[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109566.8

[51] Int. Cl.
A01N 39/00 (2006.01)
A01N 59/16 (2006.01)
A01N 59/10 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 33/32 (2006.01)
A61K 33/14 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 8 日

[11] 公开号 CN 1744819A

[22] 申请日 2003.12.23
[21] 申请号 200380109566.8
[30] 优先权
[32] 2002.12.23 [33] US [31] 60/436,197
[86] 国际申请 PCT/US2003/041038 2003.12.23
[87] 国际公布 WO2004/057965 英 2004.7.15
[85] 进入国家阶段日期 2005.8.8
[71] 申请人 格雷斯通医疗集团有限公司
地址 美国田纳西州
[72] 发明人 斯蒂芬·H·门罗
汉斯·胡克斯特拉
A·J·J·范登伯格
[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司
代理人 王允方
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称

慢性伤口护理中的活性氧物质的还原

[57] 摘要

通过以 pH 值在约 5 与约 7 之间的金属离子溶液治疗伤口来调节与所述伤口相关联的活性氧物质，所述金属离子选自由钾离子、锌离子、钙离子和铷离子组成的群组。 优选地，采用柠檬酸来调节所述 pH 值。 已发现，向显示超氧负离子的伤口施加所述提取物能够通过减少超氧负离子水平而有效治疗所述伤口。 而且，已发现，以本发明组合物治疗部分厚度切割伤口和接触烧伤可改良这些伤口的上皮形成。 除本发明的抗氧化活性外，采用本发明组合物治疗所述伤口可通过人类 PMN 对 ROS 的产生产生抑制效应，并对人类补体激活作用产生抑制效应，且因此进一步有益于慢性伤口护理。

1. 一种用于增进伤口愈合的方法，其包括如下步骤：

提供医药上有效的 pH 值基本为中性的金属离子水溶液，所述金属离子选自由钾离子、锌离子、钙离子和铯离子组成的群组，将所述溶液施加到所述伤口经一段足够使与所述伤口相关联的活性氧物质达成中和的时间，借此通过所述溶液对与所述伤口相关联的所述活性氧物质的所述中和作用增进所述伤口的愈合。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其包括以柠檬酸调节所述溶液的所述 pH 值的步骤。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所述溶液的所述 pH 值为约 5 和约 7。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述溶液显示一约为 33/ml 的超氧清除 IC50 值。

5. 一种用于增进伤口愈合的方法，其包括如下步骤：

提供医药上有效的 pH 值在约 5 与约 7 之间的金属离子水溶液，所述金属离子选自由钾离子、锌离子、钙离子和铯离子组成的群组，将所述溶液施加到所述伤口，借此所述溶液通过受激多形核嗜中性粒细胞来抑制与所述伤口相关联的活性氧物质的产生、清除超氧负离子、抑制吸引或刺激多形核嗜中性粒细胞的因子、或达成所述作用的组合，及所述伤口愈合。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中采用柠檬酸将所述溶液的所述 pH 值调节到约 5。

7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中采用盐酸将所述溶液的所述 pH 值调节到约 7。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述溶液包括 10 至 20 重量份数的钾离子、0.00001 至 20 重量份数的锌离子和数量不超过约 40 重量份数的铯离子。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述溶液含有足够的柠檬酸以将所述溶液的所述 pH 值调节到约 5 与 7 之间。

10. 根据权利要求 8 所述的方法，包括 0.01 至 10 重量份数的钙离子。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述溶液含有足够的柠檬酸以将所述溶液的所述 pH 值调节到约 5 与 7 之间。

12. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述溶液包括 10 至 20 重量份数的钾离子、0.00001 至 20 重量份数的锌离子和数量不超过约 40 重量份数的铷离子。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述溶液含有足够的柠檬酸以将所述溶液的所述 pH 值调节到约 5 与约 7 之间。

14. 根据权利要求 5 所述的方法，包括 0.01 至 10 重量份数的钙离子。

15. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述溶液含有足够的柠檬酸以将所述溶液的所述 pH 值调节到约 5 与约 7 之间。

