

说明书

发明名称: 一种具有164.88° 三螺旋结构低分子量胶原蛋白

[0001] 本申请要求申请日2023年3月16日, 申请号202310268735.1, 发明名称为“一种具有164.88° 三螺旋结构低分子量胶原蛋白”的中国发明专利申请; 申请日2023年05月16日, 申请号202310553965.2, 发明名称为“一种具有164.88° 三螺旋结构低分子量胶原蛋白”的中国发明专利申请; 申请日为2023年8月1日, 发明名称为“一种具有164.88° 三螺旋结构低分子量胶原蛋白”, 申请号为PCT/CN2023/110578的PCT专利申请的优先权权益。上述申请通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本申请涉及胶原蛋白领域, 具体地涉及小分子胶原蛋白、其制备方法和用途。

背景技术

[0003] 胶原蛋白是广泛分布于人体结缔组织的一类蛋白质, 也是人体含量最多的蛋白质, 可以占到蛋白质总量的25%~35%。它的主要功能体现在维护细胞外环境, 维持组织器官的正常生理功能, 修复肌体损伤等方面。胶原蛋白是天然的生物资源, 具有其它高分子材料所望尘莫及的生物组织相容性, 对细胞的支撑弹性和可降解性, 因此, 胶原蛋白可以广泛的应用在医药和化妆品等行业中。

[0004] 天然胶原分子可形成一种特殊的超螺旋结构, 这种结构是以3个氨基酸残基为基本重复体的左手螺旋, 这三个氨基酸残基通常为Gly-X-Pro。Gly对胶原蛋白中氢键的形成是必须的, 它本身没有侧链使胶原蛋白紧密堆积, 能维持皮肤张力和弹性。随着人们年龄的增长, 真皮内的胶原发生降解和老化, 皮肤变得干燥并出现皱纹。为防止皮肤衰老, 有学者研究通过补充胶原蛋白来达到延缓皮肤衰老的进程, 目前都知道胶原蛋白是一种高分子蛋白质, 从分子量大小来说, 是很难通过皮肤来吸收的, 只能通过破损的皮肤微创口、毛囊及汗腺口进入到真皮层补充胶原。因此, 在以往的研究中, 如何促进胶原蛋白的透皮吸收成为研究热点。

[0005] 近年来随着基因工程技术的广泛应用, 研发人员创造出各种类型的重组胶原蛋白, 例如可以通过选择来自天然人胶原蛋白的短氨基酸序列来构建重组胶原蛋白,

白，这样构建的重组胶原蛋白具有例如免疫原性低、生物活性高、稳定性好等优点。理论上，这种重组胶原蛋白的氨基酸序列越短，透皮吸收性能越好，但是氨基酸序列不是越短越好。如何设计短氨基酸序列，才能使得构建的重组胶原蛋白具有更好的透皮吸收性能，现有技术中没有任何的理论可以作为指导。

[0006] 本领域中需要新的小分子胶原蛋白。

[0007] 发明内容

[0008] 针对目前的需要，发明人发现了新的胶原蛋白，分子量约2814.07Da，可以穿过皮肤真皮层到达皮下组织。经过研究，数据表明本申请的胶原蛋白作用于皮肤12h透皮率高达85%以上，表现出优秀的胶原透皮吸收效果，作用效果明显优于市面上大分子胶原蛋白。

[0009] 在一方面，本文提供了胶原蛋白，其包含以下氨基酸序列：

[0010] (1)以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列；

[0011] (2)与以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列；或

[0012] (3)以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列。

[0013] 在一个实施方案中，突变是取代、插入、缺失或添加。在一个实施方案中，取代为保守氨基酸取代。

[0014] 在一个实施方案中，胶原蛋白来源于人。在一个实施方案中，胶原蛋白具有三螺旋结构。在一个实施方案中，胶原蛋白具有柔性三螺旋结构。在一个实施方案中，胶原蛋白为三聚体形式。

[0015] 在一个实施方案中，胶原蛋白具有以下一种或多种活性或功效：细胞粘附活性、促细胞迁移活性、透皮吸收、抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效、皮肤舒缓功效。

[0016] 在一方面，本文提供了核酸，其编码本文所述的胶原蛋白。在一个实施方案中，核酸具有以SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

- [0017] 在一方面，本文提供了载体，其包含本文所述的核酸。在一个实施方案中，载体包含编码纯化标签的核苷酸、编码前导物的核苷酸和/或调节元件。
- [0018] 在一个实施方案中，纯化标签选自His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签。
- [0019] 在一个实施方案中，调节元件选自启动子、终止子和/或增强子。
- [0020] 在一方面，本文提供了宿主细胞，其包含本文所述的核酸或载体。在一个实施方案中，宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在一个实施方案中，真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。在一个实施方案中，原核细胞是大肠杆菌细胞。在一个实施方案中，原核细胞是大肠杆菌BL21。
- [0021] 在一方面，本文提供了生产本文所述的胶原蛋白的方法，其包括：
- [0022] (1)在合适的培养条件下培养本文所述的宿主细胞；
- [0023] (2)收获包含胶原蛋白的宿主细胞和/或培养基；和
- [0024] (3)纯化融合蛋白。
- [0025] 在一个实施方案中，方法包括(1)在Ni亲和层析柱上粗纯胶原蛋白；(2)添加胶原工具酶切；和/或(3)离子交换柱精纯胶原蛋白。
- [0026] 在一方面，本文提供了组合物，其包含本文所述的胶原蛋白、本文所述的核酸、本文所述的载体和/或本文所述的宿主细胞。
- [0027] 在一个实施方案中，组合物是药物组合物、食品组合物或化妆品组合物。
- [0028] 在一个实施方案中，组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种。在一个实施方案中，组合物为溶液剂型、冻干粉剂型、凝胶剂型、海绵剂型或纤维剂型。
- [0029] 在一个实施方案中，化妆品组合物是抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效和/或皮肤舒缓功效的化妆品组合物。在一个实施方案中，皮肤控油功效是脸部皮肤控油功效。
- [0030] 在一个实施方案中，组合物包含药学、化妆品和/或食品可接受的载体。

