



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113924365 A

(43) 申请公布日 2022.01.11

(21) 申请号 202080038692.2

(22) 申请日 2020.03.27

(30) 优先权数据

62/826121 2019.03.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/025125 2020.03.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/205473 EN 2020.10.08

(71) 申请人 迪克纳制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·贾内什

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 任晓华 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书32页

序列表16页 附图23页

(54) 发明名称

用于治疗KRAS相关疾病或病症的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了治疗受试者中的KRAS相关癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的MEK抑制剂或免疫治疗剂。本文还公开了一种增强免疫治疗剂的针对KRAS相关癌症的治疗作用的方法,所述方法包括以足以增强所述免疫治疗剂的针对所述癌症的所述治疗作用的量向患有所述KRAS相关癌症的受试者施用KRAS核酸抑制剂分子。

1. 一种治疗受试者中的KRAS相关癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用:
治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子;和
治疗有效量的MEK抑制剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述MEK抑制剂是曲美替尼。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中在所述KRAS核酸抑制剂分子的施用之前,所述KRAS相关癌症对用所述MEK抑制剂进行的治疗具有抗性。
4. 一种增强免疫治疗剂的针对KRAS相关癌症的治疗作用的方法,所述方法包括以足以增强所述免疫治疗剂的针对所述癌症的所述治疗作用的量向患有所述KRAS相关癌症的受试者施用KRAS核酸抑制剂分子。
5. 如权利要求4所述的方法,其中在施用所述KRAS核酸抑制剂分子之前,所述KRAS相关癌症伴有对免疫疗法具有抗性的非T细胞发炎症表型,并且其中施用所述KRAS核酸抑制剂分子使所述非T细胞发炎症表型转变成对免疫治疗剂起响应的T细胞发炎症表型。
6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括施用降低肿瘤微环境中的基质标志物的剂。
7. 如权利要求6所述的方法,其中降低肿瘤微环境中的基质标志物的所述剂是TGF- β 抑制剂或CSF1抑制剂。
8. 一种治疗受试者中的KRAS相关癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用:
治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子,和
治疗有效量的免疫治疗剂。
9. 如权利要求4-8中任一项所述的方法,其中所述免疫治疗剂是抑制性免疫检查点分子的拮抗剂或共刺激性检查点分子的激动剂。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述免疫治疗剂是抑制性检查点的拮抗剂,并且所述抑制性检查点是PD-1或PD-L1。
11. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述抑制性免疫检查点分子的所述拮抗剂或所述共刺激性检查点分子的所述激动剂是单克隆抗体。
12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述KRAS相关癌症是胰腺癌。
13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述KRAS核酸抑制剂分子是包含有义链和反义链以及在所述有义链与所述反义链之间的具有约15-45个碱基对的互补性区域的双链RNAi抑制剂分子。
14. 如权利要求13所述的方法,其中所述有义链是25-40个核苷酸,并且含有茎和环,所述反义链是18-24个核苷酸,并且任选地在它的3'末端包含1-2个核苷酸的单链突出端,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个碱基对的双链体区域。
15. 如权利要求13所述的方法,其中所述有义链与所述反义链之间的所述互补性区域是21-26个核苷酸,其中所述有义链在长度方面是21-26个核苷酸,并且其中所述反义链在长度方面是23-38个核苷酸并在它的3'末端包括1-2个核苷酸的单链突出端。
16. 如权利要求15所述的方法,其中所述反义链还在它的5'末端包含1-5个核苷酸的单链突出端。
17. 如权利要求13所述的方法,其中:
 - a) 所述有义链是26-36个核苷酸并含有茎和四元环,并且所述反义链是18-24个核苷

酸,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个核苷酸的双链体区域;

b) 所述有义链是34-36个核苷酸并含有茎和四元环,并且所述反义链是18-24个核苷酸,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个核苷酸的双链体区域;

c) 所述有义链是34-36个核苷酸并含有茎和四元环,并且所述反义链是18-24个核苷酸,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个核苷酸的双链体区域;或

d) 所述有义链是25-35个核苷酸并含有茎和三元环,并且所述反义链是18-24个核苷酸,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个核苷酸的双链体区域。

18. 如权利要求13所述的方法,其中所述有义链与所述反义链之间的所述互补性区域是19个核苷酸,其中所述有义链在长度方面是21个核苷酸,并且在它的3'末端包括2个核苷酸的单链突出端,并且其中所述反义链在长度方面是21个核苷酸,并且在它的3'末端包括2个核苷酸的单链突出端。

19. 如权利要求13所述的方法,其中所述有义链与所述反义链之间的所述互补性区域是21个核苷酸,其中所述有义链在长度方面是21个核苷酸,并且其中所述反义链在长度方面是23个核苷酸,并且在它的3'末端包括2个核苷酸的单链突出端。

20. 如前述权利要求中任一项所述的方法或组合物,其中所述KRAS核酸抑制剂分子与脂质纳米粒子一起配制。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质和聚乙二醇化脂质。

22. 如权利要求13所述的方法,其中所述有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成。

23. 如权利要求13或22所述的方法,其中所述反义链包含SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:18的序列或由所述序列组成。

24. 如权利要求14所述的方法,其中所述有义链包含SEQ ID NO:15中的一者的序列或由所述序列组成。

25. 如权利要求14或24所述的方法,其中所述反义有义链包含SEQ ID NO:16或19中的一者的序列或由所述序列组成。

26. 如权利要求14所述的方法,其中:

(a) 所述有义链包含SEQ ID NO:3的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:4的序列或由所述序列组成;

(b) 所述有义链包含SEQ ID NO:1的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:2的序列或由所述序列组成;或

(c) 所述有义链包含SEQ ID NO:5的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:6的序列或由所述序列组成。

27. 如权利要求14所述的方法,其中:

(a) 所述有义链包含SEQ ID NO:7的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:8的序列或由所述序列组成;

(b) 所述有义链包含SEQ ID NO:9的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:10的序列或由所述序列组成;

(c) 所述有义链包含SEQ ID NO:11的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包

含SEQ ID NO:12的序列或由所述序列组成;

(d) 所述有义链包含SEQ ID NO:7的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:17的序列或由所述序列组成;

(e) 所述有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:18的序列或由所述序列组成;

(f) 所述有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:19的序列或由所述序列组成;

(g) 所述有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:14的序列或由所述序列组成;或

(h) 所述有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且所述反义有义链包含SEQ ID NO:16的序列或由所述序列组成。

用于治疗KRAS相关疾病或病症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年3月29日提交的美国临时专利申请第62/826,121号的权益,并且依赖于所述美国临时专利申请的提交日期。这个段落中引用的每个相关申请的全部内容通过引用以它的整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交,并且据此通过引用以它的整体并入本文的序列表。2020年3月26日创建的所述ASCII副本名为0243_0034-PCT_SL.txt,并且大小是15,508字节。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及使用降低KRAS基因的表达的核酸抑制剂分子与至少一种免疫治疗剂或MEK抑制剂的组合的组合疗法,以及使用KRAS核酸抑制剂分子增强免疫治疗剂的治疗作用的方法。

背景技术

[0006] Ras是控制细胞生长和细胞死亡的细胞信号传导路径中涉及的基因家族。调控异常的Ras信号传导可导致肿瘤生长和转移 (Goodsell D.S.Oncologist 4:263-4)。据估计所有人类肿瘤的20-25%含有Ras中的活化性突变;在特定肿瘤类型诸如胰腺癌中,这个数字可高达90% (Downward J.Nat Rev Cancer,3:11-22)。因此,Ras基因家族的成员是癌症治疗性药物的具有吸引力的分子靶标。

[0007] 三种人RAS基因编码高度相关的具有188至189个氨基酸的蛋白质,指定为H-Ras、N-Ras以及K-Ras4A (KRAS亚型a) 和K-Ras4B (KRAS亚型b;这两种KRas蛋白由选择性基因剪接产生)。Ras蛋白充当控制细胞内信号传导网络的二元分子开关。Ras调控的信号路径控制诸如肌动蛋白细胞骨架完整性、增殖、分化、细胞粘附、凋亡和细胞迁移的过程。Ras和Ras相关蛋白在癌症中经常是去调控的,从而导致增加的侵袭和转移以及降低的凋亡。Ras活化许多路径,但对于肿瘤发生尤其重要的一个路径似乎是丝裂原活化蛋白 (MAP) 激酶,所述激酶它们自身将信号向下游传输至其他蛋白质激酶和基因调控蛋白 (Lodish等人Molecular Cell Biology (第4版).San Francisco:W.H.Freeman,第25章,“Cancer”)。因此,抑制KRAS基因表达可用作化学治疗工具。

[0008] 具有25至35个核苷酸的链长度的双链RNA (dsRNA) 剂已被描述为哺乳动物细胞中靶标基因表达,包括KRAS基因表达 (Brown,美国专利第9,200,284和9,809,819号) 的有效抑制剂 (Rossi等人,美国专利申请第2005/0244858和US 2005/0277610号)。此长度的dsRNA剂被认为由RNA干扰 (RNAi) 路径的Dicer酶加工,从而导致此类剂被称为“Dicer底物siRNA” (“DsiRNA”) 剂。先前描述了DsiRNA剂的额外经修饰结构 (Rossi等人,美国专利申请第2007/0265220号)。

[0009] 在某些情况下,免疫系统也可涉及于癌症治疗中。免疫系统使用免疫细胞的表面

上的某些分子作为检查点来控制T细胞活化,并且防止免疫系统靶向健康细胞和诱导自体免疫性。某些癌细胞能够利用这些免疫检查点分子来逃避免疫系统。近年来,用以阻断免疫检查点分子诸如细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 和程序化细胞死亡受体1 (PD-1) 的免疫治疗策略已显示针对某些癌症取得成功。抗CTLA-4单克隆抗体(伊匹木单抗(ipilimumab))在2011年被核准用于治疗患有晚期黑素瘤的患者。抗PD-1单克隆抗体(纳武利尤单抗(nivolumab))在2014年被核准用于单独或与伊匹木单抗组合治疗患有某些晚期癌症的患者。其他PD-1抑制剂包括例如帕博利珠单抗(pembrolizumab) (Keytruda®)和纳武利尤单抗(Opdivo®)。阻断免疫检查点分子如CTLA-4、PD-1和PD-L1的抗体似乎解除了对T细胞活化的制动,并且促进强力抗肿瘤免疫应答。然而,仅有一子组患者对这个免疫疗法起响应。

[0010] 至少在某些情况下,对免疫疗法起响应的肿瘤具有预先存在的T细胞发炎表型,具有浸润性T细胞、将T细胞募集至肿瘤微环境的广泛趋化因子概况、以及高水平的IFN γ 分泌(也被称为热或发炎肿瘤)。Gajewski等人,Nat Immunol.,2013,14(10):1014-22;Ji等人,Cancer Immunol Immunother,2012,61:1019-31。相反,已显示不对免疫疗法起响应的某些肿瘤不具有T细胞发炎表型(也被称为冷或非发炎肿瘤)。同前。

[0011] 本领域中仍然需要开发新的癌症治疗选项,包括将使得非发炎肿瘤对免疫疗法起响应的选项。

发明内容

[0012] 本申请涉及包括将KRAS核酸抑制剂分子和免疫治疗剂或MEK抑制剂施用至受试者的治疗方法。本文公开的KRAS核酸分子能够在体外或在哺乳动物受试者中降低细胞中KRAS mRNA的表达。

[0013] 本文公开了一种治疗受试者中的KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的MEK抑制剂。在某些实施方案中,MEK抑制剂是曲美替尼(trametinib)。在某些实施方案中,KRAS相关疾病或病症是KRAS相关癌症。在某些实施方案中,在KRAS核酸抑制剂分子的施用之前,KRAS相关癌症对用MEK抑制剂或免疫治疗剂进行的治疗具有抗性。

[0014] 还公开了一种治疗受试者中的KRAS相关疾病或病症诸如癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的免疫治疗剂。一相关方面涉及一种增强免疫治疗剂的针对KRAS相关疾病或病症诸如癌症的治疗作用的方法,所述方法包括以足以增强所述免疫治疗剂的针对癌症的治疗作用的量向患有KRAS相关癌症的受试者施用KRAS核酸抑制剂分子。

[0015] 在某些实施方案中,在施用KRAS核酸抑制剂分子之前,KRAS相关癌症伴有对免疫疗法具有抗性的非T细胞发炎表型,并且施用KRAS核酸抑制剂分子使所述非T细胞发炎表型转变成对免疫治疗剂起响应的T细胞发炎表型。

[0016] 在某些实施方案中,本文公开的方法还包括施用降低肿瘤微环境中的基质标志物的剂,诸如TGF- β 抑制剂或CSF1抑制剂。

[0017] 在某些实施方案中,免疫治疗剂是抑制性免疫检查点分子的拮抗剂或共刺激性检查点分子的激动剂。在某些实施方案中,免疫治疗剂是抑制性检查点的拮抗剂,并且所述抑

制性检查点是PD-1或PD-L1,并且在某些实施方案中,抑制性免疫检查点分子的拮抗剂或共刺激性检查点分子的激动剂是单克隆抗体。

[0018] 在某些实施方案中,KRAS相关癌症是胰腺癌。

[0019] 根据各种实施方案,KRAS核酸抑制剂分子是包含有义链和反义链以及在所述有义链与所述反义链之间的具有约15-45个碱基对的互补性区域的双链RNAi抑制剂分子。在某些实施方案中,有义链是25-40个核苷酸并含有茎和环,并且反义链是18-24个核苷酸并任选地在它的3'末端包含1-2个核苷酸的单链突出端,其中所述有义链和所述反义链形成18-24个碱基对的双链体区域。

[0020] 在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且/或者反义链包含SEQ ID NO:14或18的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:15中的一者的序列或由所述序列组成,并且/或者反义链包含SEQ ID NO:16或19中的一者的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:14的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:18的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:16的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:19的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:7的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:17的序列或由所述序列组成。还考虑其他核酸抑制剂分子,如在本申请中其他地方所公开。

附图说明

[0021] 并入本说明书中并构成本说明书的一部分的附图说明某些实施方案,并且连同书面描述一起用于解释本文公开的组合物和方法的某些原理。

[0022] 图1显示12种不同KRAS DsiRNA构建体的结构和核苷酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 1-2、20-25、5-6、26-27、3-4以及28-37)和它们的相应四元环结构和核苷酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 7-8、38-43、11-12、44-45、9-10以及46-55),以及KRAS-446的相应U/GG四元环结构和核苷酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 15和19)。四元环结构包括36个核苷酸的有义链和22个核苷酸的单独反义链。四元环结构中的箭头指示有义链与反义链之间的不连续性的位置,其中在箭头的右手侧的“C”是有义链的3'末端,并且在箭头的左手侧的“U”、“A”或“G”核苷酸是反义链的5'末端。

[0023] 图2A是显示如实施例1中所述在用如图1中所示的各种KRAS DsiRNA构建体在1nM下在MIA PaCa细胞中进行单一处理循环之后24小时的KRAS mRNA表达水平的图。

[0024] 图2B是显示如实施例1中所述在用如图1中所示的各种KRAS DsiRNA构建体在0.1nM下在MIA PaCa细胞中进行单一处理循环之后24小时的KRAS mRNA表达水平的图。

[0025] 图3A显示3种不同KRAS四元环构建体的结构和核苷酸序列:KRAS-194T(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 7和17)、KRAS-465T(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 13和18)和KRAS-446T(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 15和19),以及作为在反义链的核苷酸1处含有4'-氧基甲基磷酸酯修饰的四元环构建体(也被称为“KRAS1”)的KRAS-465T/MOP的结构和核

核苷酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 13-14)。四元环结构包括36个核苷酸的有义链和22个核苷酸的单独反义链。四元环结构中的箭头指示有义链与反义链之间的不连续性的位置,其中在箭头的右手侧的“C”是有义链的3'末端,并且在箭头的左手侧的“U”是反义链的5'末端。

[0026] 图3B是显示在三天每日施用3mg/kg的如实施例1中所述以及图3A中所示的KRAS核酸抑制剂分子之后24小时,在使用MIA PaCa2肿瘤细胞的小鼠肿瘤模型中KRAS mRNA表达水平的柱状散点图。

[0027] 图3C是显示在三天每日施用3mg/kg的如实施例1中所述以及图3A中所示的KRAS核酸抑制剂分子之后24小时,在使用MIA LS411N肿瘤细胞的小鼠肿瘤模型中KRAS mRNA表达水平的柱状散点图。

[0028] 图4A显示在反义链的核苷酸1处含有4'-氧基甲基磷酸酯修饰的KRAS四元环构建体KRAS-465T/MOP(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 13-14)和KRAS-446T/MOP(按照出现顺序分别是SEQ ID NO15-16)的结构和核苷酸序列。四元环结构包括36个核苷酸的有义链和22个核苷酸的单独反义链。四元环结构中的箭头指示有义链与反义链之间的不连续性的位置,其中在箭头的右手侧的“C”是有义链的3'末端,并且在箭头的左手侧的“U”是反义链的5'末端。

[0029] 图4B是显示在三天每日施用3mg/kg的如实施例1中所述以及图4A中所示的两种KRAS核酸抑制剂分子(KRAS-465T/MOP和KRAS-446T/MOP)之后24小时和72小时时间点时,小鼠肿瘤模型LS411N肿瘤中的KRAS mRNA表达水平的柱状散点图。

[0030] 图5A显示用于如实施例3中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用在LNP中配制的KRAS核酸抑制剂分子(KRAS/LNP)治疗的C57BL/6小鼠的治疗时程。

[0031] 图5B是显示如实施例3中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的Kras、Cd8、FoxP3和CXCL1mRNA表达水平的柱状散点图。

[0032] 图6是显示如实施例3中所述植入C57BL/6小鼠中,并且用KRAS/LNP治疗的Pan02肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0033] 图7是显示如实施例3中所述植入C57BL/6小鼠中,并且用KRAS/LNP治疗的Panc1肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0034] 图8A是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的CXCL1 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0035] 图8B是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的FoxP3 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0036] 图8C是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的Cd8 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0037] 图8D是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的ROB01 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0038] 图8E是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的TGF-βmRNA表达水平的柱状散点图。

[0039] 图8F是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的CXCL5 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0040] 图8G是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的IL-10 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0041] 图8H是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的Cd274 (PD-L1) mRNA表达水平的柱状散点图。

[0042] 图8I是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的Axin2 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0043] 图8J是显示如实施例4中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的CSF3 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0044] 图9A是显示如实施例5中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用曲美替尼和KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的Cd8 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0045] 图9B是显示如实施例5中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用曲美替尼和KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的FoxP3 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0046] 图9C是显示如实施例5中所述用鼠PDAC Pan02肿瘤植入,并且用曲美替尼和KRAS/LNP治疗的C57BL/6小鼠的PD-L1 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0047] 图10A是显示如实施例5中所述植入C57BL/6小鼠中,并且用曲美替尼 (MEKi) 和KRAS/LNP治疗的Pan02肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0048] 图10B是显示如实施例5中所述用PDAC Pan02肿瘤植入,并且用单独曲美替尼 (MEKi) 以及用曲美替尼 (MEKi) 与KRAS/LNP两者治疗的C57BL/6小鼠的FoxP3表达水平的柱状散点图。

[0049] 图10C是显示如实施例5中所述用PDAC Pan02肿瘤植入,并且用单独曲美替尼 (MEKi) 以及用曲美替尼 (MEKi) 与KRAS/LNP两者治疗的C57BL/6小鼠的CXCL5 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0050] 图10D是显示如实施例5中所述用PDAC Pan02肿瘤植入,并且用单独曲美替尼 (MEKi) 以及用曲美替尼 (MEKi) 与KRAS/LNP两者治疗的C57BL/6小鼠的Cd274 (PD-L1) mRNA表达水平的柱状散点图。

[0051] 图10E是显示如实施例5中所述用PDAC Pan02肿瘤植入,并且用单独曲美替尼 (MEKi) 以及用曲美替尼 (MEKi) 与KRAS/LNP两者治疗的C57BL/6小鼠的CXCL1 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0052] 图10F是显示如实施例5中所述用PDAC Pan02肿瘤植入,并且用单独曲美替尼 (MEKi) 以及用曲美替尼 (MEKi) 与KRAS/LNP两者治疗的C57BL/6小鼠的Cd8 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0053] 图11根据免疫组织化学分析显示将用KRAS DsiRNA进行的治疗和MEK抑制剂组合导致Pan02肿瘤中FoxP3表达降低和CD8表达增加,如实施例5中所讨论。

[0054] 图12A是显示如实施例6中所述植入至C57BL/6小鼠中,并且用曲美替尼和KRAS1治疗的Panc1肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0055] 图12B是显示如实施例6中所述用单独曲美替尼治疗以及用曲美替尼与KRAS/LNP两者治疗的曲美替尼抗性人PDAC Panc1肿瘤的Kras和Cd274 (PD-L1) mRNA表达水平的柱状散点图。

[0056] 图13是显示如实施例6中所述植入至C57BL/6小鼠中,并且用吉西他滨

(gemcitabine) 和KRAS/LNP治疗的Panc1肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0057] 图14是显示如实施例6中所述植入至C57BL/6小鼠中,并且用吉西他滨和KRAS/LNP治疗的Pan02肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0058] 图15A是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的FoxP3 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0059] 图15B是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的CXCL1 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0060] 图15C是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的Cd8 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0061] 图15D是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的Cd274 (PD-L1) mRNA表达水平的柱状散点图。

[0062] 图15E是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的ROBO1 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0063] 图15F是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的TGF- β mRNA表达水平的柱状散点图。

[0064] 图15G是显示如实施例6中所述用单独吉西他滨治疗以及用吉西他滨与KRAS/LNP两者治疗的吉西他滨抗性鼠PDAC Pan02肿瘤的Axin2 mRNA表达水平的柱状散点图。

[0065] 图16A是显示如实施例7中所述植入至C57BL/6小鼠中,并且用TGF- β 抑制剂治疗的Pan02肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0066] 图16B是显示如实施例7中所述植入至C57BL/6小鼠中,并且用CSF1抗体治疗的Pan02肿瘤的随时间的肿瘤体积的图。

[0067] 定义

[0068] 为使本公开更易于理解,以下首先定义某些术语。以下术语和其他术语的额外定义可贯穿说明书加以阐述。如果术语的以下阐述的定义与通过引用并入的申请或专利中的定义不一致,那么本申请中阐述的定义应被用于理解所述术语的含义。

[0069] 除非上下文另外明确规定,否则如本说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个(种) (a/an)”和“这个(种) (the)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一种方法”包括本文所述的类型的以及/或者将在阅读本公开后变得为本领域技术人员显而易见的一种或多种方法和/或步骤,依此类推。

[0070] 施用:如本文所用,将组合物“施用”至受试者意指对受试者给与、施加组合物,或致使组合物与受试者接触。可通过许多途径中的任一者实现施用,包括例如经表面、口服、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内、鞘内和真皮内。

[0071] 反义链:双链核酸抑制剂分子包含两个寡核苷酸链:反义链和有义链。反义链或其区域部分地、大致上地或完全地互补于靶标核酸的相应区域。此外,双链核酸抑制剂分子的反义链或其区域部分地、大致上地或完全地互补于双链核酸抑制剂分子的有义链或其区域。在某些实施方案中,反义链还可含有非互补于靶标核酸序列的核苷酸。非互补性核苷酸可在互补性序列的任一侧上,或可在互补性序列的两侧上。在某些实施方案中,当反义链或其区域部分地或大致上地互补于有义链或其区域时,非互补性核苷酸可位于一个或多个互补性区域之间(例如一个或多个错配)。双链核酸抑制剂分子的反义链也被称为引导链。

[0072] 近似:如本文所用,如应用于一个或多个目标值的术语“近似”或“约”是指类似于陈述的参考值的值。在某些实施方案中,除非另外陈述或另外由上下文显而易见,否则术语“近似”或“约”是指落在陈述的参考值的在任一方向(大于或小于)上的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内的值的范围(例外之处是当这种数字将超过可能值的100%时)。

