(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 10 月 1 日 (01.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/191906 A1

(51) 国际专利分类号:
A61L 15/40 (2006.01) *A61L 15/32* (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/087551

(22) 国际申请日: 2019 年 5 月 20 日 (20.05.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910239309.9 2019年3月27日 (27.03.2019) CN

(71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。

(72) 发明人: 陈军 (CHEN, Jun); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。 陈经纬 (CHEN, Jingwei); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。 王德祥 (WANG, Dexiang); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。 丁少雄 (DING, Shaoxiong); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。 赵晶 (ZHAO, Jing); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。 欧徽龙 (OU, Huilong); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。 夏光远 (XIA, Guangyuan); 中国福建省厦门市思明区思明南路422号, Fujian 361000 (CN)。

(74) 代理人: 厦门市首创君合专利事务所有限公司 (SHOUCHUANG JUNHE PATENT AGENT CO., LTD.XIAMEN); 中国福建省厦门市思

(54) **Title:** SPONGY HEMOSTATIC OR TISSUE-SEALING MATERIAL AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) **发明名称**: 一种海绵质止血或组织密封材料及其制备方法

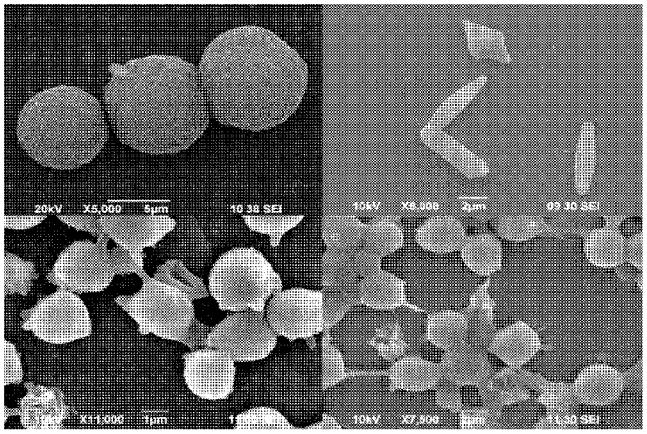


图 1

(57) **Abstract:** A spongy hemostatic material and a preparation method therefor. A major component or a partial component of the spongy hemostatic material is a sponge grown in sea water or fresh water. The spongy hemostatic material can simultaneously cover the advantages of various types of hemostatic drugs, and can be used in special situations such as a lack of platelets and hemophilia lacking coagulation factors to help patients carry out wound hemostasis so as to reduce the costs of drugs. The hemostatic material has good water absorptivity and biocompatibility, performs well in the adsorption of red blood cells and the activation of platelet aggregation, and may also effectively act on special blood suffering from coagulation factor disorders.

(57) **摘要**: 一种海绵质止血材料及其制备方法。海绵质止血材料的主要成份或部分成分为在海水或淡水中生长的海绵。该海绵质止血材料能同时涵盖多种类止血药物的优点，且能用于血小板贫乏、缺乏凝血因子的血友病等特殊情况，帮助患者其进行创口止血，以减少其药物成本。该止血材料本身具有良好的吸水性和生物相容性，不仅在红细胞吸附和聚集血小板活化上表现优异，同时能有效作用于凝血因子障碍的特殊血液。

WO 2020/191906 A1

[见续页]

明区软件园二期望海路23号之三606室, Fujian 361012 (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。

(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))。

一种海绵质止血或组织密封材料及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种止血或组织密封材料及制备方法，特别涉及天然海绵质材料。

背景技术

在紧急事故或大型灾害环境中，幸存的受害者往往因后续不可控的大量出血而丧生。据统计 2011～2013 年间，我国每年约有 60 万人死于交通事故，其中 85%人员死亡是由于在创伤初期引起的大量出血，若在 30min 内出血能得到紧急处理和控制，受伤人员的存活率将能提高 40%以上；在战争中，紧急有效的止血处理是减少士兵伤亡的最有效措施之一，止血药物是军需方重视开发的战略领域；在日常生活中，最普遍的意外事件导致小规模创口出血是人们频繁经历而又不可避免的问题之一，或是一场手术的成功与否的关键在于能否控制住病人的出血情况；同时关注血友病这一大类人群，面临凝血障碍的困境，需要大量药物辅予正常生活。可以说人在生与死的角逐中，我们的机体无时无刻都在在经历出血后如何快速修复的挑战。因此开发高效的止血药物一直是医药领域科研工作者关注的重点和需要不断突破的难题。

在创口产生造成出血的情况发生后，机体自身的修复机制是通过血管、血小板、纤溶平衡系统和凝血系统共同作用的。血管壁通过收缩来减缓血液流动速度，血小板黏附到异物表面变形，并释放出凝血因子来激活血液中的凝血活酶，生成的凝血酶作用到血液中溶解态的纤维蛋白原，使之转变为固态的纤维蛋白联结成网状结构吸附红细胞，最终在纤

维蛋白网和血小板的共同作用下在伤口表面形成血栓抑制出血情况。

对于以上不同阶段的凝血过程及机理，研发了各类凝血药物，基本可划分凝集因子类、黏附类和促凝类。凝集因子类如最常见的速效止血粉，主要成分为沸石高岭土等无机物颗粒，原理是通过其范德华力吸收伤口处血浆大量水分来减缓出血速度，浓缩凝血因子，同时放热加速血凝块形成。这类产品是最早的止血药物之一，在伊拉克战争中也曾大放异彩，但其缺陷也是不容忽视的。首先局部高温会灼烧组织创面，不利于之后伤口修复，同时小颗粒无机物容易进入到血液中，造成肺部血栓；市面上目前主流的止血产品为胶原蛋白和壳聚糖多糖这两大块，为黏附类产品。胶原本身具有非常强的吸水性，同时对血小板也有很好的亲和及吸附性，能在伤口处快速浓缩与激活血小板，促进血凝块形成。不过其本身会促进细菌生长，频繁发生污染伤口造成感染事件，并且其黏附性较差易脱落，故胶原开发方向多为手术缝合线产品。壳聚糖本身具有优秀的抗菌性及组织相容性，改性后的壳聚糖能通过氨基的正电来吸附带负电荷的红细胞，从而使红细胞聚集黏附。壳聚糖的不足在于其本身止血效果有限，无法处理广泛出血的创面，不过其仍是非常理想的止血基底材料，是目前多种材料复合止血剂研究的焦点；另外还有一类特殊止血药物，本身无任何内源性止血功能，而是利用外源物质在伤口处快速交联聚合来达到快速黏合伤口和封闭受伤组织目的。主要的产品为α-氰基丙烯酸酯和聚乙二醇等人工合成的高分子材料。虽然能快速封闭伤口，但在后期降解过程中会产生有害物质导致组织发炎坏死，所以运用情况较为特殊。

