



(21) 申请号 202211275409.5

(22) 申请日 2022.10.18

(71) 申请人 浙江双糖生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市象山县大徐镇  
汤家店村工业区(自主申报)

(72) 发明人 赵策

(74) 专利代理机构 河北圆友缘专利代理事务所  
(普通合伙) 13173

专利代理师 吴秀兰

(51) Int. Cl.

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

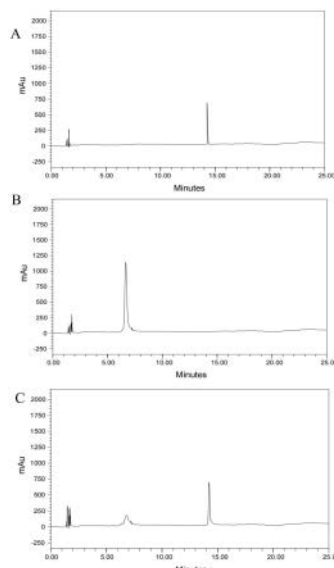
权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

重组III型胶原水凝胶组合物、制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了重组III型胶原水凝胶组合物、制备方法及应用。该重组III型胶原水凝胶组合物,其以百分比计,包含1~10% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.0001~2.5% (w/v) 重组III型胶原、0.05~5% (w/v) PEG400、10~35% (v/v) 的乙醇,余量为水。该水凝胶为一种温敏性的重组III型胶原水凝胶,其利用对罗望子木葡聚糖进行改性得到的酶解酯化罗望子木葡聚糖进行包裹,不仅具有皮肤修复功能,还对炎症皮肤具有治愈作用,并且特殊的空间构象预料不到的对重组III型胶原的释放效果能够保持长期有效,具有作为医用皮肤修复凝胶、妇科修复凝胶、面膜等应用前景。



1. 一种长效重组III型胶原水凝胶组合物, 其以百分比计, 包含1~10% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.0001~2.5% (w/v) 重组III型胶原、0.05~5% (w/v) PEG400、10~35% (v/v) 的乙醇, 余量为水。

2. 根据权利要求1所述的重组III型胶原水凝胶组合物, 其特征在于, 以百分比计, 包含2% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.2% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇, 余量为水。

3. 根据权利要求1所述的重组III型胶原水凝胶组合物, 其特征在于, 以百分比计, 包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇, 余量为水。

4. 根据权利要求1所述的重组III型胶原水凝胶组合物, 其特征在于, 所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的酯化度为74.8~91.2%, 所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的半乳糖含量为37.8~41.4%, 所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的分子量为17500~19200。

5. 一种重组III型胶原水凝胶组合物的制备方法, 其特征在于, 所述重组III型胶原水凝胶组合物, 以百分比计, 包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇, 余量为水; 按照配方量配制该重组III型胶原水凝胶组合物。

6. 根据权利要求4所述的制备方法, 其特征在于, 所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的制备方法包括:

将罗望子木葡聚糖溶于水甲酰胺中, 充分搅拌混匀后, 将其加入到已经制备好的酯化试剂中, 此反应装置置于恒温水浴中搅拌反应, 反应完成后, 冷却, 用4mol/L的NaOH调节pH至7, 蒸馏水透析96h, 浓缩、冷冻干燥得酯化罗望子木葡聚糖;

将所述酯化罗望子木葡聚糖用0.1M醋酸钠缓冲液配制成浓度为2% (w/v) 的pH=5母液; 向母液中加入 $\beta$ -半乳糖苷酶于50℃下反应20h得到酶解酯化罗望子木葡聚糖。

7. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述酯化罗望子木葡聚糖经纯化后再进行 $\beta$ -半乳糖苷酶酶解, 其中, 所述纯化的步骤包括:

将所述酯化罗望子木葡聚糖溶解在去离子水中, 离心去除不溶物后, 向上清液中逐滴加入无水乙醇至乙醇浓度为80% (v/v), 离心后的沉淀用无水丙酮和无水乙醚洗涤, 各重复三次, 最后的沉淀经冷冻干燥, 得到纯度较高的酯化罗望子木葡聚糖。

8. 权利要求1~4任一所述的重组III型胶原水凝胶组合物、或权利要求5~7任一所述的制备方法制得的重组III型胶原水凝胶组合在制备医用皮肤修复凝胶和/或妇科修复凝胶、面膜中的应用。

## 重组III型胶原水凝胶组合物、制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及重组III型胶原水凝胶技术领域,尤其涉及重组III型胶原水凝胶组合物、制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 重组III型胶原蛋白(recombinant human collagen III,Rhc-III)是利用基因工程技术以人胶原III型原始基因序列经过优化重组表达得到的,与人体天然胶原氨基酸序列高度一致。将Rhc-III用于创伤愈合,一方面Rhc-III具有丰富的亲水基团,可以增加成纤维细胞的粘附和增殖,另一方面可以直接补充创面的III型胶原蛋白,降低瘫痕的发生几率。但是水溶性的Rhc-III难以穿透角质层细胞间的脂质结构,且作用时间短,因此,需要依靠载体的帮助穿透角质层,延长其作用时间,从而达到与其治疗的效果。

[0003] 但是RhC-III作为生物药物载体,存在着易被酶解、热不稳定的问题,且水溶性的RhC-III难以穿透角质层细胞间的脂质结构,为了解决这些问题,需要对其进行合理的制剂学设计。

[0004] 对于高亲水性和稳定性差的生物大分子类药物,其经皮给药技术主要包括微针、离子电渗、超声介导、脂质囊泡和脂质体等。脂质体中的磷脂结构与人体的皮肤脂质相似,所以脂质体的生物相容性高,生物降解性好,能够促进药物的透皮吸收,因此,脂质体作为经皮给药载体有着良好的应用前景。例如,“重组人源III型胶原蛋白脂质体凝胶剂的制备及其促创伤愈合的研究[D]山东大学硕士学位论文,2021年5月”公开了采用以蛋黄卵磷脂和胆固醇作为脂质体,制备重组III型胶原水凝胶具有良好的凝胶性能,在48h内持续释放重组III型胶原蛋白,并且无皮肤毒性,能够修复破损皮肤。然而,开发新型重组III型胶原水凝胶,提高其释药时间,赋予其具有更加优异的生物相容性和生物体敏感性仍然具有十分重要的意义。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种重组III型胶原水凝胶组合物、制备方法及应用,以在一定程度上解决上述技术问题之一。

[0006] 第一方面,本发明实施例公开了一种重组III型胶原水凝胶组合物,其以百分比计,包含1~10% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.0001~2.5% (w/v) 重组III型胶原、0.05~5% (w/v) PEG400、10~35% (v/v) 的乙醇,余量为水。

[0007] 进一步的,所述重组III型胶原水凝胶组合物,以百分比计,包含2% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.2% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水。

[0008] 进一步的,所述重组III型胶原水凝胶组合物,以百分比计,包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水。

[0009] 进一步的,所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的酯化度为74.8~91.2%,所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的半乳糖含量为37.8~41.4%,所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的分子量为17500~19200。

[0010] 第二方面,本发明实施例公开了一种重组III型胶原水凝胶组合物的制备方法,所述重组III型胶原水凝胶组合物,以百分比计,包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水;按照配方量配制该重组III型胶原水凝胶组合物。

[0011] 进一步的,所述酶解酯化罗望子木葡聚糖的制备方法包括:

[0012] 将罗望子木葡聚糖溶于水甲酰胺中,充分搅拌混匀后,将其加入到已经制备好的酯化试剂中,此反应装置置于恒温水浴中搅拌反应,反应完成后,冷却,用4mol/L的NaOH调节pH至7,蒸馏水透析96h,浓缩、冷冻干燥得酯化罗望子木葡聚糖;

