“所述”包含复数指示物。因此,例如,提及“聚合物”包含单一聚合物以及相同或不同的聚合物中的两种或更多种,提及“赋形剂”包含单一赋形剂以及相同或不同的赋形剂中的两种或更多种等等。

[0095] 紧接在数值之前的“约”字表示所述值的正或负10％的范围,例如,“约50”表示45到55,“约25,000”表示22,500到27,500等,除非本公开的上下文另有说明,或与这种解释不一致。例如,在如“约49、约50、约55等数值列表中,“约50”表示延伸到小于前一值与后续值之间的一个或多个间隔的一半的范围,例如,大于49.5到小于52.5。更进一步,鉴于本文提供的术语“约”的定义,应理解短语“小于约”值或“大于约”值。

[0096] “基本上”或“本质上”意指几乎完全或彻底，例如，一些给定量的80％到95％或更高，例如，至少85％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.9％，或更多％的重量或体积或所测量的任何其它参数。“基本上不含”是指几乎完全或彻底不存在一些给定量，如存在的水平低于一些给定量的约1％到约20％，例如小于10％、小于9％、小于8％、小于7％、小于6％、小于5％、小于4％、小于3％、小于2％、小于1％、小于0.5％、小于0.1％或更小％的重量或体积或所测量的任何其它参数。在一些实施例中，“基本上不含”是指存在的水平小于或等于药物组合物重量的1％到5％。

[0097] II.概述

[0098] 本文所提供的是用于治疗和诊断伤口和伤口管理的组合物和系统，其中所述组合物在使用时指示原位伤口中存在升高的酶水平。

[0099] 如本文所用，“伤口”是指组织结构的连续性或完整性的物理破坏。“伤口愈合”是指组织完整性的恢复。应该理解，这可以指组织完整性的部分或完全恢复。因此，伤口的治疗是指与伤口愈合过程相关联的一个或多个阶段或过程的促进、改善、进展、加速或其它进步。

[0100] 伤口可以是急性的或慢性的。慢性伤口，包含褥疮、静脉性腿部溃疡和糖尿病足溃疡，可以简单地描述为无法愈合的伤口。虽然慢性伤口的确切分子发病机理尚未完全了解，但承认它是多因素的。由于急性损伤期间驻留细胞和迁移细胞的正常响应受损，这些伤口表征为延长的炎症反应、伤口细胞外基质(ECM)重塑缺陷和再上皮化失败。

[0101] 伤口可以是任何内部伤口，例如，维持了皮肤的外部结构完整性的情况，如瘀伤或内部溃疡、或外部伤口，特别是皮肤伤口，并且因此组织可以是任何内部或外部身体组织。在一个实施例中，组织是皮肤(如人体皮肤)，即伤口是皮肤伤口，如皮肤或表皮伤口。

[0102] 人体皮肤由两个不同的层组成，表皮和真皮，其下方是皮下组织。皮肤的主要功能是为内部器官和组织提供保护，免受外部创伤和病原体感染，感觉和体温调节。大多数哺乳动物的皮肤组织结构类似。

[0103] 皮肤的最外层表皮约为0.04mm厚，是无血管的，由四种细胞类型(角质形成细胞、黑素细胞、朗格汉斯细胞和Merkel细胞)组成，并且分层成几个上皮细胞层。表皮的最内上皮层是基底膜，其与真皮直接接触并将表皮固定到真皮。皮肤中发生的所有上皮细胞分裂发生在基底膜处。细胞分裂之后，上皮细胞向表皮的外表面迁移。在此迁移期间，细胞经历称为角质化的过程，从而细胞核丢失，并且细胞转化为坚韧、平坦、抗性的非活细胞。当细胞到达最外层的表皮结构，角质层，所述角质层是有助于防止下面的组织干燥的干燥、防水的鳞状细胞层时，迁移就完成了。这层死亡的上皮细胞不断脱落，并被从基底膜移动到表面的角质化细胞取代。因为表皮上皮是无血管的，所以基底膜依赖于真皮的营养供应。

[0104] 真皮是高度血管化的组织层，为表皮供应营养。此外，真皮含有神经末梢、淋巴管、胶原蛋白和结缔组织。真皮约0.5mm厚，并且主要由成纤维细胞和巨噬细胞组成。这些细胞类型主要负责胶原蛋白的产生和维持，所述胶原蛋白是在所有动物结缔组织，包含皮肤中发现的蛋白质。胶原蛋白主要负责皮肤的弹性和柔性。在富含胶原蛋白的真皮下面发现的皮下组织为其上方的组织提供皮肤活动性、绝缘性、卡路里储存和血液。

[0105] 伤口可以分为两大类中的一种，部分厚度伤口或全厚度伤口。部分厚度伤口局限

于表皮和浅表真皮，对真皮血管没有损伤。全厚度伤口涉及真皮的破坏并延伸到更深的组织层，涉及真皮血管的破坏。通过上皮组织的简单再生发生部分厚度伤口的愈合。全厚度伤口的伤口愈合更复杂。本文设想的皮肤伤口可以是部分厚度或全厚度伤口。

[0106] 本文设想的伤口包含切口和裂伤、手术切口或伤口、穿刺、擦伤、刮伤、压迫伤口、磨伤、摩擦伤口(例如，尿布疹、摩擦水疱)、褥疮溃疡(例如，压力或褥疮)；热效应伤口(来自冷源和热源的烧伤，直接或通过传导、对流或辐射以及电源)，化学伤口(例如酸或碱烧伤)或致病性感染(例如，病毒、细菌或真菌)包含开放或完整的疖、皮疹、瑕疵和痤疮，溃疡、慢性伤口、(包含糖尿病相关联的伤口，如小腿和足部溃疡、静脉性腿部溃疡和褥疮)，皮肤移植/移植供体和受体部位，免疫反应条件，例如，牛皮癣和湿疹、胃或肠溃疡，口腔伤口，包含口腔溃疡、软骨或骨质受损、截肢伤口和角膜病变。

[0107] 化学实体及其组合物

[0108] 本文所描述的实施例提供化学实体，其可以用于诊断和/或治疗慢性伤口。如本文所述的化学实体及其组合物用于检测哺乳动物伤口中一种或多种酶的水平的方法中。在一些实施例中，如本文所述的化学实体及其组合物用于诊断哺乳动物中慢性伤口的方法中。在一些实施例中，本文所述的化学实体及其组合物用于诊断哺乳动物中感染伤口的方法中。在其它实施例中，本文所述的化学实体及其组合物用于治疗哺乳动物中伤口的方法中。在进一步的实施例中，本文所述的化学实体及其组合物用于治疗哺乳动物中感染或慢性伤口的方法中。

[0109] 在一个实施例中，本文所提供的是能够检测来自体液的酶活性的化学实体，所述化学实体包括：锚区域(A)和指示剂区域(I)。在此实施例下，化学实体具有基本化学结构A-I(式I)，其中A是锚区域，并且I是指示剂区域。

[0110] 在一些实施例中，锚区域(A)通过酶识别位点(S)与指示剂区域(I)缔合。在此实施例下，酶识别位点是允许与酶结合的结构或基序。

[0111] 在一个实施例中，酶识别位点(S)天然存在于锚区域中。在另一个实施例中，通过化学修饰将酶识别位点(S)引入锚区域中。交替地，酶识别位点(S)可以天然存在于指示剂区域(I)中或通过一种或多种化学修饰合成引入指示剂区域(I)中。

[0112] 在一个实施例中，式I的化学实体包括锚(A)，所述锚(A)与指示剂(I)共价或非共价缔合。特别地，锚区域(A)与指示剂区域(I)之间的缔合是通过共价相互作用介导的。如本领域所理解的，共价键涉及在键合的原子之间共享电子。相反，非共价键可以包含例如离子相互作用、静电相互作用、氢键相互作用、物理化学相互作用、范德华力、路易斯酸/路易斯碱相互作用或其组合。

[0113] 在一个实施例中，锚A通过共价相互作用与指示剂I缔合以形成识别位点S。在另一个实施例中，锚A通过共价相互作用与指示剂I缔合，所述共价相互作用不是识别位点S的一部分。

[0114] 在一些实施例中，化学实体进一步包括酶不稳定或酶反应性区域(R)。在一个实施例中，反应性区域(R)是锚区域的一部分。在另一个实施例中，反应性区域(R)是指示剂区域(I)的一部分。仍进一步，反应性区域(R)是酶识别位点(S)的一部分。

[0115] 在一个实施例中，反应性区域(R)与选自由以下组成的组的一种或多种靶酶相互作用：弹性蛋白酶、溶菌酶、组织蛋白酶G和髓过氧化物酶或其组合。

[0116] 锚区域(A)

[0117] 在式I的化学实体的一些实施例中，锚区域包括化合物，所述化合物是多糖、纤维素、聚丙烯酸酯、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺、肽聚糖或壳聚糖、或其单体、其衍生物、其混合物或组合。

[0118] 在一个实施例中，锚A包括化合物，所述化合物是壳聚糖或其单体、其衍生物、其混合物或组合。非共价键可以包含例如离子相互作用、静电相互作用、氢键酰基-D-葡萄糖胺(乙酰化单元)。因此，壳聚糖单体可以包括D-葡萄糖胺和N-乙酰基-D-葡萄糖胺。在另一个实施例中，壳聚糖可以包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或更多个单元的D-葡萄糖胺或N-乙酰基-D-葡萄糖胺或其组合。通常通过用碱性物质，例如氢氧化钠处理几丁质，并任选地水解各个单体单元之间的糖苷键来制造壳聚糖，包含其较短的片段。

[0119] 在另一个实施例中，锚A包括壳聚糖衍生物。示例壳聚糖或壳聚糖衍生物包含壳聚糖盐、水溶性壳聚糖、水溶性、随机取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖、壳聚糖寡糖、羧甲基壳聚糖和羟烷基壳聚糖。羟烷基、壳聚糖和羧甲基壳聚糖的羧甲基取代基的羟烷基取代基可以附接到几丁质或壳聚糖环亚基上的任何侧链氮或氧基团上。代表性的羟烷基壳聚糖包含但不限于羟乙基壳聚糖(也称为乙二醇壳聚糖)、羟丙基壳聚糖、二羟丙基壳聚糖、羟丁基壳聚糖和二羟丁基壳聚糖。

[0120] 在一个实施例中，壳聚糖衍生物是无规取代的部分N-、部分O-乙酰化壳聚糖。乙酰化壳聚糖衍生物通常通过乙酰化度或乙酰化程度来定义。如本领域所理解的，乙酰化度(DA)代表N-乙酰基-d-葡萄糖胺单元相对于壳聚糖分子中单元总数的比例。参见Chatelet等人，《生物材料(Biomaterials)》，22(3):261-8,2001。术语“脱乙酰度”是指水溶性壳聚糖或壳聚糖衍生物上游离氨基的百分比。可以从脱乙酰值计算N-乙酰化的百分比。术语N-乙酰化或O-乙酰化也称为在N或O上用C(O)CH_3取代的程度。如本领域所理解的，具有DA值大于50％N-乙酰化的壳聚糖衍生物有时被描述为几丁质。然而，术语“壳聚糖”在本文的整个公开中使用，包含壳聚糖，并且如果N-乙酰化大于50％，则包含几丁质。参见美国专利号7,683,039。

[0121] 在一个实施例中，壳聚糖衍生物具有至少约40％、约41％、约42％、约43％、约44％、约44％、约45％、约46％、约47％、约48％、约49％、约50％、约51％、约52％、约53％、约54％、约55％、约56％、约57％、约58％、约59％、约60％、约61％、约62％、约63％、约64％、约65％、约66％、约67％、约68％、约69％、约70％、约71％、约72％、约73％、约74％、约75％、约76％、约77％、约78％、约79％、约80％、约81％、约82％、约83％、约84％、约85％、约86％、约87％、约88％、约89％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或更高％，例如，约45％到95％之间，特别是约60％到约80％之间的DA。特别地，壳聚糖至少48％脱乙酰化，尤其是至少75％脱乙酰化。

[0122] 在一个实施例中，如本文所用的“壳聚糖衍生物”包含壳聚糖的盐、酰胺、酯、烯醇醚、烯醇酯、缩醛、缩酮、原酸酯、半缩醛、半缩酮、酸、碱、溶剂化物、水合物或前药。本领域技术人员可以使用用于这种衍生化的已知方法容易地制备这种衍生物。在某些实施例中，衍生物可以施用于动物或人，而没有实质的毒性作用，并且是药学活性的或是前药。美国专利号9,012,429;5,773,608;和3,911,116中描述了壳聚糖衍生物的代表性类型。

[0123] 在另一个实施例中，衍生物是聚合化合物的盐，例如Li^+、Na^+、K^+、Rb^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Sr^2

$^{+}$或Ba^{2+}的盐，优选地Na^{+}、K^{+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}。几丁质和壳聚糖的盐，如钠盐或钙盐，是本领域已知的。参见美国专利号5,599,916。

[0124] 在一些实施例中，衍生物锚化合物是卤化锚固化合物，例如卤化多糖、卤化纤维素、卤代聚丙烯酸酯、卤代聚乙烯亚胺、卤代聚丙烯酰胺、卤化肽聚糖或卤化壳聚糖、或其单体，例如卤代D-葡萄糖胺和/或卤代N-乙酰基-D-葡萄糖胺。卤素选自由Cl、Br、I组成的组；特别是，卤素是Cl。

[0125] 在一些实施例中，衍生化合物是锚固化合物的异构体。术语“异构体”包含具有相同的式但分子中原子的排列不同的化合物。在实施例中，化合物的异构体是化合物的“互变异构体”或“立体异构体”。术语“立体异构体”是指在一个或多个立体中心的手性方面不同的化合物。立体异构体包含对映异构体和非对映异构体。术语“互变异构体”是指质子位置不同的化合物的替代形式，如烯醇-酮和亚胺-烯胺互变异构体，或锚固化合物的互变异构形式。

[0126] 在一些实施例中，锚固化合物可以含有前述化合物中的一种或多种的组合或混合物。术语“组合”包含含有一种以上组分的化合物，其可以彼此缀合或非缀合。在一个实施例中，锚固化合物包括前述化合物中的一种或多种的组合，所述化合物例如通过共价或非共价相互作用彼此缀合。作为特定实例，锚可以包括壳聚糖和氧化纤维素的组合。参见美国专利申请出版物号2014/0045761。

[0127] 在一些实施例中，化合物包含上述聚合化合物的混合物。术语“混合物”是指两种或更多种物质混合在一起而不会发生它们将失去其各自属性的反应。例如，化合物A和化合物B的混合物可以含有化合物A和化合物B的任何重量比，使得混合物的总重量共计100％，例如，化合物A/化合物B99:1的重量比或化合物A/化合物B1:99的重量比。典型的混合物可以含有上述聚合物化合物中的约2种、3种、4种、5种或更多种。

[0128] 在一些实施例中，锚A进一步包括离子化学基团，具有亲水部分的材料，或具有疏水部分的材料，例如脂族链或脂族醇。在其中锚包括离子化学基团的实施例中，离子化学基团可以带正电荷或带负电荷。在一些实施例中，锚区域包括用于附接到支撑材料的共价，如光活性苯基叠氮化物或环氧基团，的反应性部分。参见美国专利申请出版物号2016/0159777。

[0129] 将反应性基团引入壳聚糖和/或其它糖苷化合物如多糖、纤维素、聚糖等的方法是本领域已知的。例如，美国专利号7,125,968公开了官能化的壳聚糖衍生物，所述衍生物包括几丁质/壳聚糖以及其中掺入了碳水化合物、光反应性官能团、两亲性基团，例如聚氧乙烯烷基醚和糖胺聚糖中的至少一种。这种技术可以用于衍生其它锚固化合物的类型。

[0130] 特别地，锚区域A包括壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖；寡-β-D-1,4葡萄糖胺；乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)；葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$；乙酰基壳聚糖；壳二糖八乙酸酯；包括结构$(GlcNAc)_n$的壳寡糖，其中n＝4、5或6；壳寡糖；2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷；2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；或其组合。

[0131] 指示剂

[0132] 在一些实施例中，化学实体包括一种或多种指示剂，例如，指示剂中的至少1种、至少2种、至少3种、至少4种或更多种。这种组合物可以包含，例如，与相同凝胶聚合物或不同凝胶聚合物缀合的多个底物。

[0133] 在某些实施例中，指示剂被标记。如本文所用，术语“标记物”是指附着于表位结合剂或其它底物材料的任何物质，其中所述物质是通过检测方法可检测的。合适标记物的非限制性实例包含发光分子、化学发光分子、荧光染料、荧光猝灭剂、有色分子、放射性同位素、闪烁剂、生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素、蛋白A、蛋白G、抗体或其片段、多组氨酸、Ni2+、Flag标签、myc标签、重金属和酶(包含碱性磷酸酶、过氧化物酶和荧光素酶)。实例中描述了用于将标记物附着到锚固化合物的方法。

[0134] 在某些实施例中，使用标记物对指示剂进行标记，所述标记物是可检测标记物。可检测标记物是部分，所述部分的存在可以直接或间接确定。通常，标记物的检测涉及产生可检测的信号，如例如能量的释放。标记物可以是化学、肽或核酸性质，尽管其不限于此。所使用的标记物的性质将取决于多种因素，包含正在进行的分析的性质、所使用的能量源和检测器的类型以及聚合物、分析物、探针和一级和二级分析物特异性结合伴侣的类型。

[0135] 在特定实施例中，标记物在空间上和化学上与其结合的成分，例如锚区域兼容。特别地，标记物的形状和大小不会妨碍酶识别位点(S)和/或酶反应区(R)。

[0136] 在一个实施例中，指示剂或其中附着于锚的基序是糖苷酶的底物。特别地，指示剂或其中附着于锚的基序是溶菌酶的底物。

[0137] 在另一个实施例中，指示剂或其中附着于锚的基序是选自由以下组成的组的蛋白酶的底物：弹性蛋白酶、组织蛋白酶G或髓过氧化物酶(MAO)、或其组合。

[0138] 在另一个实施例中，指示剂或其中附着于锚的基序是糖苷酶的底物，所述糖苷酶是选自由以下组成的组的溶菌酶和蛋白酶：弹性蛋白酶、组织蛋白酶G或髓过氧化物酶(MAO)、或其组合。

[0139] 在一个实施例中，指示剂(I)或其中附着于锚的基序是过氧化物酶底物、芳胺、氨基酚、氨基苯醚、吲哚氧基、中性染料、带电染料、纳米颗粒或胶体金颗粒。

[0140] 在一些实施例中，指示剂(I)或其中附着于锚的基序是过氧化物酶底物。在一些实施例中，过氧化物酶底物选自对氨基苯酚、ABTS(2,2-苯酚、ABTS(strate。在一些实施例中，酸)二铵盐)、3,3’-二氨基联苯胺、3,4二氨基苯甲酸、DCPIP、N,N-二甲基对苯二胺、邻联茴香胺、对苯二胺、4-氯-1-萘酚、邻苯二胺N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、3-氨基-9-乙基咔唑、4-氨基邻苯二甲酰肼、5-氨基水杨酸、2,2’-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、吲哚基、靛蓝、快蓝RR、4-氯-7-硝基苯并呋咱。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是芳基胺。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是氨基酚。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是氨基苯酚醚。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是吲哚氧基。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是中性染料。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是带电荷的染料。在一些实施例中，带电荷的染料选自雷莫唑亮蓝、甲苯胺蓝、反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5和反应性橙16、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中，带电荷的染料是雷玛唑亮蓝、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中，带电荷的染料是甲苯胺蓝。在一些实施例中，带电荷的染料是反应性黑5、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中，带电荷的染料是反应性紫5、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中，带电荷的染料是反应性橙16、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是基于二氯三嗪的反应性染料，如反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10。在一些实施例中，基于二氯三嗪的反应性染

料显现黑色。

[0141] 在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的反应性染料。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5。在一些实施例中，反应性染料是雷玛唑亮蓝。在一些实施例中，反应性染料是反应性紫5。在一些实施例中，反应性染料是反应性橙16。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝或反应性紫5。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5或雷玛唑亮蓝。

[0142] 在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是纳米颗粒。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是胶体金颗粒。在一些实施例中，指示剂(I)或与其附接的标记物是带电荷的染料、吲哚衍生物或鲁米诺衍生物。

[0143] 特别地，指示剂或其中附着于锚的基序包括含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团，例如反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16、或其组合的染料；或含有二氯三嗪反应性基团，例如反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10、或其组合的染料。

[0144] 锚-指示剂缀合

[0145] 在各种酶中，锚A，例如通过糖苷键直接与指示剂I缀合。缀合物的锚部分选自由以下组成的组：例如壳聚糖、N-乙酰基壳聚糖；寡-β-D-1,4葡萄糖胺；乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)；葡萄糖胺二聚体$(GlcNAc)_2$；乙酰基壳聚糖；壳二糖八乙酸酯；包括结构$(GlcNAc)_n$的壳寡糖，其中n＝4、5或6；壳寡糖；2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷；2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷；或其组合。同样，指示剂选自由以下组成的组：反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16、反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10、或其组合。在锚固化合物的羟基与指示剂化合物中的反应性基团之间形成糖苷键。为了模拟糖苷酶的天然底物，锚分子的糖骨架中的1α-碳参与糖苷键。

[0146] 标志物

[0147] 本文所述的实施例可以利用化学部分来测定慢性或感染伤口中存在的各种生物标志物。在一个实施例中，标志物是伤口特异性标志物，所述伤口特异性标志物是选自由以下组成的组的酶：水解酶、蛋白酶、酯酶和过氧化物酶。

[0148] 如本文所用，“伤口特异性酶”是在伤口中差异表达的酶。“差异表达”是指与其它位点，例如正常组织或周围组织相比，在伤口微环境中酶的水平或活性较高或较低。特别地，与正常或未受伤的组织相比，差异表达意味着在伤口微环境中酶的较高水平的表达或活性。可以通过常规手段分析酶的差异表达。例如，可以通过ELISA测定或其它免疫测定来分析样品中酶的水平。可以通过测量底物的损失速率和/或产物的形成速率来分析酶的活性，例如使用质谱分析或HPLC。这种技术是本领域已知的并且在实例部分中描述了。

[0149] 在一个实施例中，标志物是水解酶。如本文所用，“水解酶”或“水解酶”是催化化学键的水解的酶，例如酯酶和核酸酶(断裂酯键)；糖原酶(断裂糖苷键)；肽酶(断肽键)等。

[0150] 在一个具体实施例中，伤口特异性糖苷水解酶是溶菌酶。溶菌酶(UNIPROT登录号P61626[人]和P08905[小鼠])是糖苷水解酶，并且其主要功能是破坏细菌的细胞壁。它水解肽聚糖中N-乙酰胞壁酸与N-乙酰-D-葡萄糖胺残基之间的(1→4)-β-键，以及壳多糖中N-乙

酰-D-葡萄糖胺残基之间的(1→4)-β-键。溶菌酶的天然底物是细菌细胞壁的肽聚糖层。然而,包含胞壁质降解产物以及合成化合物的各种低分子量底物已经用于各种光度、同位素和免疫学溶菌酶测定。Höltje等人,EXS,75:105-10,1996。另见Sigma目录号M5639和Sigma目录号N8638。

[0151] 在一个实施例中,化学部分的各个组分已经适合于通过伤口特异性水解酶识别,例如伤口特异性溶菌酶。

[0152] 交替地或另外,可以修饰化学部分的各个组分用于由其它伤口特异性酶识别。在一个实施例中,额外的伤口特异性酶是蛋白酶。如本文所用,"伤口特异性蛋白酶"是在伤口中差异表达的蛋白酶。"差异表达"是指与其它位点,例如正常组织或周围组织相比,在伤口微环境中蛋白酶的水平或活性较高或较低。特别地,与未受伤的组织相比,差异表达意味着在伤口微环境中蛋白酶的较高水平的表达或活性。可以通过常规手段分析蛋白酶的差异表达。例如,可以通过ELISA测定或其它免疫测定来分析样品中蛋白酶的水平。可以通过测量肽底物的损失速率和/或产物的形成速率来分析蛋白酶的活性,例如使用质谱分析或HPLC。这种技术是本领域已知的并且在实例部分中描述了。

[0153] 在一个实施例中,伤口特异性蛋白酶是组织蛋白酶G(UNIPROT登录号P08311[人]和P28293[小鼠]),其是储存在天青蛋白颗粒中的胰凝乳蛋白酶家族的三种丝氨酸蛋白酶中的一种。组织蛋白酶G特异性底物具有序列Ala-Ala-Pro-Phe或Ala-Ala-Pro-Met(Sigma Aldrich目录号S7388和M7771)。

[0154] 在另一个实施例中,伤口特异性蛋白酶是弹性蛋白酶(例如,人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶或HNE)(UNIPROT登录号P08246[人]和Q3UP87[小鼠])。HNE是与胰凝乳蛋白酶在同一家族中的丝氨酸蛋白酶,并且具有广泛的底物特异性。在炎症期间由中性粒细胞和巨噬细胞分泌,它破坏细菌和宿主组织。在一个实施例中,用于检测HNE的底物具有核心序列丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-缬氨酸(AAPV)。在另一个实施例中,HNE的底物是Ala-Pro-Glu-Glu-Ile/Met-Arg-Arg-Gln(APEEI/MRRQ)(Kasperkiewicz等人,《美国科学院院刊(PNAS USA)》,111(7):2518-2523,2014;Korkmaz等人,《分子生物学方法(Methods Mol Biol.)》,844:125-138,2012)。

[0155] 仍在进一步实施例中,伤口特异性酶是过氧化物酶,更具体地说是髓过氧化物酶(MPO)。MPO(UNIPROT登录号P05164[人]和P11247[小鼠])是在中性粒细胞中发现的过氧化物酶。在过氧化氢(H2O2)和卤化物(最常见的氯化物)的存在下,它产生抗菌物质次氯酸盐、单线态氧(1O2)、氯(Cl2)和羟基自由基(OH•)。可以使用四甲基联苯胺或4-苯甲酰氨基-2,5-二甲氧基苯胺检测MPO。参见Andrews等人,《分析生物化学(Anal Biochem)》,127(2):346-50,1982;Klebanoff等人,《白细胞生物学杂志(J.Leukocyte Biol.)》,77,598-625,2005。

[0156] 酶识别位点(S)

[0157] 就本文所公开的实施例涉及伤口特异性标志物的特异性检测而言,本文公开了含有用于伤口特异性标志物的酶识别位点(S)的底物。因此,在一个实施例中,化学部分包括锚区域A或指示剂(I),所述指示剂(I)包括用于伤口特异性酶的识别位点,例如酶切割位点。

