(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115052891 A
(43)申请公布日 2022.09.13

(21)申请号 202080092819.9
(22)申请日 2020.12.04
(30)优先权数据
19214049.9 2019.12.06 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/084665 2020.12.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/110930 EN 2021.06.10
(71)申请人 安特卫普大学
地址 比利时安特卫普
申请人 安特卫普大学医院
(72)发明人 E·斯密特斯 J·范奥德奈尔德
M·彼特尔斯
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 刘晓东
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)

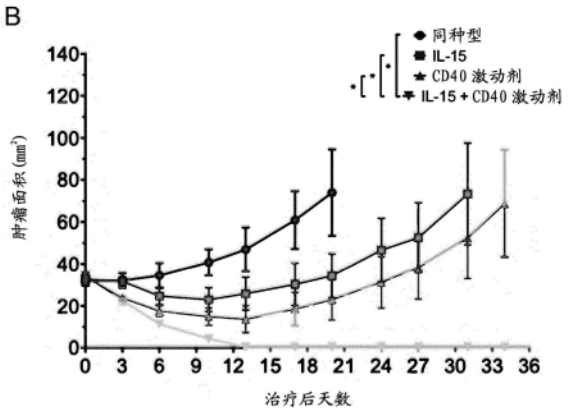
权利要求书1页 说明书10页 附图14页

(54)发明名称

癌症治疗中IL-15和CD40激动剂的组合免疫疗法

(57)摘要

本发明涉及组合免疫疗法领域，更具体地，涉及包含IL-15和CD40激动剂的组合用于治疗癌症，诸如但不限于胰腺癌(例如胰腺导管腺癌和胰腺神经内分泌肿瘤)。



CN 115052891 A

1.一种用于治疗哺乳动物中胰腺癌的包含IL-15和CD40激动剂的组合;其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

2.根据权利要求1所述的组合,其中所述IL-15和CD40激动剂的所述亚治疗剂量是低于单独施用时在所述哺乳动物中获得治疗效果所需的所述IL-15和CD40激动剂的剂量的剂量。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的组合,其中所述CD40激动剂以约20至约800μg/kg体重、优选约30至约600μg/kg体重、最优选约40至约300μg/kg体重的剂量使用。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合,其中所述IL-15以约0.1至约50μg/kg体重、优选约0.1至20μg/kg体重、最优选约0.1至约2μg/kg体重的剂量使用。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的组合,其中所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量经由IV团注静脉内施用;或者以约2μg/kg体重或低于2μg/kg体重的剂量经由连续IV滴注系统施用。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的组合,其中所述IL-15以小于2μg/kg体重的剂量皮下或皮内施用。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的组合;其中施用至少下列之一:

-所述CD40激动剂以小于300μg/kg体重的剂量使用;

-所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量通过团注静脉内注射施用;

-所述IL-15以约2μg/kg体重或低于2μg/kg体重的剂量通过连续滴注系统静脉内施用;或者

-所述IL-15以小于2μg/kg体重的剂量皮下或皮内施用。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的组合,其中所述组合呈药物组合物的形式。

9.根据权利要求1到8中任一项所述的组合,其中所述CD40激动剂是诸如选自下述的CD40抗体或其抗原结合片段:塞鲁单抗、APX005M、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CDX-1140。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的组合,其中所述CD40激动剂选自:CD40L、CD40L的三聚体、HERA-CD40L。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的组合,其中所述IL-15和所述CD40激动剂同时施用。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合,其中所述IL-15和所述CD40激动剂经静脉内、皮内或皮下施用。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的组合,其中所述胰腺癌选自:胰腺导管腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤。

14.一种用于治疗有需要的受试者的胰腺癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含IL-15和CD40激动剂的组合;其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

癌症治疗中IL-15和CD40激动剂的组合免疫疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及组合免疫疗法领域，更具体地，涉及包含IL-15和CD40激动剂的组合用于治疗癌症，诸如、但不限于胰腺癌(例如胰腺导管腺癌和胰腺神经内分泌肿瘤)。

技术背景

[0002] 胰腺导管腺癌(PDAC)是世界上第三大致命癌症，5年生存率仅为8％。甚至预计到2030年，其将成为癌症相关死亡的第二大原因。迄今为止，由于复杂的肿瘤微环境(包括强烈的促结缔组织增生反应、低免疫原性和最终有利于肿瘤的分子特征)，其仍然是最具侵袭性和攻击性的胃肠道恶性肿瘤之一，这是由多个肿瘤抑制基因的缺失驱动的。

[0003] 迄今为止，存活率没有提高，使得PDAC这种疾病代表了对新型治疗方法最终改善患者结果的迫切未满足的需求。约85％的患者在诊断时由于局部晚期或转移性疾病而无资格进行根治性手术切除。因此，根据他们的身体状况，用FOLFIRINOX或吉西他滨/nab-紫杉醇对他们进行治疗，因为前者具有严重的毒性问题，而后者仅具有有限的影响。在其他癌症类型中成功的新的有希望的方法(包括抗PD-1和抗CTLA-4)，不幸未能达到优于吉西他滨的改善。

[0004] 激动性CD40抗体在患有自发性胰腺KPC肿瘤的小鼠中显示出有希望的结果。这导致了其中几名患者用吉西他滨和CD40激动剂治疗并且在大多数患者中获得了适度结果的临床试验。然而，仍然有很大的余地来增加CD40激动剂的潜力，这可能通过与其他化合物的组合来实现。

[0005] 我们已经表明，IL-15不仅具有杀死PDAC肿瘤细胞的潜力，而且还有杀死基质胰腺星状细胞(PSC)的潜力，所述基质胰腺星状细胞是对治疗反应差的原因。IL-15是多功能细胞因子，其刺激T细胞增殖和细胞毒性淋巴细胞的产生，以及天然杀伤(NK)细胞的活化和扩增。此外，其具有诱导CD8记忆细胞的能力，从而在维持对恶性细胞的长期免疫反应和可能的复发预防中起着至关重要的作用。所有这些特征使其成为非常有吸引力的癌症免疫治疗药物，这通过其在NCI最有可能广泛用于癌症治疗的前20种免疫治疗药物中的高排名得到证实。

[0006] 虽然这两种分子以前已被证明在胰腺肿瘤的治疗中具有潜力，但我们现在惊奇地发现，在增强的抗肿瘤作用方面，它们的组合显示出累加作用，导致存活率显著增加，甚至完全治愈大多数肿瘤。此外，通过加入IL-15可以显著降低CD40激动剂的剂量，从而也降低了副作用的风险。因此，我们发现，通过组合两者，至少一种组分可以以亚治疗剂量使用，但仍获得相似的疗效。

发明内容

[0007] 本申请涉及包含IL-15和CD40激动剂的组合用于治疗胰腺癌。具体而言，本发明提供了用于治疗胰腺癌的IL-15和CD40激动剂的组合，其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

[0008] 在一个具体实施方案中,所述CD40激动剂以约20至约800μg/kg体重,优选约30至约600μg/kg体重,最优选约40至约300μg/kg体重的剂量施用/使用。

[0009] 在另一个具体实施方案中,所述IL-15以0.1至约50μg/kg体重,优选约0.1至20μg/kg体重,最优选约0.1至2μg/kg体重的剂量施用。

[0010] 在其他实施方案中,所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量静脉内施用。特别是当IL-15通过IV团注注射(bolus IV injection)施用时,剂量可以小于0.3μg/kg体重。或者,当IL15通过连续IV滴注系统施用时,剂量可以约为或低于2μg/kg体重。或者,所述IL-15以小于2μg/kg体重的剂量皮内或皮下施用。

[0011] 在又一个实施方案中,本发明提供了如本文所定义的组合,其中符合以下至少一项:

[0012] -所述CD40激动剂以小于300μg/kg体重的剂量使用;

[0013] -所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量静脉内施用;

[0014] -所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量通过团注静脉内注射施用;

[0015] -所述IL-15以约为2μg/kg体重或低于2μg/kg体重的剂量通过连续滴注系统静脉内施用;或者

[0016] -所述IL-15以小于2μg/kg体重的剂量皮下或皮内施用。

[0017] 在另一个具体实施方案中,所述组合呈药物组合物的形式。

[0018] 在另一个具体实施方案中,所述CD40激动剂是例如选自塞鲁单抗(Selicrelumab)、APX005M、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CDX-1140的CD40抗体或其抗原结合片段。

[0019] 在另一个具体实施方案中,所述CD40激动剂选自CD40L、CD40L三聚体、HERA-CD40L。

[0020] 在另一个具体实施方案中,所述IL-15和所述CD40激动剂同时施用。

[0021] 在又一个实施方案中,静脉内或皮下施用所述IL-15和所述CD40激动剂。

[0022] 在又一另外的实施方案中,所述胰腺癌选自:胰腺导管腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤。

[0023] 具体而言,本发明人发现包含IL-15和CD40激动剂的所述组合表现出增强的抗肿瘤效果,导致存活显著增加,甚至完全治愈大多数肿瘤。此外,本发明人惊奇地发现,通过加入IL-15,CD40激动剂的剂量显著减少是可能的。

附图说明

[0024] 现在具体参考附图,要强调的是,所示的细节是示例性的,并且仅仅是为了说明性地讨论本发明的不同实施方案。它们是为了提供被认为是对本发明的原理和概念方面最有用和最容易的描述而提出的。在这方面,除了对本发明的基本理解所必需的之外,没有试图更详细地示出本发明的结构细节。结合附图的描述使本领域技术人员清楚如何在实践中实施本发明的几种形式。

[0025] 图1:肿瘤动力学和存活。

[0026] C57Bl/6j小鼠皮下注射0.5x10^6个Panc02细胞(参见图1B、图1D、图1F)或KPC细胞(参见图1C、图1E、图1G)。当肿瘤达到25-35mm^2大小时,将小鼠随机化,并根据治疗方案用同

种型对照、IL-15、CD40激动剂或IL-15+CD40激动剂治疗(图1A)。IL-15(2.5μg)的给药时间安排用黑色箭头表示,CD40激动剂或相应的同种型用红色箭头表示(Panc02为12.5μg,KPC为200μg或100μg)。在图1B和1C中描绘了肿瘤动力学(n=6只小鼠/组,3个(Panc02)或2个(KPC)独立实验的代表性数据)。带Bonferroni事后分析的双因素方差分析(Two-way ANOVA)。在图1D、图1E中,示出了如所示处理的Panc02和KPC小鼠的存活。3个(Panc02)或2个(KPC)独立实验的合并数据。通过肿瘤大小达到150mm^2来确定存活率。Mantel-Cox检验。在图1F、图1G中,示出了显示了34天(Panc02)或35天(KPC)后相对于基线的倍数变化%的瀑布图。所有数据代表平均值±SEM。ns p≥0.05;*p<0.05;**p≤0.01;***p≤0.001;****p≤0.0001。

[0027] 图2:免疫细胞耗竭

[0028] 用同种型对照或单独的IL-15+CD40激动剂组合方案或用针对CD4、CD8、去唾液酸-GM1(NK细胞耗竭)的消耗性抗体治疗荷有Panc02肿瘤(参见图2A、图2B、图2C、图2D)或KPC肿瘤(参见图2E、图2F、图2G、图2H)的C57Bl/6j小鼠。图2A、图2E示出了未治疗的(同种型)、仅用组合方案治疗的(无耗竭)或组合和消耗性抗体治疗的Panc02或KPC肿瘤的肿瘤动力学。带Bonferroni事后分析的双因素方差分析。数据点代表平均值±SEM。n=5-7只小鼠/组。图2B至图2D,以及图2F至图2H示出了荷有Panc02(图2B-图2D)或KPC(图2F-图2H)的小鼠的存活,所述小鼠或者未经治疗(同种型),或者用组合方案(无耗竭)治疗,或者用针对CD4(图2B,图2F)、CD8(图2C,图2G)、去唾液酸基-GM1(图2D,图2H)的组合和消耗性抗体治疗。从n=10-11(Panc02)或n=11-13(KPC)的两个独立实验中合并的数据。

