

(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
2023 年 11 月 2 日 (02.11.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/206055 A1

(51) 国际专利分类号:
C08H 1/00 (2006.01) *A61L 27/54* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61L 26/00* (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/089182

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 26 日 (26.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳湾实验室 (SHENZHEN BAY LABORATORY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市光明区玉塘街道田寮社区光侨路高科创新中心, Guangdong 518132 (CN)。

(72) 发明人: 彭琴 (PENG, Qin); 中国广东省深圳市光明区玉塘街道田寮社区光侨路高科创新中心, Guangdong 518132 (CN)。邱菊辉 (QIU, Juhui); 中国广东省深圳市光明区玉塘街道田寮社区光侨路高科创新中心, Guangdong 518132

(CN)。钱智勇 (QIAN, Zhiyong); 中国广东省深圳市光明区玉塘街道田寮社区光侨路高科创新中心, Guangdong 518132 (CN)。

(74) 代理人: 北京元本知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING YUANBEN INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国北京市海淀区学清路9号汇智大厦3层2单元312, Beijing 100085 (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, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: MODIFICATION AND USE OF SILK FIBROIN

(54) 发明名称: 丝素蛋白的改性及应用

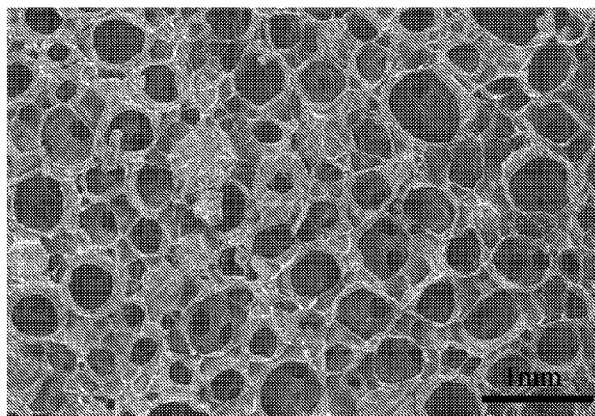


图 1

(57) Abstract: Provided are a modification and the use of silk fibroin. Calcium in silk fibroin or fibroin fibers is partially or completely removed, so as to obtain the modified silk fibroin with a broad-spectrum antioxidant effect. A method for preparing the modified silk fibroin, which method comprises: dissolving fibroin fibers by using a neutral salt solution, i.e., a calcium chloride-containing ternary solution and/or a lithium bromide solution, and performing desalting to obtain a silk fibroin solution; and adding a chelating agent to the silk fibroin solution for a full reaction, and performing a desalting treatment to obtain a low-calcium or calcium-free silk fibroin solution. The modified silk fibroin has the effects of broad-spectrum, stable and efficient removal of excessive active oxygen, and a burn dressing prepared therefrom has the effects of promoting wound healing, maintaining moisture, maintaining electrolyte balance, stopping bleeding, etc., when applied to a burn treatment. In addition, a new therapeutic strategy is provided for the treatment of acute and chronic inflammatory diseases caused by oxidative stress clinically.



WO 2023/206055 A1

(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, SC, 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))。

(57) 摘要: 一种丝素蛋白的改性及应用。将丝素蛋白或丝素纤维中的钙部分去除或完全去除, 得到具备广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白。改性丝素蛋白的制备方法: 用所述中性盐溶液氯化钙三元液和/或者溴化锂溶液溶解丝素纤维, 经过除盐得到丝素蛋白溶液; 将所述螯合剂加入上述丝素蛋白溶液中充分反应, 并除盐处理后得到低钙或者无钙的丝素蛋白溶液。改性后的丝素蛋白具有广谱、稳定和高效清除过量活性氧的作用, 将其制备成烧伤敷料应用于烧伤治疗中, 具有促进伤口愈合、保持水分、维持电解质平衡和止血等功效。同时为临床上氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病的治疗提供了新的治疗策略。

丝素蛋白的改性及应用

技术领域

本发明属于生物医用技术领域，具体涉及的是丝素蛋白的改性及应用。

背景技术

炎症与氧化应激密切相关，清除过量活性氧被认为是治疗炎症疾病的可行策略。采用 N-乙酰半胱氨酸等抗氧化药物清除过量活性氧，治疗急性肝损伤、肝纤维化、急性肾损伤等炎症性疾病，然而这类药物存在生物利用度差、稳定性差和疗效差的缺点。

随着纳米医学的进步，许多研究表明碳、氧化铈、铂、氧化还原聚合物以及多酚纳米颗粒等纳米酶可以清除过量活性氧，治疗氧化应激导致的相关疾病。此类纳米酶具有与天然酶相当的活性氧清除能力，具有广谱抗氧化作用，即便在恶劣疾病环境中仍然能够高效、稳定和快速的清除过量活性氧。然而，此类纳米酶由于其纳米尺寸而导致细胞毒性和炎症，且在动物体内的代谢过程尚且未知，存在潜在的生物安全性的风险。

丝素蛋白是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白，含量约占蚕丝的 70%~80%，含有 18 种氨基酸，其中甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸约占总组成的 80%以上。丝素蛋白具有良好的生物安全性和生物可降解性，是被 FDA 批准使用的生物材料，临床转化潜力巨大。许多研究表明丝素蛋白可以被体内酶降解成氨基酸再次被机体利用。

研究发现，丝素蛋白经螯合剂处理后，抗氧化能力增强，具有良好的广谱抗氧化作用。本发明提取的改性丝素蛋白可以作为抗氧化剂使用，清除损伤器官微环境过量活性氧；也可以作为原材料加工成组织工程需要各种器件，这些含有改性丝素蛋白的器件具有广谱、稳定和高效清除过量活性氧的功能，同时具备良好的生物安全性和可降解性，临床需求极大。本发明为临床上氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病的治疗提供了新的治疗策略。

与此同时，本发明对丝素蛋白进行改性，并制备成烧伤敷料应用于烧伤治疗中，该烧伤敷料具有促进伤口愈合、保持水分、维持电解质平衡和止血等功效，不仅可以提供类似的细胞外基质(ECM)，还可以迅速覆盖伤口，防止细菌和其他病原体入侵伤口。最重要的是，这种烧伤敷料应具有良好的烧创伤安全性，可以

通过降低创面氧化应激反应，维持烧伤创面所需的组织微环境，从而促进坏死焦痂组织的自溶清创，防止伤口坏死，促进细胞增殖和迁移，敷料的原材料来源丰富，便于规模化生产。

公开号为 CN110483630A 的发明专利公开了一种改性丝素蛋白冻干粉的制备方法，该专利通过加热、加碱的方式制备改性丝素蛋白，然而该方法制得的改性丝素蛋白抗氧化能力有限，不具有广谱、稳定和高效清除过量活性氧的功能。

公开号为 JP2015165919A 的发明专利公开了一种伤口覆盖材料。该发明的目的是提供一种具有一定的生物相容性和保水性以及较高强度的伤口敷料。其利用丝素蛋白多孔体所具有的吸收渗液能力，对皮肤的刺激性小以及透气性的特点解决了伤口组织液渗漏引发的问题，但对于烧创伤诱导的氧化应激反应仍不能有效解决。

发明内容

为解决上述问题，本发明对丝素蛋白进行改性，得到的改性丝素蛋白具有高强度广谱抗氧化作用，可以清除损伤器官微环境过量活性氧，加速修复因氧化应激导致的急性和慢性炎症损伤器官。

本发明的目的之一在于提供的是具有高强度广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白，该改性丝素蛋白具有高强度广谱抗氧化作用，可以清除损伤器官微环境过量活性氧，加速修复因氧化应激导致的急性和慢性炎症损伤器官。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

具有高强度广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白，其特征在于，所述改性丝素蛋白为部分去除钙或完全去除钙的丝素蛋白。

去除丝素蛋白中的钙离子，可以提高丝素蛋白的抗氧化作用，从而有效清除羟基自由基、过氧化氢、超氧阴离子和单线态氧。

本发明的目的之二在于提供用于改性丝素蛋白的试剂，该试剂可以将丝素纤维和/或丝素蛋白中的钙部分去除或者完全去除。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

用于改性丝素蛋白的试剂，其特征在于，所述试剂为钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸。

进一步，所述钙的螯合剂为 EDTA 及其衍生物、EGTA AM 及其衍生物、BAPTA

及其衍生物。

进一步，所述能与钙发生螯合作用的氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

更进一步，所述 EDTA 及其衍生物为 EDTA 及其衍生物水溶液、EDTA 及其衍生物改性的大分子、EDTA 及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种；所述 EGTA AM 及其衍生物为 EGTA AM 及其衍生物水溶液、EGTA AM 及其衍生物改性的大分子、EGTA AM 及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种；所述 BAPTA 及其衍生物为 BAPTA 及其衍生物水溶液、BAPTA 及其衍生物改性的大分子、BAPTA 及其衍生物改性的高分子中的任一种或几种。

更进一步，所述氨基酸为氨基酸的水溶液、氨基酸改性大分子、氨基酸改性高分子中的任一种或几种。

进一步，所述试剂还包括中性盐溶液。

更进一步，所述中性盐溶液为溴化锂溶液、氯化钙三元液、硫氰酸锂溶液、氯化锌溶液中的任一种或几种。

本发明的目的之三在于提供一种运用试剂提升丝素蛋白广谱抗氧化作用的方法。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

