

(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 12 月 30 日 (30.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/259487 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/51 (2006.01) *A61K 47/24* (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01) *A61K 47/32* (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/097676

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 23 日 (23.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910558742.9 2019年6月26日 (26.06.2019) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区浙大路38号, Zhejiang 310027 (CN)。

(72) 发明人: 杨明英(YANG, Mingying); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙江大学紫金港校区农生环C305, Zhejiang 310058 (CN)。王捷(WANG, Jie); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙江大学紫金港校区农生环C305, Zhejiang 310058 (CN)。陈玉银(CHEN, Yuyin); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号浙江大学紫金港校区农生环C305, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州知闲专利代理事务所(特殊普通合伙) (HANGZHOU ZHIXIAN PATENT AGENCY);

中国浙江省杭州市西湖区古墩路616号同人精华大厦1号楼938室黄燕, Zhejiang 310000 (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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING DRUG-LOADED SILK FIBROIN NANOCAPSULE, AND PRODUCT THEREOF

(54) 发明名称: 一种丝素载药纳米微囊的制备方法及产品

(57) Abstract: A method for preparing a drug-loaded silk fibroin nanocapsule, and a prepared drug-loaded silk fibroin nanocapsule. The method comprises: carrying out a coating treatment of applying alternating layers of silk fibroin and 3-aminopropyltriethoxysilane to functionally modified polystyrene microspheres, to ultimately obtain a multi-layer-structured coated polystyrene composite with a negative or positive potential, and finally removing the functionally modified polystyrene template with a template-removing reagent, to obtain a drug-loaded silk fibroin nanocapsule. The functionally modified polystyrene microspheres are positive potential microspheres, and silk fibroin is used for the first coating. In the case of negative potential microspheres, 3-aminopropyltriethoxysilane is used for the first treatment. The process is simple and has wide applicability. The dimensions of the prepared microcapsule can be controlled at the nanometer level, so that the microcapsule can more effectively transport a drug to the interior of a cell to function, and the surface potential of the microcapsule can be regulated according to the properties of the drug so as to enhance electrostatic adsorption and improve the effective drug loading rate.

(57) 摘要: 一种丝素载药纳米微囊的制备方法以及制备得到的丝素载药纳米微囊, 包括: 利用丝素蛋白和3-氨丙基三乙氧基硅烷对功能修饰的聚苯乙烯微球进行交替逐层包覆处理, 最终得到多层结构的带有负电势或正电势的包覆聚苯乙烯复合体, 最后利用去模板试剂去除功能修饰的聚苯乙烯模板, 得到丝素载药纳米微囊; 所述功能修饰的聚苯乙烯微球为正电势微球, 首次包覆采用丝素蛋白, 如果是负电势微球, 首次处理采用3-氨丙基三乙氧基硅烷。该工艺简单, 适用性强, 制备的微囊尺寸可控在纳米级, 能够更有效的运送药物至细胞内部发挥作用, 并且根据药物的性质可对微囊的表面电势进行调控, 增强静电吸附, 提高有效载药率。

WO 2020/259487 A1

一种丝素载药纳米微囊的制备方法及产品

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种丝素载药纳米微囊的制备方法及产品。

背景技术

丝素蛋白是一种天然的高分子聚合物，具有良好的生物相容性、高可塑性和优异的机械性能，在骨组织工程和药物载体领域均有广泛的研究和应用。在药物载体领域，丝素蛋白最常用的方式为丝素蛋白微球，其制备工艺多样、制备流程简单，如公开日为 2015 年 9 月 30 日，公开号为 CN103341175B 的中国专利文献中，公开了一种丝素微球的制备方法。然而，丝素微球作为药物载体具有其局限性，其载药方式单一，大都依靠比表面积进行物理吸附，药物装载量有限，体内运送过程也会造成药物的流失。因此，亟需新的丝素蛋白材料形式作为药物载体，以提高其药物装载率。