[0158] 在一个实施例中,酶识别位点包括糖苷键。如本文所用,在糖类(或衍生自糖类的

分子)的半缩醛或半缩酮基团与一些化合物,如醇的羟基之间形成“糖苷键”。含有糖苷键的物质是糖苷。术语“糖苷”现在扩展到还包涵在半缩醛(或半缩酮)糖基团与羟基以外的若干化学基团之间形成具有键的化合物,如-SR(硫代糖苷)、-SeR(氨基糖甙类)、-NR1R2(N-糖苷)、或甚至-CR1R2R3(C-糖苷)。

[0159] 在一个实施例中,本文所公开的化学部分含有一个或多个糖苷键,所述糖苷键被糖基化酶切割。在一个具体实施例中,化学部分包括直接或通过另一个基团连接锚A和指示剂I的糖苷键。特别地,锚A和指示剂I通过一个或多个糖苷键直接连接,在这种情况下,化学实体被糖原酶切割,并且因此可以用于检测糖原酶。

[0160] 在一个实施例中,指示剂分子包括酶促可切割的肽,所述肽包括肽键。如本文所用,“肽键”通过两个氨基酸之间的缩合反应形成,其中一个的酸部分与另一个的氨基部分反应以在两个氨基酸之间产生肽键(-CO-NH-)。单个肽提供了序列特异性蛋白酶识别的基序。如本文所用,术语“序列特异性蛋白酶”是指识别肽的特异性序列用于其消化的蛋白酶(例如,半胱天冬酶),并且区别于从其一端顺序分解肽或以序列非特异性方式消化肽的通用蛋白酶(例如,胰蛋白酶)。对于序列特异性,肽底物的氨基酸序列可以包括四个或更多个氨基酸(aa)残基。

[0161] 如本文所用,术语“肽”包含包括直链或支链氨基酸的天然肽、肽模拟物、以及其药学上可接受的盐。通常,肽包括多个氨基酸残基,例如,2、3、4、5、6、8、10或更多个氨基酸残基,其通过共价键,例如肽键彼此键合。“氨基酸残基”是指掺入本公开的肽中的各个氨基酸单元。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然存在的或合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸功能类似的氨基酸类似物、立体异构体和氨基酸模拟物。此定义包含天然氨基酸,如:(1)组氨酸(His)(2)异亮氨酸(Ile)(3)亮氨酸(Leu)(4)赖氨酸(Lys)(5)蛋氨酸(Met)(6)苯丙氨酸(Phe)(7)苏氨酸(Thr)(8)色氨酸(Trp)(9)缬氨酸(Val)(10)精氨酸(Arg)(11)半胱氨酸(Cys)(12)谷氨酰胺(Gln)(13)甘氨酸(Gly)(14)脯氨酸(Pro)(15)丝氨酸(Ser)(16)酪氨酸(Tyr)(17)丙氨酸(Ala)(18)天冬酰胺(Asn)(19)天冬氨酸(Asp)(20)谷氨酸(Glu)(21)硒代半胱氨酸(Sec);包含非天然氨基酸:(a)瓜氨酸;(b)胱氨酸;(c)氨基丁酸(GABA);(d)鸟氨酸;(f)茶氨酸和氨基酸衍生物,如甜菜碱;左旋肉碱;肌肽肌酸;羟色氨酸;羟脯氨酸;N-乙酰半胱氨酸;S-腺苷甲硫氨酸(SAM-e);牛磺酸;酪胺。其中,含有反应性侧链的氨基酸,例如半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸/天冬酰胺、谷氨酸/谷氨酰胺、甘氨酸、丙氨酸等,特别用于修饰底物。

[0162] 酶反应位点(R)

[0163] 在一些实施例中,化学实体含有一个或多个酶不稳定或酶反应性区域(R),用于检测伤口特异性酶。

[0164] 在一个实施例中,其中酶是糖苷酶如溶菌酶,酶不稳定或酶反应性区域包括至少3个葡萄糖胺或N-乙酰基葡萄糖胺或肽聚糖单元的酰基壳聚糖,所述酰基壳聚糖任选地被乙酰化。酶反应性位点可以含有,例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20或更多单位的葡萄糖胺或N-乙酰基葡萄糖胺或肽聚糖单元。在一个实施例中,R包括至少3个葡萄糖胺或N-乙酰基葡萄糖胺或其组合,其中葡萄糖胺和/或N-乙酰基葡萄糖胺任选地被乙酰化。在另一个实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括肽聚糖,其中肽聚糖任选地被乙酰化。

[0165] 在一些实施例中,化学部分包括上文公开的用于一种或多种伤口特异性蛋白酶的

酶反应性位点(R)，例如组织蛋白酶G和髓过氧化物酶、弹性蛋白酶或其组合。如本文所用，术语“用于蛋白酶的反应性位点”是指包括蛋白质的氨基酸序列的肽，其被蛋白酶识别为其蛋白酶活性的底物，例如作为可以被切割成一种或多种产品的底物。在一些实施例中，化学实体包括肽区，所述肽区包括包括多个氨基酸的肽序列。术语“多个”意指两个或更多个单元，例如氨基酸，尽管各个单元不需要在结构上和/或功能上不同。通常，化学实体的指示剂区域(I)包括用作伤口特异性蛋白酶的酶反应位点的肽。

[0166] 在一个实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括对弹性蛋白酶、组织蛋白酶G、髓过氧化物酶或其组合不稳定的肽。

[0167] 在一个实施例中，酶不稳定区域包括对弹性蛋白酶不稳定的肽。在此实施例下，弹性蛋白酶的发色指示剂将是高对比度的，并且因此当在医药产品中原位使用时用作清楚的指示剂。

[0168] 理想的底物将产生蓝色、紫色或深绿色。它也将固定在具有高周转率的空间允许位置。技术的现状正好相反。可用的底物含有对硝基苯酚基团，所述对硝基苯酚基团是低分子量但产生黄色可溶性发色团。大多数熟练的研究人员认为底物应该可溶于水，这是因为这是底物将进入活性位点的最可能方式。

[0169] 相反，本文所描述的实施例背离一般原理。设想弹性蛋白酶消化固相底物，即结构蛋白，根据定义，结构蛋白是不可溶的，因此必须适应对其特异的底物。这样，指示剂的颜色和它们可以采用的系统，例如电子检测，两者都适应伤口环境。

[0170] 因此，与采用可溶性底物的本领域教导相反，本文所述的实施例设想使用产生蓝色、紫色或绿色的低水溶性弹性蛋白酶底物。

[0171] 在一个实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽：

[0172] X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)，

[0173] 其中每个X独立地是任何氨基酸，

[0174] y各自独立地是0与200之间的整数，并且

[0175] Z包括可检测标记。

[0176] 在一个实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽：

[0177] X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)，

[0178] 其中每个X独立地是任何氨基酸，

[0179] y各自独立地是0与200之间的整数，并且

[0180] Z包括可检测标记。

[0181] 在另一个实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽：

[0182] $X_yAAP(V/F/A)X_y$-Z(SEQ ID NO:3)，

[0183] 其中每个X独立地是任何氨基酸，

[0184] y各自独立地是0与200之间的整数，并且

[0185] Z包括可检测标记。

[0186] 在又另一个实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽：

[0187] $X_yAAP(V/F/A)X_y$-L-Z(SEQ ID NO:4)，

[0188] 其中每个X独立地是任何氨基酸，

[0189] y各自独立地是0与200之间的整数，

[0190] L是连接部分，并且

[0191] Z包括可检测标记。

[0192] 在另一个具体实施例中，反应性区域R包括肽序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，其中X、L和Z各自如上所述，和y各自独立地是1到50的整数。

[0193] 仍在进一步实施例中，反应性区域R包括肽序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，其中X、L和Z各自如上所述，和y各自独立地是1到10的整数。

[0194] 特别地，反应性区域R包括肽序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，其中X、L和Z各自如上所述，和y各自独立地是1到6的整数。

[0195] 在一个实施例中，前述多肽中的每一个包括序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)，各自单独地对弹性蛋白酶不稳定。

[0196] 在一些实施例中，例如，用胺保护基团，例如，芴基甲氧基羰基(Fmoc)保护氨基酸序列X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)中氨基酸中的一个或多个。

[0197] 通常，弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f，其中

[0198] 在一个实施例中，

[0199] a选自：A、V、F、G、M、R、L

[0200] b选自：无氨基酸，或独立地P、F、A、R、L、G

[0201] g选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G

[0202] d选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G、V

[0203] e选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G、V、E

[0204] f选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G。

[0205] 在另一个实施例中，弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f，其中

[0206] a选自：A、V、F、G、M、R、L

[0207] b选自：无氨基酸，或独立地P、F、A、G

[0208] g选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G

[0209] d选自：无氨基酸，或独立地P、A、R、L、G、V

[0210] e选自：无氨基酸，或独立地P、A、G、V、E

[0211] f选自：无氨基酸，或独立地P、A、G。

[0212] 在另一个实施例中，弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f，其中

[0213] a选自：A、V、F、G、M、R、L

[0214] b选自：无氨基酸，或独立地P、F、A、G

[0215] g选自：无氨基酸，或独立地P、A、L、G

[0216] d选自：无氨基酸，或独立地P、A、L、G、V

[0217] e选自：无氨基酸，或独立地P、A、G、V、E

[0218] f选自：无氨基酸，或独立地P、A、G。

[0219] 在另一个实施例中,弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f,其中

[0220] a选自:A、V、F、G

[0221] b选自:无氨基酸,或独立地P、F、A、G

[0222] g选自:无氨基酸,或独立地P、A、G

[0223] d选自:无氨基酸,或独立地P、A、G,

[0224] e选自:无氨基酸,或独立地A、G、V,

[0225] f选自:无氨基酸,或独立地A、G。

[0226] 尤其,在另一个实施例中,弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f,其中

[0227] a选自:A、V、F

[0228] b选自:无氨基酸,或独立地P、F、A,

[0229] g选自:无氨基酸,或独立地A、G

[0230] d选自:无氨基酸,或独立地A、G,

[0231] e选自:无氨基酸,或独立地A、G,

[0232] f选自:无氨基酸,或独立地A、G。

[0233] 优选地,弹性蛋白酶底物具有式a-b-c-d-e-f,其中

[0234] a选自:A、V、F

[0235] b选自:无氨基酸,或独立地P、F、A,

[0236] g选自:无氨基酸,或独立地A,

[0237] d选自:无氨基酸,或独立地A,

[0238] e选自:无氨基酸,或独立地A,

[0239] f选自:无氨基酸,或独立地A。

[0240] 在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括对组织蛋白酶G不稳定的肽。

[0241] 在一个实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽:

[0242] $X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5),其中

[0243] X各自独立地是任何氨基酸;

[0244] y各自独立地是选自0到6的数字;

[0245] N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;

[0246] N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸;

[0247] N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸;

[0248] N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸;并且

[0249] Z包括可检测标记;并且肽对组织蛋白酶G不稳定。

[0250] 在一些实施例中,氨基酸序列中氨基酸中的一个或多个受到保护。在一些实施例中,氨基酸序列中氨基酸中的一个或多个受到fmoc基团保护。在一些实施例中,氨基酸序列中氨基酸中的一个受到fmoc基团保护。

[0251] 在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括包括以下氨基酸序列的肽:

[0252] $X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6),其中

[0253] X各自独立地是任何氨基酸;

[0254] y各自独立地是选自0到6的数字;

[0255] N^4选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺;

[0256] N^3选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、赖氨酸和丝氨酸；

[0257] N^2选自脯氨酸、丙氨酸和甘氨酸；

[0258] N^1选自丝氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、亮氨酸和蛋氨酸；并且

[0259] L是连接部分；并且

[0260] Z包括可检测标记。

[0261] 在一个实施例中，包括序列$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)和$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)的前述肽中的每个肽各自单独地对组织蛋白酶G不稳定。

[0262] 在一些实施例中，例如，用胺保护基团，例如，芴基甲氧基羰基(Fmoc)保护氨基酸序列$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)和$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID No:6)中氨基酸中的一个或多个。

[0263] 可检测标记物Z

[0264] 在一些实施例中，Z是过氧化物酶底物、芳胺、氨基酚、氨基苯醚、吲哚氧基、中性染料、带电荷染料、纳米颗粒或胶体金颗粒。

[0265] 在一些实施例中，Z是选自对氨基苯酚、ABTS(2,2苯酚、ABTS(s，过氧化物酶底物酸)二铵盐、3,3'-二氨基联苯胺、3,4二氨基苯甲酸、DCPIP、N,N-二甲基对苯二胺、邻联茴香胺、对苯二胺、4-氯-1-萘酚、邻苯二胺N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、3-氨基-9-乙基咔唑、4-氨基邻苯二甲酰肼、5-氨基水杨酸、2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、吲哚基、靛蓝、快蓝RR、4-氯-7-硝基苯并呋咱的过氧化物酶底物。

[0266] 在一些实施例中，Z是芳基胺、氨基酚、氨基苯酚醚、吲哚基、中性染料、选自雷玛唑亮蓝、甲苯胺蓝、反应性黑5、重氮亮蓝、反应性紫5和反应性橙16，或其水解或氨解衍生物的带电荷染料。特别地，Z是选自雷玛唑亮蓝的带电荷染料；甲苯胺蓝；反应性黑5或其水解或氨解衍生物。

[0267] 在一些实施例中，Z是基于二氯三嗪的反应性染料，如反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10。在一些实施例中，基于二氯三嗪的反应性染料显现黑色。在一些实施例中，Z是含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的反应性染料。

[0268] 在一些实施例中，Z是纳米颗粒。在一些实施例中，Z是胶体金颗粒。

[0269] 在一些实施例中，Z是带电荷的染料、吲哚衍生物或鲁米诺衍生物。

[0270] 在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括苯酚、氨基酚、氨基苯基醚、吲哚氧基或醌。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括苯酚。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括氨基酚。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括氨基酚醚。在一些实施例中，酶标记物或酶反应性区域包括吲哚氧基。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括醌。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域与髓过氧化物酶反应但不与血红素反应。

[0271] 在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括过氧化物酶底物、芳胺、氨基酚、中性染料、带电荷染料、纳米颗粒或胶体金颗粒。在一些实施例中，酶不稳定或酶反应性区域包括过氧化物酶底物。在一些实施例中，过氧化物酶底物选自对氨基苯酚、ABTS(2,2-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)3,3'-二氨基联苯胺、3,4二氨基苯甲酸、DCPIP、N,N-二甲基对苯二胺、邻联茴香胺、对苯二胺、4-氯-1-萘酚、邻苯二胺N-(4-(氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺、3-氨基-9-乙基咔唑、4-氨基邻苯二甲酰肼、5-氨基水杨酸、2,2'-连氮基-双

(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)和4-氯-7-硝基苯并呋咱、快蓝RR、N-(2-羟基)十四烷基-快蓝RR。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括芳胺。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括氨基酚。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括中性染料。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括带电荷的染料。在一些实施例中,带电荷的染料选自雷莫唑亮蓝、甲苯胺蓝、反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5和反应性橙16、或这些中的每一个的水解或氨解衍生物。在一些实施例中,带电荷的染料是雷玛唑亮蓝、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中,带电荷的染料是甲苯胺蓝。在一些实施例中,带电荷的染料是反应性黑5、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中,带电荷的染料是反应性紫5、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中,带电荷的染料是反应性橙16、或其水解或氨解衍生物。

[0272] 在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括基于二氯三嗪的反应性染料,如反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10。

[0273] 在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括纳米颗粒。在一些实施例中,Z是胶体金颗粒。

[0274] 在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括带电荷的染料、吲哚衍生物或鲁米诺衍生物。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括吲哚衍生物。在一些实施例中,酶不稳定或酶反应性区域包括鲁米诺衍生物。

[0275] 在一些实施例中,指示剂区域包括在正常环境照明中呈现可见的颜色变化的染料。在一些实施例中,染料与伤口产品具有对比色,其通常是红色、黄色或棕色。在进一步实施例中,染料是紫色、蓝色或深绿色。在一些实施例中,染料是紫色的。在一些实施例中,染料是蓝色的。在一些实施例中,染料是深绿色的。在一些实施例中,染料具有低分子量、带电荷、含有反应性或可连接基团、对γ辐射稳定、并且深色。在一些实施例中,染料选自cibracron系列染料、偶氮染料和雷玛唑染料、或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中,染料选自cibracron系列染料。在一些实施例中,染料选自偶氮染料。在一些实施例中,染料选自雷玛唑染料,或其水解或氨解衍生物。在一些实施例中,染料选自罗丹明、香豆素、花青、氧杂蒽、聚甲炔、芘、二吡咯甲烷二氟萘、萘二甲酰亚胺、藻胆蛋白、橄榄叶绿素蛋白、荧光素、6-FAM、罗丹明、德克萨斯红、加州红、iFluor594、四甲基罗丹明、羧基罗丹明、羧基罗丹明6F、羧醛、羧基罗丹明110、级联蓝、级联黄、香豆素、Cy2®、Cy3®、Cy3.5®、Cy5®、Cy5.5®、Cy7®、锡铬、DyLight 350、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 594、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、DyLight 750、DyLight 800、藻红蛋白、PerCP(红豆素叶绿素-a蛋白质)、PerCP-Cy5.5、JOE(6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基)、NED、ROX(5-(和-6-)-羧基-X-罗丹明)、HEX、萤光黄、玛丽娜蓝、俄勒冈州绿488、俄勒冈州绿500、俄勒冈州绿514、Alexa Fluor®350、AlexFluor®430、Alexa Fluor®488、AlexaFluor®532、AlexaFluor®546、AlexaFluor®568、AlexaFluor®594、Alexa Fluor®633、AlexaFluor®647、AlexaFluor®660、AlexaFluor®680、7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸、BODIPY® FL、BODIPY® FL-Br_2、BODIPY®530/550、BODIPY®558/568、BODIPY®630/650、BODIPY®650/665、BODIPY® R6G、BODIPY® TMR、BODIPY® TR和二甲基氨基偶氮苯磺酸(dabsyl),或其缀合物,或其组合。

[0276] 在一些实施例中,指示剂区域包括基于二氯三嗪的反应性染料,如反应性蓝4、反

应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10。在一些实施例中，基于二氯三嗪的反应性染料显现黑色。

[0277] 在一些实施例中，指示剂区域包括含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的反应性染料的反应产物。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5。在一些实施例中，反应性染料是雷玛唑亮蓝。在一些实施例中，反应性染料是反应性紫5。在一些实施例中，反应性染料是反应性橙16。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5、雷玛唑亮蓝或反应性紫5。在一些实施例中，反应性染料是反应性黑5或雷玛唑亮蓝。

[0278] 在一些实施例中，指示剂区域包括在正常环境照明中呈现颜色变化的颗粒(例如，胶体金属或量子点)。在一些实施例中，指示剂区域包括纳米颗粒。在一些实施例中，指示剂区域包括胶体金颗粒。

[0279] 在一些实施例中，指示剂区域包括在UV光下呈现可见的颜色变化的染料。在一些实施例中，指示剂区域包括荧光染料。在一些实施例中，指示剂区域包括发光的染料。

[0280] 在一些实施例中，指示剂区域包括酶反应性部分。在一些实施例中，酶反应性部分与辅助酶相互作用以产生肉眼可见或可通过电子手段检测的产物。在一些实施例中，酶反应性部分与辅助酶相互作用以产生肉眼可见的产物。在一些实施例中，酶反应性部分与辅助酶相互作用以产生可通过电子手段检测的产物。在一些实施例中，指示剂区域包括吲哚氧基糖苷，所述吲哚氧基糖苷根据所使用的末端糖被己糖胺酶、葡糖醛酸糖苷酶、葡糖苷酶或半乳糖苷酶切割，以产生靛蓝。在一些实施例中，指示剂区域包括被辅助酶氧化以产生可见产物的苯酚。在一些实施例中，指示剂区域包括被漆酶氧化以产生可见产物的苯酚。在一些实施例中，指示剂区域包括可通过电子手段检测的金属基序。在一些实施例中，指示剂区域包括可通过电子手段检测的二茂铁或二茂铁类似物。在一些实施例中，辅助酶选自脂肪酶、酯酶、己糖胺酶、过氧化物酶、氧化酶、糖苷酶、葡糖苷酶和漆酶。在一些实施例中，辅助酶不存在于伤口流体中。在一些实施例中，辅助酶存在于伤口流体中。在一些实施例中，酶反应性部分与辅助酶相互作用以产生在UV光下可见的产物。

[0281] 含有多个酶识别位点(S)和反应位点(R)的化学实体

[0282] 在进一步实施例中，本文公开了含有锚A、指示剂I的化学实体，其单独或一起包括多个酶识别位点(S)和酶反应基团(R)。通常，这种化学实体用于测定多种酶，例如包括至少一种蛋白酶和至少一种糖苷酶的组合。

[0283] 在一个实施例中，本文公开了含有锚A、指示剂I的化学实体，其单独或一起包括多个酶识别位点(S)和酶反应位点(R)，其中至少一个反应位点特异于糖苷酶，例如溶菌酶；并且至少一个酶反应位点对选自由以下组成的组的蛋白酶具有特异性：弹性蛋白酶、组织蛋白酶G、髓过氧化物酶或其组合。先前已经描述了这些酶的各个反应位点和识别位点。

[0284] 在一个实施例中，本文公开了含有锚A、指示剂I的化学实体，其单独或一起包括多个酶识别位点(S)和酶反应位点(R)，其中至少一个反应位点特异于糖苷酶，例如溶菌酶；并且至少一个酶反应位点对选自由弹性蛋白酶组成的组的蛋白酶具有特异性。先前已经描述了这些酶的各个反应位点和识别位点。

[0285] 在一个实施例中，本文公开了含有锚A、指示剂I的化学实体，其单独或一起包括多个酶识别位点(S)和酶反应位点(R)，其中至少一个反应位点特异于糖苷酶，例如溶菌酶；并

且至少一个酶反应位点对选自由组织蛋白酶G组成的组的蛋白酶具有特异性。先前已经描述了这些酶的各个反应位点和识别位点。

[0286] 在一个实施例中，本文公开了含有锚A、指示剂I的化学实体，其单独或一起包括多个酶识别位点(S)和酶反应位点(R)，其中至少一个反应位点特异于糖苷酶，例如溶菌酶；并且至少一个酶反应位点对选自由髓过氧化物酶(MPO)组成的组的蛋白酶具有特异性。先前已经描述了这些酶的各个反应位点和识别位点。

[0287] 由于使用酶底物的组合的较大的预测能力，可以设想与包括单一(例如，单一类型)的反应和识别地点的实体相比，如上所述，包括多个反应和识别位点的化学实体的诊断效用将大大增强。至少，包括多个反应/识别位点的实体将允许同时诊断至少2种、至少3种、至少4种或更多种标志物。举例来说，可以使用本文所公开的多重化学实体同时检测和监测伤口部位的溶酶体和蛋白酶活性。

[0288] 支撑材料

[0289] 在一些实施例中，化学实体的锚区域(A)将化学实体与支撑材料结合，例如，通过共价相互作用、离子相互作用、疏水相互作用、静电相互作用、氢键相互作用、物理化学相互作用、范德华力、路易斯酸/路易斯碱相互作用或其组合。

[0290] 在一些实施例中，支撑基质包括与抗体、配体或表位标签共价偶联的葡聚糖、琼脂糖、二氧化硅、合成聚合物或葡聚糖、琼脂糖、二氧化硅或合成聚合物。

[0291] 在一些实施例中，锚区域是聚苯乙烯珠、硅胶珠、多糖珠、聚丙烯酰胺珠、纤维素珠、多糖、衍生化纤维素、聚丙烯酸酯、聚乙烯亚胺、聚丙烯酰胺、UV可激活的反应性基团、肽聚糖或壳聚糖衍生物、或其组合。在一些实施例中，锚区域在短时段的UV照射之后结合到支撑材料。

[0292] 在一些实施例中，化学实体印刷在如滤纸或编织或非编织材料等支撑材料上或支撑材料中，所述滤纸或编织或非编织材料能够被伤口流体润湿并显示毛细管作用。在一些实施例中，报告实体或化学实体化学键合到如滤纸或编织或非编织材料等支撑材料上或支撑材料中，所述滤纸或编织或非编织材料能够被伤口流体润湿并显示所有尺寸类似的毛细管作用。在一些实施例中，化学实体离子结合到如滤纸或编织或非编织材料等支撑材料上或支撑材料中，所述滤纸或编织或非编织材料能够被伤口流体润湿并显示毛细管作用。在一些实施例中，化学实体共价结合到如滤纸或编织或非编织材料等支撑材料上或支撑材料中，所述滤纸或编织或非编织材料能够被伤口流体润湿并显示毛细管作用。支撑材料包含但不限于纤维素、聚酰胺、聚酯、聚丙烯酸酯和可用作纤维的其它类似聚合物。在一些实施例中，支撑材料是纤维素。在一些实施例中，支撑材料是聚酰胺。在一些实施例中，支撑材料是聚酯。在一些实施例中，支撑材料是聚丙烯酸酯。

[0293] 额外部分

[0294] 在一些情况下，伤口的pH可以影响伤口愈合的许多因素，如血管生成、蛋白酶活性、氧释放和细菌毒性。慢性不愈合伤口可能具有升高的碱性环境。随着伤口向愈合进展，伤口的pH移到中性，并且然后变为酸性。监测伤口的pH可以提供评估伤口的状况(例如，感染或无感染)的方法，并有助于确定伤口对治疗的反应。

[0295] 因此，在一些实施例中，用于检测伤口感染的化学实体包括指示剂区域，所述指示剂区域包括呈现可见的颜色变化的pH敏感性部分。在一个实施例中，pH敏感性部分在碱性

pH,例如pH＝7.2-9.5下呈现可见的颜色变化;pH＝7.2-9.0;pH＝7.2-8.5;pH＝7.2-8.0;pH＝7.5-8.5;pH＝7.5-9.0;pH＝8.0-9.0。在其它实施例中,pH敏感部分在pH＝7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4或9.5,或其0.1增量下呈现可见的颜色变化。

[0296] 在一些实施例中,pH敏感部分在中性pH范围下,例如,在pH＝6.9、7.0或7.1或其0.05增量下呈现可见的颜色变化。

[0297] 在一些实施例中,pH敏感部分在酸性pH,例如pH＝4.5-6.8下呈现可见的颜色变化;pH＝4.5-6.5;pH＝5.0-6.8;pH＝5.4-6.8;pH＝5.4-6.5。在其它实施例中,pH敏感部分在pH＝4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8或6.9,或其0.1增量下呈现可见的颜色变化。

