المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة 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 لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

جامعة تبوك
University of Tabuk
جامعة طيبة
Taibah University

براءة اختراع رقم : SA 18893

بتاريخ : 1446/06/25 هـ
الموافق : 2024/12/26 م

عن الإختراع المسمى :

تحسين إنتاج الفيروسات الانكولوتيكية الخاصة بلقاحات الأورام

Improvin the Production of Oncolytic Viruses for Cancer Vaccines

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

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 18893 B1

[12] براءة اختراع

[45] **تاريخ المنح:** 1446/06/25 هـ
الموافق: 2024/12/26 م

[21] **رقم الطلب:** 122440431
[22] **تاريخ الايداع:** 1444/04/01 هـ
الموافق: 2022/10/26 م

[72] **اسم المخترع:** أحمد بن بكر محمود، المهند عبدالوهاب الكيال
[73] **مالك البراءة:** 1) جامعة طيبة ، 2) جامعة تبوك
عنوانه: 1) ص.ب 344، المدينة المنورة، المملكة العربية السعودية، 2) ص.ب 741، تبوك 71491، المملكة العربية السعودية
جنسيته: 1) سعودية، 2) سعودية

[51] **التصنيف الدولي(IPC[8]):**
A61K39/215; C07K14/165

[56] **المراجع:**
WO 2021211704
FELT SA, GRDZELISHVILI VZ. "Recent advances in vesicular stomatitis virus-based oncolytic virotherapy: a 5-year update." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, UK.
PASIN F., ET AL. "Oncolytic effect of SARS-CoV2 in a patient with NK lymphoma.", ACTA BIO MEDICA: ATENEI PARMENSIS, IT
AZAD T., ET AL. "Nanoluciferase complementation-based bioreporter reveals the importance of N-linked glycosylation of SARS-CoV-2 S for viral entry.", MOLECULAR THERAPY. US.

الفاحص: خالد بن ناصر بن سليمان الأشقر

[54] **اسم الاختراع:** تحسين إنتاج الفيروسات الانكولوتيكية الخاصة بلقاحات الأورام
Improvin the Production of Oncolytic Viruses for Cancer Vaccines

[57] **الملخص:** يتعلق هذ الاختراع بتحسين إنتاج الفيروسات الانكولوتيكية Oncolytic virus الخاصة بلقاحات الأورام وهو عبارة عن تحسين تكاثر الفيروس لتحسين انتشاره وزياده كفاءته كعلاج للأورام. حيث تم استخدام الفيروس القاتل للخلايا السرطانية المعروف ب VSV-Δ51 كأساس تمهيدا لتعديله وراثياً, وتم تعديله ليتضمن نطاق ربط المستقبلات Receptor Binding Domain (RBD) الخاص بفيروس كورونا-٢ داخل جينوم الفيروس ويمكن استخدام هذا الاختراع في علاج امراض السرطان و التقنيات الخاصة في تصنيع الفيروسات
عدد عناصر الحماية (7)، عدد الأشكال (5)

تحسين إنتاج الفيروسات الانكولوتيكية الخاصة بلقاحات الأورام

Improving the production of oncolytic viruses for cancer vaccines

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع بتحسين إنتاج الفيروسات الأنكوليتيكية Oncolytic virus الخاصة بلقاحات الأورام و تحسين تكاثر الفيروس في الخلايا السرطانية والخلايا الخاصة بإنتاج الفيروسات. تتضمن الطريقة وجود بروتين نطاق ربط المستقبلات Receptor Binding Domain (RBD) الخاص بفيروس كورونا-٢ داخل جينوم الفيروس لتحسين انتشاره.

واقرب الحالات التقنية المشابهة للاختراع كالتالي :-

أ- الوثيقة الأمريكية رقم 1US20160130563A هو عبارة استخدام بروتين 2FGF لتعزيز تكاثر الفيروسات في بعض الخلايا السرطانية والتي تحتوي على مستقبل خاص ببروتين 2FGF ، وتشمل الطريقة إعطاء بروتين 2FGF أو متغير وظيفي منه لتكاثر الفيروسات داخل الخلايا.

ب- الوثيقة الأمريكية رقم 1US20100178684A هو عبارة عن استخدام فيروسات قاتلة للأورام تثبيط نمو الخلايا السرطانية أو قتلها. ويكون ذلك عن طريق احتواء الفيروس على تسلسل حمض نووي يشفر جينًا مثبطًا للالتهاب، على سبيل المثال جينات مثبطة لبروتين NF-κB. حيث يحسن هذا التثبيط تكاثر الفيروس داخل الخلايا السرطانية.

