

(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2月10日 (10.02.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/028107 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/435 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/099614

(22) 国际申请日: 2021年6月11日 (11.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010782559.X 2020年8月6日 (06.08.2020) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 王建南(WANG, Jiannan); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。刘苹(LIU, Ping); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。裔洪根(YI, Honggen); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (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。

(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 SILK FIBROIN AND SERICIN COMPOSITE SOLUTION

(54) 发明名称: 一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法

(57) Abstract: Provided is a method for preparing a silk fibroin and sericin composite solution, the method comprising the following steps: A) placing silk in warm water for pretreatment, then placing same in 65-95 °C water for treatment, and drying same to obtain initially treated silk; and B) treating the initially treated silk in a neutral salt solution, and then purifying the obtained silk fibroin and sericin composite dissolution solution to obtain the silk fibroin and sericin composite solution. According to the present application, the silk fibroin and sericin composite solution is prepared by using a mild degumming and one-step dissolution method, which surpasses the traditional method whereby silk fibroin and sericin are separately prepared, separately dissolved and then mixed for use in preparing a composite material. More importantly, the molecular weight of silk protein in the composite solution is concentrated at 150 kDa or above; however, the reported molecular weight of a silk fibroin solution or a solution where silk fibroin and sericin are dissolved and then mixed that is prepared using a conventional method shows a continuous distribution, being mainly distributed at 85 kDa or below to 15 kDa or even less.

(57) 摘要: 本发明提供了一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法, 包括以下步骤: A)将蚕丝置于温水中进行预处理, 再置于65~95℃的水中处理, 干燥, 得到初处理的蚕丝; B)将所述初处理的蚕丝在中性盐溶液中处理, 将得到的丝素丝胶蛋白复合溶液再纯化, 得到丝素丝胶蛋白复合溶液。本申请采用温和脱胶、一步溶解法制备了丝素丝胶蛋白复合溶液, 突破了传统的丝素蛋白和丝胶蛋白分别制备、分别溶解后混合再用于制备复合材料; 重要的是, 该复合溶液中丝蛋白分子量集中在150kDa以上; 而报导的常规方法制备的丝素蛋白溶液或丝素丝胶溶解再混合的溶液分子量大小呈现连续分布、主要分布在85kDa以下直至15kDa甚至更小。



WO 2022/028107 A1

一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法

本申请要求于 2020 年 08 月 06 日提交中国专利局、申请号为 202010782559.X、发明名称为“一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法”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

本发明涉及生物医用材料技术领域，尤其涉及一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法。

10 背景技术

随着外科手术的飞速发展，人类疾病的剧增、年轻化及世界人口的老龄化，组织移植物临床需求与治疗面临着越来越大的压力。常见的组织修复方法有传统的自体移植、同种异体移植及人工组织工程支架移植。自体移植修复虽然治疗效果最佳，但存在对供区破坏、取量不足及并发症等诸多因素的严重制约；15 异体移植面临着免疫排斥反应、疾病传播等问题；20 世纪 90 年代提出了组织工程，随后组织工程支架材料的研究得到了快速的发展。组织工程中的合成高分子材料具有来源广、物化性质可调控、优异加工成型性等优点，如聚酯、聚酸酐、聚乳酸、聚羟基乙酸及其共聚物等多种合成高分子，但材料缺乏生物活性，细胞相容性较差，不降解或降解产物影响组织微环境。原位诱导组织再生20 被认为是缺损或病变组织修复最理想的模式，因而天然高分子由于具有优异的生物活性和可降解性在组织工程支架研究中广受青睐，如胶原、明胶、海藻酸盐、透明质酸、壳聚糖等。但大多数材料的力学性能很差，作为力学性能要求高的组织（如骨、牙齿等）工程支架的应用研究还存在巨大挑战。

丝素蛋白和丝胶蛋白具有优异的细胞相容性、血液相容性和组织相容性，25 且可控成型，作为组织工程支架材料已在皮肤、血管、骨骼等组织工程应用中开展了广泛研究，但目前研究的再生蚕丝（丝素、丝胶）蛋白支架材料同样力学性能较差，难以满足骨骼、牙齿等硬组织替换的要求，这是由于现有的脱胶方法和抽提方法对丝素和丝胶大分子结构破坏较大，而高分子的聚合度（分子量）是决定高分子性能的极其重要的内在因素。

