(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114585384 A
(43)申请公布日 2022.06.03

(21)申请号 202080065820.2
(22)申请日 2020.07.27
(30)优先权数据
62/879,028 2019.07.26 US
63/050,091 2020.07.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/043705 2020.07.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/021713 EN 2021.02.04
(71)申请人 米纳治疗有限公司
地址 英国伦敦
申请人 威斯特解剖及生物研究所
(72)发明人 D·加布里洛维奇 R·哈比卜 V·里比
(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 付文川
(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

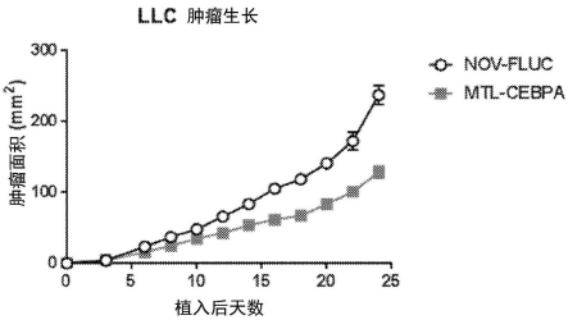
权利要求书2页 说明书33页
序列表4页 附图7页

(54)发明名称

使用C/EBPα saRNA的组合物和方法

(57)摘要

本公开涉及一种药物组合物,其包含靶向C/EBPα的saRNA和至少一种其他活性剂。还提供了使用所述药物组合物的方法。



CN 114585384 A

1.一种阻断有此需要的受试者中MDSC或TAM对T细胞增殖的抑制活性的方法,其包括向所述受试者施用合成的分离的saRNA,其中所述saRNA包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述saRNA是双链的并且进一步包含有义链。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述saRNA的有义链包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的序列。

4.如权利要求3所述的方法,其中CEBPA-51用脂质体进行递送。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述脂质体是NOV340 Smarticle。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述T细胞增殖被上调至少20%、50%、100%、2倍、3倍、4倍或5倍。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有肺癌或结肠癌。

9.一种上调有此需要的受试者细胞中的C/EBPα基因表达的方法,其中所述细胞是单核细胞髓源性抑制细胞(MDSC)或肿瘤相关巨噬细胞(TAM),所述方法包括向所述细胞施用合成的分离的saRNA,其中所述saRNA包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述saRNA是双链的并且进一步包含有义链。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述saRNA的有义链包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的序列。

12.如权利要求11所述的方法,其中CEBPA-51用脂质体进行递送。

13.如权利要求12所述的方法,其中所述脂质体是NOV340 Smarticle。

14.如权利要求9所述的方法,其中所述C/EBPα基因的表达被上调至少20%、50%、100%、2倍、3倍、4倍或5倍。

15.如权利要求9所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤。

16.如权利要求9所述的方法,其中所述受试者患有肺癌或结肠癌。

17.一种降低有此需要的受试者细胞中的靶基因表达的方法,其包括向所述细胞施用合成的分离的saRNA,其中所述saRNA包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链,其中所述靶基因是ARG1、iNOS、S100A8或S100A9。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述saRNA是双链的并且进一步包含有义链。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述saRNA的有义链包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的序列。

20.如权利要求19所述的方法,其中CEBPA-51用脂质体进行递送。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述脂质体是NOV340 Smarticle。

22.如权利要求17所述的方法,其中所述靶基因表达降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%。

23.如权利要求17所述的方法,其中所述细胞是MDSC或TAM。

24.如权利要求17所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤。

25.如权利要求18所述的方法,其中所述受试者患有肺癌或结肠癌。

26.一种将合成的分离的saRNA递送至有此需要的受试者的髓样细胞的方法,其中所述saRNA包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链,所述方法包括用脂质体配制所述

saRNA。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述saRNA是双链的并且进一步包含有义链。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述saRNA的有义链包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的序列。

29.如权利要求26所述的方法,其中所述脂质体是NOV340 Smarticle。

30.如权利要求26所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤。

31.如权利要求26所述的方法,其中所述受试者患有肺癌或结肠癌。

32.一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,其包括向细胞施用合成的分离的saRNA和其他活性剂,其中所述saRNA包含具有序列SEQ ID No.1(CEBPA-51)的反义链,并且其中所述其他活性剂是CTLA-4抑制剂、COX2抑制剂或FATP2抑制剂。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述saRNA是双链的并且进一步包含有义链。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述saRNA的有义链包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的序列。

35.如权利要求32所述的方法,其中CEBPA-51用脂质体进行递送。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述脂质体是NOV340 Smarticle。

37.如权利要求32所述的方法,其中所述CTLA-4抑制剂是CTLA-4抗体。

38.如权利要求32所述的方法,其中所述COX2抑制剂是塞来昔布。

39.如权利要求32所述的方法,其中所述FATP2抑制剂是lipofermata。

40.如权利要求32所述的方法,其中所述受试者患有肺癌或结肠癌。

使用C/EBPα saRNA的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年7月26日提交的名称为COMPOSITIONS AND METHODS OF USING C/EBP ALPHA SARNA的美国临时申请号62/879,028和2020年7月9日提交的名称为COMPOSITIONS AND METHODS OF USING C/EBP ALPHA SARNA的美国临时申请号63/050,091的优先权,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请与电子格式的序列表一同提交。以ASCII格式提交的序列表名称为2058-1027PCT_SL.txt,创建于2020年7月27日,且大小为6,725字节。序列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及用于调节C/EBPα和C/EBPα途径的多核苷酸(尤其是saRNA)、组合物以及在治疗应用中使用所述组合物的方法。

背景技术

[0006] 髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell,MDSC)与嗜中性粒细胞和单核细胞密切相关。MDSC由以下名称的两大组细胞组成:粒细胞的或多形核的(PMN-MDSC),其在表型和形态上与嗜中性粒细胞相似;和单核细胞的(M-MDSC)—在表型和形态上与单核细胞相似。已发现MDSC细胞是肿瘤进展的重要贡献因素。它们在癌症中的免疫抑制以及肿瘤血管生成、耐药性和促进肿瘤转移中发挥关键作用。

[0007] 肿瘤免疫抑制是MDSC的一个重要特征。MDSC参与抑制免疫系统的不同细胞,其中T细胞是主要靶标。MDSC介导的免疫抑制涉及的主要因素包括精氨酸酶(ARG1)、iNOS、TGFβ、IL-10、COX2、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)对半胱氨酸的隔离、T细胞导致的L-选择素(L-selectin)表达降低和其他许多因素。除了肿瘤免疫抑制外,MDSC还通过影响肿瘤微环境和肿瘤血管生成来促进肿瘤进展。因此,需要调控MDSC和抑制涉及MDSC的免疫抑制。

发明内容

[0008] 本公开提供了一种阻断有此需要的受试者中的MDSC或TAM对T细胞增殖的抑制活性的方法,其包括向受试者施用合成的分离的saRNA。所述saRNA可以包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)的序列的反义链。

[0009] 本公开还提供了一种上调有此需要的受试者的细胞中的C/EBPα基因表达的方法,其中所述细胞是单核细胞髓源性抑制细胞(MDSC)或肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophage,TAM),其包括向细胞施用合成的分离的saRNA。saRNA可以包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)的序列的反义链。

[0010] 本公开还提供了一种降低有此需要的受试者的细胞中的靶基因表达的方法,其包括向细胞施用合成的分离的saRNA。saRNA可以包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)的序列的

反义链,其中靶基因是ARG1、iNOS、S100A8或S100A9。

[0011] 本公开还提供了一种将合成的分离的saRNA递送至有此需要的受试者的髓样细胞(myeloid cell)的方法,其包括用脂质体配制saRNA。saRNA可以包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)的序列的反义链。

[0012] 本公开还提供了一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,其包括向细胞施用合成的分离的saRNA,其中受试者进一步接受CTLA-4抑制剂、COX2抑制剂、FATP2抑制剂或其组合。saRNA可以包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)的序列的反义链。

[0013] 本公开的多个实施方案的细节在下文的描述中阐述。本公开的其他特征、目的和优势将从描述和附图以及权利要求中变得显而易见。

[0014] 附图简要说明

[0015] 图1显示了LLC肿瘤模型中在MTL-CEBPA治疗后的肿瘤面积。

[0016] 图2A显示了MTL-CEBPA治疗后的CEBPA表达。

[0017] 图2B显示了MTL-CEBPA治疗后的Arg1和iNOS基因表达。

[0018] 图3A显示了MTL-CEBPA治疗后的M-MDSC细胞与未经MTL-CEBPA治疗的M-MDSC细胞相比导致的%T细胞增殖变化。

[0019] 图3B显示了MTL-CEBPA治疗后的TAM细胞与未经MTL-CEBPA治疗的M-MDSC细胞相比导致的%T细胞增殖变化。

[0020] 图4是对使用MC38肿瘤模型的研究的总结。

[0021] 图5A显示了MC38肿瘤模型中在MTL-CEBPA治疗后的肿瘤面积。

[0022] 图5B显示了M-MDSC细胞导致的T细胞增殖变化。

[0023] 图5C显示了TAM细胞导致的T细胞增殖变化。

[0024] 图6是对实施例3中研究的总结。

[0025] 图7A显示了LLC肿瘤模型中在单剂治疗(single agent treatment)(MTL-CEBPA或CTLA4 Ab)和MTL-CEBPA+CTLA4 Ab组合治疗(combo treatment)后的肿瘤面积。

[0026] 图7B显示了LLC肿瘤模型中在单剂治疗(MTL-CEBPA或塞来昔布(Celecoxib))和MTL-CEBPA+塞来昔布组合治疗后的肿瘤面积。

[0027] 图8是对实施例4中研究的总结。

[0028] 图9显示了LLC肿瘤模型中在单剂治疗(MTL-CEBPA或Lipofermata)和MTL-CEBPA+Lipofermata组合治疗后的肿瘤生长。

具体实施方式

[0029] 本公开提供了用于靶向C/EBPα转录物的核酸构建体的组合物和试剂盒以及使用这些组合物和试剂盒的方法。

[0030] CCAAT/增强子结合蛋白α(C/EBPα、C/EBP alpha、C/EBP A或CEBPA)是一种亮氨酸拉链蛋白(leucine zipper protein),从人到大鼠均是保守的。该核转录因子富含于肝细胞、骨髓单核细胞、脂肪细胞以及其他类型的乳腺上皮细胞[Lekstrom-Himes等人,J.Bio.Chem,vol.273,28545-28548(1998)]。C/EBPα蛋白已知是代谢过程和细胞增殖的关键调节剂。调节C/EBPα基因具有巨大的治疗目的潜力。本公开提供靶向C/EBPα转录物的核酸构建体,其中所述核酸构建体可以包括具有或不具有修饰的单链或双链DNA或RNA。

[0031] 如本文所用,C/EBPα基因是包含编码链和模板链的双链DNA。在本申请中,它也可以被称为靶基因。

[0032] 术语“C/EBPα转录物”、“C/EBPα靶转录物”或“靶转录物”在上下文中可以是编码C/EBPα蛋白的C/EBPαmRNA。C/EBPαmRNA从C/EBPα基因的模板链转录而来,并可以存在于线粒体中。

[0033] 从C/EBPα基因的编码链转录的C/EBPα基因的反义RNA在下文中称为靶反义RNA转录物。靶反义RNA转录物可以是长的非编码反义RNA转录物。

[0034] 术语“小激活RNA”、“短激活RNA”或“saRNA”在本公开的上下文中意指上调特定基因的表达或对其具有正向作用的单链或双链RNA。saRNA可以是14至30个核苷酸的单链。saRNA也可以是双链,每条链包含14至30个核苷酸。该基因称为saRNA的靶基因。上调C/EBPα基因表达的saRNA称为“C/EBPα-saRNA”,并且C/EBPα基因是C/EBPα-saRNA的靶基因。

[0035] 术语“靶”或“靶向”在上下文中意指对C/EBPα基因有影响。该影响可以是直接的或间接的。直接影响可以由与C/EBPα靶反义RNA转录物完全或部分杂交引起。间接影响可以是上游或下游的。

[0036] C/EBPα-saRNA可以对生物学过程或活性具有下游影响。在此类实施方案中,C/EBPα-saRNA可以对第二、非靶转录物具有影响(上调或下调)。

[0037] 术语“基因表达”在上下文中可以包括从C/EBPα基因产生C/EBPαmRNA的转录步骤或从C/EBPαmRNA产生C/EBPα蛋白的翻译步骤。C/EBPαmRNA的增加和C/EBPα蛋白的增加均表明C/EBPα基因表达的增加或正向影响。

[0038] 基因的“上调”或“激活”意指观察到基因表达水平,或基因编码的多肽水平或其活性,或从上述基因的模板链转录的RNA转录物水平增加,高于在缺少本公开的saRNA时的水平。基因的“下调”或“抑制”意指观察到基因表达水平,或基因编码的多肽水平或其活性,或从上述基因的模板链转录的RNA转录物水平减少,低于在缺少本公开的saRNA时的水平。本公开的saRNA可以对靶基因的表达具有直接或间接的上调或下调作用。

[0039] 在一个实施方案中,本公开的saRNA可以在正在增殖的细胞中显示功效。如本文关于细胞所用,“增殖”意指迅速生长和/或增殖的细胞。

[0040] I、本公开的组合物

[0041] 本公开的一个方面提供了药物组合物,其包含上调CEBPA基因的saRNA和至少一种药学上可接受的载体。这样的saRNA在下文中称为“C/EBPα-saRNA”或“本公开的saRNA”,它们在本申请中可互换使用。

[0042] C/EBPα-saRNA具有14-30个核苷酸,并包含与C/EBPα基因模板链上所靶向的序列至少80%、90%、95%、98%、99%或100%互补的序列。所靶向的序列可以具有与saRNA和/或saRNA的反向互补序列相同的长度,即相同的核苷酸数。saRNA、靶基因、靶基因的编码链、靶基因的模板链、所靶向的序列/靶位点和转录起始位点(transcription start site,TSS)之间的关系如图1所示。

[0043] 在一些实施方案中,所靶向的序列包含至少14个且少于30个核苷酸。

[0044] 在一些实施方案中,所靶向的序列具有19个、20个、21个、22个或23个核苷酸。

[0045] 在一些实施方案中,所靶向的序列的位置位于模板链的启动子区域内。

[0046] 在一些实施方案中,C/EBPα-saRNA的靶向序列位于C/EBPα基因的模板链的TSS(转

录起始位点)核心内。如本文所用,“TSS核心”或“TSS核心序列”是指TSS(转录起始位点)上游2000个核苷酸与下游2000个核苷酸之间的区域。因此,TSS核心包含4001个核苷酸,并且TSS位于距TSS核心序列5’末端的位置2001。CEBPA TSS核心序列如下表所示:

[0047]

CEBPA mRNA 参考编号	CEBPA 蛋白参考编号	CEBPA TSS 核心基因组位置	CEBPA TSS 核心序列 ID No.
NM_001285829	NP_001272758	chr19:33302564 负链	SEQ ID No. 3
NM_001287424	NP_001274353		
NM_001287435	NP_001274364		
NM_004364	NP_004355		

[0048] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS的上游1000个核苷酸和下游1000个核苷酸之间。

[0049] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS的上游500个核苷酸和下游500个核苷酸之间。

[0050] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS的上游250个核苷酸和下游250个核苷酸之间。

[0051] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS的上游100个核苷酸和下游100个核苷酸之间。

[0052] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS核心中TSS的上游。所靶向的序列可以在TSS上游少于2000个、少于1000个、少于500个、少于250个或少于100个核苷酸处。

[0053] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS核心中TSS的下游。所靶向的序列可以在TSS下游少于2000个、少于1000个、少于500个、少于250个或少于100个核苷酸处。

[0054] 在一些实施方案中,所靶向的序列位于TSS核心的TSS周围+/-50个核苷酸处。在一些实施方案中,所靶向的序列与TSS核心的TSS基本重叠。在一些实施方案中,所靶向的序列在TSS核心的TSS开始或结束。在一些实施方案中,所靶向的序列与TSS核心的TSS在上游或下游方向重叠1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个核苷酸。

[0055] 所靶向的序列在模板链上的位置由所靶向的序列的5’末端的位置限定。所靶向的序列的5’末端可以在TSS核心的任何位置,并且所靶向的序列可以在选自TSS核心的位置1至位置4001的任何位置开始。作为本文的参照,当所靶向的序列的5’最末端是从TSS核心的位置1到位置2000时,认为所靶向的序列在TSS的上游,并且当所靶向的序列的5’最末端是从位置2002到4001时,认为所靶向的序列在TSS的下游。当所靶向的序列的5’最末端是在核苷酸2001时,认为所靶向的序列是TSS中心序列,并且既不在TSS的上游也不在其下游。

[0056] 为了进一步参照,例如,当所靶向的序列的5’末端在TSS核心的位置1600处时,即它是TSS核心的第1600个核苷酸时,则所靶向的序列在TSS核心的位置1600处开始并认为在TSS上游。

[0057] 在一个实施方案中,本发明的saRNA可以具有形成双链体(duplex)的两条链,一条链为引导链(guide strand)。saRNA双链体也称为双链saRNA。如本文所用,双链saRNA或

saRNA双链体是包括多于一条且优选两条链的saRNA,其中链间杂交可形成双链体结构的区域。双链saRNA的两条链被称为反义链或引导链以及有义链或过客链(passenger strand)。

[0058] 在一些实施方案中,C/EBPα-saRNA可以包含在MiNA Therapeutics Limited的WO2015/075557或WO2016/170349中公开的任何C/EBPα-saRNA,其每一个的内容通过引用以其整体并入本文,例如WO2016/170349中公开的表1、表1A、表3-1和表3-2中的saRNA,AW51和CEBPA-51。

[0059] 在一些实施方案中,C/EBPα-saRNA可以被修饰并且可以包含在MiNA Therapeutics Limited的WO2016/170349中公开的任何修饰。

[0060] 在一个实施方案中,C/EBPα-saRNA是CEBPA-51(或CEBPA51),其是上调C/EBPα的saRNA双链体。它的设计、序列和组合物/制剂在MiNA Therapeutics Limited的WO2016/170349的具体实施方案和实施例中公开。CEBPA-51的有义和反义链的序列如表1所示。

[0061] 表1:CEBPA-51(CEBPA51)序列

[0062]

反义	GACCAGUGACAAUGACCGCmUmU	SEQ ID No. 1
有义	(invabasic)mGmCGmGUCAUUmGUCAm CUGGUCmUmU	SEQ ID No. 2