[0013] 将所述酯化罗望子木葡聚糖用0.1M醋酸钠缓冲液配制成浓度为2% (w/v) 的pH=5母液;向母液中加入 $\beta$ -半乳糖苷酶于50℃下反应20h得到酶解酯化罗望子木葡聚糖。

[0014] 进一步的,所述酯化罗望子木葡聚糖经纯化后再进行 $\beta$ -半乳糖苷酶酶解,其中,所述纯化的步骤包括:

[0015] 将所述酯化罗望子木葡聚糖溶解在去离子水中,离心去除不溶物后,向上清液中逐滴加入无水乙醇至乙醇浓度为80% (v/v),离心后的沉淀用无水丙酮和无水乙醚洗涤,各重复三次,最后的沉淀经冷冻干燥,得到纯度较高的酯化罗望子木葡聚糖。

[0016] 第三方面,本发明实施例公开了所述重组III型胶原水凝胶组合物、或所述制备方法制得的重组III型胶原水凝胶组合在制备医用皮肤修复凝胶和/或妇科修复凝胶中的应用。

[0017] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0018] 本发明提供了一种温敏性的重组III型胶原水凝胶,其利用对罗望子木葡聚糖进行改性得到的酶解酯化罗望子木葡聚糖进行包裹,不仅具有皮肤修复功能,还对炎症皮肤具有治愈作用,并且对重组III型胶原的释放效果能够保持长期有效,具有作为医用皮肤修复凝胶、妇科修复凝胶、面部护理面膜等应用前景。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明提供的咪唑-4-S,S'-二羧酸(A)、罗望子木葡聚糖(B)和酯化罗望子木葡聚糖(C)的HPLC图。

[0020] 图2为本发明实施例1提供的罗望子木葡聚糖(A)和酯化反应产物(B)的FT-IR图。

[0021] 图3为本发明实施例1提供的重组III型胶原水凝胶作用L929细胞前(A)和作用后(B)的细胞微观图。

[0022] 图4为本发明实施例1~7提供的重组III型胶原水凝胶释放分别在pH为2.0、5.0和7.8以及37℃的释放曲线。

[0023] 图5为本发明对比例1~8提供的重组III型胶原水凝胶释放分别在pH为2.0、5.0和7.8以及37℃的释放曲线。

[0024] 图6为本发明动物实验中试验组(A和B分别代表实施例1和2给药后的小鼠皮肤组织)和对照组(C和D分别代表对比例2和3给药后的小鼠皮肤组织)的HE染色图。

[0025] 图7为本发明动物实验中试验组(A和B分别代表实施例1和2给药后的小鼠皮肤组织)和对照组(C和D分别代表对比例2和3给药后的小鼠皮肤组织)的BrdU免疫荧光染色图。

## 具体实施方式

[0026] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0027] 本发明实施例对罗望子木葡聚糖进行改性,得到了一种具有明显适用于人体温度的温敏性水凝胶,该水凝胶包裹重组III型胶原不仅具有皮肤修复功能,还对炎症皮肤具有治愈作用,并且对重组III型胶原的释放效果能够保持长期有效,具有作为医用皮肤修复凝胶、妇科修复凝胶等应用前景。

### [0028] 酶解酯化罗望子木葡聚糖的制备

#### [0029] 1、酯化改性

##### [0030] (1) 酯化试剂的制备:

[0031] 将带有冷凝管和搅拌装置的三颈烧瓶置于冰浴中,搅拌,加入无水吡啶,待三颈瓶中的无水吡啶充分冷却后滴缓慢加入用咪唑-4-S,S-二硫羧酸(Imidazole-4-dithiocarboxylic acid, 简称为IDBA, CAS编号84824-76-0, 货号A31986, 品牌OKA), 此过程在15~40min内完成, 可以看到有白色固体出现。待反应结束后, 结束冰水浴, 回到室温即得到了酯化试剂。调整无水吡啶及IDBA的量, 就可以制得不同比例的酯化试剂。

##### [0032] (2) 酯化反应

[0033] 称取100mg的罗望子木葡聚糖(BOC Sciences, Xyloglucan, CAS:37294-28-3, 目录号37294-28-3, 纯度98%), 溶于15mL无水甲酰胺中, 充分搅拌混匀后, 将其加入到已经制备好的酯化试剂中, 此反应装置置于恒温水浴中搅拌反应。反应完成后, 冷却, 用4mol/L的NaOH调节pH至7, 蒸馏水透析96h, 浓缩、冷冻干燥得酯化罗望子木葡聚糖。

##### [0034] (3) 不同反应条件对罗望子木葡聚糖酯化反应的影响

[0035] 固定酯化反应的温度为60℃, 酯化反应的反应时间为2h, 调节酯化试剂中V(IDBA):V吡啶(Pyridine)的体积比例为1:1、1:2、1:4、1:6、1:8, 制得酯化罗望子木葡聚糖, 测定不同酯化试剂比例下得到的酯化罗望子木葡聚糖的取代度。

[0036] 固定酯化试剂中V(IDBA):V吡啶(Pyridine)的体积比为1:2, 酯化反应的反应时间为2h, 酯化反应的反应温度分别为:20℃, 40℃, 60℃, 80℃, 100℃, 制得酯化罗望子木葡聚糖, 测定不同温度下得到的酯化罗望子木葡聚糖的取代度。

[0037] 固定酯化试剂中V(IDBA):V吡啶(Pyridine)的体积比为1:2, 酯化反应的温度为60℃, 酯化反应的反应时间分别为:1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 制得酯化罗望子木葡聚糖, 测定不同反应时间得到的酯化罗望子木葡聚糖的取代度。

[0038] 采用HPLC法检测酯化罗望子木葡聚糖中的咪唑基含量, 根据咪唑基的含量计算得到罗望子木葡聚糖的酯化度。

[0039] TCI Kaseisorb LC ODS 2000色谱柱(4.6mm×150mm, 5μm); 流动相为体积比为28:74的乙腈和缓冲盐溶液的混合液, 其中, 缓冲盐溶液为含10mM的磷酸氢二钾和15mmol的四丁基溴化铵水溶液, 用磷酸调节pH至7.4。紫外检测器, 检测波长为259nm; 流速为1.0mL/

min;进样量为20 $\mu$ L。

[0040] 对照品溶液:精密称取二硫代咪唑甲酸对照品0.1mg用体积比为1:3的稀释剂配制对照品溶液,并稀释成0.1mg/mL、0.05mg/mL、0.01mg/mL、5 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL和1 $\mu$ g/mL。供试品溶液:精密称取上述的罗望子木葡聚糖和制得的酯化罗望子木葡聚糖,分别配制成10 $\mu$ g/mL的供试品溶液。

[0041] 取对照品溶液与供试品溶液各20 $\mu$ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图如图1所示可知,HPLC图能够清晰地区分酯化罗望子木葡聚糖(C)和罗望子木葡聚糖(B)。以对照品溶液浓度和峰面积大小制作标准曲线,根据标准曲线和标准方程计算供试品中酯化罗望子木葡聚糖的咪唑基的摩尔含量,根据计算得到的咪唑基的摩尔含量计算酯化罗望子木葡聚糖占整个酯化反应得到的产品中的质粒百分含量,以此作为经过上述酯化反应得到的酯化罗望子木葡聚糖中酯化度。

[0042] 表1

[0043]	实施方式	酯化试剂体 积比	水浴温度 ( $^{\circ}$ C)	反应时间(h)	酯化度%
	实施例 1	1:1	60	3h	74.8 $\pm$ 3.5b
	实施例 2	1:2	60	3h	91.2 $\pm$ 4.2a
	实施例 3	1:8	60	3h	23.4 $\pm$ 1.8d
	实施例 4	1:2	20	3h	47.6 $\pm$ 3.4c
	实施例 5	1:2	100	3h	39.2 $\pm$ 5.1d
	实施例 6	1:2	60	1h	29.5 $\pm$ 2.7d
	实施例 7	1:2	60	5h	58.6 $\pm$ 4.2c