以上止血材料还有一大共通的缺憾，对于血液凝固障碍的患者，上述的各类药品对于其伤口止血往往无能为力，所以开发补充凝血因子的止血药物是非常有必要的。这类促凝类的药物携带高浓度的纤维蛋白原和凝血酶等促凝因子来完成凝血三阶段，但其成本往往十分昂贵，同时本身需要进行正常的凝血阶段所以需要一定的凝血时间，与上述止血材料相比促进凝血速率的效果不明显，不适用于大面积出血情况。尤其一点是可溶性的促凝止血药物会干扰到纤溶系统的平衡，容易在体内造成血栓，埋下不必要的安全隐患。以上种种限制了这类药物的使用。

发明内容

本发明的目的是提供一种新型的止血材料，能同时涵盖多种类止血药物的优点，且能用于血小板贫乏、缺乏凝血因子的血友病等特殊情况，帮助患者其进行创口止血，以减少其药物成本。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：一种止血材料或组织密封材料，其主要成份或部分成分为在海洋或海水或淡水中生长的海绵。特别是所述的海绵去除肉质组份。

在海洋中最古老的生物之一海绵动物中，其独特的有机物质海绵质，是为一种含三螺旋结构的类胶原复杂大分子物质，且海绵质本身具有复杂的三维网孔骨架结构，可用于锚定血小板固定凝血块。

所提供了一种海绵质止血材料的制备方法，包括如下步骤：

（1）取新鲜的成株海绵，通过物理手段洗去海绵表面肉质组分，留下海绵骨架；

（2）将步骤（1）的海绵骨架浸泡于浓度为 0.7～0.8 mol/L 的 HCL

溶液中 2～3 d，取出以清水洗涤数次；

（3）将步骤（2）的海绵骨架浸泡于浓度为 0.1～0.2 mol/L 的 NaOH 溶液中 2～3 d，取出一清水浸泡 3～4 d；

（4）将步骤（3）的海绵骨架加入 Tris-HCl 缓冲液中，搅拌粉碎为匀浆悬浊液，所述 Tris-HCl 缓冲液的浓度为 0.1M， 37° C 下 PH 为 7.8；接着在悬浊液中加入 10%胰蛋白酶，震荡酶解 2～3 d；

（5）将步骤（4）的产物过滤分离，将分离得到的沉淀以清水浸泡冲洗 2～4 次，烘干得到海绵质沉淀，所述海绵质沉淀为难溶性大型分支纤维 sponging B；

（6）取步骤（5）海绵质沉淀用冷冻破碎仪破碎成小颗粒，过筛得到海绵质粉末 SFM；和/或用过氧化氢法将步骤（5）海绵质沉淀降解成可溶性海绵质 SR。

在本发明一较佳实施例中，所述海绵为网角海绵。

在本发明一较佳实施例中，所述步骤（1）中任成株海绵腐烂分解掉海绵的表皮和肉质组分，或放入海水中大力搓洗，洗去网角海绵表面肉质组分。

在本发明一较佳实施例中，所述步骤（2）中浸泡于浓度为 0.8 mol/L 的 HCL 溶液中 2 d。

在本发明一较佳实施例中，所述步骤（3）中浸泡于浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液。

在本发明一较佳实施例中，所述步骤（6）中过 200 目筛得到海绵质粉末 SFM。

在本发明一较佳实施例中，所述海绵质止血材料包括海绵质粉末 SFM 和可溶性海绵质 SR，具有错落孔隙结构。

本技术方案与背景技术相比，它具有如下优点：

1. 该止血材料具有错落孔隙结构，使得该材料本身有能与医用棉絮比拟的吸水性和透气性。强吸水性能有助于提高伤口附近凝血因子浓度，优良透气性有助于伤口附近组织正常新陈代谢，便于后续修复。

2. 该止血材料同时结合了胶原和壳聚糖的优点，对血红细胞、血小板表现出优秀的富集作用和吸附能力。

3. 该止血材料具有良好的生物相容性，在电镜下观察到血小板与之接触能快速激活分化，血红细胞与之接触后主动进行良性变形，伸出拟足附着。

4. 该止血材料具有相当优异的止血性能，且具有胶原和其它常见的止血药物所不具备的特殊止血能力，能有效作用于由于凝血因子缺陷而导致血液无法凝固的特殊情况。在无纤维蛋白原和血小板参与下仍能保证血液能够正常凝固。

5. 该止血材料源于海洋生物，为纯天然的生物材料。与人类亲缘关系疏远，无传染疾病风险。具有低敏性、安全性和成本低廉等优点。

附图说明

图 1 为血红细胞吸附能力检测中血红细胞形态变化，其中，左上：原始羊血红细胞形态；右上：空白组硅片上血红细胞；左下：SFM 组血红细胞；右下：SR 涂层组血红细胞。

图 2 为血红细胞吸附能力检测中血红细胞对各材料吸附，其中，A 为

空白组；B 为 SR 涂层组；C 为 SFM 原始形态；D 为富集红细胞的 SFM。

图 3 为血小板对各材料聚集性，其中，左上：血小板原始形态；右上：空白组；左下：SR 涂层组；右下：SFM 组。

图 4 为贫血小板血液凝固表征。

图 5 为 SFM 材料微观下贫血小板血液凝固血块结构。

图 6 为脱纤维羊血凝固表征。

图 7 为 SFM 材料微观下脱纤维血液凝固血块结构。

图 8 为 SR 材料微观下脱纤维血液凝固血块结构。

具体实施方式

实施例 1

本实施例一种海绵质止血材料的制备方法，包括如下步骤：

(1) 新鲜的成株网角海绵，通常是任其腐烂分解掉海绵的表皮和肉质组分，或放入海水中大力搓洗，通过物理手段洗去网角海绵表面肉质组分，留下其骨架。将所得海绵骨架裁剪成小块，方便后续实验。

(2) 配置 0.8mol/L 浓度的 HCL，将海绵骨架小块浸泡 2d，目的是除去残余的表面杂质、含钙络合物和部分酸溶性蛋白。

(3) 取不溶物海绵质骨架清水洗涤数次，后用 0.1mol/L 浓度的 NaOH 浸泡，清洗海绵质残留的部分碱溶性蛋白和碱溶性杂质。

(4) 将不溶物海绵质骨架用清水浸泡 3 次，除去残余氢氧化钠溶液，加入 Tris-Hcl 缓冲液 (0.1M, PH7.8, 37° C)，搅拌粉碎为匀浆悬浊液。再加入 10%胰蛋白酶，震荡酶解 2d。

(5) 过滤分离出沉淀和上清。上清中为酶溶性胞间线性纤维

spongin A 和其余酶解杂质，沉淀为难溶性大型分支纤维 sponging B 。在网角海绵中海绵质主要为难溶性的 spongin B ，具有更复杂的三维结构。

（6）取沉淀用清水浸泡冲洗 3 次，烘干。

①用冷冻破碎仪破碎成小颗粒，过 200 目筛得到海绵质粉末 SFM。

②用过氧化氢法将上述海绵质沉淀降解成可溶性海绵质 SR。

一、止血性能检测（体外凝血时间、吸水率）

①体外凝血时间

实验方法：采用玻璃试管法检测凝血时间。

用枸橼酸钠采血管采取新鲜鸡血，取 1 mL 血浆于玻璃管，在 41 ℃水浴锅下预温，后加入 2.8 mg/mL 的氯化钙溶液和各实验组材料，记录血液完全凝固时间，每组重复 3 次取均值。实验组材料分别为可溶性海绵质 SR、不溶性海绵质粉末 SFM，对照组为空白、云南白药（购于市面）、胶原蛋白。其实验结果如下表所示：

