

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 202**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61L 26/00** (2006.01)  
**A61L 15/44** (2006.01)  
**A61L 15/38** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 38/54** (2006.01)  
**A61K 31/785** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054682**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057788**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849558 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022 EP 3204037**

54 Título: **Composiciones y kits para desbridamiento enzimático y métodos de uso de estos**

30 Prioridad:

**10.10.2014 US 201414511912**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.04.2023**

73 Titular/es:

**ROCHAL TECHNOLOGIES LLC (100.0%)  
1200 Summit Avenue, Suite 414  
Fort Worth, TX 76102, US**

72 Inventor/es:

**SALAMONE, JOSEPH CHARLES;  
LEUNG, KELLY XIAOYU-CHEN;  
SALAMONE, ANN BEAL y  
REILLY, KATELYN ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 938 202 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y kits para desbridamiento enzimático y métodos de uso de estos

**Campo de la invención**

5 El desbridamiento enzimático del tejido necrótico en heridas se usa a menudo cuando el desbridamiento quirúrgico no está disponible o no se desea. Esta invención se refiere en general al desbridamiento de tejido desvitalizado mediante el uso de enzimas, específicamente enzimas que escinden enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos de carbohidratos en polisacáridos, como los de la familia de las amilasas, en contraste con la escisión de enlaces peptídicos en proteínas.

**Antecedentes de la invención**

10 La cicatrización de heridas se ve afectada por la presencia de tejido necrótico, que contiene células muertas y restos celulares en quemaduras (escaras) de segundo (grosor parcial profundo) y tercer grado (grosor total) y úlceras crónicas (p. ej., úlceras diabéticas). El tejido necrótico es tejido desvitalizado y su acumulación puede dar lugar a una respuesta inflamatoria prolongada y obstrucción mecánica del proceso de contracción de la herida con reepitelización dificultada, que impide que las heridas cicatricen y, si es necesario, que dificulte que el lecho de la herida acepte injertos de piel. El tejido necrótico es susceptible a la infección bacteriana, lo que impide aún más la cicatrización de heridas y puede inducir sepsis en casos graves. Cuando el tejido necrótico es de color amarillo o tostado y tiene una apariencia de masa fibrosa, a menudo se denomina esfacelo, y cuando el tejido está desecado y forma una textura gruesa y coriácea, se denomina escara. Se necesita el desbridamiento (eliminación) del tejido desvitalizado para mejorar el cierre de la herida. La composición de desbridamiento de esta invención es por lo tanto útil en el tratamiento de heridas.

20 La eliminación del tejido necrótico ayuda a restaurar la circulación en el sitio de la herida, ya que el suministro adecuado de oxígeno a la herida es fundamental para la curación. Los métodos para desbridar el tejido necrótico incluyen el desbridamiento quirúrgico, el desbridamiento enzimático, el desbridamiento autolítico, el desbridamiento biológico y el desbridamiento mecánico, siendo los más frecuentes el desbridamiento quirúrgico y el enzimático. El desbridamiento quirúrgico es el método de desbridamiento más rápido y eficaz y lo realizan cirujanos/personal médico capacitado. Sin embargo, se puede eliminar inadvertidamente el tejido viable debido a la falta de una demarcación clara entre el tejido necrótico y el tejido viable, lo que da como resultado un área de herida agrandada y una mayor pérdida de sangre. El desbridamiento enzimático requiere menos capacitación y, por lo general, lo realiza el personal clínico o de enfermería, lo que a menudo requiere un tratamiento de mayor duración para la eliminación del tejido necrótico. El desbridamiento enzimático implica el uso de enzimas obtenidas del exterior del cuerpo para eliminar el tejido muerto. Las enzimas de desbridamiento escinden (cortan, digieren, hidrolizan) grandes componentes de materiales biológicos, en particular biomacromoléculas, en moléculas más pequeñas que se pueden disolver y eliminar. La mayoría de las enzimas de desbridamiento funcionan como proteasas al escindir las cadenas de polímeros de proteínas y, a este respecto, se han estudiado una amplia variedad de proteasas. Las enzimas de desbridamiento son catalizadores de acción rápida que producen esfacelo de tejido necrótico. La fibrinolisisina es una enzima plasmática que, después de ser activada, ataca a los componentes de fibroína en los coágulos y exudados sanguíneos. La desoxirribonucleasa es una enzima pancreática que ataca específicamente a los componentes nucleoproteicos de los exudados purulentos. La tripsina y la quimotripsina son enzimas pancreáticas no específicas, pero pueden cortar los esqueletos de proteínas en residuos de aminoácidos específicos. Las enzimas de otros animales incluyen la krilasa, una proteasa derivada del krill antártico. Las plantas con frutos tropicales proporcionan una fuente importante de enzimas de desbridamiento. La bromelina es un grupo de enzimas proteolíticas del tallo de las plantas de piña, que incluyen tres cisteína proteasas. La papaína es una cisteína proteasa no específica del látex de papaya que escinde una amplia variedad de sustancias en los tejidos necróticos, que incluyen la fibroína, el colágeno y la elastina. La ficina es una cisteína proteasa no específica de características operativas de pH similares y se deriva de un látex vegetal de la planta de ficus (higo). Las bacterias también son una fuente de enzimas de desbridamiento. Las subtilisinas, derivadas de *Bacillus subtilis*, son mezclas de serín proteasas solubles en agua no específicas que degradan los tejidos necróticos. Las colagenasas, que son metalopeptidasas, son enzimas proteolíticas que degradan el colágeno y se derivan de *Clostridium histolyticum*. La vibriolisina es otra metalopeptidasa que ataca al colágeno y se deriva de la bacteria *Vibrio proteolyticus*. La termolisina es una enzima bacteriana de desbridamiento de *Bacillus thermoproteolyticus* que actúa de forma inespecífica con una productividad sobresaliente, incluso a alta temperatura. La estreptoquinasa, una proteasa activadora de fibrinógeno de *Streptococcus spp.* y la estreptodornasa, una desoxirribonucleasa de los estreptococos hemolíticos, se han usado también en el desbridamiento (Solicitud de Patente de EE.UU. Número 2008/0044459).

55 Se comercializaron varios productos de enzimas proteolíticas tóxicas no regulados por la FDA antes del 2009 para el desbridamiento enzimático, pero la FDA detuvo la fabricación y distribución debido a eventos alérgicos adversos y/o falta de eficacia, que incluían la papaína (papaya), la tripsina y la quimotripsina (enzimas pancreáticas) y proteasas de *Bacillus subtilis*. Actualmente, hay dos productos de desbridamiento enzimático proteolítico disponibles en los Estados Unidos, Pomada Santyl® aprobada por la FDA (Smith & Nephew), una colagenasa derivada de *Clostridium histolyticum* que digiere selectivamente el colágeno de triple hélice y utiliza 250 Unidades de colagenasa por gramo de vaselina blanca, y Debrase® Gel Dressing (NexoBrid), una mezcla de enzimas de bromelina derivadas de *Ananas comosus* (piña). Es importante destacar que la pomada Santyl® no se puede usar junto con antimicrobianos de plata y yodo, ya que desactivan la colagenasa. Debrase® (MediWound Ltd.) recibió recientemente el estatus de medicamento huérfano de la FDA para el desbridamiento de escaras.

La Patente de EE.UU. 4.668.228 describe una cinta de desbridamiento que comprende una masa adhesiva sobre un soporte oclusivo o semioclusivo biocompatible, no bioerosionable, no gel, donde se sitúa una cantidad eficaz de una enzima proteolítica de desbridamiento en forma de polvo seco sobre la superficie adhesiva. Cuando el polvo entra en contacto con los exudados de la herida, se libera inmediatamente toda la carga de enzimas.

- 5 En la Patente de EE.UU. 5.206.026 se describe una película para el suministro instantáneo de una enzima proteolítica a una herida. Cuando se expone a un líquido acuoso, la película se disuelve rápidamente, liberando así su contenido de enzimas simultáneamente.

En la Solicitud de Patente de EE.UU. 2002/0114798 se describe un desbridador enzimático de heridas que usa una combinación de una enzima proteolítica y un transportador de poloxámero hidrófilo anhidro.

- 10 En el documento de EE.UU. 5.120.656 se proporciona un proceso para el desbridamiento de hueso extraído que tiene su periostio intacto, que comprende poner en contacto el periostio con una solución de enzima seleccionada del grupo que consiste en enzima digestiva proteolítica de colágeno y mezclas de las estas en condiciones que promueven la actividad enzimática para liberar el periostio de la superficie ósea subyacente y retirar el periostio suelto del hueso.

- 15 En la Patente de EE.UU. 7.368.128 se describe un apósito para el desbridamiento de tejido necrótico y no viable en una herida, en donde el apósito comprende una cantidad eficaz de una o más enzimas proteolíticas incorporadas en un material polimérico degradable. El apósito de la invención proporciona un desbridamiento eficaz de las heridas necróticas durante un período de tiempo prolongado, ya que las enzimas se pueden liberar a lo largo del tiempo.

El documento CA 733 072 A está relacionado con un complejo enzimático bacteriano con propiedades de desbridamiento.

- 20 En la Publicación de Patente Internacional Número WO 2012/155027, las composiciones para el desbridamiento de heridas contienen la enzima proteolítica Seaprose (también conocida como Proteasa S, del hongo *Aspergillus melleus*). La enzima principal en Seaprose es una proteasa semialcalina con un peso molecular de aproximadamente 31 kDa. También puede contener otras enzimas como la amilasa, una enzima hidrolítica que descompone los carbohidratos.

- 25 En la Publicación de Patente Internacional Número WO1984/002846, se describe una pomada tópica para heridas de la superficie de la piel que comprende cantidades cicatrizantes de papaína, bromelina, tripsina, quimotripsina, pancreatina, lipasa, amilasa, extracto de aloe y un agente astringente orgánico formulado en una mezcla transportadora de aceites emolientes penetrantes y no penetrantes y un emoliente de alcohol polihídrico, con una pluralidad de proteasas. Se informa que la pomada reduce la inflamación en el sitio de las heridas de la superficie de la piel y actúa para mejorar las actividades antiinflamatorias normales del cuerpo.

- 30 En la Patente de EE.UU. 6.548.556 se informa que una enzima proteolítica tiene en parte o en su totalidad la capacidad de hidrolizar enlaces amida peptídicos y que dichas enzimas también pueden tener alguna actividad lipolítica y/o amilolítica inherente asociada con la actividad proteolítica, siendo la enzima proteolítica preferida la papaína. Otras enzimas proteolíticas adecuadas incluyen tripsina, quimotripsina, estreptoquinasa, estroptodormasa, ficina, pepsina, carboxipeptidasa, aminopeptidasa, quimopapaína, bromelina, así como otras enzimas adecuadas, como pancreatina, tripsina, colagenasa, queratinasa, carboxilasa, aminopeptidasa, elastasa y aspergilopeptidasa. La pancreatina contiene una mezcla de péptido hidrolasas/proteasas (tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), enzimas lipolíticas (lipasa, fosfolipasa A2, fosfolipasa B, colinesterasa, colesterol esterasa), glucosidasas ( $\alpha$ -amilasa, glucosidasa) y nucleasas (desoxirribonucleasa I, desoxirribonucleasa II, ribonucleasa).

- 40 En la Patente de EE.UU. 3.409.719 se describen enzimas mixtas de agente desbridante de *Bacillus subtilis*. Se informa que este producto enzimático exhibe actividad proteolítica contra la caseína (fosfoproteína) y una actividad similar contra la hemoglobina (metaloproteína). También exhibe actividad amilolítica contra el almidón gelatinizado. Es capaz de la lisis rápida de fibrina, colágeno desnaturalizado, elastina y exudado, que se declara que son los principales componentes proteicos del tejido en la herida. En la Tabla I de la Patente de EE.UU. 3.409.719 se muestra que las composiciones de enzimas mixtas contienen un mínimo de amilasa a proteasas, que oscila desde el 6,3 % de amilasa y el 93,7 % de proteasas hasta el 18,2 % de amilasa y el 81,8 % de proteasas.

- 45 Las heridas por quemaduras graves requieren desbridamiento quirúrgico con el fin de aplicar rápidamente antimicrobianos y apósitos para reducir el riesgo de infección (p. ej., sepsis por *Pseudomonas aeruginosa*, Patente de EE.UU. 4.772.465) y para preparar el lecho de la herida para la cicatrización o el posterior injerto de piel. Debido al potencial de aumento del sangrado por la extracción de tejido viable, puede ser preferible el desbridamiento enzimático para la extracción de tejido necrótico. La cicatrización de heridas también es difícil para los diabéticos debido a la insuficiencia cardiovascular y la neuropatía; por lo tanto, puede no ser deseable aumentar el tamaño de la úlcera diabética mediante desbridamiento quirúrgico, y existe una necesidad crítica de mejorar el desbridamiento de las úlceras diabéticas.

- 55 En la Publicación de Patente Internacional Número WO1999046368 se discute un método para tratar heridas que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una enzima activa para carbohidratos, que se refiere que tiene una amplia especificidad para desbridar quemaduras y otras heridas. Debido a las altas concentraciones de glucosaminoglicanos (GAG) en la piel, en pacientes quemados, las enzimas que degradan los glucosaminoglicanos

se consideran complementos útiles para el desbridamiento de heridas por quemadura.

Los glucosaminoglicanos son cadenas de azúcar que consisten en polímeros repetitivos de polisacáridos ácidos, compuestos por bloques de construcción de los siguientes azúcares en varias combinaciones: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurónico, ácido galacturónico y ácido idurónico. Se sabe que los  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225  
 230  
 235  
 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270  
 275  
 280  
 285  
 290  
 295  
 300  
 305  
 310  
 315  
 320  
 325  
 330  
 335  
 340  
 345  
 350  
 355  
 360  
 365  
 370  
 375  
 380  
 385  
 390  
 395  
 400  
 405  
 410  
 415  
 420  
 425  
 430  
 435  
 440  
 445  
 450  
 455  
 460  
 465  
 470  
 475  
 480  
 485  
 490  
 495  
 500  
 505  
 510  
 515  
 520  
 525  
 530  
 535  
 540  
 545  
 550  
 555  
 560  
 565  
 570  
 575  
 580  
 585  
 590  
 595  
 600  
 605  
 610  
 615  
 620  
 625  
 630  
 635  
 640  
 645  
 650  
 655  
 660  
 665  
 670  
 675  
 680  
 685  
 690  
 695  
 700  
 705  
 710  
 715  
 720  
 725  
 730  
 735  
 740  
 745  
 750  
 755  
 760  
 765  
 770  
 775  
 780  
 785  
 790  
 795  
 800  
 805  
 810  
 815  
 820  
 825  
 830  
 835  
 840  
 845  
 850  
 855  
 860  
 865  
 870  
 875  
 880  
 885  
 890  
 895  
 900  
 905  
 910  
 915  
 920  
 925  
 930  
 935  
 940  
 945  
 950  
 955  
 960  
 965  
 970  
 975  
 980  
 985  
 990  
 995

El control de la infección también es una necesidad significativa sin abordar en el desbridamiento. La escara de la quemadura es típicamente tejido necrótico seco que no se infecta fácilmente, pero se puede producir sepsis con quemaduras de segundo y tercer grado; por lo tanto, es muy deseable tener antimicrobianos en la escara y el lecho de la herida durante las primeras etapas de la eliminación de la escara (tejido necrótico). En contraste con la escara de la quemadura, el tejido necrótico de la herida crónica (úlceras diabéticas) parece promover la colonización bacteriana, respaldada por la presencia de fuentes de agua y nutrientes de las células muertas y los restos celulares. El tejido necrótico en las heridas puede estar asociado con infección, mientras que la mayoría de las heridas crónicas están infectadas con biopelícula de microorganismos.