[0044] 表1示出了实施例1~7提供的酯化罗望子木葡聚糖的酯化度,并对酯化度数据进行多重比较和显著性差异标记。由表1可知,在其它条件一定的情况下,随着酯化试剂中咪唑-4-S,S-二硫羧酸与吡啶比例、酯化反应的水浴温度、酯化反应的时间的变化,其均表现出对该酯化反应所制得的酯化罗望子木葡聚糖的酯化度产生影响。结果当酯化试剂中咪唑-4-S,S-二硫羧酸与吡啶比例为1:2,水浴温度为60 $^{\circ}$ C,反应时间为3h时,得到的酯化罗望子木葡聚糖的酯化度最高。

#### [0045] (4) 红外光谱分析

[0046] KBr压片,Nicolet 5700傅立叶变换红外光谱仪采集酯化罗望子木葡聚糖在500~4000 $\text{cm}^{-1}$ 区的光谱信号。结果如图2所示,罗望子木葡聚糖在3440 $\text{cm}^{-1}$ 、2930 $\text{cm}^{-1}$ 、1640 $\text{cm}^{-1}$ 、1541 $\text{cm}^{-1}$ 、1049 $\text{cm}^{-1}$ 处分别有吸收峰,分别代表-OH的伸缩振动、CH的伸缩振动、O-H的弯曲振动、N-H弯曲振动、CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>伸缩振动的吸收峰。经过本发明上述酯化反应得到的酯化罗望子木葡聚糖红外图谱显示,其不仅在上述位置具有红外吸收峰,还在3160 $\text{cm}^{-1}$ 出现了巨大的由于咪唑环上的C-H伸缩振动吸收峰,以及1560 $\text{cm}^{-1}$ 处出现的由于咪唑环振动吸收峰,以及

1000~500 $\text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰与咪唑-4-S,S-二硫羧酸 $\text{S}=\text{C}$ 吸收峰有关。由此说明,罗望子木葡聚糖酯化成功。

## [0047] 2、酶解改性

### [0048] (1) 酶解改性

[0049] 取0.1g上述实施例1~7分别制得的酯化罗望子木葡聚糖溶解在100mL去离子水中,3000g离心处理10min后,去除不溶物。向上清液中逐滴加入无水乙醇至乙醇浓度为80% (v/v),离心后的沉淀用无水丙酮和无水乙醚分别洗涤,各重复三次,最后的沉淀经冷冻干燥,得到纯度较高的酯化罗望子木葡聚糖;然后用0.1M醋酸钠缓冲液配制成浓度为2% (w/v)的pH=5母液,向母液中加入60mg $\beta$ -半乳糖苷酶( $\geq 8.0\text{U/mg}$ , EC 3.2.1.23源自米曲霉, Sigma Aldrich)于50℃下反应20h得到不同半乳糖去除率的酯化罗望子木葡聚糖,即为酶解酯化罗望子木葡聚糖。反应结束后加热至100℃将酶灭活,20min后终止反应,然后用透析袋透析混合溶液72h除去小分子酶和单糖。透析袋中的酯化罗望子木葡聚糖分别用无水乙醇、无水丙酮和无水乙醚沉淀脱水三次后冷冻干燥得绝干的酯化罗望子木葡聚糖用于后续研究。其中,采用单糖组成分析酶解反应后得到绝干的酯化罗望子木葡聚糖中半乳糖含量。

### [0050] (2) 单糖组成分析

[0051] 根据改进的美国再生能源实验室(NREL)方法(Sluite et al., 2008),通过硫酸两步水解后,测定酯化罗望子木葡聚糖分级的单糖组成,方法如下:向盛有0.3g酶解反应后得到绝干的酯化罗望子木葡聚糖的耐压瓶中加入3mL质量分数为72%的硫酸在30℃下水解1h,然后加入84mL过0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜的水,在121℃下水解1h。水解过后用碳酸钙中和样品。采用安捷伦1260型高效液相色谱测定单糖,色谱柱选用HPX-87P(300mm $\times$ 7.8mm,流动相为双蒸水,柱温箱75℃,流速0.6mL/min,雾化器温度50℃,蒸发光散射检测器蒸发温度80℃。

### [0052] (3) 分子量检测

[0053] 用多角度激光光散射-示差检测器联用仪(MALLS-VS-RI)测定上述酶解的酯化罗望子木葡聚糖的分子量。检测器是DAWN-HELEOS-II( $\lambda=663.9\text{nm}$ ,和一个RID-10A折光仪从(Shimadzu, Tokyo, Japan)。将多糖样品(0.2mg/mL)和普鲁兰多糖分子量标准品(5mg/mL溶在含0.02%  $\text{NaN}_3$ 的100mM  $\text{NaNO}_3$ 溶液中搅拌24小时。将标准品和样品分别注入检测系统。数据通过Wyatt Technology公司的Astra软件(6.1.2.84版)处理,设定 $do/dc$ 为0.152mL/g。

### [0054] (4) 水溶解性

[0055] 于4℃样品溶解在去离子水中制备浓度为1% (w/v)的溶液,30℃下磁力搅拌1h,转速3000 $\times$ g条件下离心20min,105℃烘干上清液至恒重。溶解度百分比计算为可溶性物质与初始干燥多糖的重量比,测定重复三次取平均值。

### [0056] (5) 流变性能

[0057] 于4℃制备2% (w/v)的样品溶液,以10000rpm/min均质15min,用LDV-III Ultra-Rheometer(Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA, USA)在25℃下表征溶液的流变学行为,剪切速率范围0~85rad/s。

### [0058] (6) 结果

### [0059] 表2

[0060]

实施方式	半乳糖摩尔 百分数%	分子量
实施例 1	41.4±2.3c	19200±500c

[0061]

实施例 2	37.8±1.8c	17500±700c
实施例 3	68.2±3.6b	95700±1200b
实施例 4	60.7±3.3b	82400±1400b
实施例 5	63.2±3.0b	83420±1100b
实施例 6	69.4±2.9b	107800±1500a
实施例 7	62.7±2.8b	78870±900b

[0062] 表2示出了实施例1~7分别制得的经过酶解改性的酶解酯化罗望子木葡聚糖的半乳糖摩尔百分数和分子量,并对每列数据进行多重比较和显著性差异标记。将实施例1~7分别制得的酯化罗望子木葡聚糖经过酶解,得到酶解酯化罗望子木葡聚糖分子量显著降低,但是实施例1和2提供的酶解酯化罗望子木葡聚糖的分子量最低,并且半乳糖含量也最低。

[0063] 表3

[0064]

实施方式	稠 度 系 数 (mPa·s <sup>n</sup> )	溶解度%
实施例 1	465.2±63.4c	58.2±4.2b
实施例 2	427.0±57.9c	54.8±3.9b
实施例 3	2425.3±185.6ab	82.3±4.1a
实施例 4	2069.7±239.5b	79.6±3.7a
实施例 5	1978.6±167.3b	77.8±3.5a
实施例 6	2635.0±182.4a	84.3±4.3a
实施例 7	1748.2±219.1b	80.2±5.6a

[0065] 表3示出了实施例1~7分别制得的酶解酯化罗望子木葡聚糖的稠度系数和溶解度,并对每列数据进行多重比较和显著性差异标记。由表3可知,实施例1和2制得的酶解酯化罗望子木葡聚糖的稠度系数和溶解度要显著低于其他实施例。结合表1和表2可知,由于