运用试剂提升丝素蛋白广谱抗氧化作用的方法，用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除，所述丝素蛋白来源于蚕茧、生丝或熟丝中的任一种或几种。

进一步，用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除，再用所述中性盐溶液充分反应；

或用所述中性盐溶液与丝素蛋白和/或丝素纤维充分反应后，再用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除。

进一步，用所述钙的螯合剂处理丝素纤维后，用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维获得的高强度广谱抗氧化作用丝素蛋白溶液；

或用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液，再用所述钙的螯合剂

处理溴化锂提取的丝素蛋白溶液；

或用所述氯化钙三元液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液，再用所述钙的螯合剂处理氯化钙提取的丝素蛋白溶液。

本发明的目的之四在于提供的是改性丝素蛋白的制备方法，该方法工序简单，节约成本，方便质控，可以大规模生产。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

改性丝素蛋白的制备方法，具体包括以下步骤：

S1：用所述氯化钙三元液和/或溴化锂溶液溶解丝素纤维，经过除盐得到丝素蛋白溶液；

S2：将所述钙的螯合剂加入 S1 所得的丝素蛋白溶液中充分反应，除盐处理后得到低钙或者无钙的丝素蛋白溶液。

其中，除盐方法为透析法；中性盐溶液溶解丝素纤维的温度条件优选为 80℃；加入钙的螯合剂后，反应时间为 0.1~24h。

进一步，S1 中所述氯化钙三元液为氯化钙、无水乙醇和水以摩尔比为 1：1~5：1~20 的比例配制而成。

进一步，S1 中所述溴化锂溶液浓度为 1-20M。

进一步，S2 所述钙的螯合剂为 EDTA 或其衍生物，浓度为 0.1~500mM。

进一步，改性丝素蛋白在制备治疗或检测氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病中的药物和设备中的应用。

更进一步，所述设备为可穿戴设备。

进一步，含有改性丝素蛋白制备的药学上可接受的载体的制剂。

更进一步，所述制剂为喷剂、水凝胶、支架、药物载体。

本发明的目的之五在于提供的是用于制备烧创伤敷料的组合物。不平衡的活性氧改变细胞功能，导致信号传导通路异常，诱发炎症和瘢痕挛缩，而抗氧化剂治疗可以最大限度地减少烧伤病理生理学方面的损害，比如组织脂质过氧化，组织坏死，降低死亡率。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

方案一：用于制备烧创伤敷料的组合物，所述组合物由丝素蛋白和骨架按照 1：2~10 的质量比组成；所述骨架为壳聚糖-吸水聚合物骨架；所述壳聚糖和吸水聚合物

按照 1: 0.1~5 的质量比组成。

方案二：用于制备烧创伤敷料的组合物，所述组合物由丝素蛋白、骨架和活力碘按照 1:0.5~2:0.1~10 的质量比组成；所述骨架由壳聚糖和吸水聚合物按照 1:0.1~5 的质量比组成；所述活力碘由单质碘和碘的缓释材料组成。

进一步，所述丝素蛋白为天然丝素蛋白和/或改性丝素蛋白；所述改性丝素蛋白选自部分去除或完全去除钙的丝素蛋白、加热处理的丝素蛋白及其衍生物、紫外照射的丝素蛋白及其衍生物、有机溶剂处理的丝素蛋白及其衍生物中的任一种或几种。

进一步，所述吸水聚合物选自天然吸水聚合物和/或人工合成吸水聚合物，所述天然吸水聚合物选自胶原、明胶、纤维素及其衍生物，所述工合成吸水聚合物选自聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠或聚乙烯醇。

进一步，所述聚乙二醇优选 PEG-400, PEG-600, PEG-1500, PEG-4000, PEG-6000, PEG-20000 中的一种或几种。

进一步，所述壳聚糖选自酸溶性壳聚糖、和/或水溶性壳聚糖、和/或酞类改性壳聚糖衍烧创伤、和/或高脱乙酰度壳聚糖、和/或经过酸酞类化合物修饰的壳聚糖。

进一步，方案二所述单质碘的缓释材料选自聚合物材料和/或小分子材料，所述聚合物材料包括淀粉、纤维素及其衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇，所述小分子材料包括 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精。

更进一步，所述抗菌剂选自纳米非金属抗菌材料、纳米金属抗菌材料、季铵盐类抗菌材料或氧化性材料；所述纳米非金属抗菌材料包括纳米四氧化三铁、纳米氧化锌和纳米二氧化钛，所述纳米金属抗菌材料包括纳米金、纳米银和纳米锌，所述季铵盐类抗菌材料包括壳聚糖季铵盐类和胍盐类，所述氧化性材料包括单质碘。

本发明的目的之六在于提供的是含有方案一所述组合物或方案二所述组合物的制备烧创伤敷料的制剂组合物。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

含有方案一所述组合物的制备烧创伤敷料的制剂组合物，所述制剂组合物由丝素蛋白、骨架和辅料按照 1: 2~10: 0.1~5 的质量比组成；所述辅料为增塑剂和/或乳化剂。

含有方案二所述组合物的制备烧创伤敷料的制剂组合物，所述制剂组合物由丝素蛋白、骨架、活力碘和辅料按照 1:0.5~2:0.1~10 的质量比组成；所述辅料为增塑

剂和/或乳化剂。

进一步，所述增塑剂选自甘油、丙二醇或山梨醇。

进一步，所述乳化剂选自聚氧乙烯醚、环氧乙烷嵌段共聚物、多元醇脂肪酸酯或聚乙烯醇。

本发明的目的之七在于提供的是用方案一所述组合物或其制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，该烧创伤敷料采用的制备方法中间无须分离纯化过程，既节约成本，方便质控，又利于大规模生产。。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

用方案一所述组合物或上述制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，具体包括以下步骤：

S1：制备丝素蛋白；

S2：将 S1 所得物与骨架和辅料混合。

进一步，在 S2 之后还包括 S3：将 S2 所得物用硬脂酸改性。

进一步，所述 S1 为制备上述改性丝素蛋白，在温度为 60℃~120℃，时间为 1~12h 的条件下进行加热，冷却备用；

进一步，所述 S2 为将 S1 所得物与上述骨架和辅料混合，然后搅拌乳化，倒入磨具中，在-4℃冷冻 4~24h，-20℃冷冻 6~12h，-80℃冷冻 6~12h 的条件下用冻干，即得。

进一步，所述 S3 为将 S2 获得的烧创伤敷料在水中完全溶胀后，用硬脂酸溶液滴在其表面，后用无水乙醇冲洗，-20℃放置 2h，-70℃条件下放置 6h 后再冻干，即得。

进一步，S1 在制备过程中加入了钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸；所述钙的螯合剂为 EDTA 及其衍生物、EGTAAM 及其衍生物、BAPTA 及其衍生物；所述能与钙发生螯合作用的氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

本发明的目的之八在于提供的是用上述制备烧创伤敷料的方法获得的烧创伤敷料，该烧创伤敷料具有广谱抗氧化作用，能促进氧化应激微环境下慢性难愈合创面的愈合，集聚保湿性、高强度、透气性、阻隔性以及易揭性等特点。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

用上述制备烧创伤敷料的方法获得的烧创伤敷料。

进一步，所述烧创伤敷料为多孔结构，其孔隙率为 55%~80%，其孔径大小为 0.5mm~2mm。

进一步，所述烧创伤敷料的吸水倍率为 15~20 倍；其吸水倍率可用如下公式计算： $Q=(M2-M1)/M1$ ；Q 为吸水倍率，单位为 g/g；M1 为吸液前试样质量，单位为 g；M2 为吸液后试样质量，单位为 g。

更进一步，所述烧创伤敷料在不同介质中的吸水倍率为：在去离子水中的吸水倍率 15~19；在盐水中吸水倍率 13~16；在磷酸缓冲液中的吸水倍率 11~14；在细胞培养液中的吸水倍率 8~13；在血清中的吸水倍率 4~9。

进一步，所述烧创伤敷料经过冻干处理、低温处理、高温处理、醇类改性修饰和/或射线辐照。

本发明的目的之九在于提供一种吸附液体的方法，该方法为有效吸附液体提供了一种新思路。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

所述方法为用上述烧创伤敷料对液体进行吸附，所述液体进入所述烧创伤敷料的孔隙结构，使所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无。

本发明的目的之十在于提供一种阻隔微生物的方法，该方法为有效阻隔微生物提供了一种新思路。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

用含有上述吸附液体的方法的对微生物进行阻隔，用上述吸附液体的方法对上述液体进行吸附，上述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无后将微生物隔绝在外。

本发明的目的之十一在于提供的是用方案二所述组合物或其制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，该制备生物敷料的方法中间无须分离纯化过程，既节约成本，方便质控，又利于大规模生产。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

用方案二所述组合物或其制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，具体包括以下步骤：

S1: 制备改性丝素蛋白和活力碘;

