

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045448**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.27

(21) Номер заявки
202292044

(22) Дата подачи заявки
2020.07.24

(51) Int. Cl. **A61L 27/22** (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

**(54) СПОСОБ СОЗДАНИЯ ШЕЛКОВОГО ФИБРОИНОВОГО НЕРВНОГО
ТРАНСПЛАНТАТА, СЛИТОГО С NT3**

(31) 202010396807.7

(32) 2020.05.12

(33) CN

(43) 2022.12.27

(86) PCT/CN2020/104048

(87) WO 2021/227255 2021.11.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:
**Лю Янь, Лю Мэй, Гу Сяосун, Гуань
Тучэнь (CN)**

(74) Представитель:
**Забгаева У.Г., Давыдова Е.Л.,
Мурашев П.М. (RU)**

(56) CN-A-108114315

CN-A-103705979

CN-A-1869072

CN-A-105031728

CN-A-1807459

CN-A-101597335

WO-A2-2017123383

MADDURI, S. et al. "Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves" Journal of Controlled Release, Vol. 161, 08 December 2011 (2011-12-08), pp. 274-282

(57) Изобретение относится к области биомедицинских материалов и, в частности, к шелковому фиброинному нервному трансплантату, слитому с NT3, и к способу его создания. Этапы включают: синтезировать фрагмента гена, содержащего легкую цепь фиброина шелка и NT-3, соединить его с вектором экспрессии рЕТ-30 и перенести полученный рекомбинантный вектор экспрессии в кишечную палочку BL21 для получения слитого белка; поместить шелковую фиброинную сеть в форму, смешать слитый белок и раствор шелкового фиброина, лиофилизировать, сшить шелковый фиброин и слитый белок, чтобы сформировать нервный канал; после деформационной обработки наконеч получают шелковые фиброиновые нервные трансплантаты с активностью NT-3. Шелковый фиброиновый нервный трансплантат, полученный в соответствии с изобретением, может играть роль защиты нерва и регенерации нерва в течение длительного времени, обеспечивая при этом механическую поддержку, и может регулировать долю активного пептида NT-3 в нервном катетере в соответствии с фактической ситуацией, которая способствует восстановлению поврежденного нерва.

B1

045448

045448

B1

Область техники

Изобретение относится к области биомедицинских материалов, в частности к шелковому фиброинному нервному трансплантату с NT3-активностью, и может способствовать восстановлению нервов, что может быть применено при восстановлении и регенерации периферических нервов, травмах спинного и головного мозга.

Уровень техники

С развитием тканевой инженерии, биоматериаловедения и других новых дисциплин для восстановления нервов используются все больше и больше биоматериалов. Превосходные биоматериалы должны обладать хорошей биосовместимостью, поддерживать клеточную адгезию, миграцию, межклеточное взаимодействие, пролиферацию и дифференцировку. В то же время эти материалы также нуждаются в соответствующей скорости деградации, механических свойствах и ограниченном иммунном ответе, а также имеют множество вариантов обработки, которые могут изменять структуру и морфологию в соответствии с конкретными потребностями ткани. В качестве компонента натуральной ткани белок является рациональным выбором для приложений тканевой инженерии. Структурные белки, такие как коллаген, эластин, фибриллярный белок, альбумин и фибрин, используются в качестве шовных материалов, тканевых каркасов, гемостатиков и средств доставки лекарств.

Повреждение нерва включает повреждение периферического нерва и повреждение центрального нерва. В настоящее время для лечения отдаленных повреждений периферических нервов и повреждений спинного мозга часто требуется использование различных типов трансплантатов. Из-за отсутствия источников и ограниченной области применения начинают искать новые заменители тканеинженерных трансплантатов. Протеин шелка является распространенным природным биополимерным материалом, который имеет долгую историю применения в организме человека в качестве шовного материала. В последние годы он постепенно привлекает внимание людей как биоматериал благодаря некоторым своим характеристикам. По сравнению с другими биоматериалами на основе белков из тех же или гетерогенных исходных тканей, фиброин шелка имеет несколько основных преимуществ: хорошую биосовместимость, отличные механические свойства, контролируемую биоразлагаемость, простую технологию обработки и др. В то же время полимеры фиброина шелка проявляют различную пластичность при обработке. Благодаря изменениям в технологии производства можно получить различные конфигурации матриц, включая трехмерную пористую пену, нановолокна, гидрогели, трубки и пленки, которые можно применять для восстановления различных тканей. Нейротрофический фактор 3 представляет собой белок, кодируемый геном NTF3. Это важный член семейства факторов роста нервов. Он способен питать нейроны периферической и центральной нервной системы. Он может не только способствовать выживанию существующих нейронов, но также выживанию и дифференцировке новообразованных нейронов и синаптических связей.

