



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2852668 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/113 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.10.03
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.04.27
(86)	European Application Nr.	13760133.2
(86)	European Filing Date	2013.07.12
(87)	The European Application's Publication Date	2015.04.01
(30)	Priority	2013.05.03, EP, 13166465 2013.06.18, EP, 13172515 2013.06.26, EP, 13173818 2012.07.12, US, 201261670681 P 2012.10.26, US, 201261718801 P
(84)	Designated Contracting States:	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Proprietor	ProQR Therapeutics II B.V., Darwinweg 24, 2333 CR Leiden, NL-Nederland
(72)	Inventor	DE BOER, Daniel Anton, Diernenseweg 3, NL-3882 RX Putten, NL-Nederland RITSEMA, Tita, Obrechtstraat 74, NL-3572 EH Utrecht, NL-Nederland
(74)	Agent or Attorney	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge

(54)	Title	OLIGONUCLEOTIDES FOR MAKING A CHANGE IN THE SEQUENCE OF A TARGET RNA MOLECULE PRESENT IN A LIVING CELL
------	-------	---

(56)	References Cited:	WO-A2-2005/094370 YING SHEN ET AL.: "RNA-driven genetic changes in bacteria and in human cells", MUTATION RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 717, no. 1, 31 March 2011 (2011-03-31), pages 91-98, XP028101777, ISSN: 0027-5107, DOI: 10.1016/J.MRFMMM.2011.03.016 [retrieved on 2011-04-14] K.K. GONCZ ET AL.: "Expression of [Delta]F508 CFTR in normal mouse lung after site-specific modification of CFTR sequences by SFHR", GENE THERAPY, vol. 8, no. 12, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 961-965, XP55087004, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/sj.gt.3301476 THORPE P. ET AL.: "Optimising gene repair strategies in cell culture", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 9, no. 11, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 700-702, XP009004392, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3301750 OLGA IGOUCHEVA ET AL.: "Oligonucleotide-mediated gene targeting in human hepatocytes: implications of mismatch repair", OLIGONUCLEOTIDES, vol. 18, no. 2, 1 June 2008 (2008-06- 01), pages 111-122, XP055083886, ISSN: 1545-4576, DOI: 10.1089/oli.2008.0120 IGOUCHEVA O. ET AL.: "Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells", GENE THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 8, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 391-399, XP001206900, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/SJ.GT.3301414 PETRA DISTERER ET AL.: "Oligonucleotide-mediated gene editing is underestimated in cells expressing mutated green fluorescent protein and is positively associated with target protein expression", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 14, no. 2, 20 February 2012 (2012-02-
------	----------------------	---

20), pages 109-119, XP055083874, ISSN: 1099-498X, DOI: 10.1002/jgm.1639

C. BERTONI ET AL.: "Enhanced gene repair mediated by methyl-CpG-modified single-stranded oligonucleotides", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 37, no. 22, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 7468-7482, XP055083881, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkp757

IOANNIS PAPAIOANNOU ET AL.: "Use of internally nuclease-protected single-strand DNA oligonucleotides and silencing of the mismatch repair protein, MSH2, enhances the replication of corrected cells following gene editing", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 11, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 267-274, XP055083882, ISSN: 1099-498X, DOI: 10.1002/jgm.1296

MCLACHLAN J. ET AL.: "Specific targeted gene repair using single-stranded DNA oligonucleotides at an endogenous locus in mammalian cells uses homologous recombination", DNA REPAIR, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 8, no. 12, 3 December 2009 (2009-12-03), pages 1424-1433, XP026783991, ISSN: 1568-7864, DOI: 10.1016/J.DNAREP.2009.09.014 [retrieved on 2009-10-24]

G. DE PIÉDOUE ET AL.: "Targeted gene correction with 5' Acridine-oligonucleotide conjugates", OLIGONUCLEOTIDES, vol. 17, no. 2, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 258-263, XP055083891, ISSN: 1545-4576, DOI: 10.1089/oli.2007.0074

LIVINGSTON PAULA ET AL.: "Oligonucleotide delivery by nucleofection does not rescue the reduced proliferation phenotype of gene-edited cells.", NUCLEIC ACID THERAPEUTICS, vol. 22, no. 6, December 2012 (2012-12), pages 405-413, XP002716113, ISSN: 2159-3345

JULIA U. ENGSTROM ET AL.: "Regulation of targeted gene repair by intrinsic cellular processes", BIOESSAYS, vol. 31, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 159-168, XP055083884, ISSN: 0265-9247, DOI: 10.1002/bies.200800119

PAPAIOANNOU IOANNIS ET AL.: "Oligonucleotide-directed gene-editing technology: mechanisms and future prospects", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 12, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 329-342, XP009161686, ISSN: 1744-7682

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

- 1.** Enkeltkjedet oligonukleotid hvor alle nukleosider av oligonukleotidet er 2'-O-alkylribose ribonukleosider for anvendelse ved behandling av menneske- eller dyrekroppen, hvor nevnte oligonukleotid er i stand til å danne en endring i sekvensen av et mål-RNA-molekyl som er til stede i en levende celle av nevnte menneske- eller dyrelegeme, ved å tilføre oligonukleotidet til en levende celle under betingelser som tillater opptak av den levende celle av nevnte oligonukleotid, hvor nevnte oligonukleotid omfatter en sekvens som er i det minste delvis komplementær til mål-RNA-molekylet slik at hybridisering av oligonukleotidet til mål-RNAet eller en prekursor derav eller et templat for dette, finner sted i nevnte levende celle for å tillate biokjemisk maskineri som er til stede i nevnte levende celle, å kopiere en forskjell i sekvens av oligonukleotidet i forhold til mål-RNA-molekylet til RNA-molekylet enten direkte eller via en prekursor for dette eller et templat for dette for å fremskaffe en endring i nevnte mål-RNA.
- 2.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge krav 1, hvor: (a) endringen i sekvens av mål-RNAet forårsaker cellen til å forandre fenotype; (b) endringen i sekvensen av nevnte mål-RNA blir bekreftet ved å bestemme sekvensen av nevnte mål-RNA eller en prekursor for dette eller et templat for dette; (c) endringen i sekvensen av nevnte mål-RNA blir bekreftet ved å bestemme sekvensen av et polypeptidprodukt kodet av nevnte mål-RNA; (d) endringen i sekvensen av nevnte mål-RNA blir bekreftet ved å bestemme en fenotypisk endring i nevnte levende celle eller organismen omfattende nevnte celle, ideelt hvor den fenotypiske endringen er en lindring i en lidelse kausalt relatert til sekvensen av mål-RNAet før endringen, f.eks. hvor lidelsen er en genetisk lidelse.
- 3.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvor oligonukleotidet har en lengde på 15 – 100 nukleotider, f.eks. hvor lengden av oligonukleotidet er mellom 20 og 50, mer foretrukket mellom 25 og 45 nukleotider, mer foretrukket mellom 27 og 35 nukleotider.
- 4.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor oligoribonukleotidet omfatter et inosin og/eller omfatter modifiserte nukleotider fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av 5-metyl-dC, 2-amino-dA, C5-pyrimidin og/eller modifiserte internukleosid-bindinger valgt fra gruppen bestående av fosfortioat-bindinger og metylfosfonat-bindinger.

- 5.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor alle nukleosider av oligonukleotidet er 2'-O-metylribose-nukleosider.
- 6.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor endringen i sekvensen av mål-RNA-molekylet omfatter et innskudd eller en substitusjon av én eller flere nukleosider, f.eks. hvor mål-RNAet koder for human CFTR og endringen resulterer i dannelsen eller restaureringen av en nukleosid-triplett som koder for et fenylalanin i aminosyreposisjon 508 av CFTR-proteinet, f.eks. hvor endringen omfatter innsettingen av en nukleosid-triplett valgt fra gruppen bestående av 5'-UUU-3' og 5'-CUU-3'.
- 7.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge krav 6, hvor oligonukleotidet er komplementært til en sekvens som har minst 75%, 80%, 85%, 90%, 95% eller 99% sekvensidentitet med nukleotider 16-30 og 34-48 av SEQ ID NO: 6 og endringen omfatter innsettingen av en nukleosid-triplett valgt fra gruppen bestående av 5'-UUU-3' og 5'-CUU-3'.
- 8.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor oligonukleotidet omfatter eller består av nukleotider 7-29, fortrinnsvis nukleotider 1-33, av SEQ ID NO: 1 eller av SEQ ID NO: 3, fortrinnsvis av SEQ ID NO: 1.
- 9.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor oligonukleotidet foreligger i en vehikkel, fortrinnsvis et liposom, polysom eller nanopartikkel og/eller hvor oligonukleotidet er kompleksbundet til en avleveringsforbindelse, fortrinnsvis polyetylen-imin (PEI), polyetylenglykol (PEG) og/eller er bundet til et sterol, fortrinnsvis kolesterol.
- 10.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor oligonukleotidet blir tilført luftveiene eller lungene, fortrinnsvis via luftveiene, i en tørr formulering eller i en aerosol foretrukket ved å bruke en nebulisator, og fortrinnsvis bli oligonukleotidet tilført sammen med en transfektonmediator og/eller en cystisk fibrose-medisin som er kjent for fagpersonen, fortrinnsvis DNase, mannitol (fortrinnsvis Bronchitol) og/eller et lite molekyl til behandling av CF, fortrinnsvis Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) og/eller VX-661; f.eks. hvor oligonukleotidet blir tilført i en hypertøn saline-sammensetning, fortrinnsvis på mellom 2% - 9% salinekonsentrasjon, foretrukket 3% - 8%, mer foretrukket 4% - 8%, mer foretrukket 5% - 8%, mer foretrukket 6% - 8%, mer foretrukket 6% - 7%, enda mer foretrukket omkring 7% salinekonsentrasjon, hvor den hypertone saline-

oppløsningen foretrukket er en fysiologisk og farmasøytisk akseptabel oppløsning (f.eks. hvor den hypertone salineoppløsningen er i hovedsak en NaCl-oppløsning).

- 5 **11.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge krav 10, hvor oligonukleotidet blir tilført i en mukuspenetrerende partikkel, fortrinnsvis en mukus-penetrerende nano-partikkel.
- 10 **12.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge krav 10 eller krav 11, hvor (i) administrasjonen av oligonukleotidet blir kombinert med antibiotikumbehandling for å redusere bakterielle infeksjoner samt symptomene på slike som mukusfortykning og/eller biofilm-dannelse og/eller (ii) hvor Broncheo-Alveloar Lavage (BAL) blir tilført før administrasjon av oligonukleotidet ifølge oppfinnelsen.
- 15 **13.** Oligonukleotid for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor oligonukleotidet blir administrert i en tidsfrigjøringskapsel for å lette avlevering til tarmceller, og eventuelt hvor administrasjonen av oligonukleotidet blir kombinert med administrasjonen av en biologisk eller syntetisk pankreatisk enzymsammensetning så som pancrelipase eller Creon.
- 20 **14.** Farmasøytisk sammensetning omfattende et oligonukleotid for anvendelse som definert i ethvert av kravene 1 til 13, et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel og/eller en hyperton fysiologisk og farmakologisk akseptabel salineoppløsning, fortrinnsvis på mellom 2% - 9% salinekonsentrasjon, foretrukket 3 - 8%, mer foretrukket 4% - 8%, mer foretrukket 5% - 8%, mer foretrukket 6% - 8%, mer foretrukket 6% - 7%, enda mer foretrukket omkring 7% salinekonsentrasjon, f.eks. hvor den hypertone salineoppløsningen er i hovedsak en NaCl-oppløsning.
- 15.** Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, ytterligere omfattende en transfeksjonsmediator.
- 25 **16.** Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14 eller krav 15, ytterligere omfattende en cystisk fibrose-medisin, foretrukket en DNase, mannitol og/eller et lite molekyl til behandling av CF, fortrinnsvis Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) og/eller VX-661.

17. Enkeltkjedet oligoribonukleotid eller farmasøytisk sammensetning omfattende:

(a) et enkeltkjedet oligoribonukleotid som er komplementært til en sekvens som har minst 75%, 80%, 85%, 90%, 95% eller 99% sekvensidentitet med nukleotider 16-30 og 34-48 av SEQ ID NO: 6, hvor alle nukleosider av oligoribonukleotidet er 2'-O alkylribose-nukleosider; eller

(b) et enkeltkjedet oligoribonukleotid som omfatter nukleotider 7-29, fortrinnsvis nukleotider 1-33 av SEQ ID NO: 1 eller av SEQ ID NO: 3, fortrinnsvis av SEQ ID NO: 1, hvor alle nukleosider av oligoribonukleotidet er 2'-O alkyl-ribose-

ribonukleosider.