慢性伤口护理中的活性氧物质的还原

交叉申请案

本申请案为主张2002年12月23日申请的临时申请案第60/436,197号的优先权的非临时申请案。

关于联邦政府赞助的研究或发展的陈述

不适用

技术领域

本发明涉及伤口的护理，尤其涉及性质为褥疮、烧伤等的慢性（非反应性）伤口。

背景技术

近年来，显而易见自由基在被损伤的伤口愈合中扮演重要角色。在局部和慢性伤口中，已知自由基导致细胞损坏并在愈合过程中充当抑制因子。在慢性伤口中，缺血性条件可将酶黄嘌呤脱氢酶转变成催化氧到超氧负离子的转变的黄嘌呤氧化酶。通过刺激多形核嗜中性粒细胞（PMN）在伤口中产生超氧负离子。超氧负离子为对组织有毒性的自由基，且其产生也可导致包括更有毒性的羟基和较强的非游离氧化剂次氯酸的其它活性氧物质（ROS）的形成。通过氧化氮，由巨噬细胞（伤口中的另一炎性细胞）超氧负离子产生的游离基很容易起反应形成对周围组织起最有害影响的过氧亚硝酸根。最后，超氧负离子也可诱发基质分子纤维素与纤维结合蛋白的交联，从而导致不太适合上皮生长的转化基质。

发明内容

根据本发明的一个方面，在以金属离子的合成组合物治疗之后，调制与伤口相关联的活性氧物质。已发现，向显示超氧负离子的伤口施加所述组合物通过减少与伤口相关联的超氧负离子的水平有效治疗和愈合这些伤口。本

发明在慢性伤口的治疗和愈合中尤其有效。而且，已发现以本发明组合物治疗部分厚度切割伤和接触烧伤改良了这些伤口的上皮形成。

除本发明的抗氧化活性外，采用本发明组合物治疗所述伤口将通过人类PMN而对ROS的产生产生抑制效应，并对人类补体激活产生抑制效应，且因此进一步有益于慢性伤口的护理。

附图说明

图 1 为如由超氧负离子清除剂检验所确定的天然橡树皮提取物与本发明合成溶液的IC50值的图形比较；

图 2 为如由化学发光检验所确定的天然橡树皮提取物与本发明合成溶液的IC50值的图形比较；和

图 3 为如由补体检验传统途径所确定的天然橡树皮提取物与本发明合成溶液的IC50值的图形比较。

具体实施方式

本发明所采用的技术和方法

材料

一种适用于本发明的优选组合物包含 10-80 重量份的钾离子、0.00001-20 重量份的锌离子、0.01-10 重量份的钙离子和数量高达 40 重量份的铷离子 I，所述溶液的 pH 值在约 5 与约 7 之间。在一个实施例中，所述金属离子衍生自其各自的盐，包括（例如）氯化物、硫酸盐、柠檬酸盐、氢氧化物。如所需，优选通过向所述溶液添加柠檬酸来实现所述组合物的pH值的调节。对于本发明目的而言，这一组合物在本文中有时称为PHI5（使用柠檬酸pH值调节到5的多水合物电解质）。

已发现使用钾、锌和铷离子（不包括钙）的治疗价值。然而，钙可适用于某些类型伤口的治疗，而即使对特殊伤口并非医药上有效的，当治疗所述特殊伤口时，其存在于本发明的溶液中对优选溶液的疗效是无害的。

通过人类嗜中性粒细胞抑制ROS产生的检验（化学发光检验）

从健康志愿者（Bloedbank Midden-Nederland，Utrecht，The Netherlands）的静脉血中分离出多形核嗜中性粒细胞（PMN）。在白色 96-孔平底微量滴定板（Costar，Badhoevedorp，The Netherlands）中，将试样连续稀释到最终容积 50 μL。在每孔中添加 50 μL PMN 悬浮液（1×107 细胞/毫升）和 50 μL 鲁米诺（120 μM）。通过添加 50 μL 调理的酵母聚糖 A（OPZ；最终浓度：200 μg/mL）来触发 PMN。在 30 min 期间使用 Titertek Luminoskan 光度计（TechGen International，ZelUk，Belgium）每 2 min 监控化学发光 0.5 sec。