В настоящее время функция каркасов тканевой инженерии, построенных только из фиброина шелка, является относительно единственной, а роль содействия восстановлению нервной ткани относительно ограничена. Было изучено, что нервные трансплантаты могут быть пропитаны питательными факторами (такими как NGF) или лиофилизированы после смешивания с фиброином шелка для формирования проводников, что оказывает хороший эффект на стимулирование роста нервов на ранней стадии, однако этот эффект будет постепенно ослабевать с увеличением времени. В то же время нестабильность факторов питания в организме и ограниченность источников сильно ограничивают их использование.

Суть изобретения

Стремясь устранить недостатки предшествующего уровня техники, изобретение объединяет активный пептид нейротрофического фактора 3 (NT-3) с пептидом легкой цепи фиброина шелка с образованием слитого белка. На основе слитого белка осуществляется самосборка фиброина шелка и получается новый тип нервного трансплантата, способный не только обеспечить хорошую механическую поддержку, но и стабильно длительное время выполнять нейротрофическую функцию.

Техническая схема настоящего изобретения выглядит следующим образом.

Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, включающий следующие этапы:

синтезировать фрагмента гена, содержащего легкую цепь фиброина шелка и NT-3, соединить его с вектором экспрессии pET-30 и перенести полученный рекомбинантный вектор экспрессии в кишечную палочку BL21 для получения слитого белка;

слитый белок и раствор фиброина шелка смешать для получения раствора смешанного белка, шелковую фиброиновую сеть поместить в форму, раствор смешанного белка залить в форму для лиофилизации и формирования нервного канала; после денатурации получают конечный продукт с активностью NT-3 из шелковых фиброиновых нервных трансплантатов. Далее, из фиброина шелка на ткацком станке ткнут шелковую фиброиновую сеть.

Далее, способ создания раствора шелкового фиброина заключается в следующем: шелковое фиброиново волокно помещают в раствор тиоцианата лития для растворения, а растворенный раствор помещают в мешок для диализа и подвергают диализу с тройной дистиллированной водой в качестве диализата в течение 60-80 часов для получения раствора фиброина шелка.

Далее способ создания шелкового фиброина заключается в следующем: тутовый шелк помещают в раствор карбоната натрия и кипятят без в течение менее 20 мин, его полностью промывают тройной дистиллированной водой, и этот этап повторяют от 2 до 4 раз для получения волокон фиброина шелка с удаленным наружным серицином.

Далее, концентрация раствора слитого белка и шелкового фиброина составляет 5-40%, массовое соотношение слитого белка и шелкового фиброина составляет 1:99-50:50.

Далее, деформационная обработка заключается в погружении в 60%-ый этанол на 10-14 ч.

Далее, молекулярная масса диализного мешка составляет 12-16 кДа.

Далее температура лиофилизации составляет -70°C.

Далее, концентрация раствора тиоцианата лития составляет 9 моль/л.

Настоящее изобретение также относится к шелковому фиброиновому нервному трансплантату, слитому с NT3, который получают описанным выше способом.

Положительные эффекты.

В предшествующем уровне техники в основном используется метод адсорбции нейротрофического фактора или ковалентного соединения с каркасом. В настоящем изобретении используется биоактивный фрагмент NT-3 и фиброина легкой цепи шелка для одновременной экспрессии в слитом белке. Слитый белок является эффективным компонентом слияния NT-3 с фиброином шелка в качестве основного тела и может фиксироваться в шелковом катетере с фиброином шелка. Он может играть роль нейропротекции и регенерации нервов в течение длительного времени без изменения состава фиброина шелка.