- [0031] 在一个实施方案中，组合物为固体、液体或凝胶组合物。
- [0032] 在一个实施方案中，组合物为口服和/或局部施用的组合物。在一个实施方案中，局部施用是对皮肤的局部施用。在一个实施方案中，组合物是透皮组合物。在一个实施方案中，组合物为试剂盒。
- [0033] 在一个实施方案中，组合物为液体配制剂，其包含本文所述的胶原蛋白和药学、化妆品和/或食品可接受的载体。在一个实施方案中，载体是缓冲剂，例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。
- [0034] 在一方面，本文提供了使细胞粘附或贴壁的方法，所述方法包括使细胞与本文所述的胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂接触。
- [0035] 在一方面，本文提供了促进细胞迁移的方法，所述方法包括使细胞与本文所述的胶原蛋白和/或组合物接触。
- [0036] 在另一方面，本文提供了化妆或美容方法，其包括对皮肤施用本文所述的胶原蛋白和/或组合物。在一个实施方案中，化妆或美容方法包括对皮肤应用其他美容和/或化妆产品。
- [0037] 在一个实施方案中，化妆或美容方法是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓方法。在一个实施方案中，施用为局部施用。在一个实施方案中，施用为经皮施用。
- [0038] 在又一方面，本文提供了本文所述的胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞在医药、化妆或美容产品中的用途。
- [0039] 在一个实施方案中，产品是外用产品。在一个实施方案中，化妆或美容产品是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓产品。在一个实施方案中，产品选自生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料。
- [0040] 在又一方面，本文提供了本文所述的胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞在制备药物或试剂盒中的用途，所述药物或试剂盒用于抗炎或者降低炎性细胞因子。在一个实施方案中，炎性细胞因子是TNF- α 。在一个实施方案中，炎症是由炎性细胞因子，如TNF- α 引起的。

- [0041] 在又一方面，本文提供了降低细胞中的炎性细胞因子水平的方法，其包括使细胞与本文的胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂接触。
- [0042] 本发明的优点包括：
- [0043] 1) 本文的胶原蛋白采用合成生物学技术制备，其氨基酸序列与人胶原蛋白核心功能区的氨基酸序列100%一致，是唯一具有164.88° 柔性三螺旋结构的小分子蛋白。
- [0044] 2) 本文的胶原蛋白是小分子胶原，分子量约2814.07Da，可以穿过皮肤真皮层到达皮下组织，研究表明作用于皮肤12h透皮率高达85%以上，表现出优秀的胶原透皮吸收效果，作用效果明显优于市面上大分子胶原蛋白。
- [0045] 3) 本文的胶原蛋白结构明确：本文的胶原蛋白采用国际先进的X-射线晶体衍射技术成功解析出胶原蛋白的三螺旋结构，相关数据已收录至国际蛋白数据库(PDB: 6A0A和6A0C)，为目前市面唯一具有三螺旋结构的小分子胶原。
- [0046] 4) 本文的胶原蛋白具有高活性、高亲水性：具有优于人胶原蛋白的高细胞粘附活性(是人I型胶原蛋白的2倍)。
- [0047] 5) 本文的胶原蛋白具有皮肤抗皱、控油、修复、舒缓和/或抗炎功效。

附图说明

- [0048] 图1显示了表达载体图谱。
- [0049] 图2显示了胶原蛋白纯化过程中的电泳检测结果。第1道为标志物，第2道为纯化样品，第3道为换液后的胶原蛋白，第4道为酶切后的胶原蛋白。
- [0050] 图3显示了本发明的小分子胶原蛋白C3T1的质谱检测结果。
- [0051] 图4显示了本发明的小分子胶原蛋白C3T1的纯度检测。
- [0052] 图5显示了胶原蛋白对细胞粘附的作用。样品与对照组相比， $P < 0.05$ 表示为★， $P < 0.01$ 表示为★★， $P < 0.001$ 表示为★★★。从图中结果可知，本发明的胶原蛋白与牛I型胶原蛋白相比，具有更好的粘附活性。
- [0053] 图6显示了荧光显微镜观察结果。
- [0054] 图7显示了胶原蛋白对细胞迁移的作用的柱状图。
- [0055] 图8显示了胶原蛋白样品的实际扩散百分率。从该图可知，随着时间的延长，胶原渗透率在逐步增加。12h可高达86%。

- [0056] 图9显示了胶原蛋白样品的实际扩散的定性分析。蓝色为细胞核DAPI荧光，绿色为经FITC标记样品的荧光。从图可以看出，2h时样品主要停留在皮肤表面，4、8、12h后样品穿过皮肤表皮层渗透至真皮层。
- [0057] 图10显示了各组别的I型胶原蛋白含量的柱状图。误差条形图：95%置信区间。从图可知，样品浓度在25%–100%时，可显著上调I型胶原蛋白的蛋白含量($p < 0.05$)，具有促进I型胶原蛋白合成的能力，说明样品具有明显的抗皱功效。
- [0058] 图11显示了各组别的丝聚蛋白(FLG)相对表达量的柱状图。误差条形图：95%置信区间。
- [0059] 图12显示了各组别的TGM1相对表达含量的柱状图。误差条形图：95%置信区间。
- [0060] 图13显示了各组别的TNF- α 含量的柱状图。误差条形图：95%置信区间。

