

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 43335 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 15/113**
- (43) Date de publication : **29.01.2021**
-
- (21) N° Dépôt : **43335**
- (22) Date de Dépôt : **28.07.2016**
- (30) Données de Priorité : **31.07.2015 US 201562199563P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2016/044359 28.07.2016**
- (71) Demandeur(s) : **Alnylam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, 3rd Floor Cambridge, MA 02142 (US)**
- (72) Inventeur(s) : **ZIMMERMANN, Tracy ; MAIER, Martin ; JADHAV, Vasant ; RAJEEV, Kallanthottathil, G. ; CHAN, Amy**
- (74) Mandataire : **ATLAS INTELLECTUAL PROPERTY**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: EP16750567.6
-
- (54) Titre : **COMPOSITIONS D'ARNI DE TRANSTHYRÉTINE (TTR) ET PROCÉDÉS POUR LES UTILISER POUR LE TRAITEMENT OU LA PRÉVENTION DE MALADIES ASSOCIÉES À TTR**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne des agents ARNi, par exemple des agents ARNi double brin, qui ciblent le gène de la transthyrétine (TTR) et des procédés d'utilisation de tels agents ARNi pour traiter ou prévenir les maladies associées à la TTR.

Revendications

1. Agent de type acide ribonucléique (ARNi) bicaténaire pour inhiber une expression de transthyréline (TTR) dans une cellule, dans lequel ledit agent ARNi comprend un brin sens complémentaire à un brin antisens, dans lequel ledit brin antisens comprend une région complémentaire à SEQ ID NO : 2, dans lequel chaque brin a une longueur de 14 à 30 nucléotides, dans lequel sensiblement tous les nucléotides du brin sens et sensiblement tous les nucléotides du brin antisens sont des nucléotides modifiés, dans lequel le brin sens ne comprend pas plus de 8 modifications 2'-fluoro ; dans lequel le brin antisens ne comprend pas plus de 6 modifications 2'-fluoro ; dans lequel le brin sens et le brin antisens comprennent chacun indépendamment deux liaisons phosphorothioate à l'extrémité 5' ; et dans lequel le brin sens est conjugué à au moins un ligand.

2. Agent ARNi bicaténaire selon la revendication 1, dans lequel ledit agent ARNi bicaténaire est représenté par la formule (IIIe) :

sens : 5'-N_a-YYY-N_b-3'

antisens : 3'-n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-5'(IIIe)

dans laquelle :

n_p' est un surplomb de 2 nucléotides et chaque nucléotide dans n_p' est lié à un nucléotide voisin *via* une liaison phosphorothioate ;
chaque N_a, N_b, N_a' et N_b' représente indépendamment une séquence oligonucléotidique comprenant de 0 à 25 nucléotides qui sont modifiés ou non modifiés ou des combinaisons de ceux-ci, chaque séquence comprenant au moins deux nucléotides modifiés différemment ;
YYY et Y'Y'Y' représentent chacun indépendamment un motif de trois modifications identiques sur trois nucléotides consécutifs.

3. Agent ARNi bicaténaire selon la revendication 2, dans lequel :

I) le motif YYY apparaît au niveau ou à proximité du site de clivage du brin sens ;

II) le motif Y'Y'Y' apparaît aux positions 11, 12 et 13 du brin antisens à partir de l'extrémité 5' ;

III) les nucléotides Y contiennent une modification 2'-fluoro ;

IV) les nucléotides Y' contiennent une modification 2'-O-méthyle ;

V) la région bicaténaire a une longueur de 15 à 30, 17 à 23, 17 à 25, 23 à 27, 19 à 21, ou 21 à 23 paires de nucléotides ; ou

VI) chaque brin présente 15 à 30 ou 19 à 30 nucléotides.

4. Agent ARNi bicaténaire selon la revendication 1, dans lequel :

I) les modifications sur les nucléotides sont sélectionnées dans le groupe consistant en un désoxy-nucléotide, un nucléotide désoxy-thymine (dT) 3'-terminal, un nucléotide à modification 2'-O-méthyle, un nucléotide à modification 2'-fluoro, un nucléotide à modification 2'-désoxy, un nucléotide verrouillé, un nucléotide non verrouillé, un nucléotide à conformation

restreinte, un nucléotide à éthyle contraint, un nucléotide abasique, un nucléotide à modification 2'-amino, un nucléotide à modification 2'-O-allyle, un nucléotide à modification 2'-C-alkyle, un nucléotide à modification 2'-hydroxyle, un nucléotide à modification 2'-méthoxyéthyle, un nucléotide à modification 2'-O-alkyle, un nucléotide morpholino, un phosphoramidate, un nucléotide comprenant une base non naturelle, un nucléotide à modification tétrahydropyrane, un nucléotide à modification 1,5-anhydrohexitol, un nucléotide à modification cyclohexényle, un nucléotide comprenant un groupe phosphorothioate, un nucléotide comprenant un groupe méthylphosphonate, un nucléotide comprenant un 5'-phosphate, et un nucléotide comprenant un mimétique de 5'-phosphate, et des combinaisons de ceux-ci, facultativement dans lequel les modifications sur les nucléotides sont des modifications 2'-O-méthyle ou 2'-fluoro ;

