



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106902381 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(21)申请号 201710179526.4

A61L 15/44(2006.01)

(22)申请日 2017.03.23

(71)申请人 陕西慧康生物科技有限责任公司

地址 710054 陕西省西安市雁塔区雁翔路
西安交通大学科技园保赛大厦四楼

(72)发明人 何越 侯增淼 高恩 李晓颖
李敏 杨小琳 赵金礼

(74)专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事
务所(普通合伙) 11276

代理人 刘云贵 周华宁

(51)Int.Cl.

A61L 15/32(2006.01)

A61L 15/28(2006.01)

A61L 15/20(2006.01)

A61L 15/40(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

重组人源胶原蛋白原液、敷料以及它们的制
备方法

(57)摘要

本发明提供了一种重组人源胶原蛋白原液，按重量百分比计，包括：重组人源胶原蛋白0.05%–0.2%，保湿剂0.02%–7%，增稠剂0.1–1.0%，防腐剂0.1%–2%，和余量的水。本发明还提供了一种重组人源胶原蛋白敷料，包括前述的重组人源胶原蛋白原液和载体。本发明还提供了前述的重组人源胶原蛋白原液以及敷料的制备方法。本发明的重组人源胶原蛋白原液以及敷料的有效性和安全性更高、生物活性高、保湿效果好、可提高人体吸收、增加表皮修复速度、促进创伤愈合。

1. 一种重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,按重量百分比计,包括:重组人源胶原蛋白0.05%-0.2%,保湿剂0.02%-7%,增稠剂0.1-1.0%,防腐剂0.1%-2%,和余量的水。

2. 根据权利要求1所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述重组人源胶原蛋白是由数均分子量为3kDa-20kDa的重组人源胶原蛋白和数均分子量为70kDa-140kDa的重组人源胶原蛋白优选按照重量比1:1-5组成。

3. 根据权利要求1或2所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述重组人源胶原蛋白采用微生物发酵法获得。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述保湿剂是透明质酸钠(优选分子量是200kDa-400kDa)、甘油、神经酰胺、NL-50中的任意一种或多种。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述增稠剂是羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、黄原胶、瓜尔豆胶中的任意一种或多种。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述防腐剂是山梨酸、苯甲酸钠、乳酸钠、尼泊金酯中的任意一种或多种。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,按重量百分比计,所述重组人源胶原蛋白原液包括:重组人源胶原蛋白0.1%-0.15%,保湿剂0.5%-3%,增稠剂0.1-0.5%,防腐剂0.2%-0.6%,和余量的水。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,按重量百分比计,所述重组人源胶原蛋白原液包括:重组胶原蛋白0.1%-0.15%,分子量是200kDa-400kDa的透明质酸钠0.01%-1%,甘油0.2%-2%,羧甲基纤维素0.1%-0.5%,乳酸钠0.1%-0.3%,尼泊金酯0.1%-0.3%,和余量的水。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的重组人源胶原蛋白原液,其特征在于,所述重组人源胶原蛋白原液的pH值是4.5-6.5。

10. 权利要求1-9任一项所述的重组人源胶原蛋白原液的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将重组人源胶原蛋白溶解于纯化水中得到相①;

(2) 将保湿剂、增稠剂溶解于纯化水中得到相②;

(3) 将相①和相②混合并搅拌均匀,加入防腐剂,纯化水将余量补足,加热并搅拌均匀,调节pH为4.5-6.5,得到重组胶原蛋白原液。

11. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,在步骤(2)中,将保湿剂、增稠剂加入纯化水中,随后加热至40-80℃进行溶解,待完全溶解后冷却至室温。

12. 根据权利要求10或11所述的制备方法,其特征在于,在步骤(3)中,加热温度是50-100℃。

13. 一种重组人源胶原蛋白敷料,其特征在于,包括重组人源胶原蛋白原液和载体;

其中,所述重组人源胶原蛋白原液是权利要求1-9任一项所述的重组人源胶原蛋白原液或者权利要求10-12任一项所述的制备方法制备的重组人源胶原蛋白原液。

14. 根据权利要求13所述的重组人源胶原蛋白敷料,其特征在于,所述重组人源胶原蛋白原液和所述载体被无菌封装于铝箔袋中。

15. 根据权利要求13或14所述的重组人源胶原蛋白敷料,其特征在于,所述载体是非织无纺布。

16. 权利要求13-15任一项所述的重组人源胶原蛋白敷料的制备方法,其特征在于,包括:将重组人源胶原蛋白原液装入含有载体的铝箔袋中,随后封口,并低温辐照灭菌;

