

(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
2024年1月4日 (04.01.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/002149 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/78 (2006.01) *A61K 38/39* (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61K 8/65* (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/103141

(22) 国际申请日: 2023年6月28日 (28.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210739807.1 2022年6月28日 (28.06.2022) CN

(71) 申请人: 华熙生物科技股份有限公司
(**BLOOMAGE BIOTECHNOLOGY CORPORATION LIMITED**) [CN/CN]; 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。
华熙生物科技(天津)有限公司(**BLOOMAGE BIOTECH (TIANJIN) CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国天津市滨海新区天津经济技术开发区中区纺一路33号, Tianjin 300270 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(72) 发明人: 周伟(**ZHOU, Wei**); 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。 陆雨婷(**LU, Yuting**); 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。 徐国霞(**XU, Guoxia**); 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。 张晶(**ZHANG, Jing**); 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。 刘明明(**LIU, Mingming**); 中国山东省济南市高新技术开发区天辰大街678号, Shandong 250101 (CN)。

(74) 代理人: 北京唐颂永信知识产权代理有限公司(**BEIJING TANGSONG IP FIRM**); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海国际港1602室, Beijing 100081 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

(54) **Title:** RECOMBINANT TYPE-III COLLAGEN AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 发明名称: 一种重组III型胶原蛋白及其制备方法

(57) **Abstract:** Provided are a recombinant type-III collagen and a method for preparing same and use thereof. The amino acid sequences of the recombinant type-III collagen are set forth in SEQ ID NOs: 1, 2, and 3.

(57) 摘要: 提供一种重组III型胶原蛋白及其制备方法和应用, 重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1、2、3所示。

WO 2024/002149 A1

一种重组III型胶原蛋白及其制备方法

技术领域

[0001] 本申请属于生物技术领域，具体地，本申请涉及一种重组III型胶原蛋白及其制备方法。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是一种生物高分子，它广泛存在于动物结缔组织中，约占体内蛋白总量的25%~30%，是哺乳动物体内分布最广、质量分数最多的功能性蛋白。因其具有良好的生物相容性、可生物降解性、低免疫原性以及生物活性(例如，可促进细胞增殖、分化、迁移，用于修复和止血)，被广泛应用于化妆品、食品、医药、组织工程等领域。

[0003] 目前主流的胶原蛋白制备方法包括动物源提取法和基因工程法两大类，动物源胶原蛋白的提取主要通过酸法和酶法进行产业化制备，成本相对更低，但存在动物源疾病感染、异源胶原蛋白可能导致免疫排斥或过敏反应、产能限制等问题。基因工程技术生产重组胶原蛋白组分单一、安全性高、生产过程可控。鉴于胶原蛋白具有广阔的应用前景，特别是在高端医用材料、保健品等领域对优质胶原蛋白的大量需求，利用基因工程技术重组表达胶原蛋白成为一个极具意义的研究方向。

[0004] 基因工程涉及大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞、转基因作物等不同表达体系，哺乳动物细胞、昆虫细胞等表达体系成本高、周期长，难以满足产业化需求，相比之下，微生物发酵生产重组胶原蛋白成本低、周期短、培养较容易，更易于商业化生产。

[0005] 细菌表达系统普遍存在诸如：产生的致热原致使表达产物难以应用于临床；目的蛋白以包涵体形式表达，致使产物纯化困难；原核表达系统的翻译后加工修饰体系不完善，表达产物的生物活性较低等缺点，采用巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统，可避免这些缺点，并能对翻译的蛋白质进行一定的翻译后修饰(包括二硫键形成和糖基化等)，有力支撑蛋白质生物学功能的实现。以

巴氏毕赤酵母建立表达系统具有微生物表达系统可高密度发酵生产、培养成本低、蛋白表达水平高等规模化工业生产的优点，且其可分泌于胞外，避免了菌体裂解过程带来的杂质蛋白，同时，其细胞壁成分中不含内毒素、肽聚糖。

[0006] 发明内容

[0007] 针对现有技术存在的上述问题，本申请利用基因工程技术重组表达一种新的III型胶原蛋白，其可避免病毒隐患以及排异反应，且分子量确定，生产过程条件温和，利于保持蛋白的生物活性。同时，本申请提供了该重组III型胶原蛋白的制备方法。

[0008] 具体来说，本申请涉及以下方面：

[0009] 1. 一种重组III型胶原蛋白，其特征在于，所述重组III型胶原蛋白为如下A1)-A3)中的任一种：

[0010] A1) SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2或SEQ ID NO. 3所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0011] A2) 将A1)所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与所述重组III型胶原蛋白相关的蛋白质；

[0012] A3) 与A1)或A2)具有85%以上同一性且与所述重组III型胶原蛋白相关的蛋白质。

[0013] 2. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子编码项1所述的重组III型胶原蛋白。

[0014] 3. 根据项2所述的核酸分子，其特征在于，所述核酸分子为如下C1)或C2)中的任一种：

[0015] C1) 核苷酸序列为SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5或SEQ ID NO. 6的DNA分子；

[0016] C2) 将SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5或SEQ ID NO. 6所示的核苷酸序列经过修饰和/或一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加得到的与C1)所示的DNA分子具有85%以上的同一性，且具有相同功能的DNA分子。

[0017] 4. 一种载体，其中，所述载体包含项3所述的核酸分子。

[0018] 5. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含项1所述的胶原蛋白或项2所述的核酸分子或项4所述的载体。

- [0019] 6. 根据项5所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。
- [0020] 7. 根据项6所述的宿主细胞，其特征在于，所述真核细胞为毕赤酵母。
- [0021] 8. 一种制备项1所述的重组III型胶原蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：
- [0022] 利用项5-7中任一项所述的宿主细胞表达所述重组III型胶原蛋白，然后进行分离纯化得到。
- [0023] 9. 根据项1所述的重组III型胶原蛋白，或根据项2或3所述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或由根据项5-7中任一项所述的宿主细胞产生的重组III型胶原蛋白在制备食品、化妆品、保健品或药械产品中的应用。
- [0024] 10. 一种组合物，其特征在于，所述组合物包括根据项1所述的重组III型胶原蛋白，或根据项2或3所述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或由根据项5-7中任一项所述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。
- [0025] 11. 根据项10的组合物，其用作食品、化妆品、保健品或药械产品。
- [0026] 12. 一种项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物在促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移中的用途。
- [0027] 13. 一种项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物在抗炎中用途。
- [0028] 14. 根据项12或13所述的用途，其是用于非治疗目的的。
- [0029] 15. 一种项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物在制备用于促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移的产品中的用途。
- [0030] 16. 一种项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物在制备用于抗炎的产品中的用途。
- [0031] 17. 一种抗炎方法，其包括向有此需要的受试者施用项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物。
- [0032] 18. 一种促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移的方法，其包括向有此需要的受试者施用项1所述的重组III型胶原蛋白或项10所述的组合物。

[0033] 本申请为尽可能提高巴氏毕赤酵母的表达水平，采用以下策略：1)将编码重组III型胶原蛋白的各种氨基酸的密码子完全优化为巴氏毕赤酵母的偏好密码子以利于重组III型胶原蛋白的表达；2)对高密度发酵条件及工艺进行优化，发掘其高表达潜力。

有益效果

[0034] 本申请将重组III型胶原蛋白的活性氨基酸序列进行拼接，并根据巴氏毕赤酵母表达异源蛋白的密码子偏好性对相应的碱基序列进行密码子优化。通过菌株筛选及参数优化后，发酵液上清总蛋白浓度较优化前提高50%。

[0035] 本申请采用的巴氏毕赤酵母表达系统，不含有内毒素，生产成本低，蛋白表达量较高。其生产的重组III型胶原蛋白的氨基酸组成与天然胶原蛋白 $\alpha 1$ 链一致，应用于人体不会产生免疫排斥，可以广泛应用于食品、化妆品、保健品和药械产品领域，并进行工业化大规模生产。与市售的胶原蛋白产品相比，其细胞增值、迁移等功效更好。

[0036] 本申请的重组III型胶原蛋白还能够显著促进细胞粘附，细胞粘附是一个动态过程，是细胞最基本的生命活动，因此，本申请的重组III型胶原蛋白在促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化和细胞迁移中起到关键的作用。此外，本申请的重组III型胶原蛋白还具有抗炎的作用。