30 与其它天然高分子材料尤其是蛋白质高分子材料不同的是，蚕丝中蛋白的纯度很高，组成独特，制备方法可以比较简单温和，即可以控制对蚕丝大分子

较小的破坏，不像胶原蛋白纯化复杂。

蚕丝内芯的丝素蛋白占蚕丝质量的 70~80%，大分子由 6 条约 390kDa 的重链和 6 条约 26kDa 轻链以二硫键连接，再与另一种约 25kDa 的糖蛋白/P25 疏水作用结合，其中重链具有形成高性能材料的序列结构基础；蚕丝外覆的丝胶蛋白占蚕丝质量的 20~30%，丝胶的分子量也比较大，种类有 9 种之多，涉
5 川明朗从组织学角度指出丝胶分外中内三层，小松计一提出外覆丝胶由外及内存在 4 种，即丝胶 I、丝胶 II、丝胶 III 和丝胶 IV，且由外及内容解性能越来越低， β 构象增加。

再生丝素蛋白溶液都以强碱弱酸盐或酶脱胶盐溶解获得，这些方法造成了
10 丝素蛋白大分子的破坏；再生丝胶蛋白溶液主要来源于蚕茧，两种溶液一般独立分离制备。如 CN02138129.1 公开了一种丝素丝胶蛋白复合组织工程支架的制备，复合材料采用预先制备好的再生丝素蛋白与再生丝胶蛋白按比例进行混合再制备而成，其中丝素纤维的脱胶方法采用了强碱弱酸盐溶剂，丝胶蛋白提取的是蚕茧茧丝外覆丝胶的较外层的部分。又如 CN201510353363.8 公开了一
15 种含丝素蛋白和丝胶蛋白的骨组织工程支架材料及其制备方法，也是分步分别获得再生丝素蛋白与再生丝胶蛋白后再加以混合制备支架材料，其中丝素蛋白的制备没有公开具体工艺条件，丝胶蛋白的获得来自于蚕茧，并经醇等有机溶剂处理。

20 发明内容

本发明解决的技术问题在于提供一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法，该丝素丝胶蛋白复合溶液具有粘度高、分子量高的特点。

有鉴于此，本申请提供了一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法，包括以下步骤：

25 A) 将蚕丝置于温水中进行预处理，再置于 65~95°C 的水中处理，干燥，得到初处理的蚕丝；

B) 将所述初处理的蚕丝在中性盐溶液中处理，将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液再纯化，得到丝素丝胶蛋白复合溶液。

优选的，所述温水的温度为 35~60°C，所述预处理的时间为 1~10min。

优选的，所述预处理之后还包括：将预处理后的蚕丝取出后于 25~30°C 的水中洗净、脱水。

优选的，步骤 A) 中，所述置于 65~95°C 的水中处理的时间为 1~8h。

5 优选的，步骤 A) 中，所述蚕丝与温水的比例为 1g: (40~60) ml，预处理后的蚕丝与水的比例为 1g: (40~60) ml。

优选的，步骤 A) 中，所述处理后干燥之前还包括：将处理后的蚕丝于 25~30°C 的水中清洗后脱水；所述干燥采用 40~60°C 的热风干燥。

优选的，所述中性盐溶液为 8~10M 的溴化锂水溶液，所述初处理的蚕丝与所述溴化锂水溶液的比例为 1g: (20~30) ml。

10 优选的，步骤 B) 中，所述处理的温度为 50~80°C。

优选的，所述纯化的方法具体为：

将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量 10~50kDa 的透析袋内，置于去离子水中持续透析 1~3 天。

15 本申请提供了一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法，其首先将蚕丝置于温水中预处理，再置于水中处理，得到初处理的蚕丝；再将其于中性盐溶液中处理，纯化后即得到丝素丝胶复合溶液；本申请采用温和脱胶、一步溶解法制备了丝素丝胶蛋白复合溶液，在温水中的预处理以及后续的特定温度水中的处理，使得蚕丝表面的丝胶蛋白部分脱除或全部脱除，而丝素纤维在特定温水处理的全过程中，丝素蛋白大分子链在后续脱胶过程中不会破坏，丝素纤维外层的丝胶蛋白随着包覆层的由外及内，丝胶蛋白的种类、结构和性能也不同，通过控制脱胶程度，得到了不同组成、可制备不同性能（尤其力学性能）材料的
20 丝素丝胶蛋白复合溶液；且保证丝素丝胶蛋白复合溶液高的粘度和分子量。

具体实施方式

25 为了进一步理解本发明，下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述，但是应当理解，这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点，而不是对本发明权利要求的限制。

针对现有技术中，丝素蛋白大分子破坏严重的问题或丝素丝胶复合溶液分别制备的问题，本申请采用去离子水温和脱胶、一步溶解法制备了大分子量高

粘度丝素丝胶蛋白复合溶液，该方法可以避免丝素纤维大分子的破坏，最终使制备的丝素丝胶蛋白复合溶液中的丝素蛋白和丝胶蛋白均具有较高的粘度和大分子量。具体的，本发明实施例公开了一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法，包括以下步骤：

