



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3039148 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/88 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/205 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.01.24
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.08.18
(86)	European Application Nr.	14784521.8
(86)	European Filing Date	2014.08.28
(87)	The European Application's Publication Date	2016.07.06
(30)	Priority	2013.08.28, GB, 201315321
(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
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, Nederland
(72)	Inventor	GEIJSEN, Niels, c/o Hubrecht InstituteUppsalalaan 8, NL-CT 3584 Utrecht, Nederland D'ASTOLFO, Diego, Sebastián, c/o Hubrecht InstituteUppsalalaan 8, NL-CT 3584 Utrecht, Nederland
(74)	Agent or Attorney	OSLO PATENTKONTOR AS, Hoffsvæien 1A, 0275 OSLO, Norge

(54)	Title	TRANSDUCTION BUFFER
(56)	References Cited:	WO-A2-2006/065960 WO-A1-2008/093982 US-B1- 6 258 792 DATABASE Pubchem Compound [Online] NCBI; 30 July 2008 (2008-07-30), XP002734339, Database accession no. CID 24860518 YOSHIMI SUGIURA ET AL: "Novel Thioredoxin-related Transmembrane Protein TMX4 Has Reductase Activity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 10, 5 March 2010 (2010-03-05), pages 7135-7142, XP055530844, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.082545 ULRIKE MOCK ET AL: "Efficient Lentiviral Transduction and Transgene Expression in Primary Human B Cells", HUMAN GENE THERAPY METHODS, vol. 23, no. 6, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 408-415, XP055146537, ISSN: 1946-6536, DOI: 10.1089/hgtb.2012.160 Kerri M Dawson ET AL: "Organic Osmolytes and Embryos: Substrates of the Gly and P

Transport Systems Protect Mouse Zygotes against the Effects of Raised Osmolarity", BIOLOGY OF REPRODUCTION, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 1550-1558, XP055161641, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.biolreprod.org/content/56/6/1550.full.pdf> [retrieved on 2015-01-13]

Gong Wu et al.: "Neutron Capture Therapy of Cancer: Nanoparticles and High Molecular Weight Boron Delivery Agents." In: Mansoor M. Amiji: "Nanotechnology for Cancer Therapy", 2006, CRC Press 2006, XP002734340, ISBN: 978-0-8493-7194-3 pages 77-103, DOI: DOI: 10.1201/9781420006636.ch6, figure 6.4

TAKAI T ET AL: "DNA transfection of mouse lymphoid cells by the combination of DEAE-dextran-mediated DNA uptake and osmotic shock procedure", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA . GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1048, no. 1, 30 January 1990 (1990-01-30), pages 105-109, XP023467303, ISSN: 0167-4781, DOI: 10.1016/0167-4781(90)90029-2 [retrieved on 1990-01-30]

JER-TSONG HSIEH ET AL: "R11, a novel cell-permeable peptide, as an intravesical delivery vehicle", BJU INTERNATIONAL, vol. 108, no. 10, 31 March 2011 (2011-03-31), pages 1666-1671, XP055160576, ISSN: 1464-4096, DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10185.x

GRUBER J ET AL: "RNA interference by osmotic lysis of pinosomes: liposome-independent transfection of siRNAs into mammalian cells", BIOTECHNIQUES, INFORMA HEALTHCARE, US, vol. 37, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 96-102, XP002981817, ISSN: 0736-6205

P. MALI ET AL: "RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 15 February 2013 (2013-02-15), pages 823-826, XP055159412, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033 & P. MALI ET AL: "Supplementary Materials for RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9", SCIENCE, vol. 339, no. 6121, 3 January 2013 (2013-01-03), pages 823-826, XP055161524, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1232033

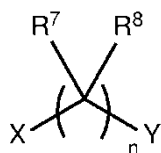
OKADA C Y ET AL: "Introduction of macromolecules into cultured mammalian cells by osmotic lysis of pinocytotic vesicles", CELL, CELL PRESS, US, vol. 29, no. 1, 1 May 1982 (1982-05-01), pages 33-41, XP023911241, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/0092-8674(82)90087-3 [retrieved on 1982-05-01]

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. *In vitro*-fremgangsmåte for transdusering av et protein, en nukleinsyre eller en kombinasjon derav inn i en celle, hvor fremgangsmåten omfatter å bringe cellen i berøring med proteinet, nukleinsyren eller kombinasjonen derav og en
- 5 transduksjonsbuffer, hvor transduksjonsbufferen omfatter (i) en transduksjonsforbindelse og (ii) et salt valgt fra et natrium-, litium-, kalium-, cesium- eller rubidiumsalt; hvor transduksjonsforbindelsen

a. har den generelle formel:



10

(I)

hvor:

X er valgt fra NR^1R^2 , $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3+$, OH og COOR^4 ;

