



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111183152 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 201880063452.0

(22)申请日 2018.07.09

(30)优先权数据

2017-189789 2017.09.29 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/025846 2018.07.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/064807 JA 2019.04.04

(71)申请人 国立研究开发法人农业・食品产业

技术综合研究机构

地址 日本茨城县

(72)发明人 西村彩子 宫内翔平 竹泽俊明

宫崎步

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.

C07K 14/78(2006.01)

A61L 27/24(2006.01)

A61L 27/60(2006.01)

A61L 27/02(2006.01)

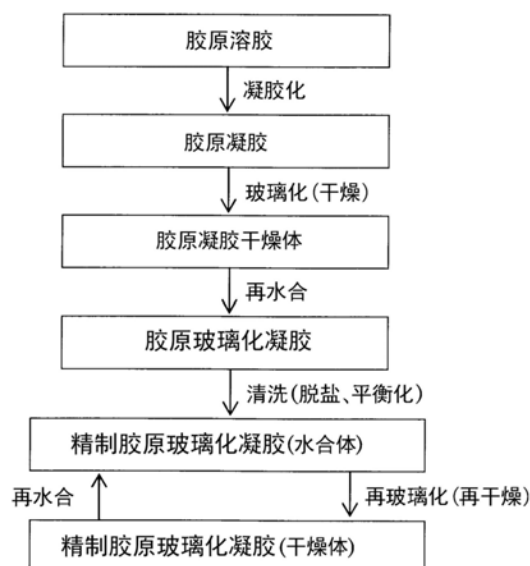
权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

胶原玻璃化凝胶及其精制物的制造方法以及通过该方法而得到的胶原玻璃化凝胶及其精制物

(57)摘要

本发明的目的在于,由胶原制造即使不进行交联处理膜强度也高、容易工业性地、机械性地制造、加工容易、处理容易、安全性高的胶原玻璃化凝胶及其精制物。一种胶原玻璃化凝胶的制造方法,其特征在于,将用于实现该目的的胶原利用含无机碳酸盐类和选自无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物的胶凝剂进行凝胶化,接着,将所得胶原凝胶玻璃化,进而对其施加水合处理;以及一种精制胶原玻璃化凝胶的制造方法,其特征在于,对该胶原玻璃化凝胶进行脱盐、平衡化,进而进行干燥;及通过这些方法而得到的胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶。



1. 一种胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其特征在于, 利用含有无机碳酸盐类和选自无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物的胶凝剂对胶原进行凝胶化, 接着, 对所得胶原凝胶进行玻璃化, 进而对其施加水合处理。

2. 根据权利要求1所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述胶原为源自猪皮肤的去端肽胶原。

3. 根据权利要求1或2所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 胶原与胶凝剂的混合物在25℃下的pH为6.2~9.8。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 胶原与胶凝剂的混合物中所包含的化合物的离子强度为0.07~0.22。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述无机碳酸盐类为无机碳酸盐或无机碳酸氢盐。

6. 根据权利要求5所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述无机碳酸盐为碳酸钠或碳酸钾。

7. 根据权利要求5或6所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述无机碳酸氢盐为碳酸氢钠或碳酸氢钾。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述无机氯化物为选自氯化钠、氯化钾、氯化镁和氯化钙组成的组中的1种以上。

9. 根据权利要求1~8中任一项所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述无机磷酸盐为选自磷酸钠、磷酸钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾和磷酸二氢钙组成的组中的1种以上。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的胶原玻璃化凝胶的制造方法, 其中, 所述胶凝剂不含源自培养基成分和有机缓冲剂成分的有机成分。

11. 一种精制胶原玻璃化凝胶水合体的制造方法, 其特征在于, 对利用权利要求1~10中任一项所述的制造方法而制备的胶原玻璃化凝胶进行脱盐、平衡化。

12. 一种精制胶原玻璃化凝胶干燥体的制造方法, 其特征在于, 对通过权利要求11的制造方法而制备的精制胶原玻璃化凝胶水合体进一步干燥并进行再玻璃化。

13. 一种精制胶原玻璃化凝胶水合体的制造方法, 其特征在于, 将通过权利要求12的制造方法而制备的精制胶原玻璃化凝胶干燥体进一步再水合。

14. 一种胶原玻璃化凝胶, 其通过权利要求1~10中任一项所述的方法而得到。

15. 一种生物体移植材料, 其至少包含权利要求14所述的胶原玻璃化凝胶。

16. 根据权利要求15所述的生物体移植材料, 其在使用前不负载细胞。

17. 一种医疗用人工皮肤, 其至少包含权利要求14所述的胶原玻璃化凝胶。

18. 一种精制胶原玻璃化凝胶水合体, 其通过权利要求11或13中任一项所述的方法而得到。

19. 一种生物体移植材料, 其至少包含权利要求18所述的精制胶原玻璃化凝胶水合物。

20. 根据权利要求19所述的生物体移植材料, 其在使用前不负载细胞。

21. 一种医疗用人工皮肤, 其至少包含权利要求18所述的精制胶原玻璃化凝胶水合物。

22. 一种精制胶原玻璃化凝胶干燥体, 其是通过权利要求12所述的方法而得到的。

23. 一种生物体移植材料, 其至少包含权利要求22所述的精制胶原玻璃化凝胶干燥体。

24. 根据权利要求23所述的生物体移植材料,其在使用前不负载细胞。
25. 一种医疗用人工皮肤,其至少包含权利要求22所述的精制胶原玻璃化凝胶干燥体。
26. 一种胶原凝胶干燥体,其通过如下方式而得到:利用含无机碳酸盐类和选自由无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物的胶凝剂对胶原进行凝胶化,接着,对所得胶原凝胶进行玻璃化,从而得到。

胶原玻璃化凝胶及其精制物的制造方法以及通过该方法而得到的胶原玻璃化凝胶及其精制物

技术领域

[0001] 本发明涉及胶原玻璃化凝胶及其精制物的制造方法。更详细而言,涉及将胶原进行纤维化且可利用于医疗用途等的胶原玻璃化凝胶、精制胶原玻璃化凝胶和它们的制造方法。

