



المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia



الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي لهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لأئحته التنفيذية. يقرر منح :

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

King Abdulaziz City for Science and Technology

بتاريخ : 1442/08/19 هـ

الموافق : 2021/04/01 م

براءة اختراع رقم : SA 7792

عن الإختراع المسمى :

جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS)
حامل لوظيفة بروتين وطريقة تحضيره

Protein Functionalized HA-CS Nanoparticle And Method Of Preparation

وفق ما هو موضح في وصف الإختراع المرفق، وكمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي:

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

[45] تاريخ المنح: 1442/08/19 هـ
الموافق: 2021/04/01 م

براءة اختراع [12]

[19] الهيئة السعودية للملكية الفكرية
[11] رقم البراءة: SA 7792 B1

[51] التصنيف الدولي (IPC⁸):

A61K 038/000, A61K 047/061
A61K 009/051

[56] المراجع:

WO 2007135164, WO 2012052565
US 7312198, WO 2016127251

ALMALIK A. ET AL., "Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, (2013), vol. 172, no. 3, doi:10.1016/J.JCONREL.2013.09.032, ISSN 0168-3659, pages 1142 - 1150, XP028797354 [A] 2,9-13 * page 1143 - column r*

GARCIA-GIL F. A ET AL., "Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4 as a Marker of Acute Rejection in Pancreas Allotransplantation in Pigs", TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ELSEVIER INC, ORLANDO, FL; US, vol. 42, no. 8, doi:10.1016/J.TRANSPROCEED.2010.08.021, ISSN 0041-1345, (20101001), pages 3063 - 3069, (20101021), XP027429432 [A] 2,9-13 * the whole document*

الفاحص: ندى بنت هذال القحطاني

[21] رقم الطلب: 117390079

[22] تاريخ الايداع: 1439/02/09 هـ

الموافق: 2017/10/29 م

[30] بيانات الأسبقية:

US 62/483.515 2017/04/10 م

[72] اسم المخترع: عبدالعزيز مالك المالك، علي حسين

الحسن، ابراهيم علي ال رضوان، ابراهيم عقلاء العنزي، افشان مسعود محمد، هشام حسين بنعبدالكامل، عاصم عبدالعزيز الفدا، وليد محمد الغامدي، هيثم خالد الربيعة

[73] مالك البراءة: مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم

والتقنية

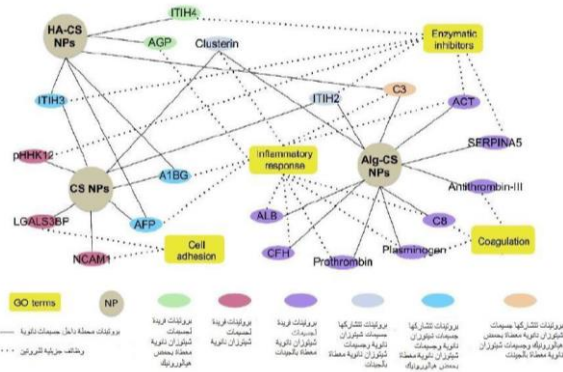
عنوانه: سعودية

جنسيته: ص ب 6086 الرياض 11442، المملكة

العربية السعودية

بحمض الهيالورونيك حاملا لوظائف بروتينات متمتزة للسطح مضادة للالتهاب والتي تم اختيارها من مجموعة من (ITIH4)، و (AGP) ومزيج من (ITIH4) و (AGP)، لتشكيل الجسيم النانوي المضاد للالتهاب والموظف للبروتين. الشكل (1)

عدد عناصر الحماية (12)، عدد الأشكال (3)



[54] اسم الاختراع: جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS) حامل لوظيفة بروتين وطريقة تحضيره

Protein Functionalized HA-CS Nanoparticle And Method Of Preparation

[57] الملخص: تم الإفصاح عن جسيم نانوي مضاد للالتهاب

موظف للبروتين وطريقة تحضير الجسيم النانوي المضاد للالتهاب والموظف للبروتين. ويحتوي الجسيم النانوي المضاد للالتهاب والموظف للبروتين على نواة مركزية تتألف من جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك وبروتينات متمتزة للسطح مضادة للالتهاب والتي تشكل الغلاف الخارجي حول النواة المركزية، حيث يتم اختيار البروتينات المتمتزة للسطح والمضادة للالتهاب من مجموعة من (ITIH4)، و (AGP) ومزيج من (ITIH4) و (AGP). وتتضمن طريقة التحضير تشتيت جسيمات شيتوزان نانوية في حمض الخل/ محلول الأسيتات لإنتاج تشتيت، وإضافة كمية متساوية من محلول أسيتات يحتوي على حمض الهيالورونيك مع التحريك القوي لتشكيل جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (CS-HA)، وجعل جسيم الشيتوزان النانوي المغطى

جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS) حامل لوظيفة بروتين وطريقة
تحضيره