ج- الوثيقة رقم 1WO2014198002A هي عبارة عن استخدام بروتينا تفرزها بكتيريا غير غازية تشتمل على تسلسل جيني ينتج بروتين يقوم على تثبيط الجينات المضادة للفيروسات. حيث يرتبط ببروتين IFN-α أو IFN-β ، أو كليهما. ويمكن استخدام البكتيريا للمساعدة في تكاثر الفيروسات القاتلة للأورام داخل الخلايا السرطانية.

ومن التحديات في الوثائق السابقة ما يلي:-

1- البروتين المستخدم هو بروتين انساني مما قد يعيق استخدامه لاحقاً في جسم الانسان كعلاج فعال بسبب إمكانية انتاج أجسام مضادة تتخلص من الفيروس الحامل للبروتين وأيضاً تهاجم خلايا الانسان الطبيعية الحاملة للبروتين الإنساني المستخدم.

2- تكاثرها محدود وعدد الفيروسات المنتجة قليل قد لا يؤدي الى النتيجة المرجوة.

3- تعمل الاختراعات السابقة من خلال تثبيط الجهاز المناعي وبالتالي قد يصبح المريض أكثر عرضه للإصابة بالأمراض خلال فترة العلاج.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

يعتبر مرض السرطان من أكثر أسباب الوفاة شيوعًا في العالم حيث أن معدل الحياة النسبي لمرضى السرطان الذين تم تشخيصهم هو 5 سنوات. لذلك اكتشاف علاجات فعالة للسرطان هو الهدف الأساسي لأبحاث السرطان. حيث تم الكشف هنا عن طريقة مبتكرة لاستخدام جزء من جين بروتين نطاق ربط المستقبلات RBD و الخاص بفيروس كورونا-٢ (كوفيد-١٩) SARS-CoV-2 لعلاج أورام الجلد والرئة. تم استخدام الفيروس القاتل للخلايا السرطانية المعروف ب VSV-Δ51 كأساس تمهيدا لتعديله وراثيا وتم التعديل باستخدام تقنية الهندسة الوراثية لينتج بروتين RBD ليزيد من سرعة انتشاره وبالتالي يزيد من تكاثره . كما يمكنه الاستفادة من اللقاح بشكل مباشر عن طريق حقن الاختراع مباشره في الورم.

و يتميز هذا الاختراع بالتالي : -

١- استخدام جزء من البروتين الشوكي لفيروس كورونا-٢ (كوفيد-١٩) لتحفيز الفيروسات الأونكوليتيكية للتكاثر وسرعة الانتشار و هذا يعتبر ميزة قوية للاختراع حيث يساعد على إنتاج كميات كبيرة منه.

٢- يُستخدم لعلاج الأورام حيث أن سرعة انتشار وتكاثر الفيروس VSV-Δ51-RBD تزيد من فاعليته لقتل الخلايا السرطانية.

شرح مختصر للرسومات

شكل ١: مساحة سطح اللويحات الفيروسية على خلايا VERO مصابة بفيروس VSV-Δ51 أو الفيروس المعدل و الذي يحتوي على الاختراع الجديد VSV-Δ51-RBD.

شكل ٢: يوضح مساهمة الاختراع على انتاج كميات كبيرة من الفيروس الحامل للاختراع فيروس VSV-Δ51-RBD بالمقارنة مع الفيروس الغير معدلVSV-Δ51 في عدة أحجام من علب الإنتاج المزرعي.

شكل ٣: يعزز وجود الاختراع و اضافته في التسلسل الجيني للفيروس VSV-Δ51 من نشاطه لقتل خلايا السرطان: تم تقييم السمية الخلوية لـ VSV-Δ51 و VSV-Δ51-RBD في خلايا 10B16F و 1LLC و 549A بعد 48 ساعة من اصابتها بالفيروسات

شكل ٤: يقوم الاختراع بزيادة انتاج خلايا VERO لفيروس VSV-Δ51 اذا تم استعماله كبروتين مؤتلف: تم تقييم السمية الخلوية لـ VSV-Δ51 في VERO المعالجة بتركيزات تصاعدية من rRBD وإصابتها بـ VSV-Δ51 حيث تم ملاحظة زيادة حساسة خلايا VERO لفيروس VSV-Δ51 كلما زاد تركيز بروتين RBD على الخلايا.

