

(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
2021 年 6 月 17 日 (17.06.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/114005 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61L 15/28 (2006.01) A61L 15/42 (2006.01)
A61L 15/40 (2006.01) A61L 15/44 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/122412
- (22) 国际申请日: 2019 年 12 月 2 日 (02.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 陈敬华(CHEN, Jinghua); 中国江苏省无
锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122
(CN)。 杨漾(YANG, Yang); 中国江苏省无锡市滨
湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
纪倩(JI, Qian); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖

大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 张燕燕
(ZHANG, Yanyan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡
湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 戴雨
桐(DAI, Yutong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501
张勇, Heilongjiang 150028 (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,

(54) Title: METHOD OF PREPARING AMNION-SPONGY CHITOSAN COMPOSITE DOUBLE-LAYER WOUND DRESSING

(54) 发明名称: 一种羊膜-海绵状壳聚糖复合双层伤口敷料的制备方法

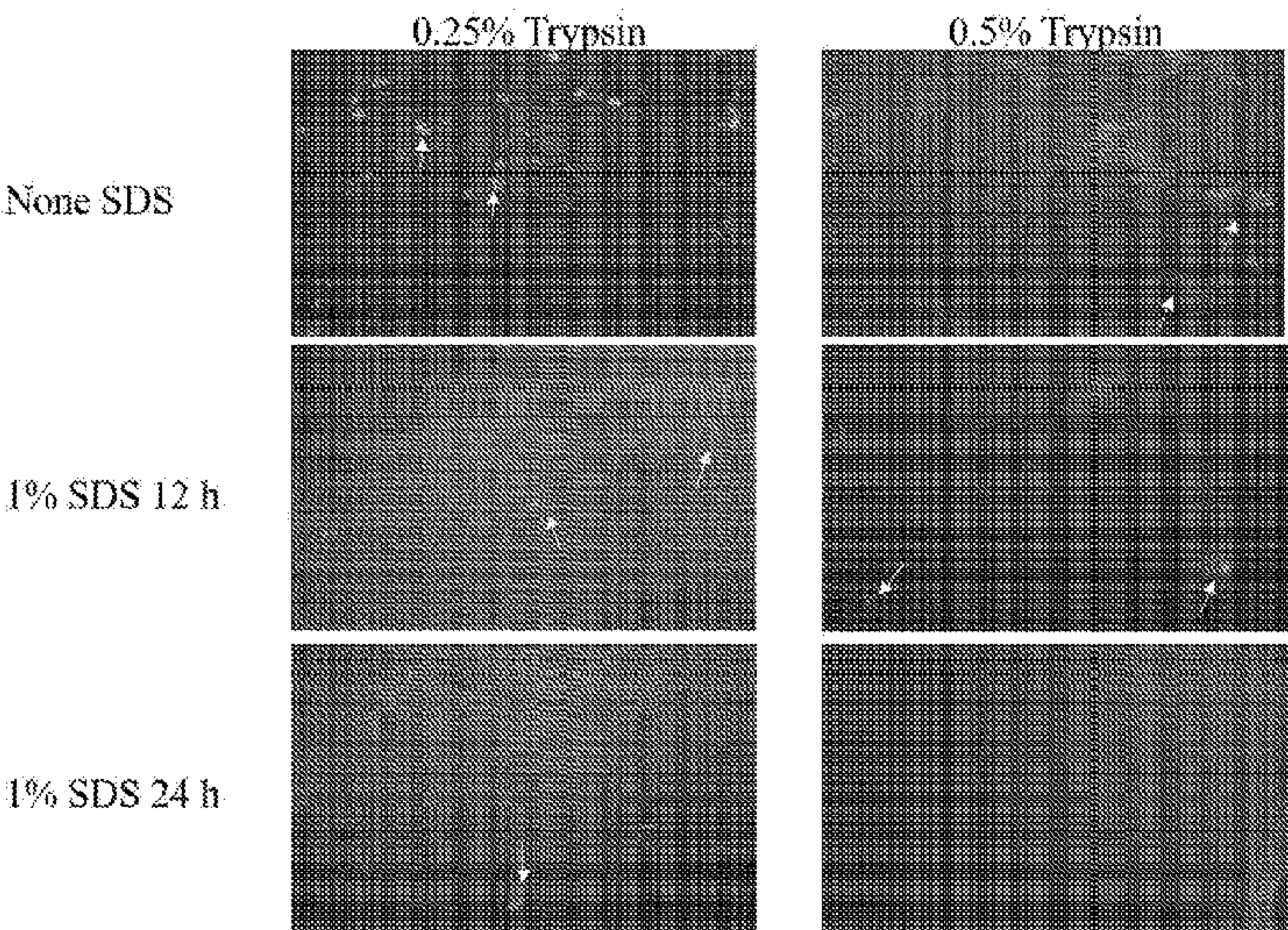


图 1

(57) Abstract: The present disclosure relates to a method of preparing an amnion-sponge chitosan composite double-layer wound dressing, and belongs to the technical field of medical dressings. The amnion-spongy chitosan composite double-layer wound dressing is prepared by combining an amnion dressing and a spongy chitosan with excellent antibacterial and swelling properties using a cross-linking method. The wound healing rate of the dressing on the 8th day of mice can reach 87.67%, and the skin thickness of mice wound tissue reached 693.9233μm. In addition, the dressing increased the concentration of hemoglobin from 72.8g/L in the amnion group to 685.39g/L, the swelling coefficient from 300% in the amnion group to 800%; and the tensile stress and nominal strain of the dressing to 1.14-2.29MPa and 6.34-6.97%. While satisfying the filling effect of deeper wounds, the dressing quickly absorbs wound exudate, prevents wound infection, maintains moist environment on the wound surface and improves wound healing.

WO 2021/114005 A1

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))。

(57) 摘要：一种羊膜-海绵状壳聚糖复合双层伤口敷料的制备方法，属于医用敷料技术领域。利用交联法将羊膜敷料及具有抗菌、溶胀性能优异的海绵状壳聚糖进行组合，制备羊膜-壳聚糖复合双层创面敷料，该敷料在第8d的小鼠创伤愈合率可达87.67%，小鼠伤口组织皮肤厚度达到693.9233μm；此外，该敷料将血红蛋白的富集浓度由羊膜组的72.8g/L提升至685.39g/L；将溶胀系数由羊膜组的300%提升至800%；将敷料的拉伸应力及标称应变增加至1.14~2.29MPa和6.34~6.97%，在满足较深伤口填充效果的同时，快速吸收创面渗出液，防止伤口感染，保持创面的湿润环境并促进创面愈合。

一种羊膜-海绵状壳聚糖复合双层伤口敷料的制备方法

技术领域

本发明涉及一种羊膜-海绵状壳聚糖复合双层伤口敷料的制备方法，属于医用敷料技术领域。

背景技术

羊膜是一种常见的伤口敷料，其优点在于能够较好地覆盖伤口，保持伤口湿润环境，同时富含多糖、胶原蛋白、生长因子等有效成分，有益于细胞的增殖分化和伤口的恢复。但是其对于较深的伤口难以进行填充，同时不能快速的吸收伤口渗出液。

壳聚糖(chitosan)又称脱乙酰甲壳素，是由自然界广泛存在的几丁质(chitin)经过脱乙酰作用得到的，因其具有生物官能性和相容性、血液相容性、安全性以及微生物降解性等优良性能，被广泛用于医药、化妆品、化工等各领域中。壳聚糖海绵敷料具有抗菌，溶胀率高等优点，但海绵状敷料的缺点为机械性能差、脆性大等缺点，易于创面发生黏连，需要反复清创，不利于创面恢复。

医用敷料作为伤口处的覆盖物，在伤口的愈合过程中，可代替受损的皮肤起到暂时性屏障作用，提供创面愈合环境，避免伤口感染，是临床中广泛使用的医疗器械用品。目前临床中使用的敷料种类繁多，包括羊膜、动物皮、胶原、壳聚糖、海藻酸等，但仅仅作为单一敷料进行使用，难以兼顾快速愈合较深伤口、吸收创面渗液、促进创面恢复等各方面的效用。因此，寻找一种理想、优质的生物敷料已成为医用敷料临床研究和应用中的重中之重。

发明内容

针对现有的技术难点及存在的问题，本发明提供了一种新型羊膜-壳聚糖复合双层敷料及其制备方法。

本发明的第一个目的是提供一种羊膜-壳聚糖复合双层敷料，所述敷料是将壳聚糖与交联剂溶液加入到羊膜上制备而成。

在一种实施例中，所述羊膜-壳聚糖复合双层敷料的羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1: (1~3): (0.2~0.6)。

在一种实施方式中，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:1:0.2。

在一种实施方式中，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:2:0.4。

在一种实施方式中，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:3:0.6。

本发明的第二个目的是提供一种羊膜-壳聚糖复合双层敷料的制备方法，包括如下步骤：

(1) 将羊膜进行脱细胞处理：新鲜羊膜用去离子水漂洗干净，然后浸于 0.25%~0.5%胰酶溶液中，搅拌 1~3 小时，用去离子水洗净后，在 1%的 SDS 水溶液处理 12 小时~24 小时，获得下层敷料；

(2) 将脱细胞羊膜：壳聚糖：交联剂 PEGDGE 按照 1：(1~3)：(0.2~0.6)，(m/m/m) 的比例，将壳聚糖与交联剂溶液加入至步骤 (1) 制备的脱细胞处理后的羊膜上，冻干；

(3) 将步骤 (2) 冻干后的双层膜转移至 30-80℃环境中，继续反应 6 小时，使双层膜固相交联。

在一种实施方式中，所述步骤 (2) 中壳聚糖的浓度为 10~30 mg/mL。

在一种实施方式中，所述壳聚糖溶液是将壳聚糖溶于浓度为 0.5~2%的醋酸溶液中，使壳聚糖的浓度达 10~30 mg/mL。

在一种实施方式中，所述壳聚糖溶液与交联剂混合后加入至羊膜表面。

本发明还要求保护所述双层敷料在外科伤口处理中的应用。

本发明还要求保护所述双层敷料的制备方法在生产医用敷料中的应用。

本发明的有益效果：

本发明利用交联法将对伤口有益的羊膜敷料及具有抗菌、溶胀性能优异的海绵状壳聚糖进行组合，制备一种述羊膜-壳聚糖复合双层创面敷料，该敷料在第 8d 的小鼠创伤愈合率可达 87.67%，小鼠伤口组织皮肤厚度达到 693.9233 μ m，显著高于对照组和药物组；此外，该敷料将血红蛋白的富集浓度由羊膜组的 72.8 g/L 提升至 685.39g/L；将敷料的溶胀系数由羊膜组的 300%提升至 800%；单侧壳聚糖海绵敷料的拉伸应力及标称应变仅为 0.29 MPa 及 2.6 %，而复合双层膜的拉伸应力及标称应变分别为 2.29MPa 及 6.97 % (M1-1)，1.14 MPa 及 6.34 % (M1-3)，在较好的满足较深伤口填充效果的同时，能够快速吸收创面渗出液，防止伤口感染，保持创面的湿润环境并促进创面愈合。

