

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03811115.2

[51] Int. Cl.

C07K 14/78 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347192C

[22] 申请日 2003.5.20 [21] 申请号 03811115.2

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 21 [33] AU [31] PS2427

[86] 国际申请 PCT/AU2003/000606 2003.5.20

[87] 国际公布 WO2003/097694 英 2003.11.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.16

[73] 专利权人 科尔泰克澳大利亚有限公司

地址 澳大利亚西澳大利亚

[72] 发明人 约翰·斯诺登

[56] 参考文献

DE20115753U1 2002.1.10

US2631942A 1953.3.17

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

胶原蛋白及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法。本发明特别涉及到一种以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法，其中包括将有机酸缓冲液施用于所述动物皮充分长的时间以提取胶原蛋白。

1. 一种以非人哺乳动物皮为原料制备胶原蛋白的方法，包括：
 - (a) 将 pH3-5 的有机酸缓冲液施用于所述动物皮并在 20-40℃ 温育 8-27 小时，使相连的毛发松动。
 - (b) 将所述的皮切成或绞成碎片皮；和
 - (c) 以所述碎片皮为原料提取胶原蛋白。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中动物皮取自一种动物，所述动物选自绵羊、牛、山羊、马、猪和有袋类动物。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中将有机酸缓冲液施用于动物皮的步骤包括将有机酸缓冲液施用于动物皮的肉面。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其中有机酸缓冲液的 pH 值在 3.2 到 4.5 之间。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中有机酸缓冲液包括一种或多种酸的水溶液或混悬液，所述有机酸选自醋酸、柠檬酸、丙酮酸、乳酸和甲酸。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其中有机酸缓冲液由 40% (w/w) 的冰醋酸水溶液组成。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其中有机酸缓冲液的 pH 值在 4.0 到 4.2 之间。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其中有机酸缓冲液以每张皮 50 到 100ml 的比例使用。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其中动物皮在步骤 (b) 之前脱毛。
10. 如权利要求 1 所述的方法，其中动物皮上残留的肉在步骤 (b) 之前通过机械或手工方法除去。
11. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 (c) 包括在非变性条件下将所述动物皮碎片与有机酸缓冲液混合成混悬液。
12. 如权利要求 11 所述的方法，其中有机酸选自醋酸、乳酸和甲酸。
13. 如权利要求 12 所述的方法，其中有机酸是浓度在 0.1M 和 0.05M 之间的醋酸。

14. 如权利要求 11 所述的方法, 其中动物皮碎片和有机酸缓冲液在温度 0 到 30℃ 之间搅拌温育。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中混悬液还包括一种或多种提取剂。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中提取剂包括一种或多种蛋白酶。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中胃蛋白酶选自 ESPERASE[®]、ALCALASE[®]、DURAZYM[®]和 SAVINASE[®]、MAXATASE[®]、MAXACAL[®]、PROPERASE[®]、MAXAPEM[®]和胃蛋白酶。

18. 如权利要求 16 所述的方法, 其中蛋白酶是胃蛋白酶。

19. 如权利要求 11 所述的方法, 还包括一个进行分离的步骤。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中分离步骤包括离心和/或过滤, 其中可溶性胶原蛋白和分散的胶原蛋白被分离。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中分离步骤包括离心且上清液含有溶解的胶原蛋白。

22. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中分离步骤包括过滤且滤液含有可溶性胶原蛋白。

23. 如权利要求 21 所述的方法, 其中用盐沉淀可溶性胶原蛋白。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 其中盐加入至最终浓度在 5 到 20 % w/v 之间。

25. 如权利要求 23 所述的方法, 其中盐加入至最终浓度为约 10 % w/v。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其中胶原蛋白被冷冻干燥。

