

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-537892

(P2017-537892A)

(43) 公表日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06 Z N A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	
<b>A 6 1 K 38/19 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-523286 (P2017-523286)	(71) 出願人	308031072
(86) (22) 出願日	平成27年10月30日 (2015.10.30)		オンコメッド ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月15日 (2017.6.15)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/058327		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッ
(87) 国際公開番号	W02016/070051		ドウッドシティー チェサピーク ドライ
(87) 国際公開日	平成28年5月6日 (2016.5.6)		ブ 800
(31) 優先権主張番号	62/073, 634	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成26年10月31日 (2014.10.31)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	62/127, 172		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成27年3月2日 (2015.3.2)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	62/192, 133	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成27年7月14日 (2015.7.14)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患の処置のための併用療法

(57) 【要約】

本発明は、免疫反応を調整するため、腫瘍成長を阻害するため、および/またはがんを処置するための併用療法を含む方法を提供する。特に、本発明は、がんおよび他の疾患の処置のために、免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

がんを処置するかまたは腫瘍成長を阻害する方法であって、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターがdelta様リガンド4(DLL4)アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質が免疫療法剤である、方法。

## 【請求項2】

制御性T細胞(Treg)または骨髄由来抑制細胞(MDSC)の活性を阻害する方法であって、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターがdelta様リガンド4(DLL4)アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質が免疫療法剤である、方法。

10

## 【請求項3】

腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法であって、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターがdelta様リガンド4(DLL4)アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質が免疫療法剤である、方法。

## 【請求項4】

腫瘍に対する持続的な免疫応答を誘発するか、活性化するか、または増強する方法であって、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターがdelta様リガンド4(DLL4)アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質が免疫療法剤である、方法。

20

## 【請求項5】

DLL4アンタゴニストが、  
TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、  
YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3)  
を含む重鎖CDR2、および  
RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)  
を含む重鎖CDR3、ならびに  
RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)  
を含む軽鎖CDR1、  
AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および  
QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)  
を含む軽鎖CDR3  
を含む抗体である、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項6】

DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域とSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項7】

Notch受容体アンタゴニストが、  
(i) ヒトNotch2および/もしくはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体、  
または  
(ii) ヒトNotch1の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体  
である、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項8】

Notch受容体アンタゴニストが、  
SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、  
VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)  
を含む重鎖CDR2、および

50

SIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3、ならびに  
RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、

GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、および

QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3

を含む抗体である、請求項1~4または7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域とSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である、請求項1~4、7、または8のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項10】

Notch受容体アンタゴニストが、

RGYWIE (SEQ ID NO:46) を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、

GTNNRAP (SEQ ID NO:50) を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3

を含む抗体である、請求項1~4または7のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項11】

Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:52を含む重鎖可変領域とSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である、請求項1~4、9、または10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

前記抗体が、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG4抗体、単一特異性抗体、二重特異性抗体、または抗原結合部位を含む抗体フラグメントである、請求項5~11のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項13】

DLL4アンタゴニストが、

(a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、および

(b) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位

を含む二重特異性抗体であり、

該第1の抗原結合部位が、

NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3

を含み、

該第2の抗原結合部位が、

TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、

YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3

を含み、かつ

40

50

該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方が、  
 RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)  
 を含む軽鎖CDR1、  
 AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および  
 QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)  
 を含む軽鎖CDR3  
 を含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

DLL4アンタゴニストが、

(a) SEQ ID NO:30の第1の重鎖可変領域、

(b) SEQ ID NO:29の第2の重鎖可変領域、ならびに

(c) SEQ ID NO:12の第1の軽鎖可変領域および第2の軽鎖可変領域

を含む二重特異性抗体である、請求項1~4または13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

免疫療法剤が、PD-1活性のモジュレーター、PD-L1活性のモジュレーター、PD-L2活性のモジュレーター、CTLA-4活性のモジュレーター、CD28活性のモジュレーター、CD80活性のモジュレーター、CD86活性のモジュレーター、4-1BB活性のモジュレーター、OX40活性のモジュレーター、KIR活性のモジュレーター、Tim-3活性のモジュレーター、LAG3活性のモジュレーター、CD27活性のモジュレーター、CD40活性のモジュレーター、GITR活性のモジュレーター、TIGIT活性のモジュレーター、CD20活性のモジュレーター、CD96活性のモジュレーター、IDO1活性のモジュレーター、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーのメンバー、および免疫刺激オリゴヌクレオチドからなる群より選択される、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

免疫療法剤が免疫チェックポイントインヒビターである、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

免疫チェックポイントインヒビターが、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、PD-L2アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、CD80アンタゴニスト、CD86アンタゴニスト、KIRアンタゴニスト、Tim-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、TIGITアンタゴニスト、CD20アンタゴニスト、CD96アンタゴニスト、IDO1アンタゴニスト、またはKIRアンタゴニストである、請求項16記載の方法。

【請求項18】

免疫療法剤が免疫チェックポイント増強物質または刺激物質である、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

免疫チェックポイント増強物質または刺激物質が、CD28アゴニスト、4-1BBアゴニスト、OX40アゴニスト、CD27アゴニスト、CD80アゴニスト、CD86アゴニスト、CD40アゴニスト、またはGITRアゴニストである、請求項18記載の方法。

【請求項20】

免疫療法剤がサイトカインである、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

がん/腫瘍が、肺がん、膵臓がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃腸がん、胃がん(gastric cancer)、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん(stomach cancer)、膀胱がん、頭頸部がん、および肝がんからなる群より選択される、請求項1~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程を含む、請求項1~21のいずれか一項記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 2 3】

少なくとも1種の追加の治療剤が化学療法剤である、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

免疫チェックポイントモジュレーターで処置されている対象のために処置を増強する方法であって、該対象に治療有効量のNotch経路インヒビターを投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 5】

第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答性の可能性があるヒト腫瘍を特定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、該腫瘍から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程を含む、方法。

10

【請求項 2 6】

前記試料が、腫瘍細胞、腫瘍浸潤免疫細胞、間質細胞、およびそれらの任意の組み合わせを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

有効量のNotch経路インヒビターを有効量の免疫療法剤と併用して対象に投与する工程をさらに含む、請求項25または26記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本願は、2014年10月31日に出願された米国仮出願第62/073,634号；2015年3月2日に出願された米国仮出願第62/127,172号；2015年7月14日に出願された米国仮出願第62/192,133；および2015年10月16日に出願された米国仮出願第62/242,567号の優先権の恩典を主張し、これにより、前記仮出願のそれぞれはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、免疫応答を調整するためならびにがんおよび他の疾患を処置するための併用療法を含む方法を提供する。特に、本発明は、DLL4アンタゴニストおよびNotch受容体アンタゴニストを含むNotch経路インヒビターを、がんの処置のための少なくとも1種の免疫療法剤と組み合わせて提供する。

30

【背景技術】

【0003】

発明の背景

がんは、先進諸国における主な死亡原因の一つであり、米国だけで毎年100万人を超える人々ががんと診断され、500,000人が死亡している。全体として、3人に1人より多くが、その生涯のうち何らかの形態のがんを発生させると見積もられる。がんには200より多くの異なるタイプがあり、そのうちの4つ、すなわち乳がん、肺がん、結腸直腸がん、および前立腺がんが、全新規症例の半分以上を超えて占める (Siegel et al., 2012, CA: Cancer J. Clin., 62:10-29 (非特許文献1))。

40

【0004】

シグナル伝達経路は、細胞外のシグナルを核へと接続することで、細胞の成長、分化、生存、および死を直接的または間接的に制御する遺伝子の発現につながる。多種多様ながんにおいて、シグナル伝達経路は調節異常を起こしており、腫瘍のイニシエーションおよび/または進行と関連づけることができる。ヒト腫瘍発生と関係があるとされているシグナル伝達経路には、Wnt経路、Ras-Raf-MEK-ERK経路すなわちMAPK経路、PI3K-AKT経路、CDKN2A/CDK4経路、Bcl-2/TP53経路、およびNotch経路が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0005】

