

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.14

(51) Int. Cl. *C07K 14/78* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.09

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ КОЛЛАГЕН И СПОСОБ ЕГО КОНСТРУИРОВАНИЯ

(31) 202010331037.8

(32) 2020.04.24

(33) CN

(86) PCT/CN2020/095014

(87) WO 2021/212627 2021.10.28

(71) Заявитель:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

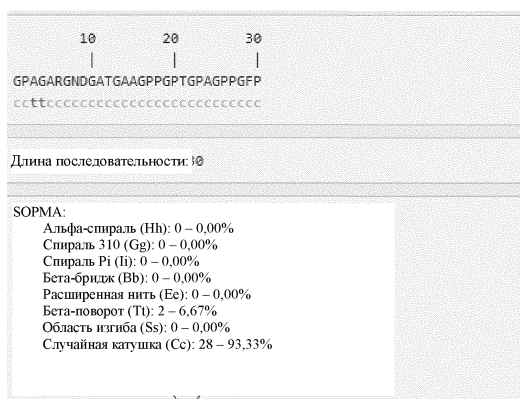
(72) Изобретатель:

Гу Сяосун, Цянь Тяньмэй, Ван Хункуй, Сунь Хуалинь, Гү Юнь (CN)

(74) Представитель:

**Забегаяева У.Г., Давыдова Е.Л.,
Мурашев П.М. (RU)**

(57) Изобретение раскрывает рекомбинантный человеческий коллаген и способ его конструирования. Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого коллагена представляет собой код посл. № 1: GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP. Рекомбинантный человеческий коллаген не имеет сигнального пептида и трансмембранной структуры. Это новый гидрофильный белок. Кроме того, белок не имеет антигенных детерминант и не вызывает иммунного отторжения при введении в организм человека. Изобретение также раскрывает способ конструирования и синтеза низкоиммуногенного и гидрофильного рекомбинантного человеческого коллагена. Рекомбинантный человеческий коллаген, синтезированный по изобретению, имеет высокую чистоту, отсутствие скрытой вирусной опасности и высокую экспрессию. Белок может быть широко использован в биомедицине, регенеративной медицине, тканевой инженерии, а также в косметике, продуктах для здоровья, туалетных принадлежностях и других сопутствующих продуктах.



Рекомбинантный человеческий коллаген и способ его конструирования

1. Область техники

5 Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к рекомбинантному человеческому коллагену и способу его конструирования.

2. Уровень техники

Коллаген является наиболее распространенным белком у млекопитающих,
10 на его долю приходится около 30% общего белка. Он широко присутствует в коже животных, хрящах, кровеносных сосудах, а также других тканях и органах, участвует в росте, развитии, дифференцировке клеток, адгезии, реакции связывания антиген-антитело и других важных жизненных процессах организмов. На сегодняшний день у позвоночных и высших беспозвоночных
15 обнаружено 28 различных типов коллагена. Среди этих типов коллагена коллаген типа I является наиболее распространенным у позвоночных. Он соединяется с другими молекулами в разных пропорциях, образуя различные тканевые каркасы, такие как базальная мембрана, связки, сухожилия, кожа и кровеносные сосуды, что придает им высокую механическую прочность.

20 Наиболее типичная структура коллагена представляет собой волокнистый белок, образованный намоткой пептидных цепей с трехцепочечной спиральной структурой. Упорядоченная агрегация трехнитевых спиральных молекул делает его молекулярную структуру очень стабильной, а волокна обладают хорошей ударной вязкостью. В то же время эта спиральная
25 структура из трех нитей может улучшить механическую прочность коллагена. Расположение аминокислот в первичной структуре коллагена соответствует

периодическому закону «глицин-Х-У (где Х, У – любая аминокислота, кроме глицина)».

Коллаген широко используется в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности из-за его превосходных биологических характеристик, таких как низкая иммуногенность, хорошая биосовместимость и биоразлагаемость. В последние годы коллаген широко используется в медицине в виде мембран, губок, инъекций, эмболии и других аспектов косметологии, ортопедии, восстановлении после ожогов, травм, восстановления твердых тканей и так далее. Однако природный коллаген нерастворим в воде, а свойства коллагена, выделенного из животных, неодинаковы, что затрудняет дальнейшую переработку. На данный момент коллаген в основном извлекают из соединительной ткани животных, такой как кожа свиньи, воловья кожа или кожа рыбы, кислотным методом, щелочным методом и различными методами ферментативного гидролиза. Тем не менее, коллаген из животных имеет много скрытых опасностей вируса, и он будет вызывать реакцию отторжения при воздействии на организм человека; во-вторых, коллаген, синтезированный химическими методами, не может не потерять свою биологическую активность, а технология сложна, методы экстракции не являются экологически чистыми, а стоимость высока, поэтому применение коллагена во многих областях, например, в медицине, сильно ограничено.