Protein Functionalized HA-CS Nanoparticle And Method Of Preparation

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

- يتعلق الارتباط الحالي بشكل عام بمجال الجسيمات النانوية الموظفة للسطح. ويتعلق الاختراع، على وجه الخصوص، بجسيم نانوي من مادة الشيتوزان مغطى بحمض الهيالورونيك وموظف للبروتين المضاد للالتهاب، وطريقة تحضيره. تطبيقات تقنية النانو في الطب لها فوائد عدة مثل تحسين جودة الممارسات الطبية سواء كان في مجال العلاج او التشخيص للأمراض (De Jong et al, International journal of nanomedicine. 3(2):133-49 (2008)). أحد تطبيقات النانو في الطب هو مجال إيصال الدواء حيث أنها قادرة على توجيه الدواء الى العضو المريض بدقة متناهية مع قدرتها على منع الآثار الجانبية التي غالبا ما تصاحب الأدوية المستخدمة عموما (De Jong et al, International journal of nanomedicine. 3(2):133-49 (2008)).
- 10 جسم الإنسان وتصل الى الدم و الى أعضاء مهمة كالدماع والقلب و الكبد وغيرها، بالتالي يجب أن تمتلك خاصية الأمان و السلامة. اختبارات السلامة لتقنيات النانو معقدة بعض الشيء حيث أن سطح مركبات النانو هو من أحد أهم العوامل التي تسبب السمية للإنسان من عدمه. عند تعرض تقنيات النانو للدوم، تقوم البروتينات الموجودة في الدم بالالتصاق وتكوين غلاف بروتيني يسمى (Protein Corona) حسب الشرح المفصل في بعض الدراسات العلمية (Walkey et al. , Lynch et al. Nano ,Chemical Society Reviews. 41(7):2780-99 (2012)).
- 15 Today. 3(1-2):40-7 (2008) Monopoli et al. Nature Nanotechnology. (2012) 7(12):779-86. مثلا، يؤدي أمتزاز بعض البروتينات الموجودة في الدم على أسطح مركبات بحجم النانو الى سرعة تخلص جسم الإنسان منها بالتالي عدم فاعليتها في إيصال الأدوية (Lee et al. Biochimica et biophysica acta. 1233(2):134-44 (1995)).
- 20 (Aggarwal et al. Advanced drug delivery reviews. 61(6):428-37 (2009)).

لذلك دراسة تأثير هذه البروتينات المكونة لغلاف المركبات النانوية قد يمكن المخترعين والباحثين من تصميم و هندسة مواد نانوية مقاومة لقدرة جسم الانسان من التخلص منها وذلك من أجل زيادة الفاعلية لاىصال الدواء. أيضا، تصنيع هذه المواد النانوية من مركبات عضوية وطبيعية ذات أمان وسلامة عاليين، يساهم بشكل كبير في إطالة عمر توأجدهم في مجرى الدم.

5

بهذا الخصوص، الكربوهيدرات التي تحتوي على سكر أحادي تم دراستها بشكل مكثف في الكثير من مراكز الأبحاث حول العالم من أجل استخدامها في مجال أىصال الدواء, فهي تعتبر مواد طبيعية وذات مستوى أمان وسلامة عاليين. في اختراعنا, قمنا باستخدام أحد أشهر الكربوهيدرات التي تحتوي على سكر أحادي و هو الشيتوزان (CS) حيث يستخدم حاليا في منتجات الأطفمة و

هندسة الأنسجة و أىصال الدواء (Mukhopadhyay et al. Progress in Polymer 10

(2012) 2;37(11):1457-75). أيضا تم استخدام الشيتوزان في عملية تصنيع مركبات النانو (WO-A-01/32751, WO-A-99/47130, ES 2098188) بسبب قدرته على جعل مركبات النانو تمتلك شحنات موجبة. الى أن هذه الشحنات الكهربائية الموجبة غالبا ماتكون هي مصدر التقليل من فاعلية الشيتوزان في أىصال الدواء حيث يتخلص جسم الإنسان من

الشيتوزان بشكل سريع وذلك كون خلايا الجسم تحتوي على شحنات كهربائية سالبة مضادة 15

(Almalik et al. Journal of controlled release. 172(3):1142-50 (2013)),
(Zaki et al. Macromolecular bioscience. 11(12):1747-60 (2011)). للتغلب على هذه المشكلة, يتم تغليف الشيتوزان بحمض الهيالورونيك (HA) ذو الشحنات الكهربائية السالبة لاطالة عمر مركب النانو في مجرى الدم عن طريق تجنب الالتصاق بخلايا الجسم و من

خلال تقليل امتزاز البروتينات الموجودة في مجرى الدم (Lemarchand et al. European 20

(2004) 58(2):327-41),
(Almalik et al. Biomaterials. 34(21):5369-80 (2013)). المراجع
(Benedetti et al, Journal of Controlled Release 13, 33-41, WO89/03207)
(1990)) توضح آلية تصنيع مركبات الهيالورونيك بحجم المايكرو، والمراجع (،

WO2004/112758، WO2007135164) توضح آلية تصنيعها بحجم النانو وذلك من أجل 25

إيصال الادوية. أيضا، المرجع (US6, 132,750) يوضح قدرة مركب الشيتوزان و الهيالورونيك على توصيل بروتينات مثل الكوليچين.

جميع الدراسات السابقة تركز على قدرة مركبات الشيتوزان والهيالورونيك النانوية على إيصال الدواء الى انها لم تثبت قدرتها على علاج الالتهابات. بالتالي أحد أكبر عيوب التقنية السابقة هو حصرها

5 في إيصال الادوية، وليس للاستخدام من أجل العلاج. الكثير من مراكز الأبحاث قامت بدراسة

تفاعل المركبات المكونة من الشيتوزان و حمض الهيالورونيك مع الجهاز المناعي، ولكن ليس لمستوى آلية تفاعل مركبات النانو مع البروتينات الموجودة في مجرى الدم. حسب علمنا، لا يوجد

تصنيف للغلاف البروتيني المكون حول الشيتوزان المغطى بحمض الهيالورونيك. لذلك الدراسة

العملية لاكتشاف امتزاز البروتينات الموجودة في مجرى الدم ضرورية من أجل إعطاء مركبات

10 الشيتوزان والهيالورونيك النانوية صفة العلاج بالإضافة لتوصيل الادوية.