表 1 各实验材料凝血时间

组别	0.5mg/mL	1mg/mL	2mg/mL
空白		3m42s	
云南白药	2m31s	2m53s	5m50s
胶原	3m37s	2m50s	4m22s
SFM	2m24s	1m58s	1m36s
SR	3m41s	3m14s	4m28s

表 1 可以看出，以上止血材料胶原的主要止血机理是通过吸水性增大局部凝血因子浓度及吸附血小板，因此在体外凝血实验中效果并不明显。云南白药的三七成分是起到促进止血的作用，但同 SR、胶原这类溶解于血液中的材料相同，随着浓度的提升反而会起到相反效果，猜测是由于高浓度的外源物质打破了血液内在的平衡体系，干扰到凝血因子和凝血酶的作用及活力。而海绵质粉末 SFM 不溶于血液，随着使用量的增大其凝血时间逐渐缩短，与空白组相对照具有显著效果。

②吸水率

实验方法：采用多孔止血材料常用的模拟体液（SBF）吸水率测试方法。配置 SBF 溶液，倒入干燥培养皿中。将样品在 60 ℃烘箱内烘至恒重，称取约 0.5 g 样品记录初始重量 W0，加入到培养皿浸没 30 min，取出称最终重量 Wt 。每组样品重复三次，取平均值。考虑到可溶海绵质 SR 材料溶于水，故实验组仅采用 SFM 原料，以棉絮为对照组。按照以下公式计算吸水率：

饱和吸水率=（Wt-W0）/ W0 × 100%

其实验结果如下表所示：

表 2 止血材料吸水率

组别	医用棉花	颗粒状海绵质	絮状海绵质
饱和吸水率(%)	1768.6±82.7	994.3±84.4	4050.3±242.6

表 2 为海绵质材料吸水率特性。完整海绵质骨架本身具有丰富微孔结构，其吸水性能优于市场上常见的各种材料。将海绵质骨架研磨至粉

末过筛后，未能过筛的大颗粒海绵质相互糅合成絮状结构，与同为絮状的医用棉花相比吸水性能是其 2.5 倍。但研磨成小颗粒的海绵质一些宏观的微孔结构被破坏，使得其吸水能力下降，但仍能达到医用棉花一半的吸水性能。故海绵质粉末自身的孔隙结构利于水分子的渗透，作为止血药物粉末能出色完成伤口处水分吸收，有利于提升局部凝血因子浓度，加速伤口处血液凝固。

二、血红细胞吸附能力、血小板聚集性检测

①血红细胞吸附能力

实验材料：新鲜羊血，海绵质粉末 SFM，可溶海绵质 SR

实验方法：

1、 血红细胞获取：取新鲜羊血，离心 1000 r/15 min，取沉淀用 PBS 冲洗，重复三次。从羊血中获得纯净的血红细胞 PBS 溶液。

2、 材料涂片的制备：

①将可溶海绵质 SR 调配成溶液，滴在硅片上，烘干使其在表面形成薄膜

②将海绵质粉末 SFM 均匀撒在鸡蛋清液浸润过的硅片上，烘干使其固定。

③空白硅片用酒精清洗，烘干。

3、 将实验组的硅片浸润在血红细胞 PBS 溶液中，于 37°C 环境下静置 30min

4、 取上述硅片用 PBS 轻轻冲洗 3 次，放入 2.5%戊二醛固定过夜。

5、 依次放入 50%、60%、70%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水，每次 15min。

6、 喷金，扫描电镜观察红细胞吸附情况。

实验结果：

图 1，在 30min 的血红细胞和空白硅片的接触后，血红细胞由圆球形态转为不规则粒状形变，为不良环境下红细胞的应激表现。相较于空白组，SR 组和 SFM 组中血红细胞基本都保持健康完整的血红细胞形态，同时观察到血红细胞在接触到外源物质时开始作出止血反馈，良性形变伸出伪足主动吸附在外源 SR 涂层、SFM 粉末表面，，能增强吸附能力有助于伤口表面血凝块的稳固。分析可知海绵质材料 SR 和 SFM 对血红细胞有良好的生物相容性。

图 2，对比空白组硅板中零散不规则的应激形态血红细胞，具有 SR 涂层的硅板表面富集了大量血红细胞，由于良性诱导伪足产生，在 PBS 反复冲洗后大量红细胞仍牢牢吸附硅板表面。C、D 为 SFM 接触血红细胞前后变化图，观察发现大面积血红细胞吸附在 SFM 表面，同时通过细胞间大分子桥联力作用使得游离的血红细胞聚积在已锚定血红细胞周围，而 SFM 复杂分叉的三维结构也给血红细胞聚积团提供多角度稳定的支撑力，最终促使形成完整的血凝块。

分析可知海绵质材料对血红细胞有良好生物相容性，材料本身不仅能对血红细胞有吸附作用，诱导红细胞分化出伪足吸附，同时不溶性的 SFM 材料本身复杂的分叉结构能给血红细胞聚集体提供牢靠的支撑力，推测其在实际应用中能在创口处取代纤维蛋白的作用，跳过凝血酶、纤

维蛋白原生成纤维蛋白等步骤，直接快速吸附血红细胞凝聚成块，具有优秀的止血价值。

②血小板聚集性

实验材料：富血小板血浆，海绵质粉末 SFM，可溶海绵质 SR

实验方法：

1、 血小板 PBS 溶液制备：取富血小板血浆，离心 3500r/15min，取沉淀用 PBS 冲洗，重复三次，获得血小板 PBS 溶液。

2、 材料涂片的制备：

①将可溶海绵质 SR 调配成溶液，滴在硅片上，烘干使其在表面形成薄膜

②将海绵质粉末 SFM 均匀撒在鸡蛋清液浸润过的硅片上，烘干使其固定。

③空白硅片用酒精清洗，烘干。

3、 将实验组的硅片浸没在血小板 PBS 溶液中，于 37°C 环境下静置 30min

4、 取上述硅片用 PBS 轻轻冲洗 3 次，放入 2.5%戊二醛固定过夜。

5、 依次放入 50%、60%、70%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水，每次 15min。

6、 喷金，扫描电镜观察血小板聚集情况。

实验结果：

血小板是止血的第一前哨。在识别到组织创伤或血管破裂后，血小板会依次在损伤处暴露的胶原纤维上进行黏附、变形活化、释放凝血因

子、大量聚集形成松软血小板血栓、再收缩成紧实血栓。后续凝血酶作用下形成胶原纤维单体也会围绕血小板血栓进一步形成大血栓拦截游离的红细胞，堵截伤口血液进一步外流。

在图 3 中，对比空白组硅板上分散稀释的未分化变形的血小板，具有 SR 涂层的硅板上有黏附了大量血小板，同时已活化变形，释放出凝血因子使得血小板开始聚集反应，在硅板平面上拉伸成树枝状结构，形成初步的网格脉络。而 SFM 组中我们可以观察到，血小板不止大量黏附在海绵质材料表面，同时高度分化变形，聚集形成血小板血栓，且已进行收缩因子的释放，最终在 SFM 表面形成紧实的血栓层。在实际应用中，SFM 组能在不依赖纤维蛋白单体的形成来提供结构力的前提下，能节约大量止血过程所耗费的时间，快速提供结合血小板形成高度分化血栓，能加速止血速率，避免血液大量流失及创口过大血栓不易形成等问题。