将峰值水平用于计算与其相应对照组（无试样情况下的相同培养）相关的试样的活性。在以 NaHCO3 缓冲到 pH 7.35 并以 0.1%（w/v）凝胶补充的 Hank 平衡盐溶液（I-IBSS）中执行实验，以避免细胞聚集（HBSS-凝胶）。通过在 37℃下以 1:10 稀释的人类混合血清（HPS）培养洗涤过的商业酵母聚糖 A 30 min 而获得 OPZ。洗涤后，经调理的产品再在 HBSS 中悬浮（最终浓度：0.8 mg/mL）。

超氧负离子清除检验

在白色 96-孔平底微量滴定板中，以磷酸盐缓冲液（PBS；pH 7.4）将试样连续稀释到最终容积 50 μL。随后，添加次黄嘌呤（50 μL；最终浓度 1 mM）和缓冲剂或超氧歧化酶（SOD；25 μL；10 U/mL）。通过添加 25 μL 的黄嘌呤氧化酶（10 mU/mL）来引进超氧负离子-O2（自由基产物），并在 15 min 期间，使用 Fluoroskan Ascent FL 光度计（Labsystems，Breda，The Netherlands）每毫米监控化学发光 0.5 sec。从所述化学发光信号的 SOD-可抑制部分计算所述测试化合物的活性。为排除试样对黄嘌呤氧化酶活性的直接影响，在 290 nm 分光光度地确定尿酸的形成。

人类补体活性的溶血检验（传统途径和替代途径）

通过 Klerx 等人（Klerx，J.P.A.M.，Beukelman，C.J.，Van Dijk，H. 等人，Microassay for colorimetric estimation of complement activity

in guinea pig, human and mouse serum. J. Immunlol Methods 1983, 63: 215-220）所描述的微量检验修改版本确定试样对人体补体的传统和替代途径（分别为 CP 和 AP）的抑制活性。在 U 型孔微量滴定板（Greiner Labortechnik, Nortingen, Germany）中，将试样系列稀释于（1）以 0.15 mM Ca2+和 0.5 mM Mg2+补充到最终容积 50 μl（CP）的 VSB-CP（佛罗那（Veronal）盐水缓冲液，以 5 mM 佛罗那、150 mM 盐水制备; pH 7.35），或（2）以上述佛罗那盐水缓冲液制备且以 0.5 mM Mg2+和 0.8 mM EGTA 补充到最终容积 100 μl（AP）的 VSB-AP 中。随后，添加 50 μl（CP）或 25 μl（AP）人类混合血清（HPS; 从健康提供者获得）的适当稀释物，并将所述板在 37℃下培养 30 min。在添加 50 μl 敏化绵羊红血球（CP）或 25 μl 家兔红血球（见下文）之后，再在 37℃下将所述板培养 1 h。存于阿氏溶液（Alsever solution）中的绵羊或家兔血液是红血球的来源。在使用之前，用盐水将红血球洗涤三次。绵羊红血球通过与稀释溶血素（1:800）一起培养 10 min 而敏化; 洗涤之后，将所述经敏化的红血球再悬浮在 VSB-CP 中（4 x 108 细胞/ml）。将家兔红血球悬浮在 VSB-AP 中（3 x 108 细胞/毫升）。最后，将所述微量滴定板离心分离（900 x g, 5 min）以使完整的细胞和碎片旋转沉降下来，并将 50 μl 上清液转移到每个孔含有 200 μl 水的 96-孔平底微量滴定板。在后板中，使用上述在 405 nm 下工作的自动 ELISA 读出器以分光光度测定法测量由红血球溶解所释放的血红蛋白量。对照组由与水（100％溶血）或缓冲液（VSB-CP 或 VSB-AP; 0%溶血）一起培养的经类似处理的红血球上清液和其中 HPS 由热灭活 HPS（56℃, 30 min; 校正试样的背景色）代替的培养物组成。

确定细胞毒性

制备 5-羧基二乙酸萤光素的丙酮储备溶液（CFDA; 10 mg/ml）并在-20℃下存储。使用前，以缓冲剂将所述储备溶液稀释为 1:1000。在 10 ml 的磷酸盐缓冲液(PBS)中溶解碘化丙啶(PI; 1.5 mg)，所述磷酸盐缓冲液(PBS)