شكل 5: حسّن فيروس VSV-Δ51-RBD نتائج العلاج في نماذج ورم 10B16F: (أ) تحليل إحصائي باستخدام معادلات كابلان-ماير لاختبار الفعالية حيث تم حقن منطقة البطن في فئران من فصيلة 6/C57bl ب خلايا سرطانية من نوع 10B16F مصابة بفيروس VSV-Δ51 أو VSV-Δ51-RBD . (ب) تحليل إحصائي باستخدام معادلات كابلان-ماير لاختبار الفعالية حيث تم حقن ورم متكون تحت الجلد من نوع 10B16F وعمره ١٠ أيام باستخدام فيروس VSV-Δ51 أو VSV-Δ51-RBD في اليوم العاشر.

الوصف التفصيلي:

يتسبب SARS-CoV-2 RBD في انتشار الفيروس VSV-Δ51 على خلايا VERO

منذ أن تم توثيق فيروس VSV-Δ51 باعتباره فيروسًا فعالًا للأورام حيث يمتاز بدورة حياة قصيرة ، أردنا تحديد ما إذا كان إضافة الاختراع و هو SARS-CoV-2 RBD عن طريق اضافته للتسلسل لفيروس VSV-Δ51 سيحسن من قدرة انتشاره على الخلايا. تم إجراء اختبار البلاك الفيروسي التقليدي لفيروسات VSV-Δ51 أو الفيروسات مع إضافة الاختراع و هي VSV-Δ51-RBD على خلايا VERO ، وتم قياس حجم اللويحة الفيروسية باستخدام ViralPlaqu. والمثير للدهشة أن مساحة سطح لويحات VSV-Δ51-RBD كانت أكبر بكثير من اللويحات التي شكلها فيروس VSV-Δ51 بمتوسط 1.962 مم 2 مقابل 1.279 مم 2 على التوالي. حيث تشير هذه الملاحظة إلى أن إضافة الاختراع و هو جين SARS-CoV-2 RBD يساعد في الانتشار الفيروسي كما في الشكل 1.

يعزز الاختراع بعد ان تم اضافته للفيروس من انتاج اعداد كبيرة من الفيروسات بالمقارنة بالفيروس في خلايا VERO

لتحديد ما إذا كان سيتم ترجمة تعزيز الانتشار الفيروسي المشار إليه أعلاه إلى الزيادة في الناتج الفيروسي ، قمنا بتقييم إجمالي إنتاج الفيروس في خلايا VERO المصابة بفيروسات غير معدله VSV-Δ51 و مقارنتها بالفيروسات التي تحمل الاختراع فيروسات VSV-Δ51-RBD في أطباق زراعة الأنسجة بمختلف أحجامها والتي تتراوح من طبق صغير ذو 96 بئراً ، مع مساحة سطح 0،32 سم 2 ، إلى أطباق متعددة الطبقات (10 طبقات) و مساحة سطح 6.350 سم2. كما هو متوقع ، كانت خلايا VERO المصابة بالفيروس الذي يحمل الاختراع

VSV-Δ51-RBD تحتوي على كميات فيروسية أعلى بكثير مقارنة بخلايا VERO في جميع أحجام المزارع المختلفة. هذه النتيجة تشير إلى أنه يمكن استخدام جين SARS-CoV-2 RBD لتحسين النتاج الفيروسي وذلك لإنتاج الفيروسات على نطاق واسع كما في الشكل 2.

لتحديد الكفاءة العلاجية للاختراع ، قمنا بتقييم السمية الخلوية للفيروسات الحاملة للاختراع VSV-Δ51-RBD و الفيروسات الغير حاملة للاختراع VSV-Δ51 باستخدام ثلاثة أنواع خلايا سرطانية مختلفة وهي: (1LLC – خلايا سرطان الرئة في الفئران، 549A – خلايا سرطان الرئة في البشر و 10B16F – خلايا سرطان الجلد في الفئران). أثبتنا في هذه التجارب أن السمية الخلوية في

المختبر للفيروسات الحاملة للاختراع VSV-Δ51-RBD كانت أعلى بشكل ملحوظ (* P <0.05) مقارنة بفيروس VSV-Δ51 وذلك باستخدام تحليل مقياس سمية الخلايا CellTiter-Glo® Luminescent ، وهذا ما وصفه الشكل 3. لمزيد من التحقق من هذه الظاهرة وإثبات مساهمة جين SARS-CoV-2 RBD في هذه السمية ، قمنا بفحص السمية الخلوية لفيروس VSV-Δ51 على خط خلايا VERO في وجود بروتين SARS-CoV-2 RBD. حيث أظهرت النتائج التوافق مع نتائج السمية الخلوية لفيروس VSV-Δ51-RBD في الشكل 4 ، وأدت إضافة بروتين SARS-CoV-2 RBD بتراكيز مختلفة وهي : 24 نانوغرام/مل و 16 نانوغرام/مل و 8 نانوغرام/مل ، إلى تعزيز السمية الخلوية لفيروس VSV-Δ51. بشكل عام ، تدعم هذه النتائج فائدة الاختراع إما كبروتين خارجي أو كجين مدمج في الجينوم الفيروسي لتعزيز السمية الخلوية الفيروسية.