丝素中空微球或中空微囊由于其内部中空结构能够提供巨大载药空间，外层结构能对药物实施更有效保护，因而，受到了广泛的关注。目前，制备丝素微囊的方法仍以模板法结合层层自组装技术（Layer-by-Layer）为主，利用有机或无机物作为软/硬模板，通过弱相互作用（如静电引力、氢键、配位键等），使丝素蛋白逐层交替沉积，经过多次重复形成分子聚集体，最终将模板去除后即可得到丝素蛋白中空微囊。然而，由于丝素蛋白结构的不稳定性，进行自组装时往往需要在每次循环时用有机溶剂对丝素蛋白进行 β 处理以稳定其结构，一方面增加了操作的复杂性，另一方面也容易造成有机溶剂的残留。丝素蛋白其表面电势呈现微弱的电负性，也常需要对丝素蛋白进行电荷修饰，才能达到良好的静电吸附效果。此外，目前制备的丝素微囊尺寸均在微米级，很难进入细胞进行有效药物传递，体内流通也容易受阻。因此，综上所述，目前还没有一种工艺简单的自助

装方法，克服上述技术缺陷，制备纳米级丝素中空微囊，作为药物载体进行药物的有效输送。

发明内容

为了克服现有制备丝素微囊技术中存在的流程复杂、微囊尺寸过大等缺陷，本发明提出了一种制备丝素载药纳米微囊的制备方法，这种方法简单快速、适用性强，而且制备效率高。

为实现上述目的，本发明提供的技术方案如下：

一种丝素载药纳米微囊的制备方法，包括：利用丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷对功能修饰的聚苯乙烯微球进行交替逐层包覆处理，最终得到多层结构的带有负电势或正电势的包覆聚苯乙烯复合体，最后利用去模板试剂去除功能修饰的聚苯乙烯模板，得到丝素载药纳米微囊；所述功能修饰的聚苯乙烯微球为正电势微球，首次包覆采用丝素蛋白，如果是负电势微球，首次处理采用 3-氨丙基三乙氧基硅烷。

作为优选，所述功能修饰的聚苯乙烯微球包括表面修饰为氨基化正电势修饰或者羧基化负电势修饰，聚苯乙烯微球的直径为 $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$ ，进一步优选为 $0.05\sim 2\mu\text{m}$ 。比如可以直接采用市购的氨基聚苯乙烯微球、羧基聚苯乙烯微球产品，市售的氨基聚苯乙烯微球、羧基聚苯乙烯微球一般以水溶液的形式保存，质量百分比浓度一般为 2~6% 之间。

作为优选，利用丝素蛋白进行包覆处理的步骤为：将待包覆的聚苯乙烯微球置于丝素蛋白水溶液中，分散均匀，然后置于 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 继续反应 5~50min，包覆完成，其中丝素蛋白水溶液的浓度为 $1\sim 10\text{mg/mL}$ 。

在利用丝素蛋白进行包覆处理的步骤中，其中待包覆的聚苯乙烯微球既包括未包覆任何材料的原始表面呈正电势的功能修饰的聚苯乙烯微球，也可以是经过一次或多次丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷交替包覆的聚苯乙烯微球，且最后一次包覆为 3-氨丙基三乙氧基硅烷包覆。

丝素蛋白包覆时，可以采用吹打或者/和超声分散对体系进行均匀化处理。丝素蛋白包覆后，可以分离溶剂，直接进行后续的氨丙基三乙氧基硅烷（即 3-氨丙基三乙氧基硅烷）的包覆。

作为优选，利用 3-氨丙基三乙氧基硅烷进行包覆处理的步骤为：将待包覆的聚苯乙烯微球与 3-氨丙基三乙氧基硅烷在溶剂中混合均匀，然后置于 0~10℃继续反应 5~50min，反应完成，去除溶剂完成包覆。

在利用 3-氨丙基三乙氧基硅烷进行包覆处理的步骤中，待包覆的聚苯乙烯微球既包括未包覆任何材料的表面为负电势的原始功能修饰的聚苯乙烯微球，也可以是经过一次或多次丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷交替包覆的聚苯乙烯微球，且最后一次包覆为丝素蛋白包覆。

3-氨丙基三乙氧基硅烷进行包覆处理后，一般经过 10000~20000rpm，10~20min 离心，分离溶剂，洗涤若干次，即可得到 3-氨丙基三乙氧基硅烷进行包覆处理的微球。

本发明中，通过控制丝素蛋白和经过 3-氨丙基三乙氧基硅烷的加入量，保证丝素蛋白包覆处理后的微球表面为负电势，经过 3-氨丙基三乙氧基硅烷包覆处理后的微球表面为正电势。

本发明中，针对 10mg 的功能修饰的聚苯乙烯微球：每次进行丝素蛋白包覆时，需要的丝素蛋白的质量为 1~20mg，进一步优选为 2~8mg；每次进行 3-氨丙基三乙氧基硅烷包覆时，需要的 3-氨丙基三乙氧基硅烷的质量为 1~5mg，进一步优选为 1~2mg。