附图说明

[0037] 图1是实施例2中重组表达载体pPIC9K-COL的质粒图谱。

[0038] 图2是实施例5中重组III型胶原蛋白发酵上清液SDS-PAGE电泳图。

[0039] 图3是实施例6中胶原蛋白促细胞增殖的结果图。不同字母“a”、“b”、“c”、“d”代表数据间具有显著性差异， $p < 0.05$ 。

[0040] 图4是实施例7中胶原蛋白细胞迁移的结果图。

[0041] 图5是实施例7中胶原蛋白细胞迁移率的结果图。不同字母“a”、“b”、“c”、“d”、“e”代表数据间具有显著性差异， $p < 0.05$ 。

[0042] 图6是重组III型胶原蛋白对HaCaT细胞模型的粘附作用。

[0043] 图7是重组III型胶原蛋白对HaCaT细胞模型的抗炎作用。

具体实施方式

- [0044] 下面结合附图和具体实施例来详细说明本申请。应理解，以下实施例仅用于说明本申请而不用于限制本申请的范围。
- [0045] 尽管本文使用了特定的术语，但它们仅用于一般性和描述性的意义，而不是为了限制的目的。除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与公开描述的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。
- [0046] 本文描述或引用的技术和程序是本领域技术人员通常熟知的且经常使用的常规方法。
- [0047] 本申请一方面提供了一种重组III型胶原蛋白。
- [0048] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。
- [0049] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。
- [0050] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。
- [0051] 在上述具体实施方案中，重组蛋白是指利用重组DNA或重组RNA技术，获得连接有可以翻译成目的蛋白的基因片段的重组载体，之后将其转入可以表达目的蛋白的宿主细胞从而表达特定的重组蛋白分子，而获得的蛋白质。体外重组蛋白的表达系统主要包括以下几种：1. 原核细胞表达系统，例如大肠杆菌；真核细胞表达系统，如酵母；哺乳动物细胞表达系统，例如细胞CHO，HEK293；及昆虫细胞表达系统。氨基酸序列是指氨基酸相互连接形成肽链(或多肽)的顺序。根据氨基酸的结构和它们连接在一起的方式，氨基酸序列只能按照一个方向读取，并且以特定形式形成肽。所有氨基酸都具有一个常规结构，包含一个碳，和分别位于两侧的一个氨基NH₃及羧基COOH。一个氨基酸的氨基和另一个氨基酸的羧基之间形成肽键，形成氨基酸序列。重组胶原蛋白是指通过基因重组技术制备的胶原蛋白，其中通常将编码胶原蛋白的DNA或RNA插入合适的表达载体中，转化进入宿主细胞中表达的胶原蛋白分子。将DNA或RNA通过同源重组或本领域公知的其它方式插入宿主染色体，并因此用于转化宿主细胞以产生蛋

白质。人体胶原蛋白根据组织部位、生理功能、分子结构不同而分为28种以上胶原蛋白，研究多的为I型、II型和III型胶原蛋白。其中I型胶原和III型胶原是皮肤中含量最多的2种胶原成分。I型胶原呈条束状，支撑皮肤结构，保持皮肤韧性；而III型胶原更像是细密的网状，散布在I型周围，紧紧网住真皮细胞与水分，决定着皮肤的弹性和嫩滑度。I型和III型胶原蛋白主要存在皮肤、肌腱、韧带、血管等结缔组织，构成细胞外基质网状结构，起到支撑器官、保护机体的作用，还与细胞附着、细胞迁移有关。市售胶原蛋白99%是从猪皮、牛皮、驴皮、鱼皮、鱼鳞等动物组织中提取的动物源胶原蛋白，对比人胶原蛋白在基因序列上存在根本性差异，属于非同源物质。进入人体后会被皮肤的免疫层所阻隔，无法深入到肌底层、真皮层。上述重组III型胶原蛋白的基因序列与人III型胶原蛋白基因序列高度一致，组织相容性好。

[0052] 本申请另一方面提供了一种核酸分子。

[0053] 在一个具体的实施方案中，所述核酸分子编码重组III型胶原蛋白。所述核酸分子的序列如SEQ ID NO. 4所示。

[0054] 在一个具体的实施方案中，所述核酸分子编码重组III型胶原蛋白。所述核酸分子的序列如SEQ ID NO. 5所示。

[0055] 在一个具体的实施方案中，所述核酸分子编码重组III型胶原蛋白。所述核酸分子的序列如SEQ ID NO. 6所示。

[0056] 在上述具体实施方案中，核酸分子是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的总称，是由许多核苷酸单体聚合成的生物大分子化合物，为生命的最基本物质之一。核苷酸序列指的是DNA或RNA中碱基的排列顺序。核酸分子含有cDNA，在一些情况下，可以修饰核酸分子以用于本申请载体中，如用于密码子优化。在一些情况下，出于克隆到载体的目的，可以将序列设计为含有末端限制性位点序列。核酸分子可以从多种来源获得，如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞中分离的编码核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得。

[0057] 本申请另一方面提供了一种载体，所述载体包含上述的核酸分子。

[0058] 在一个具体的实施方案中，载体是指在基因工程重组DNA技术中将 DNA片段(目的基因)转移至受体细胞的一种能自我复制的DNA分子。在基因工程中作为

最常用，最简单的载体，必须包括三部分：遗传标记基因，复制区，目的基因。除常用的大肠杆菌质粒载体外，还发展了许多人工构建的其它适用于微生物、酵母、植物等的质粒载体。载体包括但不限于：单链，双链或部分双链的核酸分子；包含一个或多个游离末端，没有游离末端(例如环状)的核酸分子；包含DNA，RNA或两者的核酸分子；以及本领域已知的其它多核苷酸种类。一种类型的载体是“质粒”，其是指可以插入额外DNA片段的环状双链DNA环，例如通过标准分子克隆技术。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如，非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导目的基因的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。重组表达载体可以包含适于在宿主细胞中表达核酸的形式，这意味着重组表达载体包括一种或多种调节元件，其可以基于用于表达的、可以与待表达的核酸序列可操作地连接的宿主细胞来选择。所述载体为重组表达载体pPIC9K-COL1、pPIC9K-COL2、pPIC9K-COL3。

[0059] 本申请另一方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞包含上述载体。

[0060] 在一个具体的实施方案中，宿主细胞是指任何细胞类型，其易受包含本申请的多核苷酸的核酸构建体或表达载体的转化、转染、转导等。“宿主细胞”涵盖亲本细胞的任何后代，其由于复制过程发生突变与亲本细胞不完全相同。宿主细胞可以是在本申请的重组人源化胶原蛋白生产中有用的任何细胞。为了产生重组胶原蛋白，可以将编码重组胶原蛋白的核酸分离，并且将其插入一种或多种载体中，以在宿主细胞中进一步克隆/或表达。可以使用常规技术(例如，通过使用能够与编码重组胶原蛋白的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序这种核酸。所述宿主细胞是指已引入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括转化体和转化细胞，其包括原代转化细胞和源自其的后代，不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与亲代细胞不完全相同，但可能含有突变。对于载体导入宿主细胞中的方法是公知的，例如使用电转化将载体导入宿主细胞中，所述方法还可以是转染、微注射技术、基因枪技术、脂质体介导法等。所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。所述宿主细胞选自毕赤酵母

母、酿酒酵母、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌中的任意一种。优选地，所述原核细胞为大肠杆菌；优选地，所述真核细胞为巴氏毕赤酵母。

[0061] 本申请另一方面提供了一种制备重组III型胶原蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：利用上述的宿主细胞表达所述重组III型胶原蛋白，然后进行分离纯化得到。

[0062] 在一个具体的实施方案中，所述利用宿主细胞表达指的是将宿主细胞进行培养，培养基和培养条件对于本领域技术人员来说是公知的。对于表达方式，本申请不作任何限制，其可以根据需要进行确认，例如表达方式为诱导表达。所述分离纯化的方法包括盐析法、超滤法、亲和层析法、凝胶过滤层析法、色谱层析法、酸碱沉淀法和膜分离法，优选为超滤法。

[0063] 本申请另一方面提供了上述重组III型胶原蛋白，或上述核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述宿主细胞产生的重组III型胶原蛋白在制备食品、化妆品、保健品或药械产品中的应用。

[0064] 本申请另一方面提供了一种组合物。所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。

[0065] 在一个具体的实施方案中，组合物用作食品、化妆品、保健品或药械产品。

[0066] 本申请另一方面提供了上述重组III型胶原蛋白或上述组合物在促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移中的用途。