С бурным развитием современной молекулярной биологии люди стали обращать внимание на использование технологий генной инженерии для получения рекомбинантного человеческого коллагена с использованием различных клеток-хозяев, таких как насекомые, трансгенные мыши, кишечная палочка и так далее. Например, Фан Дайди из Северо-Западного университета

и другие исследователи использовали культуру ферментации кишечной палочки высокой плотности для производства человеческого коллагена, однако экспрессия белка составляла менее 30%, а бактериальная система экспрессии имела проблемы с биобезопасностью, например, из-за наличия эндотоксина и пирогена, а белок, полученный при экспрессии, часто существует в виде телец включения, которые трудно очистить, поэтому продукт не является чистым и поэтому его трудно применять в клинической практике. Поэтому в настоящее время все больше и больше ученых начинают использовать инженерные бактерии пичиа пасторис для ферментации и культивирования рекомбинантного человеческого коллагена. Хотя он имеет преимущества отсутствия источника тепла и внеклеточной секреции продуктов, он также имеет много недостатков, таких как длительный цикл ферментации, низкая эффективность производства и низкая степень чистоты. Поэтому в технической области получения рекомбинантного человеческого коллагена необходимо срочно разработать метод с высокой степенью чистоты, высоким уровнем безопасности, высоким выходом, коротким циклом, высокой гидрофильностью и простым массовым производством; более того, для лучшего клинического применения, во избежание отторжения человеческим организмом необходимо разработать низкоиммуногенный рекомбинантный человеческий коллаген.

Суть изобретения

Техническая задача, решаемая настоящим изобретением, заключается в том, чтобы предложить рекомбинантный человеческий коллаген и способ его конструирования с учетом недостатков вышеупомянутого предшествующего уровня техники. Рекомбинантный человеческий коллаген имеет короткий

пептидный сегмент, может быть синтезирован напрямую, подходит для крупномасштабного производства, прост в использовании, имеет хорошую растворимость в воде и не содержит антигенных детерминант.

Для решения вышеупомянутых технических проблем техническое
5 решение, принятое в настоящем изобретении, следующее:

В первом аспекте мы предлагается рекомбинантный человеческий коллаген с аминокислотной последовательностью КОД ПОСЛ.№1, которая выглядит следующим образом:

GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP.

10 Среди них структура рекомбинантного человеческого коллагена представляет собой одноцепочечную односпиральную структуру, демонстрирующую характеристики последовательности коллагена «глицин-Х-У (где Х и У – любые аминокислоты, кроме глицина)», общая
15 длина составляет 30 аминокислот, которые представляют собой пептиды коллагена I типа человека.

При этом молекулярная масса рекомбинантного человеческого коллагена составляет 2526,71 Да, а теоретическая изоэлектрическая точка – 5,84.

При этом рекомбинантный человеческий коллаген не имеет сигнального пептида и трансмембранного домена и является водорастворимым.

20 При этом рекомбинантный человеческий коллаген был проанализирован с помощью инструмента прогнозирования антигенных эпитопов. Прогнозируемые антигенные пептиды, и антигенные детерминанты не были обнаружены.

При этом рекомбинантный человеческий коллаген с наибольшей
25 вероятностью образует неправильную извилистую структуру (беспорядочный клубок) при оперативном анализе с помощью SOPMA.

При этом рекомбинантный человеческий коллаген является новым белком без субклеточной локализации.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена, включающий:

5 этап (1) получить последовательность белка человеческого коллагена типа I в базе данных NCBI;

этап (2) анализ антигенных детерминант белка человеческого коллагена типа I с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных эпитопов
10 Прогнозируемые антигенные пептиды и выполнение скрининга для получения областей с низким уровнем антигенной детерминанты;

этап (3) С помощью онлайн-прогнозирования антигенных детерминантов BitGene выбирается область с низким уровнем антигенных детерминантов (в сочетании с пятью алгоритмами антигенности, гидрофильности, гибкости, доступности поверхности и предсказания β -поворота), и определяется
15 аминокислотная последовательность синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена.