[0029] 图3:肿瘤浸润淋巴细胞的表征

[0030] 用同种型对照、IL-15、CD40激动剂或后者的组合治疗荷有KPC肿瘤的C57Bl/6小鼠。在治疗开始后8天收获肿瘤。酶促消化后获得单细胞悬液用于流式细胞术分析。图3A-图3I示出了以细胞绝对数量的倍数变化指示的免疫细胞群体。来自3个独立实验的合并数据,n=13-16/组。带Bonferroni的双因素方差分析。*p<p0.0;5**p≤0.01;***p≤0.001。

[0031] 图4:肿瘤和TDLN中DC的表征。用同种型对照、IL-15、CD40激动剂或后者的组合治疗荷有KPC肿瘤的C57BL/6j小鼠。在治疗开始后第8天收获肿瘤或TDLN。酶促消化后获取单细胞悬液用于流式细胞术分析。(a,b)肿瘤中的DC或$CD103^+$DC。(c,d)TDLN中的DC或$CD103^+$DC。由三个独立实验合并的数据,n=10-16/组。带Bonferroni的单因素方差分析。*P<0.05;**P≤0.01;****P≤0.0001。

[0032] 图5:再攻击实验。在腹部的对侧向用IL-15+CD40激动剂治疗后从Panc02或KPC肿瘤治愈的C57BL/6j小鼠再次注射相同类型的肿瘤。(a,b)用Panc02肿瘤细胞再次攻击的小鼠的肿瘤动力学和存活率(对数秩检验),n=16。(c,d)用KPC肿瘤细胞再次攻击的小鼠的肿瘤动力学和存活率,n=9。(e,f)在治疗后8天对KPC荷瘤小鼠的瘤内$CD8^+$效应细胞或记忆T细胞进行流式细胞术定量(n=9)。带Bonferroni的单因素方差分析。**P≤0.01;***P≤0.001;****P≤0.0001。

具体实施方式

[0033] 现在将进一步描述本发明。在下面的段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。如此定义的每个方面可以与任何其他一个或多个方面组合,除非明确指出相反的情况。特

别地，被指示为优选或有利的任何特性可以与被指示为优选或有利的任何一个或多个其他特性组合。

[0034] 当描述本发明的化合物时，除非上下文另有说明，否则所用术语应根据以下定义来解释。

[0035] 如在说明书和所附权利要求中所使用的，除非上下文另有明确规定，否则单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该(the)”包括复数指示物。举例来说，“一种化合物”意指一种化合物或不止一种化合物。

[0036] 如本文中所用，术语“约”或“大致”当指诸如参数、量、持续时间等可测量的值时，意味着涵盖指定值的+/-10％或更小的变化，优选+/-5％或更小，更优选+/-1％或更小，还更优选+/-0.1％或更小，只要此类变化适于在所公开的发明中进行。应该理解的是，修饰语“约”或“大致”所指的值本身也是具体地、优选地公开的。

[0037] 因此，本发明涉及用于治疗胰腺癌的包含IL-15和CD40激动剂的组合。

[0038] 在本发明的上下文中，术语“胰腺癌”意指由胰腺(即胃后面的腺器官)中细胞增殖失控引起的病症。这些癌细胞具有侵入身体的其他部位的能力。胰腺癌有多种类型，其中胰腺腺癌约占病例的85％。百分之一至百分之二的胰腺癌病例是神经内分泌瘤，其由胰腺的激素产生性细胞产生。在美国，胰腺癌是第三最常见的癌症死亡原因，并且最常发生在发达国家，这可能是由于与吸烟、肥胖和糖尿病相关的风险增加。

[0039] 本发明的发明人发现，根据本发明的组合表现出增强的抗肿瘤作用，导致存活率显著增加，甚至完全治愈大多数肿瘤。因此，根据本发明的组合的一个有利方面是增强的抗肿瘤活性。这种活性是由CD8T细胞和NK细胞的扩大的浸润以及同时调节性T细胞的减少所介导的。在本申请中，提供了根据本发明的组合的临床前转化数据。此外，本发明人发现，通过使用这种特定的组合，至少一种组分可以亚治疗剂量使用，从而降低与所述组分的高剂量相关的副作用的风险。

[0040] 因此，在一个具体实施方案中，本发明提供了用于治疗胰腺癌的包含IL-15和CD40激动剂的组合；其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

[0041] 更具体地，本发明提供了用于治疗哺乳动物诸如人中的胰腺癌的包含IL-15和CD40激动剂的组合；其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

[0042] 如本文中所用，术语“IL-15”指调节T细胞和天然杀伤(NK)细胞的活化和增殖的细胞因子。本领域中IL-15的其它名称包括IL15和白细胞介素-15。本发明中使用的IL-15可以原样使用，或者可以包括重组形式诸如rh IL15的使用。或者，其也可以包括使用IL-15激动剂和超激动剂，例如RLI-15、IL15 SA或N-803。N-803，以前称为ALT-803，是IL-15超激动性突变二聚IL-15RαSushi-Fc融合蛋白复合物，其可增强$CD8^+$T和NK细胞的扩增和功能，并在临床前模型中表现出抗肿瘤功效。IL15 SA组合了IL-15和IL15Ra-Fc。RLI-15是融合蛋白，其由通过20个氨基酸的柔性接头与IL-15偶联的IL-15Rα的NH2-末端(氨基酸1-77，sushi+)细胞因子结合结构域组成。这种融合蛋白被称为蛋白受体-接头-IL-15(RLI)，作为IL-15的超激动剂，具有延长的血清半衰期和类似于复合的IL-15/IL-15Rα-Fc的生物活性。

[0043] 如本文中所用，术语“CD40激动剂”是指与受试者的CD40分子特异性结合，并且当其与表达CD40的受试者的细胞、组织或生物体接触时，增加或增强或诱导一种或多种CD40活性的分子。

[0044] 如本文中所用，“CD40”是指为肿瘤坏死因子受体家族的成员的细胞表面糖蛋白。本领域中CD40的其它名称包括:TNFRSF5、p50、CDW40和Bp50。

[0045] 根据本发明的一个实施方案，所述CD40激动剂是诸如选自:塞鲁单抗(也称为RG7876)、APX005M、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CDX-1140的抗体或其抗原结合片段。根据本发明的一个实施方案，所述CD40激动剂也可以选自:CD40L、CD40L的三聚体、HERA-CD40L。

[0046] 如本文中所用，术语“抗体”可包括完整抗体、F(ab')2片段、双抗体、三抗体、四抗体、双特异性抗体、单体抗体和任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链可变区片段(scFv)，或其二硫键稳定化的可变区片段(dsFv)。全抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(F)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。

[0047] 在本发明的所有不同实施方案中，可以以治疗或亚治疗日剂量向受试者，特别是人受试者施用根据本发明的药物组合。在另一个实施方案中，以亚治疗剂量向受试者施用本发明的药物组合的至少一种组分。在另一个实施方案中，以治疗剂量施用本发明的药物组合的至少一种组分。在另一个实施方案中，以亚治疗剂量施用药物组合的一种组分，而另一种组分以治疗剂量施用。在另一个实施方案中，以亚治疗剂量向受试者施用本发明的药物组合的所有组分。

[0048] 在本发明的说明书中，治疗性化合物的亚治疗剂量意指低于获得治疗效果所需的所述化合物的通常/典型剂量的剂量。因此，在一个优选实施方案中，以低于其单独施用时获得治疗效果所需的剂量的剂量施用其中至少一种组分。

[0049] 术语化合物的“亚治疗量”意指低于接受的治疗有效量的量。亚治疗量可被定义为低于FDA批准的针对特定疾病的一个或多个剂量的量。或者，考虑到许多药物是在适应症外使用的，因此亚治疗量可被定义为低于医生为特定疾病通常开出的剂量的量。亚治疗量还可考虑诸如体重、性别、年龄、肾脏或肝脏损伤以及可能影响给定量的特定药物的功效的其他参数等因素。在某些实施方案中，亚治疗量可为治疗有效量的85％。在其他实施方案中，亚治疗量可以是治疗有效量的70％。在其他实施方案中，亚治疗量可以是治疗有效量的60％。在其他实施方案中，亚治疗量可以是治疗有效量的50％。在其他实施方案中，亚治疗量可以是治疗有效量的40％。在其他实施方案中，亚治疗量可以是治疗有效量的30％。在其他实施方案中，其甚至可以更小。

[0050] 换句话说，亚治疗剂量是当向患者施用时，其本身不足以有效治疗所述病症的化合物/组分的量。然而，发现本文要求保护的组合在所要求保护的病症的治疗中足够有效，即使一种或多种所述化合物/组分以在治疗所述病症中不够有效的剂量施用。

[0051] 在本发明的说明书中，当提到特定剂量时，这意味着在给定的一天要施用的剂量，即使在本申请中没有明确说明。例如，当提及以约20μg/kg体重的剂量施用CD40激动剂时，这意味着理解为以每天约20μg/kg体重的剂量施用。这并不意味着在治疗方案期间，治疗方案的每一天都给予该剂量，而是在施用该剂量的每一天，每kg体重的给定剂量是如本文所述的。

[0052] 在一个优选实施方案中，在所述药物组合中，CD40激动剂以约20至约800μg/kg体重，优选约30至约600μg/kg体重，最优选约40至约300μg/kg体重的剂量施用/使用。目前临床试验中使用的治疗剂量通常超过300μg/kg体重。根据CD40激动剂的类型，亚治疗剂量可

以不同。例如，塞鲁单抗的临床使用治疗剂量总计约200μg，而对于另一种CD40激动剂APX005M，治疗剂量为300μg。因此，在一个优选实施方案中，CD40激动剂以小于300μg/kg体重，诸如小于250μg/kg体重，小于200μg/kg体重，小于150μg/kg体重，小于100μg/kg体重的亚治疗剂量施用。

[0053] 在另一个优选实施方案中，在所述药物组合中，IL-15或其激动剂以约0.1至约50μg/kg体重，优选约0.1至20μg/kg体重，最优选约0.1至约0.3μg/kg体重的剂量施用/使用。IL-15的施用剂量根据施用方法而变化。特别地，当静脉内施用IL-15时，通常以约0.3μg/kg体重的剂量在团注静脉内注射中施用IL-15，而当皮下施用IL-15时，IL-15通常以高达2μg/kg体重的剂量施用。

[0054] 因此，在一个具体实施方案中，所述IL-15以小于0.3μg/kg体重，诸如约0.2或约0.1μg/kg体重的剂量静脉内施用。特别是当IL-15通过团注静脉内注射给药时，剂量可以小于0.3μg/kg体重，例如约0.2或约0.1μg/kg体重。或者，当IL15通过连续IV滴注系统施用时，剂量可以是约2μg/kg体重或低于2μg/kg体重，诸如大约或低于1.5μg/kg体重，大约或低于1.0μg/kg体重，大约或低于0.5μg/kg体重。或者，所述IL-15以小于2μg/kg体重，诸如约1.5或约1μg/kg体重的剂量皮下或皮内施用。

[0055] 目前在临床试验中用于团注静脉内注射的治疗剂量通常超过0.3μg/kg体重。因此，在一个优选实施方案中，IL-15或其激动剂以低于0.3μg/kg体重，诸如小于0.2μg/kg体重，小于0.1μg/kg体重的亚治疗剂量施用。

[0056] 因此，在一个具体实施方案中，本发明提供了如本文所定义的组合，其中符合以下至少一项：

[0057] -所述CD40激动剂以小于300μg/kg体重的亚治疗剂量使用；

[0058] -所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的亚治疗剂量静脉内施用；

[0059] -所述IL-15以小于0.3μg/kg体重的剂量通过团注静脉内注射施用；

[0060] -所述IL-15以约为2μg/kg体重或低于2μg/kg体重的剂量通过连续滴注系统静脉内施用；或者

[0061] -所述IL-15以小于2μg/kg体重的亚治疗剂量皮下或皮内施用。

[0062] 本发明人惊奇地发现，通过加入IL-15可以显著降低CD40激动剂的剂量。该实施方案的一个有利方面是可以减少因使用CD40激动剂而产生的副作用。此外，考虑到两种分子的这种协同作用，在一个特定实施方案中，两种组分甚至均可以以亚治疗剂量使用。