Y er valgt fra SO_3H , SO_3^- , COO^- , CONH_2 , COOR^{12} , CONR^5R^6 , tetrazol, OH, $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ og H;

15 n er 3, 4, 5 eller 6;

R^1 , R^2 og R^3 hver uavhengig er valgt fra H, C_{1-6} -alkyl, C_{5-10} -aryl, C_{6-15} -aralkyl, COR^9 ; C_{1-6} -alkyl, C_{5-10} -aryl og C_{6-15} -aralkyl kan valgfritt være substituert med R^Y , OH eller COOH ;

20 eller R^1 og R^2 kan sammen med nitrogenet som de er bundet til, danne heterocyklyl;

eller når X er $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3+$, kan R^3 være fraværende og R^1 og R^2 kan sammen med nitrogenet som de er bundet til, danne heteroaryl;

R^4 , R^5 , R^6 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} er uavhengig valgt fra H og C_{1-6} -alkyl;

R^7 og R^8 er uavhengig valgt fra H, C₁₋₆-alkyl og OH;

heterocyklyl er en monocyklisk ring som er mettet eller delvis umettet, som hvor mulig inneholder 1 eller 2 ringelementer uavhengig valgt fra N, NR¹³, NR¹³R¹⁴⁺ og O, og 2 til 5 karbonatomer; heterocyklyl kan valgfritt være substituert med C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-karboksylsyre eller C₁₋₆-alkyl substituert med R^Y;

heteroaryl er en 5- eller 6-leddet aromatisk ring som hvor mulig inneholder 1, 2 eller 3 ringelementer uavhengig valgt fra N, NR¹³, NR¹³R¹⁴⁺ og O; heteroaryl kan valgfritt være substituert med C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-karboksylsyre eller C₁₋₆-alkyl substituert med R^Y;

10 R^{13} og R^{14} er uavhengig valgt fra H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-karboksylsyre og C₁₋₆-alkyl substituert med R^Y;

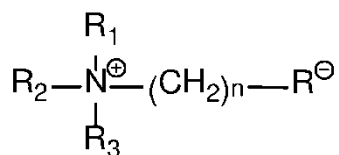
alkyl er et rettkjedet eller forgrenet mettet hydrokarbon;

R^Y er valgt fra SO₃H, SO₃⁻, COO⁻, CONH₂, COOR¹², CONR⁵R⁶, tetrazol, OH og NR¹⁰R¹¹;

15 C₁₋₆-karboksylsyre betyr -COOH eller en C₁₋₅-alkylkjede substituert med COOH

og tautomerer, solvater, dobbeltioner og salter derav; eller

b. har den generelle formel:



hvor R₁ er metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl eller heksyl;

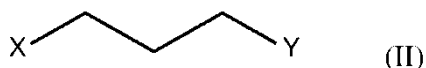
20 R₂ er metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl eller heksyl;

R₃ er metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl eller heksyl;

R⁻ er SO₃⁻ eller COO⁻ eller POO⁻ og

n er 3-6, f.eks. 3, 4, 5 eller 6.

2. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor transduksjonsforbindelsen har den generelle formel:



5 hvor

X er valgt fra NR^1R^2 og $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3+$;

Y er valgt fra SO_3H , SO_3^- , COO^- , CONH_2 , COOR^{12} og CONR^5R^6 ;

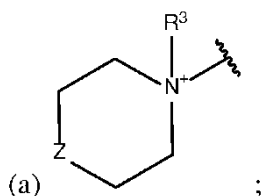
10 R^1 , R^2 og R^3 hver uavhengig er valgt fra H og C_{1-6} -alkyl som valgfritt kan være substituert med OH eller COOH; eller R^1 og R^2 kan sammen med nitrogenet som de er bundet til, danne heterocyklyl, fortrinnsvis piperidin, piperazin eller morfolin, som valgfritt kan være substituert; eller når X er $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3+$, kan R^3 være fraværende og R^1 og R^2 kan sammen med nitrogenet som de er bundet til, danne heteroaryl, fortrinnsvis pyridyl, som valgfritt kan være substituert;

og alle øvrige grupper har betydningene angitt for formel I ovenfor.

15 3. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor transduksjonsforbindelsen:

(a) inneholder en kvaternær nitrogengruppe og hvor det kvaternære nitrogen er del av en alifatisk eller aromatisk ringstruktur;

(b) er en forbindelse med formel I eller II hvor X er



20

Z er valgt fra $\text{C}(\text{R}^{15})_2$, NR^{13} , $\text{NR}^{13}\text{R}^{14}+$ og O;

hver R^{15} er uavhengig valgt fra H, C_{1-6} -alkyl, C_1 - C_6 -karboksylsyre og C_1 - C_6 -alkyl substituert med R^Y ;

R^3 er valgt fra H, C_{1-6} -alkyl, C_{5-10} -aryl, C_{6-15} -aralkyl, COR^9 ; C_{1-6} -alkyl, C_{5-10} -aryl og C_{6-15} -aralkyl kan valgfritt være substituert med R^Y , OH eller COOH, fortrinnsvis er

5 $R_3 -CH_3$;

R^{13} og R^{14} er uavhengig valgt fra H, C_{1-6} -alkyl, C_1 - C_6 -karboksylsyre og C_1 - C_6 -alkyl substituert med R^Y ; og/eller

(c) er valgt fra forbindelsene 01-06, 08, 10-12, 14-17, 20-31 og 34-46 i tabell 1.

