

(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
2022 年 9 月 15 日 (15.09.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/188399 A1

(51) 国际专利分类号:

A61L 26/00 (2006.01) C08J 3/075 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01) C08L 89/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/122111

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 30 日 (30.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110251223.5 2021 年 3 月 8 日 (08.03.2021) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(72) 发明人: 伍丽君(WU, Lijun); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。 吕强(LV, Qiang); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。 高素玥(GAO, Suyue); 中

国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。 丁召召(DING, Zhaozhao); 中国江苏省苏州市相城区济学路 8 号, Jiangsu 215000 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (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, 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: SILK PROTEIN NANOFIBER GEL DRESSING HAVING PRESSURE SPREADABILITY, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用

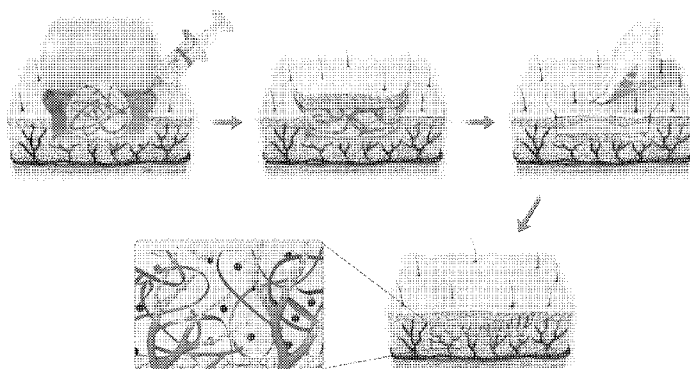


图 1

(57) Abstract: The present invention provides a method for preparing a silk protein nanofiber gel dressing having pressure spreadability, comprising the following steps: S1) mixing and stirring first silk protein nanofiber gel and water to obtain silk protein nanofiber gel having a changed rheological property, and mixing a proangiogenic drug and second silk protein nanofiber gel to obtain drug-loaded silk protein nanofiber gel; and S2) mixing and stirring the silk protein nanofiber gel having the changed rheological property and the drug-loaded silk protein nanofiber gel to obtain the silk protein nanofiber gel dressing having the pressure spreadability. Compared with the prior art, in the present invention, a special function of spreading and shaping the gel under mild pressure to form an ultra-thin coating is implemented by regulating and controlling the rheological property of the silk protein nanofiber gel; moreover, the silk protein nanofiber is used as a carrier to load the proangiogenic drug, so as to meet the special requirement of uniform vascularization of skin flaps.



WO 2022/188399 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, 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: 本发明提供了一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的制备方法, 包括以下步骤: S1) 将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌, 得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶; 将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合, 得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶; S2) 将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌, 得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。与现有技术相比, 本发明通过调控丝蛋白纳米纤维凝胶的流变特性, 实现凝胶温和压力下铺展定型形成超薄涂层的特殊功能, 同时以丝蛋白纳米纤维为载体加载促血管再生药物, 从而满足皮瓣均匀血管化的特殊需求。

具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用

本申请要求于 2021 年 03 月 08 日提交中国专利局、申请号为 202110251223.5、发明名称为“具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于创面修复技术领域，尤其涉及一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用。

背景技术

10 皮瓣移植是整形、烧伤、创伤等常用的治疗方式，能对创面提供有效保护，恢复皮肤功能。皮瓣移植成功的关键在于皮瓣和创基血管化网络的快速重构，从而能为皮瓣提供营养，避免皮瓣坏死。由于血供不足导致的皮瓣坏死是皮瓣移植手术失败的重要因素，也是制约皮瓣使用尺寸、形状和应用领域的核心问题。因此，如何提高皮瓣的促血管化能力，促进皮瓣和创基血管化网络的快速有效重构是皮瓣移植的关键问题，相关技术和产品在创面修复领域具有重要意义和广泛应用前景。

目前已有多种能够促进血管化的药物，并成功应用于临床，为实现皮瓣快速均匀血管化的要求，需要合适的载体对促血管化药物进行加载控释。具有优异生物相容性的凝胶体系不仅能够控制药物的控释，同时可为皮瓣再生提供基质，被认为是合适的载体材料，包含促血管化药物的凝胶敷料在促进真皮再生、骨组织修复等方面也表现出良好效果。然而，尽管多种生物材料载药凝胶也被尝试用于促进皮瓣的再生和血管化，由于皮瓣对血管化速率和均匀性的特殊要求，常规的载药凝胶难以获得良好预期效果。主要原因包括：（1）传统凝胶难以形成均一的涂层为皮瓣提供均匀的血管化刺激，而这种不均匀性自然带来皮瓣部分坏死；（2）尽管所载药物能够促进血管化，但凝胶本身会在皮瓣和创基之间形成物理障碍，限制两者之间血管化网络的快速形成。因此，理想的载药凝胶敷料应该具有良好的可铺展性，能够均匀布满皮瓣和创基，同时所形成涂层应该足够薄，以避免凝胶本身的物理阻碍，根据其他研究结果，最好涂层的厚度能在 200 微米以下。同时，考虑到临床实际应用，具有压力可铺展性的

-2-

凝胶,使用过程不会改变现有临床医生常规术式,是载药促血管化凝胶敷料的理想选择。然而,具有压力可铺展性,且所形成涂层满足低于 200 微米厚度要求的生物材料凝胶未见任何报道。

5 丝蛋白已被广泛尝试应用于创面修复领域,其具有优异的生物相容性,低炎症反应以及可吸收性。近年来,通过不同方式,研究者制备出不同构象和尺寸的丝蛋白纳米纤维凝胶和海绵,以进一步改善其对组织的修复能力。并且纳米纤维同时还可以加载不同药物,通过药物的控释实现不同功能。因此,考虑到丝蛋白在不同组织修复、凝胶制备以及不同药物加载控释等多方面的显著优势,以丝蛋白纳米纤维为基质,开发制备能满足皮瓣血管化特殊要求的凝胶敷料具有一定可行性,然而同其它生物材料相似,具有如上压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶未见报道。

发明内容

有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用,该丝蛋白纳米纤维凝胶敷料可在温和压力下铺展定型形成超薄涂层。

本发明提供了一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的制备方法,包括以下步骤:

S1)将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌,得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶;

20 将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合,得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶;

S2)将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌,得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

25 优选的,所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 2~5 wt%;所述第二丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 0.3~2 wt%;所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 0.6~1.5 wt%。

优选的,所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶中的丝蛋白纳米纤维为高结晶丝蛋白纳米纤维;所述高结晶丝蛋白纳米纤维的结晶度大于等于 40%;所述高结晶丝蛋白纳米纤维的直径为 10~30 nm;长度为 0.1~3 μm 。

—3—

优选的，所述步骤 S1) 中混合搅拌的速率为 200~5000 rpm；混合搅拌的时间为 1~48 h；

混合的速率为 10~800 rpm；混合的时间为 10 min~12 h；

混合后，离心，得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶；

5 所述离心的速率为 2000~15000 rpm；离心的时间为 5 min~2 h。

优选的，所述步骤 S2) 中流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶的体积比为 (8~24) : 1。