50

Notch経路は、増殖、遊走、平滑筋分化、血管新生、および動脈-静脈分化を含む、血管発生の複数の局面に参与している (Iso et al., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23:543 (非特許文献2))。Notch受容体リガンドDLL4 (Delta様リガンド4) は、Notch経路の重要な構成要素であり、血管新生において役割を果たす。DLL4のヘテロ接合性喪失は、動脈発生および卵黄嚢血管化において重篤な欠陥をもたらし、胚性致死につながる (Duarte et al., 2004, *Genes Dev.*, 18:2474-78 (非特許文献3); Gale et al., 2004, *PNAS*, 101:15949-54 (非特許文献4); Krebs et al., 2004, *Genes Dev.*, 18:2469-73 (非特許文献5))。さらにまた、腫瘍細胞および腫瘍脈管構造は、DLL4を過剰発現することが多く、DLL4発現が腫瘍血管新生において重要な役者であることを示唆する (Patel et al., 2005, *Cancer Res.*, 65:8690-97 (非特許文献6); Yan et al., 2001, *Blood*, 98:3793-99 (非特許文献7))。したがって、DLL4シグナル伝達および/またはNotchシグナル伝達の遮断が、新たな抗がん療法の開発のための有望な道として出現している。

#### 【0006】

例えば抗DLL4抗体によるNotch経路シグナル伝達の遮断は、複数の異なる機序によって腫瘍成長を低減させることが示されている (Ridgway et al., 2006, *Nature*, 444:1083-87 (非特許文献8); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444:1032-37 (非特許文献9); Hoey et al., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-77 (非特許文献10))。例えば、DLL4遮断抗体は、内皮細胞増殖および血管の発生をもたらすが、これらの血管は機能的管腔を欠如していることが報告されている。この血管新生異常の効果は、非機能的な血管の発生によって腫瘍成長を遮断することが報告されている (Ridgway et al., 2006, *Nature*, 444:1083-87 (非特許文献8); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444:1032-37 (非特許文献9); Scehnet et al., 2007, *Blood*, 109:4753-60 (非特許文献11))。追加として、DLL4遮断抗体は、腫瘍細胞の増殖の低減およびがん幹細胞頻度の低減によって、腫瘍成長を阻害することが示されている。がん幹細胞またはCSCの低減の背後にある機序は未知であるが、DLL4が、CSCの自己複製に必要とされ、これらの細胞を未分化状態に維持することが仮定されている (Hoey et al., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-77 (非特許文献10))。

#### 【0007】

腫瘍血管新生因子のシグナル伝達を遮断することを試みる治療アプローチとは異なり、抗ヒトDLL4抗体によるDLL4シグナル伝達の遮断は、内皮の肥厚および非機能的な微小血管の創出をもたらす。結果として、腫瘍血管新生因子の存在下であっても、抗ヒトDLL4抗体の投与を通じたDLL4シグナル伝達の遮断は、腫瘍の成長を支持するために必要とされる機能的な血管形成を誘発する腫瘍の能力を阻害する、血管新生異常をもたらす。

#### 【0008】

免疫療法のための基礎は、自然免疫応答および適応免疫応答の両方を含む、免疫系の操作および/または調整である。免疫療法の一般的な目標は、「外来性作用物質」、例えば病原体または腫瘍細胞に対する免疫応答を制御することによって疾患を処置することである。しかし、いくつかの例では、免疫療法は、身体に通常存在するタンパク質、分子、および/または組織に対する異常な免疫応答から生じる自己免疫疾患を処置するために使用される。免疫療法は、特異的免疫応答を誘発するかもしくは増強する、または特異的な免疫応答を阻害するかもしくは低減させる方法を含みうる。免疫系は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、およびマクロファージを含むがそれらに限定されるわけではない、多数の細胞タイプで構成されている非常に複雑な系である。これらの細胞は、その相互作用および応答を制御するために複雑で繊細な系を所有している。細胞は、チェックにおける応答を保ち、制御されていない免疫応答の結果 (例えば、自己免疫疾患) を可能にしないように、活性化および阻害性両方の機序およびフィードバックループを利用する。

#### 【0009】

一般に、免疫応答は、T細胞受容体 (TCR) による抗原認識を通して開始され、刺激シグナルと阻害シグナルとの間のバランス (すなわち、免疫チェックポイント) によって調節される。正常条件の下では、免疫チェックポイントは、活性化シグナルと阻害シグナルと

10

20

30

40

50

の間のバランスを維持するため、および、免疫系が外来性または病原性の作用物質に対して応答する時には、自己免疫の発生または組織への損傷に対して防護しながら有効な免疫応答の発生を確実にするために必要である。重要な免疫チェックポイント受容体はCTLA-4であり、これは、T細胞上に発現し、制御性T細胞（Treg）上に高発現している。CTLA-4は、阻害分子または免疫応答「ブレーキ」として作用すると考えられ、T細胞活性化の振幅を主に調節する。CTLA-4は、T細胞を活性化するためにTCRと協力して作用する、共刺激受容体CD28の活性を打ち消す。CTLA-4とCD28は、同一のリガンド、すなわちカウンター受容体であるB7-1（CD80）およびB7-2（CD86）を共有し、免疫応答のバランスは、恐らく、リガンドへの結合についてのCTLA-4とCD28との競合を含む。別の重要な免疫チェックポイント受容体はPD-1であり、これは、活性化後のT細胞上に発現し、Treg上に高発現し、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む他の活性化された細胞上に発現している。CTLA-4と同様に、PD-1は、阻害分子および免疫応答に対する「ブレーキ」として作用すると考えられる。PD-1、PD-L1（B7-H1およびCD274としても公知である）、ならびにPD-L2（B7-DCおよびCD273としても公知である）に対して2種のリガンド/カウンター受容体が存在する（Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer, 12:252-264（非特許文献12）を参照されたい）。

10

## 【0010】

がん免疫監視の概念は、免疫系が、腫瘍細胞を認識し、免疫応答を装備し、腫瘍の発生および/または進行を抑制することができるという理論に基づく。しかし、多くの癌性細胞は、腫瘍の阻害されない成長を可能にする、免疫系を免れる機序を発達させていることが明らかである。免疫チェックポイントは、腫瘍によって調節異常とされることができ、免疫耐性機序として使用されるように腫瘍によって操作される可能性がある。癌免疫療法は、腫瘍成長の阻害および/または腫瘍細胞の殺傷についてより有効な応答を達成するために免疫系を活性化および/または高揚することができる作用物質の開発に、焦点を合わせている。

20

## 【0011】

がん処置のための改善された方法、特に、Notch経路インヒビターを免疫療法剤と組み合わせる方法を提供することが、本発明の目的の一つである。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

30

## 【0012】

【非特許文献1】Siegel et al., 2012, CA: Cancer J. Clin., 62:10-29

【非特許文献2】Iso et al., 2003, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 23:543

【非特許文献3】Duarte et al., 2004, Genes Dev., 18:2474-78

【非特許文献4】Gale et al., 2004, PNAS, 101:15949-54

【非特許文献5】Krebs et al., 2004, Genes Dev., 18:2469-73

【非特許文献6】Patel et al., 2005, Cancer Res., 65:8690-97

【非特許文献7】Yan et al., 2001, Blood, 98:3793-99

【非特許文献8】Ridgway et al., 2006, Nature, 444:1083-87

【非特許文献9】Noguera-Troise et al., Nature, 444:1032-37

40

【非特許文献10】Hoey et al., 2009, Cell Stem Cell, 5:168-77

【非特許文献11】Schnet et al., 2007, Blood, 109:4753-60

【非特許文献12】Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer, 12:252-264

## 【発明の概要】

## 【0013】

本発明は、がんなどの疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）を第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質が免疫療法剤である方法を提供する。少なくとも2種の治療剤での併用療法は、異なる作用機序によって働く、および/または異なる経路を標的とする作用物質を使用することが多く、相加効果または相

