

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 2 月 27 日 (27.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/038293 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 27/36 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/101014

(22) 国际申请日: 2019 年 8 月 16 日 (16.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810949307.4 2018年8月20日 (20.08.2018) CN

(71) 申请人: 杭州启明医疗器械股份有限公司(VENUS MEDTECH (HANGZHOU) INC.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 2 幢 3 楼 311 室, Zhejiang 310052 (CN)。 四川大学(SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 王云兵(WANG, Yunbing); 中国四川省成都市一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 雷洋(LEI, Yang); 中国四川省成都市一环路南一段24号, Sichuan 610065 (CN)。 瞿振军(ZI, Zhenjun); 中国浙江省杭州市滨江区江陵路88号2幢3楼311室, Zhejiang 310052 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: METHOD FOR TREATING BIOLOGICAL VALVE USING COMBINATION OF ENZYMIC CROSS-LINKING AND TEA POLYPHENOL

(54) 发明名称: 一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法

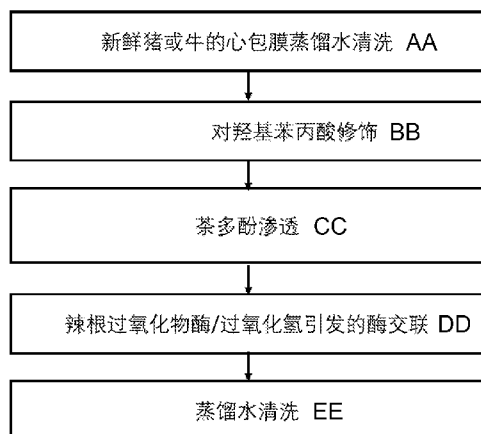


图 1

AA Clean fresh porcine or bovine pericardium with distilled water
BB Perform modification using hydroxyphenylpropionic acid
CC Allow the permeation of tea polyphenol
DD Initiate enzymatic cross-linking by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide
EE Perform cleaning with distilled water

(57) Abstract: Disclosed is a method for treating a biological valve using the combination of enzymatic cross-linking and a tea polyphenol. The method comprises: modifying porcine or bovine pericardium using hydroxyphenylpropionic acid, then soaking a tea polyphenol, and then initiating enzymatic cross-linking under conditions of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. The hydroxyphenylpropionic acid introduces a phenolic hydroxyl group to the pericardium, and exogenous tea polyphenol provides an additional phenolic hydroxyl group. The horseradish peroxidase and hydrogen peroxide implement the chemical crosslinking of the phenolic hydroxyl group. The method provided by the present invention can improve the structural stability and the anticalcification performance of a biomaterial and potentially prolong the service life of the biomaterial.

(57) 摘要: 本发明公开了一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法, 所述方法包括用羟基苯丙酸修饰猪或牛的心包膜, 然后浸泡茶多酚, 然后在辣根过氧化物酶和过氧化氢的条件下引发酶交联; 羟基苯丙酸将在心包膜上引入酚羟基, 外源茶多酚提供额外的酚羟基; 辣根过氧化物酶和过氧化氢将实现酚羟基的化学交联; 本发明提供的方法能够提升生物材料的结构稳定性及抗钙化性能, 潜在地延长其使用寿命。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法

技术领域

本发明涉及一种生物医学材料以及医疗器械技术领域，特别是一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法及其生物材料。

背景技术

心脏瓣膜疾病是一种常见的瓣膜衰退疾病。在解剖学上表现为血液通路变窄或瓣膜关闭不全。

心脏瓣膜疾病的治疗包括开胸瓣膜置换手术以及经皮心脏瓣膜置换手术。开胸手术对病人创伤大、风险高、恢复慢、需体外循环支持，很多患者无法接受。经皮心脏瓣膜置换手术因为对病人创伤小、风险低，成为未来瓣膜手术的主要趋势。