实施例1和2的木葡聚糖酯化度显著高于其他实施例,而且酶解后的半乳糖残基含量也显著低于其他实施例,使得其稠度系数和溶解度也显著低于其他实施例。

[0066] 重组III型复合水凝胶的制备

[0067] 本发明利用上述实施例制得的酶解酯化罗望子木葡聚糖作为介质,在其自组装过程中包裹重组III型胶原,制备得到一种重组III型复合水凝胶。

[0068] 在本发明实施例中,该重组III胶原水凝胶以百分比计,包含1~10% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.0001~2.5% (w/v) 重组III型胶原、0.05~5% (w/v) PEG400、10~35% (v/v) 的乙醇,余量为水。

[0069] 在一些实施例中,该重组III胶原水凝胶以百分比计,包含2% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、0.2% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水。在一些实施例中,该重组III胶原水凝胶以百分比计,包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水。

[0070] 1、供试品

[0071] 本实验中,该重组III胶原水凝胶以百分比计,包含4% (w/v) 酶解酯化罗望子木葡聚糖、1.5% (w/v) 重组III型胶原、5% (w/v) PEG400、35% (v/v) 的乙醇,余量为水。按照此配方量制备该重组III胶原水凝胶溶液,其中的酶解酯化罗望子木葡聚糖为上述实施例1~7提供,对应的重组III胶原水凝胶以作为实施例1~7提供。另外还以罗望子木葡聚糖作为原料制备得到的重组III胶原水凝胶作为对比例1提供。以实施例1~7提供的酯化罗望子木葡聚糖分别作为原料制得对比例2~8分别提供的重组III胶原水凝胶。对此实施例1~7和对比例1~8分别提供的重组III胶原水凝胶的性能进行分析,包括进行水溶解性和流变性能分析,胶凝温度、细胞相容性、pH响应性、重组III胶原的释放性能以及常见皮肤病菌的抑制作用分析,其中水溶解性和流变性能分析方法如上所示,其结果如表4所示,并对每列数据进行多重比较和显著性差异标记。

[0072] 如表3和4可知,在包裹重组III胶原后,该实施例1~7提供的水凝胶的溶解度和稠度系数相对于酶解酯化罗望子木葡聚糖形成的凝胶无明显变化,说明包裹重组III胶原对水凝胶的流变性能无明显影响。而对比例2~8分别提供的水凝胶,由于其没有进行酶解,其溶解度和稠度系数明显受到显著影响。

[0073] 表4

[0074]	实施方式	溶解度%	稠度系数(mPa·s <sup>n</sup> )	胶凝温度℃
	实施例 1	56.3±1.2d	486.4±37.2c	38.3±0.4d
	实施例 2	52.8±1.6d	453.5±31.8c	36.8±0.5d
	实施例 3	79.5±0.9b	2952.4±189.5ab	67.5±1.3b
	实施例 4	74.3±1.5c	2319.5±195.7b	64.4±1.1b
	实施例 5	73.5±1.7c	2235.0±214.6b	61.6±0.9c
	实施例 6	82.3±2.1b	2972.2±203.2ab	63.5±0.9bc
	实施例 7	80.2±1.9b	2045.8±196.5b	60.6±1.2c
	对比例 1	96.8±4.6a	3182.2±234.2a	83.7±2.3a
	对比例 2	79.4±2.8b	1768.5±189.7b	72.4±1.6b
	对比例 3	81.5±3.5b	1826.7±175.3b	70.9±1.4b
	对比例 4	82.3±1.6b	3254.6±216.3a	69.5±1.7b
	对比例 5	80.6±1.7b	3165.4±241.3a	73.7±1.9b
	对比例 6	89.2±1.9a	3375.8±235.6a	70.1±2.1b
[0075]	对比例 7	91.5±2.2a	3409.5±227.9a	67.9±1.6b
	对比例 8	93.4±2.4a	3257.4±206.8a	69.5±1.3b

## [0076] 2、胶凝温度

[0077] 分别将实施例1~7和对比例1~8分别提供的水凝胶溶液置于2mL至玻璃试管(10mm×75mm)中,然后将试管置于10℃恒温水浴中,其试管内液面低于水面2cm,平衡10min。水浴温度采用精度0.1℃的精密温度计测定,缓慢升温,升温速率为每分钟0.5℃。每升高0.1℃,取出试管迅速倾斜45°观察内容物流动情况。当试管内液体不流动时的温度为胶凝温度。结果如表4所示,实施例1和2的凝胶温度均显著低于其他实施例,并与人体体温接近;而其他实施例和对比例分别提供的水凝胶的胶凝温度均较高。

## [0078] 3、细胞相容性测试

[0079] 取5.0g水凝胶于烧杯中,按0.2g/mL的比例加入DMEM培养基,室温浸泡24h,得到水凝胶浸提液,灭菌后备用。参照“HUANG W C,YING R,WANG W,et al.A macroporous hydrogel dressing with enhanced antibacterial and anti-inflammatory capabilities for accelerated wound healing[J].Advanced Functional Materials, 2020,30 (21):2000644.DOI:10.1002/adfm.202000644.”水凝胶的体外细胞毒性测定使用

MTT法。将L929细胞(货号AW-CNM125, ATCC)复苏后传代2~3代,接种于96孔板上,调节至初始密度 $10^5$ /mL,在含10% FBS的DMEM培养基中37℃培养。

[0080] 如图3所示,孵育后的L929细胞形态,与DMEM培养基组相比,可以观察到水凝胶浸提液(实施例1提供)处理后,细胞形态未发生明显变化,说明水凝胶无细胞毒性,且水凝胶浸提液共孵育的细胞活性均保持在95%以上。结果表明,该水凝胶具有良好的生物相容性,细胞毒性可忽略不计。

#### [0081] 4、水凝胶响应性体外释放性能测试

[0082] 一般而言,若经常在皮肤上使用碱性比较强的洗护剂洗护皮肤,就会导致皮肤弱酸性被破坏,pH值偏碱性,容易出现皮肤干燥、起皮、发红、过敏等各种现象;若皮肤的酸性过强,则会导致皮肤上的油脂过多,容易发生脂溢性皮炎、痤疮等皮肤疾病“皮肤酸性pH值与化妆品研发[J]日用化学品科学,姜姗姗;李燕;韩婷婷;杨素珍;刘三岭;袁春颖,2022”。

[0083] 使用0.10mol/L盐酸和0.10mol/L氢氧化钠配制pH值分别为2.0、5.0和7.8的PBS溶液。将上述实施例1~7和对比例1~8分别制得的水凝胶添加至10mL不同pH值的PBS溶液中,并置于37℃的水浴环境中。分别在1h、2h、4h、16h、48h、72h、288h和560h后取出200μL溶液,使用紫外分光光度法计检测其中的重组III型胶原含量,根据释放溶液中重组III型胶原含量计算其占原始重组III型胶原水凝胶中含量的重量百分比含量,以作为重组III型胶原的释放率。重组III型胶原含量的检测采用III型胶原检测试剂盒检测(产品型号96T/48T, KALANG, 上海康朗生物科技有限公司)。

[0084] 结果如图4所示,实施例1~2分别提供的水凝胶能够持续560h不断释放重组III型胶原,而实施例3~7分别提供的水凝胶在前48h能够不断释放重组III型胶原,但是其释放量达到80%及以上,后续释放量不足,表明其持续释放时间不足。如图5所示,对比例1~8提供的水凝胶在pH=2和pH=5的环境下,在2h内其重组III型胶原的释放量即达到90%以上,释放速度较快,而在pH=7.8的环境中其释放量在1.5h内释放量即超过90%。