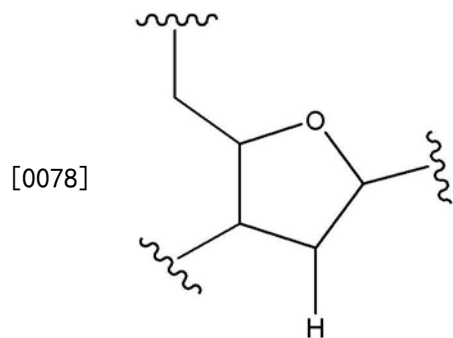
[0073] 双环核苷酸:如本文所用,术语“双环核苷酸”是指包含双环糖部分的核苷酸。

[0074] 双环糖部分:如本文所用,术语“双环糖部分”是指包含4至7元环(包括但不限于呋喃糖基)的经修饰糖部分,所述经修饰糖部分包含连接所述4至7元环的两个原子的桥以形成第二环,从而产生双环结构。通常,4至7元环是糖。在一些实施方案中,4至7元环是呋喃糖基。在某些实施方案中,桥连接呋喃糖基的2'-碳和4'-碳。

[0075] 互补:如本文所用,术语“互补”是指两个核苷酸之间(例如在两个相对核酸上或在单一核酸链的相对区域上)的容许两个核苷酸彼此形成碱基对的结构关系。举例来说,一个核酸的互补于相对核酸的嘧啶核苷酸的嘌呤核苷酸可通过彼此形成氢键来碱基配对在一起。在一些实施方案中,互补性核苷酸可以沃森-克里克(Watson-Crick)方式或以允许形成稳定双链体的任何其他方式碱基配对。“完全互补”或100%互补性是指第一寡核苷酸链或第一寡核苷酸链的区段的每个核苷酸单体可与第二寡核苷酸链或第二寡核苷酸链的区段的每个核苷酸单体形成碱基对所处的情况。小于100%互补性是指两个寡核苷酸链(或两个寡核苷酸链的两个区段)的一些而非所有核苷酸单体可彼此形成碱基对所处的情况。“大致上互补性”是指两个寡核苷酸链(或两个寡核苷酸链的区段)展现90%或更大的彼此互补性。“充分互补”是指靶标mRNA与核酸抑制剂分子之间的互补性致使在由靶标mRNA编码的蛋白质的量方面存在降低。

[0076] 互补链:如本文所用,术语“互补链”是指双链核酸抑制剂分子的部分地、大致上地或完全地互补于另一链的链。

[0077] 脱氧呋喃核糖基:如本文所用,术语“脱氧呋喃核糖基”是指见于天然存在的DNA中,并且在2'-碳处具有氢基团的呋喃糖基,如以下所说明:



[0079] 脱氧核糖核苷酸:如本文所用,术语“脱氧核糖核苷酸”是指在糖部分的2'位具有氢基团的天然核苷酸(如本文所定义)或经修饰核苷酸(如本文所定义)。

[0080] dsRNAi抑制剂分子:如本文所用,术语“dsRNAi抑制剂分子”是指具有有义链(过客)和反义链(引导)的双链核酸抑制剂分子,其中所述反义链或所述反义链的部分由Argonaute 2(Ago2)核酸内切酶用于裂解靶标mRNA。

[0081] 双链体:如本文所用,关于核酸(例如寡核苷酸)的术语“双链体”是指通过两个反平行核苷酸序列的互补性碱基配对形成的结构。

[0082] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指可包括在组合物中例如以提供或促进所需稠度或稳定作用的非治疗剂。

[0083] 呋喃糖基:如本文所用,术语“呋喃糖基”是指包含具有四个碳原子和一个氧原子的5元环的结构。

[0084] 核苷酸间连接基团:如本文所用,术语“核苷酸间连接基团”或“核苷酸间键联”是指能够共价连接两个核苷部分的化学基团。通常,化学基团是含有磷酸或亚磷酸酯基团的含磷连接基团。磷酸连接基团意图包括磷酸二酯键联、二硫代磷酸酯键联、硫代磷酸酯键联、磷酸三酯键联、硫羰烷基磷酸酯键联、硫羰烷基磷酸三酯键联、亚磷酰胺键联、磷酸酯键联和/或硼烷磷酸酯键联。许多含磷键联在本领域中是熟知的,如例如在美国专利第3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,194,599;5,565,555;5,527,899;5,721,218;5,672,697和5,625,050号中所公开。在其他实施方案中,寡核苷酸含有一个或多个不含有磷原子的核苷酸间连接基团,诸如短链烷基或环烷基核苷酸间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷酸间键联、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷酸间键联,包括但不限于具有硅氧烷骨架;硫醚、亚砷和砷骨架;甲缩醛基和硫代甲缩醛基骨架;亚甲基甲缩醛基和硫代甲缩醛基骨架;核糖乙酰基骨架;含烯炔骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;以及酰胺骨架的那些。非含磷键联在本领域中是熟知的,如例如在美国专利第5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269和5,677,439号中所公开。

[0085] 免疫检查点分子:如本文所用,术语“免疫检查点分子”是指免疫细胞诸如T细胞上的在正常生理条件下对于维持自身耐受性(或预防自体免疫性)以及当免疫系统对外来病原体起应答时保护宿主细胞和组织是重要的分子。某些免疫检查点分子是放大对抗原的T细胞应答中涉及的信号的共刺激性分子,而某些免疫检查点分子是降低对抗原的T细胞应答中涉及的信号的抑制性分子(例如CTLA-4或PD-1)。

[0086] 免疫治疗剂:起增强免疫系统对抗疾病或病症的能力的作用的用于治疗疾病或病症诸如癌症的剂。免疫治疗剂的实例包括检查点抑制剂、抗体和细胞因子诸如干扰素和白介素。

[0087] KRAS相关疾病或病症:如本文所用,术语“KRAS相关疾病或病症”是指与改变的KRAS表达、水平和/或活性相关的疾病或病症。值得注意的是,“KRAS相关疾病或病症”包括癌症和/或增生性疾病、疾患或病症。

[0088] 环:如本文所用,术语“环”是指由核酸的单链形成的结构,其中侧接于特定单链核苷酸区域的互补性区域以在所述互补性区域之间的所述单链核苷酸区域被从双链体形成物或沃森-克里克碱基配对排除的方式杂交。环是任何长度的单链核苷酸区域。环的实例包括存在于诸如发夹和四元环的结构中的未配对核苷酸。

[0089] MEK抑制剂:如本文所用,术语“MEK抑制剂”是指降低丝裂原活化蛋白激酶激酶

MEK1和/或MEK2的活性的化合物或剂。

[0090] 经修饰核碱基:如本文所用,术语“经修饰核碱基”是指不是天然核碱基或通用核碱基的任何核碱基。适合经修饰核碱基包括二氨基嘌呤和它的衍生物、烷基化嘌呤或嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶、硫醇化嘌呤或嘧啶等。其他适合经修饰核碱基包括嘌呤和嘧啶的类似物。适合类似物包括但不限于1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊基腺嘌呤、2-甲基巯基-N6-异戊基腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、2-硫代胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫鸟嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-(甲基氨基甲基)尿嘧啶、5-(羧基甲基氨基甲基)-尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、5-(2-溴乙烯基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、Q核昔、次黄嘌呤、黄嘌呤、2-氨基嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、硝基吡咯基、硝基咪唑基和二氟甲基、6-硫代嘌呤以及2,6-二氨基嘌呤硝基吡咯基、硝基咪唑基和二氟甲基。通常,核碱基含有含氮碱基。在某些实施方案中,核碱基不含有氮原子。参见例如美国公布专利申请第20080274462号。

[0091] 经修饰核昔:如本文所用,术语“经修饰核昔”是指与未连接于磷酸酯基团或经修饰磷酸酯基团(如本文所定义)的糖(例如脱氧核糖或核糖或它们的类似物)成N-糖昔键联的杂环含氮碱基,并且含有经修饰核碱基(如本文所定义)、通用核碱基(如本文所定义)或经修饰糖部分(如本文所定义)中的一者或多者。经修饰或通用核碱基(在本文中也称为碱基类似物)通常位于核昔糖部分的1'位,并且是指在于1'位的除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以外的核碱基。在某些实施方案中,经修饰或通用核碱基是含氮碱基。在某些实施方案中,经修饰核碱基不含有氮原子。参见例如美国公布专利申请第20080274462号。在某些实施方案中,经修饰核昔酸不含有核碱基(无碱基)。本文描述了在本公开的情形下适合的经修饰或通用核碱基或经修饰糖。

[0092] 经修饰核昔酸:如本文所用,术语“经修饰核昔酸”是指与连接于磷酸酯基团或经修饰磷酸酯基团(如本文所定义)的糖(例如核糖或脱氧核糖或它们的类似物)成N-糖昔键联的杂环含氮碱基,并且含有经修饰核碱基(如本文所定义)、通用核碱基(如本文所定义)或经修饰糖部分(如本文所定义)中的一者或多者。经修饰或通用核碱基(在本文中也称为碱基类似物)通常位于核昔糖部分的1'位,并且是指在于1'位的除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以外的核碱基。在某些实施方案中,经修饰或通用核碱基是含氮碱基。在某些实施方案中,经修饰核碱基不含有氮原子。参见例如美国公布专利申请第20080274462号。在某些实施方案中,经修饰核昔酸不含有核碱基(无碱基)。本文描述了在本公开的情形下适合的经修饰或通用核碱基、经修饰糖部分或经修饰磷酸酯基团。

[0093] 经修饰磷酸酯基团:如本文所用,术语“经修饰磷酸酯基团”是指磷酸酯基团的不存在于天然核昔酸中,并且包括如本文所述的非天然存在的磷酸酯模拟物的修饰形式,所述模拟物包括含有磷原子的磷酸酯模拟物和不含有磷酸酯的阴离子磷酸酯模拟物(例如乙酸酯)。经修饰磷酸酯基团还包括如本文所述的非天然存在的核昔酸间连接基团,包括含磷核昔酸间连接基团(包括例如硫代磷酸酯)与非含磷连接基团两者。

[0094] 经修饰糖部分:如本文所用,“经修饰糖部分”是指被取代的糖部分(如本文所定义)或糖类似物(如本文所定义)。

[0095] 天然核碱基:如本文所用,术语“天然核碱基”是指RNA和DNA的五种主要天然存在的杂环核碱基,即嘌呤碱基:腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基:胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0096] 天然核苷:如本文所用,术语“天然核苷”是指与未连接于磷酸酯基团的天然糖部分(如本文所定义)成N-糖苷键联的天然核碱基(如本文所定义)。

[0097] 天然核苷酸:如本文所用,术语“天然核苷酸”是指与连接于磷酸酯基团的天然糖部分(如本文所定义)成N-糖苷键联的天然核碱基(如本文所定义)。

[0098] 天然糖部分:如本文所用,术语“天然糖部分”是指呋喃核糖基(如本文所定义)或脱氧呋喃核糖基(如本文所定义)。

[0099] 非T细胞发炎表型:如本文所用,“非T细胞发炎表型”是指肿瘤微环境不具有预先存在的针对肿瘤的T细胞应答,如通过在所述肿瘤微环境中具有少许乃至不具有浸润性CD8⁺T细胞积累所证实。通常,非T细胞发炎表型的特征还在于具有不促进CD8⁺T细胞在肿瘤微环境中募集和积累的有限趋化因子概况,并且/或者具有最小的I型IFN基因特征或I型IFN基因特征不存在。

[0100] 核酸抑制剂分子:如本文所用,术语“核酸抑制剂分子”是指降低或消除靶标基因的表达的寡核苷酸分子,其中所述寡核苷酸分子含有特异性靶向靶标基因mRNA中的序列的区域。通常,核酸抑制剂分子的靶向区域包含充分互补于靶标基因mRNA上的序列以将核酸抑制剂分子的作用引导至指定靶标基因的序列。举例来说,“KRAS核酸抑制剂分子”降低或消除KRAS基因的表达。核酸抑制剂分子可包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸和/或经修饰核苷酸。

[0101] 核碱基:如本文所用,术语“核碱基”是指天然核碱基(如本文所定义)、经修饰核碱基(如本文所定义)或通用核碱基(如本文所定义)。

[0102] 核苷:如本文所用,术语“核苷”是指天然核苷(如本文所定义)或经修饰核苷(如本文所定义)。

[0103] 核苷酸:如本文所用,术语“核苷酸”是指天然核苷酸(如本文所定义)或经修饰核苷酸(如本文所定义)。

[0104] 突出端:如本文所用,术语“突出端”是指在双链核酸抑制剂分子的任一链的任一末端的一个或多个末端非碱基配对核苷酸。在某些实施方案中,突出端由一个链或区域延伸超出第一链或区域与其形成双链体的互补链的末端所致。能够通过碱基对的氢键合来形成双链体的两个寡核苷酸区域中的一者或两者可具有延伸超出由两个多核苷酸或区域共有的互补性的3'和/或5'末端的5'和/或3'末端。延伸超出双链体的3'和/或5'末端的单链区域被称为突出端。

[0105] 药物组合物:如本文所用,术语“药物组合物”包含药理学有效量的双链核酸抑制剂分子和药学上可接受的赋形剂(如本文所定义)。

[0106] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”意指赋形剂是适于与人或/或动物一起使用而无过度不利副作用(诸如毒性、刺激和过敏应答),与合理益处/风险比相称的赋形剂。

[0107] 磷酸酯模拟物:如本文所用,术语“磷酸酯模拟物”是指在寡核苷酸的5'末端的模拟磷酸酯基团的静电和空间性质的化学部分。已开发可附接于寡核苷酸的5'末端的许多磷酸酯模拟物(参见例如美国专利第8,927,513号;Prakash等人Nucleic Acids Res.,2015,43(6):2993-3011)。通常,这些5'-磷酸酯模拟物含有磷酸酶抗性键联。适合磷酸酯模拟物包括5'-磷酸酯,诸如5'-亚甲基磷酸酯(5'-MP)和5'-(E)-乙烯基磷酸酯(5'-VP),以及结合于寡核苷酸的5'末端核苷酸的糖部分(例如核糖或脱氧核糖或它们的类似物)的4'-碳的4'-磷酸酯类似物,诸如4'-氧基甲基磷酸酯、4'-硫甲基磷酸酯或4'-氨基甲基磷酸酯,如国际公布第W0 2018/045317号中所述,所述国际公布据此通过引用以它的整体并入本文。在某些实施方案中,4'-氧基甲基磷酸酯由式 $-O-CH_2-PO(OH)_2$ 或 $-O-CH_2-PO(OR)_2$ 表示,其中R独立地选自H、 CH_3 、烷基或保护基。在某些实施方案中,烷基是 CH_2CH_3 。更通常地,R独立地选自H、 CH_3 或 CH_2CH_3 。已开发用于寡核苷酸的5'末端的其他修饰(参见例如W0 2011/133871)。

[0108] 增强:如本文所用的术语“增强(potentiate/potentiating)”是指一种治疗剂(例如KRAS核酸抑制剂分子)增加或加强另一治疗剂(例如MEK抑制剂或免疫治疗剂)的治疗作用的能力。

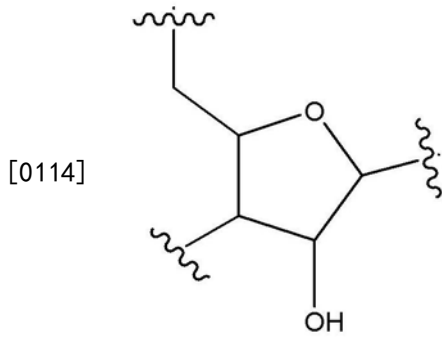
[0109] 增生性疾病或癌症:如本文所用的术语“增生性疾病”或“癌症”是指如本领域中所知的特征在于细胞生长或复制不受调控的疾病、疾患、性状、基因型或表型,包括白血病,例如急性髓源性白血病(AML)、慢性髓源性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病;AIDS相关癌症诸如卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma);乳腺癌;骨癌诸如骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、纤维肉瘤、巨细胞肿瘤、釉质瘤和脊索瘤;脑癌诸如脑脊髓膜瘤、胶质母细胞瘤、低级星形细胞瘤、少突细胞瘤、垂体肿瘤、神经鞘瘤(Schwannoma)和转移性脑癌;包括各种淋巴瘤诸如套细胞淋巴瘤的头颈部癌、非霍奇金淋巴瘤、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、胆囊和胆管癌、视网膜癌诸如视网膜母细胞瘤、食道癌、胃癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌、子宫癌、甲状腺癌、睾丸癌、子宫内膜癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、肺癌(包括非小细胞肺癌)、胰腺癌、肉瘤、威尔姆斯肿瘤(Wilms' tumor)、子宫颈癌、头颈部癌、皮肤癌、鼻咽癌、脂肉瘤、上皮癌、肾细胞癌、胆囊腺癌、腮腺腺癌、子宫内膜肉瘤、多药物抗性癌症;以及增生性疾病和疾患,诸如与肿瘤血管生成相关的新生血管形成、黄斑变性(例如湿性/干性AMD)、角膜新生血管形成、糖尿病性视网膜病变、新生血管性青光眼、近视变性和其他增生性疾病和疾患诸如再狭窄和多囊性肾病、以及可对单独或与其他疗法组合来调节细胞或组织中疾病相关基因表达起响应的其他癌症或增生性疾病、疾患、性状、基因型或表型。

[0110] 保护基:如本文所用,术语“保护基”在常规化学意义上用作可逆地致使官能团在所需反应的某些条件下不反应的基团。在所需反应之后,可移除保护基以将经保护官能团脱保护。所有保护基都应可在不降解大部分的所合成分子的条件下来移除。

[0111] 降低:如本文所用的术语“降低(reduce/reduces)”涉及它的如本领域中普遍接受的含义。关于核酸抑制剂分子,所述术语通常是指基因的表达、或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚单位的RNA分子或等效RNA分子的水平、或一种或多种蛋白质或蛋白质亚单位的活性降低至在不存在核酸抑制剂分子或抑制剂下观察到的水平以下。

[0112] 抗性:如本文所用的术语“抗性”是指当先前降低或抑制受试者中肿瘤生长的治疗不再降低或抑制那个受试者中肿瘤生长时发生的状况。

[0113] 呋喃核糖基:如本文所用,术语“呋喃核糖基”是指见于天然存在的RNA中,并且在2'-碳处具有羟基的呋喃糖基,如以下所说明:



[0115] 核糖核苷酸:如本文所用,术语“核糖核苷酸”是指在糖部分的2'位具有羟基的天然核苷酸(如本文所定义)或经修饰核苷酸(如本文所定义)。

[0116] 有义链:双链核酸抑制剂分子包含两个寡核苷酸链:反义链和有义链。有义链或其区域部分地、大致上地或完全地互补于双链核酸抑制剂分子的反义链或其区域。在某些实施方案中,有义链还可含有非互补于反义链的核苷酸。非互补性核苷酸可在互补性序列的任一侧上,或可在互补性序列的两侧上。在某些实施方案中,当有义链或其区域部分地或大致上地互补于反义链或其区域时,非互补性核苷酸可位于一个或多个互补性区域之间(例如一个或多个错配)。有义链也被称为过客链。

[0117] 受试者:如本文所用,术语“受试者”意指任何哺乳动物,包括小鼠、兔和人。在一个实施方案中,受试者是人。术语“个体”或“患者”意图可与“受试者”互换。

[0118] 被取代的糖部分:如本文所用,“被取代的糖部分”包括包含一个或多个修饰的呋喃糖基。通常,修饰存在于糖的2'-碳、3'-碳、4'-碳或5'-碳位置处。在某些实施方案中,被取代的糖部分是包含使呋喃糖基的2'-碳与4-碳连接的桥的双环糖部分。

[0119] 糖类似物:如本文所用,术语“糖类似物”是指以下结构:所述结构不包含呋喃糖基,并且能够替换核苷酸的天然存在的糖部分,以致所得核苷酸能够(1)并入至寡核苷酸中,并且(2)杂交于互补性核苷酸。此类结构通常包括相对简单的对呋喃糖基的变化,诸如环包含不同数目的原子(例如4、6或7元环);用非氧原子(例如碳、硫或氮)替换呋喃糖基的氧;或原子的数目的变化与替换氧两者。此类结构还可包含与对于被取代的糖部分所述的那些取代相对应的取代。糖类似物还包括更复杂的糖替换物(例如肽核酸的非环系统)。糖类似物包括但不限于吗啉代基、环己烯基和环己六醇。

[0120] 糖部分:如本文所用,术语“糖部分”是指核苷酸或核苷的天然糖部分或经修饰糖部分。

[0121] T细胞发炎肿瘤表型:如本文所用,“T细胞发炎表型”是指肿瘤微环境具有预先存在的针对肿瘤的T细胞应答,如通过在所述肿瘤微环境中具有浸润性CD8+T细胞积累所证实。通常,T细胞发炎表型的特征还在于具有能够将CD8+T细胞募集至肿瘤微环境的广泛趋化因子概况(包括CXCL9和/或CXCL10)和/或I型IFN基因特征。

[0122] 四元环:如本文所用,术语“四元环”是指形成促进相邻沃森-克里克杂交核苷酸的稳定性的稳定二级结构的环(单链区域)。在不受限于理论的情况下,四元环可通过堆积相互作用使相邻沃森-克里克碱基对稳定。此外,四元环中核苷酸之间的相互作用包括但不限于非沃森-克里克碱基配对、堆积相互作用、氢键合和接触相互作用(Cheong等人,Nature,

1990,346 (6285):680-2;Heus和Pardi,Science,1991,253 (5016):191-4)。四元环赋予相邻双链体的解链温度(T_m)的增加,所述增加高于从由随机碱基组成的简单模型环序列预期的增加。举例来说,四元环可对包含在长度方面是至少2个碱基对的双链体的发夹赋予在10mM NaHPO_4 中至少50°C、至少55°C、至少56°C、至少58°C、至少60°C、至少65°C或至少75°C的解链温度。四元环可含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、经修饰核苷酸、以及它们的组合。在某些实施方案中,四元环由四个核苷酸组成。在某些实施方案中,四元环由五个核苷酸组成。

[0123] RNA四元环的实例包括UNCG四元环家族(例如UUCG)、GNRA四元环家族(例如GAAA)和CUYG四元环家族,包括CUUG四元环。(Woese等人,PNAS,1990,87 (21):8467-71;Antao等人,Nucleic Acids Res.,1991,19 (21):5901-5)。RNA四元环的其他实例包括GANC、A/UGNN和UUUM四元环家族(Thapar等人,Wiley Interdiscip Rev RNA,2014,5 (1):1-28)以及GGUG、RNYA和AGNN四元环家族(Bottaro等人,Biophys J.,2017,113:257-67)。DNA四元环的实例包括d(GNNA)四元环家族(例如d(GTTA)、d(GNRA))四元环家族、d(GNAB)四元环家族、d(CNNG)四元环家族和d(TNCG)四元环家族(例如d(TTCG))。(Nakano等人Biochemistry,2002,41 (48):14281-14292。Shinji等人,Nippon Kagakkai Koen Yokoshu,2000,78 (2):731)。

[0124] 三元环:如本文所用,术语“三元环”是指形成促进相邻沃森-克里克杂交核苷酸的稳定性的稳定二级结构,并且由三个核苷酸组成的环(单链区域)。在不受限于理论的情况下,三元环可通过所述三元环内核苷酸的非沃森-克里克碱基配对以及碱基堆积相互作用来稳定。(Yoshizawa等人,Biochemistry 1997;36,4761-4767)。三元环也可赋予相邻双链体的解链温度(T_m)的增加,所述增加高于从由随机碱基组成的简单模型环序列预期的增加。三元环可含有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、经修饰核苷酸、以及它们的组合。三元环的实例包括GNA三元环家族(例如GAA、GTA、GCA和GGA)。(Yoshizawa 1997)。

[0125] 治疗有效量:如本文所用,“治疗有效量”或“药理学有效量”是指剂诸如双链核酸抑制剂分子、MEK抑制剂或免疫治疗剂的有效产生预定药理学、治疗性或预防性结果的量。

[0126] 通用核碱基:如本文所用,“通用核碱基”是指可与通常见于天然存在的核酸中的碱基中的超过一者配对,并且因此可替代双链体中此类天然存在的碱基的碱基。碱基无需能够与天然存在的碱基中的每一者配对。举例来说,某些碱基仅仅或选择性地与嘌呤配对,或仅仅或选择性地与嘧啶配对。通用核碱基可通过沃森-克里克或非沃森-克里克相互作用(例如胡斯坦(Hoogsteen)相互作用)形成氢键来进行碱基配对。代表性通用核碱基包括肌苷和它的衍生物。