يمكن ترجمة السمية الخلوية التي يسببها SARS-CoV-2 RBD من خلال وجودة مع فيروس VSV-Δ51 إلى نتائج علاج أفضل.

لتقييم نشاط الورم في وجود جين ال SARS-CoV-2 RBD في الفئران ، تم حقن خلايا 10B16F والمصابة إما بفيروسات VSV-Δ51 أو VSV-Δ51-RBD في التجويف البطني في فئران من فصيلة C57BL/6. كانت فائدة البقاء على قيد الحياة عالية بشكل ملحوظ للفئران المحقونة بخلايا مصابة بـ VSV-Δ51-RBD مقارنة بالفئران المحقونة بخلايا 10B16F والمصابة بفيروس VSV-Δ51 (الشكل 5). تدعم هذه الملاحظة كذلك الإمكانات العلاجية لـ SARS-CoV-2 RBD. لاختبار فعالية VSV-Δ51-RBD في نموذج ورم ذي صلة سريرية ، أنشأنا ورم 10B16F تحت جلد فئران عولجت لاحقًا بجرعة واحدة إما VSV-Δ51 أو VSV-Δ51-RBD ، داخل الورم. بشكل عام ، كان لدى الفئران التي عولجت إما بفيروس VSV-Δ51 أو فيروس VSV-Δ51-RBD تحسنًا كبيرًا في البقاء على قيد الحياة مقارنةً بالفئران التي لم تحصل على علاج. حيث وجد فرق إحصائي بين علاج VSV-Δ51 و VSV-Δ51-RBD. تدعم هذه النتائج إجمالاً إمكانية استخدام جين SARS-CoV-2 RBD لعلاج الأورام (الشكل 5)

وهذه الطريقة تعتبر أفضل طريقة لصنع هذا الاختراع والوحيدة.

عناصر الحماية

1- طريقة لزيادة تكاثر وإنتاج الفيروسات القاتلة للأورام Oncolytic virus تشتمل على إضافة جزء من بروتين نطاق ربط المستقبلات (RBD) لبروتين كورونا الشوكي الخاص بفيروس سارس-كوف-2 (SARS-CoV-2) ، حيث يتم تحميل التسلسل الجيني لبروتين نطاق ربط المستقبلات (RBD) داخل جينوم الفيروسات القاتلة للأورام Oncolytic virus في الموضع الذي يقع بين جين (Glycoprotein) وجين (RNA dependent RNA Polymerase) بحيث يسمح بالتعبير للبروتين (RBD) والنشاط الفيروسي معاً.

2- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 1 حيث تكون الفيروسات القاتلة للأورام Oncolytic virus من عائلة الفيروسات الربدية Rhabdoviridea.