其中,所述重组人源胶原蛋白原液是权利要求1-9任一项所述的重组人源胶原蛋白原液或者权利要求10-12任一项所述的制备方法制备的重组人源胶原蛋白原液。

17. 根据权利要求16所述的制备方法,其特征在于,所述低温辐照灭菌的温度是-20℃至-10℃、辐照剂量是5kGy-30kGy。

重组人源胶原蛋白原液、敷料以及它们的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医疗美容技术领域,具体地,本发明涉及一种基因重组人源胶原蛋白原液、敷料以及它们的制备方法。

背景技术

[0002] 皮炎、湿疹、敏感皮肤及大部分微创美容术后患者的皮肤屏障功能均会出现不同程度的受损,因此需要建立新的皮肤屏障。

[0003] 胶原蛋白是一种生物性高分子物质,可以补充皮肤各层所需的营养,使皮肤中胶原活性增强,有滋润皮肤、延缓衰老、美容、消皱等功效。小分子胶原蛋白在滋润肌肤,提高皮肤营养吸收方面的作用更为显著。胶原在修复皮肤屏障方面,如中度痤疮、皮炎/湿疹等过敏性皮肤疾病、激光美容术后护理方面的作用也已得到证实,但天然胶原蛋白也存在免疫排斥反应及病毒灭活风险。例如,申请号为201510641417.0、发明名称为“一种胶原敷料贴制备方法及其应用”的发明专利申请中公开了一种胶原蛋白敷料贴,其采用牛皮提取胶原并加工为敷料贴进行皮肤护理,具有一定的免疫原性及过敏风险。

[0004] 重组胶原蛋白的研究已经取得很大突破,所得胶原蛋白活性高,具有良好的亲水性及保水性,可以提高皮肤新陈代谢、无病毒残留、无免疫原性、无内毒素,仿皮肤角质层设计,是纯生物制剂,可长期使用且安全。专利申请号为201510883490.9、发明名称为“一种类人胶原蛋白粘膜修复凝胶”的发明专利申请中公开了一种可用于医疗、美容领域的粘膜修复凝胶,采用分子量为90kDa的重组类人胶原蛋白为主要原料,90KDa的胶原蛋白对于皮肤受损的修复及保湿具有一定效果,但难以被皮肤吸收,在美容领域的应用效果不甚理想。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术的缺陷,提供一种重组人源胶原蛋白原液及其制备方法,以及包括该重组人源胶原蛋白原液的敷料及其制备方法。

[0006] 一方面,本发明提供了一种重组人源胶原蛋白原液,按重量百分比计,包括:重组人源胶原蛋白0.05%-0.2%,保湿剂0.02%-7%,增稠剂0.1-1.0%,防腐剂0.1%-2%,和余量的水。

[0007] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述重组人源胶原蛋白是由数均分子量为3kDa-20kDa的重组人源胶原蛋白和数均分子量为70kDa-140kDa的重组人源胶原蛋白优选按照重量比1:1-5组成。

[0008] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述重组人源胶原蛋白采用微生物发酵法获得。

[0009] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述保湿剂是透明质酸钠(优选分子量是200kDa-400kDa)、甘油、神经酰胺、NL-50中的任意一种或多种。

[0010] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述增稠剂是羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、黄原胶、瓜尔豆胶中的任意一种或多种。

[0011] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述防腐剂是山梨酸、苯甲酸钠、乳酸钠、尼泊金

酯中的任意一种或多种。

[0012] 前述的重组人源胶原蛋白原液,按重量百分比计,所述重组人源胶原蛋白原液包括:重组人源胶原蛋白0.1%-0.15%,保湿剂0.5%-3%,增稠剂0.1-0.5%,防腐剂0.2%-0.6%,和余量的水。

[0013] 前述的重组人源胶原蛋白原液,按重量百分比计,所述重组人源胶原蛋白原液包括:重组胶原蛋白0.1%-0.15%,分子量是200kDa-400kDa的透明质酸0.01%-1%,甘油0.2%-2%,羧甲基纤维素钠0.1%-0.5%,乳酸钠0.1%-0.3%,尼泊金酯0.1%-0.3%,和余量的水。

[0014] 前述的重组人源胶原蛋白原液,所述重组人源胶原蛋白原液的pH值是4.5-6.5。

[0015] 另一方面,本发明提供了前述的重组人源胶原蛋白原液的制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1) 将重组人源胶原蛋白溶解于纯化水中得到相①;

[0017] (2) 将保湿剂、增稠剂溶解于纯化水中得到相②;

[0018] (3) 将相①和相②混合并搅拌均匀,加入防腐剂,纯化水将余量补足,加热并搅拌均匀,调节pH为4.5-6.5,得到重组胶原蛋白原液。

[0019] 前述的制备方法,在步骤(2)中,将保湿剂、增稠剂加入纯化水中,随后加热至40-80℃进行溶解,待完全溶解后冷却至室温。

[0020] 前述的制备方法,在步骤(3)中,加热温度是50-100℃。

[0021] 另一方面,本发明提供了一种重组人源胶原蛋白敷料,包括重组人源胶原蛋白原液和载体;