5 A) 将蚕丝置于温水中进行预处理，再置于 65~95°C 的水中处理，干燥，得到初处理的蚕丝；

 B) 将所述初处理的蚕丝在中性盐溶液中处理，将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液再纯化，得到丝素丝胶蛋白复合溶液。

 在上述丝素丝胶蛋白复合溶液制备过程中，本申请首先蚕丝置于温水中进行预处理，再置于 65~95°C 的水中处理，干燥，即得到初处理的蚕丝；在此过程中，蚕丝的丝胶蛋白全部或部分溶解，而丝素蛋白仍然是纤维状态，若有未溶解的丝胶，则未溶解的丝胶包裹在丝素纤维的外表面，溶解掉的丝胶则存在于水中，呈溶液状态。所述温水的温度为 35~60°C，即所述蚕丝可在 35°C、40°C、45°C、50°C、55°C 或 60°C 的温水中进行预处理，所述蚕丝与温水的比例为 1g: 10
15 (40~60) ml，更具体地，所述蚕丝与所述温水的比例为 1g: 42ml、1g: 45ml、1g: 48ml、1g: 52ml、1g: 55ml、1g: 58ml。所述预处理在上述恒温的温水中进行，所述预处理的时间为 1~10min，且上述预处理一直在搅拌中进行，以保证蚕丝可以初步、完全浸没于水中。在预处理完成后，则将预处理后的蚕丝取出后于 25~30°C 的去离子水中洗净、脱水。脱水后的蚕丝则在 65~95°C 的水中处理，更具体地，脱水后的蚕丝可在 68°C、70°C、72°C、75°C、78°C、80°C、20
82°C、84°C、87°C、90°C 或 93°C 的水中处理。本申请蚕丝先在水中预处理再在水中处理的方式，不涉及任何试剂处理，可以在保护丝素蛋白大分子结构不被破坏的同时溶解丝胶蛋白。所述预处理后的蚕丝与水的比例为 1g: (40~60) ml，更具体地，所述预处理后的蚕丝与水的比例为 1g: 42ml、1g: 45ml、1g: 25
48ml、1g: 50ml、1g: 52ml、1g: 55ml、1g: 58ml 或 1g: 60ml。根据水的不同温度以及时间可以调整蚕丝丝胶蛋白的脱胶率，以实现不同粘度和不同分子量丝素丝胶蛋白复合溶液的制备；在本申请中，所述水中处理的时间优选为 1~8h，以使蚕丝部分或全部脱胶；更具体地，所述水中处理的时间为 1.5h、2h、2.5h、3h、3.2h、3.6h、4.2h、4.5h、5.0h、5.5h、6.0h、6.5h、6.8h、7.0h 或 7.5h。

在处理之后，则将处理后的蚕丝于 25~30°C 的水中清洗后脱水、干燥；所述干燥采用 40~60°C 的热风干燥。蚕丝经过上述处理，得到初处理的蚕丝，该蚕丝仍然呈现纤维状态，实现了丝素蛋白的保护，以利于保证丝素丝胶蛋白的高分子量和高粘度。

- 5 按照本发明，然后将初处理的蚕丝在中性盐溶液中处理，纯化，即得到丝素丝胶蛋白复合溶液。在此过程中，将初处理的纤维状的蚕丝溶解，即得到丝素丝胶蛋白复合溶液，此时的蚕丝内芯为丝素纤维，外围包裹有不同含量的丝胶。所述中性盐溶液在本申请中具体选自溴化锂水溶液，其浓度为 8~10M，所述初处理的蚕丝与所述溴化锂水溶液的比例为 1g: (20~30) ml，更具体地，
10 所述初处理的蚕丝与所述溴化锂水溶液的比例为 1g: 22ml、1g: 24ml、1g: 25ml、1g: 27ml 或 1g: 29ml。所述处理的温度具体为 50~80°C，更具体地，所述处理的温度具体为 52°C、57°C、62°C、65°C、67°C、68°C、72°C、75°C 或 78°C。

- 在上述处理之后，则将得到的丝素丝胶溶解液进行纯化，以去除溴化锂和
15 小分子量丝素丝胶蛋白；所述纯化的方式具体为将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量 10~50kDa 的透析袋内，置于去离子水持续透析 1~3 天。