优选的，所述 S2) 中混合搅拌的速率为 200~5000 rpm；混合搅拌的时间为 1~48 h。

10 优选的，所述步骤 S2) 中混合搅拌后，还进行抽真空处理，得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

优选的，所述抽真空处理的真空度为 0.01~100 Pa；抽真空处理的时间为 10~60 min。

15 本发明还提供了一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料，所述丝蛋白纳米纤维凝胶敷料在压力作用下可铺展成厚度小于等于 200 微米的薄膜，且压力取消后仍维持铺展状态。

本发明还提供了一种上述丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为皮瓣移植用凝胶敷料的应用。

20 本发明提供了一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的制备方法，包括以下步骤：S1) 将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌，得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶；将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合，得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶；S2) 将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌，得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。与现有技术相比，本发明通过调控丝蛋白纳米纤维凝
25 胶的流变特性，实现凝胶温和压力下铺展定型形成超薄涂层的特殊功能，同时以丝蛋白纳米纤维为载体加载促血管再生药物，从而满足皮瓣均匀血管化的特殊需求，且制备得到的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料在温和压力下可均匀铺展，在压力除去后仍可保持铺展状态，得到的涂层厚度低至 200 微米以下，从而消除凝胶对皮瓣和创基血管网络重建的阻碍作用；再者敷料加载的药物可缓慢释

—4—

放，为皮瓣的血管化提供均匀稳定的刺激性环境，结合丝蛋白纳米纤维本身的生物相容性和促进组织修复的能力，有效改善皮瓣血管化水平，提高皮瓣的存活效率；并且该制备方法简单、得到的敷料性能稳定，易于规模化制备，促进血管化能力显著，不仅满足皮瓣血管化的需求，同时对其他创面的血管化具有良好的应用价值，市场前景广阔。

附图说明

图 1 为本发明提供的具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为创面修复凝胶敷料使用方法示意图；

图 2 为本发明实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料及不同浓度的流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的压力铺展效果测试图；

图 3 为本发明实施例 1 中浓度为 2.5 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶稀释至 0.8 wt% 未经剪切后的形态图；

图 4 为本发明实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的动物实验结果图；

图 5 为本发明实施例 2 中 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶在搅拌前后的形态图；

图 6 为本发明实施例 2 步骤 (3) 中浓度为 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶及加载 60 μ M DFO 的丝蛋白纳米纤维水凝胶的流变性能图；

图 7 为本发明实施例 2 中 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维水凝胶加载去铁胺前后的拉曼光谱图；

图 8 为本发明实施例 3 中加载内皮细胞生长因子后的丝蛋白纳米纤维水凝胶与 1.1 wt% 浓度的丝蛋白纳米纤维水凝胶混合后在真空下去除气泡前后的图像；

图 9 为本发明实施例 4 中加载内皮细胞生长因子后的浓度为 2 wt% 的丝蛋白纳米纤维水凝胶与 1.3 wt% 浓度的丝蛋白纳米纤维水凝胶混合后在真空下去除气泡前后的图像；

图 10 为本发明实施例 5 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶的膨胀性能测试图。

具体实施方式

—5—

下面将结合本发明实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

5 本发明提供了一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的制备方法，包括以下步骤：S1) 将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌，得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶；将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合，得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶；S2) 将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌，得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

10 本发明首先通过调整丝蛋白纳米纤维的浓度，调控丝蛋白纳米纤维凝胶的流变性到合适范围，随后通过合适的剪切作用，对流变性进行进一步调控，最终获得理想的流变性能，实现凝胶的温和压力可铺展。随后，将负载药物的丝蛋白纳米纤维同上述体系复合，通过两者比例的调整降低加入载药纳米纤维对体系流变性的影响，并通过再次搅拌的剪切处理，在实现药物均匀分散的同时，获得理想的性能。上述技术的关键在于对丝蛋白纳米纤维深度理解的基础上，优化丝蛋白纳米纤维浓度和剪切作用的协同，最终实现材料性能的突破，获得具有压力可铺展性能，且铺展后涂层厚度低于 200 微米的丝蛋白纳米纤维载药凝胶敷料。

15 并且，本发明所采用的制备方法，全部采用易于控制的物理方式，在水相中实现，方法简单可控，重复性好，有利于保持活性物质的活性，易于规模化生产，临床应用前景广阔。

其中，本发明对所有原料的来源并没有特殊的限制，为市售即可。

25 将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌，得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶；所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度优选为 2~5 wt%，更优选为 2~4 wt%，再优选为 2~3 wt%；在本发明提供的实施例中，所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度具体为 2 wt%、2.5 wt%或 3 wt%；所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶按照本领域技术人员熟知的制备方法制备即可，并无特殊的限制，在本发明中优选为：将丝蛋白纳米纤维水溶液 40℃~60℃浓缩至浓度为 6~12 wt%的

—6—

第一丝蛋白纳米纤维水溶液；将第一丝蛋白纳米纤维水溶液在 20℃~35℃ 浓缩至浓度为 18~24 wt% 的第二丝蛋白纳米纤维水溶液；将所述第二丝蛋白纳米纤维水溶液加水稀释至第三丝蛋白纳米纤维水溶液；将所述第三丝蛋白纳米纤维水溶液在 50℃~70℃ 密封孵育，得到第一丝蛋白纳米纤维凝胶。所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶中的丝蛋白纳米纤维优选为高结晶丝蛋白纳米纤维；高结晶丝蛋白纳米纤维具有高结晶度和高电荷密度，从而使得丝蛋白纳米纤维之间存在疏水作用和电荷作用的动态平衡，因此基于浓度的变化，丝蛋白纳米纤维在水中会存在由溶液态向凝胶态的逐渐转变，从而存在凝胶与溶液的中间态，能够在压力下铺展形成涂层，又能够铺展后固定在创面，为皮瓣提供持续支持；同时，丝蛋白纳米纤维高的负电荷密度赋予凝胶剪切变稀的性能，且由于负电荷导致丝蛋白纳米纤维之间的斥力，可以维持剪切处理后的流变性能，使得剪切后的凝胶在保持凝胶固态的前提下，铺展性能得到明显改善，因此，将浓度调控和剪切处理结合，在深入理解高晶丝蛋白纳米纤维内在结构和性能关系的基础上，通过浓度和剪切处理的协同作用，获得丝蛋白纳米纤维凝胶的理想状态，再结合丝蛋白纳米纤维载药特性，有望突破现有技术屏障，获得适用于皮瓣血管化的特殊丝蛋白纳米纤维凝胶敷料；所述高结晶丝蛋白纳米纤维的结晶度优选大于等于 40%，更优选为 40%~80%，再优选为 40%~60%，最优选为 40%~50%；所述高结晶丝蛋白纳米纤维的直径优选为 10~30 nm，更优选为 15~25 nm，再优选为 20 nm；长度优选为 0.1~3 μm，更优选为 0.5~2.5 μm，再优选为 0.5~1.5 μm，最优选为 1 μm；将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌；所述水优选为去离子水；所述混合搅拌的速率优选为 200~5000 rpm，更优选为 500~4000 rpm，再优选为 600~3000 rpm；在本发明提供的实施例中，所述混合搅拌的速率具体为 800 rpm、900 rpm、600 rpm、3000 rpm 或 1600 rpm；所述混合搅拌的时间优选为 1~48 h，更优选为 2~46 h；在本发明提供的实施例中，所述混合搅拌的时间具体为 24 h、46 h、2 h 或 3 h；混合搅拌后得到的流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度优选为 0.6~1.5 wt%，更优选为 0.8~1.3 wt%；在本发明提供的实施例中，所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度具体为 0.8 wt%、1 wt%、1.1 wt%、1.3 wt%、1.3 wt% 或 1.2 wt%。本发明通过特定构象和纳米结构的丝蛋白纳米纤维的选择，充分利用其疏水性和高负电