27. 一种制备纯化天然胶原蛋白的方法, 包括下述步骤:

a) 预备一张非人动物皮;

b) 使 pH3-5 的有机酸缓冲液与动物皮在 20-40℃ 接触 8-27 小时, 基本除去皮中的糖胺聚糖, 制得生皮;

c) 将所述生皮绞碎, 使暴露于一种或多种蛋白酶, 制得包括可溶的和分散的胶原蛋白在内的样品;

d) 将所述样品离心从分散的胶原蛋白中分离可溶性胶原蛋白; 和

e) 用盐沉淀所述可溶性天然胶原蛋白制得纯化胶原蛋白。

28. 一种制备纯化生物相容胶原蛋白的方法，包括下述步骤：

- a) 预备一张非人动物皮；
- b) 使 pH3-5 的有机酸缓冲液与动物皮在 20-40℃接触 8-27 小时，基本除去皮中的糖胺聚糖，制得生皮；
- c) 将所述生皮绞碎，使暴露于一种或多种蛋白酶，制得包括可溶性胶原蛋白和分散的胶原蛋白在内的样品；
- d) 将所述样品离心从分散的胶原蛋白中分离可溶性胶原蛋白；和
- e) 用盐沉淀所述可溶性天然胶原蛋白制得生物相容的胶原蛋白。

29. 一种制备明胶的方法，包括使权利要求 1 的方法制备的胶原蛋白变性的步骤。

胶原蛋白及其制备方法

发明领域

本发明涉及一种以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法。本发明特别涉及到一种以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法，其中包括将有机酸缓冲液施用于所述动物皮以提取胶原蛋白。

背景技术

胶原蛋白是一种占哺乳动物蛋白质总量约 30% 的物质(参见 L. C. Junqueira and J. Carneiro, Basic History, 4th ed., Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. [1983], pp. 89-119). 胶原蛋白是结缔组织，如皮肤、腱束和骨的主要结构蛋白，具有独特的氨基酸组成和结构。重要地是，胶原蛋白螺旋结构的主要部分在各类哺乳动物中变化极小。

来自哺乳动物的胶原蛋白实际是同一类蛋白质，由几种不同类型的细胞生成。在该蛋白质家族中，不同类型的胶原蛋白通过它们的化学组成、不同的形态以及病理特征、在组织中的分布和它们的功能区分开来。

至少存在十二种在遗传学上类型明显不同的胶原蛋白。最常见的 I 型胶原蛋白由三条多肽链组成。两条链完全相同，称为 $\alpha 1$ ，第三条称为 $\alpha 2$ 。I 型胶原蛋白构成了软结缔组织(皮、腱)和硬结缔组织(骨和牙齿)胶原蛋白的主要部分。II 型胶原蛋白是软骨中的主要胶原蛋白，由三条 $\alpha 1$ 链组成。III 型胶原蛋白由三条 $\alpha 1$ 链组成，在血管、伤口和某些肿瘤里都有发现。

胶原蛋白的诸多性质使之成为极具吸引力的可用于多种医疗用途的材料，例如植入、移植、器官置换、组织修复、玻璃体置换、整形和美容外科、外科缝合、外科创伤、烧伤敷料，等(参见 U. S. Pat. Nos. 5,106,949, 5,104,660, 5,081,106, 5,383,930, 4,485,095, 4,485,097, 4,539,716, 4,546,500, 4,409,332, 4,604,346, 4,835,102, 4,837,379, 3,800,792, 3,491,760, 3,113,568, 3,471,598, 2,202,566 和 3,157,524, 这些提及的文献均作为参考; J. F. Prudden, Arch. Surg. 89: 1046-1059 [1964]; 和 E. E. Peacock 等. Ann. Surg., 161: 238-247 [1965])。例如，就其本身而言，

胶原蛋白之所以是相对弱的免疫原，至少部分是因为胶原蛋白的结构掩盖了潜在的抗原决定簇。并且具有螺旋结构的胶原蛋白可以抵抗蛋白水解作用。此外，它还是天然的细胞粘着材料和肌肉骨骼系统的主要的抗拉承重部分。因此，胶原蛋白产品已产生了广泛的影响，适用于医疗和兽医领域。

胶原蛋白可以多种方式制备，可按不同的方法从各种组织中制得。一种最易得的胶原蛋白是“天然”胶原蛋白，它具有多种特性，包括低抗原性和抗酶消化性。高度分散的天然胶原蛋白分散体在化妆品、食品和制药工业中具有广泛的现行或潜在的用途。

然而尽管优势明显，胶原蛋白来源的材料在商业上获得成功仅限于利用了胶原蛋白特性的几种专门产品。商用胶原蛋白来源材料和生物技术产品的短缺原因主要包括制备纯胶原蛋白的高成本、分离出的胶原蛋白的易变性以及处理和储存胶原蛋白的难度。

