(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112118847 B
(45)授权公告日 2024.05.28

(21)申请号 201980028790.5

(22)申请日 2019.03.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112118847 A

(43)申请公布日 2020.12.22

(30)优先权数据
62/637,879 2018.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/020404 2019.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/169332 EN 2019.09.06

(73)专利权人 伊莱西奥治疗有限公司
地址 美国马塞诸塞州

(72)发明人 彼得·C·德穆斯
朱利安·亚当斯
马丁·斯泰因巴克

(74)专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658
专利代理师 王怡瑾 周婧

(51)Int.Cl.
A61K 31/70(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/7115(2006.01)

(56)对比文件
CN 104685055 A,2015.06.03
WO 2017127473 A1,2017.07.27
CN 1902311 A,2007.01.24
CN 101265285 A,2008.09.17
魏萍.《临床医技新编》.云南科技出版社,2016,第218页.
Y Shono et al..Specific T-cell immunity against Ki-ras peptides in patients with pancreatic and colorectal cancers.《Br J Cancer》.2003,第88卷(第4期),第530-536页.
S. Cogoi et al..Lipid-modified G4-decoy oligonucleotide anchored to nanoparticles: delivery and bioactivity in pancreatic cancer cells.《Scientific Reports》.2016,第6卷第1-13页.
徐安.癌基因Kras在非酒精性脂肪性肝病及其向肝癌转化中的作用与机制研究.《中国博士学位论文全文数据库》.2017,第1-92页. (续)

审查员 姜凯

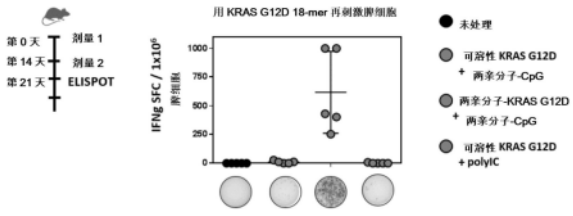
权利要求书4页 说明书21页
序列表8页 附图7页

(54)发明名称

包含突变KRAS序列和脂质的化合物及其用途

(57)摘要

本发明的特征在于包括突变KRAS序列和脂质的化合物,其中该突变KRAS序列通过接头与脂质缀合,并且(i)该接头包括一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)该脂质为1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),和(iii)该突变KRAS序列包含选自由SEQ ID NO:1-7和22-30组成的组的氨基酸序列或由其组成。本发明的特征在于一种组合物,其包括一种或多种本发明的化合物和药学上可接受的载体。本发明的特征还在于治疗人类患者的癌症的方法,该方法包括向患者用该组合物给药。此外,本发明的特征在于包含该化合物的试剂盒。



CN 112118847 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Jia Lu et al..Structural dataset for the fast-exchanging KRAS G13D.《Data in Brief》.2015,第5卷第572-578页.

Chunsong Yu et al..Immunostimulatory Properties of Lipid Modified CpG Oligonucleotides.《Molecular pharmaceutics》.2017,第14卷(第8期),第2815-2823页.

Jing Pan et al..Immunoprevention of KRAS-driven lung adenocarcinoma by a multipeptide vaccine.《Oncotarget》.2017,第8卷(第47期),第82689-82699页.

1.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物,其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合,并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE,以及(iii)所述突变KRAS序列由选自由以下的氨基酸序列组成的组:

CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1),

CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2),

CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3),

CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4),

CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5),

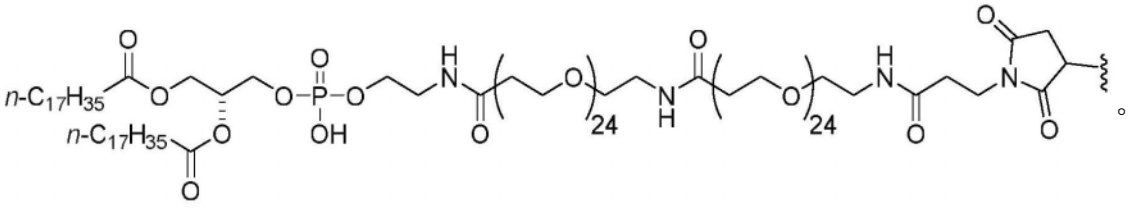
CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7),及YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)。

2.根据权利要求1所述的化合物,其中SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7的所述突变KRAS序列在其N-末端通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

3.根据权利要求1所述的化合物,其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

4.根据权利要求1所述的化合物,其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

5.根据权利要求1所述的化合物,其中所述突变KRAS序列在其N-末端与以下结构缀合:



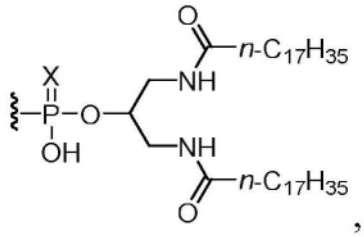
。

6.一种组合物,其包含一种或多种根据权利要求1所述的化合物和药学上可接受的载体。

7.根据权利要求6所述的组合物,其中所述化合物包含氨基酸序列YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)。

8.根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物包含:(1)包含氨基酸序列CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)的化合物,(2)包含氨基酸序列CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)的化合物,(3)包含氨基酸序列CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)的化合物,(4)包含氨基酸序列CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4)的化合物,(5)包含氨基酸序列CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5)的化合物,以及(6)包含氨基酸序列CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)的化合物。

9.根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物还包含由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物,所述核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质:



,

或其盐，

其中X是O或S。

10.根据权利要求6所述的组合物，其中所述组合物包含700μg的每种化合物。

11.根据权利要求9所述的组合物，其中所述核苷酸序列与脂质键合。

12.一种权利要求6的组合物在制备用于在人类患者中治疗癌症的药物中的用途，其中所述癌症是胰腺癌、肺癌或结肠直肠癌。

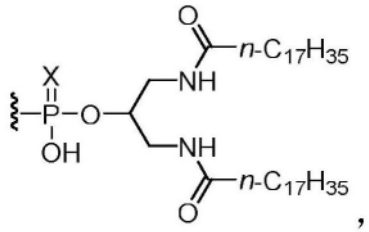
13.根据权利要求12所述的用途，其中所述组合物还包含佐剂。

14.根据权利要求13所述的用途，其中所述佐剂包含CpG核苷酸序列。

15.根据权利要求14所述的用途，其中所述CpG核苷酸序列包含5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)。

16.根据权利要求13所述的用途，其中用0.1mg、0.5mg或2.5mg的佐剂给药。

17.根据权利要求12所述的用途，其中所述组合物还包含由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物，所述核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质：



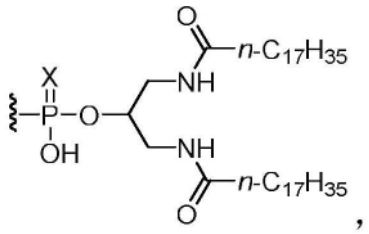
，

或其盐，

其中X是O或S。

18.根据权利要求17所述的用途，其中所述核苷酸序列与所述脂质键合。

19.根据权利要求17所述的用途，其中所述组合物包含0.1mg、0.5mg或2.5mg的由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物，所述核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质：



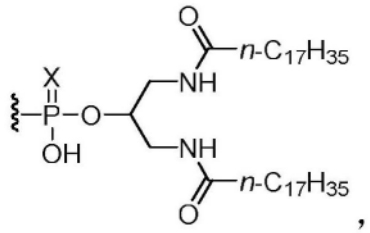
，

或其盐，

其中X是O或S。

20.根据权利要求15，17或19任一所述的用途，其中连结5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)中的核苷的所有核苷间基团均为硫代磷酸酯。

21.一种试剂盒，其包含(i)权利要求1的化合物，和(ii)由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物，所述核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质：



或其盐，

其中X是O或S。

22.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物，其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合，并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段，(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE，以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)组成，其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

23.根据权利要求22所述的化合物，其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

24.根据权利要求22所述的化合物，其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

25.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物，其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合，并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段，(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE，以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)组成，其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

26.根据权利要求25所述的化合物，其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

27.根据权利要求25所述的化合物，其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

28.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物，其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合，并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段，(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE，以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)组成，其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

29.根据权利要求28所述的化合物，其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

30.根据权利要求28所述的化合物，其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

31.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物，其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合，并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段，(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE，以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4)组成，其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

32.根据权利要求31所述的化合物，其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

33.根据权利要求31所述的化合物，其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

34.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物，其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合，并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段，(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE，以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5)组成，其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰

亚胺键与所述接头缀合。

35.根据权利要求34所述的化合物,其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

36.根据权利要求34所述的化合物,其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

37.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物,其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合,并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE,以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)组成,其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

38.根据权利要求37所述的化合物,其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

39.根据权利要求37所述的化合物,其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

40.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物,其中所述突变KRAS序列通过接头与所述脂质缀合,并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺DSPE,以及(iii)所述突变KRAS序列由氨基酸序列YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)组成,其中所述突变KRAS序列通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

41.根据权利要求40所述的化合物,其中所述接头包含2至50个重复单元的聚乙二醇。

42.根据权利要求40所述的化合物,其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

包含突变KRAS序列和脂质的化合物及其用途

背景技术

[0001] RAS蛋白是细胞信号通路的重要组成部分。在多种类型的癌症(包括胰腺癌)中经常检测到通过突变引起的RAS蛋白致癌激活。仍然需要进一步和更有效的癌症治疗。

发明内容

[0002] 本发明提供了可用于治疗方法的化合物。

[0003] 因此,在第一方面,本发明的特征在于一种化合物,其包括突变KRAS序列和脂质,其中所述突变KRAS序列通过接头与脂质缀合,并且(i)所述接头包括一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),并且(iii)所述突变KRAS序列包含或由选自由以下的氨基酸序列组成的组:

[0004] YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23),

[0005] YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:24),

[0006] YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:25),

[0007] YKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:26),

[0008] YKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:27),

[0009] YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28),

[0010] YKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:29),及

[0011] YKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:30)。

[0012] 在第二方面,本发明的特征在于一种化合物,其包括突变KRAS序列和脂质,其中所述突变KRAS序列通过接头与脂质缀合,并且(i)所述接头包括一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),并且(iii)所述突变KRAS序列包含或由选自由以下的氨基酸序列组成的组:

[0013] CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1),

[0014] CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2),

[0015] CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3),

[0016] CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4),

[0017] CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5),

[0018] CYKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:6),

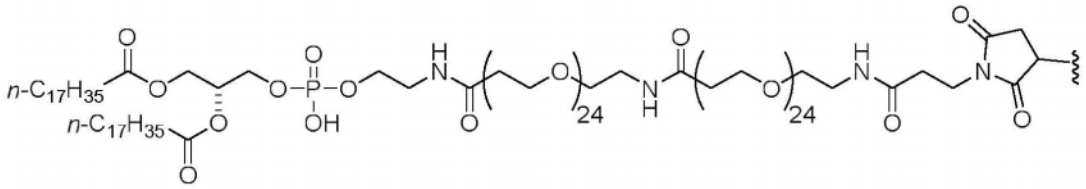
[0019] CYKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:22),及

[0020] CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)。

[0021] 在本发明的第一和第二方面的一个实施方案中,突变KRAS序列在其N-末端通过半胱氨酸-马来酰亚胺键缀合至接头。

[0022] 在本发明的第一和第二方面的另一个实施方案中,接头包括48个重复单元的聚乙二醇。

[0023] 在本发明的第一和第二方面的另一个实施方案中,突变KRAS序列在其N-末端缀合至以下结构:

[0024] 

[0025] 在第三方面,本发明的特征在于一种组合物,其包括一种或多种本发明的第一和第二方面的化合物以及药学上可接受的载体。

[0026] 在本发明的第三方面的一个实施方案中,所述组合物包括:(1)包括氨基酸序列YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23)的化合物,(2)包括氨基酸序列YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:24)的化合物,(3)包括氨基酸序列YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:25)的化合物,(4)包括氨基酸序列YKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:26)的化合物,(5)包括氨基酸序列YKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:27)的化合物,(6)包括氨基酸序列YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)的化合物或包括氨基酸序列YKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:29)的化合物,以及(7)包括氨基酸序列YKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:30)的化合物。

[0027] 在本发明第三方面的一个实施方案中,所述组合物包括:(1)包括氨基酸序列YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23)的化合物,(2)包括氨基酸序列YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:24)的化合物,(3)包括氨基酸序列YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:25)的化合物,(4)包括氨基酸序列YKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:26)的化合物,(5)包括氨基酸序列YKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:27)的化合物,(6)包括氨基酸序列YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)的化合物,以及(7)包括氨基酸序列YKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:30)的化合物。

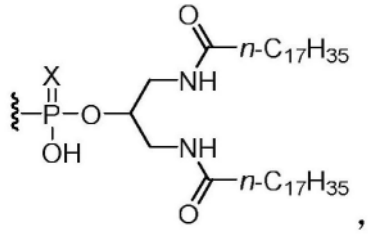
[0028] 在本发明第三方面的另一个实施方案中,所述组合物包括:(1)包括氨基酸序列CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)的化合物,(2)包括氨基酸序列CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)的化合物,(3)包括氨基酸序列CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)的化合物,(4)包括氨基酸序列CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4)的化合物,(5)包括氨基酸序列CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5)的化合物,(6)包括氨基酸序列CYKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:6)的化合物或包括氨基酸序列CYKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:22)的化合物,以及(7)包括氨基酸序列CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)的化合物。

[0029] 在本发明第三方面的另一个实施方案中,所述组合物包括:(1)包括氨基酸序列CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)的化合物,(2)包括氨基酸序列CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)的化合物,(3)包括氨基酸序列CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)的化合物,(4)包括氨基酸序列CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4)的化合物,(5)包括氨基酸序列CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5)的化合物,(6)包括氨基酸序列CYKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:6)的化合物,以及(7)包括氨基酸序列CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)的化合物。

[0030] 在一些实施方案中,组合物中包括700μg的每种化合物。

[0031] 在本发明的第三方面的另一个实施方案中,所述组合物还包括由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物,该核苷酸序列在其5'端通过

接头键合或连接至以下脂质：

[0032] 

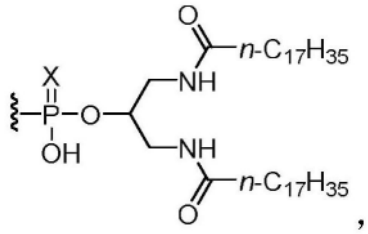
[0033] 或其盐，其中X是O或S。在一个实施方案中，核苷酸序列与所述脂质键合。在另一个实施方案中，连结5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)中的核苷的所有核苷间基团均为硫代磷酸酯。

[0034] 在第四方面，本发明的特征在于一种在人类患者中治疗癌症的方法，该方法包括向患者用本发明的第三方面的组合物给药。

[0035] 在本发明的第四方面的一个实施方案中，该方法进一步包括用佐剂给药，例如包括CpG核苷酸序列(例如5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3';SEQ ID NO:8)的佐剂。

[0036] 在一些实施方案中，用0.1mg，0.5mg或2.5mg的佐剂给药。

[0037] 在本发明的第四方面的一个实施方案中，该方法还包括向患者用由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物给药，该核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质：

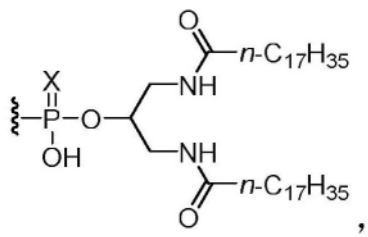
[0038] 

[0039] 或其盐，其中X是O或S。在一个实施方案中，核苷酸序列与所述脂质键合。在一个实施方案中，用0.1mg，0.5mg或2.5mg的化合物给药。

[0040] 在另一个实施方案中，连结5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)中的核苷的所有核苷间基团均为硫代磷酸酯。

[0041] 在本发明的第四方面的一个实施方案中，所述癌症是胰腺癌、肺癌或结肠直肠癌。

[0042] 在第五方面，本发明的特征在于一种试剂盒，所述试剂盒包括：(i)权利要求1-5中任一项的化合物，或权利要求6-8中任一项的组合物，和(ii)由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物，该核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质：

[0043] 

[0044] 或其盐，其中X是O或S。在一个实施方案中，核苷酸序列与所述脂质键合。在另一个实施方案中，连结5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)中的核苷的所有核苷

间基团均为硫代磷酸酯。

[0045] 定义

[0046] 如本文所用,“羰基”是指基团-C(O)-。

[0047] 如本文所用,“羧酸盐”是指基团-C(O)-OH或其盐。

[0048] 如本文所用,“缀合的”是指突变KRAS序列与接头的共价键合,以及任选地,接头与脂质的进一步共价键合。在各种实例中,将接头与突变KRAS序列或脂质连结的共价键可以是在硫原子和琥珀酰亚胺中的sp3-杂化碳原子之间、在氮原子和羰基的碳原子之间、或在氧原子和硫代磷酰基或磷酰基的磷原子之间的共价键。在各种实例中,KRAS序列和脂质中的每一个可包含用于与接头中的互补基团键合的基团。例如,KRAS多肽可包括硫原子(例如,半胱氨酸残基中的硫原子),该硫原子键合至在接头中的互补基团例如琥珀酰亚胺。从KRAS多肽中的硫原子到接头中的琥珀酰亚胺的键可以通过KRAS多肽中的硫醇(例如,半胱氨酸残基中的硫醇)与接头中的马来酰亚胺的反应形成。可替代地,KRAS多肽可包括氮原子或羰基基团,该氮原子或该羰基基团分别键合至在接头中的羰基基团或氮原子。可以通过KRAS多肽中的胺或羧酸盐分别与接头中的羧酸盐或胺之间的反应形成羰基基团和氮原子之间的键。

[0049] “脂质”是触摸时油腻,不溶于水且可溶于有机溶剂的一组有机化合物中的任何一种,并且通常包括脂肪酸及其衍生物。用于本发明的脂质的一个实例是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

[0050] 如本文所用,“接头”是指一价或二价基团,其中一个化合价共价键合到一个生物功能基团,而另一个化合价共价键合到另一生物功能基团。在一个实例中,如上所述,接头将KRAS序列连结至脂质。任选地,这样的接头可以包括一个或多个聚乙二醇嵌段。在另一个实例中,接头将例如CpG寡核苷酸的核苷酸序列连结至脂质(例如,-P(X)(OH)-O-CH($CH_2NHCO-(CH_2)_{16}-CH_3)_2$或其盐,其中X为O或S,如本文所述)。这样的接头可以任选地包括一个或多个核苷酸,例如二核苷酸(例如,GG)。

[0051] 如本文所用,“药学上可接受的载体”是指能够悬浮或溶解活性化合物并且在对用其给药的受试者(例如,人类患者)中具有无毒和非炎性的性质的媒介物。此外,药学上可接受的载体可以包括药学上可接受的添加剂,例如在药物制剂领域中已知或使用的防腐剂、抗氧化剂、香料、乳化剂、染料或赋形剂,并且不会显著干扰活性剂的生物活性的治疗效果,并且对受试者无毒。

[0052] 如本文所用,“磷酰基”是指基团-P(O)(OR^A)(OR^B),其中R^A为H,R^B为化合价。

[0053] 如本文所用,“聚乙二醇”是指嵌段-$(OCH_2CH_2)_n$-,其中n是重复单元的数字并且是从2至50的整数(例如24或48)。

[0054] 如本文所用,“硫醇”是指-SH基团。

[0055] 如本文所用,“硫代磷酰基”是指基团-P(S)(OR^A)(OR^B),其中R^A为H,R^B为化合价。

[0056] 术语“治疗”(“treat”)、“治疗”(“treatment”)和“正在治疗”(“treating”)是指旨在逆转、减轻、改善、抑制、减慢或停止与疾病或病症(例如癌症)相关的状况的进展或严重程度的治疗方法。这些术语包括减少或减轻状况、疾病或病症的至少一种不良影响或症状。如果减少一种或多种症状或临床标志,或如果诱导希望的应答(例如特异性免疫应答),则治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减少或停止,则治疗是“有效的”。

[0057] 本发明具有几个优点。例如,在包括DSPE部分时,本发明的某些化合物在被给药该某些化合物的受试者中与内源性白蛋白结合,这增强了化合物向受试者的淋巴结的递送。这有助于诱导针对化合物的KRAS序列的治疗性免疫应答,从而导致有效的癌症治疗。

[0058] 通过下面的详细描述、附图和权利要求,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0059] 图1显示两亲分子-KRas(aKRas)与两亲分子-CpG(aCpG)的组合,能活化脾细胞,而可溶性KRas与aCpG的组合,以及未处理的和可溶性KRas和polyIC(pIC)对照组则不能。

[0060] 图2显示aKRas G12R和G12V与aCpG的组合均能活化脾细胞,而可溶性KRas G12R或G12V与aCpG的组合,与未处理的和可溶性KRas和pIC对照组则不能。

[0061] 图3显示对于用aKRas G12D和aCpG的组合免疫的小鼠,具有KRas特异性$CD8^+$T细胞应答,但是对于用可溶性KRas G12D与CpG的组合或可溶性野生型KRas与CpG的组合免疫的小鼠,没有KRas特异性$CD8^+$T细胞应答。

[0062] 图4显示对于用aKRas G12D和aCpG的组合免疫的小鼠,具有KRas特异性$CD8^+$T细胞应答(9mers)和$CD8^+$或$CD4^+$T细胞应答(18mers),但对于可溶性KRas G12D与CpG的组合或未处理的对照,没有KRas特异性$CD8^+$T细胞应答(9mers)和$CD8^+$或$CD4^+$T细胞应答(18mers)。

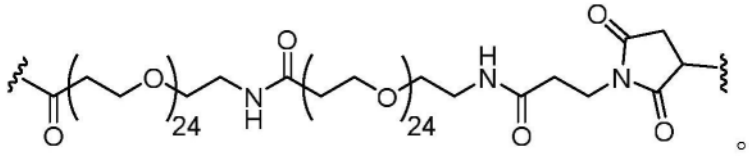
[0063] 图5显示与可溶性KRas疫苗相比,两亲分子-KRas(Amph-KRAS)和两亲分子-CpG(Amph-CpG)疫苗引起更高的内源性T细胞应答,如细胞因子珠阵列(cytokine bead array)中脾细胞产生的细胞因子增加所表明的。可溶性KRAS G12D=YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23);Amph-KRAS G12D=DSPE-酰胺基-dPEG24-酰胺基-dPEG24-CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1);KRAS G12D 18-mer=YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23);CBA=细胞因子珠阵列;IFN=干扰素;IL=白介素;KRAS=Kirsten大鼠肉瘤。

[0064] 图6显示两亲分子-肽G12D 4-21(SEQ ID NO:1)的结构。

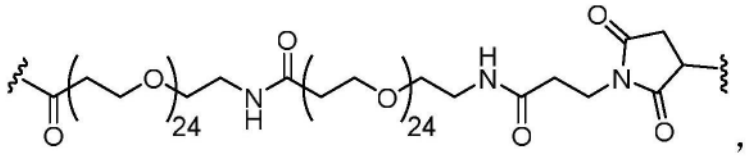
[0065] 图7显示两亲分子-CpG-7909的结构。所有的糖都是脱氧核糖。所有核苷间键都是硫代磷酸酯。结构以钠盐表示。

[0066] 发明详述

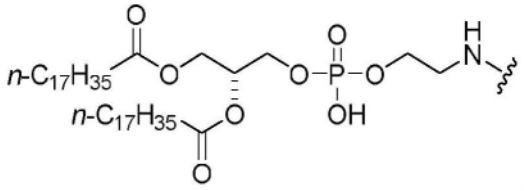
[0067] 本发明提供了可用于治疗方法的化合物。本发明的化合物各自包括突变KRAS序列(例如,SEQ ID NO:1-7和22中的任何一个,参见下表1;或SEQ ID NO:23-30中的任何一个,参见下表2)和脂质(例如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE))。这些部分(突变KRAS序列和脂质)通过接头,例如包括一个或多个聚乙二醇嵌段的接头,彼此连接。在一个示例中,所述接头为:

[0068] 

[0069] 在一个具体的例子中,突变KRAS序列(例如,SEQ ID NO:1-7或22中的任何一个,或SEQ ID NO:23-30中的任何一个)在其N-末端通过Cys残基键合至接头,并且所述接头与所述脂质键合,其中所述接头是:

[0070] 

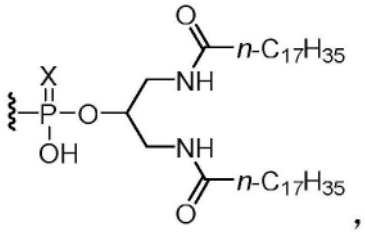
[0071] 以及所述脂质为：

[0072] 

[0073] 或其盐。

[0074] 本发明还提供了包括一种或多种本发明化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂的组合物。任选地，所述组合物可包括如上所述的七种不同的化合物，其中所述七种不同的化合物中的每一种均包括选自SEQ ID NO:1-7和23或SEQ ID NO:23-30的不同序列。包括这些化合物的子集(例如2、3、4、5或6)的组合物也包括在本发明中。本发明的组合物中包括的不同化合物可以任选地各自包括相同或不同的KRAS序列、接头和/或脂质。

[0075] 本发明的组合物可以用于诱导对化合物的KRAS序列的免疫应答的方法。因此，该组合物可以称为免疫原性或疫苗组合物。因此，组合物可以任选地包括一种或多种佐剂或与一种或多种佐剂一起给药。在一个实例中，使用的佐剂可以包括CpG寡核苷酸(例如5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3';SEQ ID NO:8;CpG-7909)，其在5'端通过接头键合或连接至如下脂质：

[0076] 

[0077] 或其盐，其中X是O或S。优选地，X是S。

[0078] CpG寡核苷酸可以直接键合到脂质上。或者，与CpG寡核苷酸和脂质键合的接头可以是GG。在CpG寡核苷酸中，所有核苷间基团均为硫代磷酸酯(例如，化合物中的所有核苷间基团均可为硫代磷酸酯)。

[0079] 本发明的化合物和组合物可以用于治疗方法。特别地，化合物的KRAS序列可以诱导对在某些癌细胞中表达的KRAS的免疫应答。因此，本发明提供了通过向受试者给药一种或多种本发明的化合物或组合物来治疗受试者(例如人类患者)的癌症的方法。本发明还包括通过向受试者给药一种或多种本发明的化合物或组合物在受试者(例如人类患者)中诱导针对KRAS的免疫应答的方法。在各种实例中，癌症选自由胰腺癌、肺癌和结肠直肠癌组成的组。任选地，本发明的方法可以进一步包括与第二(或进一步)不同的治疗方法组合用本发明的化合物或组合物给药。

[0080] 本发明还提供了试剂盒，其每个包括例如第一容器，所述第一容器包括一种或多种本发明的化合物，以及任选地与第二容器一起，所述第二容器包括佐剂，例如如本文所述的佐剂。

[0081] 表1(SEQ ID NO:1-7和22)

[0082]

肽	名称	序列	分子量(Da)	残基	两亲分子-肽分子量(Da)
1	G12D 4-21	CYKLVVVGA**DG**VGKSALTI	1893	19	5049
2	G12V 4-21	CYKLVVVGA**VG**VGKSALTI	1877	19	5033
3	G12R 4-21	CYKLVVVGA**RG**VGKSALTI	1934	19	5090
4	G12A 4-21	CYKLVVVGA**AG**VGKSALTI	1849	19	5005
5	G12S 4-21	CYKLVVVGA**SG**VGKSALTI	1865	19	5021
6	G12C 4-21 或 G12T 4-21	YKLVVVGA**CG**VGKSALTI 或 CYKLVVVGA**TG**VGKSALTI	1778	19 19	4934
7	G13D 4-21	CYKLVVVGA**GD**VGKSALTI	1790	19	5049

[0083] 对于表1中提到的每个“两亲分子-肽”,使用以下合成子通过马来酰亚胺(MAL)-半胱氨酸偶联将脂质聚(乙二醇)部分缀合到该肽上:

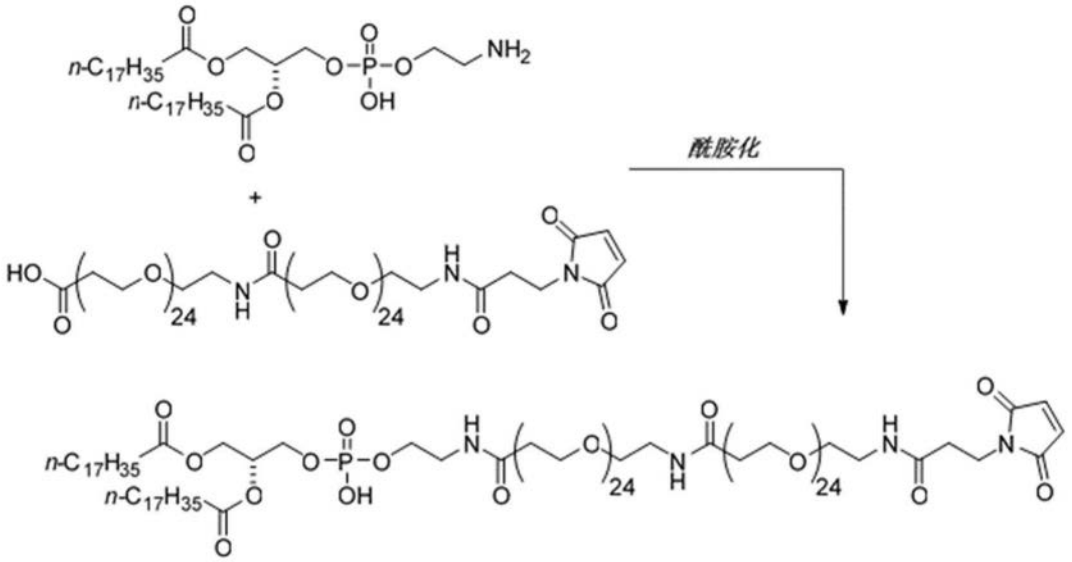
[0084] DSPE-酰胺基-dPEG24-酰胺基-dPEG24-MAL

[0085] 表2(SEQ ID NO:23-30)

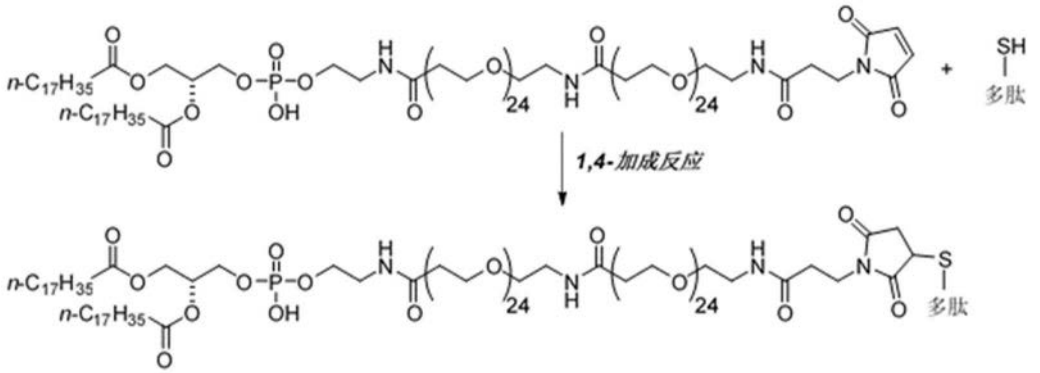
[0086]

肽	名称	序列	分子量 (Da)	残基
1	G12D 4-21	YKLVVVGA**DG**VGKSALTI	1790	18
2	G12V 4-21	YKLVVVGA**VG**VGKSALTI	1774	18
3	G12R 4-21	YKLVVVGA**RG**VGKSALTI	1831	18
4	G12A 4-21	YKLVVVGA**AG**VGKSALTI	1746	18
5	G12S 4-21	YKLVVVGA**SG**VGKSALTI	1762	18
6	G12C 4-21 或 G12T 4-21	YKLVVVGA**CG**VGKSALTI 或 YKLVVVGA**TG**VGKSALTI	1778	18 18
7	G13D 4-21	YKLVVVGA**GD**VGKSALTI	1790	18

[0087] 可以使用本领域已知的方法由突变KRAS多肽,接头前体和脂质制备本发明的化合物。在一些变体中,首先将接头前体连接至如下脂质:

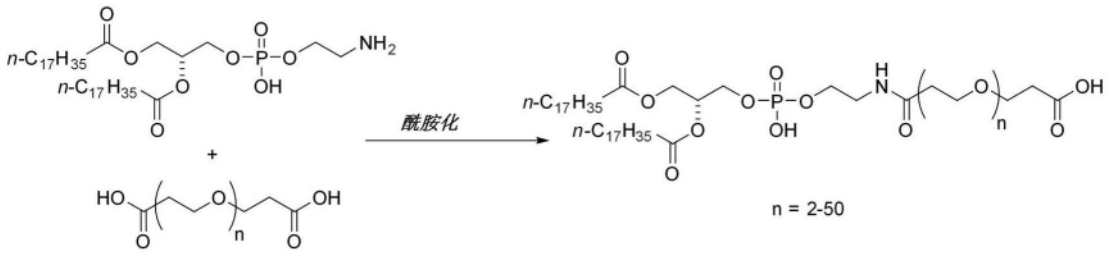
[0088] 

[0089] 酰胺化反应条件是本领域已知的,例如,典型的酰胺化条件包括使用试剂,例如EDC/DMAP、HATU/HOAt或HBTU/HOAt。或者,可以用O-琥珀酰亚胺酯、五氟苯基酯或四氟苯基酯代替羧酸盐。然后可以使该反应的产物与突变KRAS多肽反应,例如如下:

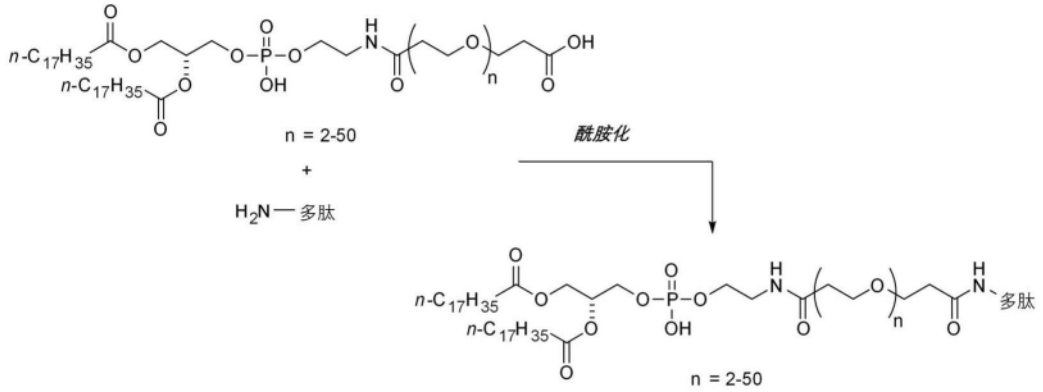
[0090] 

[0091] 所述1,4-加成反应可以在适当的溶剂例如极性有机溶剂或水中进行。

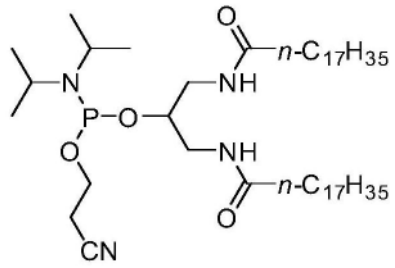
[0092] 或者,可以如下制备本发明的化合物。接头前体可以首先与如下脂质连接:

[0093] 

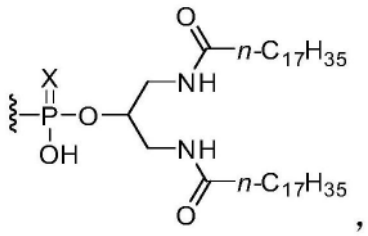
[0094] 然后可以使产物与突变KRAS多肽中的胺基团(例如N-末端胺)反应以产生本发明的化合物:

[0095] 

[0096] CpG寡核苷酸可以直接键合或通过接头连接脂质。这些化合物可以使用本领域已知的普通亚磷酰胺化学方法制备。在某些示例中,可以将CpG寡核苷酸或在5'端与GG键合的CpG寡核苷酸与以下化合物反应:

[0097] 

[0098] 产生中间体,该中间体经例如硫化剂(例如3-((N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮)氧化(例如,本领域已知的亚磷酸氧化方法)并且氰乙基基团水解后可能会产生由CpG寡核苷酸组成的化合物,该CpG寡核苷酸在其5'端通过接头与脂质键合或连接:

[0099] 

[0100] 或其盐,

[0101] 其中X是O或S。

[0102] 给药

[0103] 每个KRAS肽的给药剂量范围为每种肽100至5000微克(例如700微克/肽,对于7种肽的组,这将产生4900微克的肽剂量)。

[0104] 如果佐剂与KRAS肽一起给药,则佐剂的剂量以体重计可以高达0.48mg/kg。示例性的给药方案如下表3所示。

[0105] 表3

[0106]

给药	佐剂(例如 Amph-CpG-7909；图 6)	肽
剂量 1 (低)	0.1 mg	7 种肽每种 700μg
剂量 2 (中)	0.5 mg	7 种肽每种 700μg
剂量 3 (高)	2.5 mg	7 种肽每种 700μg

[0107] 为了更充分地理解本发明,阐述了以下实施例。这些实施例仅出于说明的目的,而不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

实施例

[0108] 实施例1:两亲分子KRas G12D引起免疫应答

[0109] 确定了可溶性-KRas(KRas)或两亲分子-KRas(aKRas)(图6)突变序列和两亲分子-CpG佐剂(aCpG)引起免疫应答的功效。在这些实验中,使用的aCpG是两亲分子-KRas的五倍,因为CpG递增(escalation)实验表明该剂量可能更有效。

[0110] 实验设计包括以下4组用所列化合物免疫的C57BL/6小鼠(每组n＝5)：

[0111] 1.KRas G12D+aCpG

[0112] 2.aKRas G12D+aCpG

[0113] 3.KRas G12D+pIC

[0114] 4.未免疫

[0115] PolyIC(pIC)被用作基准佐剂对照。

[0116] 将佐剂以及肽原液溶解在水中。最终注射液用1X PBS(磷酸盐缓冲液)稀释。

[0117] 所使用的aKRas肽是具有G12D取代的突变序列的18mer序列(野生型的氨基酸4-21→YKLVVVGAGGVGKSALTI(SEQ ID NO:9))。每次均使用20μg/100μl注射。

[0118] 使用的aCpG序列是CpG1826序列(5'-tccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:10),在5'端添加了两个鸟嘌呤(5'-ggtccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:11)浓度为每100μl注射剂5nmol。CpG1826是最佳的小鼠序列,而CpG7909对人类是最佳的,并且在小鼠中的活性较弱。CpG1826和CpG7909属于同一CpG类(B类),通常在其各自的物种中具有相似的活性谱。

[0119] 每100μl注射剂使用50μg的pIC。

[0120] 皮下(s.c.)给予初次免疫(primer immunization)到尾巴基部(第0天),以及在2周后(第14天)一剂加强剂量。加强剂量给药后第8天(第21天),使用标准方案对脾细胞上的IFNγ进行ELISpot分析。用5μg/孔的G12D序列18mer(aa4-21)→YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)激活脾细胞(10^6个细胞/孔)。如图1所示,aKRas与aCpG的组合活化脾细胞,而可溶性KRas与aCpG的组合,而未处理的和可溶性KRas和pIC对照组则没有。

[0121] 实施例2:两亲分子KRas G12R和G12V引起免疫应答

[0122] 确定了其他可溶性-KRas(KRas)或两亲分子-KRas(aKRas)突变序列和两亲分子-CpG佐剂(aCpG)或可溶性CpG(CpG)引起免疫应答的功效。

[0123] 实验设计包括以下7组用所列化合物免疫的C57BL/6小鼠(每组n＝5)：

[0124] 1.KRas G12R+CpG

[0125] 2.KRas G12V+CpG

[0126] 3.KRas G12R+pIC

[0127] 4.KRas G12V+pIC

[0128] 5.aKRas G12R+aCpG

[0129] 6.aKRas G12V+aCpG

[0130] 7.未免疫

[0131] 佐剂以及肽原液都溶解在水中。最终注射液用1X PBS稀释。

[0132] 所使用的aKras肽是具有G12R/V取代的突变序列的18mer序列(野生型氨基酸4-21→YKLVVVGAGGVGKSALTI(SEQ ID NO:9))。每次均使用20μg/100μl注射。

[0133] 使用的aCpG序列是CpG1826序列(5'-tccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:10),在5'端添加了两个鸟嘌呤(5'-ggtccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:11),浓度为每100μl注射剂5nmol。

[0134] 每100μl注射剂使用50μg的pIC。

[0135] 皮下(s.c.)给予初次免疫到尾巴基部,以及在2周后(d14)一剂加强剂量。

[0136] 加强剂量给药后第7天(d21),使用标准方案对脾细胞上的IFNγ进行ELISpot分析。用5μg/孔的以下任一种激活脾细胞(10^6细胞/孔):G12V序列18mer(aa4-21)→YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)或G12R序列18mer(aa4-21)→YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)。

[0137] 如图2所示,aKRas G12R和G12V与aCpG的组合激活脾细胞,而可溶性KRasG12R和G12V与aCpG的组合,以及未处理的和可溶性KRas和pIC对照组均没有。

[0138] 实施例3:两亲分子KRas G12D引起$CD8^+$T-细胞免疫应答

[0139] 在野生型B6小鼠中,很难引起Kras特异性$CD8^+$T-细胞应答。用可溶性或两亲分子缀合形式的KRas G12D抗原以及佐剂(CpG或aCpG)免疫人类HLA基因(A2.1)转基因的B6小鼠。已知A2.1等位基因在人类中对KRas肽产生应答。

[0140] 实验设计包括下列4组用所列化合物免疫的B6 HLA-A2.1 Tg小鼠(每组n＝5)：

[0141] 1.KRas野生型+CpG

[0142] 2.KRas 12D+CpG

[0143] 3.aKRas 12D+aCpG

[0144] 4.未免疫

[0145] 将佐剂以及肽原液溶解在水中。最终注射液用1X PBS稀释。

[0146] 所使用的aKRas肽是具有G12D取代的突变序列的18mer序列(野生型氨基酸4-21→YKLVVVGAGGVGKSALTI(SEQ ID NO:9))。每次均使用20μg/100μl注射。

[0147] 使用的aCpG序列是CpG1826序列(5'-tccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:10),在5'端添加了两个鸟嘌呤(5'-ggtccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:11),浓度为每100μl注射剂5nmol。

[0148] 将该疫苗皮下给药到雌性小鼠的尾巴基部两侧,每侧50μl。每两周间隔给予两次加强剂量。

[0149] 分别在第二和第三次加强剂量后第7天,使用标准方案对外周血单核细胞(PBMC)上的IFNγ进行了细胞内细胞因子染色(ICS)分析,并对脾细胞上的IFNγ进行了ELISpot分析。

[0150] 用5μg/孔的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12-20中的一个激活PBMC/脾细胞(10^6细胞/孔和$2x10^6$细胞/孔),如下所示:

[0151]

1. 12D 序列 18mer (aa4-21)	→ YKLVVVGADGVGKSALTI	(MHCII/CD4 表位)
2. 12D 序列 17mer (aa5-21)	→ KLVVVGADGVGKSALTI	(MHCII/CD4 表位)
3. 12D 序列 10mer (aa5-14)	→ KLVVVGADGV	(MHCI/CD8 表位)
4. 12D 序列 9mer (aa6-14)	→ LVVVGADGV	(MHCI/CD8 表位)
5. 12D 序列 9mer (aa7-15)	→ VVVGADGVG	(MHCI/CD8 表位)
6. 12D 序列 9mer (aa8-16)	→ VVGADGVGK	(MHCI/CD8 表位)
7. 12D 序列 9mer (aa9-17)	→ VGADGVGKS	(MHCI/CD8 表位)
8. 12D 序列 9mer (aa10-18)	→ GADGVGKSA	(MHCI/CD8 表位)
9. 12D 序列 9mer (aa11-19)	→ ADGVGKSAL	(MHCI/CD8 表位)
10. 12D 序列 9mer (aa12-20)	→ DGVGKSALT	(MHCI/CD8 表位)

[0152] 将特异性的突变肽仅给予用相应的18mer免疫的小鼠。

[0153] 图3示出了用aKRas G12D和aCpG的组合免疫的小鼠的KRas特异性$CD8^+$T-细胞应答,但是对于与CpG组合的可溶性KRas G12D或与CpG组合的可溶性野生型KRas没有KRas特异性CD8+T-细胞应答。

[0154] 实施例4:更高抗原浓度和不同剂量间隔的分析

[0155] 抗原的浓度从20μg增加到50μg,并以每两周(bw)或每周(w)的剂量间隔进行测试。

[0156] 实验设计包括以下5组用所列化合物免疫的C57BL/6小鼠(每组n=5):

[0157] 1.KRas 12D+CpG1826(bw)

[0158] 2.KRas 12D+CpG1826(w)

[0159] 3.aKRas 12D+aCpG1826(bw)

[0160] 4.aKRas 12D+aCpG1826(w)

[0161] 5.未免疫

[0162] 将佐剂以及肽原液溶解在水中。最终注射液用1X PBS稀释。

[0163] 所使用的aKRas肽是具有G12D取代的突变序列的18mer序列(野生型氨基酸4-21→YKLVVVGAGGVGKSALTI(SEQ ID NO:9))。每次均使用50μg/100μl注射。

[0164] 使用的aCpG序列是CpG1826序列(5'-tccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:10),在5'端添加了两个鸟嘌呤(5'-ggtccatgacgttcctgacgtt-3';SEQ ID NO:11),浓度为每100μl注射剂5nmol。

[0165] 皮下(s.c.)给予初次免疫到尾巴基部,以及2周后以一剂加强剂量。

[0166] 加强剂量给药后7天,使用标准方案对脾细胞进行IFNγ的ELISpot分析和IL6、IL10、IL12、TNFα、IFNγ和MCP1的CBA(流式细胞小球微阵列(cytometric bead array))分析。用5μg/孔的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12-21之一激活脾细胞(10^6细胞/孔),如下所示:

1. 12D 序列 18mer (aa4-21) → YKLVVVGADGVGKSALTI } (MHCII/CD4 表位)
2. 12D 序列 17mer (aa5-21) → KLVVVGADGVGKSALTI }
3. 12D 序列 10mer (aa5-14) → KLVVVGADGV }
4. 12D 序列 9mer (aa5-13) → KLVVVGADG }
5. 12D 序列 9mer (aa6-14) → LVVVGADGV }
[0167] 6. 12D 序列 9mer (aa7-15) → VVVGADGVG }
7. 12D 序列 9mer (aa8-16) → VVGADGVGK }
8. 12D 序列 9mer (aa9-17) → VGADGVGKS }
9. 12D 序列 9mer (aa10-18) → GADGVGKSA } (MHCI/CD8 表位)
10. 12D 序列 9mer (aa11-19) → ADGVGKSAL }
11. 12D 序列 9mer (aa12-20) → DGVGKSALT }

[0168] 将特异性突变肽仅给予用相应的18mer免疫的小鼠。

[0169] 制备单独的平板以用于短(9mer和10mer)或长(17mer和18mer)肽刺激。用所有刺激刺激来自“未免疫”对照小鼠的细胞。

[0170] 图4显示了对aKRas G12D和aCpG组合免疫的小鼠,具有KRas特异性$CD8^+$T-细胞应答(9mer)和$CD8^+$或$CD4^+$T-细胞应答(18mer),但对于可溶性KRas G12D与CpG组合或未经处理的对照,却没有KRas特异性$CD8^+$T-细胞应答(9mer)和$CD8^+$或$CD4^+$T-细胞应答(18mer)。

[0171] 实施例5:KRAS两亲分子的进一步分析

[0172] 如以上实施例中所述,已经在C57BL/6小鼠模型中证明了具有aCpG佐剂的突变KRAS肽-两亲分子疫苗的潜在免疫原性。这些研究以及进一步的研究总结在表4中,这些结果表明,由于MHC结合的物种差异,小鼠历来对突变KRAS肽的免疫应答较人类差。

[0173] • 由ELISPOT和细胞因子珠阵列鉴定(图1、图2、图4和图5),皮下给药突变KRAS两亲分子-肽(G12D(图6)、G12R和G12V)可在小鼠中有效诱导KRAS特异性脾T细胞

[0174] • 与突变KRAS肽与可溶性CpG或聚肌苷酸:聚胞苷酸(polyIC)的组合作为佐剂相比,突变KRAS两亲分子-肽(G12D、G12R和G12V)与aCpG组合使用作为佐剂在诱导KRAS特异性脾T细胞方面更有效(图1、图2和图5),以及

[0175] • 在引起CD4和CD8 T细胞应答方面,突变KRAS两亲分子-肽(G12D)与aCpG组合比可溶性KRAS肽与可溶性CpG组合更有效,如通过长(18-mer)或最小(9-mer)肽表位再刺激时的效应细胞因子应答所证实(图4)。

[0176]

表 4		
测试物品剂量/剂量体积	**ROA/治疗方案**	**结果**
4 组: 1) KRAS G12D + CpG; 2) 两亲分子-KRAS G12D + aCpG; 3) KRAS G12D + Poly IC; 4) 未处理 KRAS 肽（两亲的或可溶的）的剂量为 20 μg；aCpG-1826 为 5 nmoL；Poly IC 为 50 μg；将原液溶于水以及最终剂量的溶液在磷酸盐缓冲液（PBS）中。 剂量体积：给药 100 μL，在尾根（tail head）两侧分别皮下注射（每个注射部位 50 μL）	ROA: SC 初次: 第 0 天 加强: 第 14 天	ELISPOT（IFNγ）结果： 与可溶性 G12D + 可溶性 CpG 或 Poly IC 相比，两亲分子-肽 G12D + aCpG 产生了优异的脾 T 细胞应答

[0177]

表 4		
测试物品剂量/剂量体积	**ROA/治疗方案**	**结果**
7 组: 1) KRAS G12R + CpG; 2) KRAS G12V + CpG 3) KRAS G12R + Poly IC; 4) KRAS G12V + Poly IC; 5) 两亲分子-KRAS G12R + aCpG; 6) 两亲分子-KRAS G12V + aCpG; 7) 未处理 KRAS 肽（两亲的或可溶的）的剂量为 20 μg；aCpG-1826 为 5 nmoL；Poly IC 为 50 μg；将原液溶于水以及最终剂量的溶液在 PBS 中。 剂量体积：给药 100 μL，在尾根（tail head）两侧分别皮下注射（每个注射部位 50 μL）	ROA: SC 初次：第 0 天 加强：第 14 天	ELISPOT（IFNγ）结果： 当与脂质部分缀合时，KRAS 肽序列比可溶性肽具有更高的免疫原性

[0178]

表 4		
测试物品剂量/剂量体积	**ROA/治疗方案**	**结果**
5 组： 1) KRAS G12D + CpG (bw); 2) KRAS G12D + CpG (w); 3) 两亲分子-KRAS G12D + aCpG (bw); 4) 两亲分子-KRAS G12D + aCpG (w); 5) 未处理 KRAS 肽（两亲的或可溶的）的剂量为 50 μg；aCpG-1826 为 5 nmoL；将原液溶于水以及最终剂量的溶液在 PBS 中。 剂量体积：给药 100 μL，在尾根（tail head）两侧分别皮下注射（每个注射部位 50 μL）	ROA: SC 对被处理动物每两周（bw）给药 2 剂（初次+加强）和对被处理动物每周（w）给药 3 剂（初次+2 次加强） 初次：第 0 天 (w 和 bw) 加强：第 7 天 (w) 加强：第 14 天 (w 和 bw)	ELISPOT (IFNγ)和 CBA 结果： 通过 ELISPOT（IFNγ）和/或细胞因子珠阵列（cytokine bead array）（IFNγ，TNFα 和 IL-6）评估，两亲分子引起 C57BL/6 小鼠对突变 KRAS 的内源性 CD8 和 CD4 T 细胞应答

[0179] CBA＝流式细胞小球微阵列(cytometric bead array);ELISPOT＝酶联免疫斑点;IFNγ＝干扰素gamma;IL-6＝白介素6;KRAS＝Kirsten大鼠肉瘤;poly IC＝聚肌苷酸:聚胞苷酸;ROA＝给药途径;SC＝皮下;TNFα＝肿瘤坏死因子alpha

[0180] 其他实施方式

[0181] 尽管已经结合本发明的特定实施例描述了本发明,但是应当理解,本发明能够进

行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖通常遵循本发明的原理的本发明的任何变型、用途或修改。本发明以及包括与本公开的这种偏离落入本发明所属领域内的已知或惯常实践中,并且可以应用于上文阐述的基本特征。

[0182] 所有出版物、专利和专利申请都通过引用以其整体并入本文,其程度与每个单独的出版物、专利或专利申请均被明确地并单独地以引用的方式全文并入本文的程度相同。

[0183] 本发明的一些实施例在以下编号的段落内。

[0184] 1.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物,其中所述突变KRAS序列通过接头与脂质缀合,并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),以及(iii)所述突变KRAS序列包含或由选自由以下的氨基酸序列组成的组:

[0185] YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23),

[0186] YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:24),

[0187] YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:25),

[0188] YKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:26),

[0189] YKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:27),

[0190] YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28),

[0191] YKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:29),及

[0192] YKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:30)。

[0193] 2.一种包含突变KRAS序列和脂质的化合物,其中所述突变KRAS序列通过接头与脂质缀合,并且(i)所述接头包含一个或多个聚乙二醇嵌段,(ii)所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE),以及(iii)所述突变KRAS序列包含或由选自由以下的氨基酸序列组成的组:

[0194] CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1),

[0195] CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2),

[0196] CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3),

[0197] CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4),

[0198] CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5),

[0199] CYKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:6),

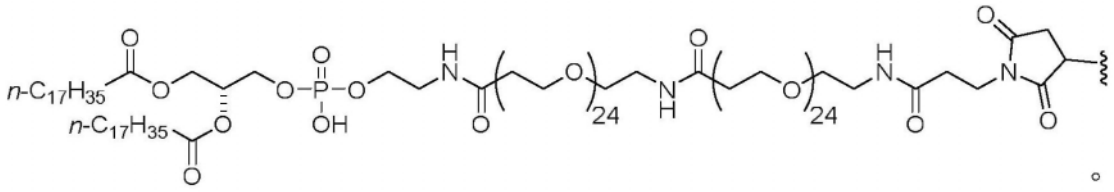
[0200] CYKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:22),及

[0201] CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)。

[0202] 3.根据段落1或2所述的化合物,其中所述突变KRAS序列在其N-末端通过半胱氨酸-马来酰亚胺键与所述接头缀合。

[0203] 4.根据段落1-3中任一段所述的化合物,其中所述接头包含48个重复单元的聚乙二醇。

[0204] 5.根据段落1或2所述的化合物,其中所述突变KRAS序列在其N-末端与以下结构缀合:

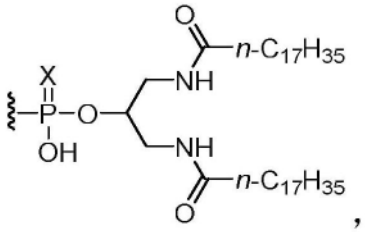
[0205] 

[0206] 6.一种组合物,其包含一种或多种根据段落1-5中任一段所述的化合物和药学上可接受的载体。

[0207] 7.根据段落6所述的组合物,其中所述组合物包含:(1)包含氨基酸序列YKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:23)的化合物,(2)包含氨基酸序列YKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:24)的化合物,(3)包含氨基酸序列YKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:25)的化合物,(4)包含氨基酸序列YKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:26)的化合物,(5)包含氨基酸序列YKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:27)的化合物,(6)包含氨基酸序列YKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:28)的化合物或包含氨基酸序列YKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:29)的化合物,以及(7)包含氨基酸序列YKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:30)的化合物。

[0208] 8.根据段落6所述的组合物,其中所述组合物包含:(1)包含氨基酸序列CYKLVVVGADGVGKSALTI(SEQ ID NO:1)的化合物,(2)包含氨基酸序列CYKLVVVGAVGVGKSALTI(SEQ ID NO:2)的化合物,(3)包含氨基酸序列CYKLVVVGARGVGKSALTI(SEQ ID NO:3)的化合物,(4)包含氨基酸序列CYKLVVVGAAGVGKSALTI(SEQ ID NO:4)的化合物,(5)包含氨基酸序列CYKLVVVGASGVGKSALTI(SEQ ID NO:5)的化合物,(6)包含氨基酸序列CYKLVVVGACGVGKSALTI(SEQ ID NO:6)的化合物或包含氨基酸序列CYKLVVVGATGVGKSALTI(SEQ ID NO:22)的化合物,以及(7)包含氨基酸序列CYKLVVVGAGDVGKSALTI(SEQ ID NO:7)的化合物。

[0209] 9.根据段落6-8中任一段所述的组合物,其中所述组合物还包含由核苷酸序列5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'(SEQ ID NO:8)组成的化合物,所述核苷酸序列在其5'端通过接头键合或连接至以下脂质:

[0210] ,

[0211] 或其盐,

[0212] 其中X是O或S。

[0213] 10.根据段落6所述的组合物,其中该组合物包含700μg的每种化合物。

[0214] 11.一种在人类患者中治疗癌症的方法,所述方法包含向所述患者用段落6-10中任一段所述的组合物给药。

[0215] 12.根据段落11所述的方法,其中所述方法还包含用佐剂给药。

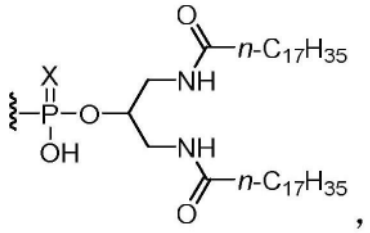
[0216] 13.根据段落12所述的方法,其中所述佐剂包含CpG核苷酸序列。

[0217] 14.根据段落13所述的方法,其中所述CpG核苷酸序列包含5'-

TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’(SEQ ID NO:8)。

[0218] 15.根据段落12-14中任一段所述的方法,其中用0.1mg、0.5mg或2.5mg的佐剂给药。

[0219] 16.根据段落10所述的方法,其中所述方法还包含向所述患者用由核苷酸序列5’-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’(SEQ ID NO:8)组成的化合物给药,所述核苷酸序列在其5’端通过接头键合或连接至以下脂质:

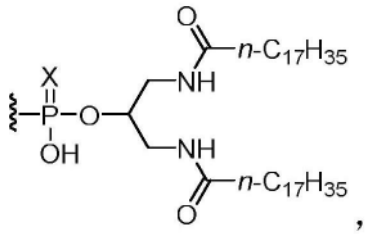
[0220] 

[0221] 或其盐,

[0222] 其中X是O或S。

[0223] 17.根据段落9的组合物或段落16的方法,其中所述核苷酸序列与脂质键合。

[0224] 18.根据段落16或17所述的方法,其中用0.1mg、0.5mg或2.5mg的由核苷酸序列5’-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’(SEQ ID NO:8)组成的化合物给药,所述核苷酸序列在其5’端通过接头键合或连接至以下脂质:

[0225] 

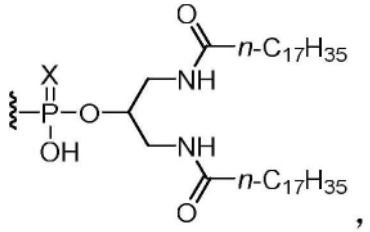
[0226] 或其盐,

[0227] 其中X是O或S。

[0228] 19.根据段落11-16或18中任一段所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌、肺癌或结肠直肠癌。

[0229] 20.根据段落11-16或18中任一段所述的方法,其中连结5’-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’(SEQ ID NO:8)中的核苷的所有核苷间基团均为硫代磷酸酯。

[0230] 21.一种试剂盒,其包含(i)段落1-5中任一段所述的化合物或段落6-8中任一段所述的组合物,和(ii)由核苷酸序列5’-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3’(SEQ ID NO:8)组成的化合物,所述核苷酸序列在其5’端通过接头键合或连接至以下脂质:

[0231] 

[0232] 或其盐,

[0233] 其中X是O或S。

[0234] 其他实施例在以下权利要求中。

[0001] 序列表

[0002] <110> 威登卓制药公司

[0003] <120> 包含突变KRAS序列和脂质的化合物及其用途

[0004] <130> 51026-026WO2

[0005] <140> PCT/US19/020404

[0006] <141> 2019-03-01

[0007] <150> US 62/637,879

[0008] <151> 2018-03-02

[0009] <160> 31

[0010] <170> PatentIn版本3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 19

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 人工序列

[0015] <220>

[0016] <223> 合成结构

[0017] <400> 1

[0018] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0019] 1 5 10 15

[0020] Leu Thr Ile

[0021] <210> 2

[0022] <211> 19

[0023] <212> PRT

[0024] <213> 人工序列

[0025] <220>

[0026] <223> 合成结构

[0027] <400> 2

[0028] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0029] 1 5 10 15

[0030] Leu Thr Ile

[0031] <210> 3

[0032] <211> 19

[0033] <212> PRT

[0034] <213> 人工序列

[0035] <220>

[0036] <223> 合成结构

[0037] <400> 3

[0038] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0039] 1 5 10 15

[0040] Leu Thr Ile

[0041] <210> 4

[0042] <211> 19

[0043] <212> PRT

[0044] <213> 人工序列

[0045] <220>

[0046] <223> 合成结构

[0047] <400> 4

[0048] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0049] 1 5 10 15

[0050] Leu Thr Ile

[0051] <210> 5

[0052] <211> 19

[0053] <212> PRT

[0054] <213> 人工序列

[0055] <220>

[0056] <223> 合成结构

[0057] <400> 5

[0058] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0059] 1 5 10 15

[0060] Leu Thr Ile

[0061] <210> 6

[0062] <211> 19

[0063] <212> PRT

[0064] <213> 人工序列

[0065] <220>

[0066] <223> 合成结构

[0067] <400> 6

[0068] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0069] 1 5 10 15

[0070] Leu Thr Ile

[0071] <210> 7

[0072] <211> 19

[0073] <212> PRT

[0074] <213> 人工序列

[0075] <220>

[0076] <223> 合成结构

[0077] <400> 7

[0078] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala

[0079] 1 5 10 15

[0080] Leu Thr Ile

[0081] <210> 8

[0082] <211> 24

[0083] <212> DNA

[0084] <213> 人工序列

[0085] <220>

[0086] <223> 合成结构

[0087] <400> 8

[0088] tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

[0089] <210> 9

[0090] <211> 18

[0091] <212> PRT

[0092] <213> 人工序列

[0093] <220>

[0094] <223> 合成结构

[0095] <400> 9

[0096] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0097] 1 5 10 15

[0098] Thr Ile

[0099] <210> 10

[0100] <211> 20

[0101] <212> DNA

[0102] <213> 人工序列

[0103] <220>

[0104] <223> 合成结构

[0105] <400> 10

[0106] tccatgacgt tcctgacgtt 20

[0107] <210> 11

[0108] <211> 22

[0109] <212> DNA

[0110] <213> 人工序列

[0111] <220>

[0112] <223> 合成结构

[0113] <400> 11

[0114] ggtccatgac gttcctgacg tt 22

[0115] <210> 12

[0116] <211> 18

[0117] <212> PRT

[0118] <213> 人工序列

[0119] <220>

[0120] <223> 合成结构

[0121] <400> 12

[0122] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0123] 1 5 10 15

[0124] Thr Ile

[0125] <210> 13

[0126] <211> 17

[0127] <212> PRT

[0128] <213> 人工序列

[0129] <220>

[0130] <223> 合成结构

[0131] <400> 13

[0132] Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

[0133] 1 5 10 15

[0134] Ile

[0135] <210> 14

[0136] <211> 10

[0137] <212> PRT

[0138] <213> 人工序列

[0139] <220>

[0140] <223> 合成结构

[0141] <400> 14

[0142] Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val

[0143] 1 5 10

[0144] <210> 15

[0145] <211> 9

[0146] <212> PRT

[0147] <213> 人工序列

[0148] <220>

[0149] <223> 合成结构

[0150] <400> 15

[0151] Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val

[0152] 1 5

[0153] <210> 16

[0154] <211> 9

[0155] <212> PRT

[0156] <213> 人工序列

[0157] <220>

[0158] <223> 合成结构

[0159] <400> 16

[0160] Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly

[0161] 1 5

[0162] <210> 17

[0163] <211> 9

[0164] <212> PRT

[0165] <213> 人工序列

[0166] <220>

[0167] <223> 合成结构

[0168] <400> 17

[0169] Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys

[0170] 1 5

[0171] <210> 18

[0172] <211> 9

[0173] <212> PRT

[0174] <213> 人工序列

[0175] <220>

[0176] <223> 合成结构

[0177] <400> 18

[0178] Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser

[0179] 1 5

[0180] <210> 19

[0181] <211> 9

[0182] <212> PRT

[0183] <213> 人工序列

[0184] <220>

[0185] <223> 合成结构

[0186] <400> 19

[0187] Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0188] 1 5

[0189] <210> 20

[0190] <211> 9

[0191] <212> PRT

[0192] <213> 人工序列

[0193] <220>

[0194] <223> 合成结构

[0195] <400> 20

[0196] Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0197] 1 5

[0198] <210> 21

[0199] <211> 9

[0200] <212> PRT

[0201] <213> 人工序列

[0202] <220>

[0203] <223> 合成结构

[0204] <400> 21

[0205] Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr

[0206] 1 5

[0207] <210> 22

[0208] <211> 19

[0209] <212> PRT

[0210] <213> 人工序列

[0211] <220>

[0212] <223> 合成结构

[0213] <400> 22

[0214] Cys Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Thr Gly Val Gly Lys Ser Ala

[0215] 1 5 10 15

[0216] Leu Thr Ile

[0217] <210> 23

[0218] <211> 18

[0219] <212> PRT

[0220] <213> 人工序列

[0221] <220>

[0222] <223> 合成结构

[0223] <400> 23

[0224] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0225] 1 5 10 15

[0226] Thr Ile

[0227] <210> 24

[0228] <211> 18

[0229] <212> PRT

[0230] <213> 人工序列

[0231] <220>

[0232] <223> 合成结构

[0233] <400> 24

[0234] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0235] 1 5 10 15

[0236] Thr Ile

[0237] <210> 25

[0238] <211> 18

[0239] <212> PRT

[0240] <213> 人工序列

[0241] <220>

[0242] <223> 合成结构

[0243] <400> 25

[0244] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0245] 1 5 10 15

[0246] Thr Ile

[0247] <210> 26

[0248] <211> 18

[0249] <212> PRT

[0250] <213> 人工序列

[0251] <220>

[0252] <223> 合成结构

[0253] <400> 26

[0254] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0255] 1 5 10 15

[0256] Thr Ile

[0257] <210> 27

[0258] <211> 18

[0259] <212> PRT

[0260] <213> 人工序列

[0261] <220>

[0262] <223> 合成结构

[0263] <400> 27

[0264] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0265] 1 5 10 15

[0266] Thr Ile

[0267] <210> 28

[0268] <211> 18

[0269] <212> PRT

[0270] <213> 人工序列

[0271] <220>

[0272] <223> 合成结构

[0273] <400> 28

[0274] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0275] 1 5 10 15

[0276] Thr Ile

[0277] <210> 29

[0278] <211> 18

[0279] <212> PRT

[0280] <213> 人工序列

[0281] <220>

[0282] <223> 合成结构

[0283] <400> 29

[0284] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Thr Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0285] 1 5 10 15

[0286] Thr Ile

[0287] <210> 30

[0288] <211> 18

[0289] <212> PRT

[0290] <213> 人工序列

[0291] <220>

[0292] <223> 合成结构

[0293] <400> 30

[0294] Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu

[0295] 1 5 10 15

[0296] Thr Ile

[0297] <210> 31

[0298] <211> 9

[0299] <212> PRT

[0300] <213> 人工序列

[0301] <220>

[0302] <223> 合成结构

[0303] <400> 31

[0304] Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly

[0305] 1 5

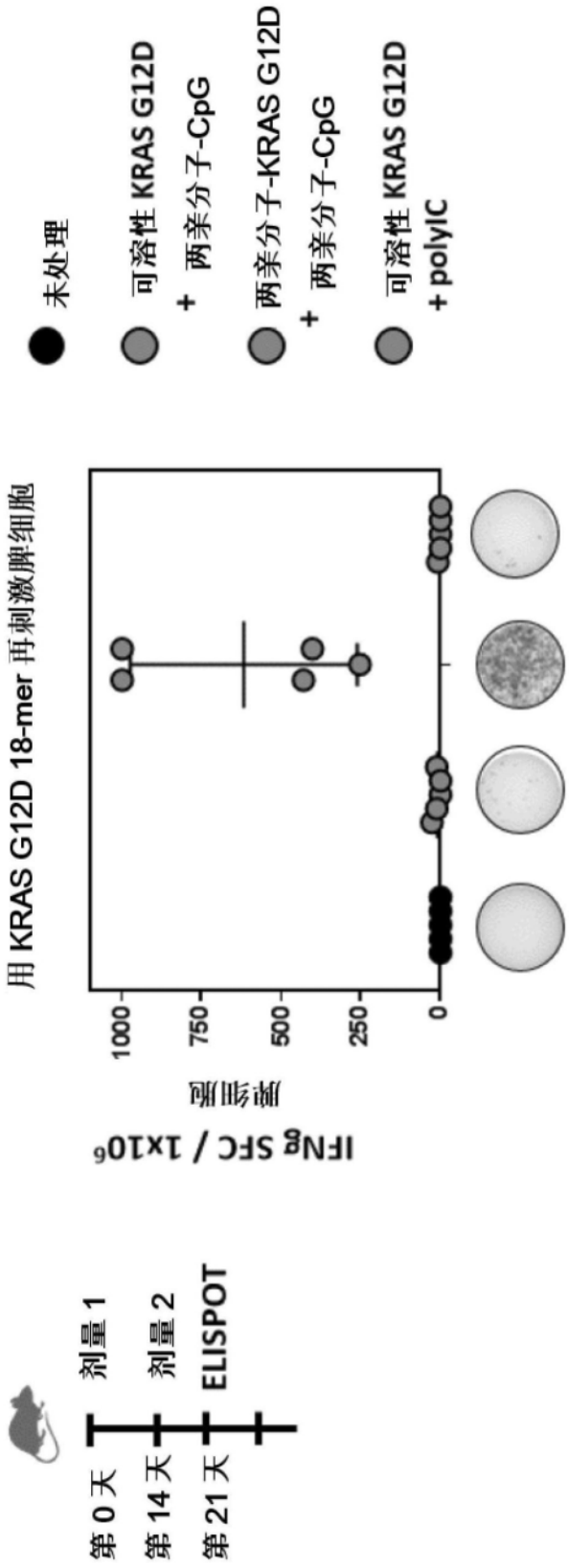

第 0 天
第 14 天
第 21 天
剂量 1
剂量 2
ELISPOT
IFNg SFC / 1x10^6
脾细胞
1000
750
500
250
0
用 KRAS G12D 18-mer 再刺激脾细胞
未处理
可溶性 KRAS G12D
+ 两亲分子-CpG
两亲分子-KRAS G12D
+ 两亲分子-CpG
可溶性 KRAS G12D
+ polyIC

图1

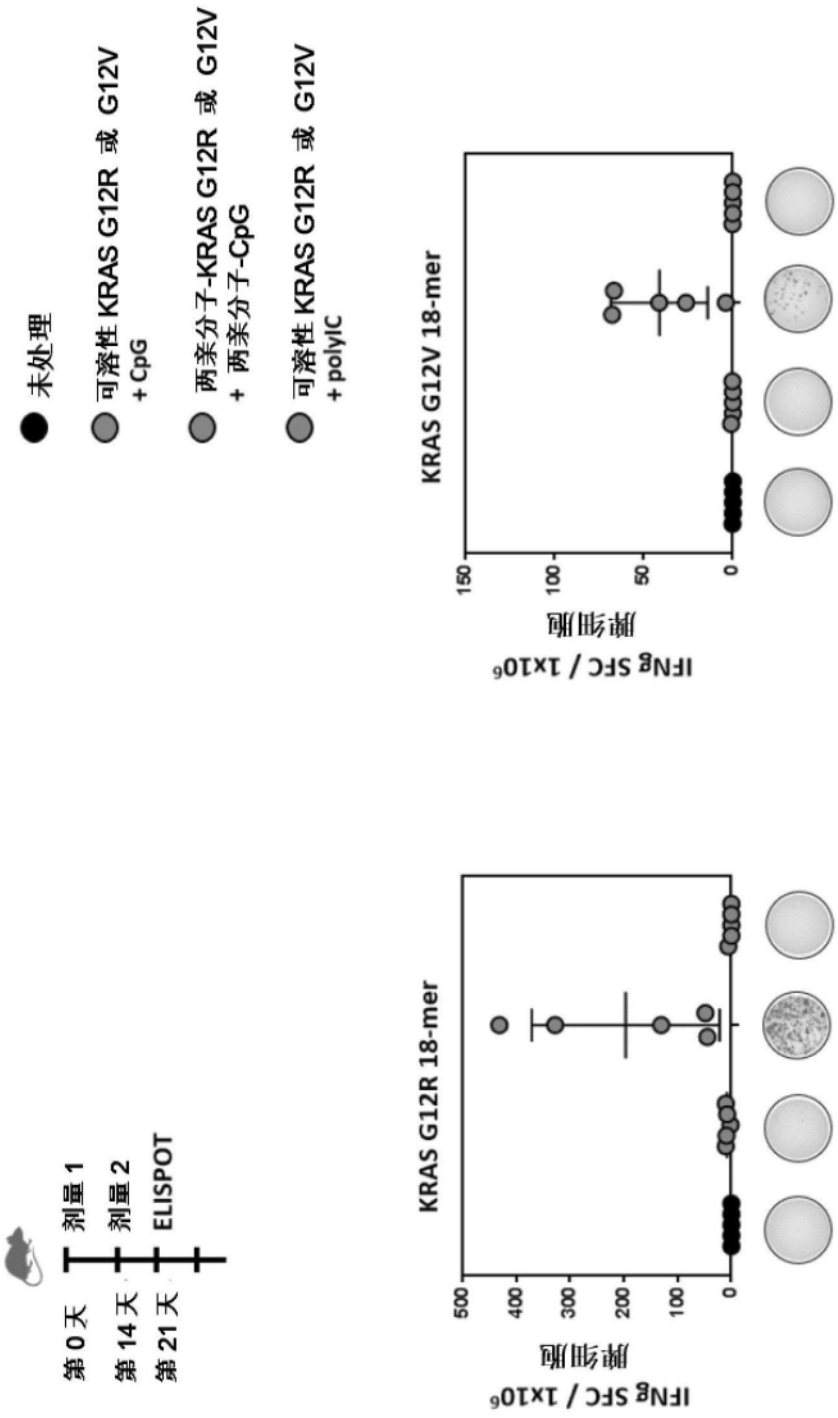

未处理
可溶性 KRAS G12R 或 G12V + CpG
两亲分子-KRAS G12R 或 G12V + 两亲分子-CpG
可溶性 KRAS G12R 或 G12V + polyIC
第 0 天
第 14 天
第 21 天
剂量 1
剂量 2
ELISPOT
KRAS G12R 18-mer
KRAS G12V 18-mer
IFNg SFC / 1x10^6 脾细胞
0
100
200
300
400
500
50
150

图2

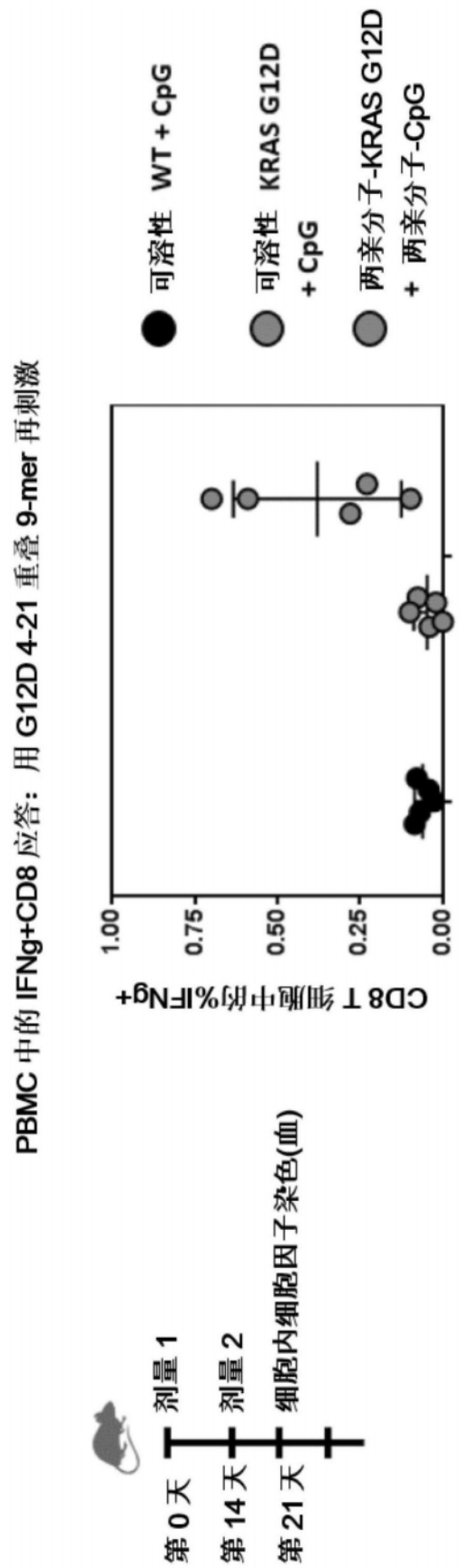

PBMC 中的 IFNg+CD8 应答：用 G12D 4-21 重叠 9-mer 再刺激
CD8 T 细胞中的%IFNg+
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
可溶性 WT + CpG
可溶性 KRAS G12D + CpG
两亲分子-KRAS G12D + 两亲分子-CpG
第 0 天
第 14 天
第 21 天
剂量 1
剂量 2
细胞内细胞因子染色(血)

图3

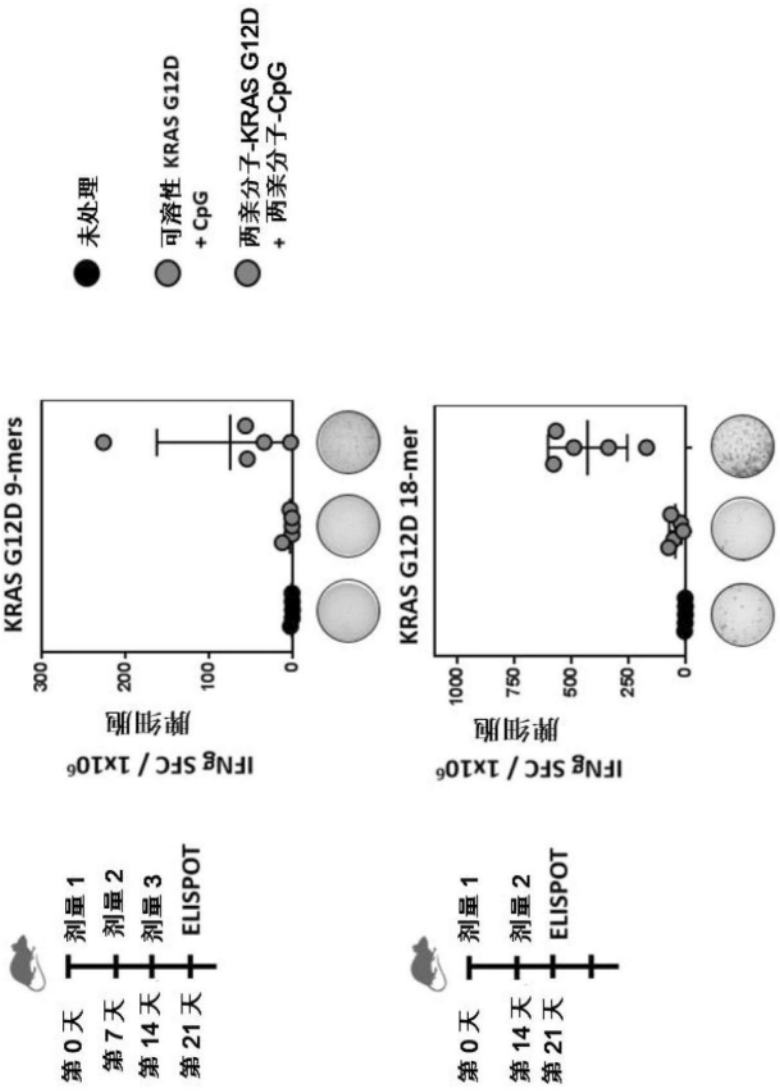

未处理
可溶性 KRAS G12D + CpG
两亲分子-KRAS G12D + 两亲分子-CpG
KRAS G12D 9-mers
KRAS G12D 18-mer
IFNg SFC / 1x10^6 脾细胞
第 0 天
第 7 天
第 14 天
第 21 天
剂量 1
剂量 2
剂量 3
ELISPOT

图4

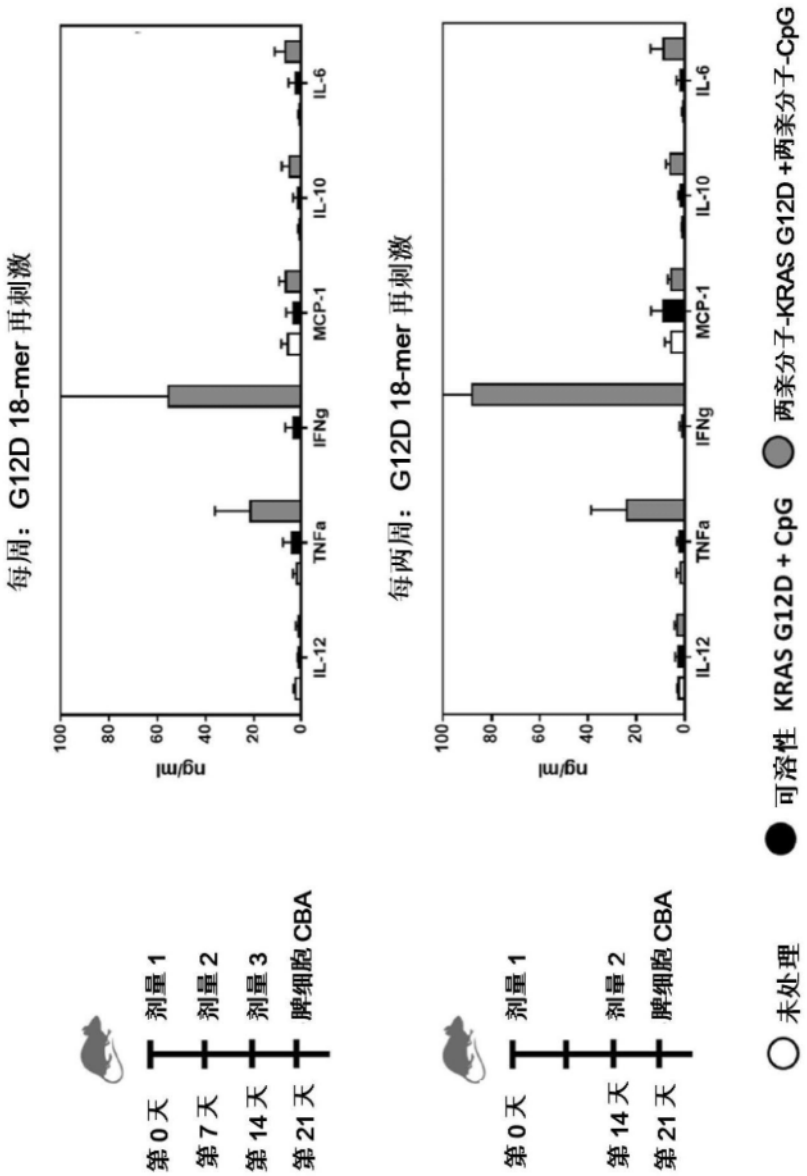

每周：G12D 18-mer 再刺激
每两周：G12D 18-mer 再刺激
ng/ml
IL-12
TNFa
IFNg
MCP-1
IL-10
IL-6
第0天
第7天
第14天
第21天
剂量1
剂量2
剂量3
脾细胞 CBA
未处理
可溶性 KRAS G12D + CpG
两亲分子-KRAS G12D +两亲分子-CpG

图5

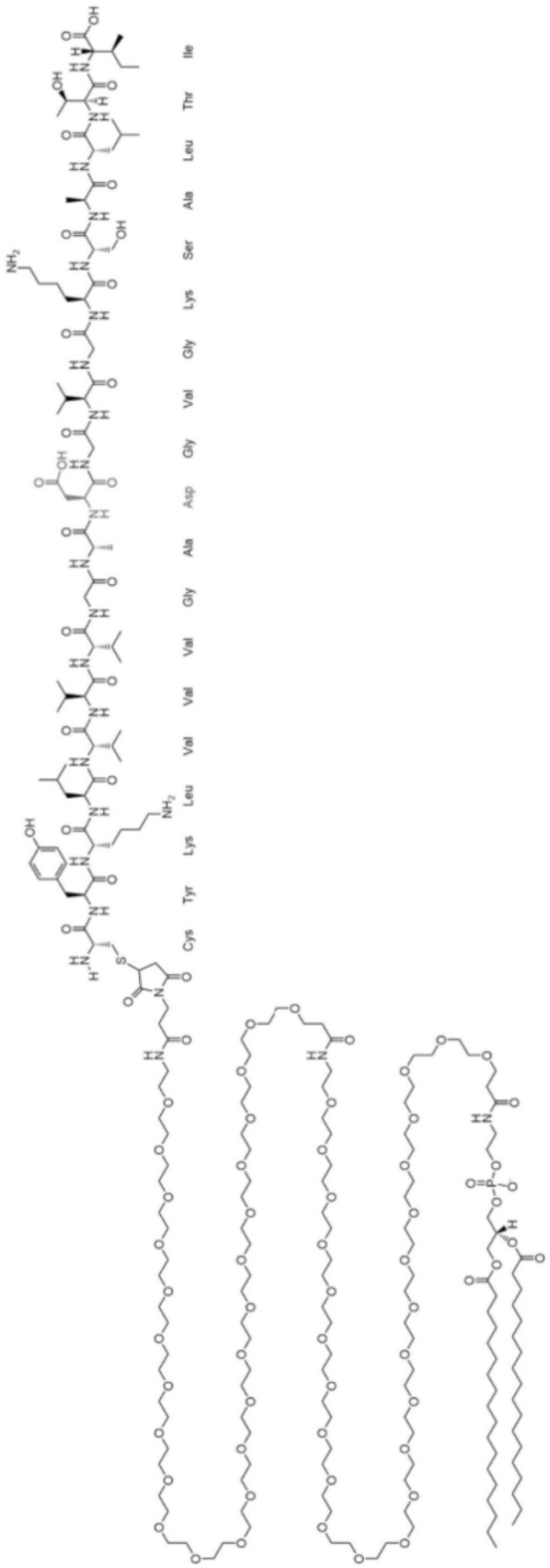

Ile
Thr
Leu
Ala
Ser
Lys
Gly
Val
Gly
Asp
Ala
Gly
Val
Val
Val
Leu
Lys
Tyr
Cys

图6

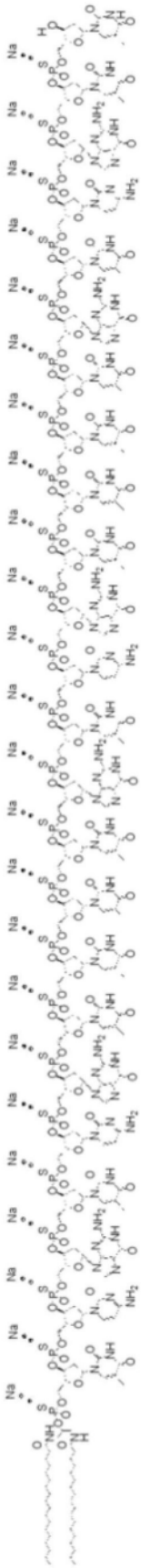


图7