المراجع

1. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. International journal of nanomedicine. 2008;3(2):133-49 15
2. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS nano. 2009;3(1):16-20
3. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. Molecular pharmaceutics. 2008;5(4):505-15 20
4. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2009;66(17):2873-96

- Morachis JM, Mahmoud EA, Almutairi A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacological reviews*. 2012;64(3):505–19 .5
- Lynch I, Dawson KA. Protein–nanoparticle interactions. *Nano Today*. 2008;3(1–2):40–7 .6 5
- Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(7):2780–99 .7
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*. 2012;7(12):779–86 .8 10
- Lee RJ, Low PS. Folate–mediated tumor cell targeting of liposome–entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et biophysica acta*. 1995;1233(2):134–44 .9
- Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(6):428–37 .10 15
- Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle–induced unfolding of fibrinogen promotes Mac–1 receptor activation and inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):39–44 .11 20
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ränge P, Cychutek K, Koch–Brandt C, et al. Apolipoprotein–mediated transport of nanoparticle–bound

- drugs across the blood–brain barrier. *Journal of drug targeting*.
.2002;10(4):317–25
- Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for .13
biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev*.
.2003;55(3):403–19 5
- Lemarchand C, Gref R, Couvreur P. Polysaccharide–decorated .14
nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics :*
official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische
.Verfahrenstechnik eV. 2004;58(2):327–41
- Mukhopadhyay P, Mishra R, Rana D, Kundu PP. Strategies for .15 10
effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A
.review. *Progress in Polymer Science*. 2012;37(11):1457–75
- Garcia–Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan–based drug nanocarriers: .16
where do we stand? *Journal of controlled release : official journal of the*
.Controlled Release Society. 2012;161(2):496–504 15
- Almalik A, Donno R, Cadman CJ, Cellesi F, Day PJ, Tirelli N. .17
Hyaluronic acid–coated chitosan nanoparticles: molecular weight–
dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation.
Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release
.Society. 2013;172(3):1142–50 20
- Zaki NM, Nasti A, Tirelli N. Nanocarriers for cytoplasmic delivery: .18
cellular uptake and intracellular fate of chitosan and hyaluronic acid–
coated chitosan nanoparticles in a phagocytic cell model. *Macromolecular*
.bioscience. 2011;11(12):1747–60

Almalik A, Karimi S, Ouasti S, Donno R, Wandrey C, Day PJ, et al. 19
Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the
receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. *Biomaterials*.
2013;34(21):5369-80.

5

الوصف العام للاختراع

يهدف هذا الاختراع إلى إنتاج جسيم نانوي له غلاف بروتيني قادر على تثبيط المناعة و مضاد
للألتهابات لتغطية مركب بحجم النانو مكون من كربوهيدرات أحادية السكر (الشيتوزان و حمض
الهيالورونيك)، والذي يتميز عن كل التقنيات السابقة في إمكانية استخدامه لعلاج الالتهابات وليس

10 لمجرد إيصال الأدوية، وذلك من خلال ربط الجسيم النانوي بالبروتين ITIH4 والبروتين

AGP والالذان يمتلكان خاصية مضادة للالتهابات. يمكن تحضير الجسيم النانوي المغطى بحمض
الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين من خلال تشتيت جسيمات الشيتوزان في وسط
حامضي. وتتضمن الخطوة التالية إضافة كمية مساوية من محلول أسيتات يحتوي على حمض
هيالورونيك عند تركيز محدد، مع التحريك القوي من أجل تكوين جسيم شيتوزان نانوي مغطى

15 بحمض هيالورونيك (CS-HA). يتم بعد ذلك تنقية جسيم الشيتوزان من خلال عملية الديليزة، والتي

يتم بعدها ربط الجسيم النانوي بالبروتينات الممتازة للسطح والمضادة للالتهاب من خلال إضافة
كميات متساوية من البروتينات والجسيمات النانوية، ومن ثم تدويرها للحصول على مستعلق
متجانس من جسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بحمض الهيالورونيك ذات بروتينات مضادة
للالتهاب. يوضح الوصف التفصيلي كافة التفاصيل للخطوات اللازمة لتحضير الجسيم النانوي

20 المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين والأوجه المختلفة لهذه الطرق.

أحد أهم مزايا هذا الغلاف البروتيني هو قدرته على أخفاء مركبات النانو من الجهاز المناعي
للإنسان. الغلاف البروتيني يعمل كمضاد للالتهابات بالتالي يعمل كسطح مثبط للجهاز المناعي
من أجل إطالة عمر مركب النانو في مجرى الدم. أغلب مركبات النانو المستخدمة حالياً لا يصل
الأدوية تقتقد للغلاف البروتيني المضاد للالتهاب. بالتالي تمتلك عمراً قصيراً جداً في مجرى الدم

يحد من فاعليتها عند استخدامها لاستهداف الأنسجة المريضة في جسم الإنسان. حالياً, يعتمد الباحثون على مركب البولي ايثيلين جلايكول (PEG) للقيام بوظيفة الغلاف البروتيني من أجل إطالة عمر مركبات النانو في مجرى الدم. الا أنه لا يمتلك خاصية التثبيط المناعي. لتزويد طرق إيصال الأدوية بخاصية التثبيط المناعي, نرى بضرورة استخدام اختراعنا المضاد للالتهاب حيث أن نظم توصيل الدواء تعد مصدر قلق بالغ عند تصميم أنظمة جسيم نانوي من أجل توصيل الدواء. 5

كما يعد الاستمناع (Immunogenicity) عامل مهم ينبغي أخذه في الاعتبار أثناء عملية تحضير أنظمة جسيم نانوي مثبثة للمناعة حيث أنها تعد مضرّة بالتوافقية الحيوية الفعالة لنظام الجسيم النانوي. إضافة إلى ذلك، يمكن أن يؤدي التحفيز المناعي غير المنضبط، إذا لم يتم حله، إلى عواقب مميتة مثل فشل أعضاء الجسم، والذي يمكن أن يصبح واسع الانتشار وقد يؤدي أيضاً إلى وفيات في مثل حالات كالتهاب المفاصل الروماتويدي، والسكتة، ونقص حجم الدم، والصدمة الإنتانية، وتعفن الدم وما شابهها من الحالات. 10

لذا هناك حاجة لنظام جسيم نانوي ملائم حيوياً بخواص مثبثة للمناعة لمنع الالتهاب الحاد أو الحد منه وللتقليل من معدلات الوفيات في فترة العواقب المميتة.