[0085] 由此说明,本申请实施例1~2提供的水凝胶能够释放不断的释放重组III型胶原,持续释放时间长达500h,这对于皮肤修复和胶原再生具有十分重要的意义。而且,实施例1~2提供的水凝胶中,采用经过酯化反应改性得到的酯化度超过75%及以上的木葡聚糖,再经过酶解得到半乳糖含量不超过41.5%的酶解酯化罗望子木葡聚糖作为成胶载体,制备得到的重组III型胶原水凝胶,具有十分适合于人体问题的成胶温度、释放速率和缓释效果。

#### [0086] 动物试验

##### [0087] 1、试验动物

[0088] SPF级雄性9周龄C57BL/6J小鼠20只,体质量20~26g,购自斯贝福生物技术有限公司。

##### [0089] 2、建立皮肤创伤模型小鼠

[0090] 将小鼠在24℃恒温下单笼饲养。术前准备、麻醉、脱毛后,使用无菌的6mm活检打孔器在小鼠背部中线两侧腰部水平刻两个直径6mm的圆形轮廓,齿镊提起轮廓中间的皮肤,眼科剪剪开全层皮肤并切除圆形部分组织,中线另一侧的对称位置重复此操作。因小鼠皮下存在一层可以收缩创面的肉膜肌,故需用固定板来防止创面收缩。固定板制备:用12mm活检打孔器在1mm厚的硅胶板上取下直径12mm的圆,并用8mm活检打孔器在12mm圆形硅胶板的中央打孔,形成一个圆环,消毒后作为创面固定板。将固定板圆心对准创面圆心,并用缝线间

断缝合的方法将固定板缝合在所有创面外周。

### [0091] 3、分组实验

[0092] 取无创始正常小鼠作为正常组,取皮肤创伤型小鼠作为模型组,并另取皮肤创伤型小鼠分为试验组和对照组。其中,试验组小鼠由分为两个小组,分别给药实施例1和2提供的水凝胶给药,小鼠单笼饲养,所有创面均每3d给予1次常规消毒处理并更换固定板。每次消毒后,空白对照组创面直接覆盖透气透明膜,其余各组创面均给予相应的水凝胶200mg,均匀涂布后覆盖透气透明膜。在21d时分别对各组半数小鼠创面组织取样。对照组分为3个小组,分别给药对比例1~3提供的水凝胶给药,其他同试验组。

### [0093] 4、创面观察和愈合率计算

[0094] 持续观察组创面出血和愈合情况,在给药后21d时分别对创面进行拍照,使用AutoCAD 2020图像分析软件(美国Auto desk公司)测量未愈合创面面积并计算创面愈合率。创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积 $\times$ 100%。

[0095] 建模后15d,试验组创面基本愈合,对照组和模型组仍可见残余创面,且模型组具有炎症感染现象。建模后21d时,模型组创面可见结痂,有少许分泌物,并见明显感染现象;试验组小鼠创面基本愈合(实施例1~2的创面愈合率为99.2%和99.5%),无残余创面,无炎症感染现象;而对照小鼠仍然存在残余创面(对比例1~3的创面愈合率依次为42.7%、66.6%和65.9%),且无炎症感染现象。由此说明本发明提供的水凝胶有抑制炎症感染的作用,并且快速促进创面愈合而无结痂,减少疤痕的作用。

### [0096] 5、创面组织病理学分析

[0097] 给药后21d,各组各随机抽取5只小鼠,置入二氧化碳箱进行安乐死,对双侧创面进行取样。两次取样范围一致:以创面圆心为中心,1cm $\times$ 1cm正方形皮肤全层。即分2个时间节点在4组共取40个创面标本。延中轴将各标本切开,取各标本的50%组织固定于体积分数为10%的甲醛中;另外50%组织切去建模前未损伤的外周部分,将重建的创面放入冻存管做好标记,立即放置于-80℃液氮中。

[0098] 观察各组小鼠给药21d后,采用脱颈法分别处死10只小鼠,取左右两侧创面组织,各放入预先标记的组织收集瓶中,迅速加入新鲜配制的4%多聚甲醛溶液固定,按常规石蜡切片方法进行脱水透明、浸蜡、石蜡包埋、切片(厚度为5gym)。将组织切片在65℃烘箱内烤片2h、脱蜡至水,行常规HE染色,观察创面愈合及毛囊生长情况。

[0099] HE染色结果如图6所示,造模后试验组和对照组创面新生表皮细胞均覆盖创面,新生表皮层厚度、上皮细胞大小形态和排列无明显区别。试验组(A和B)创面表皮层细胞向下长出毛囊上皮芽基细胞,毛囊上皮芽基细胞底部长出新生的毛乳头细胞,部分毛囊周围还可见皮脂腺;而对照组(C和D)创面表皮细胞向下长出毛囊上皮芽基细胞的情况较罕见,未见毛乳头样结构,且新生毛囊数量极少。试验组(实施例1~2的新生毛囊平均数量为15个和16个)与对照组(对比例1~2的新生毛囊平均数量为3个和3个)新生毛囊数量在用药21d后的均有统计学差异。这些结果表明,实施例1~2分别提供的重组III型胶原凝胶能够诱导全层皮肤缺损创面的毛囊再生。

[0100] 5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)免疫荧光染色,可直观反映新生的毛囊上皮细胞和角质细胞的密度,于100倍荧光显微镜下观察细胞增殖情况。BrdU免疫荧光结果如图7所示,给药21d,对照组的未愈合创面中心BrdU荧光密度较低,可见少许新

生上皮细胞,未见周围已愈合皮肤组织新生附属器的荧光分布,而试验组的未愈合创面中心BrdU荧光密度较空白对照稍高,周围已愈合皮肤组织可见少许新生附属器的荧光分布,实验组未愈合创面中心BrdU荧光密度较高,可见大量新生上皮细胞,周围已愈合皮肤组织可见大量新生附属器的荧光分布。

#### [0101] 6、羟脯氨酸分子检测

[0102] 取液氮中冻存各组小鼠在给药21d取样的创缘皮肤和创面组织,常规裂解、匀浆,按羟脯氨酸(hydroxyproline,HYP)测定试剂盒(南京建成科技有限公司)操作流程加入试剂混匀后,60℃水浴15min,冷却后3500r/min离心10min,取上清200μL加入酶标板中,波长550nm,测定吸光度值。羟脯氨酸含量(μg/mg,湿重)=(测定OD-空白OD)/(标准OD-空白OD)×标准品含量(5μg/mL)×水解液总体积(10mL)/组织湿重(mg)。

#### [0103] 表5

[0104]

试验分组		羟脯氨酸含量比较 (μg·mg <sup>-1</sup> , 湿重)
试验组	实施例 1	1.97±0.34a
	实施例 2	2.02±0.19a
对照组	对比例 1	1.67±0.35b
	对比例 2	1.72±0.23b
	对比例 3	1.69±0.44b
模型组		1.48±0.23c
正常组		2.06±0.58a

[0105] 表5各组小鼠给药后的皮肤组织羟脯氨酸含量,并对每列数据进行多重比较和显著性差异标记。结果如表5可知,建模后21d,模型组的羟脯氨酸含量较正常组有所降低,试验组提供的重组III型胶原凝胶能显著提供其皮肤组织中的羟脯氨酸含量,有可能与其能够加快恢复正常皮肤结构过程中新生的大量表皮层细胞和皮肤附属器替代胶原纤维有关。

[0106] 综上所述,本发明提供了一种温敏性的重组III型胶原水凝胶,其利用对罗望子木葡聚糖进行改性得到的酶解酯化罗望子木葡聚糖进行包裹,不仅具有皮肤修复功能,还对炎症皮肤具有治愈作用,并且预料不到的,这种特殊的空间构象对重组III型胶原的释放效果能够保持长期有效,具有作为医用皮肤修复凝胶、妇科修复凝胶等应用前景。