含有 2.5％淬火墨水（quenching ink）、5％w/v EDTA 和 8 mg 牛血清白蛋白（BSA）。在 20℃以活体染料 CFDA（10 μg/ml）标记 PMN15 min、洗涤并再在缓冲剂中悬浮，以达到 107 细胞/mL 的浓度。在 37℃下以相等容积的稀释样品将 100 μl 的所述细胞悬液培养 15 min。随后，以 25 μl PI/ink 溶液洗涤并染色所述细胞以辨别活细胞（绿色荧光）与死细胞（红色荧光）。使用荧光显微镜（Fluovert，Leitz，Wetzlar，Germany）确定死细胞的百分比。

结果和讨论

与伤口相关联的活性氧物质产生可源于若干潜在来源。本发明的溶液显示对与所述伤口相关联的活性氧物质（ROS）的产生具有医药上有效的抑制效应。

伤口中 ROS 的一个来源为由受激人类多形核嗜中性粒细胞（PMN）产生的活性氧物质。募集至（例如）伤口位置且被激活的 PMN 将会消耗大量被转变为 ROS 的氧。已知为呼吸爆发的处理取决于可由受体介导和受体非依赖性处理激活的酶 NADPH 氧化酶。典型的受体依赖性刺激物为（例如）补体组分 C5a 和 C3b、细菌衍生的趋药性三肽 fMLP 和调理的酵母聚糖；受体非依赖性刺激物包括长链不饱和脂肪酸。根据 PMN 的活化，多组分 NADPH 氧化酶集合在细胞膜中。随后，所述氧化酶将来自膜胞液侧的 NADPH 的电子转移到所述膜另一侧的分子氧（molecular oxygen）。这导致含有摄取微生物的（胞内）吞噬体中的或胞外的超氧负离子（-02）的产生。所形成的大多数超氧负离子被转变成过氧化氢（H2O2）。后者仅在高浓度时具有杀菌性，而超氧负离子由于其有限的膜透性自身不能杀死细菌。通过铁催化 Fenton 反应将一些过氧化氢转变为极具活性的羟基。然而，大多过氧化氢被转变成次氯酸（HOCL），已知大多杀菌性氧化剂通过 PMN 而产生。后一转变在存在卤素（氯化物）离子的情况下发生，并由髓过氧物酶（MPO）（一种也由受激 PMN 所释放的酶）催化。尽管在吞噬溶酶体中，胞内的 ROS（连同溶解蛋白和从溶酶

体（颗粒）释放的其它细胞毒素酶）用以杀死摄取的细菌并预防伤口感染，这些氧代谢物的胞外产生对周围组织有有害影响。

除上述 ROS 外，也注意到由存在于伤口处的巨噬细胞产生的氧化氮（NO）。所述游离基氧化氮可容易地与超氧负离子反应，其导致过氧亚硝酸根（ONOO）的形成，所述过氧亚硝酸根是一种具有类似于羟基（见上文）特性的有效的、相对稳定的氧化剂。

考虑到通过受激人类 PMN 的 ROS 抑制作用，采用化学发光检验为 PHI5 将 IC50 值确定为 12 ± 2 ml/ml。（所述 IC50 值为在给定 50％抑制作用的测试系统中的样品浓度；IC50 值表示以来自两个不同供体的两批 PMN 获得的确定的平均值± SD（标准差））。由于 ROS 产物在检验中的抑制效应可由细胞死亡而导致，因此也调查了所述试样的细胞毒性效应。剩余 PMN 以活体染料 CFDA（5-羧基二乙酸萤光素）而标记并以 PHI5 培养。随后，以碘化丙啶给死细胞染色。已发现与对照细胞相比，以 100 μl/ml PHI5 进行的培养对 PMN 无任何细胞毒性效应。推断以 PHI5 的 ROS 产物的抑制作用并不归因于对 PMN 的细胞毒性效应。