[0298] 在一些实施例中,pH敏感部分选自由以下组成的组:溴百里酚蓝、酚红、溴酚红、氯酚红、百里酚蓝、溴甲酚绿、溴甲酚紫;硝嗪黄;和磺基酞菁染料或其组合。

[0299] 组合物:

[0300] 本文所述的实施例进一步涉及含有式I化合物的组合物。可以使用常规方法制备这种组合物。

[0301] 一旦配制,可以使用常规方法,例如使用载剂、胶凝剂、润肤剂、表面活性剂、保湿剂、粘度增强剂、乳化剂等,将所得式I化合物的储备组合物进一步修饰成所期望的形式,例如凝胶、香脂、乳液、乳膏、糊剂、软膏等。参见例如WO2013/004953。

[0302] 用于组合物中使用的载剂可以包含但不限于水、甘油、双甘油、甘油衍生物、二醇、二醇衍生物、糖、乙氧基化和/或丙氧基化酯和醚、尿素、PCA钠、醇、乙醇、异丙基酒精及其组合。在一个实施例中,载剂是丙二醇。通常,组合物含有组合物重量的约1%到组合物重量的约99.9%,更通常地,组合物重量的约2%到组合物重量的约95%,并且更通常地,组合物重量的约5%到组合物重量的约90%的量的载剂。

[0303] 将热可逆胶凝剂定义为在如50℃等高温下在亲水性载剂中可溶、部分可溶或可混溶的成分,其中所述试剂具有在冷却到25℃时使载体增稠的能力,但是当需要涂覆到基板时,将在50℃下粘度降低。合适的亲水性载剂包含水、二醇,例如丙二醇。用于组合物中使用的热可逆胶凝剂可以包含脂肪酸盐,如硬脂酸钠、棕榈酸钠、硬脂酸钾。这些盐可以加入到组合物,或者可以通过加入脂肪酸原位产生并用适当的碱中和。原位形成组合物的实例以提供硬脂酸和氢氧化钠以产生硬脂酸钠。其它常见的热可逆胶凝剂可以包含例如聚乙二醇和衍生物如PEG-20、PEG-150二硬脂酸酯、PEG-150季戊四醇四硬脂酸酯、distearеth-75IPDI、distearеth-100IPDI、脂肪醇,例如鲸蜡醇,脂肪酸如硬脂酸、羟基硬脂酸及其衍生物,及其组合。

[0304] 除载剂和热可逆胶凝剂外,组合物可以含有各种其它成分和组分。可以包含在组合物内的其它成分的实例是润肤剂、甾醇或甾醇衍生物、天然和合成脂肪或油、粘度增强剂、流变改性剂、多元醇、表面活性剂、醇、酯、硅氧烷、粘土、淀粉、纤维素、颗粒、保湿剂、成膜剂、滑爽改性剂、表面改性剂、皮肤保护剂、保湿剂、防晒剂等。

[0305] 药物组合物和/或制剂:

[0306] 本文所述的实施例进一步涉及包括前述式I化合物和载剂中的一种或多种的药物组合物和/或制剂。术语“药学上可接受的”在本文中用于指那些化合物,盐、组合物、剂型

等，它们在合理的医学判断范围内-适合用于与人体和/或其它哺乳动物的组织接触，没有过多的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。在一些方面，“药学上可接受的”意指由联邦或州政府的管理机构批准，或在美国药典或其它公认的药典中列出用于哺乳动物(例如动物)，并且更特别地，用于人类。

[0307] 可以通过本领域已知的任何合适手段制备药物组合物。这种组合物的实例包含适用于以下各项的那些：(a)局部施用，例如，制品(例如，纱布、垫、拭子、敷料)、乳膏、软膏、凝胶、洗剂等；(b)肠胃外给药，例如皮下、肌肉内或静脉内注射，作为无菌溶液或悬浮液；(c)口服给药，外用(例如浸液，包含水溶液和非水溶液或悬浮液)，片剂、大丸剂、粉末、颗粒、与饲料混合的颗粒、用于舌头的糊剂等。

[0308] 在某些实施例中，药物组合物可以包括一种或多种抗生素剂。如本文所用，术语“抗生素”或“抗微生物剂”是指抑制微生物的生长或破坏微生物的物质。优选地，抗生素在抑制感染因子的毒性和/或治疗传染病方面有用。抗生素还指半合成物质，其中由微生物，例如酵母或真菌产生的天然形式在结构上被修饰。

[0309] 优选地，抗生素选自由以下组成的组：β-内酰胺类(包含β-内酰胺酶抑制剂和头孢菌素类)、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类和/或甘氨酰环素和/或多粘菌素。也可以使用抗微生物剂的任何组合，例如，至少一种β-内酰胺和至少一种氟喹诺酮；至少一种氨基糖苷类和一种头孢菌素；至少一种β-内酰胺和一种β-内酰胺酶抑制剂，任选地与氨基糖苷类等一起使用。

[0310] 如本文所用，术语“β-内酰胺”抑制剂包含天然和半合成青霉素和青霉素衍生物，例如苄星青霉素、苄青霉素(青霉素G)、苯氧基甲基青霉素(青霉素V)、普鲁卡因青霉素和苯唑西林；甲氧西林，双氯西林和氟氯西林；莫西林；阿莫西林和氨苄青霉素；阿洛西林、羧苄青霉素、替卡西林、美洛西林和哌拉西林；比阿培南、多利培南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、帕尼培南和PZ-601；头孢氨苄、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢克洛、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢替坦、头孢西丁、头孢噻肟、和头孢泊肟；头孢吡肟和头孢匹罗；头孢羟氨苄、头孢克肟、头孢丙烯、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢吡肟和头孢匹罗；头孢西丁、头孢替坦、头孢美唑和氟罗沙芬；替吉莫南、诺卡杀菌素A和野火菌毒素；克拉维酸、拉氧头孢和氟氧头孢。氟喹诺酮类包含环丙沙星、加洛沙星、加替沙星、吉米沙星、左氧氟沙星和莫西沙星。氨基糖苷类包含，例如，卡那霉素、阿米卡星、妥布霉素、地贝卡星、庆大霉素、西索米星、奈替米星、新霉素B、新霉素C、新霉素E(巴龙霉素)和链霉素，包含合成衍生物克拉霉素和阿奇霉素。四环素包含天然存在的化合物(例如，四环素、金霉素、土霉素、去甲环素)或半合成剂(例如，莱美环素、美洛环素、甲基环素、米诺环素、吡咯烷甲基四环素)。甘氨酰环素(例如，米诺环素/替加环素)衍生自四环素。多粘菌素包含例如多粘菌素B和多粘菌素E(粘菌素)。

[0311] 在某些实施例中，组合物可以含有0.1mg/mL、0.5mg/L、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、7mg/mL、8mg/mL、9mg/mL、10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、13mg/mL、14mg/mL、15mg/mL、16mg/mL、17mg/mL、18mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、21mg/mL、22mg/mL、23mg/mL、24mg/mL、25mg/mL、26mg/mL、27mg/mL、28mg/mL、29mg/mL、30mg/mL、31mg/mL、32mg/mL、33mg/mL、34mg/mL、35mg/mL、36mg/mL、37mg/mL、38mg/mL、39mg/mL、40mg/mL、41mg/mL、42mg/mL、43mg/mL、44mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/m、90mg/mL、100mg/mL、

150mg/mL、200mg/mL、250mg/mL、300mg/mL、400mg/mL、500mg/mL或更多浓度下的抗生素。例如，亚胺培南和厄他培南可以以50、30、20、15、10、5和1mg/mL的浓度使用。

[0312] 伤口敷料：

[0313] 在某些实施例中，本文公开了包括如本文所述的伤口敷料材料的伤口敷料，例如式I的化合物。在一些实施例中，伤口敷料基本上由如本文所述的伤口敷料材料组成，例如式I的化合物。

[0314] 在一个实施例中，本文所公开的伤口敷料是生物相容的、可生物降解的、非免疫原性的并且易于商购。

[0315] 在一个实施例中，式I的化合物以颗粒的形式提供，如纤维颗粒或粉末颗粒，任选地含有药物。特别地，材料优选地含有CMC纤维。

[0316] 组合物可以优选地包括敷料材料和其它化合物的紧密混合物。例如，在一个实施例中，紧密混合物包括敷料材料和合适媒介物，如溶剂的混合溶液或分散体，或通过从这种溶液或分散体移除溶剂而产生的固体组合物。在此实施例下，敷料材料占材料重量的至少5％，更优选地至少10％、20％、30％、50％、75％、90％或更高。在某些优选实施例中，材料基本上由敷料材料组成。

[0317] 材料的其它组分可以包含0到25％重量，例如约1％到约20％重量的一种或多种其它生物相容性多糖，例如藻酸盐，如海藻酸钠或藻酸钙，淀粉衍生物如羟基乙酸淀粉钠，纤维素衍生物如甲基纤维素或羧甲基纤维素，或糖胺聚糖如透明质酸或其盐、硫酸软骨素或硫酸乙酰肝素。材料还可以包括多达约25％重量，例如约1％到约20％重量的一种或多种结构蛋白，所述结构蛋白选自由以下组成的组：纤连蛋白、纤维蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白及其混合物。优选地蛋白质包括胶原蛋白，并且更优选地其基本上由胶原蛋白组成。材料还可以包括多达约20％重量，优选地约2％到约10％重量的水。材料还可以含有0到40％重量，例如约5％到约25％重量的增塑剂，优选地多元醇如甘油或山梨糖醇。

[0318] 在某些实施例中，材料还可以包括多达约10％重量，例如约0.01％到约5％重量，通常约0.1％到约2％重量的一种或多种治疗性伤口愈合剂，如非甾体抗炎药(例如对乙酰胺基酚)、类固醇、局部麻醉剂、抗微生物剂或生长因子(例如成纤维细胞生长因子或血小板衍生生长因子)。抗微生物剂可以例如包括防腐剂、抗生素或其混合物。优选的抗生素包含四环素、青霉素、土霉素、红霉素、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、莫匹罗星、克林霉素及其混合物。优选的防腐剂包含银，所述银包含胶体银，银盐，所述银盐包含构成材料的阴离子聚合物的一种或多种的盐，磺胺嘧啶银、氯己定、聚维酮碘、三氯生、硫糖铝、季铵盐及其混合物。根据所公开的技术的这些含药伤口敷料材料在伤口敷料材料在使用中分解时提供治疗剂的持续释放。

[0319] 所有上述百分比均以干重计。优选地，伤口敷料材料与其它助剂和材料的重量比为约1:99到约99:1。更优选地，重量比在约1:9到约9:1的范围中，更优选地其在约4:1到约1:4的范围中，仍更优选地在约2:1到约1:2的范围中。

[0320] 材料可以是任何方便的形式，如粉末、微球、薄片、垫子或薄膜。

[0321] 在某些实施例中，材料是半固体或凝胶软膏的形式，用于局部施用。

[0322] 在某些实施例中，材料是冷冻干燥或溶剂干燥的可生物吸收海绵的形式，用于施用于慢性伤口。优选地，海绵的平均孔径在10μm到500μm的区域中，更优选地约100μm到300μ

m。已经通过冷冻干燥或溶剂干燥包括式I化合物的水性分散体以及合适的治疗剂一起制备合适的海绵。

[0323] 在又其它实施例中，材料是柔性薄膜的形式，其可以是连续的或中断的(例如穿孔的)。柔性薄膜优选地包括增塑剂以使其柔韧，如甘油。

[0324] 具有一系列可控属性的两种凝胶形成聚合物，例如纤维素衍生物的现成可用性意味着可以将所公开技术的组合物的属性控制到优越的程度。特别地，可以控制材料的生物吸收速率、孔隙率和密度。

[0325] 在一个实施例中，本文提供了片状伤口敷料材料，其包括包括式I化合物的组合物的活性层。活性层通常是使用中的伤口接触层，但在一些实施例中，它可以通过液体可渗透的顶片与伤口分离。在一个实施例中，活性层的面积为约1cm^{2}到约400cm^2，特别地约4cm^{2}到约100cm^2。

[0326] 在另一个实施例中，伤口敷料材料进一步包括背衬片，所述背衬片在活性层上方延伸，所述活性层与活性层的面向伤口侧相对。优选地，背衬片比活性层大，使得宽度为1mm到50mm，优选地5mm到20mm的边缘区域围绕活性层延伸，以形成所谓的岛状敷料。在这种情况下，背衬片优选地至少在其边缘区域涂有压敏医用级粘合剂。

[0327] 在其中敷料材料包括背衬片的实施例中，背衬片基本上是液体不可渗透的。在另一个实施例中，背衬片是半透性的，例如，背衬片优选地可渗透水蒸气，但不能渗透液态水或伤口渗出物。优选地，背衬片也是微生物不可渗透的。合适的连续贴合背衬片将在37.5℃下，100％到10％相对湿度差下优选地具有单独背衬片的湿气透过率(MVTR)300到5000g/m^2/24小时，优选地500到2000g/m^2/24小时。背衬片厚度优选地在10到1000微米的范围中，更优选地在100到500微米的范围中。

[0328] 用于形成背衬片的合适聚合物包含聚氨酯和聚烷氧基烷基丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯。优选地，背衬片包括主要闭孔的高密度封闭聚氨酯泡沫的连续层。合适的背衬片材料是聚氨酯薄膜。

[0329] 在包括包括粘合剂的背衬层的伤口敷料中，粘合剂层应该是湿气透过和/或图案化以允许水蒸气通过。粘合剂层优选地是常规用于岛型伤口敷料的连续湿气透过的压敏粘合剂层，例如基于丙烯酸酯共聚物、聚乙烯基乙醚和聚氨酯的压敏粘合剂。可以选择性地使用基于聚氨酯的压敏粘合剂。

[0330] 在另一个实施例中，敷料可以包括多层吸收制品的进一步的层，其可以构建在活性层与保护片之间。例如，这些层可以包括有孔塑料薄膜，以在使用中为活性层提供支撑，在这种情况下，薄膜中的孔优选地与水凝胶层中的孔对齐。

[0331] 仍进一步，在其它实施例中，敷料可以包括活性层与保护片之间的吸收层，尤其是如果敷料用于渗出伤口。任选的吸收层可以是常规用于吸收伤口愈合领域中的伤口流体、血清或血液的任何层，包含纱布、非织造织物、超吸收剂、水凝胶及其混合物。优选地，吸收层包括一层吸收泡沫，如开孔的亲水性聚氨酯泡沫。在其它实施例中，吸收层可以是非织造纤维网，例如粘胶短纤维的梳理网。

[0332] 在某些实施例中，伤口敷料可以通过可移除的覆盖片保护。覆盖片通常由柔性热塑性材料形成。合适的材料包含聚酯和聚烯烃。优选地，覆盖片的面向粘合剂的表面是释放表面。也就是说，仅对活性层微弱粘附的表面和背衬片上的粘合剂有助于水凝胶层从覆盖

片剥离。例如，覆盖片可以由如含氟聚合物的非粘附性塑料形成，或者其可以提供有释放涂层，如硅树脂或含氟聚合物释放涂层。

[0333] 在一个实施例中，伤口敷料是无菌的并包装在微生物不可渗透的容器中。

[0334] 试剂盒：

[0335] 在某些实施例中，所公开的技术提供试剂盒，所述试剂盒在一个或分开的隔室中包括式I的化合物，任选地与赋形剂、载剂或油一起。试剂盒可以进一步在一个或多个隔室中包括额外的成分，例如胶凝剂、润肤剂、表面活性剂、保湿剂、粘度增强剂、乳化剂等。试剂盒可以任选地包括用于配制用于诊断、检测或治疗伤口，例如慢性或感染伤口的制品的说明书。试剂盒还可以包括在伤口治疗中单独或一起使用组分的说明书。

[0336] 在相关实施例中，所公开的技术提供了包括包装和至少一个包括上述组合物的吸收制品(如上所述)的试剂盒。交替地，试剂盒可以单独包括各个组分，任选地与辅助信息一起包括在包装中或与包装一起使用。

[0337] 本文所公开的其它实施例涉及组合物用于制备用于治疗伤口的敷料的用途。优选地，伤口是慢性伤口，例如选自由以下组成的组的伤口：静脉溃疡、褥疮性溃疡和糖尿病性溃疡。

[0338] 表面：

[0339] 所公开技术的实施例进一步提供包括前述式I化合物的表面，其中报道分子或肽朝向以允许与伴侣，例如酶结合。优选地，表面是固体支撑的表面。许多不同的固体支撑物是本领域技术人员已知的。有用的固体支撑物包含天然聚合碳水化合物及其合成修饰的、交联的或取代的衍生物，如琼脂、琼脂糖、交联的海藻酸、取代和交联的瓜尔胶、纤维素酯、尤其是与硝酸和羧酸、混合纤维素酯和纤维素醚；含氮的天然聚合物，如蛋白质和衍生物，包含交联或改性明胶；天然碳氢化合物聚合物，如乳胶和橡胶；合成聚合物，其可以用合适的多孔结构制备，如乙烯基聚合物，包含聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯及其部分水解的衍生物、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、上述缩聚物的共聚物和三元共聚物，如聚酯、聚酰胺、和其它聚合物，如聚氨酯或聚环氧化物；多孔无机材料，如碱土金属和镁的硫酸盐或碳酸盐，包含硫酸钡、硫酸钙、碳酸钙、碱硅酸盐和碱土金属、铝和镁；以及氧化铝或氧化硅或水合物，如粘土、氧化铝、滑石、高岭土、沸石、硅胶或玻璃(这些材料可以用作上述聚合物材料的过滤器)；和上述类型的混合物或共聚物，如通过在预先存在的天然聚合物上初始化合成聚合物的聚合而获得的接枝共聚物。

[0340] 在一个实施例中，支撑物是阵列板的孔，例如微阵列。用于构建这种阵列的方法是本领域已知的，例如，Cao等人，《应用环境微生物学(Appl Environ Microbiol.)》，77(23)：8219-8225，2011。可以一式三份地点样每种式I化合物(或单独的肽指示剂)以消除由于阵列中物理缺陷的不规则数据。

[0341] 系统：

[0342] 所公开技术的实施例进一步提供包括前述组合物和/或试剂盒的诊断系统。

[0343] 可以以各种形式提供诊断系统的各种部件。例如，式I化合物(例如，含有肽报道分子的化合物)可以作为冻干试剂提供。这些冻干试剂可以在冻干之前预先混合，以便在重构时它们形成具有准备用于测定中的组分中的每种的适当比例的完全混合物。此外，所公开技术的诊断系统可以含有重构试剂，用于重构试剂盒的冻干试剂。

[0344] 核酸

[0345] 在一个实施例中，本文包含编码以下肽的核酸：

[0346] X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述。

[0347] 在另一个实施例中，本文包含编码用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段的多肽序列的核酸。

[0348] 在特定实施例中，本文包含编码表4(用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM_His、CatGSub1_CBM_His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM_His、CatGSub2_CBM_His)中列出的多肽序列或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段的核酸。

[0349] 如本文所用，短语“核酸”或“核酸序列”是指基因组或合成来源的DNA或RNA的寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或其任何片段，其可以是单链或双链的，并且可以代表有义链或反义链、肽核酸(PNA)、或任何DNA样或RNA样材料。在本文中，“片段”是指那些长度大于约10个核苷酸，并且最优选地长度为至少约40个核苷酸，至少约100个核苷酸或至少约300个核苷酸的核酸序列。

[0350] 本文所公开的实施例进一步涉及前述多核苷酸的变体。

[0351] 在一个实施例中，本文包含前述核酸的变体，所述核酸包括或者替代性地由例如，与编码以下肽的核酸具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的％同一性的核苷酸序列组成。X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述。

[0352] 在一个实施例中，本文包含前述核酸的变体，所述核酸包括或者替代性地由例如，与编码ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM His中的序列、或其互补链、或其RNA等同物、或其互补RNA等同物的核苷酸具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的％同一性的核苷酸序列组成。

[0353] 在相关实施例中，本文包含前述核酸的核苷酸序列变体，所述核酸包括或者替代性地由例如，与编码表4中列出的多肽序列(对于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM_His、CatGSub1_CBM_His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM_His、CatGSub2_CBM_His)或其互补链、或其RNA等同物、或其互补RNA等同物的核苷酸具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的％同一性的核苷酸序列组成。本领域技术人员可以使用常规软件，例如，三对一序列操作套件(其为每个输入的多肽序列生成三个潜在的核酸序列)，以到达编码核酸序列。三对一软件可以从生物信息学(dot)组织免费获得。

[0354] 短语“百分比同一性”或“％同一性”是指在两个或更多个氨基酸或核酸序列的比

较中发现的序列类似性的百分比。可以电子地确定同一性百分比，例如，通过使用MEGALIGN程序(LASERGENE软件包，DNASTAR)。MEGALIGN程序可以根据不同的方法在两个或更多个序列之间产生比对，例如Clustal方法。(Higgins，D.G.和P.M.Sharp(1988)《基因(Gene)》73:237-244.)Clustal算法通过检查所有对之间的距离将序列分组成簇。簇成对排列，并且然后成组排列。通过用序列A的长度减去序列A中的缺口残基数，减去序列B中的缺口残基数，除以总和，乘以一百来计算两个氨基酸序列，例如序列A和序列B，之间的百分比相似性，所述残基在序列A与序列B之间匹配。两个氨基酸序列之间的低同源性或无同源性的缺口不包含在确定百分比相似性中。核酸序列之间的同一性百分比也可以通过Clustal方法或本领域已知的其它方法计算，如Jotun Hein方法。(参见，例如，Hein，J.(1990)《酶学方法(Mehtods Enzymol.)》183:626-645.)序列之间的同一性也可以通过本领域已知的其它方法确定，例如通过改变杂交条件。

[0355] 在另一个实施例中，本文包含变体多核苷酸，其在严格杂交条件或较低严格条件下与一种或多种核酸分子杂交。如本文所用的术语“杂交”是指核酸链通过碱基配对与互补链结合的任何过程。例如，在高严格条件下的杂交可以在约37℃到42℃下的约50％甲酰胺中发生。在约30℃到35℃下，在约35％到25％甲酰胺的降低的严格条件下杂交可以发生。特别地，杂交可以在高严格条件下在42℃下在50％甲酰胺，5×SSPE，0.3％SDS和200μg/ml剪切和变性的鲑鱼精子DNA中发生。如上所述，杂交可以在降低的严格条件下发生，但在35℃的降低温度下在35％甲酰胺中发生。通过计算相关核酸的嘌呤与嘧啶的比率并相应地调节温度，可以进一步缩小对应于特定严格性水平的温度范围。上述范围和条件的变化在本领域中是公知的。

[0356] 如本文所用，术语“杂交复合物”是指通过在互补碱基之间形成氢键而在两个核酸序列之间形成的复合物。杂交复合物可以在溶液中形成或在溶液中存在的一个核酸序列与固定在固体支撑物上的另一个核酸序列(例如，纸、膜、滤膜、芯片、针或载玻片，或细胞或其核酸已经被固定的任何其它合适的底物)之间形成。

[0357] 在另一个实施例中，本文包含的变体是前述核酸的多核苷酸片段。

[0358] 本文还包含寡核苷酸，例如PCR引物，其与一种或多种核酸杂交。如本文所用，术语“寡核苷酸”是指至少约6个核苷酸到60个核苷酸，优选地约15到30个核苷酸，并且最优选地约20到25个核苷酸的核酸序列，其可以用于PCR扩增或杂交测定或微阵列中。如本文所用，术语“寡核苷酸”基本上等同于术语“扩增子”、“引物”、“寡聚物”和“探针”，因为这些术语在本领域中通常定义。

[0359] 本文还包含修饰的核酸，如PNA。如本文所用，“肽核酸”(PNA)是指反义分子或抗基因剂，其包括长度为至少约5个核苷酸的寡核苷酸，其与以赖氨酸结尾的氨基酸残基的肽主链连接。末端赖氨酸赋予组合物溶解性。PNA优先结合互补的单链DNA和RNA并阻止转录物延伸，并且可以被聚乙二醇化以延长它们在细胞中的寿命。(参见，例如，Nielsen，P.E.等人(1993)《抗癌药物设计(Anticancer Drug Des.)》8:53-63.)