附图说明

图 1 为脱细胞羊膜 DAPI 染色结果；

图 2 为双层敷料合成流程示意图；

图 3 为双层敷料产品示意图；

图 4 为双层敷料双层辅料电子显微镜扫描表征示意图：其中 (1) 羊膜表面的扫描电镜图谱；(2) 壳聚糖表面的扫描电镜图谱；(3) M1-1 截面扫描电镜图谱；(4) M1-3 截面扫描电镜图谱；

图 5 为各组小鼠伤口愈合比较：其中 (1) 小鼠伤口愈合情况直观图；(2) 小鼠伤口愈合

率统计图；(3) 小鼠皮肤厚度统计图；

图 6 为各敷料促凝血功能、止血能力和溶胀性能比较：其中(1) 各敷料促凝血功能比较；(2) 各敷料止血能力比较；(3) 各敷料在 0~60min 的溶胀性能比较；(4) 各敷料在 0~720min 的溶胀性能比较。

图 7 为各敷料拉伸应力及标称应变比较。

具体实施方式

在不做特别说明的情况下，实施例中涉及的浓度(m/v)均指质量体积浓度，即每 100 mL 溶液中含有按质量(g)计的化合物，例如 2%(m/v)表示 2 g/100 mL。

实施例 1 羊膜的脱细胞条件的优化

采用四种条件分别对羊膜进行脱细胞处理。将新鲜羊膜用去离子水漂洗干净，然后将羊膜浸于 0.25%或 0.5%胰酶溶液中，搅拌 2 小时，用去离子水洗净后，在 1%的 SDS 水溶液处理 12 小时或 24 小时。处理后用去离子水充分清洗羊膜，自然风干后，利用 DAPI 进行染色，DAPI 染色结果见图 1。通过对 DNA 残留量的观察可以发现，当采用 0.5%胰酶处理 2 小时后，再用 1%SDS 处理 24 小时，羊膜中的细胞被高效彻底地去除，因此选择 0.5%胰酶处理 2 小时结合 1%SDS 处理 24 小时作为羊膜的脱细胞条件。

实施例 2 双层敷料的合成

双层敷料合成流程图见图 2。具体步骤如下：将脱细胞后羊膜剪成 3 cm×10 cm 的长方形置于模具中，将壳聚糖溶于 1%的醋酸水溶液中配制成 20mg/ml 的溶液，分别按照羊膜：壳聚糖：交联剂 PEGDGE 以 1:1:0.2 (m/m/m) 的质量比例，将壳聚糖与交联剂溶液加入羊膜上，制备厚度不同的双层膜 M1-1, M1-3，放于-80℃冷冻后，冻干。冻干后将模具转移至 40℃烘箱中，继续反应 6 小时。最终得到交联的双层敷料 M1-1。

实施例 3 双层敷料的合成

将脱细胞后羊膜剪成 3 cm×10 cm 的长方形置于模具中，将壳聚糖溶于 1%的醋酸水溶液中配制成 20mg/ml 的溶液，分别按照羊膜：壳聚糖：交联剂 PEGDGE 以 1:2:0.4 (m/m/m) 的质量比例，将壳聚糖与交联剂溶液加入羊膜上，制备厚度不同的双层膜 M1-1, M1-3，放于-80℃冷冻后，冻干。冻干后将模具转移至 40℃烘箱中，继续反应 6 小时。最终得到交联的双层敷料 M1-2。

实施例 4 双层敷料的合成

将脱细胞后羊膜剪成 3 cm×10 cm 的长方形置于模具中，将壳聚糖溶于 1%的醋酸水溶液中配制成 20mg/ml 的溶液，分别按照羊膜：壳聚糖：交联剂 PEGDGE 以 1:3:0.6 (m/m/m) 的

质量比例,将壳聚糖与交联剂溶液加入羊膜上,制备厚度不同的双层膜 M1-1, M1-3,放于-80℃冷冻后,冻干。冻干后将模具转移至 40℃烘箱中,继续反应 6 小时。最终得到交联的双层敷料 M1-3。

对实施例 2 和本实施例制备得到的双层敷料进行扫描电子显微镜表征,结果如图 4 所示,可以清楚的看到 M1-1, M1-3 上层的致密层厚度约 20-30μm,下层则根据制备中壳聚糖添加量的不同,形成多空的、疏松质地的不同厚度, M1-1, M1-3 下层敷料的厚度分别为 200 μm 和 600μm。

实施例 5 不同双层敷料对小鼠伤口愈合的影响

0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液: 将 2.10 g 柠檬酸加入双蒸水 100 ml 配成柠檬酸母液,称为 A 液;将 2.94 g 柠檬酸三钠加入双蒸水 100 ml 配成柠檬酸钠母液,称为 B 液;将 A、B 液按 1:1.32 (v/v) 比例混合,调定溶液 pH=4.0。

链脲佐菌素 (STZ) 溶液: 将 STZ 溶于 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液中,配制成 10 mg/mL 浓度的 STZ 溶液,并用 0.22μm 滤菌器过滤除菌。注意避光配制,现用现配。

将所有小鼠随机分为对照组和模型组,术前 12h 禁食。模型组小鼠按照 70 mg/kg 的剂量腹腔注射的 STZ 溶液,对照组给予相同剂量的 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液,连续注射 4 天。STZ 注射结束一周后,测空腹血糖,选择血糖高于 13.5 mmol/L 的小鼠纳入正式实验。

在纳入小鼠的背部剪开直径为 1cm 的创伤,将小鼠随机分为阴性组、药物组、M1-1 组、M1-3 组。阴性组采用 3M 膜处理创面;药物组给予云南白药涂抹创面; M1-1 组、M1-3 组分别采用双层膜 M1-1 及 M1-3 处理创面,每隔 3 天换药,观察并统计创伤愈合情况。14 天后处死小鼠,取伤口组织,浸入福尔马林溶液中,对皮肤厚度及伤口情况进行统计学分析。

各组小鼠创伤愈合情况见表 1 和图 5 (1) 和 (2)。结果表明,在处理 14 天后,各治疗组的创伤愈合率相近,但 M1-3 组在第 3d、第 5d、第 8d 的创伤愈合率远远高于其他组,创伤愈合速率优于阴性组和药物组,表明本发明中构建的 M1-3 双层敷料在创面恢复中具有更好的愈合速率。

表 1 各组小鼠创伤愈合率比较 (%)

伤口愈合率 (%)	阴性	药物组	M1-1	M1-3
3d	18.00	15.75	26.75	46.75
5d	30.50	41.25	42.00	62.80
8d	59.00	56.00	66.67	87.67
14d	95.33	98.33	97.33	99.17

各组小鼠伤口组织皮肤厚度见表 2 和图 5 (1) 和 (3)。结果表明, M1-1 和 M1-3 组在第 3d、第 5d 和第 14d 的伤口组织皮肤厚度较阴性组和药物组显著增加, M1-1 和 M1-3 组之间

的差异并不明显。

表 2：各组小鼠伤口组织皮肤厚度比较（μm）

皮肤厚度（μm）	阴性	药物组	M1-1	M1-3
3d	525.43333	596.2233	737.99	628.3867
5d	312.48778	420.695	711.4456	693.9233
14d	822.14333	1143.337	1222.147	1225.743

对比例 1：羊膜、M1-1 和 M1-3 促凝血性能比较

羊膜有利于伤口恢复，但是对于出血的伤口无法快速止血。本实验通过体外凝血实验比较了羊膜，M1-1 及 M1-3 的促凝血性能。将医用纱布(对照)、dBAM 羊膜、M1-1、M1-3 切成圆形(直径 15mm)，置于培养皿中。分别滴入 100 uL 含 10%柠檬酸钠的血液。将含血的膜在 37°C下孵育 5 分钟，然后缓慢地从边缘加入 50 毫升蒸馏水，将游离的红细胞溶解在水中。结果见图 6（1），医用纱布组和 dBAM 的水变成了红色，说明医用纱布和 dBAM 中血小板很难凝固；M1-1 的水溶液微红，M-3 的水溶液几乎透明。漂洗水的颜色越浅，凝血越快，这说明海绵样层的厚度对凝血速度有重要影响。

此外，通过对敷料中血红蛋白含量的检测评价羊膜，M1-1 及 M1-3 的止血性能。具体步骤如下：将上述培养皿中的样品中加入 2.5mL 血红蛋白测试液，充分混匀，静置 5min，通过双蒸水调零，测定各管的吸光度值，紫外检测器定量测定不同敷料中 540 nm 波长下各红细胞溶液的吸光度值，每组重复 6 次。血红蛋白含量(g/L) = (OD-OD₀)×367.7 (OD₀表示空白吸光度值，OD 表示样品的吸光度值)。以 100μL 血液的血红蛋白浓度为参考值。结果见图 6（2），100μL 血液、纱布、dBAM 羊膜、M1-1、M1-3 的血红蛋白浓度分别为 919.25g/L、113.99g/L、72.80g/L、293.42g/L、682.39g/L，M1-1、M1-3 的血红蛋白浓度显著高于纱布和 dBAM 羊膜组，M1-3 的血红蛋白浓度更加接近 100μL 血液的参考浓度，说明增加海绵状壳聚糖的双层敷料更容易聚集血红蛋白，从而提高创面敷料的止血能力。

对比例 2：羊膜、M1-1 和 M1-3 溶胀性能比较

羊膜有利于伤口恢复，但是对于较深的伤口无法起到填充作用，只能起到伤口的覆盖作用；对于伤口渗出液较多的伤口，其无法有效吸收渗出液，加大伤口感染的风险。本实验通过体外凝血实验比较了羊膜，M1-1 及 M1-3 的溶胀性能。将 dBAM 羊膜、M1-1 及 M1-3 分别称重后浸泡于 PBS 中，分别于 0、0.5、1、3、10、30、60、180、360、540 及 720min 对样品重量进行测定，取后用滤纸吸取表面多余水分，分别对敷料重量进行测定（n=3）。根据敷料重量的变化计算相应的溶胀系数：溶胀系数（%）=（W_t-W₀）/W₀，其中 W_t为 t 时间点敷料重量，W₀为敷料的起始重量。结果见图 6（3），数据表明，dBAM，M1-1 及 M1-3 的三种