[0063] 如本文中所用，“包含IL-15和CD40激动剂的组合”是指可以向受试者施用的包含所述IL-15和所述CD40激动剂的任何形式。如本文中所用，“组合”是指两项或更多项之间的任何关联。所述关联可以是空间上的，也可以是指所述两项或更多项用于共同目的。因此，在本发明的说明书中，本文提供的组合可以是包含两种组分的单一组合物。然而，在本发明的说明书中，组合也指使用2种单独的组合物，每种组合物包含组分之一，然而在要求保护的治疗中它们彼此联合使用。所述联合可以包括将两种组合物同时向患者施用，或者以两种组分仍然能够在预期病症的治疗中协同作用的方式分开施用。

[0064] 在本发明的另一个具体实施方案中，所述组合呈药物组合物的形式。根据本发明的药物组合物可用于人医学或兽医学。

[0065] 如本文中所用，“组合物”是指两种或更多种产品或化合物(例如药剂、调节剂、调

控剂等)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末或糊剂、水性或非水性制剂或其任意组合。在本发明的说明书中,所述组合物优选为药物组合物,包含一种或多种药物赋形剂、载体、稀释剂等。

[0066] 在本申请的说明书中,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等是指获得期望的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,所述效果可以是预防性的,并且/或者就部分或完全稳定或治愈疾病和/或由该疾病引起的副作用而言,该效果可以是治疗性的。“治疗”涵盖对哺乳动物(特别是人)的疾病的任何治疗,包括:(a)预防可能易患该疾病或症状但尚未被诊断为患有该疾病或症状的受试者发生该疾病或症状;(b)抑制疾病症状,即阻止其发展;或(c)缓解疾病症状,即引起疾病或症状的消退。

[0067] 必须理解,不同的施用方法适用于施用根据本发明的组合。根据本发明的组合的施用可以使用标准施用途径进行。非限制性实施方案包括肠胃外施用,例如皮内、肌内、皮下、经皮或粘膜施用,例如鼻内、口服等。在根据本发明的一个实施方案中,静脉内或皮下施用包含所述IL-15和所述CD40激动剂的组合。静脉内施用可以通过团注注射或通过连续IV滴注系统进行。施用途径可以决定治疗效果,因为已经发现皮下施用比IV团注注射效果更好。

[0068] 在又一其他实施方案中,所述胰腺癌选自:胰腺导管腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤。

[0069] 在另一个方面,本发明提供了用于治疗有此需要的受试者的胰腺癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含IL-15和CD40激动剂的组合;其中所述IL-15和CD40激动剂中的至少一种以亚治疗剂量使用。

[0070] 实施例

[0071] 材料和方法

[0072] 动物

[0073] 6-8周龄的雌性C57BL/6J小鼠获自Jackson实验室。所有小鼠都在University of Antwerp的动物中心进行饲养。所有动物程序均根据University of Antwerp动物伦理委员会进行并获得其批准,注册号为2016-30。所有的小鼠都被关在装满房屋和筑巢材料的过滤器顶笼中。每天对小鼠进行检查,以检查其健康和福利。小鼠到达后给予7天的适应期,然后被纳入实验以降低应激水平。

[0074] 模型和实验设计

[0075] 使用两种不同的小鼠胰腺导管腺癌细胞系。Panc02是化学诱导的细胞系,而KPC细胞源自携带KRAS和p53突变的原位KPC肿瘤。两种细胞系都在补充了10%FBS和10mM L-谷氨酰胺的DMEM细胞培养基中培养。细胞系保持在37℃和5%CO2下。在常规基础上测试所有细胞系的支原体污染。所有细胞系在冷冻与解冻之间的传代次数不超过10次,并且仅在第二代与第六代之间的实验中使用。

[0076] 肿瘤动力学和存活率

[0077] 注射前,用Tryple收获Panc02和KPC细胞,用无菌PBS洗涤三次,并放在70μm细胞过滤器上,以确保单细胞悬液没有任何污染物。接下来,在小鼠的左腹侧皮下注射悬浮在100μl无菌PBS中的$0.5.10^6$Panc02或KPC细胞。当肿瘤达到20-30mm^2的平均尺寸时,根据肿瘤尺寸将小鼠随机分成四个不同的治疗组(=第0天):1.同种型对照;2.IL-15;3.αCD40;4.IL15+α

CD40。在第0-3天、第6-10天和第13-14天给小鼠腹膜内(i.p.)施用2.5μg IL-15(NCI)。在第0天、第3天、第7天、第10天和第14天腹膜内施用小鼠激动性CD40单克隆抗体(FGK-45)或相应的同种型(2A3),panC02的剂量为每只小鼠12.5μg,KPC肿瘤的剂量为200μg(第0天)和100μg(第3天、第7天、第10天和第14天)。

[0078] 使用数字卡尺(Chicago Brand)每周测量两次肿瘤大小。使用公式长度x宽度计算肿瘤面积。当肿瘤大小达到150mm^2时处死小鼠,或者当它们达到第100天但没有达到该终点时被称为长期存活者。

[0079] 功能衰竭实验

[0080] 为了研究不同免疫细胞类型的作用,进行了功能衰竭实验。如上所述给予小鼠Panc02或KPC肿瘤。每只小鼠用200μg单克隆抗体耗尽CD4 T细胞和CD8 T细胞,用25μl抗去唾液酸基-GM1耗尽NK细胞。将小鼠随机分为六个不同的治疗组:1.同种型对照;2.IL-15+αCD40;3.IL-15+αCD40+αCD4;IL-15+αCD40+αCD8;IL-15+αCD40+抗去唾液酸基-GM1;IL-15+αCD40+αCD8+抗去唾液酸基-GM1。在第-1天、第0天、第3天、第6天、第10天和第14天腹膜内施用消耗性抗体或抗去唾液酸基-GM1。如上所述测量肿瘤动力学和存活。

[0081] 再攻击实验

[0082] 为了研究免疫记忆的诱导,进行了再攻击实验。此处,对于在开始治疗100天后完全无肿瘤的小鼠,在原发肿瘤注射侧的对侧胁腹处再次皮下(s.c.)注射Panc02或KPC细胞。如上所述测量肿瘤生长和存活。

[0083] TIL的表征

[0084] 为了表征肿瘤浸润性淋巴细胞,对来自不同治疗组的脾和肿瘤进行了多色流式细胞术实验。此处,将荷有Panc02或KPC肿瘤的小鼠随机分组,并如上所述进行治疗。在第8天,处死小鼠,在尸检过程中取出脾脏和肿瘤并称重。接下来,用解剖刀将肿瘤切碎,然后用消化培养基(RPMI 1640+10%FBS+10mM L-谷氨酰胺+胶原酶D+DNA酶-I+释放酶(Liberase))在37℃和5%CO_2下在细胞摇床上酶促消化30分钟。消化后,用洗涤缓冲液(PBS+2%FBS+1mM EDTA)洗涤所有样品,并将其通过70μm细胞过滤器以获得单细胞悬浮液。机械分离脾脏,用FACS缓冲液洗涤,并将其通过40μm细胞过滤器以获得单细胞悬浮液。

[0085] 脾和肿瘤两者的单细胞悬液都用三种不同的多色抗体小组染色。第一小组由CD107a-BV421、CD8-FITC、CD3-PE、CD4-PercP-Cy5.5、CD69-Pe-Cy7、NK1.1-APC组成,第二小组由CD8-BV421、CD25-BV786、CD4-FITC、CD3-PE、CD44-PerCP-Cy5.5、CD62L-Pe-Cy7、FoxP3-APC组成,第三小组由CD8-BV421、CD103-BV786、Ly6G-FITC、CD11b-PE、F4/80-Pe-TexasRed、Ly6C-PerCP-Cy5.5、MHC-II-PE-Cy7、CD11c-APC组成。在所有三个小组中,使用活死水(Live-dead Aqua)作为活力染色,使用CD45.2-APC-Cy7来门控筛选出白细胞而不是肿瘤细胞。在抗体染色前,用2.4G2封闭所有细胞悬液。使用FACS Aria II流式细胞仪分析所有样品。

[0086] 统计学

[0087] 使用带Bonferroni事后分析的双因素方差分析来确定不同实验中不同治疗组之间的肿瘤动力学的统计学差异。使用对数秩检验分析存活的差异。为了通过流式细胞术评估肿瘤中TIL的量之间的差异,应用了带Bonferroni事后分析的双因素方差分析。如果$p<0.5$,差异被认为是显著不同的。使用GraphPad v8.0软件制作图表。使用FlowJo v10.6.3进

行流式细胞术分析。所有统计分析均在SPSS v26中进行。

[0088] 结果

[0089] IL-15与CD40激动剂的组合导致肿瘤体积减小和存活率增加

[0090] 我们试图研究IL-15和CD40激动剂的组合治疗是否能在胰腺导管腺癌中增强抗肿瘤反应。为了对此进行研究，当肿瘤达到25-35mm^{2}的大小时，用IL-15和/或CD40激动剂腹膜内治疗荷有Panc02或KPC肿瘤的C57BL/6小鼠(图1A)。我们在此表明，在两种小鼠模型中，这些药剂的组合导致肿瘤体积减小和存活率增加。

[0091] 对于第一模型Panc02，我们观察到当小鼠用单一药剂治疗时，肿瘤体积显著减小。即使与两种单一药剂治疗相比，用组合方案治疗也导致肿瘤体积显著减小，并且存活率增加，其中17只小鼠中有16只变得完全无肿瘤(图1B、图1D、图1F)。

[0092] 在第二模型KPC中，我们观察到非常相似的结果：肿瘤体积减小和存活率增加被证实，其中组合用药明显好于对照组或任一单一药剂。同样11只小鼠中的7只变得完全无肿瘤(图1C、图1E、图1G)。

[0093] 值得注意的是，虽然我们在Panc02和KPC模型之间观察到相似的反应，但是在Panc02模型中所需的CD40激动剂剂量(12.5μg/剂量；人当量剂量为51μg/kg)低至KPC模型(200μg和100μg/剂量；人等效剂量分别为813μg/kg和406μg/kg)的1/8。因此，根据肿瘤类型，这两种药剂的组合可能导致CD40激动剂的剂量显著降低。总之，我们在此表明，IL-15和CD40激动剂的组合具有显著的抗肿瘤活性，其中两种药剂的组合导致累加效应。

[0094] $CD8^+$T细胞、NK细胞负责抗肿瘤的主要效应细胞

[0095] 为了更深入地了解负责观察到的抗肿瘤反应的免疫细胞，我们使用特定的清除抗体耗尽了荷瘤小鼠中的几种免疫细胞群。接下来，我们观察了这种耗尽对肿瘤动力学和存活率两者的影响(图2A，图2E)。在耗尽$CD4^+$T细胞后，我们在两个PDAC模型中观察到，耗尽组与未耗尽组之间的存活率没有显著差异，表明$CD4^+$T细胞在我们的组合治疗引发的抗肿瘤反应中没有发挥显著作用(图2B，图2F)。然而，当$CD8^+$T被耗尽时，组合治疗的抗肿瘤效果在两种肿瘤模型中显著降低。肿瘤生长显著增加，存活率降低(图2C，图2G)。当观察NK细胞的作用时，观察到的结果显示了混合的反应：在Panc02模型中，我们可以清楚地观察到肿瘤存活的显著降低，尽管没有观察到肿瘤生长，而对于KPC模型，观察到存活的降低，尽管没有统计学显著性(图2D，图2H)。总之，这些实验表明$CD8^+$T细胞主要负责观察到的抗肿瘤效果，并有涉及NK细胞的趋势，而$CD4^+$T细胞没有发挥显著作用。