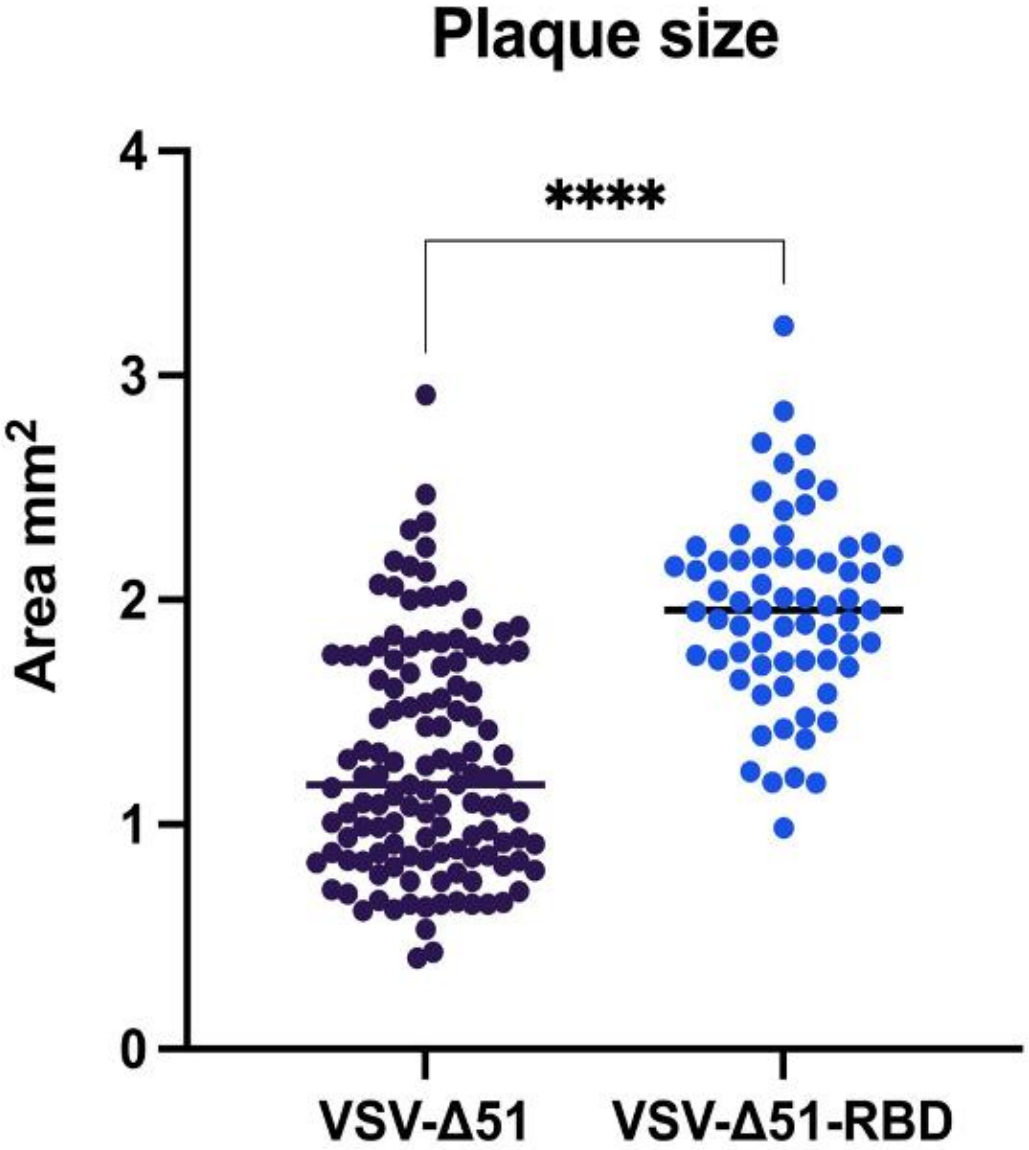
3- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 2 حيث تكون الفيروسات فيروس التهاب الفم الحويصلي Vesicular stomatitis virus (VSV).

4- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية 3 حيث تشمل تعزيز التكاثر الفيروسي لغرض تحسين كفاءة إنتاج الفيروسات الخاصة بتصنيع اللقاحات وعلاج الاورام عن طريق إضافة البروتين (RBD) المؤتلف (Recombinant protein) ضمن وسط زراعة الخلايا Culture Media المخصص لإنتاج و تكاثر الفيروسات المؤتلفة Recombinant viruses.