[0107] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

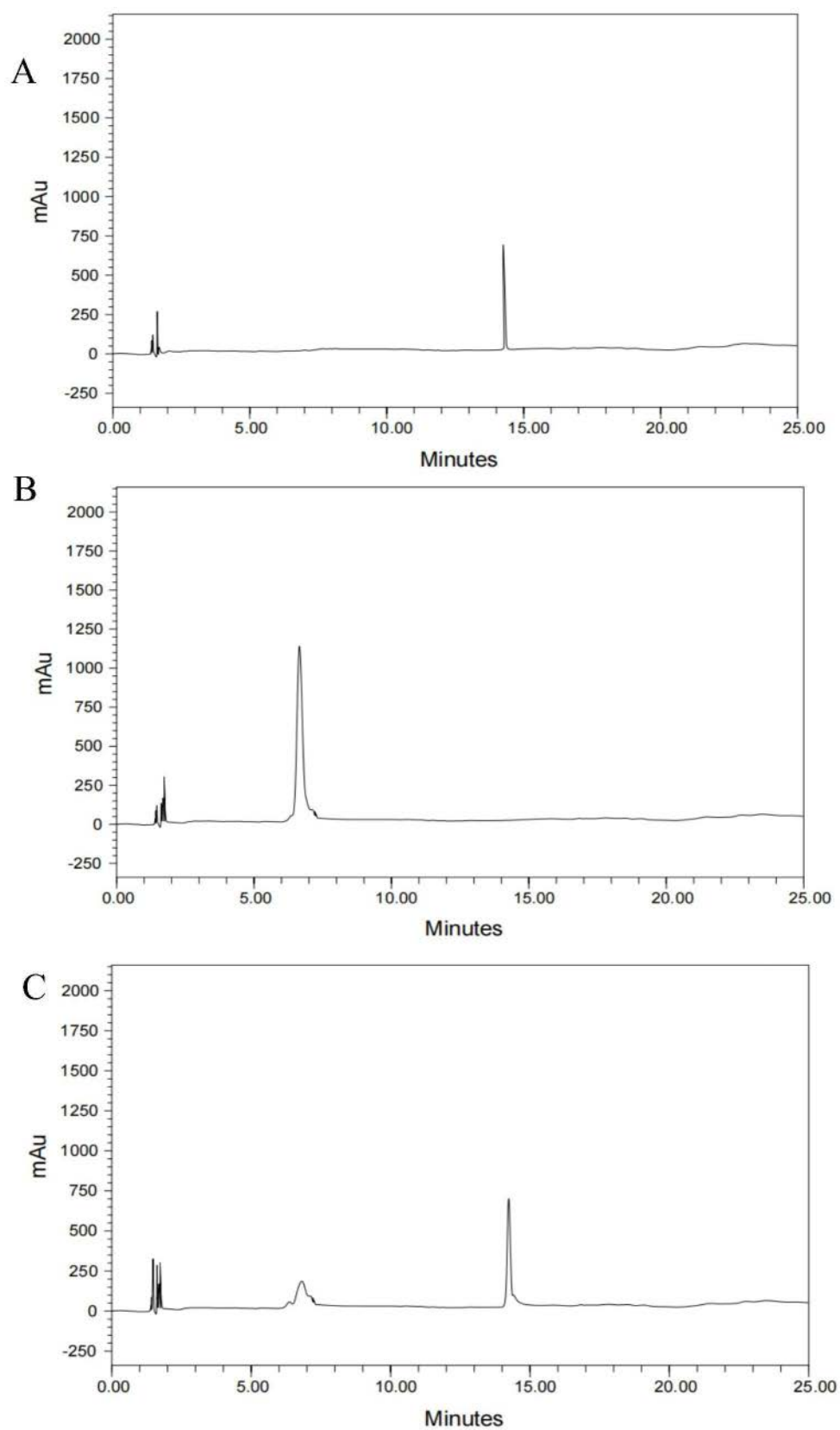


图1

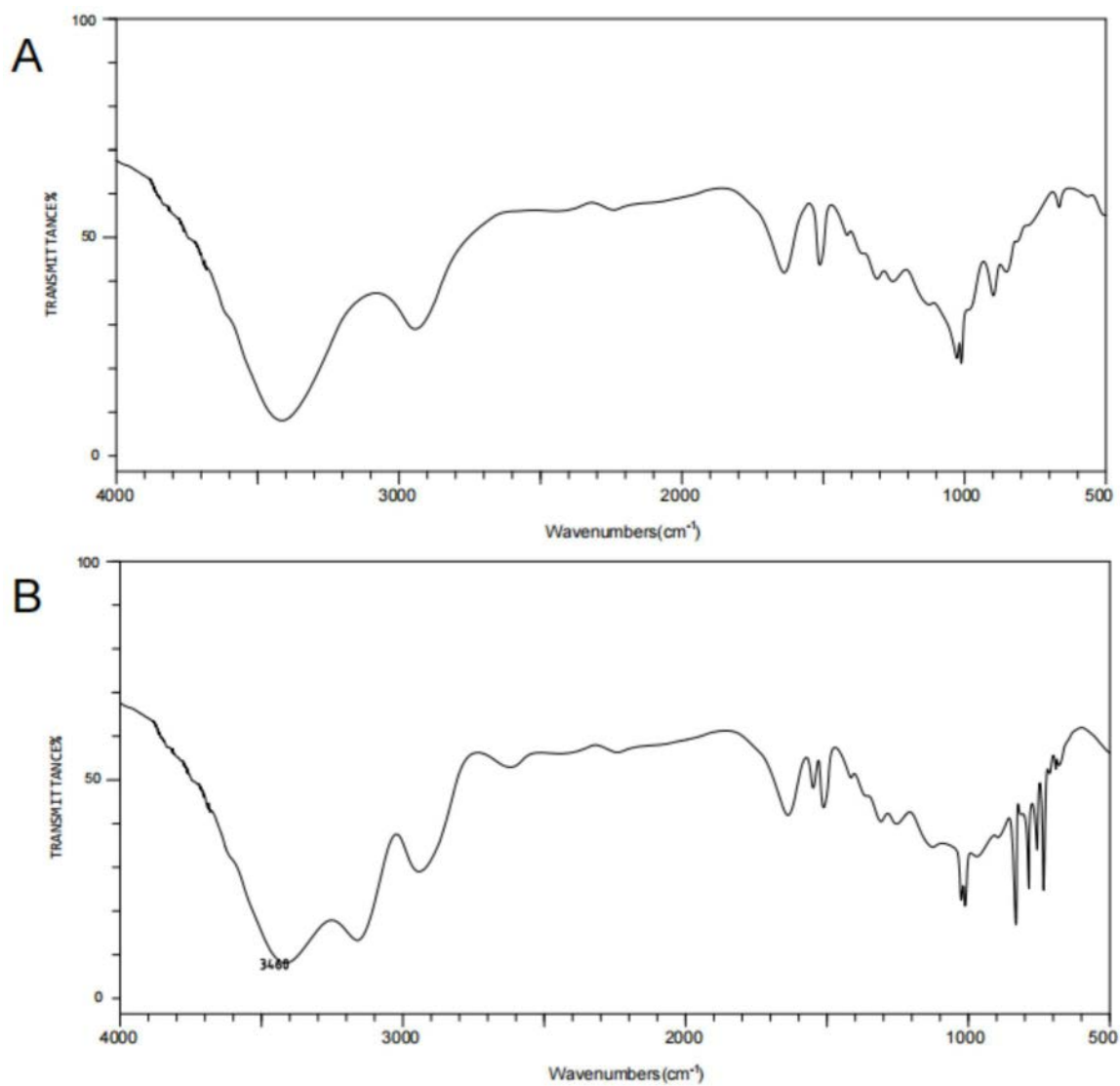


