



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3049473 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.02.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.09.22
(86)	European Application Nr.	14846953.9
(86)	European Filing Date	2014.09.25
(87)	The European Application's Publication Date	2016.08.03
(30)	Priority	2013.09.25, US, 201361882500 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	Engene, Inc., 7171 Frederick-Banting, Montreal, Quebec H4S 1Z9, Canada
(72)	Inventor	GAO, Jun, 607 Langside Avenue, Coquitlam, British Columbia V3J 2Y7, Canada HSU, Eric, 5870 Fremlin Street, Vancouver, British Columbia V5Z 3W7, Canada CHEUNG, Anthony, 2301-8 Smithe Mews, Vancouver, British Columbia V6B 0A5, Canada
(74)	Agent or Attorney	BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54)	Title	DUALLY DERIVATIZED CHITOSAN NANOPARTICLES AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME FOR GENE TRANSFER IN VIVO
------	-------	---

(56) References

Cited:

US-A1- 2012 295 355

WO-A1-2008/082282

WO-A1-2009/036022

WO-A1-2013/138930

US-A1- 2007 281 904

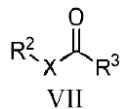
WO-A1-2012/105685

GAO Y ET AL: "Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 359, no. 1-2, 9 July 2008 (2008-07-09), pages 241-246, XP022707722, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2008.03.037 [retrieved on 2008-04-01]

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. Kitosan-derivatnanopartikkel omfattende kitosan funksjonalisert med arginin (Arg) og en hydrofil polyol (HP) av formel VII:



hvor:

R^2 velges fra: H og hydroksyl;

R^3 velges fra: H og hydroksyl; og

X er valgt fra: C2-C6-alkylen eventuelt substituert med én eller flere

hydroksylsubstituent, forutsatt at den hydrofile polyolen ikke er glukonsyre.

2. Kitosan-derivatnanopartikkelen ifølge krav 1, hvor den hydrofile polyolen har en karboksylgruppe.

3. Kitosan-derivatnanopartikkelen ifølge krav 2, hvor den hydrofile polyolen er treonsyre.

4. Kitosan-derivatnanopartikkelen ifølge krav 1, hvor den hydrofile polyolen er et sakkarid valgt fra gruppen som består av glyseraldehyd, treose, erytrose, ribose, arabinose, xylose, lyksose, allose, glukose, altrose, mannose, gulose, idose, galaktose og talose; eller hvor den hydrofile polyolen er valgt fra gruppen som består av 2,3-dihydroksylpropansyre; 2,3,4,5,6,7-heksahydroksylheptanal; 2,3,4,5,6-pentahydroksylheksanal; 2,3,4,5-tetrahydroksylheksanal; og 2,3-dihydroksylpropanal.

5. Kitosan-derivatnanopartikkelen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor den hydrofile polyolen er glukose.

6. Kitosan-derivatnanopartikkelen ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvor nanopartikkelen har et forhold mellom Arg-endelig funksjonaliseringsgrad:HP endelig funksjonaliseringsgrad på mellom ca. 1:1 til ca. 10:1, for eksempel mellom ca. 3:1 til ca. 7:1, for eksempel er forholdet mellom Arg endelig funksjonaliseringsgrad:HP endelig funksjonaliseringsgrad ca. 5:1.

7. Sammensetning omfattende nanopartikkelen ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvori kitosanet er kompleksbundet med en nukleinsyre for å danne et dobbelt derivatisert (DD) kitosannukleinsyrepolypleks, hvori eventuelt nukleinsyren er DNA eller RNA.
- 5 8. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori amin- til fosfatforholdet til DD-kitosannukleinsyrepolyplekset er mellom 2 og 100, eventuelt hvori amin- til fosfatforholdet til DD-kitosannukleinsyrepolyplekset er mellom 2 og 50, 2 og 30 eller 2 og 15.
9. Sammensetning ifølge krav 7 eller 8 for anvendelse i nukleinsyremolekyllevering til en
10 celle, hvori leveringen omfatter å bringe cellen i kontakt med sammensetningen.
10. Sammensetningen ifølge krav 9 for anvendelse i nukleinsyremolekyllevering til en celle, hvori cellen er *in vivo*.
- 15 11. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori nukleinsyren er:
- (a) en kunstig nukleinsyre, eventuelt hvori den kunstige nukleinsyren er valgt fra gruppen som består av låst nukleinsyre (LNA), glykolnukleinsyre (GNA) og treosenukleinsyre (TNA); eller
- (b) en terapeutisk nukleinsyre, eventuelt hvori den terapeutiske nukleinsyren er et
20 terapeutisk RNA, eventuelt hvori det terapeutiske RNA-et er et antisense-RNA, siRNA, kort hårnål-RNA, mRNA, mikro-RNA eller enzymatisk RNA.
12. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori polypleksene omfatter kitosanmolekyler som har en gjennomsnittlig molekylvekt på mindre enn 65 kDa før funksjonalisering, eventuelt hvori
25 polypleksene omfatter kitosanmolekyler som har en gjennomsnittlig molekylvekt på mindre enn 30 kDa før funksjonalisering.
13. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori sammensetningen har en pH mellom 4,0–7,0, eventuelt mellom 4,5–6,5.
- 30 14. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori DD-kitosannukleinsyrepolyplekset har en gjennomsnittlig polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,4, eventuelt mindre enn 0,25.