S2: 将 S1 所得物与骨架和辅料混合。

进一步, 在 S2 之后还包括 S3: 将 S2 所得物用硬脂酸改性。

进一步, 所述 S2 为将 S1 所得物与骨架和辅料混合, 搅拌乳化后在 4℃ 放置 1h, -20℃ 放置 4h, -70℃ 放置 6h 条件下冻干, 即得。

进一步, 所述 S3 为将 S2 所得物在水中完全溶胀后, 用硬脂酸溶液滴在其表面, 后用无水乙醇冲洗, -20℃ 放置 2h, -70℃ 条件下放置 6h 后再冻干, 即得。

更进一步, S1 在制备过程中加入了钙的螯合剂或能和钙发生螯合作用的氨基酸; 所述钙的螯合剂为 EDTA 及其衍生物、EGTA AM 及其衍生物、BAPTA 及其衍生物; 所述能和钙发生螯合作用氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

本发明的目的之十二在于提供的是用上述制备烧创伤敷料的方法获得的烧创伤敷料, 该烧创伤敷料具有广谱抗氧化作用, 能促进氧化应激微环境下慢性难愈合创面的愈合, 集聚保湿性、高强度、透气性、阻隔性以及易揭性等特点。

为实现上述目的, 本发明采取以下技术方案:

用上述制备烧创伤敷料的方法获得的烧创伤敷料。

进一步, 所述烧创伤敷料为多孔结构, 其孔隙率为 55%~80%, 其孔径大小为 0.5~2mm。

进一步, 所述烧创伤敷料的吸水倍率为 1~20 倍; 其吸水倍率可用如下公式计算: $Q=(M2-M1)/M1$; Q 为吸水倍率, 单位为 g/g; M1 为吸液前试样质量, 单位为 g; M2 为吸液后试样质量, 单位为 g。

更进一步, 所述烧创伤敷料在不同介质中的吸水倍率为: 在去离子水中的吸水倍率 14~16; 在盐水中吸水倍率为 12~14; 在磷酸缓冲液中的吸水倍率为 9~11; 在细胞培养液中的吸水倍率为 7~10; 在血清中的吸水倍率为 5~7。

进一步, 所述烧创伤敷料经过冻干处理、低温处理、高温处理、醇类改性修饰和/或射线辐照。

本发明的目的之十三在于提供一种用上述烧创伤敷料吸附液体的方法, 该方法为有效吸附液体提供了一种新思路。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

一种吸附液体的方法，用上述烧创伤敷料对液体进行吸附，所述液体进入所述烧创伤敷料的孔隙结构，使所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无。

本发明的目的之十四在于提供一种阻隔微生物的方法，该方法为有效阻隔微生物提供了一种新思路。

为实现上述目的，本发明采取以下技术方案：

用含有上述吸附液体的方法的对微生物进行阻隔，用上述吸附液体的方法对上述液体进行吸附，上述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无后将微生物隔绝在外。

本发明的有益效果在于：

(1) 本发明制备的丝素蛋白抗氧化效果显著，可以清除体内多种自由基，具有广谱抗氧化作用，可以作为广谱抗氧化剂治疗因氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病；且本发明提供的丝素蛋白的制备方法工序简单，既节约成本，方便质控，又利于大规模生产。

(2) 本发明制备的丝素蛋白可以加工成组织工程需要的各种器件，用于加速损伤组织修复，消除损伤部位的过量活性氧的能力使其在组织工程领域应用具有巨大优势。

(3) 本发明提供的烧创伤敷料能降低创面氧化应激反应，恢复相关细胞的修复功能，加速创面的愈合。

(4) 本发明提供的烧创伤敷料中适当比例的吸水大分子或聚合物具有一定的吸水锁水作用。当敷料与体液接触时，材料自身溶胀形成凝胶状，可以有效将创面与外界隔绝，同时具有良好的透气性。该生物敷料的锁水作用使接触面保持一定的湿度，从而有利于加速上皮组织形成、减轻疼痛、分解坏死组织，并利于抗菌剂的缓慢释放。

(5) 本发明提供的烧创伤敷料可与创面紧密贴合，封闭创面，阻隔有害微粒接触创面，且不会与创面组织粘连，适用于大面积烧伤、大面积创伤或深度烧创伤等情况。

(6) 本发明提供的生物敷料中抗菌剂缓释载体可以长时间发挥缓释抗菌剂，减少或者阻止创面微生物生长。

(7) 本发明提供的烧创伤敷料采用冻干法制备，中间无须分离纯化过程，既节约成本，方便质控，又利于大规模生产。

附图说明

图 1 为实施例 6 制备的烧创伤敷料样品 1 的电镜照片；

图 2 为实施例 14 制备的生物敷料的电镜照片。

具体实施方式

下面将结合具体的实施例对本发明的技术方案进行更进一步地清楚、完整地描述。显然，所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例，而不是全部实施例。因此，基于本发明中的实施例，本领域技术人员在没有付出创造性劳动前提下所获得的其他所有实施例都属于本发明的保护范围。

如无特殊说明，实施例中的百分数均表示溶剂的质量分数。

实施例 1.制备丝素蛋白样品 1

(1) 丝素纤维 10g，加入 100mL 氯化钙三元液，于 80℃条件下溶解，透析 3 天，每天换去离子水 3 次，得丝素蛋白溶液；

(2) 取丝素蛋白溶液 20mL，加入 2mL 浓度为 100mmol/L 的 EDTA 水溶液反应 1h，透析 3 天，每天换水 3 次，得低钙或无钙的丝素蛋白溶液，即样品 1。

实施例 2.制备丝素蛋白样品 2

(1) 丝素纤维 10g，加入 100mL 浓度为 10mol/L 的溴化锂溶液，于 80℃条件下溶解，透析 3 天，每天换去离子水 3 次，得丝素蛋白溶液；

(2) 取丝素蛋白溶液 20mL，加入浓度为 100mmol/L 的 EDTA 水溶液反应 1h，透析 3 天，每天换水 3 次，得低钙或无钙的丝素蛋白溶液，即样品 2。

实施例 3.制备丝素蛋白样品 3

(1) 丝素纤维 1g，加入 20ml 浓度为 100mmol/L 的 EDTA 水溶液反应 24h，透析 3 天，每天换水 3 次；50℃烘干，得低钙或无钙的丝素纤维。

(2) 取 10g 低钙或无钙的丝素纤维，加入 100mL 浓度为 10mol/L 的溴化锂溶液，80℃反应 24h，透析 3 天，每天换水 3 次，得低钙或无钙的丝素蛋白溶液，即样品 3。

实施例 4.制备丝素蛋白的部分优选条件

表 1

优选条件		试剂			蛋白含钙量
		溴化锂溶液浓度 (mol/L)	EDTA 水溶液浓度 (mmol/L)	氯化钙三元液 (氯化钙、无水乙醇和水的摩尔比)	
1	丝素蛋白	1	0.1	-	低钙
2		20	500	-	无钙
3		-	0.1	1:1:1	低钙
4		-	500	1:5:20	无钙
5	脱钙丝	1	-	-	无钙
6	素纤维	20	-	-	无钙

实施例 5. 体外广谱抗氧化性能实验

将实施例 1-3 中制备的低钙或无钙的丝素蛋白溶液样品进行广谱抗氧化性能测试。具体方法为：将实施例 1 制备的样品 1、实施例 2 制备的样品 2、实施例 3 制备的样品 3、谷胱甘肽和水分别与超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 反应，然后用超氧阴离子测试试剂盒、羟基自由基测试试剂盒和过氧化氢定量分析试剂盒检验 5 组样品各自清除超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 的能力。样品抗氧化作用评价记载于表 2。

表2 抗氧化作用评价

样品	羟基自由基	过氧化氢	超氧阴离子	氧化物
去离子水	-	-	-	-
谷胱甘肽	+++	+	++	++
样品 1	++	+++	++	+++
样品 2	+	++	++	++
样品 3	++	++	++	+

注：“-”表示无抗氧化作用；“+”表示清除率 10%~50%；“++”表示清除率 50%~90%；“+++”表示清除率 >90%。

通过表2可以看出，不同制备工艺制备出的丝素蛋白溶液清除超氧阴离子、羟基自由和 H_2O_2 的能力不同，但采用本发明的三种工艺制备出的3组样品均具有良好的抗氧化作用。

本专利从细胞水平检测了丝素蛋白的抗氧化能力，二氯二氢荧光素作为细胞活性氧指示探针，绿色荧光越强说明细胞内活性氧含量越高。当用过氧化氢刺激细胞时，二氯二氢荧光素发出很强的绿色荧光。

谷胱甘肽具有良好的抗氧化作用。将谷胱甘肽、实施例制备样品 1、实施例制备样品 2 和实施例制备样品 3 加入细胞发现，绿色荧光含量很低，统计学结果表明实施例制备样品 1、实施例制备样品 2 和实施例制备样品 3 抗氧化作用与谷胱甘肽相同，无显著性差异，详见表 3。

表3

样品	胞内活性氧清除效率(%)
对照	64.54
H ₂ O ₂	0
谷胱甘肽	81.64
实施例样品1	80.07
实施例样品2	83.75
实施例样品3	76.18

