(12) **Translation of European patent specification**

(11) **NO/EP 3646854 B1**

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.11.21
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.08.03
(86)	European Application Nr.	18306417.9
(86)	European Filing Date	2018.10.30
(87)	The European Application's Publication Date	2020.05.06
(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	PolyPlus Transfection, 75 rue Marguerite Perey, 67400 Illkirch-Graffenstaden, Frankrike
(72)	Inventor	STOCK, Fabrice, 34, rue Rohan, 67230 Benfeld, Frankrike TOUSSAINT MOREAU, Valérie, 11, rue de l'Aubépine, 67400 Illkirch-Graffenstaden, Frankrike ERBACHER, Patrick, 6, rue du Pont Neuf, 67230 Benfeld, Frankrike
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **COMPOSITIONS FOR TRANSFECTING MRNA INTO A CELL AND THEIR APPLICATIONS**

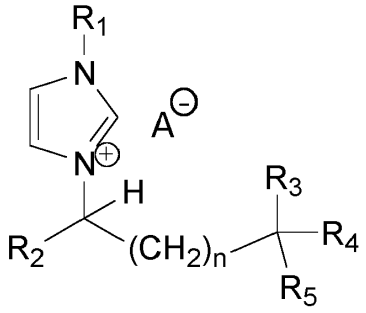
(56) References Cited:

EP-A1- 2 860 255
US-B2- 8 399 422
GEERTRUI TAVERNIER ET AL: "mRNA as gene therapeutic: How to control protein expression", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 150, no. 3, March 2011 (2011-03), pages 238-247, XP055068617, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.10.020
REJMAN J ET AL: "mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 147, no. 3, November 2010 (2010-11), pages 385-391, XP027471476, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2010.07.124 [retrieved on 2010-08-12]

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. Sammensetning egnet for transfeksjon av et budbringer-RNA (mRNA) inn i en celle omfattende et mRNA, minst et nøytralt lipid og et kationisk lipid av formel (I):



(I)

hvori

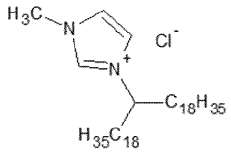
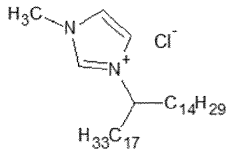
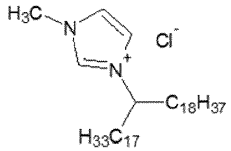
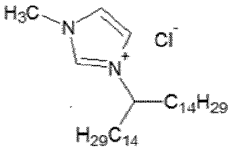
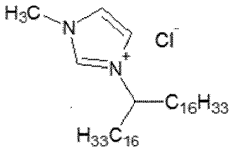
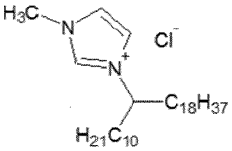
- **R_1** representerer en C_1-C_4hydrokarbonkjede eller en C_1-C_4hydroksylert kjede;
- **R_2, R_3, R_4** og **R_5,** som kan være identiske eller forskjellige, representerer H; en C_6-C_{33}-mettet eller umettet, lineær eller forgrenet hydrokarbonkjede; eller en mettet eller umettet C_6-syklus;
- **$(CH_2)_n$** representerer et hydrokarbonkjedebindeledd hvor n representerer et heltall mellom 0 og 4 inklusive;
- **A^-** representerer et biokompatibelt anion.