- 本发明采用温和脱胶、一步溶解法制备了丝素丝胶蛋白复合溶液，突破了传统的丝素蛋白和丝胶蛋白分别制备、分别溶解后混合再用于制备复合材料。重要的是，该复合溶液中丝蛋白分子量集中在 150kDa 以上，亦或含有一种
20 25kDa 左右的分子量，而报导的常规方法制备的丝素蛋白溶液或丝素丝胶溶解再混合的溶液分子量大小呈现连续分布、主要分布在 85kDa 以下直至 15kDa 甚至更小。温和脱胶一步溶解法丝蛋白溶液制备过程中，蚕丝采用热水处理，使得丝素蛋白大分子链（尤其是重链）在脱胶过程中不会被破坏；丝素纤维外层的丝胶蛋白随着包覆层的由外及内，丝胶蛋白的种类、结构和性能也不同，
25 通过控制脱胶程度，得到了不同组成、可制备不同性能（尤其力学性能）材料的丝素丝胶蛋白复合溶液。该一步溶解法的丝蛋白溶液粘度远远高于常规报导的混合溶液。更重要的是，本发明从高分子的分子量这个影响聚合物力学性能的根本因素出发，提供了高性能再生蚕丝蛋白材料的制备新技术，将解决可诱导硬组织再生修复的天然生物聚合物组织工程支架力学性能不足的卡脖子技

术难题。

为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明提供的丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法进行详细说明,本发明的保护范围不受以下实施例的限制。

实施例 1

5 1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料,取家蚕生丝 1 公斤,按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60°C,放入生丝恒温 60°C 搅拌处理 1~10 分钟,然后取出用 25~30°C 的去离子将丝洗净、脱水;

2. 将上述脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90°C 预热的去离子水中控制恒温煮 1 小时,取出含有丝胶的蚕丝用 25~30°C 的去离子充分清洗干净, 10 脱水后用 40~60°C 的热风进行干燥;

3. 称取干燥后的蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中, 65°C 处理直至蚕丝完全溶解,得到家蚕丝素丝胶蛋白复合溶解液;

4. 将丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量为 14kDa 的透析袋内,透析袋壁是半透膜;将灌注了丝素丝胶蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内,每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水,持续透析 3 天,得到 15 纯化后的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。

5. 采用旋转蒸发器浓缩丝素丝胶蛋白获得同一质量分数的复合水溶液,即得到大分子量的高粘度的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。使用 AR2000 流变仪测得丝素丝胶蛋白复合水溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 20 3.5Pa.s 和 10Pa.s。

6. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素丝胶蛋白获得一定质量分数的复合水溶液,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得复合溶液的分子量分布主要是 >150kDa, 少量的 50~100kDa, 另有 25kDa 左右的蛋白链。

7. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定,测得脱胶率为 25 8%。

实施例 2

1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料,取家蚕生丝 1 公斤,按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60°C,放入生丝恒温 60°C 搅拌处理 1~10 分钟,然后取出用 25~30°C 的去离子将丝洗净、脱水;

-7-

2. 将上述脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90°C 预热的去离子水中控制恒温煮 4 小时, 取出含有丝胶的蚕丝用 25~30°C 的去离子充分清洗干净, 脱水后用 40~60°C 的热风进行干燥;

5 3. 称取干燥后的蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中, 65°C 处理直至蚕丝完全溶解, 得家蚕丝素丝胶蛋白复合溶解液;

4. 将丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量为 14kDa 的透析袋内, 透析袋壁是半透膜, 将灌注了丝素丝胶蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内, 每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水, 持续透析 3 天, 得到纯化后的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。

10 5. 采用旋转蒸发器浓缩丝素丝胶蛋白获得同一质量分数的复合水溶液, 即得到大分子量的高粘度的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。使用 AR2000 流变仪测得丝素丝胶蛋白复合水溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 4.5Pa.s 和 9Pa.s。丝胶蛋白的粘度 (11 Pa.s 和 40Pa.s) 远大于丝素蛋白的, 丝胶的存在会增加溶液的粘度, 所以本实施例溶液在剪切作用下的粘度极值小于
15 实施例 1。

6. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素丝胶蛋白获得一定质量分数的复合水溶液, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得复合溶液的分子量分布主要是 >180kDa, 另有 25kDa 左右的蛋白链。

20 7. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定, 测得脱胶率为 17%。

实施例 3

1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料, 取家蚕生丝 1 公斤, 按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60°C, 放入生丝恒温 60°C 搅拌处理 1~10 分钟, 然后取出用 25~30°C 的去离子将丝洗净、脱水;

25 2. 将上述脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90°C 预热的去离子水中控制恒温煮 4 小时, 取出含有丝胶的蚕丝用 25~30°C 的去离子充分清洗干净, 脱水后用 40~60°C 的热风进行干燥;