敷料均能在较快的时间内达到溶胀平衡，溶胀倍数分别为 305%、366%、880%，表明壳聚糖层能够有效吸收伤口渗出液，促进伤口微环境的修复。

对比例 3：羊膜、M1-1、M1-3 及单层壳聚糖膜机械性能比较

壳聚糖海绵敷料单独作为伤口敷料，机械性能较差，易出现黏附在伤口上的情况，而清创过程则不利于伤口的恢复。将其与羊膜进行复合可以有效的增加其机械性能，减少创面的黏附，有利于其伤口的生长。本实验通过万能拉力机对脱细胞羊膜、M1-1、M1-3 及单层壳聚糖膜（参考 M1-3 的条件合成，区别在于，不添加羊膜）的机械性能进行比较，发现脱细胞羊膜、M1-1、M1-3 及单层壳聚糖膜的拉伸应力分别为 12.39 MPa、2.29 MPa、1.15 MPa、0.29 MPa，标称应变分别为 7.09%、6.97 %、6.31 %、2.6 %。从图 7 可以看出，含有羊膜的双层膜 M1-1 及 M1-3，其拉伸应力及标称应变较壳聚糖膜显著提高。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

- 1、一种制备羊膜-壳聚糖复合双层敷料的方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - (1) 将羊膜进行脱细胞处理：将羊膜漂洗后浸于 0.25%~0.5%胰酶溶液中，搅拌 1~3 小时，再将羊膜洗净，于 SDS 水溶液中处理 12~24 小时；
 - (2) 将 10~30 mg/mL 壳聚糖和交联剂以混合溶液的形式加入至步骤 (1) 制备的脱细胞处理后的羊膜上，形成厚度为 200 μm ~600 μm 的双层膜，冻干；其中，脱细胞羊膜、壳聚糖和交联剂的质量比为 1: (1~3): (0.2~0.6)；
 - (3) 将步骤 (2) 冻干后的双层膜转移至 30-80°C 环境中静置至少 6 h。
- 2、一种制备羊膜-壳聚糖复合双层敷料的方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - (1) 将羊膜进行脱细胞处理；
 - (2) 将壳聚糖和交联剂以溶液形式加入至步骤 (1) 制备的脱细胞处理后的羊膜上，形成厚度为 200 μm ~600 μm 的双层膜，冻干；其中，脱细胞羊膜、壳聚糖和交联剂的质量比为 1: (1~3): (0.2~0.6)。
 - (3) 将步骤 (2) 冻干后的双层膜转移至 30-80°C 环境中静置至少 6 h。
- 3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:1:0.2。
- 4、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:2:0.4。
- 5、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述羊膜、壳聚糖、交联剂的混合质量比为 1:3:0.6。
- 6、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 是将羊膜漂洗后浸于 0.25%~0.5%胰酶溶液中，搅拌 1~3 小时，再将羊膜洗净，于 SDS 水溶液中处理 12~24 小时。
- 7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述交联剂为聚乙二醇二缩水甘油醚。
- 8、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 中壳聚糖的浓度为 10~30 mg/mL。
- 9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，将壳聚糖溶于浓度为 0.5~2% 的醋酸溶液中，使壳聚糖的浓度达 10~30 mg/mL。
- 10、根据权利要求 2~9 任一所述的方法，其特征在于，所述壳聚糖溶液与交联剂混合后加入至羊膜表面。
- 11、一种羊膜-壳聚糖复合双层敷料，其特征在于，所述敷料是由壳聚糖与羊膜经交联剂交联形成；所述羊膜和壳聚糖的质量比为 1: (1~3)。
- 12、根据权利要求 11 所述的羊膜-壳聚糖复合双层敷料，其特征在于，是将壳聚糖与交