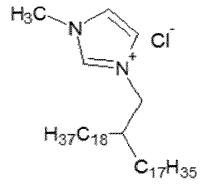
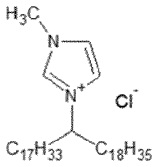
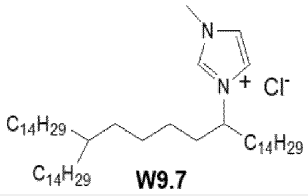
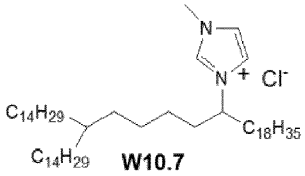
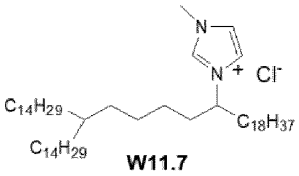
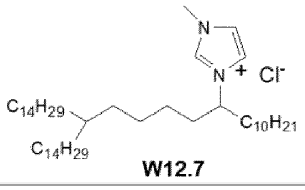
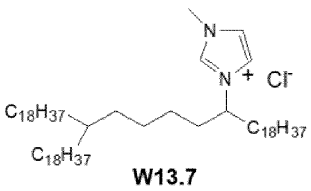
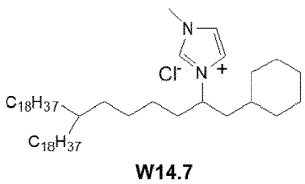
2. Sammensetningen ifølge krav 1, hvori det minst ene nøytrale lipidet er valgt fra gruppen som består av fosfatidylserin (PS), fosfatidylkolin (PC), lipid-polyetylenglykol-(PEG)-konjugater, kolesterol, 1,2-dioleoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin (DOPE), 1,2-difenytanoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin (DPyPE), palmitoyllinoleoylfosfatidyletanolamin (PaLiPE) og fosfatidyletanolamin (PE), fortrinnsvis er DOPE eller DPyPE, mer foretrukket er DPyPE.

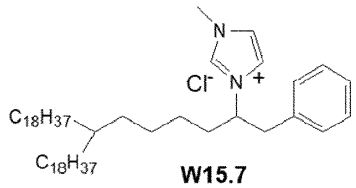
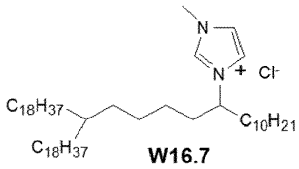
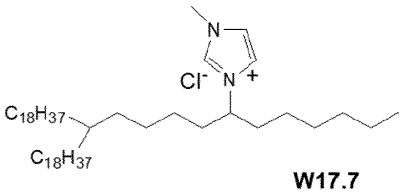
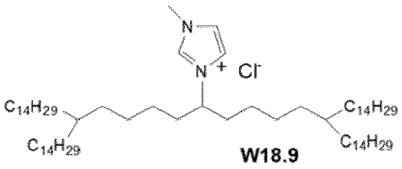
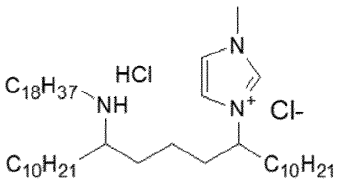
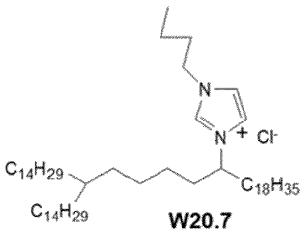
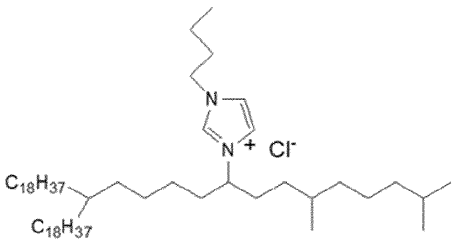
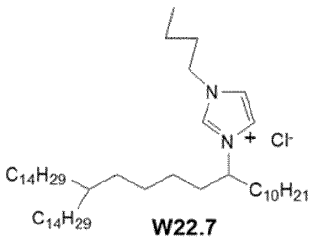
3. Sammensetningen ifølge krav 1 eller 2, hvori **n** representerer et heltall mellom 2 og 4 inklusive, fortrinnsvis n = 4, og **R_2** representerer en C_6-C_{33}-mettet eller umettet, lineær eller forgrenet hydrokarbonkjede; eller en mettet eller umettet C_6-syklus.