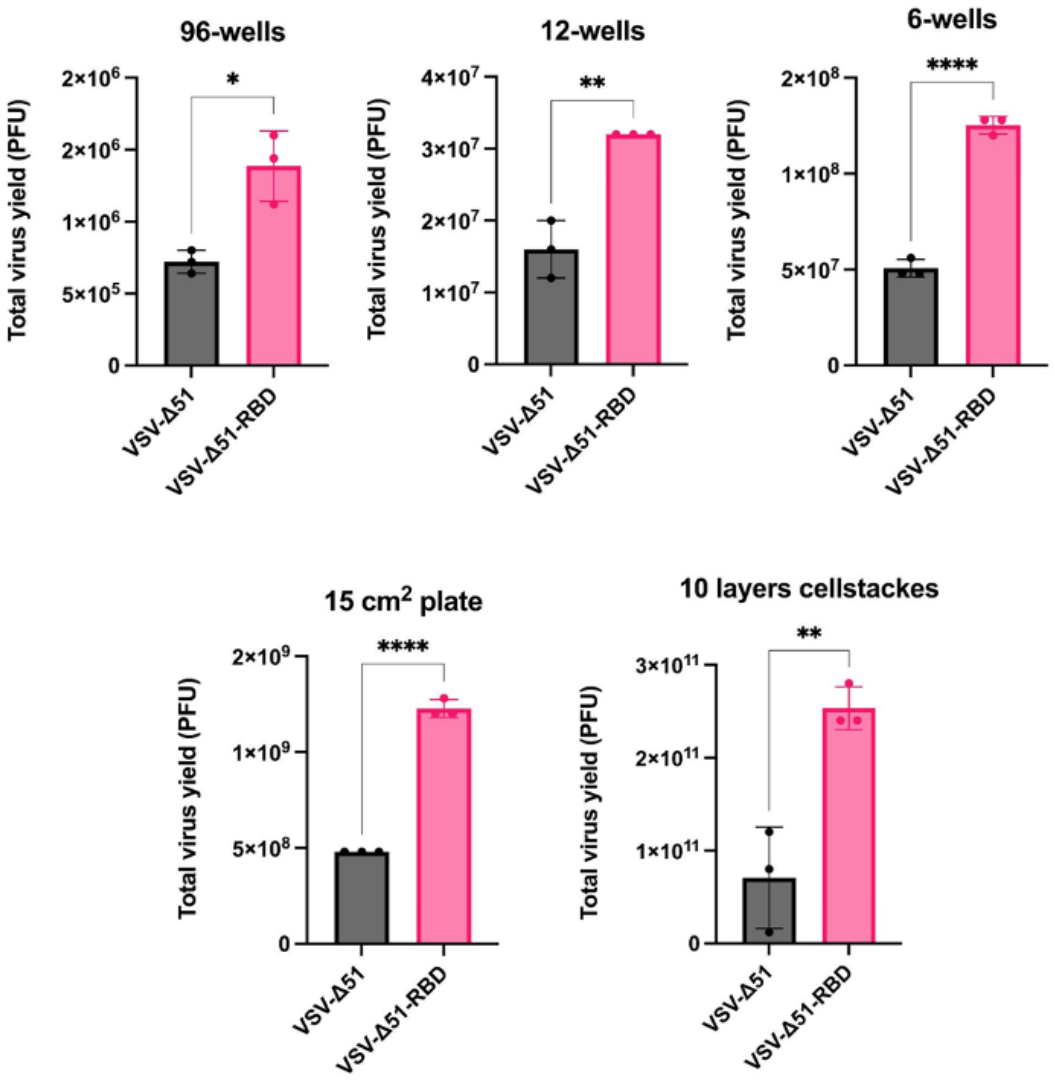
5- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 4 حيث تشتمل على استخدام خلايا مضيفة لتكاثر الفيروسات مثل خلايا VERO أو HEK أو CHO أو 549A أو 10B16F أو LLC1.

6- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم 5 تشمل إضافة البروتين (RBD) المؤتلف (Recombinant protein) بتركيز 8 نانوغرام/مل كحد أدنى ضمن وسط زراعة الخلايا Culture Media.

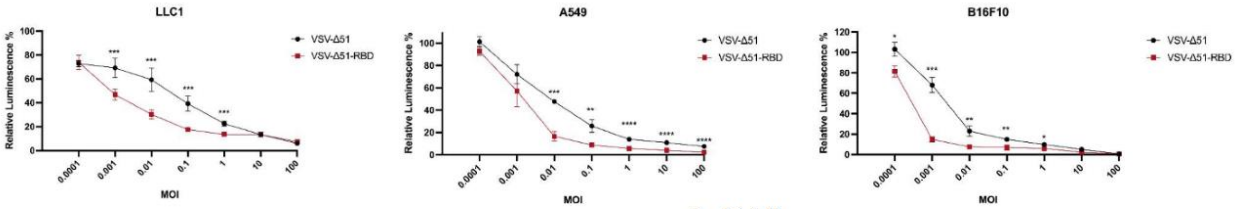
7- ناقل فيروسي (VSV) يشتمل على بروتين نطاق ربط المستقبلات (RBD) لبروتين كورونا الشوكي الخاص بفيروس سارس-كوف-2 (SARS-CoV-2) داخل الجينوم حيث يكون الفيروس من سلالة VSVΔ51 المعدل والمشتمل على حذف الحمض الأميني الميثيونين (M) في الموضع 51 في الجين (Matrix) داخل جينوم الفيروس وفقاً لطريقة الواردة في عناصر الحماية 1-6.



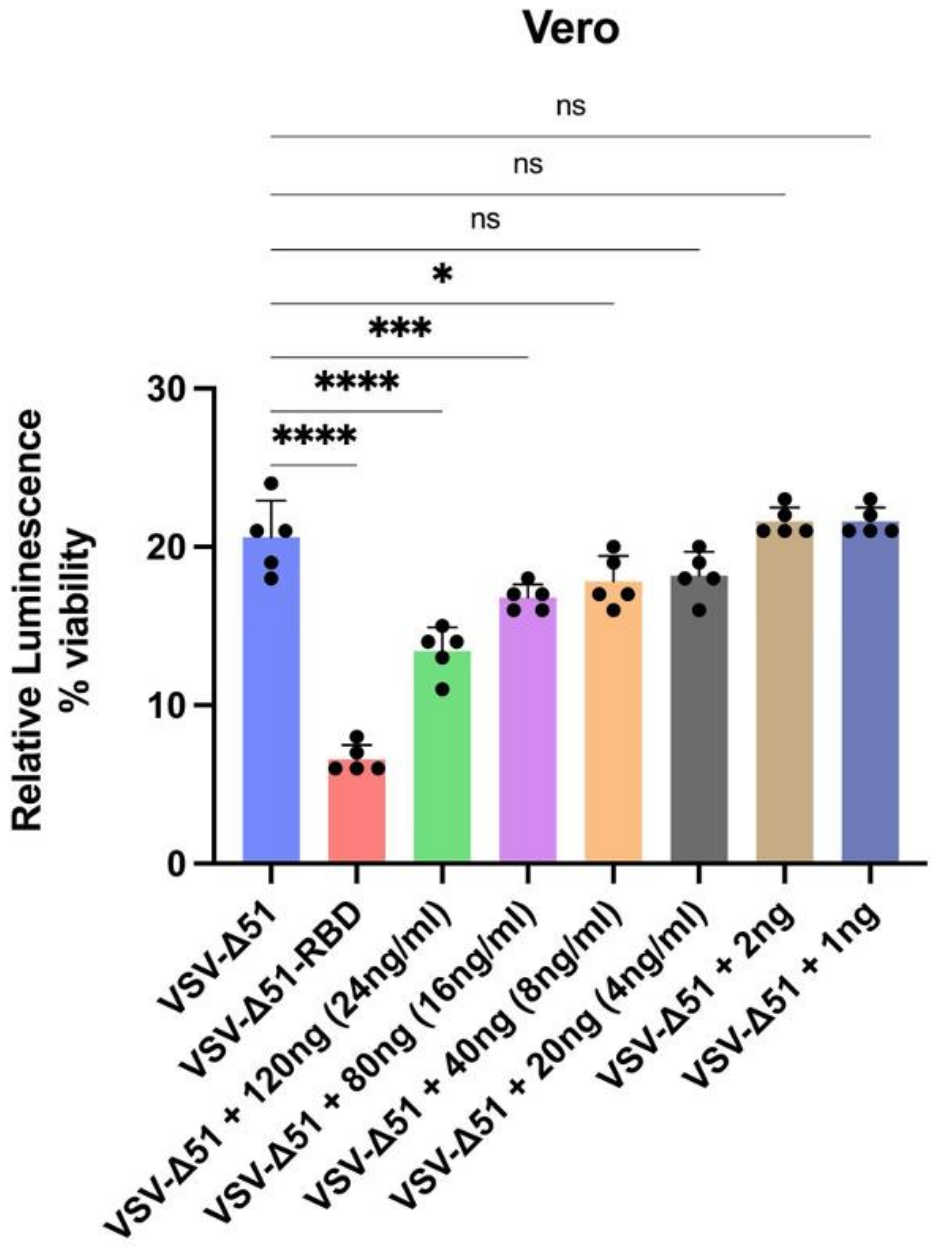
الشكل 1


96-wells
12-wells
6-wells
15 cm² plate
10 layers cellstackes
Total virus yield (PFU)
VSV-Δ51
VSV-Δ51-RBD
*
**
****
2×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
2×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
2×10⁹
1×10⁹
5×10⁸
3×10¹¹
2×10¹¹
1×10¹¹