Una dificultad en el uso de enzimas proteolíticas para el desbridamiento de tejido necrótico es su capacidad de autodigestión en solución acuosa, además de su potencial dificultad con eventos alérgicos adversos, hipersensibilidad y/o falta de eficacia. Por lo tanto, es deseable identificar una composición de desbridamiento que tenga una alta eficacia de desbridamiento para tejido necrótico, que sea clínicamente simple de usar, muestre una vida útil adecuada y no sea alérgica.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico de frecuencia frente al módulo para geles de colágeno antes y después del tratamiento con diferentes enzimas.

La Figura 2 es un gráfico de frecuencia frente al módulo complejo para geles de colágeno antes y después del tratamiento con diferentes enzimas.

La figura 3 es un gráfico del porcentaje en peso de piel de cerdo hervida digerida frente a la concentración de  $\alpha$ -amilasa después de una hora a temperatura ambiente.

#### Descripción detallada de la invención

En esta investigación se considera una composición y un enfoque novedosos para el desbridamiento enzimático a través de la supuesta escisión de enlaces glucosídicos en y/o entre polisacáridos de glucosaminoglicanos y fibrillas de colágeno, y no a través de la escisión de enlaces peptídicos de colágeno por proteasas, como se ha hecho con productos de desbridamiento enzimáticos anteriores. Se encontró inesperadamente que la amilasa, una enzima destacada por la escisión de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, como en la hidrólisis catalizada del almidón en azúcares de bajo peso molecular, es eficaz en el desbridamiento de tejido desvitalizado o necrótico. Estas composiciones únicas proporcionan composiciones de desbridamiento enzimático de alta eficacia, con una vida útil adecuada, sin reacciones alérgicas.

Las formulaciones de desbridamiento descritas en la presente memoria contienen varios tipos de la enzima amilasa. Las amilasas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -amilasa) son una familia de enzimas que hidrolizan preferentemente los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos de los polisacáridos, produciendo fragmentos de carbohidratos/azúcares de menor peso molecular. En algunas realizaciones, se usa  $\alpha$ -amilasa como la amilasa. La amilasa se encuentra de forma natural en seres humanos y otros mamíferos, y también se encuentra en plantas, bacterias y hongos.

La composición de desbridamiento de la presente invención y su uso en un método de desbridamiento de tejido desvitalizado se define y especifica en las reivindicaciones adjuntas.

El comportamiento físico del tejido de la piel viene determinado principalmente por una extensa matriz extracelular (MEC). La MEC se compone de una malla entrelazada de proteínas fibrosas y glucosaminoglicanos (GAG). Los GAGs son polímeros de carbohidratos y generalmente se unen a las proteínas de la MEC, formando proteoglicanos. En la piel, el colágeno tipo I es el principal componente proteico de la MEC y los principales componentes proteoglicanos son la decorina y el versicano. Presumiblemente, estas proteínas centrales se unen a la superficie de las fibrillas de colágeno tipo I, lo que proporciona resistencia mecánica a la piel. La unión de proteoglicanos es necesaria para el ensamblaje adecuado de las fibrillas de colágeno en la MEC e inhibe la escisión de las fibrillas de colágeno por parte

de las metaloproteasas de la matriz. Los proteoglicanos están compuestos por un núcleo de glicoproteína al que se unen covalentemente una o varias cadenas de GAGs. Existen cuatro clases diferentes de glucosaminoglicanos en los vertebrados, condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato /heparina. El hialuronano (ácido hialurónico) es uno de los principales componentes de la matriz extracelular y contribuye significativamente a la proliferación y migración celular. Sin embargo, a diferencia de otros glucosaminoglicanos, el hialuronano no se une a las proteínas para formar proteoglicanos, sino que se une y retiene a las moléculas de agua y llena los espacios entre las fibrillas de colágeno.

Los GAGs se unen a un residuo de serina de la proteína central tanto mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (principalmente a través de condroitín sulfato, dermatán sulfato) como  $\alpha$ -1,4 (principalmente a través de heparán sulfato/heparina), siendo el condroitín sulfato el GAG predominante. Para los enlaces internos, el hialuronano y el condroitín sulfato se componen predominantemente de enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4, el dermatán sulfato tiene predominantemente enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4, y la heparina/heparán sulfato tienen una mezcla de enlaces  $\beta$ -1,4 y  $\alpha$ -1,4, en donde la unidad repetitiva primaria no contiene 3 o más enlaces  $\alpha$ -1,4 (Glycosaminoglycans and Proteoglycans, [sigma.com/glycobiology](http://sigma.com/glycobiology)), como se requiere para la escisión por  $\alpha$ -amilasa.

Un estudio anterior discutió un método para el tratamiento de heridas que comprendía la etapa de administrar una cantidad eficaz de una enzima activa para carbohidratos, en donde tales enzimas son preferentemente condroitinasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de las cadenas de condroitina en proteoglicanos que contienen enlaces (1-4)- $\beta$ -D- y (1-3)- $\beta$ -D, y hialuronidasas, enzimas que escinden el hialuronano, que contiene enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3, con capacidad limitada para degradar la condroitina y los condroitín sulfatos (Publicación de Patente Internacional Número WO1999046368).

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se refieren al uso de una enzima hidrolítica no proteasa para el desbridamiento de tejido necrótico, donde inesperadamente se descubrió que la familia de amilasas, que incluye  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa, eran capaz de digerir y descomponer un análogo de tejido necrótico: piel de cerdo hervida (Patente de EE.UU. 8.119.124), así como piel de rata recién extirpada.

La amilasa es una enzima digestiva que ayuda en la escisión de los enlaces en los residuos de azúcar en los polisacáridos. Se encuentra en dos tipos principales en el cuerpo humano: amilasa salival y amilasa pancreática. En la saliva, la amilasa salival es responsable de la descomposición del almidón y del glucógeno en glucosa, maltosa y dextrina. La amilasa pancreática degrada aún más los almidones en el sistema digestivo.

En algunas realizaciones, el componente no proteolítico es mayor que el componente proteolítico de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, una relación de enzimas no proteolíticas a enzimas proteolíticas en la composición de desbridamiento es de al menos 10:1, al menos 20:1, al menos 40:1, al menos 60:1, al menos 80:1 o al menos 100:1. Cuando la cantidad de enzimas proteolíticas es 0 y la cantidad de enzimas no proteolíticas es mayor que 0, la relación es  $\infty$ :1. En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento comprende menos del 0,01 % en peso de enzimas proteolíticas, o menos del 0,001 % en peso de enzimas proteolíticas, en función del peso total de la composición de desbridamiento.

En relación con las tres formas de amilasa, la  $\alpha$ -amilasa (también llamada 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohidrolasa) es una endoamilasa que se encuentra en todos los organismos vivos. Funciona de manera aleatoria mediante un mecanismo de ataque múltiple sobre el almidón, el glucógeno y los polisacáridos y oligosacáridos relacionados con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4, lo que finalmente produce glucosa y maltosa, así como oligosacáridos más grandes, ninguno de los cuales está presente en piel humana. La  $\alpha$ -amilasa hidroliza enlaces 1,4- $\alpha$ -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen 3 o más unidades de D-glucosa unidas  $\alpha$ -1,4 (Sigma Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html>). Sin embargo, la  $\alpha$ -amilasa no puede hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6 en el glucógeno y la amilopectina.

La  $\beta$ -amilasa (también llamada 1,4- $\alpha$ -D-glucan maltohidrolasa) y la  $\gamma$ -amilasa (también llamada amiloglucosidasa, glucan 1,4- $\alpha$ -glucosidasa y glucoamilasa) son exoamilasas que se encuentran exclusivamente en plantas y microorganismos. Al igual que la  $\alpha$ -amilasa, la  $\beta$ -amilasa no puede hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6. La enzima  $\beta$ -amilasa actúa sobre los mismos sustratos que la  $\alpha$ -amilasa, pero elimina unidades de maltosa sucesivas del extremo no reductor. La  $\gamma$ -amilasa libera  $\beta$ -D-glucosa sucesivamente desde el extremo no reductor de las cadenas de polisacáridos. Varias formas de  $\gamma$ -amilasa pueden hidrolizar enlaces 1,6- $\alpha$ -D-glucosídicos cuando el siguiente enlace en la secuencia es un enlace 1,4, y algunas preparaciones pueden hidrolizar enlaces 1,6- y 1,3- $\alpha$ -D-glucosídicos en otros polisacáridos. Se usan combinaciones de las enzimas de amilasa en diversas preparaciones, como en la producción de alimentos, edulcorantes, sacarificación de almidón, industrias cerveceras y destiladoras.

Los iones de calcio y cloruro son esenciales para la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. Un  $\text{Ca}^{2+}$  está estrechamente unido a cada molécula de enzima, lo que facilita la conformación adecuada para la actividad hidrolítica, y los iones de cloruro se han considerado activadores naturales de la enzima. El exceso de calcio estabiliza la  $\alpha$ -amilasa frente al calor. La actividad catalítica es óptima en un intervalo de temperatura entre 40 °C y 45 °C y un pH de 7,0-7,5.

En esta investigación, se considera una composición y un enfoque novedosos para el desbridamiento enzimático por amilasa a través de la escisión de enlaces glucosídicos en y/o entre polisacáridos de glucosaminoglicanos y fibrillas

de colágeno, y no a través de la escisión de enlaces peptídicos de colágeno, como se ha hecho con productos de desbridamiento enzimático anteriores. Todas las amilasas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -amilasa) son una familia de enzimas que hidrolizan preferentemente los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos de los polisacáridos, produciendo fragmentos de carbohidratos/azúcares de menor peso molecular. La  $\alpha$ -amilasa escinde aleatoriamente los enlaces 1,4- $\alpha$ -D-glucosídicos entre las unidades

5 de glucosa adyacentes en la cadena lineal de amilosa del almidón. Un beneficio significativo de la  $\alpha$ -amilasa es que se encuentra de forma natural en seres humanos y otros mamíferos, y también se encuentra en plantas, bacterias y hongos. En algunas realizaciones, la amilasa comprende una amilasa microbiana. Las fuentes vegetales y animales pueden contener más material nocivo que las amilasas microbianas, incluidos los compuestos fenólicos (de plantas), inhibidores de enzimas endógenos y proteasas.

10 Dado que la amilasa no es proteolítica, no se autodigiere en agua y es más estable en comparación con las enzimas proteolíticas en condiciones acuosas similares. La alta estabilidad de la amilasa facilita su almacenamiento en una formulación hidrófila, que se puede eliminar fácilmente de una herida necrótica después del desbridamiento, a diferencia de las pomadas de desbridamiento proteolíticas a base de vaselina.

Se ha declarado la presencia de amilasa en el desbridamiento de enzimas proteolíticas principalmente en una cantidad mucho menor que las proteasas en estos procedimientos y, a menudo, es una impureza en las enzimas proteolíticas pancreáticas (documento de EE.UU. 3.409.719; Patente de EE.UU. 8.540.983). Se ha declarado que una formulación de enzimas activas para carbohidratos a base de condroitinasas e hialuronidasas desbrida quemaduras y otras heridas (Publicación de Patente Internacional Número WO1999046368). Se anticipa que estas enzimas presumiblemente serían activas contra los proteoglicanos asociados con el colágeno en la piel, como el proteoglicano predominante de condroitín sulfato. Ningún informe ha descrito el desbridamiento enzimático del tejido necrótico basado en la amilasa como el principal agente desbridador enzimático ya que se supone que la amilasa degrada solo los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 como en el almidón, un carbohidrato que no está implicado en la matriz extracelular.

Las moléculas de almidón son polímeros de glucosa unidas entre sí por los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, que consisten en componentes de amilosa lineal y de amilopectina ramificada. Con el fin de hacer uso del carbono y la

25 energía almacenados en el almidón, la amilasa, como parte del sistema digestivo humano, escinde el almidón en múltiples puntos, convirtiéndolo en azúcares más pequeños, que finalmente se convierten en unidades de glucosa. Debido a la existencia de dos tipos de enlaces, los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, son posibles diferentes estructuras para las moléculas de almidón. Un polímero de cadena simple no ramificado con únicamente enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos se llama amilosa. Por otro lado, la presencia de enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos da como resultado el

30 polímero de glucosa ramificado de amilopectina. Otro compuesto estrechamente relacionado que funciona como almacenamiento de glucosa en células humanas y animales se llama glucógeno. El glucógeno tiene una estructura similar a la de la amilopectina, excepto que las ramificaciones del glucógeno tienden a ser más cortas y numerosas. Se cree que ni la amilosa, ni la amilopectina, ni el glucógeno están presentes en la piel humana o animal como componente de estabilización o interacción con el colágeno de la matriz extracelular.

La especificidad del enlace atacado por la  $\alpha$ -amilasa depende de la fuente de la enzima. Actualmente se producen comercialmente dos clases principales de  $\alpha$ -amilasa a través de fermentación microbiana. En función del lugar donde se produzca la escisión en la cadena del polímero de glucosa, la etapa inicial en la despolimerización aleatoria del almidón es la división de las cadenas grandes en varios segmentos de menor tamaño. La ruptura de grandes segmentos reduce drásticamente la viscosidad de la solución de almidón gelatinizado, lo que da como resultado la licuefacción debida a la reducción de la viscosidad de la solución. La etapa final de la despolimerización es la

40 sacarificación, que acaba predominantemente en la formación de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.

Debido a que la  $\alpha$ -amilasa bacteriana ataca aleatoriamente solo los enlaces  $\alpha$ -1,4, pertenece a la categoría licuefactora. Por otro lado, la  $\alpha$ -amilasa fúngica pertenece a la categoría sacarificante y ataca el segundo enlace desde los terminales no reductores (es decir, el extremo C4) del segmento recto, lo que da como resultado la separación de

45 dos unidades de glucosa a la vez, generando el disacárido de maltosa. Por lo tanto, la ruptura del enlace es más extensa en las enzimas sacarificantes que en las enzimas licuefactoras. Las cadenas de almidón se cortan literalmente en pequeños pedazos. Finalmente, la  $\gamma$ -amilasa ataca selectivamente al último enlace en los terminales no reductores y puede actuar sobre los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 a una tasa relativa de 1:20, lo que da como resultado la separación de unidades simples de glucosa en la solución. La  $\alpha$ -amilasa y la  $\gamma$ -amilasa se pueden usar juntas para

50 convertir el almidón en azúcares simples.

La amilasa también se ha usado en la limpieza de superficies duras y telas, como se describe en la Publicación de Patente Internacional Número WO 2007/144856, que incluye agentes de lavado multiusos o "potentes", especialmente detergentes para ropa sucia; agentes de lavado multiusos, en forma de gel o pasta, especialmente los de tipos líquido denominados potentes; detergentes líquidos para tejidos finos; agentes lavavajillas a mano o agentes lavavajillas ligero, especialmente los del tipo de alta espuma; agentes lavavajillas a máquina, que incluyen los diversos tipos de pastillas, granulares, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes líquidos de limpieza y desinfección, que incluyen los tipos de lavado a mano antibacteriano, barras de lavandería, enjuagues bucales, limpiadores de dentaduras postizas, champús para automóviles o alfombras, limpiadores de baño; champús para el

55 cabello y aclarados para el cabello; geles de ducha y baños de espuma y limpiadores de metales; así como auxiliares de limpieza como aditivos blanqueadores y tipo "stain-stick" (barra para manchas) o de pretratamiento.