15. Sammensetningen ifølge krav 7, hvori kitosan-nukleinsyrepolypeksene omfatter kitosanmolekyler som har en gjennomsnittlig molekylvekt på:

- (a) mindre enn 50 kDa før funksjonalisering, i gjennomsnitt mindre enn 310 glukosaminmonomerenheter, et N/P-forhold på 2 til 20, en gjennomsnittlig hydrodynamisk diameter på mindre enn 500 nm, en gjennomsnittlig hydrodynamisk diameter på mindre enn 500 nm, et gjennomsnittlig zetapotensial på minst 0 mV ved en sur pH, en polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,5 og en nukleinsyrekonsentrasjon større enn 0,5 mg/ml, hvori kitosan-nukleinsyrepolypeksene er i det vesentlige frie for utfelt polypeks og er størrelsesstabil ved at de øker i gjennomsnittlig diameter med mindre enn 100 % ved romtemperatur i minst 6 timer, minst 12 timer, minst 24 timer eller minst 48 timer;
- (b) mindre enn 65 kDa før funksjonalisering, i gjennomsnitt mindre enn 400 glukosaminmonomerenheter, et N/P-forhold på 2 til 20, en gjennomsnittlig hydrodynamisk diameter på mindre enn 500 nm, et gjennomsnittlig zetapotensial på +1 til +40 mV ved en sur pH, en polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,4 og en nukleinsyrekonsentrasjon større enn 0,5 mg/ml, hvori kitosan-nukleinsyrepolypeksene er i det vesentlige frie for utfelt polypeks og er størrelsesstabile ved at de øker i gjennomsnittlig diameter med mindre enn 50 % ved romtemperatur i minst 6 timer, minst 12 timer, minst 24 timer eller minst 48 timer;
- (c) mindre enn 40 kDa før funksjonalisering, i gjennomsnitt mindre enn 250 glukosaminmonomerenheter, et N/P-forhold på 2 til 20, en gjennomsnittlig hydrodynamisk diameter på mindre enn 500 nm, et gjennomsnittlig zetapotensial på +1 til +30 mV ved en sur pH, en polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,3 og en nukleinsyrekonsentrasjon større enn 0,5 mg/ml, hvori kitosan-nukleinsyrepolypeksene er i det vesentlige frie for utfelt polypeks og er størrelsesstabile ved at de øker i gjennomsnittlig diameter med mindre enn 50 % ved romtemperatur i minst 6 timer, minst 12 timer, minst 24 timer eller minst 48 timer;
- (d) mindre enn 30 kDa før funksjonalisering, i gjennomsnitt mindre enn 190 glukosaminmonomerenheter, et N/P-forhold på 2 til 5, en gjennomsnittlig hydrodynamisk diameter på mindre enn 500 nm, et gjennomsnittlig zetapotensial på +1 til +30 mV ved en sur pH, en polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,25 og en nukleinsyrekonsentrasjon større enn 0,5 mg/ml eller 0,75 mg/ml, hvori kitosan-nukleinsyrepolypeksene er i det vesentlige frie for utfelt polypeks og er størrelsesstabile ved at de øker i gjennomsnittlig diameter med mindre enn 25 % ved romtemperatur i minst 6 timer, minst 12 timer, minst 24 timer eller minst 48 timer; eller
- (e) mindre enn 15 kDa før funksjonalisering, i gjennomsnitt mindre enn 95 glukosaminmonomerenheter, et N/P-forhold på 2 til 5, en gjennomsnittlig hydrodynamisk

diameter på mindre enn 200 nm, et gjennomsnittlig zetapotensial på +1 til +30 mV ved en sur pH, en polydispersitetsindeks (PDI) på mindre enn 0,25 og en nukleinsyrekonsentrasjon større enn 1,0 mg/ml, hvori kitosan-nukleinsyrepolypleksene er i det vesentlige frie for utfelt polypeks og er størrelsesstabile ved at de øker i gjennomsnittlig diameter med mindre enn 50 % ved romtemperatur i minst 6 timer, minst 12 timer, minst 24 timer eller minst 48 timer.

16. Sammensetning omfattende en kitosan-derivatnanopartikkel ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6 for anvendelse i behandlingen av diabetes, hvori nanopartikkelen er kompleksbundet med et nukleinsyremolekyl som koder for insulin, en glukagonantagonist, GLP-1 eller leptin for å danne et dobbelt derivatisert (DD) kitosannukleinsyrepolypleks.

17. Sammensetning omfattende en kitosan-derivatnanopartikkel ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6 for anvendelse i behandlingen av inflammatorisk tarmsykdom, hvori nanopartikkelen er kompleksbundet med et nukleinsyremolekyl som koder for IL-10 eller en TNF α -antagonist for å danne et dobbelt derivatisert (DD) kitosannukleinsyrepolypleks.

18. Sammensetning omfattende en kitosan-derivatnanopartikkel ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6 for anvendelse i behandlingen av fedme, hvori nanopartikkelen er kompleksbundet med et nukleinsyremolekyl som koder for leptin,olecystokinin, PYY eller GLP-1 for å danne et dobbelt derivatisert (DD) kitosannukleinsyrepolypleks.