50

乗効果をもたらさう。併用療法では、各作用物質の用量を、単剤療法で使用される用量より低くすることが可能になり、それによって毒性の副作用が低減し、および/または作用物質の治療係数が増大しう。併用療法では、作用物質に対する耐性が発生する可能性が減少しう。併用療法では、1つの作用物質が、第2の作用物質により増強された活性に対して腫瘍細胞（がん幹細胞を含む）を敏感にすることが可能になりう。免疫療法剤を含む併用療法では、1つの作用物質が腫瘍または腫瘍細胞に対する免疫応答を増強することが可能になり、同時に、第2の作用物質がより直接的に腫瘍細胞を殺傷するのに有効でありう。加えて、各治療剤の投与の順序および/またはタイミングは、薬物併用の有効性全体に影響を及ぼしう。

#### 【0014】

本発明は、Delta様リガンド4（DLL4）アンタゴニストおよびNotch受容体アンタゴニストを含むがそれらに限定されるわけではない、Notch経路インヒビターを提供する。DLL4アンタゴニストには、DLL4に結合する抗体および他のポリペプチド、DLL4に結合する小分子、ならびに可溶性Notchタンパク質が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本明細書において使用する「DLL4アンタゴニスト」には、二重特異性抗体、ヘテロ二量体二重特異性分子、ホモ二量体二重特異性分子、ならびに/または抗DLL4抗体および免疫療法剤を含む二機能性分子が含まれる。Notch受容体アンタゴニストには、Notch1、Notch2、Notch3、および/またはNotch4に結合する抗体および他のポリペプチド、Notch1、Notch2、Notch3、および/またはNotch4に結合する小分子、ならびに可溶性Notchリガンド（DLL1、DLL3、DLL4、Jag1、およびJag2）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本明細書において使用する「Notch受容体アンタゴニスト」には、二重特異性抗体、ヘテロ二量体二重特異性分子、ホモ二量体二重特異性分子、ならびに/または抗Notch抗体および免疫療法剤を含む二機能性分子が含まれる。

#### 【0015】

本発明は、PD-1活性のモジュレーター、PD-L1活性のモジュレーター、PD-L2活性のモジュレーター、CTLA-4活性のモジュレーター、CD28活性のモジュレーター、CD80活性のモジュレーター、CD86活性のモジュレーター、4-1BB活性のモジュレーター、OX40活性のモジュレーター、KIR活性のモジュレーター、Tim-3活性のモジュレーター、LAG3活性のモジュレーター、CD27活性のモジュレーター、CD40活性のモジュレーター、GITR活性のモジュレーター、TIGIT活性のモジュレーター、CD20活性のモジュレーター、CD96活性のモジュレーター、IDO1活性のモジュレーター、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーのメンバー、および免疫刺激オリゴヌクレオチドを含むがそれらに限定されるわけではない、免疫療法剤を提供する。

#### 【0016】

Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）および/または少なくとも1種の追加の免疫療法剤を含む組成物が、提供される。Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤を含む薬学的組成物が、提供される。

#### 【0017】

創薬と開発が進歩するにつれて、特にがん分野において、「1つの薬物がすべての人に適合する」というアプローチが、「個別化医療」戦略にシフトしている。個別化医療戦略は、予後マーカー、薬力学マーカー、および予測マーカーを含むバイオマーカーに基づく処置レジメンを含みう。一般に、予測バイオマーカーは、腫瘍またはがんが、特定の治療用作用物質または作用物質の組み合わせに対して応答性または感受性である見込みを評価し、その1つまたは複数の作用物質の使用から恐らく恩恵を受ける患者の特定および/または選択を可能にしう。本発明は、免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対する応答性についての予測バイオマーカーとして、PD-L1の使用を提供する。また、処置に対して応答性または非応答性の可能性があるとして腫瘍および/またはがんを有する患者を特定および/または選択するために予測バイオマーカーを使用する方法も提供される。免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答性であ

10

20

30

40

50

ると予測および/または特定されている患者を処置するための方法もまた、提供される。

【0018】

一局面において、本発明は、腫瘍成長を阻害する方法を提供する。いくつかの態様では、方法が、腫瘍細胞を有効量のNotch経路インヒビターと、有効量の第2の作用物質と併用して接触させる工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。方法は、インビボまたはインビトロでありうる。一定の態様では、腫瘍が対象中にあり、腫瘍細胞をNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤と接触させる工程が、治療有効量の各作用物質を対象に投与することを含む。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。

10

【0019】

別の局面において、本発明は、がんを処置する方法を提供する。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。

20

【0020】

別の局面において、本発明は、方法を提供する。いくつかの態様では、免疫応答を調整する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、免疫応答が抗腫瘍応答である。いくつかの態様では、免疫応答が、増強されるか、増大されるか、活性化されるか、および/または誘発される。いくつかの態様では、免疫応答の調整がTh1タイプ応答の増大を含む。いくつかの態様では、免疫応答の調整がTh2タイプ応答の減少を含む。いくつかの態様では、免疫応答の調整がTh17タイプ応答の減少を含む。

30

【0021】

別の局面において、本発明は、制御性T細胞(Treg)の活性を阻害する方法を提供する。いくつかの態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Treg活性の阻害が、免疫応答の抑制を阻害することを含む。いくつかの態様では、Treg活性の阻害が、免疫応答の抑制の阻害をもたらす。

40

【0022】

別の局面において、本発明は、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)の活性を阻害する方法を提供する。いくつかの態様では、MDSCの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCの活性を阻害する方法

50

が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSC活性の阻害が、免疫応答の抑制を阻害することを含む。いくつかの態様では、MDSC活性の阻害が、免疫応答の抑制の阻害をもたらす。

【0023】

別の局面において、本発明は、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法を提供する。いくつかの態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。

10

20

【0024】

別の局面において、本発明は、腫瘍に対する持続的または長期の免疫応答を活性化するかまたは増強する方法を提供する。いくつかの態様では、腫瘍に対する持続的な免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する持続的な免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する持続的な免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。

30

【0025】

別の局面において、本発明は、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的または長期の免疫を誘発する方法を提供する。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的な免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的な免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的な免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。

40

【0026】

別の局面において、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターの有効性を増大させる方法を提供する。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターと併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効

50

量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターを投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターを投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターが免疫チェックポイントインヒビターである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターが免疫チェックポイント増強物質または刺激物質である。

【0027】

別の局面において、本発明は、対象において転移を低減させるかまたは防止する方法を提供する。いくつかの態様では、対象において転移を低減させるかまたは防止する方法が、該対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、対象において転移を低減させるかまたは防止する方法が、該対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、対象において転移を低減させるかまたは防止する方法が、該対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストである。

10

【0028】

別の局面において、本発明は、免疫チェックポイントインヒビターで処置されている対象のために処置を増強する方法であって、該対象に治療有効量のNotch経路インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。

20

【0029】

別の局面において、本発明は、対象において抗腫瘍免疫応答を増強するかまたは誘発する方法であって、該対象に治療有効量のNotch経路インヒビターを投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。

30

【0030】

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答性の可能性があるヒト腫瘍を特定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、腫瘍から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の併用処置に対して応答性の可能性があるヒト腫瘍を特定する方法が、a) ヒト腫瘍の試料を取得する工程；b) 試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；ならびにc) PD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での併用処置に対して応答性または非応答性の可能性があるとして腫瘍を特定する工程を含む。

40

【0031】

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対するヒト腫瘍の応答性（または感受性）を決定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a) ヒト腫瘍の試料を取得する工程；(b) 試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；および(c) PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対する腫瘍の応答性を決定する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤と併用したDLL4アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤と併用したNotch受容体アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。

50

【0032】

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるがんを有する患者を特定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a)患者から試料を取得する工程；(b)試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；および(c)PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤と併用したNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答する可能性があるがんを有する患者を特定する工程を含む。