具体实施方式

- [0061] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明的实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。
- [0062] 如本文中所用，肽或多肽是指通过肽键连接的多个氨基酸残基。在本文中，胶原蛋白也可称为胶原蛋白肽或多肽。
- [0063] 如本文中所用，“核酸”是指通过核苷酸间连接的多个核苷酸。核苷酸间连接可以是例如磷酸二酯键。本文中的核酸可以包含编码本发明的胶原蛋白的多核苷酸。为了便于胶原蛋白后续处理，本发明的核酸还可以包含编码纯化标签，例如His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签的核苷酸，以及当需要时编码前导序列的核苷酸序列。
- [0064] 如本文中所用，术语“载体”是可将多核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白质获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬

菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体可以包含本发明的核酸以便于导入细胞进行表达。载体可以包含与上述核酸可操作连接的表达控制元件，如启动子、终止子和/或增强子。

[0065] 如本文中所用，术语“重组人胶原蛋白”指由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长氨基酸序列，且有三螺旋结构。如本文中所用，术语“重组人源化胶原蛋白”是由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段，或是含人胶原蛋白功能片段的组合。

[0066] 如本文中所用，术语“宿主细胞”是已经通过分子生物学技术将核酸分子引入的细胞。这些技术包括转染病毒载体，用质粒载体转化，以及通过电穿孔、脂转染、和粒子枪加速引入裸DNA。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。例如，真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞。原核细胞可以是大肠杆菌细胞。

[0067] 如本文中所用，两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS：欧洲分子生物学开放软件套件，Rice等人，2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276–277)(优选5.0.0版或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼–翁施算法(Needleman和Wunsch，1970,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443–453)来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下：

[0068] $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0069] 出于本发明的目的，使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS：欧洲分子生物学开放软件套件，Rice等人,2000,同上)(优选5.0.0版本或更新版本)的尼德尔程序所实施的尼德曼–翁施算法(Needleman和Wunsch,1970,同上)来确定两个脱氧核苷酸

序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5、和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的尼德尔的输出(使用非简化选项获得)用作同一性百分比并且计算如下：

- [0070] (相同的脱氧核糖核苷酸x 100)/(比对长度-比对中的空位总数)
- [0071] 在本发明的上下文中，保守氨基酸取代或保守取代可由在一个或多个下表中反映的氨基酸类别内的取代定义：
- [0072] 保守类别的氨基酸残基：

酸性残基	D和E
碱性残基	K、R、和H
亲水的不带电残基	S、T、N和Q
脂族不带电残基	G、A、V、L和I
非极性不带电残基	C、M和P
芳族残基	F、Y和W

- [0073] 备选的氨基酸残基的物理和功能分类：

含醇基残基	S和T
脂族残基	I、L、V和M
环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水的残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电残基	H、K和R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
极小残基	A、G和S
参与转角形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

- [0074] 胶原蛋白
- [0075] 在本文中，本发明的胶原蛋白可以存在一定的突变。例如，这些部分中的一个或多个的氨基酸序列可以存在氨基酸残基的取代、缺失、添加或插入。也就是说，本发明可以使用变体，只要变体保留促进细胞黏附和/或增殖的活性。具体而言，变体可以与指定的序列具备一定的百分比同一性，例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

指定的序列可以是本发明的任何序列，例如SEQ ID NO.1，但是优选的是这些变体保留本发明的胶原蛋白的功能。本发明的胶原蛋白可以具有良好的透皮性能，可以直达真皮层。本发明的多天可以用于具有以下功能中的一种或多种：抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效、皮肤舒缓功效和抗炎功效。

[0076] 本发明的胶原蛋白可以通过任何合适的方式进行制备，例如可以通过合成制备。优选地，本发明的胶原蛋白可以通过重组方式制备。

[0077] 本发明的胶原蛋白可以具有三螺旋结构区。例如，胶原蛋白具有柔性三螺旋结构区。本发明的胶原蛋白可以形成三螺旋结构。经过测定，本发明的小分子胶原蛋白C3T1可以形成 164.88° 三螺旋结构。

[0078] 组合物

[0079] 本发明的胶原蛋白可以制备为组合物。组合物可以包含本文所述的胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞。组合物还可以包含药学、化妆品和/或食品可接受的载体或溶剂。组合物可以是药物组合物、食品组合物或化妆品组合物，用于药品、食品和/或化妆品的目的。例如，组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种。

[0080] 化妆品组合物可以是抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效和/或皮肤舒缓功效的化妆品组合物。化妆品组合物应用的部分没有特别限制，可以是脸部、手部、腿部、躯干等。例如，皮肤控油功效是脸部皮肤控油功效。

[0081] 组合物的形式没有特别限制，只要可以实现预期的功能。例如，组合物为固体、液体或凝胶组合物。

[0082] 组合物可以以任何合适的方式应用，例如为口服和/或局部施用的组合物。局部施用可以是对皮肤的局部施用。由于组合物的透皮性能，组合物可以制备成透皮产品，透皮化妆用品。组合物也可以制备为试剂盒。试剂盒可以包含另外的成分，例如辅助成分，如缓冲剂，并且包含使用说明书。特别地，组合物可

以配制成合适的配制剂，如液体配制剂。配制剂可以包含缓冲剂，例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。

[0083] 方法

[0084] 本文提供了使细胞粘附或贴壁的方法，所述方法包括使细胞与本文所述的胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂接触。本发明的方法可以在体外进行，以增加细胞对培养容器的粘附。或者，本发明的方法也可以在体内进行。