三、特殊的止血性能

海绵质材料最为特殊的止血性能表现在对于有凝血因子缺陷的血液与之接触作用后能表现正常凝血功能。我们实验中试验了贫血小板血液和脱纤维蛋白原血液进行检测。

实验原料如下：

无菌脱纤维羊血：采购于南京茂捷微生物有限公司

贫血小板血：取新鲜血浆于离心机离心 1000rpm/10min，分离红细胞和血浆。将红细胞用 PBS 溶液反复离心清洗 3 次，血浆再离心 3500rpm/15min，取上层贫血小板血浆，重复 3 次，将红细胞与贫血小板血浆按原比例混合得到贫血小板血。

实验组:小颗粒海绵质粉末 SFM、可溶性降解海绵质 SR、大颗粒絮状海绵质 SX、完整海绵质骨架 SP

对照组：空白、胶原蛋白、云南白药

实验方法：采用玻璃试管法表达全血凝固时间，宏观上采用纯水裂解游离红细胞法观测血液凝固程度，微观上采用扫描电镜观测形成血栓的结构。

实验结果：

缺乏血小板参与凝血的血液在正常条件下是难以凝固的。血小板活化后释放的凝血因子激活凝血酶原转化为凝血酶，使得血液中纤维蛋白原围绕血小板血栓形成纤维蛋白单体，最终完成血块生成与凝固。

表 3 贫血小板血液对各材料凝血时间(单位：min)

组别	10mg/mL	50mg/mL	100mg/mL
空白		未凝固	
胶原		未凝固	
云南白药		未凝固	
SFM	25.49±1.11	16.97±1.08	13.73±0.46
SX	40.74±2.91	33.52±0.51	32.37±0.62
SP		未凝固	
SR		未完全凝固	

结合表 3、图 4，可以看出对照组各材料最终无法促使存在血小板缺陷的血液完成凝固。而海绵质材料对于贫血小板血液有显著的止血效果，同时其止血效果与海绵质本身的形态结构有关。

对比 SFM 和 SX、SP 的结构，其主要差别是海绵质粒径大小和材料间隙距离。推测是完整的海绵质骨架为肉眼可见的网孔结构，骨架间距大无法使得血红细胞牢靠附着和吸附，而通过研磨，海绵质材料的粒径越小，海绵质材料的比表面积越大，海绵质间距缩短，其拦截吸附血红细胞的效率越高，血液的凝固速率愈快。

对比图 5、图 6 可以看出，贫血小板血液形成的血栓表面相对光滑，缺少了血小板形成血栓支撑物。而 SR 材料是溶解于血液，本身亦无提供支撑力的稳定结构，所以在实验中观测到 SR 组中血液未能完全凝固，但在重力沉降和缺少支撑力的相互作用下，血液在底部形成局部血块。

表 4 脱纤维羊血对各材料凝血时间(单位：min)

组别	10mg/mL	20mg/mL	40mg/mL	60mg/mL
空白	未凝固			
胶原	未凝固			
云南白药	未凝固			
SFM	未完全凝固	8.29±0.37	3.18±0.21	2.1±0.14
SX	未凝固			
SP	未凝固			
SR	4.92±0.21	3.71±0.12	4.49±0.43	9.23±0.48

表 4、图 6、图 7 为脱纤维血液的凝固实验结果。我们所知血栓形成的过程中各凝血机制最终目的是将血液中的纤维蛋白原转化为固态的纤维蛋白单体网络，配合血小板血栓去固定游离红细胞和血浆成分。而脱纤维血液实验我们排除了纤维蛋白原这一成分，实验结果表明仅有 SR

材料和 SFM 能使得脱纤维羊血能够正常凝固。结合上述实验，分析认为：

1、 SR 材料溶解在血液中，无法像其他不溶态海绵质颗粒物有稳定的固态结构。对比脱纤维血实验和贫血小板血液，我们发现 SR 组在凝血过程中需要血小板形成血栓提供结构力上的协助，而在无纤维蛋白组分的存在下能使得血液正常凝固，因此我们推测海绵质材料能够良好的替代血液中纤维蛋白原的成分。

2、 对比 SFM、SX、SP 的实验结果，发现不同于其它止血药物过高浓度会干扰血液凝结反应的现象，海绵质在血液中含量越高，材料本身粒度越小，其凝血性能越好。推测是海绵质不仅是单纯的替代纤维蛋白原，并且不溶态的海绵质粉末个体分枝间相互交叉重叠在微观下能观察到形成致密的网状结构，与纤维蛋白单体交联形成的纤维蛋白网相似，本身也具有富集红细胞和聚集血小板特性，从而直接替代纤维蛋白凝块功能，与血液中红细胞和其他凝血物质凝结成血栓，缩减了凝血三阶段生成纤维蛋白单体的过程，大大缩短了凝血所需的时间。

综上实验所述，海绵质作为止血材料，本身具有良好的吸水性和生物相容性，不仅在红细胞吸附和聚集血小板活化上表现优异，同时能有效作用于凝血因子障碍的特殊血液，且其成本低廉产量高，能大大缓解血友病患者等特殊人群用药昂贵难以支付等问题，具有广泛的市场前景。

以上所述，仅为本发明较佳实施例而已，故不能依此限定本发明实施的范围，即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰，皆应仍属本发明涵盖的范围内。

工业实用性

本发明公开了一种海绵质止血材料及其制备方法，其制备的止血材料能同时涵盖多种类止血药物的优点，且能用于血小板贫乏、缺乏凝血因子的血友病等特殊情况，帮助患者其进行创口止血，以减少其药物成本。且该止血材料本身具有良好的吸水性和生物相容性，不仅在红细胞吸附和聚集血小板活化上表现优异，同时能有效作用于凝血因子障碍的特殊血液，且其成本低廉产量高，能大大缓解血友病患者等特殊人群用药昂贵难以支付等问题，具有广泛的市场前景，具有良好的工业实用性。

权 利 要 求

1. 一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

（1）取新鲜的成株海绵，通过物理手段洗去海绵表面肉质组分，留下海绵骨架；

（2）将步骤（1）的海绵骨架浸泡于浓度为0.7～0.8 mol/L 的HCL溶液中2～3 d，取出以清水洗涤数次；

（3）将步骤（2）的海绵骨架浸泡于浓度为0.1～0.2 mol/L 的NaOH溶液中2～3 d，取出一清水浸泡3～4 d；

（4）将步骤（3）的海绵骨架加入Tris-HCl缓冲液中，搅拌粉碎为匀浆悬浊液，所述Tris-HCl缓冲液的浓度为0.1M，37° C 下PH为7.8；接着在悬浊液中加入10%胰蛋白酶，震荡酶解2～3 d；