图2

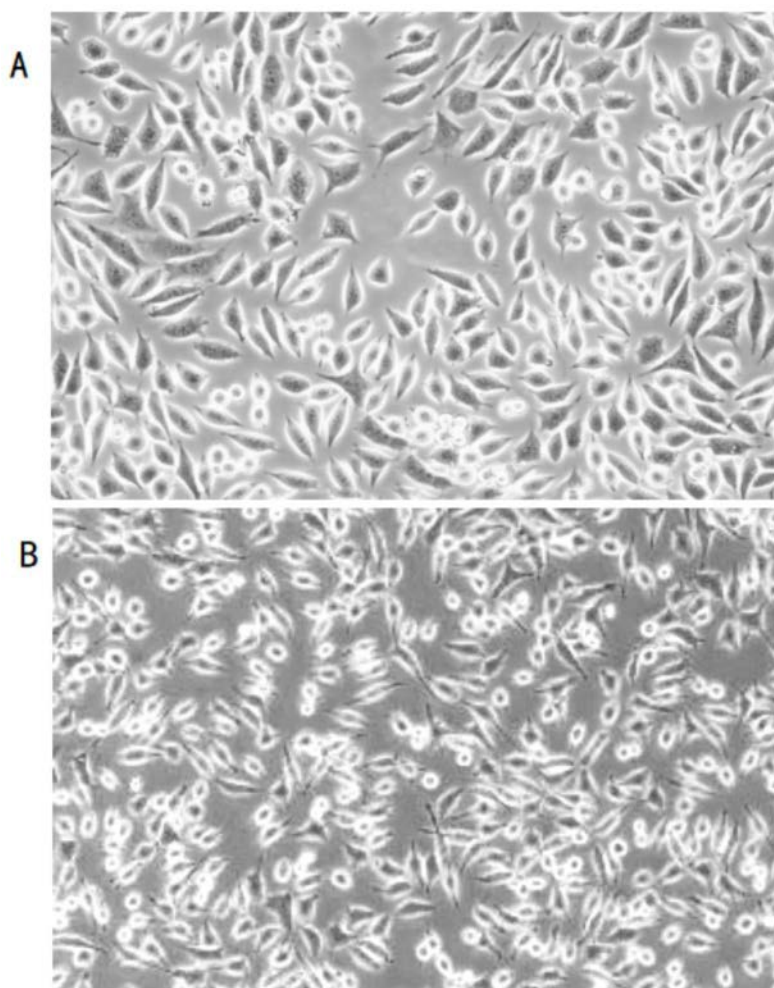


图3



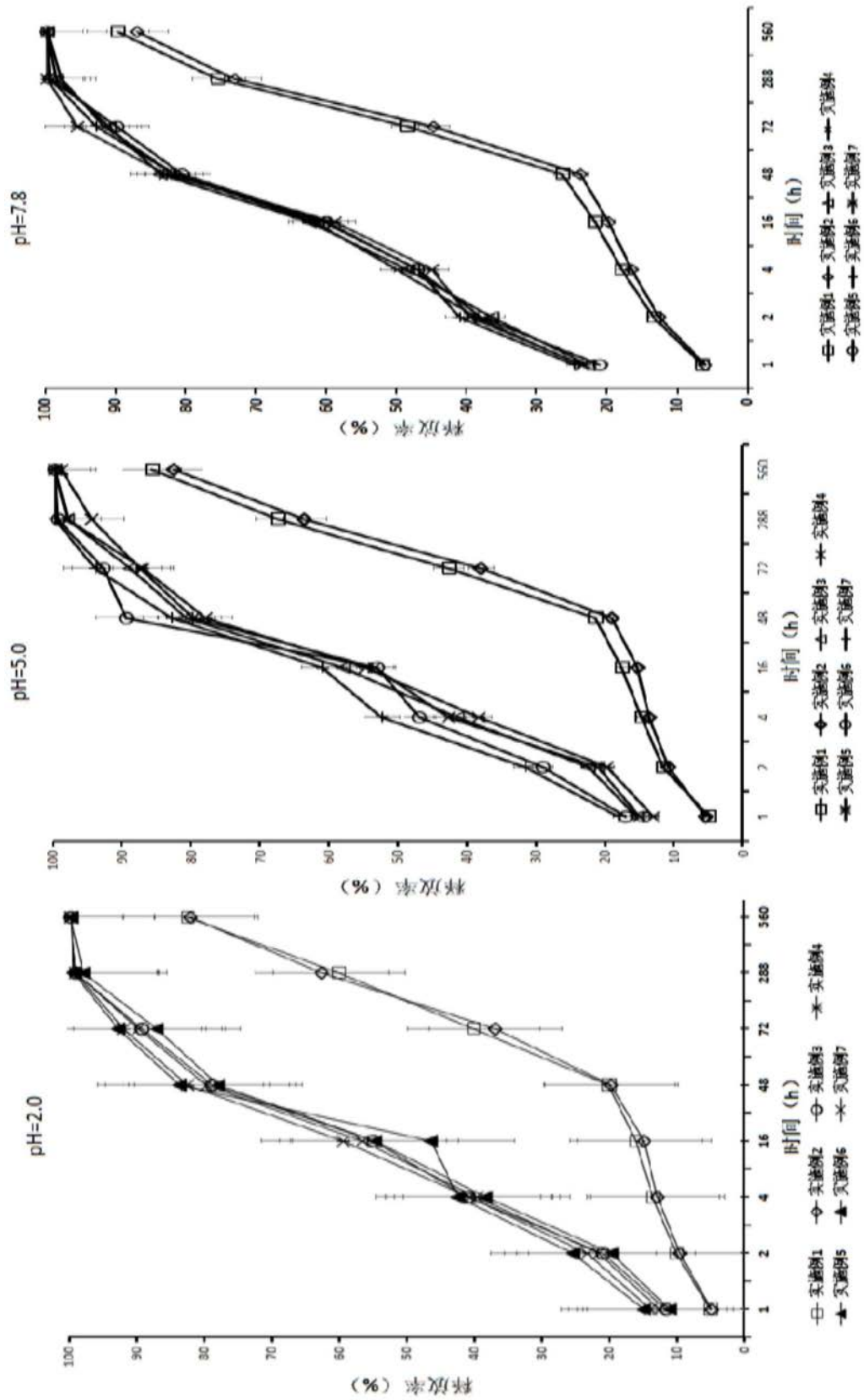


图4