德国专利 201 15 753 公开了一种从猪皮提取胶原蛋白的方法。该方法涉及将猪皮匀浆...至 4-10mm 大小的颗粒，优选 6mm 的颗粒。该步骤优选在 45℃ 以下的温度进行，且优选在皮肤暴露于酸性缓冲液之前进行。该专利并没有公开“预浸泡(pre-maceration)”。

美国专利 2,631,942 公开了从胶原蛋白形成纤维的方法，其中的胶原蛋白已经从动物皮或血液中提取出来。也就是说，该专利仅仅告诉阅读者将现有技术提取胶原蛋白的方法作为一个前驱步骤。这一现有技术的方法根本没有公开“预浸泡”步骤。

本申请的申请人令人吃惊地发现了一种非常简单的技术，使用它能以动物皮为原料制得高收率的天然可溶性胶原蛋白和分散的不溶胶原蛋白，成本低廉且克服或至少缓解了以前遇到的问题。特别地，申请人发现用适当的有机酸缓冲液处理动物皮，酶溶性天然胶原蛋白的收率获得了提高。

发明概述

泛言之，本发明提供了一种以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法，其中包括将有机酸缓冲液施用于所述动物皮充分长的时间以提取胶原蛋白。

更深一层，本发明提供了胶原蛋白用以制备医疗和生物技术产品，用于普通外科、皮肤病科、口腔外科、整形和重建外科、神经外科、整形外科外科、眼科、血管外科、兽医以及其它相关领域。

优选天然可溶性胶原蛋白和高度分散的天然胶原蛋白。

本领域普通技术人员很容易理解本发明公开的方法可适用于从任何一种动物皮中提取胶原蛋白。然而本发明特别适用于从取自偶蹄目、兔形目、啮齿目、奇蹄目、食肉目和有袋目的哺乳动物皮中提取胶原蛋白。优选的动物皮取自一种动物，该动物选自绵羊、牛、山羊、马、猪和有袋动物组成的类群。更优选的动物皮是绵羊的皮。

有机酸缓冲液可包括本领域已知的任何适用的有机酸。作为优选，有机酸是选自醋酸、柠檬酸、丙酮酸、乳酸和甲酸中的一种或多种酸的水溶

液或混悬液。更优选的有机酸缓冲液由冰醋酸水溶液组成，pH 值在 3 到 5 之间。更加优选的有机酸缓冲液 pH 值在 3.2 到 4.5 之间。最优选的有机酸缓冲液的 pH 值在 4.0 到 4.2 之间。

一旦将有机酸缓冲液施用于动物皮后，应允许有充分长的时间进行温育 (incubate) 以使羊毛或毛发松动或除去。温育优选在温度 20 到 40℃ 之间、时间 8 到 27 个小时之间的条件下进行。接着动物皮被切成或绞成碎片。

作为优选，切好或绞碎的皮在非变性条件下同有机酸缓冲液混合成混悬液，在温度 0 到 30℃ 之间不停地搅拌，进行温育。作为优选，也可以在一种或多种蛋白酶存在的条件下进行温育。更为优选的蛋白酶选自 ESPERASE[®]、ALCALASE[®]、DURAZYM[®]和 SAVINASE[®]、MAXATASE[®]、MAXACAL[®]、PROPERASE[®]、MAXAPEM[®]和胃蛋白酶。最优选胃蛋白酶。

皮的碎片在有机酸缓冲液和蛋白酶混悬液中温育，之后混悬液经离心和/或过滤，可溶性和/或分散的胶原蛋白被移去。

胶原蛋白可干燥粉碎成粉。胶原蛋白交替经过干燥和粉碎后成粉，用有机酸再分散，所得分散体通过冷冻干燥法形成胶原蛋白底物或海绵，冷冻干燥法在 Silyer 等. U. S. Pat. No. 4, 703, 108 中有公开。