实施例 6.烧创伤敷料样品 1 的制备

- 1)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液在 95℃条件下加热处理 2h，冷却备用；
- 2)在步骤 1)所得溶液中加入 1mL 甘油，机械搅拌 10min 后加入 10mL 5%的明胶溶液，再机械搅拌 10min 形成白色乳液，取 10mL 2%的壳聚糖溶液加入上述白色乳液中机械搅拌 30min 备用；
- 3)将步骤 2)制得的白色乳液倒入 100×150mm 容器中，4℃放置 1h，-20℃放置 4h，-70℃放置 6h，冻干机冻干后获得 CTS-GEL/SF 敷料备用；
- 4)让 CTS-GEL/SF 敷料充分吸收去离子水，-20℃放置 4h，将 8mL 硬脂酸溶液(40 mmol/L 乙醇，DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-GEL/SF 敷料的光滑表面上，冷冻 2 小时，在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-GEL/SF 敷料的光滑表面 3 次，得到 CTS-GEL/SF/SA 敷料，裁切，包装，钴 60 辐照灭菌，即得。

实施例 7.烧创伤敷料样品 2 的制备

- 1)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液在 95℃条件下加热处理 2h，冷却备用；

2)在步骤 1)所得溶液中加入 1mL 甘油,机械搅拌 10min 后加入 10mL 5%的聚乙二醇(PEG)溶液,再机械搅拌 10min 形成白色乳液,取 10mL 2%的壳聚糖溶液加入上述白色乳液中机械搅拌 30min 备用;

3)将步骤 2)制得的白色乳液倒入 100×150mm 容器中,4℃放置 1h,-20℃放置 4h,-70℃放置 6h,冻干机冻干后获得 CTS-PEG/SF 敷料备用;

4)让 CTS-PEG/SF 敷料充分吸收去离子水,-20℃放置 4h,将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇,DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-PEG/SF 敷料的光滑表面上,冷冻 2 小时,在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-PEG/SF 敷料的光滑表面 3 次,得到 CTS-PEG/SF/SA 敷料,裁切,包装,钴 60 辐照灭菌,即得。

实施例 8.烧创伤敷料样品 3 的制备

1)将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中,配制成质量分数为 5%的碘酒。将 2%的β-环糊精加热溶解,将 5%的碘酒加入到β-环糊精溶液中,超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体,收集固体粉末备用;

2)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h,加入 1mL 甘油,机械搅拌 10min,加入 10mL 5%的聚乙烯醇溶液,机械搅拌 10min 形成白色乳液,取 10mL 2%壳聚糖溶液加入上述白色乳液中,机械搅拌 30min 备用;

3)取步骤 1)所得物 1g 溶解在 5mL 去离子水里,加入步骤 2)所得物中,机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中,4℃放置 1h,-20℃放置 4h,-70℃放置 6h,冻干机冻干,获得 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵备用;

4)让 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵充分吸收去离子水,-20℃放置 4h,将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇,DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵的光滑表面上,冷冻 2 小时,在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-PVA/SF/CD-I 敷料的光滑表面 3 次,得到 CTS-PVA/SF/CD-I/SA 敷料,裁切,包装,钴 60 辐照灭菌,即得。

实施例 9.烧创伤敷料样品 4 的制备

1)将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中,配制成质量分数为 5%的碘酒。将 5%的碘酒加入到 2%的聚乙烯吡咯烷酮溶液中,超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体,收集固体粉末备用;

2)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h,加入 1mL 甘油,机械搅

拌 10min, 加入 10mL 5% 的聚乙烯醇溶液, 机械搅拌 10min 形成白色乳液, 取 10mL 2% 壳聚糖溶液加入上述白色乳液中, 机械搅拌 30min 备用;

3) 取步骤 1) 所得物 1g 溶解在 5mL 去离子水里, 加入步骤 2) 所得物中, 机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中, 4℃ 放置 1h, -20℃ 放置 4h, -70℃ 放置 6h, 冻干机冻干, 获得 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵备用;

4) 让 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵充分吸收去离子水, -20℃ 放置 4h, 将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇, DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵的光滑表面上, 冷冻 2 小时, 在 20℃ 条件下用无水乙醇冲洗 CTS-PVA/SF/PP-I 敷料的光滑表面 3 次, 得到 CTS-PVA/SF/PP-I/SA 敷料, 裁切, 包装, 钴 60 辐照灭菌, 即得。

实施例 10. 物理和结构表征

将实施例 6-9 制备的烧创伤敷料以样品 1 为代表, 进行大体结构观察, 并采用扫描电子显微镜进行微观结构观察。如图 1 所示, 样品皆为相互连通的多孔道结构。其孔隙率在 55%-80% 之间。互相贯穿的孔道结构与体液接触后其孔隙结构迅速将体液吸入孔内, 吸水聚合物迅速凝胶化, 一方面使得孔道壁吸水后增厚并凝胶化, 管腔变无, 另一方面可有效阻隔空气微生物伤侵染伤口。

实施例 11. 物理性能表征

对实施例 6-9 制备的烧创伤敷料样品的溶胀性能进行测试, 分别准确称取实施例 6-9 中的试样 0.1g, 将其浸于去离子水(pH=7.0)、生理盐水、磷酸缓冲液、DMEM 培养基和血清液中, 37℃ 吸水完全溶胀, 吸去表面水分, 称取试样吸液后质量, 计算样品的吸水倍率。吸水倍率 Q 计算公式如下: $Q=(M2-M1)/M1$, Q 为吸水(盐水)倍率, 单位为 g/g; M1 为吸液前试样质量, 单位为 g; M2 为吸液后试样质量, 单位为 g。

如表 4 所示, 实施例 6-9 中样品 1-4 表现出相近的吸水性。以实施例 4 制备敷料为例, 其在不同介质中的吸水倍率: 在去离子水中的吸水倍率为 14~16; 在盐水中吸水倍率为 12~14; 在磷酸缓冲液中的吸水倍率为 9~11; 在细胞培养液中的吸水倍率为 7~10; 在血清中的吸水倍率为 5~7。

表4 不同介质吸水倍率

材料	去离子水	生理盐水	PBS	DMEM	血清
实施例6样品	16± 1.51	14 ± 2.14	12±2.43	10 ± 1.73	7 ± 2.12

实施例7样品	15± 1.43	14 ± 1.82	12±1.83	9 ± 1.78	5± 2.33
实施例8样品	17 ± 1.74	15 ± 1.48	13±1.91	10 ±2.54	7 ± 1.73
实施例9样品	18 ±2.31	16 ± 1.55	14±2.12	12 ± 1.93	8± 2.32

将实施例 6-9 获得的烧创伤敷料进行保湿性能检测，结果显示，实施例 6-9 获得的烧创伤敷料保湿时间比对照组长，保湿时间均在 15 小时以上。

实施例 12.烧创伤敷料样品的体外广谱抗氧化性能实验

对实施例 6-9 制备的烧创伤敷料样品的广谱抗氧化能进行测试。

将实施例 6-9 中各样品分别与含有超氧阴离子、羟基自由基和 H₂O₂ 的溶液反应，用谷胱甘肽和水作为对照。用超氧阴离子测试试剂盒、羟基自由基测试试剂盒和过氧化氢定量分析试剂盒检验 6 组样品分别清除超氧阴离子、羟基自由基和 H₂O₂ 的能力。结果如表 5 所示，实施例 6-9 中各样品和谷胱甘肽有良好的抗氧化作用。

表 5 样品的广谱抗氧化能力

试样	清除率			
	羟基自由基清除率(%)	过氧化氢清除率(%)	超氧阴离子清除率(%)	氧化物清除率(%)
加热丝素蛋白	71.3	83.4	78.4	78.6
丝素蛋白	59.3	77.6	58.8	71.3
实施例样品1	51.3	61.3	60.3	58.1
实施例样品2	46.5	53.4	43.4	41.4
实施例样品3	31.6	41.2	40.3	56.6
实施例样品4	33.7	38.9	28.2	31.6
谷胱甘肽	80.7	42.6	31.2	41.3
H ₂ O	0	0	0	0

实施例 13.全层皮肤损伤修复体内评估

深圳湾实验室动物伦理委员会批准体内动物实验。

将 120 只 BALB/c 小鼠，雄性，每只约重 18g±2g，随机分为 6 组(每组 20 只小鼠)。腹腔注射戊巴比妥钠(20mg/kg)麻醉小鼠，脱除皮毛，在每只小鼠背部做成 Φ1cm 全层皮肤损伤。分别用本发明实施例 5-8 样品和无菌纱布紧密覆盖创面，每周进行 2

次更换。通过 BALB/c 小鼠感染创面修复情况，对本发明的烧创伤敷料进行伤口愈合效应的评价。

5 种敷料治疗下的创面均有不同程度的结痂，并且创面开始收缩。其中本发明实施例 6 制备敷料修复的创面收缩较为明显，治疗效果最佳。5 个试样的治疗结果如表 6 所示，创伤后第 3 天，本发明实施例 6-9 样品伤口愈合分别达到 51.64 ± 1.45 、 45.51 ± 2.31 、 46.11 ± 1.42 和 43.73 ± 1.71 ，纱布组仅达到 26.12 ± 2.26 。实施例 6-9 样品治疗组创面边缘未见红肿发生，纱布组仍可见部分感染渗出物。