[0067] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述细胞为HaCaT细胞。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。在一个具体的实施方案中，所述用途是用于非治疗目的的。

[0068] 本申请另一方面提供了上述重组III型胶原蛋白或上述组合物在抗炎中用途。

[0069] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述抗炎为对HaCaT细胞抗炎。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。在一个具体的实施方案中，所述用途是用于非治疗目的的。

[0070] 本申请另一方面提供了上述重组III型胶原蛋白或上述组合物在制备用于促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移的药物中的用途。

[0071] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述细胞为HaCaT细胞。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。

[0072] 本申请另一方面提供了上述重组III型胶原蛋白或上述组合物在制备用于抗炎的药物中的用途。

[0073] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述抗炎为对HaCaT细胞抗炎。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。

[0074] 本申请另一方面提供了一种促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移的方法，其包括向有此需要的受试者施用上述重组III型胶原蛋白或上述组合物。

[0075] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述细胞为HaCaT细胞。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。

[0076] 本申请另一方面提供了一种抗炎的方法，其包括向有此需要的受试者施用上述重组III型胶原蛋白或上述组合物。

[0077] 在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 1所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 2所示。在一个具体的实施方案中，所述重组III型胶原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO. 3所示。在一个具体的实施方案中，所述细胞为HaCaT细胞。在一个具体的实施方案中，所述组合物包括上述的重组III型胶原蛋白，或上述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或上述的宿主细胞产生的重组胶原蛋白。

[0078] 在上述具体实施方案中，抗炎是指帮助机体抵抗炎症的发生和蔓延，此时组织对各种损伤因子产生的刺激进行防御，防御时产生的病理过程为炎症反应，通过重组胶原蛋白或其组合物能够抵抗这些因素造成的炎症，此过程称为抗炎。细胞增殖是生物体的重要生命特征，是指细胞以分裂的方式进行增殖。单细胞生物，以细胞分裂的方式产生新的个体。多细胞生物，以细胞分裂的方式产生新的细胞，用来补充体内衰老或死亡的细胞。细胞分化是指同一来源的细胞逐渐产生出形态结构、功能特征各不相同的细胞类群的过程，其结果是在空间上细胞产生差异，在时间上同一细胞与其从前的状态有所不同。细胞分化的本质是基因组在时间和空间上的选择性表达，通过不同基因表达的开启或关闭，最终产生标志性蛋白质。细胞迁移是指细胞爬行、细胞移动或细胞运动，是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度后而产生的移动。细胞迁移为细胞头部伪足的延伸、新的黏附建立、细胞体尾部收缩在时空上的交替过程。

细胞迁移是正常细胞的基本功能之一，是机体正常生长发育的生理过程，也是活细胞普遍存在的一种运动形式。胚胎发育、血管生成、伤口愈合、免疫反应、炎症反应、动脉粥样硬化、癌症转移等过程中都涉及细胞迁移。

[0079] 本说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。除了本文所示和所描述的那些之外，根据前面的描述，本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的，并且落入所附权利要求的范围内。

[0080] 实施例1：重组III型胶原蛋白的序列设计

[0081] 利用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站获取天然人III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链蛋白(参考序列号NP_000081)，根据优选人III型胶原蛋白成熟肽的有效序列，进行功能片段组合及等电点，蛋白稳定性等理化性质优化，设计出3条III型胶原蛋白序列COL1、COL2、COL3，具体序列详见序列表中的SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3。

[0082] 实施例2：重组III型胶原蛋白的基因合成

[0083] 按照巴氏毕赤酵母表达异源蛋白的密码子偏好性，设计并人工全基因合成3条III型胶原蛋白的核苷酸序列并亚克隆至pPIC9K质粒上，具体序列详见序列表中的SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6。全基因合成由南京金斯瑞生物科技股份有限公司完成，重组质粒载体命名为pPIC9K-COL1、pPIC9K-COL2、pPIC9K-COL3(图1)。

[0084] 实施例3：巴氏毕赤酵母电转化

[0085] 首先对pPIC9K-COL1、pPIC9K-COL2、pPIC9K-COL3重组质粒进行Sac I(购于Thermo Fisher公司)线性化，反应体系如下：

组分	添加量(μL)
10×Buffer	10
重组质粒(200 ng/ μL)	25
Sac I	5
ddH ₂ O	70
总体系	100

[0086] 上述试剂加好后，混匀，37℃水浴反应2h，终止反应前，先取出5 μL，在质量百分浓度为1.0%的琼脂糖凝胶电泳上检测是否酶切完全。之后，用DNA纯化试剂盒对线性化的pPIC9K-COL1、pPIC9K-COL2、pPIC9K-COL3质粒进行回收。

[0087] 分别将5 μg经Sac I内切酶线性化的pPIC9K-COL1、pPIC9K-COL2、pPIC9K-COL3质粒，与100 μL巴氏毕赤酵母感受态细胞混匀，转至电极间距0.2cm的冰预冷的电转化杯中，电击4~10毫秒，加入1mL冰预冷的1M的山梨醇溶液将菌体混匀，涂布于MD(Minimal Dextrase; 1L MD含有YNB 13.4g，生物素0.2g，葡萄糖20g，琼脂粉20g)培养基平板，30℃倒置培养2~3天，待MD培养基平板上长出菌落。

[0088] 实施例4：多拷贝插入重组子的筛选

[0089] 将MD培养基平板上长出的菌落用无菌牙签对应接种到G418浓度分别为0.5g/L、1g/L、2g/L的YPD(酵母浸出粉胨葡萄糖；1L中含有酵母提取物10g，胰蛋白胨20g，葡萄糖20g，琼脂粉20g)培养基平板上，30℃培养，通过高浓度抗生素培养筛选来获得转化子。毕赤酵母转化子若能在含高浓度G418的平板上生长，说明该转化子含有多拷贝的目的基因，即有多个重组片段进入了巴氏毕赤酵母体内并通过同源重组整合至其染色体上。经过这一步筛选可得到的高拷贝、可高效表达的重组巴氏毕赤酵母工程菌种。

[0090] 实施例5：重组III型胶原蛋白的发酵

[0091] 将筛选到的转化子接种于50mL YPD培养基中，30℃，200rpm，振荡培养24h，作为一级种子转接于280mL YPD培养基中，30℃，200rpm，培养24h，作为二级种子转接入装有3.5L的主发酵基础盐(1L中含甘油40g、K₂SO₄ 18.2g、H₃PO₄ 26.7mL、CaSO₄·2H₂O 0.93g、MgSO₄ 14.9g、KOH 4.13g混合制成)培养基的10L罐发酵。发酵过程中，生长温度26℃，pH值为5.3，溶氧控制在20%左右，当溶氧陡然上升时，表明基础盐培养基中的甘油已耗尽，开始速率为15mL/L/h流加质量百分浓度为50%的甘油，在质量百分浓度为50%甘油中含10mL/L微量元素PTM1(1L中含CuSO₄·5H₂O 6g、NaI 0.08g、MnSO₄·H₂O 3g、Na₂MoO₄·H₂O 0.2g、H₃BO₃ 0.02g、H₂SO₄ 5mL、CoCl₂·6H₂O 0.5g、ZnCl₂ 20g、FeSO₄·7H₂O 75g、生物素0.2g，混合制成)，溶氧维持在15%~20%。发酵液的湿菌重

达到180-200mg/mL时，停止补料，饥饿1h，甘油耗尽，流加甲醇诱导发酵，甲醇中含10mL/L PTM1微量元素，以速率为2mL/L/h流加2~3h，然后提高速率至10.9mL/L/h流加进行发酵。通过调节转速、罐压和通气量使溶氧大于15%，诱导发酵96h，发酵液上清电泳结果见图2，泳道M为蛋白Marker，其余泳道分别为COL1、COL2和COL3。

[0092] 实施例6：重组III型胶原蛋白促细胞增殖/细胞毒性实验

[0093] 取对数生长期BALB/C3T3细胞(小鼠胚胎成纤维细胞)(购自中国科学院上海细胞库)，以 1×10^5 个/mL密度接种于96孔板，每孔100 μ L，分为对照组和实验组。置于二氧化碳细胞培养箱，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂常规培养24h。用无血清培养液(购自江苏凯基生物技术股份有限公司)配制三种重组III型胶原蛋白样品(COL1、COL2、COL3)溶液、鱼胶原和市售重组胶原，每种溶液浓度为400 μ g/mL，并将溶液用0.22 μ m滤膜过滤除菌。BALB/C3T3细胞常规培养24h后，弃去旧培养液，加入100 μ L无血清培养液或100 μ L重组III型胶原蛋白样品溶液，对照组为加入等量无血清培养液，实验组为加入100 μ L重组III型胶原蛋白样品溶液，每组3个平行样。继续培养24h后，弃去培养液，每孔加入100 μ L用无血清培养液稀释10倍的CCK-8(购自生工生物工程(上海)股份有限公司中)，放入细胞培养箱中继续孵育2h。采用CCK-8法检测细胞相对增殖率，于450nm波长处用酶标仪测定吸光度。计算细胞相对增殖率(RGR) % = 实验组吸光度值/正常对照组吸光度值 \times 100%。

[0094] 如图3所示，本实施例中，重组III型胶原蛋白COL1、COL2、COL3、鱼胶原以及市售重组胶原作用于BALB/C3T3细胞24h，在胶原蛋白浓度为400 μ g/mL时，COL1、COL3、鱼胶原和市售重组胶原的促细胞相对增值率均显著高于对照组，分别提高了20.7%、24.3%、11.2%以及19.7%。此外，COL1的促细胞相对增值率显著高于鱼胶原，COL3的促细胞相对增值率显著高于鱼胶原和市售重组胶原。COL2的促细胞增殖能力与对照组无显著性差异。

[0095] 实施例7：划痕法检测重组胶原蛋白细胞迁移活性

[0096] 取处于对数生长期的HacaT细胞(购自中国科学院上海细胞库)作为样品，常规消化后以 3×10^5 个/mL的密度接种于24孔板中的ibidi小室。小室的左、右两

孔各加入70 μ L细胞悬液，小室外补充400 μ L无血清培养液(购自江苏凯基生物技术股份有限公司)。放置于37℃、5%的CO₂培养箱培养24h。取出ibidi小室，拍照，弃去培养液，加入1mL配制好的400 μ g/mL重组III型胶原蛋白COL1、COL2、COL3、鱼胶原和市售重组胶原的溶液，对照组加入1mL的无血清培养液。继续培养24h后观察并拍照。使用Image J软件(<https://imagej.nih.gov/ij>)对细胞迁移的图片进行处理，分析细胞划痕区域的愈合率。获得初始划痕面积和无细胞空白区域面积数据，计算迁移率，细胞迁移率(%) = (1-划痕区域面积/初始划痕区域面积) × 100%。

[0097] 体外细胞迁移实验在一定程度上模拟了体内细胞迁移的过程，直接反映了细胞与胞外基质及基质影响下细胞之间的相互作用。细胞迁移活性是更有效表征胶原蛋白生物学活性的指标，迁移率越高，速度越快，说明胶原蛋白的生物学活性越佳。结果如图4所示，24h拍摄的细胞迁移实际对比图(两黑色线内为初始及细胞迁移后划痕伤口区域)及图5所示的计算出的细胞相对迁移率比较可知，COL1、COL2、COL3迁移率均显著高于对照组，其中细胞迁移率COL3为对照组的3.6倍，COL1为对照组的3.04倍，COL2为对照组的2.49倍，因此，COL1、COL2、COL3均具有较强的细胞迁移活性。与鱼胶原和市售重组胶原相比，COL3和COL1的细胞相对迁移率均显著高于鱼胶原和市售胶原。

[0098] 实施例8：重组III型胶原蛋白对HaCaT细胞模型的粘附作用评估

[0099] 待测样品及浓度如下表：

组别	终浓度 (mg/ml)
C	/
重组III型胶原蛋白COL1	2
重组III型胶原蛋白COL2	2
重组III型胶原蛋白CoL3	2

[0100] 首先进行样品处理，用1x PBS配制2mg/ml的重组III型胶原蛋白COL1、COL2、CoL3，将配制好的重组III型胶原蛋白CoL3加到96孔板，阴性对照C组加入

1x PBS，并在37℃培养箱放置2h，然后，轻轻吸除液体，用5%BSA在37℃培养箱封闭1h，用无血清培养基清洗2次。然后接种细胞，取HaCaT细胞用含10%FBS的DMEM培养基，待细胞密度约80%，用0.05%胰酶消化，1000rpm离心5min，用无血清培养基重悬。将无血清培养基重悬的HaCaT细胞以1x10⁵个/孔的密度加入孔中，并在37℃下孵育1h，之后用PBS洗涤4次，加入MTT，3h后检测吸光度。用Excel软件处理分析MTT的吸光值，通过以下公式计算相对粘附率：

$$\text{相对粘附率(\%)} = \frac{\text{样品组平均值} - \text{空白组平均值}}{\text{对照组平均值} - \text{空白组平均值}} \times 100\%$$

[0101] 用Graphpad Prism绘图软件进行数据处理，结果表示为平均值±SD。组间比较采用t检验，*P<0.05表示有统计学差异，**P<0.01表示有显著性统计学差异，***P<0.001为有极其显著的统计学差异。

[0102] 结果如图6显示，与阴性对照C组相比，2mg/ml的重组III型胶原蛋白COL1、COL2、COL3对HaCaT细胞相对粘附率均显著高于对照组，分别提高了144%、67%、114%，均有显著促粘附作用。

[0103] 实施例9：重组III型胶原蛋白对HaCaT细胞模型的抗炎作用评估

[0104] 待测样品及浓度如下表：

组别	终浓 (mg/ml)
C	/
划痕组	/
重组III型胶原蛋白COL1+划痕组	2
重组III型胶原蛋白COL2+划痕组	2
重组III型胶原蛋白COL3+划痕组	2

[0105] 首先接种细胞，取HaCaT细胞用含10%FBS的DMEM培养基，待细胞密度约80%，用0.05%胰酶消化，1000rpm离心5min，重悬计数，接种于6孔板，在37℃、5%CO₂条件下培养。然后进行样品处理，种板24h后吸去培养基，分别加入对应浓度样本。待细胞生长融合后，用200 μ L枪头在细胞中制造划痕，用1×PBS洗涤细胞3次，加入无血清DMEM培养基。6h后收集上清，ELISA检测各组炎症因子的表达水平。

[0106] 结果如图7显示，与阴性对照组C相比，划痕处理组可以引起炎症因子PGE₂显著上升，增加了8.16倍；而重组III型胶原蛋白处理组COL1+划痕组、COL2+划痕组、COL3+划痕组可以显著抑制划痕引起的PGE₂表达增加，分别抑制了69.2%、49.5%和66.1%。与阴性对照组C相比，划痕处理组可以引起TNF-α 的显著上升，增加了86.9%；而重组III型胶原蛋白处理组COL1+划痕组、COL2+划痕组、COL3+划痕组可以显著抑制划痕引起的TNF-α 表达增加，分别抑制了30.3%、18.9%、27.8%。说明重组III型胶原蛋白具有良好的抗炎作用。

[0107] 序列表：

编号	序列
SEQ ID NO.: 1	EKGETGAPGLKGENGLPGENGAPGAPGERGRPLPGAAGARGNDGARGSDGQPGPPGPPGTAGFPG SPGAKGEVGPAGSPGSNGAPGQRGEPGPQGHAGAQQPPGPPGINGSPPGKGMGPAGIPGAPGLMG ARGPPGAPANGAPGLRGGAGEPGKNGAKGEPGPRGERGIPGVPAKGEDGKDGSPGEPGANGLP AAGERGAPGFRGPAGPNGIPGEKGPAGERGAPGAPRGAAGEPGRDGVPGGPGMRGMPGSPGGP GSDGKPGPPGSQGESGRPGPPGSPGRGQPGVMGFPGPKGNDGAPKNGERGGPGGPGPQGGPPGKN GETGPQGGPPTGPGGDKGDTGPPGQGLQGLPGTGGPPGENGKPGEPGPKGDAGAPGAPGGKGA GAPGERGPPGLAGAPGLRGGAGPPGPEGGKAAGPPPPGAAGTPGLQGMPPER
SEQ ID NO.: 2	GFPEKGETGAPGAPGAAGARGARGQPPGPPGTAGFPSPGAPGQRGEPGPQGIHAGEPGAAGKEDG KDGSPGEPGANGEKGPAGAPGAPRGAAGEPGRDGGPGMRGMPGSPGGPGSDGKPGPPGSQGES GRPGGPGGPPGQGGPPGKNGETGPQGGPPTGPGGDKGDTGPPGQGENGKPGEPGPKGDAGAPGAP GGKGDAGPPGLAGAAGTPGLQGDKEGGAPGRGSPGETGPPGQNGEPGGKGPAGEKGEGGPQGV KGNPFPSPGSPGKDGPPGAPNTGAPGSPGPKGDAGQPEKGSQAQARGPRGSPGQGESGKP GPPGPQGTAGEPGRDGNPGSDGRDGSPPGKGDRENGSPGAPGAPGHPGKSGDRGESGPAGPAGAP GPAGSRGAPGPQGPKEGTAAP
SEQ ID NO.: 3	GAPGLKGENGLPGENGAPGAPGERGAAGARGARGQPPGPPGTAGAKGSPGAPGQRGEPGPQGH AGEPGRGERGAKGEDGKDGSPGEPGANGERGEKGPAGERGAPGAPRGAAGEPGRDGGPGMRG MPGSPGGPGSDGKPGPPGSQGESGRPGPPGSPGRGQPGPKGAPGERGGPGGPGPQGGPPGKNGETGP QGGPPTGPGGDKGDTGPPGQGENGKPGEPGPKGDAGAPGAPGGKGDAGAPGERPPGPEGGKGER GDKGEGGAPGRGSPGERGETGPPGQNGEPGGKGERGAPGEKGEGGPQGVKGERGARGNPFPSPS GSPGKDGPPGAPNTGAPGSPGPKGDAGQPEKGSQAQARGPRGSPGQGESGKPERGPPGPQ GTAGEPGRDGNPGSDGRDGSPPGKGDRENGSPGAPGAPGHPGKSGDRGESGPAGPAGAPGAPGSR GAPGPQGPGRDKGETGERGAAGIKGHRGFPGNPAP
SEQ ID NO.: 4	GAAAAGGGAGAACTGGTGCCCCGGACTTAAGGGAGAGAACGGCCTACCCGGTGA AAAATGGA GCCCCGGTGCTCCAGGAGAGCGAGGCCGCCCTGGGTTGCCGGGCGCCCGGTGCCCGTGGGA ATGATGGCGCCAGAGGTTCCGGATGGACAGCCTGGTCCCGCCGACCGCCTGGCACTGCGGGTTT TCCTGGGTCTCCGGGTGCAAAAGGAGAAGTAGGACCGGCTGGTTCCCTGGTTCCACGGGGCT CCCGGACAACGGGGTGAACCTGGACCACAGGGTCACGCGGGCGCCAGGGCCCTCCAGGACCA CCAGGAATCAACGGATCTCCGGGTGGGAAAGGAGAGATGGGCCCCGAGGTATCCCTGGCGCC CCAGGACTGATGGGCGCAAGGGGGCCCGGGGGCCCGCAGGTGCGAATGGCGCACCAAGGACTC AGAGGTGGGGCAGGAGAGCCAGGTAAGAATGGTGCTAAGGGAGAACCTGGTCCAAGGGGAGA ACGAGGGATTCCGGGTGTCCGGGTGCTAAAGGCGAGGATGGCAAAGATGGGTCCCGGGGAGA GCCCGGGGCAAATGGCCTGCCCGGAGCGGCCGGTGAACGGGGGGCTCCAGGTTTCCCGGGACC TGCGGGTCCCAACGGTATTCCTGGCGAGAAAGGACCCGCTGGGGAACGTGGTGCCCCGGGGCCC GCGGGACCACGGGGCGCCGACGGGAACAGGGAGGGATGGTGCCCTGGTGGTCCCGGCATG AGGGGAATGCCTGGTTACCTGGAGGTCCCGGGTCAGATGGCAAACCAAGGACCCCTGGGAGTC AAGGCGAGAGTGGGGCCCCAGGCCCCCCCGGCCATCTGGCCCTCGTGGGCAACCTGGCGTAAT GGGATTTCCCGGTCCAAAGGAAACGACGGGGCACCGGGAAAAAATGGGGAGCGCGGGGGGGC CAGGGGGCCCCGGTCCGACGGGTCCACCGGGGAAGAACGGCGAAAATGGACCCAGGGTCCCC CTGGACCGACCGGCCAGGAGGCGATAAAGGTGACACGGGGCCGCTGGACCGCAAGGGCTTC AAGGATTACCTGGAACAGGTGGTCCACCAGGGGAAAATGGTAAACCTGGGGAGCCGGGACCGA AAGGAGATGCCGGCGCACCGGGTGCTCCGGGCGGGAAAGGGCAGCGGGGCGCTCCAGGTGAAC GCGGGCCACCGGGGCTGGCCGGTGACCCGGGCTAAGAGCGGGGGCGGGCCCCCTGGCCCCG

	AGGGAGGCAAAGGAGCGGCTGGCCCGCTGGGCCTCCCGGCGCTGCAGGGACACCCGGCCTCC AGGGTATGCCAGGAGAGCGA
SEQ ID NO.: 5	GGTTTCCCCGAGAAAAGGCGAAACCGGAGCACCGGGGGCCCCGGGAGCTGCGGGCGCTAGGGGC GCTCGTGGCCAACCAAGGACCGCCGGGGCCGCCCGGCACAGCTGGATTCCAGGTTCCGCCGGGTG CGCCAGGTCAACGAGGCGAACCCGGCCCCAGGGGCATGCAGGTGAGCCAGGGGCTAAGGGGG AAGATGGGAAGGACGGGTACCCGGGAGAACCTGGGGCCAACGGGAAAAGGGACCGGGCGGG GCTCCAGGGCCCGTGGACCGCGTGGGGCGGCGGGAGAACCCGGTAGGGACGGCGGTCCGGGC ATGCGAGGCATGCCGGTTCTCCGGGTGGGCCTGGCAGTGATGGTAAACCCGGCCACCAGGTT CTCAAGGAGAGTCCGGCCGGCCTGGCGGGCCAGGGGGACCTGGGCCTCAGGGCCCCCAGGCA AAAATGGGGAGACAGGCCCCCAAGGCCACCGGGGCCGACGGTCCCGGTGGTGATAAAGGAG ATACTGGTCCGCCCGGGCCACAGGGTGAGAATGGTAAACCTGGTGAACCAGGCCAAAAGGGAG ATGCGGGGGCGCCAGGGGGCCAGGAGGTAAGGGCGATGCAGGTCTCCCGGTCTGGCGGGTG CAGCAGGCACACCCGACTCCAAGGCGACAAAGGAGAGGGGGGGGCACCGGGCCCAAGAGGG TCGCCGGGGGAGACGGGACCTCCGGGTGAGAATGGCGAGCCTGGGGAAAAGGGGGCCCCAGGT GAGAAAGGAGAGGGGGGTCCACAGGGCGTAAAGGGTAAACCCGGCCCTCCGGGGCTTCTGGC TCTCCGGGAAAAGACGGCCCGCGGGACCAGCCGGGAATACCGGTGCTCCTGGGAGCCCTGGA CCAAAAGGTGACGCTGGCCAACCCGGAGAAAAGGGCAGCCCTGGAGCACAAAGGGGCTAGAGG GCCCGGGGTTACCGGGACCACAGGGTGAATCCGGAAAACCCGGACCGCCCGGCCCTCAAGG TACTGCCGGCGAACCTGGGCGCGACGGTAAACCTGGTTCGGATGGCCGGGACGGATCGCCGGGA GGTAAAGGCGATCGCGGAGAAAACGGTAGTCTGGTGCCCTGGAGCCCAGGCCACCCGGG AAGAGTGGAGACCGTGGAGAGAGCGGACCTGCCGGCCTGCAGGAGCACCCGGACCTGCCGGT TCAAGGGGTGCCCTGGCCACAGGGGCCGAAGGGGGAGACGGGAGCAGCGGCTCCT
SEQ ID NO.: 6	GGGGACCGGGCCTCAAAGGAGAAAACGGTTTACCTGGAGAAAATGGAGCACCCGGCGCGCCC GGCGAGCGCGGAGCTGCGGGTGCTCGAGGGGCACGAGGCCAACCCGGACCGCCTGGTCCCCG GGAACGGCTGGCGCGAAGGGATCCCTGGGGCACCCGGGCAGAGGGGGAAACCAGGCCCGCAG GGGCACGCTGGAGAGCCTGGCCCCAGGGGGCAGCGGGGTGCAAAGGGAGAGGATGGCAAAGA TGGCAGTCCCGGGAGCCAGGGGCTAATGGAGAGAGAGGAGAGAAGGGCCAGCCGGTGAAA GAGGGGCCCCGGCCCTGCAGGTCCCCGGGGCTGCCGGTGAACCCGGGCGTGATGGTGGTCC CGGCATGAGAGGCATGCCCGTTACCCGGGTGGTCCGGTTCTGACGGAAAACCCGGACCGCCC GGATCTCAGGGAGAGTCAGGTCTCTGGTCCGCCAGGGCCCTCGGGACCGCGAGGCCAGCCG GGTCTTAAAGGAGCCCCGGTGAGCGCGCGGTCTGGTGGCCCTGGACCACAAGGTCCCCAG GTAAGAATGGTGAGACAGGACCCAGGGCCCGCTGGCCCCACCGGGCCTGGGGGCGACAAGG GGGATACCGGCCCTCCGGGTCCGCAAGGGGAGAATGGTAAACCAAGGGAGCCAGGCCAAAAAG GCGACGCTGGTGCTCCTGGCGCTCCCGGTGGCAAGGGCGACGCAGGCGCCCCAGGGGAGCGTC CACCAGGACCTGAAGGGGGAAAAGGAGAACGGGGTGATAAGGGGGAAGGCGGCGGCCAGGT CCTAGGGGTAGCCCGGGAGAAAAGAGGGCGAACTGGTCCACCAGGACAAAACGGGGAACCAGG CGGGAAAAGGCGAAAAGGGGTGCCCCAGGAGAAAAGGGCGAGGGGGGTCTCAGGGGGTTAAAG GGGAGCGGGGGGCCCGCGGGAACCCCGACCTCCAGGACCTAGTGGATCGCCCGGGAAGGACG GACCACTGGGCCTGCCGGGAATACGGGTGCACCTGGATCAACAGGCGCCGAAAAGGGGATGCCG GCCAACCCGGTGAAAAGGRTTCCCAAGGTGCGCAAGGAGGCGCTGGGCCCGCGGGGTCTCCGG GCCCGCAGGGAGAGTCGGGAAAAGCCAGGAGAACGTGGACCGCTGGGCCACAGGGAACAGCG GGAGAGCCGGTTCGAGACGGAAAACCCAGGATCTGATGGGCGAGACGGCAGCCCTGGTGGGAAA GGAGACAGAGGAGAAAATGGCAGTCTGGAGCCCCGGGCGTCCCGGCCATCTGGAAAAGAGC GGGGATAGAGGAGAAAAGCGGGCTGCGGGTCCGGCAGGCGCTCCGGGTCCCGCGGTTCCTCGC GGGGACCAAGGTCCGCAAGGGCCACGGGGCGACAAGGGAGAGACTGGTGAAGGGGGGCGAGC

	GGGTATTAAAGGGCATCGAGGCTTCCCCGGCAACCCGGGCGCGCC
--	---

权利要求书

- [权利要求 1] 一种重组III型胶原蛋白，其特征在于，所述重组III型胶原蛋白为如下A1)-A3)中的任一种：
A1)SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2或SEQ ID NO. 3所示的氨基酸序列组成的蛋白质；
A2)将A1)所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与所述重组III型胶原蛋白相关的蛋白质；
A3)与A1)或A2)具有85%以上同一性且与所述重组III型胶原蛋白相关的蛋白质。
- [权利要求 2] 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子编码权利要求1所述的重组III型胶原蛋白。
- [权利要求 3] 根据项2所述的核酸分子，其特征在于，所述核酸分子为如下C1)或C2)中的任一种：
C1)核苷酸序列为SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5或SEQ ID NO. 6的DNA分子；
C2)将SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5或SEQ ID NO. 6所示的核苷酸序列经过修饰和/或一个或几个核苷酸的取代和/或缺失和/或添加得到的与C1)所示的DNA分子具有85%以上的同一性，且具有相同功能的DNA分子。
- [权利要求 4] 一种载体，其中，所述载体包含权利要求2所述的核酸分子。
- [权利要求 5] 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含权利要求1所述的胶原蛋白或权利要求2所述的核酸分子或权利要求4所述的载体。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的宿主细胞，其特征在于，所述真核细胞为毕赤酵母。
- [权利要求 8] 一种制备权利要求1所述的重组III型胶原蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

利用权利要求5-7中任一项所述的宿主细胞表达所述重组III型胶原蛋白，然后进行分离纯化得到。

[权利要求 9] 根据权利要求1所述的重组III型胶原蛋白，或根据权利要求2或3所述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或由根据权利要求5-7中任一项所述的宿主细胞产生的重组III型胶原蛋白在制备食品、化妆品或药械产品中的应用。

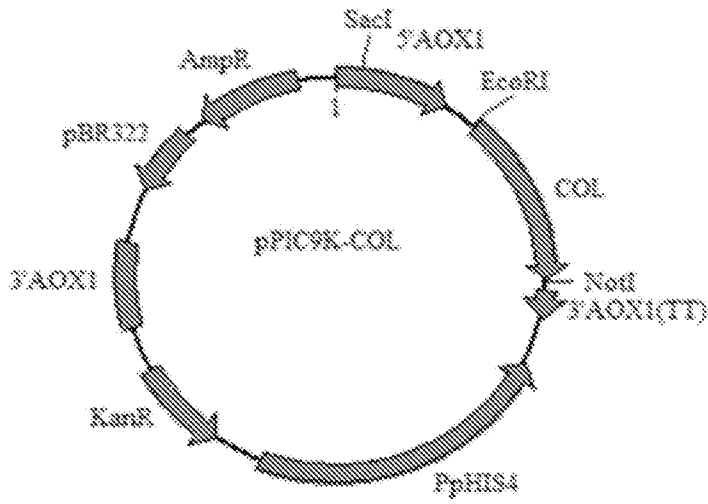
[权利要求 10] 一种组合物，其特征在于，所述组合物包括根据权利要求1所述的重组III型胶原蛋白，或根据权利要求2或3所述的核酸分子编码的重组III型胶原蛋白，或由根据权利要求5-7中任一项所述的宿主细胞产生的重组III型胶原蛋白。

[权利要求 11] 一种权利要求10的组合物在制备食品、化妆品或药械产品中的应用。

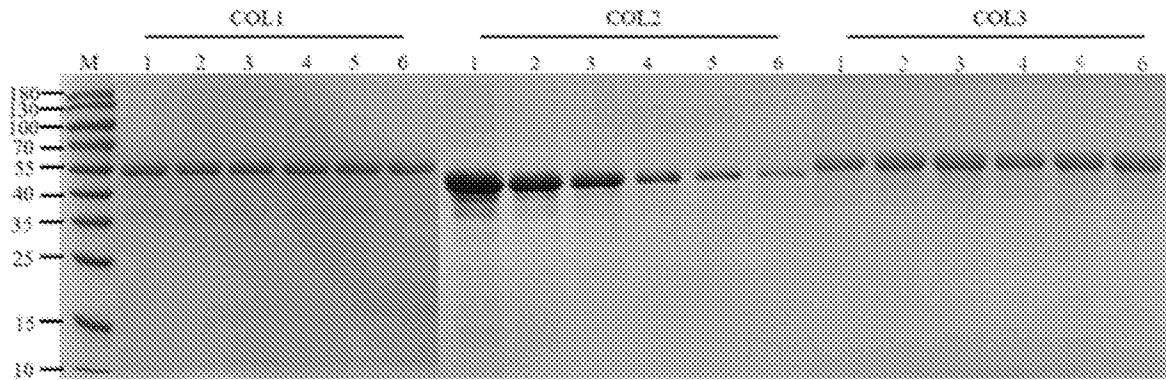
[权利要求 12] 一种权利要求1所述的重组III型胶原蛋白或权利要求10所述的组合物在制备用于促进细胞增殖、维持细胞活性、细胞分化或细胞迁移的产品中的用途。

[权利要求 13] 一种权利要求1所述的重组III型胶原蛋白或权利要求10所述的组合物在制备用于抗炎的产品中的用途。

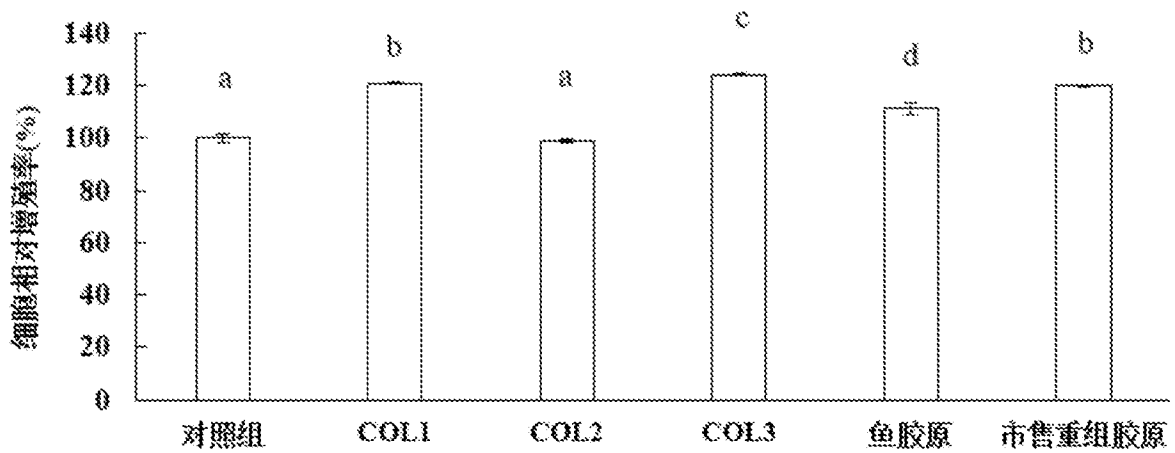
[图 1]



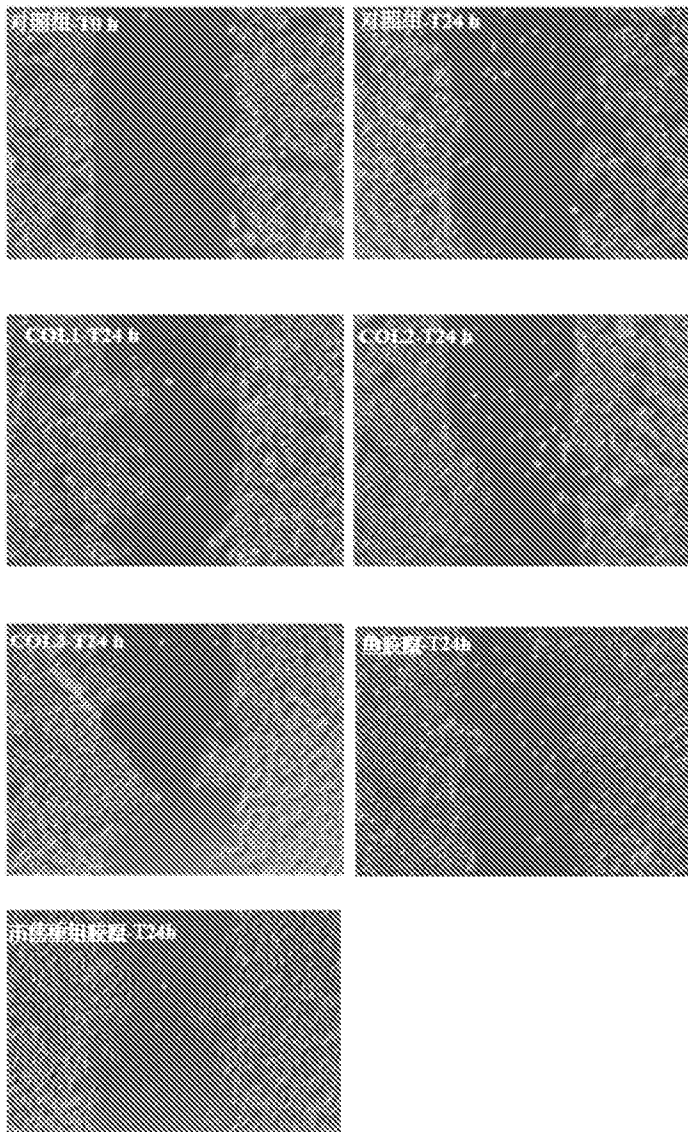
[图 2]



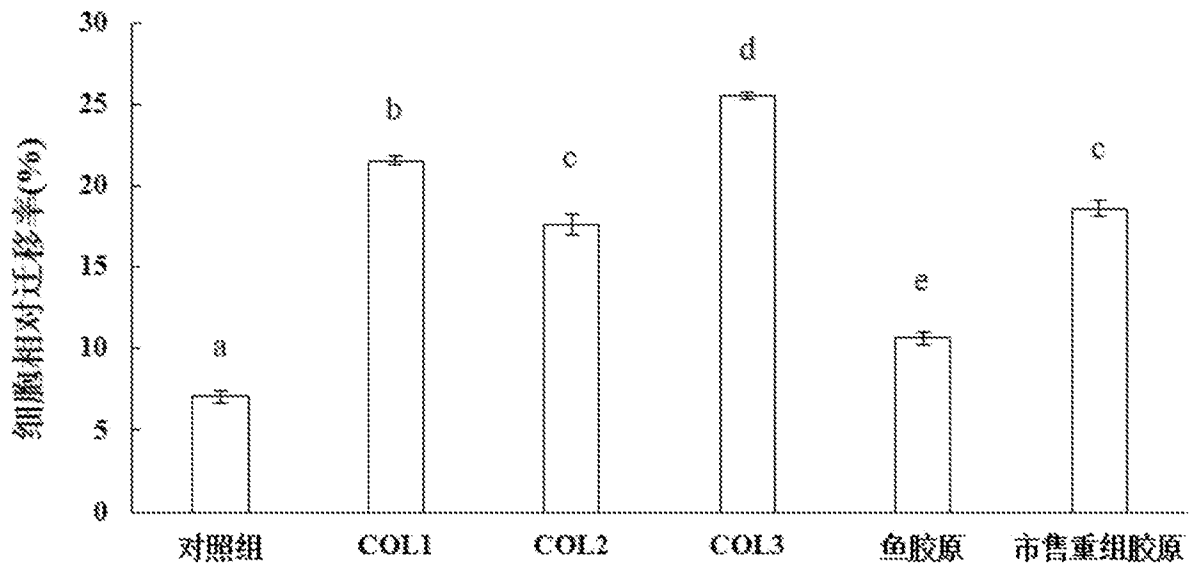
[图 3]



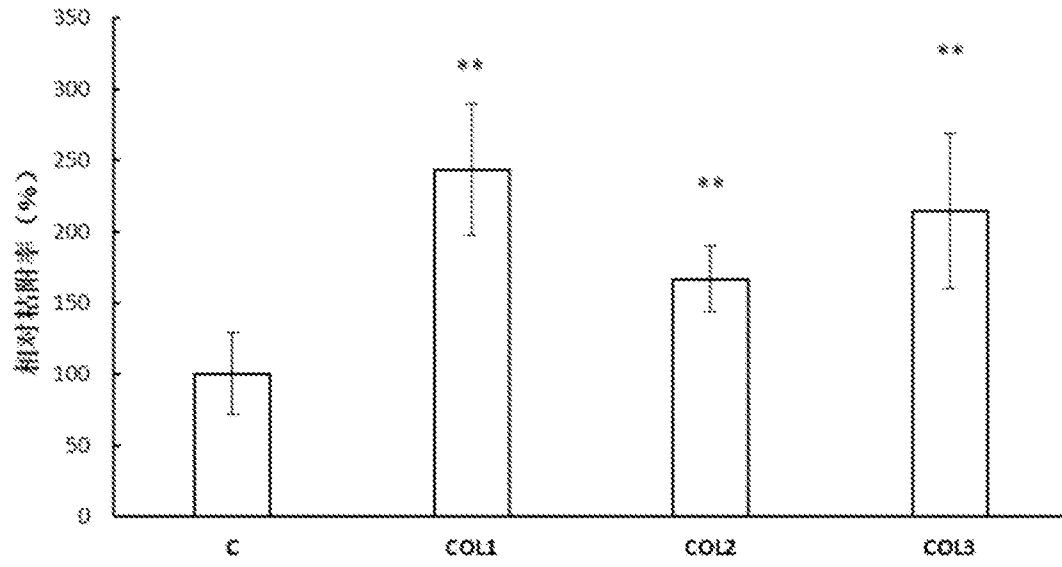
[图 4]