Основным материалом, используемым в настоящем изобретении, является шелковый фиброин, дополненный легкой цепью шелкового фиброина, слитой с активным пептидным сегментом NT-3. В процессе обработки токсичные вещества и вещества с побочными эффектами, такие как сшивающий агент и поверхностно-активное вещество, не добавляются, поэтому он обладает хорошей биосовместимостью.

Когда слитый белок шелкового фиброина согласно настоящему изобретению совместно культивируют *in vitro* с клетками нервной ткани, он проявляет очевидный стимулирующий рост эффект посредством морфологического наблюдения и определения экспрессии факторов, родственных NT-3, среди которых FIBL-NT3-L-NT3 самый активный.

Катетер из шелкового фиброина, описанный в изобретении, вводит легкую цепь шелкового фиброина, слитую с сегментом функционального пептида NT-3, перед кристаллизацией шелкового фиброина. Следовательно, в процессе самосборки шелкового фиброина активный полипептид NT-3 будет фиксироваться в катетере шелкового фиброина вместе с легкой цепью шелкового фиброина, что может играть роль защиты нерва и регенерации нерва в течение длительного времени, в то же время пропорцию активного пептида NT-3 в нервном канале можно регулировать в соответствии с реальной ситуацией, что способствует восстановлению повреждения нерва.

Описание прилагаемых чертежей

На фиг. 1 показано влияние различных конструкций слитых белков, содержащих NT3, на рост нейритов нейронов ганглий дорзальных корешков, культивируемых *in vitro*.

На фиг. 2 показано влияние различных конструкций слитых белков, содержащих NT3, на рост нейритов нейронов ганглий дорзальных корешков, культивируемых *in vitro*.

Конкретные варианты осуществления

Пример 1.

Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, включающий следующие этапы.

1. Экспрессия и очистка слитого белка шелкового фиброина: создание рекомбинантного вектора экспрессии, экспрессия целевого белка и его очистка.
2. Получение волокна шелкового фиброина: взять шелк-сырец из шелка шелковицы, удалить серицин и получить волокно шелкового фиброина.
3. Приготовление раствора шелкового фиброина.
4. Подготовка шелковой фиброиновой сети.
5. Поместить шелковую фиброиновую сеть в форму, перемешать белковый раствор, полученный на этапах 1 и 3, и переместить в форму. Лиофилизировать шелковый фиброин для самосборки и формирования нервного канала.

Пример 2.

Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, включающий следующие этапы.

1. Конструирование рекомбинантного вектора экспрессии: синтезировать фрагмент гена, содержащий легкую цепь шелкового фиброина и NT-3, соединить его с вектором экспрессии pET-30 и завершить конструирование рекомбинантного вектора экспрессии. Различные последовательности слитых белков, содержащие tag и linker, следующие.

Последовательность слитого белка (включая N-концевой His и гибкий Linker):

Длина белка FIBL=253 MW=26898,8 pI=6,10

MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI
 AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHLASAGIPGDACAAANVINS
 YTDGVRSGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNINQLVINPGQLRYSVGPALGC
 AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH
 LLPPVAQVFHQASAGSITDLLRGVGNNGNDATGLVANAQRYIAQAASQVHV

Длина белка FIBL-NT3=372 MW=40503,7 pI=7,39

MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI
 AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHLASAGIPGDACAAANVINS
 YTDGVRSGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNINQLVINPGQLRYSVGPALGC
 AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH
 LLPPVAQVFHQASAGSITDLLRGVGNNGNDATGLVANAQRYIAQAASQVHVYA
 EHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYFE
 TRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRI
 DTSCVCALSRKIGRT

FIBL-linker-NT3 Длина белка=382 MW=41134,1 pI=7,39

MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI
 AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHLASAGIPGDACAAANVINS
 YTDGVRSGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNINQLVINPGQLRYSVGPALGC
 AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH
 LLPPVAQVFHQASAGSITDLLRGVGNNGNDATGLVANAQRYIAQAASQVHVGG
 GGGGGGSAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKT
 GNSPVKQYFYFETRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSEN
 NKLVGWRWIRIDTS CVCALSRKIG RT