（5）将步骤（4）的产物过滤分离，将分离得到的沉淀以清水浸泡冲洗2～4次，烘干得到海绵质沉淀，所述海绵质沉淀为难溶性大型分支纤维 sponging B；

（6）取步骤（5）海绵质沉淀用冷冻破碎仪破碎成小颗粒，过筛得到海绵质粉末 SFM；和/或用过氧化氢法将步骤（5）海绵质沉淀降解成可溶性海绵质SR。

2. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于：所述海绵为网角海绵。

3. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于：所述步骤（1）中任成株海绵腐烂分解掉海绵的表皮

和肉质组分，或放入海水中大力搓洗，洗去网角海绵表面肉质组分。

4. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于：所述步骤（2）中浸泡于浓度为 0.8 mol/L 的 HCL 溶液中 2 d。

5. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于：所述步骤（3）中浸泡于浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血或组织密封材料的制备方法，其特征在于：所述步骤（6）中过 200 目筛得到海绵质粉末 SFM。

7. 根据权利要求 1 所述的一种海绵质止血材料的制备方法，其特征在于：所述海绵质止血材料具有错落孔隙结构。

8、一种止血材料或组织密封材料，其特征在于其主要成份或部分成分为在海水或淡水中生长的海绵。

9、根据权利要求 8 的止血材料或组织密封材料，其特征在于所述的海绵去除表面肉质组份。

10、根据权利要求 8 或 9 的止血材料或组织密封材料，其特征在于所述的海绵经沉淀用冷冻破碎，得到海绵质粉末 SFM。

11、根据权利要求 8 或 9 的止血材料或组织密封材料，其特征在于所述的海绵质材料经沉淀降解成可溶性海绵质 SR。

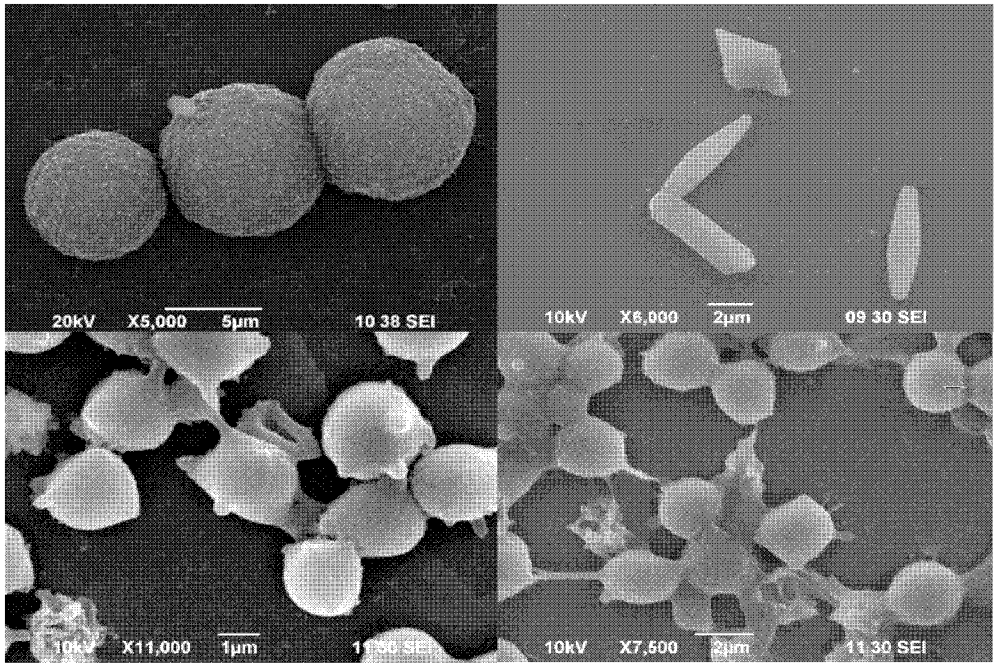

20kV X5,000 5μm 10 38 SEI
10kV X6,000 2μm 09 30 SEI
10kV X11,000 1μm
10kV X7,500 2μm 11 30 SEI

图 1

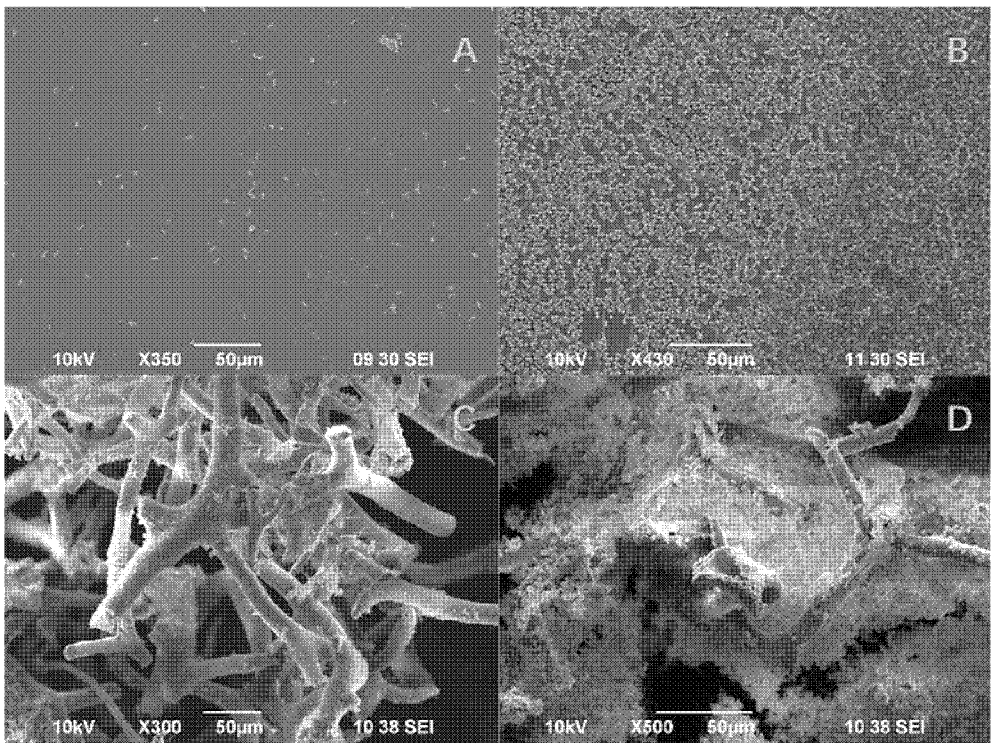

A
B
10kV X350 50μm 09 30 SEI
10kV X430 50μm 11 30 SEI
C
D
10kV X300 50μm 10 38 SEI
10kV X500 50μm 10 38 SEI