[0022] 其中,所述重组人源胶原蛋白原液是前述的重组人源胶原蛋白原液或者前述的制备方法制备的重组人源胶原蛋白原液。

[0023] 前述的重组人源胶原蛋白敷料,所述重组人源胶原蛋白原液和所述载体被无菌封装于铝箔袋中。

[0024] 前述的重组人源胶原蛋白敷料,所述载体是非织无纺布。

[0025] 另一方面,本发明提供了前述的重组人源胶原蛋白敷料的制备方法,包括:将重组人源胶原蛋白原液装入含有载体的铝箔袋中,随后封口,并低温辐照灭菌;

[0026] 其中,所述重组人源胶原蛋白原液是前述的重组人源胶原蛋白原液或者前述的制备方法制备的重组人源胶原蛋白原液。

[0027] 前述的制备方法,所述低温辐照灭菌的温度是-20℃至-10℃、辐照剂量是5kGy-30kGy。

[0028] 相对于现有技术,本发明的重组人源胶原蛋白原液、敷料以及它们的制备方法具有如下有益效果:

[0029] (1) 本发明的重组人源胶原蛋白原液以及敷料的有效性和安全性更高。

[0030] (2) 本发明的重组人源胶原蛋白原液以及敷料的生物活性高、保湿效果好、可提高人体吸收、增加表皮修复速度、促进创伤愈合。

附图说明

[0031] 图1是对使用一个疗程后志愿者的角质层膜套蛋白基因、发挥皮肤屏障功能相关

合成酶的表达及神经酰胺合成酶的表达进行mRNA差异检测的结果。

具体实施方式

[0032] 为了充分了解本发明的目的、特征及功效,通过下述具体实施方式,对本发明作详细说明。本发明的工艺方法除下述内容外,其余均采用本领域的常规方法或装置。

[0033] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种重组人源胶原蛋白原液,按重量百分比计,包括:重组人源胶原蛋白0.05%-0.2%,保湿剂0.02%-7%,增稠剂0.1-1.0%,防腐剂0.1%-2%,和余量的水。

[0034] 重组人源胶原蛋白是利用转基因技术和基因重组技术在动物、植物或者微生物表达体系中获得的人源胶原蛋白。在本发明中,所述重组人源胶原蛋白是由数均分子量为3kDa至20kDa的重组人源胶原蛋白和数均分子量为70kDa至140kDa的重组人源胶原蛋白按照重量比1:(1-5)组成的重组人源胶原蛋白混合物。前述各种分子量的重组人源胶原蛋白是以基因工程的方法由微生物发酵获得,例如,采用如下方法:构建毕赤酵母工程菌,筛选高表达毕赤酵母工程菌进行发酵生产,发酵结束后离心取上清液,用孔径为0.22 μ m中空纤维微滤系统进行微滤,收集滤过液,再采用中空纤维超滤系统对目标分子量的蛋白进行截留超滤、脱盐浓缩,收集浓缩液,采用离子交换层析、洗脱等进行胶原蛋白纯化,胶原蛋白溶液经0.22 μ m膜过滤后冻干。具体可参考申请号为201610388271.8、名称为“一种重组人源胶原蛋白及其编码基因和制备方法”的发明专利申请,该专利申请通过引用的方式整体并入本申请中。

[0035] 保湿剂用于促进皮肤保水、保油,以使皮肤具有更好的保湿、保油功能。医疗美容领域常用的保湿剂均可用于本发明中,例如,保湿剂可以是透明质酸钠(优选分子量是200kDa-400kDa的透明质酸钠)、甘油、神经酰胺、NL-50(即吡咯烷酮羧酸钠,PCA-Na)中的任意一种或多种。

[0036] 增稠剂属于流变助剂,主要用于改进和调节粘性。医疗美容领域常用的增稠剂均可用于本发明中,例如,增稠剂可以是羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、黄原胶、瓜尔豆胶中的任意一种或多种。

[0037] 防腐剂主要用于抑制微生物的生长和繁殖,以延长物质的保存时间,抑制物质腐败。常用的医用防腐剂均可用于本发明中,例如,防腐剂可以是山梨酸、苯甲酸钠、乳酸钠、尼泊金酯中的任意一种或多种。

[0038] 上述的保湿剂、增稠剂、防腐剂均可通过常规市购获得。

[0039] 本发明的重组人源胶原蛋白原液的pH值是4.5-6.5,一方面,能够避免原液中出现沉淀物,另一方面,人体皮肤表面为弱酸性,原液pH值与人体皮肤表面pH值接近,更有利于皮肤的吸收与保护。