[0360] 载体

[0361] 本文还包含含有上述核酸中的一种或多种的载体。在一个实施例中，载体包括至少一种编码核酸的蛋白质，例如编码用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、

ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段和/或其与一个或多个额外的序列可操作地连接的免疫原性片段的多肽序列的核酸。额外的序列本质上可以是合成的。如本文所用，术语“可操作地相关联”或“可操作地连接”是指功能相关的核酸序列。如果启动子控制编码的多肽的转录，则启动子与编码序列可操作地相关联或可操作地连接。虽然可操作地相关联或可操作地连接的核酸序列可以是连续的并且在阅读框架中，但是某些遗传元件，例如阻遏基因不与编码的多肽连续连接，但仍然与控制多肽表达的算子序列结合。

[0362] 密码子优化序列

[0363] 本文包含前述核酸序列和载体的密码子优化序列。用于在宿主细胞，例如细菌，如大肠杆菌或昆虫Hi5细胞中表达的密码子优化可以使用密码子优化工具(CodonOpt)常规进行，可以从爱荷华州，珊瑚村，集成DNA技术公司免费获得。

[0364] 宿主细胞

[0365] 本文包含含有上述核酸序列和载体的宿主细胞。在一个实施例中，宿主细胞能够在标准培养条件下重组表达载体中含有的基因序列以生成多肽产物，例如ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段的多肽序列的核酸。在一个具体实施例中，宿主细胞是大肠杆菌。

[0366] 多肽

[0367] 在一个实施例中，本文包含的是包括以下氨基酸序列的多肽：X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述。

[0368] 在另一个实施例中，本文包含用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段的多肽序列。

[0369] 在特定实施例中，本文包含表4(用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM_His、CatGSub1_CBM_His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM_His、CatGSub2_CBM_His)中列出的多肽序列或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段。

[0370] 在另一个实施例中，本文包含前述多肽的变体，所述多肽包括或者替代性地由例如，与以下多肽序列具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的％同一性的氨基酸序列组成：X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述。

[0371] 在另一个实施例中，本文包含变体多肽，所述变体多肽包括或者替代性地由例如，

与用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段的多肽序列具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、或更高的％同一性的氨基酸序列组成。特别地，片段包括用于本文所述的水解酶的酶识别位点(S)或酶反应性位点(R)的最小结构基序，例如溶菌酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶G、MAO或其组合。交替地或另外，片段肽是可以被抗体或其抗原结合结构域识别的免疫原性分子。

[0372] 同源物

[0373] 在另一个实施例中，本文包含前述肽和多核苷酸的同源物。如本文所用，术语“同源性”是指一定程度的互补性。可能存在部分同源性或完全同源性。“同一性”一词可以取代“同源”一词。至少部分抑制相同序列与靶核酸杂交的部分互补序列称为“基本上同源的”。可以在严格性降低的条件下使用杂交测定(Southern或northern杂交、溶液杂交等)检查完全互补序列与靶序列杂交的抑制。基本上同源的序列或杂交探针将在严格性降低的条件下竞争并抑制完全同源序列与靶序列的结合。这并不是说严格性降低的条件是允许非特异性结合的，因为降低的严格性条件要求两个序列彼此结合是特异性(即选择性)相互作用的。可以通过使用缺乏甚至部分程度互补(例如，小于约30％同源性或同一性)的第二靶序列来测试不存在非特异性结合。在不存在非特异性结合的情况下，基本上同源的序列或探针将不会与第二非互补靶序列杂交。

[0374] 突变体

[0375] 在另一个实施例中，本文包含变体肽，所述变体肽包括用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段的核心多肽序列中的突变。

[0376] 在一个实施例中，突变是1到3个氨基酸的取代、缺失、添加。优选地，突变不改变如此形成的突变肽中的酶识别位点。如果突变导致识别位点或切割位点的组合物发生变化，则设想突变是由于守恒的氨基酸取代，

[0377] 如本文所用，词语“插入”或“添加”是指氨基酸或核苷酸序列的变化，分别导致在天然存在的分子中发现的序列中添加一个或多个氨基酸残基或核苷酸。如本文所用，“取代”是指分别用不同的氨基酸或核苷酸替代一个或多个氨基酸或核苷酸。

[0378] 抗体

[0379] 本文所公开的实施例进一步包含与前述免疫原性肽中的一种或多种特异性结合的抗体。

[0380] 在一个实施例中，抗体结合到包括以下氨基酸序列的多肽：X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述。在另一个实施例中，抗体结合到这些多肽的片段。本文设想这种抗体的抗原结合片段，例如F(ab)结构域、$F(ab)_2$结构域、scFv结构域、包含合成生成

的抗体(使用例如相位展示技术)。

[0381] 在一个实施例中,抗体结合到用于ElaSub1_CBM、CatGSub1_CBM、ElaSub1_CBM His、CatGSub1_CBM His、ElaSub2_CBM、CatGSub2_CBM、ElaSub2_CBM His、CatGSub2_CBM His、ElaSub1_PDM、CatGSub1_PDM、ElaSub1_PDM His、CatGSub1_PDM His、ElaSub2_PDM、CatGSub2_PDM、ElaSub2_PDM His、CatGSub2_PDM或其酶可切割片段和/或其免疫原性片段的多肽序列。本文设想这种抗体的抗原结合片段,例如F(ab)结构域、$F(ab)_2$结构域、scFv结构域、包含合成生成的抗体(使用例如相位展示技术)。

[0382] 纯化的分子

[0383] 本文包含纯化的生物分子,例如核酸、蛋白质、肽和/或抗体分子,包含其缀合物。如本文所用,术语“基本上纯化的”是指从其天然环境中移除并被分离或分开的核酸、氨基酸或抗体,并且至少约60%不含,优选地约75%不含,并且最优选地约90%不含与它们天然相关联的其它组分。

[0384] 在本文所述的实施例中,可以通过与化学实体的各种组分,例如锚区域和/或指示剂区域组合来改变生物分子,使得与任何天然对应物相比,它们的形式和/或功能显著改变。

[0385] 制备式I化合物的方法:

[0386] 本文提供的实施例进一步涉及制备式I化合物的方法,包含其前体。术语“前体”包含用作反应物以生成中间产物或最终产物的任何化合物。

[0387] 在一个实施例中,本文提供制备包括结构A-I的式I化合物的方法,其中A是如上所述的锚,并且I是如上所述的指示剂,包括将锚与指示剂分子缀合,例如,通过共价键。在一个实施例中,锚或指示剂可以包括伤口特异性标记物的识别位点(S)或反应/不稳定位点(R),例如伤口特异性酶,如水解酶,并且更具体地,蛋白酶或糖苷酶,如前所述。在此实施例下,用于伤口特异性标记物的底物包括,例如,可水解的底物,例如氨基酸、糖、肽、多糖、核酸、脂质或其组合。

[0388] 在一个实施例中,锚通过肽键、糖苷键、酰胺键、酯键、醚键、酸酐键或类似键与报告分子缀合。如本文所用,“肽键”通过两个氨基酸之间的缩合反应形成,其中一个的酸部分与另一个的氨基部分反应以在两个氨基酸之间产生肽键(-CO-NH-)。在一个实施例中,用伤口特异性蛋白酶切割肽键,例如弹性蛋白酶、组织蛋白酶G或MAO,或其组合。如本文所用,在糖类(或衍生自糖类的分子)的半缩醛或半缩酮基团与一些化合物,如醇的羟基之间形成“糖苷键”。在一个实施例中,用伤口特异性糖苷酶,例如溶菌酶切割肽键。

[0389] 缀合反应性部分以生成糖苷、肽、酯、氧酯、酰胺、酰氨基、氧酰胺基、醚、磺酰基、亚磺酰基、磺酰胺或其它键如烷氧基、烷硫基、烷基氨基等的方法是本领域已知的,并且在实例中进一步描述。

[0390] 在另一个实施例中,本文提供制备包括结构A-I的式I化合物的方法,其中,A和I各自如前所述。

[0391] 在一个实施例中,A通过糖苷键与I缀合。

[0392] 在另一个实施例中,A通过亲水或疏水键与I缀合。

[0393] 在一个实施例中,通过首先将锚区域A与指示剂区域I缀合以生成式I化合物来合成具有结构A-I的式I化合物。

[0394] 在另一个实施例中，首先通过基因重组技术合成指示剂，例如，在合适的宿主细胞中表达编码指示剂区域的核酸，并将指示剂与锚区域结合。在此实施例下，在一个实例中，指示剂区域被设计成含有与锚区域结合的核酸序列，例如亲水地或疏水地。亲水性相互作用的一个代表性实例包括使用含有极性基团的锚，例如，部分脱乙酰化(例如，DA<30％)的壳聚糖、纤维素或羧甲基纤维素(或其衍生物)，其与来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性碳水化合物结合模块(CBM)相互作用。疏水性相互作用的另一个代表性实例包括使用含有非极性基团的锚，例如聚乙烯对苯二甲酸酯(或其衍生物)，其与或来自粪产碱菌聚羟基脂肪酸酯解聚酶(PDB)的疏水性结合模块相互作用。

[0395] 在一个实施例中，肽指示剂，例如包括以下氨基酸序列的多肽：X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述，(包含变体多肽)可以通过宿主细胞表达系统合成。这种方法可以包括，例如，生成编码前述多肽或变体中的一种或多种的构建体，将所述构建体置于合适的载体中，例如质粒载体或杆状病毒载体，用载体转染宿主细胞，例如大肠杆菌或昆虫Hi5细胞；在合适的条件下培养宿主细胞以允许表达所述载体；并任选地从培养物中纯化表达的多肽。

[0396] 在另一个实施例中，肽指示剂，例如包括以下氨基酸序列的多肽：X_yAAPX_y-Z(SEQ ID NO:1)、X_yAAPX_y-L-Z(SEQ ID NO:2)、X_yAAP(V/F/A)X_y-Z(SEQ ID NO:3)或X_yAAP(V/F/A)X_y-L-Z(SEQ ID NO:4)；$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-Z(SEQ ID NO:5)或$X_yN^4N^3N^2N^1X_y$-L-Z(SEQ ID NO:6)，其中X、N1、N2、N3、N4、L和Z各自如上所述(包含变体多肽)可以使用固相肽合成来合成(参见Merrifield等人，《美国化学协会期刊(J.Am.Chem.Soc.)》85(14):2149-2154)。

[0397] 仍进一步，可以在单个反应室或多个反应室中合成具有结构A-I的式I化合物。

[0398] 诊断和治疗方法：

[0399] 在一个实施例中，本文所述的组合物、敷料材料、制品、试剂盒和系统在诊断或治疗伤口，特别是慢性或感染伤口方面有用。尽管可以诊断和/或治疗任何类型的伤口，但是实施例特别适用于诊断和治疗渗出伤口液的伤口。例如，伤口可以是慢性或急性伤口。慢性伤口的代表性实例包含例如静脉溃疡、褥疮、褥疮性溃疡、糖尿病性溃疡和病因不明的慢性溃疡。急性伤口的代表性实例包含例如急性创伤性撕裂，可能由有意的手术切口引起。

[0400] 如本文所用，术语“伤口液”是指存在于伤口表面或通过抽吸、吸收或洗涤从伤口表面移除的任何伤口渗出物或其它流体(适当地基本上不包含血液)。在已经从患者体内移除的伤口液上适当地进行确定、测量或量化，但也可以在伤口液上原位进行。术语“伤口液”通常不是指远离伤口部位的血液或组织血浆。伤口液是哺乳动物伤口液，合适地是人体伤口液。

[0401] 在一个实施例中，诊断方法包括使伤口与包括式I或式II化合物的至少一种组合物接触，包括这种化合物的敷料材料，包括这种材料或化合物的制品，包括这种材料或化合物的试剂盒，或包括本文所述的这种材料或化合物的系统；并测量与伤口相关联的参数。在具体实施例中，测量的参数是伤口特异性水解酶的水平或活性。特别地，测量的参数是水解酶的活性。

[0402] 在前述实施例中，测量可以原位或非原位进行。如本文所用，术语“原位”是指在系

统或装置的上下文内存在或发生的过程、事件、对象或部件，包含周围环境，例如，与组合物、制品、系统或装置接触的生物材料。作为实例，原位反应可以指装置中存在的各种组分(例如，式I或式II化合物)的反应，包含由人类皮肤组织提供的组分(例如，含有酶的伤口渗出物)。术语与非原位形成对比，所述非原位是指环境之外。

[0403] 在第二实施例中，测量是非原位进行的，例如，从伤口移除流体以在所公开技术的设备或装置中进行分析。

[0404] 适当地，测量是原位进行的。

[0405] 在一个诊断实施例中，方法包括确定报道的水平，例如受伤口特异性酶作用的底物的产物。更具体地，方法包括确定水解酶产物的水平。如本文所用，术语“确定”包含测量所述水解酶的活性或水平的数值；确定活性或水平是否落入高于或低于预定的范围；和/或将活性或水平的数值与对照标准进行比较。对照标准可以包括确定从未受伤部位或从健康受试者获得的活检材料中水解酶的水平或活性。

[0406] 在一个具体实施例中，术语“确定”包括测量至少一种伤口特异性蛋白酶的参数(例如，活性或水平)，所述伤口特异性蛋白酶选自由以下组成的组：MMP-1(胶原酶)、MMP-2(明胶酶A)、MMP-3(溶基质素1)、MMP-8(中性粒细胞胶原酶)、MMP-9(明胶酶B)、人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)、组织蛋白酶G、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、溶菌酶、或其组合；确定所述参数是否超过第一预定阈值；和/或将参数的数值与对照标准进行比较。对照标准可以包括确定从未受伤部位或从健康受试者获得的活检材料中蛋白酶的参数。在相关实施例中，术语“确定”包括确定与多种前述蛋白酶相关联的参数的加权平均值(加权和)是否超过所述加权平均值的预定阈值。

[0407] 在一个特定实施例中，参数是伤口液中分析物(例如蛋白酶)的活性水平。通常，单个分析物的活性以术语单位/mL表达。

[0408] 在另一个实施例中，参数是伤口液中分析物(例如蛋白酶)的水平。通常，术语量也指示特定分析物的活性。

[0409] 当在本文中使用时，术语“组合量”或“组合活性”是指由将数学函数应用于多个值而产生的单个数值，例如对于多个单独分析物获得的那些量。例如，术语“组合量”或“组合活性”可以指一组单个值的总和或乘积。通常，术语“组合量”或“组合活性”涉及一组单个值的总和。例如，在合适的实施例中，弹性蛋白酶的量是指弹性蛋白酶样活性(例如，U/mL)，并且金属蛋白酶(MMP)的量是指相应分析物的总浓度(例如，以ng/mL计)。

[0410] 当在本文中使用时，术语“定量”是指在实验误差的范围内测量样品中一种或多种特定分析物或一种或多种底物的绝对数量。

[0411] 术语“标记物”或“分析物”是指使用本文定义的设备、装置、试剂盒或方法鉴定或确定的任何化学实体。由所公开技术的设备、装置、试剂盒或方法确定或鉴定的标记物或分析物是前述酶的裂解产物。

[0412] 当在本文中使用时，术语“预定范围”是指技术人员将理解的数据范围或简档指示患者的特定亚类。例如，预定范围可以是对特定伤口治疗，如抗生素治疗响应良好的伤口的典型数据范围或简档。替代性地，预定范围可以适当地指对于特定伤口治疗，如抗生素治疗不能很好地响应的伤口的典型数据范围。

[0413] 当在本文中使用时，术语“预定阈值”是指技术人员基于对已知愈合和不愈合伤口

确定的水平的统计分析来确定指示不愈合伤口的最小水平，例如如以上进一步解释的。为使测试临床有用，应该将阈值设定在适当的水平，以便正确鉴定具有高蛋白酶活性的不愈合伤口。增加阈值将增加仅有不愈合伤口超过阈值的机率。然而，如果阈值太高，则将无法鉴定由于高水平的蛋白酶而不愈合的伤口，并且临床上这将意味着它们将不会接受所需的蛋白酶调节治疗。

[0414] 当在本文中使用时，术语“对照标准”或“对照”是指可以用作参考或比较的数据集或简档，以便定义或标准化另一个数据点或数据集。例如，术语“对照”或“对照标准”可以是指示患者的特定子类的数据集或简档。适当地，对照标准可以是指示愈合或不愈合伤口状态的数据集或简档。

[0415] 适当地，在所公开技术的其它方面或实施例中，“对照”或“对照标准”可以是可以用作比较工具的数据集或简档，以允许技术人员确定伤口是否可能对伤口治疗有反应或无反应，如抗生素治疗。在一个实施例中，对照标准是指示对伤口治疗反应不佳的患者的数据集或简档。通常，对照标准是指示对伤口治疗反应良好的患者的数据集或简档。如本文所公开的倾向于对伤口治疗反应良好的患者表现出比不易对治疗反应良好的患者较低的水解酶组合量或活性。例如，如本文所公开的倾向于对伤口治疗反应良好的患者表现出至少一种伤口特异性水解酶的较低组合量。

[0416] 在一个实施例中，阈值人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶活性为约5U/mL到约30U/mL，包含其间的所有值，例如约6U/mL、约7U/mL、约8U/mL、约9U/mL、约10U/mL、约11U/mL、约12U/mL、约13U/mL、约14U/mL、约15U/mL、约16U/mL、约17U/mL、约18U/mL、约19U/mL、约20U/mL、约21U/mL、约22U/mL、约23U/mL、约24U/mL、约25U/mL或更多，指示慢性伤口感染。

[0417] 在一个具体实施例中，至少9.6的阈值人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶活性水平指示慢性伤口感染。在一些实施例中，至少22.9U/mL的人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶活性水平指示慢性伤口感染。

[0418] 在一个实施例中，约1000U/mL到约10000U/mL的阈值溶菌酶活性水平，包含其间的所有值，例如约1100U/mL、约1200U/mL、约1300U/mL、约1400U/mL、约1500U/mL、约1600U/mL、约1700U/mL、约1800U/mL、约1900U/mL、约2000U/mL、约2100U/mL、约2200U/mL、约2300U/mL、约2400U/mL、约2500U/mL、约2600U/mL、约2700U/mL、约2800U/mL、约2900U/mL、约3000U/mL、约3250U/mL、约3500U/mL、约3750U/mL、约4000U/mL、约4250U/mL、约4500U/mL、约4750U/mL、约5000U/mL、约5250U/mL、约5500U/mL、约5750U/mL、约6000U/mL或更多，指示慢性伤口感染。在一个具体实施例中，至少4800U/mL的溶菌酶活性水平指示慢性伤口感染。

[0419] 在一个实施例中，约10U/mL到约100U/mL的阈值组织蛋白酶G活性水平，包含其间的所有值，例如约15U/mL、约20U/mL、约25U/mL、约30U/mL、约35U/mL、约40U/mL、约45U/mL、约50U/mL、约55U/mL、约60U/mL、约65U/mL、约70U/mL、约75U/mL、约80U/mL、约85U/mL、约90U/mL、约95U/mL、约100U/mL、约110U/mL、约120U/mL或更多，指示慢性伤口感染。在一些实施例中，至少50U/mL、至少40U/mL、至少30U/mL、至少20U/mL、至少15U/mL或至少10U/mL的组织蛋白酶G活性水平指示慢性伤口感染。

[0420] 本文所公开的实施例进一步涉及使用本文所述的组合物、材料、制品、敷料、试剂盒和/或系统治疗慢性或感染伤口。治疗实施例包含使所公开技术的组合物、材料、制品、敷料、试剂盒、系统或装置与有需要的受试者接触。任选地，方法可以包含确定受试者是否对

治疗有反应。

[0421] 技术人员将能够容易地鉴定伤口是否“对治疗有反应”。特别地，技术人员将能够容易地确定本权利要求书中鉴定的蛋白酶水平，其预测或指示对伤口治疗的良好反应或不良反应，特别是对包括氧化纤维素的伤口敷料的治疗。如本文所用，术语“响应的”和“一个或多个响应者”是指被认为对伤口治疗响应良好的伤口，特别是用药理学试剂例如抗生素治疗。类似地，“无响应的”和“一个或多个无响应者”是指被认为对伤口治疗响应不良的伤口，特别是用药物治疗例如抗生素治疗。例如，在4周的伤口治疗之后表现出优于50％伤口闭合的患者被认为对所述治疗有响应。

[0422] 在某些实施例中，可以用本文所述的组合物、制品、系统或装置同时诊断和治疗患者。当在本文中使用时，术语“同时”意指一起执行规定的目标，例如诊断和治疗。

[0423] 在某些实施例中，可以用本文所述的组合物、制品、系统或装置按顺序诊断和治疗患者。当在本文中使用时，术语“按顺序”意指规定的目标，例如，诊断和治疗，在时间上或空间上是分离的，例如，治疗之前的诊断或治疗之后的诊断或其组合，例如，第1次诊断＝＝>治疗＝＝>第2次诊断。

[0424] 本文所述的实施例进一步使护理人员或患者能够快速且可靠地确定伤口是否可能不愈合，并且基于此确定选择适当的治疗。例如，不愈合的伤口可能需要应用特殊的伤口敷料，如包括特定治疗剂的伤口敷料，以促进愈合。因此，本文所述的实施例进一步提供治疗伤口，例如慢性或感染伤口的方法，包括确定伤口是愈合还是不愈合，然后如果其是非愈合伤口，则将包括治疗剂的伤口敷料应用于伤口。

[0425] 本文所述的实施例提供用于诊断或检测感染伤口的方法和测定。方法适用于检测细菌感染因子。在一个实施例中，伤口被革兰氏阴性细菌感染。典型的革兰氏阴性细菌包含蛋白菌如大肠杆菌、沙门氏菌、假单胞菌和螺杆菌，以及蓝细菌。当结合药物分类时，它们包含引起呼吸系统紊乱的铜绿假单胞菌和流感嗜血杆菌、引起泌尿系统紊乱的大肠杆菌和奇异变形杆菌、以及引起消化系统和微球菌紊乱的幽门螺杆菌和加特纳芽孢杆菌，所述微球菌如脑膜炎奈瑟氏球菌、粘膜炎莫拉菌和淋病双球菌。

[0426] 在另一个实施例中，伤口被革兰氏阳性细菌感染。“革兰氏阳性细菌”意指含有磷壁酸(例如，脂磷壁酸和/或壁磷壁酸)的细菌或细菌，或其细胞壁中功能等同的糖聚合物(例如，鼠李糖多糖、糖醛酸磷壁(酸)质、阿拉伯半乳聚糖、lipomannan)。功能等同的糖聚合物的非限制性实例描述于Weidenmaier等人，《自然(Nature)》，6:276-287,2008中。

[0427] 细菌包含感染哺乳动物宿主(例如，牛、鼠、马、灵长类动物、猫科动物、犬科动物和人类宿主)的病原菌。这种病原菌的实例包含例如细菌物种的成员，如拟杆菌、梭菌、链球菌、葡萄球菌、假单胞菌、嗜血杆菌、军团菌、分枝杆菌、埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、弧菌或李斯特菌。在人类宿主中引起疾病的病原菌的一些临床相关实例包含但不限于炭疽芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、百日咳博德特氏菌、伯氏疏螺旋体、流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、马尔他布鲁氏杆菌、猪布鲁氏杆菌、空肠弯曲杆菌、衣原体肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、耐万古霉素粪肠球菌、屎肠球菌、大肠埃希菌、产肠毒素大肠杆菌(ETEC)、肠致病性大肠杆菌、E大肠杆菌O157:H7、土拉弗朗西斯菌、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、单核细胞增生李斯特氏菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈

瑟菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、立克次体立克次体、S伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内志贺菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VSA)、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌和鼠疫耶尔森氏菌。

[0428] 在另一个实施例中，感染性细菌选自由以下组成的组：艰难梭菌、耐碳青霉烯的肠杆菌科(CR-克雷伯氏菌；CR-大肠杆菌)和淋病奈瑟氏球菌。在另一个实施例中，感染性细菌选自由以下组成的组：多药耐药性不动杆菌、耐药性弯曲杆菌、产生广谱β-内酰胺酶(ESBL)的肠杆菌科细菌、耐万古霉素肠球菌、多药耐药性铜绿假单胞菌、耐药非伤寒沙门氏菌、耐药沙门氏菌肠炎沙门氏菌、耐药志贺氏菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐药肺炎链球菌和耐药结核病。在另一个实施例中，感染性细菌选自由以下组成的组：耐万古霉素金黄色酿脓葡萄球菌、红霉素抗性的A组链球菌、克林霉素抗性的B组链球菌。

[0429] 在某些实施例中，在宿主受试者中发现慢性或感染伤口。优选地，宿主是哺乳动物，例如啮齿目动物、人、家畜、伴侣动物或非驯养或野生动物。在一个实施例中，受试者可以是啮齿目动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠等。在另一个实施例中，受试者可以是家畜。合适的家畜的非限制性实例可以包含猪、牛、马、山羊、绵羊、美洲驼和羊驼。在仍另一个实施例中，受试者可以是伴侣动物。伴侣动物的非限制性实例可以包含宠物，如狗、猫、兔和鸟。在又另一个实施例中，受试者可以是动物园动物。如本文所用，“动物园动物”是指可以在动物园中发现的动物。这种动物可以包含非人灵长类动物、大型猫科动物、狼和熊。在示例性实施例中，受试者是人。

[0430] 在一个方面，本文提供了检测哺乳动物伤口中一种或多种酶的水平的方法，方法包括以下步骤：(A)将本文所述的伤口敷料材料与哺乳动物伤口接触；(b)在视觉上比较与哺乳动物伤口接触的伤口敷料材料与一个或多个参考样品；以及(c)获得与哺乳动物伤口接触的伤口敷料材料中报告分子浓度的定性确定。

[0431] 优选地，诊断和治疗是原位进行的。因此，本文所述的实施例允许以容易、非侵入性的方式诊断和治疗伤口。例如，可以实时进行诊断，并且可以将治疗应用于感染伤口或患者(系统地)，并且实时监测伤口治疗的进展，例如，由报告分子由于伤口愈合生成的信号的消散。

[0432] 在另一个方面，本文提供了使用化学实体检测伤口中蛋白酶活性的方法，其中化学实体包括选自由以下组成的组的一种或多种组分：锚区域、酶不稳定或酶反应区、和指示剂区域。在另一个方面，方法妥协将MPO、弹性蛋白酶、溶菌酶、磷脂酶和过氧化氢酶的底物置于固体表面上，使得任何反应对于眼睛是可见的。在另一个方面，方法用于评估各种体液，包含伤口、泪液、玻璃体、CSF、气道抽吸物或痰液、滑液、血液、血浆、血清、尿液、腹膜、间质、皮下、胆汁、肠或类似流体，通过使它们与含有底物的材料接触并随后评估底物的变化。

[0433] 实例

[0434] 本文所述的结构、材料、组合物和方法旨在是代表性实例，并且应当理解，本公开的范围不受实例的范围限制。本领域技术人员将认识到，可以对所公开的结构、材料、组合物和方法进行变化来实践实施例和所公开的技术，并且这种变化被认为是在本公开的范围内。

[0435] 实例1：壳聚糖的纯化

[0436] 将壳聚糖(10g,来自虾壳)溶解在2％乙酸溶液(1L)中。将溶液在室温下搅拌过夜,并且然后使用尼龙过滤器(0.45μm)过滤。随后通过加入4M NaOH将pH调节到8以沉淀壳聚糖。通过离心(10000rpm,10分钟)分离所获得的沉淀物并用蒸馏水彻底洗涤直到洗涤溶液的pH达到～7。然后用90％乙醇洗涤沉淀物,允许剩余的乙醇蒸发并将壳聚糖冷冻干燥。将纯化的产物通过FTIR(1560cm^{-1},1640cm^{-1})分析,并且具有约48％的DA的材料被进一步使用

[0437] 实例2:壳聚糖的选择性N-乙酰化

[0438] 将纯化的壳聚糖(实例1)溶解在10％乙酸溶液中,以获得1％壳聚糖溶液。加入等体积的96％乙醇以及乙酸酐。在将pH调节到7之前,将反应搅拌1小时。通过离心分离沉淀物并冷冻干燥。随后,将所获得的乙酰化壳聚糖用蒸馏水洗涤数次并再次冷冻干燥。通过^{1}H-NMR和FTIR(1560cm^{-1},1640cm^{-1})分析N-乙酰化程度(DA),并且发现其为40％到60％,如下图所示。产生具有不同DA的壳聚糖衍生物,但仅进一步使用具有48％的DA的物质

[0439] 实例3:反应性黑5与乙酰基-壳聚糖的缀合

[0440] 在加入0.5％(w/w)反应性黑5的溶液(0.5mL)之前,将乙酰化壳聚糖(DA＝48％,100mg;实例2)悬浮在蒸馏水中。加入由蒸馏水中的2.5％(w/v)Na_2SO_4和1％(w/v)Na_2CO_3组成的溶液,并将混合物在25℃下孵育10分钟。在65℃下的后续孵育步骤之后,通过离心(7800rpm,5分钟)分离固体。用蒸馏水洗涤沉淀物直到洗涤溶液保持无色,并且然后冷冻干燥。确定染料含量,测量反应完成之后未结合的反应性黑5。染料主要与沉淀物和高MW分数相关联。酰化度为48％。