شرح مختصر للرسومات

تشير الأشكال المصاحبة ذات الأرقام المرجعية المتشابهة إلى عناصر مطابقة أو مماثلة وظيفياً من خلال طرق العرض المختلفة، وقد تم دمجها مع الوصف المفصل أدناه حيث شكلت جزءاً من المواصفة، وهي تعمل على توضيح التجسيديات المختلفة وشرح الأساسيات والمزايا المتعددة وفقاً للاختراع. 15

الشكل 1 هو عبارة عن توضيح لشبكة وظيفة بروتين نانوي الجسيم تركز على الالتهاب، حيث يصور تخطيطاً لتسعة عشر بروتين مصل (وظائف جزيئية ذات علاقة بالالتهاب) تقوم بامتزازها جسيمات شيتوزان نانوية ((chitosan nanoparticles (CS NPs))، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض الهيالورونيك ((hyaluronic acid-coated CS NPs (HA-CS NPs))، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالألجينات (alginate-coated CS NPs (Alg-CS NPs)). 20

الشكلان 2أ و2ب هما عبارة عن توضيح لمقارنة التداخل الخاصة بأكاليل البروتين التي تكونها جسيمات شيتوزان نانوية (CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض الهيالورونيك (HA-CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالألجينات (Alg- CS NPs) كضوابط، ومخطط فين (venn diagram) يصور الاختلافات والتشابهات في عدد بروتينات الأكليل المحددة بين كل نظام جسيم نانوي على التتابع.

5

الشكل 3 هو عبارة عن آلية تكوين مواد نانوية لتحويل مناعي، وبالتحديد جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك موظف للبروتين وذلك بالتوافق مع الاختراع الحالي.

الوصف التفصيلي:

قبل توضيح الوصف المفصل للتجسيديات بالتوافق مع الاختراع، تجدر الإشارة إلى أن التجسيديات قائمة في الأساس على جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض هيالورونيك مضاد للالتهاب وموظف للبروتين، وطريقة تحضيره. وتتضمن طريقة التحضير جعل جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك حاملا لوظيفة بروتينات ذات امتزاز للسطح مضادة للالتهاب.

10

يقصد بالمصطلحين "يتألف" أو "مؤلف" ومشتقاتهما في هذه الوثيقة شمول غير حصري مثل عملية أو طريقة أو بند أو تركيب يضم قائمة من العناصر، حيث لا يشمل فقط تلك العناصر ولكن يمكن أن يشمل عناصر أخرى غير المذكورة صراحة أو الملازمة للعملية أو الطريقة أو البند أو التركيب. إن العنصر الذي يسبقه مصطلح "يشتمل" لا يمنع، دون مزيد من المعوقات، وجود عناصر إضافية متطابقة في العملية أو الطريقة أو البند أو التركيب الذي يضم العنصر.

15

تقدم تجسيديات مختلفة للاختراع جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض هيالورونيك مضاد للالتهاب وموظف للبروتين، وطريقة تحضيره.

وبالتوافق مع الاختراع الحالي، فإن جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض هيالورونيك مضاد للالتهاب وموظف للبروتين يتضمن نواة مركزية وغللاف خارجي يحيط بالنواة المركزية. وتشتمل النواة المركزية للاختراع على جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك بينما يشتمل الغلاف الخارجي على بروتينات حاملة لوظائف مضادة للالتهاب وممتزة للسطح، تم ربطها بالنواة

20

- المركزية. كما أن البروتينات المضادة للالتهاب التي تم توظيفها في جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك هي عبارة عن (ITIH4) أي مثبط تريسين انتر-ألفا ثقيل السلسلة 4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) و (AGP) أي (بروتين سكري حمضي ألفا 1، والمعروف أيضا بأوروزوموكويد (orosomuroid)). وتخضع النواة المركزية والجسيمات الحاملة لوظائف ومضادة للالتهاب إلى عملية امتزاز كيميائي (chemisorption process). 5
- وبالتالي، يقوم بروتين (ITIH4) بتشكيل رابطة إستر بين المجموعات الكربوكسيلية للأسبارتات عند أطرافها الكربوكسيلية ومجموعات الهيدروكسيل (C-6) الخاصة بحمض الهيالورونيك. إضافة إلى ذلك، يقوم بروتين (AGP) الممتز كيميائيا داخل طبقة حمض الهيالورونيك بتشكيل رابطة جليكوسيدية عبر فروع الغليكان لبروتين (AGP).
- 10 في أحد التجسيديات، تم ربط مزيج من بروتينات (ITIH4) و (AGP) مضادة للالتهاب بجسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك ذا النواة المركزية، بحيث تشكل أنظمة جسيم نانوي مستقرة بفضل الرابطة التساهمية القوية التي تشكلت بين البروتينات المضادة للالتهاب والتي تقدم أكليل بروتين مستقر.
- وفي تجسيد آخر، يمكن للبروتينات المضادة للالتهاب التي تم ربطها بالنواة المركزية أن تتضمن إما (ITIH4) أو (AGP). 15
- كما هو موضح في الشكل 1، يتم عرض شبكة وظيفة بروتين نانوي الجسيم تركز على الالتهاب، حيث تتضمن شبكة البروتين تخطيطا لتسعة عشر بروتين مصل (وظائف جزيئية ذات علاقة بالالتهاب) تقوم بامتزازها جسيمات شيتوزان نانوية (CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض الهيالورونيك (HA-CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالأجينات (Alg- CS NPs) على التتابع، وذلك من أجل تأسيس دراسة مقارنة. وبالإشارة إلى الشكل 1، فإن العقد الكروية في شبكة البروتين تمثل جسيمات نانوية، والعقد البيضاوية تمثل البروتينات المضادة للالتهاب، والعقد المستطيلة الصفراء تمثل وظائف جزيئية. إضافة إلى ذلك، تمثل الخطوط التامة في شبكة البروتين بروتينات ممتزة محددة لكل نظام من أنظمة الجسيم النانوي، بينما تمثل الخطوط المنقطه الوظائف الجزيئية المتعلقة بالبروتينات المحددة. وبالإشارة إلى توقيع البروتين الفريد لجسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بحمض الهيالورونيك، فإنه من الملاحظ أن بروتين سكري 25