[0063] mU、mG和mC意指2'-O-甲基修饰的U、G和C。

[0064] invabasic=倒置的非碱基糖盖(inverted abasis sugar cap)。

[0065] 链的比对如表2所示。

[0066] 表2:CEBPA-51的链的比对

[0067]

saRNA 名称	CEBPA-51 总碱基:21 mer,包括碱基修饰						
mer	3	6	9	12	15	18	21
有义链 5'→3' (SEQ ID No. 2)	bmGm CG	mGU C	AUU	mGU C	AmC U	GGU	CmUm U
互补的 反义链 3'→5' (SEQ ID No. 1)	mUmU C	GCC	AGU	AAC	AGU	GAC	CAG

[0068]

符号定义:A、U、G、C 是 2'-OH 核糖核苷酸,mU、mG、mC 是 2'-O-甲基核糖核苷酸, b= 倒置的非碱基糖盖。

[0069] 将CEBPA-51包封到脂质体(Marina Biotech拥有的NOV340 SMARTICLES®技术)中以制备MTL-CEBPA。NOV340 SMARTICLES®的脂质组分包括1-棕榈酰基-2-油酰基-

sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,POPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,DOPE)、胆固醇基-半琥珀酸酯(cholesteryl-hemisuccinate,CHEMS)和4-(2-氨基乙基)-吗啉代-胆固醇半琥珀酸酯(4-(2-aminoethyl)-morpholino-cholesterol hemisuccinate,MOCHOL)。NOV340SMARTICLES®由POPC、DOPE、CHEMS和MOCHOL组成,摩尔比为6:24:23:47。这些纳米颗粒在生理pH下是阴离子的,并且它们的具体脂质比率赋予脂质体"pH可调"的特性和根据微环境的周围pH而改变的电荷,以促进移动跨过生理膜。SMARTICLES®纳米颗粒的大小被调整以避免广泛的即刻肝阻隔作用,平均直径大致为约50-约150nm或约100-约120nm,这有助于i.v.注射后更加延长的全身分布并改善血清稳定性,从而导致报告的更广泛的组织分布以及在肝脏、脾脏和骨髓中的高水平。

[0070] MTL-CEBPA还包含形成缓冲剂的赋形剂,例如蔗糖和磷酸盐。MTL-CEBPA(2.5mg/ml)的定性和定量组成如表3所示。

[0071] 表3:MTL-CEBPA组成

[0072]

成分名称	功能	参考	量 (每 ml)
CEBPA-51 (saRNA)	活性药物成分	制造商的规范	2.5 mg/ml
1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(POPC)	成膜脂质	制造商的规范	4.65 mg/ml
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)	成膜的促融脂质	制造商的规范	18.0 mg/ml
胆固醇基-半琥珀酸酯(CHEMS)	阴离子两性脂质	制造商的规范	11.3 mg/ml

[0073]

成分名称	功能	参考	量 (每 ml)
胆固醇基-4-[[2-(4-吗啉基)乙基]氨基]-4-氧代丁酸酯(MOCHOL)	阳离子两性脂质	制造商的规范	27.0 mg/ml
蔗糖	冷冻保护剂，渗透浓度控制	BP, JP, NF, EP	92.4 mg/ml
磷酸氢二钾，二水合物	缓冲剂 pH 调节	BP, USP, EP	1.44 mg/ml
磷酸二氢钾	缓冲剂 pH 调节	EP, BP, NF	0.2 mg/ml
氯化钾 (KCl)	离子强度调节剂	EP, BP, USP	0.2 mg/ml
注射用水 (WFI)	溶剂	WFI (USP, EP)	qs 1 ml

[0074] 施用

[0075] C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物，例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA，可以通过任何产生治疗有效结果的途径施用。这些途径包括但不限于肠内、胃肠、硬膜外(epidural)、经口、经皮、硬膜外(epidural，peridural)、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、表皮的(施加到皮肤上)、皮内(进入皮肤本身)、皮下(皮肤下)、经鼻施用(通过鼻子)、静脉内(进入静脉)、动脉内(进入动脉)、肌内(进入肌肉)、心内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管)、腹膜内(输注或注射入腹膜)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼睛)、海绵体内注射(进入阴茎基部)、阴道内施用、子宫内、羊膜外施用、透皮(扩散穿过完整的皮肤以进行全身分布)、经粘膜(扩散穿过粘膜)、吹入(鼻吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼(到结膜上)或滴入耳。在具体的实施方案中，可以以允许组合物穿过血脑屏障、血管屏障或其他上皮屏障的方式施用组合物。2012年12月14日提交的国际公开WO 2013/090648中公开的施用途径可以用于施用本公开的saRNA，其内容通过引用以其整体并入本文。

[0076] 给药

[0077] 在一些实施方案中，每天一次、每2天一次、每3天一次、每4天一次或每5天一次施用C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物，例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。

[0078] 在一些实施方案中，向受试者施用至少两个剂量的C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物，例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。受试者可以患有肝脏疾病，例如肝癌、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪变性、肝损害、肝功能衰竭或肝纤维化。剂量间隔少于7天。在一个实施方案中，每24小时施用一次CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。在一个实施方案中，每48小时施用一次CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。

[0079] 在一些实施方案中，患者接受至少2剂，例如3剂、4剂、5剂、6剂、7剂、8剂、9剂或10剂C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物，例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。

[0080] 在一些实施方案中，施用C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物(例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA)至少2天的时间，例如3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、2周、3周、4周、5周或6周。

[0081] 在一个实施方案中，每24小时施用CEBPA-51和/或MTL-CEBPA，持续时间为至少2天，例如3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、2周、3周、4周、5周或6周。

[0082] 在一个实施方案中，每48小时施用CEBPA-51和/或MTL-CEBPA，持续时间为至少2天，例如3天、4天、5天、6天、1周、8天、9天、10天、2周、3周、4周、5周或6周。

[0083] 在一些实施方案中，通过静脉内输注在60分钟内施用C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物，例如CEBPA-51和/或MTL-CEBPA。剂量在约20至约160mg/m^2之间。

[0084] 本申请中公开的给药方案可以应用于任何可以用C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA组合物治疗的适应症或病症。

[0085] II.使用方法

[0086] 本公开的一个方面提供了使用C/EBPα-saRNA和包含所述C/EBPα-saRNA和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物的方法。C/EBPα-saRNA调节C/EBPα基因表达。在一个实施方案中，与不存在本公开的saRNA时C/EBPα基因的表达相比，C/EBPα基因的表达在存在本公开的saRNA时增加至少20％、30％、40％，更优选至少45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％，甚至更优选至少80％。在另一个优选的实施方案中，与不存在本公开的saRNA时C/EBPα基因的表达相比，C/EBPα基因的表达在存在本公开的saRNA时增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍，更优选增加至少15、20、25、30、35、40、45、50倍，甚至更优选至少60、70、80、90、100倍。

[0087] 在一个实施方案中，本文所述的saRNA的基因表达增加显示在正在增殖的细胞中。

[0088] 过度增殖性病症(hyperproliferation disorder)

[0089] 在本公开的一个实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于减少过度增殖性细胞的细胞增殖。过度增殖性细胞的实例包括癌细胞，例如上皮癌(carcinomas)、肉瘤、淋巴瘤和母细胞瘤。此类癌细胞可以是良性或恶性的。过度增殖性细胞可以是由自身免疫性病况引起的，例如类风湿性关节炎、炎性肠病或银屑病。过度增殖性细胞也可以在接触致敏原的具有过度敏感性免疫系统的患者体内产生。这类涉及过度敏感性免疫系统的病况包括但不限于哮喘、过敏性鼻炎、湿疹和过敏反应，例如变应性过敏反应。在一个实施方案中，肿瘤细胞发育和/或生长得到抑制。在一个优选的实施方案中，实体瘤细胞增殖得到抑制。在另一个优选的实施方案中，肿瘤细胞的转移得以防止。在另一个优选的实例中，未分化的肿瘤细胞增殖得到抑制。

[0090] 抑制细胞增殖或减少增殖意指增殖减少或完全停止。因此，“减少增殖”是“抑制增殖”的一个实施方案。与用本公开的saRNA处理之前所述细胞的增殖相比，或与等同(equivalent)的未经处理的细胞的增殖相比，细胞的增殖在存在本公开的saRNA时减少至少20％、30％或40％，或优选至少45％、50％、55％、60％、65％、70％或75％，甚至更优选至少80％、90％或95％。在过度增殖性细胞中细胞增殖得以抑制的实施方案中，“等同”细胞也是过度增殖性细胞。在优选的实施方案中，降低增殖至与等同的健康(非过度增殖性)细胞

的增殖速率相当的速率。另一方面来看，“抑制细胞增殖”的一个优选实施方案是抑制过度增殖或调节细胞增殖以达到正常的健康的增殖水平。

[0091] 在一个非限制性实例中，C/EBPα-saRNA用于减少白血病和淋巴瘤细胞的增殖。优选地，细胞包括Jurkat细胞(急性T细胞淋巴瘤细胞系)、K562细胞(红白血病细胞系)、U373细胞(胶质母细胞瘤细胞系)和32Dp210细胞(髓样白血病细胞系)。

[0092] 在另一个非限制性实例中，C/EBPα-saRNA用于减少卵巢癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、大鼠肝癌细胞和胰岛素瘤细胞的增殖。优选地，细胞包括PEO1和PEO4(卵巢癌细胞系)、HepG2(肝细胞癌细胞系)、Panc1(人胰腺癌细胞系)、MCF7(人乳腺腺癌细胞系)、DU145(人转移性前列腺癌细胞系)、大鼠肝癌细胞和MIN6(大鼠胰岛素瘤细胞系)。

[0093] 在另一个非限制性实例中，C/EBPα-saRNA与靶向C/EBPβ基因的siRNA组合使用，以减少肿瘤细胞增殖。肿瘤细胞可以包括肝细胞癌细胞，例如HepG2细胞，和乳腺癌细胞，例如MCF7细胞。

[0094] 在一个实施方案中，本公开的saRNA用于治疗过度增殖性病症。肿瘤和癌症代表特别令人关注的过度增殖性病症，并且包括所有类型的肿瘤和癌症，例如实体瘤和血液学癌症。癌症的实例包括但不限于子宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、胆囊癌、肝癌、头颈癌、鳞状细胞癌、胃肠道癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病(如急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病和慢性髓性白血病)、脑癌(例如星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤)、神经母细胞瘤、肉瘤、结肠癌、直肠癌(rectum cancer)、胃癌、肛门癌(anal cancer)、膀胱癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、淋巴瘤、视网膜母细胞瘤、Wilm瘤、尤因肉瘤、黑色素瘤和其他皮肤癌。肝癌可包括但不限于胆管上皮癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤或肝细胞癌(HCC)。尤其考虑肝癌。

[0095] 原发性肝癌是全球第五大最常见的癌症，同时也是癌症相关死亡的第三大最常见原因。HCC代表了绝大多数原发性肝癌[El-Serag等人，Gastroenterology，vol.132(7)，2557-2576(2007)，其内容以其整体公开于此]。HCC受涉及癌细胞生物学、免疫系统和不同病因(病毒、毒性和一般病因)的多种因素相互作用的影响。大多数HCC患者是从肝硬化的背景发展为恶性肿瘤。当前，大多数患者在晚期才被诊断出，因此大多数HCC患者的5年生存率仍然令人沮丧。手术切除、局部区域消融和肝移植是目前仅有的可能治愈HCC的治疗选择。但是，基于对个体肝功能和肿瘤负荷的评估，只有约5-15％的患者符合手术干预的条件。C/EBP转录因子家族的结合位点存在于许多基因的启动子区域，这些基因参与维持正常肝细胞功能和对损伤的应答(包括白蛋白、白介素6应答、能量稳态、鸟氨酸循环调控和血清淀粉样蛋白A表达)。本公开利用C/EBPα-saRNA来调节C/EBPα基因表达并治疗肝硬化和HCC。

[0096] 本公开的方法可以使肿瘤体积减少至少10、20、30、40、50、60、70、80或90％。优选地，抑制一个或多个新肿瘤的形成，例如根据本公开治疗的受试者形成更少和/或更小的肿瘤。更少的肿瘤意指在一定的时间段内，他比等同受试者形成更少数目的肿瘤。例如，他比等同对照(未治疗)受试者少形成至少1、2、3、4或5个肿瘤。更小的肿瘤意指该肿瘤的重量和/或体积比等同受试者的肿瘤小至少10、20、30、40、50、60、70、80或90％。本公开的方法将肿瘤负荷降低至少10、20、30、40、50、60、70、80或90％。

[0097] 所述一定的时间段可以是任何合适的时间段，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个月

或多年。

[0098] 在一个非限制性实例中，提供了一种治疗未分化肿瘤的方法，包括使细胞、组织、器官或受试者与本公开的C/EBPα-saRNA接触。与分化的肿瘤相比，未分化的肿瘤的预后通常较差。由于肿瘤的分化程度与预后有关，因此假设使用有分化作用的生物制剂可能是一种有益的抗增殖药。已知C/EBPα恢复急性髓性白血病中的髓样分化并防止造血细胞过度增殖。优选地，可以用C/EBPα-saRNA治疗的未分化的肿瘤包括未分化的小细胞肺癌、未分化的胰腺腺癌、未分化的人胰腺癌、未分化的人转移性前列腺癌和未分化的人乳腺癌。

[0099] 在一个非限制性实例中，将C/EBPα-saRNA复合为PAMAM树状聚合物(dendrimer)，称为C/EBPα-saRNA-树状聚合物，用于体内靶向递送。如实施例1所示，在临床相关的大鼠肝肿瘤模型中，证明了静脉内注射的C/EBPα-saRNA-树状聚合物的治疗效果。在以48小时间隔尾静脉注射三个剂量后，治疗的肝硬化大鼠在一周内显示出血清白蛋白水平显著升高。在C/EBPα-saRNA树状聚合物治疗组中，肝肿瘤负荷显著降低。这项研究首次证明，可通过全身静脉内施用使用小激活RNA分子的基因靶向，以同时改善患有HCC的肝硬化大鼠的肝功能并减轻其肿瘤负荷。

[0100] 在一个实施方案中，C/EBPα-saRNA用于调控癌基因和肿瘤抑制基因。优选地，可以是下调癌基因的表达。与不存在本公开的C/EBPα-saRNA时的表达相比，在本公开的C/EBPα-saRNA存在时癌基因的表达降低至少20、30、40％，更优选至少45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95％。在另一个优选的实施方案中，与不存在本公开的C/EBPα-saRNA时的表达相比，存在本公开的C/EBPα-saRNA时癌基因的表达降低至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍，更优选至少15、20、25、30、35、40、45、50倍，甚至更优选至少60、70、80、90、100倍。优选地，可以抑制肿瘤抑制基因的表达。与不存在本公开的C/EBPα-saRNA时的表达相比，存在本公开的C/EBPα-saRNA时肿瘤抑制基因的表达增加至少20、30、40％，更优选至少45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95％，甚至更优选至少100％。在另一个优选的实施方案中，与不存在本公开的C/EBPα-saRNA时的表达相比，存在本公开的C/EBPα-saRNA时肿瘤抑制基因的表达增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍，更优选至少15、20、25、30、35、40、45、50倍，甚至更优选至少60、70、80、90、100倍。癌基因和肿瘤抑制基因的非限制性实例包括Bcl-2相关X蛋白(BAX)、BH3互作结构域死亡激动剂(BH3 interacting domain death agonist,BID)、胱天蛋白酶8(caspase 8,CASP8)、缺陷同源物2相互作用蛋白(disabled homolog 2-interacting protein,DAB21P)、在肝癌中缺失1(deleted in liver cancer 1,DLC1)、Fas表面死亡受体(FAS)、脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad,FHIT)、生长停滞和DNA损伤诱导型β(growth arrest and DNA-damage-inducible-beta,GADD45B)、刺猬因子相互作用蛋白(hedgehog interacting protein,HHIP)、胰岛素样生长因子2(IGF2)、淋巴样增强子结合因子1(lymphoid enhancer-binding factor 1,LEF1)、磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog,PTEN)、蛋白酪氨酸激酶2(PTK2)、视网膜母细胞瘤1(RB1)、runt相关转录因子3(runt-related transcription factor 3,RUNX3)、SMAD家族成员4(SMAD4)、细胞因子信号传导阻抑蛋白(3SOCS3)、转化生长因子β受体II(TGFBR2)、肿瘤坏死因子(配体)超家族成员10(TNFSF10)、P53、含解整联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白17(disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17,ADAM17)、v-akt鼠胸腺瘤病毒癌基因同源物1(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1,

AKT1)、血管生成素2(angiopoietin 2,ANGPT2)、B细胞CLL/淋巴瘤2(BCL2)、BCL2-样1(BCL2L1)、含杆状病毒IAP重复2(baculoviral IAP repeat containing 2,BIRC2)、含杆状病毒IAP重复5(BIRC5)、趋化因子(C-C基序)配体5(CCL5)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1,CCND1)、细胞周期蛋白D2(CCND2)、钙粘蛋白1(cadherin 1,CDH1)、钙粘蛋白13(CDH13)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1A(CDKN1A)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1B(CDKN1B)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白2A(CDKN2A)、CASP8和FADD样细胞凋亡调节剂(CASP8 and FADD-like apoptosis regulator,CFLAR)、连环蛋白(钙粘蛋白相关蛋白)β1(CTNNB1)、趋化因子受体4(CXCR4)、E2F转录因子1(E2F1)、表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、E1A结合蛋白p300(EP300)、Fas(TNFRSF6)相关死亡结构域蛋白(Fas(TNFRSF6)-associated via death domain,FADD),fms相关酪氨酸激酶1(FLT1)、卷曲家族受体7(frizzled family receptor 7,FZD7)、谷胱甘肽S-转移酶pi 1(glutathione S-transferase pi 1,GSTP1)、肝细胞生长因子(HGF)、哈维大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog,HRAS)、胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP1)、胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP3)、胰岛素受体底物1(IRS1)、整联蛋白β1(ITGB1)、激酶插入物结构域受体(kinase insert domain receptor,KDR)、髓样细胞白血病序列1(myeloid cell leukemia sequence 1,MCL1)、met原癌基因(MET)、mutS同源物2(MSH2)、mutS同源物3(MSH3)、异黏蛋白(metadherin,MTDH)、v-myc禽骨髓细胞瘤病病毒癌基因同源物(v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog,MYC)、B细胞中的κ轻链多肽基因增强子的核因子1(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1,NFKB1)、神经母细胞瘤RAS病毒(v-ras)癌基因同源物(NRAS)、阿片类结合蛋白/细胞粘附分子样(OPCML)、血小板源性生长因子受体α多肽(PDGFRA)、肽基脯氨酰顺/反异构酶NIMA相互作用1(peptidylprolyl cis/trans isomerase,NIMA-interacting 1,PIN1)、前列腺素-内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2,PTGS2)、包含PYD和CARD结构域(PYD and CARD domain containing,PYCARD)、与ras相关的C3肉毒杆菌毒素底物1(RAC1)、Ras关联(RalGDS/AF-6)结构域家族成员1(RASSF1)、络丝蛋白(reelin,RELN)、ras同源物家族成员A(RHOA)、分泌性卷曲相关蛋白2(SFRP2)、SMAD家族成员7(SMAD7)、细胞因子信号传导阻抑蛋白1(suppressor of cytokine signaling 1,SOCS1)、信号传导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)、转录因子4(TCF4)、端粒酶逆转录酶(TERT)、转化生长因子α(TGFA)、转化生长因子β1(TGFB1)、toll样受体4(TLR4)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(TNFRSF10B)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、Wilms肿瘤1(WT1)、X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis,XIAP)和Yes相关蛋白1(YAP1)。

[0101] 在一个实施方案中,提供了一种通过向有此需要的患者施用本公开的C/EBPα-saRNA来增加白细胞计数的方法。还提供了一种通过向患有败血症或慢性炎症疾病(例如,肝炎和肝硬化)的患者和免疫受损的患者(例如,接受化学疗法的患者)施用本公开的C/EBPα-saRNA来治疗所述患者的白血球减少症(leukopaenia)的方法。还提供了一种通过向有此需要的患者施用本公开的C/EBPα-saRNA来治疗包括白血病和淋巴瘤在内的前B细胞和B细胞恶性肿瘤的方法。还提供了一种通过向有此需要的患者施用本公开的C/EBPα-saRNA来动员白细胞、造血或间充质干细胞的方法。在一个实施方案中,与未经C/EBPα-saRNA治疗的患

者相比，用C/EBPα-saRNA治疗的患者中的白细胞计数增加至少50％、75％、100％，更优选至少1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5倍，更优选至少6、7、8、9、10倍。

[0102] 在一个实施方案中，C/EBPα-saRNA在肝细胞癌的治疗中用于调控微RNA(microRNA，miRNA或miR)。微RNA是调控基因表达的小的非编码RNA。它们参与重要的生理功能并且可能参与癌发生的每个单独步骤。它们通常具有21个核苷酸，并且通过与mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)结合而阻断所述mRNA翻译或诱导mRNA降解，从而在转录后水平上调控基因表达。

[0103] 在肿瘤中，miRNA表达的调控会影响肿瘤进展。在HCC中，如其他癌症中那样，miRNA作为癌基因或肿瘤抑制基因起作用，影响细胞生长和增殖、细胞代谢和分化、凋亡、血管生成、转移和最终的预后。[Lin等人，Biochemical and Biophysical Research Communications，vol.375，315-320(2008)；Kutay等人，J.Cell.Biochem.，vol.99，671-678(2006)；Meng等人，Gastroentero10gy，vol.133(2)，647-658(2007)，其每一个的内容通过引用以其整体并入本文]。本公开的C/EBPα-saRNA调节HCC细胞中的C/EBPα基因表达和/或功能，并且还调控miRNA水平。可以由本公开的C/EBPα-saRNA调控的miRNA的非限制性实例包括hsa-let-7a-5p、hsa-miR-133b、hsa-miR-122-5p、hsa-miR-335-5p、hsa-miR-196a-5p、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-184、hsa-miR-214-3p、hsa-miR-15a-5p、hsa-let-7b-5p、hsa-miR-205-5p、hsa-miR-181a-5p、hsa-miR-140-5p、hsa-miR-146b-5p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-134、hsa-let-7g-5p、hsa-let-7c、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-206、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-10b-5p、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-1、hsa-miR-150-5p、hsa-let-7i-5p、hsa-miR-27b-3p、hsa-miR-127-5p、hsa-miR-191-5p、hsa-let-7f-5p、hsa-miR-10a-5p、hsa-miR-15b-5p、hsa-miR-16-5p、hsa-miR-34a-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-128、hsa-miR-215、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-23b-3p、hsa-miR-203a、hsa-miR-30c-5p、hsa-let-7e-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-let-7d-5p、hsa-miR-9-5p、hsa-miR-181b-5p、hsa-miR-181c-5p、hsa-miR-20b-5p、hsa-miR-125a-5p、hsa-miR-148b-3p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-378a-3p、hsa-miR-130a-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-132-3p、hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-148a-3p、hsa-miR-138-5p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-135b-5p、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-181d、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-200c-3p、hsa-miR-7-5p、hsa-miR-29a-3p、hsa-miR-210、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-98-5p、hsa-miR-25-3p、hsa-miR-143-3p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-18a-5p、hsa-miR-125b-5p、hsa-miR-126-3p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-372、hsa-miR-149-5p和hsa-miR-32-5p。

[0104] 在一个非限制性实例中，miRNA是致癌的miRNA，并且与不存在C/EBPα-saRNA时相比，在存在本公开的C/EBPα-saRNA时miRNA被下调至少0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、1、1.5、2、2.5和3倍。在另一个非限制性实例中，所述miRNA是肿瘤抑制性miRNA，并且与不存在C/EBPα-saRNA时相比，在存在本公开的C/EBPα-saRNA时被上调至少0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、1倍，更优选至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍，更优选至少15、20、25、30、35、40、45、50倍，甚至更优选至少60、70、80、90、100倍。

[0105] 调控免疫系统

[0106] 肿瘤是体内由致癌突变引发的生长器官，并且包含不同的免疫细胞群体。肿瘤的

预后结果不仅取决于肿瘤的突变类型，还取决于肿瘤基质组分，尤其是免疫细胞。在一些实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于调控受试者的免疫系统和/或免疫细胞。

[0107] 在一些实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于调控MDSC。在癌症和慢性炎症中，骨髓和脾脏增加成熟和未成熟骨髓细胞的生成，这些细胞包括单核细胞和嗜中性粒细胞之间的系列细胞(spectrum)。在小鼠中，MDSC亚群PMN-MDSC和M-MDSC可以通过排除双联体(doublet)、门控活CD11b+细胞以及评估Ly6C和Ly6G细胞的比例来鉴定。朝向系列细胞的嗜中性粒细胞末端的小鼠MDSC(PMN-MDSC)显示出$CD11b^{+}Ly6C^{低}Ly6G^{+}$的典型表型，而朝向系列细胞的单核细胞末端的小鼠MDSC(M-MDSC)显示$CD11b^{+}Ly6C^{高}Ly6G^{-}$的典型表型。人PMN-MDSC显示出典型的$CD14^{-}CD11b^{-}CD15^{+}$(或$CD66b^{+}$)表型。人M-MDSC显示出典型的$CD11b^{+}CD14^{+}HLA\text{-}Dr^{低/-}CD15^{-}$表型。

[0108] MDSC的主要特征包括免疫抑制和肿瘤促进活性。尽管MDSC参与抑制免疫系统的不同细胞，但T细胞是MDSC的主要靶标。MDSC的免疫调节活性取决于氨基酸L-精氨酸和L-色氨酸的代谢消耗和转化，通过诱导型酶如精氨酸酶1(ARG1)、一氧化氮合酶2(NOS2/iNOS)的活性。与MDSC特征化相关的生物标志物包括转录因子和凋亡调节因子，例如IRF8、磷酸化-STAT3、CEBP/β、S100A8/9、RB、磷酸化-STAT5、ROR/RORC1、sXBP和CHOP；有助于免疫调节活性的基因和分子，例如ARG1、NOS2/NO、NOX2/ROS、PNT/RNS、VEGF、PGE和PD-L1；细胞因子和受体，例如IL-10、TGFβ和IL-4R(CD124)；GM-CSF、G-CSF、IL-13和IL-1。

[0109] 在一些实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于调控肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。TAM已被证明可以保护癌细胞免受抗肿瘤免疫应答，并且可以是肿瘤免疫检查点机制的重要因素。TAM表达程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、PD-L2、CD80和CD86，其在与免疫检查点受体、程序性细胞死亡蛋白1(PD1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)结合后限制CD8+ T细胞活性。从小鼠和人类肿瘤中分离出的巨噬细胞可以在体外直接抑制T细胞应答，并且TAM的耗减会增强接受化疗治疗的小鼠的乳腺肿瘤中的CD8+ T细胞介导的抗肿瘤免疫。因此，TAM是肿瘤中的免疫抑制细胞，其限制CD8+ T细胞诱导的抗肿瘤免疫反应。

[0110] 在一些实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于抑制受试者中包括M-MDSC和PMN-MDSC在内的MDSC或TAM的免疫抑制。例如，本公开的C/EBPα-saRNA，例如包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链的合成的分离的saRNA，可以降低受试者中MDSC或TAM对T细胞增殖的抑制活性。saRNA可以是双链的并且进一步包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的有义链。CEBPA-51可以与脂质体一同递送，例如NOV340 Smarticle。T细胞增殖可以被上调至少20％、50％、100％、2倍、3倍、4倍或5倍。受试者可以患有肿瘤，例如肺癌或结肠癌。

[0111] 在一些实施方案中，本公开的C/EBPα-saRNA用于调控有此需要的受试者的免疫细胞中的靶基因表达，包括向所述细胞施用本公开的C/EBPα-saRNA。免疫细胞可以是MDSC，如M-MDSC或PMN-MDSC，或TAM。在一些实施方案中，靶基因可以是C/EBPα，其中靶基因表达被本公开的C/EBPα-saRNA上调至少20％、50％、100％、2倍、3倍、4倍或5倍。在一些实施方案中，靶基因可以是ARG1、iNOS、S100A8或S100A9，其中靶基因表达被本公开的C/EBPα-saRNA降低至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或80％。本公开的C/EBPα-saRNA可以是包含具有SEQ ID No.1(CEBPA-51)序列的反义链的合成的分离的saRNA。本公开的C/EBPα-saRNA可以是双链的并且进一步包含SEQ ID No.2(CEBPA-51)的有义链。CEBPA-51可以与脂质体一同递送，例如NOV340 Smarticle。受试者可以患有肿瘤，例如肺癌或结肠癌。

[0112] 与其他疗法的组合

[0113] 本公开的saRNA可以与已知对所考虑的特定方法有作用的其他活性剂或疗法组合提供。例如，可以将包含saRNA和其他活性剂或疗法的组合疗法给予有此需要的任何患者以治疗本文所述的任何病症，包括代谢调节、外科护理、过度增殖性病症和/或干细胞调控。

[0114] 其他活性剂可以与saRNA同时或顺序施用。其他活性剂可以与saRNA混合施用，或与saRNA分开施用。

[0115] 如本文所用，术语“同时施用”没有特别限制，并且意指基本上同时施用组合疗法的组分，即本公开的saRNA和其他活性剂，例如，作为混合物或紧随其后的顺序。

[0116] 如本文所用，术语“顺序施用”没有特别限制，并且意指组合疗法的组分，即本公开的saRNA和其他活性剂，不是同时施用，而是一个接一个地施用，或者分组施用，在施用之间有特定的时间间隔。在组合疗法的各组分的各个施用之间的时间间隔可以相同或不同，并且可以例如选自2分钟至96小时、1至7天或1、2或3周的范围。通常，施用之间的时间间隔可以在几分钟至几小时的范围内，例如在2分钟至72小时、30分钟至24小时或1至12小时的范围内。进一步的实例包括24至96小时、12至36小时、8至24小时和6至12小时范围内的时间间隔。在一些实施方案中，在其他活性剂之前施用本公开的saRNA。在一些实施方案中，在本公开的saRNA之前施用其他活性剂。

[0117] 对本公开的saRNA与其他活性剂的摩尔比没有特别限制。例如，当两种组分在组合物中组合时，两种组分之间的摩尔比可以在1:500至500:1、或1:100至100:1、或1:50至50:1、或1:20至20:1、或1:5至5:1，或1:1的范围内。当组合物中组合超过两种组分时，适用相似的摩尔比。每种组分的预定摩尔量百分比可独立地为组合物的约1％至10％、或约10％至约20％、或约20％至约30％、或约30％至40％、或约40％至50％、或约50％至60％、或约60％至70％、或约70％至80％、或约80％至90％、或约90％至99％。

[0118] 在一个实施方案中，C/EBPα-saRNA与调节不同靶基因的saRNA一起施用。非限制性实例包括调节白蛋白、胰岛素或HNF4A基因的saRNA。可以使用单个saRNA或两个或更多个不同saRNA的组合来实现对任何基因的调节。可以与本公开的C/EBPα-saRNA一同施用的saRNA的非限制性实例包括2012年6月20日提交的国际公开WO 2012/175958中公开的调节白蛋白或HNF4A的saRNA，均于2011年10月10日提交的国际公开WO 2012/046084和WO 2012/046085中公开的调节胰岛素的saRNA，2006年11月13日提交的美国专利号7,709,456和2010年4月23日提交的美国专利公开US 2010/0273863中公开的调节人孕酮受体、人主要穹隆蛋白(human major vault protein，hMVP)、E-钙粘蛋白基因、p53基因或PTEN基因的saRNA，和2006年4月11日提交的国际公开WO 2006/113246中公开的靶向p21基因的saRNA，其各自的内容通过引用以其整体并入本文。

[0119] 在一个实施方案中，将C/EBPα-saRNA与抑制C/EBPβ基因表达的小干扰RNA或siRNA即C/EBPβ-siRNA组合施用。

[0120] 在一个实施方案中，C/EBPα-saRNA与一种或多种调控代谢特别是肝功能的药物一起施用。在非限制性实例中，本公开的C/EBPα-saRNA与降低低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平的药物一起施用，例如他汀(statin)、辛伐他汀(simvastatin)、阿托伐他汀(atorvastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、依泽麦布(ezetimibe)、烟酸(niacin)、PCSK9抑制剂、CETP抑制剂、氯贝丁酯(clofibrate)、非诺贝酸(fenofibric)、生育三烯酚

(tocotrienol)、植物甾醇(phytosterol)、胆汁酸螯合剂(bile acid sequestrant)、普罗布考(probucol)或其组合。C/EBPα-saRNA也可以与Orvig等人的US 6287586中公开的双胍钒(vanadium biguanide)复合物一起施用。在另一个实例中,可以将C/EBPα-saRNA与Rhodes的WO 201102838中公开的组合物一起施用以降低血清胆固醇,其内容通过引用以其整体并入本文。所述组合物包含选择性结合并抑制PCSK9蛋白的抗原结合蛋白;和抑制细胞中PCSK9基因表达的RNA效应剂。在又一个实例中,可以将C/EBPα-saRNA与具有ABC1生物学活性的ABC1多肽或编码具有ABC1活性的ABC1多肽的核酸一起施用以调节胆固醇水平,如Brooks-Wilson等人的EP1854880中所述,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0121] 在另一个实施方案中,本公开的C/EBPα-saRNA与增加胰岛素敏感性或治疗II型糖尿病的药物一起施用,例如二甲双胍(metformin)、磺酰脲(sulfonylurea)、非磺酰脲促分泌剂(nonsulfonylurea secretagogue)、α葡糖苷酶抑制剂、噻唑烷二酮(thiazolidinedione)、吡格列酮(pioglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)、胰高血糖素样肽-1类似物(glucagon-like peptide-1analog)和二肽基肽酶-4抑制剂或其组合。可以与本公开的saRNA组合施用的其他肝保护剂公开于Adams等人,Postgraduate Medical Journal,vol.82,315-322(2006),其内容通过引用以其整体并入本文。

[0122] 免疫疗法

[0123] 在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与另一种疗法,例如手术疗法、放射疗法、免疫疗法、基因疗法和/或与任何其他抗肿瘤治疗方法组合。

[0124] 如本文所用,术语“免疫疗法”是指可引起和/或增强免疫应答以破坏受试者中肿瘤细胞的任何疗法。

[0125] 在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与癌症疫苗和/或互补免疫疗法如免疫检查点抑制剂组合。如本文所用,术语“疫苗”是指用于产生免疫力以预防和/或治疗疾病的组合物。

[0126] 在一些实施方案中,检查点抑制剂可以是针对CTLA-4的拮抗剂,例如可以以高亲和力与CTLA-4结合并防止B7-1/2(CD80/86)与CTLA-4相互作用的抗体、抗体的功能片段、多肽或多肽的功能片段或肽。在一个实例中,CTLA-4拮抗剂是拮抗性抗体或其功能片段。合适的抗CTLA-4拮抗性抗体包括但不限于抗CTLA-4抗体、人抗CTLA-4抗体、哺乳动物抗CTLA-4抗体、人源化抗CTLA-4抗体、单克隆抗CTLA-4抗体、多克隆抗CTLA-4抗体、嵌合抗CTLA-4抗体、MDX-010(伊匹木单抗(ipilimumab))、曲美木单抗(tremelimumab)(完全人源化的)、抗CD28抗体、抗CTLA-4adnectin、抗CTLA-4结构域抗体、单链抗CTLA-4抗体片段、重链抗CTLA-4片段、轻链抗CTLA-4片段以及在美国专利号:8,748,815;8,529,902;8,318,916;8,017,114;7,744,875;7,605,238;7,465,446;7,109,003;7,132,281;6,984,720;6,682,736;6,207,156;5,977,318和欧洲专利号EP1212422B1;和美国公布号US 2002/0039581和US 2002/086014;和Hurwitz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1998,95(17):10067-10071中公开的抗体,其各自的内容通过引用以其整体并入本文。

[0127] 其他抗CTLA-4拮抗剂包括但不限于能够破坏CTLA-4与配体CD80/86结合能力的任何抑制剂。

[0128] 在一些实施方案中,检查点抑制剂可以是用于阻断PD-1途径的试剂,包括拮抗性肽/抗体和可溶性PD-L1配体(参见表4)。

[0129] 表4:阻断抑制性PD-1和PD-L1途径的试剂

[0130]

试剂	说明	靶标
纳武单抗（Nivolumab）(BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106	人 IgG	PD-1
派姆单抗（Pembrolizumab）(MK-3475, lambrolizumab, Keytruda®)	人源化 IgG4	PD-1
匹地利珠单抗（Pidilizumab） (CT-011)	人源化抗 PD-1 IgG1κ	PD-1
AMP-224	B7-DC/IgG1 融合蛋白	PD-1
MSB0010718 (EMD-Serono)	人 IgG1	PD-L1
MEDI4736	工程化人 IgG 1κ	PD-L1
MPDL3280A	工程化 IgG1	PD-L1
AUNP-12	分支的 29 个氨基酸的肽	PD-1

[0131] 在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与基因疗法,例如CRISPR(成簇的、规律间隔的短回文重复序列)疗法组合。如本文所用,CRISPR疗法是指涉及用于基因编辑的CRISPR-Cas系统的任何疗法。

[0132] 在一些实施方案中,本公开的C/EBPα-saRNA可以与一种或多种免疫检查点阻断(immune checkpoint blockade,ICB)剂组合使用。所述组合可对预防和/或治疗任何癌症具有协同作用,例如但不限于HCC。

[0133] 在一些实施方案中,ICB是小的抑制性RNA(siRNA)。siRNA可以是单链或双链的。

[0134] 在一些实施方案中,ICB是抗体。

[0135] 在一些实施方案中,ICB是小分子。

[0136] 在一些实施方案中,ICB是表4中的检查点抑制剂中的任何试剂。

[0137] 在一些实施方案中,ICB是派姆单抗(Pembroluzimab)、曲美木单抗(Tremelimumab)、杜伐单抗(Durvalumab)或纳武单抗(Nivolumab)。

[0138] 在一些实施方案中,接受C/EBPα-saRNA和至少一种ICB的组合疗法的患者可以患有HCC。患者可以先用ICB治疗,然后用C/EBPα-saRNA治疗;先用C/EBPα-saRNA治疗,然后用

ICB治疗;或者用包含C/EBPα-saRNA和ICB两者的组合物进行治疗。

[0139] 在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与CTLA-4抑制剂组合。在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与COX2抑制剂组合。在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与FATP2抑制剂组合。在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与CTLA-4抑制剂、COX2抑制剂和FATP2抑制剂中的至少一种组合。在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与CTLA-4抑制剂、COX2抑制剂和FATP2抑制剂中的至少两种组合。在一些实施方案中,本申请的C/EBPα-saRNA和/或组合物可以与CTLA-4抑制剂、COX2抑制剂和FATP2抑制剂组合。

[0140] III.试剂盒和装置

[0141] 试剂盒

[0142] 本公开提供了用于方便和/或有效地实施本公开方法的多种试剂盒。通常,试剂盒将包含足够数量和/或数目的组分,以允许使用者对受试者进行多次治疗和/或进行多次实验。

[0143] 在一个实施方案中,包含本文所述的saRNA的试剂盒可用于正在增殖的细胞以显示功效。

[0144] 在一个实施方案中,本公开提供了用于在体外或体内调控基因表达的试剂盒,其包含本公开的C/EBPα-saRNA或C/EBPα-saRNA、调节其他基因的saRNA、siRNA或miRNA的组合。试剂盒可进一步包括包装和说明书和/或递送剂以形成制剂组合物。递送剂可以包括本文公开的盐水、缓冲溶液、类脂质(lipidoid)、树状聚合物或任何递送剂。基因的非限制性实例包括C/EBPα、C/EBP家族的其他成员、白蛋白基因、甲胎蛋白基因、肝特异性因子基因、生长因子、核因子基因、肿瘤抑制基因、多能性因子基因。

[0145] 在一个非限制性实例中,缓冲溶液可包括氯化钠、氯化钙、磷酸盐和/或EDTA。在另一个非限制性实例中,缓冲溶液可包括但不限于盐水、含2mM钙的盐水、5%蔗糖、含2mM钙的5%蔗糖、5%甘露醇、含2mM钙的5%甘露醇、林格氏乳酸盐、氯化钠、含2mM钙和甘露糖的氯化钠(参见美国公开号20120258046;通过引用以其整体并入本文)。在另一个非限制性实例中,可以使缓冲溶液沉淀或可以将其冻干。每种组分的量可以变化以实现一致的、可再现的更高浓度的盐水或简单的缓冲液制剂。为了增加saRNA在缓冲液中在一段时间内和/或在各种条件下的稳定性,还可以改变组分。

[0146] 在另一个实施方案中,本公开提供了调控细胞增殖的试剂盒,其包含以引入所述细胞时有效抑制细胞增殖的量提供的本公开的C/EBPα-saRNA;任选地,进一步调节靶细胞增殖的siRNA和miRNA;以及包装和说明书和/或递送剂以形成制剂组合物。

[0147] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于降低细胞中LDL水平的试剂盒,其包含本公开的saRNA分子;任选的降低LDL的药物;以及包装和说明书和/或递送剂以形成制剂组合物。

[0148] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于调控细胞中miRNA表达水平的试剂盒,其包含本公开的C/EBPα-saRNA;任选的siRNA、eRNA和lncRNA;以及包装和说明书和/或递送剂以形成制剂组合物。

[0149] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于组合疗法的试剂盒,其包含本公开的C/EBPα-saRNA和至少一种其他活性成分或疗法。

[0150] 装置

[0151] 本公开提供了可以并入本公开的C/EBPα-saRNA的装置。这些装置包含可立即递送给有此需要的受试者(例如人类患者)的稳定制剂。这样的受试者的非限制性实例包括患有过度增生性病症如癌症、肿瘤或肝硬化,以及代谢病症如NAFLD、肥胖症、高LDL胆固醇或II型糖尿病的受试者。

[0152] 在一些实施方案中,该装置包含组合疗法中的成分,包括本公开的C/EBPα-saRNA和至少一种其他活性成分或疗法。

[0153] 装置的非限制性实例包括泵、导管、针、透皮贴剂、加压嗅觉递送装置(pressurized olfactory delivery device)、离子导入装置(iontophoresis device)、多层化微流体装置(multi-layered microfluidic device)。所述装置可以用于根据单次给药、多次给药或分割给药(split-dosing)方案递送本公开的C/EBPα-saRNA。所述装置可以用于跨生物组织、真皮内、皮下或肌内递送本公开的C/EBPα-saRNA。在2012年12月14日提交的国际公开WO 2013/090648中公开了适用于递送寡核苷酸的装置的更多实例,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0154] 定义

[0155] 为方便起见,下文提供了在说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语和短语的含义。如果本说明书其他部分中术语的使用与本节中提供的定义之间存在明显差异,则以本节中的定义为准。

[0156] 约(about):如本文所用,术语“约”意指所述值的+/-10%。

[0157] 组合施用:如本文所用,术语“以组合施用”或“组合施用”意指将两种或更多种试剂如saRNA同时或在如此间隔内施用于受试者,使得每种试剂对患者的作用可能存在重叠。在一些实施方案中,它们在彼此之间约60、30、15、10、5或1分钟内施用。在一些实施方案中,试剂的施用彼此足够紧密地如此间隔,从而实现联合(例如,协同)作用。

[0158] 氨基酸:如本文所用,术语“氨基酸”是指所有天然存在的L-α-氨基酸。氨基酸以单字母或三字母命名标识,如下所示:天冬氨酸(Asp:D)、异亮氨酸(Ile:I)、苏氨酸(Thr:T)、亮氨酸(Leu:L)、丝氨酸(Ser:S)、酪氨酸(Tyr:Y)、谷氨酸(Glu:E)、苯丙氨酸(Phe:F)、脯氨酸(Pro:P)、组氨酸(His:H)、甘氨酸(Gly:G)、赖氨酸(Lys:K)、丙氨酸(Ala:A)、精氨酸(Arg:R)、半胱氨酸(Cys:C)、色氨酸(Trp:W)、缬氨酸(Val:V)、谷氨酰胺(Gln:Q)、甲硫氨酸(Met:M)、天冬酰胺(Asn:N),其中首先列出氨基酸,然后在括号中分别列出三字母和单字母代码。

[0159] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人类动物。在某些实施方案中,非人类动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、犬、猫、羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、禽、爬行动物、两栖动物、鱼和蠕虫。在一些实施方案中,动物是转基因动物、基因工程化动物或克隆。

[0160] 大约(approximately):如本文所用,术语“大约”或“约”应用于一个或多个感兴趣的值时,是指类似于所述参比值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在任一方向(大于或小于))落入所述参比值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小之内的数值范围,除非另

有说明或从上下文明显可见(除非该数字超过100％的可能值)。

[0161] 与...结合(associated with):如本文所用,术语“与...结合”、“缀合(conjugated)”、“连接(linked)”、“附加(attached)”和“拴系(tethered)”,当相对于两个或更多个部分使用时,是指该部分在物理上彼此直接地或通过一个或多个另外的作为连接剂的部分结合或连接,以形成足够稳定的结构,使得在使用该结构的条件下,例如生理条件下,这些部分保持物理结合。“结合”不必严格地通过直接共价化学键来实现。它也可以指足够稳定的离子键合作用或氢键合作用或基于杂交的连接,使得“结合的(associated)”实体保持物理结合。

[0162] 双功能的:如本文所用,术语“双功能的”是指能够执行或维持至少两种功能的任何物质、分子或部分。这些功能可影响相同或不同的结果。产生功能的结构可以相同或不同。

[0163] 生物相容的:如本文所用,术语“生物相容的”是指与活细胞、组织、器官或系统相容,引起伤害、毒性或免疫系统排斥的风险微小至没有风险。

[0164] 可生物降解的:如本文所用,术语“可生物降解的”是指能够通过活生物的作用分解成无害的产物。

[0165] 生物活性的:如本文所用,短语“生物活性的”是指在生物系统和/或生物体中具有活性的任何物质的特征。例如,当施用给生物体时对该生物体具有生物作用的物质被认为是生物活性的。在具体的实施方案中,如果甚至saRNA的一部分是生物活性的或模拟认为生物学相关的活性,则可以认为本公开的saRNA是生物活性的。

[0166] 癌症:如本文所用,术语“癌症”在个体中是指存在具有致癌细胞典型特征的细胞,例如不受控制的增殖、永生、转移潜力、快速生长和增殖速率以及某些特征性形态特征。通常,癌细胞将处于肿瘤的形式,但是此类细胞可能单独存在于个体中,或者可能作为独立细胞(例如白血病细胞)在血流中循环。

[0167] 细胞生长:如本文所用,术语“细胞生长”主要与细胞数目的增长有关,所述增长借助细胞复制速率大于细胞死亡速率(例如通过细胞凋亡或坏死)时的细胞复制(即增殖)发生,从而导致细胞群体的大小增长,尽管在某些情况下这种生长的小部分可能是由于单个细胞的细胞尺寸或细胞质体积增加所致。因此,抑制细胞生长的试剂可以通过抑制增殖或刺激细胞死亡或两者兼而有之而改变这两个相反过程之间的平衡。

[0168] 细胞类型:如本文所用,术语“细胞类型”是指来自给定来源(例如组织、器官)的细胞或处于给定分化状态的细胞,或与给定病变或遗传组成相关的细胞。

[0169] 染色体:如本文所用,术语“染色体”是指存在于细胞中的DNA和蛋白的组织化结构。

[0170] 互补的:如本文所用,术语“互补的”在涉及核酸时是指,核苷酸或核酸之间例如双链DNA分子的两条链之间或寡核苷酸探针和靶标之间的杂交或碱基配对是互补的。

[0171] 病况:如本文所用,术语“病况”是指任何细胞、器官、器官系统或生物体的状态。病况可以反映实体的疾病状态或者简单的生理表现或情况。病况可以表征为表型病况,例如疾病的宏观表现,或基因型病况,例如与病况相关的潜在基因或蛋白表达谱。病况可以是良性或恶性的。

[0172] 控释:如本文所用,术语“控释”是指符合特定的释放模式以产生治疗结果的药物

组合物或化合物释放特征。

[0173] 抑制细胞的(cytostatic):如本文所用,“抑制细胞的”是指抑制、减少、阻抑细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的生长、分裂或增殖。

[0174] 细胞毒性的:如本文所用,“细胞毒性的”是指杀死细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合或对其造成有害、有毒或致死效果。

[0175] 递送:如本文所用,“递送”是指递送化合物、物质、实体、部分、载荷(cargo)或酬载(payload)的行为或方式。

[0176] 递送剂:如本文所用,“递送剂”是指促进(至少部分地)本公开的saRNA体内递送至所靶向细胞的任何物质。

[0177] 去稳定化的:如本文所用,术语“去稳定的”、“去稳定化”或“去稳定化的区域”意指与相同区域或分子的起始、野生型或天然形式相比较不稳定的区域或分子。

[0178] 可检测的标记物:如本文所用,“可检测的标记物”是指一种或多种标记、信号或部分,其与另一实体连接、掺入或结合,所述另一实体易于通过本领域已知的方法检测,包括放射线照相术、荧光、化学发光、酶活性、吸光度等。可检测的标记物包括放射性同位素,荧光团,发色团,酶,染料,金属离子,诸如生物素、抗生物素蛋白、链霉亲和素和半抗原之类的配体,量子点等。可检测的标记可以位于本文公开的肽、蛋白或多核苷酸如saRNA中的任何位置。它们可位于N末端、C末端或5’或3’末端的氨基酸、肽、蛋白或多核苷酸的内部,这视情况而定。

[0179] 包封:如本文所用,术语“包封”意指围绕、包围或包裹。

[0180] 工程化的:如本文所用,当本公开的实施方案被设计为具有不同于起点、野生型或天然分子的(结构的或化学的)特征或特性时,则其是“工程化的”。

[0181] 等同受试者:如本文所用,“等同受试者”可以是例如具有类似的年龄、性别和健康(例如肝脏健康或癌症分期)的受试者,或根据本公开的治疗之前的同一受试者。如果等同受试者没有接受用本公开的saRNA进行的治疗,则他是“未治疗的”。但是,他可以接受常规抗癌治疗,前提是用本公开的saRNA治疗的受试者也接受相同或等效的常规抗癌治疗。

[0182] 外来体:如本文所用,“外来体”是哺乳动物细胞分泌的小泡。

[0183] 表达:如本文所用,核酸序列的“表达”是指以下事件中的一种或多种:(1)从DNA序列(例如,通过转录)产生RNA模板;(2)加工RNA转录物(例如,通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端加工);(3)RNA翻译成多肽或蛋白;和(4)多肽或蛋白的翻译后修饰。

[0184] 特征:如本文所用,“特征”是指性质、特性或不同元素。

[0185] 制剂:如本文所用,“制剂”至少包括本公开的saRNA和递送剂。

[0186] 片段:如本文所用,“片段”是指一部分。例如,蛋白的片段可以包含通过消化从培养的细胞分离的全长蛋白而获得的多肽。

[0187] 功能性的:如本文所用,“功能性的”生物分子是处于其表现出作为其特征的特性和/或活性的形式的生物分子。

[0188] 基因:如本文所用,术语“基因”是指包含产生多肽或前体所需的控制序列和最通常的编码序列的核酸序列。但是,基因可以不翻译,而是编码调控性或结构性RNA分子。

[0189] 基因可以完整地或部分地源自本领域已知的任何来源，包括植物，真菌，动物，细菌基因组或附加体，真核DNA、核DNA或质粒DNA，cDNA，病毒DNA或化学合成的DNA。基因可以在编码区或非翻译区中包含一个或多个修饰，该修饰可能会影响表达产物的生物学活性或化学结构、表达速率或表达控制方式。此类修饰包括但不限于一个或多个核苷酸的突变、插入、缺失和取代。基因可以构成不间断的编码序列，或者可以包括一个或多个被适当的剪接交界界定的内含子。

[0190] 基因表达：如本文所用，术语“基因表达”是指核酸序列经历成功转录并且在大多数情况下经历成功翻译以产生蛋白或肽的过程。为了清楚起见，当提到测量“基因表达”时，应该理解为意指可以测量转录的核酸产物，例如RNA或mRNA，或翻译的氨基酸产物，例如多肽或肽。测量RNA、mRNA、多肽和肽的量或水平的方法是本领域公知的。

[0191] 基因组：术语“基因组”旨在包括生物体的完整DNA互补物，包括核DNA组分、染色体或染色体外DNA以及胞质域(例如线粒体DNA)。

[0192] 同源性：如本文所用，术语“同源性”是指聚合物分子之间如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)和/或多肽分子之间的整体相关性。在一些实施方案中，如果聚合物分子序列为至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％同一或相似，则认为它们彼此“同源”。术语“同源”必然是指至少两条序列(多核苷酸或多肽序列)之间的比较。根据本公开，如果两个多核苷酸序列编码的多肽对于至少约20个氨基酸的至少一个片段是至少约50％、60％、70％、80％、90％、95％或甚至99％，则认为它们是同源的。在一些实施方案中，同源的多核苷酸序列的特征在于，能够编码至少4-5个唯一指定氨基酸的片段。对于长度少于60个核苷酸的多核苷酸序列，同源性由编码至少4-5个独特指定氨基酸的片段的能力决定。根据本公开，如果蛋白对于至少约20个氨基酸的至少一个片段至少约50％、60％、70％、80％或90％同一，则认为两个蛋白序列是同源的。

[0193] 术语“过度增殖性细胞”可指与等同的健康细胞(其可以称为“对照”)的增殖速率相比以异常高的速率增殖的任何细胞。“等同的健康”细胞是细胞的正常健康对应物。因此，它是执行与对比细胞相同的功能的相同类型细胞，例如来自相同的器官。例如，过度增殖性肝细胞的增殖应参考健康的肝细胞来评定，而过度增殖性前列腺细胞的增殖应参考健康的前列腺细胞来评定。

[0194] “异常高”的增殖速率是指，与等同的健康(非过度增殖性)细胞的增殖速率相比，过度增殖性细胞的增殖速率增加至少20、30、40％，或至少45、50、55、60、65、70、75％，或至少80％。“异常高”的增殖速率还可以指与等同的健康细胞的增殖速率相比，增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10倍，或至少15、20、25、30、35、40、45、50倍，或至少60、70、80、90、100倍的速率。

[0195] 如本文所用，术语“过度增殖性细胞”不是指与大多数细胞相比以较高速率自然增殖但却是健康细胞的细胞。已知在整个生命中不断分裂的细胞的实例是皮肤细胞、胃肠道细胞、血细胞和骨髓细胞。但是，当此类细胞的增殖速率高于其健康对应物时，它们就是过度增殖的。

[0196] 过度增殖性病症：如本文所用，“过度增殖性病症”可以是涉及如上定义的过度增殖性细胞的任何病症。过度增殖性病症的实例包括肿瘤性病症，如癌症、银屑病关节炎、类

风湿性关节炎、胃过度增殖性病症如炎性肠病、皮肤病症包括银屑病、莱特尔综合症(Reiter's syndrome)、毛发红糠疹(pityriasis rubra pilaris)和角化病症的过度增殖性变体。

[0197] 技术人员完全知晓如何鉴定过度增殖性细胞。使用例如X射线、MRI或CT扫描之类的扫描,可以鉴定动物体内过度增殖性细胞的存在。还可以通过体外培养样品,使用细胞增殖测定法如MTT、XTT、MTS或WST-1测定法,来鉴定过度增殖性细胞,或者测定细胞的增殖。还可以使用流式细胞术测定体外细胞增殖。

[0198] 同一性:如本文所用,术语"同一性"是指聚合物分子之间,例如寡核苷酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)和/或多肽分子之间的整体相关性。例如,可以通过以下方式计算两个多核苷酸序列的同一性百分数:将两条序列为最佳比较目的而比对(例如,可以为了最佳比对结果而在第一核酸序列和第二核酸序列之一或两者中引入空位,并且可以为比较目的而忽略不相同的序列)。在某些实施方案中,为了比较目的而比对的序列的长度为参考序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、95%或100%。然后,比较相应核苷酸位置上的核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的核苷酸占据时,则分子在该位置是同一的。考虑到为最佳比对这两个序列而需要引入的空位的数目和每个空位的长度,两条序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置数的函数。两条序列之间序列的比较和同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。例如,两条核苷酸序列之间的同一性百分比可以使用例如下述中公开的方法进行确定:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991;其各自通过引用并入本文。例如,可以使用已经并入ALIGN程序(2.0版)的Meyers和Miller的算法(CABIOS,1989,4:11-17),使用PAM120权重余数表、空位长度罚分12和空位罚分4,确定两条核苷酸序列之间的同一性百分比。或者,可以使用GCG软件包中的GAP程序,使用了NWSgapdna.CMP矩阵,确定两条核苷酸序列之间的同一性百分比。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包括但不限于在Carill10,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的那些方法,所述文献通过引用并入本文。另外,确定同一性的技术已编入公共可用的计算机程序中。确定两条序列之间同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包,Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984)),BLASTP,BLASTN和FASTA Altschul,S.F.等人,J.Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0199] 抑制基因表达:如本文所用,短语"抑制基因表达"是指引起基因表达产物量的减少。表达产物可以是从基因转录的RNA(例如,mRNA)或从转录自基因的mRNA翻译的多肽。通常,mRNA水平降低导致从其翻译的多肽水平降低。可以使用测量mRNA或蛋白的标准技术来确定表达水平。

[0200] 体外:如本文所用,术语"体外"是指在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培养皿中等发生,而不是在生物体(例如动物、植物或微生物)中发生的事

件。

[0201] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在生物体(例如动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[0202] 分离的:如本文所用,术语“分离的”是指已经从与之相关联的(无论是在自然界中还是在实验环境中)至少一些组分中分离的物质或实体。分离的物质可以相对于与其相关联的物质具有不同的纯度水平。分离的物质和/或实体可以与至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多起初与之关联的其他组分分离。在一些实施方案中,分离的物质的纯度大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%。如本文所用,如果一种物质基本上不含其他组分,则该物质是“纯的”。

[0203] 基本分离的:“基本分离的”是指化合物与形成或检测到该化合物的环境基本分离。部分分离可以包括例如富含本公开化合物的组合物。基本分离可包括含有以重量计至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%本公开化合物或其盐的组合物。分离化合物及其盐的方法是本领域常规的。

[0204] 标记物:术语“标记物”是指物质或化合物,所述物质或化合物如此并入某对象,从而该物质、化合物或对象可以被检测。

[0205] 接头:如本文所用,接头是指一组原子,例如10-1,000个原子,并且可以包含原子或基团,例如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砜、磺酰基、羰基和亚胺。接头可在第一端连接至核碱基或糖部分上的修饰的核苷或核苷酸,并在第二端连接至酬载,例如可检测物质或治疗剂。接头可以具有足够的长度,从而不干扰向核酸序列中并入。如本文所述,接头可用于任何有用的目的,例如形成saRNA缀合物以及施用酬载。可以并入接头中的化学基团的实例包括但不限于烷基、烯基、炔基、酰氨基、氨基、醚、硫醚、酯、亚烷基、杂亚烷基、芳基或杂环基,其每一个可以任选地取代,如本文所述。接头的实例包括但不限于不饱和烷烃、聚乙二醇(例如,乙二醇或丙二醇单体单元,例如,二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、四乙二醇或四乙二醇)和葡聚糖聚合物及其衍生物。其他实例包括但不限于接头内部可使用还原剂或光解作用裂解的可裂解部分,如,例如二硫键(-S-S-)或偶氮键(-N=N-)。可选择性裂解键的非限制性实例包括可例如通过使用三(2-羧乙基)膦(TCEP)或其他还原剂和/或光解作用裂解的酰氨键,以及例如通过酸性或碱性水解裂解的酯键。

[0206] 转移:如本文所用,术语“转移”意指癌症借以从其最初作为原发肿瘤出现的位置扩散到体内远处位置的过程。转移还指由原发肿瘤扩散引起的癌症。例如,患有乳腺癌的人可能在其淋巴系统、肝脏、骨骼或肺出现转移灶。

[0207] 修饰的:如本文所用,“修饰的”是指本公开的分子的改变的状态或结构。分子可以多种方式修饰,包括化学、结构和功能方式修饰。在一个实施方案中,通过引入非天然核苷和/或核苷酸来修饰本公开的saRNA分子。

[0208] 天然存在的:如本文所用,“天然存在的”意指在没有人工帮助的情况下存在于自然界中。

[0209] 核酸:如本文所用,术语“核酸”是指包含一个或多个核苷酸,即核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或两者的分子。该术语包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的单体和聚合物,在聚合物的情况下,核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸通过5’至3’连接结合在一起。核糖核苷

酸和脱氧核糖核苷酸聚合物可以是单链或双链的。然而，连接可以包括本领域已知的任何连接，包括例如包含5'至3'连接的核酸。核苷酸可以是天然存在的，或者可以是能够与天然存在的碱基对形成碱基配对关系的合成产生的类似物。能够形成碱基配对关系的非天然存在碱基的实例包括但不限于氮杂(aza)和去氮杂(deaza)嘧啶类似物、氮杂和去氮杂嘌呤类似物以及其他杂环碱基类似物，其中嘧啶环的一个或多个碳原子和氮原子已被杂原子取代，例如氧、硫、硒、磷等。

[0210] 患者：如本文所用，“患者”是指可能寻求或需要治疗、要求治疗、正在接受治疗、将要接受治疗的受试者，或因特定疾病或病况而在受过培训的专业人员护理下的受试者。

[0211] 肽：如本文所用，“肽”的长度小于或等于50个氨基酸，例如长约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。

[0212] 药学上可接受的：短语“药学上可接受的”在本文中用于指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型，其在合理的医学判断范围内，适用于接触人和动物的组织而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，且与合理的获益/风险比相称。

[0213] 药学上可接受的赋形剂：如本文所用，短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物以外(例如，能够悬浮或溶解活性化合物的媒介物)并在患者中具有基本上无毒和非炎性性质的任何成分。赋形剂可包括例如：抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣剂、压制助剂、崩解剂、染料(颜料)、软化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣剂、风味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性的赋形剂包括但不限于：丁羟甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸(氢二)钙、硬脂酸钙、交联羧甲纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交联聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预糊化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶(shellac)、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟乙酸钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0214] 药学上可接受的盐：本公开还包括本文所述化合物的药学上可接受的盐。如本文所用，“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物，其中通过将现有的酸或碱部分转化为其盐形式(例如，通过使游离碱基与合适的有机酸反应)，修饰母体化合物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基如胺的无机或有机酸盐；酸性残基如羧酸的碱式盐或有机盐；等等。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐(picrate)、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等，以及无毒铵、季铵和胺阳离子，包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包括例如

由无毒的无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。本公开的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法从含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常，此类盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的合适碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备；通常，优选非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。合适盐的清单可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,p.1418,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(eds.),Wiley-VCH,2008，和Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977)，其各自通过引用以其整体并入本文。

[0215] 药学上可接受的溶剂化物：如本文所用，术语“药学上可接受的溶剂化物”是指其中合适溶剂的分子引入晶体晶格中的本公开的化合物。合适的溶剂在所施用的剂量下是生理上可耐受的。例如，可以通过从包含有机溶剂、水或其混合物的溶液结晶、重结晶或沉淀，制备溶剂化物。合适的溶剂的实例是乙醇、水(例如一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水为溶剂时，溶剂化物称为“水合物”。

[0216] 药理学作用：如本文所用，“药理学作用”是生物体或系统中在生物体或系统已经接触或暴露于外源物质后出现的可测量的生物学现象。药理学作用可产生治疗有效的结果，例如治疗、改善一种或多种症状，诊断、预防和延迟疾病、病症、病况或感染的发生。此类生物现象的测量可以是定量的、定性的或相对于另一种生物现象。定量测量可以是统计学显著的。定性测量可以按程度或种类进行，并且可以至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更大的不同。它们可以观察为存在或不存在、更好或更差、更多或更少。当指药理学作用时，外源性物质是相对于生物体或系统全部或部分外源的试剂。例如，对野生型生物分子的修饰，无论结构性还是化学性修饰，都会产生外源物质。同样，野生型分子引入生物体或系统中天然不存在的化合物、分子或物质或与之组合，也会产生外源物质。本公开的saRNA包含外源物质。药理学作用的实例包括但不限于细胞计数的改变，例如嗜中性粒细胞、网织红细胞、粒细胞、红细胞(红血细胞)、巨核细胞、血小板、单核细胞、结缔组织巨噬细胞、表皮朗格汉斯细胞、破骨细胞、树突状细胞、小胶质细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、辅助T细胞、抑制性T细胞、细胞毒性T细胞、天然杀伤性T细胞、B细胞、天然杀伤性细胞或网织红细胞的增加或减少。药理作用还包括血液化学、pH、血红蛋白、血细胞比容的变化，酶(例如但不限于肝酶AST和ALT)水平的变化，脂质谱、电解质、代谢标志物、激素或其他本领域技术人员已知的标志物或谱的变化。

[0217] 物理化学的：如本文所用，“物理化学的”是指或涉及物理和/或化学性质。

[0218] 预防：如本文所用，术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病况的发作；部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种症状、特征或临床表现的发作；部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种症状、特征或表现的发作；部分或完全延迟感染、特定疾病、病症和/或病况的进展；和/或降低发展与感染、疾病、病症和/或病况相关的病变的风险。

[0219] 前药：本公开还包括本文所述化合物的前药。如本文所用，“前药”是指任何物质、

分子或实体，其处于据预期该物质、分子或实体在化学或物理改变后充当治疗剂的形式。前药可以以某种方式共价结合或掩蔽，并且在施用给哺乳动物受试者之前、同时或之后释放或转化成活性药物部分。前药可以通过修饰化合物中存在的官能团来制备，修饰方式使得修饰物可以在常规操作中或在体内裂解为母体化合物。前药包括这样的化合物，其中羟基、氨基、巯基或羧基与当施用于哺乳动物受试者时遭受裂解以分别形成游离羟基、氨基、巯基或羧基的任何基团结合。前药的制备和使用在以下中讨论：T.Higuchi和V.Stella，“Pro-drugs as Novel Delivery Systems，”Vol.14of the A.C.S.Symposium Series和Bioreversible Carriers in Drug Design，ed.Edward B.Roche，American Pharmaceutical Association and Pergamon Press，1987，两者通过引用以其整体并入本文。

[0220] 预后：如本文所用，术语“预后”意指特定生物学事件将在未来发生或非常有可能发生的陈述或主张。

[0221] 进展：如本文所用，术语“进展”或“癌症进展”意指疾病或病况的推进或恶化，或朝向疾病或病况推进或恶化。

[0222] 增殖：如本文所用，术语“增殖”意指生长、扩大或增加或引起迅速生长、扩大或增加。“增殖性”意指具有增殖能力。“抗增殖性”意指具有与增殖特性相反或相对的特性。

[0223] 蛋白：“蛋白”意指通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。如本文所用，该术语是指任何大小、结构或功能的蛋白、多肽和肽。但是，通常蛋白的长度至少为50个氨基酸。在一些情况下，编码的蛋白小于约50个氨基酸。在这种情况下，多肽称为肽。如果蛋白是短肽，则其长度将至少约10个氨基酸残基。蛋白可以是天然的、重组的或合成的，或这些的任意组合。蛋白也可以包含天然蛋白或肽的片段。蛋白可以是单个分子，或可以是多分子复合物。术语蛋白也可以应用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物。

[0224] 蛋白表达：术语“蛋白表达”是指核酸序列进行翻译从而表达可检测水平的氨基酸序列或蛋白的过程。

[0225] 纯化的：如本文所用，“纯化”、“纯化的”是指基本上纯的或不含不需要的组分、污染物、混合物或杂质。

[0226] 消退：如本文所用，术语“消退”或“消退程度”是指癌症进展在表型或基因型上的逆转。减缓或阻止癌症进展可被视为消退。

[0227] 样品：如本文所用，术语“样品”或“生物样品”是指其组织、细胞或组分部分的子集(例如体液，包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液)。样品可以进一步包括从完整生物体或其组织、细胞或组分部分的子集制备的匀浆、裂解物或提取物，或其级分或部分，包括但不限于例如血浆，血清，脊液，淋巴液，皮肤的外部部分，呼吸道、肠道和泌尿生殖道，眼泪，唾液，乳，血细胞，肿瘤，器官。样品进一步是指可以包含细胞组分如蛋白或核酸分子的培养基，例如营养肉汤或凝胶。

[0228] 信号序列：如本文所用，短语“信号序列”是指可以指导蛋白的转运或定位的序列。

[0229] 单个单位剂量：如本文所用，“单个单位剂量”是指以一个剂量/在一个时间/单个途径/单个接触点(即单次施用事件)施用的任何治疗剂的剂量。

[0230] 相似性：如本文所用，术语“相似性”是指聚合物分子之间的总体相关性，例如多核

苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间。可以按照与计算同一性百分比相同的方式计算聚合物分子彼此之间的相似性百分比,不同之处在于相似性百分比的计算考虑了保守性取代,这是本领域理解的。

[0231] 分割剂量:如本文所用,“分割剂量”是将单个单位剂量或每日总剂量分成两个或更多个剂量。

[0232] 稳定的:如本文所用,“稳定的”是指足够稳健以承受从反应混合物中成功分离到可用纯度,并且优选能够配制成有效治疗剂的化合物。

[0233] 稳定化的:如本文所用,术语“稳定化”、“稳定化的”、“稳定化的区域”意指使得或变得稳定。

[0234] 受试者:如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指可以例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的,向其施用本公开的组合物的任何生物体。常见的受试者包括动物(例如哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、非人类灵长类动物和人类)和/或植物。

[0235] 基本上:如本文所用,术语“基本上”是指显示完全或近完全程度或度的所关注特征或特性的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,生物学和化学现象极少(如果有的话)达到完整和/或推进到完整或极少实现或避免绝对结果。因此,在本文中使用的术语“基本上”来涵盖许多生物学和化学现象中固有的潜在缺乏完整性。

[0236] 基本上等于:如本文所用,当其涉及剂量之间的倍数差时,该术语是指正/负2%。

[0237] 基本同时:如本文所用并且当涉及多个剂量时,该术语是指在2秒内。

[0238] 患有:正在“患有”疾病、病症和/或状况的个体已诊断出患有疾病、病症和/或病况或表现出疾病、病症和/或病况的一种或多种症状。

[0239] 易感:“易感”疾病、病症和/或病况的个体尚未被诊断出患有该疾病、病症和/或病状和/或未表现出该疾病、病症和/或病况的症状但具有发展疾病或其症状的倾向。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病况(例如,癌症)的个体可以通过以下一种或多种来表征:(1)与形成疾病、病症和/或病况相关的基因突变;(2)与形成疾病、病症和/或病况相关的遗传多态性;(3)与疾病、病症和/或病况相关的蛋白和/或核酸的表达和/或活性的增加和/或降低;(4)与形成疾病、病症和/或病况相关的习惯和/或生活方式;(5)疾病、病症和/或病况的家族病史;和(6)暴露于和/或感染与形成疾病、病症和/或病况相关的微生物。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病况的个体将发生疾病、病症和/或病况。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病况的个体将不会发生疾病、病症和/或病况。

[0240] 缓释:如本文所用,术语“缓释”是指在特定时间段内符合释放速率的药物组合物或化合物释放曲线。

[0241] 合成的:术语“合成的”意指由人手工生产、制备和/或制造。本公开的多核苷酸或多肽或其他分子的合成可以是化学的或酶促的。

[0242] 靶向的细胞:如本文所用,“靶向的细胞”是指任何一种或多种目的细胞。细胞可以在体外、体内、原位或生物体的组织或器官中发现。生物可以是动物,优选为哺乳动物,更优选为人,并且最优选为患者。

[0243] 治疗剂:术语“治疗剂”是指当施用于受试者时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引起期望的生物学和/或药理作用的任何物质。

[0244] 治疗有效量:如本文所用,术语“治疗有效量”意指待递送物质(例如,核酸、药物、

治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量,在施用给患有或易患感染、疾病、病症和/或病况的受试者时,足以治疗该感染、疾病、病症和/或病况,改善其症状,诊断、预防和/或延迟其发作。

[0245] 治疗有效的结果:如本文所用,术语“治疗有效的结果”意指在患有或易患感染、疾病、病症和/或病况的受试者中足以治疗该感染、疾病、病症和/或病况,改善其症状,诊断、预防和/或延迟其发作的结果。

[0246] 每日总剂量:如本文所用,“每日总剂量”是在24小时内供给或开具的剂量。它可以以单个单位剂量施用。

[0247] 转录因子:如本文所用,术语“转录因子”是指DNA结合蛋白,其例如通过激活或阻遏转录来调控DNA向RNA的转录。一些转录因子单独实现转录的调控作用,而其他一些则与其他蛋白一起发挥作用。在某些条件下,一些转录因子既可以激活也可以阻遏转录。通常,转录因子结合特定的靶序列或与靶基因调控区中的特定共有序列高度相似的序列。转录因子可单独或与其他分子复合调控靶基因的转录。

[0248] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指部分或完全减轻(alleviating)、改进(ameliorating)、改善(improving)、缓解(relieving)特定感染、疾病、病症和/或病况的一种或多种症状或特征,延迟其发作,抑制其进展,降低其严重程度和/或降低其发生率。例如,“治疗”癌症可以指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。可以将治疗施用给未表现出疾病、病症和/或病况的迹象的受试者和/或仅表现出疾病、病症和/或病况的早期迹象的受试者,目的是降低发生与该疾病、病症和/或病况相关的病变的风险。

[0249] 短语“治疗方法”或其等同用语在应用于例如癌症时,是指设计用于减少、消除或阻止个体中的癌细胞数量,或减轻癌症症状的过程或作用期间。癌症或其他增生性病症的“治疗方法”并不必然意指实际上将彻底消除癌细胞或其他病症,细胞或病症的数量实际上将减少,或癌症或其他病症的症状实际上将得到减轻。通常,即使在成功的可能性很小的情况下,也将执行癌症治疗方法,但是考虑到个体的医疗史和估计的存活预期,仍然可以将其视为总体有益的作用过程。

[0250] 肿瘤生长:如本文所用,除非另有说明,否则术语“肿瘤生长”或“肿瘤转移生长”如肿瘤学中通常所用的那样使用,其中该术语主要与肿瘤或肿瘤转移的质量或体积增加相关,主要是肿瘤细胞生长所致。

[0251] 肿瘤负荷:如本文所用,术语“肿瘤负荷”是指受试者携带的直径超过3mm的所有肿瘤结节的总肿瘤体积。

[0252] 肿瘤体积:如本文所用,术语“肿瘤体积”是指肿瘤的大小。通过以下公式计算以mm^3为单位计算肿瘤体积:体积=(宽度)^{2}x长度/2。

[0253] 未修饰的:如本文所用,“未修饰的”是指在以任何方式改变之前的任何物质、化合物或分子。未修饰的可以是指生物分子的野生型或天然形式,但并非总是如此。分子可以经历一系列的修饰,从而每种修饰的分子可用作后续修饰的“未修饰的”起始分子。

[0254] 等同方案和范围

[0255] 本领域技术人员将认识到或仅通过常规实验就能够确定本文所述的本公开的具体实施方案的许多等同方案。本公开的范围不旨在限于以上描述,而是如所附权利要求书中所述。

[0256] 除非相反地指出或从上下文中明显可见,否则在权利要求中,诸如“a”、“an”和

“the”的冠词可以表示一个或多个。除非相反地指出或从上下文中明显可见，否则如果某群组成员的一个、多于一个或全部均存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关，则在该群组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述将被认为得到满足。本公开包括这样的实施方案，其中该群组中的恰好一个成员存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关。本公开包括这样的实施方案，其中该群组成员中多于一个或所有成员均存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关。

[0257] 还应注意，术语“包括”旨在是开放的，并允许包括其他的要素或步骤。

[0258] 在给出范围时包括端点。此外，应当理解，除非另外指出或从上下文和本领域普通技术人员的理解中明显可见，否则在本公开的不同实施方案中，表示为范围的值可以认为是所述范围内的任何特定值或子范围，至该范围下限单位的十分之一，除非上下文另外明确指出。

[0259] 另外，应当理解，落入现有技术范围内的本公开的任何具体实施方案都可以明确地从任何一个或多个权利要求中排除。由于这样的实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的，所以可以将其排除，即使在本文中未明确阐明。本公开的组合物的任何具体实施方案(例如，任何核酸或由此编码的蛋白；任何生产方法；任何使用方法；等等)都可以出于任何原因从任何一项或多项权利要求排除，而与现有技术是否存在无关。

[0260] 所有引用的来源，例如本文引用的参考文献、出版物、数据库、数据库条目和技术，即使未在引用中明确指出，也都通过引用引入到本申请中。如果引用的来源与本申请的声明存在冲突，则以本申请中的声明为准。

[0261] 通过以下非限制性实施例进一步说明本发明。

[0262] 实施例

[0263] 实施例1:CEBPA-51和MTL-CEBPA的制备

[0264] 制备CEBPA-saRNA的材料和程序已经公开于MiNA Therapeutics Limited的WO2015/075557和WO2016/170349中。CEBPA-51和MTL-CEBPA的制备已公开在WO2016/170349的实施例中。

[0265] 简言之，通过顺序偶联亚磷酰胺单体在固体支持物上合成CEBPA-51的每条链。合成在自动合成仪如Akta Oligopilot 100(GE Healthcare)和Technikrom合成仪(Asahi Kasei Bio)上进行，该合成仪将指定体积的试剂和溶剂递送进装有固体支持物的合成反应器(柱型)并由此递出。该过程开始于将试剂装入连接到反应器的指定容器中，并用合适的固体支持物填充反应容器。试剂和溶剂流由一系列计算机控制的阀门和泵调节，并自动记录流速和压力。固相方法能够通过用溶剂洗涤固相支持物，而在合成的每个步骤中有效分离与固相偶联的反应产物与溶液相中的试剂。

[0266] 将CEBPA-51在环境温度下溶于乙酸钠/蔗糖缓冲液pH 4.0中，并将脂质在55℃下溶于无水乙醇中。脂质体通过乙醇错流注射技术制备。脂质体形成后，立即用pH 9.0的氯化钠/磷酸盐缓冲液稀释该悬浮液。使收集的中间产物通过孔径为0.2μm的聚碳酸酯膜。通过超滤达到目标saRNA浓度。随后通过用pH 7.5的蔗糖/磷酸盐缓冲液渗滤除去未包封的药物物质和残留的乙醇。之后，将浓缩的脂质体悬浮液进行0.2μm过滤并储存在5±3℃。最后，配制散装产品，0.2μm过滤，并装入20ml小瓶中。

[0267] MTL-CEBPA以输注用浓缩液提供。每个小瓶包含在20ml pH约7.5的蔗糖/磷酸盐缓

冲液中的50mg CEBPA-51(saRNA)。

[0268] 实施例2:CEBPA-saRNA抑制MDSC的免疫抑制

[0269] 材料和方法

[0270] 细胞系

[0271] LLC肺癌细胞系获自ATCC并在补充有10%FBS(Atlanta Biologicals,Inc.)和1%抗生素(Thermo Fisher Scientific Inc.)的DMEM(Corning Incorporated)中培养。细胞在37℃和5%CO_2中孵育。使用0.25%胰蛋白酶(Thermo Fisher Scientific Inc.)收获70-80%汇合度的细胞并进行传代或用于实验。

[0272] 动物

[0273] 所有程序均严格按照Wistar研究所(The Wistar Institute)的动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)以及NIH实验室动物护理和使用指南(NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animal guidelines)进行和批准。将6周龄雌性C57BL/6小鼠(Charles River Labs)维持在温度受控的房间中,具有12/12小时的光照/黑暗时间表,并自由提供食物。

[0274] 荷瘤小鼠和治疗

[0275] 收获LLC细胞并悬浮在DPBS(Corning)中,为200μL含有5×10^5个细胞,并在第0天s.c.注射至小鼠体内。肿瘤建立后,将小鼠随机分成2组,并每周两次用3mg/kg的MTL-CEBPA或NOV-FLUC静脉内治疗。

[0276] 细胞分离

[0277] 在第24天和第25天处死用MTL-CEBPA或NOV-FLUC治疗的荷瘤小鼠。使用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec)解离肿瘤组织。通过物理捣碎处理脾脏。用ACK缓冲液裂解红细胞。

[0278] 流式细胞术

[0279] 对小鼠细胞表面标志物CD45、CD11b、Ly6G、Ly6C、F4/80特异的单克隆抗体购自BD bioscience。使用BD LSR II流式细胞仪获取流式细胞术数据,并使用FlowJo软件(Tree Star)进行分析。

[0280] 抑制测定

[0281] 通过在FACSAria细胞分选仪(BD Biosciences)上进行细胞分选,从肿瘤细胞分离出PMN-MDSC(CD11b+,Ly6G+,Ly6Clow)、M-MDSC(CD11b+,Ly6G-,Ly6Chigh)和巨噬细胞(CD11b+,F4/80+)。PMEL小鼠具有识别gp100衍生肽的CD8+ T细胞,用作应答者(responder)。来自PMEL小鼠的全脾细胞与来自初始小鼠(naïvemice)的脾细胞以1:4在完全RPMI培养基中混合,并以10^5个细胞/孔接种到96孔U型底板(U-bottom plate)中。将Ly6G+或Ly6C+细胞以0.0625-1×10^5个细胞/孔(1:16-1:1)添加到孔中。将鼠gp100肽(25-33)EGSRNQDWL(AnaSpec,Inc.)溶解在ddH_2O中,用RPMI完全培养基稀释并以0.1μg/mL的最终浓度添加到孔中。培养48小时后,用^{3}H-胸苷(1μCi/孔;GE Healthcare)脉冲细胞16小时。使用液体闪烁计数器以每分钟计数(counts per minute,cpm)计数^{3}H-胸苷摄取,并计算相对于阳性对照(具有应答细胞(responder cell)和肽的孔)的增殖百分比。

[0282] 定量RT-PCR

[0283] 用总RNA提取试剂盒(Zymo research)提取RNA。合成cDNA(cDNA逆转录酶试剂盒;

Applied Biosystems)，并使用SYBR Green Master Mixture(Thermo Fisher)和针对b-肌动蛋白(正向:5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'，反向:5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3')、乳转铁蛋白(Ltf，正向:5'-TGCTCCCAACAGCAAAGAGA-3'，反向:5'-CTTCAGTGTTCTTCCCGTCAGT-3')和C/EBP-α的引物(QuantiTect Primer Assays，Qiagen)对每个样品一式三份进行PCR，并使用$2^{-\Delta Ct}$方法计算与b-肌动蛋白相比的基因相对表达。

[0284] CD8耗减

[0285] 在第-3、1、4、7、10和14天以100μg/小鼠的剂量向小鼠i.p.施用抗小鼠CD8α抗体或大鼠IgG2a同种型对照(BioXCell)。在第0天，以5×10^5个细胞/小鼠将LLC细胞s.c.注射到小鼠中。在第3天，将小鼠随机分为3组(n＝5)，并每周两次用3mg/kg的MTL-CEBPA或NOV-FLUC静脉内治疗。

[0286] 结果和讨论

[0287] 在第0天将LLC细胞s.c.注射至小鼠。在第3天，将小鼠随机分成2组，并每周两次用3mg/kg的MTL-CEBPA或NOV-FLUC静脉内治疗。测量小鼠的肿瘤面积并显示在图1中。MTL-CEBPA显示出肿瘤生长抑制。

[0288] 在第24天和第25天处死用MTL-CEBPA或NOV-FLUC治疗的荷瘤小鼠。通过流式细胞术分析脾细胞和肿瘤细胞。测量脾脏和肿瘤的骨髓细胞比例。

[0289] M-MDSC、PMN-MDSC和TAM(肿瘤相关巨噬细胞)细胞通过在FACSAria(BD Biosciences)上进行细胞分选从肿瘤细胞中分离出来。提取总RNA并通过qRT-PCR分析基因的表达。如图2A所示，C/EBPα表达在M-MDSC、PMN-MDSC和TAM细胞中上调。Ly6C代表M-MDSC细胞，Ly6G代表PMN-MDSC细胞。如图2B所示，ARG1和iNOS基因表达减少。使用PMEL小鼠作为应答细胞，进行抑制测定。对M-MDSC和TAM进行系列稀释，并测量T细胞增殖百分比，并显示在图3A和图3B中。观察来自肿瘤的M-MDSC和TAM的抑制活性。经MTL-CEBPA治疗和未经MTL-CEBPA治疗的细胞表现出不同的活性。

[0290] 在MC38模型(免疫反应性结肠癌)中进行了类似的研究。研究设计总结在图4中。测量MTL-CEBPA治疗后的肿瘤面积并显示在图5A中。与对照相比，MTL-CEBPA显示出减少肿瘤面积的功效。M-MDSC和TAM细胞中的T细胞增殖(每分钟计数(CPM))如图5B和图5C所示。来自MTL-CEBPA治疗的小鼠的肿瘤的M-MDSC和TAM对T细胞增殖的抑制活性较低。

[0291] 因此，MTL-CEBPA可用于在M-MDSC、PMN-MDSC和TAM细胞中上调C/EBPα表达并下调ARG1和iNOS表达。MTL-CEBPA还可用于阻断M-MDSC和TAM对T细胞增殖的抑制活性。

[0292] 实施例3:CEBPA-saRNA与抗CTLA4 Ab和COX2抑制剂的组合疗法

[0293] 如上所述，CEBPA-saRNA可用于减少MDSC和TAM细胞的免疫抑制。在这项研究中，MTL-CEBPA与多种免疫疗法组合。研究设计总结在图6中。将荷瘤小鼠(LLC模型)分组并用以下治疗:第1组):对照，第2组):在第3、6、10、13、17和20天，3mg/kg(i.v.)的MTL-CEBPA，第3组):在第10、17和24天，200μg/小鼠(i.p.)的抑制CTLA4活性的CTLA4抗体(Ab)，第4组):每天50mg/kg(p.o.)的塞来昔布(一种COX2抑制剂)，第5组):MTL-CEBPA+CTLA4 Ab，和第6组):MTL-CEBPA+塞来昔布。

[0294] 测量治疗后的肿瘤面积。如图7A所示，与单剂治疗相比，MTL-CEBPA+CTLA4 Ab的组合治疗具有最好的肿瘤抑制作用。如图7B所示，与单剂治疗相比，MTL-CEBPA+塞来昔布的组合治疗也具有最好的肿瘤抑制作用。

[0295] 实施例4:CEBPA-saRNA与Lipofermata的组合疗法

[0296] 多形核髓源性抑制细胞(PMN-MDSC)是病理性激活的嗜中性粒细胞,其对调控癌症中的免疫应答至关重要。这些细胞导致癌症治疗失败,并且与不良临床结果有关。据报道,小鼠和人类PMN-MDSC上调脂肪酸转运蛋白2(FATP2),而FATP2的抑制消除了PMN-MDSC的活性并显著延缓了肿瘤进展。

[0297] 在本研究中,MTL-CEBPA与Lipofermata(5-溴-5'-苯基螺环[3H-1,3,4-噻二唑-2,3'-吲哚]-2-酮,5-bromo-5'-phenylspiro[3H-1,3,4-thiadiazole-2,3'-indoline]-2-one,一种FATP2抑制剂)组合。研究设计总结在图8中。将荷瘤小鼠(LLC模型)分组并用以下治疗:第1组):对照,第2组):在第5、7、10、12和14天,3mg/kg(i.v.)的MTL-CEBPA,第3组):每一天每天两次,2mg/kg(s.c.)的Lipofermata,第4组):在第5、7、10、12和14天,3mg/kg(i.v.)的MTL-CEBPA+每一天每天两次2mg/kg(s.c.)的Lipofermata。

[0298] 测量治疗后的肿瘤面积。如图9所示,与单剂治疗相比,MTL-CEBPA+Lipofermata的组合治疗具有最好的肿瘤抑制作用。

[0299] 等同方案和范围

[0300] 本领域技术人员将认识到或仅通过常规实验就能够确定本文所述的本公开的具体实施方案的许多等同方案。本公开的范围不旨在限于以上描述,而是如所附权利要求书中所述。

[0301] 除非相反地指出或从上下文中明显可见,否则在权利要求中,诸如"a"、"an"和"the"的冠词可以表示一个或多个。除非相反地指出或从上下文中明显可见,否则如果某群组成员的一个、多于一个或全部均存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关,则在该群组的一个或多个成员之间包括"或"的权利要求或描述将被认为得到满足。本公开包括这样的实施方案,其中该群组中的恰好一个成员存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关。本公开包括这样的实施方案,其中该群组成员中多于一个或所有成员均存在于给定的产品或过程中、用于其中或与之相关。

[0302] 还应注意,术语"包括"旨在是开放的,并允许包括其他的要素或步骤。当本文中使用术语"包括"时,术语"由……组成"因此也被涵盖和公开。

[0303] 在给出范围时包括端点。此外,应当理解,除非另外指出或从上下文和本领域普通技术人员的理解中明显可见,否则在本公开的不同实施方案中,表示为范围的值可以认为是所述范围内的任何特定值或子范围,至该范围下限单位的十分之一,除非上下文另外明确指出。

[0304] 另外,应当理解,落入现有技术范围内的本公开的任何具体实施方案都可以明确地从任何一个或多个权利要求中排除。由于这样的实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,所以可以将其排除,即使在本文中未明确阐明。本公开的组合物的任何具体实施方案(例如,任何抗生素、治疗剂或活性成分;任何生产方法;任何使用方法;等等)都可以出于任何原因从任何一项或多项权利要求排除,而与现有技术是否存在无关。

[0305] 应当理解,已经使用的词语是描述性词语而不是限制性词语,并且可以在所附权利要求的范围内进行改变而不背离本公开在其更广泛方面的真实范围和精神。

[0306] 尽管本公开已针对数个描述的实施方案进行了一定长度和一些特殊性的描述,但并不旨在将其限制于任何此类细节或实施方案或任何特定实施方案,而是参考所附权利要

求来解释,以便鉴于现有技术提供对此类权利要求的最广泛可能的解释,并因此有效地涵盖本公开的预期范围。

序列表

<110> 米纳治疗有限公司(MiNA Therapeutics Limited)

威斯特解剖及生物研究所(The Wistar Institute of Anatomy and Biology)

<120> 使用C/EBPα saRNA的组合物和方法

<130> 2058.1027PCT

<140> PCT/US2020/XXXXXX

<141> 2020-07-27

<150> US 62/879,028

<151> 2019-07-26

<150> US 63/050,091

<151> 2020-07-09

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基(modified_base)

<222> (20)..(21)

<223> 2'-OMe修饰的核苷酸

<400> 1

gaccagugac aaugaccgcu u 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基(modified_base)

<222> (1)..(1)

<223> 反向的无碱基修饰

<220>

<221> 修饰的碱基(modified_base)

<222> (1)..(2)

<223> 2'-OMe修饰的核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基(modified_base)
<222> (4)..(4)
<223> 2'-OMe修饰的核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基(modified_base)
<222> (10)..(10)
<223> 2'-OMe修饰的核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基(modified_base)
<222> (14)..(14)
<223> 2'-OMe修饰的核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基(modified_base)
<222> (20)..(21)
<223> 2'-OMe修饰的核苷酸
<400> 2
gcggucauug ucacuggucu u 21
<210> 3
<211> 4001
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 3
tccctctccc accaggggta tacatcctca gagctgaccc acgacctagc tttctggtgt 60
gactcggggt gggggctccc actggtcacc tggtgacccc catcgcagtg agttccgccc 120
caaggggaag cccagcctat agcaggctgg ggtggggtgt gtgcggaggg aggtgggaga 180
ggcgtggaac tagagaccct ccaccttcat gtagaactag gggaacaacc ttaggttcca 240
agccccaagt ccctatgttt ccaccccttt ctaaggacag gcgtggagga gcggctgggg 300
ctggcgggct tgtcgggatc tcagctccct gagccctcct cctgccacgg gcctgctccc 360
ctccttctct catgggggtc tgctgtagcc tcgggaagga ggcaggaaac ctccaaataa 420
aatgacaagg cacgatttgc tccccctact cagtaggcat tggagcggtg agtttgcatt 480
tccaaggcac aaggttatcc taaatactag agttgccggg ctcccagctc agccccaaga 540
attctcccct cctcgcaggg agaagccacc gcctggcccc ctcatcttag acgcaccaag 600
tccggcgcag aggaagggag gggacacgcg gagcaggcca ggctttcagg aggcaccgga 660
atctcctagt cctggctcgc acggctcggg caagcctcga gatccggcga ccccaaacca 720
ctccctgggt ccccgccgga ggctggccca gggcggtccc acagccgcgc gcctcacgcg 780
cagttgccca tggccttgac caaggagctc tctggcagct ggcggaagat gccccgcagc 840
gtgtccagtt cgcggctcag ctgttccacc cgcttgcgca ggcggtcatt gtcactggtc 900

agctccagca ccttctgctg cgtctccacg ttgcgctgct tggccttgtc gcggctcttg 960
cgcaccgcga tgttgttgcg ctcgcgccgc acccggtact cgttgctgtt cttgtccacc 1020
gacttcttgg ccttgcccgc gccgctgccg ccactcgcgc ggaggtcggg gtgcgcggcg 1080
cccagcccct tgagcgcgct gccagggccc ggcaggccgg cggcaccgag cgcgggcgcg 1140
gggtgcgggc tgggcacggg cgtgggcggc ggcgtggggt gaccgggctg caggtgcatg 1200
gtggtctggc cgcagtgcgc gatctggaac tgcaggtgcg gggcggccag gtgcgcgggc 1260
ggcgggtgcg ggtgcgggtg cgagggcggc ggcggcggcg gcggctggta agggaagagg 1320
ccggccagcg ccagctgctt ggcttcatcc tcctcgcggg gctcctgctt gatcaccagc 1380
ggccgcagcg ccggcgcccc gacgcgctcg tacaggggct ccagcctgcc gtccaggtag 1440
ccggcggccg cgcagccgta gccgggcggg ggcccgtgcg ctcccccggg catgacggcg 1500
ccgccggggc ccgcgggcgc gcccgggtag tcaaagtcgc cgccgccgcc gccgcccgtg 1560
gggcccacgg ccgccttggc cttctcctgc tgccggctgt gctggaacag gtcggccagg 1620
aactcgtcgt tgaaggcggc cgggtcgatg taggcgctga tgtcgatgga cgtctcgtgc 1680
tcgcagatgc cgcccagcgg ctccggggcg gcaggtgggg cgggaggctg cgcggggccc 1740
gcgccccggg gaaagccgaa ggcggcgctg ctgggcgcgt gcgggggget ctgcaggtgg 1800
ctgctcatcg ggggccgcgg ctccgcctcg tagaagtcgg ccgactccat gggggagtta 1860
gagttctccc ggcatggcga gcctcggcgg cctccagcct gcgcggggcg tcgccgccgc 1920
ccacccggag accctgctcg cccgcgcccg cgcacctccg ggtcgcgaat ggcccggccc 1980
gcgccggccc agcttttata cccggcaggc cgcgtcgccc cctagagtcc gaggcggcct 2040
ctgtccccgg gctgcggcgg cgcggcgcct gctgggtcct agcgcgcggc cggcatgggg 2100
cggcgaacca gcgcggcaca gcgccgcgct ccccaggcag gccgcggcgc aacgcccacc 2160
gcctccagcg cgcccagcag agccgcggcg ctcgctccaa gctccgcccc cggcccggcc 2220
gtcgcccccg cgcccacgtg gtcggtagcg ggggcccccc cctcctgcct gccctaggcg 2280
cccgtatcca gccacggccg ggagcccagg agtatcccga ggctgcacgg ggtaggggtg 2340
gggggcggag ggcgagtctt ggtcttgagc tgctggggcg cggattctct ttcaaagcca 2400
gaaccaggcc tgtcccggac ccgcgtcccg gggaggctgc agcgcagagc agcggggctg 2460
gggccggtgg ggggccgttt gggacgcgcg gagaggtcct gagcgcggtg gctctgcgtc 2520
tcctagctct gatctccagg ctacccctgt gattccgcgc agaggtacct ctcggaggac 2580
gccggggtcc catgggcggc gccgcgcagg gcgctaggac cccgcgggga gcggaggcgg 2640
cctcggcccg ggagcctgga ggacctggcc ggtcgatccg cccgggctgg aaaactttct 2700
ttataattac ttctccaggt cggagcgcgc ggcttgctag gcgcgcgggg ccggcgctgt 2760
tacccggcgt ggagtcgccg attttttttc ctgcgggacc gcggggcccc ccagactagc 2820
ggagctggac gccggggcga gcacggggag gggcgcaccg agggaggaga caaacttaac 2880
tctggggccg ggattccgag gcgggggccg cagccctcga ggcccgaagc caccgcttcc 2940
tcccccgcct ccccattcag gtgggcgcca acggcgggag cgagggtgtc caggccgccg 3000
ggctgccagg tccgagcacg cacagggaga actctgccca gtggttcgcc gggcgctgta 3060
gtccccggga tcctagggac cgaggcggcc aggccctggg gcccccttgag tgcggcagct 3120
aatgctctca ccgcggcggg ggaaggagct tgccaccgag acccccagcc acgtgcgtcc 3180
ctcgcattct ttaccggggc cggggtggcg gctacggacc gtcagctggg cccagatgga 3240

gtcttgggag ccctcaagtg tctcctgtcc ttgcccgcgc cgcccctcgc cactggcgct 3300
gaggcctgac gccgcctgcg tcccggctag aggcgcgctt gcctacaggt gagggaagac 3360
ccccttcacc gacagtggcc ttaggcctgg caaggcgcca cgacccgccc aggagccccg 3420
gaggggcac agctaaaaac accgctggag agccccgagc ttccacgacg atcgcagtaa 3480
agaagcagtt tcatctgggc aacgcacact gcgctttaat caagttccta ttcaacatag 3540
tcccagtgat taatagccca actgcttcgt tttcggtcca gagctcataa acaagatatt 3600
tttagcttga cgcttttgga cgggagggag taaaaaccag atacgttaaa taaatatccc 3660
gatgtgagcc ggagagctgc ttgctgagcc aaatgcagga cccattcata tagcattcac 3720
ctgtggaggg agacctggac ggaaatcaaa aagcaccaag agcgatttgc gtttttttct 3780
gcggtgctaa aactaatggc ttttcctacc taggaacaaa gaaacgccac tgtacatgca 3840
cggttcccgg cctgtggagt tgtgggagga aggcgatgtc tggccttttt tgcacagctg 3900
ctgttgcctg cccagagatc gggaactctg ccccgtagga ctggaagaaa cctcagtaat 3960
gggaataaga ctttgtccaa taggggctg atgaatgtgt g 4001

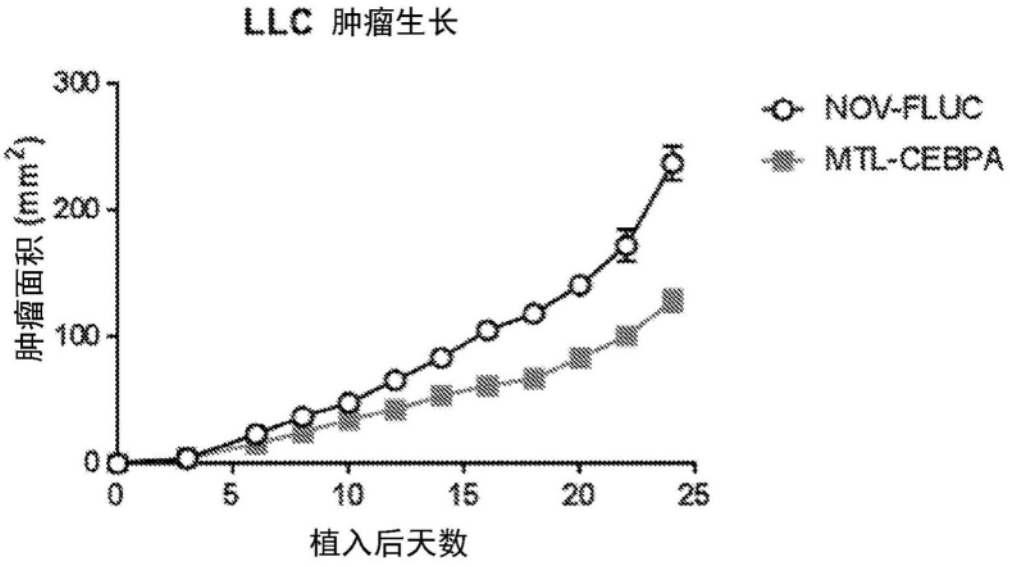

LLC 肿瘤生长
肿瘤面积 (mm²)
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
植入后天数
NOV-FLUC
MTL-CEBPA

图1

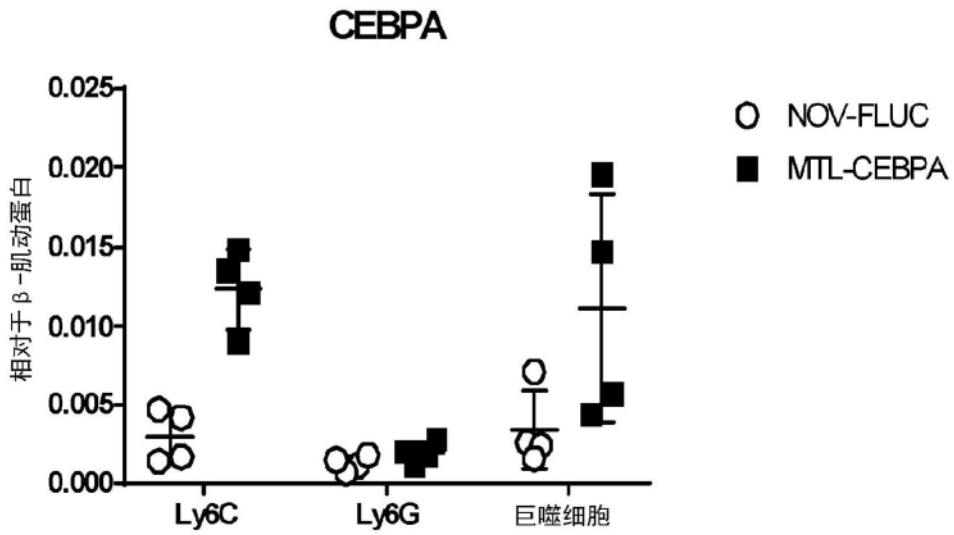

CEBPA
相对于β-肌动蛋白
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
Ly6C
Ly6G
巨噬细胞
NOV-FLUC
MTL-CEBPA

图2A

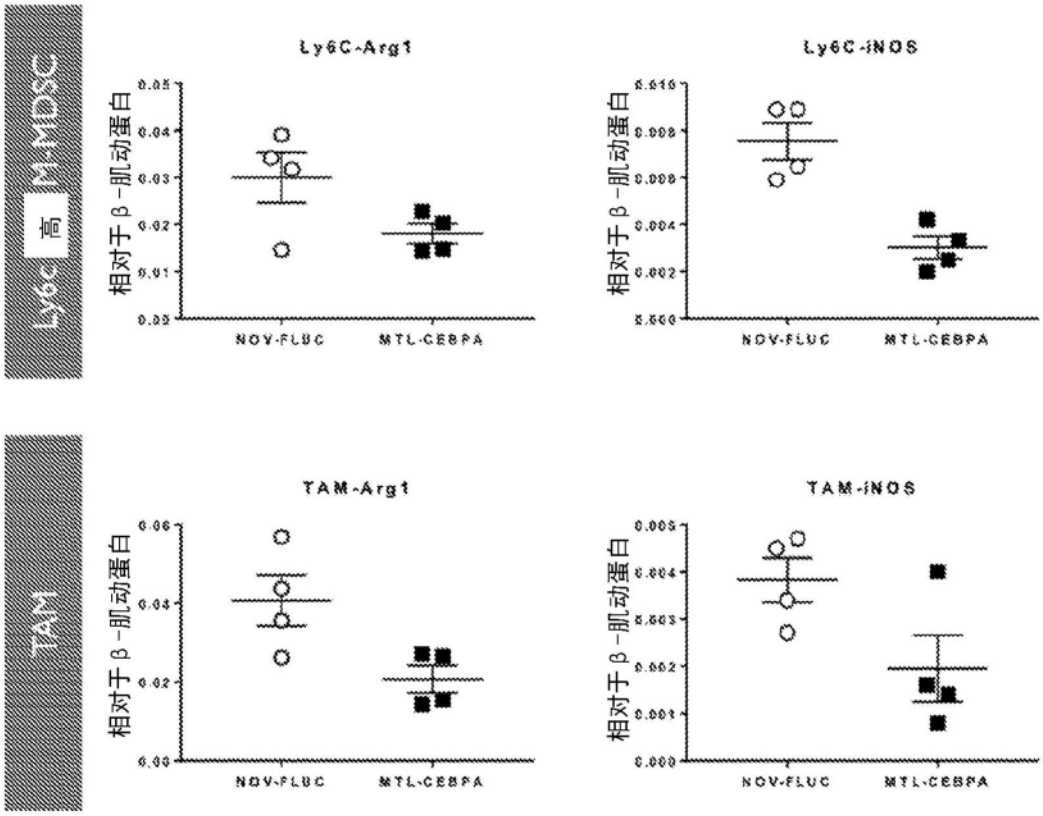

Ly6C 高 M-MDSC
Ly6C-Arg1
Ly6C-iNOS
相对于β-肌动蛋白
NOV-FLUC
MTL-CEBPA
TAM
TAM-Arg1
TAM-iNOS