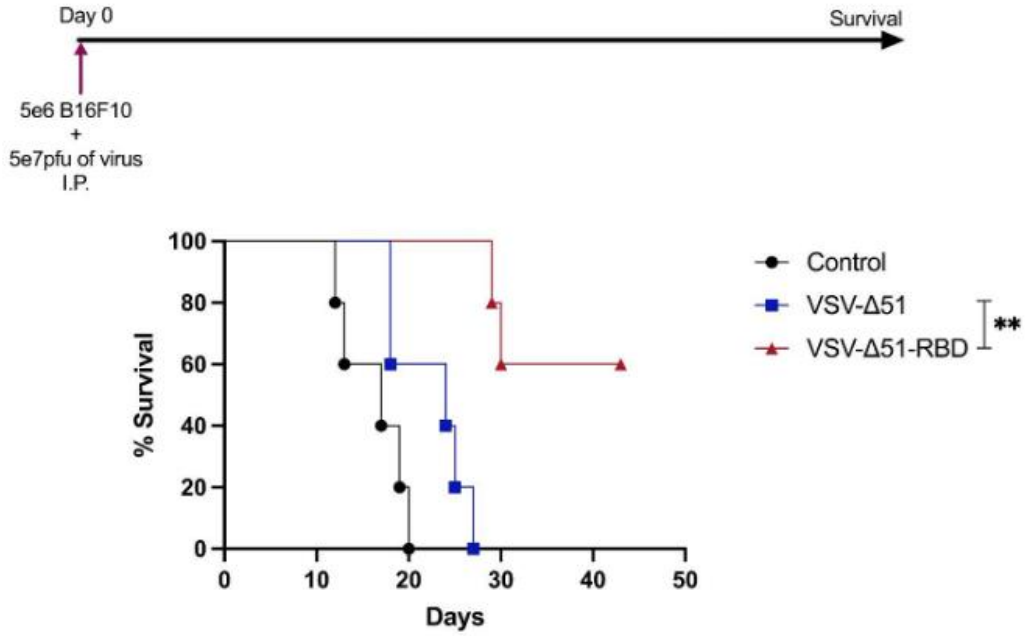
الشكل 2

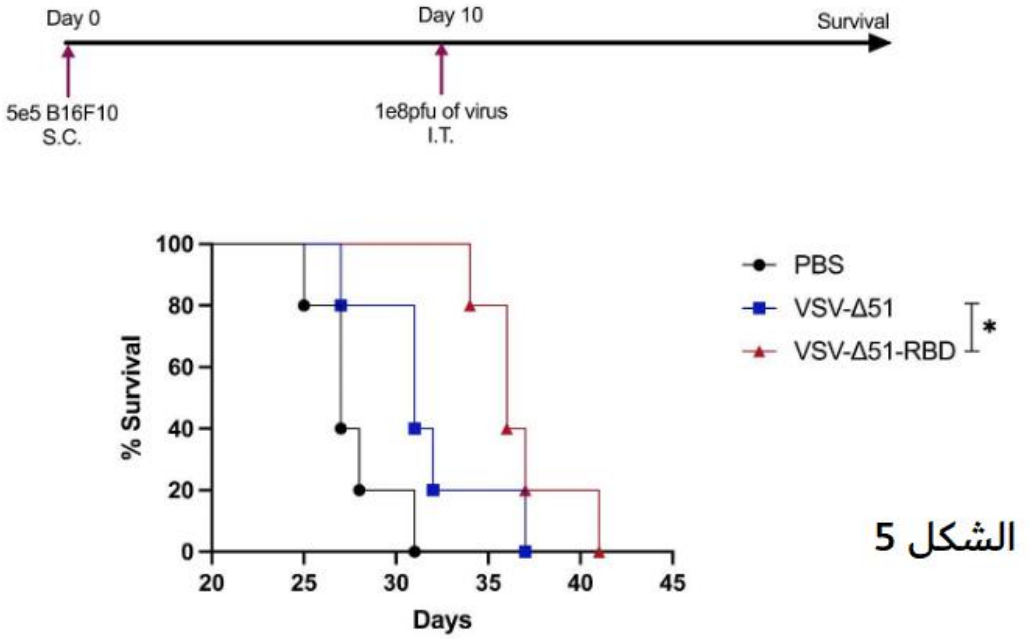

LLC1
A549
B16F10
Relative Luminescence %
MOI
VSV-Δ51
VSV-Δ51-RBD

الشكل 3


Vero
ns
ns
ns
*
***
****
****
Relative Luminescence
% viability
30
20
10
0
VSV-Δ51
VSV-Δ51-RBD
VSV-Δ51 + 120ng (24ng/ml)
VSV-Δ51 + 80ng (16ng/ml)
VSV-Δ51 + 40ng (8ng/ml)
VSV-Δ51 + 20ng (4ng/ml)
VSV-Δ51 + 2ng
VSV-Δ51 + 1ng

الشكل 4


Day 0
Survival
5e6 B16F10
+
5e7pfu of virus
I.P.
% Survival
Days
Control
VSV-Δ51
VSV-Δ51-RBD
**


Day 0
Day 10
Survival
5e5 B16F10
S.C.
1e8pfu of virus
I.T.
% Survival
Days
PBS
VSV-Δ51
VSV-Δ51-RBD
*

الشكل 5

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