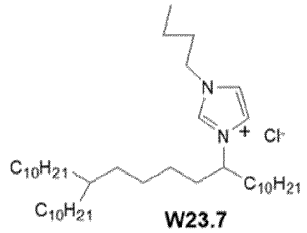
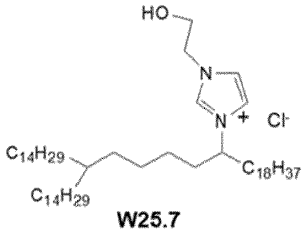
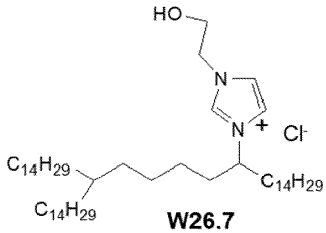
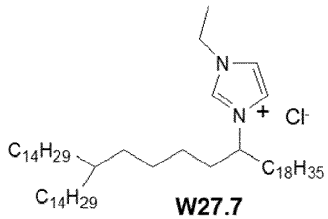
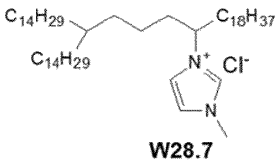
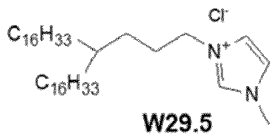
4. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori **n** representerer et heltall mellom 2 og 4 inklusive, og $\mathbf{R_1}$ representerer en C_1-, C_2- eller C_4-hydrokarbonkjede eller en C_2-hydroksylert kjede, fortrinnsvis er n = 4 og $\mathbf{R_1}$ representerer en C_1- eller en C_4-hydrokarbonkjede.

5. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori det kationiske lipidet av formel (I) er valgt fra gruppen som består av de følgende forbindelsene:

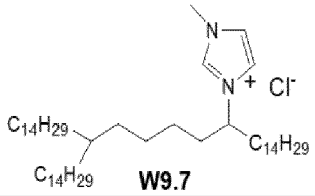
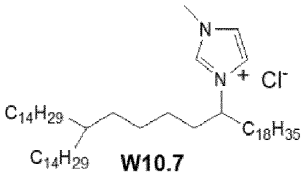
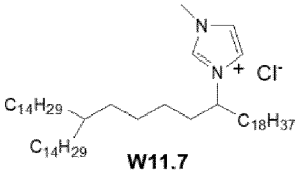
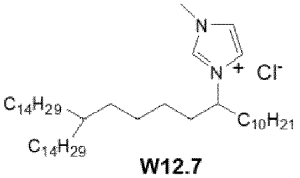
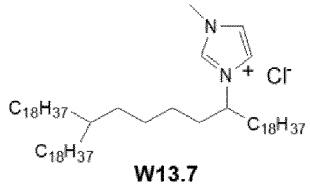
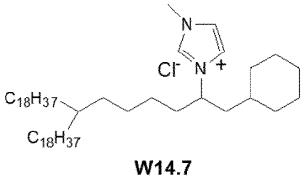
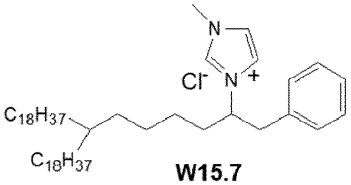
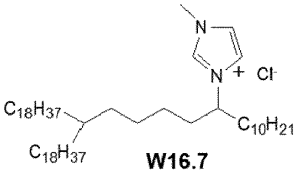
 **W1.4**	 **W2.5**
1-metyl-3-(heptatriakonta-9,28-dien-19-yl)-1-metyl-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(heptatriakonta-9,28-dien-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 **W3.5**	 **W4.3**
1-metyl-3-(heksatriakont-8-en-18-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(nonakosan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 **W5.3**	 **W6.3**
1-metyl-3-(tritriakontan-17-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(nonakosan-11-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