60

Las amilasas son una de las principales enzimas usadas en la industria. Las amilasas tienen una aplicación potencial en un amplio número de procesos industriales, como en las industrias alimentaria, de fermentación y farmacéutica. Aunque las  $\alpha$ -amilasas se pueden obtener de plantas, animales y microorganismos, las enzimas de fuentes fúngicas y bacterianas han dominado las aplicaciones en la industria, que incluyen los microorganismos de *Bacillus* spp. y *Aspergillus* spp., con la mayoría de las amilasas comerciales que se producen a partir de fuentes bacterianas como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus*.

Las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria se pueden formular como líquido, gel, polvo, pasta, pomada, loción, emulsión o microemulsión, y se pueden administrar al tejido necrótico o desvitalizado como una espuma, espray, apósito, malla, vendaje o película, en donde estos últimos pueden contener polímeros formadores de película, polímeros semipermeables o permeables, o un sustrato degradable o no degradable, como un apósito, vendaje o material de espuma. La composición de desbridamiento incluye uno o más transportadores farmacéutica o cosméticamente aceptables que son compatibles con la composición de desbridamiento enzimático. Los ejemplos de transportadores farmacéutica o cosméticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina normal (solución salina isotónica), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), soluciones salinas que contienen cloruro de calcio añadido, solución de Ringer, glicerina, propilenglicol, etanol, isopropanol, butano-1,3-diol, poli(alquilenglicol)es líquidos (p. ej., poli(etilenglicol), poli(etilenglicol) terminado en metil éter, poli(etilenglicol)-*block*-propilenglicol-*block*-etilenglicol)), y poliéteres de silicona líquidos solubles en agua, medios insolubles en agua, como isopropil miristato, isopropil palmitato, aceite mineral, dimeticona y vaselina. En algunas realizaciones, los excipientes pueden estar presentes en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 99,9 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.

La composición de desbridamiento también puede incluir agentes humectantes, tampones, agentes gelificantes, tensioactivos, agentes quelantes y emulsionantes. Otros excipientes podrían incluir varios tampones a base de agua que oscilan con un pH de 5,0 a 7,5, siliconas, copolímeros de poliéter, grasas y aceites vegetales y de plantas, aceites esenciales, alcoholes hidrófilos e hidrófobos, vitaminas, monoglicéridos y ésteres que mejoran la penetración, como los ésteres de laurato, ésteres de miristato, ésteres de palmitato y ésteres de estearato. En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento puede estar en una forma seleccionada de líquido, gel, pasta, crema, emulsión y combinaciones de estos y similares.

En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento enzimático se liofiliza hasta obtener un polvo seco. La composición de desbridamiento enzimático liofilizada se puede usar en forma de polvo, o el polvo se puede procesar adicionalmente en soluciones, cremas, lociones, geles, espráis, espumas, aerosoles, películas u otras formulaciones.

En algunas realizaciones, se pueden usar emulsionantes tensioactivos para formar emulsiones que facilitan la compatibilización con disolventes orgánicos. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen, pero no se limitan a, disolventes no irritantes, como disolventes de silicona volátiles y alcanos volátiles para formar emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua, emulsiones inversas, miniemulsiones (nanoemulsiones), microemulsiones, y microemulsiones inversas. Los disolventes de silicona volátiles no irritantes incluyen, pero no se limitan a, polidimetilsiloxanos de bajo peso molecular, como hexametildisiloxano u octametiltrisiloxano; siloxanos cíclicos de bajo peso molecular, como hexametilciclotrisiloxano u octametilciclotetrasiloxano; alcanos lineales, ramificados o cíclicos, como propano, butano e isobutano (aerosoles bajo presión), pentano, hexano, heptano, octano, isooctano e isómeros de estos, destilados de petróleo y ciclohexano; y clorofluorocarburos, como tricloromonofluorometano, diclorodifluorometano y diclorotetrafluoroetano; fluorocarburos, como tetrafluoroetano, heptafluoropropano, 1,1-difluoroetano, pentafluoropropano, perfluoroheptano, perfluorometilciclohexano, hidrofluoroalcanos, como aerosoles de 1,1,1,2,-tetrafluoroetano y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, combinaciones de estos y similares; y gases volátiles bajo presión, como aire, óxido nítrico y dióxido de carbono líquido; o una mezcla de estos. Como se comprenderá, cuando se almacena a alta presión, el dióxido de carbono puede estar presente en forma de líquido a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el disolvente volátil puede ser hexametildisiloxano, isooctano y mezclas de estos. En algunas realizaciones, el disolvente volátil puede ser hexametildisiloxano. En algunas realizaciones, los disolventes pueden estar presentes en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 99,9 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.

Los gelificantes solubles en agua útiles en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma guar, hidroxietilguar, hidroxipropilguar, hidroxipropilmetilguar, carboximetilguar, carboximetilquitosano, goma de algarroba, carragenano, goma xantana, goma gellan, gel de aloe vera, escleroglucano, esquizofilano, goma arábiga, goma de tamarindo, poli(vinil alcohol), poli(óxido de etileno), poli(etilenglicol), poli(metil vinil éter), carbómero y sus sales, ácido poliacrílico y sus sales, ácido polimetacrílico y sus sales, poli(2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato) de sodio, poli(acrilamida), poli(N,N-dimetilacrilamida), poli(N-vinilacetamida), poli(N-vinilformamida), poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(gliceril metacrilato), poli(N-vinilpirrolidona), poli(N-isopropilacrilamida) y poli(N-vinilcaprolactama), los dos últimos hidratados por debajo de sus Temperaturas de Solución Crítica Inferior, y similares, y combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, se pueden usar como gelificantes polímeros solubles en agua que tengan una carga neutra y no sean degradables enzimáticamente por la amilasa. Los ejemplos de tales gelificantes incluyen, pero no se limitan a, poli(óxido de etileno), poli(etilenglicol), poli(vinil alcohol) y poli(N-vinilpirrolidona). Otros gelificantes útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos

- neutros que tienen enlaces  $\beta$  entre las unidades de monosacárido, como en la metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Otros gelificantes todavía útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen carga aniónica, como Carbómero y sus sales, ácido poliacrílico y sus sales, y ácido polimetacrílico y sus sales. Otros gelificantes todavía útiles son los polisacáridos aniónicos que tienen enlaces  $\beta$  entre las unidades de monosacárido, como en la carboximetilcelulosa. Tales gelificantes se pueden emplear en cantidades que oscilan de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 50,0 por ciento en peso de la composición de desbridamiento para la preparación de geles viscosos o pastas. Los gelificantes pueden estar presentes en cantidades que oscilan entre el 0,1 y el 45 % en peso, entre el 0,5 y el 25 % en peso o entre el 1,0 y el 10,0 % en peso.
- 5
- 10 También se pueden añadir aceites esenciales a la formulación como fragancia o agentes aromáticos y/o como agentes antimicrobianos. Los ejemplos de aceites esenciales útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, timol, mentol, sándalo, alcanfor, cardamomo, canela, jazmín, lavanda, geranio, enebro, mentol, pino, limón, rosa, eucalipto, clavo, naranja, orégano, menta, linalool, hierbabuena, menta, hierba de limón, bergamota, citronela, ciprés, nuez moscada, abeto, árbol de té, gaulteria (metil salicilato), vainilla y similares. En algunas realizaciones, los aceites esenciales se pueden seleccionar de timol, aceite de sándalo, aceite de gaulteria, eucaliptol, aceite de pino y combinaciones de estos. En algunas realizaciones, los aceites esenciales pueden estar presentes en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 5 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, los aceites esenciales pueden estar presentes en una cantidad de al menos el 0,1 % en peso, o al menos el 0,25 % en peso, o al menos el 0,5 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.
- 15
- 20 En algunas realizaciones, también se puede usar clorofilina, un derivado semisintético soluble en agua de la clorofila, para controlar el olor de la herida y para proporcionar propiedades antiinflamatorias. En algunas realizaciones, la clorofilina puede estar presente en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 5 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, la clorofilina puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,1 % en peso, o al menos el 0,25 % en peso, o al menos el 0,5 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.
- 25
- También se puede añadir un agente queratolítico a la composición de desbridamiento para ayudar a digerir el tejido de la escara. Por ejemplo, el agente queratolítico puede promover el ablandamiento y descamación de la epidermis. Los agentes queratolíticos útiles en las composiciones de desbridamiento que se describen en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, urea, ácido salicílico y  $\alpha$ -hidroxiácidos, como ácido láctico, ácido glicólico y ácido cítrico. Por ejemplo, se puede usar urea para ayudar a eliminar el tejido muerto en heridas necróticas para ayudar a la cicatrización de heridas (Patente de EE.UU. 8.754.045). En algunas realizaciones, el agente queratolítico puede estar presente en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 15 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, los aceites esenciales pueden estar presentes en una cantidad de al menos el 0,1 % en peso, o al menos el 0,25 % en peso, o al menos el 0,5 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.
- 30
- 35 En algunas realizaciones, la cantidad total de enzima no proteolítica en una composición de desbridamiento capaz de desbridar tejido desvitalizado o necrótico puede ser de al menos el 0,001 % en peso al 60 % en peso en función del peso total de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, la cantidad total de enzima no proteolítica puede ser al menos del 1 % en peso al 50 % en peso, o al menos del 2 % en peso al 40 % en peso, o al menos del 5 % en peso al 35 % en peso, o al menos el 10 % en peso al 30 % en peso
- 40
- En algunas realizaciones, la cantidad de componente de desbridamiento enzimático no proteolítico capaz de desbridar tejido desvitalizado o necrótico en la composición de desbridamiento puede ser de al menos el 0,001 % en peso, o al menos el 0,01 % en peso, o al menos el 0,05 % en peso, o al menos el 0,075 % en peso, o al menos el 0,1 % en peso, o al menos el 0,15 % en peso.
- 45
- En algunas realizaciones, la cantidad de amilasa en el componente de desbridamiento enzimático no proteolítico puede ser del 100 % en peso, al menos del 99,5 % en peso, al menos del 99 % en peso, al menos del 95 % en peso, al menos del 90 % en peso, al menos del 85 % en peso, o al menos del 80% en peso, siendo el resto del componente de desbridamiento enzimático no proteolítico otras enzimas no proteolíticas. La cantidad de  $\alpha$ -amilasa puede ser de al menos el 80 % en peso, al menos el 90 % en peso o el 100 % en peso del contenido de amilasa. En algunas realizaciones, la porción restante del componente de desbridamiento enzimático no proteolítico (20 % en peso o menos, 15 % en peso o menos, 10 % en peso o menos, 5 % en peso o menos, 1 % en peso o menos, 0,5 % en peso o menos) pueden ser, pero no se limitan a, enzimas hidrolíticas, líticas y oxidativas/reductoras, que incluyen, pero no se limitan a, enzimas hidrolíticas, líticas y oxidativas/reductoras seleccionadas del grupo que consiste en lipasas, hialuronidasas, condroitinasas, heparanasas, heparinasas, peroxidadas, xilanasas, nucleasas, fosfolipasas, estererasas, fosfatasas, isoamilasas, maltasas, glicosilasas, galactosidasas, cutinasas, lactasas, inulasas, pectinasas, mananasas, glucosidasas, invertasas, pectato liasas, reductasas, oxidadasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tanasas, pentosanasas, glucanasas, arabinosidasas, sulfatasas, celulasas, hemicelulasas, lacasas, mezclas de estas y similares. Los ejemplos de enzimas proteolíticas que pueden estar presentes en la composición de desbridamiento incluyen, pero no se limitan a, proteasas y queratinasas.
- 50
- 55
- 60 La composición de desbridamiento puede incluir un medio acuoso. En algunas realizaciones, los medios acuosos

pueden tener un pH en el intervalo de 3,0 a 10,0, o de 4,5 a 8,0, o de 5,5 a 7,5. En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento puede tener una osmolalidad de 10-340 mOsm/kg. Cuando la composición de desbridamiento es una solución, gel o pasta de base acuosa, se puede añadir un polímero soluble en agua para aumentar la viscosidad de la solución y prolongar el tiempo de residencia de la composición enzimática en el tejido necrótico, en la superficie de una herida o por vía subcutánea en una herida

La composición de desbridamiento enzimático se puede aplicar al tejido desvitalizado según sea necesario para disolver los restos celulares necróticos en y alrededor de una herida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de desbridamiento enzimático puede estar en contacto con el tejido desvitalizado aproximadamente durante 1 a 48 horas, 1 a 24 horas, 1 a 12 horas, 1 a 8 horas, 1 a 4 horas o 1 a 2 horas antes de la eliminación.

En algunas realizaciones, la formulación de amilasa se puede eliminar de una herida limpiando o enjuagando con solución salina o agua. Estas etapas se pueden repetir según sea necesario. Se pueden tratar una amplia variedad de heridas con las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria, incluyendo heridas por quemadura de espesor total y parcial, úlceras diabéticas, lesiones ulcerosas, principalmente úlceras por presión (decúbito), úlceras venosas, úlceras tróficas, heridas quirúrgicas como heridas por amputación, incisión, traumáticas y piógenas, heridas infectadas por microorganismos, heridas de injertos de piel donante y receptora, malignidad, quistes, heridas por radiación, quemaduras solares y por congelación.

En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento enzimático se puede inyectar en el tejido desvitalizado. También se puede utilizar un potenciador de la penetración para aumentar la administración transdérmica de soluciones, geles, cremas, lociones, aerosoles y espráis. Los potenciadores de la penetración que se pueden usar en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos como ácidos saturados C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> lineales y ramificados, ácidos insaturados, como ácido oleico C<sub>14</sub> a C<sub>22</sub>, ácido cis-9-octadecenoico, ácido linoléico, ácido linolénico, alcoholes grasos, como terpenos saturados C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>, como d-limoneno, α-pineno, 3-careno, mentona, fenchona, pulegona, piperitona, eucaliptol, aceite de quenopodio, carvona, mentol, α-terpineol, terpinen-4-ol, carveol, óxido de limoneno, óxido de pineno, óxido de ciclopentano, triacetina, óxido de ciclohexano, ascaridol, 7-oxabicyclo[2,2,1]heptano, 1,8-cineol, monoésteres de glicerol, monolaurato de glicerol, monooleato de glicerol, isoestearil isoestearato, isopropil miristato, isopropil palmitato, isopropil lanolato, pirrolidonas, como N-metil-2-pirrolidona, 1-etil-2-pirrolidona, 5-metil-2-pirrolidona, 1,5-dimetil-2-pirrolidona, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, N-hexil-2-pirrolidona, N-lauril-2-pirrolidona, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, 4-decicloxazolidin-2-ona, N-dodecilcaprolactama y 1-metil-3-dodecil-2-pirrolidona N-n-butil-N-n-dodecilacetamida, N,N-di-n-dodecilacetamida, N-cicloheptil-N-n-dodecilacetamida y N,N-di-n-propildodecanamida, urea, 1-dodecilurea, 1,3-didodecilurea, 1,3-difenilurea, dimetilsulfóxido, decilmethylsulfóxido, tetradecilmethylsulfóxido, ciclodextrinas y combinaciones de estos. También los potenciadores de penetración eficaces incluyen 1-alkil-2-piperidinonas, 1-alkil-2-azacicloheptanonas, como 1-dodeciazacicloheptan-2-ona, 1,2,3-alcanotrioles, como 1,2,3-nonanotriol, 1,2-alcanodioles, n-2-(1-alkil)-2-metil-1,3-dioxolanos, oxazolidinonas, como 4-decicloxazolidin-2-ona, N,N-dimetilalcanamidas, 1,2-dihidroxiopropil alcanooatos, como 1,2-dihidroxiopropil decanoato, 1,2-dihidroxiopropil octanoato, desoxicolato de sodio, *trans*-3-alken-1-oles, *cis*-3-alken-1-oles, y *trans*-hidroxiprolina-N-alcanamida-C-etilamida, y combinaciones de estos. En algunas realizaciones, los potenciadores de penetración pueden incluir ésteres hidrófobos, isopropil miristato, isopropil palmitato o combinaciones de estos.