FIBL- (NT3) 2 Длина белка=501 MW=54739,0 pI=8,28

MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI
 AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHLASAGIPGDACAAANVINS
 YTDGVRSGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNINQLVINPGQLRYSVGPALGC
 AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH
 LLPPVAQVFHQASAGSITDLLRGVGNNGNDATGLVANAQRYIAQAASQVHVYA
 EHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYFE
 TRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRI
 DTSCVCALSRKIGRTGGGGGGGGGSAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSS
 AIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYFETRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNS
 QCKTSQTYVRA LTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCALSRKIGRT

2. Экспрессия и очистка слитого белка: перенос рекомбинантного вектора экспрессии, полученного на этапе 1, в кишечную палочку BL21, индукция экспрессии при 37°C и разрушение ее ультразвуком. Очистка слитого белка с помощью Ni NTA и его идентификация, чтобы получить слитый белок.

3. Взять соответствующее количество шелка тутового дерева и кипятят его в 0,2% растворе карбоната натрия в течение 30 мин. После извлечения полностью промыть его тройной дистиллированной водой. Повторить этот шаг три раза, чтобы получить шелковое фиброинное волокно с удаленным внешним серицином, и поместить его в ультратонкий стол для просушки в режиме ожидания.

4. Поместите шелковое фиброинное волокно в 9M раствор тиоцианата лития для растворения, поместите растворенный раствор в мешок для диализа (остаточная молекулярная масса составляет около 14 кДа) и диализировать тройной дистиллированной водой в качестве диализата в течение 72 часов для получения раствора шелкового фиброина.

5. Шелковое фиброинное волокно, полученное на этапе 3, вплетают в шелковую фиброинную сеть с помощью ткацкого станка.

6. Смешать слитый белок, полученный на этапе 2, и раствор шелкового фиброина, полученный на этапе 4, в определенной пропорции, чтобы получить раствор смешанного белка. Настроить концентрацию смешанного белкового раствора на 5-40%, а массовое соотношение слитого белка и шелкового фиброина - 1:99-50:50. Поместить полотно из шелковой фиброиновой сети, полученной на этапе 5, в форму, залить раствор смешанного белка в форму и лиофилизировать его при температуре -70°C , шелковый фиброин, слитые белки и шелковая фиброиновая сеть перекрестно связываются, образуя нервные каналы.

7. Замачивание в 60% этаноле для деформационной обработки в течение 12 ч, промывание тройной дистиллированной водой и сушка на воздухе, и наконец, получение шелковых фиброиновых нервных трансплантатов с активностью NT-3.

Чертеж (фиг. 1) и статистическая диаграмма (фиг. 2). Фиброин, слитый с NT-3, FIBL, FIBL-NT3, FIBL-linker-NT3, FIBL-(NT3)₂ способствует росту аксонов DRG. Статистические данные получают из среднего значения длины аксонов 30 нейронов в каждой группе. Из чертежей видно, что по сравнению с контрольной группой NT3 может способствовать росту аксонов клеток, а FIBL-NT3, FIBL-linker-NT3, FIBL-(NT3) могут более эффективно способствовать росту аксонов.

Перечень последовательностей

<110> Наньтун Университи

<120> Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3

<130> EP138232-FZ200paу

<140> EP20935613.8

<141> 2020-07-24

<150> PCT/CN2020/104048

<151> 2020-07-24

<150> CN202010396807.7

<151> 2020-05-12

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 253

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЕПТИД, фиброин шелка

<400> 1

Met His His His His His His Ala Pro Ser Val Thr Ile Asn Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Glu Ile Pro Arg Asp Ile Asp Asp Gly Lys Ala Ser Ser
 20 25 30
 Val Ile Ser Arg Ala Trp Asp Tyr Val Asp Asp Thr Asp Lys Ser Ile
 35 40 45
 Ala Ile Leu Asn Val Gln Glu Ile Leu Lys Asp Met Ala Ser Gln Gly
 50 55 60
 Asp Tyr Ala Ser Gln Ala Ser Ala Val Ala Gln Thr Ala Gly Ile Ile
 65 70 75 80
 Ala His Leu Ser Ala Gly Ile Pro Gly Asp Ala Cys Ala Ala Ala Asn
 85 90 95
 Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Val Arg Ser Gly Asn Phe Ala Gly
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ser Leu Gly Pro Phe Phe Gly His Val Gly Gln Asn Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ile Asn Gln Leu Val Ile Asn Pro Gly Gln Leu Arg Tyr Ser
 130 135 140
 Val Gly Pro Ala Leu Gly Cys Ala Gly Gly Gly Arg Ile Tyr Asp Phe
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Trp Asp Ala Ile Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Phe Leu