[0085] 本文还提供了促进细胞迁移的方法，所述方法包括使细胞与胶原蛋白和/或组合物接触。本发明的方法可以在体外进行或者在体内进行。

[0086] 本文还提供了化妆或美容方法，其包括对皮肤施用本文所述的胶原蛋白和/或组合物。对皮肤施用可以是局部施用，例如对需要抗皱、控油、修复和/或舒缓的皮肤部位进行施用。方法还可以包括对皮肤应用其他美容和/或化妆产品。其他美容和/或化妆产品的种类没有特别限制，可以是其他具有皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓作用的化妆品，如胶原蛋白。这些化妆或美容方法可以是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓方法。由于本发明的胶原蛋白透皮效果良好，对皮肤施用后可以经皮作用于皮肤内层。

[0087] 本文还提供了对有需要的受试者施用本文所述的胶原蛋白或组合物的方法。该方法可以用于治疗或预防胶原蛋白缺乏相关的状况，或者可以用于受试者中的皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓。该施用可以是口服施用。

[0088] 本文还提供了降低细胞中的炎性细胞因子水平的方法，其包括使细胞与本文所述的胶原蛋白、组合物和/或液体配制剂接触。炎性细胞因子的种类没有特别限制，但是优选是TNF- α 。

[0089] 用途

[0090] 本文还提供了胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞在医药、化妆或美容产品中的用途或者用于皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓的用途。这些产品可以是外用产品，例如外用的化妆产品或美容产品。这些化妆或美容产品可以是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓产品。例如，产品可以选自生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射

填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料。

[0091] 本文还提供了本文所述的胶原蛋白、核酸、载体和/或宿主细胞在制备药物或试剂盒中的用途，所述药物或试剂盒用于抗炎或者降低炎性细胞因子，如TNF- α 。

[0092] 实施例

[0093] 提供以下实施例来阐述本发明。领域技术人员应当理解实施例仅仅是例示性的，而非限制性的。本发明仅仅由所附权利要求书的范围限定。

[0094] 实施例1：小分子胶原蛋白C3T1的构建和表达

[0095] 1.大肠杆菌基因工程菌的构建

[0096] 小分子胶原蛋白C3T1对应的氨基酸序列为：GERGAPGFRGPAG
PNGIPGEKGPAGERGAP(SEQ ID NO:1)。该氨基酸序列的对应的核苷酸
序列为：GGAGAAAGGGGGGCGCCAGGCTTCCGCGGTCCGGCGG
GTCCGAACGGCATCCCGGGTGAGAAGGGTCCGGC
TGGCGAACGTGGCGCACCG(SEQ ID NO:2)。将小分子胶原蛋白C3T1的核
苷酸序列克隆进入表达载体，然后将表达载体转入大肠杆菌表达菌株中，筛选
得到大肠杆菌基因工程菌。

[0097] 具体而言，根据C3T1的氨基酸序列，优化选择其大肠杆菌偏好的密码子基因
SEQ ID NO:2。合成SEQ ID NO:2的核苷酸序列。将C3T1基因片段通过Kpn I(N
EB公司货号：R0136L)和Xho I(NEB公司，货号：R0146L)的酶切位点插入pET-
32a表达载体(北京盛元科盟生物科技有限公司)，构建得到pET-32a-C3T1表达载
体，见图1，将表达载体导入大肠杆菌BL21(DE3)中，筛选得到阳性大肠杆菌基
因工程菌。以上操作委托北京盛元科盟生物科技有限公司进行。

[0098] 2.大肠杆菌基因工程菌的发酵培养

[0099] a.挑取优选后的大肠杆菌基因工程菌单菌落，置于5ml的LB培养基中35 ~
38℃培养过夜，温度为37℃。b.将菌液按照1：100接种放大培养，37℃培养
7小时，加入0.5mM IPTG进行诱导，降温至16℃，过夜诱导培养；此时表达
出的蛋白为C3T1，离心收集菌体。c.将收集的菌体用平衡工作液(200mM氯

化钠, 25mM Tris, 20mM咪唑, pH8.0)重悬, 将菌液降温至 $\leq 15^{\circ}\text{C}$, 进行均质, 高压均质两次, 完成后收集菌液。将均质后的菌液分装至离心瓶中, 于17000rpm、 4°C 离心30min, 收集上清液, 取上清液和沉淀进行电泳检测。3.小分子胶原蛋白C3T1的纯化

- [0100] a.水洗柱材(Ni6FF, Cytiva), 5个柱体积(CV)。b.平衡液(200mM氯化钠, 25mM Tris, 20mM咪唑)平衡柱材, 5个CV。c.上样: 将离心后的上清液加入柱材中, 直至液体流完后。d.清洗杂蛋白: 添加洗杂液25mL(200mM氯化钠, 25mM Tris, 20mM咪唑)至液体流完。e.收集目的蛋白: 添加25mL洗脱液(200mM氯化钠, 25mM Tris, 250mM咪唑), 并收集流穿液得到目的多肽Trx-His-C3T1。f.换液: 使用G-25柱材(Cytiva)将收集的目的蛋白换液至PBS(300mM氯化钠, 50mM磷酸二氢钠, pH7.3)。如果需要切除Trx-His标签的目的蛋白, 可以加入适量胶原工具酶, 于 16°C 孵育2h后, 即为去除标签蛋白Trx-His的小分子胶原蛋白C3T1。电泳检测结果如图2所示(1: Maker; 2: 收集的目的蛋白; 3: 换液至PBS的目的蛋白; 4: 酶切后样品)。4.小分子胶原蛋白C3T1的质谱检测
- [0101] 小分子胶原蛋白C3T1的理论分子量为2814.07Da, 无法通过常规的SDS-PAGE进行检测, 需要利用质谱方法进行鉴定。选用Biozen™ 1.8 μm dSEC-2, 200Å LC Column 150 $\times$ 4.6mm色谱柱, 将酶切后的样品使用LC-MS设备在分子量检测质谱方法MS方法及液相方法LC方法条件下进行分析。
- [0102] 如图3所示, 根据质谱方法鉴定, 本发明的小分子胶原蛋白C3T1的实际分子量为2814Da, 与理论分子量一致。
- [0103] 5.小分子胶原蛋白C3T1的纯度检测
- [0104] 检验方法参照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部通则(0512高效液相色谱法)通过分子排阻色谱对蛋白质供试品进行分析, 结果利用峰面积归一法进一步计算得出主峰的纯度百分比。
- [0105] 将供试品空白和胶原蛋白C3T1放入样品盘中进行测定。实验参数设置如下:

色谱柱	Acquity UPLC protein BEH SEC, 2.7 μ m, 4.6*150mm		
流动相	A相	0.1% TFA 水溶液	
	B相	0.1% TFA 乙腈溶液	
洗脱程序	时间 (min)	A%	B%
	0	65	35
	20	65	35
流速	0.3 ml/min		
柱温	40° C		
检测波长	214 nm		
进样量	5 μ l		

[0106] 检测结果如下：

[0107] 表1

色谱峰	样品	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	%面积
1	蛋白	4.889	5582783	87.70
2	--	6.030	783115	12.30

[0108] 图4显示了本发明的小分子胶原蛋白C3T1的纯度检测。小分子胶原蛋白C3T1纯度高达87.70%。

[0109] 实施例2：小分子胶原蛋白C3T1的细胞粘附活性检测

[0110] 细胞粘附活性检测的参考标准，中华人民共和国医药行业标准YYT1849-2022 重组胶原蛋白

[0111] 具体实施方法如下：

[0112] 使用D-PBS溶解样品，0.22 μ m滤膜过滤后，稀释到使用浓度备用；使用D-PBS将阳性对照牛I型胶原蛋白(河北考力森生物科技有限公司；货号：CSC113A)稀释至1mg/ml备用；阴性对照为D-PBS缓冲液。

[0113] 在酶标板中分别加入不同浓度(0.5、1或2mg/mL)的胶原蛋白C3T1及阳性对照和阴性对照，每孔100 μ L,每组设置5个复孔，4℃孵育过夜。

- [0114] 每孔中加入 10^5 个D-PBS重悬的培养状态良好3T3/NIH细胞，37℃孵育120min。每孔用D-PBS溶液清洗3次。
- [0115] 用CCK8检测试剂盒(Vazyme; 货号: A311-01-AA)根据产品说明书测定OD450nm的吸光度。根据如下公式: 细胞贴壁率=(测试孔-空白孔)×100%/(阳性孔-空白孔)。计算细胞的贴壁程度。细胞的贴壁率即可以反应胶原蛋白的细胞粘附能力。细胞粘附能力越高, 越能在短时间给细胞提供优质的外环境, 帮助细胞贴壁。
- [0116] 结果参见图5。从图5中可知, 本文的胶原蛋白C3T1与牛I型胶原蛋白相比, 具有更好的粘附活性。
- [0117] 实施例3: 小分子胶原蛋白C3T1的促细胞迁移活性检测
- [0118] 含0.4%血清的培养基(ECM: 500ml基础培养基+25ml FBS血清+5ml ECGS内皮细胞生长添加剂+5ml P/S青霉素/链霉素溶液)为阴性对照(NC), EGF为阳性对照(PC), 胶原蛋白C3T1为供试品。培养的细胞为HUVEC细胞。以含0.4%血清的ECM培养基溶解胶原蛋白至使用浓度, $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 倍半稀释法依次稀释。胶原蛋白C3T1在培养基中的终浓度为0.001、0.002、0.05和0.5mg/mL。EGF以含0.4%血清的ECM培养基溶解终浓度为10ng/ml, 过滤除菌。消化细胞, 终止消化后离心弃去培养液, 用PBS清洗1-2遍。用无血清培养基重悬, 调整细胞密度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ 。使用两室系统(Nest, 细胞小室培养板)。在下室加入500 μl 样品, 上室加入200 μl 细胞悬液, 培养12-48h。用镊子小心取出上室, 吸干液体并移到预先加入约800 μl 甲醇的孔中, 室温固定30min后用PBS清洗两次。在上室中加入100 μl DAPI, 染色15min后用棉签轻轻擦掉上层未迁移的细胞并用PBS洗3次。荧光显微镜下观察并拍照, 用image J进行计数。计算公式如下: 相对细胞迁移率=实验组计数/阴性组计数的平均值×100%
- [0119] 图6显示了不同测试组的荧光显微镜观察结果。图7显示了不同测试组的相对细胞迁移率(%)。
- [0120] 根据图7显示, 与阴性对照组相比阳性对照组能促进细胞迁移, 差异具有统计学意义。随着胶原蛋白C3T1浓度的升高, 其对促进细胞迁移的作用逐步增强。而细胞迁移活动是反应胶原蛋白生物活性的指标, 迁移率越高, 说明胶原蛋白