更可以想到纯化胶原蛋白还可包含一些添加的化合物，包括但不限于抗菌剂、抗病毒剂、生长因子、防脱水化合物、防腐剂或其它化合物，适合在生物医学和/或兽医上使用。

发明详述

在描述本方法前要说明，显然本发明不限于所述的具体材料和方法，因为这些都可以改变。很显然这里所用的术语也仅仅为了描述具体的实施方式，并非用于限定本发明的范围，本发明的范围只通过所附的权利要求来限定。需要指出的是，在这里以及在所附的权利要求中，所用的单数形式的指示代词，如“一种”和“这个” (“a,” “an,” and “the”) 都包括了其复数关系，除非上下文清楚地有了不同的表述。因此，比如，提到“一种有机酸”就是提到了一种和多种有机酸及其为本领域普通技术人员所知的等同物，等等。除非有不同规定，这里用到的所有技术和科学术语都具有相同的含义，一如本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的那

样。尽管任何与这里所描述的那些相似或等同的材料和方法都可用于实践或测试本发明，但现在只对优选的材料和方法进行描述。

所有这里提到的出版物均被引用，以说明并公开这些出版物中报道的方法、记录和试药，而这些方法、记录和试药可以和本发明联系在一起使用。在这里，没有任何东西可被解释为承认了本发明不具有早于由在先发明所公开的内容的资格。

本发明涉及到以动物皮为原料制备胶原蛋白的方法。本发明特别提供了适合在生物医学、兽医和其它领域使用的胶原蛋白的制备方法。

这里使用的术语“动物”指的是任何可以按所公开的方法从中提取出胶原蛋白的动物。例如，动物可选自偶蹄目、兔形目、啮齿目、奇蹄目、食肉目和有袋目的哺乳动物。

偶蹄目包括大约 150 个现存的物种，分布于 9 个科：猪(猪科)、野猪(Tayassuidae)、河马(河马科)、骆驼(驼科(Camelidae))、麋鹿(麋鹿科)、长颈鹿和霍加狓(长颈鹿科)、鹿(鹿科)、麋鹿(Antilocapridae)，和牛、绵羊、山羊、羚羊(牛科)。许多动物如山羊、绵羊、牛和猪具有非常相似的生物学特性和高度的基因同源性。更重要的是，众所周知某类动物如山羊、绵羊、马和驴可以异种交配。

奇蹄目是“奇数趾”或“奇数蹄”的哺乳动物，包括犀牛、貘和马。兔形目包括大鼠、小鼠、家兔、野兔和其它啮齿类动物，而有袋目包括大袋鼠和小袋鼠。

上述动物类群所有成员的皮都有两层，即真皮和表皮。表皮分为好几层，表示发育连续的几级。皮最老的部分是可消耗的外层，坚韧、起保护作用，由死细胞构成，在表面不断被磨损掉、不断地被里层的皮所替代。伴随细胞的生长和成熟，细胞的核逐渐消失，大部分细胞内容物转化成角蛋白，即一种不仅生成皮外保护层，还生成了甲、蹄、毛发和角等构造的蛋白。

真皮层在表皮之下，是一层厚结缔组织，与肌肉、神经和血管相连。结缔组织含丰富的胶原蛋白。

这里所使用的术语“胶原蛋白”指的是细胞外家族的纤维蛋白，其特征是牢固的三股螺旋结构。三条胶原蛋白多肽链(“ α -链”)相互缠绕形成螺旋结构。该术语也包含各种不同类型的胶原蛋白，尽管优选的形态为 I

型和III型胶原蛋白。术语“天然胶原蛋白”指的是保留完整的胶原蛋白三螺旋区域。

如上所述,胶原蛋白螺旋结构的主要部分在不同种类的哺乳动物之间变化极小。实际上,各种类型的胶原蛋白在核苷酸和氨基酸序列上具有高度的同源性。比如,将人类、马科动物和鼠科动物进行比较,II型 α I胶原蛋白核苷酸序列的同源性至少88%。人类和马科动物在核苷酸水平上序列的同源性达93%,而小鼠和马科动物的序列同源性达89%。人类和小鼠的核苷酸序列同源性为88%(参见,NCBI accession numbers U62528(Equine),NM033150(Human) and NM031163(mouse) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。其它类型的胶原蛋白有程度相似的氨基酸同源性。比如,猪和绵羊的I型 α I胶原蛋白之间的核苷酸序列同源性为90%(参见,NCBI accession numbers AF29287(Ovine) and AF201723(Porcine) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