3. 称取干燥后的蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中, 65°C 处理直至蚕丝完全溶解, 得家蚕丝素丝胶蛋白复合溶解液;

4. 将丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量为 50kDa 的透析袋内，透析袋壁是半透膜，将灌注了丝素丝胶蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内，每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水，持续透析 3 天，得到纯化后的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。

5 5. 采用旋转蒸发器浓缩丝素丝胶蛋白获得同一质量分数的复合水溶液，即得到大分子量的高粘度的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。使用 AR2000 流变仪测得丝素丝胶蛋白复合水溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 8.0Pa.s 和 12Pa.s。与实施例 2 相比，丝素丝胶复合溶液的粘度值显著增加是因为溶液分子量增大、小分子量减少（去除了 25kDa 左右的蛋白链）。与实施例 10 5 相比，丝胶的存在增加了溶液的粘度。

6. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素丝胶蛋白获得一定质量分数的复合水溶液，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得复合溶液的分子量分布主要是 > 180kDa。

7. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定，测得脱胶率为 15 17%。

实施例 4

1. 以经过煮茧缫制的家蚕生丝为原料，取家蚕生丝 1 公斤，按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60℃，放入生丝恒温 60℃ 搅拌处理 1~10 分钟，然后取出用 25~30℃ 的去离子将丝洗净、脱水；

20 2. 将上述脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90℃ 预热的去离子水中控制恒温煮 7 小时，取出蚕丝用 25~30℃ 的去离子充分清洗干净，脱水后用 40~60℃ 的热风进行干燥；

3. 称取干燥后的蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中，65℃ 处理直至蚕丝完全溶解，得家蚕丝素丝胶蛋白复合溶解液；

25 4. 将丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量为 14kDa 的透析袋内，透析袋壁是半透膜。将灌注了丝素丝胶蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内，每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水，持续透析 3 天，得到纯化后的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。

5. 采用旋转蒸发器浓缩丝素丝胶蛋白获得同一质量分数的复合水溶液，

即得到大分子量的高粘度的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。使用 AR2000 流变仪测得丝素丝胶蛋白复合水溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 2.0Pa.s 和 5Pa.s。

5 6. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素丝胶蛋白获得一定质量分数的复合水溶液, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得复合溶液的分子量分布主要是 >200kDa, 另有 25kDa 左右的蛋白链。

7. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定, 测得脱胶率为 23%。

10 与比较例 1 常规脱胶法相比, 脱胶率相同, 即脱尽了丝胶, 且透析截留分子量相同, 但是本实施例热水脱胶的丝溶液的分子量不仅分子量大且分布很集中, 常规碳酸钠脱胶的丝溶液分子量小且分布很散; 分子量越大粘度越大, 分子量多分散系数越小粘度越大, 本实施例测量的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为比较例 1 的 20 倍和 12.5 倍。

实施例 5

15 1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料, 取家蚕生丝 1 公斤, 按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60℃, 放入生丝恒温 60℃搅拌处理 1~10 分钟, 然后取出用 25~30℃的去离子将丝洗净、脱水;

20 2. 将脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90℃预热的去离子水中控制恒温煮 7 小时, 取出蚕丝用 25~30℃的去离子充分清洗干净, 脱水后用 40~60℃的热风进行干燥;

3. 称取干燥后的蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中, 65℃处理直至蚕丝完全溶解, 得家蚕丝素丝胶蛋白复合溶解液;

25 4. 将丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量为 50kDa 的透析袋内, 透析袋壁是半透膜, 将灌注了丝素丝胶蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内, 每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水, 持续透析 3 天, 得到纯化后的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。

5. 采用旋转蒸发器浓缩丝素丝胶蛋白获得同一质量分数的复合水溶液, 即得到大分子量的高粘度的家蚕丝素丝胶蛋白复合水溶液。使用 AR2000 流变仪测得丝素丝胶蛋白复合水溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为

4.0Pa.s 和 8.5Pa.s。与实施例 4 相比，丝素丝胶复合溶液的粘度值显著增加是因为溶液分子量增大、小分子量减少（去除了 25kDa 左右的蛋白链）。

6. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素丝胶蛋白获得一定质量分数的复合水溶液，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得复合溶液的分子量分布主要是
5 > 200kDa。

7. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定，测得脱胶率为 23%，本实施例测量的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为比较例 1 的 40 倍和 21 倍。

比较例 1 常规纯丝素溶液制备方法

10 1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料，将家蚕生丝按照浴比 1:50 (g/mL) 放入浓度为 0.1~0.06 % 的碳酸钠水溶液中，于 98~100℃ 处理三次，每次处理 30 分钟，然后取出用 25~30℃ 的去离子水将丝充分清洗干净，脱水后用 40-60℃ 的热风进行干燥；