[0096] IL-15与CD40激动剂的组合导致肿瘤中抗肿瘤免疫细胞数量的增加

[0097] 为了进一步探索组合方案的抗癌效果，进行多色流式细胞术以绘制肿瘤浸润淋巴细胞的图表。我们观察到这种组合疗法的不同臂之间存在有趣的差异。所处理的免疫细胞群是：白细胞(图3A)、NK细胞(图3B)、NK T细胞(图3C)、T细胞(图3D)、CD4 T细胞(图3E)、CD8 T细胞(图3F)、Tregs(图3G)、树突细胞(DC)(图3H)、嗜中性粒细胞(图3I)。第一个观察结果是，抗肿瘤效果不是由于较高量的浸润性淋巴细胞本身，而是由现有免疫细胞亚群之间的显著差异引起的(图3A)。首先，与同种型和CD40激动剂组相比，组合组中浸润性NK和NK T细胞的量显著更高。单独的IL-15显示两种细胞类型的量增加，尽管没有统计学显著性(图3B，图3C)。关于T细胞，我们确实观察到组合方案中总T细胞的量增加(图3D)。当放大该T细胞区室时，很明显，该T细胞量的增加可归因于CD8+T细胞，当与所有其他臂相比时，所述CD8+T细

胞在组合中显著更高，而在浸润性CD4 T细胞中没有差异(图3E，图3F)。有趣的是，当CD40激动剂是治疗的一部分时，我们还观察到肿瘤中存在的Tregs显著减少(图3G)。接下来，在组合组中瘤内DC的量也增加，表明CD8 T细胞和NK细胞的更好的引发(图3H)。最后，未观察到存在的嗜中性粒细胞的量有显著差异(图3I)。将对NK细胞、CD8+T细胞、DC和Tregs的这些观察放在一起，有意义的是，组合治疗具有更深远的抗肿瘤效果，因为其引起抗癌免疫细胞(DC)的更好引发，接着是抗肿瘤免疫细胞(NK、NK T和CD8+T细胞)显著增加，同时作为Treg的免疫抑制细胞减少，这也由CD8/Treg比率的增加所证明。

[0098] 组合疗法导致$CD103^+$交叉呈递DC量的增加

[0099] 已知树突状细胞在抗原加工和呈递中起关键作用，并且在NK和T细胞的活化中起关键作用。我们进一步探索了它们在KPC肿瘤模型中的存在。此处，我们仅在组合疗法组中观察到肿瘤中DC的数量显著增加(图4a)。此外，还测定了$CD103^+$DC(负责交叉呈递的亚型)的数量。此处，IL-15导致肿瘤中$CD103^+$DC的数量显著增加，而在用CD40激动剂治疗后的组中这显著降低(图4b)。为了进一步研究DC的行为，我们分析了这些细胞在肿瘤引流淋巴结(TDLN)中的存在，并观察到当施用CD40激动剂时，DC的数量增加至3倍(图4c)。在这些条件下，$CD103^+$交叉呈递DC的频率增加了两倍(图4d)，这表明这些CD在肿瘤部位捕获抗原，并迁移到TDLN以活化NK和T细胞。此外，当施用组合疗法时，基因特征显示CD80、CD83和CD86的更高表达，表明可能的抗原呈递细胞如DC被活化并成熟。作为趋化性趋化因子的CXCR3、CXCL9和CXCL10(非CXCL11)的mRNA编码表达的增加表明它们参与了抗肿瘤免疫细胞向肿瘤部位的运输(数据未显示)。

[0100] 免疫记忆的诱导

[0101] 免疫疗法的目标之一是诱导强免疫记忆以防止将来复发。我们在我们的研究中观察到，与同种型对照或单臂治疗相比，用组合方案治疗KPC肿瘤时，效应和中枢记忆CD8+T细胞的数量增加(图5a和图5b)。为了研究是否诱导了功能性免疫记忆，用与最初用来接种组合治疗组的无肿瘤小鼠的肿瘤细胞类型相同的肿瘤细胞类型再次攻击所述组合治疗组的无肿瘤小鼠。此处，我们观察到在两种PDAC模型中免疫记忆的明显诱导，其中与初次接触试验的对照小鼠相比，16只小鼠中的14只在Panc02肿瘤模型中变成无肿瘤的，并且所有小鼠在KPC肿瘤模型中变成无肿瘤的(图5c-图5f)。

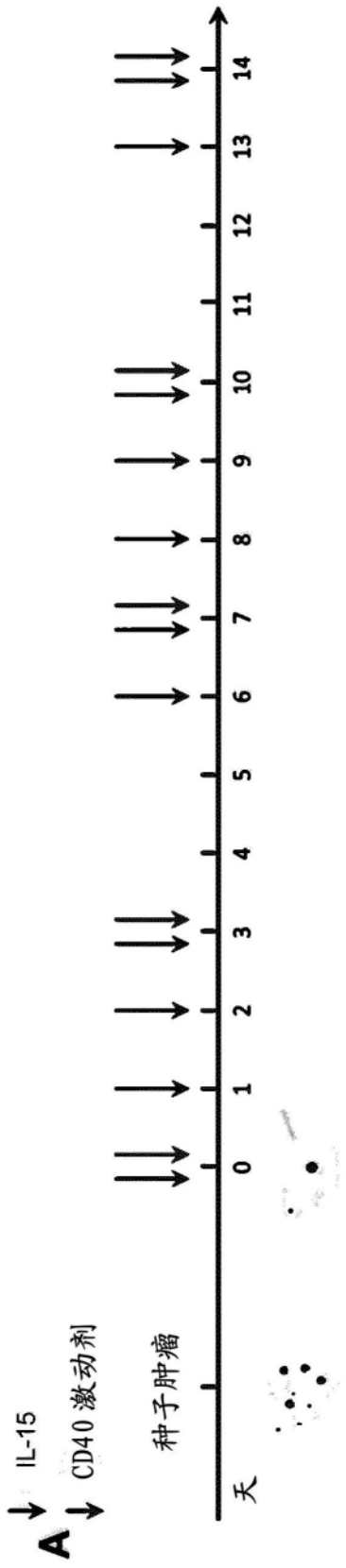
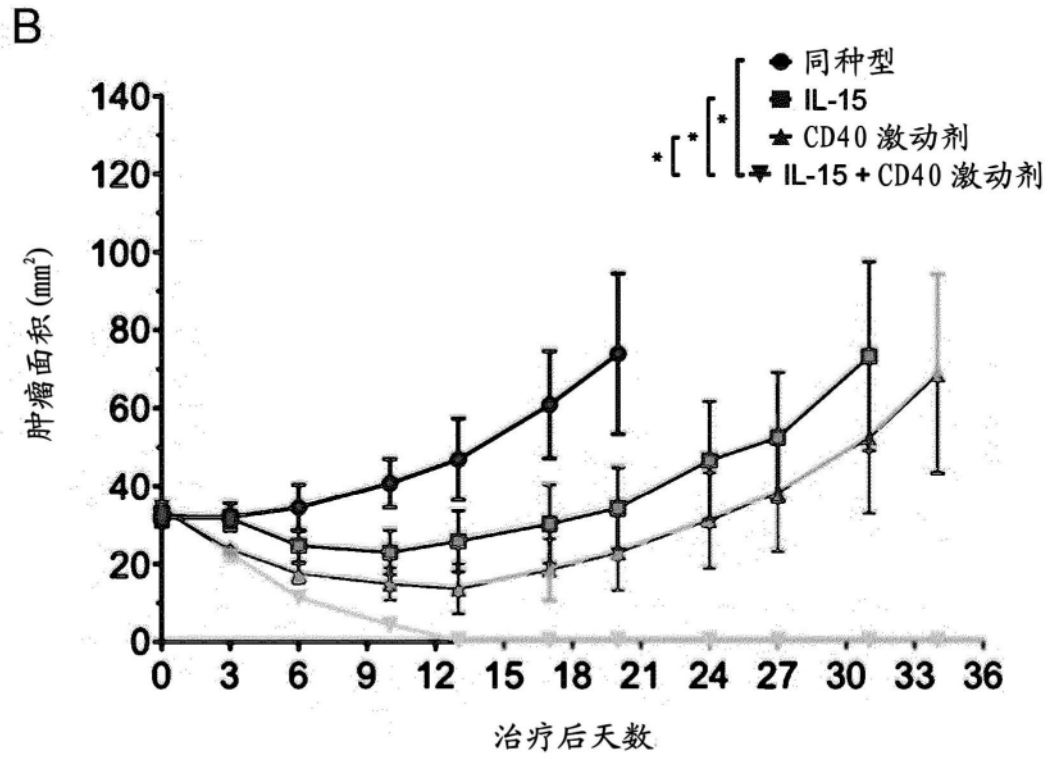


图1


B
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
肿瘤面积 (mm²)
治疗后天数

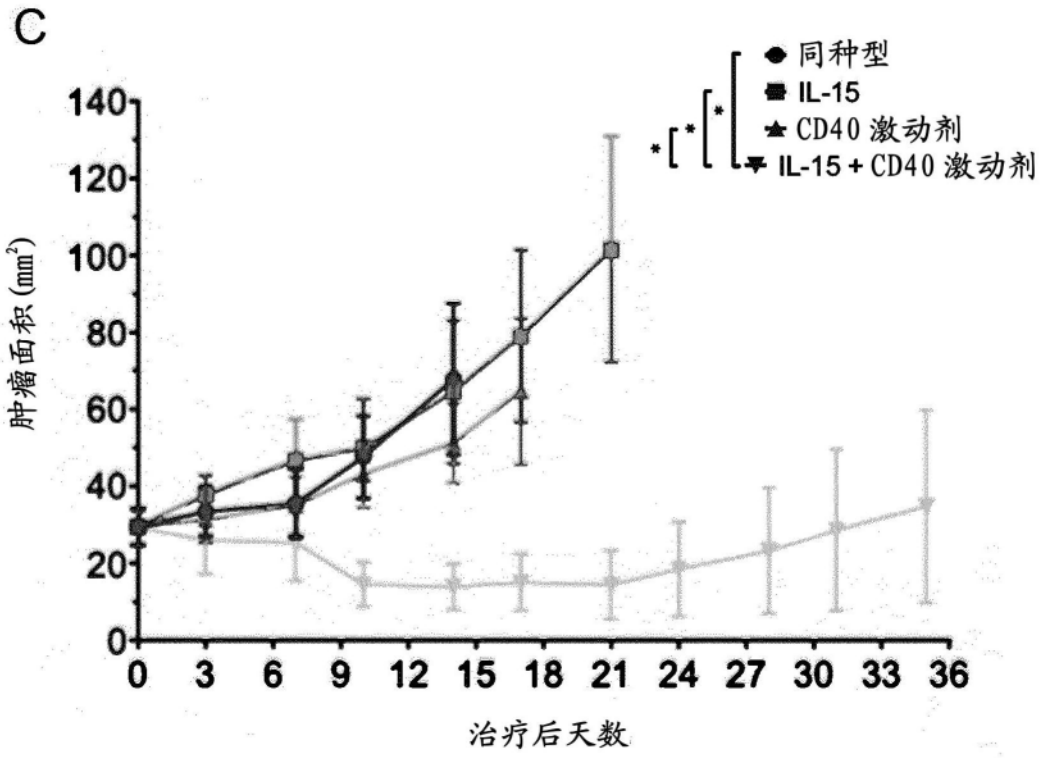
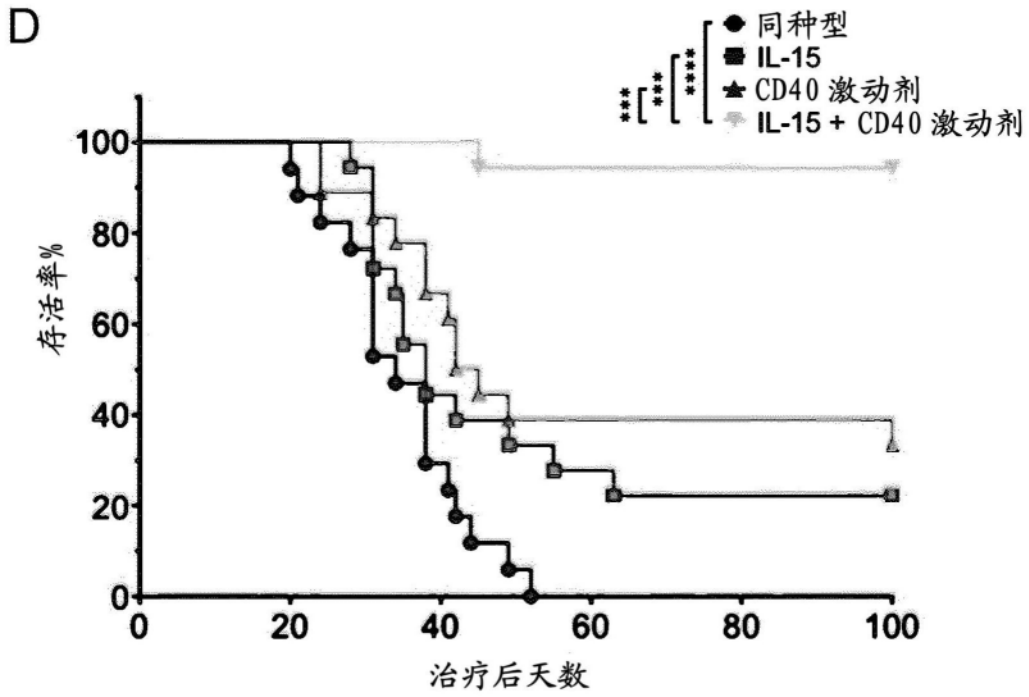