**【0033】**

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置のために腫瘍を有する対象を選択する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、a)対象から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程；b)PD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答性または非応答性の可能性があるとして腫瘍を特定する工程；ならびにc)腫瘍が処置に対して応答性の可能性があるとして特定される場合には、処置のために対象を選択する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。

**【0034】**

別の局面において、本発明は、患者においてがんを処置する方法であって、(a)患者が、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるかどうかを特定する工程であり、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、該特定が(i)患者から試料を取得する段階；(ii)試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する段階；および(iii)PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する段階を含む工程；ならびに(b)処置に対して応答する可能性がある患者に、有効量のNotch経路インヒビターを免疫療法剤と併用して投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法は、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して患者が応答する可能性があるかどうかを特定する工程を含む。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤(例えば化学療法剤)と併用して、患者に投与する工程を含む。

**【0035】**

別の局面において、本発明は、患者においてがんを処置する方法であって、患者に、有効量のNotch経路インヒビターを第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質が免疫療法剤であり；該患者が、該患者由来の試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答すると予測される方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、患者が、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答すると予測される。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤(例えば化学療法剤)と併用して、患者に投与する工程を含む。

**【0036】**

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの有効な処置の可能性を増大させるための方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a)患者が、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答する可能性がある腫瘍を有するかどうかを特定する工程であり、該特定が(i)患者から試料を取得する段階；(ii)試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する段階；および(iii)PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する段階を含む工程；ならびに(b)有効量のNotch経路インヒビターを免疫療法剤と併用し

10

20

30

40

50

て患者に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法は、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して患者が応答する可能性がある腫瘍を有するかどうかを特定する工程を含む。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤（例えば化学療法剤）と併用して、患者に投与する工程を含む。

【0037】

別の局面において、本発明は、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの有効な処置の可能性を増大させるための方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、有効量のNotch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤を患者に投与する工程を含み；該患者が、試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答する可能性があるとして特定される方法を提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、患者が、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるとして特定される。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤（例えば化学療法剤）と併用して、患者に投与する工程を含む。

10

【0038】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、抗体が、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する。いくつかの態様では、抗体が、ヒトDLL4の細胞外ドメインのアミノ酸27~217 (SEQ ID NO:17) 内のエピトープに特異的に結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸66~73 (QAVVSPGP、SEQ ID NO:18) を含むエピトープに結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸139~146 (LISKIAIQ、SEQ ID NO:19) を含むエピトープに結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸66~73 (QAVVSPGP、SEQ ID NO:18) およびアミノ酸139~146 (LISKIAIQ、SEQ ID NO:19) を含むエピトープに結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、約10nM~約0.1nMの解離定数 ( $K_D$ ) でヒトDLL4に結合する。

20

30

【0039】

いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、  
YISCYNGATNYNPKFKG  
(SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:3), または YISVYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3；ならびに/または

RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、

YISSYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3；ならびに

RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

40

50

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および  
 QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)  
 を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

【 0 0 4 0 】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、もしくはSEQ ID NO:11に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

10

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、2007年5月10日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたATCC寄託番号PTA-8425を有するプラスミドによってコードされる抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、2007年5月10日にブタペスト条約の条件下でATCCに寄託されたATCC寄託番号PTA-8427を有するプラスミドDNAによってコードされる抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、2007年9月28日にブタペスト条約の条件下でATCCに寄託されたATCC寄託番号PTA-8670を有するハイブリドマによって産生される抗体のCDRを含む抗体である。いくつかの態様では、抗DLL4抗体がデムシズマブ (OMP-h21M18) である。

20

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含む二重特異性抗体であり、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、  
 DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)  
 を含む重鎖CDR2、および  
 HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1

30

、  
 YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、

RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:30の第1の重鎖可変領域；SEQ ID NO:29の第2の重鎖可変領域；ならびに、SEQ ID NO:12の第1の軽鎖可変領域および第2の軽鎖可変領域を含む二重特異性抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:32の第1の重鎖；SEQ ID NO:31の第2の重鎖；ならびに、SEQ ID NO:33の第1の軽鎖および第2の軽鎖を含む二重特異性抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストがOMP-305B83である。

40

【 0 0 4 3 】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、抗体が、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する。

【 0 0 4 4 】

50

いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合し、SSSGMS (SEQ ID NO:34)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36)を含む重鎖CDR3、ならびに/またはRASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP1 (SEQ ID NO:39)を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。いくつかの態様では、Notch2/3アンタゴニストが、SSSGMS (SEQ ID NO:34)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36)を含む重鎖CDR3、ならびにRASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP1 (SEQ ID NO:39)を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

10

## 【 0 0 4 5 】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:41に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

20

## 【 0 0 4 6 】

いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、2009年7月6日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたATCC寄託番号PTA-10170を有するプラスミドDNAによってコードされる抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、抗Notch2/3抗体タレクスマブ (tarextumab) (OMP-59R5) である。

## 【 0 0 4 7 】

いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、抗体が、Notch1の細胞外ドメインの非リガンド結合膜近位領域に特異的に結合する。いくつかの態様では、Notch1に特異的に結合する抗体が、RGYWIE (SEQ ID NO:46)を含む重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)を含む重鎖CDR2、およびFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)を含む重鎖CDR3、ならびに/またはRSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50)を含む軽鎖CDR2、およびALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、RGYWIE (SEQ ID NO:46)を含む重鎖CDR1、QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)を含む重鎖CDR2、およびFDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)を含む重鎖CDR3、ならびにRSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50)を含む軽鎖CDR2、およびALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

30

40

## 【 0 0 4 8 】

50

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:53に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:52を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

【0049】

いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、2008年10月15日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたATCC寄託番号PTA-9549を有するプラスミドDNAによってコードされる抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、抗Notch1抗体ブロンチクツズマブ (brontictuzumab) (OMP-h52M51) である。

10

【0050】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、Notch経路インヒビターが抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、抗体が組換え抗体である。いくつかの態様では、抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。いくつかの態様では、抗体が、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。一定の態様では、抗体または抗体フラグメントが、一価、単一特異性、二価、二重特異性、または多重特異性である。いくつかの態様では、抗体がIgG1抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG2抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG4抗体である。いくつかの態様では、抗体または抗体フラグメントが二重特異性作用物質の一部である。いくつかの態様では、抗体または抗体フラグメントがヘテロ二量体二重特異性分子の一部である。いくつかの態様では、抗体または抗体フラグメントがホモ二量体二重特異性分子の一部である。一定の態様では、抗体または抗体フラグメントが単離されている。他の態様では、抗体または抗体フラグメントが実質的に純粋である。

20

30

【0051】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、免疫療法剤が、免疫応答を調整する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、抗腫瘍免疫応答を増強する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、細胞媒介性免疫を増大させる作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、T細胞活性を増大させる作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、細胞溶解性T細胞 (CTL) 活性を増大させる作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、NK細胞活性を増大させる作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、免疫応答の抑制を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、サブレッサー細胞またはサブレッサー細胞活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、Treg活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、MDSC活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、阻害性免疫チェックポイント受容体の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-L1および/またはPD-L2の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、CTLA-4の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、CD80および/またはCD86の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、TIGITの活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、KIRの活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、IDO1の活性を阻害する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、活性化免疫チェックポイント

40

50

受容体の活性を増強するかまたは刺激する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、GITRの活性を増強するかまたは刺激する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、OX40の活性を増強するかまたは刺激する作用物質である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、CD40の活性を増強するかまたは刺激する作用物質である。