表 6 创面愈合率

试样	愈合率			
	0d	3d	7d	12d
纱布	0	26.12 ± 2.26	40.56 ± 1.72	81.37 ± 2.53
实施例 6 样品	0	51.64 ± 1.45	80.14 ± 1.61	99.17 ± 2.42
实施例 7 样品	0	45.51 ± 2.31	70.73 ± 2.13	95.62 ± 2.31
实施例 8 样品	0	46.11 ± 1.42	75.62 ± 1.31	93.56 ± 1.63
实施例 9 样品	0	43.73 ± 1.71	69.71 ± 1.31	94.93 ± 1.75

通过对小鼠创伤后第 7 天创面的观察发现，实施例 6-9 样品治疗组愈合率在 $69.71\pm 1.31\sim 80.14\pm 1.61$ 。纱布组肉芽生长明显，仍存在部分炎性渗出物。术后第 12 天，实施例 6 样品治疗组最佳可以达到 99.17 ± 2.42 ，实施例 7-9 样品治疗组分别为 95.62 ± 2.31 、 93.56 ± 1.63 和 94.93 ± 1.75 。

三组的愈合率具有显著的统计学差异(Table1 $p<0.01$)，结果说明实施例 6-9 样品治疗组最佳，纱布组较差。

实施例 14.烧创伤敷料样品 5 的制备

1)将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中，配制成质量分数为 5%的碘酒。将 2%β-环糊精加热溶解，将 5%碘酒加入到 β-环糊精溶液中，超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体，收集固体粉末备用；

2)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h，加入 1mL 纯甘油，机械搅拌 10min，加入 10mL 5%的明胶溶液，机械搅拌 10min 形成白色乳液，取 10mL 2%壳聚糖溶液加入上述白色乳液中，机械搅拌 30min 备用；

3)取步骤 1)所得物 1g 溶解在 4mL 去离子水里，加入步骤 2)所得物中，机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中，4℃放置 1h，-20℃放置 4h，-70℃放置 6h，冻干机冻干，获得 CTS-GEL/SF/CD-I 海绵备用；

4)让 CTS-GEL/SF/CD-I 海绵充分吸收去离子水, -20℃放置 4h, 将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇, DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-GEL/SF/CD-I 海绵的光滑表面上, 冷冻 2 小时, 在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-GEL/SF/CD-I 敷料的光滑表面 3 次, 得到 CTS-GEL/SF/CD-I/SA 敷料, 裁切, 包装, 钴 60 辐照灭菌, 即得。

实施例 15.烧创伤敷料样品 6 的制备

1)将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中, 配制成 5%的碘酒。将 5%的碘酒加入到 2%的聚乙烯吡咯烷酮溶液中, 超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体, 收集固体粉末备用;

2)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h, 加入 1mL 甘油, 机械搅拌 10min, 加入 10mL 5%的明胶溶液, 机械搅拌 10min 形成白色乳液, 取 10mL 2%壳聚糖溶液加入上述白色乳液中, 机械搅拌 30min 备用;

3)取步骤 1)所得物 1g 溶解在 5mL 去离子水里, 加入步骤 2)所得物中, 机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中, 4℃放置 1h, -20℃放置 4h, -70℃放置 6h, 冻干机冻干, 获得 CTS-GEL/SF/PP-I 海绵备用;

4)让 CTS-GEL/SF/PP-I 海绵充分吸收去离子水, -20℃放置 4h, 将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇, DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-GEL/SF/PP-I 海绵的光滑表面上, 冷冻 2 小时, 在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-GEL/SF/PP-I 敷料的光滑表面 3 次, 得到 CTS-GEL/SF/PP-I/SA 敷料, 裁切, 包装, 钴 60 辐照灭菌, 即得。

实施例 16.烧创伤敷料样品 7 的制备

1)将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中, 配制成质量分数为 5%的碘酒。将 2%的β-环糊精加热溶解, 将 5%的碘酒加入到β-环糊精溶液中, 超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体, 收集固体粉末备用;

2)取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h, 加入 1mL 甘油, 机械搅拌 10min, 加入 10mL 5%的聚乙烯醇溶液, 机械搅拌 10min 形成白色乳液, 取 10mL 2%壳聚糖溶液加入上述白色乳液中, 机械搅拌 30min 备用;

3)取步骤 1)所得物 1g 溶解在 5mL 去离子水里, 加入步骤 2)所得物中, 机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中, 4℃放置 1h, -20℃放置 4h, -70℃放置

6h, 冻干机冻干, 获得 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵备用;

4) 让 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵充分吸收去离子水, -20℃放置 4h, 将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇, DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-PVA/SF/CD-I 海绵的光滑表面上, 冷冻 2 小时, 在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-PVA/SF/CD-I 敷料的光滑表面 3 次, 得到 CTS-PVA/SF/CD-I/SA 敷料, 裁切, 包装, 钴 60 辐照灭菌, 即得。

实施例 17. 烧创伤敷料样品 8 的制备

1) 将单质碘溶解在 75%乙醇溶液中, 配制成质量分数为 5%的碘酒。将 5%的碘酒加入到 2%的聚乙烯吡咯烷酮溶液中, 超声 30min。旋转蒸发仪蒸干液体, 收集固体粉末备用;

2) 取 20mL 4%的丝素蛋白溶液经过 95℃加热处理 2h, 加入 1mL 甘油, 机械搅拌 10min, 加入 10mL 5%的聚乙烯醇溶液, 机械搅拌 10min 形成白色乳液, 取 10mL 2%壳聚糖溶液加入上述白色乳液中, 机械搅拌 30min 备用;

3) 取步骤 1) 所得物 1g 溶解在 5mL 去离子水里, 加入步骤 2) 所得物中, 机械搅拌 10min 后倒入 100×150mm 容器中, 4℃放置 1h, -20℃放置 4h, -70℃放置 6h, 冻干机冻干, 获得 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵备用;

4) 让 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵充分吸收去离子水, -20℃放置 4h, 将 8mL 硬脂酸溶液(40mmol/L 乙醇, DCC 作为脱水剂)均匀地浇在 CTS-PVA/SF/PP-I 海绵的光滑表面上, 冷冻 2 小时, 在 20℃条件下用无水乙醇冲洗 CTS-PVA/SF/PP-I 敷料的光滑表面 3 次, 得到 CTS-PVA/SF/PP-I/SA 敷料, 裁切, 包装, 钴 60 辐照灭菌, 即得。

实施例 18. 物理和结构表征

实施例 14-17 所制备的生物敷料样品有弹性, 可卷曲, 无异味。以烧创伤敷料样品 5 为代表, 进行大体结构观察, 并采用扫描电子显微镜进行微观结构观察。

如图 2 所示, 样品为相互连通的多孔道结构, 其孔隙率在 60%-80%之间。互相贯穿的孔道结构与体液接触后其孔隙结构迅速将体液吸入孔内, 吸水聚合物迅速凝胶化, 一方面使得孔道壁吸水后增厚并凝胶化, 管腔变窄, 管壁粘弹性增加; 另一方面迅速凝胶化敷料开始缓慢释放活力碘, 起到广谱抗菌和促进愈合的作用。

实施例 19. 物理性能表征

将实施例 14-17 中制备的烧创伤敷料样品的溶胀性能进行测试。

对实施例 14-17 中制备的烧创伤敷料样品吸水倍率进行测试：分别准确称取实施例 14-17 中的试样 0.1g，将其浸于去离子水(pH=7.0)、生理盐水、磷酸缓冲液、DMEM 培养基和血清液中，37°C 吸水完全溶胀，吸去表面水分，称取试样吸液后质量，计算样品的吸水倍率。吸水倍率 Q 计算公式如下： $Q=(M2-M1)/M1$ ，Q 为吸水(盐水)倍率，单位为 g/g；M1 为吸液前试样质量，单位为 g；M2 为吸液后试样质量，单位为 g。结果如表 7 所示，烧创伤敷料样品 5-8 表现出相近的吸水性。

以实施例 14 制备的烧创伤敷料样品 5 为例，其在不同介质中的吸水倍率：在去离子水中的吸水倍率为 14~16；在盐水中吸水倍率为 12~14；在磷酸缓冲液中的吸水倍率为 9~11；在细胞培养液中的吸水倍率为 7~10；在血清中的吸水倍率为 5~7。

表 7 不同介质吸水倍率

材料	去离子水	生理盐水	PBS	DMEM	血清
实施例14样品	15± 1.21	13 ± 1.14	10±1.43	8 ± 1.17	6 ± 1.21
实施例15样品	17 ±1.31	15 ± 1.51	13±1.12	10 ± 1.21	7± 1.46
实施例16样品	14± 1.35	11 ± 1.32	8±1.65	7 ± 1.41	5± 1.83
实施例17样品	18 ± 1.34	16 ± 1.68	13±1.71	11 ±1.54	6 ± 1.45

将实施例 14-15 获得的烧创伤敷料进行保湿性能检测，其保湿时间比对照组长，保湿时间在 15 小时以上。

将实施例 14-15 制备的烧创伤敷料进行碘缓释功能测试，分别准确称取实施例 5-8 中的试样 0.1g，37°C 将其浸于生理盐水中，于 2h、4h、8h、12h、24h、36h、48h、60h 和 72h 分别用电感耦合等离子光谱发生仪检测生理盐水释放碘的含量，结果如表 8 所示。