—7—

性,通过纳米纤维浓度变化和剪切的协同作用调控疏水性和高负电性对凝胶理化性能的影响,最终获得能够在压力下铺展,形成厚度低于 200 微米涂层的丝蛋白纳米纤维凝胶,满足皮瓣再生的特殊要求。

将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合;所述促血管再生的
5 药物为本领域技术人员熟知的促血管化的药物即可,并无特殊的限制,其可为小分子药物、大分子药物或其他具有促血管化能力的功能分子,在本发明中优选为去铁胺或生长因子 VEGF;所述第二丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度优选为 0.3~2 wt%,更优选为 0.6~2 wt%;在本发明提供的实施例中,所述第二丝蛋白
10 蛋白纳米纤维凝胶的浓度具体为 1.2 wt%、1 wt%、2 wt%或 0.6 wt%;所述第二丝蛋白纳米纤维凝胶可按照上述第一丝蛋白纳米纤维凝胶的方法进行制备即可;所述第二丝蛋白纳米纤维凝胶中丝蛋白纳米纤维也优选为高结晶丝蛋白纳米纤维;所述高结晶丝蛋白纳米纤维的结晶度优选大于等于 40%,更优选为 40%~80%,再优选为 40%~60%,最优选为 40%~50%;所述高结晶丝蛋白纳
15 米纤维的直径优选为 10~30 nm,更优选为 15~25 nm,再优选为 20 nm;长度优选为 0.1~3 μm ,更优选为 0.5~2.5 μm ,再优选为 0.5~1.5 μm ,最优选为 1 μm ;所述混合的速率优选为 10~800 rpm,更优选为 50~700 rpm,再优选为 100~600 rpm;在本发明提供的实施例中,所述混合的速率具体为 200 rpm、400 rpm、600 rpm 或 100 rpm;混合的时间优选为 10 min~12 h,更优选为 0.5~10 h,再
20 优选为 2~10 h;混合后体系中促血管再生的药物的浓度优选为 0.01~5 mg/ml,更优选为 0.05~3 mg/ml,再优选为 0.06~2 mg/ml;混合后,优选离心,得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶;所述离心的速率优选为 2000~15000 rpm,更优选为 5000~15000 rpm,更优选为 5000~14000 rpm;在本发明提供的实施例中,所述离心的速率具体为 12000 rpm、14000 rpm、9000 rpm 或 5000 rpm;所述离心的时间优选为 5 min~2 h,更优选为 10~100 min,再优选为 20~80 min,最优选
25 为 25~60 min。通过离心可除去未加载的药物。

在本发明中上述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶的制备并无先后顺序之分。

将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌;所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶体

—8—

积比优选为 (8~24): 1; 在本发明提供的实施例中, 所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶体积比具体为 8: 1、15: 1、24: 1 或 12: 1; 所述混合搅拌的速率优选为 200~5000 rpm, 更优选为 500~4000 rpm, 再优选为 500~2000 rpm; 在本发明提供的实施例中, 所述混合搅拌的速率具体为 1000 rpm、600 rpm、2000 rpm 或 500 rpm; 混合搅拌的时间优选为 1~48 h, 更优选为 2~40 h, 再优选为 2~30 h, 最优选为 2~24 h; 在本发明提供的实施例中, 所述混合搅拌的时间具体为 6 h、14 h、4 h、2 h 或 24 h。通过丝蛋白纳米纤维加载促血管化药物, 利用相同丝蛋白纳米纤维易于相互分散的优势, 实现药物在凝胶中的均匀分散, 结合超薄涂层实现对皮瓣血管化的均匀作用, 解决现有技术体系难以均匀作用的问题以及凝胶物理阻碍作用的问题, 性能显著提高; 同时药物负载在纳米纤维上, 再同处理后的纳米纤维凝胶复合, 并通过两者比例的调整, 降低载药纳米纤维对凝胶体系本体流变性的影响, 使得体系具有更高灵活性, 可以根据不同要求, 选择合适药物, 以满足不同应用需求。

混合搅拌后, 优选还进行抽真空处理, 得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料; 所述抽真空处理的真空度优选为 0.01~100 Pa, 更优选为 1~100 Pa, 再优选为 5~100 Pa, 最优选为 10~100 Pa; 抽真空处理的时间优选为 10~60 min, 更优选为 20~60 min。通过抽真空处理可除去其中的气泡。

本发明通过调控丝蛋白纳米纤维凝胶的流变特性, 实现凝胶温和压力下铺展定型形成超薄涂层的特殊功能, 同时以丝蛋白纳米纤维为载体加载促血管再生药物, 从而满足皮瓣均匀血管化的特殊需求, 且制备得到的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料在温和压力下可均匀铺展, 在压力除去后仍可保持铺展状态, 得到的涂层厚度低至 200 微米以下, 从而消除凝胶对皮瓣和创基血管网络重建的阻碍作用; 再者敷料加载的药物可缓慢释放, 为皮瓣的血管化提供均匀稳定的刺激性环境, 结合丝蛋白纳米纤维本身的生物相容性和促进组织修复的能力, 有效改善皮瓣血管化水平, 提高皮瓣的存活效率; 并且该制备方法简单、得到的敷料性能稳定, 易于规模化制备, 促进血管化能力显著, 不仅满足皮瓣血管化的需求, 同时对其他创面的血管化具有良好的应用价值, 市场前景广阔。

本发明还提供了一种上述方法制备的具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料, 所述丝蛋白纳米纤维凝胶敷料在压力作用下可铺展成厚度小于等

-9-

于 200 微米的薄膜，且压力取消后仍维持铺展状态。

其中，所述压力优选为 500 g。

本发明还提供了上述方法制备的具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为创面修复凝胶敷料的应用，尤其是皮瓣移植用凝胶敷料的应用。参见图 1，图 1 为本发明提供的具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为创面修复凝胶敷料使用方法示意图。

为了进一步说明本发明，以下结合实施例对本发明提供的一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料、其制备方法及应用进行详细描述。

以下实施例中所用的试剂均为市售。

实施例 1

(1) 将浓度为 2.5 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶 (丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m) 添加去离子水，将浓度调控到 0.8 wt%，利用磁力搅拌器在 800 rpm 的速率下，搅拌 24 小时；