15 2. 称取上述干燥后的家蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中，65℃ 处理直至蚕丝完全溶解，得家蚕丝素蛋白溶解液；

3. 将家蚕丝素蛋白溶解液灌注于截留分子量为 14kDa 的透析袋内，透析袋壁是半透膜，将灌注了家蚕丝素溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内，每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水，持续透析 3 天，得到纯化后的家蚕丝素蛋白水溶液；

20 4. 然后采用旋转蒸发器浓缩丝素蛋白获得同一质量分数的水溶液，使用 AR2000 流变仪测得家蚕丝素蛋白溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 0.1Pa.s 和 0.4Pa.s。

25 5. 采用旋转蒸发器浓缩或去离子水稀释丝素蛋白获得一定质量分数的水溶液，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得丝素蛋白溶液的分子量分布分散，并且主要分布于 85kDa 以下，虽然同样使用了截留分子量为 14kDa 的透析袋，但 15kDa 以下的丝素蛋白含量仍很多。

6. 采用称重法对第 1、2 步处理后的蚕丝进行脱胶率测定，测得脱胶率为 23%。

比较例 2 常规脱胶制备丝素溶液、再与丝胶蛋白溶液混合的复合溶液

1. 以经过煮茧缲制的家蚕生丝为原料，将家蚕生丝按照浴比 1:50 (g/mL) 放入浓度为 0.1~0.06 % 的碳酸钠水溶液中，于 98~100°C 处理三次，每次处理 30 分钟，然后取出用 25~30°C 的去离子水将丝充分清洗干净，脱水后用 40~60°C 的热风进行干燥；

5 2. 称取干燥后的家蚕丝按 1:25 (g/mL) 的浴比溶解于 9.3M 的溴化锂水溶液中，65°C 处理直至蚕丝完全溶解，得家蚕丝素蛋白溶解液；

3. 将家蚕丝素蛋白溶解液灌注于截留分子量为 14kDa 的透析袋内，透析袋壁是半透膜，将灌注了家蚕丝素蛋白溶解液的透析袋置于盛有去离子水的容器内，每隔 2 小时用新的去离子水更换容器内的水，持续透析 3 天，得到纯化后的家蚕丝素蛋白水溶液；

10

4. 另取经过煮茧缲制的家蚕生丝 1 公斤，按照浴比 1:50 (g/mL) 量取 50L 去离子水预热至 60°C，放入生丝恒温 60°C 搅拌处理 1~10 分钟，然后取出用 25~30°C 的去离子水将丝洗净、脱水；

5. 脱水后的蚕丝按照浴比 1:50 (g/mL) 置于 90°C 预热的去离子水中控制恒温煮 7 小时，弃去纤维，收集丝胶水溶液冷冻干燥得固体丝胶；

15

6. 然后采用旋转蒸发器浓缩第 3 步的丝素蛋白水溶液并加入与实施例 2 等同含量的丝胶、溶解混合均匀，调制与所有实施例相同质量分数的丝素丝胶复合水溶液，使用 AR2000 流变仪测得溶液的初始剪切作用下的粘度值和粘度极值为 0.45Pa.s 和 1.07Pa.s。

20 实施例 1~5 制备的丝素丝胶蛋白复合水溶液的分子量和粘度显著高于对比例 1~2 常规脱胶法获得的丝蛋白溶液。

以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

25

对所公开的实施例的上述说明，使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例，而

—12—

是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

权 利 要 求

1、一种丝素丝胶蛋白复合溶液的制备方法，包括以下步骤：

5 A) 将蚕丝置于温水中进行预处理，再置于 65~95°C 的水中处理，干燥，
得到初处理的蚕丝；

B) 将所述初处理的蚕丝在中性盐溶液中处理，将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液再纯化，得到丝素丝胶蛋白复合溶液。

2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述温水的温度为 35~60°C，所述预处理的时间为 1~10min。

10 3、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述预处理之后还包括：将预处理后的蚕丝取出后于 25~30°C 的水中洗净、脱水。

4、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 A) 中，所述置于 65~95°C 的水中处理的时间为 1~8h。

15 5、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 A) 中，所述蚕丝与温水的比例为 1g:(40~60) ml，预处理后的蚕丝与水的比例为 1g:(40~60) ml。

6、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 A) 中，所述处理后干燥之前还包括：将处理后的蚕丝于 25~30°C 的水中清洗后脱水；所述干燥采用 40~60°C 的热风干燥。