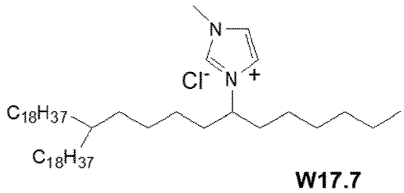
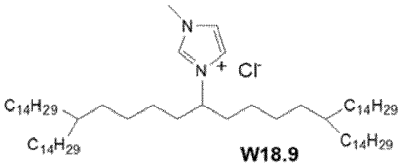
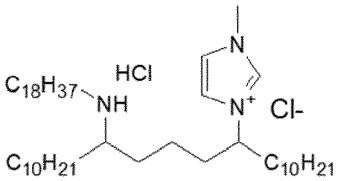
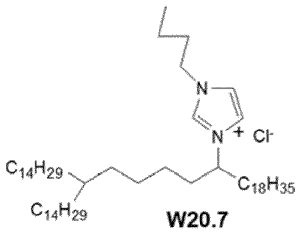
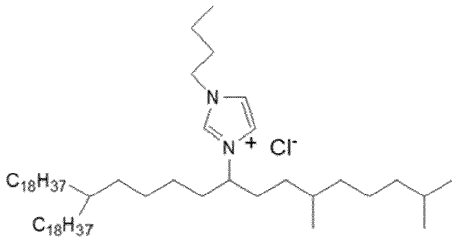
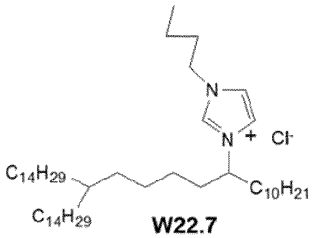
 W7.4	 W8.7
1-metyl-3-(2-heptadecylikosyl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(heksatriakonta-8,27-dien-18-yl)-1H-imidazol-3-ium
 W9.7	 W10.7
1-metyl-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W11.7	 W12.7
1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W13.7	 W14.7
1-metyl-3-(24-oktadecyldotetrakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(1-sykloheksyl-7-oktadecylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

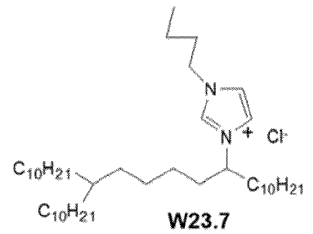
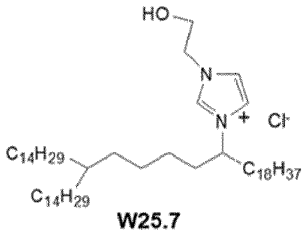
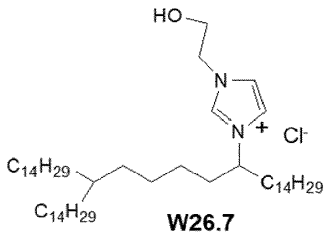
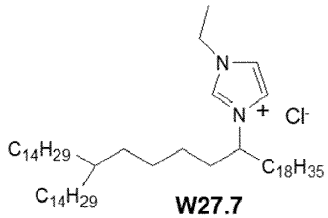
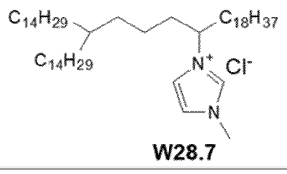
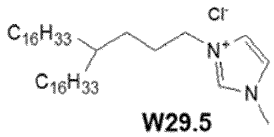
 W15.7	 W16.7
1-metyl-3-(7-oktadecyl-1-fenylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W17.7	 W18.9
1-metyl-3-(12-oktadecyltriakontan-7-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(15,25-ditetradecylnonatriakontan-20-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W19.7	 W20.7
1-metyl-3-(15-(oktadecylammonio)pentakosan-11-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W21.7	 W22.7

1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W23.7	 W25.7
1-butyl-3-(14-(3,7-dimetyloktyl)-2,6,17,21-tetrametyldokosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-(2-hydroksyetyl)-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W26.7	 W27.7
1-(2-hydroksyetyl)-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-etyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W28.7	 W29.5
1-metyl-3-(15-tetradecylheptatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(4-heksadecylikosyl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