图 2

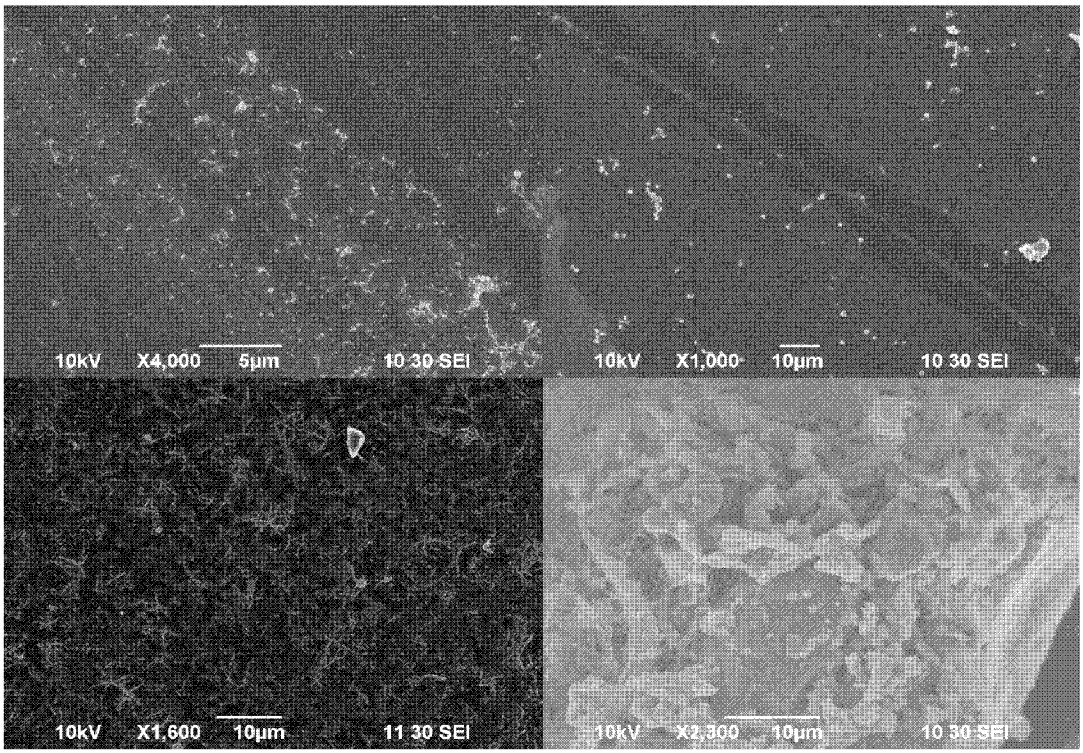

10kV X4,000 5μm 10 30 SEI
10kV X1,000 10μm 10 30 SEI
10kV X1,600 10μm 11 30 SEI
10kV X2,300 10μm 10 30 SEI