20 7、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述中性盐溶液为 8~10M 的溴化锂水溶液，所述初处理的蚕丝与所述溴化锂水溶液的比例为 1g:(20~30) ml。

8、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 B) 中，所述处理的温度为 50~80°C。

25 9、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述纯化的方法具体为：

将得到的丝素丝胶蛋白复合溶解液灌注于截留分子量 10~50kDa 的透析袋内，置于去离子水中持续透析 1~3 天。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/099614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/435(2006.01)i; C07K 1/14(2006.01)i; A61L 27/22(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) C07K 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; CNKI; CJFD; USTXT; EPTXT; WOTXT; VEN; ISI Web of Science; 百度学术; 百度; 苏州大学, 王建南, 刘苹, 裔洪根, 田伟, 蚕丝, 丝素, 丝胶, 蛋白, 复合溶液, 温水, 沸水, 开水, 脱胶, 中性盐, 溴化锂, 透析, 粘度, 黏度, 分子量, SOOCHOW UNIVERSITY, WANG Jiannan, LIU Ping, YI Honggen, TIAN Wei, silk, fibroin, sericin, degum, gum, protein, complex, combine, water, boil, hot, neutral salt, lithium bromide, dialysis, viscosity, molecular weight		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111875691 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 03 November 2020 (2020-11-03) claims 1-9	1-9
PX	CN 111671980 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 18 September 2020 (2020-09-18) claims 1-10	1-9
PX	CN 111821514 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 27 October 2020 (2020-10-27) claims 1-10	1-9
PX	CN 111870740 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 03 November 2020 (2020-11-03) claims 1-10	1-9
PX	田伟 (TIAN, Wei). "丝素/丝胶蛋白共混材料的制备及其矿化性能的研究 (Preparation and Mineralization of Silk Fibroin/Sericin Blended Materials)" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Engineering Science and Technology I), 15 February 2021 (2021-02-15), ISSN: 1674-0246, B020-743	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 10 August 2021		Date of mailing of the international search report 30 August 2021
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/CN2021/099614

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 101121040 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 26 March 2012 (2012-03-26) claims 1-6, description, paragraphs [0020]-[0027]	1-9
X	CN 1229362 A (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INST. OF SECRICTLURAL AND ENTOMOLOGICAL SCIENCE MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES) 22 September 1999 (1999-09-22) description page 5 line 19 - page 6 line 31, embodiment 1	1-9
A	CN 1407992 A (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES et al.) 02 April 2003 (2003-04-02) entire document	1-9
A	CN 103290085 A (HUZHOU XINTIANSI BIO-TECH CO., LTD.) 11 September 2013 (2013-09-11) entire document	1-9
A	JP H02233128 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN et al.) 14 September 1990 (1990-09-14) entire document	1-9
A	CN 110003518 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 12 July 2019 (2019-07-12) entire document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/099614

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111875691	A	03 November 2020	None			
CN	111671980	A	18 September 2020	None			
CN	111821514	A	27 October 2020	None			
CN	111870740	A	03 November 2020	None			
KR	101121040	B1	26 March 2012	WO	2013028017	A2	28 February 2013
				WO	2013028017	A3	10 May 2013
CN	1229362	A	22 September 1999	JP	2990239	B2	13 December 1999
				KR	20000068154	A	25 November 2000
				WO	9857676	A1	23 December 1998
				TW	397693	B	11 July 2000
				EP	0920875	A1	09 June 1999
				JP	H1170160	A	16 March 1999
				CN	1116904	C	06 August 2003
				US	6175053	B1	16 January 2001
				KR	431659	B1	17 May 2004
CN	1407992	A	02 April 2003	US	2003165548	A1	04 September 2003
				KR	20020065521	A	13 August 2002
				EP	1241178	A1	18 September 2002
				JP	2001163899	A	19 June 2001
				EP	1241178	A4	08 September 2004
				CN	1190445	C	23 February 2005
				WO	0142300	A1	14 June 2001
CN	103290085	A	11 September 2013	None			
JP	H02233128	A	14 September 1990	JP	H0583292	B2	25 November 1993
CN	110003518	A	12 July 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/099614