生物心脏瓣膜是指一类用于替换人体病变心脏瓣膜的生物医学材料。生物心脏瓣膜一般由猪心包膜、牛心包膜等通过戊二醛交联制备而成。

戊二醛交联处理具有操作简单，成本低以及胶原蛋白交联程度高的特点，是目前生物心脏瓣膜化学交联的行业首选。然而，戊二醛交联的生物心脏瓣膜存在容易降解以及钙化的问题，导致生物心脏瓣膜只有 10 年左右的有效使用年限。戊二醛可以实现胶原蛋白的稳定交联，但是不能交联弹性蛋白，导致其有一定技术局限性。

因此，通过优化生物心脏瓣膜的化学交联方法，特别是开发能够提高弹性蛋白结构稳定性的新型材料处理方法，将提升生物心脏瓣膜的整体结构稳定性以及抗钙化性能，对于科学研究以及相关产业领域的发展具有重大意义，而目前并没有很好的方法，因此需要改进。

发明内容

本发明的目的是为了解决上述现有技术的不足而提供一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，能有效提升生物心脏瓣膜等生物材料的结构稳定性以及抗钙化性能，潜在地延长其使用寿命。

本发明的目的通过以下技术方案予以实现。

一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，具体包括以下步骤：

S1、获取生物材料；

S2、用蒸馏水浸泡清洗；

S3、然后将步骤 S2 清洗后的生物材料进行羟基苯丙酸修饰，使用的羟基苯丙酸摩尔浓度为 1 mM-1 M 的水溶液，使用的碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔浓度为 0.01-1 M；

S4、将步骤 S3 处理后的生物材料浸泡茶多酚，使用的茶多酚质量浓度为 0.1 %-10 %；

S5、将步骤 S4 处理后的生物材料进行辣根过氧化物酶/过氧化氢引发的酶交联，使用的辣根过氧化物酶质量浓度为 0.1 %-10 %，使用的过氧化氢质量浓度为 0.1 %-10 %；

S6、最后用蒸馏水浸泡清洗。

进一步的，在步骤 S1 中：采集新鲜的生物材料，如猪或牛的心包组织，并于 4 摄氏度低温湿润状态下保存。

进一步的，在步骤 S2 中，采用柔和摩擦和流体压力在振荡条件之下用蒸馏水清洗心包组织，去除粘附的非心包和非胶原组织，所述清洗通过

渗压休克实现对心包组织有效脱细胞，且优选地，清洗持续到没有可见的粘附的非心包或非胶原组织，优选地，是于 4 摄氏度 100 RPM 转速振荡条件之下蒸馏水清洗 2 小时。

进一步的，在步骤 S3 中，清洗后的生物材料进行羟基苯丙酸修饰，使用的羟基苯丙酸摩尔浓度为 1 mM-1 M 的水溶液，这个步骤需要确保羟基苯丙酸达到接近饱和的物理渗透，从而尽可能多地引入羟基苯丙酸。

进一步的，在步骤 S4 中，处理后的生物材料浸泡茶多酚，使用的茶多酚质量浓度为 0.1 %-10 %，茶多酚通过氢键作用吸附于弹性蛋白纤维的疏水段，从而提高弹性蛋白的结构稳定性能。

进一步的，在步骤 S5 中，处理后的生物材料进行辣根过氧化物酶/过氧化氢引发的酶交联，使用的辣根过氧化物酶质量浓度为 0.1 %-10 %，使用的过氧化氢质量浓度为 0.1 %-10 %，过氧化氢是一种氧化剂，辣根过氧化物酶在氧化剂的作用下，能够催化酚羟基实现化学交联。