حمضي ألفا 1 (AGP) ومثبط تريسين انتر-ألفا ثقيل السلسلة H4 (ITI4) هما بروتينان فريدان ممتازان في جسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض الهيالورونيك، غائبان عن أكاليل البروتين لكلا من جسيمات الشيتوزان النانوية وجسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بالألجينات، مما يسهم في عملية تكوين جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين الخاص بالاختراع الحالي. 5

وتماشيا مع الشكل 1، فإن الشكلين 2أ و2ب يوضحان مقارنة أكاليل البروتين التي شكلتها جسيمات شيتوزان نانوية (CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض الهيالورونيك (HA-CS NPs)، وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالألجينات (Alg- Cs NPs)، حيث تصور الاختلافات والتشابهات (تداخل) في عدد البروتينات في بروتين الأكليل لكل واحد من الجسيمات النانوية الثلاث. وساهمت توافيق البروتين الفريدة في أكليل البروتين بنسبة 17% (3 بروتينات)، و31% (5 بروتينات)، و56% (14 بروتين) من البروتينات المميزة. وبالإشارة إلى الشكل 2 أيضا، وعلى الرغم من أن درجة التشابهات بين أكاليل البروتين المتشكلة حول أنظمة الجسيمات النانوية الثلاث أدت إلى تحديد سبعة بروتينات عادية متمزة في الجسيمات النانوية الثلاث جميعها، وأربعة بروتينات عادية تتشاركها جسيمات شيتوزان نانوية وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالألجينات، وأربعة بروتينات عادية أخرى تمت مشاركتها عن طريق جسيمات شيتوزان نانوية وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض هيالورونيك وبروتين واحد عادي تمت مشاركته عن طريق جسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض هيالورونيك وجسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بالألجينات، إلا أنه تم امتصاص اثنان من البروتينات الفريدة المضادة للالتهاب داخل جسيمات شيتوزان نانوية مغطاة بحمض هيالورونيك. كما أن كلا من جسيمات الشيتوزان النانوية وجسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بالألجينات قد قامت حصريا بامتزاز (clusterin)، بينما لم يكن ذلك محددًا داخل بروتين الأكليل لجسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بحمض الهيالورونيك، وبالتالي فإنهما يسهلان من عملية تشكيل نظام جسيم نانوي منخفض الاستمناع حيث أن (clusterin) يرتبط بعمليات مناعة مضيفة مختلفة والتي تتضمن التنظيم المناعي، والتصاق الخلايا، وموت الخلايا النشطة. فيما يلي تم وصف طريقة تحضير الجسيم النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين. 25

- تبدأ طريقة تحضير الجسيم النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين بعملية تشتيت جسيمات الشيتوزان النانوية في حمض الخل/ محلول الأسيتات بمقدار 0.1 مول عند درجة حموضة تبلغ 5 درجات من أجل إنتاج تشتيت. وتتضمن الخطوة التالية إضافة كمية مساوية من محلول أسيتات يحتوي على حمض الهيالورونيك عند تركيز يبلغ 1.5 ملغ/مل، مع التحريك القوي لفترة زمنية مقدارها 30 دقيقة عند 1200 دورة على الدقيقة من أجل تكوين جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (CS-HA)، حيث تم تنفيذ عملية الديليزة (dialyzed) لجسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك مقابل مياه منزوعة الأيونات. وبعد ذلك، يخضع جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك، في خطوة ضرورية، لعملية تجعله يحمل وظائف بروتينات ممتزة للسطح ومضادة للالتهاب كما هو موضح في الشكل 3. ويتم اختيار البروتينات المضادة للالتهاب والتي تم ربطها بجسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك من إما (ITI4) أو (AGP). وفي تجسيد آخر، يتم تحميل النواة المركزية ووظائف مجموعة من (ITI4) و(AGP).
- بالنظر إلى أحد أمثلة خطوة عملية توظيف بروتينات ممتزة للسطح ومضادة للالتهاب، فإن عملية التوظيف تتضمن إضافة 1 ملغ من البروتينات المضادة للالتهاب، تحديداً (ITI4) و(AGP)، إلى 1 ملغ من جسيمات الشيتوزان النانوية المشتتة والمغطاة بحمض الهيالورونيك، ثم يتبعها تدوير معتدل في جهاز دوامة لمدة دقيقة من أجل الحصول على مستعلق متجانس من جسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بحمض الهيالورونيك ذات بروتينات مضادة للالتهاب. وفي الخطوة التالية، يتم نقل المستعلق المتجانس إلى حاضنة تدوير بسرعة 50 دورة في الدقيقة طوال الليل عند 4 درجة مئوية، حيث تحدث حينها عملية امتزاز كيميائي، وبالتالي تتشكل روابط جليكوسيدية ومادة الإستر بين جسيمات الشيتوزان النانوية المغطاة بحمض الهيالورونيك والبروتينات الممتزة للسطح والمضادة للالتهاب. إضافة إلى ذلك، يخضع المستعلق المتجانس الذي تم تحضيره لعملية الديليزة مقابل مياه منزوعة الأيونات للتخلص من البروتينات غير المقيدة لأكليل البروتين غير المستقر والذي يحيط بالجسيم النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين. تتضمن طريقة تحضير جسيمات الشيتوزان (CS NPs) أيضاً العديد من الخطوات. إذ تتضمن الخطوة الأولى من تحضير جسيمات الشيتوزان عملية إذابة الشيتوزان عند تركيز يبلغ 0.07%