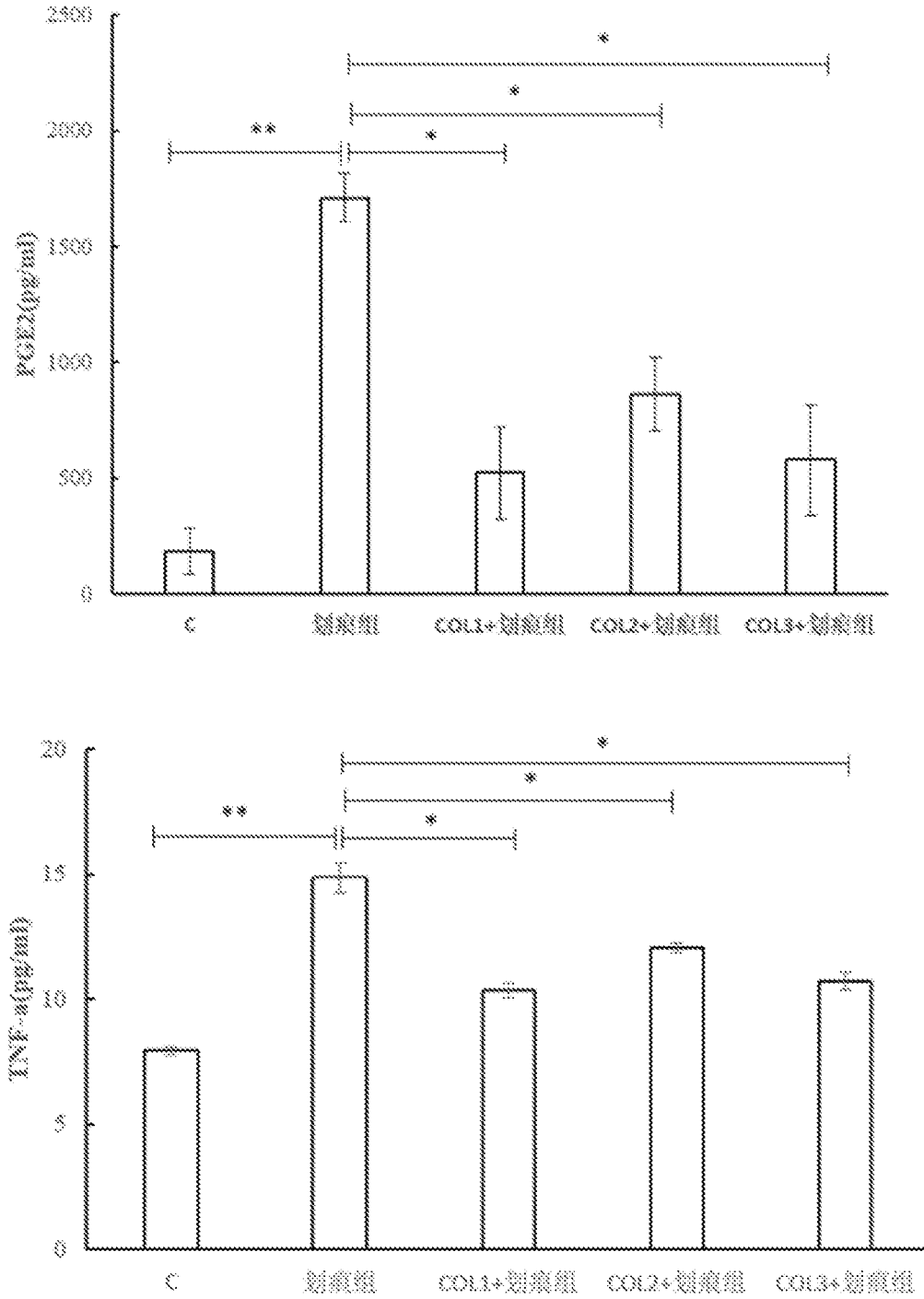
[图 5]



[图 6]



[图 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/103141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/78(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; A61K 38/39(2006.01)i; A61K 8/65(2006.01)i; A61P 29/00(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) IPC: C07K C12N A61K A61P		
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, WPABS, WPABSC, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, EPTXTC, CNKI, PUBMED, ISI web of science, Genbank, EMBL, STN, 万方数据库, WANFANG Database, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System. 胶原蛋白, 功能片段, 连接, 拼接, Type III collagen, Collagen, fragment, Stitching, Connect, Combination, Chimeric, 对SEQ ID NO: 1-6进行序列检索, sequence search for SEQ ID NOs: 1-6.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110606896 A (JIANGSU YUEZHI BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.) 24 December 2019 (2019-12-24) see claim 1, and embodiments 1-6, SEQ ID NO: 1	1-13
A	CN 114085284 A (XI'AN DENOVO HITH MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 25 February 2022 (2022-02-25) see claims 1-10, and SEQ ID NOs: 1-5	1-13
PX	CN 114805551 A (BLOOMAGE BIOTECHNOLOGY CORPORATION LIMITED; BLOOMAGE BIOTECHNOLOGY (TIANJIN) CO., LTD.) 29 July 2022 (2022-07-29) see claims 1-11, and SEQ ID NOs: 1-6	1-13
A	US 2006199180 A1 (MACINA ROBERTO A; SALCEDA SUSANA; LIU CHENGHUA; SUN YONGMING; TURNER LEAH R) 07 September 2006 (2006-09-07) see SEQ ID NO: 288	1-13
<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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 14 July 2023		Date of mailing of the international search report 30 July 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN2023/103141

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110606896	A	24 December 2019	None	
CN	114085284	A	25 February 2022	None	
CN	114805551	A	29 July 2022	None	
US	2006199180	A1	07 September 2006	WO	2004013311 A2 12 February 2004
				WO	2004013311 A3 04 May 2006
				US	7678889 B2 16 March 2010
				AU	2003258127 A1 23 February 2004

A. 主题的分类		
C07K 14/78(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; A61K 38/39(2006.01)i; A61K 8/65(2006.01)i; A61P 29/00(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)		
IPC: C07K C12N A61K A61P		
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))		
数据库: CNABS, WPABS, WPABSC, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, EPTXTC, CNKI, PUBMED, ISI web of science, Genbank, EMBL, STN, 万方数据库, 百度学术, 中国专利生物序列检索系统。 检索词: 胶原蛋白, 功能片段, 连接, 拼接, Type III collagen, Collagen, fragment, Stitching, Connect, Combination, Chimeric, 对 SEQ ID NO:1-6进行序列检索。		
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 110606896 A (江苏悦智生物医药有限公司) 2019年12月24日 (2019 - 12 - 24) 参见权利要求1, 实施例1-6, SEQ ID NO: 1	1-13
A	CN 114085284 A (西安德诺海思医疗科技有限公司) 2022年2月25日 (2022 - 02 - 25) 参见权利要求1-10, SEQ. ID. NO. 1-5	1-13
PX	CN 114805551 A (华熙生物科技股份有限公司 华熙生物科技(天津)有限公司) 2022年7月29日 (2022 - 07 - 29) 参见权利要求1-11, SEQ ID NO: 1-6	1-13
A	US 2006199180 A1 (MACINA ROBERTO A;SALCEDA SUSANA;LIU CHENGHUA;SUN YONGMING;TURNER LEAH R;) 2006年9月7日 (2006 - 09 - 07) 参见SEQ ID NO:288	1-13
A	EMBL NUMBER. "JB613164" EMBL, 2013年11月11日 (2013 - 11 - 11), 参见全文	1-13
<input 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。		
* 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 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "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		国际检索报告邮寄日期
2023年7月14日		2023年7月30日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		王雪
		电话号码 (+86) 010-62412261

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
 - a. 作为国际申请的一部分提交的;
 - b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/103141

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	110606896	A	2019年12月24日	无			
CN	114085284	A	2022年2月25日	无			
CN	114805551	A	2022年7月29日	无			
US	2006199180	A1	2006年9月7日	WO	2004013311	A2	2004年2月12日
				WO	2004013311	A3	2006年5月4日
				US	7678889	B2	2010年3月16日
				AU	2003258127	A1	2004年2月23日