10 4. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav, hvor transduksjonsbufferen ytterligere omfatter et osmo-beskyttende middel valgt fra glycin, histidin, alanin, isoleucin, arginin, asparagin, leucin, asparaginsyre, lysin, glutaminsyre, cystein, metionin, fenylalanin, glutamin, treonin, tryptofan, prolin, valin, ornitin, selenocystein, serin, tyrosin og prolin.

15

5. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav, hvor:

transduksjonsbufferen ytterligere omfatter et osmo-beskyttende middel valgt fra glycin og/eller glycerol;

20 transduksjonsbufferen ytterligere omfatter et osmo-beskyttende middel i en konsentrasjon mellom ca. 5 og ca. 500 mM;

transduksjonsbufferen har en osmolalitet på minst 300 mOsm/kg;

transduksjonsforbindelsen foreligger i en konsentrasjon mellom ca. 0,1 mM og ca. 500 mM; og/eller

25 hvor saltet er natriumklorid.

6. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav, hvor transduksjonsbufferen ytterligere omfatter: en biologisk pH-buffer, så som PBS, TES eller HEPES; et viskositetsfremmende middel, så som polyvinylpyrrolidon

(PVP); en hemmer av interferonresponsbanen; og/eller en vekstfaktor, for eksempel valgt fra EGF, FGF, HGF, BDNF, PDGF, VEGF eller IGF, eller er hvilken som helst kombinasjon derav.

- 5 7. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav, hvor transduksjonsbufferen omfatter NDSB-201 som transduksjonsforbindelse, og fortrinnsvis ytterligere omfatter GABA som transduksjonsforbindelse.
8. *In vitro*-fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav,
 - 10 hvor transduksjonsbufferen omfatter: (i) NDSB-201 og GABA som transduksjonsforbindelser; (ii) natriumklorid som salt; og fortrinnsvis (iii) glycin og/eller glycerol som osmo-beskyttende middel; og hvor osmolaliteten av transduksjonsbufferen er minst 300 mOsm/kg.
- 15 9. *In vitro* fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de forutgående krav, hvor transduksjonsbufferen ytterligere omfatter en aktivator/forsterker av en natrium-hydrogen-transportør, hvor aktivatoren/forsterkeren er en vekstfaktor.
- 10 10. Transduksjonsbuffer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9 for anvendelse i en fremgangsmåte ved behandling av en genetisk sykdom, hvor fremgangsmåten omfatter å modifisere en nukleinsyre, så som en genetisk sekvens, i en celle, hvor fremgangsmåten omfatter å bringe cellen i berøring med et protein som har evnen til å modifisere en nukleinsyre, og transduksjonsbufferen.
- 25 11. Transduksjonsbuffer for anvendelse ifølge krav 10, hvor proteinet som har evnen til å modifisere en nukleinsyre, er iboende målrettet mot en bestemt målsekvens, for eksempel hvor proteinet er et sinkfingernuklease eller et TALEN, Cas9, en Cas9-analog, et DNA-rettet FokI-nuklease-assosiert protein, et Cascade-kompleks, et TtAgo-protein eller et annet Argonaut-protein.
- 30 12. Transduksjonsbuffer for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 11, hvor cellen ytterligere bringes i berøring med et styringsmolekyl for å rette proteinet mot en genetisk målsekvens.
- 35 13. Transduksjonsbuffer for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 12, hvor transduksjonsbufferen ytterligere omfatter en aktivator/forsterker av en natrium-hydrogen-transportør, hvor aktivatoren/forsterkeren er en vekstfaktor.

14. Transduksjonsbuffer ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvor osmolaliteten av transduksjonsbufferen er minst 650 mOsm/kg.
15. Farmasøytisk sammensetning omfattende en transduksjonsbuffer ifølge krav 14.
16. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15 for anvendelse i terapi eller diagnostisering.
17. Anvendelse av glycin og/eller glycerol i en fremgangsmåte for transdusering av et protein, en nukleinsyre eller en kombinasjon derav inn i en celle ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9.
18. Anvendelse av en transduksjonsforbindelse valgt fra forbindelsene 01-06, 08, 10-12, 14-17, 20-31 og 34-46 i tabell 1 for transdusering av et protein, en nukleinsyre eller en kombinasjon derav inn i en celle, hvor fremgangsmåten er i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 9.