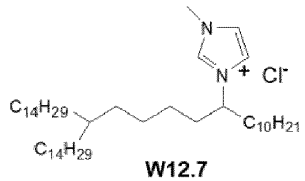
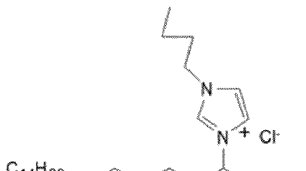
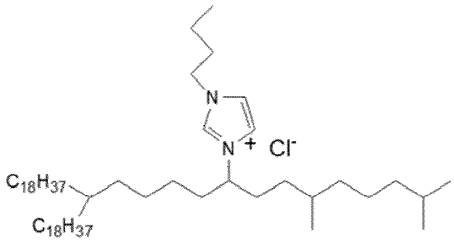
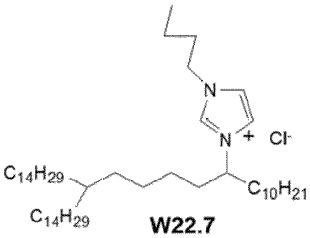
6. Sammensetningen ifølge krav 5, hvori det kationiske lipidet av formel (I) er valgt fra gruppen som består av de følgende forbindelsene:

 **W9.7**	 **W10.7**
1-metyl-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 **W11.7**	 **W12.7**
1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 **W13.7**	 **W14.7**
1-metyl-3-(24-oktadecyldotetrakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(1-sykloheksyl-7-oktadecylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 **W15.7**	 **W16.7**

1-metyl-3-(7-oktadecyl-1-fenylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W17.7	 W18.9
1-metyl-3-(12-oktadecyltriakontan-7-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(15,25-ditetradecylnonatriakontan-20-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W19.7	 W20.7
1-metyl-3-(15-(oktadecylammonio)pentakosan-11-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W21.7	 W22.7
1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

 W23.7	 W25.7
1-butyl-3-(14-(3,7-dimetyloktyl)-2,6,17,21-tetrametyldokosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-(2-hydroksyetyl)-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W26.7	 W27.7
1-(2-hydroksyetyl)-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-etyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W28.7	 W29.5
1-metyl-3-(15-tetradecylheptatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(4-heksadecylikosyl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

7. Sammensetningen ifølge krav 6, hvori det kationiske lipidet av formel (I) er valgt fra gruppen som består av de følgende forbindelsene:

 W12.7	 W20.7
1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W21.7	 W22.7
1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

8. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvori **A**$^-$ representerer Cl^- eller OH^-.

9. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvori molforholdet mellom det kationiske lipidet av formel (I) og det minst ene nøytrale lipidet varierer fra 1:1 til 1:2, fortrinnsvis er 1:1,5.

10. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvori 5'-enden av mRNA-et har kappe, fortrinnsvis har kappe av en 7-metylguanosinstruktur, en kappestrukturanalog slik som anti-revers-kappeanalog (ARCA), en kappe-0-struktur som inkluderer en 7-

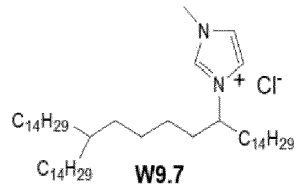
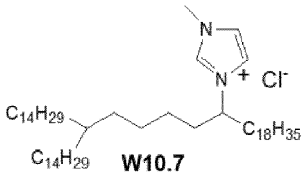
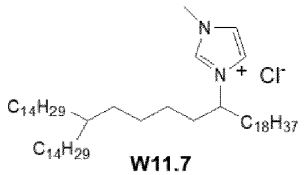
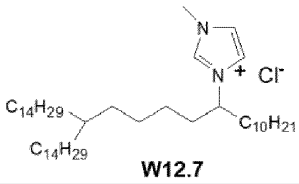
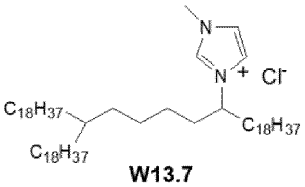
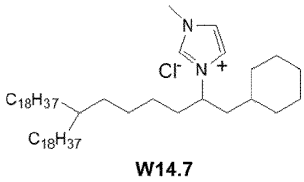
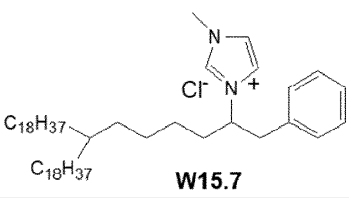
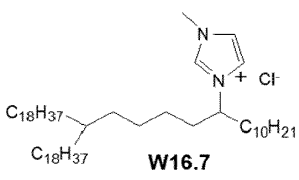
metylguanylatkappe, en kappe-1-struktur som inkluderer en 7-metylguanylatkappe og en metylert 2'-hydroksygruppe på det første ribosesukkeret, eller en kappe-2-struktur som inkluderer en 7-metylguanylatkappe (m^7G) og metylerte 2'-hydroksygrupper på de to første ribosesukkerne.