进一步的，在步骤 S6 中，进行蒸馏水清洗，这个清洗步骤将清除没有反应的茶多酚、辣根过氧化物酶以及过氧化氢。

本发明的有益效果是：本发明提供的方法能够提升生物材料的结构稳定性及抗钙化性能，潜在地延长其使用寿命。

附图说明

为了进一步澄清一个或多个本发明的上述以及其他的优点和特性，通过参照附图中示出的特定实施方案，呈现一个或多个本发明更具体的描述。

图 1 是制备的生物心脏瓣膜的具体流程图。

图 2 是对羟基苯丙酸修饰心包膜和辣根过氧化物酶 / 过氧化氢酶交联化学原理示意图。

图 3 是采用实施例 1 所得到的酶降解重量损失百分比。FP: 新鲜猪心包膜。GLUT: 戊二醛处理组。EDC: 碳二亚胺处理组。HPA/EDC/EGCG: 对羟基苯丙酸、碳二亚胺、没食子儿茶素没食子酸酯的酶交联处理组。

图 4 是采用实施例 1 所得到的弹性蛋白定量检测结果。GLUT: 戊二醛处理组。EDC: 碳二亚胺处理组。HPA/EDC/EGCG: 对羟基苯丙酸、碳二亚胺、没食子儿茶素没食子酸酯的酶交联处理组。

图 5 是采用实施例 1 所得到的大鼠皮下植入挂钙量检测结果。GLUT: 戊二醛处理组。EDC: 碳二亚胺处理组。HPA/EDC/EGCG: 对羟基苯丙酸、碳二亚胺、没食子儿茶素没食子酸酯的酶交联处理组。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合具体实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

实施例 1

在本实施例中，新鲜采集的猪心包于 4 摄氏度 100 RPM 转速振荡条件之下蒸馏水清洗 2 小时。然后浸泡在 50 mM 羟基苯丙酸水溶液在室温当中 4 小时。然后采用 10 mM 碳二亚胺和 10 mM N-羟基琥珀酰亚胺在室温浸泡 24 小时。然后采用 1 % 表没食子儿茶素没食子酸酯浸泡 24 小时。然后采用 1 % 辣根过氧化物酶和 1 % 过氧化氢于 37 摄氏度 150 RPM 转速振荡条

件之下浸泡 24 小时。

实施例 2

在本实施例中，新鲜采集的猪心包于 4 摄氏度 100 RPM 转速振荡条件之下蒸馏水清洗 2 小时。然后浸泡在 100 mM 羟基苯丙酸水溶液在室温当中 4 小时。然后采用 10 mM 碳二亚胺和 10 mM N-羟基琥珀酰亚胺在室温浸泡 24 小时。然后采用 1 % 表没食子儿茶素没食子酸酯浸泡 24 小时。然后采用 1 % 辣根过氧化物酶和 1 % 过氧化氢于 37 摄氏度 150 RPM 转速振荡条件之下浸泡 24 小时。

实施例 3

在本实施中，新鲜采集的猪心包于 4 摄氏度 100RPM 转速振荡条件之下蒸馏水清洗 2 小时。然后浸泡在 100 mM 羟基苯丙酸水溶液在室温当中 4 小时。然后采用 10 mM 碳二亚胺和 10 mM N-羟基琥珀酰亚胺在室温浸泡 24 小时。然后采用 1 % 表没食子儿茶素没食子酸酯浸泡 24 小时。然后采用 5 % 辣根过氧化物酶和 5 % 过氧化氢于 37 摄氏度 150 RPM 转速振荡条件之下浸泡 24 小时。

处理过程当中，设置了三个对照组：（1）新鲜心包膜（FP）组。（2）戊二醛（GLUT）处理组。（3）碳二亚胺（EDC）处理组。戊二醛（GLUT）处理组即将心包膜浸泡于 0.625% 的戊二醛当中 24 小时。碳二亚胺（EDC）处理组即将心包膜浸泡于 10 mM 碳二亚胺和 10 mM N-羟基琥珀酰亚胺当中 24 小时。