表 8 碘缓释功能评价

缓释时间（小时）	碘的含量(%)	
	实施例 5 样品	实施例 6 样品
2	18.6±1.87	21.87±3.75

4	24.27±2.82	27.66±3.42
8	27.98±2.25	30.9±5.1
12	28.37±3.23	34.66±5.65
24	30.5±3.72	41.43±1.58
36	32.53±2.99	43.96±3.6
48	34.2±3.15	49.6±3.14
60	39.61±4.2	55.33±4.72
72	42.57±3.87	57.86±5.16

实施例 20.体外广谱抗氧化性能实验

将实施例 14-17 中制备的烧创伤敷料样品其广谱抗氧化能进行测试, 结果如表 9 所示。将实施例 14-17 中样品、谷胱甘肽溶液和水与含有超氧阴离子、羟基自由基和 H_2O_2 的溶液进行反应, 用超氧阴离子测试试剂盒、羟基自由基测试试剂盒和过氧化氢定量分析试剂盒检验 6 组样品分别清除超氧阴离子、羟基自由基和 H_2O_2 的能力。实验结果表明, 实施例 14-17 中的样品和谷胱甘肽有良好的抗氧化作用。

表 9 样品的广谱抗氧化能力

试样	清除率			
	羟基自由基清除率(%)	过氧化氢清除率(%)	超氧阴离子清除率(%)	氧化物清除率(%)
加热丝素蛋白	61.2	85.6	64.6	80.6
丝素蛋白	58.6	82.3	58.1	73.1
实施例样品1	43.6	66.5	50.3	60.7
实施例样品2	42.7	58.3	41.6	56.6
实施例样品3	28.7	50.6	39.8	42.3
实施例样品4	36.6	41.6	30.6	38.4
谷胱甘肽	76.6	39.1	38.1	37.1
H_2O	0	0	0	0

实施例 21.体外广谱抗菌性能实验

将实施例 14-17 制备的烧创伤敷料的抗菌活性通过抑菌环法进行测试。

使用金黄色葡萄球菌、耐药型金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、耐药型铜绿假单胞菌和白色念珠菌进行敷料的抗菌活性评估。将 70 μ L 细菌悬浮液 (1 \times 10⁸ CFU/mL) 铺在 LB 琼脂平板上, 将无菌纱布、含碘纱布、实施例 14-17 制备的烧创伤敷料放在琼脂表面, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12h 后, 测得抑菌环的直径。表 10 显示了 6 种敷料对 6 种菌株(白色念珠菌, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌, 金黄色葡萄球菌耐药菌株和铜绿假单胞菌耐药菌株)的杀伤作用。

表 10 抗菌效果评价

材料	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌	金黄色葡萄球菌(耐药)	铜绿假单胞菌(耐药)
无菌纱布	—	—	—	—	—	—
含碘纱布	++	++	++	++	++	++
实施例 14 样品	+	+	+	+	+	+
实施例 15 样品	+	+	+	+	+	+
实施例 16 样品	+	+	+	+	+	+
实施例 17 样品	+	+	+	+	+	+

注: 不抗菌用“—”; 抗菌用“+”表示, 其中抑菌圈直径大于 3mm 用“++”表示

实施例 22. 感染性伤口愈合效应体内评估

深圳湾实验室动物伦理委员会批准体内动物实验。

将 120 只 BALB/c 小鼠, 雄性, 每只约重 18g \pm 2g, 随机分为 6 组(每组 20 只小鼠)。腹腔注射戊巴比妥钠(20mg/kg)麻醉小鼠, 脱除皮毛, 在每只小鼠背部做成 Φ 1cm 全层皮肤损伤, 创面上滴加浓度为 1 \times 10⁸CFU 的铜绿假单胞菌菌液, 每个创面 80 μ l, 形成感染创面。分别用本发明实施例 14-17 中的样品、含碘纱布和无菌纱布紧密覆盖创面。每周进行 2 次更换。通过 BALB/c 小鼠感染创面修复情况, 对本发明抗氧化抗菌促愈合烧创伤敷料进行伤口愈合效应的评价。6 种敷料治疗下的创面均有不同程度的结痂, 并且创面开始收缩。

治疗结果如表 11 所示, 创伤后第 3 天, 本发明实施例 14-17 样品伤口愈合分别达到 50.42 \pm 2.23、43.32 \pm 1.21、48.56 \pm 2.13 和 40.52 \pm 1.34, 含碘纱布和纱布组仅达到

19.34±1.32 和 28.23±1.08。实施例 14-17 样品治疗组创面边缘未见红肿发生，含碘纱布组创面边缘红肿，纱布组仍可见部分感染渗出物。通过对小鼠创伤后第 7 天创面的观察我们发现，实施例 14-17 样品治疗组愈合率在 67.43±2.12~79.73±1.24。而含碘纱布与创面粘连严重，创面边缘红肿明显。纱布组肉芽生长明显，仍存在部分炎性渗出物。术后第 12 天，实施例 14 样品治疗组最佳可以达到 99.01±1.31，实施例 15-17 样品治疗组分别为 93.24±1.12、95.41±1.36 和 90.47±1.67，而含碘纱布组仅仅是 67.02±1.41，这可能是在消除感染后，过量的碘对伤口造成损伤。

表 11 感染性创面的创面愈合率

试样	愈合率			
	0d	3d	7d	12d
纱布	0	28.23±1.08	42.47±2.45	83.54±1.78
含碘纱布	0	19.34±1.32	36.42±1.43	67.02±1.41
实施例 14 样品	0	50.42±2.23	79.73±1.24	99.01±1.31
实施例 15 样品	0	43.32±1.21	68.25±1.67	93.24±1.12
实施例 16 样品	0	48.56±2.13	74.42±1.21	95.41±1.36
实施例 17 样品	0	40.52±1.34	67.43±2.12	90.47±1.67

结果表明，六组的愈合率具有显著的统计学差异(Table1 $p<0.01$)，实施例 14-17 样品治疗组最佳，纱布组次之，含碘纱布较差。其中实施例 14 制备的敷料修复的创面收缩较为明显，治疗效果最佳。

权利要求书

1. 具有高强度广谱抗氧化作用的改性丝素蛋白，其特征在于，所述改性丝素蛋白为部分去除钙或完全去除钙的丝素蛋白。

2. 用于改性丝素蛋白的试剂，其特征在于，所述试剂为钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸。

3. 根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述钙的螯合剂为EDTA及其衍生物、EGTA AM及其衍生物、BAPTA及其衍生物。

4. 根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述能与钙发生螯合作用的氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

5. 根据权利要求2所述的试剂，其特征在于，所述试剂还包括中性盐溶液。

6. 根据权利要求5所述的试剂，其特征在于，所述中性盐溶液为溴化锂溶液、氯化钙三元液、硫氰酸锂溶液、氯化锌溶液中的任一种或几种。

7. 运用权利要求6所述的试剂提升丝素蛋白广谱抗氧化作用的方法，其特征在于，用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除，所述丝素蛋白来源于蚕茧、生丝或熟丝中的任一种或几种。

8. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于，用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除，再用所述中性盐溶液充分反应；

或用所述中性盐溶液与丝素蛋白和/或丝素纤维充分反应后，再用所述钙的螯合剂将丝素蛋白和/或丝素纤维中的钙部分去除或者完全去除。

9. 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，用所述钙的螯合剂处理丝素纤维后，用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维获得的高强度广谱抗氧化作用丝素蛋白溶液；

或用所述溴化锂溶液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液，再用所述钙的螯合剂处理溴化锂提取的丝素蛋白溶液；

或用所述氯化钙三元液溶解丝素纤维制备的丝素蛋白溶液，再用所述钙的螯合剂处理氯化钙提取的丝素蛋白溶液。

10. 权利要求1所述的改性丝素蛋白的制备方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

S1：用权利要求6所述氯化钙三元液和/或溴化锂溶液溶解丝素纤维，经过除盐得到丝素蛋白溶液；

S2：将权利要求2所述钙的螯合剂加入S1所得的丝素蛋白溶液中充分反应，除盐处理后得到低钙或者无钙的丝素蛋白溶液。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，S1 中所述氯化钙三元液为氯化钙、无水乙醇和水以摩尔比为 1: 1~5: 1~20 的比例配制而成。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，S1 中溴化锂浓度为 1-20M。

13. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于，S2 所述钙的螯合剂为 EDTA 或其衍生物，浓度为 0.1~500mM。

14. 权利要求 1 所述的改性丝素蛋白在制备治疗或检测氧化应激导致的急性和慢性炎症疾病中的药物和设备中的应用。

15. 根据权利要求 14 所述的应用，其特征在于，所述设备为可穿戴设备。

16. 含有权利要求 1 所述的改性丝素蛋白制备的药学上可接受的载体的制剂。

17. 根据权利要求 16 所述的制剂，其特征在于，所述制剂为喷剂、水凝胶、支架、药物载体。

18. 用于制备烧创伤敷料的组合物，其特征在于，所述组合物由丝素蛋白和骨架按照 1: 2~10 的质量比组成；所述骨架为壳聚糖-吸水聚合物骨架；所述壳聚糖和吸水聚合物按照 1: 0.1~5 的质量比组成。