【0052】

本明細書に記載する方法の態様のいくつかでは、免疫療法剤が、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、PD-L2アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、CD80アンタゴニスト、CD86アンタゴニスト、TIGITアンタゴニスト、KIRアンタゴニスト、Tim-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、CD96アンタゴニスト、CD20アンタゴニスト、またはIDO1アンタゴニストである。いくつかの態様では、PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、PD-1に結合する抗体が、ペムプロリズマブ（KEYTRUDA；MK-3475）、ピジリズマブ（CT-011）、またはニボルマブ（OPDIVO；BMS-936558）である。いくつかの態様では、PD-L1アンタゴニストが、PD-L1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、PD-L1に結合する抗体が、RG7446（MPDL3280A）、デュルバルマブ（MEDI4736）、またはBMS-936559である。いくつかの態様では、CTLA-4アンタゴニストが、CTLA-4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、CTLA-4に結合する抗体が、イピリムマブ（YERVOY）またはトレメリマブ（CP-675,206）である。いくつかの態様では、KIRアンタゴニストが、KIRに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、KIRに結合する抗体がリリルマブである。

10

【0053】

本明細書に記載する方法の態様のいくつかでは、免疫療法剤が、CD28アゴニスト、4-1BBアゴニスト、OX40アゴニスト、CD27アゴニスト、CD80アゴニスト、CD86アゴニスト、CD40アゴニスト、またはGITRアゴニストである。

20

【0054】

本明細書に記載する方法の態様のいくつかでは、免疫療法剤がサイトカインである。いくつかの態様では、サイトカインが、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、または腫瘍壊死因子ファミリーのメンバーである。いくつかの態様では、サイトカインが、IL-2、IL-15、またはインターフェロンである。

【0055】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項に記載する他の局面および態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程を含む。いくつかの態様では、少なくとも1種の追加の治療剤が化学療法剤である。

30

【0056】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項に記載する他の局面および態様では、方法が、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体を、ヒトPD-1に特異的に結合する抗体と併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、デムシズマブを、ペムプロリズマブと併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、デムシズマブを、ペムプロリズマブおよび少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、デムシズマブを、ペムプロリズマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、ヒトDLL4およびヒトVEGFに特異的に結合する二重特異性抗体を、ヒトPD-1に特異的に結合する抗体と併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、OMP-305B83を、ペムプロリズマブと併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、OMP-305B83を、ペムプロリズマブおよび少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、OMP-305B83を、ペムプロリズマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与する工程を含む。

40

【0057】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項に記載する他の局面および態様では、がんが、肺がん、膵臓がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃腸がん、胃がん（gastric cancer）、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、子宮内膜がん、腎臓

50

がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん (stomach cancer)、膀胱がん、頭頸部がん、および肝がんからなる群より選択されるがんである。いくつかの態様では、がんが肺がんである。いくつかの態様では、がんまたはがん細胞がPD-L1を発現する。いくつかの態様では、がんまたはがん細胞がPD-L1を過剰発現する。いくつかの態様では、がんまたはがん細胞がPD-L2を発現する。いくつかの態様では、がんまたはがん細胞がPD-L2を過剰発現する。いくつかの態様では、がんまたはがん細胞が、PD-L1発現のあらかじめ決定されたレベルと比較した際に増大したPD-L1発現のレベルを有する。

【0058】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、腫瘍が、肺腫瘍、膵臓腫瘍、乳房腫瘍、結腸腫瘍、結腸直腸腫瘍、メラノーマ、胃腸腫瘍、胃腫瘍 (gastric tumor)、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸部腫瘍、胃腫瘍 (stomach tumor)、膀胱腫瘍、頭頸部腫瘍、および肝腫瘍からなる群より選択される腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍が肺腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L1を発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L1を過剰発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L2を発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L2を過剰発現する。いくつかの態様では、腫瘍が、PD-L1発現のあらかじめ決定されたレベルと比較した際に増大したPD-L1発現のレベルを有する。

10

【0059】

前述した各局面の一定の態様、ならびに本明細書の他の項で記載する他の局面および態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程をさらに含む。いくつかの態様では、追加の治療剤が化学療法剤である。いくつかの態様では、追加の治療剤が抗体である。

20

【0060】

前述した局面および態様のいくつかでは、方法が、対象または患者から試料を取得する工程を含む。いくつかの態様では、試料が生検試料である。いくつかの態様では、試料が腫瘍由来である。いくつかの態様では、試料が、腫瘍細胞、腫瘍浸潤免疫細胞、間質細胞、およびそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、試料がホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料である。いくつかの態様では、試料が、保存組織、新鮮組織、または凍結組織である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿である。いくつかの態様では、試料におけるPD-L1の発現レベルが、PD-L1のあらかじめ決定された発現レベルと比較される。いくつかの態様では、PD-L1発現のあらかじめ決定された発現レベルが、参照試料、参照腫瘍試料、参照正常組織試料、一連の参照腫瘍試料、または一連の参照正常組織試料におけるPD-L1の発現レベルである。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、免疫組織化学 (IHC) アッセイを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、Hスコア評価を含むアッセイを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、ELISAを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、PD-L1に特異的に結合する抗体を用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1が腫瘍細胞上に検出される。いくつかの態様では、PD-L1が腫瘍浸潤免疫細胞上に検出される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、PCRベースのアッセイを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1が細胞溶解物において検出される。

30

40

【0061】

本明細書に記載する免疫療法剤および薬学的に許容されるビヒクルを含む薬学的組成物と組み合わせて使用される、本明細書に記載するNotch経路インヒビター (例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト) および薬学的に許容されるビヒクルを含む薬学的組成物もまた、提供される。

【0062】

本発明の局面または態様が、マーカッシュ群または他の選択肢の群の形で記載されている場合、本発明は、列挙された群全体をまとめて包含するだけでなく、その群の各メン

50

パーも個別に包含し、主群の考えうる部分群も全て包含し、群のメンバーの1つまたは複数を欠く主群も包含する。本発明はまた、請求項に係る発明における群メンバーのいずれかの1つまたは複数の明示的な排除も、想定している。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】CT26.WT腫瘍由来の細胞におけるPD-1発現に対する抗DLL4抗体の効果。図1A．抗mDLL4抗体21R30、SIRP $\alpha$ -Fcタンパク質、または対照で処置したマウス由来の腫瘍細胞溶解物におけるPD-1レベル。図1B．各処置群の4種の個々の腫瘍由来の代表的なウェスタンブロット解析。

【図2A】腫瘍成長の阻害。CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗mDLL4抗体21R30(- -)、mIL-2-Fc(- -)、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用(- x -)、または対照(- -)で処置した。データを処置後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

10

【図2B】腫瘍成長の阻害。CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗mDLL4抗体21R30(- -)、mIL-2-Fc(- -)、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用(- x -)、または対照(- -)で処置した。データを処置後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

【図2C】KP\_LUN01腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗mDLL4抗体21R30(- -)、mIL-2-Fc(- -)、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用(- x -)、または対照(- -)で処置した。データを処置後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

20

【図3A】NK細胞の細胞傷害アッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。標的細胞(YAC-1細胞またはCT26.WT細胞)を、10 $\mu$ MカルセインAMで標識し、25:1のエフェクター：標的比で脾細胞と混合した。上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。

【図3B】NK細胞の細胞傷害アッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。標的細胞(YAC-1細胞またはCT26.WT細胞)を、10 $\mu$ MカルセインAMで標識し、25:1のエフェクター：標的比で脾細胞と混合した。上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。

30

【図3C】細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したKP\_LUN01腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。標的細胞(YAC-1細胞)を、10 $\mu$ MカルセインAMで標識し、25:1のエフェクター：標的比で脾細胞と混合した。上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。

【図4】T細胞の細胞傷害アッセイ。図4A．細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。脾細胞をAH-1ペプチドで刺激した。標的細胞(CT26.WT細胞)を、10 $\mu$ MカルセインAMで標識し、刺激した脾細胞と混合した。上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。図4B．細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したKP\_LUN01腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。脾細胞を、マイトマイシンで処置したKP\_LUN01細胞で刺激した。標的細胞(KP\_LUN01細胞)を、10 $\mu$ MカルセインAMで標識し、刺激した脾細胞と混合した。上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。