具体实施方式

[0127] 本申请提供了可调节(例如抑制)KRAS表达的KRAS核酸抑制剂分子和治疗受试者中的KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子。本申请还提供了治疗受试者中的KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂和治疗有效量的额外剂,诸如MEK抑制剂或免疫治疗剂。本发明的KRAS核酸抑制剂分子调节KRAS RNA,诸如对应于通过GenBank登录号NM_033360和NM_004985提及的cDNA序列的那些,以及在美国公布专利第8,372,816;8,513,207;9,200,284;和9,809,819号以及美国公布专利申请第2018/0044680号中提及的那

些,所述美国公布专利和美国公布专利申请全都通过引用并入本文。

[0128] 本文还公开了用于治疗癌症的新方法和组合物,所述癌症包括对免疫疗法(例如阻断免疫检查点分子)不起响应的癌症。通常,对免疫疗法不起响应的癌症的特征在于具有非T细胞发炎表型(也被称为冷或非发炎肿瘤),在肿瘤微环境中具有少许乃至不具有浸润性CD8+T细胞。降低KRAS表达可使冷或非发炎肿瘤转变成热或发炎肿瘤,并且增强免疫疗法的作用。换句话说,通过将KRAS抑制剂与免疫疗法组合,有可能治疗通常对免疫疗法不起响应的冷或非发炎肿瘤。通常,KRAS核酸抑制剂分子用于降低KRAS表达。然而,本文所述的方法和组合物中可使用降低KRAS表达的任何KRAS抑制剂或路径抑制剂,包括但不限于靶向KRAS或KRAS路径的组成部分的小分子、肽和抗体。已显示这个组合治疗方法在体内强力抑制肿瘤生长。

[0129] 对本发明的各个方面和实施方案的以下描述参考通常在本文中称为KRAS的示例性KRAS RNA来提供。然而,此参考意图仅是示例性的,并且本发明的各个方面和实施方案还涉及替代性KRAS RNA,诸如突变KRAS RNA或额外KRAS剪接变体。某些方面和实施方案还涉及KRAS路径中涉及的其他基因,包括其错误调控与KRAS的错误调控联合起作用(或受影响或影响KRAS调控)以产生可被靶向来进行治疗的表型效应(例如肿瘤形成和/或生长等)的基因。可使用DsiRNA以及使用靶向KRAS的DsiRNA的本文所述的方法靶向此类额外基因。因此,可如本文所述实施其他基因的抑制和此抑制的影响。

[0130] 核酸抑制剂分子

[0131] 在某些实施方案中,使用核酸抑制剂分子降低KRAS表达。各种寡核苷酸结构已作为核酸抑制剂分子加以使用,包括单链和双链寡核苷酸。

[0132] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是包含有义(或过客)链和反义(或引导)链的双链RNAi抑制剂分子。多种双链RNAi抑制剂分子结构在本领域中是已知的。举例来说,关于RNAi抑制剂分子的早期研究集中于每个链具有19-25个核苷酸的大小,具有至少一个含有1至5个核苷酸的3'-突出端的双链核酸分子(参见例如美国专利第8,372,968号)。随后,开发了在体内由Dicer酶加工成活性RNAi抑制剂分子的较长双链RNAi抑制剂分子(参见例如美国专利第8,883,996号)。后来的研究开发了延伸双链核酸抑制剂分子,其中至少一个链的至少一个末端延伸超出分子的双链靶向区域,包括其中一个链包括热力学稳定化四元环结构的结构(参见例如美国专利第8,513,207号、美国专利第8,927,705号、WO 2010/033225和WO 2016/100401,所述专利的对这些双链核酸抑制剂分子的公开内容通过引用并入本文)。那些结构包括单链延伸部分(在分子的一侧或两侧上)和双链延伸部分。

[0133] 在一些实施方案中,有义链和反义链在15-66、25-40或19-25个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,有义链小于30个核苷酸,诸如19-24个核苷酸,诸如21个核苷酸。在一些实施方案中,反义链小于30个核苷酸,诸如19-24个核苷酸,诸如21、22或23个核苷酸。通常,双链体结构在长度方面在15与50个碱基对之间,诸如在15与30个碱基对之间,诸如在18与26个碱基对之间,更通常在19与23个碱基对之间,并且在某些情况下在19与21个碱基对之间。

[0134] 在一些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子还可包含一个或多个单链核苷酸突出端。通常,dsRNAi抑制剂分子具有1-4或1-2个核苷酸的单链突出端。单链突出端通常位于有义链的3'末端和/或反义链的3'末端。在某些实施方案中,1-10、1-4或1-2个核苷酸的单链突

出端位于反义链的5'末端。在某些实施方案中,1-10、1-4或1-2个核苷酸的单链突出端位于有义链的5'末端。在某些实施方案中,1-2个核苷酸的单链突出端位于反义链的3'末端。在某些实施方案中,dsRNA抑制剂分子具有钝性末端,通常在分子的右侧,即有义链的3'末端和反义链的5'末端。在一些实施方案中,dsRNA抑制剂分子具有位于反义链的3'末端的2核苷酸突出端。

[0135] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有在长度方面是21个核苷酸的引导链和在长度方面是21个核苷酸的过客链,其中存在在分子的右侧(过客链的3'末端/引导链的5'末端)上的2核苷酸3'过客链突出端和在分子的左侧(过客链的5'末端/引导链的3'末端)上的2核苷酸3'引导链突出端。在此类分子中,存在19碱基对双链体区域。

[0136] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有在长度方面是23个核苷酸的引导链和在长度方面是21个核苷酸的过客链,其中存在在分子的右侧(过客链的3'末端/引导链的5'末端)上的钝性末端和在分子的左侧(过客链的5'末端/引导链的3'末端)上的2核苷酸3'引导链突出端。在此类分子中,存在21碱基对双链体区域。

[0137] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有在长度方面是23个核苷酸的引导链和在长度方面是21个核苷酸的过客链,其中存在在分子的右侧(过客链的3'末端/引导链的5'末端)上的钝性末端和在分子的左侧(过客链的5'末端/引导链的3'末端)上的2核苷酸3'引导链突出端。在此类分子中,存在21碱基对双链体区域。

[0138] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子具有在长度方面是27个核苷酸的引导链和在长度方面是25个核苷酸的过客链,其中存在在分子的右侧(过客链的3'末端/引导链的5'末端)上的钝性末端和在分子的左侧(过客链的5'末端/引导链的3'末端)上的2核苷酸3'引导链突出端。在此类分子中,存在25碱基对双链体区域。

[0139] 在一些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包括茎和环。通常,dsRNAi抑制剂分子的过客链的3'末端区域或5'末端区域形成单链茎和环结构。

[0140] 在一些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子含有茎和四元环或三元环。在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含引导链和过客链,其中所述过客链含有茎和四元环或三元环,并且在长度方面在20-66个核苷酸的范围内。通常,引导链和过客链是单独链,各自具有5'末端和3'末端,不形成连续寡核苷酸(有时被称为“切口”结构)。

[0141] 在那些实施方案中的某些中,引导链在长度方面在15与40个核苷酸之间。在某些实施方案中,过客链的含有茎和四元环或三元环的延伸部分在链的3'末端上。在某些其他实施方案中,过客链的含有茎和四元环或三元环的延伸部分在链的5'末端上。

[0142] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子的含有茎和四元环的过客链在长度方面在26-40个核苷酸之间,并且所述dsRNAi抑制剂分子的引导链含有20-24个核苷酸,其中所述过客链和所述引导链形成18-24个核苷酸的双链体区域。在某些实施方案中,过客链在长度方面是26-30个核苷酸,并且茎在长度方面是1、2或3个碱基对并含有一个或多个双环核苷酸。

[0143] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子的含有茎和三元环的过客链在长度方面在27-39个核苷酸之间,并且所述dsRNAi抑制剂分子的引导链含有20-24个核苷酸,其中所述过客链和所述引导链形成18-24个核苷酸的双链体区域。在某些实施方案中,过客链在长度方面是27-29个核苷酸,并且茎在长度方面是2或3个碱基对并含有一个或多个双环核苷酸。

[0144] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含(a)含有茎和四元环,并且在长度方面是36个核苷酸的过客链,其中所述过客链的来自5'末端的前20个核苷酸互补于引导链,并且所述过客链的之后16个核苷酸形成茎和四元环,和(b)在长度方面是22个核苷酸,并且在它的3'末端具有两个核苷酸的单链突出端的引导链,其中所述引导链和所述过客链是不形成连续寡核苷酸的单独链。

[0145] 在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子包含(a)含有茎和三元环,并且在长度方面是35个核苷酸的过客链,其中所述过客链的来自5'末端的前20个核苷酸互补于引导链,并且所述过客链的之后16个核苷酸形成茎和三元环,和(b)在长度方面是22个核苷酸,并且在它的3'末端具有两个核苷酸的单链突出端的引导链,其中所述引导链和所述过客链是不形成连续寡核苷酸的单独链。

[0146] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是单链核酸抑制剂分子。单链核酸抑制剂分子在本领域中是已知的。举例来说,新近尝试已证明ssRNAi抑制剂分子的活性(参见例如Matsui等人,Molecular Therapy,2016,24(5):946-55)。并且,反义分子已持续数十年用于降低特定靶标基因的表达。Pelechano和Steinmetz,Nature Review Genetics,2013,14:880-93。已为一系列靶标开发了关于这些结构的共同主题的许多变化形式。单链核酸抑制剂分子包括例如常规反义寡核苷酸、微小RNA、核酶、适体和ssRNAi抑制剂分子,它们全都在本领域中是已知的。

[0147] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是具有14-50、16-30或15-25个核苷酸的ssRNAi抑制剂分子。在其他实施方案中,ssRNAi抑制剂分子具有18-22或20-22个核苷酸。在某些实施方案中,ssRNAi抑制剂分子具有20个核苷酸。在其他实施方案中,ssRNAi抑制剂分子具有22个核苷酸。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是抑制外源性RNAi抑制剂分子或天然miRNA的单链寡核苷酸。

[0148] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是具有8-80、12-50、12-30或12-22个核苷酸的单链反义寡核苷酸。在某些实施方案中,单链反义寡核苷酸具有16-20、16-18、18-22或18-20个核苷酸。

[0149] 修饰

[0150] 通常,核酸抑制剂分子的许多核苷酸亚单位被修饰来改善分子的各种特征,诸如对核酸酶的抗性或降低的免疫原性(参见例如Bransen等人(2009),Nucleic Acids Res.,37,2867-2881)。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的一个至每个核苷酸是经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的大致上所有核苷酸是经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的超过一半核苷酸是经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的少于一半核苷酸是经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的核苷酸都不是经修饰的。修饰可存在于寡核苷酸链上的基团中,或不同经修饰核苷酸可为散布的。

[0151] 许多核苷酸修饰已在寡核苷酸领域中使用。可对核苷酸的任何部分进行修饰,包括糖部分、磷酸酯键联和核碱基。在核酸抑制剂分子的某些实施方案中,一个至每个核苷酸是使用例如本领域中已知以及本文所述的2'-碳修饰在糖部分的2'-碳处经修饰的。2'-碳修饰的典型实例包括但不限于2'-F、2'-O-甲基("2'-OMe"或"2'-OCH₃")、2'-O-甲氧基乙基("2'-MOE"或"2'-OCH₂CH₂OCH₃")。修饰还可存在于核苷酸的糖部分的其他部分诸如5'-碳处,如本文所述。

[0152] 在某些实施方案中,糖部分的环结构是经修饰的,包括但不限于双环核苷酸,诸如锁定核酸(“LNA”) (参见例如Koshkin等人(1998),Tetrahedron,54,3607-3630)和桥接核酸(“BNA”) (参见例如美国专利第7,427,672号以及Mitsuoka等人(2009),Nucleic Acids Res.,37(4):1225-38);以及未锁定核酸(“UNA”) (参见例如Snead等人(2013),Molecular Therapy-Nucleic Acids,2,e103(doi:10.1038/mtna.2013.36))。

[0153] 经修饰核碱基包括如本领域中所知以及如本文所述的在1'位的除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以外的核碱基。经修饰核碱基的一典型实例是5'-甲基胞嘧啶。

[0154] RNA和DNA的天然存在的核苷酸间键联是3'至5'磷酸二酯键联。经修饰磷酸酯键联包括如本领域中所知以及如本文所述的非天然存在的核苷酸间连接基团,包括含有磷原子的核苷酸间键联和不含有磷原子的核苷酸间键联。通常,核酸抑制剂分子含有一个或多个如本文所述的含磷核苷酸间连接基团。在其他实施方案中,核酸抑制剂分子的核苷酸间连接基团中的一者或多者是如本文所述的非含磷键联。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子含有一个或多个含磷核苷酸间连接基团和一个或多个非含磷核苷酸间连接基团。

[0155] 核酸抑制剂分子的5'末端可包括天然取代基,诸如羟基或磷酸酯基团。在某些实施方案中,羟基附接于核酸抑制剂分子的5'末端。在某些实施方案中,磷酸酯基团附接于核酸抑制剂分子的5'末端。通常,在寡核苷酸合成之前将磷酸酯添加至单体。在其他实施方案中,在将核酸抑制剂分子引入至胞质溶胶中之后,例如通过胞质溶胶Clp1激酶天然地实现5'-磷酸化。在一些实施方案中,5'-末端磷酸酯是磷酸酯基团,诸如5'-单磷酸酯[(HO)₂(O)P-O-5']、5'-二磷酸酯[(HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5']或5'-三磷酸酯[(HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5']。

[0156] 还可修饰核酸抑制剂分子的5'末端。举例来说,在一些实施方案中,核酸抑制剂分子的5'末端附接于氨基磷酸酯[(HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5']。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的5'末端附接于磷酸酯模拟物。适合磷酸酯模拟物包括5'-磷酸酯,诸如5'-亚甲基磷酸酯(5'-MP)和5'-(E)-乙烷基磷酸酯(5'-VP)。Lima等人,Cell,2012,150-883-94;WO2014/130607。其他适合磷酸酯模拟物包括如国际公布第WO 2018/045317号中所述的结合于寡核苷酸的5'末端核苷酸的糖部分(例如核糖或脱氧核糖或它们的类似物)的4'-碳的4-磷酸酯类似物,所述国际公布据此通过引用以它的整体并入本文。举例来说,在一些实施方案中,核酸抑制剂分子的5'末端附接于氧基甲基磷酸酯,其中氧基甲基的氧原子结合于糖部分或其类似物的4'-碳。在其他实施方案中,磷酸酯类似物是硫甲基磷酸酯或氨基甲基磷酸酯,其中硫甲基的硫原子或氨基甲基的氮原子结合于糖部分或其类似物的4'-碳。

[0157] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子包括一个或多个脱氧核糖核苷酸。通常,核酸抑制剂分子含有少于5个脱氧核糖核苷酸。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子包括一个或多个核糖核苷酸。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的所有核苷酸都是核糖核苷酸。

[0158] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的一个或两个核苷酸经谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。通常,谷胱甘肽敏感性部分位于糖部分的2'-碳处,并且包含磺酰基。在某一实施方案中,谷胱甘肽敏感性部分可与亚磷酰胺寡核苷酸合成方法相容,如例如国际公布第WO 2018/045317号中所述,所述国际公布据此通过引用以它的整体并入本文。在某些实施

方案中,核酸抑制剂分子的超过两个核苷酸经谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。在某些实施方案中,大多数核苷酸经谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的所有或大致上所有核苷酸经谷胱甘肽敏感性部分可逆地修饰。

[0159] 至少一个谷胱甘肽敏感性部分通常位于单链核酸抑制剂分子的5'或3'末端核苷酸、或双链核酸抑制剂分子的过客链或引导链的5'或3'末端核苷酸处。然而,至少一个谷胱甘肽敏感性部分可位于核酸抑制剂分子中任何目标核苷酸处。

[0160] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子是完全经修饰的,其中完全经修饰核酸抑制剂分子的每个核苷酸都是经修饰的。在某些实施方案中,完全经修饰核酸抑制剂分子不含可逆修饰。在一些实施方案中,单链核酸抑制剂分子、或双链核酸抑制剂分子的引导链或过客链的至少一个,诸如至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸是经修饰的。

[0161] 在某些实施方案中,完全经修饰核酸抑制剂分子经一个或多个可逆谷胱甘肽敏感性部分修饰。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的大致上所有核苷酸是经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的超过一半核苷酸经除可逆修饰以外的化学修饰加以修饰。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子的少于一半核苷酸经除可逆修饰以外的化学修饰加以修饰。修饰可存在于核酸抑制剂分子上的基团中,或不同经修饰核苷酸可为散布的。

[0162] 在核酸抑制剂分子的某些实施方案中,一个至每个核苷酸是在2'-碳处经修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂分子(或其有义链和/或反义链)是经2'-F、2'-O-Me和/或2'-MOE部分地或完全地修饰的。在某些实施方案中,核酸抑制剂的有义链和反义链的每个核苷酸是经2'-F或2'-O-Me修饰的。在核酸抑制剂分子的某些实施方案中,一个至每个磷原子是经修饰的,并且一个至每个核苷酸是在2'-碳处经修饰的。

[0163] KRAS核酸抑制剂分子

[0164] 术语“KRAS”是指编码Kras蛋白、肽或多肽的核酸序列(例如KRAS转录物,诸如KRAS Genbank登录号NM_033360.2和NM_004985.3的序列)。在某些实施方案中,术语“KRAS”还意图包括其他KRAS编码序列,诸如其他KRAS亚型、突变KRAS基因、KRAS基因的剪接变体以及KRAS基因多态性。本文所述的KRAS核酸抑制剂分子可被设计来杂交于任何目标KRAS靶标序列,包括在美国公布专利第8,372,816;8,513,207;9,200,284;和9,809,819号以及美国公布专利申请第2018/0044680号中公开的那些以及在其中提及的那些,所述美国公布专利和美国公布专利申请全都通过引用并入本文。术语“Kras”用于指代KRAS基因/转录物的多肽基因产物,例如Kras蛋白、肽或多肽,诸如由KRAS Genbank登录号NM_033360.2和NM_004985.3编码的那些。

[0165] 如本文所用,“KRAS相关疾病或病症”是指本领域中已知与改变的KRAS表达、水平和/或活性相关的疾病或病症。值得注意的是,“KRAS相关疾病或病症”包括癌症和/或增生性疾病、疾患或病症。“KRAS相关癌症”是指本领域中已知与改变的KRAS表达、水平和/或活性相关的癌症。

[0166] 在某些实施方案中,评估DsiRNA介导的对KRAS靶标序列的抑制。在此类实施方案中,可通过本领域公知的方法(例如RT-PCR、Northern印迹、表达阵列等),任选地通过在如本文公开的KRAS核酸抑制剂分子存在下的KRAS水平与不存在此KRAS核酸抑制剂分子进行比较来评估KRAS RNA水平。在某些实施方案中,将在KRAS核酸抑制剂分子存在下的KRAS

水平与在单独媒介物存在下,在针对无关靶标RNA的核酸抑制剂分子存在下,或在不存在任何处理下观察到的那些水平进行比较。还应认识到Kras蛋白的水平可作为KRAS RNA水平和/或核酸抑制剂分子抑制KRAS表达所处的程度的指示来评估,因此,本领域公知的评估KRAS蛋白质水平的方法(例如Western印迹、免疫沉淀、其他基于抗体的方法等)也可用于考查核酸抑制剂分子的抑制作用。如果相较于适当对照,当将如本文公开的KRAS核酸抑制剂分子施用至系统(例如无细胞体外系统)、细胞、组织或生物体时观察到KRAS RNA或蛋白质水平的统计显著降低,那么如本文公开的KRAS核酸抑制剂分子被视为具有“KRAS抑制活性”。实验值的分布以及进行的重复测定的数目将倾向于指示什么样的KRAS RNA或蛋白质降低水平(以%形式或以绝对值形式)被视为统计显著(如通过本领域中已知的确定统计显著性的标准方法所评估)的参数。然而,在某些实施方案中,“KRAS抑制活性”基于系统、细胞、组织或生物体中KRAS的水平降低的%或绝对水平来定义。举例来说,在某些实施方案中,如果相对于对于适合对照观察到的KRAS水平,在核酸抑制剂分子存在下观察到KRAS RNA降低至少5%或降低至少10%,那么本文公开的KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。(举例来说,在某些实施方案中,如果例如相对于对照观察到KRAS水平降低5%或10%,那么组织和/或受试者中的体内KRAS水平可被视为由如本文公开的核酸抑制剂分子抑制。)

[0167] 在某些其他实施方案中,如果观察到KRAS RNA水平相对于适当对照降低至少15%,相对于适当对照降低至少20%,相对于适当对照降低至少25%,相对于适当对照降低至少30%,相对于适当对照降低至少35%,相对于适当对照降低至少40%,相对于适当对照降低至少45%,相对于适当对照降低至少50%,相对于适当对照降低至少55%,相对于适当对照降低至少60%,相对于适当对照降低至少65%,相对于适当对照降低至少70%,相对于适当对照降低至少75%,相对于适当对照降低至少80%,相对于适当对照降低至少85%,相对于适当对照降低至少90%,相对于适当对照降低至少95%,相对于适当对照降低至少96%,相对于适当对照降低至少97%,相对于适当对照降低至少98%,或相对于适当对照降低至少99%,那么如本文公开的KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。在一些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性需要完全抑制KRAS。在某些模型(例如细胞培养)中,如果相对于适合对照观察到KRAS水平降低至少40%,那么KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。在某些实施方案中,如果相对于适合对照观察到KRAS水平降低至少50%,那么KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。在某些其他实施方案中,如果相对于适合对照观察到KRAS水平降低至少80%,那么KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。

[0168] 还可随时间(持续时间)以及历经浓度范围(效能)评估KRAS抑制活性,其中根据所施用浓度和在施用之后的持续时间调整怎样算是核酸抑制剂分子具有KRAS抑制活性的评估。因此,在某些实施方案中,如果在施用之后以2小时、5小时、10小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或更久的持续时间观察到/持续存在KRAS活性降低至少50%,那么如本文公开的KRAS核酸抑制剂分子被视为具有KRAS抑制活性。在额外实施方案中,如果在细胞的环境中在1nM或更小、500pM或更小、200pM或更小、100pM或更小、50pM或更小、20pM或更小、10pM或更小、5pM或更小、2pM或更小、或甚至1pM或更小的浓度下观察到KRAS抑制活性(例如在某些实施方案中,KRAS被抑制至少40%或KRAS被抑制至少50%),那么如本文公

开的KRAS核酸抑制剂分子被视为强力KRAS抑制剂。

[0169] 含有两个单独寡核苷酸的适合核酸抑制剂分子组合物可通过化学连接基团在它们的退火区域外部化学连接。许多适合化学连接基团在本领域中是已知的,并且可被使用。适合基团将不阻断Dicer对核酸抑制剂分子的活性,并且将不干扰对从靶标基因转录的RNA的定向破坏。或者,两个单独寡核苷酸可由第三寡核苷酸连接以致在组成核酸抑制剂分子组合物的两个寡核苷酸的退火后产生发夹结构。发夹结构将不阻断Dicer对核酸抑制剂分子的活性,并且将不干扰对靶标RNA的定向破坏。

[0170] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-194。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:1 (5'-GGCCUGCUGAAAAUGACUGAAUATA-3')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:2 (3'-CUCCGGACGACUUUUACUGACUUUAU-5')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:1的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:2的序列或由所述序列组成。

[0171] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-465。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:3 (5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUUCACCA-3')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:4 (3'-AUGAUUUAGUAAACUUCUAUAAGUGGU-5')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:3的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:4的序列或由所述序列组成。

[0172] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-446。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:5 (5'-GUAUUUGCCAUAAAUAUACUAAAT-3')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:6 (3'-CACAUAAACGGUAUUUAUAUGAUUUA-5')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:5的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:6的序列或由所述序列组成。