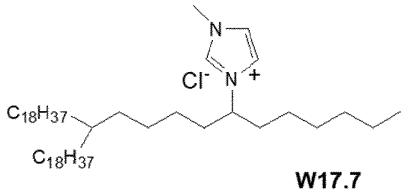
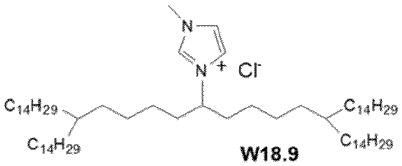
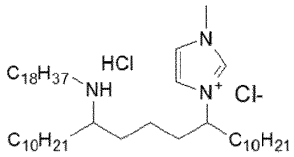
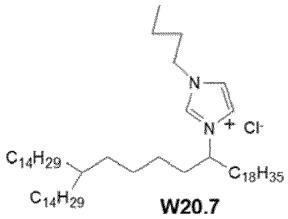
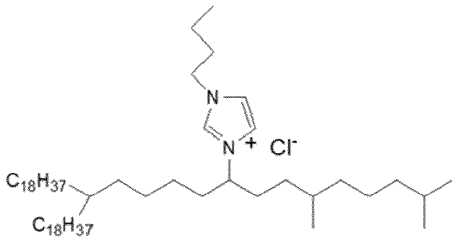
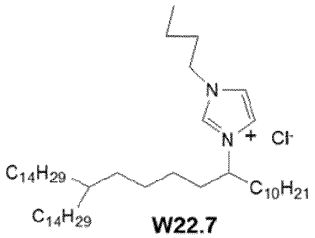
11. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvori mRNA, særlig er mRNA-et med kappe ytterligere 3'-ende-polyadenylert og/eller inneholder modifiserte nukleosider slik som 5-metoksyuridin, 2-tiouridin, 5-joduridin, 5-bromuridin, 5-metylcytidin, 5-jodocytidin, 5-bromocytidin, 2-tiocytidin, pseudo-uridin, N^6-metyladenosin eller N^1-metylguanosin.

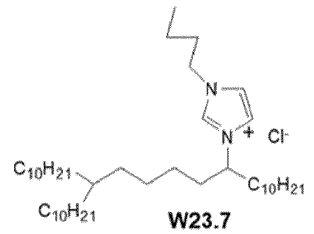
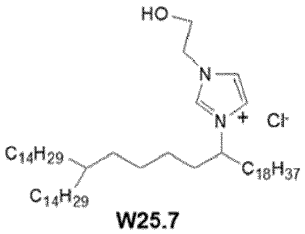
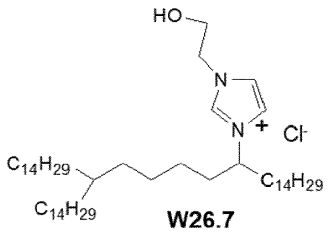
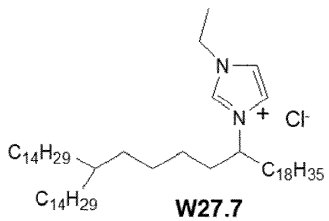
12. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvori mRNA-et koder for et protein, særlig et peptid eller et enzym, særlig en nuklease slik som en endonuklease eller en eksonuklease, og eventuelt er proteinet et terapeutisk protein, mer foretrukket et terapeutisk protein for å korrigere genetiske lidelser, et terapeutisk protein mot kreft slik som et cytokin, et anti-onkogen, et antistoff slik som et blokkerende antistoff, en anti-tumorsuppressor eller et toksin, et terapeutisk protein med antiviral aktivitet eller et terapeutisk protein for immunterapi.

13. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, videre omfattende en forbindelse valgt fra gruppen som består av (i) et distinkt mRNA for ko-transfeksjon, (ii) et kort ikke-kodende RNA slik som guide-RNA, særlig et CRISPR guide-RNA, et mikroRNA, et shRNA eller et siRNA, og (iii) et langt ikke-kodende RNA.

14. Blanding av forbindelser hvori forbindelsene omfatter minst ett nøytralt lipid og et kationisk lipid valgt fra gruppen som består av de følgende forbindelsene, hvori det minst ene nøytrale lipidet og det kationiske lipidet er egnet for anvendelse ved transfeksjon av et budbringer-RNA (mRNA) inn i en celle:

 W9.7	 W10.7
1-metyl-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W11.7	 W12.7
1-metyl-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W13.7	 W14.7
1-metyl-3-(24-oktadecyldotetrakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(1-sykloheksyl-7-oktadecylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W15.7	 W16.7

1-metyl-3-(7-oktadecyl-1-fenylpentakosan-2-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W17.7	 W18.9
1-metyl-3-(12-oktadecyltriakontan-7-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-metyl-3-(15,25-ditetradecylnonatriakontan-20-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W19.7	 W20.7
1-metyl-3-(15-(oktadecylammonio)pentakosan-11-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W21.7	 W22.7
1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-oktadecyldotriakontan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-butyl-3-(2,6-dimetyl-14-tetradecyloktakosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

 W23.7	 W25.7
1-butyl-3-(14-(3,7-dimetyloktyl)-2,6,17,21-tetrametyldokosan-9-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-(2-hydroksyetyl)-3-(24-tetradecyloktatriakontan-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid
 W26.7	 W27.7
1-(2-hydroksyetyl)-3-(20-tetradecyltetratriakontan-15-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid	1-etyl-3-(24-tetradecyloktatriakont-9-en-19-yl)-1H-imidazol-3-ium-klorid

15. Blandingen av forbindelser ifølge krav 14, hvori
(i) det minst ene nøytrale lipidet er valgt fra gruppen som består av fosfatidylserin (PS), fosfatidylkolin (PC), lipid-polyetylenglykol-(PEG)-konjugater, kolesterol, 1,2-dioleoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin (DOPE), 1,2-difenytanoyl-sn-glysero-3-fosfoetanolamin (DPyPE), palmitoyllinoleoylfosfatidyletanolamin (PaLiPE) og fosfatidyletanolamin (PE), fortrinnsvis er DOPE eller DPyPE, mer foretrukket er DPyPE, og/eller
(ii) molforholdet mellom det kationiske lipidet og det minst ene nøytrale lipidet varierer fra 1:1 til 1:2, er fortrinnsvis 1:1,5.

16. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, som omfatter minst to, minst tre eller minst fire nøytrale lipider valgt fra gruppen

som består av DPyPE, DOPE, kolesterol og lipid-PEG-konjugater.

17. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 for anvendelse som en terapeutisk eller profylaktisk vaksine mot virusinfeksjoner, eller en terapeutisk vaksine mot kreft.

18. Sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13, for anvendelse i *in vivo*-applikasjoner for mRNA-basert terapi.

19. Fremgangsmåte for *in vitro*-transfeksjon av levende celler omfattende å introdusere i cellene sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13.

20. Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 for *in vitro*-transfeksjon av et mRNA til en celle, fortrinnsvis en pattedyrcelle, en insektcelle, en cellelinje, en primærcelle, en adherent celle eller en suspensjonscelle.

21. Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 for *in vitro*- eller *ex vivo*-celleomprogrammering, for *in vitro*- eller *ex vivo*-differensiering av celler, for *in vitro*- eller *ex vivo*-genredigering eller genomengineering.

22. Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 13 i produksjonen *in vitro* eller *ex vivo* av biologiske midler som koder for et rekombinant protein eller antistoff, eller i produksjonen av rekombinant virus, sammensetningen videre omfattende et distinkt mRNA eller langt RNA.