045448

```

                165                170                175
Asn Glu Glu Tyr Cys Ile Val Lys Arg Leu Tyr Asn Ser Arg Asn Ser
      180                185                190
Gln Ser Asn Asn Ile Ala Ala Tyr Ile Thr Ala His Leu Leu Pro Pro
      195                200                205
Val Ala Gln Val Phe His Gln Ser Ala Gly Ser Ile Thr Asp Leu Leu
      210                215                220
Arg Gly Val Gly Asn Gly Asn Asp Ala Thr Gly Leu Val Ala Asn Ala
      225                230                235                240
Gln Arg Tyr Ile Ala Gln Ala Ala Ser Gln Val His Val
                245                250

```

```

<210> 2
<211> 372
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> ПЕПТИД, фиброин шелка, слитый с NT3

```

```

<400> 2
Met His His His His His His Ala Pro Ser Val Thr Ile Asn Gln Tyr
1      5      10      15
Ser Asp Asn Glu Ile Pro Arg Asp Ile Asp Asp Gly Lys Ala Ser Ser
      20      25      30
Val Ile Ser Arg Ala Trp Asp Tyr Val Asp Asp Thr Asp Lys Ser Ile
      35      40      45
Ala Ile Leu Asn Val Gln Glu Ile Leu Lys Asp Met Ala Ser Gln Gly
      50      55      60
Asp Tyr Ala Ser Gln Ala Ser Ala Val Ala Gln Thr Ala Gly Ile Ile
      65      70      75      80
Ala His Leu Ser Ala Gly Ile Pro Gly Asp Ala Cys Ala Ala Ala Asn
      85      90      95
Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Val Arg Ser Gly Asn Phe Ala Gly
      100     105     110
Phe Arg Gln Ser Leu Gly Pro Phe Gly His Val Gly Gln Asn Leu
      115     120     125
Asn Leu Ile Asn Gln Leu Val Ile Asn Pro Gly Gln Leu Arg Tyr Ser
      130     135     140
Val Gly Pro Ala Leu Gly Cys Ala Gly Gly Gly Arg Ile Tyr Asp Phe
      145     150     155     160
Glu Ala Ala Trp Asp Ala Ile Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Phe Leu
      165     170     175
Asn Glu Glu Tyr Cys Ile Val Lys Arg Leu Tyr Asn Ser Arg Asn Ser
      180     185     190
Gln Ser Asn Asn Ile Ala Ala Tyr Ile Thr Ala His Leu Leu Pro Pro
      195     200     205
Val Ala Gln Val Phe His Gln Ser Ala Gly Ser Ile Thr Asp Leu Leu
      210     215     220
Arg Gly Val Gly Asn Gly Asn Asp Ala Thr Gly Leu Val Ala Asn Ala
      225     230     235     240
Gln Arg Tyr Ile Ala Gln Ala Ala Ser Gln Val His Val Tyr Ala Glu
      245     250     255
His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu
      260     265     270
Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val
      275     280     285
Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr
      290     295     300
Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys
      305     310     315     320
Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln
      325     330     335
Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp
      340     345     350
Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys
      355     360     365
Ile Gly Arg Thr
      370

```

<210> 3
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЕПТИД, фиброин шелка, слитый с NT3

<400> 3
 Met His His His His His His Ala Pro Ser Val Thr Ile Asn Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Glu Ile Pro Arg Asp Ile Asp Asp Gly Lys Ala Ser Ser
 20 25 30
 Val Ile Ser Arg Ala Trp Asp Tyr Val Asp Asp Thr Asp Lys Ser Ile
 35 40 45
 Ala Ile Leu Asn Val Gln Glu Ile Leu Lys Asp Met Ala Ser Gln Gly
 50 55 60
 Asp Tyr Ala Ser Gln Ala Ser Ala Val Ala Gln Thr Ala Gly Ile Ile
 65 70 75 80
 Ala His Leu Ser Ala Gly Ile Pro Gly Asp Ala Cys Ala Ala Ala Asn
 85 90 95
 Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Val Arg Ser Gly Asn Phe Ala Gly
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ser Leu Gly Pro Phe Phe Gly His Val Gly Gln Asn Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ile Asn Gln Leu Val Ile Asn Pro Gly Gln Leu Arg Tyr Ser
 130 135 140
 Val Gly Pro Ala Leu Gly Cys Ala Gly Gly Arg Ile Tyr Asp Phe
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Trp Asp Ala Ile Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Phe Leu
 165 170 175
 Asn Glu Glu Tyr Cys Ile Val Lys Arg Leu Tyr Asn Ser Arg Asn Ser
 180 185 190
 Gln Ser Asn Asn Ile Ala Ala Tyr Ile Thr Ala His Leu Leu Pro Pro
 195 200 205
 Val Ala Gln Val Phe His Gln Ser Ala Gly Ser Ile Thr Asp Leu Leu
 210 215 220
 Arg Gly Val Gly Asn Gly Asn Asp Ala Thr Gly Leu Val Ala Asn Ala
 225 230 235 240
 Gln Arg Tyr Ile Ala Gln Ala Ala Ser Gln Val His Val Gly Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly
 260 265 270
 Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser
 275 280 285
 Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile
 290 295 300
 Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys
 305 310 315 320
 Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys
 325 330 335
 His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu
 340 345 350
 Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp
 355 360 365
 Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
 370 375 380

<210> 4
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ПЕПТИД, фиброин шелка, слитый с NT3

<400> 4

045448

Met His His His His His His Ala Pro Ser Val Thr Ile Asn Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Glu Ile Pro Arg Asp Ile Asp Asp Gly Lys Ala Ser Ser
 20 25 30
 Val Ile Ser Arg Ala Trp Asp Tyr Val Asp Asp Thr Asp Lys Ser Ile
 35 40 45
 Ala Ile Leu Asn Val Gln Glu Ile Leu Lys Asp Met Ala Ser Gln Gly
 50 55 60
 Asp Tyr Ala Ser Gln Ala Ser Ala Val Ala Gln Thr Ala Gly Ile Ile
 65 70 75 80
 Ala His Leu Ser Ala Gly Ile Pro Gly Asp Ala Cys Ala Ala Ala Asn
 85 90 95
 Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Gly Val Arg Ser Gly Asn Phe Ala Gly
 100 105 110
 Phe Arg Gln Ser Leu Gly Pro Phe Phe Gly His Val Gly Gln Asn Leu
 115 120 125
 Asn Leu Ile Asn Gln Leu Val Ile Asn Pro Gly Gln Leu Arg Tyr Ser
 130 135 140
 Val Gly Pro Ala Leu Gly Cys Ala Gly Gly Gly Arg Ile Tyr Asp Phe
 145 150 155 160
 Glu Ala Ala Trp Asp Ala Ile Leu Ala Ser Ser Asp Ser Ser Phe Leu
 165 170 175
 Asn Glu Glu Tyr Cys Ile Val Lys Arg Leu Tyr Asn Ser Arg Asn Ser
 180 185 190
 Gln Ser Asn Asn Ile Ala Ala Tyr Ile Thr Ala His Leu Leu Pro Pro
 195 200 205
 Val Ala Gln Val Phe His Gln Ser Ala Gly Ser Ile Thr Asp Leu Leu
 210 215 220
 Arg Gly Val Gly Asn Gly Asn Asp Ala Thr Gly Leu Val Ala Asn Ala
 225 230 235 240
 Gln Arg Tyr Ile Ala Gln Ala Ala Ser Gln Val His Val Tyr Ala Glu
 245 250 255
 His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu
 260 265 270
 Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val
 275 280 285
 Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr
 290 295 300
 Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys
 305 310 315 320
 Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln
 325 330 335
 Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp
 340 345 350
 Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys
 355 360 365
 Ile Gly Arg Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Ala
 370 375 380
 Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser
 385 390 395 400
 Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln
 405 410 415
 Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln
 420 425 430
 Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly
 435 440 445
 Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser
 450 455 460
 Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly
 465 470 475 480
 Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg
 485 490 495
 Lys Ile Gly Arg Thr
 500