- نسبة وزنية في 4.6 ملي مولار من كلوريد الهيدروجين. ويتم تعديل درجة حموضة محلول الشيتوزان حينها إلى 5 درجات عن طريق إضافة كميات مناسبة من هيدروكسيد الصوديوم بمقدار 0.1 مولار، ومن ثم تحريكه بشكل مستمر طوال الليل. وفي الخطوة التالية، يتم تحضير محلول ثلاثي فينيل الفوسفات (TPP) بمقدار 0.1% نسبة وزنية في مياه منزوعة الأيونات ومن ثم تعديل درجة حموضة المحلول إلى 5 درجات باستخدام 0.1 مولار من كلوريد الهيدروجين. وتمت إضافة محلول ثلاثي فينيل الفوسفات المحضّر إلى محلول الشيتوزان بنسبة كتلة تبلغ 1:9، من أجل تحضير محلول معقدات (complexation solution). وبالنظر إلى أحد الأمثلة، فإنه تمت إضافة 0.214 ملل من محلول ثلاثي فينيل الفوسفات إلى 2.786 ملل من محلول الشيتوزان، حيث بلغ التركيزان النهائيان لثلاثي فينيل الفوسفات والشيتوزان 0.0071 و0.064% نسبة وزنية على التوالي، وبالتالي بلغت نسبة كتلة ثلاثي فينيل الفوسفات إلى الشيتوزان 1:9. وتمت تصفية كل المحاليل عبر مرشح بحجم مسامي يبلغ 0.22 مايكرومتر. ومن ثم تم تعريض محلول المعقدات إلى تحريك مغناطيسي وخضخضة لفترة زمنية تبلغ 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. وفي النهاية، تم ترك محلول المعقدات دون تدخل لمدة 24 ساعة بعد تعريضه للأمواج الصوتية لفترة قصيرة وذلك لإنتاج جسيمات الشيتوزان النانوية. ومن ثم تمت ديلزة جسيمات الشيتوزان النانوية المشتتة مقابل مياه منزوعة الأيونات (قطع الوزن الجزيئي 1000 كيلو دالتون).
- وفي تجسيد آخر، تم توظيف جسيم الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك المضاد للالتهاب والموظف للبروتين ذي بروتينات (TIH4/AGP) ممتدة للسطح في نظام توصيل للدواء. وبالنظر إلى أحد الأمثلة، تم توصيل كابح مناعة كورتيكوستيرويد معروف على نطاق واسع، تحديدا الديكساميثازون (DXM)، عن طريق جسيم نانوي بالتوافق مع الاختراع الحالي لتقليل الاستجابات الالتهابية الحادة في حالات مثل التهاب المفاصل الروماتويدي، والسكتة، ونقص حجم الدم، والصدمة الإنتانية، وتعفن الدم وما شابهها من الحالات.
- سيفهم أصحاب الخبرة في المجال ان الفوائد المذكورة أعلاه وغيرها من الفوائد التي تم ذكرها هنا هي لضرب الأمثلة ولا يقصد بها حصر جميع الفوائد للتجسيديات المختلفة للاختراع.
- في المواصفات التالية، تم وصف تجسيديات معينة في الاختراع. ولكن اي شخص ملم بهذا المجال سيفهم أنه يمكن عمل التعديلات والتغييرات داخل نطاق الاختراع كما هو مذكور في عناصر

الحماية أدناه. ووفقا لذلك فإن المواصفات والأشكال هي على سبيل المثال وليس الحصر، كما أن جميع التعديلات تدرج ضمن نطاق الاختراع. ولا ينبغي تفسير الفوائد والمزايا وحلول المشاكل وأي عناصر قد تؤدي إلى ظهور فائدة أو ميزة أو حل وجعلها أكثر وضوحا كميزة مهمة ومطلوبة، أو سمات أساسية أو عناصر لأي من أو كل عناصر الحماية. ويتم تعريف الاختراع وحده عن طريق عناصر الحماية الملحقة بما في ذلك التعديلات التي حصلت خلال تعليق هذا التطبيق وكل ما يعادلها من عناصر الحماية الصادرة.

فيما يلي مثال يبين طريقة عمل الاختراع.

- 10 أهم مكون للاختراع هو الغلاف البروتيني المكون من بروتين ITIH4 وبروتين AGP و القادر على تثبيط المناعة و المضاد للالتهابات. هذا الغلاف البروتيني نستطيع استخدامه لتغطية أسطح و مركبات عديدة عادة ما تستخدم في مجال إيصال الدواء من أجل اكساب هذه المركبات بخاصية أخفائها من الجهاز المناعي للإنسان. الغلاف البروتيني يعمل كمضاد للالتهابات بالتالي يعمل كسطح مثبط للجهاز المناعي من أجل إطالة عمر مركبات توصيل الأدوية في مجرى الدم. بشكل أدق، يستطيع رجل المهنة العادي استخدام بروتين ITIH4 وبروتين AGP من أجل تغليف أدوية مثل التي تستخدم في العلاج الكيميائي لمرضى السرطان من أجل زيادة فاعليتها و خفض أثارها الجانبية. عملية التغطية أو التغليف من مادة الى أخرى. في حال الشيتوزان المغطى بحمض هيالورونيك، فان عمل التغطية هي عبارة عن مجرد مزجه مع البروتينات ولا يتطلب أجهزة معقدة أو مهارات خاصة. هذه البروتينات تقوم بشكل تلقائي بعملية التغطية بعد المزج مباشرة.