C
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
肿瘤面积 (mm²)
治疗后天数

图1续


D
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
存活率%
治疗后天数
0
20
40
60
80
100

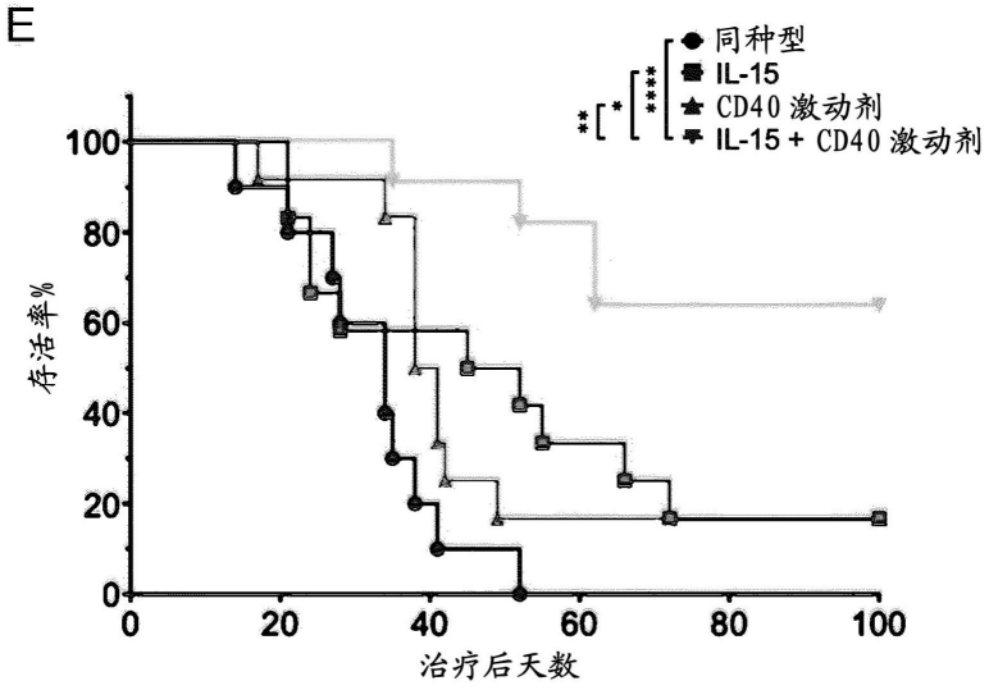

E
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
存活率%
治疗后天数
0
20
40
60
80
100

图1续

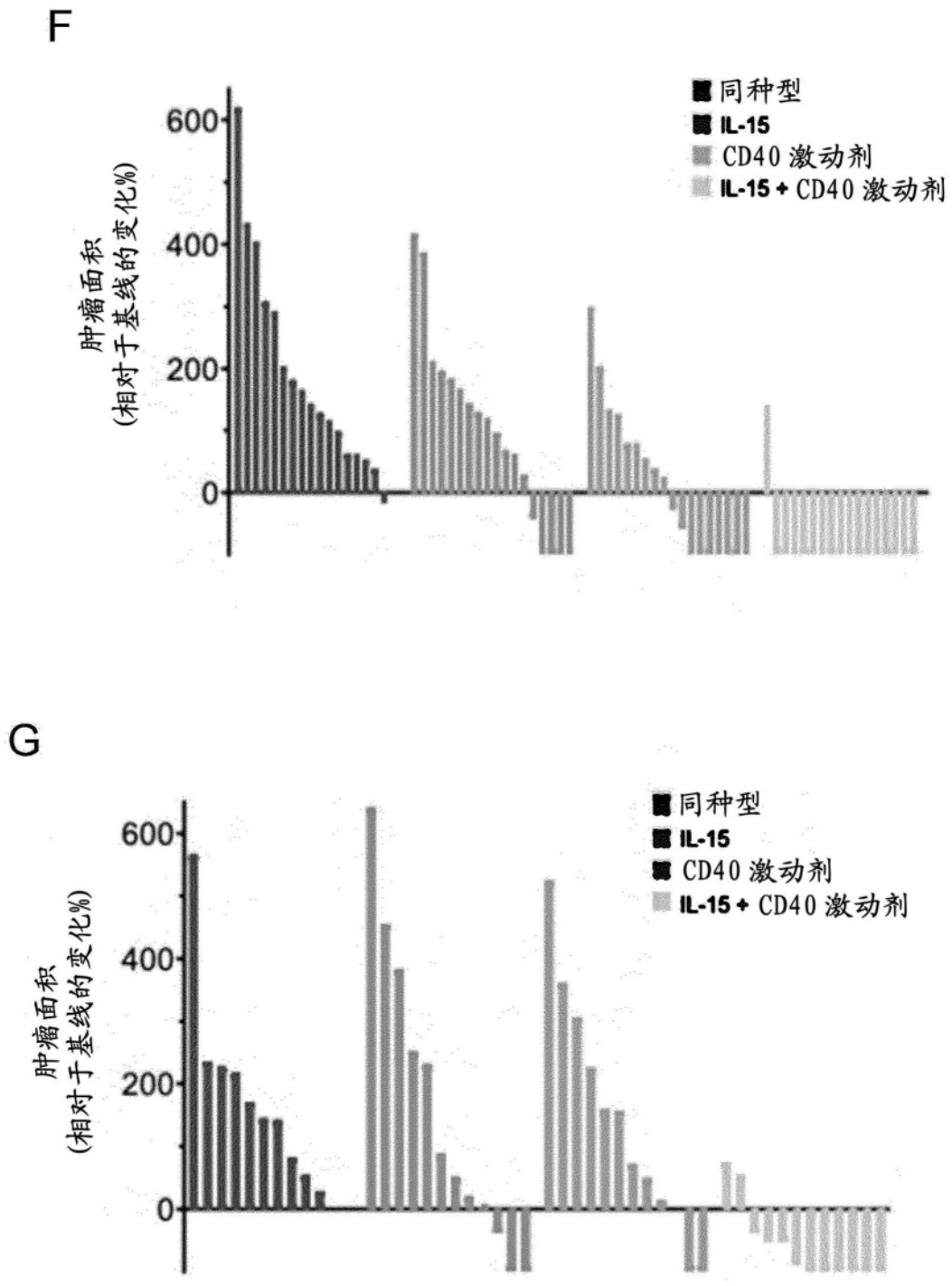

F
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
肿瘤面积
(相对于基线的变化%)
600
400
200
0
G
同种型
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
肿瘤面积
(相对于基线的变化%)
600
400
200
0