当上述很多动物都具有水平相同的家系和生物学特性,当许多种动物,如牛、绵羊、小鼠、和猪的胶原蛋白都具有相似的形态学即皮的构造、高度的氨基酸和核苷酸序列同源性,本领域普通技术人员很容易预见到这里所公开的方法适用于所有动物。

当动物被选来用于提取胶原蛋白时,先除去皮。可以使用任何本领域已知方法取下动物皮。此外,皮可以取自任何年岁的动物,在优选的实施方式中动物是小于14周的小羊。

取下的皮可立即在本发明的方法中使用,或选择在低于20℃条件下存放,优选在4℃到20℃之间。然而,可以预见在该温度范围外过长时间存放对提取出的胶原蛋白的数量和质量有不利影响。

在一个优选的实施方式中,将一种或多种有机酸基的缓冲液施用于新鲜动物皮的肉面。这里所用的术语“新鲜”指的是在使用前取下不超过一天的动物皮。优选使用前不超过12个小时。更为优选取下后8小时内使用的动物皮。

有机酸缓冲液优选乳酸缓冲液、醋酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、丙酮酸缓冲液、甲酸缓冲液或其组合;然而,其它本领域已知的有机酸缓冲液也可以使用。

使用醋酸钠、柠檬酸钠、丙酮酸钠、氢氧化钠、碳酸氢钠和碳酸钠，钾盐及类似盐也可以，来调整有机酸缓冲液 pH 值，优选的 pH 值在 3 到 5 之间、更优选在 3.2 到 4.6 之间。

在另一个更为优选的实施方式中，缓冲液由醋酸、乳酸或甲酸中的一种或多种与一种碱金属(包括铵)或一种碱金属盐混合的水溶液或混悬液所组成。也可以使用无机酸和有机酸的混合物。

最优选的缓冲液由 40 % (w/w) 的冰醋酸水溶液组成，通过加入大约 20 % 的无水醋酸钠和需要量的氢氧化钠将 pH 调整至优选值 (4.0-4.2)。

施用有机酸缓冲液可以通过本领域已知的任何方法。比如，可以通过喷雾、涂抹、浸渍或类似的方法。作为优选，施用方法是以每张皮大约 50 到 100ml 的比例涂抹。如果有机酸缓冲液作浸渍用或将皮浸入有机酸缓冲液中，有机酸缓冲液需加水稀释 10 倍。

施用有机酸缓冲液后，将动物皮在 20℃ 到 40℃ 温度下温育 8 到 27 个小时。优选在温育过程中有足够高的相对湿度，以免动物皮干枯。比如，相对湿度高于 60 % 的，优选高于 80 %，更优选高于 90 % 的相对湿度。

不受什么特别的理论或假说限制，本申请确信在提取过程阶段使用有机酸缓冲液不仅会使羊毛和毛发的松动，也会使皮上的糖胺聚糖 (GAGs) 被大量消化。GAGs 的去除使得胶原蛋白结构打开，在后续阶段依次促进了酶对胶原蛋白的增溶作用。

这里使用术语“大量”和“大量地”，当其用来描述 GAG 的去除时，是相对于动物皮中正常 GAG 量而言，在有机酸缓冲液的初期温育结束时，被消化掉的 GAG 量优选占有所有 GAG 总量超过 70 %，更优选超过 80%，更加优选超过 90 %。

在温育后用机械或手工方法除去羊毛或毛发，制得脱毛的皮，这里称之为术语“生皮 (pelt)”。如果羊毛或毛发具有经济价值可以干燥并包装，否则弃去。

生皮用机械或手工方法去肉。除去或弃去任何含有残留羊毛或毛发的生皮。然后将生皮切成或绞成碎片。可以使用任何能够使生皮破碎的设备，包括工业绞碎器、研磨机或食品处理器。