[0040] 本发明的重组人源胶原蛋白原液采用不同分子量的胶原蛋白搭配使用,其中3kDa至20kDa的低分子量重组人源胶原蛋白具有吸收性强,改善皮肤细胞代谢,促进皮肤修复、创面愈合等生物活性,70kDa至140kDa的高分子量重组人源胶原蛋白具有保湿、屏障保护、增强血液循环、抗菌消炎等功能,二者按照上述比例组合,即可保证产品较高的生物活性作用,较高的保湿效果,也可提高人体吸收,增加表皮修复速度,且其湿性环境更利于创面修复,减少瘢痕形成。并且,本发明中采用的各种分子量的重组人源胶原蛋白都是采用微生物

发酵法,其免疫原性低、纯度高、稳定性和水溶性好。保湿剂能够调节表皮胶质形成细胞,调控胶原合成,促进创伤愈合,本发明通过重组胶原蛋白与保湿剂的共同作用,有效调控胶原蛋白合成,减少瘢痕,提高皮肤修复效果;并且,通过加入增稠剂,与其它组分特别是不同大小的重组胶原蛋白协同作用,重组胶原大小分子优良的亲水性可以只添加极小量的增稠剂即可获得理想的肤感舒适、使用方便的料液粘稠性状;而防腐剂的加入,有效保证了各组分最佳活性。上述这些组分的组合以及各组分的百分比范围,都是发明人通过大量实验、付出创造性劳动而确定的,上述组合以及百分比范围使本发明的重组人源胶原蛋白原液具有上述的有效性和安全性。

[0041] 在一种优选的具体实施方式中,本发明的重组人源胶原蛋白原液按重量百分比计包括:重组人源胶原蛋白0.1%-0.15%,保湿剂0.5%-3%,增稠剂0.1-0.5%,防腐剂0.2%-0.6%,和余量的水。

[0042] 在一种特别优选的具体实施方式中,本发明的重组人源胶原蛋白原液按重量百分比计包括:重组胶原蛋白0.1%-0.15%,分子量是200kDa-400kDa的透明质酸0.01%-1%,甘油0.2%-2%,神经酰胺0.1%-0.4%,羧甲基纤维素钠0.1%-0.5%,乳酸钠0.1%-0.3%,尼泊金酯0.1%-0.3%,和余量的水。

[0043] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了上述重组人源胶原蛋白原液的制备方法,包括:

[0044] (1) 按上述重量百分比将重组人源胶原蛋白溶解于纯化水中得到相①;

[0045] (2) 按上述重量百分比将保湿剂、增稠剂溶解于纯化水中得到相②;

[0046] (3) 将相①和相②混合并搅拌均匀,按上述重量百分比加入防腐剂,纯化水将余量补足,加热并搅拌均匀,调节pH为4.5-6.5,得到重组胶原蛋白原液。

[0047] 其中,在步骤(2)中,将保湿剂、增稠剂加入纯化水中,随后加热至40-80℃进行溶解,待完全溶解后冷却至室温;在步骤(3)中,加热温度是50-100℃。

[0048] 本发明的重组人源胶原蛋白原液具有较高的生物活性、保湿效果、利于吸收且具有较好的皮肤修复功效,因此具有极高的医疗、美容领域的应用价值,可以通过多种形式进行使用。因此,根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种重组人源胶原蛋白敷料,包括上述的重组人源胶原蛋白原液和载体,其中,所述载体可以是医疗美容领域常用的任何载体,包括但不限于非织无纺布。在一种优选的具体实施方式中,本发明的重组人源胶原蛋白敷料包括无菌封装于铝箔袋中的重组人源胶原蛋白原液和非织无纺布。

[0049] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了上述重组人源胶原蛋白敷料的制备方法,包括将重组人源胶原蛋白原液装入含有载体的铝箔袋中,随后封口,并低温辐照灭菌。采用低温辐照,既可以保证产品的无菌水平(10^{-6}),又可防止胶原结构损坏或发生变性。优选地,所述低温辐照灭菌的温度是-20℃至-10℃、辐照剂量是5kGy-30kGy。

[0050] 本发明的重组人源胶原蛋白原液及其制成的敷料可广泛应用于医疗、美容护理领域,主要针对皮炎、湿疹、敏感肌肤及光子嫩肤、激光美容、果酸活肤等术后皮肤屏障功能受损者。

[0051] 实施例

[0052] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商

品说明书选择。下列实施例中采用的重组人源胶原蛋白粉采用申请号为201610388271.8、名称为“一种重组人源胶原蛋白及其编码基因和制备方法”的发明专利申请中公开的方法制备获得。

[0053] 实施例1

[0054] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的组成如下(%表示重量百分比):

[0055] 重组人源胶原蛋白:0.12%,其中,70kDa的重组人源胶原蛋白与15kDa的重组人源胶原蛋白的重量比是1:1

透明质酸钠(分子量 200kDa-400kDa): 0.05%

甘油 1.5%

羧甲基纤维素: 0.1%

[0056] 乳酸钠: 0.3%

神经酰胺: 0.1%

尼泊金甲酯: 0.1%

纯化水: 补足 100%

[0057] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的制备方法如下:

[0058] (1) 在十万级洁净区内,将纯化的重组人源胶原蛋白粉溶解于10ml纯化水中为相①,其中加入分子量70kDa重组人源胶原蛋白0.06g,分子量15kDa重组人源胶原蛋白0.06g;

[0059] (2) 将0.05g透明质酸钠,1.5g甘油,0.1g羧甲基纤维素、0.1g神经酰胺溶解于50ml纯化水中得到相②;

[0060] (3) 将相①和相②混合并搅拌均匀,再次加入0.3g乳酸钠、0.1g尼泊金甲酯并混匀,纯化水将余量补足100g,加热80℃搅拌均匀并调节pH为6.0,得到重组人源胶原蛋白原液。

[0061] 本实施例的重组人源胶原蛋白敷料是将25ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中构成。制备方法是:将25ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中,封口,于-20℃冷冻处理4h,15kGy辐照灭菌,获得基因重组胶原蛋白敷料。

[0062] 实施例2

[0063] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的组成如下(%表示重量百分比):

[0064] 重组人源胶原蛋白:0.15%,其中,70kDa的重组人源胶原蛋白与15kDa的重组人源胶原蛋白的重量比是2:1

透明质酸钠: 0.12%

甘油 2.5%

[0065] 羧甲基纤维素: 0.2%

苯甲酸钠: 0.3%

纯化水: 补足 100%

[0066] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的制备方法如下：

[0067] (1) 在十万级洁净区内，将纯化的重组人源胶原蛋白粉溶解于10ml纯化水中为相①，其中加入分子量70kDa重组人源胶原蛋白0.1g，分子量15kDa重组人源胶原蛋白0.05g；

[0068] (2) 将0.12g透明质酸钠，2.5g甘油，0.2g羧甲基纤维素溶解于50ml纯化水中得到相②；

[0069] (3) 将相①和相②混合并搅拌均匀，加入0.3g苯甲酸钠并混匀，纯化水将余量补足100g，加热70℃搅拌均匀并调节pH为6.0，得到重组人源胶原蛋白原液。

[0070] 本实施例的重组人源胶原蛋白敷料是将23ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中构成。制备方法是：将23ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中，封口，于-10℃冷冻处理8h，20kGy辐照灭菌，获得基因重组胶原蛋白敷料。

[0071] 实施例3

[0072] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的组成如下（%表示重量百分比）：

[0073] 重组人源胶原蛋白：0.16%，其中，70kDa的重组人源胶原蛋白与5kDa的重组人源胶原蛋白的重量比是3:1

[0074]	透明质酸钠：	0.2%
	甘油	2.2%
	黄原胶：	0.3%
[0075]	苯甲酸钠：	0.3%
	乳酸钠	0.05%
	纯化水：	补足 100%

[0076] 本实施例的重组人源胶原蛋白原液的制备方法如下：

[0077] (1) 在十万级洁净区内，将纯化的重组人源胶原蛋白粉溶解于10ml纯化水中为相①，其中加入分子量70kDa重组人源胶原蛋白0.12g，分子量5kDa重组人源胶原蛋白0.04g；

[0078] (2) 将0.2g透明质酸钠，2.2g甘油，0.3g黄原胶溶解于50ml纯化水中得到相②；

[0079] (3) 将相①和相②混合并搅拌均匀，加入0.3g苯甲酸钠、0.05g乳酸钠并混匀，纯化水将余量补足100g，加热85℃搅拌均匀并调节pH为6.0，得到重组人源胶原蛋白原液。

[0080] 本实施例的重组人源胶原蛋白敷料是将25ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中构成。制备方法是：将25ml上述重组人源胶原蛋白原液灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中，封口，于-15℃冷冻处理5h，25kGy辐照灭菌，获得基因重组胶原蛋白敷料。

[0081] 实施例4-8

[0082] 实施例4-8的重组人源胶原蛋白原液的组成如表1所示，其中的%表示重量百分比，其中实施例4和5中的重组人源胶原蛋白是100kDa的重组人源胶原蛋白与20kDa的重组人源胶原蛋白按重量比是1:1组成，实施例6和7中的重组人源胶原蛋白是140kDa的重组人源胶原蛋白与20kDa的重组人源胶原蛋白按重量比是5:1组成，实施例8中的重组人源胶原蛋白是100kDa的重组人源胶原蛋白与20kDa的重组人源胶原蛋白按重量比是3:1组成。实施

例4-8的重组人源胶原蛋白原液的制备方法是按照表1中各组分的含量重复实施例1的方法。

[0083] 实施例4-8的重组人源胶原蛋白敷料是将25ml各实施例中制备的重组人源胶原蛋白原液分别灌装于含有非织无纺布的铝箔袋中构成。实施例4-8的重组人源胶原蛋白敷料的制备方法与实施例1相同。