19. 用于制备烧创伤敷料的组合物，其特征在于，所述组合物由丝素蛋白、骨架和活力碘按照 1:0.5~2:0.1~10 的质量比组成；所述骨架由壳聚糖和吸水聚合物按照 1:0.1~5 的质量比组成；所述活力碘由单质碘和碘的缓释材料组成。

20. 根据权利要求 18 所述的组合物和/或权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，所述丝素蛋白为天然丝素蛋白和/或改性丝素蛋白；所述改性丝素蛋白选自部分去除或完全去除钙的丝素蛋白、加热处理的丝素蛋白及其衍生物、紫外照射的丝素蛋白及其衍生物、有机溶剂处理的丝素蛋白及其衍生物中的任一种或几种。

21. 根据权利要求 18 所述的组合物和/或权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，所述吸水聚合物选自天然吸水聚合物和/或人工合成吸水聚合物，所述天然吸水聚合物选自胶原、明胶、纤维素及其衍生物，所述工合成吸水聚合物选自聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠或聚乙烯醇。

22. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于，所述单质碘的缓释材料选自聚合物材料和/或小分子材料，所述聚合物材料包括淀粉、纤维素及其衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇，所述小分子材料包括 α -环糊精、 β -环糊精和 γ -环糊精。

23. 含有权利要求 18 所述组合物的制备烧创伤敷料的制剂组合物，其特征在于，所述制剂组合物由丝素蛋白、骨架和辅料按照 1: 2~10: 0.1~5 的质量比组成；所述辅料为增塑剂和/或乳化剂。

24. 含有权利要求 19 所述组合物的制备烧创伤敷料的制剂组合物，其特征在于，所述制剂组合物由丝素蛋白、骨架、活力碘和辅料按照 1:0.5~2:0.1~10 的质量比组成；所述辅料为增塑剂和/或乳化剂。

25. 用权利要求 18 所述的组合物或权利要求 23 所述的制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

S1：制备丝素蛋白；

S2：将 S1 所得物与骨架和辅料混合。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其特征在于，在 S2 之后还包括 S3：将 S2 所得物用硬脂酸改性。

27. 根据权利要求 25 所述的方法，其特征在于，S1 制备过程中加入了钙的螯合剂或能与钙发生螯合作用的氨基酸；所述钙的螯合剂为 EDTA 及其衍生物、EGTA AM 及其衍生物、BAPTA 及其衍生物；所述能与钙发生螯合作用的氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

28. 用权利要求 25-27 所述制备生物敷料的方法获得的烧创伤敷料。

29. 根据权利要求 28 所述的烧创伤敷料，其特征在于，所述烧创伤敷料为多孔结构，其孔隙率为 55%~80%，其孔径大小为 0.5mm~2mm。

30. 根据权利要求 28 所述的烧创伤敷料，其特征在于，所述烧创伤敷料的吸水倍率为 15~20 倍；其吸水倍率可用如下公式计算： $Q=(M2-M1)/M1$ ；Q 为吸水倍率，单位为 g/g；M1 为吸液前试样质量，单位为 g；M2 为吸液后试样质量，单位为 g。

31. 根据权利要求 30 所述的烧创伤敷料，其特征在于，所述烧创伤敷料在不同介质中的吸水倍率为：在去离子水中的吸水倍率 15~19；在盐水中吸水倍率 13~16；在磷酸缓冲液中的吸水倍率 11~14；在细胞培养液中的吸水倍率 8~13；在血清中的吸水倍率 4~9。

32. 用权利要求 28-31 所述的烧创伤敷料吸附液体的方法，其特征在于，用所述烧创伤敷料对液体进行吸附，所述液体进入所述烧创伤敷料的孔隙结构，使所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无。

33. 含有权利要求 32 所述方法的对微生物进行阻隔的方法，其特征在于，用所述烧创伤敷料对所述流体进行吸附，所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无后将微生物隔绝在外。

34. 用权利要求 19 所述的组合物或权利要求 24 所述的制剂组合物制备烧创伤敷料的方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

S1: 制备改性丝素蛋白和活力碘;

S2: 将 S1 所得物与骨架和辅料混合。

35. 根据权利要求 34 所述的方法, 其特征在于, 在 S2 之后还包括 S3: 将 S2 所得物用硬脂酸改性。

36. 根据权利要求 34 所述的方法, 其特征在于, S1 制备过程中加入了钙的螯合剂或能和钙发生螯合作用的氨基酸; 所述钙的螯合剂为 EDTA 及其衍生物、EGTA AM 及其衍生物、BAPTA 及其衍生物; 所述能和钙发生螯合作用氨基酸包括谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺氨酸、精氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、甘氨酸、丝氨酸、缬氨酸、组氨酸、异亮氨酸和半胱氨酸及其衍生物中的任一种或几种。

37. 用权利要求 34-36 所述制备烧创伤敷料的方法获得的烧创伤敷料。

38. 根据权利要求 37 所述的烧创伤敷料, 其特征在于, 所述烧创伤敷料为多孔结构, 其孔隙率为 55%~80%, 其孔径大小为 0.5~2mm。

39. 根据权利要求 37 所述的烧创伤敷料, 其特征在于, 所述烧创伤敷料的吸水倍率为 1~20 倍; 其吸水倍率可用如下公式计算: $Q=(M2-M1)/M1$; Q 为吸水倍率, 单位为 g/g; M1 为吸液前试样质量, 单位为 g; M2 为吸液后试样质量, 单位为 g。

40. 根据权利要求 39 所述的烧创伤敷料, 其特征在于, 所述烧创伤敷料在不同介质中的吸水倍率为: 在去离子水中的吸水倍率 14~16; 在盐水中吸水倍率为 12~14; 在磷酸缓冲液中的吸水倍率为 9~11; 在细胞培养液中的吸水倍率为 7~10; 在血清中的吸水倍率为 5~7。

41. 用权利要求 37-40 所述的烧创伤敷料吸附液体的方法, 其特征在于, 用所述烧创伤敷料对液体进行吸附, 所述液体进入所述烧创伤敷料的孔隙结构, 使所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无。

42. 含有权利要求 41 所述方法的对微生物进行阻隔的方法, 其特征在于, 用所述烧创伤敷料对所述流体进行吸附, 所述烧创伤敷料孔道壁增厚并凝胶化使管腔变无后将微生物隔绝在外。