生皮碎片加入非变性溶液制成一种混悬液。非变性溶液包括一种有机酸缓冲液，混悬液在非变性条件下温育。这里所使用的术语“非变性条

件”指的是胶原蛋白的三螺旋结构得以保存的条件。相应地，在一种优选的实施方式中，所用有机酸缓冲液优选 pH 值约为 2、在温度低于 25℃ 条件下使用。

在一种优选的实施方式中，有机酸缓冲液包括醋酸、乳酸、甲酸或其组合。有机酸缓冲液的浓度可在 0.01M 到 0.5M 之间，更优选在 0.1M 到 0.05M 之间。优选浓度在 0.1M 和 0.05M 之间的醋酸。

生皮碎片和非变性溶液相对的比例在 10:1 到 1000:1 之间。混悬液在制备时最好缓缓摇动。摇动的次数有赖于混悬液中生皮碎片的尺寸，然而，优选摇动的力度足以轻轻地移动生皮碎片。混悬液优选的温育温度在 0 到 30℃ 之间、温育时间至少 1 小时。在一种有优选的实施方式中，最多可以温育 7 天，然而，温育时间是由 pH 值、温度和生皮的种类一起决定的。

在一个优选的实施方式中，在混悬液中引入一种蛋白酶。现有很多合适的蛋白酶在市面上有售或为本领域所公知。比如，合适的蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶类，从特定菌株枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(枯草杆菌蛋白酶 BPN 和 BPN')中得到。一种合适的蛋白酶是从芽孢杆菌菌株中得到的，在 pH 值范围 8-12 之间活性最强，丹麦的 Novo Industries A/S，此后简称

“Novo”对其进行了研发并以商品名 ESPERASE® 销售。对该酶和类似酶的制备在 Novo 的 GB 1,243,784 中有述。其它合适的蛋白酶包括来自 Novo 的 ALCALASE®、DURAZYM® 和 SAVINASE® 和来自 Gist-Brocades 的 MAXATASE®、MAXACAL®、PROPERASE®、MAXAPEM® (MAXACAL 经蛋白质加工)。蛋白酶中也包括改性细菌丝氨酸蛋白酶，在下述文献中有述，European Patent Application Serial Number 87303761.8，申请日 April 28, 1987 (具体页数 17、24 和 98)，以及 European Patent Application Serial Number 199,404, Venegas, 出版日期 October 29, 1986, 其中提到一种改性细菌丝氨酸蛋白酶。

其它合适的蛋白酶还包括碱性丝氨酸蛋白酶，在 EP 90915958:4 中有述，对应 WO 91/06637，出版日期 May 16, 1991。专利申请 EP 251 446 和 WO 91/06637 中所述的蛋白酶也适用于本发明，WO 91/02792 中所述的蛋白酶 BLAPS 和 WO 95/23221 所述的它们的变种也适用于本发明。

同样是得到最高收率的可溶性胶原蛋白，所需时间及所用条件会有很大变化，取决于所需要的酶消化的种类和数量，从 1 到 10 天不等。酶与生

皮的重量比值变化很大,从 1:10 到 1:1000 (w/w) 不等。胃蛋白酶是优选的酶,该酶与生皮的重量配比约为 1:100。

温育后可通过沉淀或过滤方法分离可溶胶原蛋白和分散的胶原蛋白。采用离心,上清含有溶解的胶原蛋白,沉淀含有分散的胶原蛋白。采用过滤,溶解的胶原蛋白在滤液中。

可通过已知方法,如沉淀、过滤或类似方法从上清液中回收溶解的胶原蛋白。优选盐沉淀溶解的胶原蛋白的方法。可将盐,如 NaCl 加入上清液(过滤液),使最终浓度在 5 到 20% w/v 之间,优选 10%。将混悬液离心,得到沉淀,弃去上清液。沉淀在稀 (0.1M) 醋酸或乳酸中再溶解(沉淀与溶液的比例约为 1:100)。可溶性胶原蛋白通过加入盐再沉淀。接着再将沉淀溶于稀酸并离心。然后测量混悬液中胶原蛋白的浓度,并将其调至所需浓度(从 1 到 10mg/ml)。胶原蛋白以这种形式使用,或将溶解的胶原蛋白经对水透析转化成脱水胶原蛋白。