40

【図5】IFN- $\gamma$ についてのELISpotアッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。IFN- $\gamma$ を産生する細胞の数を示す。

【図6】CT26.WT腫瘍におけるCD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞。腫瘍を、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc

50

、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用、または対照で処置したマウスから採取し、単一細胞懸濁液を調製した。細胞を、FACS解析によりCD45発現およびPD-1発現について解析した。

【図7A】CT26.WT腫瘍成長の阻害。CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗mDLL4抗体21R30(- -)、抗PD-L1抗体(- x -)、抗CTLA-4抗体(- -)、抗mDLL4抗体21R30および抗CTLA-4抗体の併用(- \* -)、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-L1抗体の併用(- -)、または対照(- -)で処置した。データを処置後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

【図7B】CT26.WT腫瘍成長の阻害。各処置群由来の個々のマウスからの結果。

【図7C】CT26.WT腫瘍成長の阻害。各処置群由来の個々のマウスからの結果。

【図8A】CT26.WT腫瘍成長の阻害。CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗mDLL4抗体21R30(- -)、抗PD-1抗体(- -)、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用(- -)、または対照(- -)で処置した。データを細胞注射後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

【図8B】CT26.WT腫瘍成長の阻害。各処置群由来の個々のマウスからの結果。

【図9】腫瘍での再攻撃後の処置したマウスにおけるCT26.WT腫瘍成長。抗PD-1抗体(- -)、または抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用(- -)で以前に処置し、その腫瘍が検出不可能なレベルに退縮していたマウスを、CT26.WT腫瘍細胞で再攻撃した。データを再攻撃後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

【図10A】ELISpotおよびELISAアッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、抗PD-1抗体、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用、または対照抗体で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。IFN- $\gamma$ を産生する細胞の数を示す。

【図10B】ELISpotおよびELISAアッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、抗PD-1抗体、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用、または対照抗体で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。IL-2を産生する細胞の数を示す。

【図10C】ELISpotおよびELISAアッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、抗PD-1抗体、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用、または対照抗体で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。IL-17を産生する細胞の数を示す。

【図10D】ELISpotおよびELISAアッセイ。細胞を、抗mDLL4抗体21R30、抗PD-1抗体、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用、または対照抗体で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。産生されたIL-6の量を示す。

【図11】骨髓由来サプレッサー細胞および活性化骨髓細胞のFACS解析。

【図12】メモリーT細胞のFACS解析。

【図13】制御性T細胞(Treg)アッセイ。

【図14】CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害アッセイ。

【図15】CT26.WT腫瘍成長の阻害およびRenca腫瘍成長の阻害。図15A. CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗PD-1抗体(- -)、抗mDLL4抗体21R30および抗mVEGF抗体の併用(- -)、抗mDLL4抗体21R30、抗mVEGF抗体、および抗PD-1抗体の併用(- x -)、または対照(- -)で処置した。データを細胞注射後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。図15B. Renca腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗PD-1抗体(- -)、抗mDLL4抗体21R50および抗mVEGF抗体B20の併用(- x -)、抗mDLL4抗体21R50、抗mVEGF抗体B20、および抗PD-1抗体の併用(- -)、または対照(- -)で処置した。データを細胞注射後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

【図16】セントラルメモリーCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞のFACS解析。

【図17A】腫瘍部位でのサイトカイン発現。

【図17B】腫瘍部位でのサイトカイン発現。

【図18】CT26.WT腫瘍成長の阻害。CT26.WT腫瘍細胞を、Balb/Cマウスに皮下注射した。マウスを、抗Notch2/3抗体59R5(- -)、抗PD-1抗体(- -)、抗Notch2/3抗体59R5および抗PD-1抗体の併用(- -)、または対照(- -)で処置した。データを細胞注射後の日数に対する腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)として示す。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0064】

## 発明の詳細な説明

本発明は、免疫応答、特に抗腫瘍免疫応答を調整する方法、腫瘍成長を阻害する方法、およびがんを処置する方法を提供する。本明細書において提供する方法は、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1活性のモジュレーター、PD-L1活性のモジュレーター、PD-L2活性のモジュレーター、CTLA-4活性のモジュレーター、CD28活性のモジュレーター、CD80活性のモジュレーター、CD86活性のモジュレーター、4-1BB活性のモジュレーター、OX40活性のモジュレーター、KIR活性のモジュレーター、Tim-3活性のモジュレーター、LAG3活性のモジュレーター、CD27活性のモジュレーター、CD40活性のモジュレーター、GITR活性のモジュレーター、TIGIT活性のモジュレーター、CD20活性のモジュレーター、CD96活性のモジュレーター、IDO1活性のモジュレーター、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーのメンバー、および免疫刺激オリゴヌクレオチドを含むが、それらに限定されるわけではない。本発明はまた、免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答性の可能性がある腫瘍を特定する方法であって、腫瘍から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程を含む方法も提供する。本発明は、免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置のために対象または患者を選択する方法であって、対象から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程を含む方法を提供する。

## 【0065】

## 1. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および表現を以下に定義する。

## 【0066】

本明細書において使用する「アンタゴニスト」および「アンタゴニスト性」という用語は、標的および/またはシグナル伝達経路の生物学的活性を部分的にまたは完全に遮断するか、阻害するか、低減させるか、または中和する任意の分子を指す。「アンタゴニスト」という用語は、本明細書においては、タンパク質の活性を部分的にまたは完全に遮断するか、阻害するか、低減させるか、または中和する任意の分子を含むように使用される。適切なアンタゴニスト分子には、アンタゴニスト抗体、抗体フラグメント、可溶性受容体、および小分子が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0067】

本明細書において使用する「アゴニスト」および「アゴニスト性」という用語は、標的および/またはシグナル伝達経路の生物学的活性を直接的または間接的に、実質的に誘発するか、活性化するか、促進するか、増大させるか、または増強する能力を有する作用物質を指すか、または説明する。「アゴニスト」という用語は、本明細書においては、タンパク質の活性を部分的にまたは完全に誘発するか、活性化するか、促進するか、増大させるか、または増強する任意の作用物質を含むように使用される。適切なアゴニストには、具体的に、アゴニスト抗体またはそのフラグメント、可溶性受容体、他の融合タンパク質、および小分子が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0068】

本明細書において使用する「バイオマーカー」という用語は、核酸およびタンパク質、ならびにその変異体およびフラグメントを含みうるが、それらに限定されるわけではない。バイオマーカーは、バイオマーカーをコードする全核酸配列もしくは部分核酸配列を含

むDNA、またはそのような配列の相補物を含みうる。本発明において有用なバイオマーカー核酸は、関心対象の核酸配列のいずれかの全配列または部分配列を含むDNAおよびRNAの両方を含むと考えられる。バイオマーカータンパク質は、バイオマーカータンパク質またはポリペプチドのいずれかの全アミノ酸配列または部分アミノ酸配列を含むと考えられる。

#### 【0069】

本明細書において使用する「抗体」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖質、ポリヌクレオチド、脂質、または前述の組み合わせなどの標的を、免疫グロブリン分子の変領域内の少なくとも1つの抗原結合部位によって認識し、それらに特異的に結合する、免疫グロブリン分子を指す。本明細書において使用する場合は、この用語は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗原結合部位を含む抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvフラグメント）、一本鎖Fv（scFv）抗体、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体、単一特異性抗体、一価抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質、およびその抗体が所望の生物学的活性を呈する限り、抗原結合部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの独自性に基づく5種の主要な免疫グロブリンクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）のいずれかであることができる。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なるよく特徴付けられたサブユニット構造および三次元配置を有する。抗体は、そのままでよいし、限定されるわけではないが、毒素および放射性同位体を含む他の分子にコンジュゲートされてもよい。