生物学活性更高。通过与EGF进行比较，胶原蛋白C3T1具有更高的细胞迁移活性。

[0121] 实施例4：小分子胶原蛋白C3T1的透皮吸收检测

[0122] 小分子胶原蛋白C3T1的透皮吸收检测参考GB/T27818-2011化学品皮肤吸收体外实验方法标准。

[0123] 具体实施方法如下：

[0124] 透皮吸收定量测定步骤：向接收室中加入接收液(生理盐水)，并将配套的磁力搅拌子放置于接收室内。将乳猪皮(测试品放置于乳猪皮表面)固定于Franz cell扩散池的扩散室和接收室之间，在取样管中补加1ml接收液，使乳猪皮真皮层与接收液紧密接触。将Franz cell扩散池固定于透皮吸收扩散仪中。开启电磁搅拌器，300rpm搅拌，保持水浴夹层无气泡。待温度恒定后，吸取400 μ l样品至乳猪皮表面。分别在2、4、8h抽取接收液1ml，置于2ml EP管中，再补加适量生理盐水溶液至接收室中，并于12h收样。皮上未渗透部分处理：12h(样品)渗透结束后，用生理盐水清洗乳猪皮表面，定容至2ml。皮中残留部分处理：12h(样品)渗透结束后，将乳猪皮剪碎置于EP管中，用生理盐水定容至2ml，超声30min。用福林酚法对各时间点取样进行胶原蛋白C3T1(测试品放置于乳猪皮表面)含量定量分析。

[0125] 透皮吸收定性测定步骤：向接收室中加入接收液，并将配套的磁力搅拌子放置于接收室内。将乳猪皮固定于Franz cell扩散池的扩散室和接收室之间，在取样管中补加1ml接收液，使乳猪皮真皮层与接收液紧密接触。将Franz cell扩散池固定于透皮吸收扩散仪中。开启电磁搅拌器，300rpm搅拌，保持水浴夹层无气泡。待温度恒定后，吸取400 μ l样品胶原蛋白C3T1(已用FITC(异硫氰荧光素脂)荧光标记)至乳猪皮表面。定性分析：收取各组猪皮进行冰冻切片，DAPI复染后利用荧光显微镜进行拍照。按照上述方法做三组平行。累计渗透量计算公式： $Q = C_n \times V + \sum C_i \times V_0 (i=1 \cdot \cdot \cdot n-1)$

[0126] 式中：Q：累计渗透量

[0127] V：接收室接收液体积

[0128] V_0 ：每次取样的体积

- [0129] C_i : 第1次至第 $n-1$ 次取样时接收液中目标物浓度
- [0130] C_n : 第 n 个取样点测得的目标浓度。
- [0131] 扩散百分率计算公式: $P = Q/P_0 \times 100\%$
- [0132] 式中: P : 扩散百分率
- [0133] Q : 接收室中每个时间点的累积渗透量
- [0134] P_0 : 扩散室中的初始上样量
- [0135] 结果如图8中所示。从图8可知,随着时间的延长,胶原蛋白C3T1渗透率在逐步增加,12h可高达86%。图9显示了定性分析荧光显微镜结果。从图9可以看出,2h样品主要停留在皮肤表明,4、8、12h后样品穿过皮肤表皮层渗透至真皮层。
- [0136] 综上所述,胶原蛋白测试组扣除空白组后,2h样品主要停留在皮肤;4h时胶原蛋白C3T1渗透率为33%,FITC标记的胶原蛋白C3T1穿过皮肤表皮层渗透至真皮层;8h时胶原蛋白渗透率为70%,FITC标记的胶原蛋白C3T1穿过皮肤表皮层渗透至真皮层;12h时胶原蛋白渗透率为86%,FITC标记的胶原蛋白C3T1穿过皮肤表皮层渗透至真皮层;说明胶原蛋白C3T1为真小分子胶原,具有更高的透皮率,可以直达真皮层,起到直补胶原蛋白的作用。
- [0137] 实施例5: 小分子胶原蛋白C3T1的细胞毒性测试
- [0138] 人成纤维细胞(购自广东博溪生物科技有限公司)按 1×10^4 个/孔的接种密度接种至96孔板,培养箱(37℃、5% CO₂)中孵育过夜。待96孔板中细胞铺板率达到40%–60%时进行给样。调零组是无细胞接种,每孔仅加入200 μ L FbGrowth培养液(供应商: 博溪生物和货号: PY3091);溶剂对照组是接种细胞的孔中每孔加200 μ L的FbGrowth培养液,阳性对照组是接种细胞的孔中每孔加200 μ L含10%DMSO(厂家: MACKLIN货号: D806645)的FbGrowth培养液,样品组是接种细胞的孔中每孔加200 μ L含对应浓度胶原蛋白C3T1的FbGrowth培养液。给样完成后将96孔板置于培养箱(37℃、5% CO₂)中培养。
- [0139] 检测: 细胞孵育培养24h后,弃上清,加入MTT工作液(供应商: 源叶和商品货号: S19063)(0.5mg/mL),37℃避光孵育4h,弃上清,每孔加150 μ L DMSO,在

490nm处读取OD值，根据公式计算细胞相对活力：细胞相对活力(%)=(样品孔OD-调零孔OD)÷(溶剂对照孔OD-调零孔OD)×100%

[0140] 表2显示了细胞毒性结果。

[0141] 表2：细胞毒性结果

样品浓度 (%)	调零 孔	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125
相对存活 率%	/	98.27	100.46	100.59	101.09	101.59	102.60	101.96	99.86
标准差	/	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01

[0142] 从表2可知，胶原蛋白C3T1在设置的浓度梯度中，对细胞毒性较小，实验结果可信。

[0143] 实施例6：小分子胶原蛋白C3T1体外抗皱功效测定

[0144] 胶原蛋白是细胞外基质中最重要的组成成分，可以是皮肤更加紧致，具有更好的伸展性，当胶原蛋白减少时会出现明显的皱纹，人真皮成纤维细胞能在体内合成I型前胶原并分泌至胞外，在胞外会聚合形成胶原纤维，因此人真皮成纤维细胞可以作为研究化妆品促进I型胶原蛋白合成的细胞模型，用于评价受试物是否具有促进胶原蛋白合成的作用，从而评价化妆品的抗皱功效。