[0173] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-194T。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:7 (5'-GGCCUGCUGAAAAUGACUGAGCAGCCGAAAGGCGC-3')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:8 (3'-CUCCGGACGACUUUUACUGACU-5')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:7的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:8的序列或由所述序列组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,有义链包含SEQ ID NO:7或由其组成,并且反义链包含SEQ ID NO:17 (3'-GGCCGGACGACUUUUACUGACU-5')或由其组成。

[0174] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-465T。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:9 (5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUUGCAGCCGAAAGGCGC-3')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:10 (3'-AUGAUUUAGUAAACUUCUAUAA-5')的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:9的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:10的序列或由所述序列组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,有义链包

含SEQ ID NO:13 (5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUAGCAGCCGAAAGGCUGC-3') 或由其组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,反义链包含SEQ ID NO:18 (3'-GGGAUUUAGUAAACUUCUAUUAU-5') 或由其组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,有义链包含SEQ ID NO:13或由其组成,并且反义链包含SEQ ID NO:18或由其组成。

[0175] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-446T。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:11 (5'-GUAUUUGCCAUAAAUAUACGCAGCCGAAAGGCUGC-3') 的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:12 (3'-CACAUAAACGGUAUUUAUUUAUG-5') 的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:11的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:12的序列或由所述序列组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,有义链包含SEQ ID NO:15 (5'-GUAUUUGCCAUAAAUAUAAAGCAGCCGAAAGGCUGC-3') 或由其组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,反义链包含SEQ ID NO:19 (3'-GGCAUAAACGGUAUUUAUUUAU-5') 或由其组成。在某些实施方案(U/GG形式)中,有义链包含SEQ ID NO:15或由其组成,并且反义链包含SEQ ID NO:19或由其组成。

[0176] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-465T/MOP。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:13 (5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUAGCAGCCGAAAGGCUGC-3') 的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:14 (3'-GGGAUUUAGUAAACUUCUAUUAU-5',其中下划线指示4'-氧基甲基磷酸酯修饰)的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:14的序列或由所述序列组成。

[0177] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是KRAS-446T/MOP。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:15 (5'-GUAUUUGCCAUAAAUAUAAAGCAGCCGAAAGGCUGC-3') 的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的反义链包含SEQ ID NO:16 (3'-GGCAUAAACGGUAUUUAUUUAU-5',其中下划线指示4'-氧基甲基磷酸酯修饰)的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子的有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且反义链包含SEQ ID NO:16的序列或由所述序列组成。

[0178] MEK抑制剂

[0179] 如本文所述,术语“MEK”是指丝裂原活化蛋白激酶激酶MEK1和/或MEK2。MEK也被称为MAP2K和MAPKK。MEK是在某些癌症诸如黑素瘤中活化的RAS/RAF/MEK/ERK信号传导级联的成员。路径通过许多生长因子和细胞因子与细胞表面上的受体的结合来活化,所述结合活化受体酪氨酸激酶。受体酪氨酸激酶的活化导致RAS的活化,所述RAS接着募集RAF,所述RAF转而通过多个磷酸化事件而活化。

[0180] 活化的RAF使MEK激酶磷酸化和活化,所述MEK激酶转而使ERK激酶(也被称为丝裂原活化蛋白激酶“MAPK”)磷酸化和活化。磷酸化ERK可接着易位至核,在所述核中,它直接地或间接地使各种转录因子诸如c-Myc和CREB磷酸化和活化。这个过程导致对于细胞生长和增殖重要的基因的基因转录改变。

[0181] 作为RAS/RAF/MEK/ERK信号传导级联中的纽带,MEK1和MEK2在肿瘤发生、细胞增殖

和凋亡抑制中起作用。尽管MEK1/2它们自身很少突变,但组成型活性MEK已见于超过30%的测试原代肿瘤细胞系中。一种使这个级联停止的方式是抑制MEK。当MEK被抑制时,阻断了细胞增殖,并且诱导了凋亡。因此,抑制MEK已成为对于开发药物治疗来说具有吸引力的目标。

[0182] MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼(GSK1120212)、司美替尼(selumetinib)、贝美替尼(binimetinib)(MEK162)、可美替尼(cobimetinib)(XL518)、瑞美替尼(refametinib)(BAY 86-9766)、匹马司替(pimasertib)、PD-325901、R05068760、CI-1040(PD035901)、AZD8330(ARRY-424704)、R04987655(CH4987655)、R05126766、WX-554、E6201和TAK-733。在一个实施方案中,MEK抑制剂是曲美替尼。

[0183] 曲美替尼是一种小分子激酶抑制剂,并且被核准作为单一剂或与达拉菲尼(dabrafenib)组合用于治疗患有在BRAF基因中具有V600E或V600K突变的不可切除或转移性黑素瘤的受试者。BRAF编码细胞内信号传导中涉及的被称为B-Raf的丝氨酸/苏氨酸激酶。

[0184] 免疫治疗剂

[0185] 本文公开的各种方法和组合物涉及采用KRAS核酸抑制剂分子和免疫治疗剂的组合疗法。施用KRAS核酸抑制剂分子可致使对免疫疗法不起响应的某些肿瘤易感于免疫疗法。

[0186] 免疫疗法是指增强免疫应答的方法。通常,在本文公开的方法中,抗肿瘤免疫应答得到增强。在某些实施方案中,免疫疗法是指增强针对肿瘤或癌症的T细胞应答的方法。

[0187] 在某些实施方案中,免疫疗法或免疫治疗剂靶向免疫检查点分子。某些肿瘤能够通过征用免疫检查点路径来逃避免疫系统。因此,靶向免疫检查点已作为一种用于对抗肿瘤逃避免疫系统的能力以及活化针对某些癌症的抗肿瘤免疫性的有效方法而出现。Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12: 252-264。

[0188] 在某些实施方案中,免疫检查点分子是降低对抗原的T细胞应答中涉及的信号的抑制性分子。举例来说,CTLA4在T细胞上表达,并且在通过结合抗原递呈细胞上的CD80(也称为B7.1)或CD86(也称为B7.2)来下调T细胞活化方面起作用。PD-1是在T细胞上表达的另一抑制性免疫检查点分子。PD-1限制在炎症性应答期间在外周组织中T细胞的活性。此外,PD-1的配体(PD-L1或PD-L2)通常在许多不同肿瘤的表面上上调,从而导致肿瘤微环境中抗肿瘤免疫应答的下调。在某些实施方案中,抑制性免疫检查点分子是CD8、CTLA4或PD-1。在其他实施方案中,抑制性免疫检查点分子是PD-1的配体,诸如CD274(PD-L1)或PD-L2。在其他实施方案中,抑制性免疫检查点分子是CTLA4的配体,诸如CD80或CD86。在其他实施方案中,抑制性免疫检查点分子是淋巴细胞活化基因3(LAG3)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳糖素9(GAL9)或腺苷A2a受体(A2aR)。

[0189] 靶向这些抑制性免疫检查点分子的拮抗剂可用于增强针对某些癌症的抗原特异性T细胞应答。因此,在某些实施方案中,免疫疗法或免疫治疗剂是抑制性免疫检查点分子的拮抗剂。在某些实施方案中,抑制性免疫检查点分子是PD-1。在某些实施方案中,抑制性免疫检查点分子是PD-L1。在某些实施方案中,抑制性免疫检查点分子的拮抗剂是抗体,并且优选地是单克隆抗体。在某些实施方案中,抗体或单克隆抗体是抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体。在某些实施方案中,抗体是单克隆抗PD-1抗体。在某些实施方案中,抗体是单克隆抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,单克隆抗体是抗CTLA4抗体和抗

PD-1抗体、抗CTLA4抗体和抗PD-L1抗体、或抗PD-L1抗体和抗PD-1抗体的组合。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是帕博利珠单抗(Keytruda®)或纳武利尤单抗(Opdivo®)中的一者或多者。在某些实施方案中,抗CTLA4抗体是伊匹木单抗(Yervoy®)。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是阿替利珠单抗(atezolizumab)(Tecentriq®)、阿维利尤单抗(avelumab)(Bavencio®)或度伐利尤单抗(durvalumab)(Imfinzi®)中的一者或多者。

[0190] 在某些实施方案中,免疫疗法或免疫治疗剂是针对CD80、CD86、LAG3、KIR、TIM3、GAL9或A2aR的拮抗剂(例如抗体)。在其他实施方案中,拮抗剂是抑制性免疫检查点分子的可溶性形式,诸如包含抑制性免疫检查点分子的细胞外结构域和抗体的Fc结构域的可溶性融合蛋白。在某些实施方案中,可溶性融合蛋白包含CTLA4、PD-1、PD-L1或PD-L2的细胞外结构域。在某些实施方案中,可溶性融合蛋白包含CD80、CD86、LAG3、KIR、TIM3、GAL9或A2aR的细胞外结构域。在一个实施方案中,可溶性融合蛋白包含PD-L2或LAG3的细胞外结构域。

[0191] 在某些实施方案中,免疫检查点分子是放大对抗原的T细胞应答中涉及的信号的共刺激性分子。举例来说,CD28是在T细胞上表达的共刺激性受体。当T细胞通过它的T细胞受体结合抗原时,CD28结合抗原递呈细胞上的CD80(也称为B7.1)或CD86(也称为B7.2)以放大T细胞受体信号传导,并且促进T细胞活化。因为CD28与CTLA4结合相同配体(CD80和CD86),所以CTLA4能够抵抗或调控由CD28介导的共刺激性信号传导。在某些实施方案中,免疫检查点分子是选自CD28、诱导型T细胞共刺激物(ICOS)、CD137、OX40或CD27的共刺激性分子。在其他实施方案中,免疫检查点分子是共刺激性分子的配体,包括例如CD80、CD86、B7RP1、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L或CD70。

[0192] 靶向这些共刺激性检查点分子的激动剂可用于增强针对某些癌症的抗原特异性T细胞应答。因此,在某些实施方案中,免疫疗法或免疫治疗剂是共刺激性检查点分子的激动剂。在某些实施方案中,共刺激性检查点分子的激动剂是激动剂抗体,并且优选地是单克隆抗体。在某些实施方案中,激动剂抗体或单克隆抗体是抗CD28抗体。在其他实施方案中,激动剂抗体或单克隆抗体是抗ICOS抗体、抗CD137抗体、抗OX40抗体或抗CD27抗体。在其他实施方案中,激动剂抗体或单克隆抗体是抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗B7RP1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、抗CD137L抗体、抗OX40L抗体或抗CD70抗体。

[0193] 药物组合物

[0194] 本公开提供了包含KRAS核酸抑制剂分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,包含KRAS核酸抑制剂分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物还包含MEK抑制剂。在某些实施方案中,包含KRAS核酸抑制剂分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物还包含免疫治疗剂。

[0195] 可用于本公开中的药学上可接受的赋形剂是常规的。由E.W.Martin所编的Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975)描述适于药物递送一种或多种包括疫苗的治疗性组合物和额外药剂的组合物和制剂。适合药物赋形剂包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。一般来说,赋形剂的性质将取决于所采用的特定施用模式。举例来说,胃肠外制剂通常包含可注射流体作为媒介物,所述流体包括药学上和生理上可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶

液、缓冲液、右旋糖水溶液、甘油等。对于固体组合物(例如粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式),常规无毒固体赋形剂可包括例如药品级甘露糖醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物中性载体之外,待施用的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。在某些实施方案中,药学上可接受的赋形剂是非天然存在的。

[0196] 根据本文公开的某些实施方案的药物组合物可包含可属于相同或不同赋形剂种类的至少一种成分,包括至少一种崩解剂、至少一种稀释剂和/或至少一种粘合剂。

[0197] 可添加至根据本文公开的实施方案的药物组合物中的至少一种崩解剂的典型非限制性实例包括但不限于聚维酮、交联聚维酮、羧甲基纤维素、甲基纤维素、海藻酸、交联羧甲基纤维素钠、淀粉乙醇酸钠、淀粉、甲醛-酪蛋白、以及它们的组合。

[0198] 可添加至根据本文公开的实施方案的药物组合物中的至少一种稀释剂的典型非限制性实例包括但不限于麦芽糖、麦芽糖糊精、乳糖、果糖、糊精、微晶纤维素、预胶凝淀粉、山梨糖醇、蔗糖、硅化微晶纤维素、粉状纤维素、葡萄糖结合剂、甘露糖醇、磷酸钙、以及它们的组合。

[0199] 可添加至根据本文公开的实施方案的药物组合物中的至少一种粘合剂的典型非限制性实例包括但不限于阿拉伯胶、糊精、淀粉、聚维酮、羧甲基纤维素、瓜尔胶(guar gum)、葡萄糖、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯、麦芽糖糊精、羟乙基纤维素、以及它们的组合。

[0200] 本文公开的药物组合物的适合制剂形式包括例如片剂、胶囊、软质胶囊、颗粒剂、粉剂、混悬剂、气雾剂、乳液、微乳液、纳米乳液、单位剂型、环、膜剂、栓剂、溶液、乳膏剂、糖浆、经皮贴片、软膏剂或凝胶剂。

[0201] KRAS核酸抑制剂分子可与包括例如以下的用于帮助摄取、分布或吸收的其他分子、分子结构、或化合物的混合物掺混、包封、缀合或以其他方式联合:脂质体和脂质,诸如美国专利第6,815,432、6,586,410、6,858,225、7,811,602、7,244,448和8,158,601号中公开的那些;聚合物材料诸如美国专利第6,835,393、7,374,778、7,737,108、7,718,193、8,137,695号以及美国公布专利申请第2011/0143434、2011/0129921、2011/0123636、2011/0143435、2011/0142951、2012/0021514、2011/0281934、2011/0286957和2008/0152661号中公开的那些;衣壳、类壳体或受体靶向分子。

[0202] 在某些实施方案中,核酸抑制剂分子于脂质纳米粒子(LNP)中配制。脂质-核酸纳米粒子通常在将脂质与核酸混合以形成复合物后自发形成。视所需粒度分布而定,可任选地使用例如热机筒挤出机诸如Lipex挤出机(Northern Lipids, Inc)将所得纳米粒子混合物通过聚碳酸酯膜(例如100nm截断值)来挤出。为制备供治疗使用的脂质纳米粒子,可合乎需要的是移除用于形成纳米粒子和/或更换缓冲液的溶剂(例如乙醇),其可通过例如透析或切向流过滤实现。制备含有核酸抑制剂分子的脂质纳米粒子的方法在本领域中是已知的,如例如在美国公布专利申请第2015/0374842和2014/0107178号中所公开。

[0203] 在某些实施方案中,LNP包含含有阳离子脂质体和聚乙二醇化脂质的脂质体。LNP可还包含一种或多种包膜脂质,诸如阳离子脂质、结构脂质、固醇、聚乙二醇化脂质、或它们的混合物。

[0204] 用于LNP中的阳离子脂质在本领域中是已知的,如例如在美国公布专利申请第

2015/0374842和2014/0107178号中所讨论。通常,阳离子脂质是在生理pH下具有净正电荷的脂质。在某些实施方案中,阳离子脂质体是DODMA、DOTMA、DL-048或DL-103。在某些实施方案中,结构脂质是DSPC、DPPC或DOPC。在某些实施方案中,固醇是胆固醇。在某些实施方案中,聚乙二醇化脂质是DMPE-PEG、DSPE-PEG、DSG-PEG、DMPE-PEG2K、DSPE-PEG2K、DSG-PEG2K或DSG-MPEG。在一个实施方案中,阳离子脂质是DL-048,聚乙二醇化脂质是DSG-MPEG,并且一种或多种包膜脂质是DL-103、DSPC、胆固醇和DSPE-MPEG。

[0205] 在某些实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子共价缀合于引导寡核苷酸递送至目标组织的配体。已探究许多此类配体。参见例如Winkler, *Ther. Deliv.* 4 (7) : 791-809 (2013)。举例来说,KRAS核酸抑制剂分子可缀合于一个或多个糖配体部分(例如N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc))以引导寡核苷酸摄取至肝中。参见例如美国专利第5,994,517号;美国专利第5,574,142号;WO 2016/100401。通常,KRAS核酸抑制剂分子缀合于三个或四个糖配体部分(例如GalNAc)。可使用的其他配体包括但不限于甘露糖-6-磷酸、胆固醇、叶酸、转铁蛋白和半乳糖(对于其他特定示例性配体,参见例如WO 2012/089352)。通常,当寡核苷酸缀合于配体时,以裸寡核苷酸形式施用所述寡核苷酸,其中所述寡核苷酸也未在LNP或其他保护性包衣中配制。在某些实施方案中,裸寡核苷酸内的每个核苷酸是在糖部分的2'位经修饰的,通常经2'-F、2'-OMe和/或2'-MOE修饰。

[0206] 这些药物组合物可通过常规灭菌技术灭菌,或可加以无菌过滤。所得水溶液可被包装以按原样使用或可被冻干,其中冻干制剂在施用之前与无菌水性载体组合。制剂的pH通常将在3与11之间,更优选是在5与9之间或在6与8之间,并且最优选是在7与8之间,诸如7至7.5。呈固体形式的所得组合物可以多个单次剂量单位包装,每个单位含有固定量的以上提及的一种或多种剂,诸如以片剂或胶囊的密封包装形式。呈固体形式的组合物还可包装在容器中以取用灵活数量,诸如在被设计用于可表面施加的乳膏剂或软膏剂的可挤压管中。

[0207] 在某些实施方案中,本文所述的药物组合物用于治疗KRAS相关疾病或病症,诸如KRAS相关癌症。在某些实施方案中,用于治疗KRAS相关疾病或病症的药物组合物包含KRAS核酸抑制剂分子,其中所述组合物与MEK抑制剂(例如曲美替尼)组合施用。在某些实施方案中,用于治疗KRAS相关疾病或病症的药物组合物包含KRAS核酸抑制剂分子,其中所述组合物与免疫治疗剂组合施用。在其他实施方案中,用于治疗KRAS相关疾病或病症的药物组合物包含KRAS核酸抑制剂分子,其中所述组合物与不同化学治疗剂诸如TGF- β 抑制剂分子或CSF-1抗体组合施用。在某些实施方案中,KRAS相关疾病或病症是癌症,诸如胰腺癌、结肠直肠癌、肝细胞癌或黑色素瘤。在某些实施方案中,KRAS相关癌症已转移。在某些实施方案中,KRAS相关癌症是胰腺癌。

[0208] 剂型

[0209] 本文公开的药物组合物可与常规赋形剂一起配制用于任何预定施用途径。

[0210] 通常,以液体形式配制含有KRAS核酸抑制剂分子的本公开的药物组合物以用于例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射进行的胃肠外施用。通常,以液体形式配制含有免疫治疗剂诸如抑制性免疫检查点分子的拮抗剂(例如抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体中的一者或多者)或共刺激性检查点分子的激动剂的药物组合物以用于例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射进行的胃肠外施用。

[0211] 适于胃肠外施用的剂型通常包括一种或多种适于胃肠外施用的媒介物,例如包括无菌水溶液、盐水、低分子量醇诸如丙二醇、聚乙二醇、植物油、明胶、脂肪酸酯诸如油酸乙酯等。胃肠外制剂可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、制菌剂、致使制剂与预定接受体的血液等张的溶质、或助悬剂或增稠剂。可例如通过使用表面活性剂维持适当流动性。可将液体制剂冻干并储存以供稍后在用无菌可注射溶液复原后使用。

[0212] 药物组合物还可被配制用于其他施用途径,包括表面或经皮施用、经直肠或经阴道施用、经眼施用、经鼻施用、经颊施用或舌下施用。

[0213] 施用/治疗方法

[0214] 通常,以静脉内或皮下方式施用本发明的核酸抑制剂分子。然而,还可通过本领域中已知的任何方法施用本文公开的药物组合物,包括例如口服、经颊、舌下、经直肠、经阴道、尿道内、表面、眼内、鼻内和/或心房内,所述施用可包括片剂、胶囊、颗粒剂、水性混悬剂、凝胶剂、喷雾剂、栓剂、油膏剂、软膏剂等。施用还可通过注射进行,例如在腹膜内、肌肉内、真皮内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内等。

[0215] 本文公开的化合物的治疗有效量可取决于施用途径和患者的身体特征,诸如总体状态、重量、膳食和其他药物治疗。如本文所用,治疗有效量意指一种或多种化合物的有效预防、缓和或改善所治疗受试者的疾病或疾患症状的量。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,并且通常在每名患者每剂约0.5mg至约3000mg的一种或多种小分子剂的范围。

[0216] 在一个方面,本文公开的药物组合物可用于治疗或预防与KRAS相关疾病或病症相关的症状。一个实施方案涉及一种治疗KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子。一个实施方案涉及一种治疗KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的MEK抑制剂。一个实施方案涉及一种治疗KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的免疫治疗剂。另一实施方案涉及一种治疗KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的化学治疗剂,诸如TGF- β 抑制剂分子或CSF-1抗体。

[0217] 通常,核酸抑制剂分子与和核酸抑制剂分子组合的小分子治疗剂诸如MEK抑制剂分开并且根据不同时程施用。举例来说,当用作单一剂时,曲美替尼当前是以每日口服剂量(通常约1-2mg/天)来开处方的。在另一方面,核酸抑制剂分子可能通过静脉内或皮下途径,以一周一次、每两周一次、一个月一次、每三个月一次、一年两次等给与的剂量施用。在启动核酸抑制剂分子的施用时,受试者可能已正在服用小分子治疗剂。在其他实施方案中,受试者可在大约相同的时间开始小分子治疗剂与核酸抑制剂分子两者的施用。在其他实施方案中,受试者可在启动核酸抑制剂分子的施用之后开始服用小分子治疗剂。在某些实施方案中,可在受试者开始服用小分子治疗剂之后,诸如在受试者已停止服用小分子治疗剂之后,向受试者施用核酸抑制剂分子。

[0218] 另外,核酸抑制剂分子可与免疫治疗剂分开并且根据不同时程施用。举例来说,当用作单一剂时,每3周在3mg/kg的推荐剂量下历经90分钟静脉内施用伊匹木单抗(抗CTLA-4抗体),持续总共4剂。类似地,当用作单一剂时,每2周在240mg(或3mg/kg)的推荐剂量下历经60分钟静脉内施用纳武利尤单抗(抗PD-1抗体)。当纳武利尤单抗与伊匹木单抗组合施用

时,纳武利尤单抗的推荐剂量是1mg/kg,历经60分钟静脉内施用;继之以在同一天在3mg/kg的推荐剂量下施用伊匹木单抗,每3周,持续总共4剂;接着每2周在240mg的推荐剂量下施用纳武利尤单抗。当帕博利珠单抗用作单一剂时,它通常每3周在200mg的推荐剂量下历经30分钟静脉内加以施用,直至疾病进展、不可接受的毒性、或直至24个月无疾病进展。

[0219] 在本文公开的治疗方法的某些实施方案中,一种药物组合物可包含KRAS核酸抑制剂分子,并且单独药物组合物可包含MEK抑制剂。

[0220] 在其他实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子可与MEK抑制剂同时施用。

[0221] 因此,在本文公开的治疗方法的某些实施方案中,单一药物组合物可包含KRAS核酸抑制剂分子与MEK抑制剂和/或免疫治疗剂两者。因此,在本文公开的治疗方法的一个实施方案中,将单一药物组合物施用至受试者,其中所述单一药物组合物包含KRAS核酸抑制剂分子与MEK抑制剂诸如曲美替尼两者。

[0222] 在某些实施方案中,以每天每千克接受者体重20微克至10毫克、每千克100微克至5毫克、每千克0.25毫克至2.0毫克、或每千克0.5至2.0毫克的剂量施用KRAS核酸抑制剂分子。

[0223] 在某些实施方案中,每日一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、一个季度一次、一年两次或每年一次施用KRAS核酸抑制剂分子。在某些实施方案中,每2、3、4、5、6或7天一次或两次施用KRAS核酸抑制剂分子。组合物(含有两种剂或单一单独剂)可每月一次、每周一次、每日一次(QD)、每隔一天一次加以施用,或分成多个每月、每周或每日剂量,诸如每日两次、一天三次或每两周一次。在某些实施方案中,可一天一次施用组合物,持续二、三、四、五、六或至少七天。尽管剂可同时施用,但通常,每种剂将根据不同时程施用,特别是如果剂通过不同途径来施用。

[0224] 或者,考虑足以维持血液中的治疗有效浓度的连续静脉内输注。熟练技术人员将了解某些因素可影响为有效治疗受试者所需的剂量和时间选择,所述因素包括但不限于疾病或病症的严重性、先前治疗、受试者的总体健康状况和/或年龄或重量、以及存在的其他疾病。

[0225] 用治疗有效量的剂治疗受试者可包括单次治疗,或优选地,可包括一系列治疗。在某些实施方案中,治疗时程包括第一负荷剂量或阶段,此通常是较高剂量或频率,继之以维持剂量或阶段,此相比于负荷剂量/阶段通常是较低剂量或频率。通常,治疗持续直至发生疾病进展或不可接受的毒性。

[0226] 在某些实施方案中,可例如使用本领域中已知的方法将KRAS核酸抑制剂分子插入至表达构建体例如病毒载体、逆转录病毒载体、表达盒或质粒病毒载体中。可通过例如吸入、口服、静脉内注射、局部施用(参见美国专利第5,328,470号)或通过立体定向注射(参见例如Chen等人(1994),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91,3054-3057)将表达构建体递送至受试者。

[0227] 表达构建体可为适用于适当表达系统中的构建体,并且包括但不限于如本领域中所知的逆转录病毒载体、线性表达盒、质粒和病毒或病毒源性载体。此类表达构建体可包括一种或多种诱导型启动子, RNA Pol III启动子系统诸如U6 snRNA启动子或H1 RNA聚合酶III启动子、或本领域中已知的其他启动子。构建体可包括siRNA的一个或两个链。表达两个链的表达构建体还可包括连接两个链的环结构,或每个链可从同一构建体内的单独启动子

单独转录。每个链还可从单独表达构建体转录,例如Tuschl(2002,Nature Biotechnol 20:500-505)。

[0228] 一个方面涉及治疗KRAS相关疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者(优选是人)施用治疗有效量的如本文所述的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的MEK抑制剂或免疫治疗剂。

[0229] 在一个实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子是dsRNAi抑制剂分子。在那些实施方案中的某些中,有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且/或者反义链包含SEQ ID NO:14的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:13或由其组成,并且反义链包含SEQ ID NO:14或由其组成。在那些实施方案中的某些中,有义链包含SEQ ID NO:15的序列或由所述序列组成,并且/或者反义链包含SEQ ID NO:16的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:15或由其组成,并且反义链包含SEQ ID NO:16或由其组成。在一个实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子包含四元环。在一个实施方案中,KRAS核酸抑制剂分子与脂质纳米粒子一起配制。在一个实施方案中,以静脉内方式施用KRAS核酸抑制剂分子。在某些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13或15中的一者的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,反义链包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14或16中的一者的序列或由所述序列组成。图1或图3A的任何DsiRNA或四元环结构也可用于本文所述的方法中。

[0230] 在一个实施方案中,治疗方法包括向受试者(优选是人)施用治疗有效量的KRAS核酸抑制剂分子和治疗有效量的MEK抑制剂。在一个实施方案中,MEK抑制剂是曲美替尼。在一个实施方案中,以口服方式施用曲美替尼。在一个实施方案中,每日或每隔一天以约1-2mg的剂量施用曲美替尼。在一个实施方案中,每日以2mg的剂量施用曲美替尼。

[0231] 在一个实施方案中,MEK抑制剂是口服施用的曲美替尼,并且KRAS核酸抑制剂分子是dsRNAi抑制剂分子,其中所述dsRNAi抑制剂分子的有义链与反义链之间的互补性区域在长度方面在15与40个核苷酸之间,包括例如具有有义链和反义链的双链核酸,其中所述有义链包含SEQ ID NO:13的序列或由所述序列组成,并且所述反义链包含SEQ ID NO:14的序列或由所述序列组成。在某些实施方案中,dsRNAi抑制剂分子的有义链与反义链之间的互补性区域在长度方面是约20-35,诸如约25-35、约20-26、约25或约26个核苷酸。KRAS dsRNAi抑制剂分子可与脂质纳米粒子一起配制,并且以静脉内方式施用。

[0232] 在这些治疗方法的某些实施方案中,KRAS相关疾病或病症是癌症,诸如胰腺癌、结肠直肠癌、肝细胞癌或黑素瘤。

[0233] 在这些治疗方法的某些实施方案中,KRAS相关癌症已转移。在某些实施方案中,KRAS相关癌症是已转移的胰腺癌。在某些实施方案中,治疗减轻受试者中的转移。在某些实施方案中,用KRAS核酸抑制剂分子诸如dsRNAi抑制剂分子和MEK抑制剂诸如曲美替尼的组合治疗使受试者的存活期增加超过接受用所述KRAS核酸抑制剂分子或所述MEK抑制剂(单独地而非组合地)治疗的患有癌症的患者的平均存活期。

[0234] 实施例

[0235] 实施例1:KRAS构建体

[0236] 构建了靶向KRAS基因的核酸抑制剂分子(KRAS1)。首先,选择若干25/27聚体KRAS DsiRNA(除在引导链的3'末端上的三个甲基之外不具有修饰)。接着使这些构建体转变成切

口四元环形式,以22聚体形式使用U/GG惯例,以致碱基从5'末端开始脱离引导链。参见图1。使用转脂胺,在每种构建体1nM和0.1nM浓度下,在体外在人胰腺癌(MIA PaCa2)细胞中筛选这些DsiRNA以测定效能。参见图2A和图2B。

[0237] 接着选择来自这个体外筛选的最好的三个序列(KRAS-194、KRAS-465和KRAS-446),并且构建成具有U/GG形式的四元环(KRAS-194T、KRAS-465T和KRAS-446T)并于EnCore脂质纳米粒子(LNP)中配制。参见图3A。

[0238] 具体地说,KRAS-194的有义链含有SEQ ID NO:1(5'-GGCCUGCUGAAAAUGACUGAAUATA-3'),并且KRAS-194的反义链含有SEQ ID NO:2(3'-CUCCGGACGACUUUUACUGACUUAUUAU-5')。KRAS-465的有义链含有SEQ ID NO:3(5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUUCACCA-3'),并且KRAS-465的反义链含有SEQ ID NO:4(3'-AUGAUUUAGUAAACUUCUAUAAGUGGU-5')。KRAS-446的有义链含有SEQ ID NO:5(5'-GUAUUUGCCAUAUUUAUACUAAAT-3'),并且KRAS-446的反义链含有SEQ ID NO:6(3'-CACAUAAACGGUAUUUAUUAUGAUUUUA-5')。

[0239] 在U/GG形式中,KRAS-194T的有义链含有SEQ ID NO:7(5'-GGCCUGCUGAAAAUGACUGAGCAGCCGAAAGGCUGC-3'),并且KRAS-194T的反义链含有SEQ ID NO:17(3'-GGCCGGACGACUUUUACUGACU-5')。在U/GG形式中,KRAS-465T的有义链含有SEQ ID NO:13(5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUAGCAGCCGAAAGGCUGC-3'),并且KRAS-465T的反义链含有SEQ ID NO:18(3'-GGGAUUUAGUAAACUUCUAUUAU-5')。在U/GG形式中,KRAS-446T的有义链含有SEQ ID NO:15(5'-GUAUUUGCCAUAUUUAUUAAGCAGCCGAAAGGCUGC-3'),并且KRAS-446T的反义链含有SEQ ID NO:19(3'-GGCAUAAACGGUAUUUAUUAUU-5')。

[0240] 使用MIA PaCa 2和结肠癌LS411N细胞系,在肿瘤模型中测试了四元环序列。参见图3B和图3C。接着进一步修饰来自这个筛选的最好的两者(KRAS-465T和KRAS-446T)以在反义链的5'末端的核苷酸上具有4'-氧基甲基磷酸酯修饰(KRAS-465T/MOP和KRAS-446T/MOP)。KRAS-465T/MOP的有义链含有SEQ ID NO:13(5'-CUAAAUCAUUUGAAGAUUAGCAGCCGAAAGGCUGC-3'),并且KRAS-465T/MOP的反义链含有SEQ ID NO:14(3'-GGGAUUUAGUAAACUUCUAUUAU-5',其中下划线指示4'-氧基甲基磷酸酯修饰)。KRAS-446T/MOP的有义链含有SEQ ID NO:15(5'-GUAUUUGCCAUAUUUAUUAAGCAGCCGAAAGGCUGC-3'),并且KRAS-446T/MOP的反义链含有SEQ ID NO:16(3'-GGCAUAAACGGUAUUUAUUAUU-5',其中下划线指示4'-氧基甲基磷酸酯修饰)。

[0241] 在LS411N肿瘤中在24小时和72小时时间点下筛选两种构建体。参见图4A和图4B。选择KRAS-465T/MOP(或KRAS1)用于以下在实施例2-8中描述的肿瘤研究中。

[0242] 实施例2:用于肿瘤研究的方法

[0243] 将6至8周龄有免疫能力或免疫损害的小鼠(C57BL/6/裸)用 2×10^6 个Pan02(小鼠胰腺腺细胞系)或 5×10^6 个Panc1(人胰腺腺细胞系)肿瘤细胞在右肩皮下注射。一周每2-3天测量肿瘤体积以监测肿瘤生长。当肿瘤达到约 200mm^3 时开始给药。对于肿瘤生长抑制研究,将动物随机化并分配至不同群组,并且使其经受给药循环。以 10ml/kg 的总体积通过侧尾静脉来静脉内给与KRAS1配制的LNP("KRAS/LNP")或安慰剂(搅乱的KRAS dsRNAi)配制的LNP。以 10ml/kg 的体积腹膜内或口服给与免疫调节剂(CSF1抗体、TGF- β 抑制剂或检查点抑制剂)。以 10ml/kg 的总体积口服给与曲美替尼(MEK抑制剂)。

[0244] 小鼠胰腺细胞系Pan02从NCI获得,并且人胰腺细胞系Panc1细胞从ATCC (Manassas,VA)获得并在补充以10%FBS的RPMI/DMEM培养基中生长。Pan02是一种具有KRAS G12D突变的鼠PDAC细胞系。Panc1是一种具有KRAS G12D突变的人PDAC细胞系。

[0245] 实施例3:KRAS核酸抑制剂分子在具有KRAS G12D突变的鼠和人PDAC中的治疗

[0246] KRAS1和安慰剂于EnCore LNP中配制,并且用于以下研究中。为评估LNP配制的KRAS1是否将有效地将核酸有效载荷递送至胰腺腺癌(PDAC)肿瘤,将C57BL/6小鼠用鼠PDAC Pan02肿瘤进行植入。在Pan02肿瘤细胞植入后十四天时,平均肿瘤尺寸是约200mm³,将小鼠被分成两个组,并且用KRAS/LNP或安慰剂/LNP在10mg/kg下治疗。参见图5A。在末次剂量之后二十四小时,收集肿瘤,并且通过qPCR分析KRAS的mRNA水平。相较于来自用KRAS/LNP治疗的小鼠的肿瘤中的对照水平,KRAS基因的表达水平降低约40-50%。参见图5B。同样,CD8、FoxP3和CXCL1的表达水平全都降低。参见图5B。

[0247] 为了解观察到的KRAS敲低是否可转换成生长抑制,如上所述用Pan02肿瘤进行植入,并且当它们达到恰当尺寸(例如约200mm³)时,将它们分选并用KRAS/LNP或安慰剂/LNP (cKras)在10mpk下一周一次治疗3周,并且监测肿瘤生长。如图6中所示,对于KRAS/LNP治疗的Pan02肿瘤,观察到完全生长抑制。

[0248] 为了解KRAS/LNP是否将在人肿瘤中具有相同作用,将人PDAC Panc1细胞植入裸小鼠中,并且当它们达到200mm³的平均尺寸时,将它们分成2个组,并且历经3周用KRAS/LNP或安慰剂/LNP (cKras)在5mpk (qdx2, 5mpk)下治疗。监测肿瘤生长,并且如图7中所示,如同Pan02肿瘤一样,Panc1肿瘤也显示完全生长抑制,从而表明约40-50%KRAS敲低可足以显示KRAS依赖性胰腺肿瘤的完全肿瘤生长抑制。

[0249] 实施例4:KRAS抑制导致对鼠胰腺癌的肿瘤微环境中抑制性分子而非基质活化标志物的调节

[0250] 为了解单次KRAS/LNP治疗是否将导致对肿瘤微环境的调节,分析来自实施例3中所述的研究的样品(图5A至图5B)的某些T细胞标志物(CD8和FoxP3)和趋化因子(CXCL1)。FoxP3是在调控或抑制免疫系统的其他细胞方面起重要作用的免疫抑制性T细胞(Treg)的标志物。CXCL1是活跃地将抑制性分子诸如Treg和髓源性抑制细胞募集至肿瘤微环境的趋化因子。引起关注的是,在肿瘤微环境中,KRAS1治疗的肿瘤具有显著降低水平的FoxP3与CXCL1 mRNA两者。然而,在单次治疗后,CD8水平不变,从而表明单次KRAS1治疗可能不足以增加T细胞浸润至Pan02的抑制性肿瘤微环境中。

[0251] 为了解连续KRAS抑制是否将导致对肿瘤微环境的调节,在末次剂量之后24小时收集来自实施例3中所述的功效研究的Pan02肿瘤(图6),并且使其经受qPCR以测量免疫细胞标志物(CD8、FoxP3)、免疫抑制性细胞因子(CXCL1、CXCL5和IL10)、免疫检查点(PD-L1)或基质活化标志物(TGF- β 、Axin2、ROBO1和CSF3)的mRNA。如图6中所示,KRAS DsiRNA治疗导致这些肿瘤的完全生长抑制。这转而导致若干关键抑制性分子(FoxP3、CXCL1和CXCL5)的下调。参见图8A、图8B和图8F。此外,这还增加了Cd8 mRNA和Cd274 (PD-L1) mRNA的水平。参见图8C和图8H。然而,所有基质活化标志物在KRAS抑制后似乎都略微增加。参见图8D、图8E、图8I和图8J。这个数据表明连续KRAS抑制会调节抑制性肿瘤微环境标志物以有利于T细胞浸润,但不改变基质活化。

[0252] 实施例5:MEKi/KRAS治疗调节肿瘤微环境以有利于T细胞浸润

[0253] FDA核准的MEK抑制剂曲美替尼被证明会抑制MAPK路径。为了解单独MEKi介导的抑制调节肿瘤微环境的程度,将Pan02肿瘤植入C57BL/6小鼠中。在第6天时,此时肿瘤达到约200mm³的尺寸,用曲美替尼在3mpk下治疗它们3天,即在肿瘤植入后第6、7和8天(qdx3, 3mpk)。在末次剂量之后24小时,即肿瘤植入后第9天,收集肿瘤,并且分析免疫细胞标志物和其他相关标志物(CD8、FoxP3、PD-L1等)。FoxP3 mRNA水平由于MEK抑制而下调(参见图9B),然而,Cd8和Cd274 (PD-L1) mRNA水平不变。参见图9A和图9C。

[0254] 为了解连续MEKi治疗是否将增强CD8 T细胞浸润,在另一研究中,用MEKi治疗Pan02肿瘤多次。在3个治疗循环之后,将进行了末次MEKi治疗的10只小鼠中的5只另外用KRAS1在10mpk下治疗。参见图10A。在KRAS/LNP治疗之前和之后收集肿瘤,并且分析T细胞标志物(CD8、FoxP3)、趋化因子标志物(CXCL1、CXCL5)和检查点(PD-L1)。在3个MEKi治疗循环之后,CXCL1和CXCL5的mRNA水平增加。然而,在MEKi治疗之后的单次KRAS/LNP治疗使CXCL1和CXCL5的mRNA水平降低至背景水平。参见图10C和图10E。KRAS/LNP治疗还增加了Cd8和Cd274 (PD-L1)的由MEKi治疗降低的mRNA水平。参见图10D和图10F。然而,在MEKi和KRAS/LNP治疗之后,FoxP3 mRNA水平降低。参见图10B。这些mRNA数据表明单独MEKi不能使抑制性趋化因子/分子降低至可有利于T细胞浸润的水平,而单次KRAS/LNP治疗有效降低了许多抑制性分子,并且增加了CD8和PD-L1的水平。这也由FoxP3和CD8免疫组织化学染色载玻片所证明。参见图11。

[0255] 实施例6:定向靶向KRAS激起了KRAS G12D突变胰腺癌中由MEKi(曲美替尼)和吉西他滨介导的抗性

[0256] 为了解曲美替尼在人PDAC中表现得如何,如上所述用Panc1肿瘤进行植入,并且用曲美替尼(3mg/kg/剂)治疗,如图12A中所示。在整个研究时期中进行肿瘤测量以监测肿瘤生长。当肿瘤停止对曲美替尼治疗起响应时(认为肿瘤变得对曲美替尼具有抗性),接着用KRAS/LNP在5mpk(qdx3)下治疗肿瘤。在KRAS/LNP治疗之前和之后收集肿瘤以进行mRNA分析。引起关注的是,曲美替尼抗性Panc1肿瘤对KRAS/LNP治疗起响应,并且消退。参见图12A。相较于未进行KRAS/LNP治疗的抗性肿瘤,KRAS1治疗的肿瘤在治疗之后显示约40-50%KRAS敲低,从而表明甚至当这些肿瘤对靶向剂具有抗性时,它们仍然对KRAS DsiRNA敏感。引起关注的是,在进行了MEKi或MEKi+KRAS DsiRNA治疗的肿瘤中,Cd274 (PD-L1) mRNA水平增加。参见图12B。

[0257] 类似地,在另一研究中,如所描述使Panc1肿瘤生长,并且用当前护理标准吉西他滨(50mpk)治疗。尽管在开始时肿瘤令人满意地起响应,但它们在数轮治疗之后变得具有抗性。参见图13。同样,当如上所述以及如图13中所示用KRAS/LNP(10mpk)治疗这些抗性肿瘤时,正如曲美替尼抗性肿瘤对起KRAS/LNP响应一样,抗性肿瘤对KRAS1起响应,从而表明变得对靶向剂或化学治疗剂具有抗性的这些肿瘤仍然对KRAS/LNP敏感。

[0258] 还在Pan02肿瘤中重复了类似研究。用吉西他滨连续治疗Pan02肿瘤直至它们变得具有抗性,并且接着用KRAS1治疗抗性Pan02肿瘤。参见图14。对于Panc1肿瘤与Pan02肿瘤两者观察到了类似结果。吉西他滨抗性Pan02肿瘤对KRAS/LNP良好地起响应,并且消退。在这个情况下,收集肿瘤,并且分析促进对肿瘤微环境和基质活化的调节的mRNA标志物。

[0259] 当用吉西他滨治疗肿瘤直至它们变得具有抗性时,CXCL1 mRNA水平增加。单次KRAS1治疗未使这些水平降低至基线。参见图15B。吉西他滨治疗继之以KRAS/LNP治疗不改

变Cd8和Cd274 (PD-L1) 的mRNA水平。参见图15C和图15D。然而, 吉西他滨治疗±KRAS/LNP治疗似乎降低了一些基质活化标志物(Axin2、ROBO1和TGF- β)。参见图15E至图15G。这表明吉西他滨治疗可用于降低基质活化, 但可能不足以降低肿瘤微环境中的抑制性免疫细胞标志物。

[0260] 实施例7: 单一剂TGF- β 抑制剂或CSF1抗体用以使基质标志物失活

[0261] 可合乎需要的是降低肿瘤微环境中的许多抑制性分子以增加这些Pan02肿瘤中的CD8 T细胞浸润。还显而易见的是基质区室的失活对于在肿瘤微环境中维持有效T细胞可为同等重要的, 因为基质组分在促进肿瘤生长和侵袭方面起作用。KRAS抑制(多达约40%)似乎降低许多抑制性分子, 并且增加CD8 T细胞, 但似乎不改变基质区室。因为TGF- β 和Wnt信号传导路径牵涉于使基质区室活化中, 所以在这些肿瘤中评估了下调这些路径中的一者的抑制剂。TGF- β 抑制剂(加尼司替(galunisertib))或CSF1抗体(据报道会降低PDAC周围的巨噬细胞积累和基质含量)在研究中用于核实假设。在一个研究中, 用TGF- β 抑制剂在75mpk (BID x2/循环)下或用媒介物口服治疗Pan02肿瘤2周, 并且在整个研究时期中监测肿瘤生长。参见图16A。在另一研究中, 用CSF1抗体(q5d, 第一剂在50mpk下, 并且随后剂量在25mpk下)腹膜内治疗Pan02肿瘤, 并且随时间监测肿瘤生长。参见图16B。在两种情况下, 均观察到约50%的肿瘤生长抑制。参见图16A至图16B。还收集了在研究结束时的肿瘤, 并且分析基质活化标志物(ROBO1、TGF- β 、Axin2等)。

[0262] 实施例8: KRAS抑制连同使基质活化失活的药物一起的组合

[0263] 为合并从那些单一剂治疗获得的知识, 可设计和进行组合研究。可使降低免疫抑制性分子的药物(KRAS核酸抑制剂分子)与降低基质活化的药物(例如TGF- β 抑制剂或CSF1抑制剂)和缓解检查点阻断的药物组合。可如所描述用Pan02肿瘤进行植入, 并且用KRAS/LNP、TGF- β 抑制剂和检查点抑制剂治疗。

[0264] 除非另外指示, 否则说明书和权利要求中使用的所有数值都应被理解为在所有情况下都由术语“约”修饰, 无论是否如此陈述。还应了解说明书和权利要求中使用的精确数值形成本公开的额外实施方案, 在任何指定端点内的所有范围和子范围也是如此。此外, 应注意当公开步骤时, 除非明确陈述, 否则步骤无需按照那个顺序进行。

[0265] 其他实施方案将由考虑本公开的说明书和实践而为本领域技术人员显而易见。

序列表

<110> 迪克纳制药公司(DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.)
 <120> 用于治疗KRAS相关疾病或病症的组合物和方法
 <130> 0243.0034-PCT
 <140>
 <141>
 <150> 62/826,121
 <151> 2019-03-29
 <160> 55
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 [0001] <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸"
 <400> 1
 ggccugcuga aaaugacuga auata 25
 <210> 2
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"
 <400> 2
 uauauucagu cauuuucagc aggccuc 27
 <210> 3
 <211> 25

	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 3	
	cuaaaucuu ugaagauuu cacca	25
	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 4	
	uggugaauu cucaaauga uuuagua	27
[0002]	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 5	
	guauuugcca uaaauaauc uaaat	25
	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	

	<400> 6 auuuaguauu auuuauaggca aaucac	27
	<210> 7 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 7 ggccugcuga aaaugacuga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 8 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
[0003]	<400> 8 ucagucuuu ucagcaggcc uc	22
	<210> 9 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 9 cuaaaucuu ugaagauuu gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 10 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> 来源	

	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 10	
	aaauaucuua aaugauuuag ua	22
	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 11	
	guauuugcca uaaauaaauac gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0004]	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 12	
	guauuauuuu uggcaaaauac ac	22
	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 13	
	cuaaaucuu ugaagauaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<220>	
	<221> 经修饰的_碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 4'-氧基甲基磷酸酯尿嘧啶	
	<400> 14	
	nauaucuuca aaugauuuag gg	22
	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 15	
[0005]	guauuuugcca uaaauaauaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<220>	
	<221> 经修饰的_碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 4'-氧基甲基磷酸酯尿嘧啶	
	<400> 16	
	nuauuuuuua uggcaauuac gg	22
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 17	
	ucagucauuu ucagcaggcc gg	22
	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 18	
	uauaucuuca aaugauuuag gg	22
	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> RNA	
[0006]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 19	
	uuuuuuuuu uggcaauac gg	22
	<210> 20	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 20	
	gauggagaaa ccugucucu ggata	25

	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 21	
	uauccaagag acagguuucu ccaucaa	27
	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 22	
[0007]	ucuuggauau ucucgacaca gcagg	25
	<210> 23	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 23	
	ccugcugugu cgagaauauc caagaga	27
	<210> 24	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“组合DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 24	
	gaguacagug caaugaggga ccagt	25
	<210> 25	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 25	
	acugguccu caugcacug uacuccu	27
	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> DNA	
[0008]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“组合DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 26	
	uugccauaaa uauuacuaaa ucatt	25
	<210> 27	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 27	
	aaugauuuag uauuauuuau ggcaau	27

- <210> 28
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"
- <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸"
- <400> 28
 cauaaagaaa agaugagcaa agatg 25
- <210> 29
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
 <221> 来源
 [0009] <223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"
- <400> 29
 caucuuugcu caucuuuuucu uuauguu 27
- <210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"
- <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸"
- <400> 30
 uacauuacac uaaauuauua gcatt 25
- <210> 31
 <211> 27

	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 31	
	aaugcuaaau auuuagugua auguaca	27
	<210> 32	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 32	
	cuaaaauauu agcauuuguu uuagc	25
[0010]	<210> 33	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 33	
	gcuaaaaca augcuaauaa uuuagug	27
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 34	
	uagcauuugu uuuagcauuu ccuaa	25

	<210> 35	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 35	
	uuagguaaug cuaaaacaaa ugcuaau	27
	<210> 36	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<220>	
	<221> 来源	
[0011]	<223> /注释="组合DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 36	
	uauauuuaca ugcuaacuaaa uuutt	25
	<210> 37	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 37	
	aaaaauuuag uagcauguaa auauagc	27
	<210> 38	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	

	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 38	
	gauggagaaa ccugucucu gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 39	
	aagagacagg uuucuccauc aa	22
	<210> 40	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0012]	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 40	
	ucuuggauau ucucgacaca gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释=“人工序列的描述：合成寡核苷酸”	
	<400> 41	
	ugugucgaga auaaccaaga ga	22
	<210> 42	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 42	
	gaguacagug caaugaggga gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 43	
	ucccucauug cacuguacuc cu	22
	<210> 44	
	<211> 36	
	<212> RNA	
[0013]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 44	
	uugccauaaa uauacuaaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"	
	<400> 45	
	uuuaguauua uuuauaggcaa au	22
	<210> 46	
	<211> 36	
	<212> RNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 46	
	cauaaaagaaa agaugagcaa gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 47	
	uugcucaucu uuucuuuauug uu	22
[0014]	<210> 48	
	<211> 36	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 48	
	uacauuacac uaaaauuaua gcagccgaaa ggcugc	36
	<210> 49	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 49	
	uaauaaauua guguaaugua ca	22
	<210> 50	

<211> 36	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
<400> 50	
cuaaaauuuu agcauuuguu gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 51	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
<400> 51	
aacaaaugcu aaauuuuug ug	22
[0015]	
<210> 52	
<211> 36	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
<400> 52	
uagcauuugu uuuagcauuu gcagccgaaa ggcugc	36
<210> 53	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
<400> 53	
uaaugcuaaa acaaaugcua au	22

<210> 54
 <211> 36
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 54
 uauuuuuaca ugcuaacuaaa gcagccgaaa ggcugc 36

[0016]

<210> 55
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 55
 uuuaguagca uguaaaaua gc 22

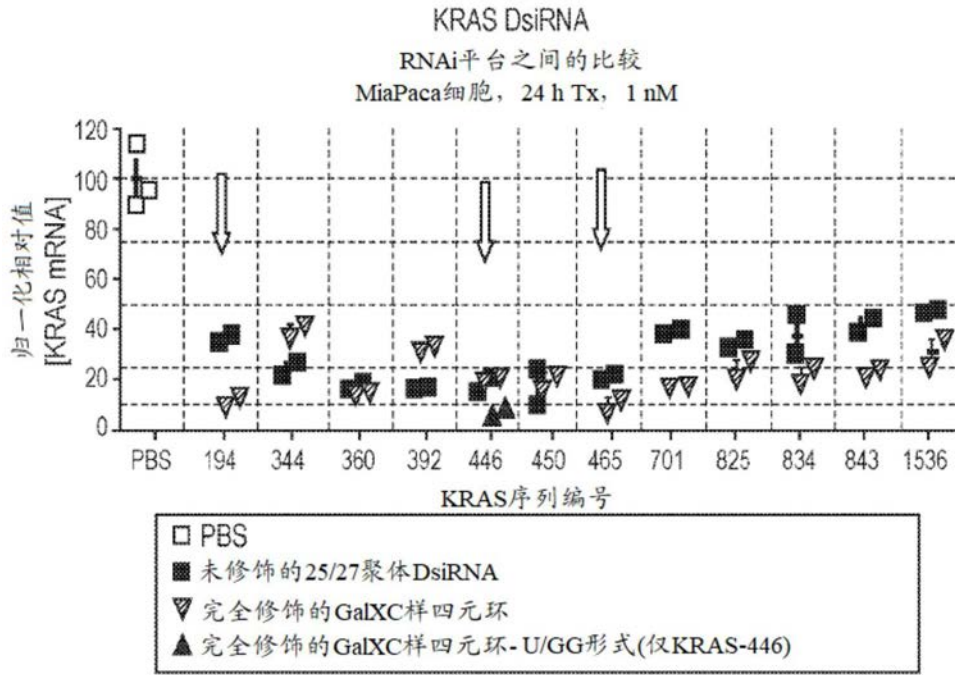


图2A

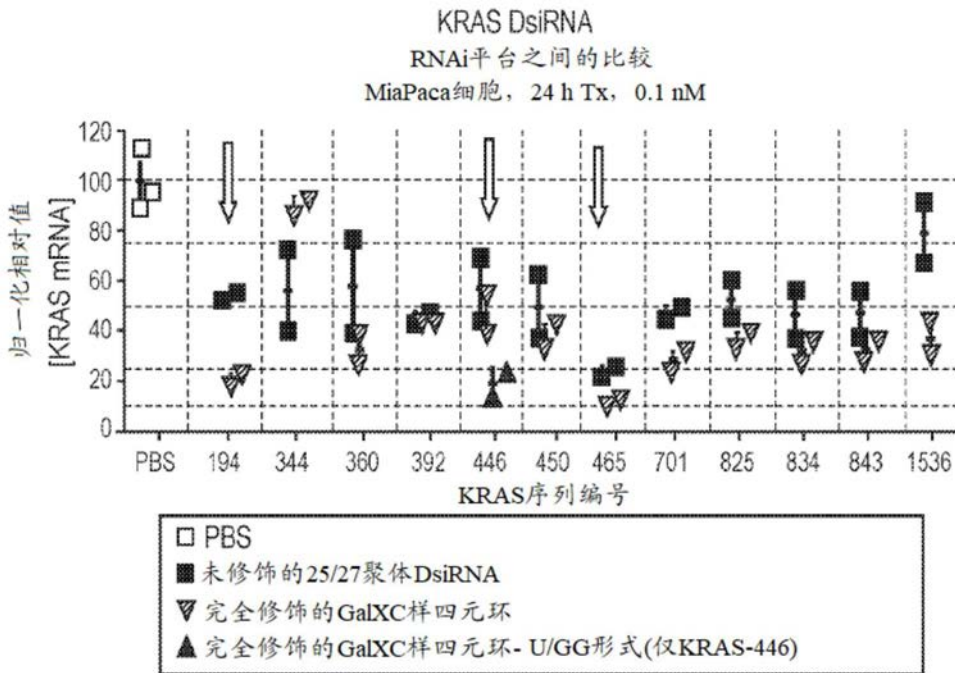


图2B

U/GG形式

DP13339P:DP13338G (KRAS-194T)

5' GGCCUGCUGAAAAUGACUGAGCAGCC^G A
 3' GGCCGGACGACUUUUACUGACUCGUCGG_A A
 ↑

DP13341P:DP13340G (KRAS-465T)

5' CUAAAUCAUUUGAAGAUAUAGCAGCC^G A
 3' GGGAUUUAGUAAACUUCUAUAUCGUCGG_A A
 ↑

DP13341P:DP13344G (KRAS-465T/MOP)

5' CUAAAUCAUUUGAAGAUAUAGCAGCC^G A
 3' GGGAUUUAGUAAACUUCUAUAUCGUCGG_A A
 ↑

DP13343P:DP13342G (KRAS-446T)

5' GUAUUUGCCAUAUUUAUAUAAGCAGCC^G A
 3' GGCAUAAACGGUAUUUAUAUAUCGUCGG_A A
 ↑

图3A

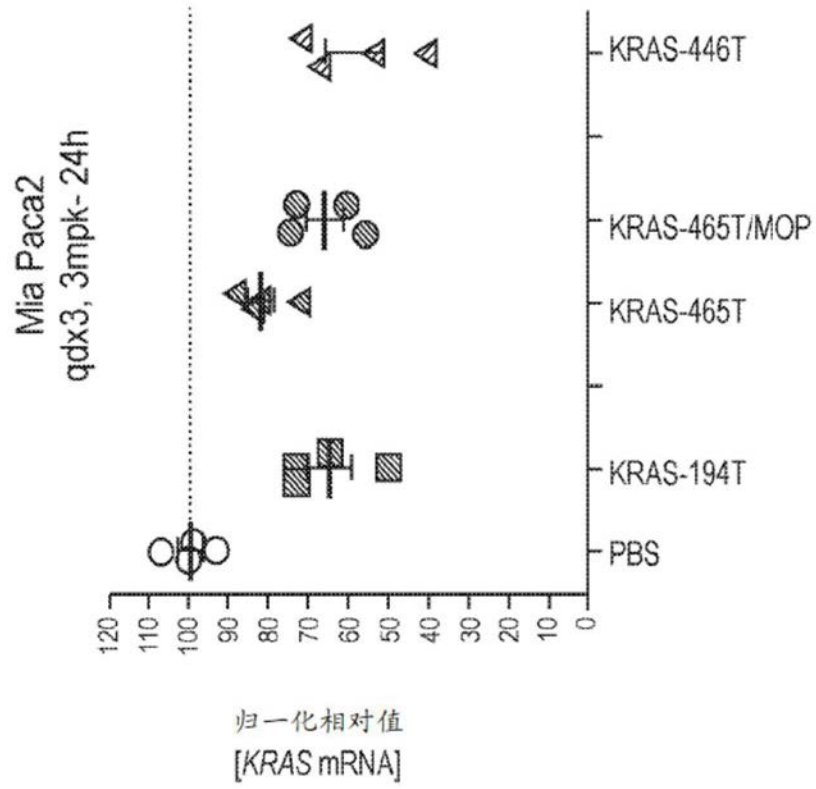


图3B

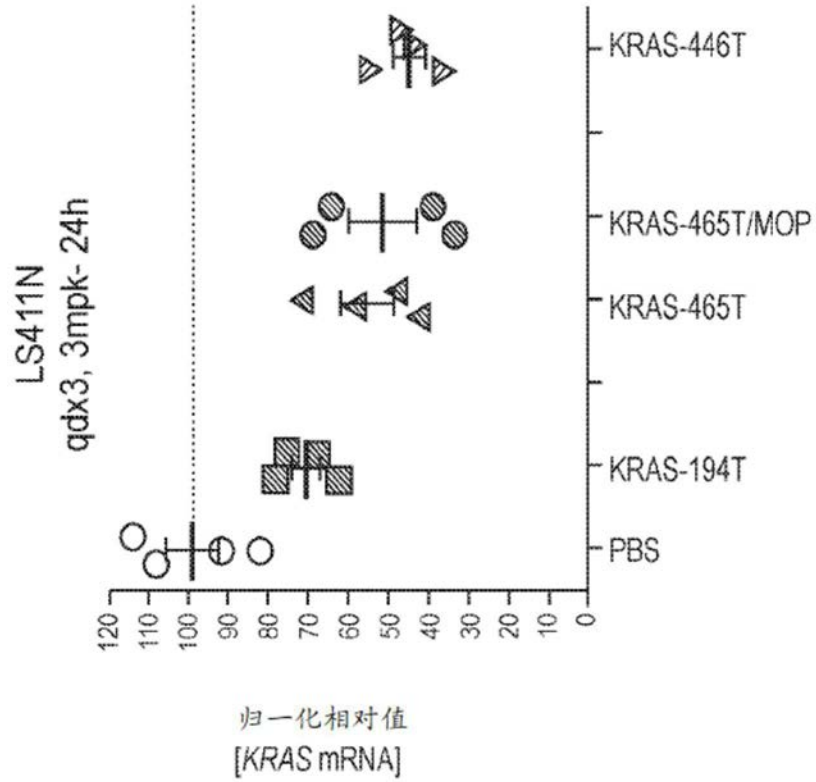
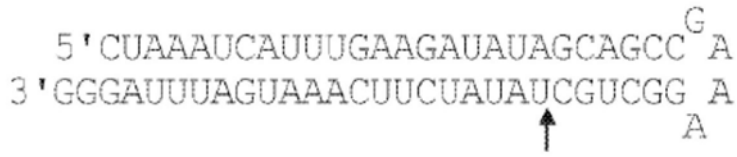


图3C

DP13341P:DP13344G (KRAS-465T/ MOP)



DP13343P:DP13839G (KRAS-446T/ MOP)

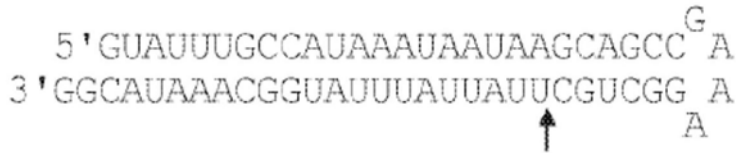


图4A

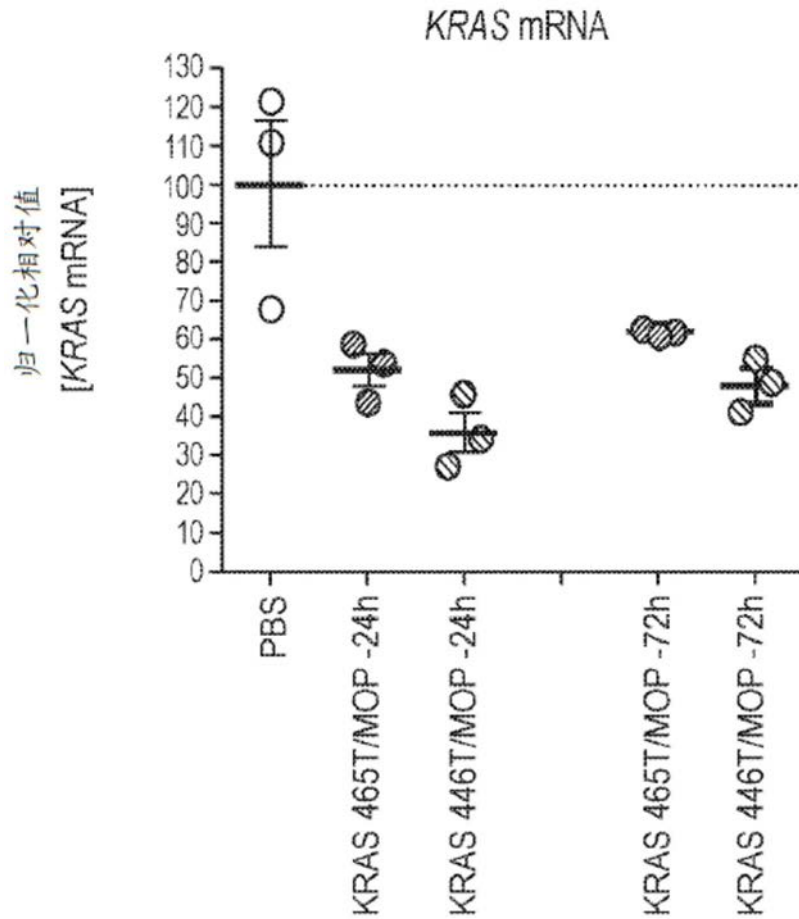


图4B

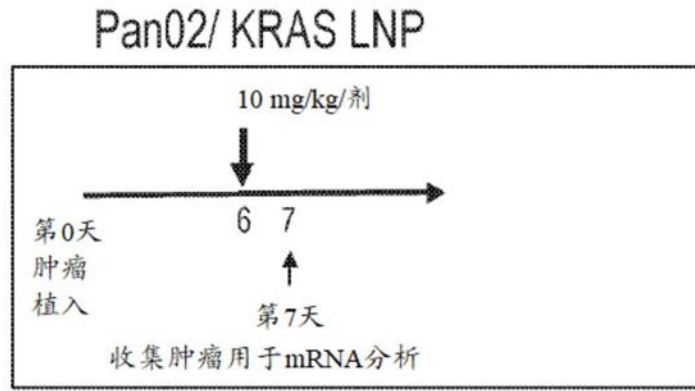


图5A

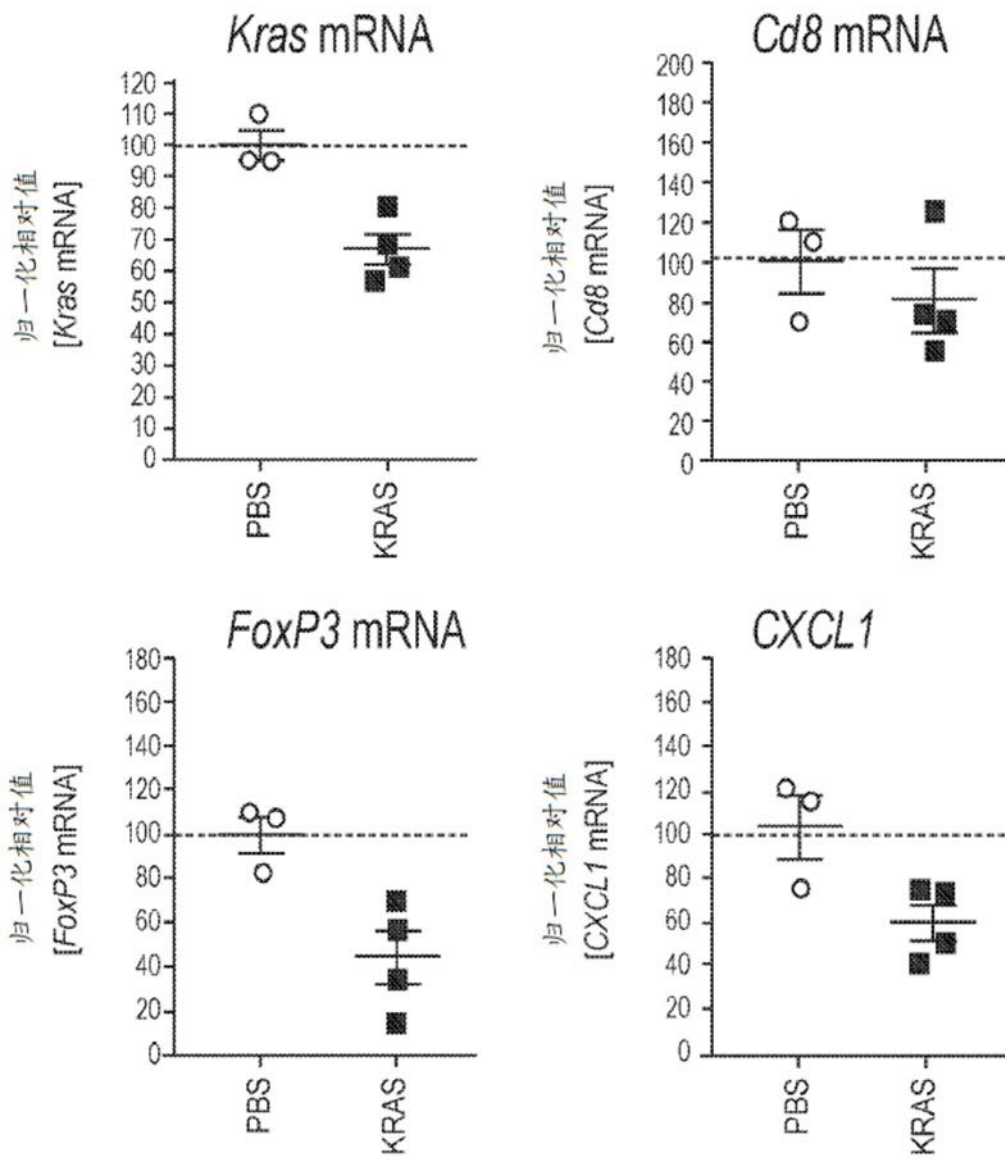


图5B

在Pan02肿瘤中进行的KRAS1单药疗法

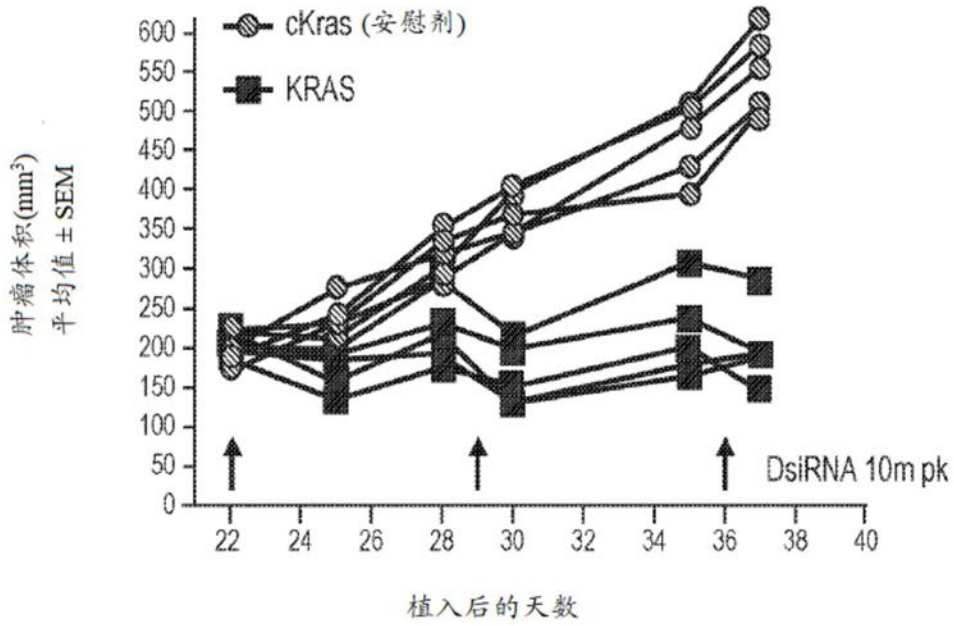


图6

在Panc1肿瘤中进行的KRAS1单药疗法

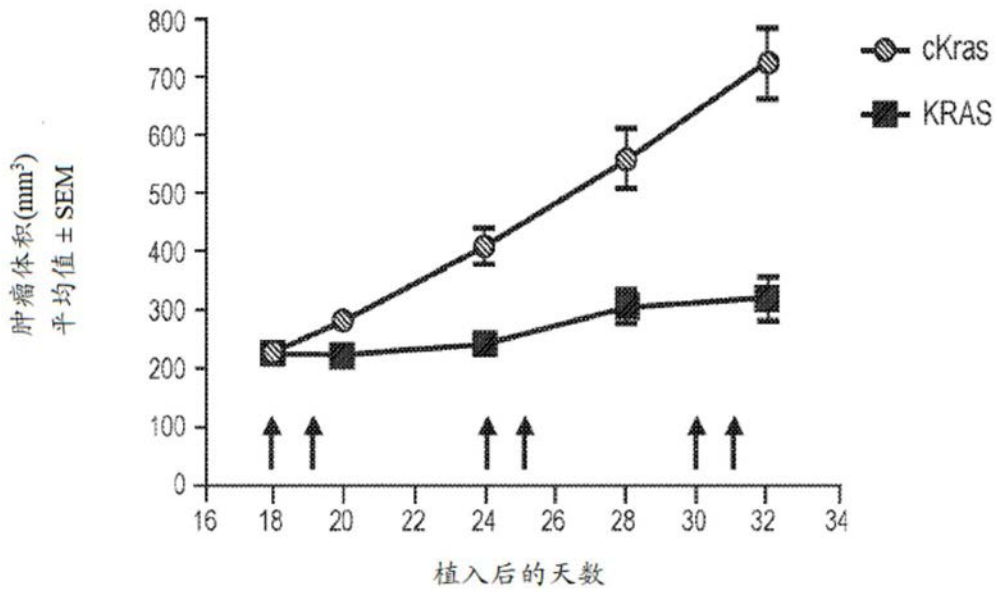


图7

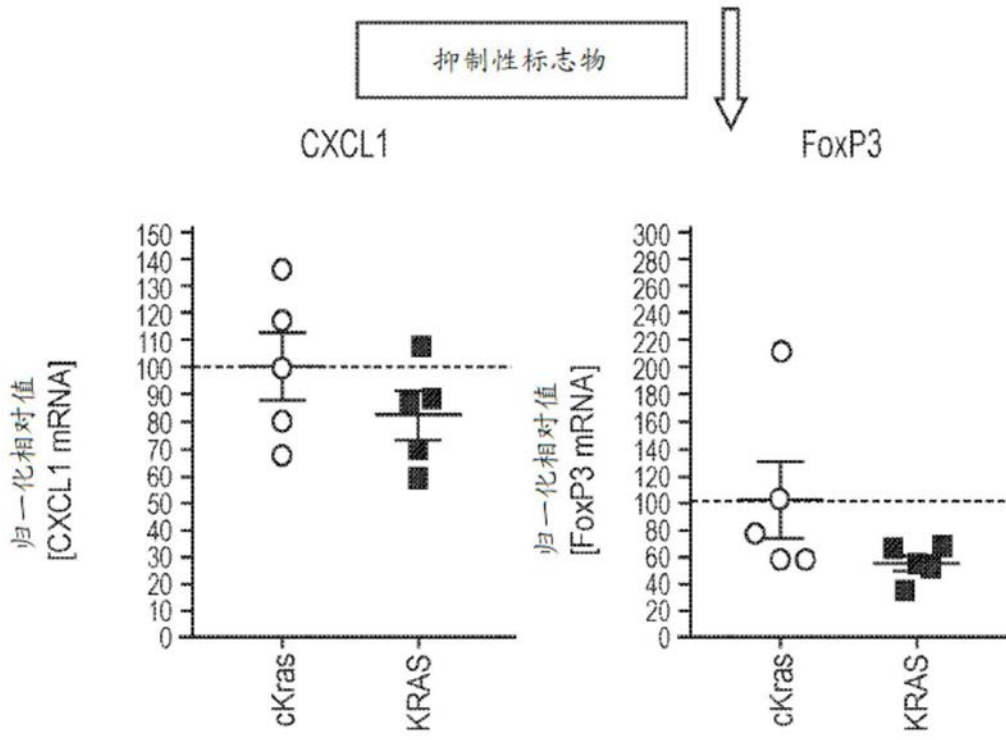


图 8A

图 8B

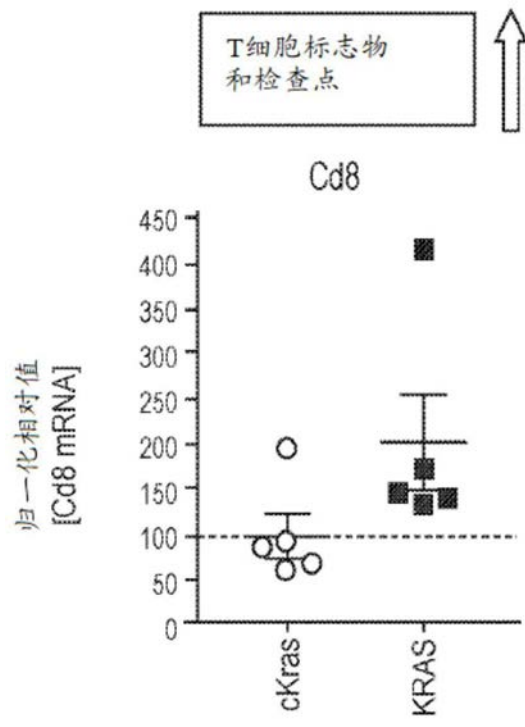


图8C

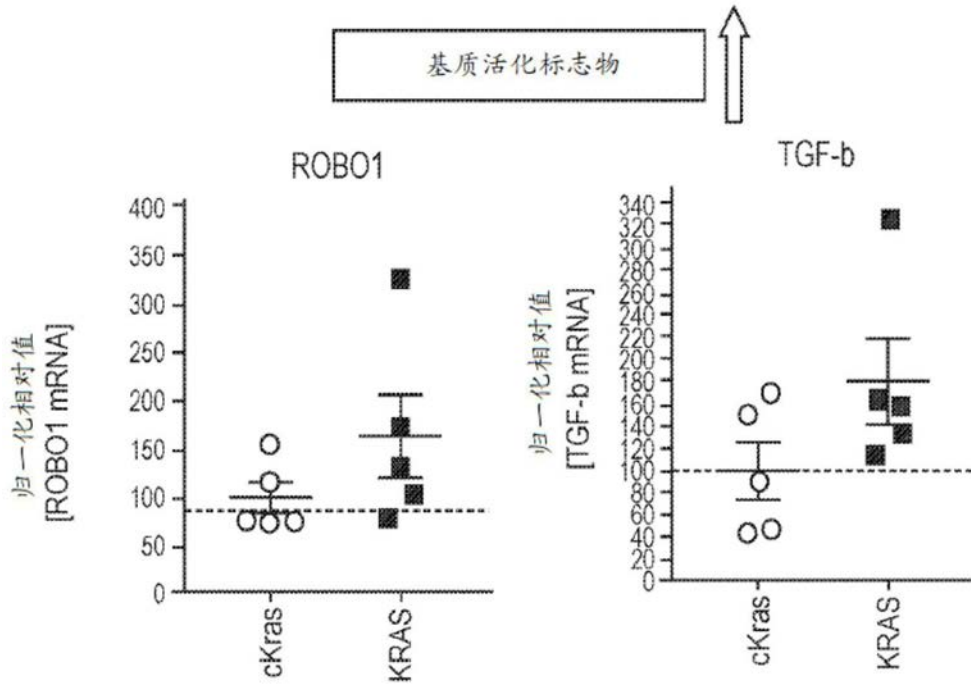


图 8D

图 8E

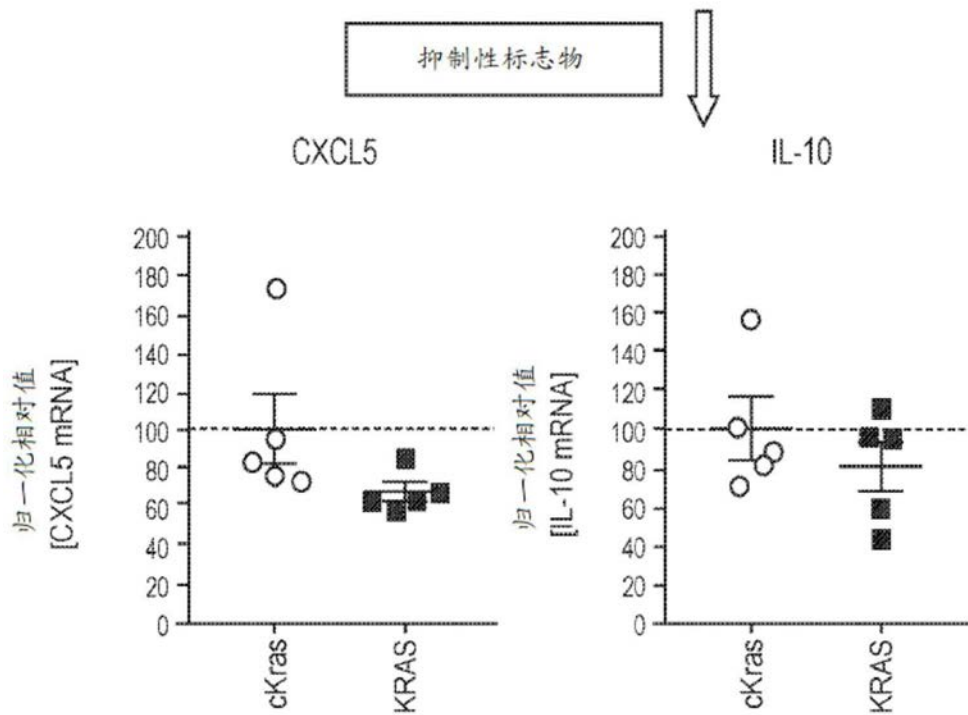


图 8F

图 8G

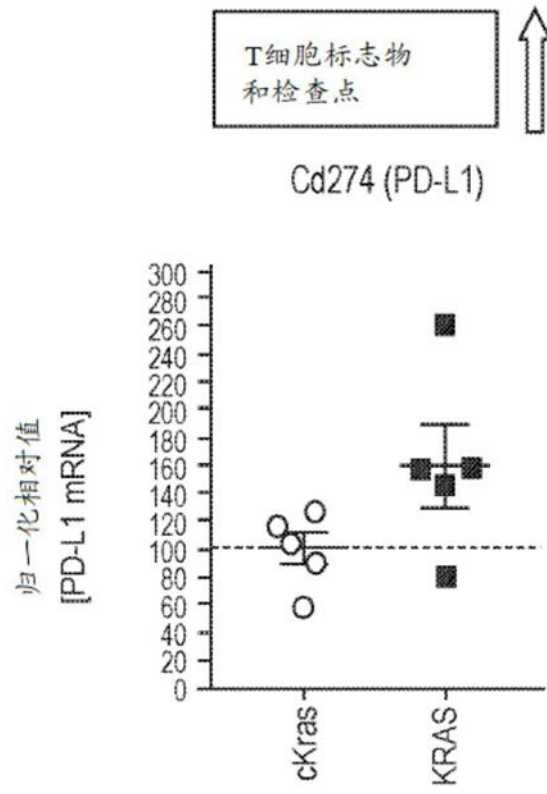


图8H

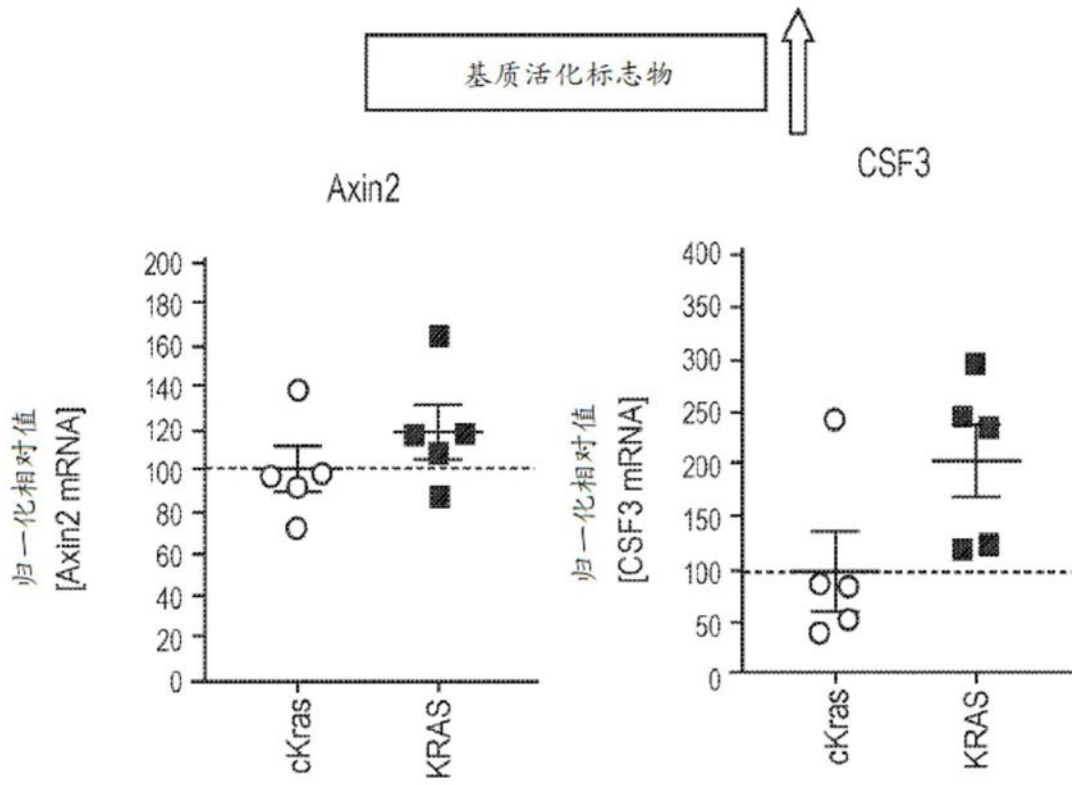


图 8I

图 8J

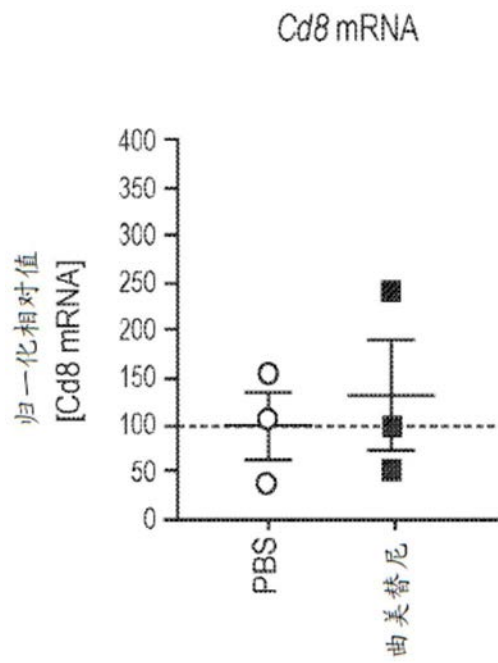


图9A

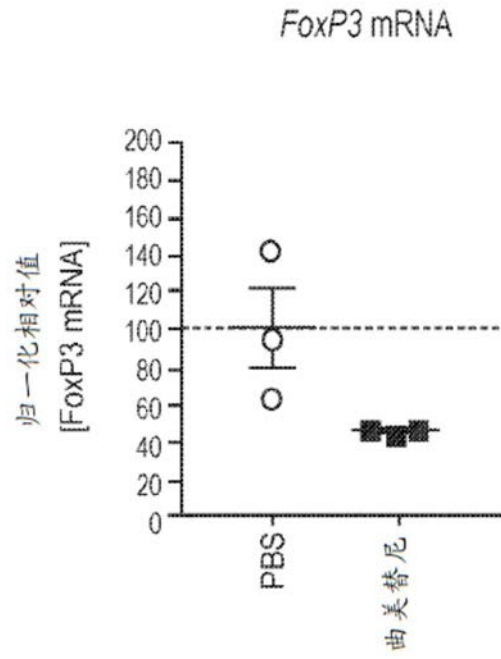


图9B

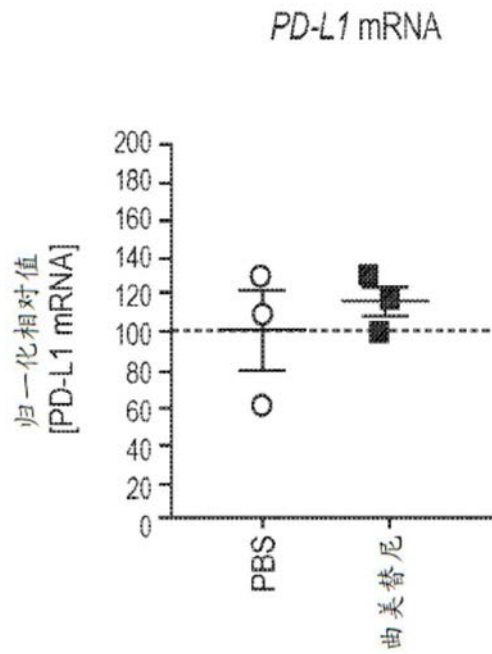


图9C

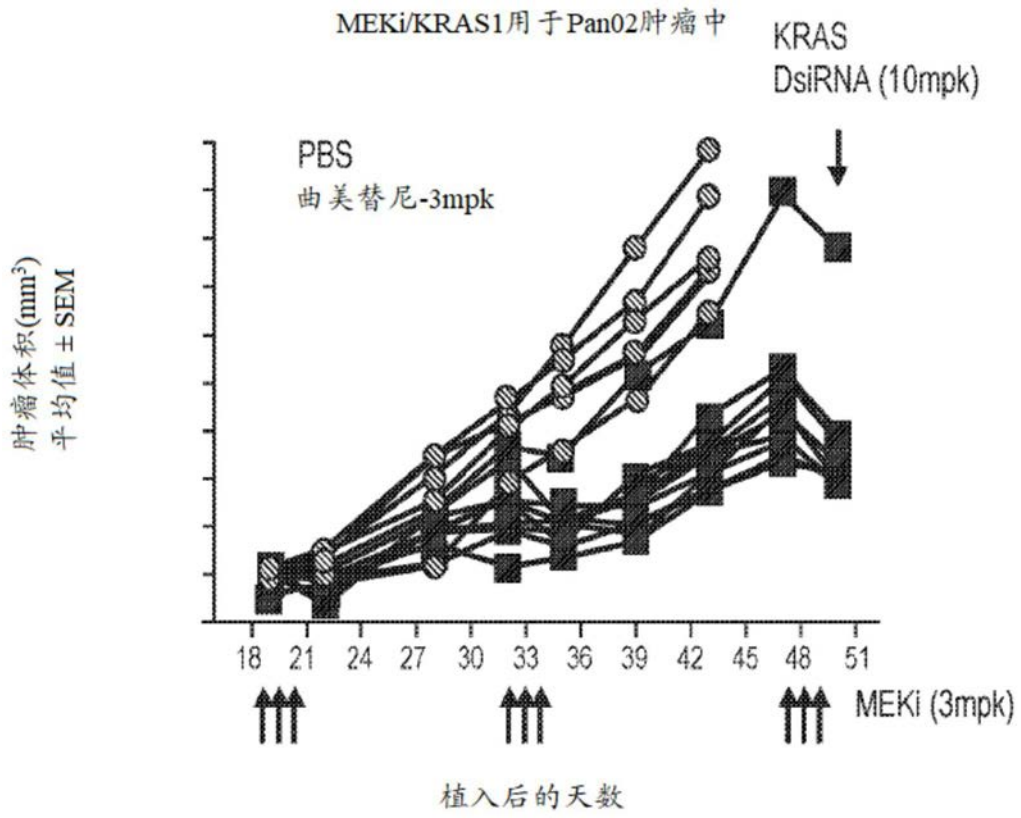


图10A

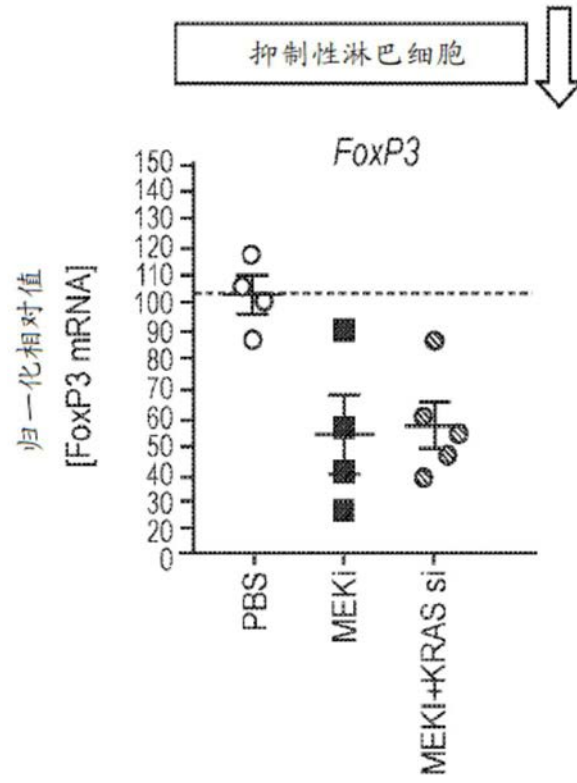


图10B