如图 3 所示，评估时检测的实验组（HPA/EDC/EGCG）组胶原蛋白酶、弹性蛋白酶降解的重量损失百分比较小，如图 4 所示，弹性蛋白含量提

高，如图 5 所示，大鼠皮下植入 30 天的挂钙量减少。

本发明的有益效果是：本发明提供的方法能够提升生物材料的弹性蛋白的稳定性及抗钙化性能，潜在地延长其使用寿命。

当然，以上只是本发明的典型实例，除此之外，本发明还可以有其它多种具体实施方式，凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案，均落在本发明要求保护的范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

S1、获取生物材料；

S2、用蒸馏水浸泡清洗；

S3、然后将步骤 S2 清洗后的生物材料进行羟基苯丙酸修饰，使用的羟基苯丙酸摩尔浓度为 1 mM-1 M 的水溶液，使用的碳二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔浓度为 0.01-1 M；

S4、将步骤 S3 处理后的生物材料浸泡茶多酚，使用的茶多酚质量浓度为 0.1%-10%；

S5、将步骤 S4 处理后的生物材料进行辣根过氧化物酶/过氧化氢引发的酶交联，使用的辣根过氧化物酶质量浓度为 0.1 %-10 %，使用的过氧化氢质量浓度为 0.1 %-10 %；

S6、最后用蒸馏水浸泡清洗。

2、根据权利要求 1 所述的一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，其特征在于：所述茶多酚包括单宁酸、儿茶素、没食子儿茶素、儿茶素没食子酸酯和没食子儿茶素没食子酸酯的一种或多种。

3、根据权利要求 1 所述的一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，其特征在于：所述生物材料为动物组织包括心包膜、瓣膜、肠膜、脑膜、肺膜、血管、皮肤或韧带的一种或多种。

4、根据权利要求 1 所述的一种采用酶交联和茶多酚组合联用处理生物瓣膜的方法，其特征在于：所述生物材料不限于经皮介入生物心脏瓣膜，也适用于开胸瓣膜置换手术所用的生物材料。