作为优选，以包覆完成一次丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷或者包覆完成一次 3-氨丙基三乙氧基硅烷和丝素蛋白为一层，总层数为 3~15 层。所述步骤（6）的重复次数可为 3~12 次不等，根据自组装层数的不同获得的丝素纳米微囊的囊层厚度也各有差异。

作为一种具体的优选方案，

一种丝素载药纳米微囊的制备方法，采用如下步骤：

（1）提取家蚕丝素蛋白，获得丝素蛋白水溶液，调整丝素蛋白浓度为 1~10mg/mL；

（2）取功能化修饰的聚苯乙烯（以正电势功能化修饰后的聚苯乙烯）微球作为模板，经过离心、洗涤后获得微球沉淀；

（3）将 5~10mL 丝素蛋白溶液与聚苯乙烯微球（以 0.5mL，2.5%，计算）共混，分散均匀，超声后再置于 0~5℃继续反应 10~30min；

(4) 向步骤(3)反应体系中加入 3-氨丙基三乙氧基硅烷 2~5 μ L, 剧烈震荡后, 置于 0~5 $^{\circ}$ C 继续反应 10~30min;

(5) 将步骤(4)反应溶液进行离心, 去除上清液后用去离子水洗涤, 去除未反应的丝素和氨丙基三乙氧基硅烷;

(6) 再次加入丝素蛋白, 重复上述(3)~(5)反应步骤 3~12 次, 获得不同厚度丝素蛋白层包裹的聚集体;

(7) 将上述溶液体系离心后, 用去膜板试剂(比如二甲基甲酰胺)进行处理, 去除聚苯乙烯微球模板, 最终获得丝素蛋白载药纳米微囊。

针对目前制备丝素蛋白中空微囊过程中存在的步骤复杂、尺寸较大的不足提出了解决方案。本发明依次包括如下步骤: 提取丝素蛋白, 获得丝素蛋白溶液; 选取尺寸在纳米尺度、表面修饰的聚苯乙烯微球作为模板, 加入丝素蛋白进行包覆; 加入 3-氨丙基三乙氧基硅烷作为交联剂, 结合并引导丝素蛋白包覆, 交替结合形成层层组装; 重复处理步骤获得具有厚实丝素蛋白壳层的微球聚合体; 用二甲基甲酰胺去除聚苯乙烯微球模板, 获得丝素蛋白纳米载药微囊, 可作为药物载体对药物进行装载。本发明工艺简单, 适用性强, 制备的微囊尺寸可控在纳米级, 能够更有效的运送药物至细胞内部发挥作用, 并且根据药物的性质可对微囊的表面电势进行调控, 增强静电吸附, 提高有效载药率。

本发明中, 加入的 3-氨丙基三乙氧基硅烷能够水解成硅醇化合物, 能够作为交联剂与丝素蛋白的羟基和羧基发生亲核反应, 依靠氢键和静电引力结合, 形成聚合体, 与此同时, APTES 也提供了高的正电荷, 在下一步反应中又能吸引带负电的丝素蛋白, 诱导丝素蛋白包覆, 由此能够进行层层自组装循环。根据反应体系, APTES 的加入量为 2~5 μ L。

本发明还提供了一种丝素载药纳米微囊, 由上述任一技术方案所述的制备方法制备得到。

根据药物性质, 可对丝素蛋白载药纳米微囊的表面电荷进行调控, 最后一次包覆处理为丝素蛋白时可获得表面负电势的微囊, 利于装载正电势分子药物, 最后一次加入的是 APTES 时可获得表面正电势的微囊, 能够对负电势的大分子药物、质粒、DNA 等进行装载。作为优选, 装载正电

势分子药物时，采用最后一次包覆处理为丝素蛋白的表面为负电势的丝素载药纳米微囊；装载负电势的分子药物、质粒、DNA 进行装载时，采用采用最后一次包覆处理为 3-氨丙基三乙氧基硅烷的表面为正电势的丝素载药纳米微囊。