图 3

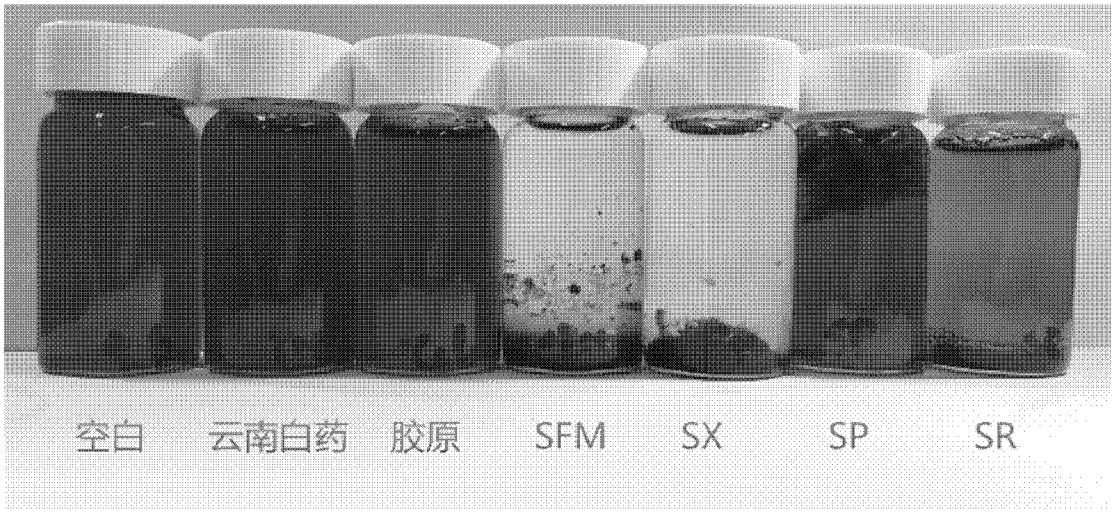

空白
云南白药
胶原
SFM
SX
SP
SR

图 4

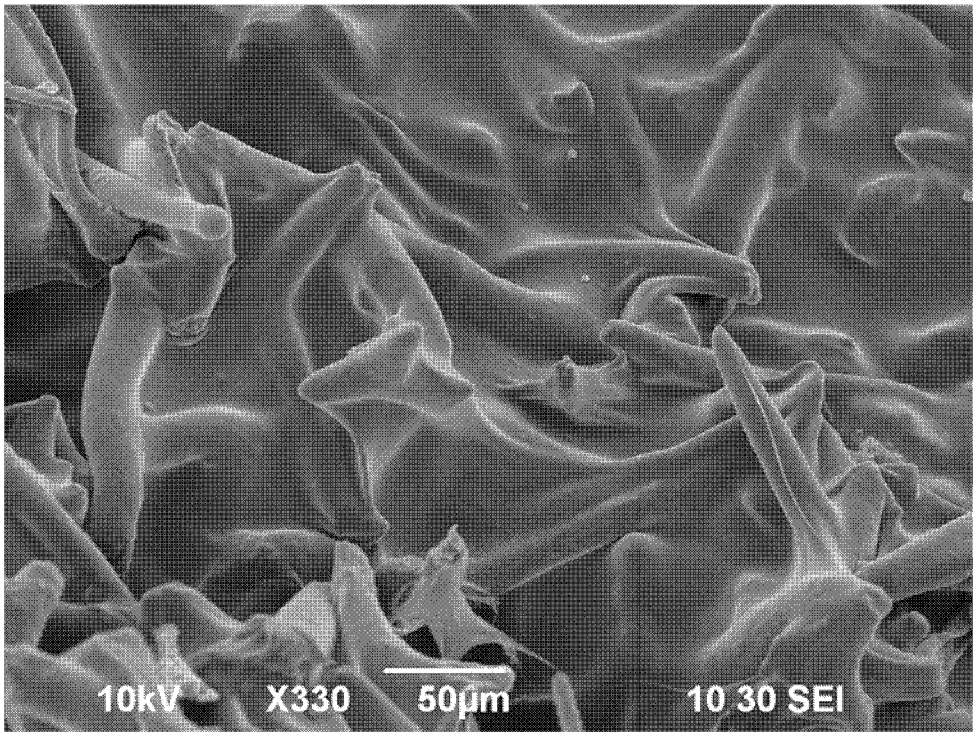


图 5

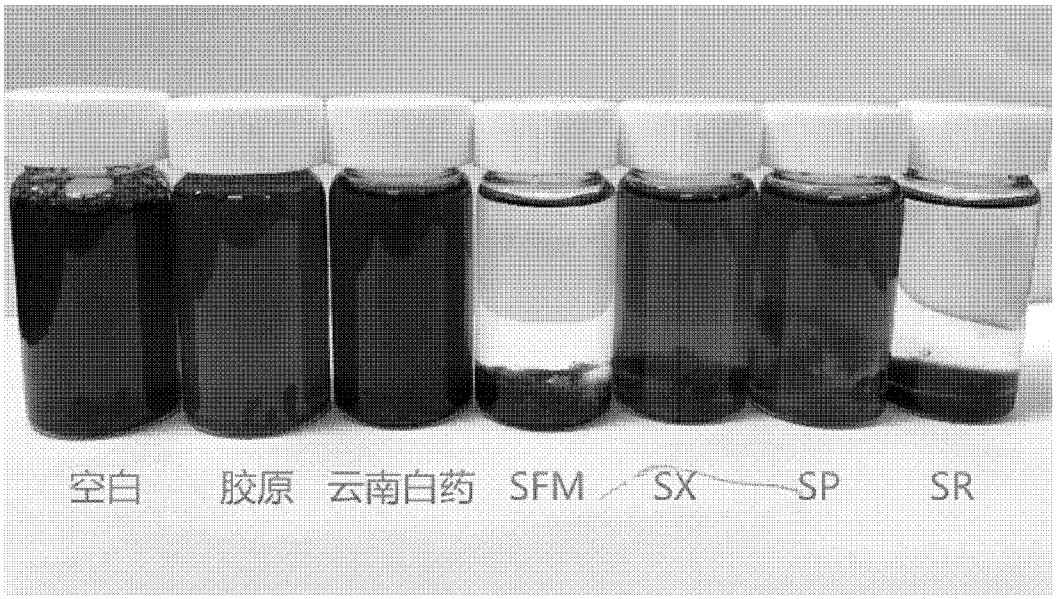


图 6

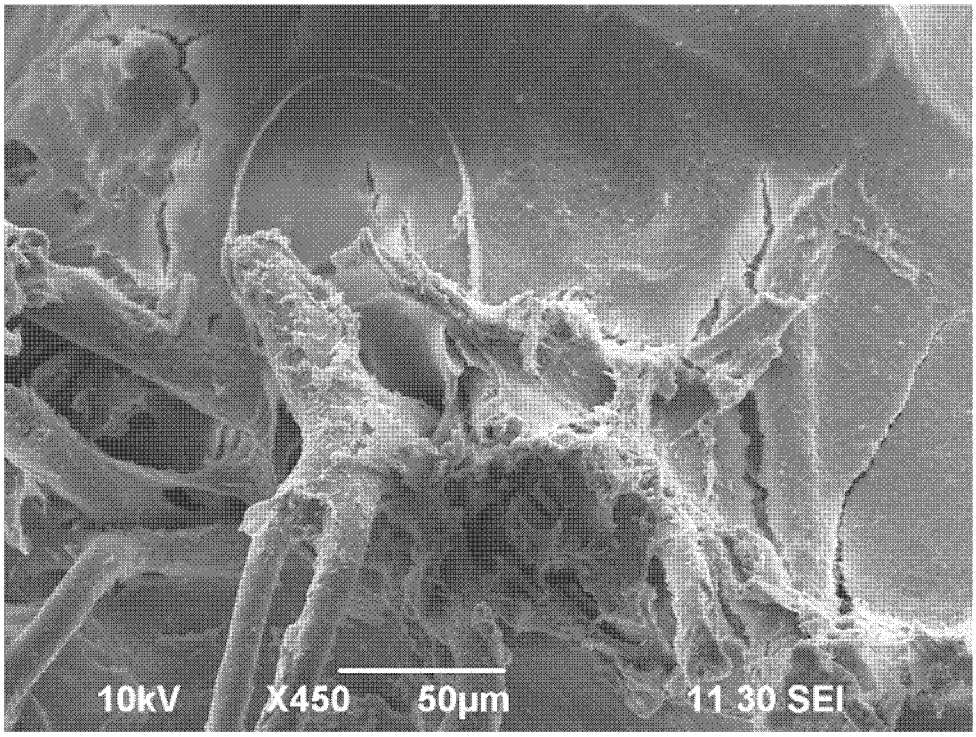


图 7

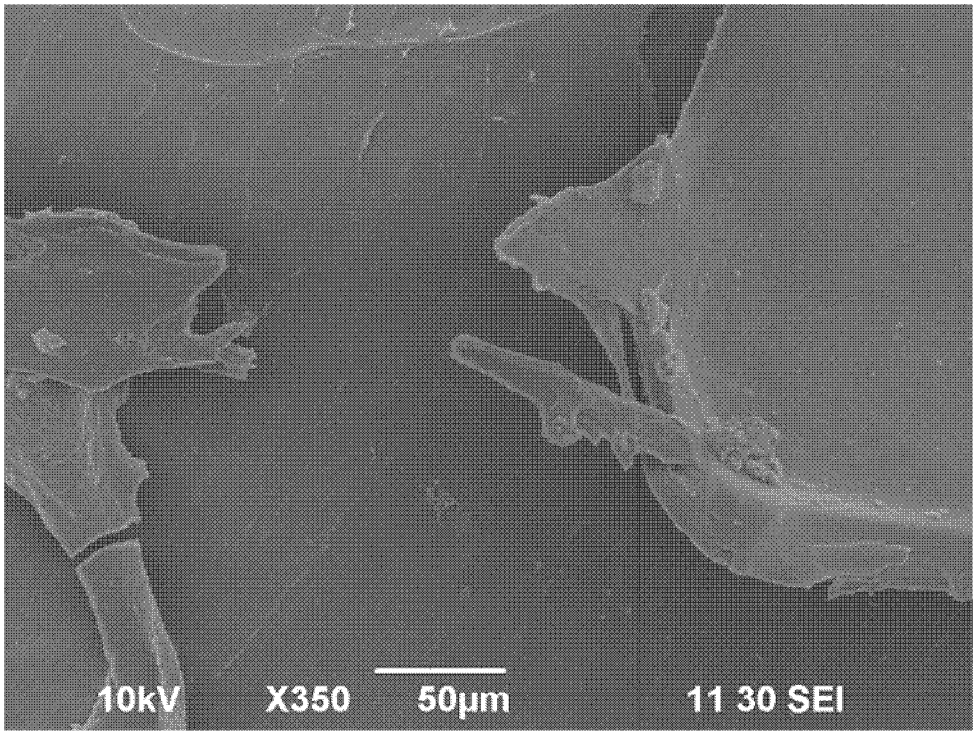


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/087551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 15/40(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; A61L 15/32(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