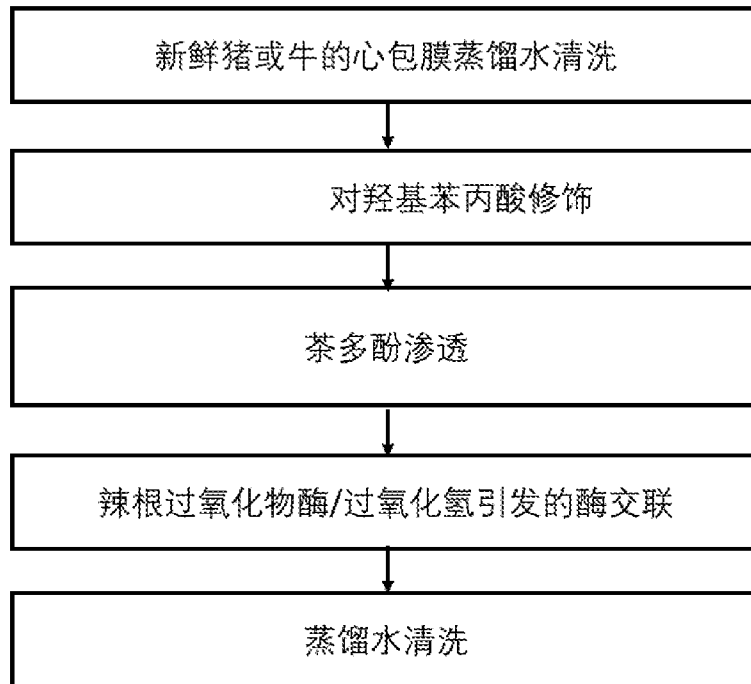


图 1

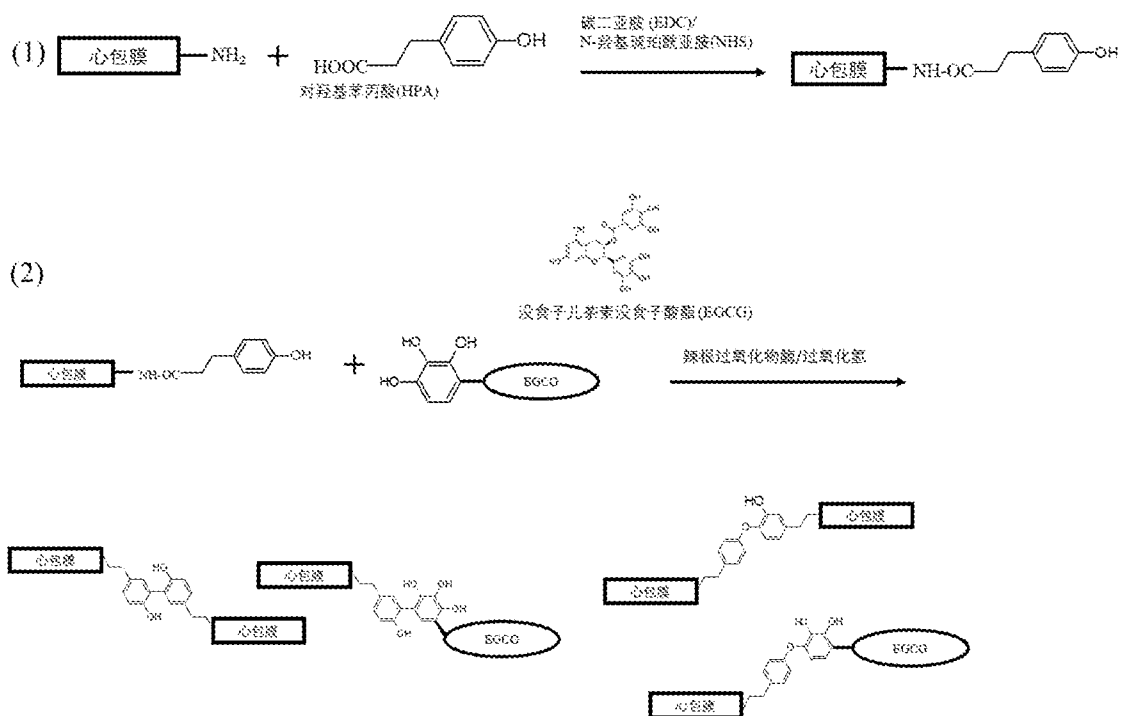


图 2

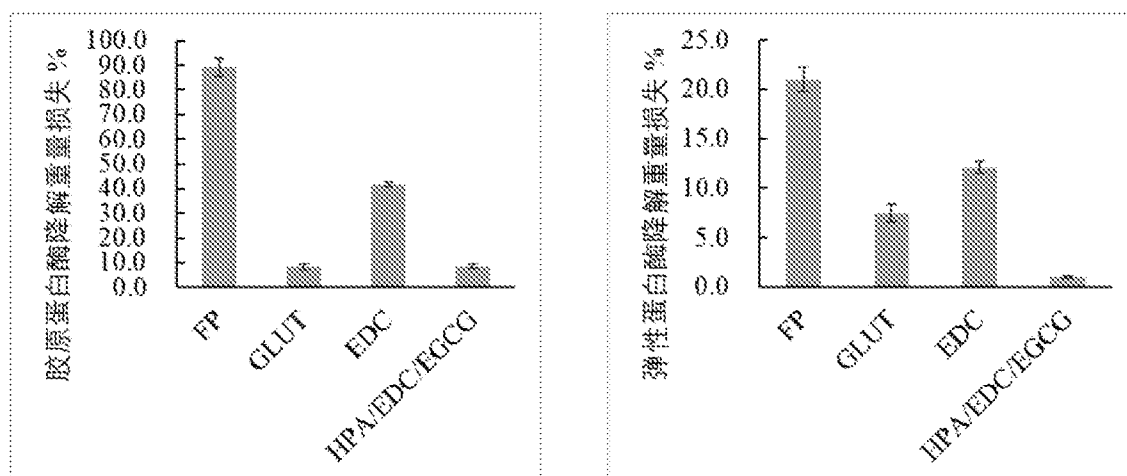


图 3

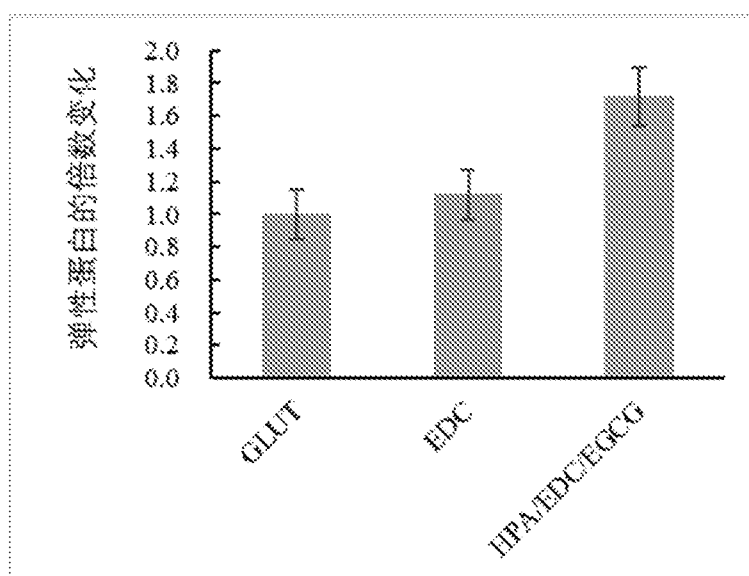


图 4

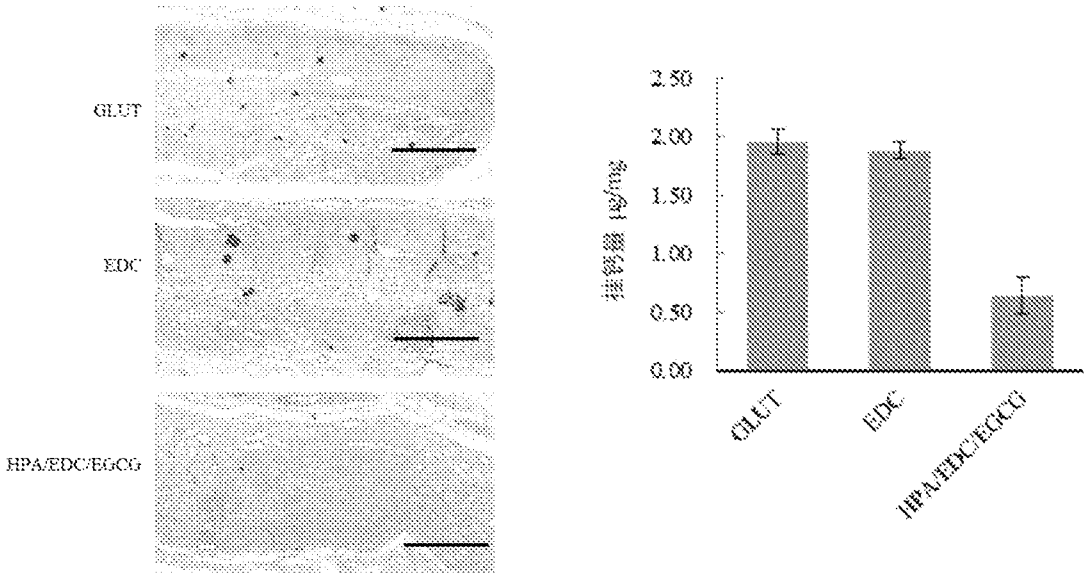


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/36(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L, A61F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, DWPI, EPODOC: 酶, 茶多酚, 茶单宁, 茶鞣, 单宁酸, 儿茶素, 没食子儿茶素, 没食子酸酯, 生物瓣膜, 瓣膜, 羟基苯丙酸, 辣根过氧化物酶, 过氧化氢, enzyme, tea polyphenol, TP, biovalve, valve, hydroxyphenylpropionic acid, tannin, horseradish peroxidase, HRP, hydrogen peroxide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	YANG, Lei et al. "EGCG and Enzymatic Cross-Linking Combined Treatments for Improving Elastin Stability and Reducing Calcification in Bioprosthetic Heart Valves." <i>Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials</i> , Vol. 107, No. (5), 29 September 2018 (2018-09-29), pages 1551-1552	1-4
A	CN 101224313 A (SHANGHAI INSTITUTE OF CERAMICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 23 July 2008 (2008-07-23) entire document	1-4
A	CN 1775304 A (SHANGHAI INSTITUTE OF CERAMICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 24 May 2006 (2006-05-24) entire document	1-4
