

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292044** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.12.27

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

(22) Дата подачи заявки  
2020.07.24

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

(31) 202010396807.7

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

(32) 2020.05.12

(33) CN

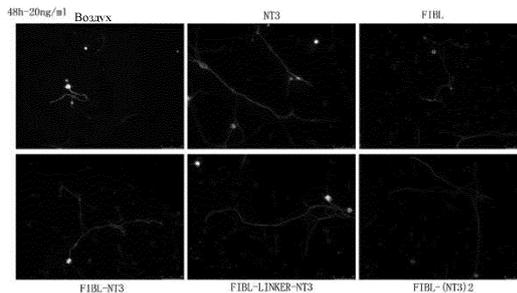
(86) PCT/CN2020/104048

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

(87) WO 2021/227255 2021.11.18

(71) Заявитель:  
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

(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 фрагмент гена, содержащего легкую цепь фиброина шелка и NT3, 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 NT3. 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 NT3 в нервном катетере в соответствии с фактической ситуацией, которая способствует восстановлению поврежденного нерва.



202292044

A1

A1

202292044

## **Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3**

### **1. Область техники**

5       Изобретение относится к области биомедицинских материалов, в частности к шелковому фиброиновому 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.

10

### **2. 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

15       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

20       доставки лекарств.

25

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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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**

10 Стремясь устранить недостатки предшествующего уровня техники, изобретение объединяет активный пептид нейропротекторного 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  
15 обеспечить хорошую механическую поддержку, но и стабильно длительное время выполнять нейропротекторную функцию.

Техническая схема настоящего изобретения выглядит следующим образом:

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

20 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

Слитый белок и раствор фиброина шелка смешать для получения раствора  
25 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.

5 Далее, способ создания раствора шелкового фиброина заключается в следующем: шелковое фиброиновое 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.

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

15 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 часов.

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

20 Далее температура лиофилизации составляет  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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.

25 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**

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

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

### **Конкретные варианты осуществления**

#### Пример 1

Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата,  
15 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  
20 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.  
25 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  
5 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  
10 Linker):

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

MННННННHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI  
AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHL SAGIPGDACAAANVINS  
YTDGVRSNGNFAGFRQSLGPF FGHV GQNLNLINQLVINPGQLRYSVGPALGC  
15 AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIVKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH  
LLPPVAQVFHQ SAGSITDLLRGVGN G NDATGLVANAQRYIAQAASQVHV

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

MННННННHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI  
AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHL SAGIPGDACAAANVINS  
20 YTDGVRSNGNFAGFRQSLGPF FGHV GQNLNLINQLVINPGQLRYSVGPALGC  
AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIVKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH  
LLPPVAQVFHQ SAGSITDLLRGVGN G NDATGLVANAQRYIAQAASQVHVYA  
EHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYE  
TRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVVRALTSENNKLVGWRWIRI  
25 DTSCVCALSRKIGRT

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

MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI  
AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHL SAGIPGDACAAANVINS  
YTDGVRSNGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNLINQLVINPGQLRYSVGPALGC  
AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIVKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH  
5 LLPPVAQVFHQ SAGSITDLLRGVGNNDATGLVANAQRYIAQAASQVHVGG  
GGSGGGGSYAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKT  
GNSPVKQYFYETRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRA L TSEN  
NKLVGWRWIRIDTS CVCALSRKIG RT

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

10 MHHHHHHAPSVTINQYSDNEIPRDIDDGKASSVISRAWDYVDDTDKSI  
AILNVQEILKDMASQGDYASQASAVAQTAGIIAHL SAGIPGDACAAANVINS  
YTDGVRSNGNFAGFRQSLGPFVGHVQNLNLINQLVINPGQLRYSVGPALGC  
AGGGRIYDFEAAWDAILASSDSSFLNEEYCIVKRLYNSRNSQSNNIAAYITAH  
LLPPVAQVFHQ SAGSITDLLRGVGNNDATGLVANAQRYIAQAASQVHVYA  
15 EHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYE  
TRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRA L TSEN  
NKLVGWRWIRIDTS CVCALSRKIGRTGGGGSGGGGSYAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSS  
AIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETRCKEARPVKNGCRGIDDKHWNS  
QCKTSQTYVRA L TSEN  
20 NKLVGWRWIRIDTS CVCALSRKIGRT

20 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.