背景技术

[0002] 胶原是生物体内存在的蛋白质之一。在人体中占据全身蛋白质的约30%,尤其是大量存在于皮肤、骨、软骨、腱和血管壁中。胶原的分子量约为30万,形成了包含3条分子量约10万的多肽链的三螺旋结构。该胶原根据成为其来源的动物及其组织而存在氨基酸排序和氨基酸组成比不同的多个分子种类。

[0003] 已知胶原在生物体内作为细胞外基质而发挥出作为细胞的骨架的作用,同时对增殖、分化和形态形成造成影响,一直以来作为细胞培养载体而进行利用,近年来,还用作生物体移植材料。

[0004] 其中,作为细胞培养载体而实施了胶原涂覆的各种培养皿、烧瓶已经有市售,此外,已知使细胞分散至胶原凝胶中来进行培养的包埋培养法。另一方面,作为生物体移植材料,存在负载了细胞的胶原凝胶材料、在溶液状态下进行移植并使在生物体内凝胶化的可注射凝胶、胶原凝胶干燥而加工成膜状或海绵状的材料等。

[0005] 此外,作为包含胶原的生物体移植材料,非专利文献1公开了一种软骨移植用材料,专利文献1公开了一种生物体内注入用凝胶化材料,专利文献2公开了一种人工皮肤材料等。像这样,包含胶原的生物体移植材料的形状多种多样,但应用胶原凝胶并加工、成形而得到的材料较多。

[0006] 已知这种胶原凝胶通过将胶原溶液置于生理性盐浓度、氢离子浓度和温度条件下而得到,作为用于此的胶凝剂,通常使用各种细胞培养液、生理盐水、在中性区域具有缓冲能力的缓冲液。

[0007] 然而,期待其作为生物体移植材料而进行应用的新型胶原蛋白材料有“胶原玻璃化凝胶”。“玻璃化凝胶(Vitrigel)(注册第5602094号商标)”是指由竹泽等人命名的新术语,定义为对以往的细胞外基质等水凝胶进行玻璃化(vitrification)后,再进行再水合而得到的处于稳定状态的凝胶(非专利文献2)。由作为一种细胞外基质的胶原形成的胶原玻璃化凝胶包含高密度的胶原纤维。

[0008] 利用了该胶原玻璃化凝胶的薄膜具有比以往的板状胶原凝胶材料更薄且强度高的特征,期待其用作生物体移植材料,例如,非专利文献3公开了一种包含以源自猪皮肤的去端肽胶原作为原料的胶原玻璃化凝胶薄膜的软骨移植用材料。此外,以源自牛皮肤的天然胶原作为原料的胶原玻璃化凝胶干燥体薄膜已经作为细胞培养用基材进行了产品化(关东化学公司, #ad-MED玻璃化凝胶(商标名))。

[0009] 对于该胶原玻璃化凝胶的制造而言,首先需要制备胶原凝胶。以往在制备胶原凝

胶时,如上所述将一般的细胞培养液、例如达尔伯克改良伊格尔培养液(DMEM)用作胶凝剂。此外,非专利文献4公开了一种将添加有HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)的DMEM作为胶凝剂且由源自猪皮肤的去端肽胶原来制备胶原玻璃化凝胶的方法。

[0010] 然而,以DMEM作为胶凝剂而得到胶原凝胶的方法是在体外(in vitro)试验的包埋培养法中一直以来使用的制备方法,但作为生物体移植材料的制备方法并不优选。这是因为:DMEM中包含超过30种的化合物,但其中参与胶原凝胶化的化合物是极少的一部分,为了在作为生物体移植材料的胶原玻璃化凝胶的制备中使用DMEM,需要确认超过30种的、化合物的安全性且设定残留允许限度值,对于制造者而言负担较大。

[0011] 作为上述问题的解决方法的一个例子,前述非专利文献4公开了将添加有HEPES的磷酸缓冲液(PBS)用于胶凝剂而得到的胶原玻璃化凝胶。然而,将该溶液作为胶凝剂而制备的胶原玻璃化凝胶存在强度低、不适合生物体移植材料的问题,且指出了HEPES本身也存在安全性的悬念。

[0012] 此外,不限于通过上述方法而得到的产物,作为弥补胶原玻璃化凝胶的低强度的方法,已知通过基于添加交联剂的化学交联、基于照射紫外线或伽马射线的物理交联来提高膜强度的方法。但是,假设将其用作生物体移植材料的情况,担心基于化合物的交联与其添加的化合物的生物体毒性有关,此外,担心紫外线、伽马射线的照射存在胶原变性,因此理想的是不进行这些交联处理。

[0013] 综上所述,寻求开发出选择安全性高的化合物作为胶凝剂的成分且既能尽可能地简化组成又能制备最终具有足够强度的胶原玻璃化凝胶的方法。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:日本专利第6071468号公报

[0017] 专利文献2:日本专利第4674211号公报

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:菅原桂、“基于培养软骨的软骨缺损治疗的最新进展”《培養軟骨による軟骨欠損治療の最近の進歩》、人工臓器、日本人工臓器学会、2013年、42卷、3号、P.198-200

[0020] 非专利文献2:Toshiaki Takezawa、“Collagen Vitrigel:A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids”、Cell Transplantation、(2004)、Vol13、p.463-473

[0021] 非专利文献3:Hideaki Maruki、“Effects of a cell-free method using collagen vitrigel incorporating TGF- β 1 on articular cartilage repair in a rabbit osteochondral defect model”、Journal of Biomedical Materials Research B、(2016)

[0022] 非专利文献4:“医药品作物、医疗用原材料等的开发研究成果第561集”、日本农林水产省农林水产技术会议事務局、2016年、P.315-322

发明内容

[0023] 发明要解决的问题

[0024] 本发明的课题在于,考虑到上述情况,开发仅由对于生物体的安全性高的化合物构成的简单组成的胶凝剂,并由胶原制造即使不进行交联处理其膜强度高、容易工业性地、机械性地制造、加工容易、处理容易的胶原玻璃化凝胶及其精制物。

[0025] 即,本发明的目的在于,提供使用仅包含对于生物体的安全性高的化合物的简单组成的胶凝剂,将胶原进行纤维化而得到的胶原玻璃化凝胶、其精制物和它们的制造方法,其是膜强度高、容易工业性地、机械性地制造、加工容易、处理容易、生物体安全性高、也可用作医疗用途的胶原玻璃化凝胶及其精制物和它们的低成本的制造方法。

[0026] 用于解决问题的方案

[0027] 关于胶原凝胶的制造中使用的胶凝剂,本发明人等反复进行了深入研究,结果发现:通过将含有无机碳酸盐、无机碳酸氢盐等无机碳酸盐类中的至少1种化合物以及无机氯化物、无机磷酸盐中的至少1种化合物的溶液用作胶凝剂,即使不使用以往的培养基成分、有机系缓冲成分也能够制造胶原凝胶,而且,所得胶原凝胶不含除了上述无机成分之外的成分,因此已知其安全性高。而且发现:由该胶原凝胶衍生的胶原玻璃化凝胶、其精制物的膜强度高,容易制造、加工,容易处理,从而完成了本发明。

[0028] 即,本发明是一种胶原玻璃化凝胶的制造方法,其特征在于,利用含有无机碳酸盐类和选自由无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物的胶凝剂对胶原进行凝胶化,接着,将所得胶原凝胶干燥而进行玻璃化,进而对其施加水合处理。

[0029] 此外,本发明是一种精制胶原玻璃化凝胶(水合体),其特征在于,将通过上述制造方法而制备的胶原玻璃化凝胶进行脱盐、平衡化;以及一种精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)的制造方法,其特征在于,将精制胶原玻璃化凝胶(水合体)进一步干燥并进行再玻璃化。

[0030] 进而,本发明是通过上述方法而得到的胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶。

[0031] 发明的效果

[0032] 本发明方法中,不向胶原的胶凝剂中配混培养基成分、有机系缓冲成分等有机化合物,仅使用无机盐类,因此,所生成的凝胶中的残留成分少且其组成明确,可以得到不易发生因夹杂物的问题的胶原凝胶。

[0033] 因此,由该胶原凝胶制造的胶原玻璃化凝胶、进而由其衍生的精制胶原玻璃化凝胶对于生物体的安全性高,例如可有利地用于包括生物体移植在内的医疗用途。

附图说明

[0034] 图1是针对本发明的胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶简单地示出其制法、关系等的附图。

具体实施方式

[0035] 本说明书中,如图1所示那样,胶原玻璃化凝胶是指对通过干燥胶原凝胶而使其玻璃化的胶原凝胶干燥体(胶原干凝胶)进行再水合而得到的产物。此外,精制胶原玻璃化凝胶是指对该胶原玻璃化凝胶进行脱盐处理后再平衡化而得到的产物、将其进一步干燥并进行再玻璃化的产物及其再水合物。

[0036] 本发明的胶原玻璃化凝胶如下获得:对胶原及含有无机碳酸盐类和选自由无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物(无机盐)的水溶液进行混合而制备胶原凝胶,接

着,通过对其干燥而进行玻璃化,将由此得到的胶原凝胶干燥体进一步水合而得到。

[0037] 更详细而言,胶原玻璃化凝胶如下制造。即,首先通过对胶原溶液及含有前述无机碳酸盐类和选自由无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物的水溶液(以下有时简称为“胶凝剂”)进行混合而制成胶原溶胶,将该胶原溶胶加热而使其纤维化,从而制成胶原凝胶。接着,通过对将其干燥、玻璃化而得到的胶原凝胶干燥体进行水合处理,由此得到胶原玻璃化凝胶。

[0038] 此外,精制胶原玻璃化凝胶通过将如上那样得到的胶原玻璃化凝胶进一步进行脱盐(清洗)、平衡化而得到,进而通过使其干燥、再玻璃化,并根据需要进行再水合而得到。

[0039] 为了通过本发明方法来制备胶原玻璃化凝胶,首先,需要将胶原与胶凝剂进行混合来制备胶原凝胶。

[0040] 关于本发明中使用的胶原,对于成为其来源的动物种类没有特别限定,可以使用各种动物。例如,作为其来源,可以利用源自哺乳类的胶原(例如源自牛的胶原、源自猪的胶原、源自山羊的胶原、源自绵羊的胶原或源自猴子的胶原)、源自鸟类的胶原(例如源自鸡的胶原、源自鹅的胶原、源自鸭的胶原或源自鸵鸟的胶原)、源自鱼类的胶原(例如源自大马哈鱼的胶原、源自鲷鱼的胶原、源自金枪鱼的胶原、源自吴郭鱼的胶原或源自鲸鱼的胶原)、源自爬虫类的胶原(例如源自鳄鱼的胶原)、源自两栖类的胶原(例如源自青蛙的胶原)、源自无脊椎动物的胶原(例如源自水母的胶原)。此外,针对前述胶原的来源部位,没有特别限定,可列举出例如皮肤、骨、软骨、肌肉或鳞片。

[0041] 本发明中,优选使用的胶原是在人类的生物体温度即37℃以下稳定而不会变性的胶原。胶原的变性温度与成为其来源的生物的生存区域有关,鱼类等水生生物的胶原与人类的胶原相比在低温区域存在变性温度。因此,优选为源自胶原的变性温度接近人类的陆生生物的胶原,从工业稳定供给的方面出发,优选由畜产动物获得胶原。作为畜产动物,可列举出牛、猪,牛存在保留BSE(疯牛病)等病原体的危险性而不优选,优选猪。

[0042] 进而,本发明中使用的胶原只要是纤维性胶原,则对其分子结构没有限定,作为分子种类(类型),可列举出例如I型胶原蛋白、II型胶原蛋白、III型胶原蛋白或V型胶原蛋白。尤其是,以I型胶原蛋白或III型胶原蛋白作为主要成分而构成的胶原蛋白的工业产量大,且能够以相对低廉的价格稳定地供给,从这方面出发是优选的。此外,存在于胶原分子末端的非螺旋结构区(端肽)具有抗原性,因此,更优选使用通过酶处理而去除该端肽(去端肽化)后的去端肽胶原。

[0043] 该胶原优选在凝胶化时以溶解于水等溶剂的溶液状态来使用,更优选pH为2.0~6.0的酸增溶胶原溶液。pH小于2.0时,存在胶原分子发生水解的可能性,pH高于6.0时,存在无法使胶原充分增溶的可能性,均不优选。

[0044] 此外,针对凝胶化时的胶原溶液的胶原浓度,只要胶原的溶解性、胶原溶液的粘性不妨碍胶原凝胶的制造,且所得胶原玻璃化凝胶的物性足以用于其用途,就没有限定,与胶凝剂混合后的最终浓度优选为0.05w/v%~5.0w/v%的范围,进一步优选为0.2w/v%~2.0w/v%的范围。

[0045] 另一方面,如上所述,在胶原的凝胶化时使用的胶凝剂是含有无机碳酸盐类(无机碳酸盐、无机碳酸氢盐)和选自由无机氯化物和无机磷酸盐组成的组中的化合物(以下有时简称为“无机盐类”)的水溶液。

[0046] 本发明中,作为胶凝剂的成分而使用的无机碳酸盐类只要对于水为易溶性,则对其分子结构就没有限定,可以利用例如碳酸钠、碳酸钾等无机碳酸盐;碳酸氢钠、碳酸氢钾等无机碳酸氢盐。

[0047] 此外,作为胶凝剂的其它成分而使用的无机盐类只要属于无机氯化物、无机磷酸盐,且易溶于水,则对其分子结构就没有限定,可以利用例如氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙等无机氯化物;磷酸钠、磷酸钾、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸二氢钙等无机磷酸类。

[0048] 关于该胶凝剂中的无机碳酸盐类和无机盐类(无机氯化物或无机磷酸盐)的种类或其组合,只要在混合胶原溶液时能够引发胶原的纤维化(自组装化),就没有特别限定,需要含有无机碳酸盐类之中的至少1种以及无机氯化物、无机磷酸盐中的至少1种化合物。

[0049] 此外,将胶凝剂与胶原溶液混合后的溶液(胶原溶胶)在25℃下的pH优选处于6.2~9.8的范围,更优选为6.8~9.0。进而,作为无机碳酸盐类和无机盐类在胶凝剂中的浓度,在胶原溶胶中的离子强度优选处于0.07~0.22的范围,更优选处于0.07~0.18的范围。

[0050] 本发明中,对将胶凝剂与胶原溶液混合而制备的胶原溶胶进行加热而使胶原纤维化,从而制成胶原凝胶,但此时的温度优选基于所使用的胶原的变性温度来确定。胶原的纤维化在胶原的变性温度附近发生,在明显低于变性温度的温度下不会发生纤维化。即,与变性温度相比低20℃以上,优选为变性温度以下的范围。例如,源自猪的胶原的变性温度为41℃,因此,优选为21℃~41℃的范围。

[0051] 接下来对如上操作而得到的胶原凝胶进行干燥、玻璃化而制成胶原凝胶干燥体(胶原干凝胶)。该“玻璃化(vitrification)”是指通过例如将鸡蛋的蛋白(蛋清)等的热变性蛋白质的水凝胶干燥而充分去除水分,由此变换成硬质且透明度高的玻璃状物质的现象(Takushi Eisei、“Edible eyeballs from fish”、*Nature*、1990年、Vol345、p.298-299)。

[0052] 本发明方法中,作为用于将胶原凝胶玻璃化的干燥方法,优选使用风干,此外,作为其温度,优选为胶原的变性温度以下。

[0053] 更具体而言,优选的是:风干使用恒温恒湿机,在例如温湿度条件为10℃、40%rh左右的条件下使胶原凝胶静置2天,从而进行胶原凝胶的玻璃化。

[0054] 接下来通过使这样操作而得到的胶原凝胶干燥体再水合而制成胶原玻璃化凝胶。胶原凝胶干燥体的再水合所使用的溶液可列举出含有本发明的胶凝剂所含成分的例如生理盐水、磷酸缓冲液、纯化水等pH处于中性区域(例如pH为6.0~8.0左右)的水溶液。该再水合中使用的溶液与制造胶原凝胶时的胶凝剂及其组成、浓度无需相同,且不限于此。

[0055] 在上述再水合时,优选将每10mg胶原凝胶干燥体在1mL以上的D-PBS(-)中浸渍30分钟以上而使其水合。水合所使用的水溶液的温度优选为明显小于所使用的胶原的变性温度的温度,优选与变性温度相比低20℃以下。

[0056] 如上操作,以水合物的形式制备胶原玻璃化凝胶。该胶原玻璃化凝胶本身的强度高,容易工业性地、机械性地制造、加工容易、处理容易。并且,该胶原玻璃化凝胶仅使用无机碳酸盐类、无机氯化物、无机磷酸盐等无机化合物作为其制造工序中使用的胶凝剂、再水合剂的成分,不使用以往使用的培养基成分、有机物,因此,可作为例如生物体安全性高的医疗用胶原玻璃化凝胶而进行利用。

[0057] 需要说明的是,上述胶原玻璃化凝胶可通过进一步实施脱盐处理、平衡化处理,然

后使其干燥而制成精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0058] 前述胶原凝胶干燥体(胶原干凝胶)是将胶原凝胶进行干燥而得到的,因此存在所使用的胶凝剂中含有的无机化合物因干燥而被浓缩而以晶体的形式析出的情况。在胶原玻璃化凝胶干燥体的表面不均匀地析出晶体,因此,有可能损害外观且产品的均匀性产生问题。

[0059] 与此相对,通过对胶原玻璃化凝胶进行脱盐处理、平衡化处理,能够获得均匀性高且外观良好的精制胶原玻璃化凝胶(水合体)。此处进行的脱盐处理通过将胶原玻璃化凝胶浸渍于pH处于中性区域(例如pH为6.0~8.0左右)的水溶液中进行,优选浸渍于D-PBS(-)中进行。具体而言,可以将例如每10mg胶原凝胶干燥体浸渍于1mL以上的D-PBS(-)中而使其水合来制成胶原玻璃化凝胶后,去除胶原玻璃化凝胶周围的D-PBS(-),进而在D-PBS(-)中浸渍2次以上,由此进行基于胶原玻璃化凝胶的脱盐、D-PBS(-)的平衡化。

[0060] 该操作中的水溶液的温度优选为明显小于所使用的胶原的变性温度的温度,优选与变性温度相比低20℃以下。

[0061] 进而,用于精制胶原玻璃化凝胶(水合体)的再玻璃化的干燥优选使用风干,此外,作为其温度,优选为胶原的变性温度以下。更具体而言,风干优选使用恒温恒湿机,优选例如使精制胶原玻璃化凝胶(水合体)在温湿度条件为10℃、40%rh的恒温恒湿机内静置1天来进行干燥。

[0062] 如上所述,通过上述说明的方法而制备的胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶本身具有足够的强度且安全性高,因此,尤其是可用作医疗用途的再生医疗用细胞载体、创伤覆盖材料、人工皮肤、防粘连材等的设备。此外,其形状也可根据其用途而加工成任意的形状、例如板状、膜状、棒状、丝状、筒状、管状、袋状等。

[0063] 实施例

[0064] 以下示出实施例,更具体地说明本发明,但本发明不限于这些实施例,可以在不超过本发明的技术思想的范围内进行各种变更。

[0065] 实施例1

[0066] (胶原溶液的制备)

[0067] 将源自猪皮肤的去端肽胶原(Nippon Ham Co.,Ltd.、#NMP Collagen PS)2g溶解于灭菌水200mL,制备1w/v%胶原溶液。

[0068] (胶凝剂的制备)

[0069] 向磷酸缓冲生理盐水(D-PBS(-);和光纯药工业株式会社、#045-29795)500mL中添加碳酸氢钠(和光纯药工业株式会社、#191-01305)1.85g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0070] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0071] 向50mL容量的锥形管(Corning、#352070)中分别采取20mL的胶凝剂和1w/v%胶原溶液并均匀混合,将其制成胶原溶胶。胶原溶胶的制备在冰冷下进行。接着,在聚苯乙烯方型培养皿(AS-ONE Co.,Ltd. #D210-16)中放置亚克力圆筒模具(VIDTEC、外径38.8mm×内径34.8mm×高度30.0mm),向该模具内填充胶原溶胶10mL。在37℃的恒温机内静置2小时而使胶原纤维化,得到胶原凝胶。

[0072] 将该胶原凝胶在恒温恒湿机(温湿度条件为10℃、40%rh)中干燥2天,使其玻璃化而得到胶原凝胶干燥体。进而,将每10mg该胶原凝胶干燥体浸渍于1mL的D-PBS(-)中使其水

合,得到胶原玻璃化凝胶。

[0073] 通过将上述胶原玻璃化凝胶用D-PBS (-) 清洗2次而去除过量的盐,将胶原玻璃化凝胶内平衡化至D-PBS (-) 后,再次在恒温恒湿机(温湿度条件为10℃、40%rh)中干燥2天,得到精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0074] 实施例2

[0075] (胶凝剂的制备)

[0076] 采取氯化钠(和光纯药工业株式会社、#191-01665) 3.21g、磷酸二氢钾(和光纯药工业株式会社、#169-04245) 3.40g、碳酸氢钠1.85g,溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0077] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0078] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0079] 实施例3

[0080] (胶凝剂的制备)

[0081] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠1.85g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0082] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0083] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0084] 实施例4

[0085] (胶凝剂的制备)

[0086] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠0.42g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0087] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0088] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0089] 实施例5

[0090] (胶凝剂的制备)

[0091] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠0.84g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0092] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0093] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0094] 实施例6

[0095] (胶凝剂的制备)

[0096] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠2.27g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0097] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0098] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0099] 实施例7

[0100] (胶凝剂的制备)

[0101] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠0.42g和碳酸钠(和光纯药工业株式会

社、#196-01595) 0.53g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0102] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0103] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0104] 实施例8

[0105] (胶凝剂的制备)

[0106] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠1.85g和碳酸钠0.53g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0107] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0108] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0109] 实施例9

[0110] (胶凝剂的制备)

[0111] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠2.94g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0112] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0113] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0114] 实施例10

[0115] (胶凝剂的制备)

[0116] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠0.46g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0117] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0118] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0119] 实施例11

[0120] (胶凝剂的制备)

[0121] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠0.84g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0122] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0123] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0124] 实施例12

[0125] (胶凝剂的制备)

[0126] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠2.52g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0127] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0128] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0129] 实施例13

[0130] (胶凝剂的制备)

[0131] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠2.94g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0132] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0133] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0134] 实施例14

[0135] (胶凝剂的制备)

[0136] 采取氯化钠3.21g、碳酸氢钠3.36g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0137] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0138] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0139] 实施例15

[0140] (胶凝剂的制备)

[0141] 采取氯化钠3.21g、氯化钾(和光纯药工业株式会社、#163-03545)0.10g、氯化钙(和光纯药工业株式会社、#039-00475)0.10g、磷酸二氢钠一水合物(Millipore#10049-21-5)0.07g、碳酸氢钠0.42g、碳酸钠0.53g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0142] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0143] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0144] 实施例16

[0145] (胶凝剂的制备)

[0146] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠1.85g、碳酸钠1.59g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0147] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0148] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0149] 实施例17

[0150] (胶凝剂的制备)

[0151] 采取氯化钠1.17g、碳酸氢钠4.62g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0152] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0153] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0154] 实施例18

[0155] (胶凝剂的制备)

[0156] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠0.42g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0157] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0158] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0159] 实施例19

[0160] (胶凝剂的制备)

[0161] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸

氢钠0.84g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0162] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0163] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0164] 实施例20

[0165] (胶凝剂的制备)

[0166] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠1.68g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0167] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0168] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0169] 实施例21

[0170] (胶凝剂的制备)

[0171] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠2.52g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0172] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0173] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0174] 实施例22

[0175] (胶凝剂的制备)

[0176] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠3.36g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0177] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0178] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0179] 实施例23

[0180] (胶凝剂的制备)

[0181] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠4.20g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0182] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0183] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0184] 实施例24

[0185] (胶凝剂的制备)

[0186] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸钠0.53g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0187] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0188] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0189] 实施例25

[0190] (胶凝剂的制备)

[0191] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸钠1.06g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0192] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0193] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0194] 实施例26

[0195] (胶凝剂的制备)

[0196] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠0.84g、碳酸钠0.27g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0197] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0198] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0199] 实施例27

[0200] (胶凝剂的制备)

[0201] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠0.84g、碳酸钠0.53g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0202] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0203] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0204] 实施例28

[0205] (胶凝剂的制备)

[0206] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠0.84g、碳酸钠1.06g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0207] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0208] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0209] 实施例29

[0210] (胶凝剂的制备)

[0211] 向磷酸缓冲生理盐水500mL中添加碳酸氢钠0.21g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0212] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0213] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0214] 实施例30

[0215] (胶凝剂的制备)

[0216] 向汉克斯缓冲盐类溶液(HBSS(-);和光纯药工业株式会社、#085-09355) 500mL中添加碳酸钠0.85g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0217] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0218] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0219] 实施例31

[0220] (胶凝剂的制备)

[0221] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸钠0.27g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0222] (胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶的制备)

[0223] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,利用与实施例1相同的方法制备胶原玻璃化凝胶和精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)。

[0224] 比较例1

[0225] (胶凝剂的制备)

[0226] 向达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)490mL中添加1mol/L HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸);Thermo Fisher Scientific、#15630-080)10mL,均匀混合而将其作为胶凝剂。

[0227] (胶原玻璃化凝胶和胶原玻璃化凝胶干燥体的制备)

[0228] 向50mL容量的锥形管中分别采取20mL的上述胶凝剂和实施例1的1w/v%胶原溶液并均匀混合而将其制成胶原溶胶。胶原溶胶的制备在冰冷下进行。接着,在聚苯乙烯方型培养皿中放置亚克力圆筒模具,向该模具内填充胶原溶胶10mL。在37℃的二氧化碳孵化器(CO₂为5%)内静置2小时,使胶原进行纤维化而得到胶原凝胶。

[0229] 将该胶原凝胶在恒温恒湿机中干燥,使其玻璃化而得到胶原凝胶干燥体。进而,将每10mg该胶原凝胶干燥体浸渍在1mL的D-PBS(-)而使其水合,得到胶原玻璃化凝胶。通过将胶原玻璃化凝胶用D-PBS(-)清洗2次而去除过量的盐、其它成分,使胶原玻璃化凝胶内平衡化至D-PBS(-)后,再次干燥而得到胶原玻璃化凝胶的对应干燥体。

[0230] 比较例2

[0231] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0232] 除了将胶凝剂变更为D-PBS(-)之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,暂时凝胶化的胶原凝胶在接下来的工序中发生溶解、溶胶化,因此无法以胶原凝胶干燥体的形式回收,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0233] 比较例3

[0234] (胶凝剂的制备)

[0235] 采取氯化钠8.77g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0236] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0237] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,暂时凝胶化的胶原凝胶在接下来的工序中发生溶解、溶胶化,因此,无法以胶原凝胶干燥体的形式回收,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0238] 比较例4

[0239] (胶凝剂的制备)

[0240] 采取氯化钠1.75g、磷酸二氢钠一水合物0.14g、磷酸氢二钠(和光纯药工业株式会社、#197-02865)1.35g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0241] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0242] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,暂时凝胶化的胶原凝胶在接下来的工序中发生溶解、溶胶化,因此,无法以胶原凝胶干燥体的形式回收,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0243] 比较例5

[0244] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0245] 除了将胶凝剂变更为HBSS(-)之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0246] 比较例6

[0247] (胶凝剂的制备)

[0248] 向HBSS(-) 500mL中添加碳酸钠2.12g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0249] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0250] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0251] 比较例7

[0252] (胶凝剂的制备)

[0253] 向HBSS(-) 500mL中添加碳酸钠4.24g,使其溶解而制成胶凝剂。

[0254] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0255] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0256] 比较例8

[0257] (胶凝剂的制备)

[0258] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0259] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0260] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0261] 比较例9

[0262] (胶凝剂的制备)

[0263] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸氢钠0.21g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0264] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0265] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0266] 比较例10

[0267] (胶凝剂的制备)

[0268] 采取氯化钠3.21g、氯化钾0.10g、氯化钙0.10g、磷酸二氢钠一水合物0.07g、碳酸钠2.12g,将其溶解于灭菌水500mL中,将其作为胶凝剂。

[0269] (胶原玻璃化凝胶的制备)

[0270] 除了将胶凝剂变更为上述胶凝剂之外,尝试利用实施例1的方法来制备胶原玻璃化凝胶。但是,由于胶原未发生凝胶化而无法获得胶原凝胶,无法获得胶原玻璃化凝胶。

[0271] 试验例1

[0272] 物性测定:

[0273] 通过下述方法进行实施例1~31和比较例1~10的胶原溶胶所包含的无机化合物的浓度及其离子强度和pH、实施例1~3、实施例8、实施例10、实施例12、实施例18、实施例23~25、实施例27、实施例29~31和比较例1的精制胶原玻璃化凝胶(水合体)的膜强度测定。将其结果示于表1~表7。

[0274] (pH测定)

[0275] 针对实施例1~29和比较例1~10的凝胶化前的胶原溶胶,测定pH。pH测定通过将各胶原溶胶0.5mL放入pH计(堀场制作所、#LAQUAtwin AS-712)的测定电极皿中测定其pH来进行。

[0276] (离子强度计算)

[0277] 将胶原溶胶所包含的化合物(不包括胶原在内)的离子种A、B、C...各自的摩尔浓度(mol/L)记作 m_A 、 m_B 、 m_C ...,并将各自的电荷数记作 Z_A 、 Z_B 、 Z_C ...时,用下式定义该胶原溶胶的离子强度I。

[0278] 式1

$$[0279] \quad I = \frac{1}{2} \sum_i m_i Z_i^2 \quad (i = A, B, C, \dots)$$

[0280] (膜强度测定)

[0281] 测定实施例1~3、实施例8、实施例10、实施例12、实施例18、实施例23~25、实施例27、实施例29~31和比较例1的精制胶原玻璃化凝胶(水合体)的膜强度。精制胶原玻璃化凝胶(水合体)的膜强度通过下述方法进行测定。即,将直径34.8mm的精制胶原玻璃化凝胶(干燥体)浸渍于8ml的D-PBS(-)中,进行1小时的再水合。将通过水合而得到的精制胶原玻璃化凝胶(水合体)用2片中央开有直径5mm孔的直径50mm的亚克力板夹持并固定。相对于从该直径5mm的孔观察的已被固定的膜,将直径1.0mm的不锈钢制针以3.0mm/分钟的速度垂直地进行穿刺,使用小型台式试验机(岛津制作所、#EZ-SX、测力传感器最大载荷为5N)测定至针贯穿精制胶原玻璃化凝胶(水合体)为止的最大应力(N)。针对1个精制胶原玻璃化凝胶(水合体)进行三处测定,将其平均值作为最大应力(N)。对于3个精制胶原玻璃化凝胶(水合体)进行该操作,将3个最大应力的平均值作为膜强度(N)。

[0282] [表1]

[0283]

		实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6
浓度 (mmol /L)	NaCl	68	55	55	68	68	68
	KCl	1.4	—	—	1.4	1.4	1.4
	CaCl ₂	—	—	—	—	—	—
	MgSO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—
	KH ₂ PO ₄	0.8	5	—	0.8	0.8	0.8
	Na ₂ HPO ₄	4	—	—	4	4	4
	NaHCO ₃	22	22	22	5	10	27
	Na ₂ CO ₃	—	—	—	—	—	—
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无	无
离子强度		0.165	0.151	0.121	0.113	0.128	0.179
pH		7.5	7.3	7.4	7.2	7.2	7.4
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		0.021± 0.002	0.025± 0.002	0.028± 0.003	无数据	无数据	无数据
备注							

[0284] [表2]

		实施例7	实施例8	实施例9	实施例10	实施例11	实施例12
浓度 (mmol /L)	NaCl	68	68	68	55	55	55
	KCl	1.4	1.4	1.4	—	—	—
	CaCl ₂	—	—	—	—	—	—
	MgSO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—
	KH ₂ PO ₄	0.8	0.8	0.8	—	—	—
	Na ₂ HPO ₄	4	4	4	—	—	—
	NaHCO ₃	5	22	35	5.5	10	30
	Na ₂ CO ₃	5	5	—	—	—	—
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无	无
离子强度		0.128	0.179	0.203	0.072	0.085	0.145
pH		9.0	8.6	7.7	7.0	7.0	7.4
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		无数据	0.067± 0.013	无数据	0.024± 0.003	无数据	0.025± 0.004
备注							

[0286] 表3

[0287]

		实施例13	实施例14	实施例15	实施例16	实施例17	实施例18
浓度 (mmol /L)	NaCl	55	55	55	55	20	55
	KCl	—	—	2.6	2.6	—	2.6
	CaCl ₂	—	—	0.9	0.9	—	0.9
	MgSO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	—	—	0.5	0.5	—	0.5
	KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—
	Na ₂ HPO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaHCO ₃	35	40	5	22	55	5
	Na ₂ CO ₃	—	—	5	15	—	—
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无	无
离子强度		0.160	0.175	0.093	0.174	0.185	0.078
pH		7.5	7.7	9.0	9.4	7.9	6.3
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		无数据	无数据	无数据	无数据	无数据	0.019± 0.002
备注							

[0288] [表4]

[0289]

		实施例 19	实施例 20	实施例 21	实施例 22	实施例 23	实施例 24
浓度 (mmol /L)	NaCl	55	55	55	55	55	55
	KCl	2. 6	2. 6	2. 6	2. 6	2. 6	2. 6
	CaCl ₂	0. 9	0. 9	0. 9	0. 9	0. 9	0. 9
	MgSO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5
	KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	—	—
	Na ₂ HPO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaHCO ₃	10	20	30	40	50	—
	Na ₂ CO ₃	—	—	—	—	—	5
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无	无
离子强度		0. 093	0. 123	0. 153	0. 183	0. 213	0. 078
pH		6. 7	7. 1	7. 2	7. 8	8. 5	9. 3
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		无数据	无数据	无数据	无数据	0. 033± 0. 005	0. 042± 0. 005
备注							

[0290] [表5]

[0291]

		实施例 25	实施例 26	实施例 27	实施例 28	实施例 29	实施例 30
浓度 (mmol /L)	NaCl	55	55	55	55	68	68. 5
	KCl	2. 6	2. 6	2. 6	2. 6	1. 4	2. 7
	CaCl ₂	0. 9	0. 9	0. 9	0. 9	—	—
	MgSO ₄	—	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	0. 5	0. 5	0. 5	0. 5	—	—
	KH ₂ PO ₄	—	—	—	—	0. 8	0. 2
	Na ₂ HPO ₄	—	—	—	—	4	0. 2
	NaHCO ₃	—	10	10	10	2. 5	2. 1
	Na ₂ CO ₃	10	2. 5	5	10	—	8. 0
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无	无
离子强度		0. 093	0. 101	0. 108	0. 123	0. 106	0. 104
pH		9. 8	8. 1	8. 6	9. 3	6. 6	9. 6
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		0. 053± 0. 008	无数据	0. 053± 0. 005	无数据	0. 011± 0. 002	0. 054± 0. 005
备注							