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, CNTXT, DWPI, EPODOC, SIPOABS: 海绵, 止血, 组织, 密封, 洗, 骨架, 浸, 泡, 酸, 碱, 盐酸, 氢氧化钠, HCl, NOH, 缓冲液, 胰蛋白酶, 烘干, 沉淀, 降解, sponge, hemostasis, tissue, seal, wash, skeleton, dip, soak, acid, alkali, hydrochloric acid, sodium hydroxide, buffer, trypsin, dry, precipitation, degradation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101507837 A (BIOLAND LTD.) 19 August 2009 (2009-08-19) entire document	1-7
X	US 2003032601 A1 (KREUTER, J. et al.) 13 February 2003 (2003-02-13) description, paragraphs [0001], [0005], [0014], [0016], [0019], [0023], [0037], and [0048]-[0050]	8-11
A	US 2003032601 A1 (KREUTER, J. et al.) 13 February 2003 (2003-02-13) entire document	1-7
A	DE 3203957 C2 (CHEMOKOL, G. et al.) 07 December 1989 (1989-12-07) entire document	1-7
A	CN 101137669 A (LOHMANN & RAUSCHER GMBH & CO. K) 05 March 2008 (2008-03-05) entire document	1-11
A	CN 101626775 A (VILLANI, M.) 13 January 2010 (2010-01-13) entire document	1-11

☑ 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	Date of mailing of the international search report
22 November 2019	**02 January 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **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/CN2019/087551

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 3126382 A1 (A4TEC ASSOC ADVANCEMENT TISSUE ENG CELL) 08 February 2017 (2017-02-08) entire document	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/087551

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101507837	A	19 August 2009	KR	100947553	B1	12 March 2010
				KR	20090088054	A	19 August 2009
				US	2009208551	A1	20 August 2009
US	2003032601	A1	13 February 2003	EP	1259120	B1	29 August 2007
				WO	0164046	A2	07 September 2001
				DE	10010113	A1	13 September 2001
				WO	0164046	A3	14 March 2002
				AU	3741701	A	12 September 2001
				DE	10010113	B4	07 May 2009
				AT	371375	T	15 September 2007
				EP	1259120	A2	27 November 2002
				JP	2003526715	A	09 September 2003
				DE	50112931	D1	11 October 2007
DE	3203957	C2	07 December 1989	DE	3203957	A1	18 August 1983
CN	101137669	A	05 March 2008	WO	2006089660	A2	31 August 2006
				JP	2008531774	A	14 August 2008
				ES	2645089	T3	04 December 2017
				WO	2006089660	A3	11 October 2007
				US	2010105881	A1	29 April 2010
				PT	1863843	T	10 November 2017
				EP	1863843	B1	02 August 2017
				CN	101137669	B	10 August 2011
				DE	102005008416	A1	07 September 2006
				US	2008261876	A1	23 October 2008
				DE	102005008416	B4	29 September 2011
				US	7687604	B2	30 March 2010
				US	7858748	B2	28 December 2010
				EP	1863843	A2	12 December 2007
				DE	102005063438	A1	27 December 2007
CN	101626775	A	13 January 2010	KR	20090087877	A	18 August 2009
				EP	2073824	A2	01 July 2009
				AU	2007303040	A1	10 April 2008
				RU	2009116923	A	10 November 2010
				WO	2008043071	A3	20 November 2008
				WO	2008043071	A2	10 April 2008
				US	2010080853	A1	01 April 2010
EP	3126382	A1	08 February 2017	WO	2015151030	A1	08 October 2015
				EP	3126382	B1	12 June 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/087551

A. 主题的分类

A61L 15/40(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; A61L 15/32(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

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, CNTXT, DWPI, EPODOC, SIPOABS：海绵，止血，组织，密封，洗，骨架，浸，泡，酸，碱，盐酸，氢氧化钠，HCl，NOH，缓冲液，胰蛋白酶，烘干，沉淀，降解，sponge, hemostasis, tissue, seal, wash, skeleton, dip, soak, acid, alkali, hydrochloric acid, sodium hydroxide, buffer, trypsin, dry, precipitation, degradation

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
A	CN 101507837 A (株式会社BIOLAND) 2009年 8月 19日 (2009-08-19) 全文	1-7
X	US 2003032601 A1 (KREUTER J等) 2003年 2月 13日 (2003-02-13) 说明书第[0001], [0005], [0014], [0016], [0019], [0023], [0037], [0048]-[0050]段	8-11
A	US 2003032601 A1 (KREUTER J等) 2003年 2月 13日 (2003-02-13) 全文	1-7
A	DE 3203957 C2 (CHEMOKOL GES等) 1989年 12月 7日 (1989-12-07) 全文	1-7
A	CN 101137669 A (洛曼－劳舍尔国际股份有限公司) 2008年 3月 5日 (2008-03-05) 全文	1-11
A	CN 101626775 A (玛丽亚 维拉尼) 2010年 1月 13日 (2010-01-13) 全文	1-11

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2019年 11月 22日	2020年 1月 2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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 王暾 电话号码 86-(010)-62089179

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/087551

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
A	EP 3126382 A1 (A4TEC ASSOC ADVANCEMENT TISSUE ENG CELL) 2017年 2月 8日 (2017-02-08) 全文	1-11

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/087551

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	101507837	A	2009年 8月 19日	KR	100947553	B1	2010年 3月 12日
				KR	20090088054	A	2009年 8月 19日
				US	2009208551	A1	2009年 8月 20日
US	2003032601	A1	2003年 2月 13日	EP	1259120	B1	2007年 8月 29日
				WO	0164046	A2	2001年 9月 7日
				DE	10010113	A1	2001年 9月 13日
				WO	0164046	A3	2002年 3月 14日
				AU	3741701	A	2001年 9月 12日
				DE	10010113	B4	2009年 5月 7日
				AT	371375	T	2007年 9月 15日
				EP	1259120	A2	2002年 11月 27日
				JP	2003526715	A	2003年 9月 9日
				DE	50112931	D1	2007年 10月 11日
DE	3203957	C2	1989年 12月 7日	DE	3203957	A1	1983年 8月 18日
CN	101137669	A	2008年 3月 5日	WO	2006089660	A2	2006年 8月 31日
				JP	2008531774	A	2008年 8月 14日
				ES	2645089	T3	2017年 12月 4日
				WO	2006089660	A3	2007年 10月 11日
				US	2010105881	A1	2010年 4月 29日
				PT	1863843	T	2017年 11月 10日
				EP	1863843	B1	2017年 8月 2日
				CN	101137669	B	2011年 8月 10日
				DE	102005008416	A1	2006年 9月 7日
				US	2008261876	A1	2008年 10月 23日
				DE	102005008416	B4	2011年 9月 29日
				US	7687604	B2	2010年 3月 30日
				US	7858748	B2	2010年 12月 28日
				EP	1863843	A2	2007年 12月 12日
				DE	102005063438	A1	2007年 12月 27日
CN	101626775	A	2010年 1月 13日	KR	20090087877	A	2009年 8月 18日
				EP	2073824	A2	2009年 7月 1日
				AU	2007303040	A1	2008年 4月 10日
				RU	2009116923	A	2010年 11月 10日
				WO	2008043071	A3	2008年 11月 20日
				WO	2008043071	A2	2008年 4月 10日
				US	2010080853	A1	2010年 4月 1日
EP	3126382	A1	2017年 2月 8日	WO	2015151030	A1	2015年 10月 8日
				EP	3126382	B1	2019年 6月 12日