[0145] 为了测定胶原蛋白体外抗皱功效，采用体外促成纤维细胞I型胶原蛋白合成能力强弱，说明其抗皱功效。

[0146] 具体实施如下：

[0147] 细胞培养：

[0148] 收集对数生长期的人成纤维细胞，按照细胞密度为 1×10^4 个/孔接种至96孔板，37℃、5%CO₂培养箱培养24h，待96孔板中细胞铺板率达到40%–60%时进行给样。空白对照组是接种细胞的孔中添加FbGrowth培养液，阳性对照组是接种细胞的孔中加TGFβ 1(供应商： Absin货号ABS04204)(称取10μg TGFβ 1溶于200μl 10mM柠檬酸溶液，做为贮备液；吸取2μl TGFβ 1贮备液溶于998μl FbGrowth培养液作为阳性对照工作液)，样品组是接种细胞的孔中加各浓度胶原蛋

白C3T1的FbGrowth培养液。给样完成后将96孔板置于培养箱(37℃、5%CO₂)中培养24h。

- [0149] 培养结束后，收集细胞于EP管中，使用I型胶原蛋白ELISA试剂盒检测I型胶原蛋白(供应商：ELK Biotechnology和商品号：ELK2377，详细操作参见试剂盒说明书)。
- [0150] 检测结果：从图10可知，样品浓度在25%–100%时(浓度为0.075–0.3 μg/ml)，可显著上调I型胶原蛋白的蛋白含量($p < 0.05$)，具有促进I型胶原蛋白合成的能力，说明胶原蛋白C3T1样品具有明显的抗皱功效。
- [0151] 实施例7：小分子胶原蛋白C3T1体外面部控油功效
- [0152] 细胞培养：收集对数生长期的KC人表皮细胞(购自广东博溪生物科技有限公司)，按照细胞密度为 1×10^4 个/孔接种至96孔板，37℃、5%CO₂培养箱培养KC人表皮细胞24h，待96孔板中细胞铺板率达到40%–60%时进行给药。空白对照组是接种细胞的孔中加KcGrowth培养液(供应商：博溪生物和货号：PY3011)，阴性对照组是接种细胞的孔中加0.2%SLS(供应商：Solarbio和货号：S8100)的KcGrowth培养液，阳性对照组是接种细胞的孔中加0.2%SLS和WY14643(供应商：碧云天和货号：SD7189–25mg)的KcGrowth培养液，样品组是接种细胞的孔中加0.2%SLS和各浓度胶原蛋白C3T1的KcGrowth培养液。给药完成后将96孔板置于培养箱(37℃、5%CO₂)中培养24h。
- [0153] 检测：培养结束后，收集细胞于EP管中，取上清，使用人丝聚蛋白ELISA试剂盒检测人丝聚蛋白(供应商：ELK Biotechnology和货号ELK3513，详细操作参见试剂盒说明书)。
- [0154] 实验结果见图11。试验样品浓度在25% ~ 100% (浓度为0.075–0.3 μg/ml)时，可促进人角质形成细胞丝聚蛋白(FLG)表达量以剂量依赖性方式增加，与阴性对照相比，具有显著性差异($P < 0.05$)；试验样品胶原蛋白C3T1具有控油功效。
- [0155] 实施例8：小分子胶原蛋白C3T1体外修复功效检测
- [0156] 细胞培养：收集对数生长期的KC人表皮细胞(购自广东博溪生物科技有限公司)，按照细胞密度为 1×10^4 个/孔接种至96孔板，37℃、5%CO₂培养箱培养KC人表皮细胞24h。待96孔板中细胞铺板率达到40%–60%时进行给样。空白对

照组是接种细胞的孔中KcGrowth培养液，阴性对照组是接种细胞的孔中加0.2% SLS的KcGrowth培养液，阳性对照组是接种细胞的孔中加0.2% SLS和WY14643的KcGrowth培养液，样品组是接种细胞的孔中加0.2% SLS和各浓度胶原蛋白C3T1的KcGrowth培养液。给样完成后将96孔板置于培养箱(37℃、5% CO₂)中培养24h。

- [0157] 检测：培养结束后，收集细胞于EP管中，取上清，用于TGM1检测，使用人TGM1ELISA试剂盒检测人TGM1(供应商：ELK Biotechnology和货号ELK2193，详细操作参见试剂盒说明书)。
- [0158] 实验结果见图12。试验样品浓度在25% ~ 100% (浓度为0.075–0.3 μg/ml)时，可促进人角质形成细胞TGM1表达量以剂量依赖性的方式增加；试验样品胶原蛋白C3T1具有修复功效。
- [0159] 实施例9：小分子胶原蛋白C3T1体外舒缓功效检测
- [0160] 细胞培养：收集对数生长期的鼠巨噬细胞RAW264.7(购自广东博溪生物科技有限公司)，按照细胞密度为 1×10^4 个/孔接种至96孔板，37℃、5% CO₂培养箱培养小鼠巨噬细胞RAW264.7达24h。待96孔板中细胞铺板率达到40%–60%时进行给样。空白对照组是细胞培养基(高糖DMEM培养液(10%胎牛血清))(供应商：Biosharp 货号：BL301A)，每孔200 μL，阴性对照组是含有LPS(1 μg/ml)(厂家：absin，货号：ABS47014848)的细胞培养基，每孔200 μL，阳性对照组是含有阳性对照(取10mg地塞米松(厂家Solarbio货号：D8040)溶于1mL DMSO溶液，为地塞米松母液，浓度10mg/mL；吸取地塞米松母液用含有LPS的高糖DMEM培养液1:100稀释至100 μg/mL作为阳性对照工作液)和LPS的培养基，每孔200 μL，样品组是含有一定浓度胶原蛋白C3T1和LPS的培养基，每孔200 μL。给样完成后将96孔板置于培养箱(37℃、5% CO₂)中培养24h。
- [0161] 检测：培养结束后，收集细胞培养液，离心收集上清，用于TNF-α检测，具体步骤参见TNF-α炎症因子ELISA试剂盒(供应商：ELK Biotechnology和货号：ELK1190)说明书。