作为优选，正电势的抗肿瘤药物为盐酸阿霉素。

由于上述技术方案的运用，本发明与现有技术相比具有以下突出优点：

(1) 与现有的方法，即由于是利用氢键或亲疏水力使丝素蛋白包覆，吸附力弱不稳定，需要对丝素蛋白进行 β 化处理的方法不同，本发明引进了 APTES，既有氢键又能产生静电引力，能够使丝素蛋白较稳定的吸附在模板表面，因此，可以不需要 β 化处理。本发明在制备过程中减少了对丝素蛋白的 β 化处理，既简化了制备工艺，也减轻了有机溶剂进行 β 化处理时造成的毒副作用。

(2) 本发明引入了氨丙基三乙基硅烷作为交联，同时发挥了氢键和静电引力的非共价键作用进行结合，使形成的丝素蛋白沉积稳定，无需每次都使用有机溶剂进行 β 处理。

(3) 本发明的制备技术引入纳米级的微球模板，从而能够获得丝素蛋白纳米微囊，更加有效地将药物运送至细胞。

(4) 本发明可根据最外层包覆丝素蛋白或 APTES 决定纳米微囊表面电势的正负特性，从而可根据需要对具有电势的分子药物进行有效装载。

附图说明

图 1 为实施例 1 中丝素载药纳米微囊制备过程中表面电势变化图。

图 2 为实施例 1 中制备的丝素载药纳米微囊形貌的扫描电镜图片。

图 3 为实施例 3 中丝素微囊药物装载率图片。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明做进一步的详细说明，以下实施例是对本发明的解释而本发明并不局限于以下实施例。

本发明的实施例如下：

实施例 1

本实施例中丝素载药纳米微囊的制备方法依次包括如下步骤：

(1) 提取家蚕丝素蛋白，调整丝素蛋白浓度为 1mg/mL 备用（溶剂为水）；

(2) 取表面氨基化（-NH₂）的聚苯乙烯微球溶液 0.5mL（阿拉丁，氨基聚苯乙烯微球，浓度 25g/L），微球平均粒径为 0.05 - 0.1μm，离心、洗涤两次后获得微球沉淀，得到的微球模板备用；

(3) 将 5mL 步骤（1）得到的丝素蛋白溶液与步骤（2）的微球模板进行混合，吹打均匀后，超声分散 10min，置于 4℃ 反应 15min；

(4) 向步骤（3）的反应溶液中加入氨丙基三乙氧基硅烷 2μL，剧烈震荡 5s 后，置于 4℃ 反应 15min；

(5) 将步骤（4）获得的反应体系经过 15000rpm，15min 离心，去除上清液中，用去离子水洗涤两次，获得沉淀；

(6) 向步骤（5）中的沉淀中再次加入丝素蛋白 5mL，重复（3）～（5）反应步骤 5 次，最后一次仅用丝素蛋白处理，获得丝素蛋白包覆聚苯乙烯复合体，丝素蛋白包覆层总数为 6 层，经过电位测试，表面电势为负电势，表面电势变化如图 1 所示。

(7) 用 5mL 二甲基甲酰胺处理步骤（6）的产物 24h，去除聚苯乙烯模板，离心、洗涤后可获得中空的丝素纳米载药微囊，其扫描电镜形貌如图 2 所示。

(8) 将丝素纳米载药微囊与正电势的抗肿瘤药物盐酸阿霉素进行共培养 24h，可对药物进行装载。

实施例 2

(1) 提取家蚕丝素蛋白，调整丝素蛋白浓度为 2mg/mL 备用；

(2) 取表面羧基基化（-COOH）的聚苯乙烯微球溶液 0.5mL（阿拉丁，羧基聚苯乙烯微球，浓度 25g/L），微球平均粒径为 0.05-0.1μm，离心、洗涤两次后获得微球沉淀；

(3) 将微球再次用 5mL 去离子水进行分散，加入氨丙基三乙氧基硅烷 2μL，剧烈震荡 5s 后，置于 4℃ 反应 15min；

(4) 将步骤（3）的反应溶液离心，去除上清液，随后加入 5mL 丝

素蛋白，吹打均匀后，超声分散 10min，置于 4℃反应 15min；

(5) 向步骤(4)的反应溶液中再次加入氨丙基三乙氧基硅烷 2 μL ，剧烈震荡 5S 后，置于 4℃反应 15min；

(6) 将步骤(5)获得的反应体系经过 12000rpm，15min 离心，去除上清液中，用去离子水洗涤两次，获得沉淀；

(7) 重复(4)～(6)反应步骤 8 次，最后一次用 APTES（氨丙基三乙氧基硅烷）处理，获得丝素蛋白包覆聚苯乙烯复合体，丝素蛋白包覆层总数为 9 层，经过电位测试，表面电势为正；