Кроме того, он также включает этап (4), подтверждающий иммуногенность синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных детерминант
20 Прогнозируемые антигенные пептиды.

Последовательность белка человеческого коллагена типа I, полученная из базы данных NCBI, как описано на этапе (1) выше, выглядит следующим образом:

Выполнить поиск «человек и коллаген типа I» в базе данных Ген NCBI и
25 загрузить последовательность белка человеческого коллагена типа I NP_000079.2, длина которой составляет 1464 аминокислоты.

Процесс получения области с низким уровнем антигенной детерминанты, описанный на вышеприведенном этапе (2), выглядит следующим образом:

Вышеупомянутый белок человеческого коллагена I типа человека длиной 1464 аминокислоты использовали для анализа его антигенных детерминант с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных детерминант Прогнозируемые антигенные пептиды (URL: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), отобрали 171 аминокислоту в области низкой антигенной детерминанты 230-400.

Процесс определения синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена на этапе (3) выше, выглядит следующим образом:

Используют выбранный выше человеческий коллаген длиной 171 аминокислоты, анализ проводят с использованием BitGene с пятью стандартными методами онлайн-антигенности Антигенность Коласкара и Тонгаонкара, гидрофильности Гидрофильность Паркера, гибкость Гибкость Карплюса и Шульца, доступности Доступность поверхности Эмини, β -поворота Бета-поворот Чоу и Фасмана прогнозирования антигенных эпитопов.

Выбирают с низким уровнем антигенных детерминант, высокой гидрофильностью в сочетании с характеристиками последовательности коллагена, то есть демонстрирующие правило расположения «глицин-X-Y (где X, Y представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина)», предпочтительно получить низкоиммуногенные, гидрофильные рекомбинантные последовательности человеческого коллагена.

Согласно настоящему изобретению сегмент рекомбинантного пептида коллагена человека является коротким, может быть синтезирован напрямую, имеет высокий выход, короткий цикл, высокую степень чистоты, не содержит

скрытой вирусной опасности и является водорастворимым.

Кроме того, последовательность рекомбинантной ДНК (КОД ПОСЛ. №2) для получения рекомбинантного человеческого коллагена также представлена следующим образом:

5 GGCCCTGCTGGTGCTCGTGGAATGATGGTGCTACTGGTGCTGCCGG
GCCCCCTGGTCCCACCGGCCCGCTGGTCCTCCTGGCTTCCCT.

По сравнению с предшествующим уровнем техники рекомбинантный человеческий коллаген и способ его конструирования, предусмотренные изобретением, имеют следующие преимущества:

10 1. Пептидный сегмент рекомбинантного человеческого коллагена по изобретению является коротким и имеет длину всего 30 аминокислот. Он может быть синтезирован напрямую компанией без прокариотической или эукариотической экспрессии. Он прост в использовании и позволяет легко получать большое количество белков; кроме того, нет скрытой опасности
15 вируса, а степень чистоты, определяемая с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, достигает 95% и более.

2. Согласно настоящему изобретению рекомбинантный человеческий коллаген обладает низкой иммуногенностью и является водорастворимым. Его аминокислотный состав такой же, как и соответствующая часть
20 аминокислотной последовательности природного коллагена. Он не вызывает иммунного отторжения при использовании в организме человека и может широко применяться в клинической практике.

Описание прилагаемых чертежей

25 Фиг.1 представляет собой диаграмму анализа сигнальных пептидов рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом

осуществления настоящего изобретения;

Фиг. 2 представляет собой диаграмму анализа трансмембранного домена рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения;

5 Фиг.3 представляет собой диаграмму анализа гидрофильности рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения;

Фиг.4 представляет собой диаграмму структурного анализа рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения;

Фиг. 5 представляет собой карту прогнозирования антигенной детерминанты рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения;

Фиг. 6 представляет собой схему локализации клеток рекомбинантного человеческого коллагена в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения;

Фиг.7 представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматограмму рекомбинантного коллагена человека в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

20

Конкретные варианты осуществления

Изобретение более подробно описано ниже в сочетании с прилагаемыми чертежами и вариантами осуществления.

Пример 1

25 Способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена, включающий:

(1) получить последовательность белка человеческого коллагена типа I в базе данных NCBI;

(2) анализ антигенных детерминант белка человеческого коллагена типа I с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных эпитопов
5 Прогнозируемые антигенные пептиды и выполнение скрининга для получения областей с низким уровнем антигенной детерминанты;

(3) с помощью онлайн-прогнозирования антигенных детерминантов BitGene выбирается область с низким уровнем антигенных детерминантов (в сочетании с пятью алгоритмами антигенности, гидрофильности, гибкости,
10 доступности поверхности и предсказания β -поворота), и определяется аминокислотная последовательность синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена.

(4) Подтверждение иммуногенности синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена с помощью онлайн-инструмента прогнозирования
15 антигенных детерминант Прогнозируемые антигенные пептиды.

Последовательность белка человеческого коллагена типа I, полученная из базы данных NCBI, как описано на этапе (1) выше, выглядит следующим образом:

Выполнить поиск «человек и коллаген типа I» в базе данных Ген NCBI и
20 загрузить последовательность белка человеческого коллагена типа I NP_000079.2, длина которой составляет 1464 аминокислоты.

Процесс получения области с низким уровнем антигенной детерминанты, описанный на вышеприведенном этапе (2), выглядит следующим образом:

Вышеупомянутый белок человеческого коллагена I типа человека длиной
25 1464 аминокислоты использовали для анализа его антигенных детерминант с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных детерминант

Прогнозируемые антигенные пептиды (URL: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), отобрали 171 аминокислоту в области низкой антигенной детерминанты 230-400.

Процесс определения синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена на этапе (3) выше, выглядит следующим образом:

Используют выбранный выше человеческий коллаген длиной 171 аминокислоты, анализ проводят с использованием BitGene с пятью стандартными методами онлайн-антигенности Антигенность Коласкара и Тонгаонкара, гидрофильности Гидрофильность Паркера, гибкость Гибкость Карплюса, доступности Доступность поверхности Эмини, β -поворота Бета-поворот Чоу и Фасмана прогнозирования антигенных эпитопов.

Выбирают с низким уровнем антигенных детерминант, высокой гидрофильностью в сочетании с характеристиками последовательности коллагена, то есть демонстрирующие правило расположения «глицин-X-Y (где X, Y представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина)», предпочтительно получить низкоиммуногенные, гидрофильные рекомбинантные последовательности человеческого коллагена (КОД ПОСЛ. №1), например: GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP.

Пример 2: Способ синтеза рекомбинантного человеческого коллагена
Способ синтеза рекомбинантного человеческого коллагена, включающий следующие стадии:

1. Набухание твердой смолы дихлорметаном в течение 15 минут, удаление раствора, удаление флуоренового метоксикарбонила 20% раствором пиперидина/диметилформамида в течение 15 минут, промывание диметилформамидом 9 раз, взвешивание защитной аминокислоты, о-бензотриазолтетраметилмочевины гексафторфосфата, 1

-гидроксibenзотриазол, N,N-диизопропилэтиламин для реакции конденсации в течение 40 минут, смолу промывают диметилформамидом 6 раз после достижения точки, затем берут небольшое количество смолы и наблюдают за реакцией с раствором нингидрина, результат показывает отсутствие цвета.

5 Реакция завершена.

2. Дефлуоренметоксикарбонил дефторируют 20% раствором пиперидина/диметилформамида в течение 15 минут, промывают диметилформамидом 9 раз, взвешивают защитную аминокислоту, о-бензотриазол тетраметилмочевину гексафторфосфат,

10 1-гидроксibenзотриазол, N,N-диизопропилэтиламин для реакции конденсации в течение 40 минут, промывают смолу диметилформамидом 6 раз после того, как реакция достигнет точки, затем берут небольшое количество смолы с раствором нингидрина для мониторинга реакции, результат показывает отсутствие цвета и завершение реакции. И так до завершения реакции до
15 последней аминокислоты.

3. Пептид смолы подкисляют и расщепляют смесью 95% трифторуксусной кислоты/воды в течение 2 часов, отфильтровывают и удаляют смолу, добавляют маточный раствор к эфиру для отделения пептида и центрифугируют раствор для получения пептида. Неочищенный полипептид
20 очищают высокоэффективной жидкостной хроматографией и лиофилизируют для получения чистого полипептида.