这里所用的术语“脱水胶原蛋白”指的是已经脱水的胶原蛋白,脱水可采用任何本领域公知的方法。在优选的实施方式中,脱水胶原蛋白通过冻干法、冷冻干燥或干燥来制备。

含有分散的胶原蛋白的混悬液经过滤除去大颗粒。将滤液中胶原蛋白的浓度调至所需,并以该形式进行使用。也可选择将胶原蛋白水洗并干燥。

这里所用的术语“干燥”指的是任何从胶原蛋白中去除水的方法。该术语所包括的方法含有但不限于风干或冻干。

由上述内容可知,按本发明方法制备的不同实施方式中的胶原蛋白适合于各种需要用到胶原蛋白的生物学用途。可预期地,本发明的胶原蛋白能在多种装置和多种用途中应用,包括但不限于,胶原蛋白缝合线、包括创伤和烧伤敷料的胶原蛋白软组织置换、动脉血管置换、止血剂、药物递送基质、眼科治疗中用到的玻璃体置换和牙髓治疗、细胞温育支架,等。进一步还可预见到,本发明的不同实施方式能以任何形式应用,包括但不限于纤维或膜片、袋、海绵、缝合线和水溶性混悬液,以及各种复合材料。此外,如果需要的话,本发明的方法制备的胶原蛋白还可以按预期应用的需要进一步修饰,提供改善的生物活性相应。还可预见,本发明的方法也可用于制备其它生物分子及胶原蛋白。

在说明书中，“包括(comprise)”一词和该词的其它形式，如“包括有(comprising)”和“包括了(comprises)”，表示“包括但不限于”，不用于排除其它附加剂、成分、各个整体或各个步骤。

仅通过参照下述不起限定作用的实施例来描述本发明。然而显然下述实施例仅作为例证使用，无论如何不应被理解为对以上本发明概述的限定。比如，实施例主要部分涉及的是绵羊皮，很容易理解，本发明还可用于这里所述的其它动物皮，包括如牛、猪和袋鼠。

实施例 1 以绵羊皮为原料提取 I 型和 III 型胶原蛋白

一张新取美利奴绵羊皮，羊毛长约 5cm，取自当地屠宰场刚刚宰杀后的羊。皮移至试验室放入低温冷冻容器中。皮通过机械方法去肉，然后喷洒接近 50ml 的有机酸缓冲液。缓冲液是 40% 的溶于水的冰醋酸，已用氢氧化钠调整 pH 值至 4.0。

皮在温度 35℃、相对湿度 85% 下温育 16 个小时。手工除去羊毛，修剪除去任何皮上残留的羊毛和毛发。所得生皮称重约 1.2kg。

然后将生皮水洗，使用工业技术等级的食品处理器将其切成碎片。

切碎的生皮导入含有 0.1M 醋酸的非变性溶液。所用生皮和非改性溶液的比例为 50:1 (w/w)。按胃蛋白酶与组织的比例为 1:100 往混悬液中加入胃蛋白酶(1:2000)。然后，混悬液在 5℃ 条件下温育 7 天，其间偶尔搅拌一下。

温育后混悬液在 10,000g 条件下离心 60 分钟。回收含溶解了蛋白质的上清液和含有不溶的分散胶原蛋白的沉淀。

加入盐(NaCl)，使浓度达到 10% (w/w)，可溶性胶原蛋白沉淀下来。所得混悬液经离心得到沉淀，上清液弃去。沉淀再溶于稀醋酸(0.1M)，沉淀和醋酸的比例为 1:100。然后将所得的溶液离心。溶解了的胶原蛋白经过几次的换水透析直到盐浓度达到预期水平，然后，冷冻干燥。

使用该工艺，得到 30g 胃蛋白酶可溶的胶原蛋白，纯度可比市售的牛胶原蛋白。制得的可溶性胶原蛋白由 95% 的 I 型胶原蛋白和 5% 的 III 型胶原蛋白组成。以羟基脯氨酸的含量进行估算，也制得了约 270g 的分散胶原蛋白。

实施例 2 以小羊皮为原料提取 I 型和 III 型胶原蛋白

按例 1 所示方法进行制备，使用取自一头“乳”羊，即小于 12 到 14 周的小羊。该方法最终得到超过 50% 的胶原蛋白，该胶原蛋白作为酸可溶胶原蛋白被分离出来。I 型胶原蛋白相对于 III 型比例为 90%:10%。