(8) 用 8mL 二甲基甲酰胺处理步骤(7)的产物 24h，去除聚苯乙烯模板，离心、洗涤后可获得中空的丝素纳米载药微囊。

(9) 将丝素纳米载药微囊与负电势的质粒进行共培养 24h，可对质粒进行装载，运送到细胞内部后可进行基因治疗。

实施例 3

(1) 提取家蚕丝素蛋白，调整丝素蛋白浓度为 1mg/mL 备用；

(2) 取表面氨基化 (-NH₂) 的聚苯乙烯微球溶液 1mL（阿拉丁，氨基聚苯乙烯微球，浓度 25g/L），微球平均粒径为 0.1 - 0.2 μm ，离心、洗涤两次后获得微球沉淀；

(3) 将 5mL 丝素蛋白溶液与步骤(2)的微球模板进行混合，吹打均匀后，超声分散 10min，置于 4℃反应 15min；

(4) 向步骤(3)的反应溶液中加入氨丙基三乙氧基硅烷 5 μL ，剧烈震荡 5S 后，置于 4℃反应 15min；

(5) 将步骤(4)获得的反应体系经过 12000rpm，15min 离心，去除上清液中，用去离子水洗涤两次，获得沉淀；

(6) 向步骤(5)中再次加入丝素蛋白 5mL，重复(3)～(5)反应步骤 8 次，获得丝素蛋白包覆聚苯乙烯复合体，丝素蛋白包覆层总数为 9 层，经过电位测试，表面电势为负电势。

(7) 用 10mL 二甲基甲酰胺处理步骤(6)的产物 24h，去除聚苯乙烯模板，离心、洗涤后可获得壳层较厚的丝素纳米载药微囊。

按照实施例 1 方法制备 3 层的丝素纳米载药微囊。然后将三层的丝素

纳米载药微囊、实施例 1 制备得到的丝素纳米载药微囊和实施例 3 制备得到的丝素纳米载药微囊与正电势的抗肿瘤药物盐酸阿霉素进行共培养 24h，可对药物进行装载，其药物装载率如图 3 所示，由图 3 所示，9 层的丝素纳米载药微囊载药率在 80%以上。

最后，还需要注意的是，以上列举的仅是本发明的具体实施例子。显然，本发明不限于以上实施例子，还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形，均应认为是本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，包括：利用丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷对功能修饰的聚苯乙烯微球进行交替逐层包覆处理，最终得到多层结构的带有负电势或正电势的包覆聚苯乙烯复合物，最后利用去模板试剂去除功能修饰的聚苯乙烯模板，得到丝素载药纳米微囊；所述功能修饰的聚苯乙烯微球为正电势微球，首次包覆采用丝素蛋白，如果是负电势微球，首次处理采用 3-氨丙基三乙氧基硅烷。

2、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，利用丝素蛋白进行包覆处理的步骤为：将待包覆的聚苯乙烯微球置于丝素蛋白水溶液中，分散均匀，然后置于 0~10℃继续反应 5~50min，包覆完成，其中丝素蛋白水溶液的浓度为 1~10mg/mL。

3、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，利用 3-氨丙基三乙氧基硅烷进行包覆处理的步骤为：将待包覆的聚苯乙烯微球与 3-氨丙基三乙氧基硅烷在溶剂中混合均匀，然后置于 0~10℃继续反应 5~50min，反应完成，去除溶剂完成包覆。

4、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，所述功能修饰的聚苯乙烯微球包括表面修饰为氨基化正电势修饰或者羧基化负电势修饰，聚苯乙烯微球的直径为 0.05~0.5 μ m。

5、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，经过丝素蛋白包覆处理后的微球表面为负电势，经过 3-氨丙基三乙氧基硅烷包覆处理后的微球表面为正电势。

6、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，针对 10mg 的功能修饰的聚苯乙烯微球：每次进行丝素蛋白包覆时，需要的丝素蛋白的质量为 1~20mg；每次进行 3-氨丙基三乙氧基硅烷包覆时，需要的 3-氨丙基三乙氧基硅烷的质量为 1~5mg。

7、根据权利要求 1 所述的丝素载药纳米微囊的制备方法，其特征在于，以包覆完成一次丝素蛋白和 3-氨丙基三乙氧基硅烷或者包覆完成一次 3-氨丙基三乙氧基硅烷和丝素蛋白为一层，总层数为 3~15 层。