[0084] 表1

		实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8
重组人源胶原蛋白		0.15%	0.10%	0.20%	0.05%	0.13%
保湿剂	透明质酸钠 分子量是 200kDa-400kDa	1.00%	0.01%	—	—	0.20%
	甘油	1.60%	2.00%	—	2.00%	0.20%
	神经酰胺	0.40%	0.40%	—		0.10%
	NL-50	—	—	0.02%	5.00%	
增稠剂	羧甲基纤维素	0.50%	0.10%	—	—	0.30%
	羧乙基纤维素	—	—	0.50%	—	—
	黄原胶	—	—	0.20%	0.05%	—
	瓜尔豆胶	—	—	0.30%	0.05%	—
防腐剂	山梨酸	—	—	1.00%	—	—
	苯甲酸钠	—	—	1.00%	0.20%	—
	乳酸钠	0.30%	0.10%	—	0.10%	0.10%
	尼泊金酯	0.10%	0.30%	—	—	0.10%
水		补足 100%	补足 100%	补足 100%	补足 100%	补足 100%

[0085] 应用实施例1

[0086] 选取28名志愿者,22-30岁,混合性肤质,痘史12年,T区毛孔大,皮肤粗糙,发红严重,有少量痘痘。左侧面部使用实施例1的敷料作为实验组,右侧面部采用市购同类产品作为对照组,对照组采用的敷料的组成是:(胶原蛋白94KDa 0.18wt%、山梨酸1.8wt%、苯甲酸钠0.8wt%、医用矫味剂2.1wt%,水补足100%)。两侧分别使用敷料贴7贴,其中第1、2、3、4贴每天连续使用,第5、6、7贴间隔两天使用。

[0087] (1) 保湿性和血红素变化

[0088] 固定每天早上11点进行测试,收集使用后面部水分含量及血红素含量数据。

[0089] 测试结果如表2所示:

[0090] 表2

	水分含量 (au)		血红素 (au)	
	对照组	实验组	对照组	实验组
使用前	58.8	58.7	33.1	33.0
第 1 贴	59.9	59.8	33.0	32.8
第 2 贴	60.1	63.6	32.7	31.3
第 3 贴	61.2	62.7	32.8	32.2
第 4 贴	60.9	63.0	32.6	29.6
第 5 贴	61.5	64.4	33.0	28.9
第 6 贴	62.5	64.5	32.6	28.7
第 7 贴	61.9	64.9	32.1	28.8

[0092]

[0093] 由上表可知,实验组水分含量持续稳定升高,优于对照组,差异明显。对照组血红素与实验组均下降,实验组更为显著,差异具有统计学意义($P<0.05$)。这说明采用本发明配方制备敷料,作用显著,功效明显。

[0094] (2) 粘度与舒适性

[0095] 采用品氏粘度计分别对实验组和对照组敷料中料液进行粘度检测,结果为:实验组:50~120mm²/s;对照组20~50mm²/s。

[0096] 同时受试者反应对照组敷料贴料液较稀,敷贴过程中容易流下,且料液不足,20min后面膜布较干,敷贴期间需要补液,不便使用。本发明制备敷料粘度合适,舒适感强,肤感较好,且用后未出现过敏或其它不良症状。这得益于本发明重组蛋白分子大小不同,与增稠剂起协同作用,增加肤感和使用性;并使用特殊低温辐照技术保证最终产品的灭菌,既不破坏增稠体系,也保证了产品安全性。

[0097] (3) 促进新陈代谢作用

[0098] 分别对使用一个疗程后志愿者的角质层膜套蛋白基因、发挥皮肤屏障功能相关合成酶的表达及神经酰胺合成酶的表达等进行mRNA差异检测,以间接反应蛋白合成的变化,结果如图1所示。由图1可知,实验组各基因表达量与对照组相比均增加明显,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

[0099] (4) 不良反应

[0100] 实验组使用过程中未发现不良反应;对照组有1例1级不良反应(瘙痒、红斑),1例2级不良反应(水肿、局部皮损),停止使用后消退,因此,本发明的敷料在安全性、持续使用性方面优于现有产品及技术,可放心使用。

[0101] 应用实施例2

[0102] 对实施例1的敷料进行多项生物相容性评价,检测结果如下:

[0103] (1) 迟发性致敏反应

[0104] 按GB/T 16886.10-2005规定的最大剂量致敏方法进行检验,具体为:取白化豚鼠30只,分成3组,阳性对照组(10只),实验组(10只)、阴性对照组(10只),开始适应环境,为时一周。试验前一天,在胸廓的背前区备皮(4cm×6cm)。在豚鼠背部去毛,消毒后于肩胛骨内侧从头向尾成对注射6个点,每点注射0.1mL;其中一对注射完全弗氏佐剂与生理盐水(1:1)