[0441]

在反应中应用的染料溶液百分比	染料含量[％w/w]
0.4	4.58
0.2	2.55
0.1	1.33

[0442] 实例4:壳聚糖的水解以获得壳寡糖

[0443] 将纯化的壳聚糖(2.5g;实例1)溶解在乙酸盐缓冲液(100mM,pH 5)中,以获得1％壳聚糖溶液。然后加入来自灰色链霉菌(1单位)的壳聚糖酶,并将反应混合物在热混合器(37℃,150rpm)上搅拌5天。将溶液真空浓缩,并用1体积当量的96％乙醇沉淀非低聚壳聚糖。将上清液再次浓缩,并且然后通过加入9体积当量的丙酮使低聚糖沉淀。通过离心分离寡糖,用50％丙酮水溶液洗涤数次,并在没有预先洗涤的情况下冷冻干燥。通过TLC和SEC(TSK凝胶G5000PWXL,普鲁兰作为标准)确定聚合度,表示平均MW为5360,与约24的聚合度相关联。

[0444]

数量分子量（Mn）	多分散指数（PDI）	聚合度（DP） 从 SEC 数据预期
5360	2.51	~30

[0445] 实例5:壳寡糖的选择性N-乙酰化

[0446] 在加入96％乙醇(400mL)之前,将壳寡糖混合物(7g)(实例4)溶解在蒸馏水(200mL)中。将溶液搅拌5分钟并加入乙酸酐(4.12mL,1摩尔当量,相对于游离胺计算)。在用10％NaOH溶液将pH调节到7之前,将混合物在室温下进一步搅拌2小时。移除溶剂,并将剩余

的沉淀物冷冻干燥。通过^{1}H-NMR,FTIR(1560cm^{-1},1640cm^{-1})和染料含量(光度法,626nm)分析N-乙酰化度。发现N-乙酰化度为48％。

[0447] 实例6:甲苯胺O蓝与壳寡糖的缀合

[0448] 将乙酰化的壳寡糖(DA＝48％,7g;实例5)分散在1％乙酸(500mL)中。在加入1ml戊二醛溶液之前,然后加入甲苯胺O蓝(3.9g)并允许其溶解。将混合物搅拌2小时,并使用10％NaOH将pH调节到7。通过过滤分离固体部分,用蒸馏水洗涤数次,并冷冻干燥。通过^{1}H-NMR,FTIR和光度法分析N-乙酰化度。发现乙酰化度为48％。发现染料含量为0.74。

[0449] 溶菌酶消化染色的壳聚糖衍生物。在不同介质中研究合成的底物:磷酸钾缓冲液(66mM,pH 6.2)以及含有来自鸡蛋白的5000U溶菌酶的人工伤口液和来自感染伤口的人体伤口液(参见图5和图6)。

[0450] 将两毫克溶菌酶底物悬浮在各自的测试培养基中并在35℃下孵育。对于时间测量,将样品短暂离心,将200μL上清液转移到96孔板,并在相应染料的最大吸收下进行光度法分析。分析之后,将取出的样品放回反应瓶中并进一步孵育。

[0451] 人工伤口液的组合物含有人血清白蛋白(2％)、氯化钠(0.36％)、碳酸氢钠(0.05％)、柠檬酸钠(0.02％)、乳酸钠(0.1％)、葡萄糖(0.1％)、氯化钙二水合物(0.01％)、氯化镁(0.02％)和尿素(0.01％)。

[0452] 实例7:基于吲哚/壳寡聚物的底物的合成,用于检测伤口感染。

[0453] 合成(GlcNAc)$_{n}$-吲哚(n＝4到6)甲壳质的乙酰化

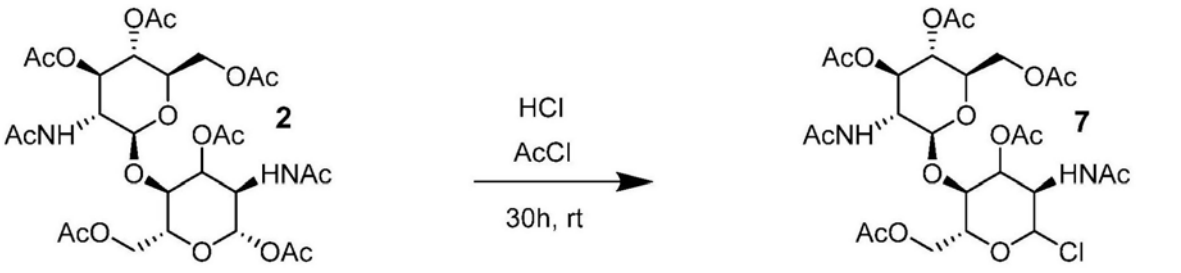
[0454] 将几丁质(2g)悬浮在冷却的乙酸酐(20mL)中并浓缩,逐滴加入硫酸(2,3mL)。将悬浮液搅拌过夜并允许达到室温。用冰冷的水稀释之后,用乙酸钠(12g)中和溶液。过滤溶液,并且用色素萃取滤液。用碳酸氢盐洗涤氯仿相,用硫酸镁干燥并真空浓缩。

[0455] 通过MPLC(SiO_2,40g)使用氯仿:乙醇梯度(98:2→90:10)分级不同聚合度(DP)的所得壳寡糖(COS)。

[0456] 

[0457] 实例8:1-氯,3-O,6-O-二乙酰基-4-O-[3-O,4-O,6-O-三乙酰基-2-(乙酰胺基)-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基]-2-(乙酰胺基)-2-脱氧-α-D-吡喃葡萄糖苷(化合物7)

[0458] 将壳二糖八乙酸酯2(20mg)悬浮在乙酰氯中,并且用HCl气体使溶液饱和并搅拌30小时。然后蒸发溶液,并且无需进一步纯化使用。

[0459] 

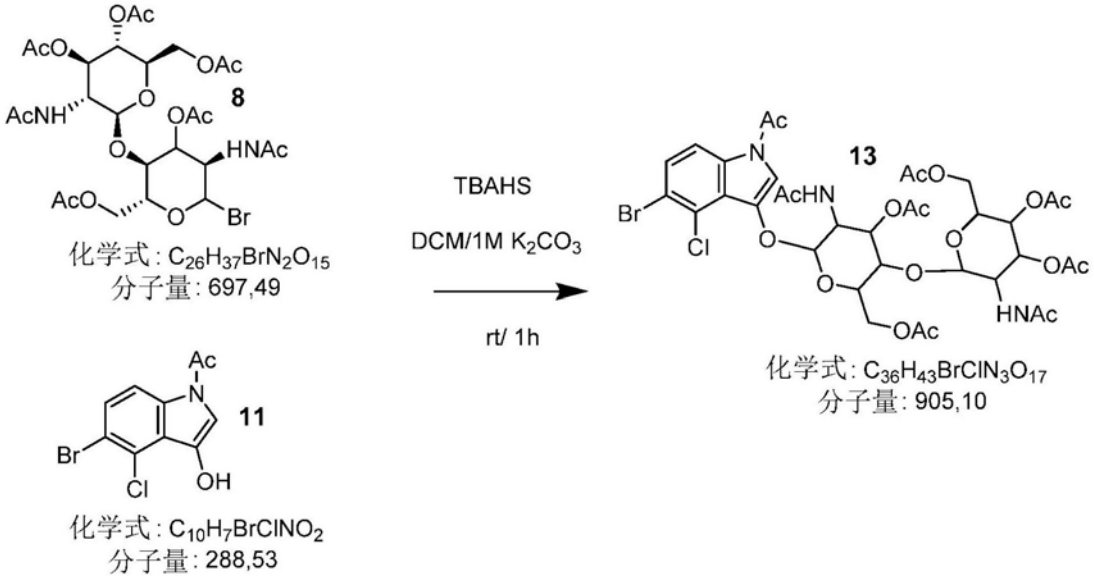
化学式:$C_{28}H_{40}N_2O_{17}$
分子量:676,63

化学式:$C_{26}H_{37}ClN_2O_{15}$
分子量:653,03

[0460] 实施例9:1-(5-溴-4-氯-N-乙酰基-3-吲哚基),3-O,6-O-二乙酰基-4-O-[3-O,4-O,6-O-三乙酰基-2-(乙酰基氨基)-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基]-2-(乙酰基氨基)-2-脱氧-α-D-吡喃葡萄糖苷(化合物13)

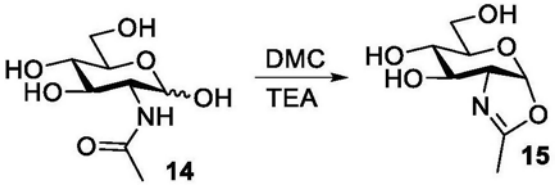
[0461] 将化合物7(0,028mmol)溶解在DCM(2.5mL)中,加入11(82.87mg)并溶解。然后加入四丁基硫酸氢铵(9.7mg)和1mL1M碳酸钾溶液。在剧烈搅拌下,将反应在室温下放置1小时。分离有机相,并在压力下移除溶剂。

[0462] 使用12gMPLC柱,用10个柱体积的纯氯仿到15份氯仿到一份乙醇的梯度进行分离。然后使用5个柱体积的15份氯仿到一份乙醇等度。最后的冲洗步骤是10份氯仿到一份乙醇,5个柱体积。

[0463] 

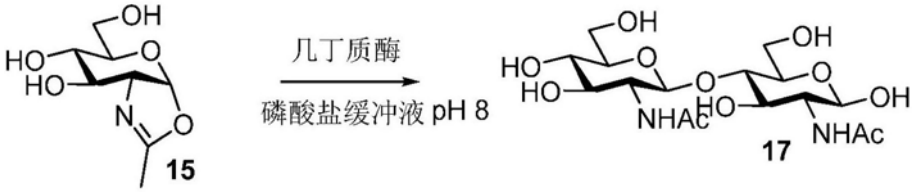
[0464] 实例10：N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)恶唑啉15

[0465] 将GlcNAc 14(100mg)溶解在H_2O(1,8mL)中并加入三乙胺(0,6mL)。在加入2-氯-1,3-二甲基咪唑啉氯化物(DMC,230mg)之前，将溶液在冰浴中冷却。将溶液搅拌30分钟。通过MPLC(C18)使用H_2O作为洗脱液移除DMC和TEA。集中产物部分并真空浓缩。

[0466] 

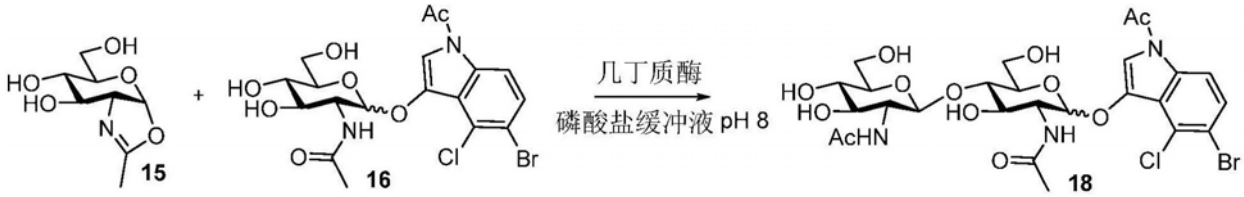
[0467] GlcNAc二聚体(化合物17)

[0468] 将化合物15(27mg)溶解在磷酸钠缓冲液(50mM,pH 8,0)中，并加入几丁质酶(25mU/mL)。孵育溶液并通过TLC(CHCL3:MeOH 2:1)监测反应进程。

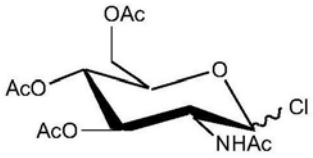
[0469] 

[0470] $(GlcNAc)_2$-吲哚(化合物18)

[0471] 将化合物15(27mg)和GlcNAc-吲哚16溶解在磷酸钠缓冲液(50mM,pH 8,0)中，并加入几丁质酶(25mU/mL)。孵育溶液并通过TLC(CHCL3:MeOH 2:1)监测反应进程。

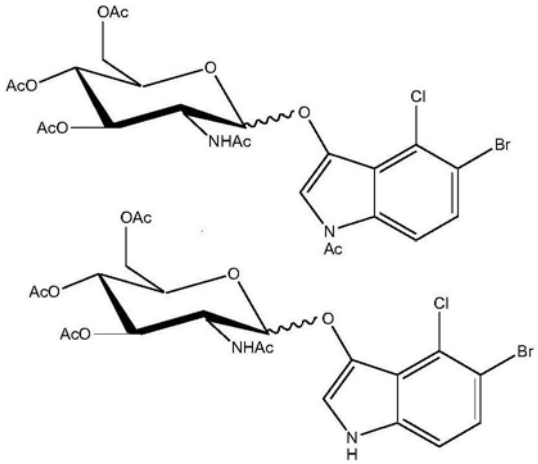
[0472] 

[0473] 实施例11：2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖基氯

[0474] 

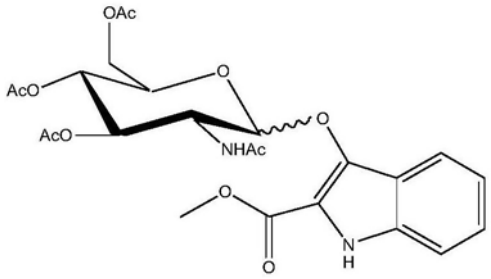
[0475] 将N-乙酰基-β-D-葡萄糖胺四乙酸酯(391mg,1.00mmol)悬浮在乙酰氯(7mL)中,同时用冰浴冷却。将混合物用氩气脱气5分钟。然后在两小时的时段内滴加MeOH(1.00mL)。在加入MeOH的前15分钟期间,将反应混合物用氩气脱气;然后将其保持在氩氛下(始终在冰浴中搅拌)。在完全加入MeOHl之后,将反应混合物搅拌额外10分钟,同时在冰浴中冷却。然后将其温热到室温并在室温下搅拌过夜。将混合物浓缩到干燥,溶于DCM(10mL)中,再次浓缩到干燥,溶于二异丙基醚(15mL)中并再次浓缩到干燥,以得到黄色固体,其无需进一步纯化即可使用。

[0476] 实例12:(N-乙酰基-5-溴-4-氯-吲哚-3-基)-2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷(12a)和(5-溴-4-氯-吲哚-3-基)2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷(12b)

[0477] 

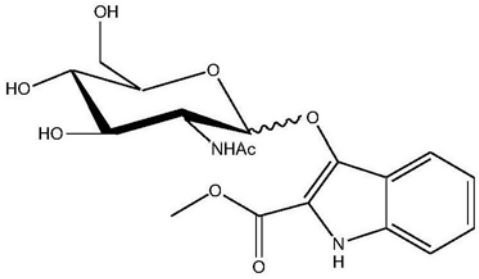
[0478] 在加入1-乙酰基-5-溴-4-氯-3-吲哚乙酸酯(100mg,0.30mmol)之前,将DMF(干燥,4mL)用氩气脱气5分钟。将混合物用氩气脱气额外5分钟,然后一次性加入NaOMe(51mg,0.94mmol)。在室温下搅拌同时用氩气脱气持续25分钟,然后一次性加入2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖基氯(110mg,0.30mmol)。将反应混合物在室温下在光照(铝箔)保护下搅拌,同时用氩气脱气1小时,然后在氩氛下在室温下在光照保护下搅拌过夜。将混合物浓缩到干燥并与甲苯(3×20mL)共蒸发。然后将其溶于EtOAc(30mL)中并过滤。将滤液浓缩到干燥,以得到150mg粗产物。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$:597(14b)和$[M+Na]^+$:639(12a)。

[0479] 实例13:(吲哚-3-基甲酸甲酯)2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷

[0480] 

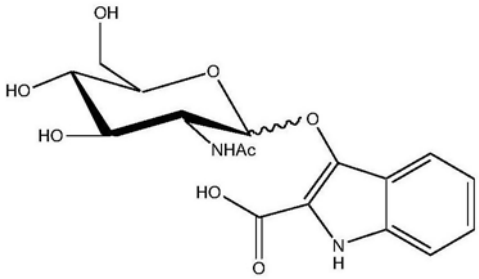
[0481] 将2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖基氯(1.00mmol,实例13)、TBAHS(339mg,1.00mmol)和甲基-3-羟基-1H-吲哚-2-羧酸酯(210mg,1.10mmol)在室温下溶解在DCM(干燥,10mL)中。然后一次性加入K_2CO_3溶液(12mL),并将混合物在室温下搅拌2.5小时。加入DCM(20mL)和水(20mL)。萃取之后,将有机相干燥(Na_2SO_4)并浓缩到干燥。通过柱色谱(30.0g硅胶,洗脱液:DCM中5%MeOH)纯化粗产物,分离250mg纯产物和92mg含杂质的产物。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$:543,$[M+K]^+$:559.

[0482] 实例14:(吲哚-3-环己酸甲酯)2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷

[0483] 

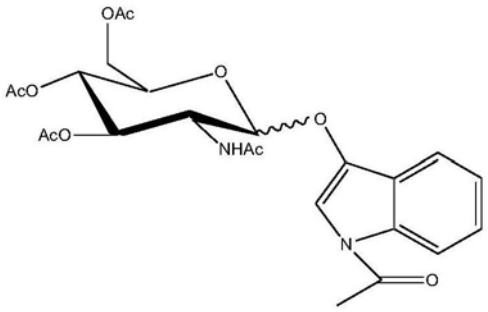
[0484] (吲哚-3-环己酸甲酯)将2-乙酰胺基-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷(250mg,0.48mmol)在室温下悬浮在MeOH(7mL)中。加入NaOMe(催化量)并将混合物在室温下搅拌1小时45分钟。滤出沉淀物。由于沉淀物和滤液的MS相同,因此将它们再次组合并浓缩到干燥。将产物悬浮在DCM/MeOH(9:1,10mL)中并在冰箱中保持3小时。滤出无色固体,以得到90mg无色固体。将滤液再次浓缩到干燥,以得到105mg褐色固体。使用固体和滤液两者而无需进一步纯化。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$:417.

[0485] 实例15:(吲哚-3-环己酸)2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷

[0486] 

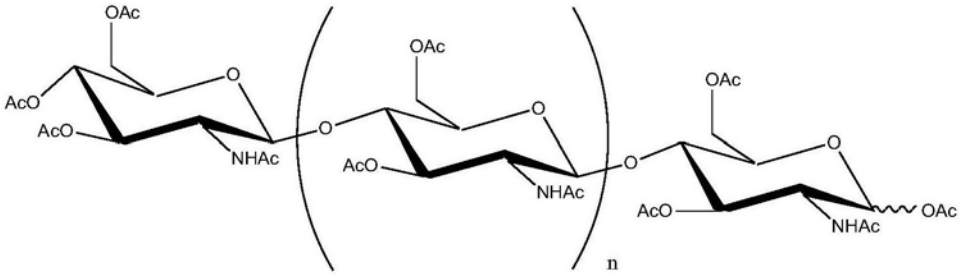
[0487] (吲哚-3-酸甲酯)将2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷(105mg,0.25mmol)悬浮在NaOH溶液(0.1M,在水中,10mL)中,并且在室温下搅拌3.5小时。将反应混合物浓缩到干燥,并且产物无需进一步纯化即可使用。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$:403.

[0488] 实例16:(N-乙酰基-吲哚-3-基)-2-脱氧-3,4,6-三-O-乙酰基-D-吡喃葡萄糖苷

[0489] 

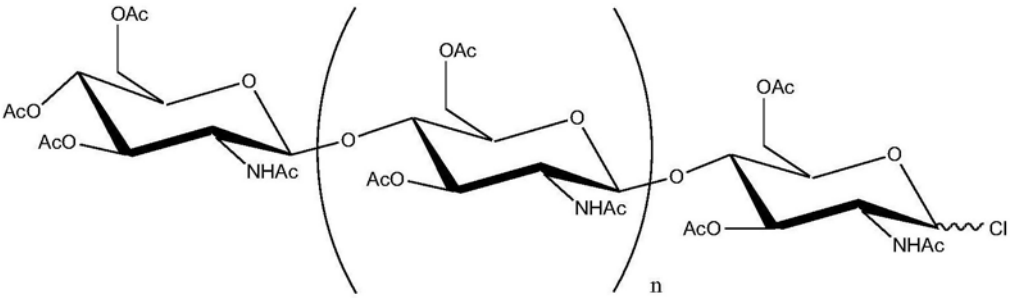
[0490] (吲哚-3-环己酸)将2-乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖苷(105mg,0.25mmol)、AgOAc(125mg,0.75mmol)、K_2CO_3(207mg,1.50mmol)和Ac_2O(6mL)加热到118℃(油浴温度)1小时。然后将反应混合物冷却到室温。加入DCM(40mL)和水(30mL)。萃取之后,用饱和$NaHCO_3$溶液(3×30mL)、干燥的(Na_2SO_4)洗涤有机相,并浓缩到干燥。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$:527.

[0491] 实例17:过乙酰基-低聚-β-D-1,4-葡萄糖胺

[0492] 

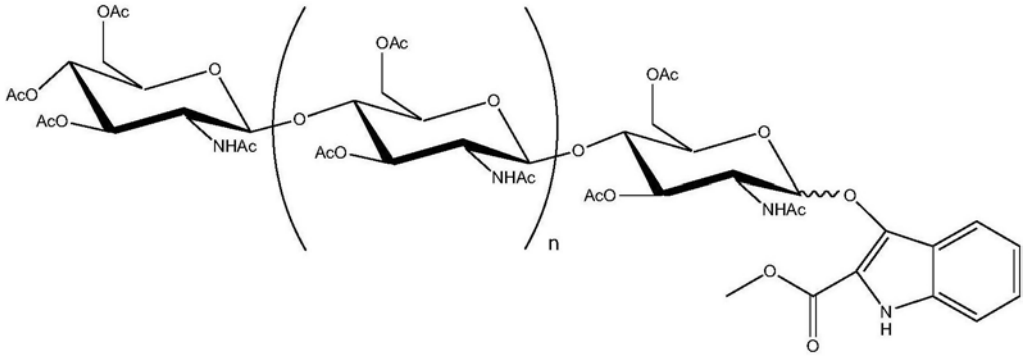
[0493] 将吡啶(500μL)和乙酸酐(500μL)加入到壳聚糖低聚物(低聚物和乙酸钠的比例为5到4.1的混合物)(101mg,1与4之间的链长)中并将混合物在室温下摇动过夜。由于并非所有材料都溶解,因此将混合物再次摇动过夜。然后将其保存在冰箱中十天。加入DCM(20mL),并将混合物倒入冰冷的柠檬酸(10%水溶液,20mL)中。萃取之后,用冰冷的柠檬酸(10%水溶液,20mL)洗涤有机相,然后用盐水(15mL)。将有机相干燥(Na2SO4)并浓缩到干燥(64mg粗产物)。粗产物无需进一步纯化即可使用。MS数据:。ESI-MS(阳性):[M+Na]+(二聚体):699,[M+Na]+(三聚体):986。

[0494] 实施例18:1-氯-乙基-低聚-β-D-1,4-葡萄糖胺

[0495] 

[0496] 在氩氛下将实例19的粗产物溶解在乙酰氯(1mL)中并在冰浴中冷却。在约1分钟内逐滴加入MeOH(55μL)。加完之后,将混合物在冰浴中再额外搅拌10分钟,然后将溶液温热到室温;加入额外的乙酰氯(05mL)。将混合物在室温下搅拌过夜。然后将其浓缩到干燥,溶于二氯甲烷(5mL)中,再次浓缩到干燥,悬浮于二异丙醚中并再次浓缩到干燥,以得到55mg粗产物。粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤。

[0497] 实例19:O-(2-羧甲基-3-吲哚氧基)-过乙酰基-低聚-β-D-1,4-葡萄糖胺

[0498] 

[0499] 将实例20的粗产物(55mg粗产物)、硫酸氢四丁基铵(20mg)和3-羟基-1H-吲哚-2-羧酸甲酯(13mg)在室温下溶解在DCM(干燥,1.5mL)中;加入K_2CO_3(1M水溶液,1mL)并将混合物在室温下搅拌过夜。加入DCM(20mL)和水(15mL)。萃取之后,将有机相干燥(Na_2SO_4)并浓缩到干燥(39mg粗产物)。通过柱色谱纯化粗产物。洗脱液:DCM中5%MeOH。分离的:含有一个糖部分的1.8mg产物,含有两个糖部分的1.2mg产物。ESI-MS(阳性):$[M+Na]^+$(单体):543,$[M+Na^+]$(二聚体):830。

[0500] 实例20。用于检测伤口感染的基于苯酚/壳聚糖/漆酶的底物的合成。

[0501] 用芥子酸(SA)接枝的N-乙酰基壳聚糖。

[0502] 将N-乙酰基壳聚糖溶解在乙酸钠缓冲液(100mM,pH 5,0)中,以获得1%溶液(w/v)。将20mL此溶液与20mL芥子酸溶液在乙醇(20mM)中混合。加入EDC和NHS(各1,3g)并将溶液搅拌2小时。通过逐滴加入NaOH(1M)终止反应,用水洗涤所得沉淀物直到在洗涤溶液中不再检测到苯酚。然后将产物冷冻干燥。

[0503] N-乙酰基壳聚糖/氨基甲氧基苯酚纳米颗粒

[0504] 将N-乙酰基壳聚糖溶解在乙酸钠缓冲液(100mM,pH 5,0)中,并且加入氨基甲氧基苯酚(溶解在乙醇中),以获得20mM的总浓度。将2,3mL此溶液与1,6mL十二烷混合并施加到超声波仪上以产生乳液。

[0505] 溶菌酶水解SA接枝N-乙酰基壳聚糖

[0506] 将SA接枝的N-乙酰基壳聚糖(5mg)悬浮于含有溶菌酶(0,1mg/mL)的500μL磷酸钾缓冲液(62mM,pH 6,2)中。将溶液孵育一小时。将反应上清液与漆酶(1U/mL)一起孵育,并且观察到立即的颜色变化。

[0507] 溶菌酶水解N-乙酰基壳聚糖/氨基甲氧基苯酚纳米粒子

[0508] 将N-乙酰基壳聚糖/氨基甲氧基苯酚纳米颗粒乳剂(50μL)与含有溶菌酶(0,1mg/mL)和漆酶(1U/mL)的450μL磷酸钾缓冲液(62mM,pH 6,2)混合。15分钟之后,纳米颗粒被破坏(产生澄清溶液),产生强烈的颜色。