10

20

#### 【0070】

本明細書において使用する「抗体フラグメント」という用語は、インタクトな抗体の一部を指し、一般に、インタクトな抗体の抗原決定可変領域または抗原結合部位を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvフラグメント、線状抗体（linear antibody）、一本鎖抗体、および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本明細書において使用する「抗体フラグメント」は、少なくとも1つの抗原結合部位またはエピトープ結合部位を含む。

#### 【0071】

本明細書において使用する抗体の「可変領域」という用語は、単独または組み合わせのいずれかの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖または軽鎖の可変領域は一般に、「超可変領域」としても知られる3つの相補性決定領域（CDR）によって接続された4つのフレームワーク領域からなる。各鎖中のCDRは、フレームワーク領域によって近接した状態にまとめられており、他方の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための技法は少なくとも2つある：（1）異種間の配列可変性に基づくアプローチ（すなわちKabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Edition, National Institutes of Health, Bethesda MD）および（2）抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948）。当技術分野では、これら2つのアプローチの組み合わせを用いて、CDRを決定することもある。

30

40

#### 【0072】

本明細書において使用する「モノクローナル抗体」という用語は、単一の抗原決定基またはエピトープの著しく特異的な認識および結合に関わる均一な抗体集団を指す。これは、典型的には異なる抗原決定基に対する異なる抗体の混合物を含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトな抗体と完全長抗体の両方、ならびに抗体フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、一本鎖（scFv）抗体、抗体の一部を含む融合タンパク質、および少なくとも1つの抗原結合部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらにまた、「モノクローナル抗体」は、限定されるわけではないが、ハイブリドーマ生産、ファージ選択、組換え発現、および

50

トランスジェニック動物を含む、いくつもある技法によって作られた、そのような抗体を指す。

【0073】

本明細書において使用する「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト配列を含有する特異的免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはそのフラグメントである抗体を指す。典型的には、ヒト化抗体は、CDRのアミノ酸残基が、所望の特異性、親和性、および/または結合能を有する非ヒト種（例えばマウス、ラット、ウサギ、またはハムスター）のCDRからのアミノ酸残基により置き換えられているヒト免疫グロブリンである。

【0074】

本明細書において使用する「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生される抗体、または、当技術分野において公知の技法のいずれかを用いて作られる、ヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。

10

【0075】

本明細書において使用する「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、親和性、および/または結合能を有する1つの哺乳動物種（例えばマウス、ラット、ウサギなど）に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域は、別の種（通常はヒト）に由来する抗体中の配列に相同である。

【0076】

本明細書において使用する「親和性成熟抗体」という用語は、1つまたは複数のCDR中に、改変を持たない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つまたは複数の改変を有する抗体を指す。いくつかの例において、改変はフレームワーク領域内になされる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモルの親和性、さらにはピコモルの親和性を有することになる。親和性成熟抗体は、重鎖および軽鎖可変領域シャッフリング、CDRおよび/もしくはフレームワーク残基のランダム変異導入法、またはCDRおよび/もしくはフレームワーク残基の部位指定変異導入法を含む、当技術分野において公知の手法によって産生される。

20

【0077】

「エピトープ」および「抗原決定基」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特定の抗体により認識されて特異的に結合される能力を有する抗原の一部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、連続するアミノ酸からも、タンパク質の三次フォールディングによって並置される不連続なアミノ酸からも形成されうる。連続するアミノ酸から形成されるエピトープ（線状エピトープとも呼ばれる）は、典型的には、タンパク質変性時に保たれるのに対し、三次フォールディングによって形成されるエピトープ（コンフォメーションエピトープとも呼ばれる）は、典型的には、タンパク質変性時に失われる。エピトープは、典型的には、特有の空間的コンフォメーションにある少なくとも3個、より通常は少なくとも5個、または8~10個のアミノ酸を含む。

30

【0078】

本明細書において使用する「選択的に結合する」または「特異的に結合する」という用語は、結合作用物質または抗体が、エピトープ、タンパク質、または標的分子に、無関連のタンパク質または関連するタンパク質を含む代替物質よりも、より高い頻度で、より迅速に、より長い持続時間で、より強い親和性で、または前記の何らかの組み合わせで、反応または会合することを意味する。一定の態様では、「特異的に結合する」が、例えば、抗体が、約0.1 mM以下、しかしより通常は約1  $\mu$ M未満の $K_D$ で標的に結合することを意味する。一定の態様では、「特異的に結合する」が、抗体が、少なくとも約0.1  $\mu$ M以下、少なくとも約0.01  $\mu$ M以下、または少なくとも約1 nM以下の $K_D$ で標的に結合することを意味する。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性ゆえに、特異的結合は、2つ以上の種のタンパク質を認識する抗体を含むことができる。同様に、異なるタンパク質のポリペプチド配列の一定領域内の相同性ゆえに、特異的結合は、2種以上のタンパク質を認識する抗体（または他のポリペプチドもしくは結合作用物質）を含むことができる。一定の態

40

50

様では、第1の標的に特異的に結合する抗体または結合作用物質が、第2の標的に特異的に結合する場合も、特異的には結合しない場合もありうると理解される。したがって、「特異的結合」は、排他的結合、すなわち単一標的への結合を（含むことはできるものの）必ずしも必要とはしない。したがって、抗体は、一定の態様では、2つ以上の標的に特異的に結合しうる。一定の態様では、複数の標的が、抗体上の同じ抗原結合部位によって結合されうる。例えば、抗体は、ある例では、それぞれが2種以上のタンパク質上の同じエピトープに特異的に結合する2つの同一抗原結合部位を含みうる。一定の代替的な態様では、抗体が二重特異性であって、特異性が異なる少なくとも2つの抗原結合部位を含みうる。一般に、結合への言及は特異的結合を意味するが、必ずしもそうとは限らない。

**【0079】**

本明細書において使用する「可溶性受容体」という用語は、可溶型で細胞から分泌されうる、受容体の第1膜貫通ドメインの前にある受容体タンパク質の細胞外フラグメント（またはその一部分）を指す。

**【0080】**

「ポリペプチド」および「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、線状でも分岐していてもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸により中断されていてもよい。これらの用語はまた、天然に修飾された、または介入、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば標識構成要素とのコンジュゲーションによって修飾された、アミノ酸ポリマーも包含する。この定義には、例えば、1つまたは複数のアミノ酸類似体（例えば非天然アミノ酸を含む）、および当技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づきうるため、一定の態様では、ポリペプチドは一本鎖または会合した鎖として存在しうるということが理解される。

**【0081】**

本明細書において使用する「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに、天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣薬を指す。天然アミノ酸は、遺伝コードによってコードされているもの、ならびに、後に修飾されているアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタマート、およびO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」という表現は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造、例えば、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合している炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、修飾されたR基を有しうる（例えばノルロイシン）か、または修飾されたペプチドバックボーンを有しうるが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保つ。「アミノ酸模倣薬」という表現は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

**【0082】**

「ポリヌクレオチド」および「核酸」および「ヌクレオチド配列」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを包含する。ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは修飾塩基、および/またはそれらの類似体、またはDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによって組み込まれうる任意の基質であることができる。

**【0083】**

2つ以上の核酸またはポリペプチドに関して「同一」またはパーセント「同一性」という用語は、比較して、どの保存的アミノ酸置換も配列同一性の一部とみなさずに一致度が最大になるように（必要であればギャップを導入して）整列させた時に、同じであるか、または指定したパーセンテージの同じヌクレオチド残基もしくはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。パーセント同一性は、配列比較用のソフトウェアまたはアルゴリズムによって、または目視検査によって測定することができる。当技術分野では、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用するこ