图1续

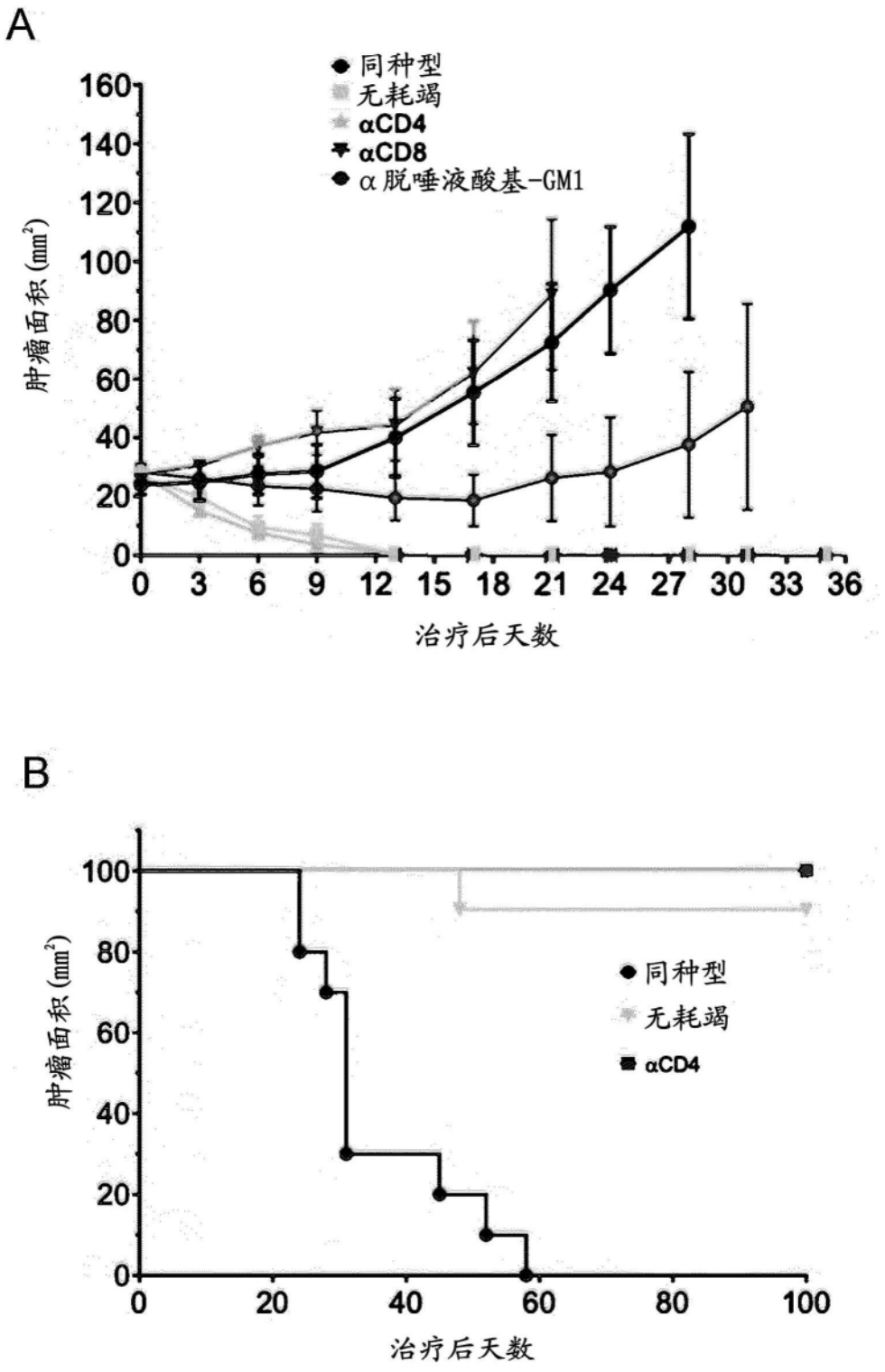

A
同种型
无耗竭
αCD4
αCD8
α脱唾液酸基-GM1
肿瘤面积(mm²)
治疗后天数
B
同种型
无耗竭
αCD4
肿瘤面积(mm²)
治疗后天数

图2

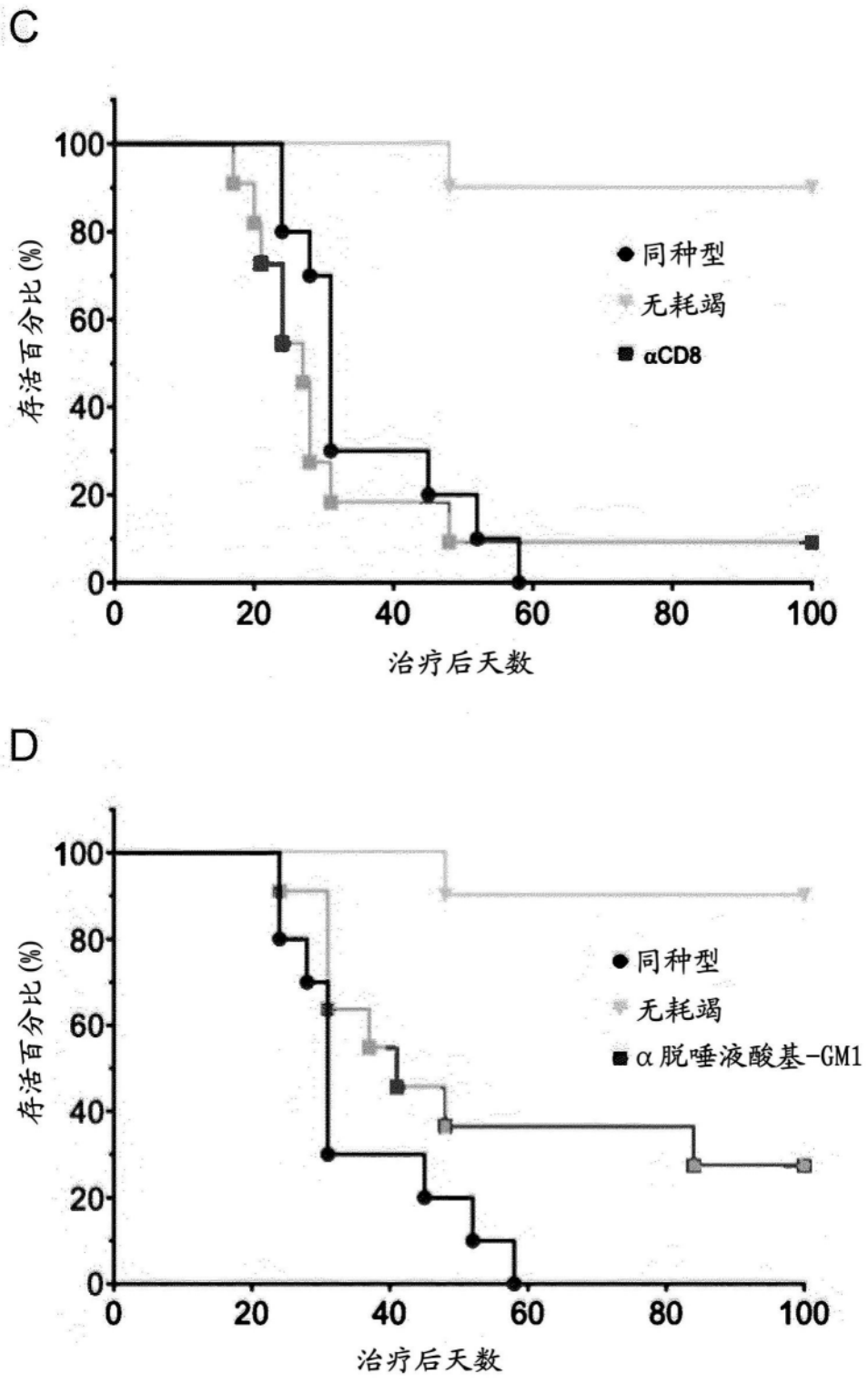
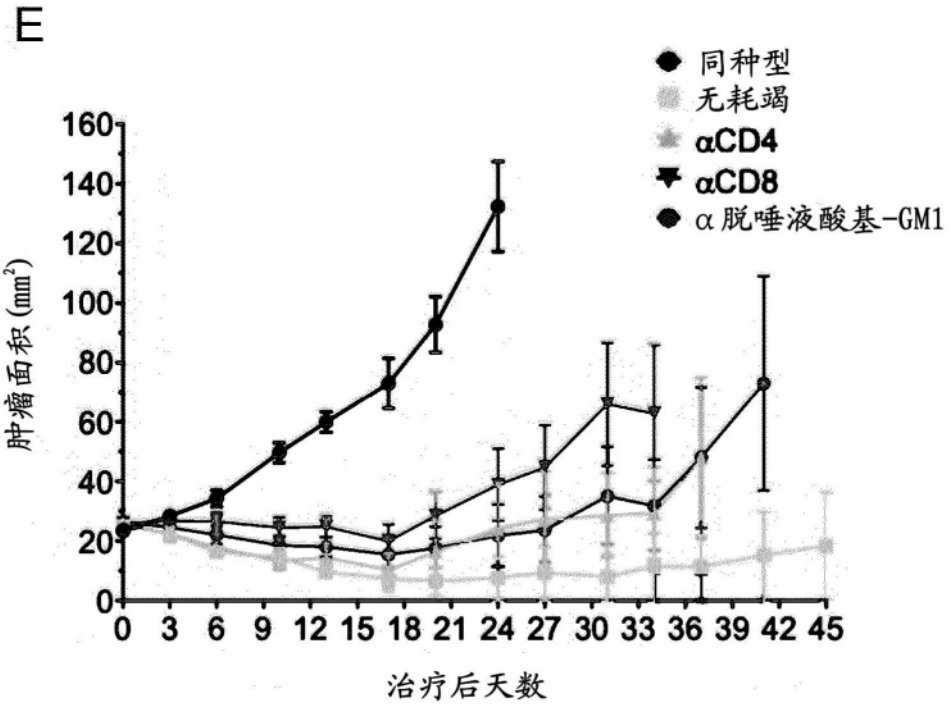

C
存活百分比(%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
治疗后天数
同种型
无耗竭
αCD8
D
存活百分比(%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
治疗后天数
同种型
无耗竭
α脱唾液酸基-GM1

图2续


E
同种型
无耗竭
αCD4
αCD8
α脱唾液酸基-GM1
肿瘤面积(mm²)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
治疗后天数

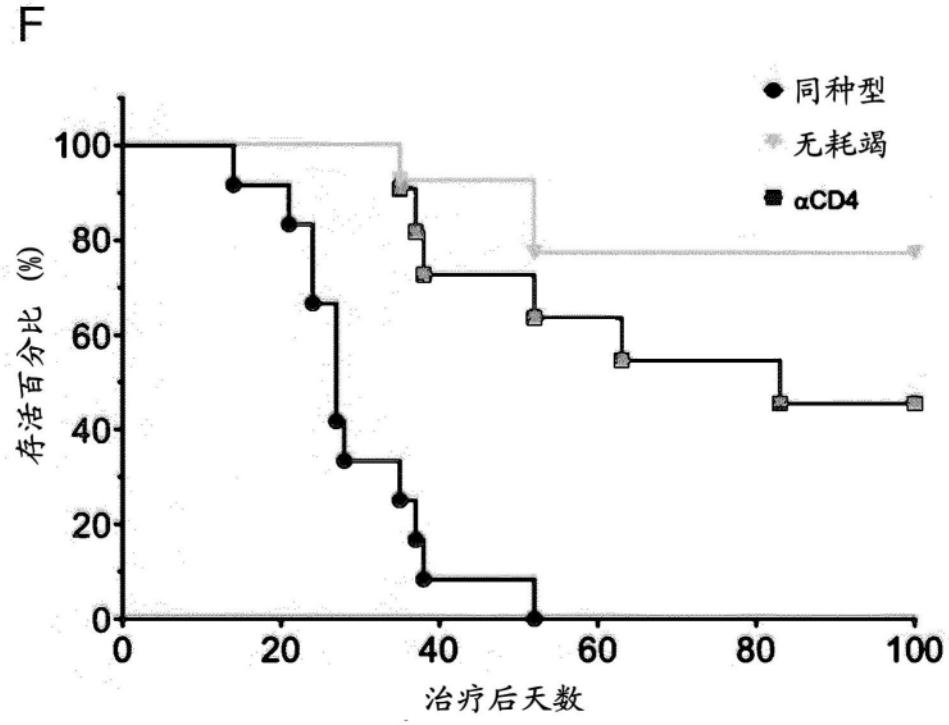
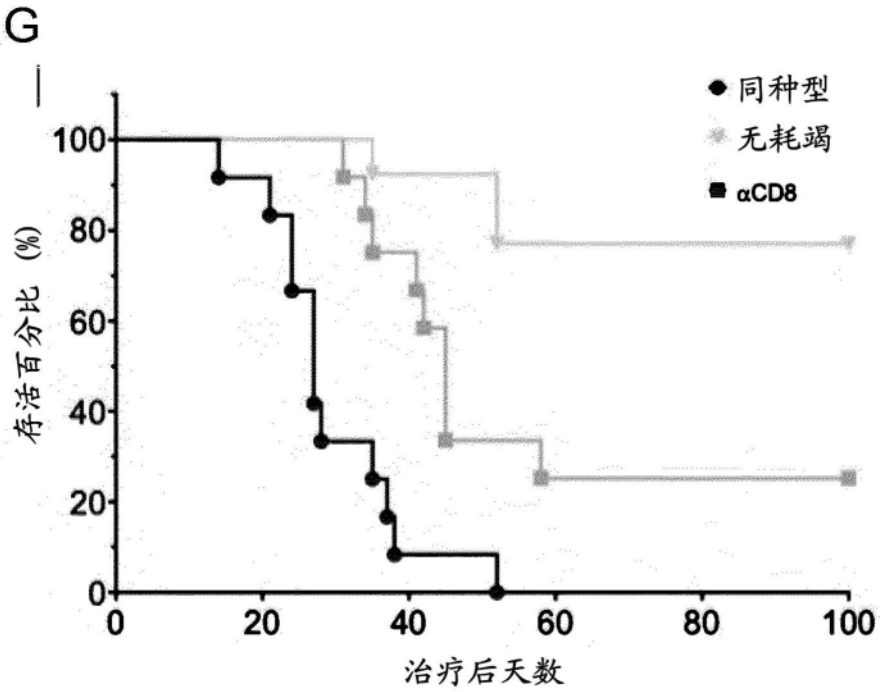