[0509] 实例21。染色用于检测伤口感染的肽聚糖

[0510] 不同的反应性染料可以用于肽聚糖的染色(表1)。优选的是含有磺酰基乙基-硫酸氢酯-反应性基团的反应性染料,如反应性黑5、雷玛唑亮蓝、反应性紫5或反应性橙16。替代性地,可以使用含有二氯三嗪反应性基团,如反应性蓝4、反应性红120、反应性蓝2、反应性绿19和反应性棕10的染料。通过考虑它们与肽聚糖的反应程度和当染色的肽聚糖与溶菌酶一起孵育时释放染料的速度来评估染料(参见实例7用于染色的早期部分,并且实例6用于消化测定)。

[0511] 表格1。反应性染料的评估

[0512]

染料	评估
反应性黑5	+++
雷玛唑亮蓝	++
反应性绿	+
反应性棕	-

[0513] 肽聚糖染色程序1：

[0514] 用反应性染料染色的肽聚糖的制备和灭菌：

[0515] 将来自无动物发酵的溶原微球菌细胞培养液在4000g和4℃下离心15分钟以获得湿细胞沉淀。将细胞沉淀(20g)用ddH20(800ml)洗涤两次以除去任何剩余的培养基组分(恒定离心条件)。

[0516] 将湿的溶原微球菌细胞沉淀(20g，湿:干比例4:1，5g干燥的溶原微球菌细胞)悬浮在1M HCl(80g)中，并在60℃和720rpm下孵育1小时。然后将灭菌和中断的细胞在4000g和4℃下离心15分钟。将肽聚糖沉淀重新悬浮并用Na-磷酸盐缓冲液(400ml，100mM，pH 7.0)洗涤，以将悬浮液的pH调节到中性pH并除去破碎过程的细胞组分(恒定离心条件)。用500ml的ddH20执行另一个洗涤步骤以除去破碎的细胞组分和缓冲盐。在最后一次洗涤步骤之后，所获得的沉淀准备用于染色程序。

[0517] 将肽聚糖(50mg)、反应性黑5(5mg)、Na2CO3(10mg)和Na2SO4(25mg)溶解/悬浮在双蒸水(ddH20)(2mL)中。摇动1分钟之后，将反应混合物在25℃和750rpm下孵育10分钟，然后在65℃和750rpm下摇动另一个30分钟进行第二孵育步骤。

[0518] 将染色的肽聚糖在10000g下离心10分钟。收集上清液，并将沉淀重新悬浮在ddH20中并再次在10000g下离心10分钟。重复洗涤程序直到上清液澄清。不同的缓冲液或有机溶剂像乙醇可以用于洗涤程序。在597nm处测量所有上清液的吸光度水平。如果吸光度低于值0.05，则将上清液定义为澄清。使用校准曲线和测量的上清液的吸光度水平计算上清液中未结合的染料的量。因此，计算了肽聚糖结合染料的量。将染色的肽聚糖在4℃到8℃下储存最多2周，或通过冻干干燥用于更长的储存期。

[0519] 肽聚糖染色程序2：

[0520] 将反应性黑5(200mg)和肽聚糖(300mg)溶解在ddH20(40mL)中。将反应溶液在50℃下搅拌30分钟。在30分钟期间，每6分钟加入Na2SO4(1g)(总量:4g)。在前30分钟孵育之后，将Na3PO4(200mg)加入到反应溶液中，再在50℃下搅拌30分钟。

[0521] 将染色的肽聚糖在10000g下离心10分钟。收集上清液，将沉淀重新悬浮在ddH20中，并且再次在10000g下离心10分钟。重复洗涤程序直到上清液澄清。不同的缓冲液或有机溶剂像乙醇可以用于洗涤程序。在597nm处测量所有上清液的吸光度水平。如果吸光度低于值0.05，则将上清液定义为澄清。使用校准曲线和测量的上清液的吸光度水平计算上清液中未结合的染料的量。因此，计算了肽聚糖结合染料的量。将染色的肽聚糖储存在4℃到8℃下，其中它似乎是稳定的或通过冷冻干燥干燥。

[0522] 肽聚糖染色程序3：

[0523] 将肽聚糖(150mg，干重)悬浮在ddH20(20ml)中并加热到50℃。通过加入反应性黑5

(根据表X,具有不同量的反应性染料的7种不同变体)开始反应。将反应在50℃下搅拌(210rpm)1小时。在前10分钟之后,每10分钟定期加入Na2CO3(5×100mg,10分钟、20分钟、30分钟、40分钟和50分钟反应时间之后)。在最后一次加入Na2CO3之后,将反应混合物搅拌另一个10分钟。将反应溶液在4℃下在4000g下离心15分钟。将沉淀重新悬浮并在ddH2O(40g)中洗涤3次,并如之前一直离心。不同的缓冲液或有机溶剂像乙醇可以用于洗涤程序。将所有上清液重量分析并用于确定未结合的染料浓度,并进一步确定染色程度。因此,将1ml每种上清液转移到1.5ml埃彭道夫管中,并在10000g和环境温度下离心5分钟。将3倍的100μl每种上清液转移到96孔板中,并在597nm处测量吸光度水平。如果吸光度低于值0.05,则将上清液定义为澄清。使用校准曲线和测量的上清液的吸光度水平计算上清液中未结合的染料的量。结合染料的百分比列于表2中。整个染色的肽聚糖构建体(LPG-RB5)的反应性黑5的百分比也列于表2中。

[0524] 表2:染色的肽聚糖的不同变体

[0525]

变体	量反应性黑	%反应性黑	LPG-RB5 的

[0526]

	5 (mg)	5 结合	%RB5
LPG-RB5-05	150	74	45
LPG-RB5-06	200	64	50
LPG-RB5-07	75	89	34
LPG-RB5-08	50	92	22
LPG-RB5-09	25	92	12
LPG-RB5-10	10	88	5

[0527] 实例22。用于检测伤口感染的溶菌酶活性测量

[0528] 染色的肽聚糖:

[0529] 制备每种LPG-RB5变体(实例21)(1.5mg/ml)的一种悬浮液(NaCl-溶液,0.9%),并各自分成6个1ml样品(3个阳性,3个阴性)。将阳性对照与溶菌酶原液(10μl,1,000,000U/ml)混合到10,000U/ml的最终溶菌酶活性。将所有样品在37℃下孵育60分钟,并且然后离心(5分钟,10000g)。在上清液中检测到蓝色的显色。将100μl每种上清液转移到96孔板中,并在597nm处测量吸光度。图8中示出了不同变体的上清液的吸光度。图9中示出了染色程度的影响。

[0530] 染料计算:PG比率:

[0531] 未结合染料的量:

[0532] $$x = \left(\frac{\mathrm{AbsWL} - \mathrm{d}}{k}\right) * z * y$$

[0533] AbsWL...597nm处不同洗涤溶液的所测量吸光度

[0534] d...染料校准曲线的线性回归截距

[0535] k...染料校准曲线的线性回归斜率

[0536] z...所测量的洗涤溶液的稀释因子

[0537] y...洗涤溶液的体积(ml)

[0538] x...洗涤溶液中RB5的量(mg)

[0539] 结合染料的量:

[0540] a＝(用量染料)-(未结合染料量)

[0541] a...结合染料的量

[0542] 考虑染料容器中的染料含量：

[0543] c＝a*0.85

[0544] c...结合染料的量(mg)(考虑的染料含量)

[0545] 0.85...85％染料含量

[0546] a...结合染料的量(mg)

[0547] 考虑因离去反应性染料基团的重量损失(反应性黑5)：

[0548] f＝c*0.76

[0549] f...最终结合染料量(mg)(反应性基团)

[0550] c...结合染料的量(mg)(考虑的染料含量)

[0551] PG与RB5之间的比例：

[0552] $$R = \frac{L - f}{f}$$

[0553] R...纯PG与RB5之间的比例

[0554] L...干PG-RB5的产量(mg)

[0555] f...最终结合染料量(mg)

[0556] 实例23:用于检测髓过氧化物酶活性的比色酶测定

[0557] 试剂如3,4-二氨基苯甲酸、3-氨基-4-羟基苯甲酸、4-氨基-3-羟基苯甲酸、2,3-二氨基苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸、2-氨基苯酚、2-氨基-3-甲氧基苯甲酸、甲基-3,4-二氨基苯甲酸酯和2-氨基-4-甲氧基苯酚可以用于检测MPO活性(表2)。测定条件:将1mg/mLDABA或等同物溶解在100mM磷酸钠缓冲液(pH 6.4)中。加入H_2O_2到最终浓度5mM。将底物/H_2O_2溶液(95μL)与5μL含MPO的样品一起加入96孔微量滴定板中。在MPO氧化后溶液变成褐色。使用标准光度板读数器在450nm处监测反应。

[0558] 表格3。评估新型MPO底物

[0559]

底物	评估
3,4-二氨基苯甲酸	+++
3-氨基-4-羟基苯甲酸	++
4-氨基-3-羟基苯甲酸	+++
2,3-二氨基苯甲酸	++
3,4-二羟基苯甲酸	+
2-氨基苯酚	++
2-氨基-3-甲氧基苯甲酸	+
甲基-3,4-氨基苯甲酸酯	+++
2-氨基-4-甲基苯酚	+

[0560] 实例24。用聚合物结合序列构建人白细胞弹性蛋白酶(HLE)和人组织蛋白酶G(CatG)底物

[0561] 合成嵌合基因变体,其编码来自纤维二糖水解酶I(里氏木霉)的亲水性碳水化合

物结合模块(CBM)，或来自聚羟基链烷酸酯解聚酶(粪产碱菌)的疏水性结合模块(PDB)中的一到四个多联体。具有亲水性结合模块(CBM)的嵌合变体使附着到基于纤维素的滤纸/织物，与此相反，具有疏水性结合模块(PDM)的嵌合变体使附着到基于PET(聚对苯二甲酸酯)的条带。

[0562] 为了赋予适当的重组蛋白表达，设计了TrxA-ElaSub1_CBM_His融合蛋白的变体。构建体由trxA(硫氧还蛋白)基因组成，所述trxA(硫氧还蛋白)基因是编码6xHis-标签和肠激酶切割位点(Asp Asp Asp Lys)的短间隔子序列，用于从相关蛋白质分离TrxA融合标签。在肠激酶位点之后，将新设计的elasub1_cbm编码序列引入构建体中。elasub1序列编码暴露许多官能团，如巯基、羟基、氨基或羧基的氨基酸。这些氨基酸(半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸)应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。天然亲水性结合模块(CBM)的编码序列直接位于elasub1序列的下游，称为elasub1_cbm。另外，将针对HLE(Ala-Ala-Pro-Val)或CatG(Ala-Ala-Pro-Phe)的两个或更多个识别/切割位点引入elasub1编码序列中。为了使HLE或CatG的作用可视化，将包括正或负带电荷基团的某些染料分子(例如雷玛唑亮蓝)附接到上面列出的氨基酸的官能团。嵌合肽通过HLE或CatG的酶促切割导致携带偶联染料或前染料的肽片段的释放。通过离子交换，酶反应(HLE或CatG)可以通过使释放的肽片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。为了纯化嵌合肽，将编码His-标签(6xHis)的额外的重复序列拉伸附接到elasub1_cbm融合构建体的C-末端。

[0563] 融合构建体trxA__elasub1_cbm_his的DNA序列；下划线标出了来自表达载体pET32b(+)的序列：

[0564] ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGGTGGTAGCTGCGGTGGTGGTGGTAGCGCAGCACCGGTTGGTGGTGGCGGTTCAGCTGCTCCTGTGGGTGGCGGTGGTTCACCGCCTGGTGGTAATCGTGGTACAACCACCACCCGTCGTCCGGCAACCACAACCGGTAGCAGTCCGGGTCCGACCCAGAGCCATTATGGTCAGTGTGGTGGTATTGGTTATAGCGGTCCGACCGTTTGTGCAAGCGGCACCACCTGTCAGGTTCTGAATCCGTATTATAGCCAGTGTCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[0565] TrxA_ElaSub1_CBM-His融合蛋白的蛋白质序列：

[0566] MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH*

[0567] 天然ElaSub1_CBM_His融合蛋白的蛋白质序列：

[0568] MGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH*

[0569] 如表4中所示设计具有亲水性结合模块的以下变体。

[0570] 表4:具有亲水性结合模块(CBM)以及具有可能的疏水性结合模块的变体

[0571]

变体	构造体（名称）	结合单位	切割单位	纯化	反应位点	颜色
1	ElaSub1_CBM	CBM	HLE		硫醇基团（n=1）	蓝色
2	CatGSub1_CBM	CBM	CatG		硫醇基团（n=1）	蓝色
3	ElaSub1_CBM His	CBM	HLE	His 标签	硫醇基团（n=1）	蓝色
4	CatGSub1_CBM His	CBM	CatG	His 标签	硫醇基团（n=1）	蓝色
5	ElaSub2_CBM	CBM	HLE		硫醇基团（n=3）	蓝色
6	CatGSub2_CBM	CBM	CatG		硫醇基团（n=3）	蓝色
7	ElaSub2_CBM His	CBM	HLE	His 标签	硫醇基团（n=3）	蓝色
8	CatGSub2_CBM His	CBM	CatG	His 标签	硫醇基团（n=3）	蓝色
9	ElaSub1_PDM	PDM	HLE		硫醇基团（n=1）	蓝色
10	CatGSub1_PDM	PDM	CatG		硫醇基团（n=1）	蓝色
11	ElaSub1_PDM His	PDM	HLE	His 标签	硫醇基团（n=1）	蓝色
12	CatGSub1_PDM His	PDM	CatG	His 标签	硫醇基团	蓝色

[0572]

变体	构造体（名称）	结合单位	切割单位	纯化	反应位点	颜色
					（n=1）	
13	ElaSub2_PDM	PDM	HLE		硫醇基团（n=3）	蓝色
14	CatGSub2_PDM	PDM	CatG		硫醇基团（n=3）	蓝色
15	ElaSub2_PDM His	PDM	HLE	His 标签	硫醇基团（n=3）	蓝色
16	CatGSub2_PDM His	PDM	CatG	His 标签	硫醇基团（n=3）	蓝色

[0573] 变体1:ElaSub1_CBM。

[0574] ElaSub1构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub1蛋白质序列的下游,称为ElaSub1_CBM。在此区域内插入半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将HLE(Ala-Ala-Pro-

Val)的两个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使HLE的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过HLE的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽片段的释放。通过离子交换,HLE酶反应应该通过使释放的肽片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0575] 变体2:CatGSub1_CBM。

[0576] CatGSub1构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub1蛋白质序列的下游,称为CatGSub1_CBM。在此区域内插入半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将CatG(Ala-Ala-Pro-Phe)的两个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使CatG的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过CatG的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽片段的释放。通过离子交换,CatG酶反应应该通过使释放的肽片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0577] 变体3:ElaSub1_CBM_His。

[0578] ElaSub1构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub1蛋白质序列的下游,称为ElaSub1_CBM。在此区域内插入半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将HLE(Ala-Ala-Pro-Val)的两个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使HLE的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过HLE的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽片段的释放。通过离子交换,HLE酶反应应该通过使释放的肽片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。为了纯化此嵌合变体,编码His标签的重复序列段随后附接到编码碳水化合物结合模块的序列。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0579] 变体4:CatGSub1_CBM_His。

[0580] CatGSub1构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub1蛋白质序列的下游,称为CatGSub1_CBM。在此区域内插入半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将CatG(Ala-Ala-Pro-Phe)的两个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使CatG的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过CatG的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽片段的释放。通过离子交换,CatG酶反应应该通过使释放的肽片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。为了纯化此嵌合变体,编码His标签的重复序列段随后附接到编码碳水化合物结合模块的序列。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0581] 变体5:ElaSub2_CBM。

[0582] ElaSub2构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub2蛋白质序列的下游,称为ElaSub2_CBM。在此区域内插入三个半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将HLE(Ala-Ala-Pro-Val)的三个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使HLE的作用可视化,可以将包含带或带负电荷基团的某些染料分子连接到半胱氨酸的硫醇基团上。嵌合肽通过HLE的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽/肽片段/片段的释放。通过离子交换,HLE酶反应应该通过使释放的肽片段/片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。表4中示出了此变体

的氨基序列。

[0583] 变体6:CatGSub2_CBM。

[0584] CatGSub2_CBM构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于CatGSub2蛋白质序列的下游,称为CatGSub2_CBM。在此区域内插入三个半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将CatG(Ala-Ala-Pro-Phe)的三个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使CatG的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过CatG的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽/肽片段/片段的释放。通过离子交换,CatG酶反应应该通过使释放的肽片段/片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0585] 变体7:ElaSub2_CBM_His。

[0586] ElaSub2构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于ElaSub2蛋白质序列的下游,称为ElaSub2_CBM。在此区域内插入三个半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将HLE(Ala-Ala-Pro-Val)的三个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使HLE的作用可视化,可以将包含带或带负电荷基团的某些染料分子连接到半胱氨酸的硫醇基团上。嵌合肽通过HLE的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽/肽片段/片段的释放。通过离子交换,HLE酶反应应该通过使释放的肽片段/片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。为了纯化此嵌合变体,编码His标签的重复序列段随后附接到编码碳水化合物结合模块的序列。表4中示出了此变体的氨基序列。

[0587] 变体8:CatGSub2_CBM_His

[0588] CatGSub2_CBM构建体编码一段主要亲水性氨基酸。天然亲水性结合模块(CBM)的序列直接位于CatGSub2蛋白质序列的下游,称为CatGSub2_CBM。在此区域内插入三个半胱氨酸密码子。半胱氨酸的硫醇基团应该促进染料或前染料与嵌合肽的偶联。另外,将CatG(Ala-Ala-Pro-Phe)的三个识别/切割位点引入亲水性间隔区。为了使CatG的作用可视化,可以将包括带正或负电荷基团的某些染料分子附接到半胱氨酸的硫醇基团。嵌合肽通过CatG的酶促切割应该导致携带偶联染料或前染料的肽/肽片段/片段的释放。通过离子交换,CatG酶反应应该通过使释放的肽片段/片段通过染料的带电荷基团结合而可视化。为了纯化此嵌合变体,编码His标签的重复序列段随后附接到编码碳水化合物结合模块的序列。表5中示出了此变体的氨基序列。

[0589] 变体9到变体16可以设计成与变体1到变体8相同,除了将亲水性碳水化合物结合模块(CBM)改变为疏水性结合模块(PDB)。

[0590] 表5A:具有亲水性碳水化合物结合模块的嵌合蛋白质变体的氨基酸序列。

[0591]

构建体	序列
ElaSub1_CBM	MGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRRP ATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYS QCL
CatGSub1_CBM	MGGSCGGGGSAAPFGGGGSAAPFGGGGSPPGGNRGTTTTRRP ATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYS QCL
ElaSub1_CBM_His	MGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRRP

[0592]

构建体	序列
	ATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYS QCLLEHHHHHH
CatGSub1_CBM_His	MGGSCGGGGSAAPFGGGGSAAPFGGGGSPPGGNRGTTTTRRP ATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYS QCLLEHHHHHH
ElaSub2_CBM	MCGGGGSAAPVEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPVSEALEQWG GGGSCGGGGSAAPVAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG TTCQVLNPYYSQCL
CatGSub2_CBM	MCGGGGSAAPFEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPFSEALEQWG GGGSCGGGGSAAPFAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG TTCQVLNPYYSQCL
ElaSub2_CBM_His	MCGGGGSAAPVEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPVSEALEQWG GGGSCGGGGSAAPVAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG TTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH
CatGSub2_CBM_His	MCGGGGSAAPFEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPFSEALEQWG GGGSCGGGGSAAPFAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASG TTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH

[0593] 表5B:具有亲水性碳水化合物结合模块的嵌合基因变体的核苷酸序列。使用位于克隆载体的MCS中的Nco I和Xho I限制性位点将所有八种构建体克隆到pET-32b(+)表达载体(Novagen)中。

[0594]

ElaSub1_CBM ATGGGTGGTAGCTGCGGTGGTGGTGGTAGCGCAGCACCGGTTGGTGGTGGCGGTTCA GCTGCTCCTGTGGGTGGCGGTGGTTCACCGCCTGGTGGTAATCGTGGTACAACCACCA CCCGTCGTCCGGCAACCACAACCGGTAGCAGTCCGGGTCCGACCCAGAGCCATTATG GTCAGTGTGGTGGTATTGGTTATAGCGGTCCGACCGTTTGTGCAAGCGGCACCACCTG TCAGGTTCTGAATCCGTATTATAGCCAGTGTCTG
CatGSub1_CBM ATGGGTGGTAGCTGCGGTGGTGGTGGTAGCGCAGCACCGTTTGGTGGTGGCGGTTCA GCTGCTCCTTTTGGTGGCGGTGGTTCACCGCCTGGTGGTAATCGTGGTACAACCACCA CCCGTCGTCCGGCAACCACAACCGGTAGCAGTCCGGGTCCGACCCAGAGCCATTATG GTCAGTGTGGTGGTATTGGTTATAGCGGTCCGACCGTTTGTGCAAGCGGCACCACCTG TCAGGTTCTGAATCCGTATTATAGCCAGTGTCTG
ElaSub1_CBM _His ATGGGTGGTAGCTGCGGTGGTGGTGGTAGCGCAGCACCGGTTGGTGGTGGCGGTTCA GCTGCTCCTGTGGGTGGCGGTGGTTCACCGCCTGGTGGTAATCGTGGTACAACCACCA CCCGTCGTCCGGCAACCACAACCGGTAGCAGTCCGGGTCCGACCCAGAGCCATTATG GTCAGTGTGGTGGTATTGGTTATAGCGGTCCGACCGTTTGTGCAAGCGGCACCACCTG TCAGGTTCTGAATCCGTATTATAGCCAGTGTCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC TGA
CatGSub1_CBM_His ATGGGTGGTAGCTGCGGTGGTGGTGGTAGCGCAGCACCGTTTGGTGGTGGCGGTTCA GCTGCTCCTTTTGGTGGCGGTGGTTCACCGCCTGGTGGTAATCGTGGTACAACCACCA

[0595]

CCCGTCGTCCGGCAACCACAACCGGTAGCAGTCCGGGTCCGACCCAGAGCCATTATG GTCAGTGTGGTGGTATTGGTTATAGCGGTCCGACCGTTTGTGCAAGCGGCACCACCTG TCAGGTTCTGAATCCGTATTATAGCCAGTGTCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC TGA
ElaSub2_CBM ATGTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTGAACAGCTGGAATGGCTGCAGGG CGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTAGCGAAGCGCTGG AACAGTGGGGCGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTGCG GGCGCGGGCGCGGGCACCCAGAGCCATTATGGCCAGTGCGGCGGCATTGGCTATAGC GGCCCGACCGTGTGCGCGAGCGGCACCACCTGCCAGGTGCTGAACCCGTATTATAGCC AGTGCCTG
CatGSub2_CBM ATGTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTGAACAGCTGGAATGGCTGCAGGGC GGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTAGCGAAGCGCTGGA ACAGTGGGGCGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTGCGG GCGCGGGCGCGGGCACCCAGAGCCATTATGGCCAGTGCGGCGGCATTGGCTATAGCG GCCCGACCGTGTGCGCGAGCGGCACCACCTGCCAGGTGCTGAACCCGTATTATAGCCA GTGCCTG
ElaSub2_CBM_His ATGTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTGAACAGCTGGAATGGCTGCAGGG CGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTAGCGAAGCGCTGG AACAGTGGGGCGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGGTTGCG GGCGCGGGCGCGGGCACCCAGAGCCATTATGGCCAGTGCGGCGGCATTGGCTATAGC GGCCCGACCGTGTGCGCGAGCGGCACCACCTGCCAGGTGCTGAACCCGTATTATAGCC AGTGCCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
CatGSub2_CBM_His ATGTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTGAACAGCTGGAATGGCTGCAGGGC GGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTAGCGAAGCGCTGGA ACAGTGGGGCGGCGGCGGCAGCTGCGGCGGCGGCGGCAGCGCAGCACCGTTTGCGG GCGCGGGCGCGGGCACCCAGAGCCATTATGGCCAGTGCGGCGGCATTGGCTATAGCG GCCCGACCGTGTGCGCGAGCGGCACCACCTGCCAGGTGCTGAACCCGTATTATAGCCA GTGCCTGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

[0596] 实例25:具有聚合物结合序列的弹性蛋白酶(HLE)底物的表达。

[0597] 变体3(实例9):BL21金(DE3)[pET32b(+)ela sub1_cbm his]

[0598] 使用NcoI和XhoI限制性位点/酶将嵌合基因克隆到pET32b(+)表达系统中。嵌合肽的最终蛋白质表达在大肠杆菌BL21金(DE3),蛋白酶缺陷表达宿主中进行,其能够基于pET32b(+)表达载体的T7启动子进行适当的蛋白质表达。用补充有100μg ml^{-1}氨苄青霉素的2xTY培养基进行含有重组[pET32b(+)ela sub1_cbm]构建体的BL21金(DE3)宿主菌株的发酵,用于维持质粒。在30℃下摇动生长的过夜培养物用于接种主要培养物。细胞在37℃(快速诱导方案)和30℃(慢速诱导方案)下摇动生长,直到600nm处的光密度达到约0.6。通过加入0.5mM IPTG(终浓度)诱导重组构建体的表达,而蛋白质表达在37℃下进行4小时(快速诱导),并在18℃下进行20小时(慢速诱导)。两种方案(快速和慢速诱导)显示出与可溶性重组蛋白的产量相同的结果。蛋白质表达之后,通过离心收获细胞,并通过溶菌酶处理破碎细胞,然后进行超声处理。与相同表达的空pET32b(+)载体相比,用SDS-PAGE监测重组蛋白的适当蛋白质表达。根据IBA方案,使用IBA Ni-NTA琼脂糖重力流动柱(1ml)从粗裂解物纯化

嵌合构建体。使用SDS-PAGE检查含有纯化蛋白质的级分。为了防止蛋白质在洗脱之后暴露于高咪唑浓度，使用来自通用电气医疗集团的PD 10脱盐柱进行缓冲液交换。纯化的嵌合融合构建体的产量可以用每2g初始细胞沉淀30mg蛋白质计算。为了将嵌合构建体与TrxA融合标签分离，使用来自默克米利波(Merck Millipore)的重组表达牛肠激酶。通过SDS-PAGE验证所需嵌合构建体与TrxA-Tag的分离。将含有HLE识别/切割位点两次的分离的嵌合蛋白用于与不同染料或前染料的偶联程序，所述染料或前染料表现出关于它们暴露正电荷基团和负电荷基团的能力的不同属性。