除如上所述由受激 PMN 所产生的超氧负离子外，这些自由基也可产生于慢性伤口中，在所述慢性伤口处缺血性条件可将所述酶黄嘌呤脱氢酶转变为可催化氧转变成超氧负离子的黄嘌呤氧化酶。因此，包括清除由 PMN 或通过黄嘌呤氧化酶所产生的超氧负离子在内的抗氧化活性被视为有益于治疗慢性伤口。PHI5 显示为超氧负离子的重要清除剂，此主要是由于存在柠檬酸之故。

在 ROS 产生检验（见上文）中所见的抑制作用也可通过超氧负离子的特定清除而产生。已报告橡树皮提取物（OBE）直接影响 PMN 的作用。如在采用 PHI5（IC50 12 μl/ml）的超氧负离子清除检验中所观察到的，活性的增加最可能是由通过 PHI5 的柠檬酸组份对超氧负离子的额外清除所致。因此，PHI5 可提供超氧负离子清除和对 ROS 产生的抑制这两种作用，借此增进本

发明在伤口护理（尤其是慢性伤口护理）中的有用性。

在溶血检验中还测试了 PHI5 对补体活性的调节作用。补体系统为非适应性体液性免疫系统的一部分并在人类防御机理中扮演重要角色。补体系统包含二十多种蛋白质，包括补体组份 C1 到 C9。通过传统、替代或外源凝集素途径的补体激活作用可导致连续补体蛋白质以类似级联方式发生溶解蛋白解离，此最终会导致致使细菌死亡（或通过溶解导致外源红细胞死亡）的高分子膜攻击复合物（MAC）的形成。另外，还会产生可调节很多免疫调节效应的小分裂产物。在此方面，补体因子 C3b 具有主要的生物功能，这是由于（病原）微生物和外源细胞（酵母聚糖）被 C3b 覆盖（调理素作用），此使得其膜上具有 C3b 受体的吞噬细胞（例如 PMN）能识别并吞食这些入侵者并通过产生 ROS 破坏所述入侵者。片断 C5a 为 PMN 的另一活化剂；另外，其还是这些吞噬细胞的主要趋药性因子。

补体激活的抑制作用限制了如 C5a 的补体分裂产物的产生。如上所概述，这将导致伤口中 PMN 更少的流入和降低的伤口中 PMN 的刺激，并因此减少 ROS 和过氧亚硝酸根的胞外形成，且因此减少组织损伤。

尽管控制伤口愈合的其它因子可能也很重要（例如，MMP），但 PHI5 经由所述传统途径抑制人类补体激活，并通过被激活的 PMN 抑制 ROS 的产生。另外，已发现与 PHI5 相关联的柠檬酸有助于清除超氧负离子。ROS 水平的减少有助于伤口护理（尤其是慢性伤口护理）中所见的有益效果，而制剂含有本发明组合物的金属离子和柠檬酸。

图 1-3 为现有技术的橡树皮提取物的 IC-50 值与本发明的合成组合物的比较，其为描绘如超氧负离子清除剂检验（图 1）、化学发光检验（图 2）和补体检验传统途径（图 3）中所确定的所述两种组合物的 IC50 值的图形。参看这些图形，其显示关于超氧清除和 PMN 抑制（化学发光检验）PHI5 比天然橡树皮提取物（OBE）更有效，且关于补体活性的调制 PHI5 仅稍不如天然橡树皮提取物（OBE）有效。