A	CN 105326581 A (THE INSTITUTE OF METAL RESEARCH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 17 February 2016 (2016-02-17) entire document	1-4
A	CN 101690829 A (SHANGHAI INSTITUTE OF CERAMICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 07 April 2010 (2010-04-07) entire document	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 October 2019

Date of mailing of the international search report

23 October 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101014

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016303289 A1 (BIOTRONIK AG) 20 October 2016 (2016-10-20) entire document	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/101014

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101224313	A	23 July 2008	CN	101224313	B	15 February 2012
CN	1775304	A	24 May 2006	CN	100360190	C	09 January 2008
CN	105326581	A	17 February 2016	CN	105326581	B	26 December 2017
CN	101690829	A	07 April 2010	CN	101690829	B	18 September 2013
US	2016303289	A1	20 October 2016	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/101014

A. 主题的分类

A61L 27/36(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61L, A61F

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, DWPI, EPODOC: 酶, 茶多酚, 茶单宁, 茶鞣, 单宁酸, 儿茶素, 没食子儿茶素, 没食子酸酯, 生物瓣膜, 瓣膜, 羟基苯丙酸, 辣根过氧化物酶, 过氧化氢, enzyme, tea polyphenol, TP, biovalve, valve, hydroxyphenylpropionic acid, tannin, horseradish peroxidase, HRP, hydrogen peroxide