(2) 将去铁胺粉末同浓度为 1.2 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶 (丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m) 混合，使得去铁胺浓度为 1mg/ml，在 200 rpm 的速率下搅拌 4 小时，随后在 12000 rpm 的转速下离心 30 分钟，底部为载药的丝蛋白纳米纤维凝胶；

(3) 将上述载药纳米纤维凝胶和 (1) 中搅拌处理的凝胶按照 1:15 的体积比混合，然后在 1000 rpm 的转速下搅拌 6 小时，使得两种凝胶充分混合，且混合凝胶的流变性调整到合适程度；

(4) 将上述丝蛋白载药纳米纤维凝胶在 60 Pa 的真空度下抽真空 50 分钟，去除气泡，获得最终的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

同时将浓度为 2.5 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶 (丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m) 添加去离子水，将浓度调控到 0.3~2 wt%，利用磁力搅拌器在 800 rpm 的速率下，搅拌 24 小时，得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

对实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料及不同浓度的流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的压力铺展效果进行测试，压力为 500 g，得到其结果如图 2 所示，其中 a~c 为实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料

的压力铺展效果图，可以看到凝胶在玻璃板和动物创面上均可以均匀铺展，且压力去除后不会收缩；图 2 中 d 为不同浓度的流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的压力铺展效果图，可以看到，浓度过高，凝胶在压力取消后会收缩，浓度过低，凝胶流动性太好，容易流失。

5 图 3 为浓度为 2.5 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶稀释至 0.8 wt% 未经剪切后的形态图。从图 3 中可以看出未经剪切处理的凝胶没有合理的流动性，不具备合理的压力铺展性能。

图 4 为实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的动物实验结果图，其中 Control 为对照图，不经任何处理，SNF 为步骤 (1) 中得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶，SNF-DFO 为实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。由图 4 可以看出，实施例 1 中得到的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料可均匀分布在皮瓣和创基之间，并铺满整个皮瓣，皮瓣的存活率和血管化网络程度均显著改善。动物实验过程中，将大鼠以 4% 浓度的水合氯醛腹腔注射麻醉 (1ml/100g) 后，剃除背部毛发，室温下大鼠以俯卧位置于手术台上，
10 标记双侧髂后上棘位置，设计大鼠背部“乒乓球拍”形狭长窄蒂皮瓣，蒂部起点为两侧髂棘连线水平，蒂宽 1 cm，蒂长 3 cm，圆形瓣部直径 3 cm；用 75% 乙醇进行皮肤消毒；手术刀沿设计线切开皮肤全层，保留蒂部连接，将皮瓣自肉膜层掀起，全层分离后，回移植，用 5-0 可吸收线原位缝合，间断缝合结束
15 前自创口边缘将 0.5 ml 材料 (空白组、SNF、SNF-DFO) 推注至皮瓣与基底之间，完成缝合，以指腹约 500g 压力于皮瓣上方轻柔按摩，使材料铺展于皮瓣下方，清洁纱布包扎，手术时长控制在 30 分钟内，术后不使用抗生素，大鼠分笼饲养。

实施例 2

(1) 将浓度为 2 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶 (丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m) 添加去离子水，将浓度调控到 1 wt%，
25 利用磁力搅拌器在 900 rpm 的速率下，搅拌 24 小时；

(2) 将去铁胺粉末同浓度为 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶 (丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m) 混合，使得去铁胺浓度为 2 mg/ml，在 200 rpm 的速率下搅拌 6 小时，随后在 14000 rpm 的转速下离

心 25 分钟，底部为载药的丝蛋白纳米纤维凝胶；

(3) 将上述载药纳米纤维凝胶和(1)中搅拌处理的凝胶按照 1:24 的体积比混合，然后在 600 rpm 的转速下搅拌 14 小时，使得两种凝胶充分混合，且混合凝胶的流变性调整到合适程度；

5 (4) 将上述丝蛋白载药纳米纤维凝胶在 100 Pa 的真空度下抽真空 60 分钟，去除气泡，获得最终的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

图 5 为浓度为 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶在搅拌前后的形态图，可以看出，经过搅拌获得了良好的流动性和可铺展性，未经搅拌处理的凝胶没有合理的流动性，不具备合理的压力铺展性能。

10 图 6 为步骤(3)中浓度为 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶及加载 60 μ M DFO 的丝蛋白纳米纤维水凝胶的流变性能图，从中可以看出，加入小分子药物对凝胶材料的流变性能没有明显改变，药物的加载仅使得丝蛋白纳米纤维水凝胶在低剪切速率时有少许黏度增加的现象。

15 图 7 为 1 wt% 的丝蛋白纳米纤维水凝胶加载去铁胺前后的拉曼光谱图，加载去铁胺后的拉曼光谱上同时具有丝蛋白和去铁胺的特征峰，证实去铁胺的加载。

实施例 3

(1) 将浓度为 2 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶（丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m）添加去离子水，将浓度调控到 1.1 wt%，
20 利用磁力搅拌器在 600 rpm 的速率下，搅拌 46 小时；

(2) 将内皮细胞生长因子粉末同浓度为 1.2 wt% 的丝蛋白纳米纤维凝胶（丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m）混合，使得内皮生长因子浓度为 60 μ g/ml，在 400 rpm 的速率下搅拌 4 小时，随后在 9000 rpm 的转速下离心 60 分钟，底部为载药的丝蛋白纳米纤维凝胶；

25 (3) 将上述载药纳米纤维凝胶和(1)中搅拌处理的凝胶按照 1:8 的体积比混合，然后在 2000 rpm 的转速下搅拌 4 小时，使得两种凝胶充分混合，且混合凝胶的流变性调整到合适程度；

(4) 将上述丝蛋白载药纳米纤维凝胶在 40 Pa 的真空度下抽真空 30 分钟，去除气泡，获得最终的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

图 8 为加载内皮细胞生长因子后的丝蛋白纳米纤维水凝胶与 1.1 wt%浓度的丝蛋白纳米纤维水凝胶混合后在真空下去除气泡前后的图像。

实施例 4

(1) 将浓度为 3 wt%的丝蛋白纳米纤维凝胶(丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m)添加去离子水，将浓度调控到 1.3 wt%，利用磁力搅拌器在 3000 rpm 的速率下，搅拌 2 小时；

(2)将内皮细胞生长因子粉末同浓度为 2 wt%的丝蛋白纳米纤维凝胶(丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m)混合，使得内皮生长因子浓度为 100 μ g/ml，在 600 rpm 的速率下搅拌 2 小时，随后在 5000 rpm 的转速下离心 60 分钟，底部为载药的丝蛋白纳米纤维凝胶；

(3) 将上述载药纳米纤维凝胶和 (1) 中搅拌处理的凝胶按照 1:12 的体积比混合，然后在 2000 rpm 的转速下搅拌 2 小时，使得两种凝胶充分混合，且混合凝胶的流变性调整到合适程度；

(4)将上述丝蛋白载药纳米纤维凝胶在 10 Pa 的真空度下抽真空 30 分钟，去除气泡，获得最终的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