Debido a la posibilidad de infección en el tejido necrótico desvitalizado, la composición de desbridamiento puede incluir un agente biológico en una cantidad suficiente para impedir o erradicar los microorganismos. Dichos agentes biológicos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, antisépticos, agentes antiinfecciosos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivirales, agentes antiprotzoarios, agentes esporicidas, agentes antiparasitarios. En algunas realizaciones, el agente biológico es biodegradable y no citotóxico para las células humanas y animales. Los agentes biocidas útiles incluyen, pero no se limitan a, biguanidas, como hidrocloreto de poli(hexametilén biguanida) (PHMB), un policatión sintético de bajo peso molecular, clorhexidina y sus sales, como digluconato de clorhexidina (CHG), y alexidina y sus sales, donde los dos últimos son bis(biguanidas).

En algunas realizaciones, la biguanida es PHMB debido a su alta actividad biocida contra microorganismos, combinada con su biodegradación y baja citotoxicidad. El PHMB es principalmente activo contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y virus, y también sirve como conservante. A diferencia de los antibióticos, que se consideran productos farmacéuticos regulados, a los que se puede generar resistencia bacteriana, dicha resistencia no se produce con PHMB. En general, un agente antimicrobiano se define como una sustancia que mata los microorganismos o inhibe su crecimiento o replicación, mientras que un agente antiinfeccioso se define como una sustancia que contrarresta la infección matando a los agentes infecciosos, como los microorganismos, o impidiendo que se propaguen. A menudo los dos términos se usan indistintamente. Como se usa en la presente memoria, el PHMB se considera un agente antimicrobiano.

En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento es una composición de desbridamiento acuosa. En algunas realizaciones, las composiciones acuosas de desbridamiento descritas en la presente memoria pueden incluir PHMB biocida a una concentración que oscila del 0,01 % en peso (100 ppm) al 1 % en peso (10.000 ppm), o que oscila del 0,05 % en peso (500 ppm) al 0,5 % en peso (5.000 ppm), o que oscila del 0,1 % en peso (1.000 ppm) al 0,15 % en peso (1.500 ppm) en función del peso total de la composición de desbridamiento. También se pueden añadir bis(biguanidas), como alexidina y sus sales y clorhexidina y sus sales, a las composiciones antimicrobianas en

concentraciones del 0,001 % en peso (10 ppm) al 4,0 % en peso (40.000 ppm).

5 La interacción del policatión de PHMB de bajo peso molecular (peso molecular ~ 2.400 daltons) con la amilasa, una amilasa de alto peso molecular cargada negativamente (peso molecular 55.000 daltons) a pH fisiológico puede generar un complejo de proteína-polielectrolito de PHMB que interacciona iónicamente con la amilasa. En una herida, el PHMB se puede liberar del complejo proteína-polielectrolito de forma continua en función de la cantidad de catión de bajo peso molecular en los fluidos corporales (como los iones de sodio, potasio, calcio y magnesio) que desplazan la interacción iónica con el PHMB catiónico con sitios aniónicos de la amilasa.

10 La dosis a la que se administran las composiciones terapéuticas de amilasa depende de la fuente de la amilasa, de la actividad (es decir, el número de Unidades involucradas), del tamaño del tejido necrótico, de la edad del paciente, de la disponibilidad de atención clínica y de la incidencia de la infección. La cantidad de amilasa terapéutica que se puede administrar hasta dos veces al día puede variar desde la aplicación de un polvo (al 100 % en peso) hasta una solución diluida (de aproximadamente el 0,001 % en peso). En algunas realizaciones, la actividad de la amilasa puede oscilar de 250 Unidades a 250.000 Unidades por gramo de enzima en 1 gramo de la composición de desbridamiento.

15 La composición de desbridamiento en tejido necrótico se puede realizar por un médico, de modo que el paciente no tenga ninguna otra dificultad médica. El método de desbridamiento con amilasa se puede realizar en combinación con otros métodos de desbridamiento conocidos.

Como se usa en la presente memoria, "desbridamiento" tiene su significado estándar e incluye la eliminación de tejido lacerado, desvitalizado, muerto, dañado, infectado o contaminado, cuerpos extraños y otros restos del lecho de la herida con el fin de exponer el tejido sano. El tejido no viable o necrótico puede ser escara o esfacelo.

20 Como se usa en la presente memoria, "tejido necrótico" tiene su significado estándar e incluye tejido muerto que contiene células muertas y restos celulares, como consecuencia de la fragmentación de células moribundas. El color del tejido necrótico cambia de rojo a marrón, o negro o morado, a medida que se deshidrata, lo que finalmente da como resultado una estructura de escara negra, seca, gruesa y coriácea, que puede aparecer en una amplia variedad de tipos de heridas, incluidas las quemaduras y todo tipo de heridas crónicas.

25 Como se usa en la presente memoria, "escara" tiene su significado estándar e incluye formas de tejido necrótico. Es el recubrimiento similar al cuero sobre la herida en la superficie de la piel, y puede ser dura o flexible.

Como se usa en la presente memoria, "esfacelo" tiene su significado estándar e incluye tejido necrótico húmedo. Este tipo de tejido desvitalizado es suave, húmedo y, a menudo, de consistencia fibrosa y suele ser de color amarillo, blanco o gris.

30 Como se usa en la presente memoria, "tejido desvitalizado" tiene su significado estándar e incluye tejido desprovisto de vitalidad o vida, es decir, tejido muerto.

Como se usa en la presente memoria, "enzima proteolítica" tiene su significado estándar e incluye enzimas que escinden (digieren, rompen, hidrolizan) de forma independiente las moléculas poliméricas de proteínas en forma de cadena larga en fragmentos más cortos de péptidos y, finalmente, en sus componentes básicos de aminoácidos.

35 Como se usa en la presente memoria, "extirpar" tiene su significado estándar e incluye un procedimiento quirúrgico que requiere una incisión utilizando un bisturí u otro instrumento afilado a través de la dermis profunda (que incluyen los tejidos subcutáneos y más profundos).

Como se usa en la presente memoria, un enlace covalente que se forma entre una molécula de carbohidrato y otra molécula, particularmente entre dos restos de monosacárido, es un "enlace glucosídico" o "unión glucosídica".

40 Como se usa en la presente memoria, las "uniones  $\alpha$ -1,4-glucosídicas" son enlaces que normalmente se forman entre el carbono-1 de un azúcar y el carbono-4 de otro resto de azúcar en un polisacárido. Se forma un enlace  $\alpha$ -glucosídico cuando el grupo -OH del carbono-1 está por debajo del plano del anillo de glucosa. Por otro lado, se forma un enlace  $\beta$ -glucosídico cuando está por encima del plano. Por ejemplo, la celulosa está formada por moléculas de glucosa unidas por enlaces 1-4  $\beta$ -glucosídicos, mientras que el almidón está compuesto por enlaces 1-4  $\alpha$ -glucosídicos.

45 Como se usa en la presente memoria, la " $\alpha$ -amilasa" incluye  $\alpha$ -amilasas de origen natural así como  $\alpha$ -amilasas recombinantes, en donde la  $\alpha$ -amilasa recombinante quiere decir una  $\alpha$ -amilasa en la que se modifica la secuencia genética de ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa de origen natural para producir una secuencia de ADN mutante que codifica la sustitución, inserción o eliminación de uno o más aminoácidos en la secuencia de la  $\alpha$ -amilasa en comparación con la  $\alpha$ -amilasa natural.

50 Como se usa en la presente memoria, "amilolítico" se caracteriza por la capacidad de la digestión enzimática del almidón en dextrinas y azúcares, en particular por la amilasa.

Como se usa en la presente memoria, la cantidad de enzima utilizada se expresa en porcentaje en peso y su actividad se da en Unidades de actividad por gramo, donde una "Unidad" se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 micromol de sustrato por minuto.

Como se usa en la presente memoria, "tensoactivo" tiene su significado estándar e incluye compuestos que reducen la tensión superficial (o tensión de interfase) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido e incluye agentes emulsionantes, emulsionantes, detergentes, agentes humectantes y agentes tensoactivos.

5 Como se usa en la presente memoria, "microemulsión" tiene su significado estándar e incluye mezclas termodinámicamente estables de aceite, agua (y/o compuesto hidrófilo) y tensoactivo. Las microemulsiones incluyen tres tipos básicos: directas (aceite disperso en agua, ac./ag.), inversas (agua disperso en aceite, ag./ac.) y bicontinuas. Las microemulsiones son ópticamente claras porque las micelas dispersas tienen un diámetro menor que la longitud de onda de la luz visible (*p. ej.*, menos de 380 nanómetros, menos de 200 nanómetros o menos de 100 nanómetros) de diámetro. En ausencia de opacificantes, las microemulsiones son líquidos isotrópicos ópticamente transparentes.

10 Como se usa en la presente memoria, "microemulsión inversa" tiene su significado estándar e incluye una microemulsión que comprende una fase hidrófila suspendida en una fase oleosa continua. Una microemulsión inversa puede incluir gotitas de una fase hidrófila (*p. ej.*, agua, alcohol o una mezcla de ambos) estabilizadas en una fase oleosa por un tensoactivo de emulsión inversa. En tales casos, se puede solubilizar en las gotitas un agente activo hidrófilo. Sin embargo, en otros casos, la microemulsión inversa puede estar libre de agua y/o alcohol, y el agente activo hidrófilo se puede solubilizar directamente en la fase oleosa mediante el tensoactivo de emulsión inversa.

15 Como se usa en la presente memoria, "hidrófilo" tiene su significado estándar e incluye compuestos que tienen afinidad por el agua y pueden ser iónicos o neutros o tener grupos polares en su estructura que atraen el agua. Por ejemplo, los compuestos hidrófilos pueden ser miscibles, hinchables o solubles en agua.

20 Como se usa en la presente memoria, las composiciones "acuosas" se refieren a un espectro de soluciones a base de agua que incluyen, pero no se limitan a, soluciones homogéneas en agua con componentes solubilizados, soluciones emulsionadas en agua estabilizadas por tensoactivos o polímeros hidrófilos, y soluciones homogéneas o emulsionadas viscosas o gelificadas en agua.

25 Como se usa en la presente memoria, una enzima es "soluble" o "solubilizada" si la cantidad de enzima presente en el sistema de disolvente se disuelve en el sistema de disolvente sin que la enzima forme un precipitado o partículas de gel hinchadas visibles en solución.

Como se usa en la presente memoria, "sin escozor" significa que la formulación no provoca un dolor agudo, irritante, quemante o punzante como resultado del contacto con una superficie biológica.

30 Como se usa en la presente memoria, "volátil" tiene su significado estándar, es decir, se puede evaporar rápidamente a temperaturas y presiones normales. Por ejemplo, un disolvente es volátil si una gota (0,05 ml) del disolvente se evapora completamente entre 20 y 25 °C en 5 minutos, o en 4 minutos, o en 3 minutos, o en 2 minutos o en 1 minuto o en 30 segundos, o en 15 segundos.

35 Tal como se usa en la presente memoria, un "agente antimicrobiano" se define como una sustancia que mata los microorganismos o inhibe su crecimiento o replicación, mientras que un agente antiinfeccioso se define como una sustancia que contrarresta la infección matando los agentes infecciosos, como los microorganismos, o previniendo que se esparzan. A menudo, los dos términos se usan indistintamente. Se consideran antibióticos aquellas sustancias que originalmente fueron producidas por un microorganismo o sintetizadas con propiedades activas que pueden matar o impedir el crecimiento de otro microorganismo. El término antibiótico se usa comúnmente para referirse a casi cualquier fármaco recetado que intente eliminar la infección. Los agentes antimicrobianos no provocan resistencia biocida tal como puede ocurrir con los antibióticos, en donde se puede producir resistencia antibiótica a un fármaco.

40 Los agentes antimicrobianos tienen un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos, virus, protozoos y priones. Los ejemplos de agentes antimicrobianos incluyen biguanidas, como hidrocloreto de poli(hexametilen biguanida) (PHMB), clorhexidina y sus sales, alexidina y sus sales, povidona/yodo, cadexómero yodado, sulfadiazina de plata, plata nanocristalina, plata iónica, miel, agentes blanqueadores diluidos como hipoclorito de sodio y ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos como peróxido de benzoílo, alcoholes como etanol e

45 isopropanol, anilidas como triclocarbán, bisfenoles como triclosán, compuestos de cloro como dióxido de cloro y N-cloraminas y compuestos de amonio cuaternario como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio y bromuros de alquiltrimetilamonio, así como miconazol, clotrimazol, ketoconazol, fluconazol, cristal violeta, anfotericina B, aceite de árbol de té y similares. Las biguanidas, como PHMB, son útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria.

50 Una biguanida polimérica útil en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria es poli(hexametilen biguanida), disponible comercialmente de Arch Chemicals, Inc., Smyrna, GA bajo la marca registrada Cosmocil™ CQ. Los polímeros de poli(hexametilen biguanida) también se denominan poli(hexametilen biguanida) (PHMB), poli(hexametilen bisbiguanida) (PHMB), poli(hexametilen guanida) (PHMB), poli(aminopropil biguanida) (PAPB), poli[aminopropil bis(biguanida)] (PAPB), polihexanida e hidrocloreto de

55 poli(iminoimidocarbonil)iminohexametileno; sin embargo, PHMB es la abreviatura preferida. El PHMB es un antimicrobiano de amplio espectro y se ha usado en soluciones para múltiples propósitos para lentes de contacto, soluciones para enjuague de heridas, apósitos para heridas, productos de limpieza perioperatoria, enjuagues bucales, desinfectantes de superficies, desinfectantes de alimentos, aplicaciones veterinarias, conservantes cosméticos,

conservantes de papel, desinfectantes de recuperación secundaria de aceite, desinfectantes tratamientos industriales de agua, y en limpiafondos de piscinas. Normalmente se obtiene comercialmente en forma de hidrocloreto en agua. También se pueden añadir otros polímeros antimicrobianos, como polyquaternium 1, polyquaternium 6, polyquaternium 10, guar catiónico y derivados hidrosolubles de quitosano.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, un "antibiótico" es un medicamento o fármaco, generalmente recetado, como penicilina, estreptomina, cloranfenicol y tetraciclina, generalmente producido por varios microorganismos, que inhibe el crecimiento o destruye microorganismos, usado principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se consideran antibióticos aquellas sustancias que originalmente fueron producidas por un microorganismo o sintetizadas con propiedades activas relacionadas que pueden matar o prevenir el crecimiento de otro microorganismo. El término  
10 antibiótico se usa comúnmente para referirse a casi cualquier fármaco recetado que intente eliminar la infección.

Como se usa en la presente memoria, "resistencia a los antibióticos" es la capacidad de las bacterias y otros microorganismos para resistir los efectos de un antibiótico al que alguna vez fueron susceptibles.

- 15 La composición de desbridamiento descrita en la presente memoria puede incluir un monoalquil glicol biocida, éter de alquil glicerol y monoacil glicerol en una concentración combinada del 0,05 % en peso (500 ppm) al 4 % en peso (4.000 ppm) o del 0,1 % en peso (1.000 ppm) al 1 % en peso (10.000 ppm), o del 0,4 % en peso (4.000 ppm) al 0,6 % en peso (6.000 ppm) en función del peso de la composición de desbridamiento. El monoalquil glicol, el éter de alquil glicerol y el monoacil glicerol pueden ser hidrófobos.

- 20 Los ejemplos de monoalquil glicoles útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,2-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 1,2-heptanodiol, 1,2-octanodiol (caprilil glicol), 1,2-nonanodiol, 1,2-decanodiol, 1,2-undecanodiol, 1,2-dodecanodiol, 1,2-tridecanodiol, 1,2-tetradecanodiol, 1,2-pentadecanodiol, 1,2-hexadecanodiol, 1,2-heptadecanodiol y 1,2-octadecanodiol. También se pueden añadir glicoles no vecinales para potenciar la actividad biocida. Los glicoles no vecinales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 2-metil-2,4-pentanodiol, 1,3-butanodiol, dietilenglicol, trietilenglicol y éter de bis(hidroxietyl) glicol.

- 25 Los ejemplos de éteres de alquil glicerol útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, 1-O-heptilglicerol, 1-O-octilglicerol, 1-O-nonilglicerol, 1-O-decilglicerol, 1-O-undecilglicerol, 1-O-dodecilglicerol, 1-O-tridecilglicerol, 1-O-tetradecilglicerol, 1-O-pentadecilglicerol, 1-O-hexadecilglicerol (alcohol quimílico), 1-O-heptadecilglicerol, 1-O-octadecilglicerol (batilol), 1-O-octadec-9-enil glicerol (alcohol selaquilo), éter de 1-(2-etilhexil) glicerol (también conocido como octoxiglicerina, 2-etilhexil glicerina, 3-(2-etilhexiloxi)propano-1,2-diol, y Sensiva® SC 50), éter de 1-heptil glicerol, éter de 1-octil glicerol, éter de 1-decil glicerol y éter de 1-dodecil glicerol, éter de 1-tridecil glicerol, éter de 1-tetradecil glicerol, éter de 1-pentadecil glicerol, éter de 1-hexadecil glicerol y éter de 1-octadecil glicerol.

- 35 Los ejemplos de monoacilgliceroles útiles en las composiciones de desbridamiento descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, 1-O-decanoilglicerol (monocaprino), 1-O-undecanoilglicerol, 1-O-undecanoilglicerol, 1-O-dodecanoilglicerol (monolaurina, también llamado monolaurato de glicerol y Lauricidin®), 1-O-tridecanoilglicerol, 1-O-tetradecanoilglicerol (monomiristina), 1-O-pentadecanoilglicerol, 1-O-hexadecanoilglicerol, 1-O-heptadecanoilglicerol y 1-O-octanoilglicerol (monocaprilina). En general, son más preferidos los gliceroles sustituidos en la posición 1-O que los sustituidos en la posición 2-O o disustituidos en las posiciones 1-O y 2-O.

- 40 Como se usa en la presente memoria, "hidrófobo" se refiere a repeler el agua, ser insoluble o relativamente insoluble en agua y carecer de afinidad por el agua. Los compuestos hidrófobos con sustituyentes hidrófilos, como los dioles vecinales, pueden formar emulsiones en agua, con o sin tensioactivo añadido.

Como se usa en la presente memoria, "anfótero" se refiere a una mezcla de cargas catiónicas y aniónicas en una molécula o polímero en el que la carga total depende localmente del pH, mientras que "anfólico" tiene el mismo número de cargas catiónicas y aniónicas en un amplio intervalo de pH.

- 45 Como se usa en la presente memoria, un "excipiente" es una sustancia normalmente inerte que forma un vehículo, como un líquido, fluido o gel, que solubiliza o dispersa una enzima u otros ingredientes añadidos.

- 50 Las composiciones de amilasa pueden incluir uno o más tensioactivos adicionales para mejorar la eliminación del tejido necrótico. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos, anfóteros y anfólicos. En algunas realizaciones, los tensioactivos son tensioactivos no iónicos y anfóteros. En algunas realizaciones, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 10 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento. En algunas realizaciones, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,01 % en peso, o al menos el 0,1 % en peso, o al menos el 0,25 % en peso, o al menos el 0,5 % en peso, o al menos el 1 % en peso, en función al peso de la composición de desbridamiento. Los tensioactivos pueden tener un valor HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 18-30 con el fin de mantener la estructura catalítica de las enzimas en solución y no obstaculizar la actividad biocida de cualquiera de los agentes antimicrobianos añadidos, al tiempo que facilita una solución no citotóxica. Los valores altos de HLB representan tensioactivos que son más hidrófilos que aquellos con valores de HLB más bajos.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno de poloxámeros, poloxámeros inversos, poloxaminas y poloxaminas inversas. Se prefieren poloxámeros y poloxaminas, y los más preferidos son los poloxámeros. Los poloxámeros y las poloxaminas están disponibles en BASF Corp. con los respectivos nombres comerciales de Pluronic® y Tetronic®. Los tensioactivos Pluronic adecuados comprenden, pero no se limitan a, Pluronic F38 que tiene un HLB de 31, Pluronic F68 que tiene un HLB de 29, Pluronic 68LF que tiene un HLB de 26, Pluronic F77 que tiene un HLB de 25, Pluronic F87 que tiene un HLB de 24, Pluronic F88 que tiene un HLB de 28, Pluronic F98 que tiene un HLB de 28, Pluronic F108 que tiene un HLB de 27, Pluronic F127 (también conocido como poloxámero 407) que tiene un HLB de 18-23 y Pluronic L35 que tiene un HLB de 19. Un tensioactivo de poloxamina ejemplar de este tipo es Tetronic 1107 (también conocido como poloxamina 1107) que tiene un HLB de 24.

Además de los anteriores, se pueden añadir otros tensioactivos neutros, como por ejemplo ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos, p. ej., éteres de coco, polisorbato, polioxietileno o polioxipropileno de alcanos superiores (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>), polisorbato 20 disponible con la marca registrada Tween 20, polioxietileno (23) lauril éter disponible con la marca registrada Brij 35, polioxietileno (40) estearato disponible con la marca registrada Myrj 52 y polioxietileno (25) estearato de propilenglicol disponible con la marca registrada Atlas G 2612, todos disponibles en Akzo Nobel, Chicago, IL. Otros tensioactivos neutros incluyen etoxilatos de nonilfenol como etoxilatos de nonilfenol, Tritón X-100, tensioactivos Brij de éteres grasos de polioxietileno de origen vegetal, Tween 80, decil glucósido y lauril glucósido.

Los tensioactivos anfóteros adecuados para su uso en composiciones antimicrobianas de acuerdo con la presente invención incluyen materiales del tipo ofrecido comercialmente bajo la marca comercial Miranol (Rhodia). Otra clase útil de tensioactivos anfóteros se ejemplifica por betaínas, que incluyen cocoamidopropil betaína, undecilenamidoalquil betaína y lauramidoalquil betaína y cocoanfoacetato de sodio. Los tensioactivos anfóteros son muy suaves y tienen excelentes propiedades dermatológicas, lo que los hace especialmente adecuados para su uso en aplicaciones de cuidado personal.

La composición de desbridamiento puede comprender además un agente quelante a una concentración del 0,01 % en peso al 1 % en peso. Por ejemplo, el agente quelante puede estar presente en una cantidad de al menos el 0,01 % en peso, o al menos del 0,03 % en peso, o al menos del 0,05 % en peso, o al menos del 0,1 % en peso, o al menos del 0,50 % en peso, o al menos del 0,75 % en peso, o al menos del 1,0 % en peso. El agente quelante se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido nitrilotriacético, ácido nitrilotripropiónico, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido 2-hidroxi-etilendiaminotriacético, ácido 1,6-diaminohexametilentaacético, ácido 1,2-diaminociclohexanotetraacético, ácido O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicoltetraacético, ácido 1,3-diaminopropanotetraacético, ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamino-N,N'-diacético, ácido etilendiamino-N,N'-diacético, ácido etilendiamino-N,N'-dipropiónico, ácido trietilentaaminohexaacético, ácido etilendiamino-N,N'-bis(metilenfosfónico), ácido iminodiacético, ácido monosódico-N-lauril-β-iminodipropiónico (lauriminodipropionato de sodio, Deriphat® 160C), N,N-bis(2-hidroxi)etilglicina, ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropanotetraacético, ácido 1,2-diaminopropanotetraacético, ácido etilendiaminotetrakis(metilenfosfónico), ácido N-(2-hidroxi)etiliminodiacético, bifosfonatos, editronato y sales de estos.

Las composiciones de desbridamiento también pueden contener clorofilina y sus derivados solubles en agua para reducir la inflamación local, promover la cicatrización y controlar el olor. Se ha informado que en el tratamiento de heridas que requieren desbridamiento, algunos de los productos finales de la proteólisis son mucoproteínas, que frecuentemente producen una acción irritante y otras acciones perjudiciales sobre el tejido en contacto con dichos productos finales. Con el fin de controlar tales efectos indeseables, se ha incorporado a una formulación de desbridamiento proteolítico un derivado hidrosoluble de clorofila, generalmente en una cantidad del 0,05 al 1 % en peso de la composición total, y preferiblemente en una cantidad del 0,1 % al 0,5% (Patente de EE.UU. 2.917.433). Las clorofilas solubles en agua que se pueden usar para el propósito antes mencionado se ejemplifican por las descritas en la Patente de EE.UU. N.º 2.120.667, que incluye especialmente clorofilina sódica o potásica de cobre, clorofilina sódica o potásica de magnesio y clorofilina sódica o potásica de hierro. La clorofila soluble en agua preferida para este propósito era una mezcla de clorofilina de cobre de sodio y potasio, predominantemente la sal de potasio.

Otras aplicaciones de la clorofilina en el tratamiento de heridas se ejemplifican en la Publicación de Patente Internacional Número WO 2008/063229, en donde una composición de desbridamiento de enzima proteasa es una pomada hidrófila que además comprende un agente suplementario que minimiza el daño a las células sanas normales de los compuestos liberados por las células que se están muriendo, en donde el agente es opcionalmente clorofilina de cobre y sodio, en donde el intervalo de la relación estequiométrica de moles de clorofilina administrada con respecto a los moles de enzima de desbridamiento administrada es opcionalmente de 0,1 a 10,0, de 0,3 a 3,0 o de 1,0.

La clorofilina de cobre y sodio también es un agente colorante alimentario y se conoce como verde natural 3. Su adición a un producto de desbridamiento también añade coloración, lo que es útil para visualizar la eliminación de la composición de desbridamiento.

Si se requiere reducir el dolor durante el desbridamiento, la formulación puede comprender además agentes analgésicos, agentes anestésicos y agentes para el dolor neuropático, como lidocaína, capsaicina, benzocaína, tetracaína, prilocaína, bupivacaína, levobupivacaína, procaína, carbocaína, etidocaína, mepivacaína, nortripileno, amitriptilina, pregabalina, diclofenaco, fentanilo, gabapentina, agentes antiinflamatorios no esteroideos, salicilatos,

combinaciones de estos y similares.

5 Mientras que las  $\alpha$ -amilasas catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1-4) internos de los polímeros de glucosa como reacción principal, algunas  $\alpha$ -amilasas, particularmente las amilasas sacarificantes, sin embargo, catalizan reacciones de transferencia además de la hidrólisis (Patente de EE.UU. 8.486.664; Solicitud de Patente Internacional Número WO 2012/013646). Estas  $\alpha$ -amilasas son capaces de transferir residuos de glicósidos a alcoholes de bajo peso molecular así como al agua, una propiedad relacionada con la actividad transferasa de las glucosidasas. No se sabe si dicho proceso de transglicosilación es operativo en el desbridamiento de tejido necrótico en relación con esta invención.

10 En algunas realizaciones, se describe un kit que incluye un recipiente que contiene una composición de desbridamiento de acuerdo con cualquiera de las variaciones descritas en la presente memoria, y se describen instrucciones para usar la composición de desbridamiento para el desbridamiento de tejido desvitalizado. Las instrucciones pueden incluir poner en contacto la composición de desbridamiento con un área de piel que necesita desbridamiento. Las instrucciones pueden incluir la repetición de la etapa de contacto a intervalos regulares. Los intervalos regulares pueden ser al menos una vez al día, o al menos dos veces al día (cada 12 horas), o al menos tres veces al día (cada 8 horas). Las instrucciones pueden incluir mezclar y/o diluir la composición de desbridamiento en un disolvente u otro líquido transportador. Las instrucciones pueden incluir la eliminación del tejido necrótico tratado con la composición de desbridamiento mediante limpieza y aclarado con disolvente.

20 También se describe un método de desbridamiento de tejido desvitalizado. El método puede incluir poner en contacto una composición de desbridamiento de acuerdo con cualquiera de las variaciones descritas en la presente memoria con un área de piel que necesite desbridamiento, como por ejemplo mediante un polvo, líquido, gel, hidrogel, espuma, pasta, spray o película. En algunas realizaciones, la composición de desbridamiento se aplica a un apósito para heridas, como gasa, tela, fibra, alginato, hidrocoloide, composite o película. En algunas realizaciones, el apósito para heridas se compone de componentes naturales o sintéticos, o combinaciones de estos. El método también puede incluir la abrasión y/o la eliminación de la composición de desbridamiento después de un período de tiempo determinado. El método puede incluir repetir la etapa de contacto a intervalos regulares. En algunas realizaciones, los intervalos regulares pueden ser al menos una vez al día, o al menos dos veces al día (cada 12 horas), o al menos tres veces al día (cada 8 horas). En algunas realizaciones, el método también incluye retirar el tejido desbridado del área de piel.

Es un objeto de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar el desbridamiento enzimático de restos necróticos y escaras.

30 Es un objeto de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un tratamiento de desbridamiento enzimático de heridas crónicas, heridas agudas y heridas por quemaduras.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento enzimático de tejido necrótico que no se base predominantemente en la escisión/hidrólisis de péptidos por proteasas.

35 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas para el desbridamiento que escindan los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicodídicos de carbohidratos en polisacáridos o los enlaces glucosídicos con proteínas.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas hidrolíticas de carbohidratos para el desbridamiento enzimático basadas en la familia de enzimas amilasa.

40 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria tratar heridas necróticas que comprenden la etapa de administrar una cantidad eficaz de una enzima amilasa.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas hidrolíticas de carbohidratos para el desbridamiento enzimático basadas en  $\alpha$ -amilasa.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas hidrolíticas de carbohidratos para el desbridamiento enzimático basadas en  $\beta$ -amilasa.

45 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas hidrolíticas de carbohidratos para desbridamiento enzimático basadas en  $\gamma$ -amilasa en combinación con  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa.

50 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar enzimas hidrolíticas de carbohidratos para el desbridamiento enzimático basadas en la familia de las amilasas, seleccionadas de combinaciones de  $\alpha$ -amilasa, con  $\beta$ -amilasa y  $\gamma$ -amilasa.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento enzimático de tejido basado predominantemente en  $\alpha$ -amilasa, con un mínimo (20% en peso o menos) de otras familias de enzimas.

Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un

- 5 desbridamiento enzimático de tejido en donde las familias de enzimas de escisión hidrolítica distintas de las amilasas incluyen un 20 % en peso o menos de proteasas, condroitinasas, hialuronidasas, lipasas, glucosidasas, heparanasas, dermatanasas, pululananas, N-acetilglucosaminidasa, lactasas, fosfolipasas, transglicosilasas, esterases, tioéster hidrolisasas, sulfatasas, escarasas, nucleasas, fosfatasas, fosfodiesterasas, mananasas, manosidasas, isoamilasas, liasas, inulinasas, queratinasas, tananasas, pentosanasas, glucanasas, arabinosidasas, pectinasas, celulasas, quitinasas, xilanasas, cutinasas, pectato liasas, hemicelulasas, combinaciones de estas y similares.
- 10 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento enzimático de tejido en donde las familias de enzimas distintas de las amilasas incluyen un 20 % en peso o menos de oxidasas, peroxidasas, glucosa oxidasas, catalasas, oxidorreductasas, fenoloxidasas, lacasas, lipoxigenasas, isomerasas, ligninasas, combinaciones de estas y similares.
- 15 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento basado en  $\alpha$ -amilasa, en donde la  $\alpha$ -amilasa se administra en forma de polvo, gel, pasta, líquido, pomada, espuma, vendaje, malla o apósito.
- 15 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento basado en  $\alpha$ -amilasa que se administra por vía tópica o subcutánea.
- Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento basado en  $\alpha$ -amilasa, en donde la  $\alpha$ -amilasa se aplica en un medio hidrófilo o acuoso.
- 20 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar una fragancia agradable a las composiciones de desbridamiento.
- 20 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria aplicar clorofilina a una herida para reducir la inflamación local, promover la cicatrización y controlar el olor.
- Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un apósito para heridas para el tratamiento con amilasa compuesto por gasa, malla, tela, fibra, espuma o película.
- 25 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar formulaciones de amilasa con conservantes.
- Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar formulaciones antimicrobianas de amilasa.
- 30 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar formulaciones antimicrobianas de amilasa que reduzcan o eliminen bacterias Gram positivas y Gram negativas en heridas y superficies biológicas.
- Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar formulaciones antimicrobianas de amilasa que reduzcan o eliminen las levaduras en heridas y superficies biológicas.
- 35 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar formulaciones antimicrobiana de amilasa que incorporen aceites esenciales antimicrobianos para aumentar la actividad antimicrobiana de las composiciones.
- 40 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un desbridamiento basado en  $\alpha$ -amilasa mediante un tensioactivo capaz de solubilizar, hinchar o hidratar el tejido desvitalizado o la escara.
- 40 Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar un polímero hidrófilo para el desbridamiento basado en  $\alpha$ -amilasa capaz de aumentar la viscosidad o provocar la gelificación de la formulación.
- Es un objeto adicional de las composiciones, kits y métodos descritos en la presente memoria proporcionar amilasa en forma de kit para el tratamiento de heridas y tejido necrótico.

### Ejemplos

- 45 En esta invención se usan los siguientes ingredientes y sus abreviaturas:

#### *Enzimas*

$\alpha$ -Amilasa #1, páncreas porcino, 30 U/mg, Sigma Aldrich, A3176-500KU, lote SLBF3831V.

$\alpha$ -Amilasa #2, páncreas porcino (contiene un 0,2 % de proteasa), 230 U/mg, Lee BioSolutions, lote M60404.

$\alpha$ -Amilasa #3, páncreas porcino (contiene un 0,05 % de proteasa), 210 U/mg, Lee BioSolutions, lote P70442.

## ES 2 938 202 T3

$\alpha$ -Amilasa #4, saliva humana, 117,5 U/mg, Sigma Aldrich, lote SLBB8953V.

$\alpha$ -Amilasa #5, *Bacillus licheniformis*, 500-1.500 U/mg, Sigma Aldrich, lote SLBG8595V.

$\alpha$ -Amilasa #6, *Bacillus subtilis* spp., polvo, 7.278 U/mg, Dyadic International, lote ADY4001.

$\alpha$ -Amilasa #7, *Bacillus subtilis* spp., solución, 1.269 U/mg, Dyadic International, lote ASP3001.

5  $\beta$ -Amilasa, cebada, 41,6 U/mg, Sigma Aldrich, lote SLBC2932V.

$\gamma$ -Amilasa #1, *Aspergillus niger*, 129,2 U/mg, Sigma Aldrich, lote BCB1453V.

$\gamma$ -Amilasa #2, *Rhizopus* spp., MyBiosource Inc., lote 22200303.

Bromelina, tallo de piña, 3-7 U/mg, Sigma Aldrich, lote SLBG2202V

Colagenasa, Tipo I, *Clostridium histolyticum*, 125 U/mg, Sigma Aldrich, C0130-100UG, lote SLBH5757V.

10 Lipasa #1, páncreas porcino, 30-90 U/mg, Sigma Aldrich, lote SLBH6427V.

Lipasa # 2, páncreas porcino (contiene <0,05 % de proteasa), 360 U/mg, Lee BioSolutions, 400-10, lote R24160.

### Otros ingredientes

15 AC, Composición Antimicrobiana, Agua, 95,5 % en peso, PHMB 0,1 % en peso, EDTA 0,065 % en peso, P407 2 % en peso, HPMC, 2 % en peso, SC50, 0,3 % en peso, SC10, 0,1 % en peso, pH 5,5.

CHG, gluconato de clorhexidina, Spectrum Chemicals, lote ZQ1023.

Colágeno, tipo I, cola de rata, Corning Inc., 354236, lote 3298599.

DC 193, PEG-12 Dimeticona, Dow Corning, lote 0002250697

Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, DPBS, pH 7,1, Sigma Aldrich, D8537, lote RNBC1143.

20 EDTA, sales di-, tri-sódicas del ácido etilendiaminotetraacético, Spectrum Chemicals, lotes 1AE0430, YL0044.

Glicerina, Quality Choice, lote 519675.

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), Amerchol Corp., lote WF15012N01.

Aceite mineral, CVS, lote 5BF0201.

PEG 400, Polietilenglicol, 400 M<sub>n</sub>, Sigma-Aldrich, lote MKBD2642V.

25 Vaselina, vaselina, lote 02011HU00.

PHMB, hidrocloreto de poli (hexametileno biguanida), Cosmocil™ CQ, Arch Chemical, lote 11RC116995.

P407, Poloxámero 407, Pluronic F127, Spectrum Chemicals, lote 1AD0265.

Polímero JR-30M, Amerchol, lote XL2850GRXA.

SC10, Sensiva® SC 10, 1,2-dihidroxiocetano), Schülke & Mayr, lote 1178933.

30 SC50, Sensiva® SC 50, éter de 1-(2-etilhexil) glicerol, Schülke & Mayr, lote 1179743.

Hidróxido de sodio, NaOH Puritan al 50%, UN1824, lote 011043.

Urea, Sigma Aldrich, lote SLBF4607V.

Agua, Desionizada, ajustada a pH 7.

35 *Digestión del gel de colágeno*

Con el fin de determinar si una  $\alpha$ -amilasa contenía una proteasa y, por lo tanto, era capaz de escindir un gel de colágeno (es decir, un gel a base de proteínas), se estudió la digestión del gel de colágeno por reología en condiciones de frecuencia variada usando  $\alpha$ -amilasa y colagenasa como potenciales enzimas de digestión. Si la  $\alpha$ -amilasa no provocase la digestión del gel de colágeno, su actividad de desbridamiento del tejido no se basaría en ninguna contaminación por una proteasa y, por lo tanto, no por la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las cadenas de polímero

40

de colágeno.

Los geles de colágeno se prepararon a 2,0 mg/ml usando colágeno tipo I. Los geles se prepararon mezclando 500  $\mu$ l de colágeno (~4,1 mg/ml), 500  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y 10  $\mu$ l de NaOH 1 N (diluido a partir de NaOH Puritan al 50%). Se formaron hidrogeles de colágeno sólidos después de 30 min en una incubadora a 37 °C. Los geles se incubaron a 37 °C durante 24 horas con las siguientes enzimas:

2 mg (250 U) de colagenasa

8 mg (250 U) de  $\alpha$ -amilasa #1

Las pruebas reológicas se realizaron en un reómetro Anton Paar MCR 302 usando una placa paralela de 25 mm (para geles sólidos) y un cono y placa de 25 mm (para geles completamente licuados, es decir, gel de colágeno tratado con colagenasa). Todos los barridos de frecuencia se realizaron a 37 °C y 1% de deformación (región viscoelástica lineal determinada por un barrido de amplitud de deformación). Los datos se muestran en la Figura 1, para los módulos de almacenamiento y pérdida frente a la frecuencia, y en la Figura 2, para los módulos complejos para gel de colágeno sin tratar, para gel de colágeno tratado con amilasa y gel de colágeno tratado con colagenasa.

En la Figura 1, se representan los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) frente a la frecuencia para controles de gel de colágeno sin tratar, geles de colágeno tratados con 250 Unidades de colagenasa y geles de colágeno tratados con 250 Unidades de  $\alpha$ -amilasa #1. El módulo de almacenamiento representa la naturaleza sólida y el módulo de pérdida representa la naturaleza líquida del gel de colágeno viscoelástico. No hay una diferencia significativa entre los módulos de almacenamiento y de pérdida entre el gel de colágeno sin tratar y el gel tratado con  $\alpha$ -amilasa #1, lo que demuestra que la  $\alpha$ -amilasa no digiere el gel de colágeno (proteína). La proteasa colagenasa licuó completamente el gel de colágeno, lo que se demuestra por los módulos de almacenamiento y de pérdida significativamente más bajos.

En la Figura 2, se representa el módulo complejo ( $G^*$ ) frente a la frecuencia para controles de gel de colágeno sin tratar, geles de colágeno tratados con 250 Unidades de colagenasa y geles de colágeno tratados con 250 Unidades de  $\alpha$ -amilasa #1. El módulo complejo representa el módulo de almacenamiento (comportamiento similar a un sólido) y el módulo de pérdida (comportamiento similar a un líquido), que se correlaciona con la rigidez del gel. La  $\alpha$ -amilasa #1 no digiere los geles de colágeno en comparación con el control de gel de colágeno sin tratar (sin diferencias estadísticamente significativas en los módulos complejos).

Estas figuras demuestran que la colagenasa, una proteasa, licuó completamente los geles de colágeno en 24 horas, mientras que la  $\alpha$ -amilasa #1, una enzima proteica destacada por la escisión de los polisacáridos con enlace  $\alpha$ , como los del almidón y el glucógeno, no digirió el gel de colágeno en comparación con el control de gel de colágeno sin tratar (sin diferencias estadísticamente significativas en los módulos de almacenamiento, módulos de pérdida o módulos complejos). A partir de estas Figuras, se observa que los módulos aumentan con la frecuencia debido a la naturaleza viscoelástica del polímero (colágeno) ensayado. A altas frecuencias, las cadenas de polímero de colágeno no tienen tiempo para relajarse, lo que da como resultado un comportamiento viscoelástico más rígido observado. Los datos del gel de colágeno tratado con colagenasa parecen confusos debido a la naturaleza líquida de la digestión resultante del gel de colágeno. La colagenasa degradó y licuó el gel de colágeno completamente, y la solución enzimáticamente degradada resultante se tuvo que evaluar usando geometría de cono y placa en el reómetro. Mientras que el gel se licuó por completo, la solución resultante seguía siendo viscoelástica debido a la naturaleza del colágeno y los péptidos que quedaban en la solución.

Los datos de reología respaldan la actividad de desbridamiento en el tejido desvitalizado por la  $\alpha$ -amilasa ya que no depende de la contaminación por una proteasa.

Método para evaluar la eficacia de la digestión de varias enzimas *ex vivo*.

En la Patente de EE.UU. 8.119.124, se informó un modelo de herida por quemadura *in vivo* (*ex-vivo*) que usaba la piel de cerdos jóvenes debido a su similitud con la de los humanos. En nuestra investigación, se obtuvieron varias muestras de piel de cerdo congelada de Culebra Meat Market, San Antonio, TX, y se usaron como un análogo de desbridamiento. Para cada experimento de digestión, la piel de cerdo se hirvió en agua durante 1 minuto y luego se cortó en pequeños trozos cuadrados. La piel de cerdo hervida se pesó inmediatamente antes de la aplicación de una formulación de desbridamiento. Luego se incubó con 1 gramo de cada formulación de desbridamiento durante 16 horas a 34 °C en agua a pH 7 y se limpió suavemente con una toalla de papel para eliminar cualquier tejido digerido. A continuación, se pesó el tejido restante. Como control, se trató piel de cerdo hervida sin enzima activa mediante el mismo procedimiento. El porcentaje de digestión de piel de cerdo se calculó usando la siguiente formulación:

$$\% \text{ piel de cerdo digerida} = \frac{W_2 \text{ enz}}{W_1 \text{ enz} * \frac{W_2 \text{ veh}}{W_1 \text{ veh}}} * 100\%$$

donde

$W_1$  enz: peso de piel de cerdo antes de la digestión en una formulación que contiene una o más enzimas activas.

W<sub>1</sub> veh: peso de piel de cerdo antes de la digestión en la misma formulación excepto sin enzimas activas.

W<sub>2</sub> enz: peso de la piel de cerdo después de la digestión en una formulación que contiene una o más enzimas activas.

W<sub>2</sub> veh: peso de la piel de cerdo después de la digestión en la misma formulación excepto sin enzimas activas.

Resultados de digestión, piel de cerdo

5 La amilasa de diferentes fuentes, o a diferentes niveles de actividad expresados en Unidades (U), mostró diferentes niveles de actividad de desbridamiento *ex vivo* (Tabla 1). La  $\alpha$ -amilasa de páncreas porcino tanto de Sigma Aldrich ( $\alpha$ -amilasa #1) como de Lee BioSolutions ( $\alpha$ -amilasa #2,  $\alpha$ -amilasa #3) mostró una alta eficacia de desbridamiento, donde 10 1 gramo de formulación contiene 250 U de enzima. Sorprendentemente, la  $\alpha$ -amilasa (Lee BioSolutions, 0,2 % de proteasa) que contenía una mayor cantidad de impurezas de proteasa ( $\alpha$ -amilasa #2) tuvo una eficacia de desbridamiento ligeramente menor que la  $\alpha$ -amilasa que contenía una menor cantidad de impurezas de proteasa (Lee BioSolutions, 0,05 % de proteasa) ( $\alpha$ -amilasa #3), lo que respalda aún más la conclusión de que la actividad de desbridamiento de la amilasa no es el resultado de la contaminación por proteasa. La  $\alpha$ -amilasa de la saliva humana ( $\alpha$ -amilasa #4) fue ineficaz para digerir la piel de cerdo a la concentración estudiada. La actividad de la  $\alpha$ -amilasa derivada de bacterias es muy variable dependiendo de la cepa bacteriana y del proveedor. La  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* ( $\alpha$ -amilasa #5) mostró una eficacia de desbridamiento muy débil, mientras que la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis* spp. mostró una alta eficacia de desbridamiento ( $\alpha$ -amilasa #6,  $\alpha$ -amilasa #7), particularmente a una actividad de 15 250.000 Unidades de enzima en 1 gramo de formulación. La  $\beta$ -amilasa mostró cierta actividad en la digestión de la piel de cerdo en función de su capacidad para actuar sobre los mismos sustratos que la  $\alpha$ -amilasa pero con un mecanismo catalítico diferente, mientras que la  $\gamma$ -amilasa #1 y #2 fueron ineficaces en este modelo de desbridamiento.

20 Tabla 1. Eficacia de desbridamiento de amilasas de varias fuentes sobre piel de cerdo hervida en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	96,30%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #2	99,891/0,109	1g/250U	96,60%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #3	99,88/0,12	1g/250U	97,90%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #4	99,8/0,2	1g/250U	4,30%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #5	99,95 g/0.05	1g/250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #5	99,9/0,1	1g/500U	13,50%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,9966/0,0033	1g/250U	17,50%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,966/0,034	1g/2.500U	70,80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	96,6/3,4	1g/250.000U	100%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #7	99,9803/0,0197	1g/250U	15,00%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #7	99,803/0,197	1g/2.500U	77,60%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #7	80,3/19,7	1g/250.000U	100%
H <sub>2</sub> O/ $\beta$ -amilasa	99,4/0,6	1g/250U	18,60%
H <sub>2</sub> O/ $\beta$ -amilasa	94/6	1g/2.500U	38,90%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -amilasa #1	99,8/0,2	1g/250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -amilasa #1	99/1	1g/1.250U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -amilasa #1	98/2	1g/2.500U	0%
H <sub>2</sub> O/ $\gamma$ -amilasa #2	99,4/0,6	1g/250U	0%

25 En la Tabla 2 se enumeran los efectos de varios aditivos y excipientes sobre la eficacia de desbridamiento de la  $\alpha$ -amilasa #1 con piel de cerdo hervida. Se incluye una solución tamponada de DPBS, una formulación en aceite mineral, una formulación de un polímero hidrófilo que aumenta la viscosidad, HPMC, en DPBS, y una formulación con un polímero catiónico que aumenta la viscosidad, Polymer JR (hidroxietilcelulosa catiónica). Los resultados se comparan con la  $\alpha$ -amilasa #1 en agua a pH 7. Cada formulación contenía la misma cantidad de  $\alpha$ -amilasa #1, concretamente 30 250 Unidades. Se ve que la consistencia de la formulación afectó a la eficacia de desbridamiento de la amilasa. La adición de tampón DPBS pareció mejorar la eficacia del desbridamiento en comparación con la  $\alpha$ -amilasa en agua, mientras que el aceite mineral disminuyó en gran medida la eficacia de desbridamiento, presumiblemente debido a la falta de agua para la solubilidad y la actividad enzimáticas; los polímeros solubles en agua de HPMC a base de celulosa neutra en DPBS y el polímero JR a base de celulosa catiónica en agua añadidos redujeron un poco la eficacia de desbridamiento, posiblemente debido a un menor contenido de agua en sus formulaciones en comparación con la  $\alpha$ -amilasa #1 por sí sola en agua.

Tabla 2. Eficacia de desbridamiento de  $\alpha$ -amilasa #1 en varias formulaciones sobre piel de cerdo hervida *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	96,30%
DPBS/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	100%
Aceite mineral/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	62,90%
HPMC/DPBS/ $\alpha$ -amilasa #1	5/94,2 g/0,8	0,05g/0,95g/250U	80,10%
Polímero JR-30M/H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	5/94,2 g/0,8	0,05g/0,95g/250U	84,30%

5 En la Tabla 3 se describen combinaciones de  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa que usan  $\alpha$ -amilasa bacteriana de *Bacillus subtilis* ( $\alpha$ -amilasa #6) junto con  $\beta$ -amilasa derivada de plantas. En este modelo, la mayor cantidad de  $\beta$ -amilasa parecía dificultar la digestión general de la piel de cerdo hervida.

Tabla 3. Eficacia de desbridamiento de piel de cerdo hervida por  $\alpha$ -amilasa #6 con  $\beta$ -amilasa en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/250U	79,20%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6/ $\beta$ -amilasa	96,6/0,34/3,16	1g/250U/131U	53,70%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6/ $\beta$ -amilasa	99,32/0,34/0,34	1g/250U/14U	72,30%

10 En la Tabla 4, se proporciona la adición de otra enzima hidrolítica no proteolítica, la lipasa, a la  $\alpha$ -amilasa #3 en la digestión de la piel de cerdo hervida, que usa contenidos de amilasa del 100 % en peso, 90 % en peso y 80 % en peso de lipasa. La lipasa se destaca por su capacidad para catalizar la hidrólisis de los enlaces éster en los lípidos (triglicéridos, grasas y aceites). Existen múltiples fuentes de lipasa, ya que se produce en el páncreas, el hígado, el intestino, la lengua, el estómago y muchas otras células, así como en las semillas de las plantas. La adición de lipasa a la  $\alpha$ -amilasa podría ser un complemento importante en el desbridamiento en donde está involucrado el tejido adiposo.

15 En el modelo de cerdo estudiado, el % de piel de cerdo hervida digerida fue relativamente constante para las tres muestras estudiadas, que usan una concentración de enzima total del 0,2 % en peso, a pesar de que la cantidad de amilasa #3 disminuyó con el aumento del contenido de lipasa, lo que indica que las enzimas proteolíticas contribuyeron a la digestión de la piel de cerdo hervida.

Tabla 4. Eficacia de desbridamiento de piel de cerdo hervida por  $\alpha$ -amilasa #3 con lipasa #2 en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #3	99,8/0,2	1g/420U	83,90%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #3/lipasa #2	99,8/0,18/0,02	1g/378U/72U	84,10%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #3/lipasa #2	99,8/0,16/0,04	1g/336U/144U	81,20%

20 En la Tabla 5 se dan los resultados de piel de cerdo digerida por  $\alpha$ -amilasa #1 en agua con el agente queratolítico urea, con clorofilina para reducir la inflamación local, promover la cicatrización y controlar el olor, y con una combinación de urea y clorofilina. Todas las soluciones con clorofilina fueron de color verde. Se ve que una fuente diferente de piel de cerdo, comparada con la de la Tabla 1, hecha en condiciones similares, tenía un nivel de digestión reducido. La adición de urea pareció aumentar la eficacia de la digestión por la  $\alpha$ -amilasa, mientras que la adición de

25 dos concentraciones de clorofilina pareció disminuir la eficacia de la amilasa. Una combinación de los tres ingredientes proporcionó una eficacia de digestión superior a la de la clorofilina y la  $\alpha$ -amilasa, y menor que la de la urea y la amilasa, o la  $\alpha$ -amilasa por sí sola.

Tabla 5. Eficacia del desbridamiento de piel de cerdo hervida por  $\alpha$ -amilasa #1 con urea y clorofilina en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	78,60%
H <sub>2</sub> O/urea/ $\alpha$ -amilasa #1	89,2/10/0,8	1g/250U	84,90%
H <sub>2</sub> O/clorofilina/ $\alpha$ -amilasa #1	98,7/0,5/0,8	1g/250U	54,80%
H <sub>2</sub> O/clorofilina/ $\alpha$ -amilasa #1	98,2/1/0,8	1g/250U	59,30%
H <sub>2</sub> O/urea/clorofilina/ $\alpha$ -amilasa #1	88,7/10/0,5/0,8	1g/250U	67,20%

30 El tejido necrótico es susceptible a la infección bacteriana, lo que impide aún más la cicatrización de heridas y puede inducir sepsis en casos graves. Debido a la posibilidad de infección en heridas necróticas y tejido dañado e irritado, se desea la adición de un agente biológico que impida o elimine los microorganismos. En este sentido, se investigaron dos biguanidas antimicrobianas usadas en el cuidado de heridas, hidrocloreuro de poli(hexametilén biguanida) (PHMB)

y digluconato de clorhexidina (CHG). La Tabla 6 es una comparación de tres formulaciones de soluciones acuosas de PHMB con  $\alpha$ -amilasa #6 y CHG con  $\alpha$ -amilasa #6, todas con el mismo % en peso de  $\alpha$ -amilasa #6. Para las soluciones basadas en PHMB, estas actividades fueron análogas o ligeramente mayores que las de la  $\alpha$ -amilasa por sí sola, aunque el nivel más alto de PHMB del 0,15 % en peso (1.500 ppm) puede haber disminuido ligeramente la actividad de la amilasa. Sin embargo, el uso de CHG pareció disminuir notablemente la capacidad de digestión de la amilasa.

Tabla 6. Desbridamiento de piel de cerdo por  $\alpha$ -amilasa #6 con PHMB y CHG en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/25.000U	83,90%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -amilasa #6	99,51/0,15/0,34	1g/25.000U	81,30%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -amilasa #6	99,56/0,1/0,34	1g/25.000U	84,90%
H <sub>2</sub> O/PHMB/ $\alpha$ -amilasa #6	99,61/0,05/0,34	1g/25.000U	86,80%
H <sub>2</sub> O/CHG/ $\alpha$ -amilasa #6	97,66/2/0,34	1g/25.000U	60,50%

Resultados de digestión, piel de rata

Se obtuvo tejido de piel de rata recién extirpado de dos ratas adultas de 9 y 11 meses de edad del Centro de Recursos de Animales de Laboratorio de la Universidad de Texas en San Antonio, San Antonio, TX, bajo un protocolo aprobado por IACUC. Se recuperó un gran trozo de piel del lomo de cada rata Sprague-Dawley macho. Se cortó la mitad de la piel y se hirvió en agua durante 60 segundos. Tanto las mitades hervidas como las no hervidas de la piel se cortaron en trozos más pequeños y se recortaron de modo que cada trozo pequeño pesara de 0,23 g a 0,25 g. Se empapó un pequeño trozo de piel en 1 gramo de cada formulación de desbridamiento y se incubó a 34 °C para la desbridación durante 24 horas. Después de la incubación de 24 horas, se retiró la piel de la formulación de desbridamiento. La piel desbridada (tejido blando y pastoso) se limpió suavemente con toallas de papel y se pesó el resto de la piel no desbridada. A continuación, se calculó el porcentaje de piel desbridada en función del peso antes y después del procedimiento de desbridamiento.

Las tablas 7 y 8 presentan los resultados del desbridamiento de piel de rata recién extirpada que se desbridó en condiciones hervidas y sin hervir, respectivamente, usando las enzimas amilolíticas  $\alpha$ -amilasa #1 y  $\alpha$ -amilasa #6, así como las enzimas proteasas de bromelina y colagenasa, todo en agua a pH 7. Para la piel de rata sin hervir (Tabla 7), se observa que las dos enzimas proteasas fueron más eficaces que cualquiera de las amilasas, siendo la colagenasa la más eficaz en la digestión de la piel de rata con un 79 %. Sin embargo, para la piel de rata hervida (Tabla 8), que es más análoga al tejido necrótico desvitalizado, las enzimas amilolíticas fueron comparables a las enzimas proteolíticas en su capacidad para digerir la piel de rata.

Tabla 7. Desbridamiento de piel de rata sin hervir por  $\alpha$ -amilasa, bromelina y colagenasa en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	31,80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/25.000U	29,80%
H <sub>2</sub> O/bromelina	90/10	1g/250U	51,90%
H <sub>2</sub> O/colagenasa	99,8/0,2	1g/250U	79%

Tabla 8. Desbridamiento de piel de rata hervida por  $\alpha$ -amilasa, bromelina y colagenasa en agua *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	86,80%
H <sub>2</sub> O/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/25.000U	90,40%
H <sub>2</sub> O/bromelina	90/10	1g/250U	92,90%
H <sub>2</sub> O/colagenasa	99,8/0,2	1g/250U	86%

Si el tejido necrótico se infecta con una biopelícula microbiana, que posiblemente cubra aún más el tejido necrótico con polisacáridos adicionales (un componente de una sustancia polimérica extracelular, a veces denominada baba) que emanan de los microorganismos de la biopelícula, que pueden ser potencialmente bacterianos en origen, la eliminación o la reducción de la biopelícula puede acelerar la eliminación del tejido necrótico o desvitalizado. Las tablas 9 y 10 ofrecen los resultados del uso de una composición antimicrobiana acuosa (AC) a pH 5,5 que ha demostrado eficacia en la reducción de biopelículas (Patente de EE.UU. 8.829.053). La composición antimicrobiana contiene un agente antimicrobiano de biguanida polimérica de PHMB, EDTA como un agente quelante y estabilizador del pH, HPMC como un polímero que aumenta la viscosidad, un tensioactivo neutro de P407 para la limpieza y una combinación de 2-etilhexilglicerina y 1,2-octanodiol por sus propiedades emolientes y antimicrobianas. Con la condición de la piel de rata sin hervir en la composición antimicrobiana (Tabla 9), ni la  $\alpha$ -amilasa #1 ni la  $\alpha$ -amilasa #6

fueron tan eficaces en la digestión en relación con la mostrada por las mismas enzimas para la piel de rata sin hervir en agua (Tabla 7). Aunque la bromelina en la composición antimicrobiana fue más eficaz que la amilasa con la piel de rata sin hervir (Tabla 9), su efecto de digestión es menor que el demostrado para la digestión de la piel de rata en agua (Tabla 7). Mientras que la colagenasa fue muy eficaz para la digestión de piel de rata hervida y sin hervir en agua (Tablas 7 y 8), su efecto en la digestión fue insignificante para la piel de rata sin hervir en presencia de la composición antimicrobiana acuosa (Tabla 9). Este efecto también ocurrió para la colagenasa con la piel de rata hervida en la composición antimicrobiana (Tabla 10), mientras que la  $\alpha$ -amilasa #1, la  $\alpha$ -amilasa #6 y la bromelina fueron altamente eficaces (Tabla 10). Dado que la composición antimicrobiana contiene el agente quelante de iones metálicos EDTA, esto puede haber inactivado la colagenasa, que es una metaloproteínasa (endopeptidasa de zinc). El complejo de calcio de la amilasa parece no verse afectado por la quelación con EDTA, y las composiciones antimicrobianas de la  $\alpha$ -amilasa serían un tratamiento no proteolítico eficaz del tejido necrótico infectado con biopelícula microbiana. La baja eficacia de desbridamiento de la  $\alpha$ -amilasa #1 y la  $\alpha$ -amilasa #6 en la piel de rata recién extirpada y sin hervir en la composición antimicrobiana (Tabla 9) también respalda que la composición de desbridamiento amilolítico sea altamente específica para el tejido desvitalizado y no para el tejido vivo circundante.

Tabla 9. Desbridamiento de piel de rata sin hervir por  $\alpha$ -amilasa, bromelina y colagenasa en una composición antimicrobiana *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
AC/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	6,00%
AC/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/250U	0%
AC/Bromelina	90/10	1g/250U	18,20%
AC/colagenasa	99,8/0,2	1g/250U	4,70%

Tabla 10. Desbridamiento de piel de rata hervida por  $\alpha$ -amilasa, bromelina y colagenasa en una composición antimicrobiana *ex vivo*

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)	% digerido
AC/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U	96,50%
AC/ $\alpha$ -amilasa #6	99,66/0,34	1g/250U	100%
AC/bromelina	90/10	1g/250U	100%
AC/colagenasa	99,8/0,2	1g/250U	0%

Excipientes

Además del agua y las soluciones tamponadas (Tabla 2), las amilasas, además de ser utilizadas en forma de polvo, se pueden mezclar con varios excipientes, que incluyen hidrocarburos hidrófobos de vaselina y aceite mineral, alcoholes de glicerina que contienen -OH hidrófilos y PEG 400, y el líquido anfifílico Dimeticona PEG-12, un poliéter de silicona. En cada caso, la  $\alpha$ -amilasa #1 podría dispersarse en el excipiente (Tabla 11). Otros excipientes podrían incluir varios tampones a base de agua con un pH de 5,0 a 7,5, tensioactivos, siliconas, copolímeros de poliéter, éteres de polioxietileno, grasas y aceites vegetales y de plantas, aceites esenciales, alcoholes hidrófilos e hidrófobos, vitaminas, monoglicéridos, ésteres de laurato, ésteres de miristato, ésteres de palmitato y ésteres de estearato, preferiblemente en forma de líquido, gel o pasta, combinaciones de estos y similares. En algunas realizaciones, los excipientes pueden estar presentes en una cantidad que oscila entre el 0 % y el 99,9 % en peso en función del peso de la composición de desbridamiento.

Tabla 11. Excipientes para  $\alpha$ -amilasa #1

formulación	relación de formulación (% en peso)	formulación (Unidades)
vaselina/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U
aceite mineral/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U
glicerina/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U
PEG 400/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U
DC 193/ $\alpha$ -amilasa #1	99,2/0,8	1g/250U

Concentración eficaz de  $\alpha$ -amilasa

Para determinar la cantidad de  $\alpha$ -amilasa necesaria para el desbridamiento del tejido necrótico, se realizó un estudio para medir la eficacia del desbridamiento (p. ej., % en peso digerido) frente a la concentración de  $\alpha$ -amilasa. Los resultados de la Figura 3 muestran la concentración de  $\alpha$ -amilasa #6 frente al porcentaje en peso de piel de cerdo hervida digerida en una hora a temperatura ambiente. La curva en forma de campana muestra que la actividad de

desbridamiento se produce a una concentración máxima de amilasa en el intervalo de 13,6 a 27,2 % en peso, aunque la eficacia es del 10 % en peso o mayor en todo el intervalo de 3,4 % a 54,5 % de  $\alpha$ -amilasa.

5 Si bien la memoria descriptiva anterior contiene muchos aspectos específicos, estos no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención, sino más bien como ejemplos de realizaciones preferidas de esta. Son posibles muchas otras variaciones. Por consiguiente, el alcance de la invención se debe determinar no por las realizaciones ilustradas, sino por las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de desbridamiento que comprende:

- de 0,001 a 60 % en peso de un componente de desbridamiento enzimático no proteolítico en función del peso total de la composición de desbridamiento,

5 en donde dicho componente de desbridamiento enzimático no proteolítico comprende al menos un 80 % en peso de una amilasa en función del peso de dicho componente de desbridamiento enzimático no proteolítico

y dicha amilasa comprende al menos un 80 % en peso de  $\alpha$ -amilasa

y

10 - un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable en una cantidad de hasta el 99,9 % en peso en función del peso total de la composición de desbridamiento,

en donde la proporción de enzimas no proteolíticas a enzimas proteolíticas en la composición de desbridamiento es al menos 10:1.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha amilasa comprende al menos un 80 % en peso de  $\alpha$ -amilasa seleccionada de páncreas humano, páncreas animal y bacterias.

15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha amilasa comprende hasta un 20 % en peso de una amilasa seleccionada entre  $\beta$ -amilasa,  $\gamma$ -amilasa y combinaciones de estas.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho componente de desbridamiento enzimático no proteolítico comprende

20 hasta un 20 % en peso, preferiblemente hasta un 10 % en peso, de enzimas hidrolíticas seleccionadas del grupo que consiste en condroitinasas, hialuronidasas, lipasas, glucosidasas, heparanasas, dermatanasas, pululanases, N-acetylglucosaminidasa, lactasas, fosfolipasas, transglicosilasas, estererasas, tioéster hidrolisasas, sulfatasas, escarasas, nucleasas, fosfatasas, fosfodiesterasas, mananasas, manosidasas, isoamilasas, liasas, inulinasas, queratinasas, tanasas, pentosanasas, glucanasas, arabinosidasas, pectinasas, celulasas, quitinasas, xilanasas, cutinasas, pectato liasas, hemicelulasas, y combinaciones de estas.

25 o

hasta un 20 % en peso de otras enzimas seleccionadas entre oxidasas, peroxidasas, glucosa oxidasas, catalasas, oxidorreductasas, fenoloxidasas, lacasas, lipoxigenasas, isomerasas y ligninasas.

30 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos una biguanida polimérica en una cantidad de al menos el 0,01 % en peso al 1,0 % en peso en función del peso total de la composición de desbridamiento, en donde preferiblemente dicha biguanida polimérica comprende poli(hexametilen biguanida) y sus sales.

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además

35 un polímero soluble en agua a una concentración del 0,01 % en peso al 50 % en peso en función del peso total de la composición de desbridamiento, en donde el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma guar, hidroxietilguar, hidroxipropilguar, hidroxipropilmetilguar, carboximetilguar, carboximetilquitosano, goma de algarroba, carragenano, goma xantana, goma gellan, gel de aloe vera, escleroglucano, esquizofilano, goma arábica, goma de tamarindo, poli(vinil alcohol), poli(óxido de etileno), poli(etilén glicol), poli(metil vinil éter), carbómero y sus sales, ácido poli acrílico y sus sales, ácido poli metacrílico y sus sales, poli(2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato) de sodio, poliacrilamida, poli(N,N-dimetilacrilamida), poli(N-vinilacetamida), poli(N-vinilformamida), poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(gliceril metacrilato), poli(N-vinilpirrolidona), poli(N-isopropilacrilamida) y poli(N-vinilcaprolactama), y combinaciones de estos,

40 o

45 un agente quelante a una concentración del 0,01 % en peso al 1 % en peso en función del peso total de la composición de desbridamiento, en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido nitrilotriacético, ácido nitrilotripropiónico, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido 2-hidroxietilendiaminotriacético, ácido 1,6-diaminohexametilenditetracético, ácido 1,2-diaminociclohexanotetraacético, ácido O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicoltetraacético, ácido 1,3-diaminopropanotetraacético, ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamino-N,N'-diacético, ácido etilendiamino-N,N'-diacético, ácido etilendiamino-N,N'-dipropiónico, ácido trietilentetraaminohexaacético, ácido etilendiamino-N,N'-bis(metilenfosfónico), ácido iminodiacético, ácido monosódico-N-lauril- $\beta$ -iminodipropiónico, lauriminodipropionato de sodio, N,N-bis(2-hidroxietil)glicina, ácido 1,3-diamino-2-hidroxipropanotetraacético, ácido 1,2-

50

diaminopropanotetraacético, ácido etilendiaminotetrakis(metilenfosfónico), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético, bifosfonatos, editronato y sales de estos.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además

5 un monoalquil glicol seleccionado del grupo que consiste en 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,2-butanodiol, 1,2-pentanodiol, 1,2-hexanodiol, 1,2-heptanodiol, 1,2-octanodiol (caprilil glicol), 1,2-nonanodiol, 1,2-decanodiol, 1,2-undecanodiol, 1,2-dodecanodiol, 1,2-tridecanodiol, 1,2-tetradecanodiol, 1,2-pentadecanodiol, 1,2-hexadecanodiol, 1,2-heptadecanodiol, 1,2-octadecanodiol, 2-metil-2,4-pentanodiol, 1,3-butanodiol, dietilenglicol, trietilenglicol, éter de bis(hidroxietil) glicol y combinaciones de estos,

o

10 un éter de alquil glicerol seleccionado del grupo que consiste en 1-O-heptilglicerol, 1-O-octilglicerol, 1-O-nonilglicerol, 1-O-decilglicerol, 1-O-undecilglicerol, 1-O-dodecilglicerol, 1-O-tridecilglicerol, 1-O-tetradecilglicerol, 1-O-pentadecilglicerol, 1-O-hexadecilglicerol (alcohol químico), 1-O-heptadecilglicerol, 1-O-octadecilglicerol (batilol), 1-O-octadec-9-enil glicerol (alcohol selaquilo), éter de 1-(2-etilhexil) glicerol, 2-etilhexil glicerina, éter de 1-heptil glicerol, 15 éter de 1-octil glicerol, éter de 1-decil glicerol y éter de 1-dodecil glicerol, éter de 1-tridecil glicerol, éter de 1-tetradecil glicerol, éter de 1-pentadecil glicerol, éter de 1-hexadecil glicerol, éter de 1-octadecil glicerol y combinaciones de estos.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además

al menos una biguanida polimérica en una cantidad de al menos el 0,01 % en peso,

un agente quelante a una concentración del 0,01 % en peso al 1 % en peso,

20 y un componente de diol vecinal seleccionado del grupo que consiste en un monoalquil glicol y un monoalquil glicerol a una concentración del 0,05 % en peso al 4 % en peso,

donde todos los % en peso son en función del peso total de la composición de desbridamiento.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos un agente analgésico, un agente anestésico, un agente para el dolor neuropático o una combinación de estos.

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición de desbridamiento

25 tiene una forma seleccionada de un grupo que consiste en polvo, solución acuosa, solución líquida orgánica, silicona, gel, crema, película, látex, aerosol, suspensión, pasta, pomada y espuma,

o

se adsorbe sobre o en un apósito o fibra natural o sintética, malla, hidrocoloide, alginato, hidrogel, película semipermeable, película permeable o un polímero natural o sintético.

30 11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para usar en un método de desbridamiento de tejido desvitalizado,

en donde el método comprende preferiblemente

poner en contacto dicha composición de desbridamiento con un área de piel que necesita desbridamiento.

35 12. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el desbridamiento comprende la eliminación de tejido lacerado, desvitalizado, muerto, dañado, infectado o contaminado, cuerpos extraños y otros restos del lecho de la herida con el fin de exponer tejido sano.

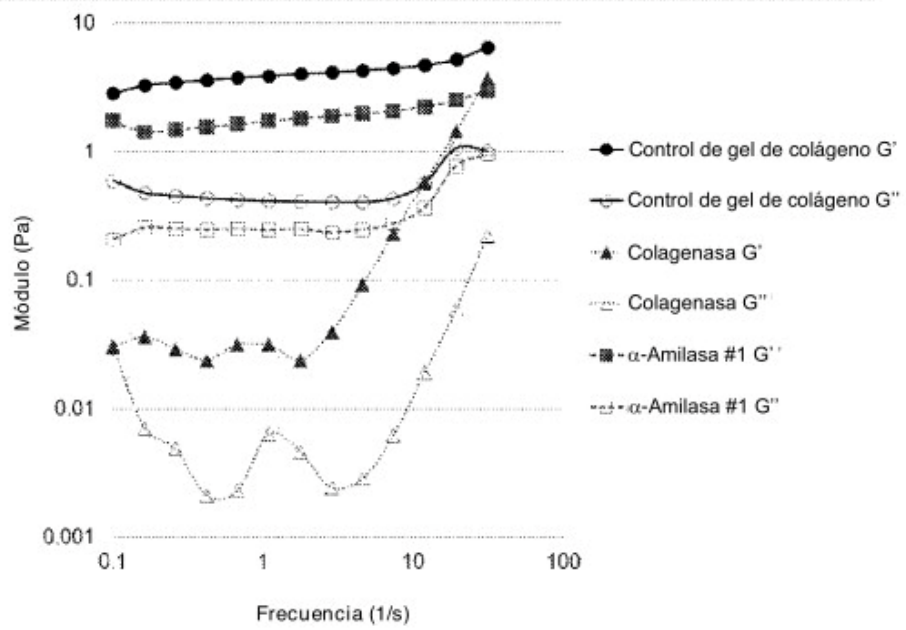


Figura 1

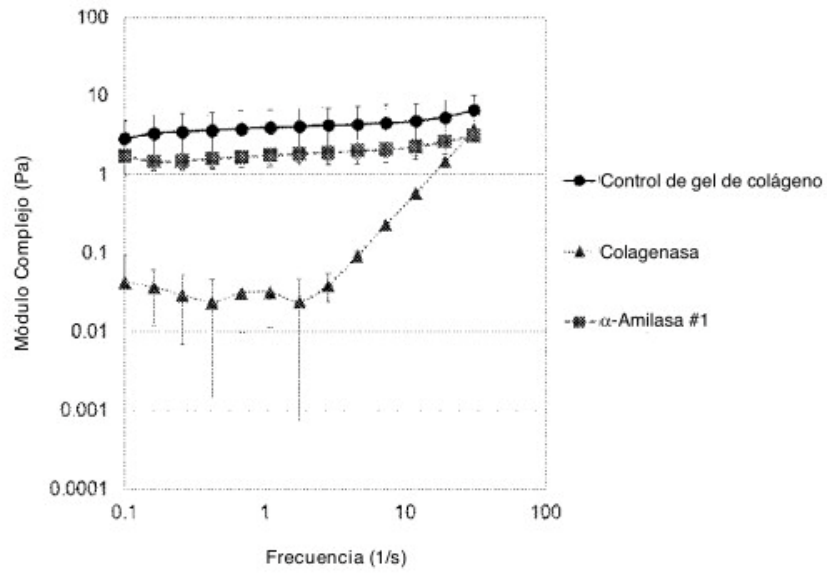


Figura 2

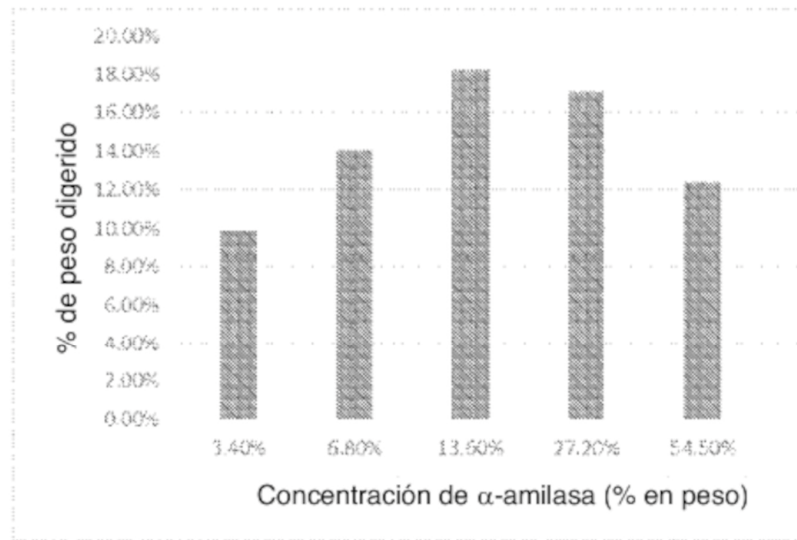


Figura 3