联剂按照 (1~3): (0.2~0.6) 的质量比混合, 冻干固定, 再于 30-80°C 固相交联后获得。

13、权利要求 11 或 12 所述的羊膜-壳聚糖复合双层敷料在非治疗用途下改善皮肤状态方面的应用。

14、权利要求 11 或 12 所述的羊膜-壳聚糖复合双层敷料在外科伤口处理中的应用。

15、权利要求 1~10 任一所述双层敷料的制备方法在生产医用敷料中的应用。

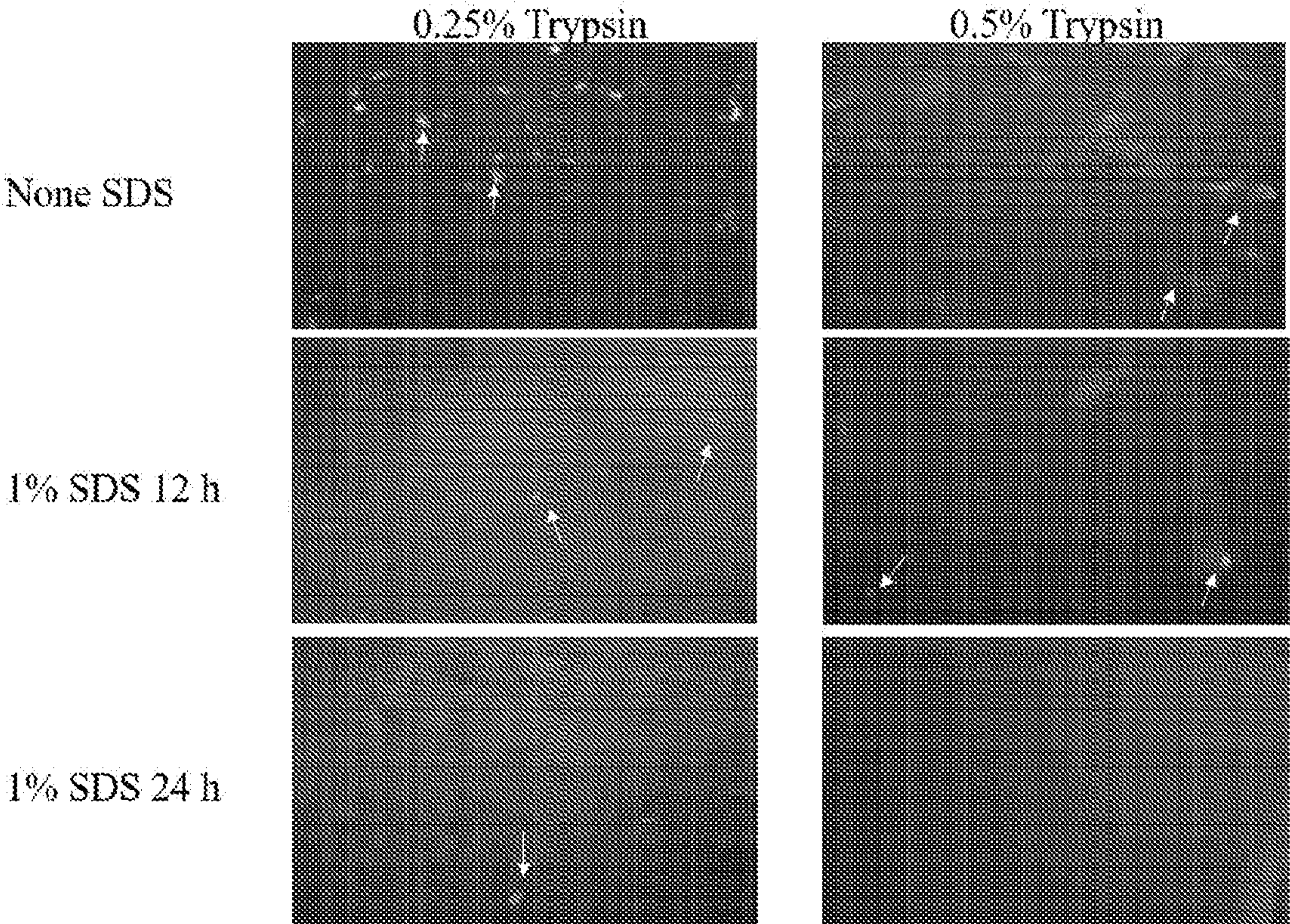


图 1

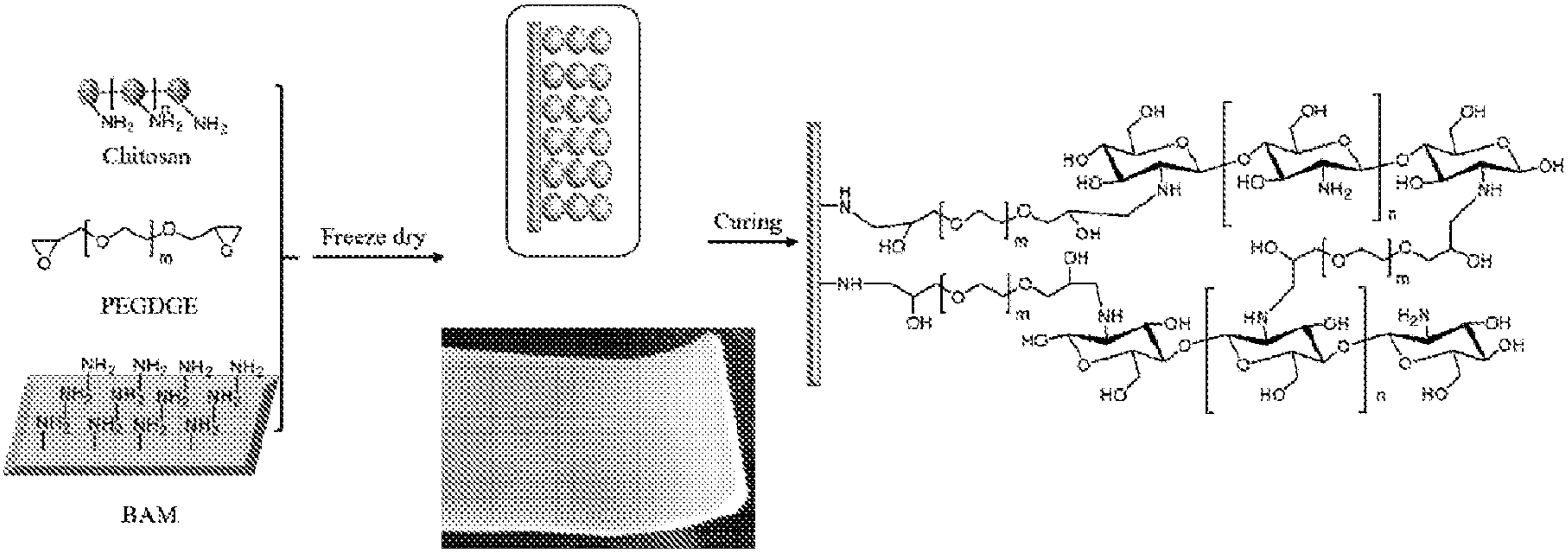


图 2

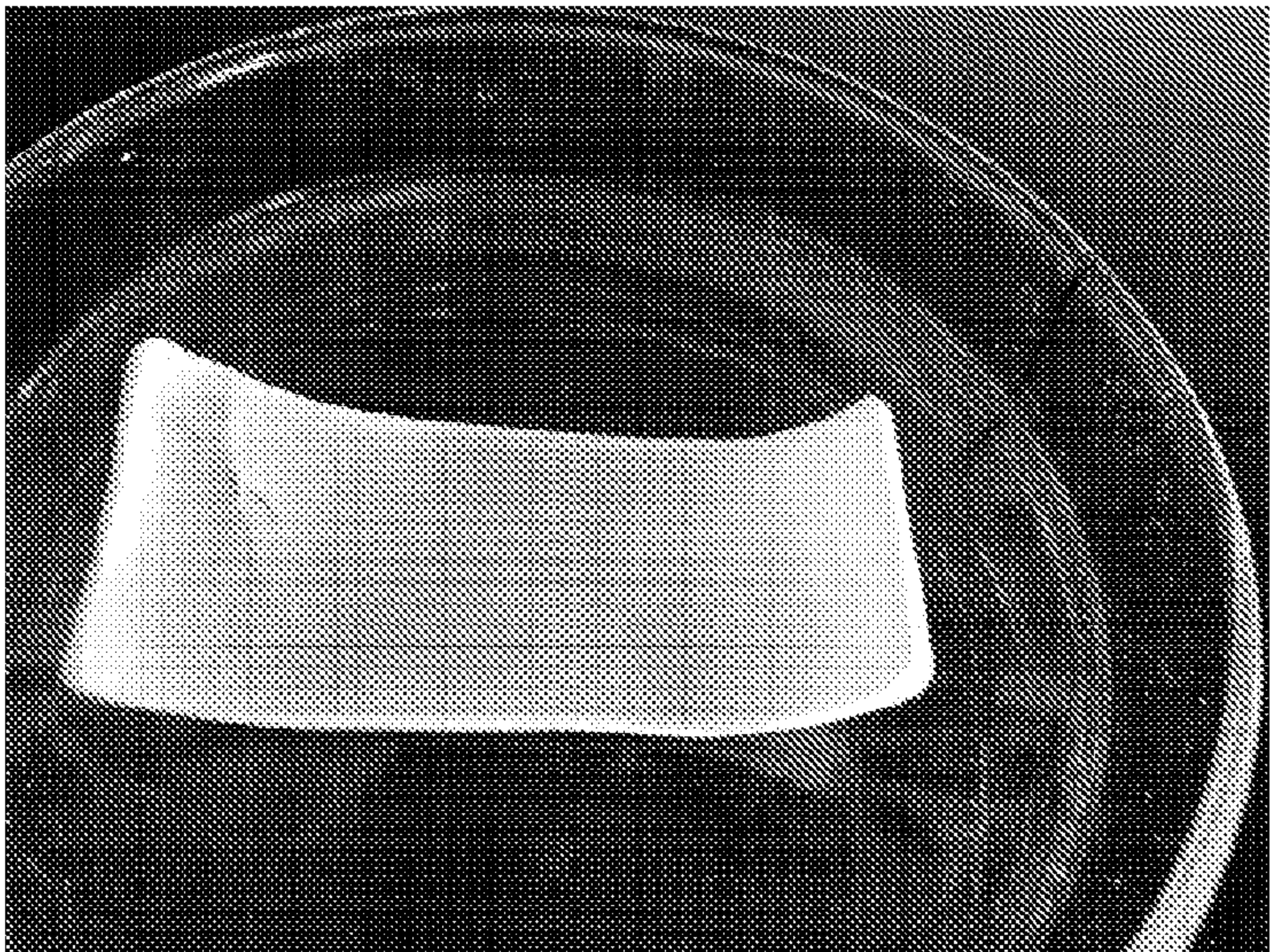
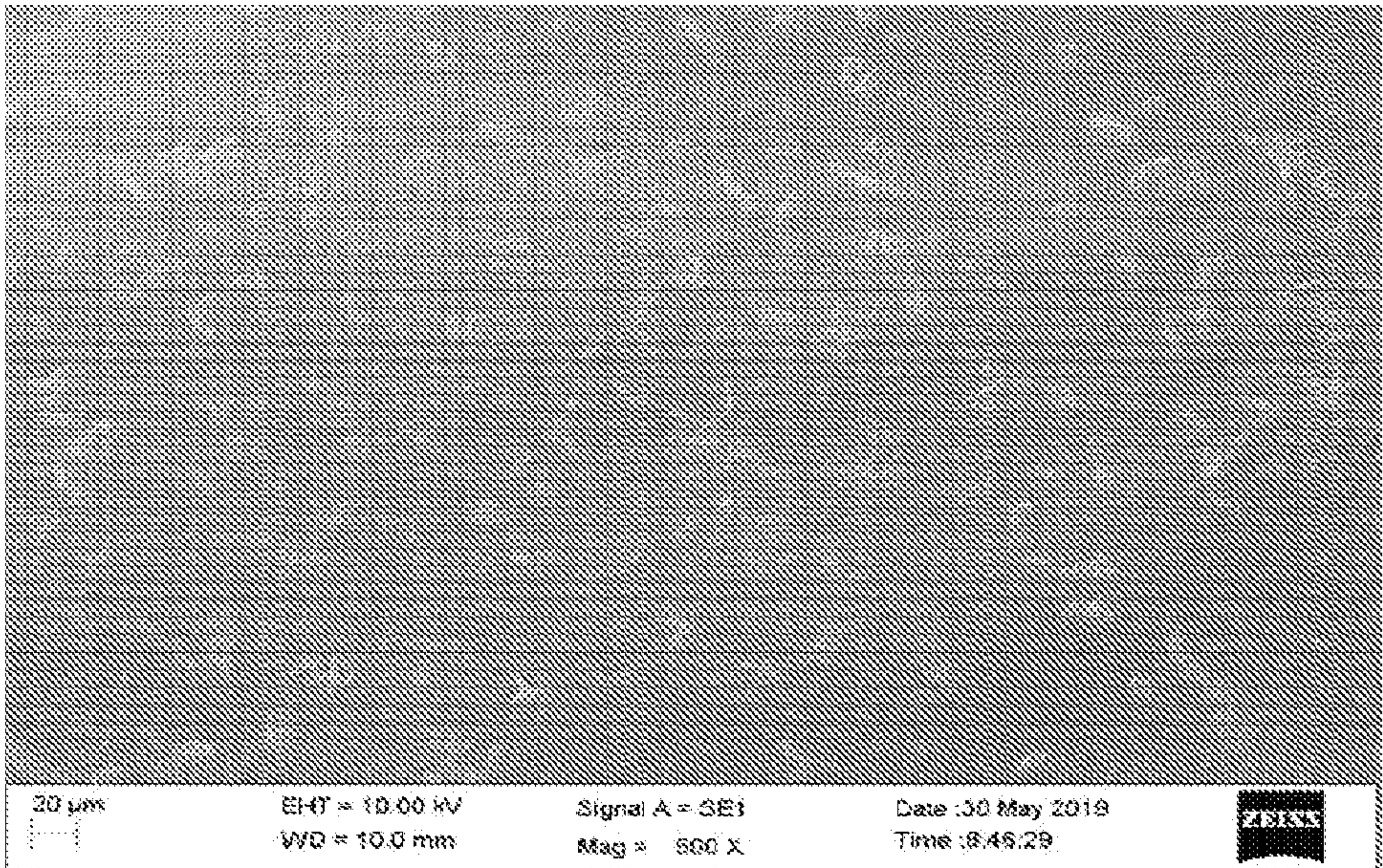
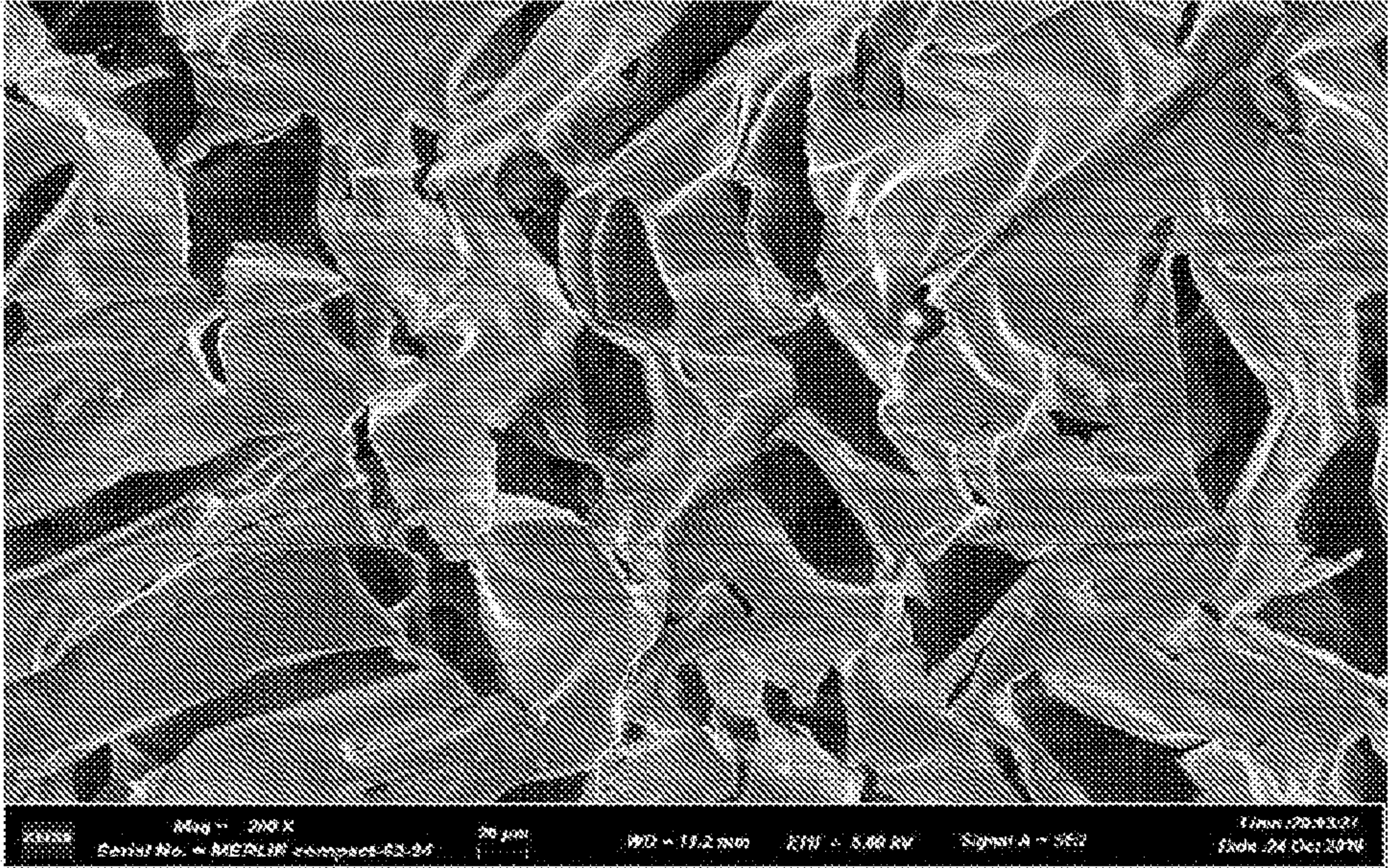


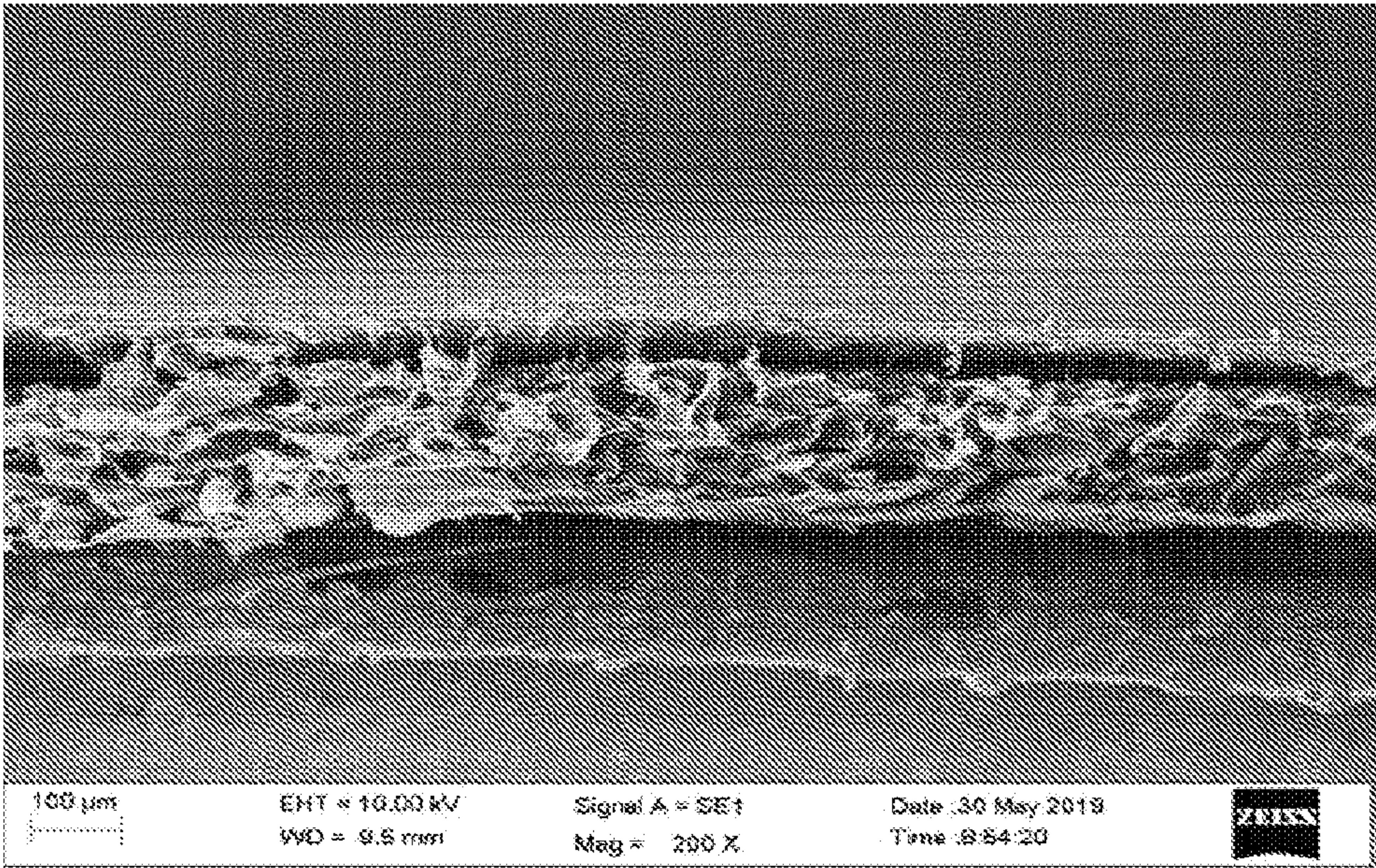
图 3



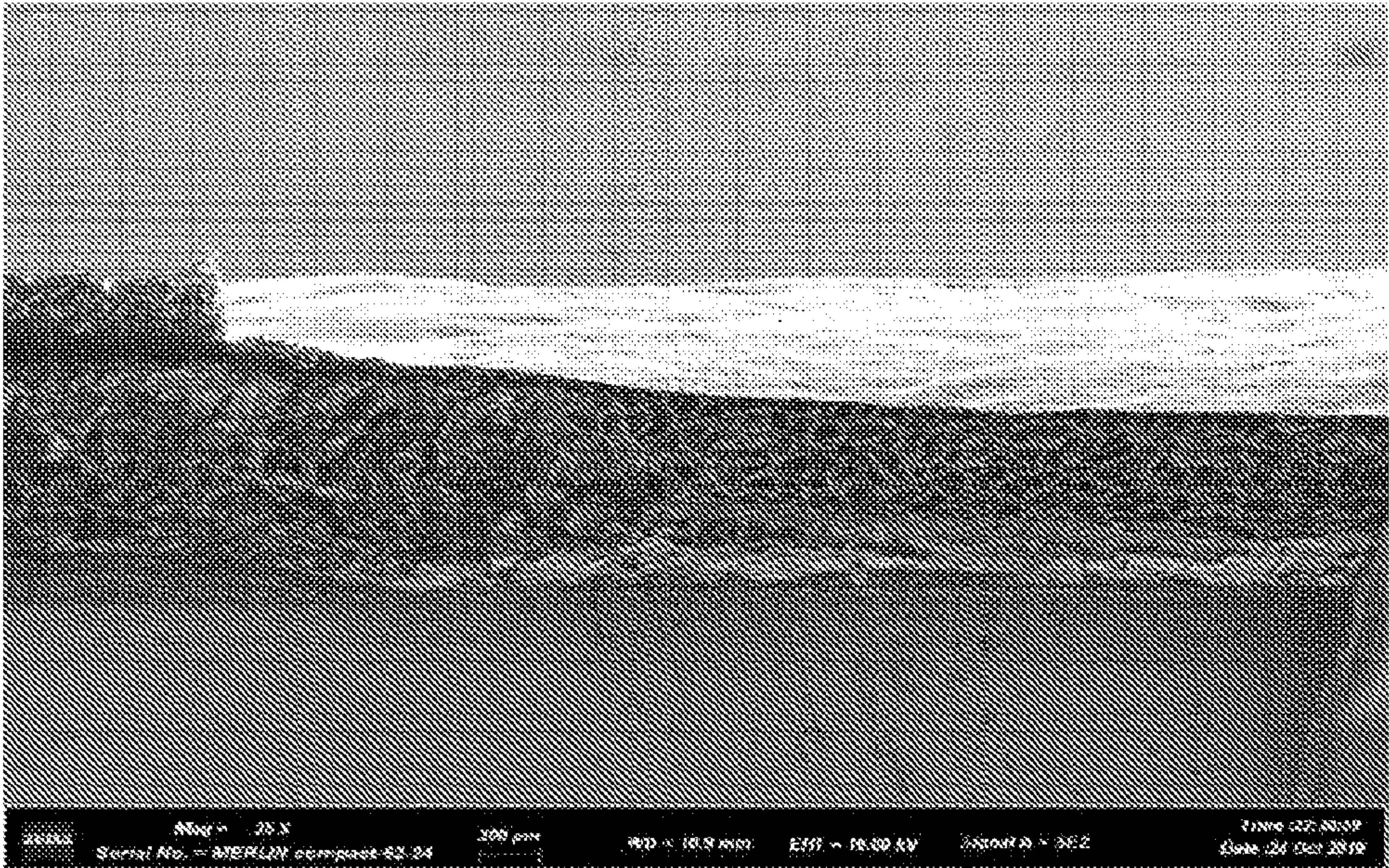
(1)



(2)

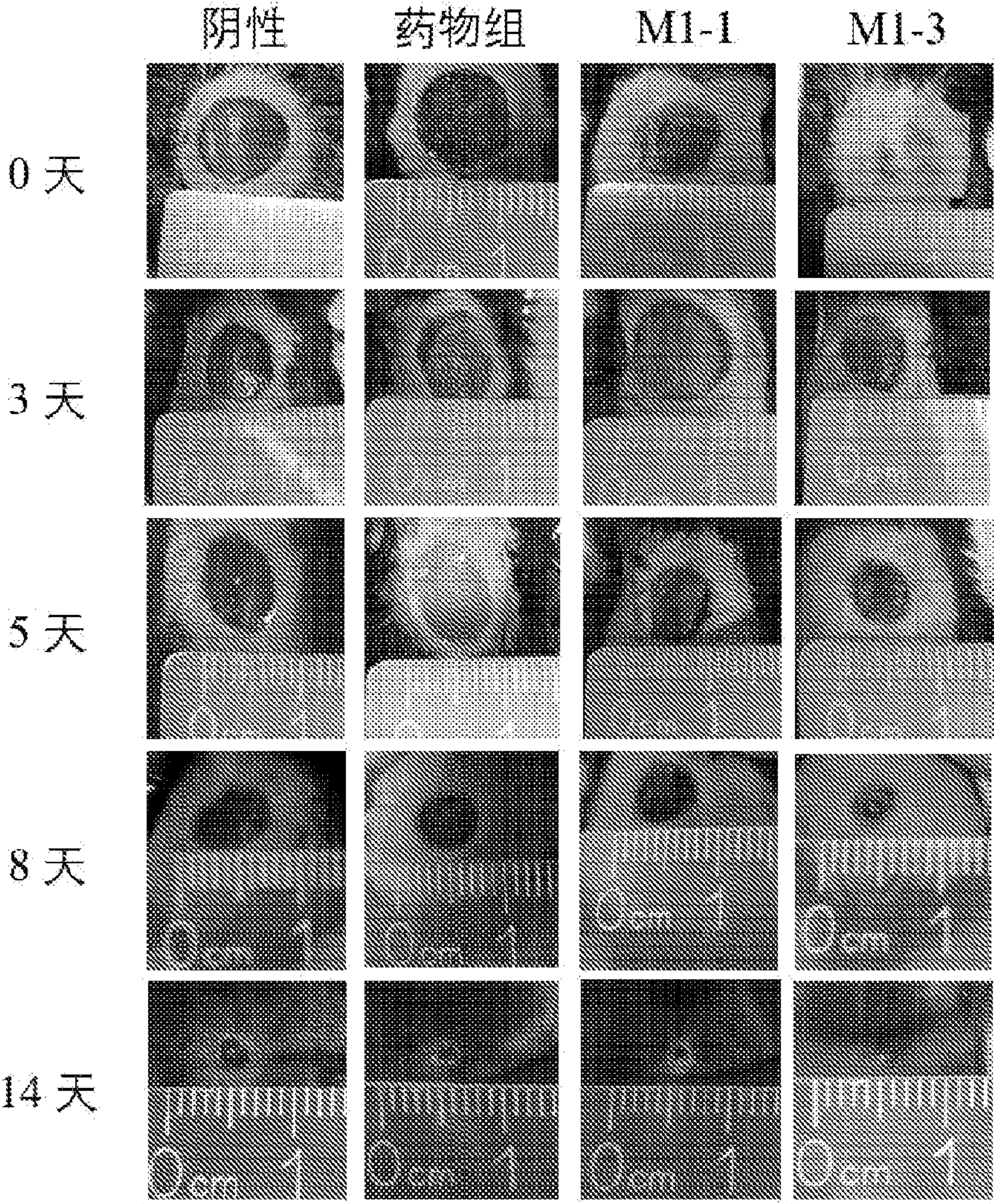


(3)

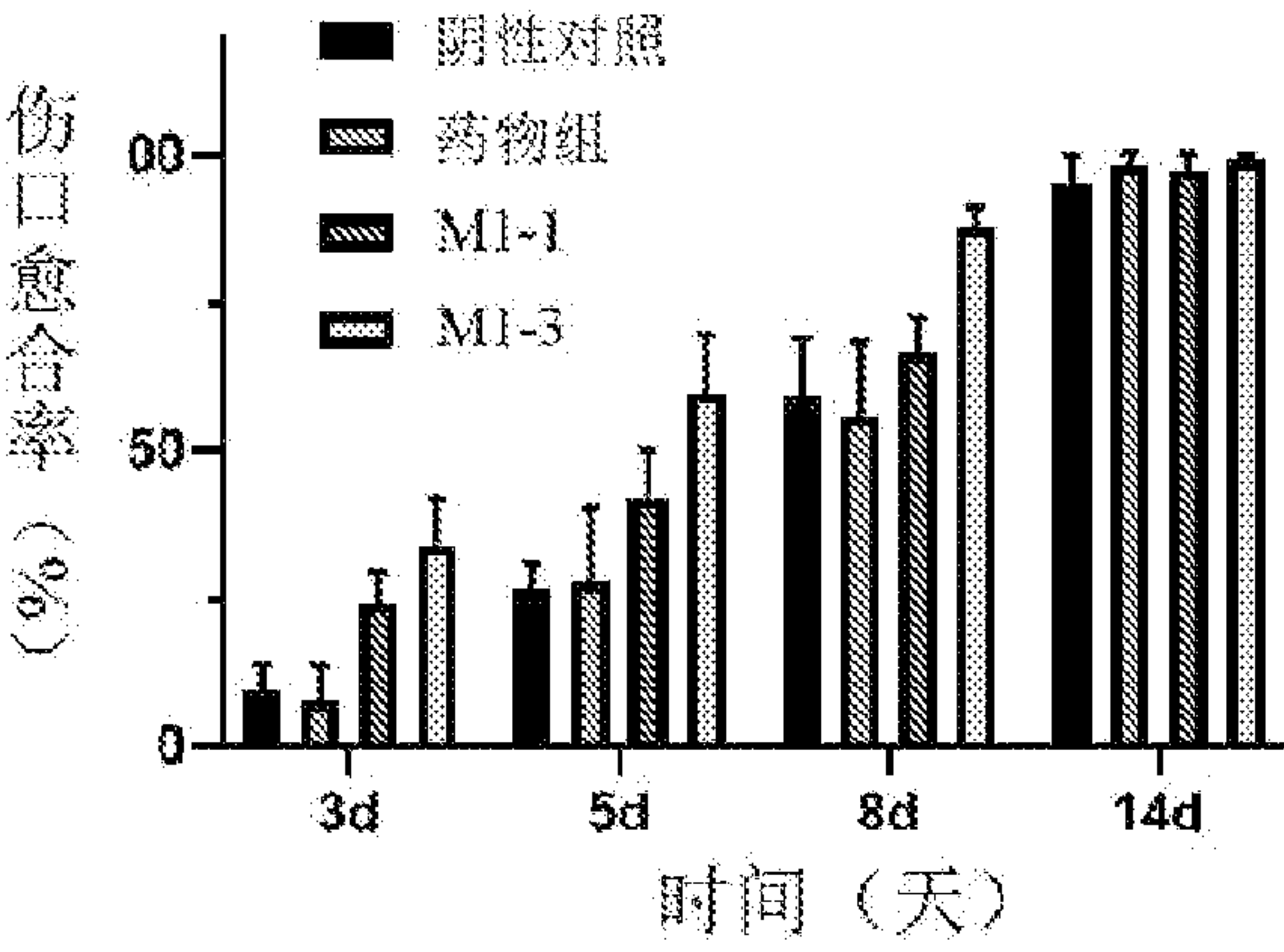


(4)

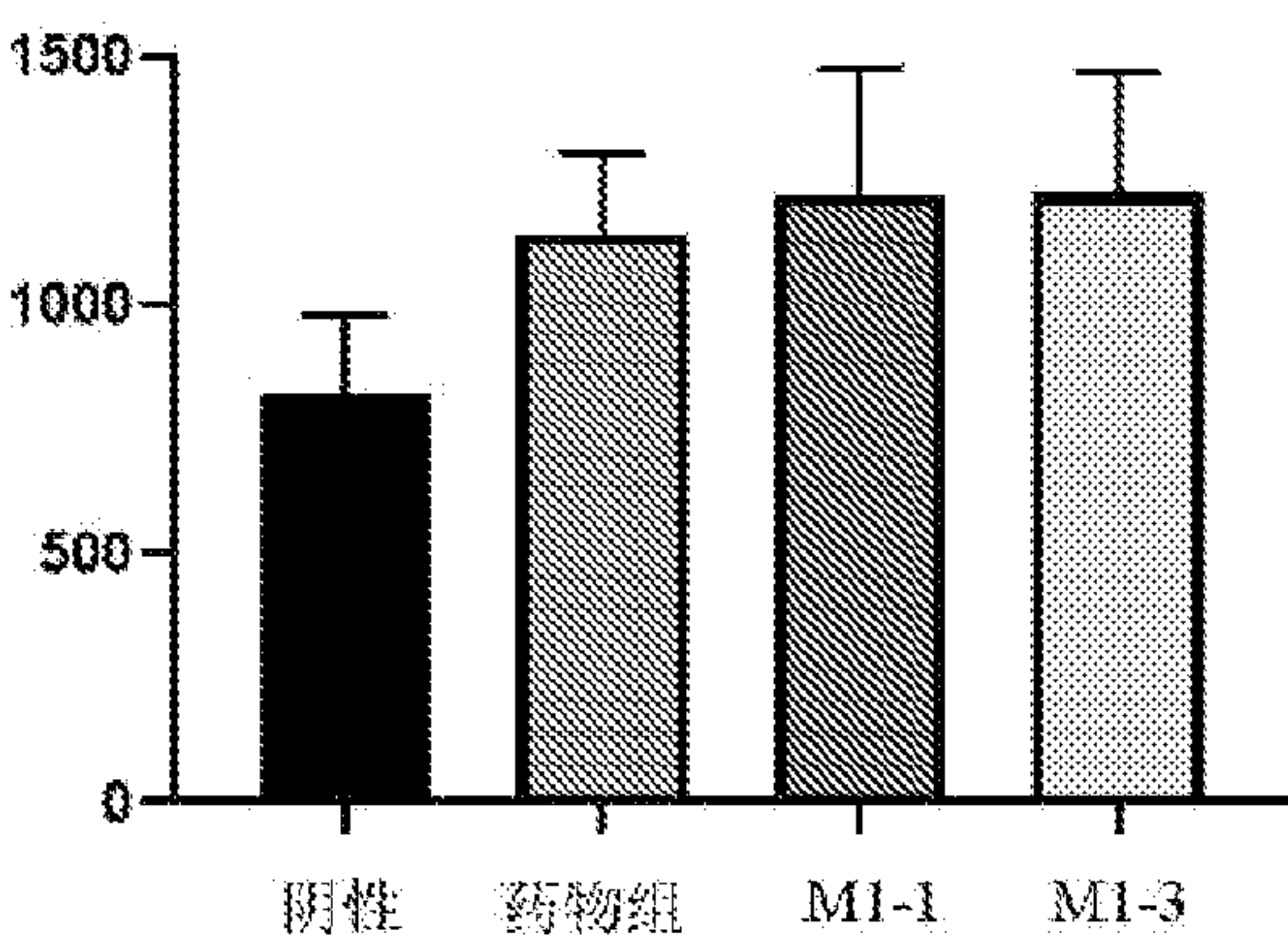
图 4



(1)