عناصر الحماية

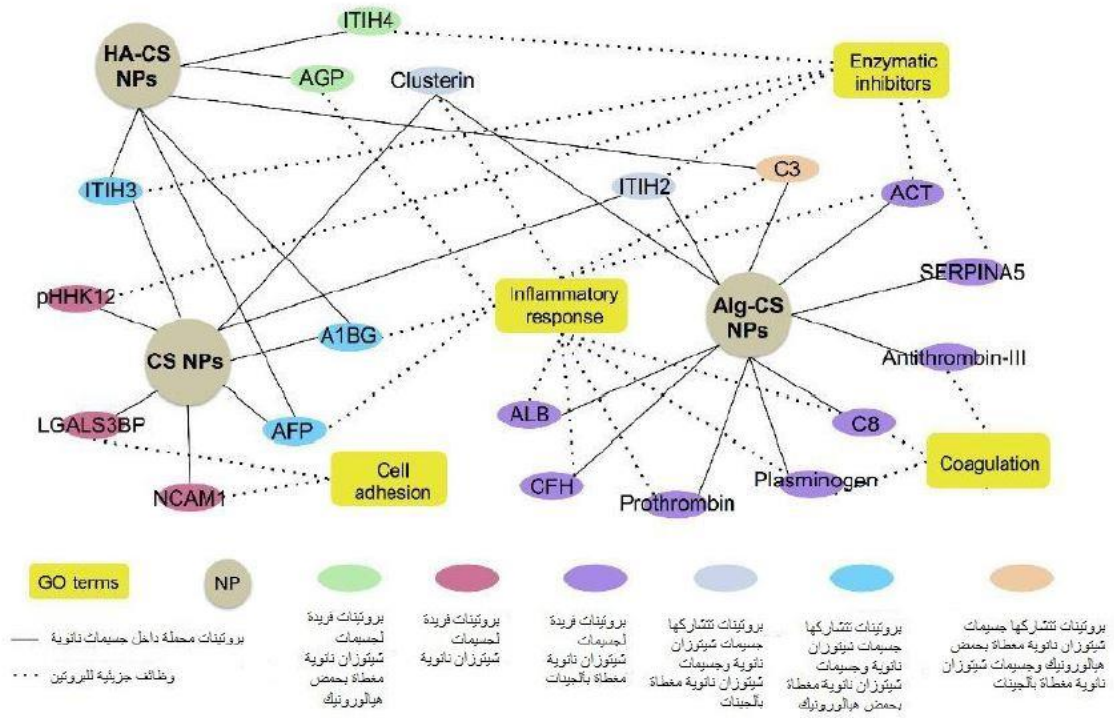
- ١ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين، والذي يتألف من نواة مركزية تحتوي على جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك، وبروتينات ممتزة للسطح مضادة للالتهاب تشكل غلاف خارجي حول النواة المركزية،
- 5 حيث يتم اختيار البروتينات الممتزة للسطح والمضادة للالتهاب من مجموعة من (ITI4)، و (AGP) ومزيج من (ITI4) و (AGP).
- ٢ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، حيث أن يتراوح حجم النواة المركزية من ١٧٠-٢٧٠ نانومتر.
- ٣ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، حيث أن الغلاف البروتيني حيث يكون الغلاف البروتيني للجسيمات النانوية الوظيفية المضادة للالتهابات المتوافقة حيويًا ذو قدة منخفضة على الاستحثاث المناعي.
- ٤ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، لاستخدامه كمادة غلافية نانوية في جهاز توصيل طبي نانوي.
- ٥ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، لاستخدامه كمادة غلافية نانوية في جهاز طبي نانوي.
- ٦ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، لاستخدامه في تثبيط مناعة الخلايا السرطانية المنشطة.
- ٧ - جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض الهيالورونيك (HA-CS NP) موظف للبروتين وفقا لعنصر الحماية رقم ١، لاستخدامه في تثبيط المناعة الناتجة عن حالات مختارة من مجموعة من الحالات والتي تشمل التهاب المفاصل الروماتويدي، والسكتة الدماغية، ونقص حجم الدم، والصدمة الإنتانية، والإنتان، وحروق الجلد، والصدمات.
- 20