II) le brin sens ne comprend pas plus de 6, 5, ou 4 modifications 2'-fluoro ;

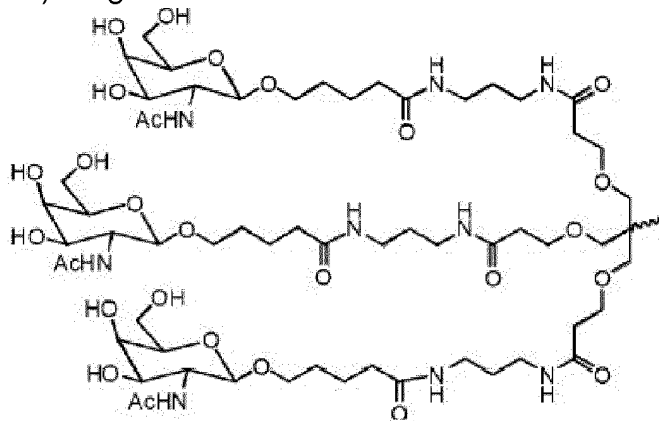
III) le brin antisens ne comprend pas plus de 5, 4, 3, ou 2 modifications 2'-fluoro ;

IV) l'agent ARNi bicaténaire comprend en outre un 5'-phosphate ou un mimétique de 5'-phosphate au niveau du nucléotide en 5' du brin antisens ;

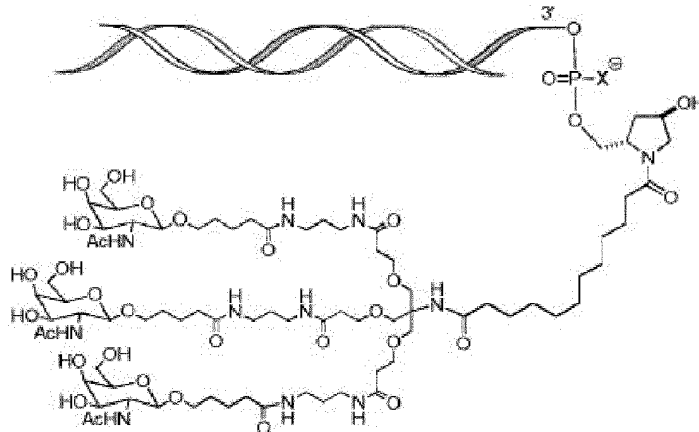
V) l'agent ARNi bicaténaire comprend en outre un mimétique de 5'-phosphate au niveau du nucléotide en 5' du brin antisens, facultativement dans lequel le mimétique de 5'-phosphate est un 5'-vinyl phosphate (5'-VP) ;

VI) le ligand est un ou plusieurs dérivés de GalNAc liés par l'intermédiaire d'un lieu ramifié bivalent ou trivalent ;

VII) le ligand est



VIII) le ligand est lié à l'extrémité 3' du brin sens, facultativement dans lequel l'agent ARNi est conjugué au ligand comme indiqué sur le schéma suivant



dans lequel X est O ou S ;

IX) les brins antisens comprennent une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe consistant en

5'-usCfsuugguuaeaugAfaaucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 6),

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7),

5'-UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 8), et

5'-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 9),

dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U, respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; s est une liaison phosphorothioate ; et VP est un mimétique de 5'-phosphate ;

X) les brins sens et antisens comprennent des séquences nucléotidiques sélectionnées dans le groupe consistant en

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-usCfsuugguuaacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO:6);

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO:10) et

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO:7);

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 8); et

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 9),

dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U, respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; et s est une liaison phosphorothioate ; et VP est un mimétique de 5'-phosphate ; ou

XI) ledit agent d'ARNi est sélectionné dans le groupe d'agents ARNi listés dans l'un quelconque des tableaux 1, 3, 5, 6, ou 7.