[0292] [表6]

[0293]

		实施例31	比较例1	比较例2	比较例3	比较例4	比较例5
浓度 (mmol /L)	NaCl	55	55	68	150	30	68.5
	KCl	2.6	2.6	1.4	—	—	2.7
	CaCl ₂	0.9	0.9	—	—	—	—
	MgSO ₄	—	0.4	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	0.5	0.5	—	—	1	—
	KH ₂ PO ₄	—	—	0.8	—	—	0.2
	Na ₂ HPO ₄	—	—	4	—	19	0.2
	NaHCO ₃	—	22	—	—	—	2.1
	Na ₂ CO ₃	2.5	—	—	—	—	—
除无机盐以外的成分		无	有(氨基酸、维生素、糖、HEPES等共计27种成分)	无	无	无	无
离子强度		0.071	0.131	0.098	0.150	0.150	0.080
pH		6.7	7.0	5.1	3.1	7.4	4.3
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		0.024± 0.002	0.022± 0.001	—	—	—	—
备注				无法制造	无法制造	无法制造	无法制造

[0294] [表7]

[0295]

		比较例6	比较例7	比较例8	比较例9	比较例10
浓度 (mmol /L)	NaCl	68.5	68.5	55	55	55
	KCl	2.7	2.7	2.6	2.6	2.6
	CaCl ₂	—	—	0.9	0.9	0.9
	MgSO ₄	—	—	—	—	—
	NaH ₂ PO ₄	—	—	0.5	0.5	0.5
	KH ₂ PO ₄	0.2	0.2	—	—	—
	Na ₂ HPO ₄	0.2	0.2	—	—	—
	NaHCO ₃	2.1	2.1	—	2.5	—
	Na ₂ CO ₃	20	40	—	—	20
除无机盐以外的成分		无	无	无	无	无
离子强度		0.140	0.200	0.063	0.071	0.123
pH		10.0	10.5	3.2	4.4	10.2
膜强度(N) (平均值±标准偏差)		—	—	—	—	—
备注		无法制造	无法制造	无法制造	无法制造	无法制造

[0296] 由表1～表6可以明确:通过本发明方法而得到的精制胶原玻璃化凝胶具有充足的膜强度,且实质上不含除了无机盐之外的残留成分,生物体安全性高且实用。

[0297] 产业上的可利用性

[0298] 如上所述,根据本发明的制造方法,能够简单且低成本地获得生物体安全性高的胶原玻璃化凝胶及其精制物。

[0299] 而且,所得胶原玻璃化凝胶、精制胶原玻璃化凝胶具有充足的膜强度,容易工业性地、机械性地制造,容易加工,容易处理且安全性高,因此,作为各种生物体移植材料、例如再生医疗用细胞载体、创伤覆盖材料、人工皮肤、防粘连材料等是有用的。

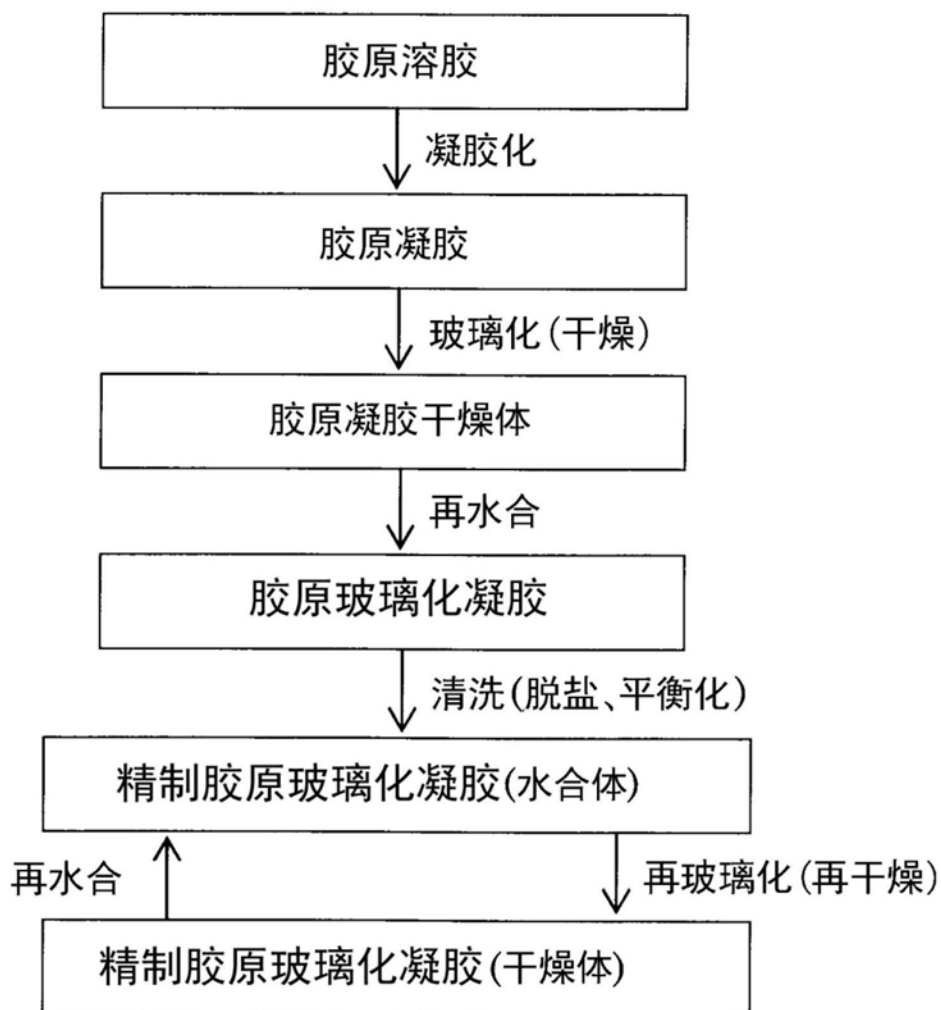


图1