8、一种丝素载药纳米微囊，其特征在于，由所述权利要求 1~7 任一项所述的制备方法制备得到。

9、根据权利要求 8 所述的丝素载药纳米微囊，其特征在于，装载正电势分子药物时，采用最后一次包覆处理为丝素蛋白的表面为负电势的丝素载药纳米微囊；装载负电势的分子药物、质粒、DNA 进行装载时，采用采用最后一次包覆处理为 3-氨丙基三乙氧基硅烷的表面为正电势的丝素载药纳米微囊。

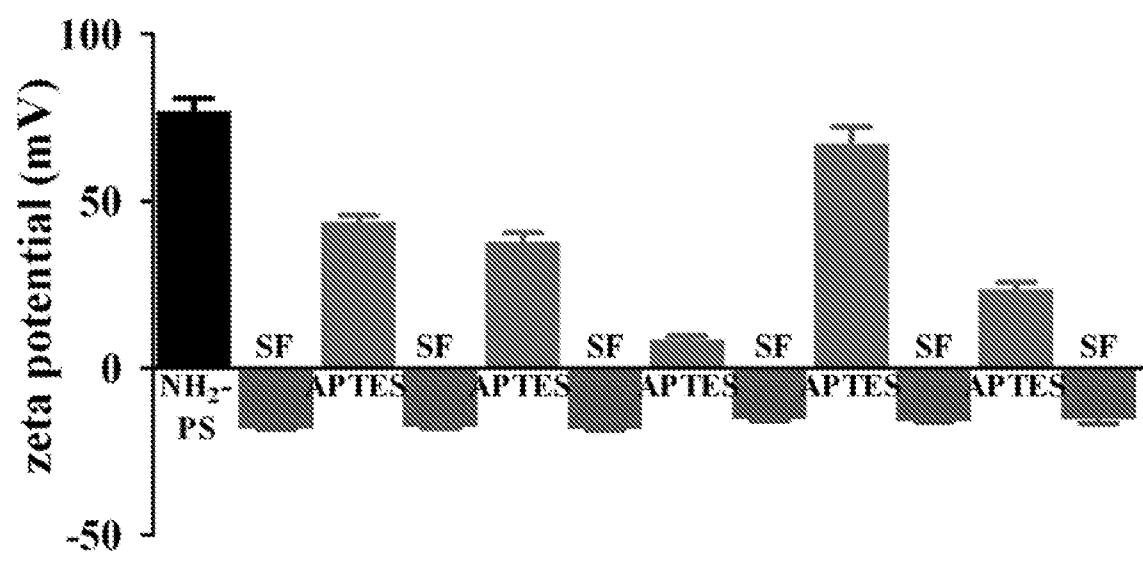


图 1

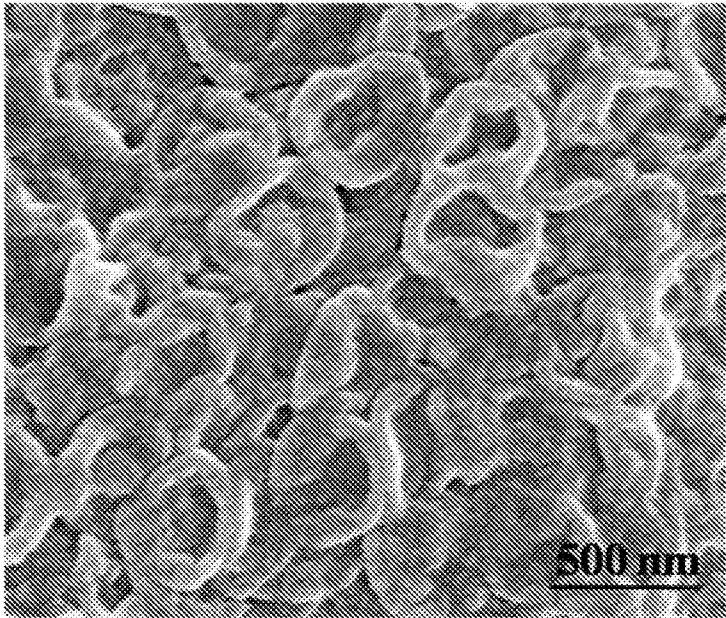


图 2

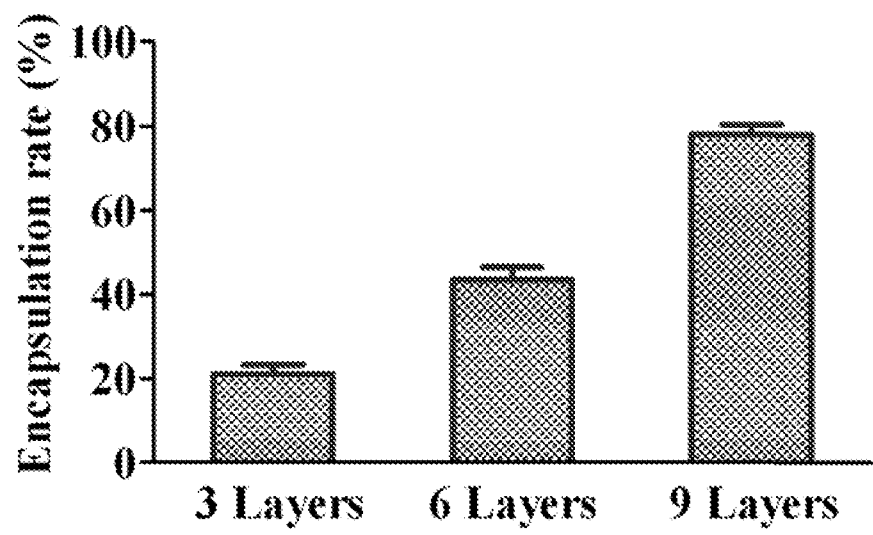


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/097676

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 9/51(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/32(2006.01)i; A61P 35/00(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) A61K; 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) CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; STN; 百度学术: 丝素蛋白, 微囊, 纳米囊, 3-氨丙基三乙氧基硅烷, APTES, 聚苯乙烯, 逐层, 负电势, 正电势, 模板, 浙江大学, 杨明英, 王捷, 陈玉银, fibroin, 3-aminopropyltriethoxysilane, polystyrene, microcapsule?, nanocapsule?, +capsule?, +sphere?, template, layer by layer, positive charge, negative charge																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 110327307 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 October 2019 (2019-10-15) claims 1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Linhao Li et al. . "Silk Fibroin Layer-by-layer Microcapsules for Localized Gene Delivery." <i>Biomaterials.</i>, Vol. 35, 13 June 2014 (2014-06-13), pp. 7929-7939</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103768038 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 07 May 2014 (2014-05-07) entire document</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105963275 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES et al.) 28 September 2016 (2016-09-28) entire document</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011041395 A2 (TUFTS COLLEGE et al.) 07 April 2011 (2011-04-07) entire document</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106492270 A (HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 15 March 2017 (2017-03-15) entire document</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	PX	CN 110327307 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 October 2019 (2019-10-15) claims 1-9	1-9	A	Linhao Li et al. . "Silk Fibroin Layer-by-layer Microcapsules for Localized Gene Delivery." <i>Biomaterials.</i> , Vol. 35, 13 June 2014 (2014-06-13), pp. 7929-7939	1-9	A	CN 103768038 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 07 May 2014 (2014-05-07) entire document	1-9	A	CN 105963275 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES et al.) 28 September 2016 (2016-09-28) entire document	1-9	A	WO 2011041395 A2 (TUFTS COLLEGE et al.) 07 April 2011 (2011-04-07) entire document	1-9	A	CN 106492270 A (HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 15 March 2017 (2017-03-15) entire document	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
PX	CN 110327307 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 15 October 2019 (2019-10-15) claims 1-9	1-9																					
A	Linhao Li et al. . "Silk Fibroin Layer-by-layer Microcapsules for Localized Gene Delivery." <i>Biomaterials.</i> , Vol. 35, 13 June 2014 (2014-06-13), pp. 7929-7939	1-9																					
A	CN 103768038 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 07 May 2014 (2014-05-07) entire document	1-9																					
A	CN 105963275 A (INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES et al.) 28 September 2016 (2016-09-28) entire document	1-9																					
A	WO 2011041395 A2 (TUFTS COLLEGE et al.) 07 April 2011 (2011-04-07) entire document	1-9																					
A	CN 106492270 A (HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 15 March 2017 (2017-03-15) entire document	1-9																					
☒ 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 09 September 2020		Date of mailing of the international search report 25 September 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/CN2020/097676