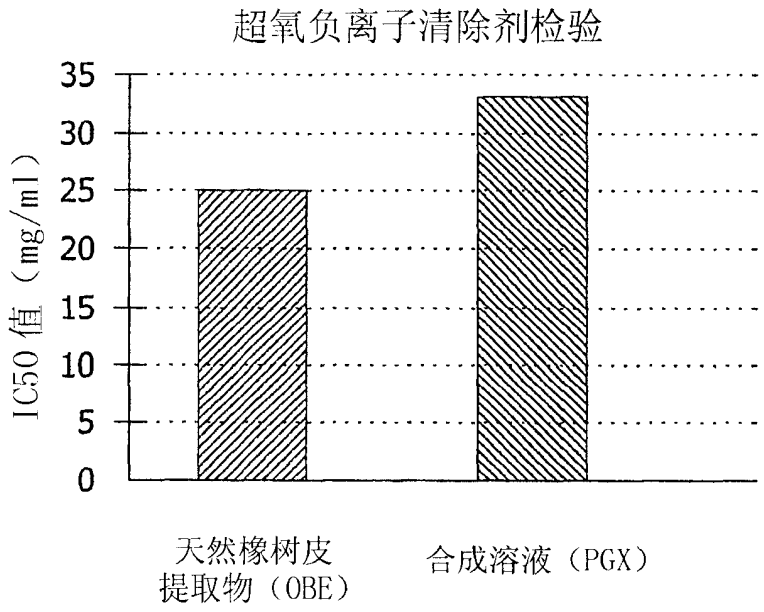

超氧负离子清除剂检验
IC50 值（mg/ml）
35
30
25
20
15
10
5
0
天然橡树皮
提取物（OBE）
合成溶液（PGX）

图 1

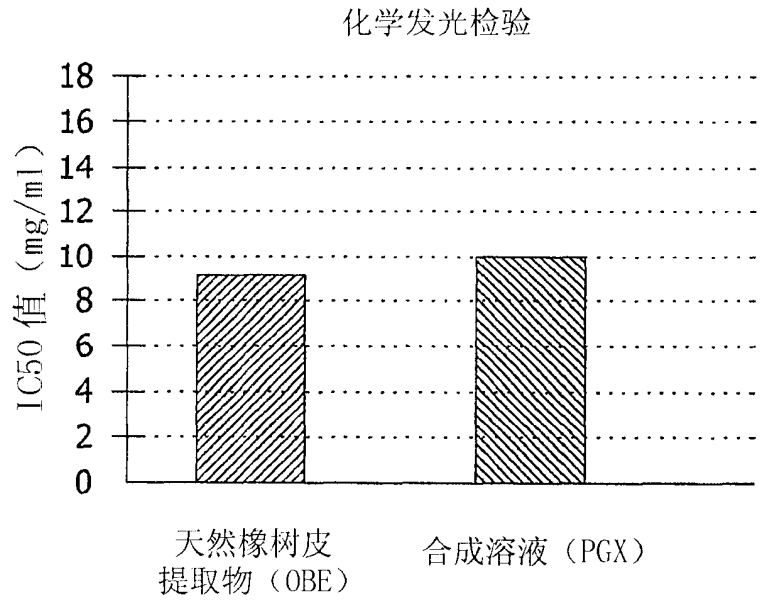

化学发光检验
IC50 值（mg/ml）
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
天然橡树皮
提取物（OBE）
合成溶液（PGX）

图 2

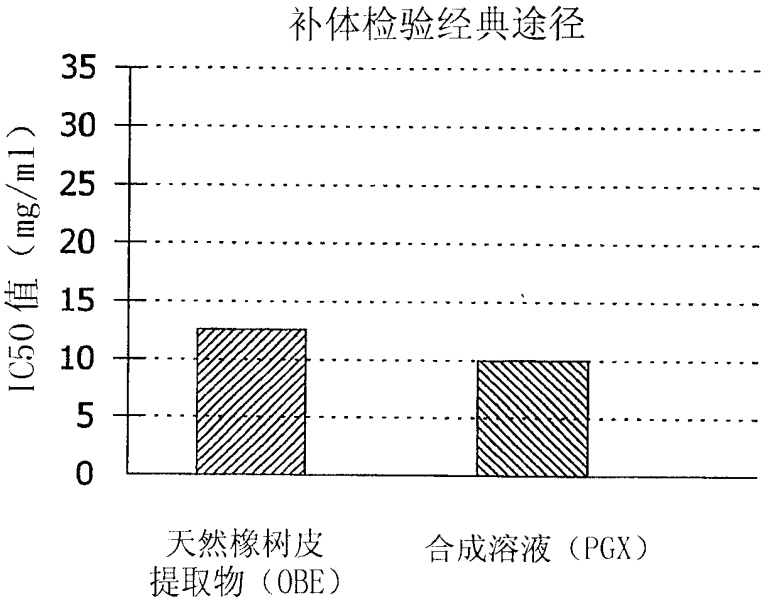


图 3