- ٨- طريقة تحضير جسيم نانوي مضاد للالتهاب موظف للبروتين، تتألف من:
تشيتت جسيمات الشيتوزان النانوية في ١, ٠ مولار حمض الخل/ محلول الأسيتات عند درجة
جموضة ٥، لإنتاج تشيتت،
5 وإضافة كمية متساوية من محلول أسيتات يحتوي على حمض الهيالورونيك مع التحريك القوي لمدة
٣٠ دقيقة عند سرعة دوران ١٢٠٠ دورة في الدقيقة، لتشكيل جسيم شيتوزان نانوي مغطى بحمض
الهيالورونيك (HA-CS NP)، والذي يتم ترشيحه غشائيا مع الماء اللاأيوني، مع جعل جسيم
الشيتوزان النانوي المغطى بحمض الهيالورونيك حاملا لوظائف بروتينات ممتزة للسطح مضادة
للتهاب والتي تم اختيارها من مجموعة من (ITIH4)، و (AGP) ومزيج من (ITIH4) و (AGP)
لتشكيل الجسيم النانوي المضاد للالتهاب والموظف للبروتين.
- ٩- الطريقة وفقا لعنصر الحماية ٨، حيث تتضمن الطريقة توظيف جسيم شيتوزان الهيالورونيك
10 النانوي HA-CS NPs بالبروتين السطحي الممتاز المضاد للالتهاب حمض الفا ١ جليكوبروتين
(AGP) Alpha- 1 Acid glycoprotein، حيث تشتمل الطريقة على:
إذابة البروتين حمض الفا ١ جليكوبروتين (AGP) Alpha- 1 Acid glycoprotein في محلول
PBS عند درجة حموضة ٤, ٧، مزج البروتين (AGP) مع ١ مل من HA-CS NPs عند
15 ٢٥, ٠ مجم/مل للوصول إلى تركيز ١٠٠ ميكروجرام/مل من معلق HA-CS NPs موظف بالـ
(AGP-HA-CS NP) AGP
مزج معلق (AGP-HA-CS NP) بشدة للحصول على معلق متجانس من (AGP-HA-CS
NP)
نقل المعلق المتجانس من (AGP-HA-CS NP) إلى منصة دوارة عند درجة حرارة ٣٧° درجة
20 مئوية وسرعة ٥٠ دورة بالدقيقة، لفترة احتضان ٣٠ دقيقة معلق متجانس محتضن من (AGP-
HA-CS NP)
القيام بالطرد المركزي لمعلق (AGP-HA-CS NP) المحتضن المتجانس عند سرعة ١٥٠٠-- دورة
بالدقيقة عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة لفصل (AGP-HA-CS NP) من AGP غير
المرتبط
- ١٠- الطريقة وفقا لعنصر الحماية ٨ والتيتتضمن تحضير جسيمات شيتوزان النانوية ، حيث
25 تشتمل طريقة تحضير جسيمات شيتوزان النانوية على:

إذابة شيتوزان في حمض الهيدروكلوريك عند درجة حموضة معدلة إلى ٥ لإنتاج ٠,٠٧٪ وزن محلول شيتوزان، حيث أن يتم تعريض محلول الشيتوزان لتحريك مستمر، وإضافة محلول TPP عند نسبة كتلة ٩:١ لتكوين محلول مركب، حيث أن محلول TPP يتم تحضيره في ماء لا أيوني عند درجة حموضة معدلة إلى ٥، مع التحريك الشديد للمحلول المركب باستخدام المغناطيس لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، 5

ومن ثم تعريض المحلول المركب للموجات فوق الصوتية لإنتاج جسيمات الشيتوزان ١١- الطريقة وفقا لعنصر الحماية رقم ٨ حيث يتم إضافة محلول الاسيتات المحتوي على حمض الهيالورونيك عند تركيز ١,٥ مجم/مل

١٢- الطريقة وفقا لعنصر الحماية رقم ٨ حيث أن إذابة الشيتوزان تتضمن أيضا إذابته عند تركيز ٠,٢٥٪ وزن. 10



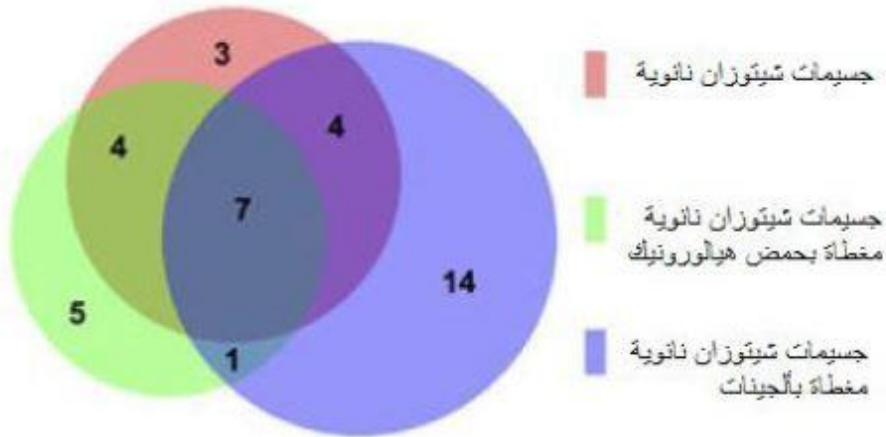
الشكل ١

KACSTP126-USP

٣/٢



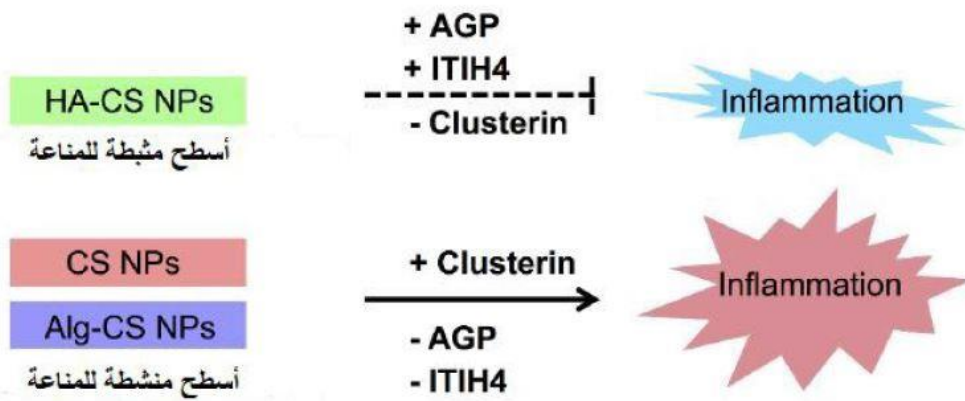
الشكل ١٢



الشكل ٢ ب

KACSTP126-USP

٣/٣



الشكل ٣



مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA