



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3052628 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2020.07.20
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2020.02.26
(86)	European Application Nr.	14800179.5
(86)	European Filing Date	2014.10.03
(87)	The European Application's Publication Date	2016.08.10
(30)	Priority	2013.10.04, US, 201361887288 P 2014.04.24, US, 201461983720 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
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	Alnylam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, NY 10029, USA
(72)	Inventor	BETTENCOURT, Brian, 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA FITZGERALD, Kevin, 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA QUERBES, William, 300 Third Street, Cambridge, MA 02142, USA DESNICK, Robert, J., 170 East 93rd Street, New York, NY 10128, USA YASUDA, Makiko, 100 Overlook TerraceApartment 612, New York, NY 10040, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54) Title **COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF THE ALAS1 GENE**

(56) References
Cited: EP-A2- 2 213 738
WO-A2-2013/155204
Leda m. Oliveri ET AL: "ALAS1 gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1 by vanadate in diabetic mice", Biochemical Journal, vol. 442, no. 2, 1 March 2012 (2012-03-01) , pages 303-310, XP055422907, GB ISSN: 0264-6021, DOI: 10.1042/BJ20111005
"ALAS1 Pre-design Chimera RNAi", INTERNET CITATION, 22 January 2010 (2010-01-22),

pages 1-2, XP002701598, Retrieved from the Internet:

URL:[http://www.abnova.com/PDFServer/output s/H00000211-R02.pdf](http://www.abnova.com/PDFServer/output%20s/H00000211-R02.pdf) [retrieved on 2013-07-11]

L. YIN ET AL: "Rev-erb , a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways", SCIENCE, vol. 318, no. 5857, 14 December 2007 (2007-12-14), pages 1786-1789, XP055071004, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1150179

M. BALWANI ET AL: "The porphyrias: advances in diagnosis and treatment", BLOOD, vol. 120, no. 23, 29 November 2012 (2012-11-29), pages 4496-4504, XP055093645, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-05-423186

HOMEDAN CHADI ET AL: "Acute intermittent porphyria causes hepatic mitochondrial energetic failure in a mouse model", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, vol. 51, 13 April 2014 (2014-04-13), pages 93-101, XP029026620, ISSN: 1357-2725, DOI: 10.1016/J.BIOCEL.2014.03.032

NARESH KUMAR ET AL: "Regulation of Adipogenesis by Natural and Synthetic REV-ERB Ligands", ENDOCRINOLOGY, vol. 151, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 3015-3025, XP055100265, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/en.2009-0800

AMY CHAN ET AL: "Preclinical Development of a Subcutaneous ALAS1 RNAi Therapeutic for Treatment of Hepatic Porphyrins Using Circulating RNA Quantification", MOLECULAR THERAPY - NUCLEIC ACIDS, vol. 4, 1 January 2015 (2015-01-01), page e263, XP055422923, GB ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2015.36

YAO X ET AL: "Heme controls the regulation of protein tyrosine kinases Jak2 and Src", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 403, no. 1, 3 December 2010 (2010-12-03), pages 30-35, XP027536757, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2010.10.101 [retrieved on 2010-10-29]

M. YASUDA ET AL: "RNAi-mediated silencing of hepatic Alas1 effectively prevents and treats the induced acute attacks in acute intermittent porphyria mice", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 21, 12 May 2014 (2014-05-12) , pages 7777-7782, XP055165224, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1406228111

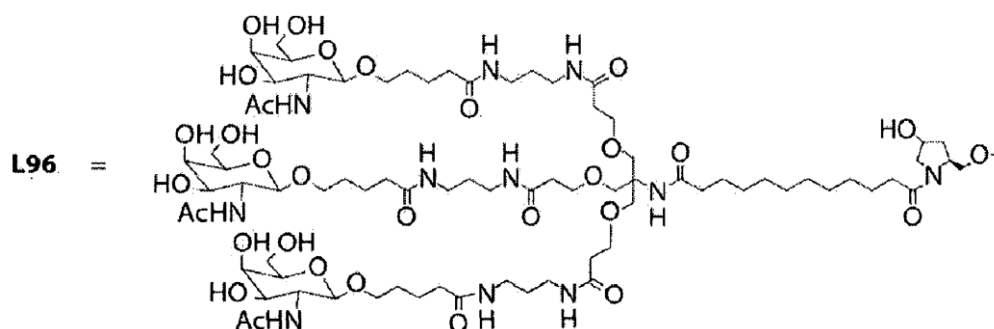
J. L. ESTALL ET AL: "PGC-1 negatively regulates hepatic FGF21 expression by modulating the heme/Rev-Erb axis", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 52, 29 December 2009 (2009-12-29), pages 22510-22515, XP055071011, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0912533106

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. Dobbeltstrenget ribonukleinsyre (dsRNA) for å hemme ekspresjon av ALAS1, hvori dsRNA-et omfatter en sense-streng og en antisense-streng, hvor antisense-strengen er omfattende en region med komplementaritet til et ALAS1 RNA-transkript (f.eks. SEQ ID NO:1), idet antisense-strengen omfatter usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161), hvori c, a, g, u = 2'-OMe-ribonukleosider; Af, Cf, Gf, Uf = 2'-F-ribonukleosider; s = fosfortioat, eller en sekvens som ikke avviker med mer enn 1, 2 eller 3 nukleotider derav.

2. dsRNA-et ifølge krav 1, som videre omfatter en sense-streng omfattende csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96 (SEQ ID NO: 4160), hvori



3. dsRNA-et ifølge krav 1 eller 2, hvori dsRNA-et har én eller flere av følgende:

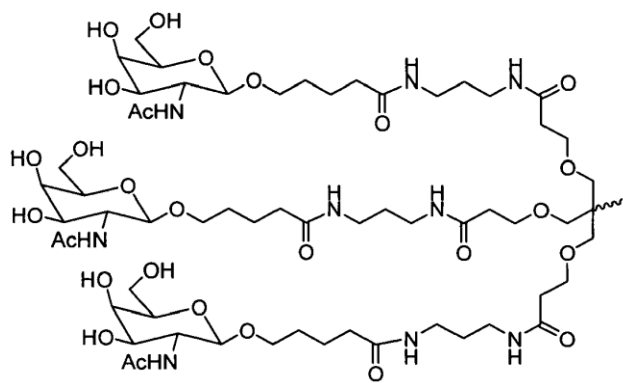
- (a) omfatter en dupleksregion som er 17–23 nukleotidpar i lengde;
- (b) minst én streng omfatter et 3'-overheng på minst 2 nukleotider; eller
- (c) hver streng er ikke lengre enn 26 nukleotider i lengde.

4. dsRNA-et ifølge krav 3, hvori dupleksregionen er 21–23 nukleotidpar eller 21 nukleotidpar i lengde.

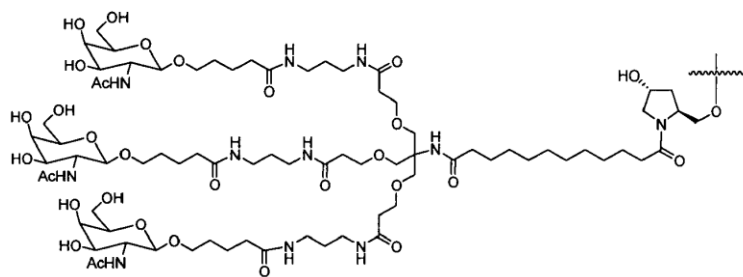
5. dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, videre omfattende en ligand.

6. dsRNA-et ifølge krav 5, hvori liganden har én eller flere av følgende:

- (a) er konjugert til 3'-enden av sense-strengen til dsRNA-et;
- (b) omfatter et karbohydrat, eventuelt hvori liganden er en GalNAc-ligand, eventuelt hvori liganden er:



(c) er festet via et bivalent eller trivalent forgrenet bindeledd, eventuelt hvori liganden og bindeleddet er som vist i formel XXIV:



5 eller

(d) retter seg mot dsRNA-et til hepatocytter.

7. dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori antisense-strengen omfatter eller består av usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161), og/eller sense-strengen omfatter eller består av csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96 (SEQ ID NO: 4160).

8. dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori dsRNA-et har ett, to eller alt av følgende:

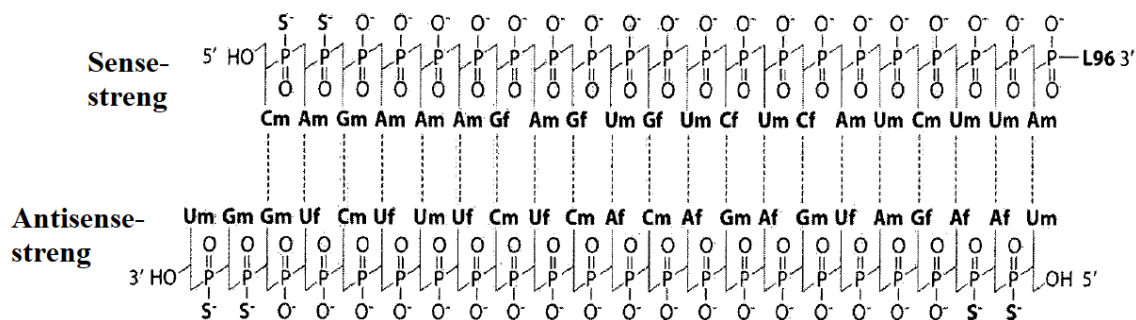
15 (i) er kjemisk syntetisert;

(ii) har et 3'-overheng; eller

(iii) omfatter, eller består av, en sense-streng som har csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuaL96 (SEQ ID NO: 4160) og en antisense-streng som har usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161).

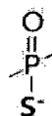
20

9. dsRNA-et ifølge krav 1, hvori dsRNA-et er i form av et konjugat som har strukturen:



, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

hvor Af, Cf, Gf, Uf = 2'-F-ribonukleosider; Am, Cm, Gm, Um = 2'-OMe-ribonukleosider;

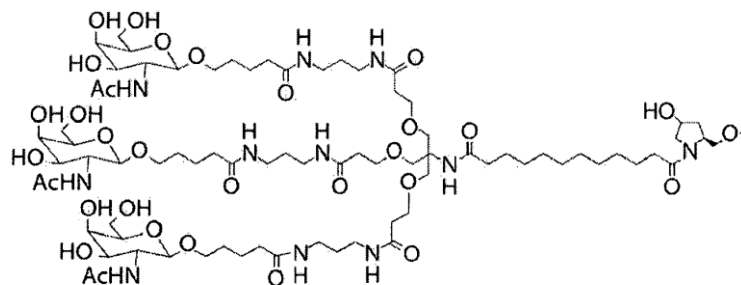


5 = fosfortioat;



= fosfodiester, og hvori

L96 =



10

10. Celle omfattende dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9.

11. Farmasøytisk sammensetning omfattende dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eventuelt hvori sammensetningen omfatter vann for injeksjon, eventuelt hvori sammensetningen er egnet for subkutan administrering.

12. dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11, for anvendelse i en fremgangsmåte for å hemme ALAS1-ekspressjon i en celle, fremgangsmåten omfattende:

(a) å innføre i cellen dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, eller den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 11, og

(b) å opprettholde cellen fra trinn (a) i en tid som er tilstrekkelig til å oppnå nedbrytning av mRNA-transkriptet av et ALAS1-gen, og derved hemme ekspressjon av ALAS1-genet i

cellen, eventuelt hvori ekspresjonen av ALAS1 hemmes i cellen med minst 20 % eller minst 30 %, eventuelt hvori ekspresjonen av ALAS1 hemmes i cellen med minst 80 % målt ved forgrenet DNA-analyse (bDNA-analyse).

5 **13.** dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11, for anvendelse i en fremgangsmåte for å redusere et nivå av et porfyrin eller en porfyrinforløper (f.eks. ALA eller PBG) i en celle (f.eks. en hepatocyt), omfattende å bringe cellen i kontakt med dsRNA-et ifølge et hvilket som
10 helst av kravene 1 til 9, eller med den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 11, i en mengde som er effektiv for å redusere nivået av porfyrinet eller porfyrinforløperen i cellen.

14. dsRNA-et ifølge et hvilket som helst av kravene 1–9, eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 11, for anvendelse i behandling av en porfyri hos et individ,
15 eventuelt hvori porfyrien er en leverporfyri eller en akutt intermitterende porfyri (AIP), eventuelt hvori porfyrien er en akutt leverporfyri.

15. dsRNA-et ifølge krav 7 for anvendelse i behandling av en akutt leverporfyri.

20 **16.** dsRNA-et, eller farmasøytisk sammensetning, for anvendelse ifølge krav 14 eller 15, hvori anvendelsen har én eller flere av følgende:

(a) individet er i fare for å utvikle, eller er diagnostisert med, en porfyri;

(b) porfyrien er akutt intermitterende porfyri eller ALA-dehydratasemangel porfyri;

(c) (i) dsRNA-et eller sammensetningen administreres etter et akutt angrep av porfyri,
25 (ii) dsRNA-et eller sammensetningen administreres under et akutt angrep av porfyri, eller
 (iii) dsRNA-et eller sammensetningen administreres profylaktisk for å forhindre et akutt angrep av porfyri;

(d) dsRNA-et administreres i en dose på 0,05 til 50 mg/kg kroppsvekt av individet, f.eks. i en dose på 0,01 mg/kg til 5 mg/kg kroppsvekt av individet;

30 (e) fremgangsmåten (i) reduserer et nivå av et porfyrin eller en porfyrinforløper (f.eks. δ-aminolevulinsyre (ALA) eller porfopilinogen (PBG)) hos individet, eventuelt hvori nivået reduseres med minst 30 %, og/eller (ii) hemmer ALAS1-ekspresjon i individet;

(f) fremgangsmåten (i) lindrer et symptom assosiert med en ALAS1-relatert lidelse (f.eks. en porfyri), (ii) reduserer hyppigheten av akutte angrep av symptomer assosiert
35 med en porfyri hos individet, og/eller (iii) reduserer forekomsten av akutte angrep av symptomer assosiert med en porfyri hos individet når individet eksponeres for en utfellende faktor;

- (g) dsRNA-et eller sammensetningen omfattende dsRNA-et administreres i henhold til et doseringsregime, f.eks. ukentlig, annenhver uke eller månedlig;
- (h) dsRNA-et administreres før et akutt angrep av porfyri, f.eks. under et prodrom;
- (i) individet har et forhøyet nivå (f.eks. plasma- eller urinnivå) av ALA og/eller PBG, og
5 eventuelt hvori individet lider av kroniske smerter;
- (j) fremgangsmåten reduserer det forhøyede nivået av ALA og/eller PBG;
- (k) fremgangsmåten reduserer eller forhindrer smerter, nevropati og/eller nerveskader;
- (l) fremgangsmåten forhindrer akutte angrep av porfyri; eller
- (m) dsRNA-et eller sammensetningen omfattende dsRNA-et administreres gjentatte
10 ganger.