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с нейротрофическим фактором 3 (NT3), отличающийся тем, что включает следующие этапы:

синтез фрагмента гена, содержащего легкую цепь фиброина шелка и NT-3, соединение его с вектором экспрессии рЕТ-30 и перенос полученного рекомбинантного вектора экспрессии в кишечную палочку BL21 для получения слитого белка;

затем слитый белок и раствор фиброина шелка смешивают для получения раствора смешанного белка, шелковую фиброиновую сеть помещают в форму, раствор смешанного белка заливают в форму для лиофилизации и формирования нервного канала; выполняют деформационную обработку и получают шелковые фиброиновые нервные трансплантаты с активностью NT-3.

2. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что шелковая фиброиновая сеть соткана из шелкового фиброина на ткацком станке.

3. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что способ создания описанного раствора шелкового фиброина заключается в следующем: шелковое фиброиновое волокно помещают в раствор тиоцианата лития для растворения, а полученный раствор помещают в мешок для диализа и подвергают диализу в тройной дистиллированной воде в течение 60-80 ч для получения раствора фиброина шелка.

4. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.2 или 3, отличающийся тем, что способ создания описанного шелкового фиброинового волокна заключается в следующем: тутовый шелк помещают в раствор карбоната натрия и кипятят в течение менее 20 мин, его полностью промывают тройной дистиллированной водой, и этот этап повторяют от 2 до 4 раз для получения волокон фиброина шелка с удаленным наружным серицином.

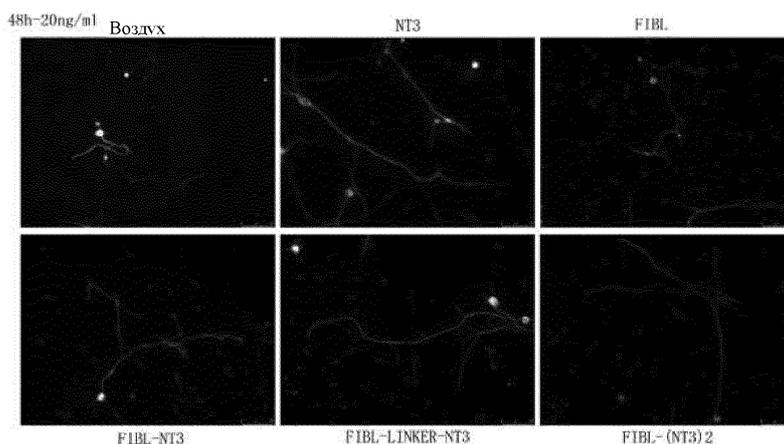
5. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что концентрация белка в смешанном белковом растворе составляет 5-40%; массовое соотношение слитого белка и фиброина шелка составляет 1:99~50:50.

6. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что деформационную обработку проводят замачиванием в 60% этаноле и выдержкой 10-14 ч.

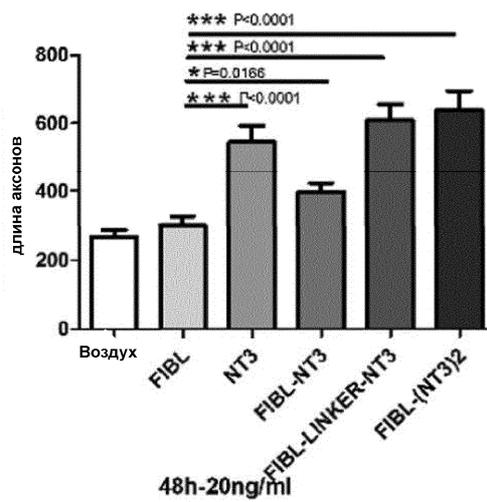
7. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.3, отличающийся тем, что у мешка для диализа молекулярная масса перехвата составляет 12-16 кДа.

8. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что температура лиофилизации составляет -70°C .

9. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что концентрация раствора тиоцианата лития составляет 9 моль/л.



Фиг. 1



Фиг. 2