Чистота синтезированного рекомбинантного человеческого коллагена по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии составила более 95% (как показано на фиг.7).

25 Под микроскопом наблюдают приготовленный рекомбинантный человеческий коллаген, который представляет собой неправильную

извилистую завитую структуру.

Тест на растворимость в воде рекомбинантного человеческого коллагена выглядит следующим образом:

5 растворяют 32 мг рекомбинантного человеческого коллагена в 8 мл воды, не перемешивая, чтобы образовался прозрачный раствор без цвета, осадков и плавающих частиц. Результат показывает, что рекомбинантный человеческий коллаген, полученный согласно изобретению, обладает хорошей растворимостью в воде и подтверждается, что он является гидрофильным белком.

10 Рекомбинантный человеческий коллаген, синтезированный по изобретению, имеет высокую чистоту, отсутствие скрытой вирусной опасности и высокую экспрессию. Белок может быть широко использован в биомедицине, регенеративной медицине, тканевой инженерии, а также в косметике, продуктах для здоровья, туалетных принадлежностях и других
15 сопутствующих продуктах.

Пример 3: Анализ основных свойств рекомбинантного человеческого коллагена

Рекомбинантный человеческий коллаген, его последовательность (КОД ПОСЛ. №1) следующая:

20 GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP.

Структура рекомбинантного человеческого коллагена представляет собой одноцепочечную односпиральную структуру, демонстрирующую
характеристики последовательности коллагена G-X-Y (где X и Y представляют собой любые аминокислоты, отличные от глицина), общая длина составляет
25 30 аминокислот, является пептидом человеческого коллагена I типа.

Молекулярная масса рекомбинантного человеческого коллагена

составляет 2526,71 Да, а теоретическая изоэлектрическая точка – 5,84.

Как показано на фиг. 1, рекомбинантный белок человеческого коллагена был проанализирован с помощью инструмента прогнозирования SignalP, который показал, что белок не содержит сигнального пептида; как показано на
5 фиг. 2, рекомбинантный белок человеческого коллагена не имеет трансмембранного домена по анализу прогнозирования TMHMM; как показано на фиг. 3, рекомбинантный белок человеческого коллагена является гидрофильным белком согласно анализу ExPASy; как показано на фиг.4, рекомбинантный человеческий коллаген, скорее всего, образует неправильную
10 извилистую структуру (беспорядочный клубок) с помощью онлайн-анализа SOPMA.

Пример 4: анализ антигенных детерминант рекомбинантного человеческого коллагена

Рекомбинантный человеческий коллаген, его последовательность (КОД
15 ПОСЛ. №1) следующая:

GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP

Антигенная детерминанта белка проанализирована с помощью онлайн-инструмента предсказания эпитопов Прогнозируемые антигенные пептиды (URL: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), ее средняя
20 антигенность составила 0,9687, антигенные детерминанты не были обнаружены (показаны на фиг.5).

Пример 5: Клеточная локализация рекомбинантного человеческого коллагена

Рекомбинантный человеческий коллаген, его последовательность (КОД
25 ПОСЛ. №1) следующая:

GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP

Белок анализировали онлайн с помощью PredictProtein (веб-сайт: <https://www.predictprotein.org/home>) Онлайн-анализ показал, что белок был новым белком, субклеточной локализации обнаружено не было (как показано на фиг.6).

5

Список последовательностей

<110> Наньтун Университи

10 <120> Разновидность рекомбинантного человеческого коллагена и способ его изготовления

<160> 2

15 <170> Список последовательностей SIPO 1.0

<210> 1

<211> 30

<212> Белок

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Коллаген rh

25

<400> 1

Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly

1

5

10

15

Pro Pro Gly Pro Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Phe Pro

20

25

30

5

<210> 2

<211> 90

<212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность рекомбинантной ДНК

15 <400> 2

ggccctgctg gtgctcgtgg aaatgatggt gctactggtg ctgccggggcc ccctgggtccc

60

accggccccg ctggtcctcc tggtctccct

90

20

Формула изобретения

1. Рекомбинантный человеческий коллаген, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого коллагена представляет собой КОД ПОСЛ. №1: GPAGARGNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFP.