[0162] 实验结果见图13。胶原蛋白C3T1浓度在25% ~ 100% (浓度为0.075–0.3 μ g/ml) 时, 各组别与阴性对照相比, TNF- α 含量下降, 且具有显著性差异($P < 0.05$), 具有抑制TNF- α 含量的作用, 具有舒缓或抗炎功效。

[0163] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 胶原蛋白，其包含以下氨基酸序列：
- (1)以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列；
 - (2)与以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列；或
 - (3)以SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中进行了一个或多个氨基酸残基的突变的氨基酸序列；优选地，突变是取代、插入、缺失或添加；优选地，取代为保守氨基酸取代；
- 优选地，所述胶原蛋白来源于人；
- 优选地，所述胶原蛋白具有三螺旋结构，优选柔性三螺旋结构，优选 164.88° 三螺旋结构；优选地，胶原蛋白为三聚体形式；
- 优选地，所述胶原蛋白具有以下一种或多种活性或功效：细胞粘附活性、促细胞迁移活性、透皮吸收、抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效、皮肤舒缓功效。
- [权利要求 2] 核酸，其编码根据权利要求1所述的胶原蛋白；优选地，其中所述核酸具有以SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。
- [权利要求 3] 载体，其包含根据权利要求2所述的核酸，任选地，所述载体包含编码纯化标签的核苷酸、编码前导物的核苷酸和/或调节元件；
- 优选地，纯化标签选自His标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签或NusA标签；
- 优选地，调节元件选自启动子、终止子和/或增强子。
- [权利要求 4] 宿主细胞，其包含根据权利要求2所述的核酸或根据权利要求3所述的载体；其中优选地，宿主细胞是真核细胞或原核细胞；其中优选地，真核细胞是酵母细胞、动物细胞和/或昆虫细胞，和/或原核细胞是大肠杆菌细胞，例如大肠杆菌BL21。
- [权利要求 5] 生产根据权利要求1所述的胶原蛋白的方法，其包括：
- (1)在合适的培养条件下培养根据权利要求4所述的宿主细胞；
 - (2)收获包含胶原蛋白的宿主细胞和/或培养基；和

(3)纯化融合蛋白，例如包括(1)在Ni亲和层析柱上粗纯胶原蛋白；(2)添加胶原工具酶切；和/或(3)离子交换柱精纯胶原蛋白。

[权利要求 6]

组合物，其包含根据权利要求1所述的胶原蛋白、根据权利要求2所述的核酸、根据权利要求3所述的载体和/或根据权利要求4所述的宿主细胞；

优选地，组合物是药物组合物、食品组合物或化妆品组合物，

优选地，组合物是生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料、化妆品原料、药用辅料和食品添加剂中的一种或多种；

优选地，化妆品组合物是抗皱功效、皮肤控油功效、皮肤修复功效和/或皮肤舒缓功效的化妆品组合物；优选地，皮肤控油功效是脸部皮肤控油功效；

优选地，组合物包含药学、化妆品和/或食品可接受的载体；

优选地，组合物为固体、液体或凝胶组合物；

优选地，组合物为溶液剂型、冻干粉剂型、凝胶剂型、海绵剂型或纤维剂型；

优选地，组合物为口服和/或局部施用的组合物；优选地，局部施用是对皮肤的局部施用；优选地，组合物是透皮组合物；

优选地，组合物为试剂盒；

优选地，组合物为液体配制剂，其包含根据权利要求1所述的胶原蛋白和药学、化妆品和/或食品可接受的载体；优选地，载体是缓冲剂，例如D-PBS缓冲剂或PBS缓冲剂。

[权利要求 7]

使细胞粘附或贴壁的方法，所述方法包括使细胞与根据权利要求1所述的胶原蛋白和/或根据权利要求6的组合物。

[权利要求 8]

促进细胞迁移的方法，所述方法包括使细胞与根据权利要求1所述的胶原蛋白和/或根据权利要求6的组合物接触。

- [权利要求 9] 化妆或美容方法，其包括对皮肤施用根据权利要求1所述的胶原蛋白和/或根据权利要求6的组合物，以及任选地对皮肤应用其他美容和/或化妆产品；
优选地，所述化妆或美容方法是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓方法；
优选地，施用为局部施用；
优选地，施用为经皮施用。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的胶原蛋白、根据权利要求2所述的核酸、根据权利要求3所述的载体和/或根据权利要求4所述的宿主细胞在医药、化妆或美容产品中的用途或者用于皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓的用途，
优选地，其中产品是外用产品，
优选地，其中化妆或美容产品是皮肤抗皱、控油、修复和/或舒缓产品；
优选地，产品选自生物敷料、人体仿生材料、整形美容材料、类器官培养材料、心血管支架材料、涂层材料、组织注射填充材料、眼科材料、妇产科生物材料、神经修复再生材料、肝脏组织材料及血管修复再生材料、3D打印人造器官生物材料。
- [权利要求 11] 根据权利要求1所述的胶原蛋白、根据权利要求2所述的核酸、根据权利要求3所述的载体和/或根据权利要求4所述的宿主细胞在制备药物或试剂盒中的用途，所述药物或试剂盒用于抗炎或者降低炎性细胞因子，如TNF- α 。
- [权利要求 12] 降低细胞中的炎性细胞因子水平的方法，其包括使细胞与根据权利要求1所述的胶原蛋白和/或根据权利要求6的组合物。