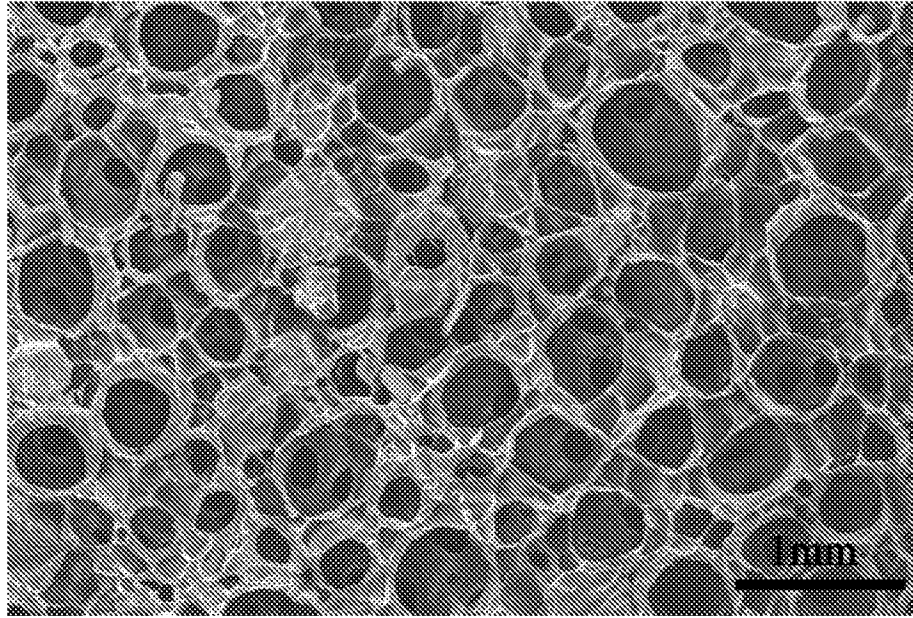


图 1

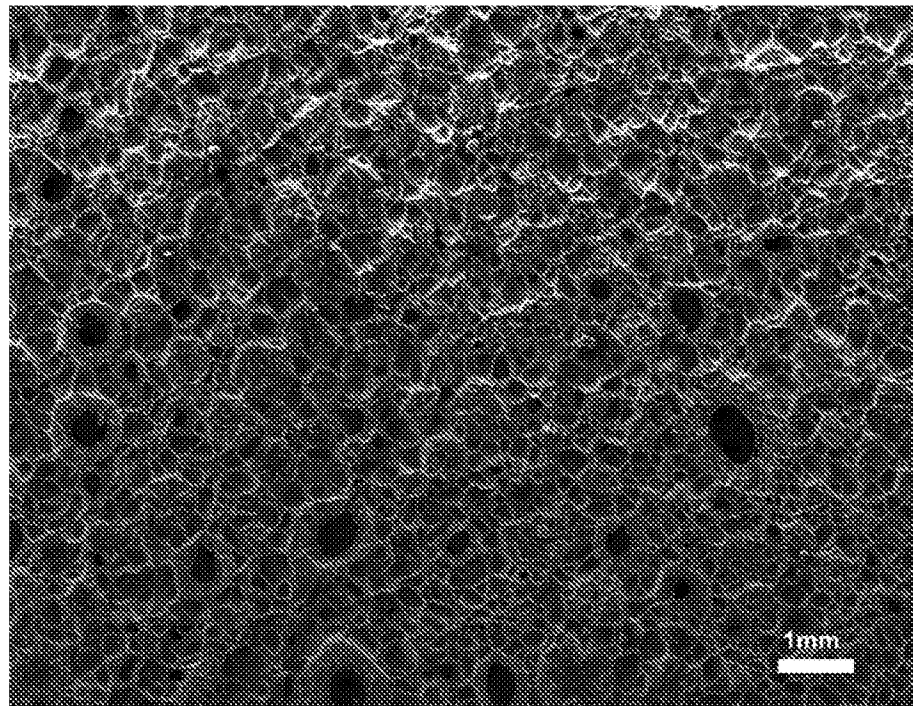


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/089182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C08H 1/00(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i; A61L 26/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 39/06(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) C08H; A61K; A61L; A61P		
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) CNTXT, CNABS, CNKI, VEN, DWPL, WOTXT, USTXT, PUBMED, ISI Web of Science, 万方数据, Wanfang Data, 深圳湾实验室, 彭琴, 邱菊辉, 钱智勇, 丝素蛋白, 抗氧化, 氧化应激, 脱钙, 除钙, 氨基酸, 螯合, 乙二胺四乙酸, 氯化钙, 溴化锂, 单质碘, 壳聚糖, 硬脂酸, 创伤, 敷料, 多孔, 孔隙, silk fibroin, antioxidant, decalcium, calcium, amino acid, chelating, EDTA, lithium bromide, calcium chloride, iodine, chitosan, stearic acid, dressing, film, porous		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110903374 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY) 24 March 2020 (2020-03-24) description, paragraphs [0011]-[0015]	1-3, 5-6, 10-13, 16-17
Y	CN 110903374 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY) 24 March 2020 (2020-03-24) description, paragraphs [0011]-[0015]	7-9, 14-15, 20, 27, 34, 36
X	CN 1566086 A (WU, Qiong) 19 January 2005 (2005-01-19) description, page 5 lines 1-16	2, 4
Y	包立军等 (BAO, Lijun et al.). "水解方式对黄茧蚕丝多肽抗氧化的活性的影响 (Studies on Polypeptide Antioxidant Activity of Natural Yellow Cocoon by Different Hydrolysis Methods)" <i>食品研究与开发 (Food Research and Development)</i> , Vol. 38, No. (17), 30 September 2017 (2017-09-30), pages 14-16, 30	7-9, 14-15
Y	CN 101700409 A (YU, Zhending) 05 May 2010 (2010-05-05) description, paragraphs [0004]-[0034]	18-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2023		Date of mailing of the international search report 19 January 2023
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/CN2022/089182

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 110152051 A (FEILINGHE (BEIJING) INVESTMENT MANAGEMENT CO., LTD.) 23 August 2019 (2019-08-23) description, paragraphs [0006], [0017], [0039]-[0045]	18-42
Y	CN 110975000 A (BEIHANG UNIVERSITY) 10 April 2020 (2020-04-10) description, paragraph [0028]	26, 35
A	刘珍珠等 (LIU, Zhenzhu et al.). "可溶性丝素蛋白新型脱盐工艺研究 (New Desalination Process Research on Soluble Silk Fibroin)" <i>水处理技术 (Technology of Water Treatment)</i> , Vol. 43, No. (4), 30 April 2017 (2017-04-30), pp. 62-65	1-42

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **32, 33, 41, 42**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 32 and 41 relate to a method for adsorbing liquid with a burn wound dressing, and claims 33 and 42 relate to a method for blocking microorganisms. The subject matter of said claims relates to a method for treatment of diseases, and therefore said claims do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present search report is provided on the basis of said claims being amended to relevant preparation use claims.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN2022/089182

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110903374	A	24 March 2020	None			
CN	1566086	A	19 January 2005	None			
CN	101700409	A	05 May 2010	None			
CN	110152051	A	23 August 2019	CN	110152051	B	08 October 2021
CN	110975000	A	10 April 2020	None			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C08H 1/00(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i; A61L 26/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 39/06(2006.01)i</p> <p>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</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C08H; A61K; A61L; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNXTX, CNABS, CNKI, VEN, DWPI, WOTXT, USTXT, PUBMED, ISI Web of Science, 万方数据, 深圳湾实验室, 彭琴, 邱菊辉, 钱智勇, 丝素蛋白, 抗氧化, 氧化应激, 脱钙, 除钙, 氨基酸, 螯合, 乙二胺四乙酸, 氯化钙, 溴化锂, 单质碘, 壳聚糖, 硬脂酸, 创伤, 敷料, 多孔, 孔隙, silk fibroin, antioxidant, decalcium, calcium, amino acid, chelating, EDTA, lithium bromide, calcium chloride, iodine, chitosan, stearic acid, dressing, film, porous</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段</td> <td>1-3, 5-6, 10-13, 16-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段</td> <td>7-9, 14-15, 20, 27, 34, 36</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1566086 A (吴琼) 2005年1月19日 (2005 - 01 - 19) 说明书第5页第1-16行</td> <td>2, 4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>包立军等, “水解方式对黄茧蚕丝多肽抗氧化的活性的影响,” 食品研究与开发, 第38卷, 第17期, 2017年9月30日 (2017 - 09 - 30), 第14-16、30页</td> <td>7-9, 14-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101700409 A (余振定) 2010年5月5日 (2010 - 05 - 05) 说明书第[0004]-[0034]段</td> <td>18-42</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110152051 A (非零和北京投资管理有限公司) 2019年8月23日 (2019 - 08 - 23) 说明书第[0006]、[0017]、[0039]-[0045]段</td> <td>18-42</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段	1-3, 5-6, 10-13, 16-17	Y	CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段	7-9, 14-15, 20, 27, 34, 36	X	CN 1566086 A (吴琼) 2005年1月19日 (2005 - 01 - 19) 说明书第5页第1-16行	2, 4	Y	包立军等, “水解方式对黄茧蚕丝多肽抗氧化的活性的影响,” 食品研究与开发, 第38卷, 第17期, 2017年9月30日 (2017 - 09 - 30), 第14-16、30页	7-9, 14-15	Y	CN 101700409 A (余振定) 2010年5月5日 (2010 - 05 - 05) 说明书第[0004]-[0034]段	18-42	Y	CN 110152051 A (非零和北京投资管理有限公司) 2019年8月23日 (2019 - 08 - 23) 说明书第[0006]、[0017]、[0039]-[0045]段	18-42
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段	1-3, 5-6, 10-13, 16-17																					
Y	CN 110903374 A (重庆医科大学) 2020年3月24日 (2020 - 03 - 24) 说明书第[0011]-[0015]段	7-9, 14-15, 20, 27, 34, 36																					
X	CN 1566086 A (吴琼) 2005年1月19日 (2005 - 01 - 19) 说明书第5页第1-16行	2, 4																					
Y	包立军等, “水解方式对黄茧蚕丝多肽抗氧化的活性的影响,” 食品研究与开发, 第38卷, 第17期, 2017年9月30日 (2017 - 09 - 30), 第14-16、30页	7-9, 14-15																					
Y	CN 101700409 A (余振定) 2010年5月5日 (2010 - 05 - 05) 说明书第[0004]-[0034]段	18-42																					
Y	CN 110152051 A (非零和北京投资管理有限公司) 2019年8月23日 (2019 - 08 - 23) 说明书第[0006]、[0017]、[0039]-[0045]段	18-42																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年1月12日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年1月19日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>于莉</p> <p>电话号码 (86-10)-53961883</p>																					

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
Y	CN 110975000 A (北京航空航天大学) 2020年4月10日 (2020 - 04 - 10) 说明书第[0028]段	26, 35
A	刘珍珠等, . “可溶性丝素蛋白新型脱盐工艺研究, ” 水处理技术, , 第43卷, 第4期, 2017年4月30日 (2017 - 04 - 30), 第62-65页	1-42

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 32, 33, 41, 42
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求32和41涉及用烧创伤敷料吸附液体的方法，权利要求33和42涉及对微生物进行阻隔的方法。上述权利要求的主题涉及疾病的治疗方法，不符合PCT细则第39.1(iv)的规定。本检索报告是基于其修改为相关的制备用途权利要求基础上作出的。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/089182

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	110903374	A	2020年3月24日	无	
CN	1566086	A	2005年1月19日	无	
CN	101700409	A	2010年5月5日	无	
CN	110152051	A	2019年8月23日	CN	110152051 B 2021年10月8日
CN	110975000	A	2020年4月10日	无	