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUAN Guo-ping et al. . "Promoted Cytocompatibility of Silk Fibroin Fiber Vascular Graft through Chemical Grafting with Bioactive Molecules." <i>Journal of Donghua University.</i> , Vol. 30, No. 5, 31 May 2013 (2013-05-31), pp. 362-366	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/097676

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110327307	A	15 October 2019	CN	110327307	B	23 June 2020
CN	103768038	A	07 May 2014	CN	103768038	B	19 August 2015
CN	105963275	A	28 September 2016	CN	105963275	B	17 May 2019
WO	2011041395	A2	07 April 2011	EP	2483199	A4	16 October 2013
				US	2015056293	A1	26 February 2015
				EP	2483199	B1	26 April 2017
				WO	2011041395	A3	25 August 2011
				US	9381164	B2	05 July 2016
				US	8715740	B2	06 May 2014
				IL	218654	A	31 August 2015
				US	2012187591	A1	26 July 2012
				IL	218654	D0	31 May 2012
				CA	2774643	A1	07 April 2011
				JP	5730317	B2	10 June 2015
				JP	2013506007	A	21 February 2013
				IN	2358DEN2012	A	21 August 2015
				EP	2483199	A2	08 August 2012
CN	106492270	A	15 March 2017	CN	106492270	B	26 March 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/097676

A. 主题的分类

A61K 9/51(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; A61K 47/32(2006.01)i; A61P 35/00(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)

A61K; A61P

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; DWPI; SIPOABS; STN; 百度学术: 丝素蛋白, 微囊, 纳米囊, 3-氨丙基三乙氧基硅烷, APTES, 聚苯乙烯, 逐层, 负电势, 正电势, 模板, 浙江大学, 杨明英, 王捷, 陈玉银, fibroin, 3-aminopropyltriethoxysilane, polystyrene, microcapsule?, nanocapsule?, +capsule?, +sphere?, template, layer by layer, positive charge, negative charge

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	CN 110327307 A (浙江大学) 2019年 10月 15日 (2019 - 10 - 15) 权利要求1-9	1-9
A	Linhao Li等. "Silk Fibroin Layer-by-layer Microcapsules for Localized Gene Delivery." Biomaterials., 第35卷, 2014年 6月 13日 (2014 - 06 - 13), 第7929-7939页	1-9
A	CN 103768038 A (中国医学科学院生物医学工程研究所) 2014年 5月 7日 (2014 - 05 - 07) 全文	1-9
A	CN 105963275 A (中国医学科学院生物医学工程研究所等) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 全文	1-9
A	W0 2011041395 A2 (TUFTS COLLEGE等) 2011年 4月 7日 (2011 - 04 - 07) 全文	1-9
A	CN 106492270 A (哈尔滨工业大学等) 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15) 全文	1-9

☒ 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

2020年 9月 9日

国际检索报告邮寄日期

2020年 9月 25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

齐丹丹

电话号码 53961871

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	GUAN Guo-ping等. "Promoted Cytocompatibility of Silk Fibroin Fiber Vascular Graft through Chemical Grafting with Bioactive Molecules." Journal of Donghua University., 第30卷, 第5期, 2013年 5月 31日 (2013 - 05 - 31), 第362-366页	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/097676

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	110327307	A	2019年 10月 15日	CN	110327307	B	2020年 6月 23日	
CN	103768038	A	2014年 5月 7日	CN	103768038	B	2015年 8月 19日	
CN	105963275	A	2016年 9月 28日	CN	105963275	B	2019年 5月 17日	
WO	2011041395	A2	2011年 4月 7日	EP	2483199	A4	2013年 10月 16日	
				US	2015056293	A1	2015年 2月 26日	
				EP	2483199	B1	2017年 4月 26日	
				WO	2011041395	A3	2011年 8月 25日	
				US	9381164	B2	2016年 7月 5日	
				US	8715740	B2	2014年 5月 6日	
				IL	218654	A	2015年 8月 31日	
				US	2012187591	A1	2012年 7月 26日	
				IL	218654	D0	2012年 5月 31日	
				CA	2774643	A1	2011年 4月 7日	
				JP	5730317	B2	2015年 6月 10日	
				JP	2013506007	A	2013年 2月 21日	
				IN	2358DEN2012	A	2015年 8月 21日	
				EP	2483199	A2	2012年 8月 8日	
CN	106492270	A	2017年 3月 15日	CN	106492270	B	2019年 3月 26日	