图 9 为加载内皮细胞生长因子后的浓度为 2 wt%的丝蛋白纳米纤维水凝胶与 1.3 wt%浓度的丝蛋白纳米纤维水凝胶混合后在真空下去除气泡前后的图像。

实施例 5

(1) 将浓度为 2 wt%的丝蛋白纳米纤维凝胶(丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m)添加去离子水，将浓度调控到 1.2 wt%，利用磁力搅拌器在 1600 rpm 的速率下，搅拌 3 小时；

(2)将去铁胺粉末同浓度为 0.6 wt%的丝蛋白纳米纤维凝胶(丝蛋白纳米纤维的结晶度为 40%，直径为 20 nm，长度为 1 μ m)混合，使得去铁胺浓度为 1.2 mg/ml，在 100 rpm 的速率下搅拌 10 小时，随后在 12000 rpm 的转速下离心 60 分钟，底部为载药的丝蛋白纳米纤维凝胶；

(3) 将上述载药纳米纤维凝胶和 (1) 中搅拌处理的凝胶按照 1:12 的体积比混合，然后在 500 rpm 的转速下搅拌 24 小时，使得两种凝胶充分混合，且混合凝胶的流变性调整到合适程度；

—13—

(4)将上述丝蛋白载药纳米纤维凝胶在 10 Pa 的真空度下抽真空 20 分钟，去除气泡，获得最终的载药丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

图 10 为制备所得丝蛋白纳米纤维凝胶的膨胀性能测试，经过测试，丝蛋白纳米纤维水凝胶及加载药物的丝蛋白纳米纤维水凝胶在 37℃，与模拟人体内环境组织液的 pH=7.4 的盐溶液接触时，在长时间（超过 24h）下体积未发生明显变化（体积变化 < 10%）。
5

权 利 要 求

1、一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

5 S1) 将第一丝蛋白纳米纤维凝胶与水混合搅拌，得到流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶；

将促血管再生的药物与第二丝蛋白纳米纤维凝胶混合，得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶；

10 S2) 将所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶混合搅拌，得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料。

2、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 2~5 wt%；所述第二丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 0.3~2 wt%；所述流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶的浓度为 0.6~1.5 wt%。

15 3、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述第一丝蛋白纳米纤维凝胶中的丝蛋白纳米纤维为高结晶丝蛋白纳米纤维；所述高结晶丝蛋白纳米纤维的结晶度大于等于 40%；所述高结晶丝蛋白纳米纤维的直径为 10~30 nm；长度为 0.1~3 μm 。

4、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 S1) 中混合搅拌的速率为 200~5000 rpm；混合搅拌的时间为 1~48 h；

20 混合的速率为 10~800 rpm；混合的时间为 10 min~12 h；

混合后，离心，得到载药丝蛋白纳米纤维凝胶；

所述离心的速率为 2000~15000 rpm；离心的时间为 5 min~2 h。

25 5、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 S2) 中流变性改变的丝蛋白纳米纤维凝胶与载药丝蛋白纳米纤维凝胶的体积比为 (8~24): 1。

6、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述 S2) 中混合搅拌的速率为 200~5000 rpm；混合搅拌的时间为 1~48 h。

7、根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述步骤 S2) 中混合搅拌后，还进行抽真空处理，得到具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷

料。

8、根据权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于，所述抽真空处理的真空度为 0.01~100 Pa；抽真空处理的时间为 10~60 min。

5 9、一种具备压力可铺展性的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料，其特征在于，所述丝蛋白纳米纤维凝胶敷料在压力作用下可铺展成厚度小于等于 200 微米的薄膜，且压力取消后仍维持铺展状态。

10、权利要求 1~8 任意一项制备方法所述制备的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料或权利要求 9 所述的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为皮瓣移植用凝胶敷料的应用。