图2B

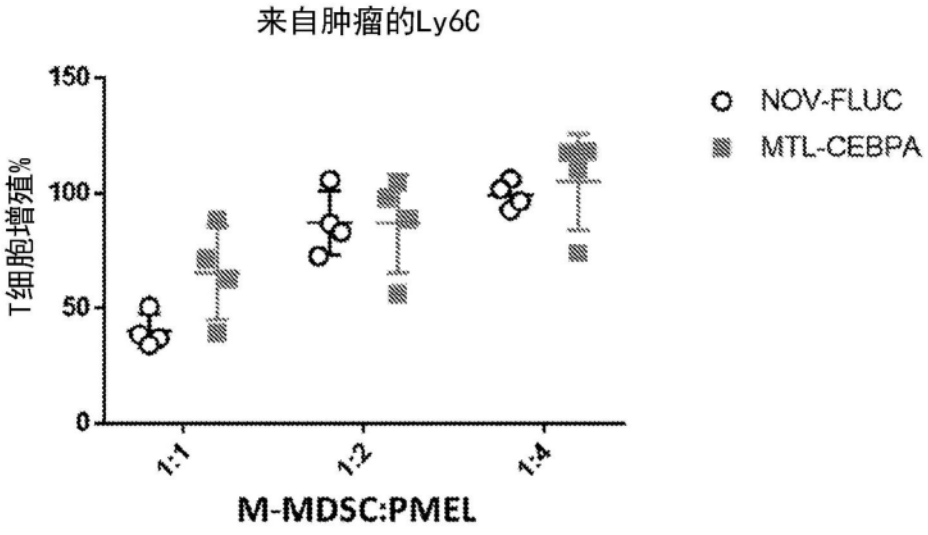

来自肿瘤的Ly6C
T细胞增殖%
150
100
50
0
1:1
1:2
1:4
M-MDSC:PMEL
NOV-FLUC
MTL-CEBPA

图3A

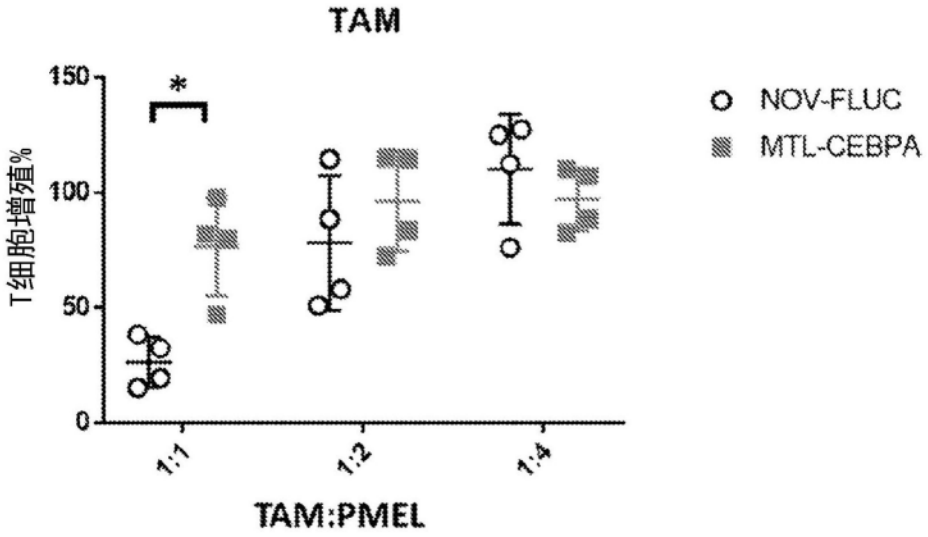

TAM
150
100
50
0
T细胞增殖%
*
1:1
1:2
1:4
TAM:PMEL
NOV-FLUC
MTL-CEBPA

图3B

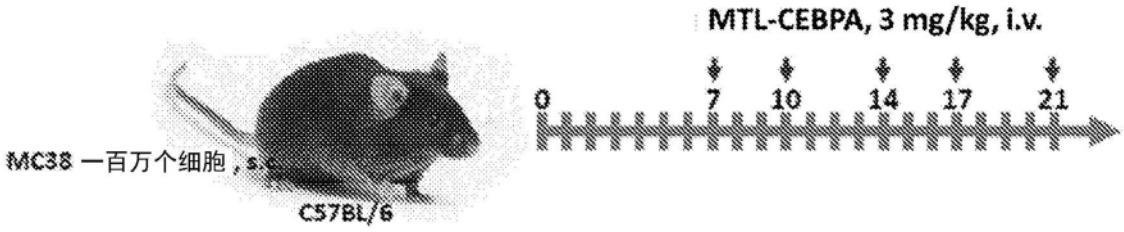

MTL-CEBPA, 3 mg/kg, i.v.
0
7
10
14
17
21
MC38 一百万个细胞，s.c.
C57BL/6

图4

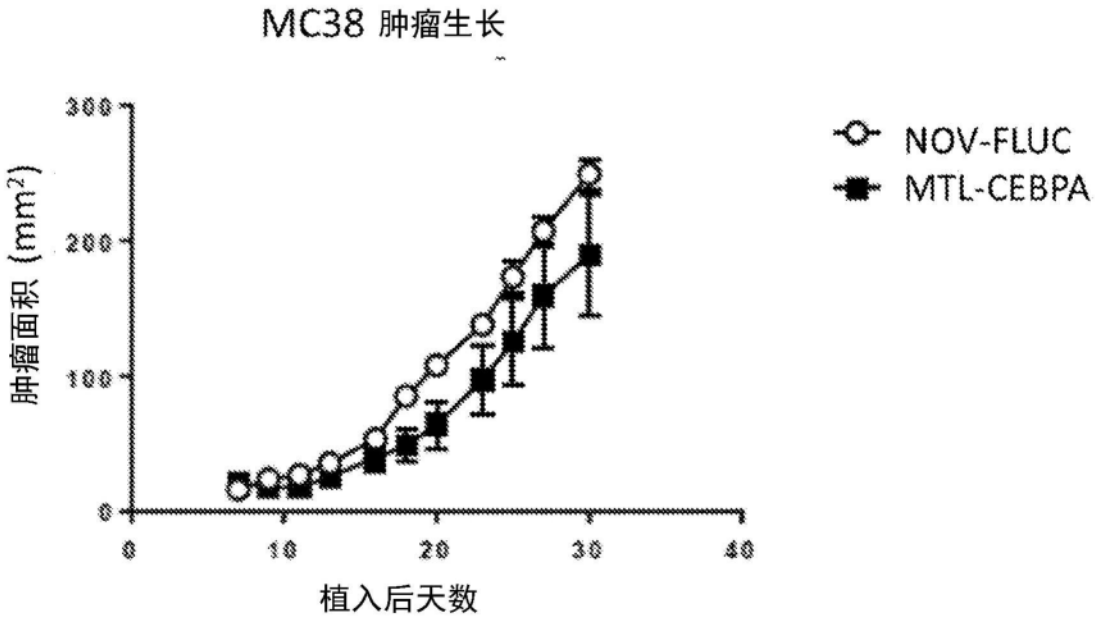

MC38 肿瘤生长
300
200
100
0
肿瘤面积 (mm²)
0
10
20
30
40
植入后天数
NOV-FLUC
MTL-CEBPA

图5A

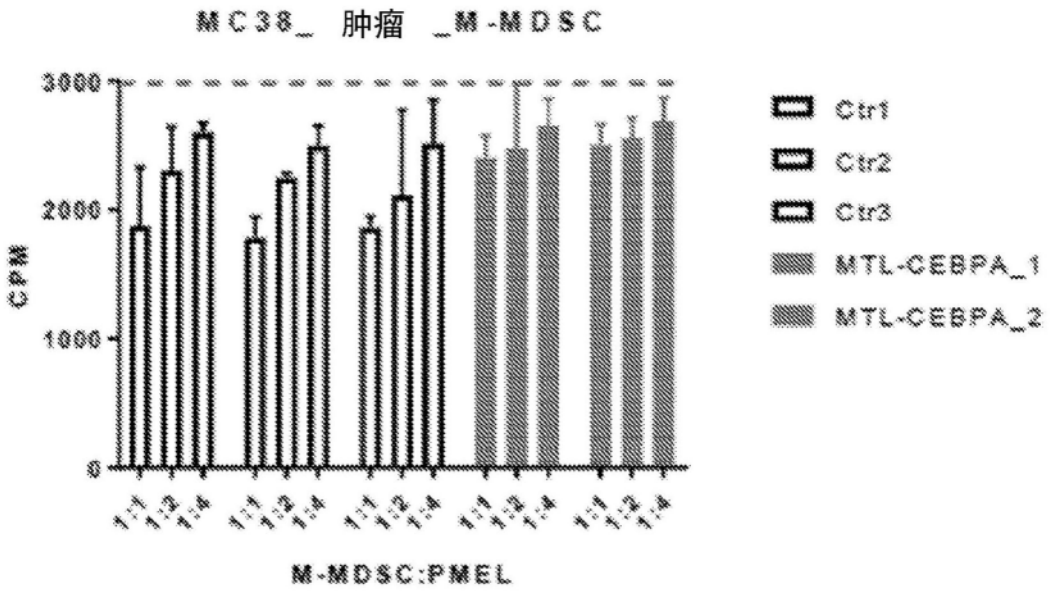

MC38_ 肿瘤 _M-MDSC
3000
2000
1000
0
CPM
Ctr1
Ctr2
Ctr3
MTL-CEBPA_1
MTL-CEBPA_2
M-MDSC:PMEL

图5B

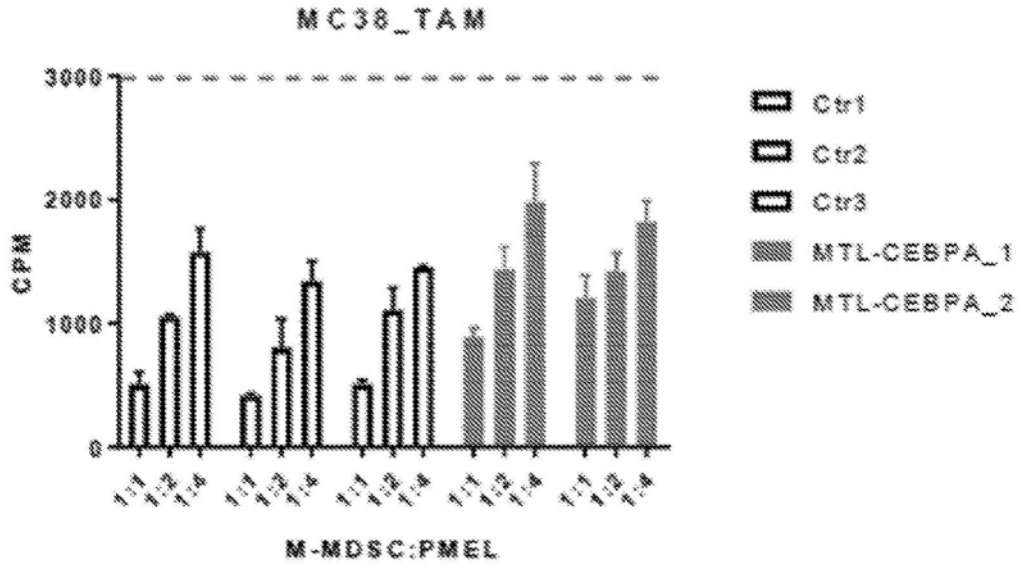
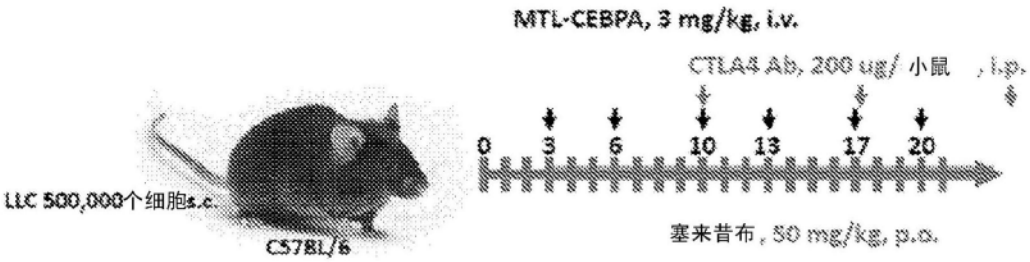

MC38_TAM
3000
2000
1000
0
CPM
Ctr1
Ctr2
Ctr3
MTL-CEBPA_1
MTL-CEBPA_2
M-MDSC:PMEL

图5C



1、 对照
2、 CEBPA
3、 CTLA4
4、 塞来昔布
5、 CEBPA+CTLA4
6、 CEBPA+塞来昔布

图6

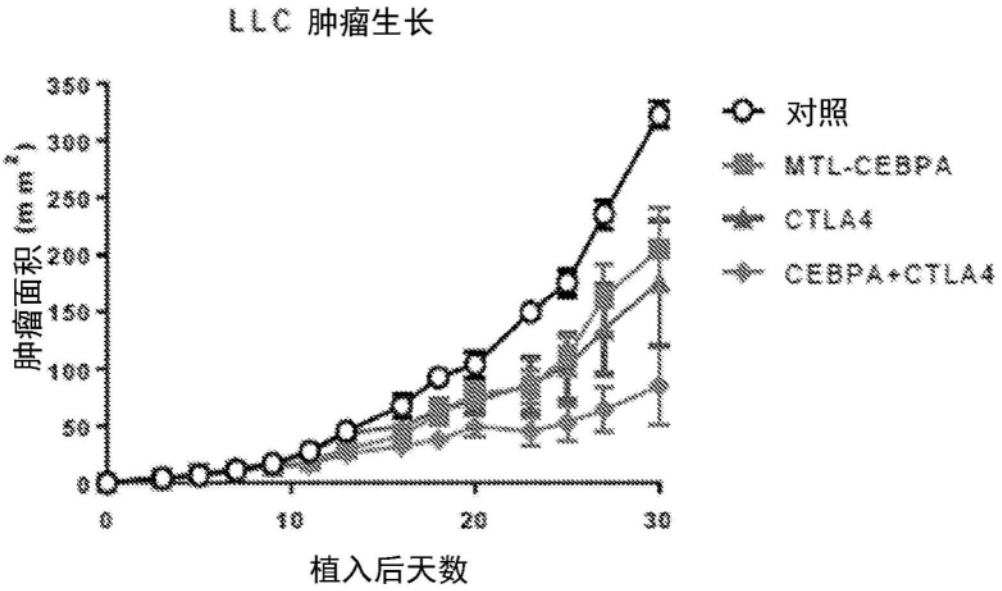


图7A

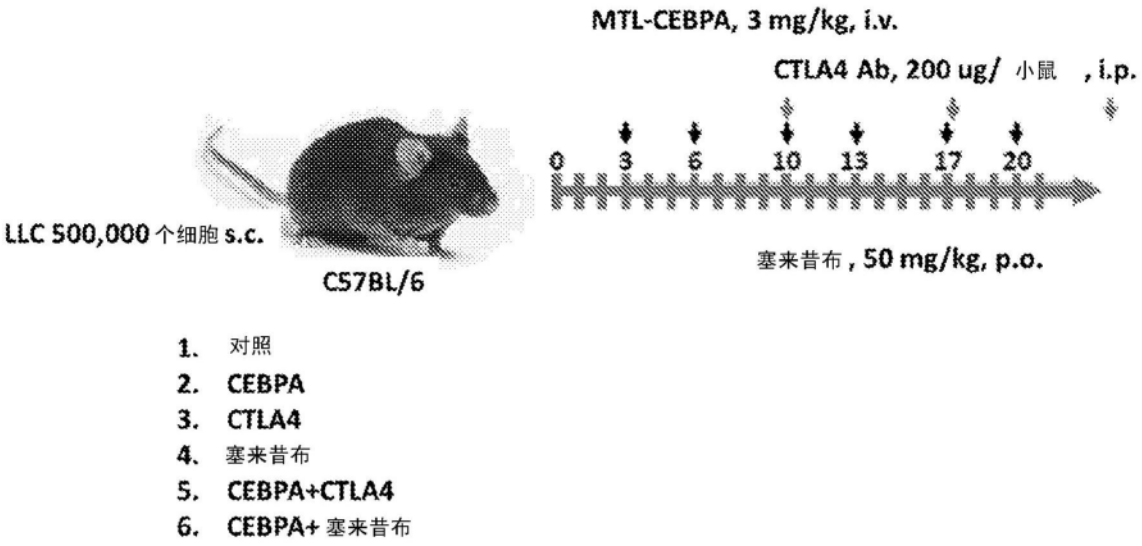

MTL-CEBPA, 3 mg/kg, i.v.
CTLA4 Ab, 200 ug/ 小鼠 , i.p.
0 3 6 10 13 17 20
LLC 500,000 个细胞 s.c.
C57BL/6
塞来昔布 , 50 mg/kg, p.o.
1. 对照
2. CEBPA
3. CTLA4
4. 塞来昔布
5. CEBPA+CTLA4
6. CEBPA+ 塞来昔布

图6

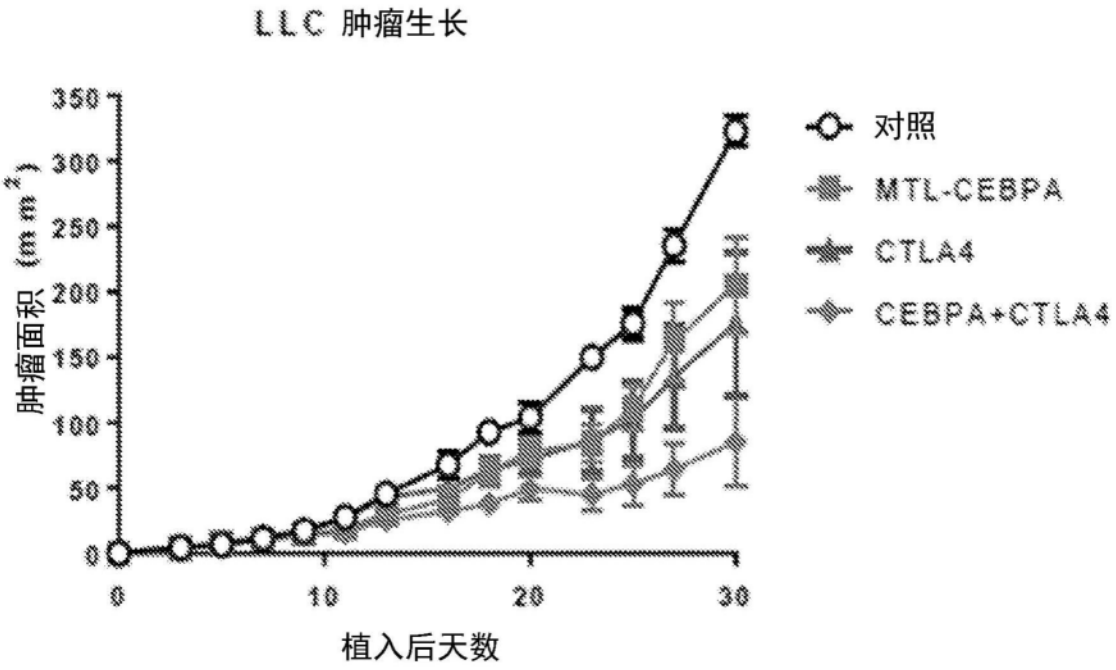

LLC 肿瘤生长
肿瘤面积 (mm²)
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
植入后天数
对照
MTL-CEBPA
CTLA4
CEBPA+CTLA4

图7A

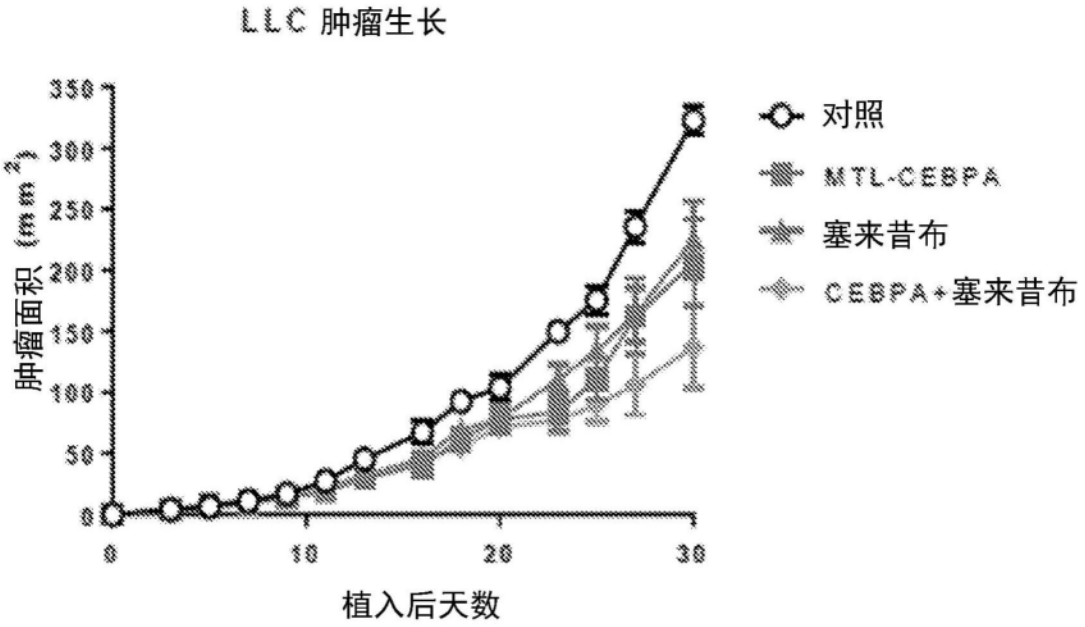
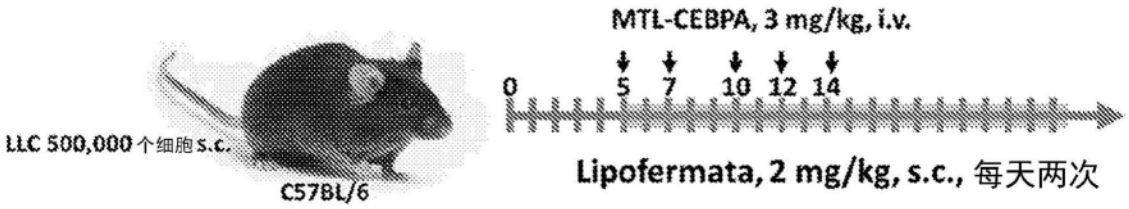


图7B



1. 对照
2. CEBPA
3. Lipofermata
4. CEBPA+Lipofermata

N = 5

图8