混合液；另一对注射待检物(1:9的浸提液)与完全弗氏佐剂的等体积混合物，阴性对照组则注射生理盐水，阳性对照组注射巯基苯并噻唑；最后一对注射前2种注射液的等体积混合物。之后进行局部诱导和激发，并于激发后24h和48h观察实验组和对照组动物激发部位皮肤情况，在自然光或全光谱光线下观察皮肤反应。

[0105] Magnusson和Kligman分级标准如下：

反应情况	等级
无明显改变	0
[0106] 散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和水肿	3

[0107] 表3

动物编号	皮内诱导体积(mL)	激发体积(mL)	24h			48h		
			实验组	阳性对照	阴性对照	实验组	阳性对照	阴性对照
1	0.1	0.1	0	2	0	0	3	0
2	0.1	0.1	0	3	0	0	2	0
3	0.1	0.1	0	3	0	0	2	0
[0108] 4	0.1	0.1	0	3	0	0	3	0
5	0.1	0.1	0	2	0	0	3	0
6	0.1	0.1	0	2	0	0	3	0
7	0.1	0.1	0	2	0	0	4	0
8	0.1	0.1	0	3	0	0	3	0
9	0.1	0.1	0	3	0	0	4	0
10	0.1	0.1	0	3	0	0	3	0
致敏率			0	100%	0	0	100%	0

[0109] 由表3结果可知，根据Magnusson和Kligman分级标准，本产品的致敏性与阴性对照评分均为0，阳性对照均有中、重度的致敏反应。因此，本发明的产品检测结果为无致敏反应。

[0110] (2) 皮肤刺激

[0111] 取本品按GB/T 16886.10-2005规定的方法进行检测，具体为：取12只新西兰兔，体重 $2.0\text{kg} \pm 0.2\text{kg}$ ，3-4个月龄。分笼饲养于空调室内，室温 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相对湿度40-70%，每天光照12小时，自由饮用自来水。试验前适应性饲养三天。并在试验前24h将动物背部脊柱两侧背毛除去(2.5cm×2.5cm)。样品采用生理盐水进行浸提(1:9)，分为实验部位和阳性观察部位(各2cm×2cm)。通过单次接触、多次涂抹给药在同一部位行皮肤刺激性试验，确保每次给药时间相同，贴敷时间一般不超过4周。在自然光线下观察皮肤反应(红斑和水肿)，判定皮肤刺激强度。

[0112] 积分标准：

皮肤反应	积分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
轻微红斑(勉强可见)	1
明显红斑	2
中度~重度红斑	3
严重红斑(紫红色)至轻微焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
轻微水肿(勉强可见)	1
轻度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)	2
中度水肿(皮肤隆起约1mm)	3
重度水肿(皮肤隆起超过1mm,范围扩大)	4
最高积分	8

[0114] 表4

动物编号	24h						48h					
	样品			阳性对照			样品			阳性对照		
	红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分	红斑	水肿	总分
1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0		0	1	1	0	0	0
总积分平均值	0.17			0			0.33			0		

[0116] 由表4结果可知,本发明的产品与阳性对照的评分差值小于1,且平均积分小于0.5,根据GB16886.第十部分对刺激的评价标准,判断本发明产品无刺激性。

[0117] (3) 细胞毒性

[0118] 取本品按照GB/T 16886.5-2003中规定的评价方法进行评价,具体为:将传代48-72h生长旺盛的L929细胞胰酶消化收集,用高糖DMEM培养基配置成 1×10^4 /ml的细胞悬液,接种至96孔板中,每孔200 μ l。样品按照1:9比例浸提,浸提介质为含10%新生牛血清的高糖DMEM培养液,浸提温度为37 $^{\circ}$ C,浸提时间为24h。将实验组、空白组及阳性对照组分别加入细胞悬液中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱培养,每天显微镜下观察细胞形态。在培养第5d时,使用酶联免疫检测仪在490nm波长下测各孔吸光度值(OD值),用空白调零孔OD

值调零,取平均值并记录。根据各组的吸光度均值计算细胞的相对增值率。

[0119] 细胞毒性反应分级标准

	细胞相对增殖率(RGR)	反应分级
	≥100	0级
	80-99	1级
[0120]	50-79	2级
	30-49	3级
	1-29	4级
	0	5级

[0121] 表5

样品编号	1	2	3	4	5	6
[0122] 细胞增值率	85%	92%	91%	88%	87%	90%

[0123] 根据细胞毒性反应分级标准并结合表5的结果可知,细胞毒性均为1级,说明材料安全性高,无明显细胞毒性。

[0124] (4) 无菌检测

[0125] 对样品敷料进行无菌检测,具体为无菌拆开包装,分别接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中,按照《中华人民共和国药典》(2010年版)三部附录XII A规定的方法测定,结果显示无菌。