F
同种型
无耗竭
αCD4
存活百分比 (%)
100
80
60
40
20
0
0 20 40 60 80 100
治疗后天数

图2续


G
同种型
无耗竭
αCD8
存活百分比（%）
治疗后天数
0
20
40
60
80
100

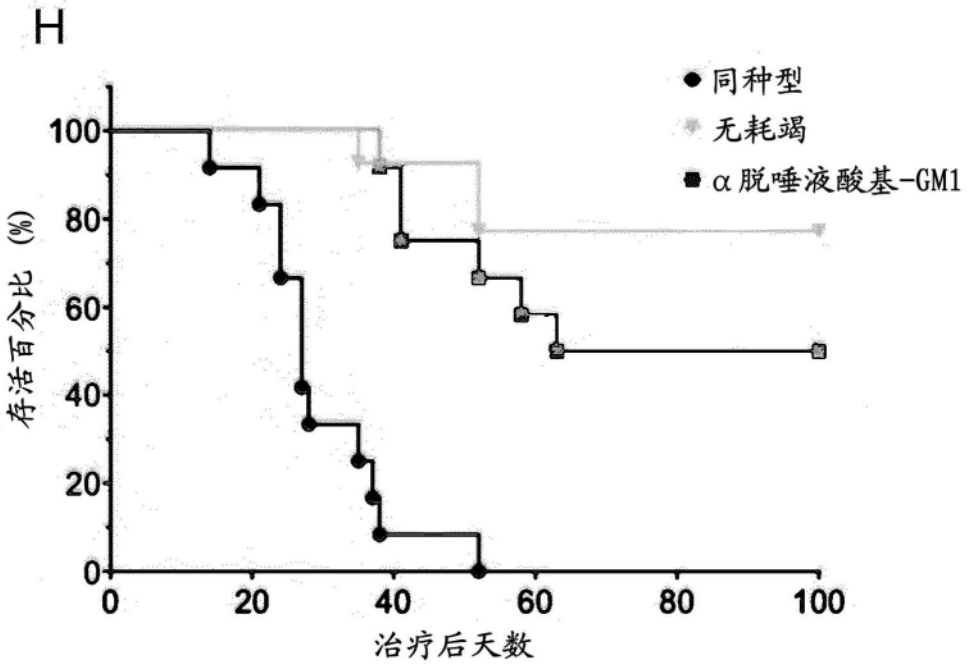

H
同种型
无耗竭
α脱唾液酸基-GM1
存活百分比（%）
治疗后天数
0
20
40
60
80
100

图2续

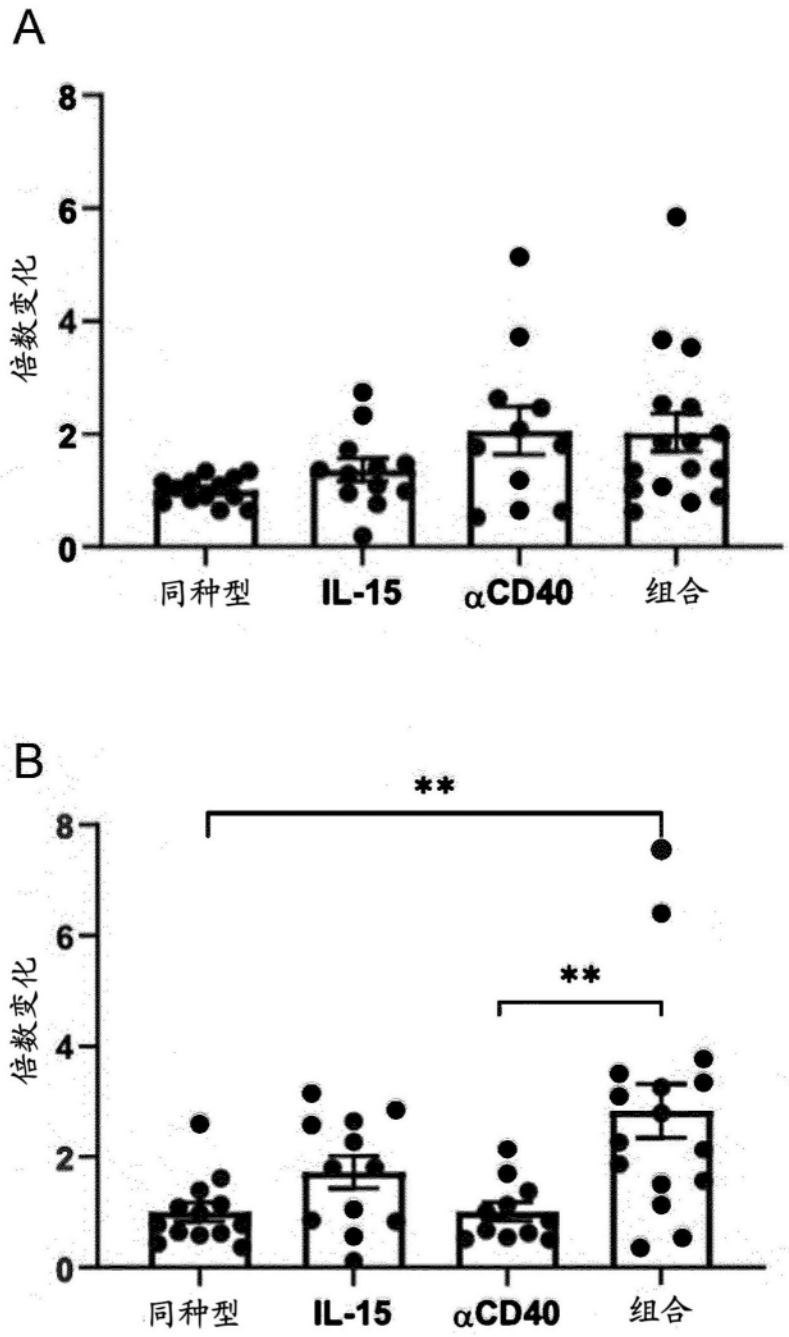


图3

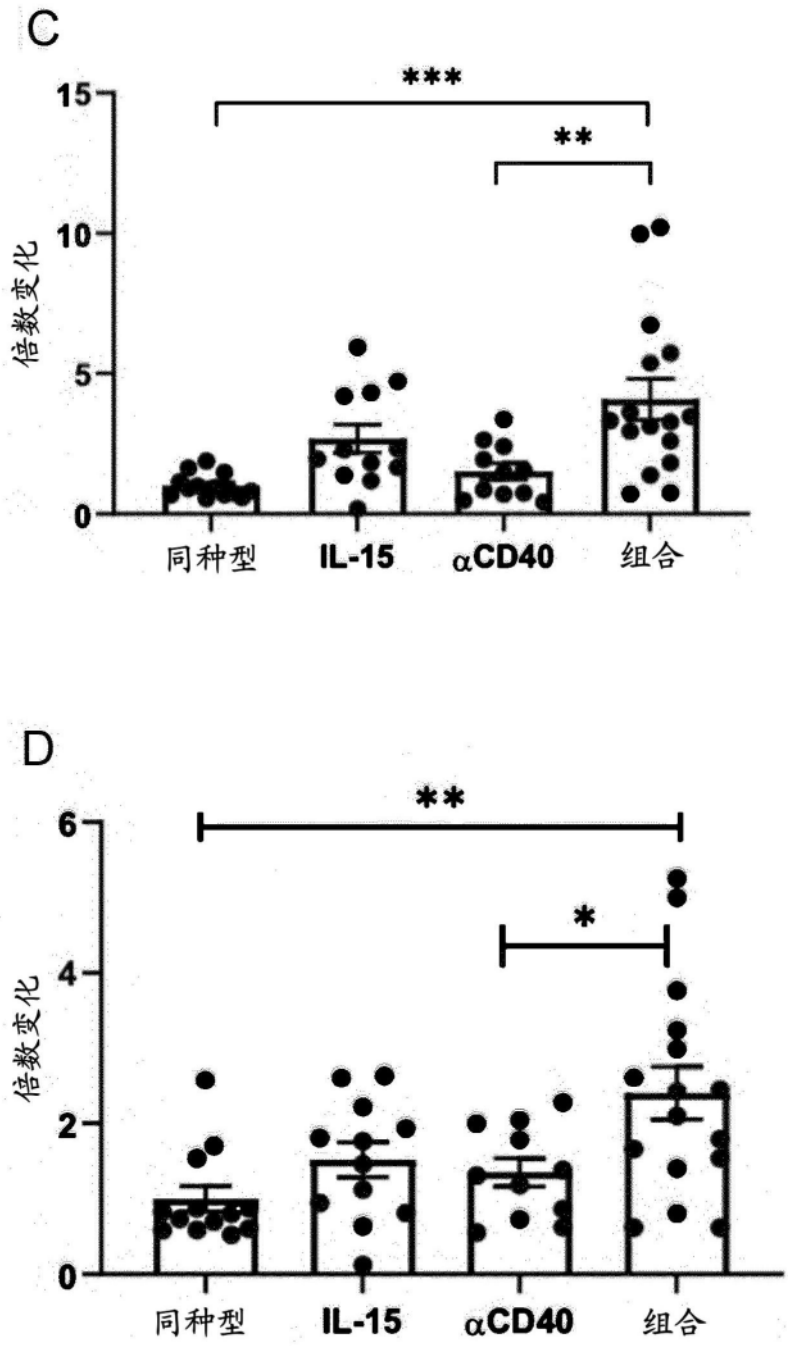


图3续

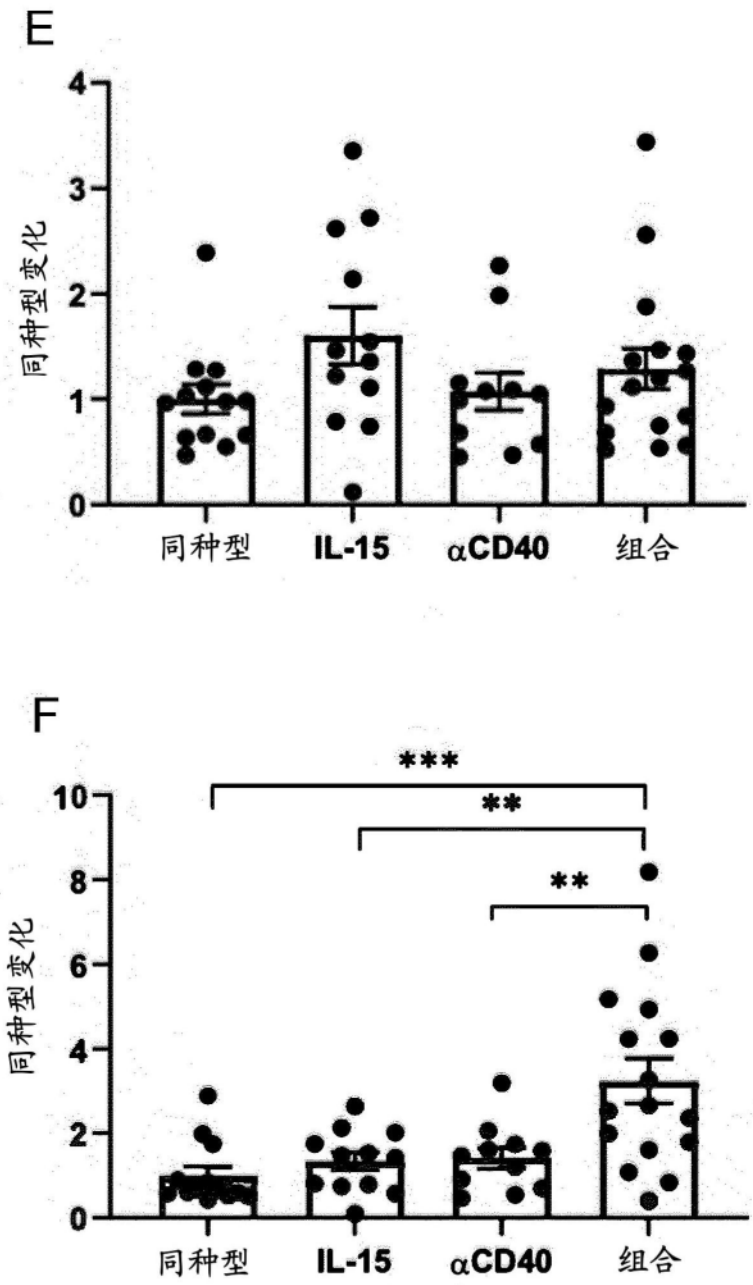

E
同种型变化
0
1
2
3
4
同种型
IL-15
αCD40
组合
F
同种型变化
0
2
4
6
8
10
***
**
**
同种型
IL-15
αCD40
组合