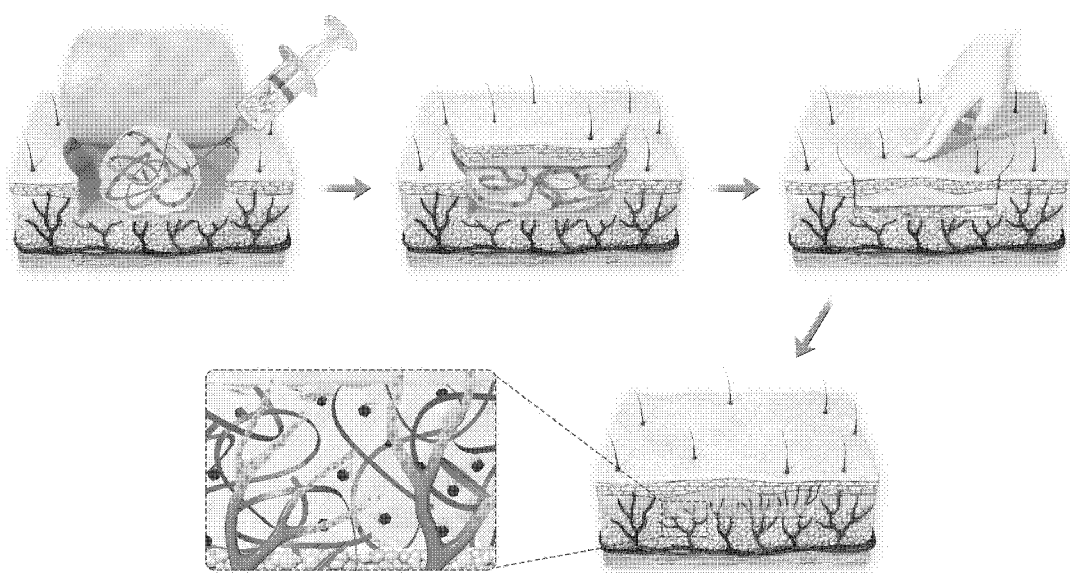


图1

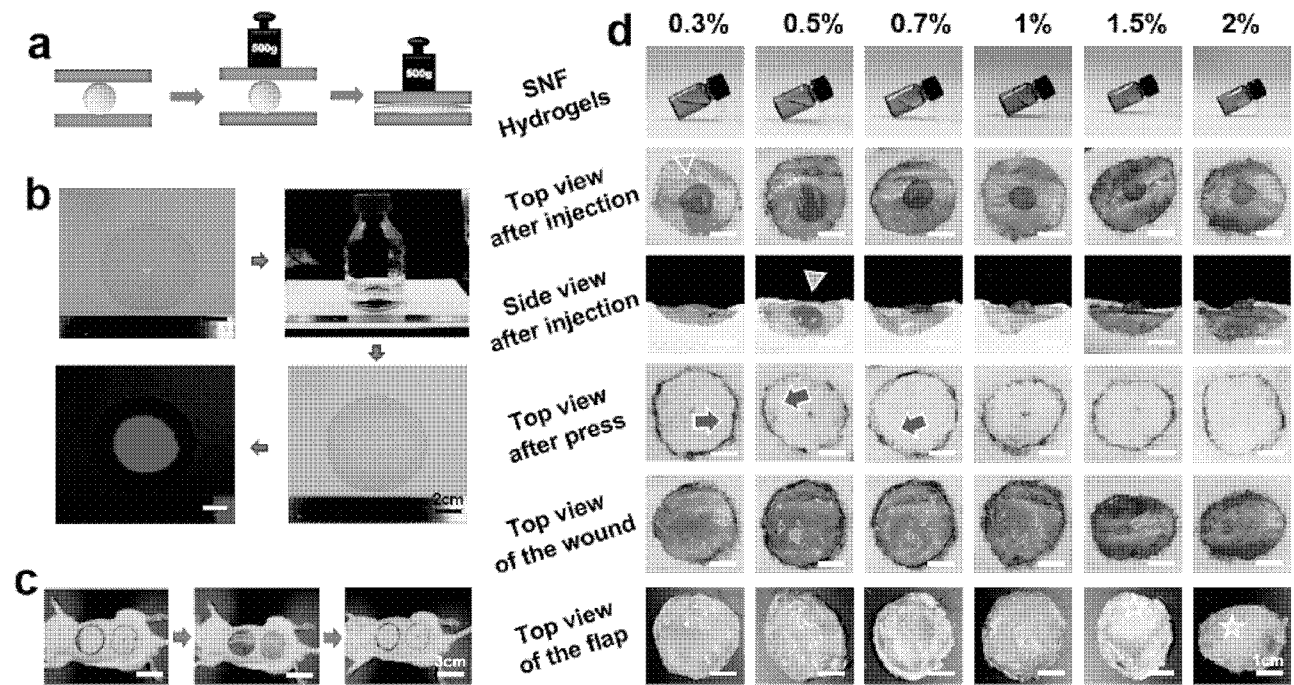


图2

—2/5—

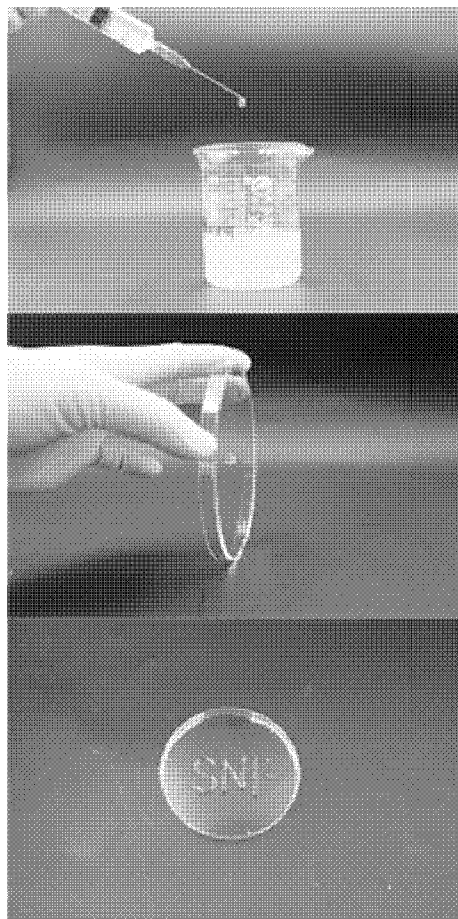


图3

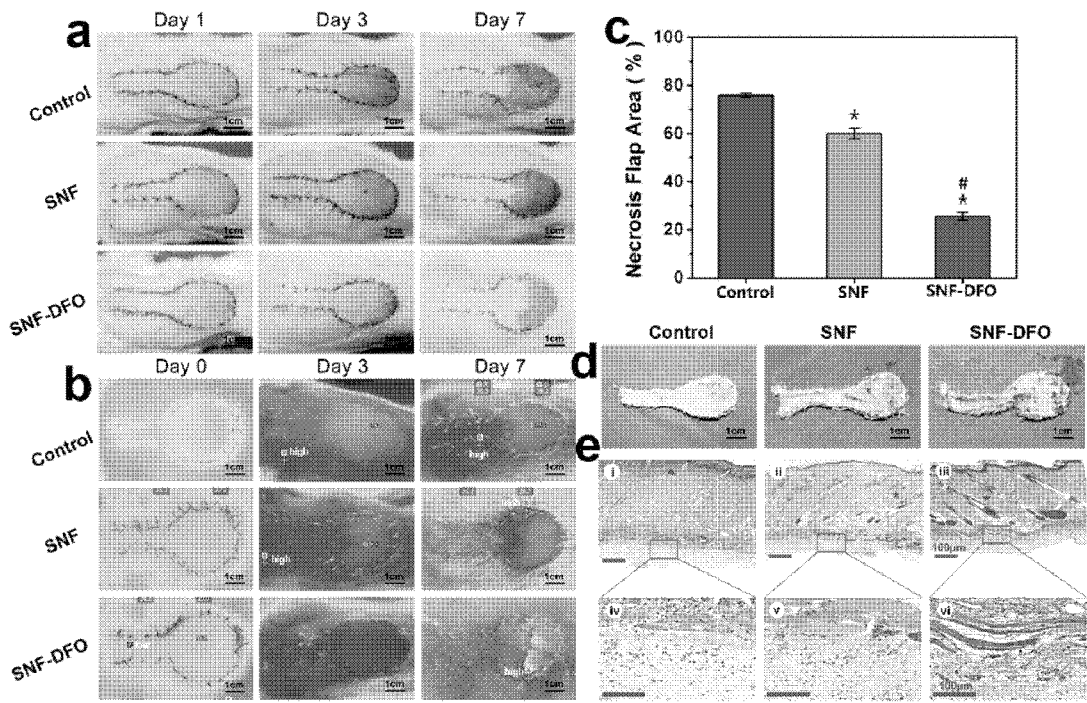


图4

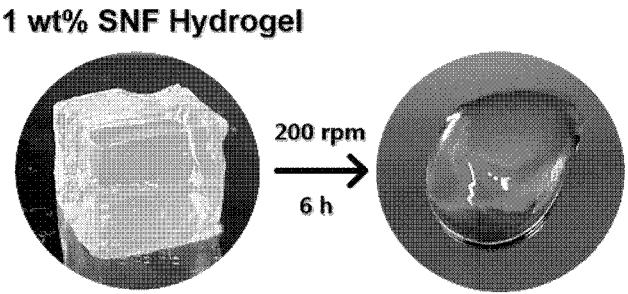


图5

—4/5—

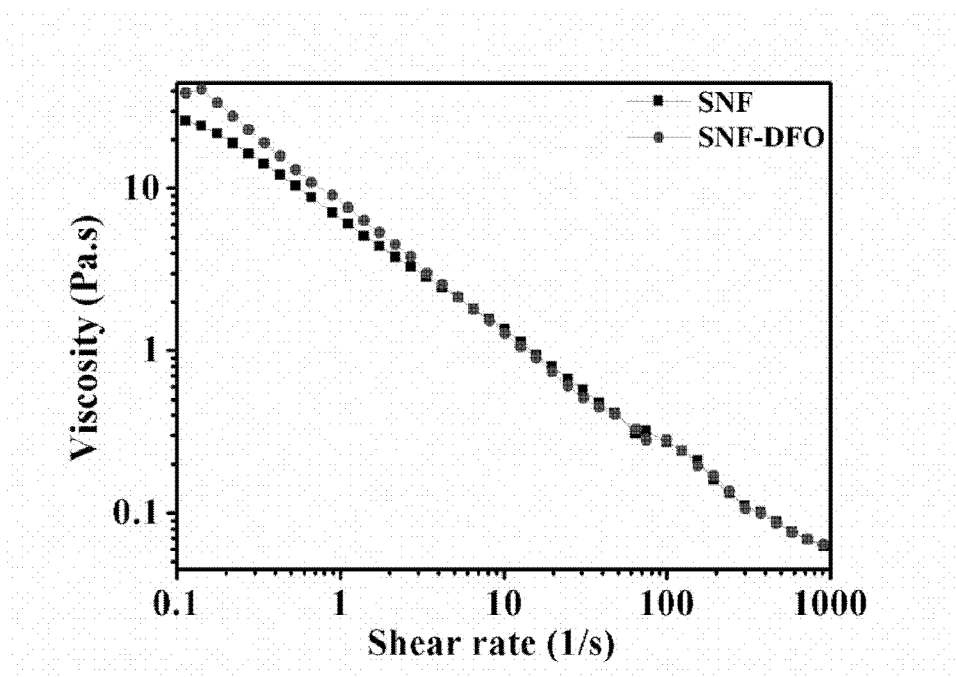


图6

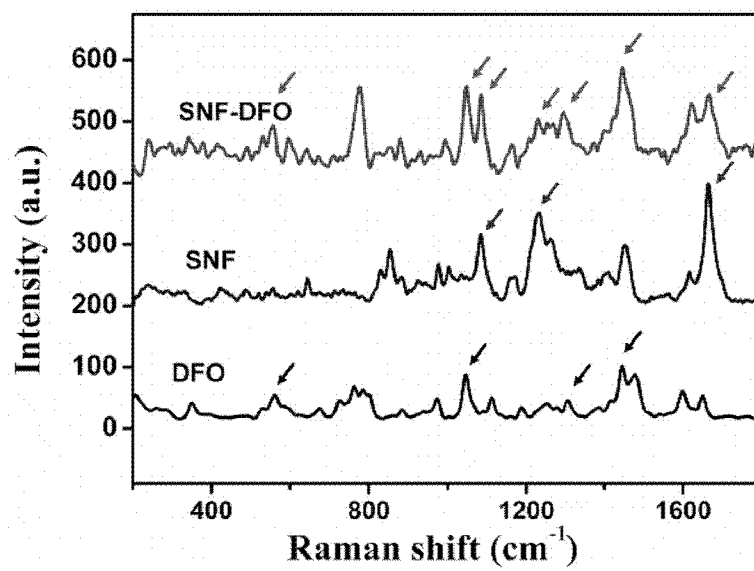


图7

—5/5—

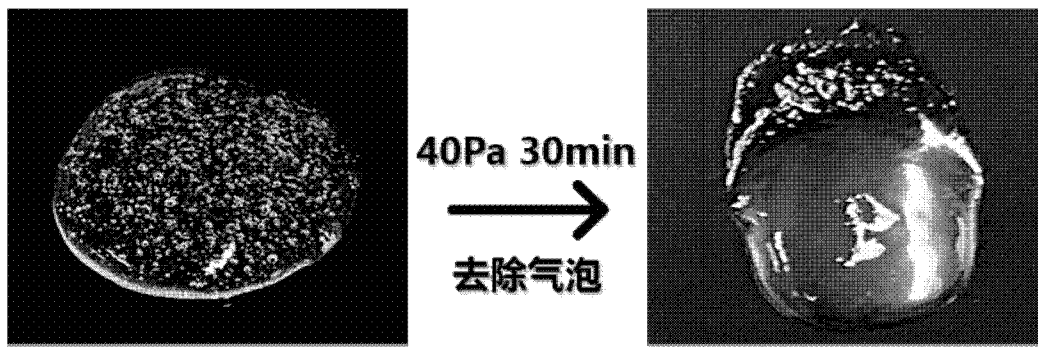


图8

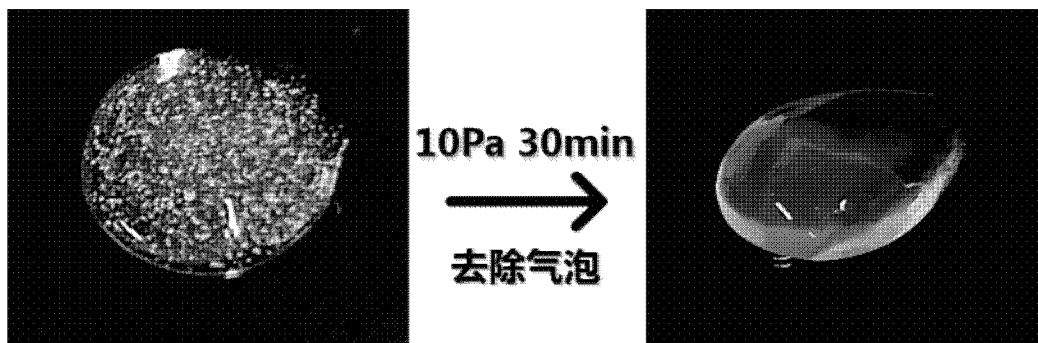


图9

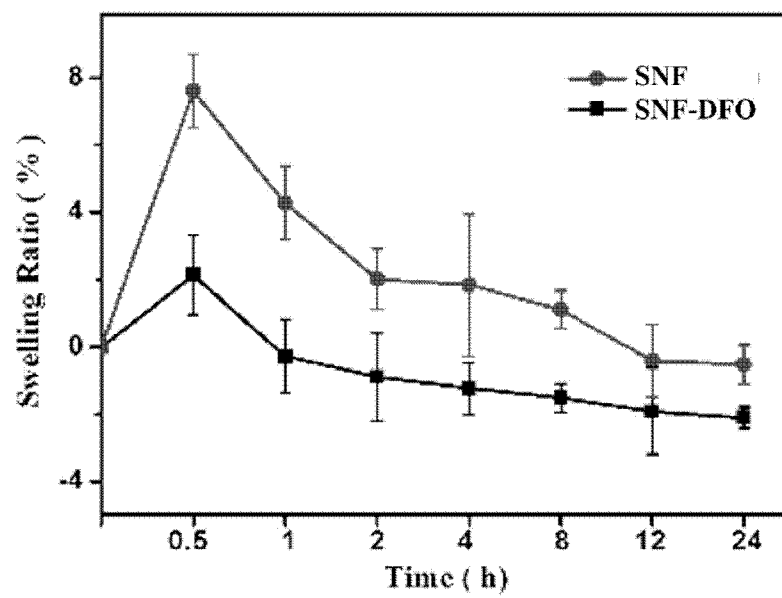


图10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/122111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L 26/00(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; A61L 27/52(2006.01)i; C08J 3/075(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; C08L 89/00(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) A61L,C08J,C08L 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, SIPOABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT: 压力可铺展性, 丝, 纳米纤维, 凝胶, 敷料, 流变性, 促血管再生, 药, 混合, 搅拌, 皮瓣移植, pressure spreadability, silk, nanofiber, +gel, dressing, rheological characteristic, angiogenesis Stimulator, promot+ blood vessel regenerat+, medicine, drug, mix+, stir+, skin flap transplantat+																	
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 112999411 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 June 2021 (2021-06-22) claims 1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>高素玥 (Gao, Suyue). "加载去铁胺的丝蛋白纳米纤维水凝胶对狭长窄蒂皮瓣血管化的影响 (Effects of DFO-loaded Silk Nanofiber Hydrogel Systems on Vascularization of Slender Narrow Pedicle Flap)" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑 (China Doctoral Dissertations and Master's Theses Full-text Database (Master), Medicine and Health Sciences), 15 February 2021 (2021-02-15), pp. 17-19, 23-25, and 31</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DING, Zhaozhao et al. "Injectable Silk Nanofiber Hydrogels for Sustained Release of Small-Molecule Drugs and Vascularization" ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING, Vol. 5, No. 8, 30 September 2019 (2019-09-30), experiment part</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110272547 A (HANGZHOU DIANZI UNIVERSITY) 24 September 2019 (2019-09-24) entire document</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	PX	CN 112999411 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 June 2021 (2021-06-22) claims 1-10	1-10	X	高素玥 (Gao, Suyue). "加载去铁胺的丝蛋白纳米纤维水凝胶对狭长窄蒂皮瓣血管化的影响 (Effects of DFO-loaded Silk Nanofiber Hydrogel Systems on Vascularization of Slender Narrow Pedicle Flap)" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑 (China Doctoral Dissertations and Master's Theses Full-text Database (Master), Medicine and Health Sciences), 15 February 2021 (2021-02-15), pp. 17-19, 23-25, and 31	1-10	X	DING, Zhaozhao et al. "Injectable Silk Nanofiber Hydrogels for Sustained Release of Small-Molecule Drugs and Vascularization" ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING, Vol. 5, No. 8, 30 September 2019 (2019-09-30), experiment part	1-10	A	CN 110272547 A (HANGZHOU DIANZI UNIVERSITY) 24 September 2019 (2019-09-24) entire document	1-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