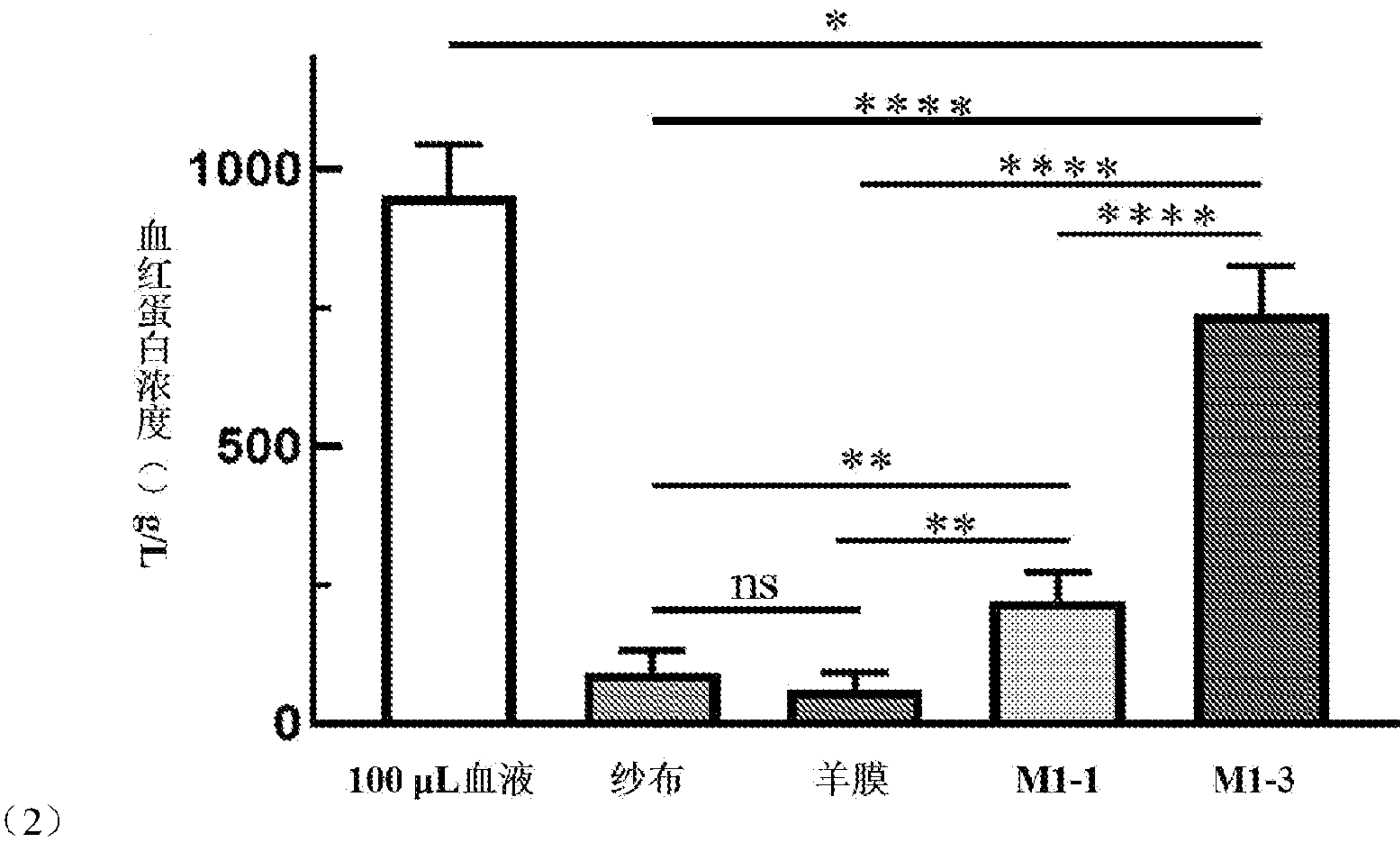
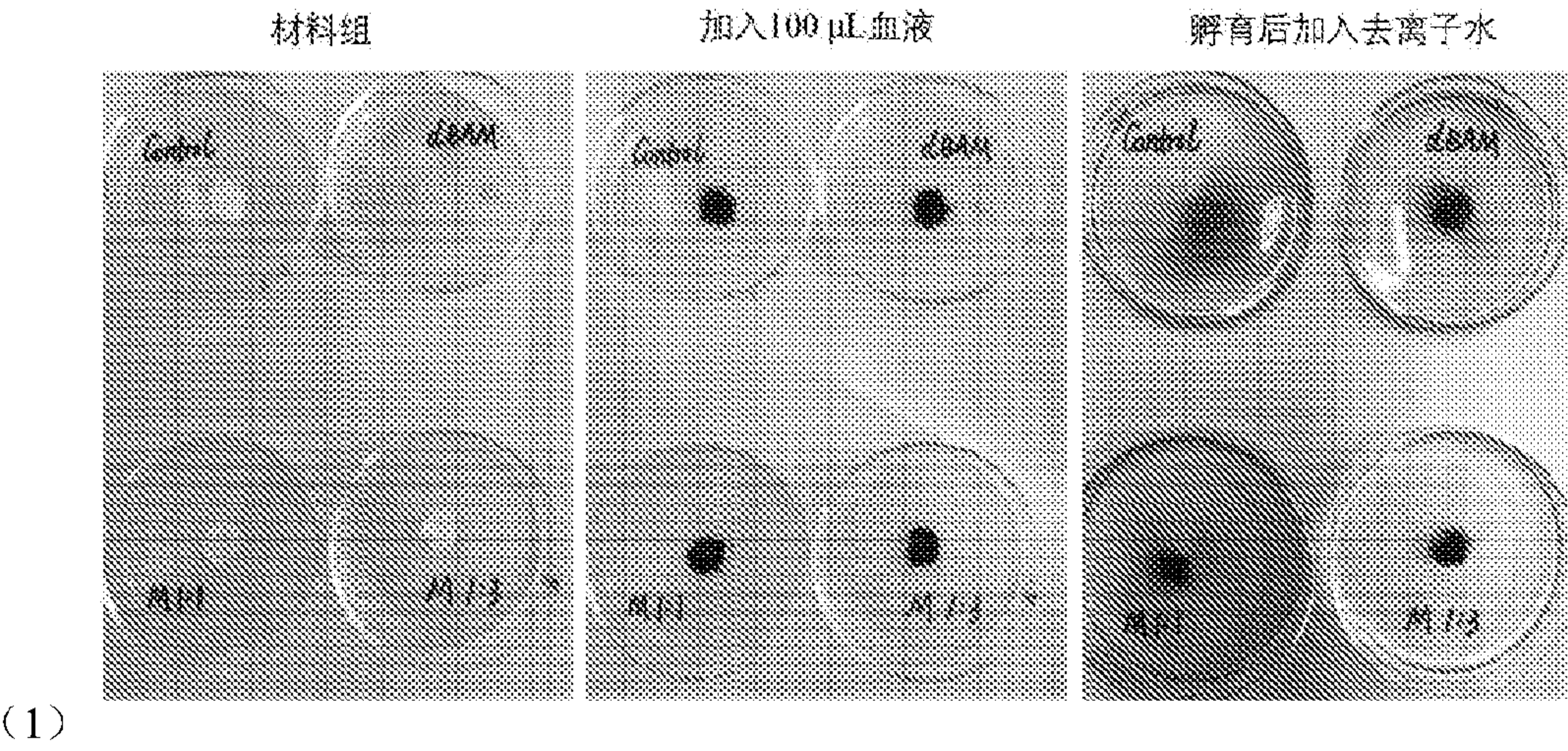


(2)



(3)

图 5



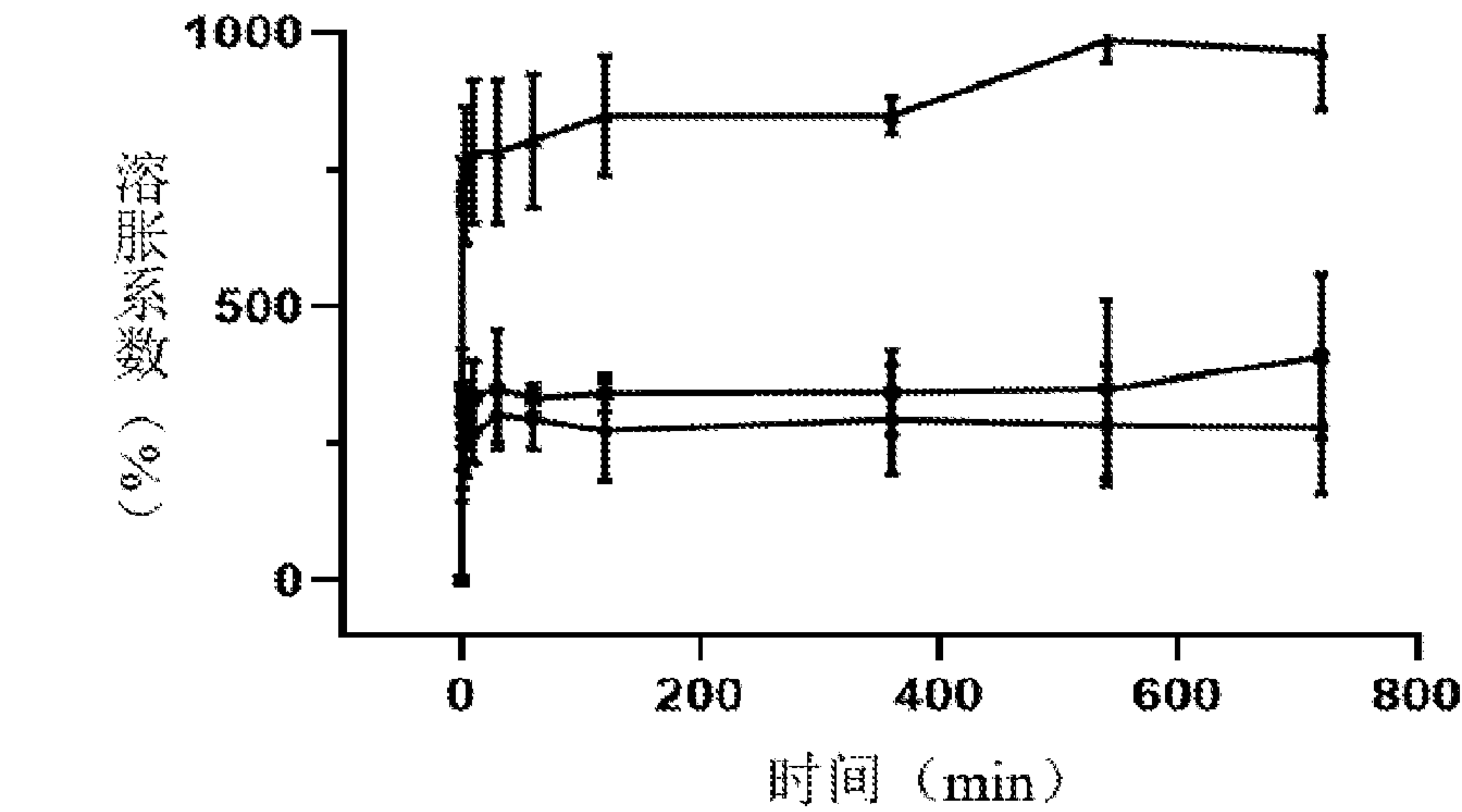
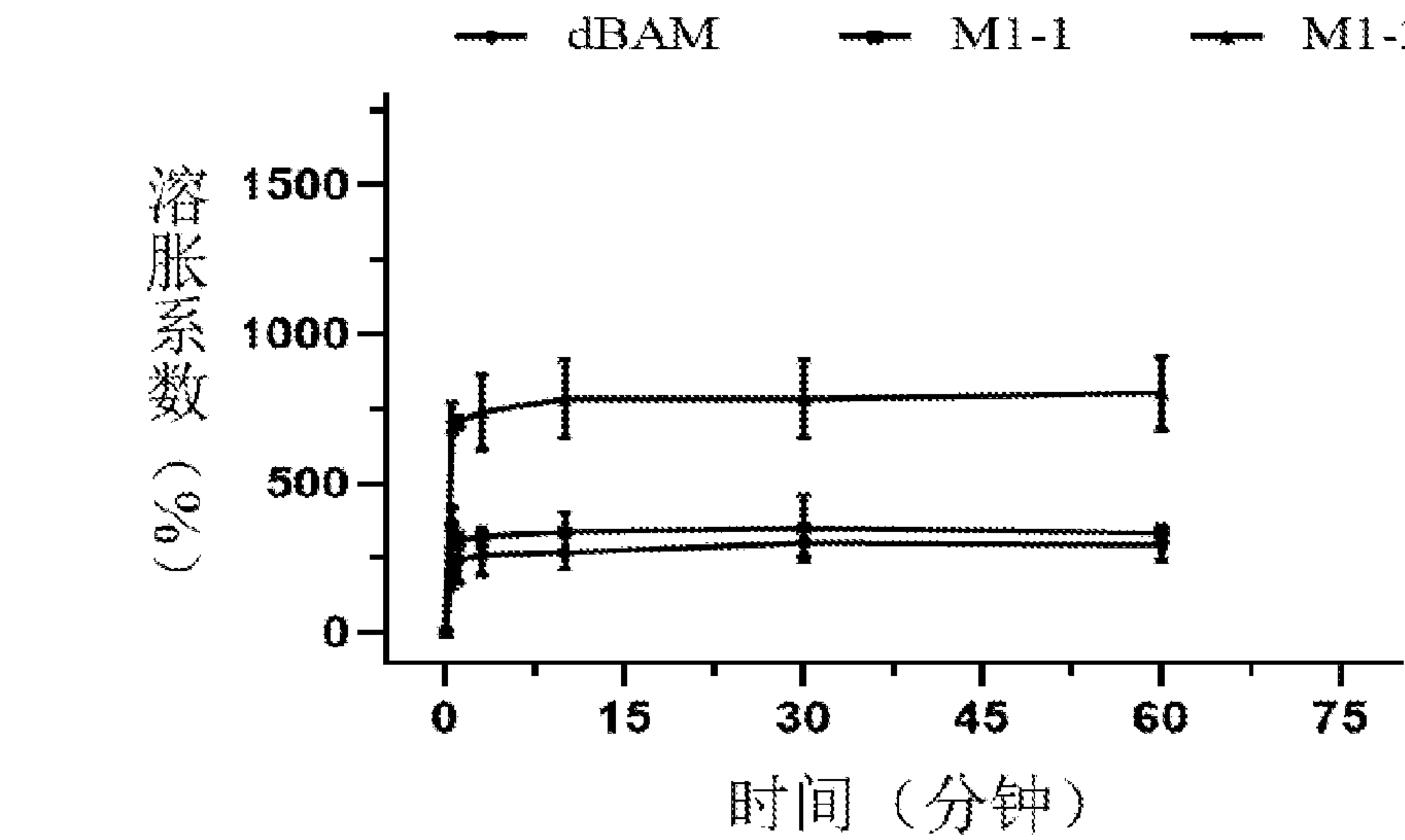