[0599] 通过亲水性碳水化合物结合模块将完成的嵌合构建体吸附到基于纤维素的滤纸(或织物)上。将含有嵌合肽的滤条用含有0.05U/ml HLE的0.1M磷酸钠缓冲液(pH 7.4)以及人体伤口液孵育30分钟。最初显示弹性蛋白酶活性的无色样品(澄清的上清液)显色蓝色，这取决于附着的染料。由于在内部HLE限制性位点(Ala-Ala-Pro-Val)中的一个或两个处的酶促切割，具有附着的雷玛唑亮蓝染料分子的肽片段脱离，产生蓝色上清液。替代性地，具有疏水性结合模块(PDB)的嵌合构建体可以用于吸附基于PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)的载剂材料。含有CatG切割位点而不是HLE切割位点的嵌合变体的产生允许在与具有HLE限制性位点的构建体所表达的相同要求下检测人CatG酶。

[0600] 在含有PDM结构域的构建体中，PDM基团可以以前述方式与CBD互换。来自粪产碱菌(PBM或PDM)序列的聚羟基丁酸酯解聚酶描述于Ribitsch等人，“纤维素裂解酶结合域的融合调节吸附特性和促进PET水解(Fusion of Binding Domains to Thermobifida cellulosilytica Cutinase to Tune Sorption characteristics and Enhancing PET Hydrolysis)，”《生物大分子(Biomacromolecules)》，14(6)，pp 1769-1776，2013。Ribitsch中的公开通过引用以其整体并入本文。类似地，可以以此方式使用任何固相结合结构域。可以互换地使用其它类型的CBD肽以实现所需的功能。

[0601] 如前述实例和功能测定所证明的，本文所公开的构建体包括不可溶的锚如CBD，其可与其它锚，特别是其它CBD或PDM互换。出于化学计量原因，优选较小的锚。

[0602] 关于构建体中含有的酶识别位点，如本文所例示的弹性蛋白酶具有广泛的偏好，其中AAPV序列是最优选的，然而，AAPF在转换方面几乎相同并且AAAA是类似的。因此，这些序列中的任何一个都可以在不丧失功能的情况下与另一个序列互换。

[0603] 关于构建体的C末端和所附到其的氨基酸，许多变化是可能的，但共识是缺乏侧链和缺乏电荷对于不阻碍切割位点是重要的。细胞素特别用作锚定染料的手段，并且特别是每个构建体不超过一个，优选地每个切割位点一个。它们应该远离切割位点，以确保磺化染料不会与酶相互作用超过必要的程度。

[0604] 关于肽底物中使用的染料，重要的是考虑靶向识别位点的特定酶。为此，弹性蛋白酶是碱性酶，并且它被强负电荷基团抑制。这意味着不需要每个切割位点多于一种磺化染料。期望磺酸盐基团的数量低于每个切割位点4个。随着这种磺酸盐基团数量的增加，存在将掩盖进入切割地点的风险。

[0605] 实例26:用乙烯基砜染料作为弹性蛋白酶底物染色纯化的Trx-Ela-Sub1

[0606] 将纯化和冻干的Trx-Ela-Sub1溶解在H_2O(0.01g/2.5ml)中(蛋白质浓度～0.2mg/ml)。使用PD-10柱将缓冲液从Tris-HCl交换为Na_2PO_4/Na_2SO_4溶液。

[0607] 用乙烯基砜染料(雷玛唑亮蓝R，RBB)染色:将210μlRBB(溶解在1.5mlNa_2PO_4/

Na_2SO_4中的7.7mg)溶液加入到1900μl蛋白质溶液并在37℃下摇动(750rpm)80分钟。

[0608] 通过His-Tag纯化进行纯化。

[0609] Trx-Ela-Sub1-RBB与弹性蛋白酶的反应：

[0610] 将染色和纯化的肽构建体涂覆在纤维素表面上，并在37℃下干燥2小时。用H_2O移除未结合的Trx-Ela-Sub1-RBB。将具有涂覆的弹性蛋白酶底物的条带分别与含有和不含弹性蛋白酶的缓冲液一起孵育。图10中可以看到弹性蛋白酶响应染料释放。

[0611] 实例27：硝酸呋喃黄和溴甲酚紫的固定化

[0612] 通过(3-缩水甘油氧基丙基)三甲氧基硅烷(GPTMS)将硝嗪黄和溴甲酚紫固定在纤维素上。将15mM上述染料的溶液与GPTMS(300mM)在25℃下反应过夜。将完全反应混合物(5μL)移液到滤纸条上，并且在80℃下干燥30分钟，并在170℃下干燥5分钟。然后将染色的条带在水中彻底洗涤。通过将它们在不同pH的溶液中孵育，可以观察条带的pH响应。图7中显示了在pH 4.5、7.2或8.5中孵育之后的颜色响应。除pH 8.5缓冲液外，两种染料混合物均未显示颜色响应，表明它们的pH转变介于pH 7.2与8.5之间。

[0613] 实例28：溴代甲酚紫在富含OH的表面上的3步固定化，如纤维素作为pH指示剂。

[0614] 1.步骤：在环境温度和搅拌条件下，使GPTMS(9mM到450mM)在乙酸(57μM)中反应10到180分钟。

[0615] 2.步骤：在反应溶液中浸泡富含OH的表面(例如纤维素)。将浸泡的材料在80到120℃下孵育5到20分钟。

[0616] 3.步骤：将溴甲酚紫(0.1到3.3mg/ml)涂覆在预处理的材料上并在120℃下干燥20分钟。

[0617] 表6中列出了不同pH值下的不同颜色。

[0618] 表6：不同的pH值和固定的溴甲酚紫的对应颜色

[0619]

pH值	颜色
4.5	黄色
5.0	黄色/绿色
5.5	绿色
6.0	绿色
6.2	绿色
6.5	深绿色
7.0	汽油
7.5	蓝色
8.0	蓝色

[0620] 实例29：基于磷脂酶C的测试-液体系统

[0621] 诊断系统的制备

[0622] 对于此诊断工具，使用对硝基苯基磷酰胆碱作为磷脂酶C的底物。将对硝基苯基磷酸胆碱溶解在水(50到100mM)中。使用具有70％山梨醇pH 7.2的250mM Tris/HCl缓冲液作为测定缓冲液。将230μl缓冲液和100μl底物移液到微量滴定板中。

[0623] 诊断：将5与12μL之间体积的伤口液样品加入测试系统，优选地8与10μl之间，并通

过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育30分钟。此后，感染将通过从无色到黄色的颜色变化来指示。

[0624] 测试方案和结果：

[0625] 将感染伤口液样品(A、B、C)和未感染的样品(D、E、F)与IA中描述的诊断系统一起孵育。孵育30分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B和C的颜色变为黄色。

[0626]

伤口液样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0627] 实例30：基于磷脂酶A2的测试-液体系统

[0628] 诊断系统的制备。对于此诊断工具，使用4-硝基-3-辛酰基苯甲酸作为磷脂酶A2-底物。将4-硝基-3-辛酰基苯甲酸(1,7mM)溶解在含有50mM Tris/HCl缓冲液pH 7,2,150mM KCL和10mM CaCl2的测定缓冲液中。将190μl缓冲液移液到微量滴定板中。

[0629] 诊断：将5与12μL之间体积的伤口液样品加入测试系统，优选地8与10μl之间，并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育30分钟。此后，感染将通过从无色到黄色的颜色变化来指示。

[0630] 测试方案和结果：将感染伤口液样品(A,B,C)和未感染的样品(D,E,F)与IA中描述的诊断系统一起温育。孵育30分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B和C的颜色变为黄色。

[0631]

伤口液样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0632] 实例31：基于过氧化氢酶的测试-液体系统

[0633] 诊断系统的准备：

[0634] 对于此诊断工具：使用Purpald作为过氧化氢酶的底物。将Purpalt溶解在水(50到100mM)中。将200μl底物溶液移液到微量滴定板中。

[0635] 诊断：将5与12μL之间体积的伤口液样品加入测试系统，优选地8与10μl之间，并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育30分钟。此后，感染将通过从无色到深紫的颜色变化来指示。

[0636] 测试方案和结果：将感染伤口液样品(A,B,C)和未感染的样品(D,E,F)与IA中描述

的诊断系统一起温育。孵育30分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B和C的颜色变为紫色。

[0637]

伤口液样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0638] 实例32：测试体液

[0639] 含有MPO、弹性蛋白酶、溶菌酶、磷脂酶和过氧化氢酶和任选地pH指示剂中的一种或多种的底物的材料与体液接触，如伤口、泪液、玻璃体、脑脊液、气道吸出物或痰液、滑液、血液、血浆、血清、尿液、腹膜、间质、皮下、胆汁、肠道或类似流体。来自受感染的有机体或组织的样品倾向于显示更高程度的反应。反应中的一种或多种的组合用于检测感染及其程度。

[0640] 实例33：基于弹性蛋白酶的测试-液体系统

[0641] 将在DMSO中溶解在0.1M HEPES缓冲液(pH 7.4，含有0.5M NaCl)中的100μL浓度为20mM的N-甲氧基琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-丙醇-对-对硝基苯胺溶液移液到透明的埃彭多夫管中。N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-pro-val-p-硝基苯胺的终浓度可以在0.05到2.50mM之间，并且优选地在0.80与1.20mM之间。将1与15μL之间体积的痰样品加入测试系统，优选地2到5μl之间，并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育5分钟。此后，伤口感染将通过从浅粉红色到黄色的颜色变化来指示。含有未感染痰标品的混合物不会改变颜色。将2μL感染的(A、B、C)和未感染的痰样品(D、E、F)与IA中描述的诊断系统一起孵育，所述诊断系统含有1.0mM N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺的底物浓度。孵育10分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的痰样品A、B和C的颜色变为黄色。

[0642]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0643] 实例34：基于弹性蛋白酶的测试-基于纤维素纸的系统

[0644] 诊断系统的制备。

[0645] 将N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺以281mM的浓度溶解在二甲氧基亚砜中。将2到5μl此溶液，优选地2μl移液到惠特曼滤纸上。

[0646] 然后将与N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺一起孵育的惠特曼滤

纸测试系统与1到5μl，优选地2μl痰样品和2μl 2μl NaCl(50mM)一起孵育并在室温下孵育5分钟。此后，通过滤纸颜色变为黄色来指示感染。未感染的痰样品不会改变颜色。

[0647] 使用惠特曼滤纸的小拭子，取感染的样品(A、B)和未感染的样品(C、D)并置于含有底物mM N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺的1C中所述的诊断系统中。孵育10分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B的颜色变为黄色。

[0648]

痰样品	根据医生的诊断	测试响应	根据测试感染

[0649]

	感染		
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	否	没有颜色变化	否
D	否	没有颜色变化	否

[0650] 实例35:基于组织蛋白酶的测试-液体系统

[0651] 将N-琥珀酰-ala-ala-pro-phe-对硝基苯胺以20mM的浓度溶解在二甲氧基亚砜中，并在0.1M HEPES缓冲液(pH 7.4，含有0.5M NaCl)中稀释。N-甲氧基琥珀酰-ala-ala-pro-phe对硝基苯胺的终浓度可以为0.5到5mM之间，并且优选地为3mM。

[0652] 将1与5μL之间体积的痰样品加入测试系统，优选地2到4μl，并通过手动摇动混合。将此混合物在37℃下孵育20分钟。此后，感染将通过颜色变为黄色来指示。含有未感染样品的混合物不会改变颜色。

[0653] 将5μL感染的(A、B、C)和未感染的痰样品(D、E、F)与IA中描述的诊断系统一起孵育，所述诊断系统包括底物浓度为3.0mM N-

[0654] ala-ala-pro-phe-对硝基苯胺。孵育20到30分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B和C的颜色变为黄色。

[0655]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0656] 实例36:基于组织蛋白酶的测试-基于纤维素的系统

[0657] 将N-甲氧基琥珀酰-ala-ala-pro-phe-对硝基苯胺以20mM的浓度溶解在二甲氧基亚砜中，并在0.1M HEPES缓冲液(pH 7.4，含有0.5M NaCl)中稀释。N-甲氧基琥珀酰-ala-ala-pro-phe-对硝基苯胺的终浓度可以为0.5到10mM之间，并且优选地为5.00mM。将10μL此溶液移液到惠特曼滤纸上。

[0658] 然后将与N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺一起孵育的惠特曼滤纸测试系统与1到20μl，优选地2μl痰样品和2μl 2μl NaCl(50mM)一起孵育并在室温下孵育5分钟。此后，通过滤纸颜色变为黄色来指示感染。未感染的痰液样本不会改变颜色，

[0659] 使用惠特曼滤纸的小拭子，取感染的样品(A、B)和未感染的样品(C、D)并置于含有

底物mM N-甲氧基琥珀酰基-ala-ala-丙谷胱精对硝基苯胺的1C中所述的诊断系统中。孵育210分钟之后对样品进行目视检查表明，只有感染的样品A、B的颜色变为黄色。

[0660]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	否	没有颜色变化	否
D	否	没有颜色变化	否

[0661] 实例37:基于髓过氧化物酶的测试-液体系统

[0662] 对于此诊断工具，可以使用六种不同的底物，即TMB、ABTS、愈创木酚、4-氨基-3-甲氧基苯甲酸和快蓝RR。使用包括0.3M蔗糖的3350μl琥珀酸盐缓冲液(pH 5.4)，加入15μl 1％H2O2和7μl底物(5到40mM ABTS，20到150mM TMB，0.025mM快蓝RR，10到50mM 4-氨基-3-甲氧基苯甲酸和10到20mM愈创木酚)。首先将TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶解在N,N-甲基甲酰胺中，将快蓝RR溶解在乙醇中，同时可以将ABTS溶解在水中，并且4-氨基-3-甲氧基苯甲酸溶解在DMSO中。愈创木酚。将100μl溶液移液到微量滴定板中。

[0663] 将1与7μL之间体积的痰样品加入测试系统，优选地4到6μl之间，并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育10分钟。此后，感染将通过分别从无色到蓝色(TMB或绿色(ABTS)以及到棕色到红色(4-氨基-3-甲氧基苯甲酸和愈创木酚)的颜色变化表示，含有未感染样品的混合物不会改变颜色

[0664] 将感染的痰样品(A、B、C)和未感染的痰样品(D、E、F)与含有不同底物的IA中描述的诊断系统一起孵育。孵育5分钟之后对样品进行目视检查表明，对于TMB，只有感染的样品A、B和C的颜色变为蓝色。

[0665]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	蓝色	是
B	是	蓝色	是
C	是	蓝色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0666] 实例38:基于髓过氧化物酶的测试-基于纤维素的系统

[0667] 将1,5μlH2O2(50mM)和1,5μl底物(109mM ABTS，454mM TMB，230mM快蓝，x mM愈创木酚，x mM 4-氨基-3-甲氧基苯甲酸)孵育在小惠特曼滤纸盘上。

[0668] 然后将与不同MPO底物孵育的惠特曼滤纸的测试系统与1到5μl，优选地2μl痰样品一起孵育，并在室温下孵育5分钟。此后，通过滤纸颜色变为蓝色、绿色或棕红色来指示感染。未感染的痰液样本不会改变颜色。

[0669] 使用惠特曼滤纸的小拭子，取感染的样品(A、B)和未感染的样品(C、D)并置于含有底物TMB、ABTS、快蓝RR、愈创木酚和4A3Mba的1C中所述的诊断系统中。孵育5分钟之后对样品进行目视检查表明，对于感染的样品A、B，颜色变为棕色(4A3Mba)。

[0670]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	棕色	是
B	是	棕色	是
C	否	没有颜色变化	否
D	否	没有颜色变化	否

[0671] 实例39:基于磷脂酶A2的测试-液体系统

[0672] 对于此诊断工具,使用4-硝基-3-辛酰基苯甲酸作为磷脂酶A2-底物。将4-硝基-3-辛酰基苯甲酸(1.7mM)溶解在含有50mM Tris/HCl缓冲液pH 7.2,150mM KCL和10mM CaCl2的测定缓冲液中。将190μl缓冲液移液到微量滴定板中。

[0673] 将5与12μL之间体积的痰伤口液样品加入测试系统,优选地8与10μl之间,并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育30分钟。此后,感染将通过从无色到黄色的颜色变化来指示。将感染的痰样品(A、B)和未感染的样品(E、F)与IA中描述的诊断系统一起孵育。孵育30分钟之后对样品进行目视检查表明,只有感染的样品A、B和C的颜色变为黄色。

[0674]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0675] 实例40:基于过氧化氢酶的测试-液体系统

[0676] 对于此诊断工具:使用Purpald作为过氧化氢酶的底物。将Purpalt溶解在水(50到100mM?)中。将200μl底物溶液移液到微量滴定板中。

[0677] 将5与12μL之间体积的痰样品加入测试系统,优选地8与10μl之间,并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在室温下孵育30分钟。此后,感染将通过从无色到深紫的颜色变化来指示。

[0678] 将感染伤口液样品(A、B、C)和未感染的样品(D、E、F)与IA中描述的诊断系统一起孵育。孵育30分钟之后对样品进行目视检查表明,只有感染的痰样品A、B和C的颜色变为紫色。

[0679]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	黄色	是
B	是	黄色	是
C	是	黄色	是
D	否	没有颜色变化	否
E	否	没有颜色变化	否
F	否	没有颜色变化	否

[0680] 实例41:基于溶菌酶的测试-液体系统

[0681] 将1与15mg之间的量的溶血微球菌肽吡啶聚糖悬浮在15ml 0.1M KH2PO4缓冲液(pH 7.0)中。优选地,悬浮8与10mg之间的量。将290μL此溶液移液到透明的微量滴定板中。

[0682] 将10μL体积的痰加入到测试系统中并通过手动摇动混合10秒。将此混合物在37℃下孵育15分钟。此后,感染将通过浊度下降来指示。含有未感染样品的混合物不会改变。

[0683] 将10μL感染的(A、B、C)和未感染的样品(D、E、F)与含有溶原微球菌的2A中描述的诊断系统一起孵育作为溶菌酶的底物。孵育20分钟之后对样品进行目视检查表明,只有感染的样品A、B和C发生浊度变化。

[0684]

痰样品	根据医生的诊断感染	测试响应	根据测试感染
A	是	澄清	是
B	是	澄清	是
C	是	澄清	是
D	否	没有浑度损失	否
E	否	没有浑度损失	否
F	否	没有浑度损失	否

[0685] 用于检测感染的溶菌酶活性测量

[0686] 染色的肽聚糖。

[0687] 制备每种LPG-RB5变体(1.5mg/ml)的一种悬浮液(NaCl-溶液,0.9%),并各自分成6个1ml样品(3个阳性,3个阴性)。将阳性对照与溶菌酶原液(10μl,1,000,000U/ml)混合到10,000U/ml的最终溶菌酶活性。将所有样品在37℃下孵育60分钟,并且然后离心(5分钟,10000g)。在上清液中检测到蓝色的显色。将100μl每种上清液转移到96孔板中,并在597nm处测量吸光度。

[0688] 其它实施例:

[0689] 通过将本公开技术的一般或具体描述的反应物和/或操作条件替换为前述实例中使用的那些,可以类似的成功重复前述实例。

[0690] 通过以上的说明,本领域的技术人员可以很容易地确定本公开技术的实质特征并且在不偏离其精神和范围的情况下可以对本公开技术作不同变化和变更,以使它适应不同用途和条件。

[0691] 除非另外限定,否则本文中使用的全部技术与科学术语具有本公开技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于本公开技术的实践或测试中,但是在前述段落中描述了合适的方法和材料。此外,材料、方法、以及实例仅是说明性的,并且不旨在进行限制。在有冲突的情况下,将以本说明书,包含定义为准。

[0692] 本文引用的所有美国专利和公开的或未公开的美国专利申请都通过引用而并入。本文引用的所有公开的外文专利合专利申请都通过引用特此并入。本文引用的所有公开的参考文献、文献、手稿、科学文献均通过引用并入本文。与本文引用的NCBI、GENBANK、EBI、PUBMED数据库有关的所有标识符和登录号在此并入作为参考。

[0693] 尽管本文已经示出并描述了本公开技术的优选实施例,但对于本领域的技术人员

而言是显而易见的是这种实施例仅以实例的方式提供。在不脱离本公开技术的情况下，本领域技术人员现在将想到许多变化、改变和替换。应当理解的是，在实践本公开技术时可以采用本文所描述的本公开技术的实施例的各种替代方案。下述权利要求旨在限定本公开技术的范围，并且因此覆盖这些权利要求及其等效物的范围内的方法和结构。

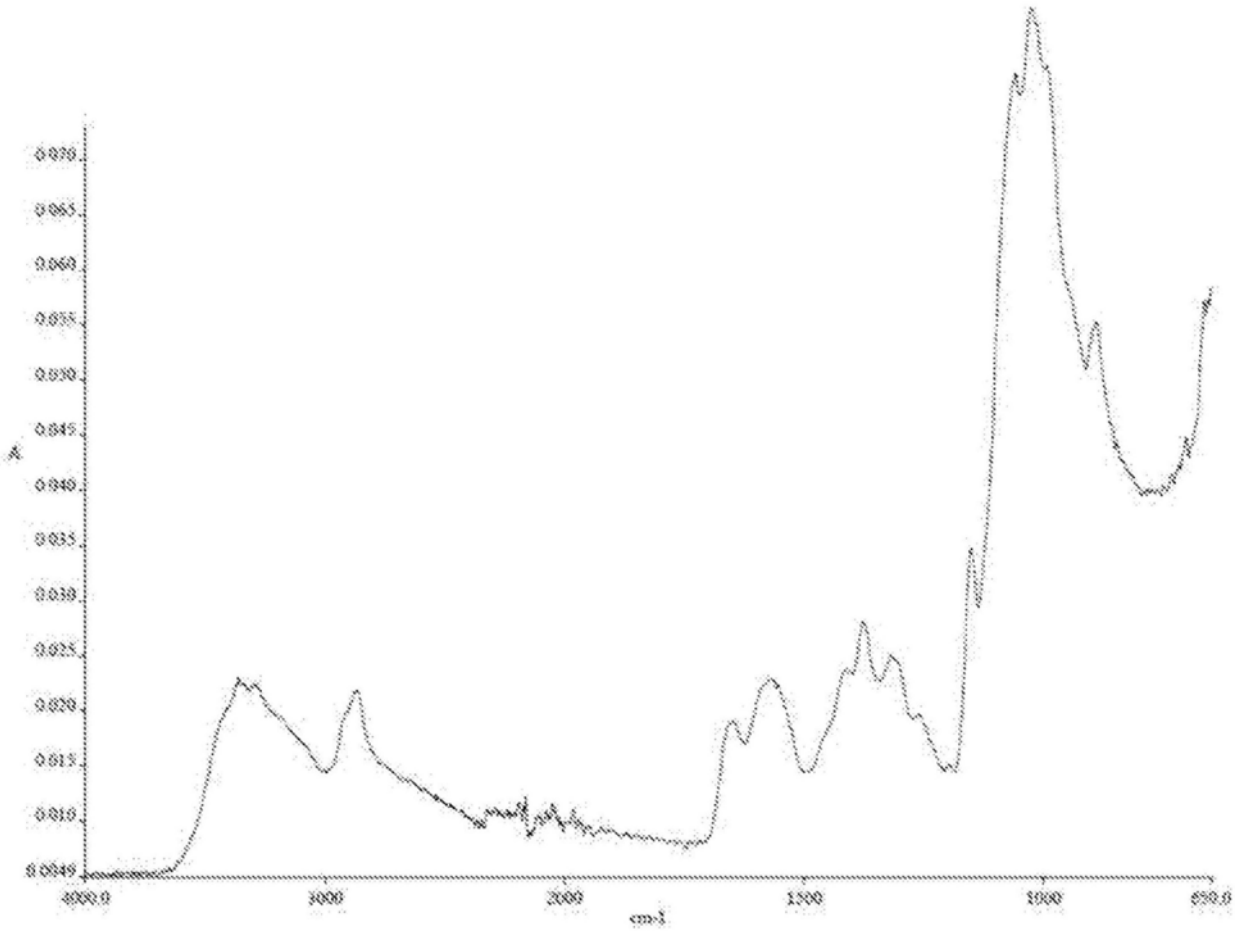

A
0.070
0.065
0.060
0.055
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.0049
4000.0
3000
2000
1500
1000
650.0
cm-1

图1

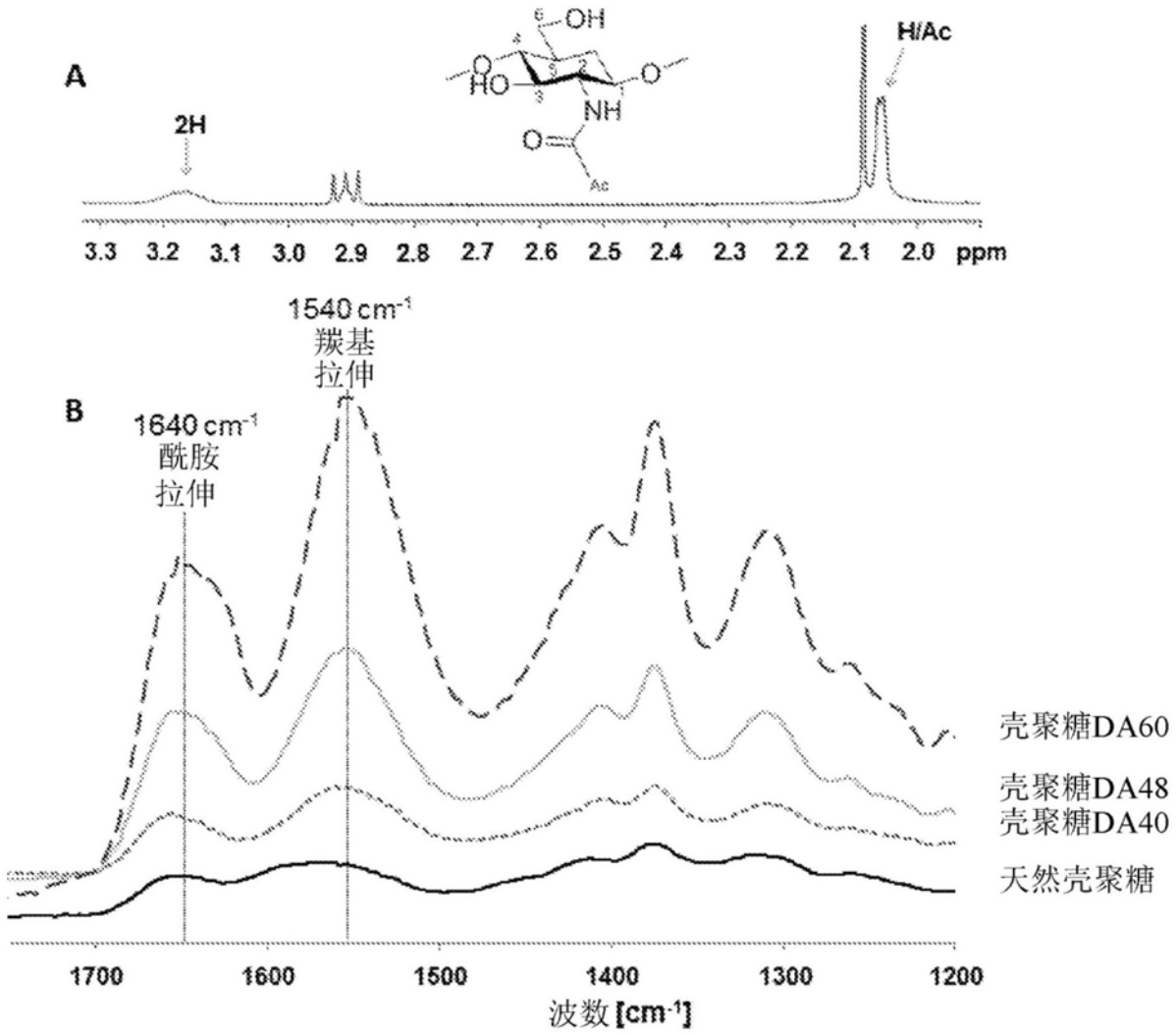

A
2H
H/Ac
OH
HO
NH
Ac
3.3 3.2 3.1 3.0 2.9 2.8 2.7 2.6 2.5 2.4 2.3 2.2 2.1 2.0 ppm
B
1540 cm-1
羰基
拉伸
1640 cm-1
酰胺
拉伸
壳聚糖DA60
壳聚糖DA48
壳聚糖DA40
天然壳聚糖
1700 1600 1500 1400 1300 1200
波数 [cm-1]