2. Рекомбинантный человеческий коллаген по п.1, отличающийся тем, что структура описанного рекомбинантного человеческого коллагена представляет собой одноцепочечную, односпиральную структуру, представляет характерную последовательность коллагена «глицин-X-Y», где X и Y представляют собой любые аминокислоты, кроме глицина, а общая длина составляет 30 аминокислот, которые представляют собой пептиды коллагена I типа человека.

3. Рекомбинантный человеческий коллаген по п.1, отличающийся тем, что молекулярная масса рекомбинантного человеческого коллагена составляет 2526,71 Да, а теоретическая изоэлектрическая точка – 5,84.

4. Рекомбинантный человеческий коллаген по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный человеческий коллаген не имеет сигнального пептида и трансмембранного домена и представляет собой гидрофильный белок.

5. Рекомбинантный человеческий коллаген по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный человеческий коллаген не имеет антигенных детерминант и представляет собой низкоиммуногенный белок.

6. Рекомбинантный человеческий коллаген по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный человеческий коллаген может образовывать неправильную извилистую завитую структуру.

7. Способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена

по п.1, отличающийся тем, что описанный способ включает:

этап (1) получить последовательность белка человеческого коллагена типа I в базе данных NCBI;

5 этап (2) анализ антигенных детерминант белка человеческого коллагена типа I с помощью онлайн-инструмента прогнозирования антигенных эпитопов Прогнозируемые антигенные пептиды и отбор для получения областей с низким уровнем антигенной детерминанты;

10 этап (3) С помощью онлайн-прогнозирования антигенных детерминантов BitGene (в сочетании с пятью алгоритмами антигенности, гидрофильности, гибкости, доступности поверхности и предсказания β -поворота) выбирается область с низкой антигенной детерминантой, гидрофильной области и в сочетании с характеристиками последовательности коллагена для определения аминокислотной последовательности синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена.

15 8. Способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена по п.7, отличающийся тем, что порядковый номер белка человеческого коллагена типа I составляет NP_000079.2, длина 1464 аминокислоты.

20 9. Способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена по п.8, отличающийся тем, что на этапе (2) выбранная область низкого эпитопа представляет собой 171 аминокислоту при 230-400 в белке коллагена I типа человека.

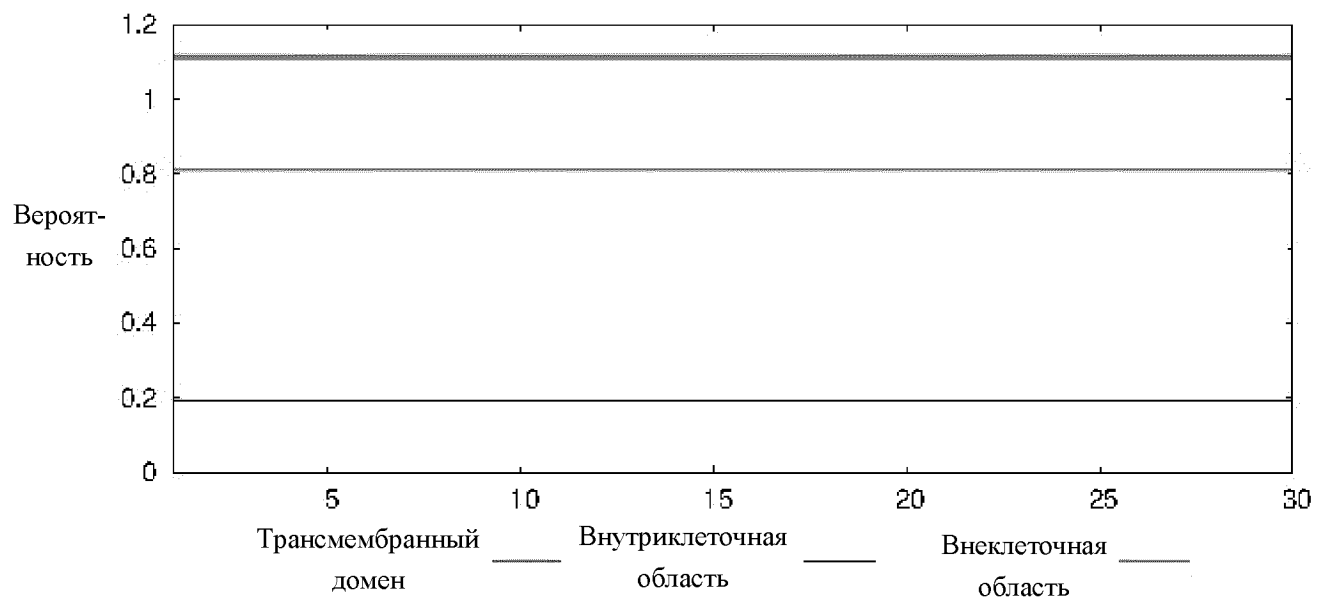
10. Способ конструирования рекомбинантного человеческого коллагена по п.9, отличающийся тем, что на этапе (2) для области с низкой антигенной детерминантой, состоящей из 171 аминокислоты, для анализа и определения
25 ее антигенной детерминанты использовались стандартные онлайн-методы BitGene для определения антигенности, гидрофильности, гибкости,