25 3. Взять соответствующее количество шелка тутового дерева и кипятят его в 0,2% растворе карбоната натрия в течение 30 минут. После извлечения полностью промыть его тройной дистиллированной водой. Повторить этот

шаг три раза, чтобы получить шелковое фиброиновое волокно с удаленным внешним серицином, и поместить его в ультрачистый стол для просушки в режиме ожидания.

4. Поместите шелковое фиброиновое 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 фиброиновое волокно, полученное на этапе 3, вплетают в шелковую фиброиновую 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 часов, 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)<sub>2</sub> 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.

5

## Формула изобретения

1. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, отличающийся тем, что включает следующие этапы:

5            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

10            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; после деформационной обработки наконец получают шелковые фиброиновые нервные трансплантаты с активностью NT-3.

15            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.

20            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 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.

25            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 без в течение менее 20 минут, 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 5. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что концентрация смешанного белкового раствора составляет 5%-40%; массовое соотношение слитого белка и фиброина шелка составляет 1:99~50:50.

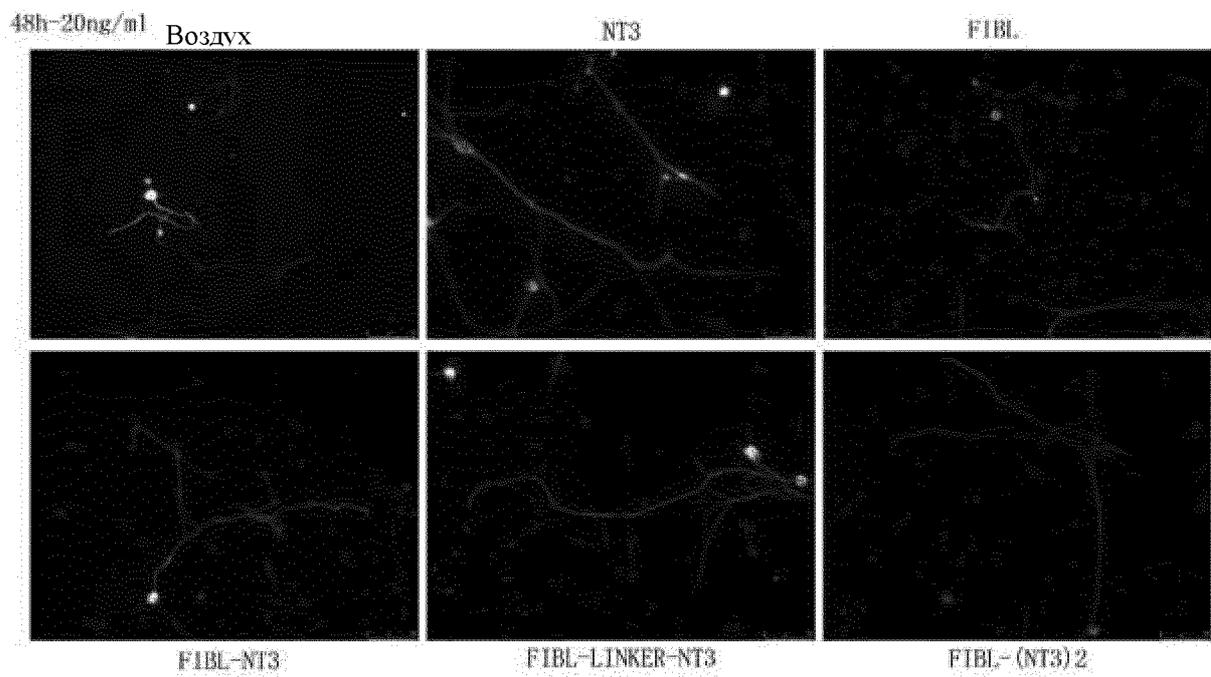
10 6. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что деформационную обработку проводят замачиванием в 60% этаноле и выдержкой 10-14ч.

7. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что молекулярная масса перехваченного диализного мешка 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.

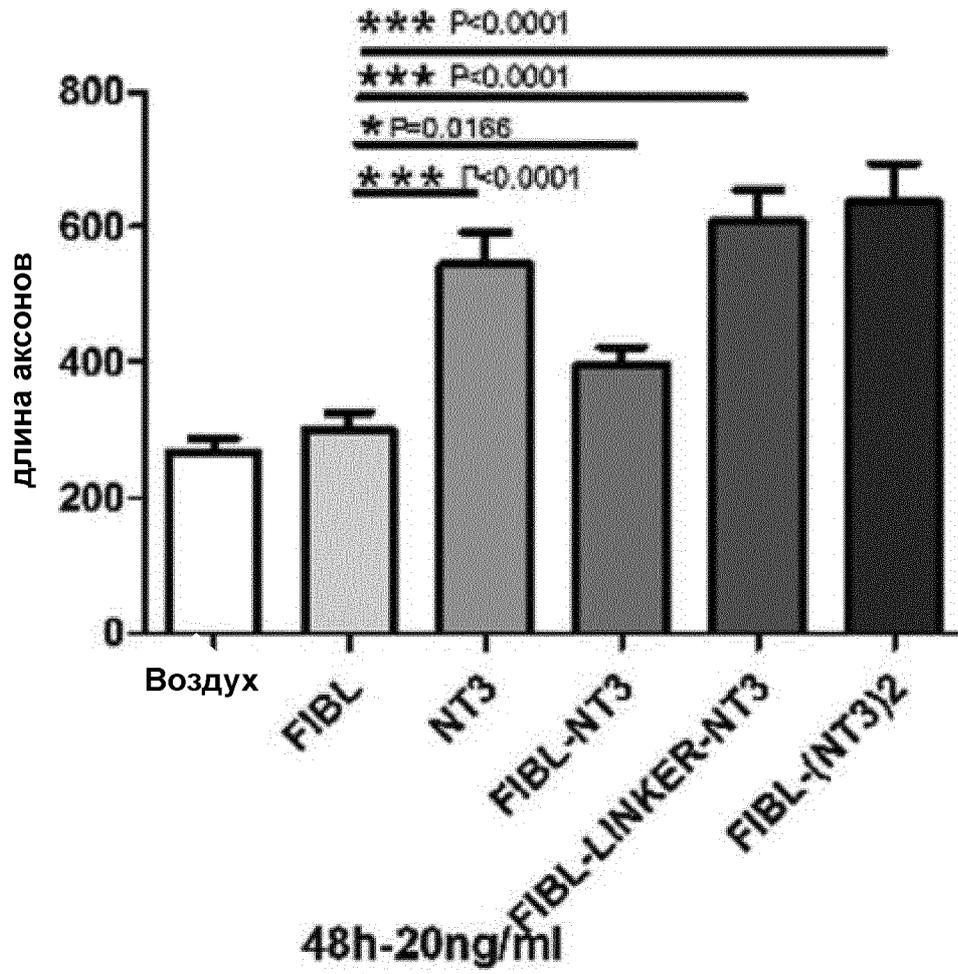
20 9. Способ создания шелкового фиброинового нервного трансплантата, слитого с NT3, по п.1, отличающийся тем, что концентрация раствора тиоцианата лития составляет 9 моль/л.

10. Шелковый фиброиновый нервный трансплантат, слитый с NT3, отличающийся тем, что его получают способом, описанным в любом из пп.1-9.



5

Фиг. 1



Фиг.2