图3续

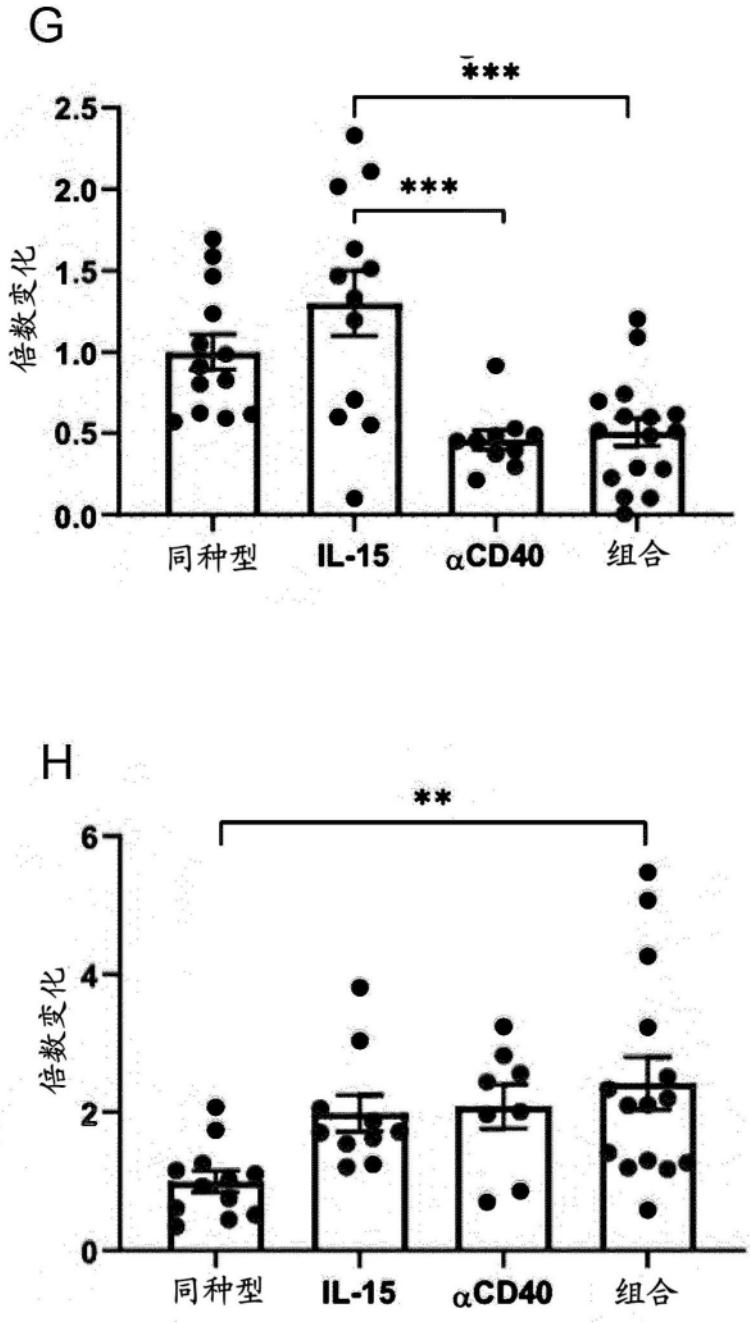

G
***
***
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数变化
同种型
IL-15
αCD40
组合
H
**
6
4
2
0
倍数变化
同种型
IL-15
αCD40
组合

图3续

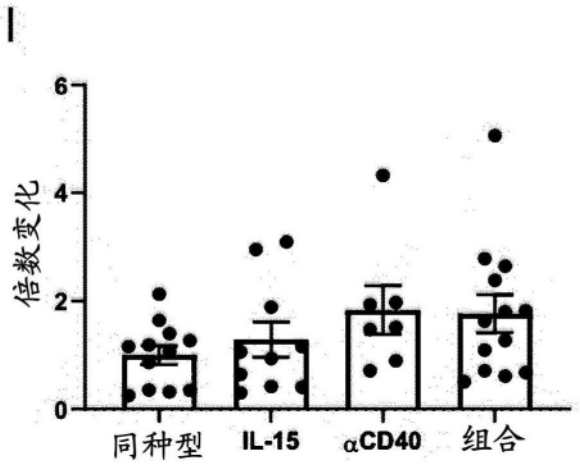

倍数变化
6
4
2
0
同种型
IL-15
αCD40
组合

图3续

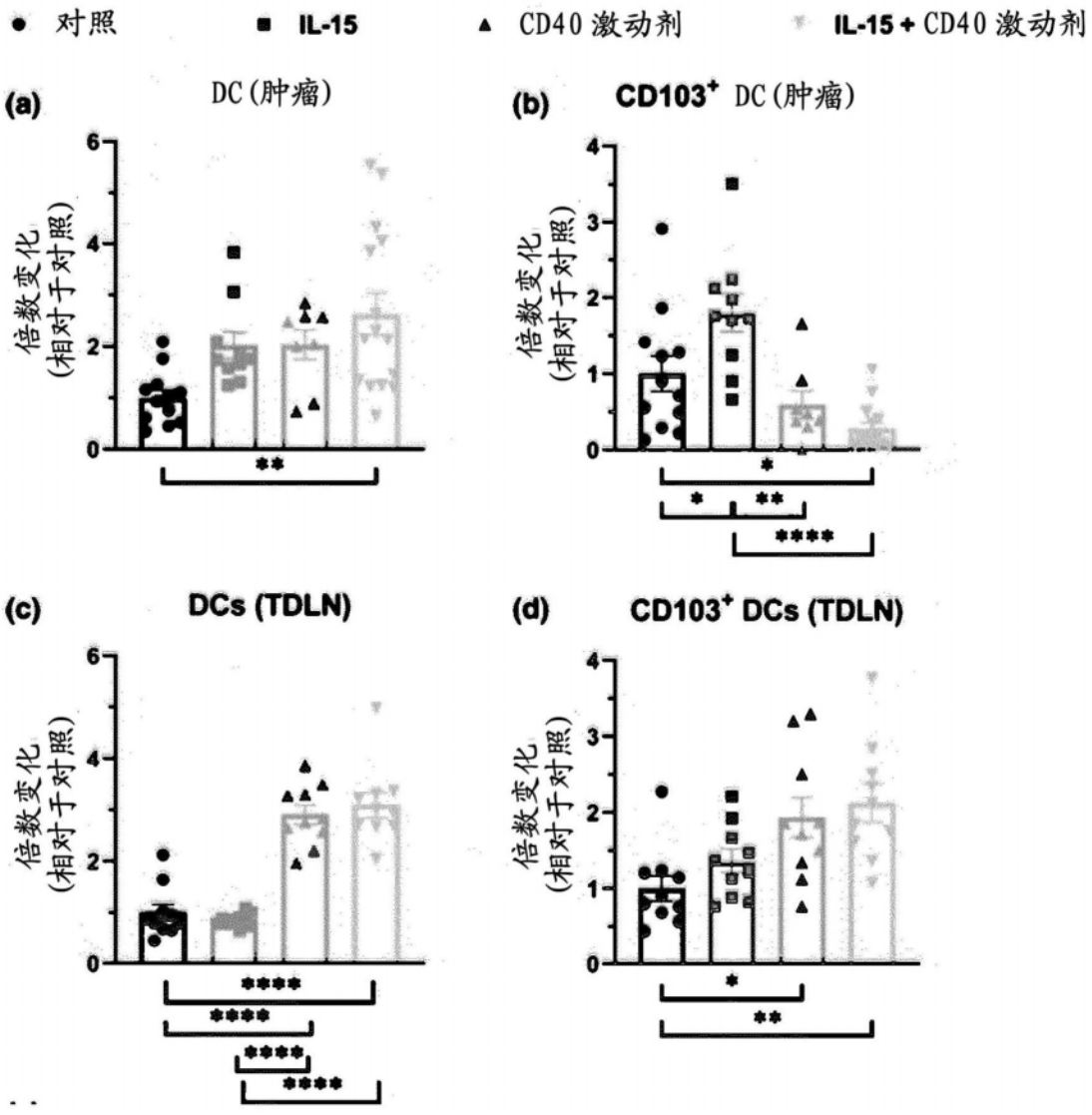

对照
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
(a) DC(肿瘤)
(b) CD103+ DC(肿瘤)
(c) DCs (TDLN)
(d) CD103+ DCs (TDLN)
倍数变化
(相对于对照)

图4

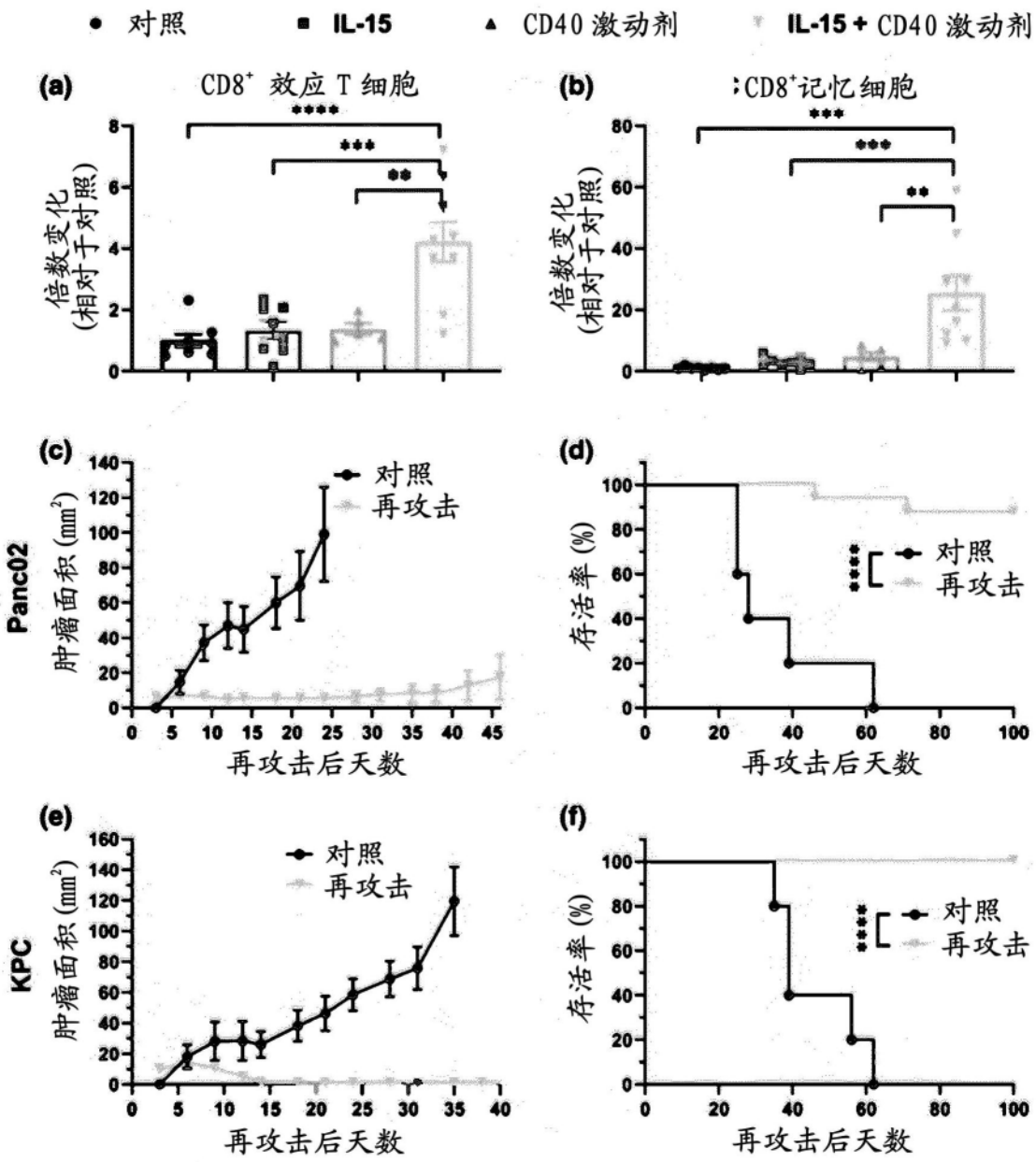

对照
IL-15
CD40 激动剂
IL-15 + CD40 激动剂
(a)
CD8+ 效应 T 细胞
倍数变化 (相对于对照)
(b)
CD8+记忆细胞
倍数变化 (相对于对照)
(c)
Panc02
肿瘤面积 (mm2)
再攻击后天数
(d)
存活率 (%)
再攻击后天数
(e)
KPC
肿瘤面积 (mm2)
再攻击后天数
(f)
存活率 (%)
再攻击后天数

图5