5. Agent ARNi bicaténaire selon la revendication 1, dans lequel les brins sens et antisens comprennent les séquences nucléotidiques

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

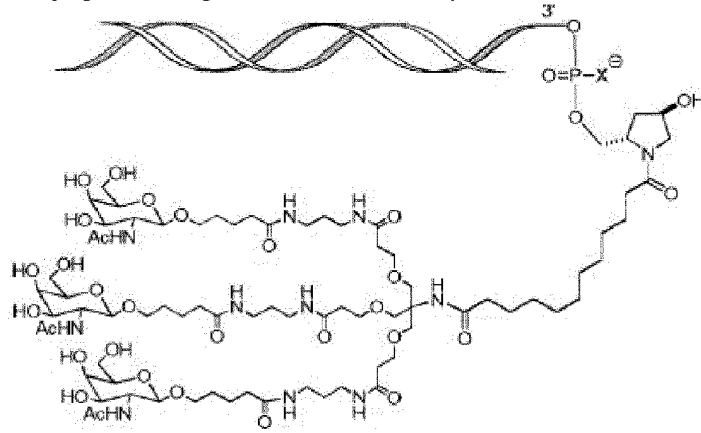
dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U, respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; et s est une liaison phosphorothioate.

6. Agent ARNi bicaténaire selon la revendication 5,

dans lequel les brins sens et antisens consistent en les séquences nucléotidiques

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),
 dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U,
 respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; et
 s est une liaison phosphorothioate
 dans lequel le ligand est lié à l'extrémité 3' du brin sens, dans lequel l'agent ARNi est
 conjugué au ligand comme indiqué sur le schéma suivant



dans lequel X est O.

7. Cellule contenant l'agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Composition pharmaceutique comprenant l'agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, facultativement dans laquelle :

- I) l'agent ARNi bicaténaire est administré dans une solution non tamponnée, facultativement dans laquelle ladite solution non tamponnée est une solution saline ou de l'eau ; ou
- II) ledit agent ARNi bicaténaire est administré avec une solution tampon, dans laquelle facultativement a) ladite solution tampon comprend de l'acétate, du citrate, de la prolamine, du carbonate, ou du phosphate ou n'importe quelle combinaison de ceux-ci, ou b) ladite solution tampon est une solution saline tamponnée au phosphate (PBS).

9. Procédé *in vitro* d'inhibition d'une expression de transthyréline (TTR) dans une cellule, le procédé comprenant :

une mise en contact de la cellule avec l'agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ou de la composition pharmaceutique selon la revendication 8, pour ainsi inhiber une expression du gène TTR dans la cellule, dans lequel facultativement l'expression de TTR est inhibée d'au moins environ 10%, environ 15%, environ 20%, environ 25 %, environ 30 %, environ 40 %, environ 50%, environ 60 %, environ 70 %, environ 80 %, environ 90 %, environ 95 %, environ 98 % ou environ 100%.

10. Agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ou composition selon la revendication 8 pour une utilisation dans un procédé de traitement d'un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une quantité thérapeutiquement efficace ou d'une quantité prophylactiquement

efficace de l'agent ARNi bicaténaire, ou de la composition pharmaceutique, pour ainsi traiter ledit sujet.

11. Agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou composition selon la revendication 8 pour une utilisation dans :

- I) un procédé de réduction, de ralentissement, ou d'arrêt d'un score de déficience neuropathique (NIS) ou d'un NIS modifié (mNIS+7) chez un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une quantité thérapeutiquement efficace ou d'une quantité prophylactiquement efficace de l'agent ARNi bicaténaire, ou de la composition pharmaceutique, pour ainsi réduire, ralentir, ou arrêter un score de déficience neuropathique (NIS) ou un NIS modifié (mNIS+7) chez ledit sujet ; ou
- II) un procédé d'augmentation d'un test de marche de 6 minutes (6MWT) chez un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une quantité thérapeutiquement efficace ou d'une quantité prophylactiquement efficace de l'agent ARNi bicaténaire, ou de la composition pharmaceutique, pour ainsi augmenter un test de marche de 6 minutes (6MWT) chez ledit sujet.

12. Agent ARNi bicaténaire ou composition pour une utilisation selon les revendications 10 ou 11, dans lequel :

- I) le sujet est un humain ;
- II) ledit sujet est un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ;
- III) ledit sujet est un sujet à risque de développer une maladie associée à TTR ;
- IV) ledit sujet porte une mutation du gène de TTR qui est associée au développement d'une maladie associée à TTR ;
- V) ladite maladie associée à TTR est sélectionnée dans le groupe consistant en l'amyloïdose systémique sénile (SSA), l'amyloïdose familiale systémique, la polyneuropathie amyloïdotique familiale (FAP), la cardiomyopathie amyloïdotique familiale (FAC), l'amyloïdose leptoméningée/du système nerveux central (SNC), et l'hyperthyroïdisme ;
- VI) ledit sujet présente une amyloïdose associée à TTR et ledit procédé réduit un dépôt de TTR amyloïde chez ledit sujet ;
- VII) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par un moyen d'administration sélectionné dans le groupe consistant en une administration sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intrabronchique, intrapleurale, intrapéritonéale, intra-artérielle, lymphatique, cérébrospinale, et n'importe quelle combinaison de celles-ci ;
- VIII) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par administration sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse ;
- IX) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par administration sous-cutanée, facultativement dans lequel l'administration sous-cutanée est une auto-administration, facultativement dans lequel l'auto-administration se fait par une seringue préremplie ou une seringue d'auto-injecteur, facultativement l'agent ARNi bicaténaire est administré de manière chronique

au sujet toutes les 4 semaines, toutes les 5 semaines, ou toutes les six semaines ; ou