[0126] (5) 重金属检测

[0127] 对样品敷料进行重金属检测,具体为称取样品1.0g,置已炽灼至恒重的坩埚中,精密称定,于600℃以下缓缓炽灼至完全炭化,放冷后加硫酸0.5mL,于600℃下再次横重,收取残渣,按《中华人民共和国药典》(2010年版)二部附录VIII H第二法规定的方法进行测定,结果<10μg/g。

[0128] 由以上检测结果可知,本发明制备产品符合参照医疗器械管理的安全性要求,可应用于医疗美容领域。

[0129] 本发明在上文中已以优选实施例公开,但是本领域的技术人员应理解的是,这些实施例仅用于描绘本发明,而不应理解为限制本发明的范围。应注意的是,凡是与这些实施例等效的变化与置换,均应设为涵盖于本发明的权利要求范围内。因此,本发明的保护范围应当以权利要求书中所界定的范围为准。

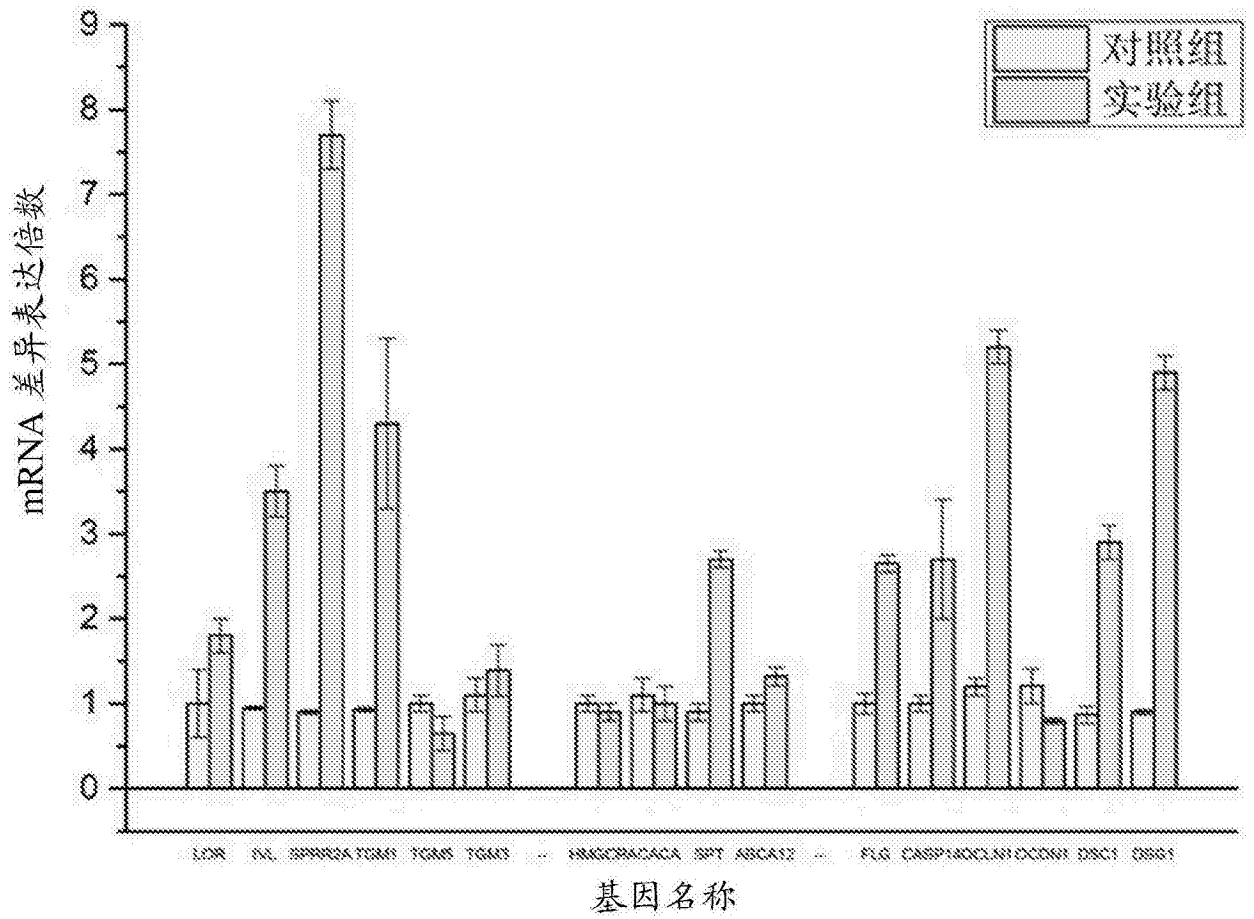


图1