доступности поверхности и предсказания эпитопа β -поворота;

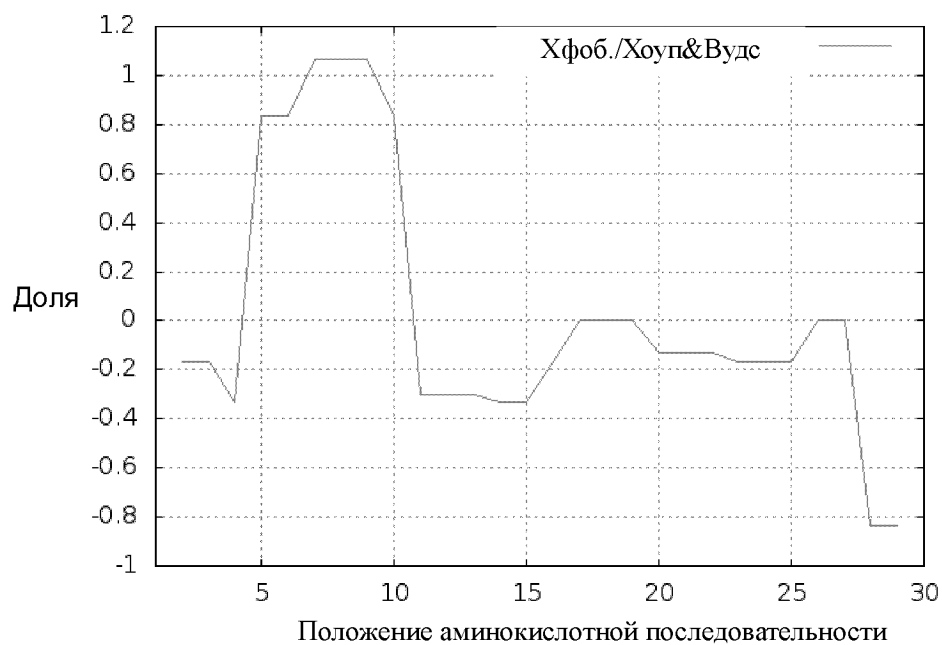
5 выбирают с низким уровнем антигенных детерминант, высокой гидрофильностью в сочетании с характеристиками последовательности коллагена, то есть демонстрирующие правило расположения «глицин-X-Y (где X, Y представляет собой любую аминокислоту, кроме глицина)», определяют аминокислотную последовательность синтезируемого рекомбинантного человеческого коллагена.