X) le procédé comprend en outre une évaluation du niveau d'expression d'ARNm de TTR ou d'expression de protéine de TTR dans un échantillon dérivé du sujet.

13. Agent ARNi bicaténaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour une utilisation dans :

I) un procédé de traitement d'un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une dose fixe d'environ 50 mg à environ 250 mg d'un agent de type acide ribonucléique bicaténaire (ARNi) ;

II) un procédé de réduction, de ralentissement, ou d'arrêt d'un score de déficience neuropathique (NIS) ou d'un NIS modifié (mNIS+7) chez un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une dose fixe d'environ 50 mg à environ 250 mg d'un agent de type acide ribonucléique bicaténaire (ARNi) ; ou

III) un procédé d'augmentation d'un test de marche de 6 minutes (6MWT) chez un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou à risque de développer une maladie associée à TTR, comprenant une administration au sujet d'une dose fixe d'environ 50 mg à environ 250 mg d'un agent de type acide ribonucléique bicaténaire (ARNi).

14. Agent ARNi bicaténaire pour une utilisation selon la revendication 13, dans lequel :

I) l'agent ARNi bicaténaire est administré au sujet à une dose fixe d'environ 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, ou 250 mg ;

II) la dose fixe de l'agent ARNi bicaténaire est administrée au sujet une fois environ toutes les 4 semaines, toutes les 5 semaines, toutes les 6 semaines, toutes les 8 semaines ou tous les trimestres ;

III) la dose fixe de l'agent ARNi bicaténaire est administrée au sujet une fois environ tous les trimestres ;

IV) l'agent ARNi bicaténaire est administré de manière chronique au sujet ;

V) le sujet est un humain, facultativement dans lequel ledit sujet est un sujet souffrant d'une maladie associée à TTR ou ledit sujet est un sujet à risque de développer une maladie associée à TTR ;

VI) ledit sujet porte une mutation du gène de TTR qui est associée au développement d'une maladie associée à TTR dans lequel ladite maladie associée à TTR est sélectionnée dans le groupe consistant en l'amyloïdose systémique sénile (SSA), l'amyloïdose familiale systémique, la polyneuropathie amyloïdotique familiale (FAP), la cardiomyopathie amyloïdotique familiale (FAC), l'amyloïdose leptoméningée/du système nerveux central (SNC), et l'hyperthyroïdisme ;

VII) ledit sujet présente une amyloïdose associée à TTR et ledit procédé réduit un dépôt de TTR amyloïde chez ledit sujet ;

VIII) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par a) un moyen d'administration sélectionné dans le groupe consistant en une administration sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intrabronchique, intrapleurale, intrapéritonéale, intra-artérielle, lymphatique, cérébrospinale, et n'importe quelle combinaison de celles-ci, b) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par administration sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse, ou c) ledit agent ARNi bicaténaire est administré audit sujet par administration sous-cutanée, dans lequel facultativement l'administration sous-cutanée est une auto-administration, dans lequel facultativement l'auto-administration se fait par une seringue préremplie ou une seringue d'auto-injecteur ; ou IX) le procédé comprend en outre une évaluation du niveau d'expression d'ARNm de TTR ou d'expression de protéine de TTR dans un échantillon dérivé du sujet.

15. Agent ARNi bicaténaire pour une utilisation selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, dans lequel les brins sens et antisens de l'agent comprennent les séquences nucléotidiques

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U, respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; et s est une liaison phosphorothioate.

16. Agent ARNi bicaténaire pour une utilisation selon la revendication 15, dans lequel les brins sens et antisens consistent en les séquences nucléotidiques

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) et

5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

dans lesquelles a, c, g, et u sont des 2'-O-méthyl (2'-OMe) A, C, G, et U, respectivement ; Af, Cf, Gf, et Uf sont des 2'-fluoro A, C, G, et U, respectivement ; et s est une liaison phosphorothioate

dans lequel le ligand est lié à l'extrémité 3' du brin sens, dans lequel l'agent ARNi est conjugué au ligand comme indiqué sur le schéma suivant