图 6

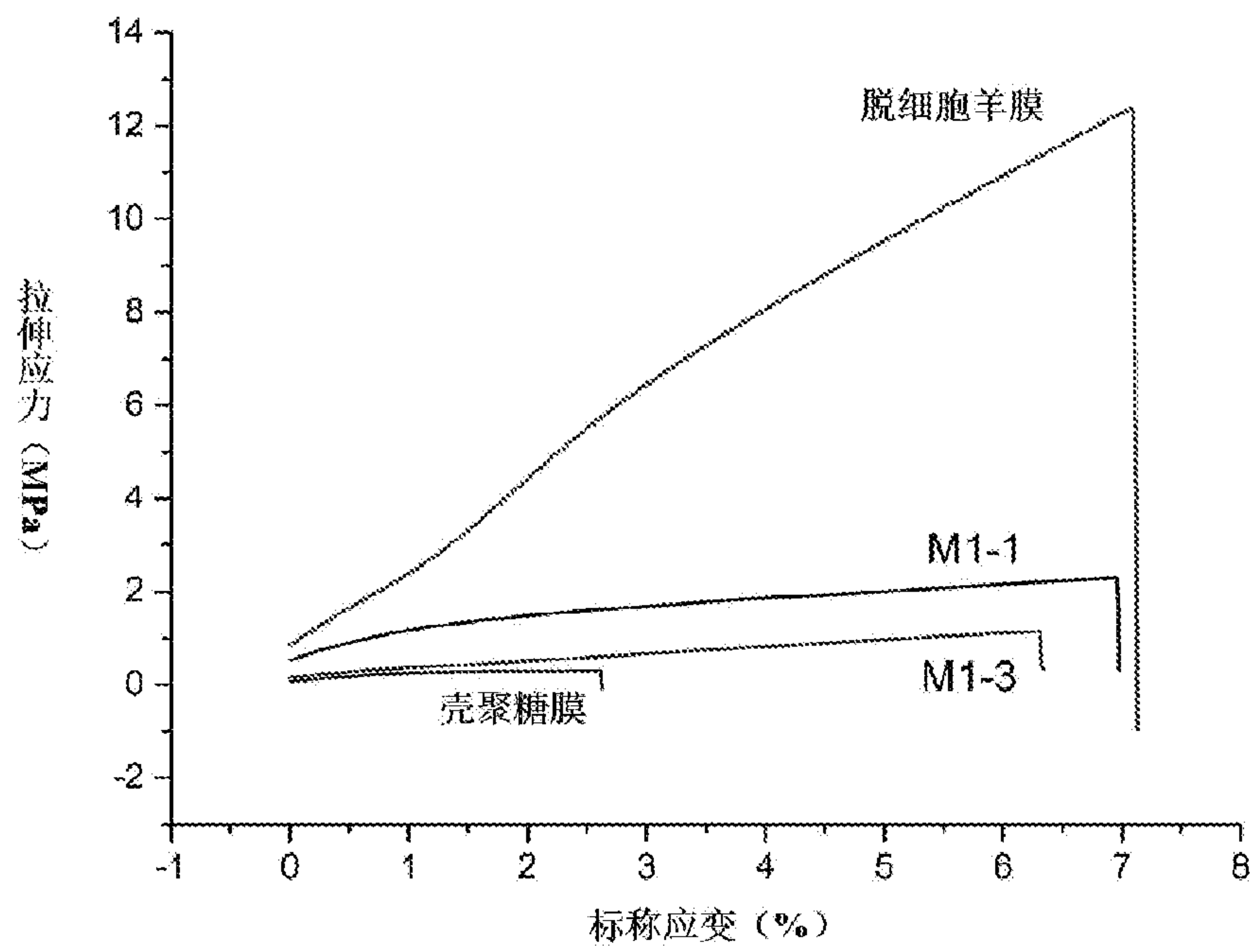


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/122412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L 15/28(2006.01)i; A61L 15/40(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; A61L 15/44(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) CNABS; CNTXT; SIPOABS, DWPI, EPTXT; USTXT; WOTXT; 中国期刊网全文数据库, ISI Web of Science, 万方, 超星, 读秀, 江南大学, 陈敬华, 羊膜, 冻干, 壳聚糖, 交联, 基质, 脱乙酰甲壳素, 甲壳素, 细胞外基质, 双层, 乙二醇二缩水甘油醚, 海绵, 脱细胞, 动物膜, 膜, 复合, 创可贴, 敷贴, 创口贴, 贴剂, membrane, acellular, ECM, wound-healing, CS, ACTM, 敷料, link+, ligand+, amniotic, chitosan?, chitin, wound healing, bond+, Crosslink, animal, dressing				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	CN 107412868 A (GUANGZHOU RAINHOME PHARM&TECH CO., LTD.) 01 December 2017 (2017-12-01) claims 1-10	1-13, 15		
Y	CN 1943796 A (GUAN, Zhiguang) 11 April 2007 (2007-04-11) description, page 2 paragraph 2, page 4 paragraph 5 - paragraph 3 from the bottom	1-13, 15		
Y	CN 109718392 A (GUANGZHOU RAINHOME PHARM&TECH CO., LTD.) 07 May 2019 (2019-05-07) description, paragraphs 0007-0031	1-13, 15		
A	CN 109847088 A (GUANGZHOU RAINHOME PHARM&TECH CO., LTD.) 07 June 2019 (2019-06-07) entire document	1-13, 15		
A	CN 105999410 A (GUANGZHOU XINSHENG MEDICAL MATERIALS CO., LTD.) 12 October 2016 (2016-10-12) entire document	1-13, 15		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
<table><tr><td>* 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</td><td>“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</td></tr></table>			* 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
* 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 14 August 2020		Date of mailing of the international search report 28 August 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/CN2019/122412

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 20130111849 A (K. STEMCELL CO.LTD., et al.) 11 October 2013 (2013-10-11) entire document	1-13, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/122412

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.: 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 14 sets forth a use of the amnion-chitosan compound dual-layer dressing of claim 11 or 12 in surgical wound treatment, and therefore the use set forth in claim 14 is a method for treatment of a disease, and does not comply with PCT Rule 39.1(iv).
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/CN2019/122412

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107412868	A	01 December 2017	None			
CN	1943796	A	11 April 2007	CN	100540065	C	16 September 2009
CN	109718392	A	07 May 2019	None			
CN	109847088	A	07 June 2019	None			
CN	105999410	A	12 October 2016	CN	105999410	B	07 April 2020
KR	20130111849	A	11 October 2013	KR	101404089	B1	05 June 2014

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2019/122412		
A. 主题的分类 A61L 15/28(2006.01)i; A61L 15/40(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; A61L 15/44(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)) CNABS;CNTXT;SIPOABS, DWPI,EPTXT;USTXT;WOTXT; 中国期刊网全文数据库, ISI Web of Science, 万方, 超星, 读秀, 江南大学, 陈敬华, 羊膜, 冻干, 壳聚糖, 交联, 基质, 脱乙酰甲壳素, 甲壳素, 细胞外基质, 双层, 乙二醇二缩水甘油醚, 海绵, 脱细胞, 动物膜, 膜, 复合, 创可贴, 敷贴, 创口贴, 贴剂, membrane, acellular, ECM, wound-healing, CS, ACTM, 敷料, link+, ligand+, amniotic, chitosan?, chitin, wound healing, bond+, Crosslink, animal, dressing				
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 107412868 A (广州润虹医药科技股份有限公司) 2017年 12月 1日 (2017 - 12 - 01) 权利要求1-10	1-13, 15		
Y	CN 1943796 A (关志广) 2007年 4月 11日 (2007 - 04 - 11) 说明书第2页第2段, 第4页第5段-倒数第3段	1-13, 15		
Y	CN 109718392 A (广州润虹医药科技股份有限公司) 2019年 5月 7日 (2019 - 05 - 07) 说明书第0007-0031段	1-13, 15		
A	CN 109847088 A (广州润虹医药科技股份有限公司) 2019年 6月 7日 (2019 - 06 - 07) 全文	1-13, 15		
A	CN 105999410 A (广州昕生医学材料有限公司) 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12) 全文	1-13, 15		
A	KR 20130111849 A (K. STEMCELL CO.LTD., 等) 2013年 10月 11日 (2013 - 10 - 11) 全文	1-13, 15		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。				
<table><tr><td>* 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</td><td>“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</td></tr></table>			* 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
* 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 2020年 8月 14日		国际检索报告邮寄日期 2020年 8月 28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 牛培利 电话号码 86-(10)-53962685		

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： 14 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14要求保护一种权利要求11或12所述的羊膜-壳聚糖复合双层敷料在外科伤口处理中的应用，因此权利要求14要求保护的用途属于疾病的治疗方法，不符合PCT实施细则39.1（iv）的规定。 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/CN2019/122412

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	107412868	A	2017年 12月 1日	无	
CN	1943796	A	2007年 4月 11日	CN	100540065 C 2009年 9月 16日
CN	109718392	A	2019年 5月 7日	无	
CN	109847088	A	2019年 6月 7日	无	
CN	105999410	A	2016年 10月 12日	CN	105999410 B 2020年 4月 7日
KR	20130111849	A	2013年 10月 11日	KR	101404089 B1 2014年 6月 5日