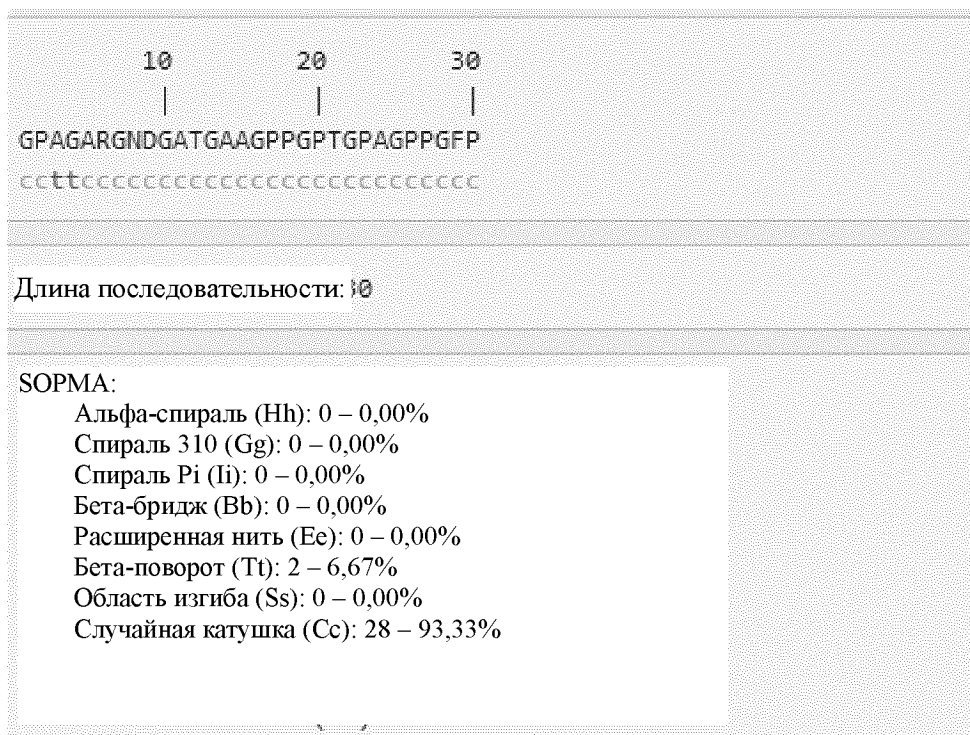
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5

Прогнозирование локализации белка

Прогнозирование локализации у растений

Результаты не найдены

Прогнозирование локализации у животных

Результаты не найдены

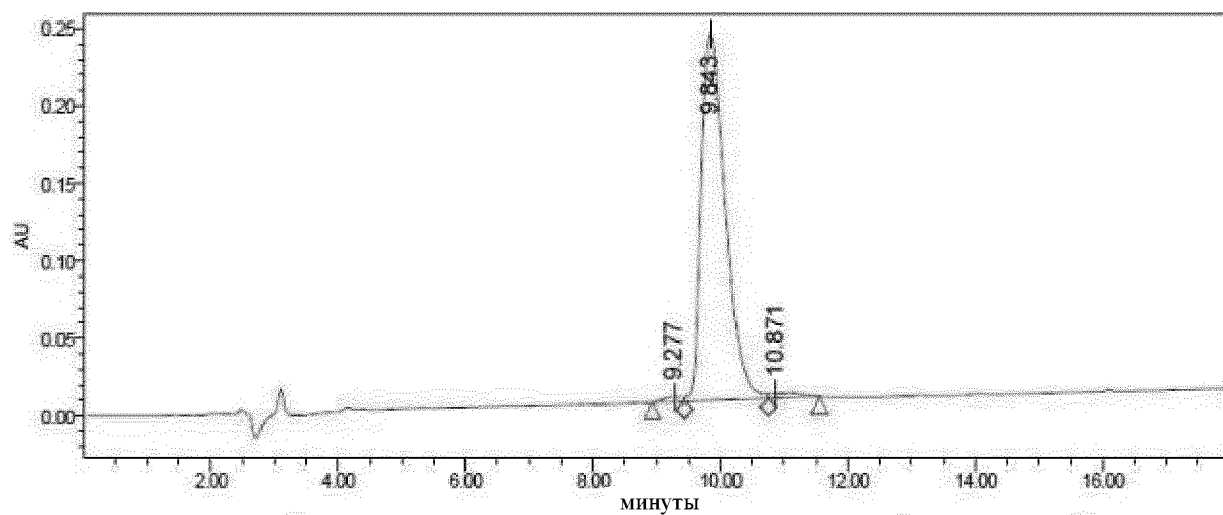
Прогнозирование локализации у прокариот

Результаты не найдены

Прогнозирование сигналов ядерной локализации (NLS)

Этот белок не содержит сигнала ядерной локализации

Фиг.6



Название образца Р190312-1, склянка для пробы 38, введение пробы 1

Каналы обработки: 2487 каналов 1

	Канал обработки	Время удерживания (минуты)	Область	% область	Высота пика
1	2487 Канал 1	9.277	58381	0.91	2820
2	2487 Канал 1	9.843	6243626	97.47	236656
3	2487 Канал 1	10.871	103860	1.62	3230

Фиг.7