PX	CN 112999411 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 22 June 2021 (2021-06-22) claims 1-10	1-10															
X	高素玥 (Gao, Suyue). "加载去铁胺的丝蛋白纳米纤维水凝胶对狭长窄蒂皮瓣血管化的影响 (Effects of DFO-loaded Silk Nanofiber Hydrogel Systems on Vascularization of Slender Narrow Pedicle Flap)" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑 (China Doctoral Dissertations and Master's Theses Full-text Database (Master), Medicine and Health Sciences), 15 February 2021 (2021-02-15), pp. 17-19, 23-25, and 31	1-10															
X	DING, Zhaozhao et al. "Injectable Silk Nanofiber Hydrogels for Sustained Release of Small-Molecule Drugs and Vascularization" ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING, Vol. 5, No. 8, 30 September 2019 (2019-09-30), experiment part	1-10															
A	CN 110272547 A (HANGZHOU DIANZI UNIVERSITY) 24 September 2019 (2019-09-24) entire document	1-10															
☒ 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 23 December 2021		Date of mailing of the international search report 05 January 2022															
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/CN2021/122111**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110256693 A (HANGZHOU DIANZI UNIVERSITY) 20 September 2019 (2019-09-20) entire document	1-10
A	CN 104017374 A (FUDAN UNIVERSITY) 03 September 2014 (2014-09-03) entire document	1-10
A	US 2004266992 A1 (KESENCI, K. et al.) 30 December 2004 (2004-12-30) entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/122111**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.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 10 relates to a silk protein nanofiber gel dressing prepared by the preparation method of any one of claims 1-8 or an application of the silk protein nanofiber gel dressing according to claim 9 as a gel dressing for skin flap transplantation. The application belongs to a method for treating a living human body or animal body, belonging to the subject matter listed in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority. "An application as a gel dressing for skin flap transplantation" in claim 10 is reasonably expected to be "an application for the preparation of a gel dressing for skin flap transplantation", and the search is performed on the subject matter amended after a reasonable expectation.
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/CN2021/122111