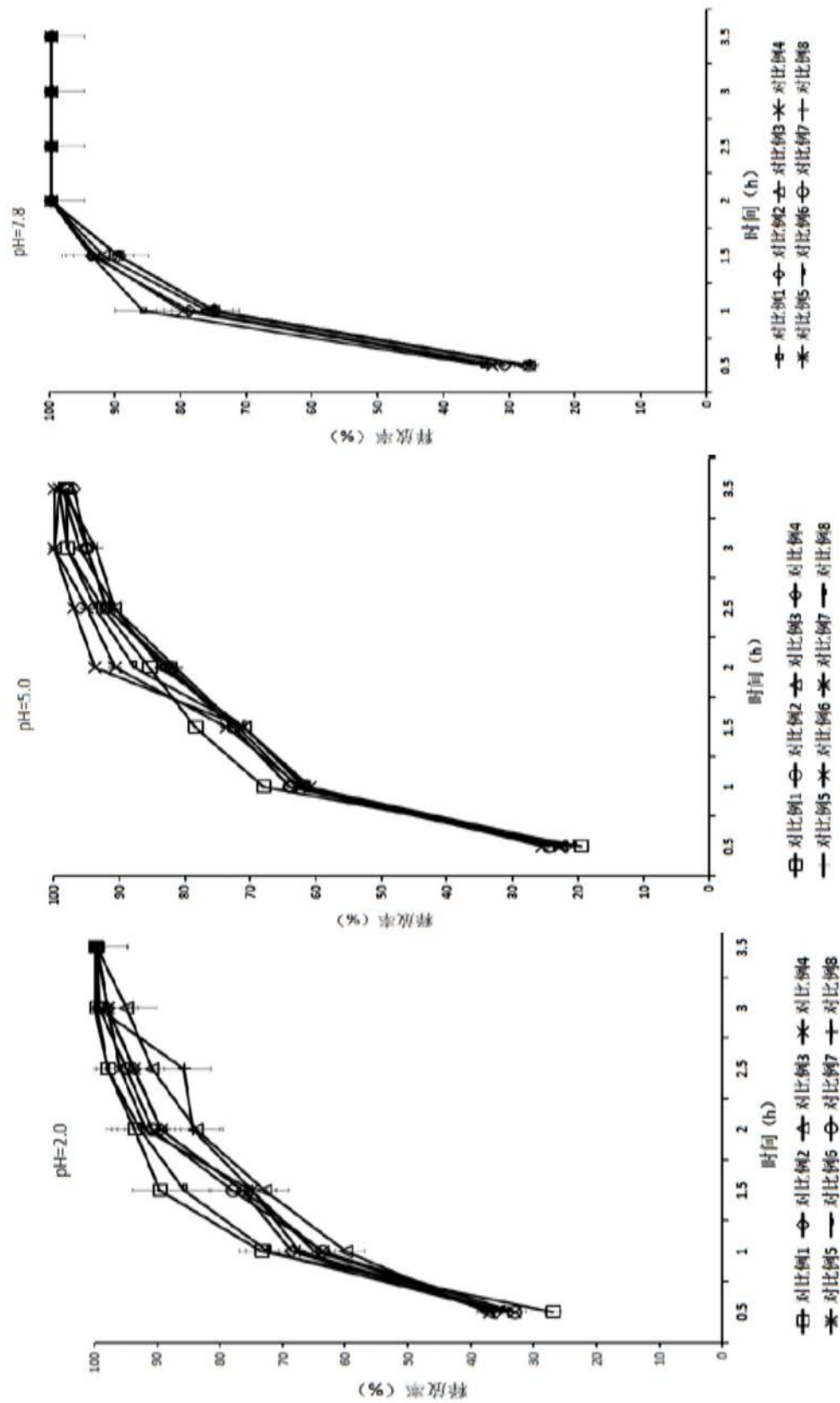


图5

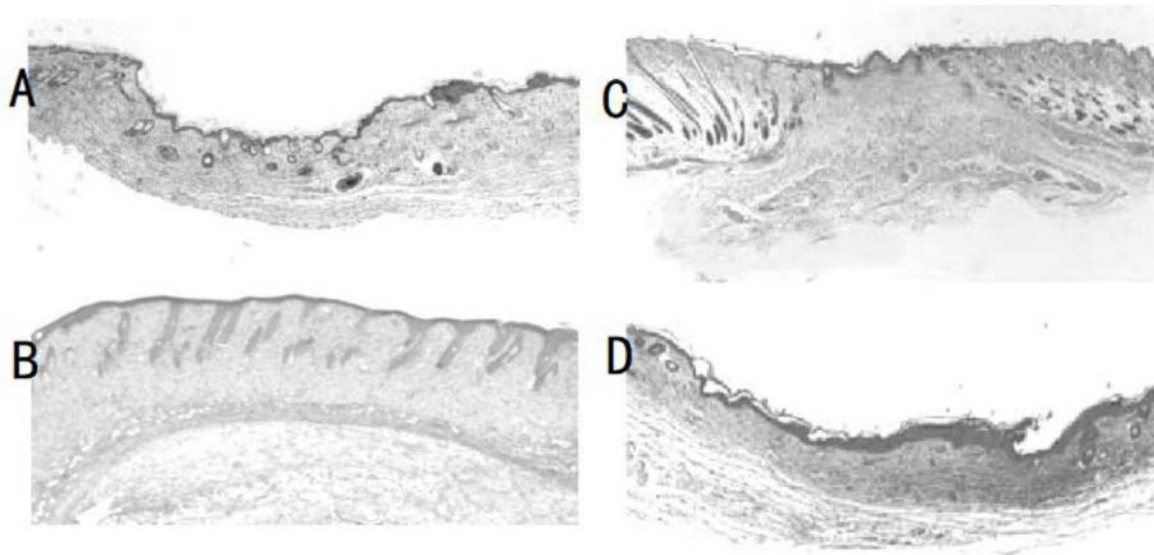


图6

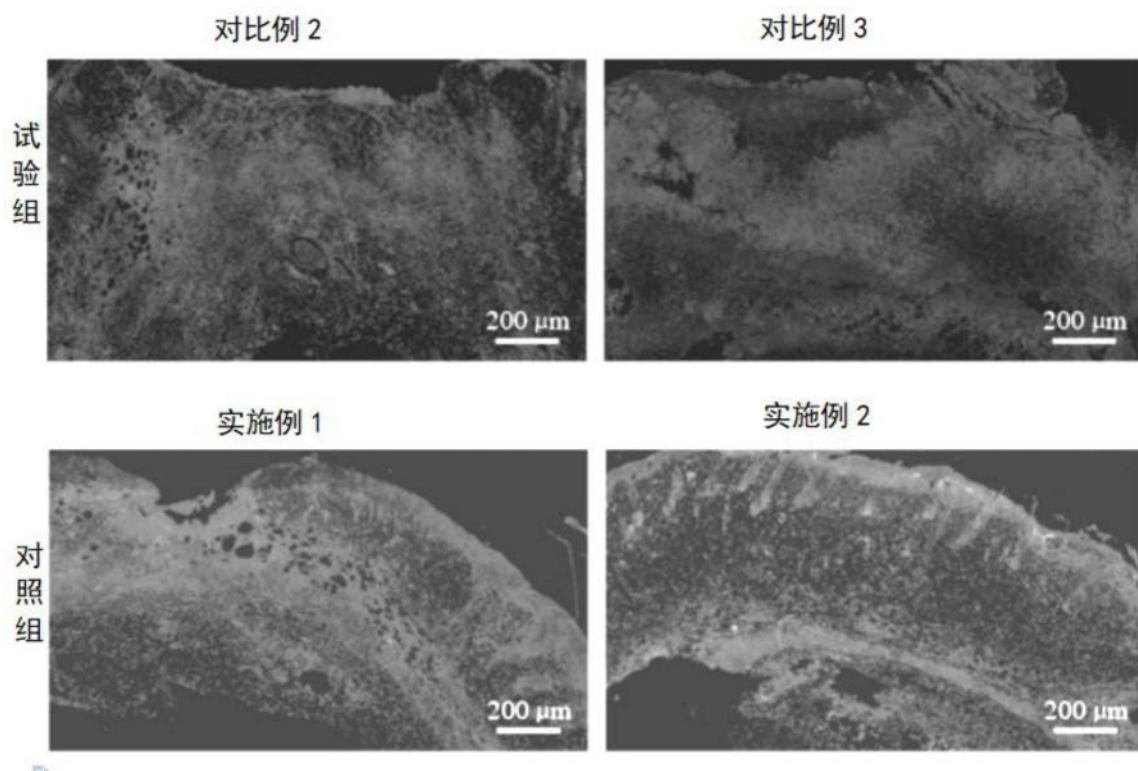


图7