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	Yang lei 等. "EGCG and enzymatic cross-linking combined treatments for improving elastin stability and reducing calcification in bioprosthetic heart valves." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials., 第107卷, 第5期, 2018年 9月 29日 (2018 - 09 - 29), pages 1551-1552	1-4
A	CN 101224313 A (中国科学院上海硅酸盐研究所) 2008年 7月 23日 (2008 - 07 - 23) 全文	1-4
A	CN 1775304 A (中国科学院上海硅酸盐研究所) 2006年 5月 24日 (2006 - 05 - 24) 全文	1-4
A	CN 105326581 A (中国科学院金属研究所) 2016年 2月 17日 (2016 - 02 - 17) 全文	1-4
A	CN 101690829 A (中国科学院上海硅酸盐研究所) 2010年 4月 7日 (2010 - 04 - 07) 全文	1-4
A	US 2016303289 A1 (BIOTRONIK AG) 2016年 10月 20日 (2016 - 10 - 20) 全文	1-4

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 10月 8日

国际检索报告邮寄日期

2019年 10月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

赵洁

传真号 (86-10)62019451

电话号码 62084695

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/101014

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101224313	A	2008年 7月 23日	CN	101224313	B	2012年 2月 15日
CN	1775304	A	2006年 5月 24日	CN	100360190	C	2008年 1月 9日
CN	105326581	A	2016年 2月 17日	CN	105326581	B	2017年 12月 26日
CN	101690829	A	2010年 4月 7日	CN	101690829	B	2013年 9月 18日
US	2016303289	A1	2016年 10月 20日	无			