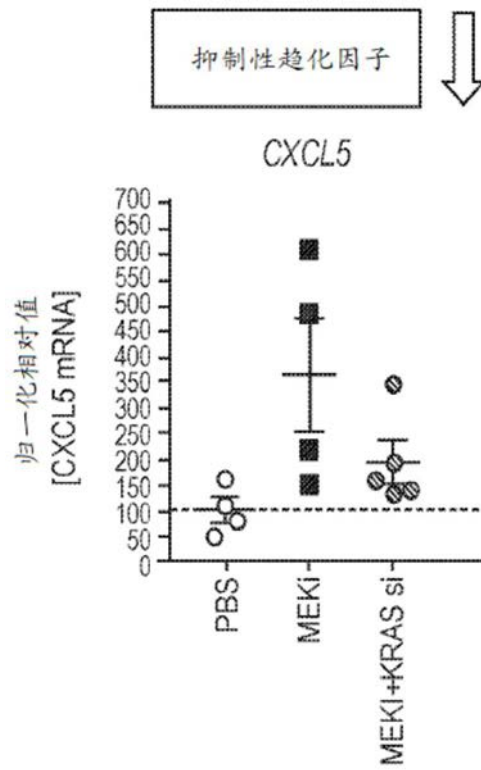


图10C

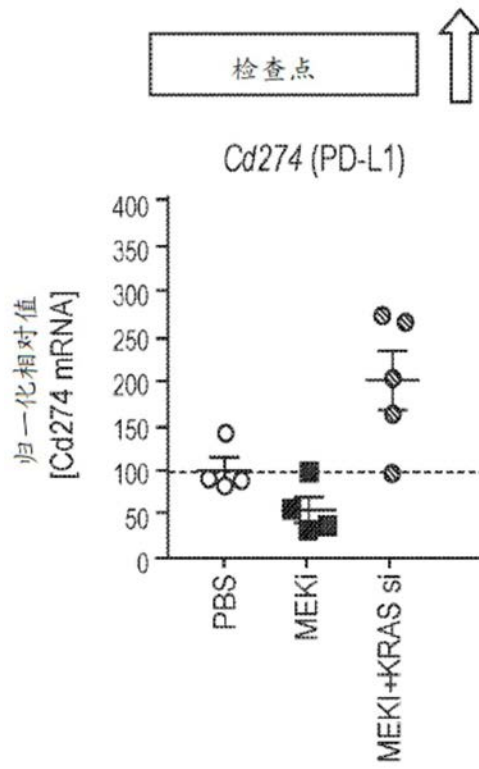


图10D

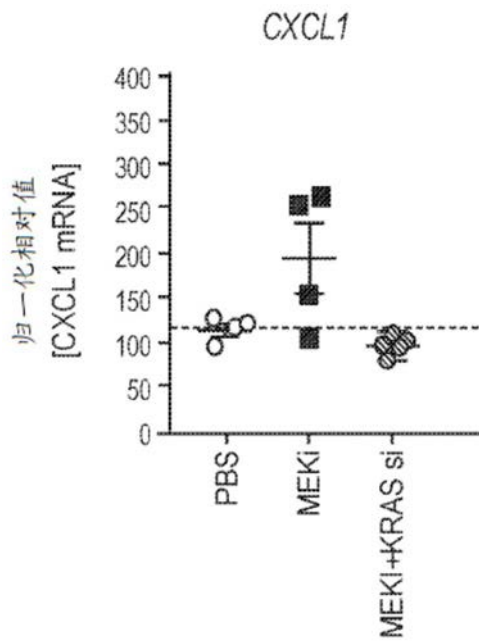


图10E

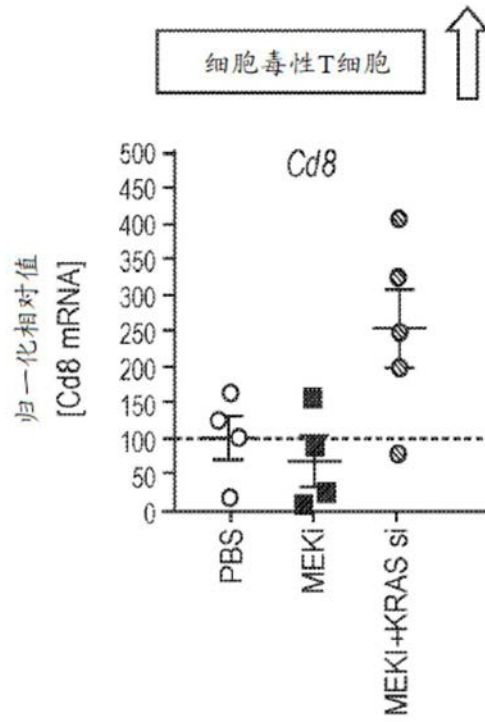


图10F

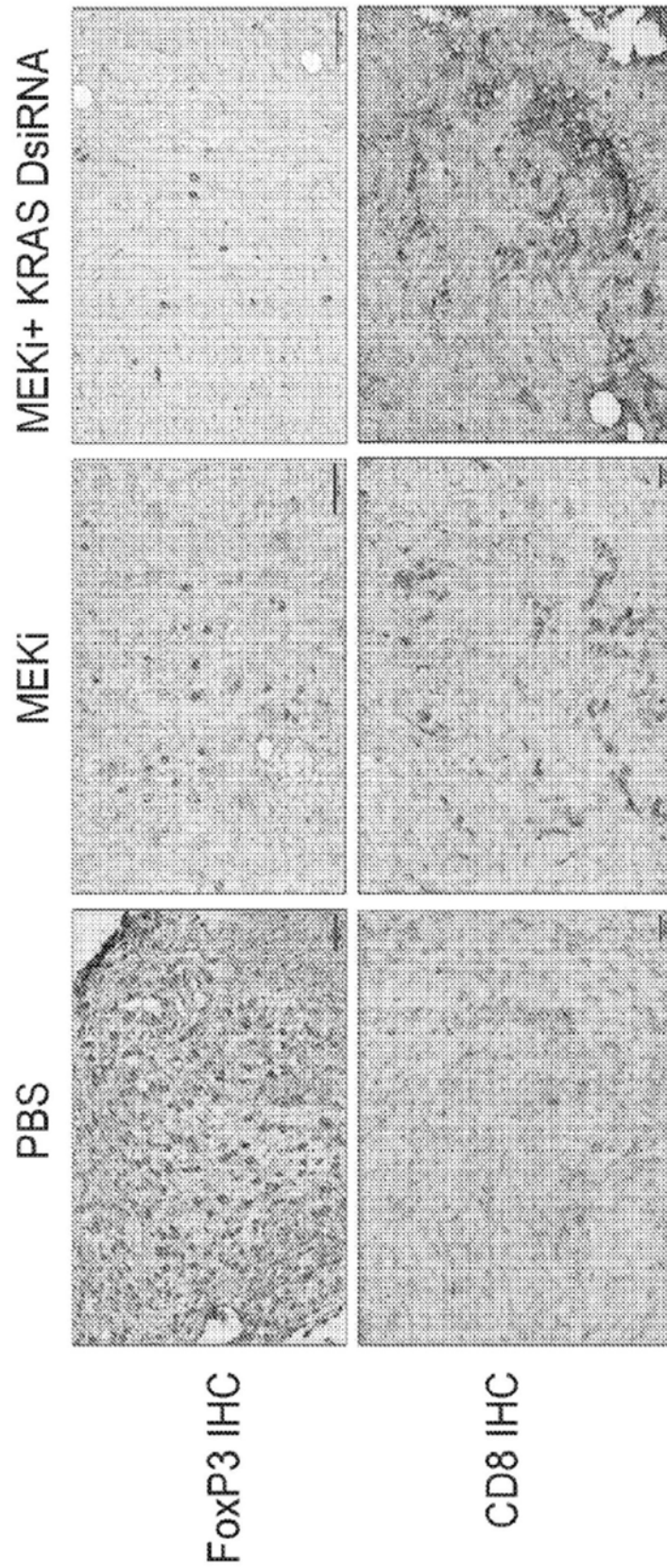


图11

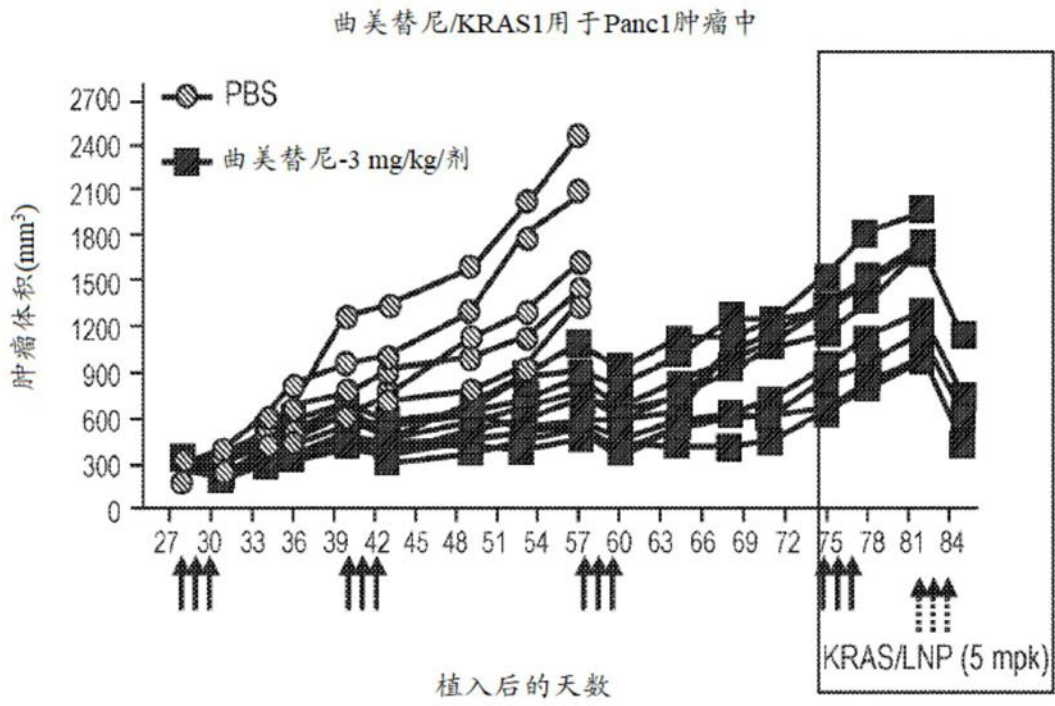


图12A

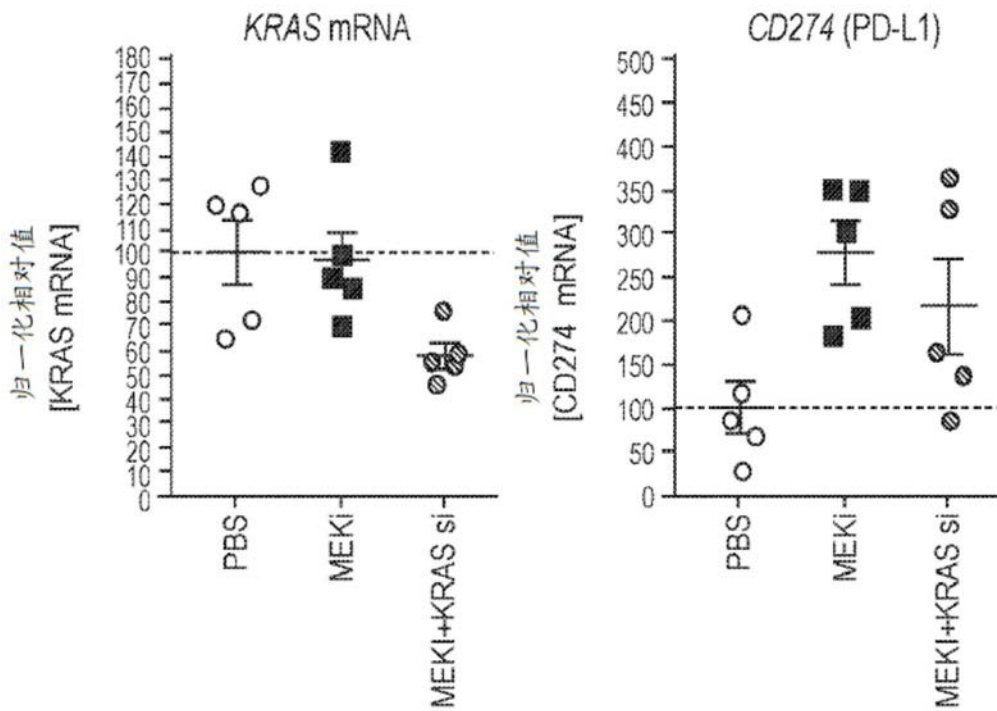


图12B

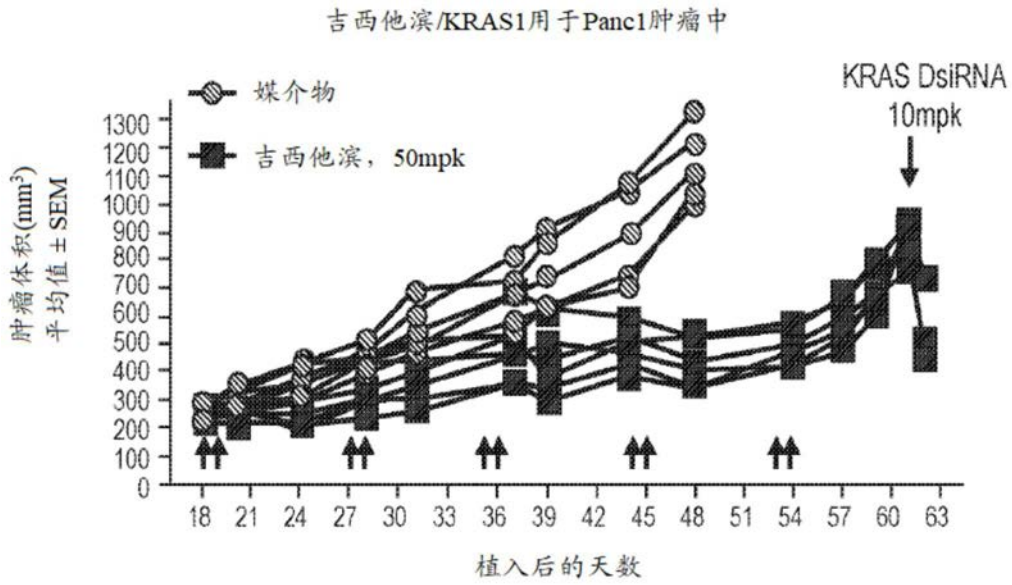


图13

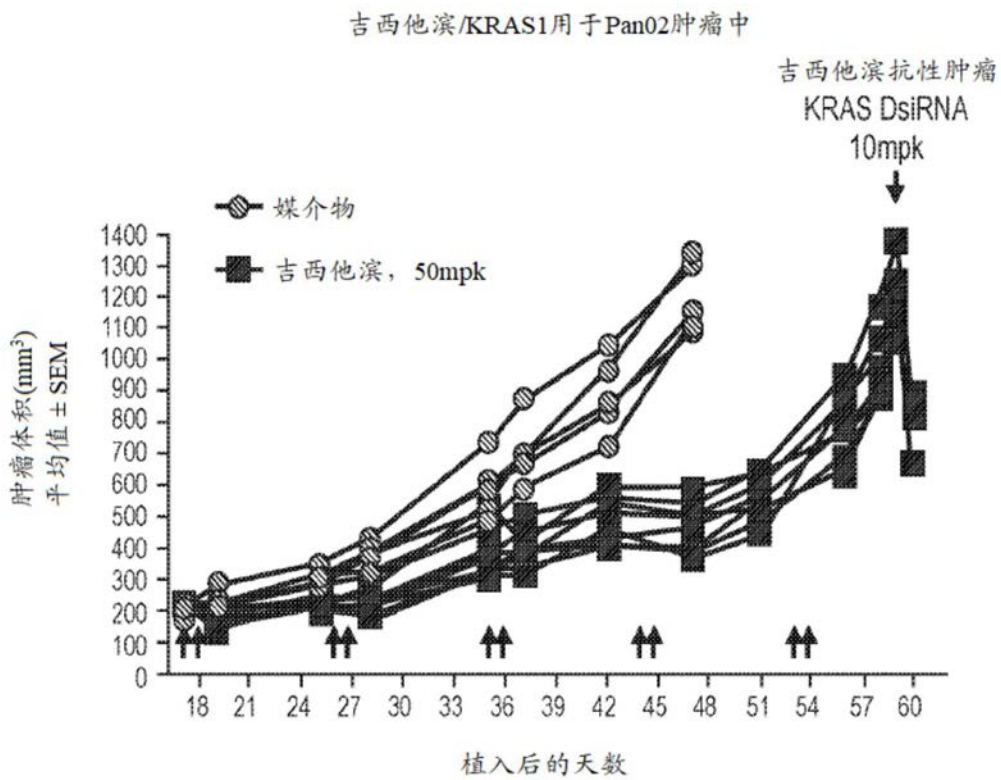


图14

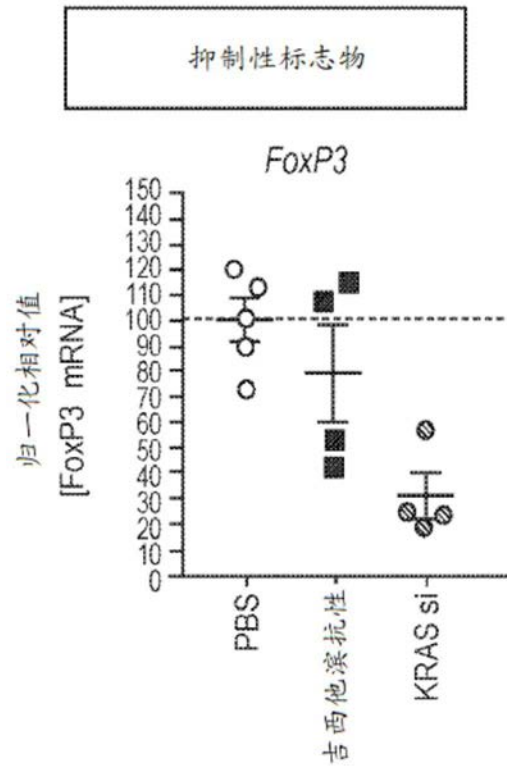


图15A

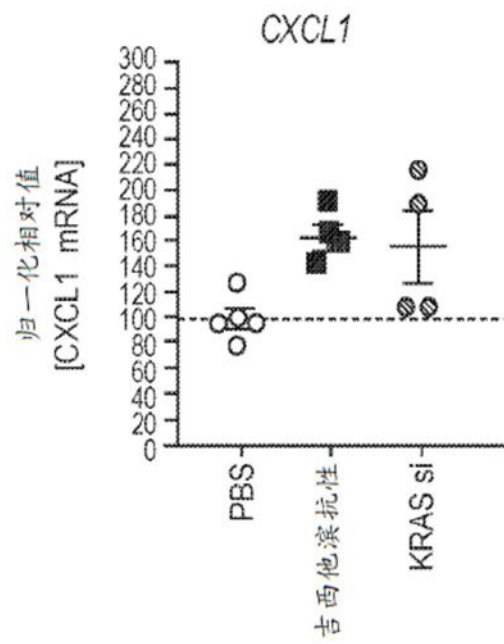


图15B

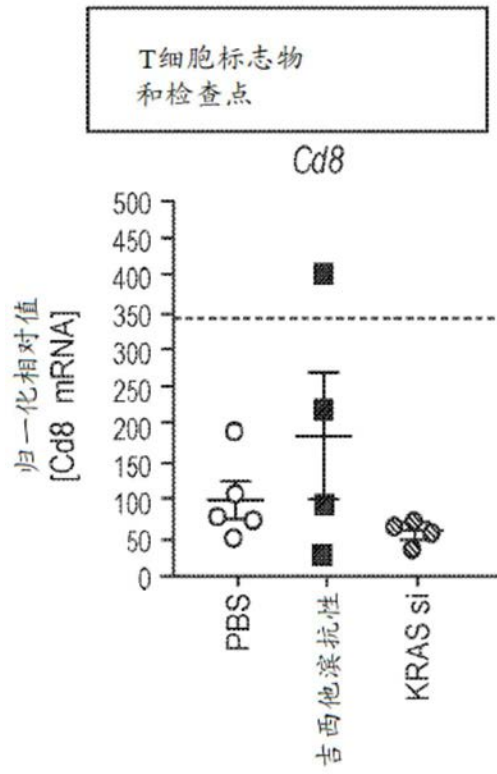


图15C

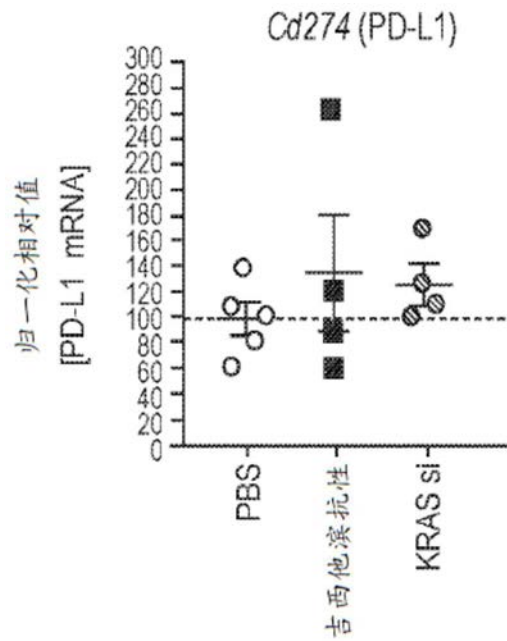


图15D

基质活化标志物

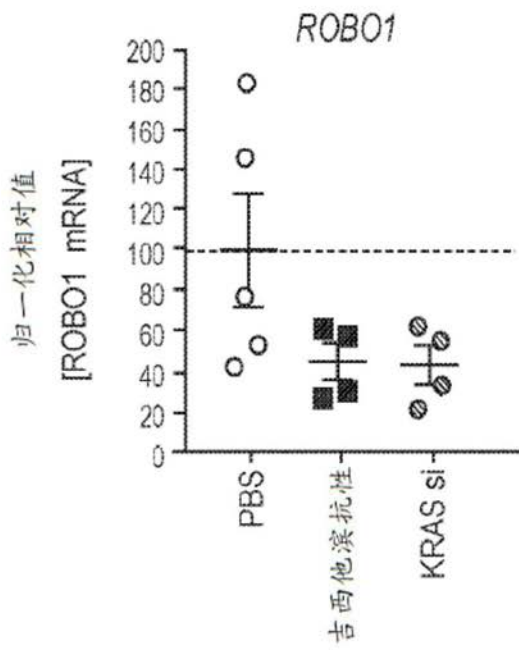


图 15E

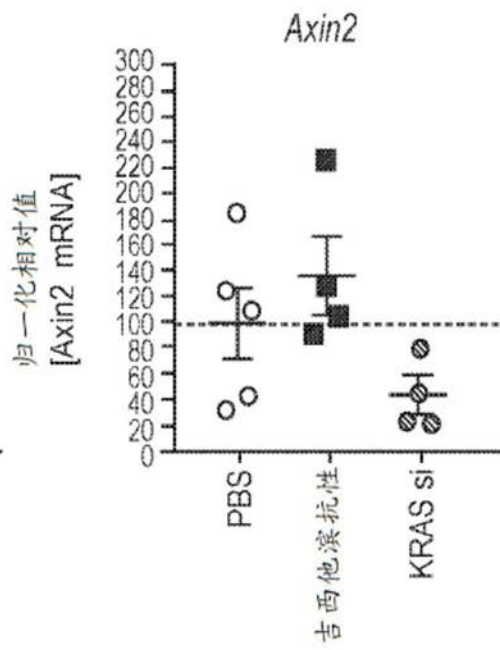


图 15G

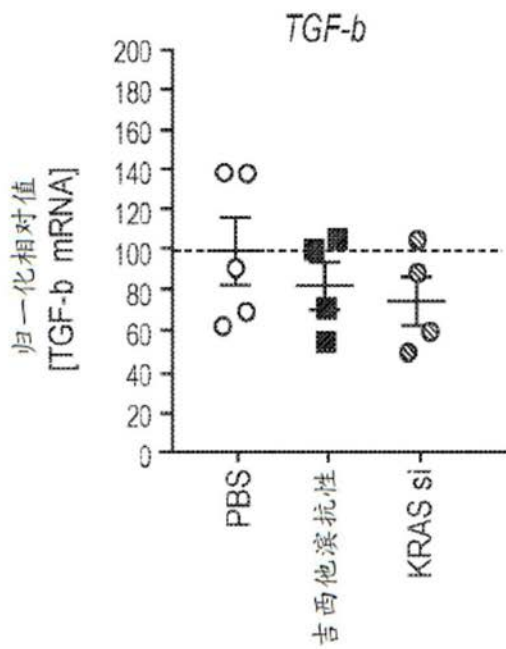


图 15F

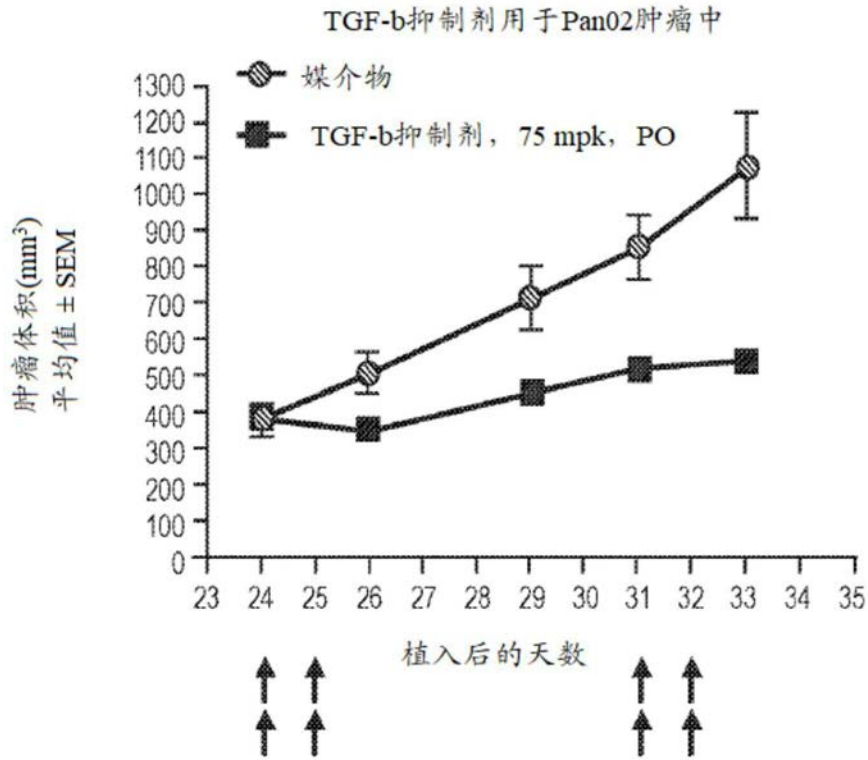


图16A

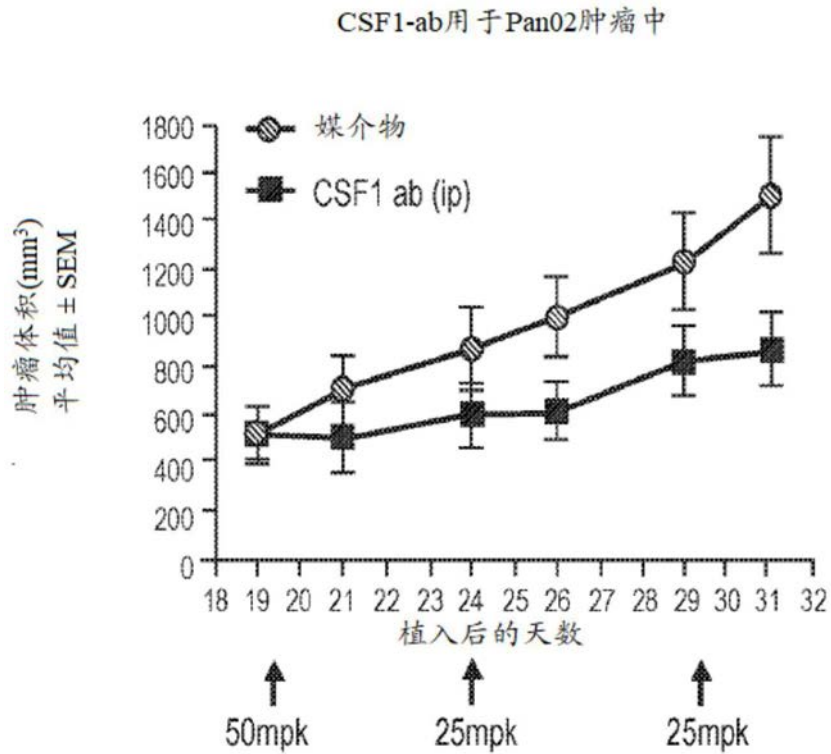


图16B