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/435(2006.01)i; C07K 1/14(2006.01)i; A61L 27/22(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>C07K A61L</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>CNABS;CNTXT;CNKI;CJFD;USTXT;EPTXT;WOTXT;VEN;ISI Web of Science;百度学术;百度;苏州大学, 王建南, 刘苹, 裔洪根, 田伟, 蚕丝, 丝素, 丝胶, 蛋白, 复合溶液, 温水, 沸水, 开水, 脱胶, 中性盐, 溴化锂, 透析, 粘度, 黏度, 分子量, SOOCHOW UNIVERSITY, WANG Jiannan, LIU Ping, YI Honggen, TIAN Wei, silk, fibroin, sericin, degum, gum, protein, complex, combine, water, boil, hot, neutral salt, lithium bromide, dialysis, viscosity, molecular weight</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>PX</td> <td>CN 111875691 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111671980 A (苏州大学) 2020年 9月 18日 (2020 - 09 - 18) 权利要求1-10</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111821514 A (苏州大学) 2020年 10月 27日 (2020 - 10 - 27) 权利要求1-10</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111870740 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-10</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>田伟, “丝素/丝胶蛋白共混材料的制备及其矿化性能的研究” 中国优秀博士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑, 2021年 2月 15日 (2021 - 02 - 15), ISSN: 1674-0246, B020-743</td> <td>1-9</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	PX	CN 111875691 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-9	1-9	PX	CN 111671980 A (苏州大学) 2020年 9月 18日 (2020 - 09 - 18) 权利要求1-10	1-9	PX	CN 111821514 A (苏州大学) 2020年 10月 27日 (2020 - 10 - 27) 权利要求1-10	1-9	PX	CN 111870740 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-10	1-9	PX	田伟, “丝素/丝胶蛋白共混材料的制备及其矿化性能的研究” 中国优秀博士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑, 2021年 2月 15日 (2021 - 02 - 15), ISSN: 1674-0246, B020-743	1-9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 111875691 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-9	1-9																		
PX	CN 111671980 A (苏州大学) 2020年 9月 18日 (2020 - 09 - 18) 权利要求1-10	1-9																		
PX	CN 111821514 A (苏州大学) 2020年 10月 27日 (2020 - 10 - 27) 权利要求1-10	1-9																		
PX	CN 111870740 A (苏州大学) 2020年 11月 3日 (2020 - 11 - 03) 权利要求1-10	1-9																		
PX	田伟, “丝素/丝胶蛋白共混材料的制备及其矿化性能的研究” 中国优秀博士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑, 2021年 2月 15日 (2021 - 02 - 15), ISSN: 1674-0246, B020-743	1-9																		
<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: “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</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 8月 10日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 8月 30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 传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>笪久香</p> <p>电话号码 (86-512)88996576</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
X	KR 101121040 B1 (KYUNGPOOK NAT UNIV IND ACAD) 2012年 3月 26日 (2012 - 03 - 26) 权利要求1-6, 说明书第[0020]-[0027]段	1-9
X	CN 1229362 A (农林水产省蚕丝昆虫农业技术研究所所长代表日本国) 1999年 9月 22日 (1999 - 09 - 22) 说明书第5页第19行-第6页31行, 实施例1	1-9
A	CN 1407992 A (独立行政法人农业生物资源研究所 等) 2003年 4月 2日 (2003 - 04 - 02) 全文	1-9
A	CN 103290085 A (湖州新天丝生物技术有限公司) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 全文	1-9
A	JP H02233128 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN等) 1990年 9月 14日 (1990 - 09 - 14) 全文	1-9
A	CN 110003518 A (苏州大学) 2019年 7月 12日 (2019 - 07 - 12) 全文	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/099614

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	111875691	A	2020年 11月 3日	无			
CN	111671980	A	2020年 9月 18日	无			
CN	111821514	A	2020年 10月 27日	无			
CN	111870740	A	2020年 11月 3日	无			
KR	101121040	B1	2012年 3月 26日	WO	2013028017	A2	2013年 2月 28日
				WO	2013028017	A3	2013年 5月 10日
CN	1229362	A	1999年 9月 22日	JP	2990239	B2	1999年 12月 13日
				KR	20000068154	A	2000年 11月 25日
				WO	9857676	A1	1998年 12月 23日
				TW	397693	B	2000年 7月 11日
				EP	0920875	A1	1999年 6月 9日
				JP	H1170160	A	1999年 3月 16日
				CN	1116904	C	2003年 8月 6日
				US	6175053	B1	2001年 1月 16日
				KR	431659	B1	2004年 5月 17日
CN	1407992	A	2003年 4月 2日	US	2003165548	A1	2003年 9月 4日
				KR	20020065521	A	2002年 8月 13日
				EP	1241178	A1	2002年 9月 18日
				JP	2001163899	A	2001年 6月 19日
				EP	1241178	A4	2004年 9月 8日
				CN	1190445	C	2005年 2月 23日
				WO	0142300	A1	2001年 6月 14日
CN	103290085	A	2013年 9月 11日	无			
JP	H02233128	A	1990年 9月 14日	JP	H0583292	B2	1993年 11月 25日
CN	110003518	A	2019年 7月 12日	无			