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112999411	A	22 June 2021	None			
CN	110272547	A	24 September 2019	None			
CN	110256693	A	20 September 2019	None			
CN	104017374	A	03 September 2014	None			
US	2004266992	A1	30 December 2004	WO	03022909	A1	20 March 2003
				EP	1436346	A1	14 July 2004
				IT	VR20010098	A1	11 March 2003
				AU	2002362267	A1	24 March 2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/122111

A. 主题的分类

A61L 26/00(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; A61L 27/52(2006.01)i; C08J 3/075(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; C08L 89/00(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)

A61L, C08J, C08L

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, SIPOABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT压力可铺展性, 丝, 纳米纤维, 凝胶, 敷料, 流变性, 促血管再生, 药, 混合, 搅拌, 皮瓣移植, pressure spreadability, silk, nanofiber, +gel, dressing, rheological characteristic, angiogenesis Stimulator, promot+ blood vessel regenerat+, medicine, drug, mix+, stir+, skin flap transplantat+

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 112999411 A (苏州大学) 2021年6月22日 (2021 - 06 - 22) 权利要求1-10	1-10
X	高素玥. “加载去铁胺的丝蛋白纳米纤维水凝胶对狭长窄蒂皮瓣血管化的影响” 中国优秀硕士学位论文全文数据库(硕士)医药卫生科技辑, 2021年2月15日 (2021 - 02 - 15), 第17-19, 23-25, 31页	1-10
X	Zhaozhao Ding等. “Injectable Silk Nanofiber Hydrogels for Sustained Release of Small-Molecule Drugs and Vascularization” ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING, 第5卷, 第8期, 2019年9月30日 (2019 - 09 - 30), 实验部分	1-10
A	CN 110272547 A (杭州电子科技大学) 2019年9月24日 (2019 - 09 - 24) 全文	1-10
A	CN 110256693 A (杭州电子科技大学) 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20) 全文	1-10

☒ 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

2021年12月23日

国际检索报告邮寄日期

2022年1月5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

王墩

电话号码 86-(010)-62089179

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 104017374 A (复旦大学) 2014年9月3日 (2014 - 09 - 03) 全文	1-10
A	US 2004266992 A1 (KESENCI K 等) 2004年12月30日 (2004 - 12 - 30) 全文	1-10

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： 10
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10涉及权利要求1~8任意一项制备方法所述制备的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料或权利要求9所述的丝蛋白纳米纤维凝胶敷料作为皮瓣移植用凝胶敷料的应用。该应用属于对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1中所列的不要求国际检索单位进行检索的主题。将权利要求10中“作为皮瓣移植用凝胶敷料的应用”合理预期为“用于制备皮瓣移植用凝胶敷料的应用”，检索所针对的是合理预期后修改的主题。
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/CN2021/122111

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	112999411	A	2021年6月22日	无			
CN	110272547	A	2019年9月24日	无			
CN	110256693	A	2019年9月20日	无			
CN	104017374	A	2014年9月3日	无			
US	2004266992	A1	2004年12月30日	WO	03022909	A1	2003年3月20日
				EP	1436346	A1	2004年7月14日
				IT	VR20010098	A1	2003年3月11日
				AU	2002362267	A1	2003年3月24日