图2

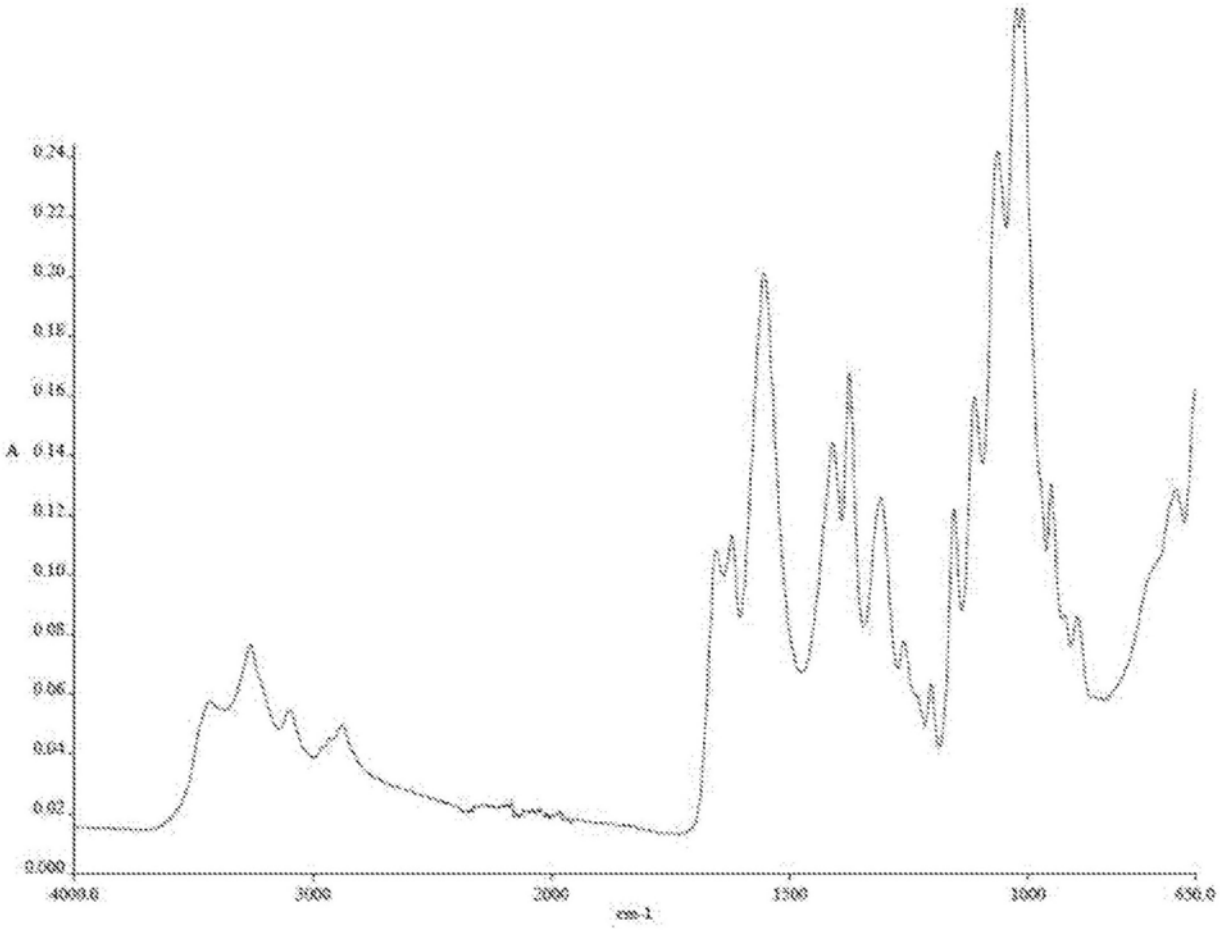

A
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.000
4000.0
3000
2000
1500
1000
650.0
cm-1

图3

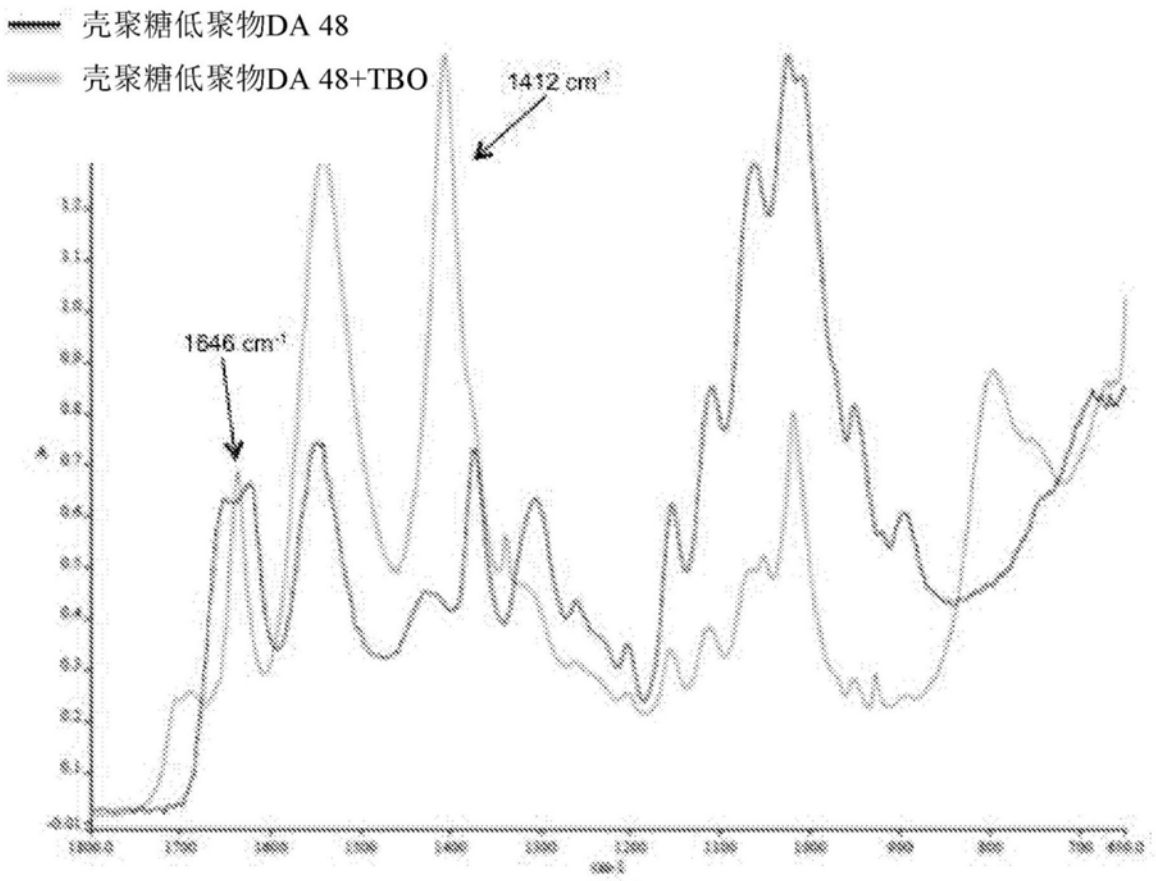


图4

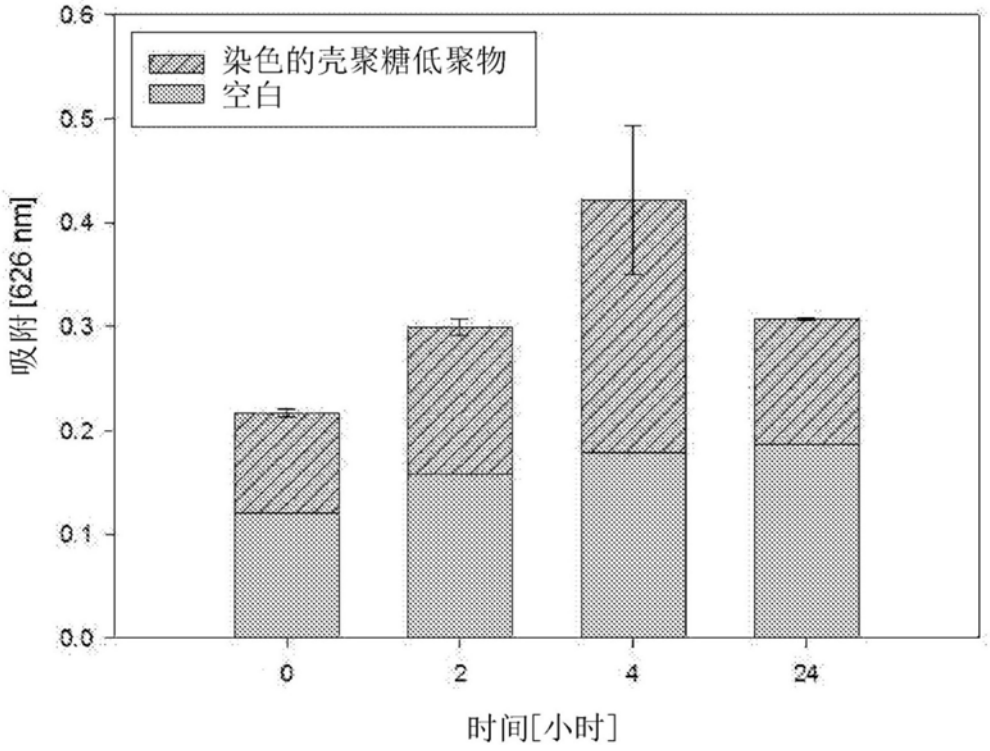


图5

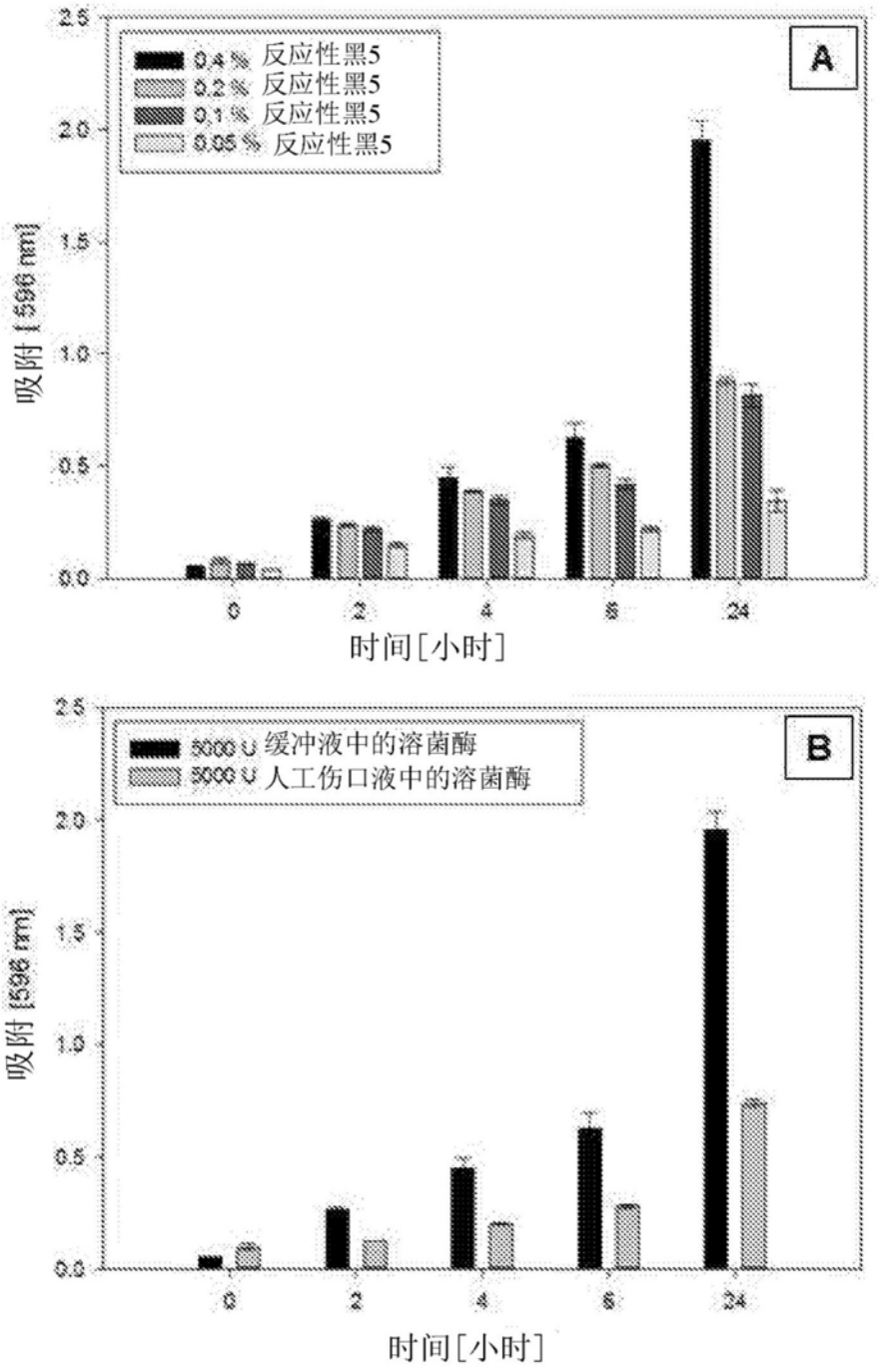

A
0.4 % 反应性黑5
0.2 % 反应性黑5
0.1 % 反应性黑5
0.05 % 反应性黑5
吸附 [596 nm]
时间[小时]
B
5000 U 缓冲液中的溶菌酶
5000 U 人工伤口液中的溶菌酶
吸附 [596 nm]
时间[小时]

图6

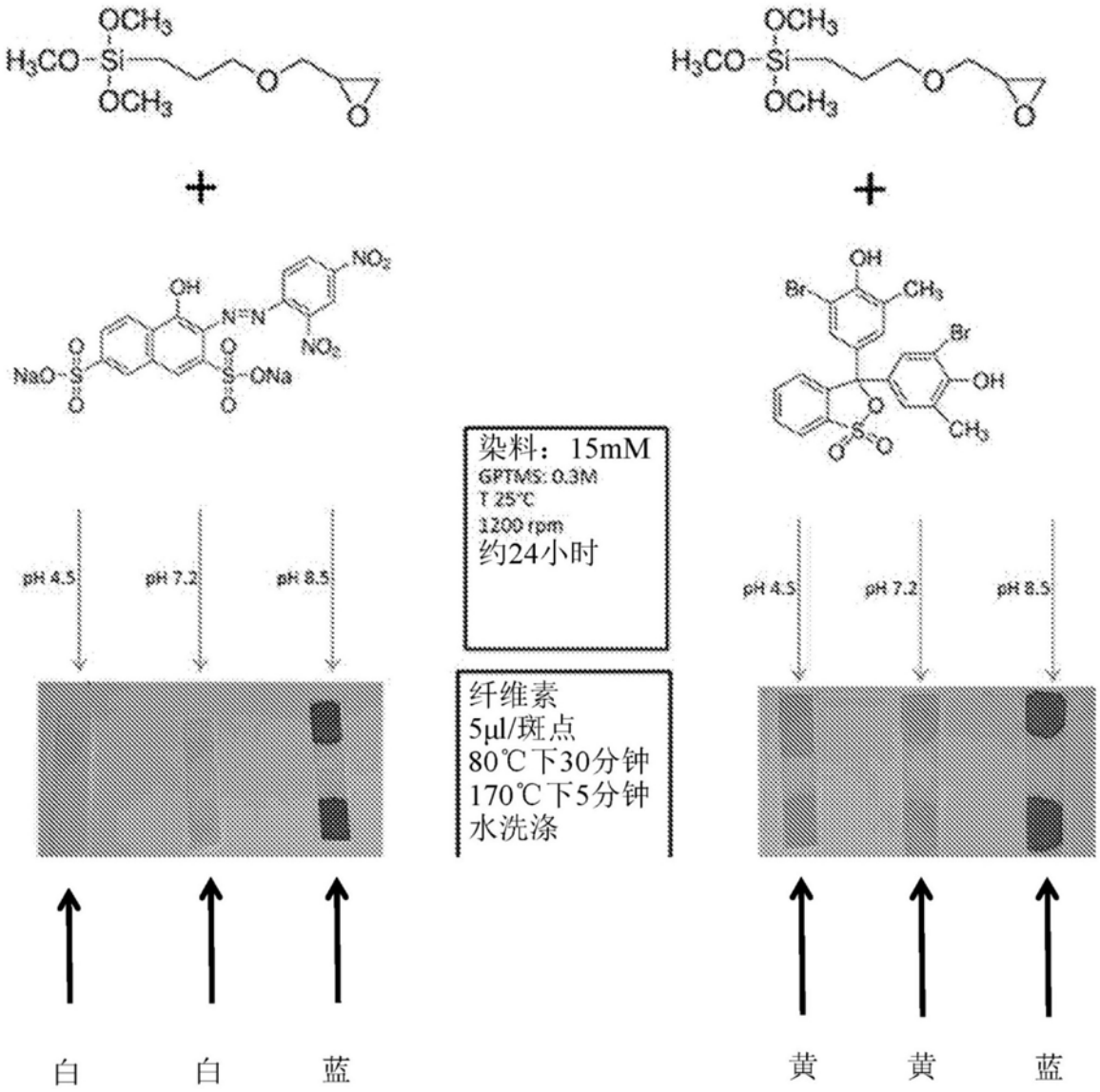

染料：15mM
GPTMS: 0.3M
T 25℃
1200 rpm
约24小时
纤维素
5μl/斑点
80℃下30分钟
170℃下5分钟
水洗涤
pH 4.5
pH 7.2
pH 8.5
白
白
蓝
黄
黄
蓝

图7

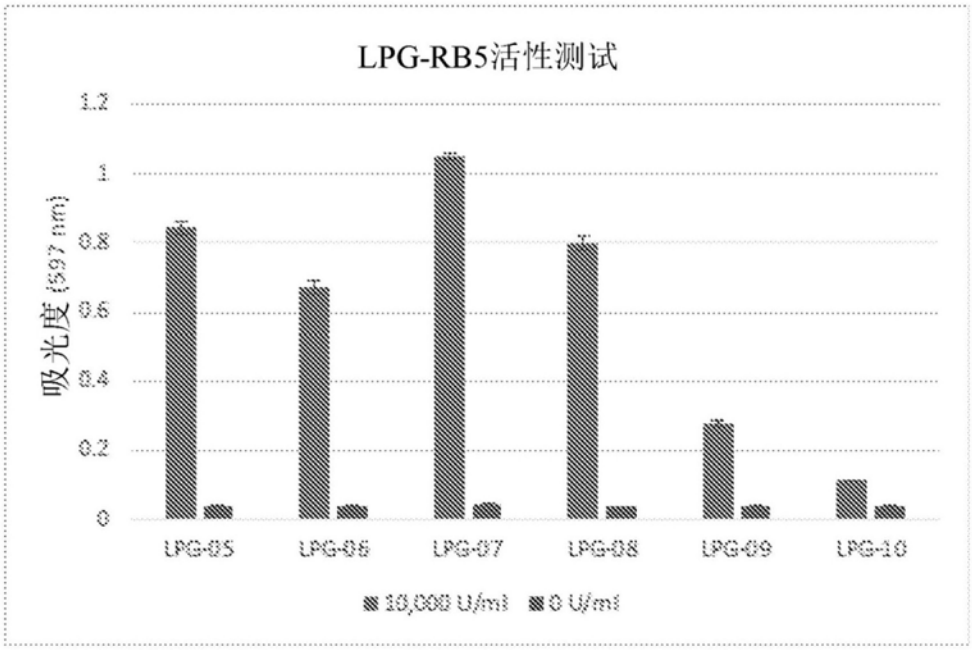

LPG-RB5活性测试
吸光度(597 nm)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
LPG-05
LPG-06
LPG-07
LPG-08
LPG-09
LPG-10
10,000 U/ml
0 U/ml

图8

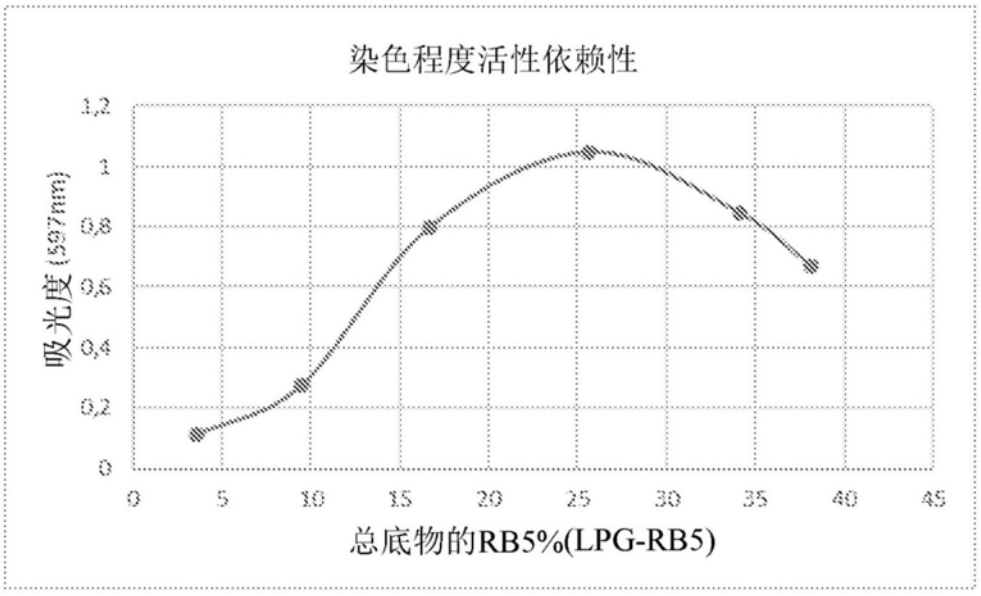

染色程度活性依赖性
吸光度(597nm)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
总底物的RB5%(LPG-RB5)

图9

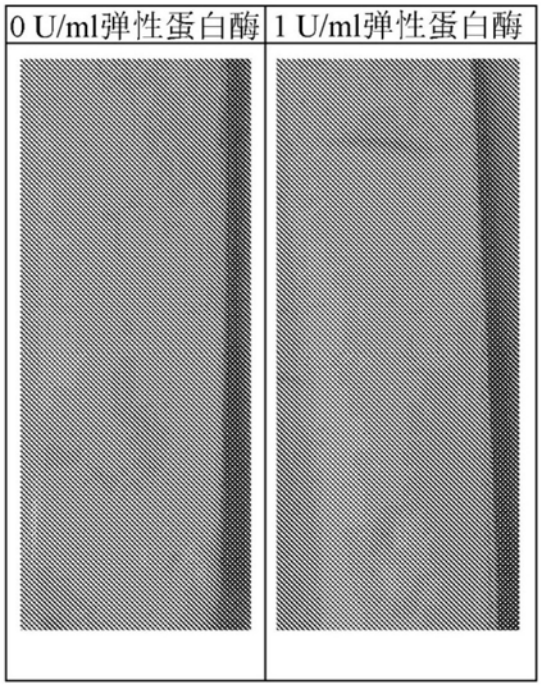


图10

各种构建体的多序列比对

```
CatGSub2CBM         MCGGGGSAAPFEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPFSEALE--QWGGGGSCGGGGS-------
ElaSub2CBM          MCGGGGSAAPVEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPVSEALE--QWGGGGSCGGGGS-------
CatGSub2CBMHis      MCGGGGSAAPFEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPFSEALE--QWGGGGSCGGGGS-------
ElaSub2CBMHis       MCGGGGSAAPVEQLEWLQGGGGSCGGGGSAAPVSEALE--QWGGGGSCGGGGS-------
ElaSub1CBM          ------------------MGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRR
ElaSub1CBMHis       ------------------MGGSCGGGGSAAPVGGGGSAAPVGGGGSPPGGNRGTTTTRR
CatGSub1CBM         ------------------MGGSCGGGGSAAPFGGGGSAAPFGGGGSPPGGNRGTTTTRR
CatGSub1CBMHis      ------------------MGGSCGGGGSAAPFGGGGSAAPFGGGGSPPGGNRGTTTTRR
                                       ************.. . .    *****  **.

CatGSub2CBM         -AAPFAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL--------
ElaSub2CBM          -AAPVAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL--------
CatGSub2CBMHis      -AAPFAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH
ElaSub2CBMHis       -AAPVAGAGAGTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH
ElaSub1CBM          PATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL--------
ElaSub1CBMHis       PATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH
CatGSub1CBM         PATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCL--------
CatGSub1CBMHis      PATTTGSSPGPTQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPYYSQCLLEHHHHHH
                     *:  ..: . **********************************
```

图11