10

20

30

40

50

とができるさまざまなアルゴリズムおよびソフトウェアがよく知られている。これらには、BLASTおよびBLASTパリエーション、ALIGNおよびALIGNパリエーション、Megalign、Best Fit、GCG Wisconsin Packageなどがあるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、2つの核酸または本発明のポリペプチドが実質的に同一である。すなわち、それらは、比較して、配列比較アルゴリズムを使った測定で、または目視検査による測定で、一致度が最大になるように整列させた時に、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、またいくつかの態様では、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチド残基同一性またはアミノ酸残基同一性を有する。いくつかの態様では、同一性が、当該配列のうち、少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約40~60、少なくとも約60~80ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基長、またはそれらの間の任意の整数値である領域にわたって存在する。いくつかの態様では、同一性が、60~80ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基より長い領域、例えば少なくとも約80~100ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の領域にわたって存在し、いくつかの態様では、比較されている配列、例えばヌクレオチド配列のコード領域の全長にわたって、配列が実質的に同一である。

10

20

30

40

50

#### 【0084】

本明細書において使用する「保存的アミノ酸置換」という用語は、あるアミノ酸残基が、類似する側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられる置換を指す。当技術分野では、類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが規定されており、これには、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ-分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。例えば、フェニルアラニンによるチロシンの置換は保存的置換である。好ましくは、本発明のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたは抗体の、抗原への結合を、抑止しない。抗原結合を排除しないアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当技術分野では周知である。

#### 【0085】

本明細書において使用する「ベクター」という用語は、宿主細胞に、1つまたは複数の関心対象の遺伝子または配列を送達し、通常は、それを発現させる能力を有する、コンストラクトを意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、裸のDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド、またはファージベクター、カチオン性凝集剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクター、およびリポソームに封入されたDNAまたはRNA発現ベクターなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0086】

本明細書において使用する「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物とは、自然には見いだされない形態にあるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物には、それらがもはや自然に見いだされる形態にはない程度にまで精製されたものが含まれる。いくつかの態様では、単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。

#### 【0087】

本明細書において使用する「実質的に純粋」という用語は、少なくとも50%純粋（すなわち不純物を含まない）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である材料を指す。

#### 【0088】

本明細書において使用する「がん」および「がん性」という用語は、細胞の集団が無秩

序な細胞成長を特徴とするような哺乳動物における生理的状态を指すか、そのような生理的状态を記述している。がんの例には、癌腫、芽細胞腫、肉腫、ならびにリンパ腫および白血病などの血液がんなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0089】

本明細書において使用する「増殖性障害」および「増殖性疾患」という用語は、がんのような異常な細胞増殖に関連する障害を指す。

【0090】

本明細書において使用する「腫瘍」および「新生物」という用語は、良性（非がん性）であれ、前がん病巣を含む悪性（がん性）であれ、過剰な細胞成長または細胞増殖がもたらす任意の組織塊を指す。

10

【0091】

本明細書において使用する「転移」という用語は、がんが元の部位から身体の別の領域に伝播または移行して、類似するがん性病巣を新しい場所に発生させる過程を指す。「転移」細胞または「転移性」細胞は概して、近隣細胞との付着接触を失って疾患の原発部位から移動することで、隣接した組織部位に侵入するものである。

【0092】

「がん幹細胞」および「CSC」および「腫瘍幹細胞」および「腫瘍始原細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用され、（1）高い増殖能を有し、（2）非対称細胞分裂を起こして増殖能または発生能が低減している1タイプまたは複数タイプの分化型細胞の子孫を生成させる能力を有し、（3）自己再生または自己維持のために対称細胞分裂を起こす能力を有する、がんまたは腫瘍からの細胞を指す。これらの性質は、免疫不全宿主（例えばマウス）への累代移植時に、腫瘍を形成しえない腫瘍細胞の大部分と比べて、腫瘍またはがんを形成または確立する能力を、がん幹細胞に付与する。がん幹細胞は、自己再生と分化とを無秩序に起こすことで、変異が発生するにつれて経時的に変化する異常細胞タイプを伴う腫瘍を形成する。

20

【0093】

本明細書において使用する「がん細胞」および「腫瘍細胞」という用語は、がんまたは腫瘍または前がん病巣に由来する細胞の全集団を指し、がん細胞集団の大部分を構成する非腫瘍形成性細胞と、腫瘍形成性細胞（がん幹細胞）の両方を包含する。本明細書において使用する「がん細胞」または「腫瘍細胞」という用語は、それらの腫瘍細胞をがん幹細胞とは区別するために、再生し分化する能力を欠く細胞をもつばら指す場合には、「非腫瘍形成性」という用語で修飾される。

30

【0094】

本明細書において使用する「対象」という用語は、特定の処置の受容者となる任意の動物（例えば哺乳動物）を指し、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類動物などを含むが、それらに限定されるわけではない。典型的には、「対象」および「患者」という用語は、ヒト対象に関して、本明細書では互換的に使用される。

【0095】

「薬学的に許容される」という用語は、ヒトを含む動物における使用について、連邦政府、州政府の規制当局によって承認されたかもしくは承認されうる、および/または、米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に掲載されている、作用物質、化合物、分子などを指す。

40

【0096】

「薬学的に許容される賦形剤、担体、またはアジュバント」および「許容される薬学的担体」という表現は、治療剤と一緒に対象に投与することができて、その薬理学的活性を破壊せず、治療効果を送達するのに十分な用量で投与した時に非毒性である、賦形剤、担体、またはアジュバントを指す。一般に、当業者およびFDAは、薬学的に許容される賦形剤、担体、またはアジュバントを、任意の製剤または薬学的組成物の不活性成分であると考える。

【0097】

50

本明細書において使用する「有効量」および「治療有効量」および「治療効果」という用語は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「処置する」のに有効な結合作用物質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小分子、または他の治療剤の量を指す。がんの場合、作用物質（例えば抗体）の治療有効量は、治療効果を有し、したがって、免疫反応を増強し、抗腫瘍反応を増強し、免疫細胞の細胞溶解活性を増大させ、がん細胞の数を低減し、腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、または腫瘍形成能を減少させ、がん幹細胞の数または頻度を低減し、腫瘍サイズを低減し、がん細胞集団を低減し、例えば軟組織および骨へのがんの伝播を含む、周辺臓器へのがん細胞の浸潤を阻害および/または停止し、腫瘍またはがん細胞の転移を阻害および停止し、腫瘍またはがん細胞の成長を阻害および/または停止し、がんに関連する症状の1つまたは複数のある程度は除去し、罹病率および死亡率を低減し、生活の質を改善することができるか、またはそのような効果の組み合わせを起こすことができる。作用物質が、成長を防止し、かつ/または既存のがん細胞を殺す限りにおいて、それを、細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性と呼ぶことができる。

10

#### 【0098】

「処置する」および「処置」および「処置すること」および「軽減する」および「軽減すること」という用語は、1) 診断された病的状態または障害を治し、減退させ、その症状を減らし、かつ/またはその進行を停止させる治療的手段と、2) 標的とする病的状態または障害の発生を防止するか、または遅らせる予防的または防止的手段との両方を指す。したがって、処置を必要とする者には、すでに障害を有する者、障害を患いやすい者、および障害を防止すべき者が含まれる。いくつかの態様では、患者が以下の1つまたは複数を示すのであれば、対象は本発明の方法によってうまく「処置され」ている：免疫反応の増大；抗腫瘍反応の増大；免疫細胞の細胞溶解活性の増大；免疫細胞による腫瘍細胞の死滅の増大；がん細胞の数の低減またはがん細胞の完全な欠如；腫瘍サイズの低減；軟組織および骨へのがん細胞の伝播を含む、周辺臓器へのがん細胞の浸潤の阻害または欠如；腫瘍またはがん細胞の転移の阻害または欠如；がん成長の阻害または欠如；腫瘍成長の阻害または欠如；特定のがんと関連する1つまたは複数の症状の緩和；罹病率および死亡率の低減；生活の質の改善；腫瘍形成性の低減；がん幹細胞の数または頻度の低減；または効果のいくつかの組み合わせ。

20

#### 【0099】

本開示および特許請求の範囲において使用する場合、単数形「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」は、文脈上そうでないことが明らかな場合を除き、複数形を含む。

30

#### 【0100】

本明細書において「を含む(comprising)」という言葉を用いて態様が説明されている場合は常に、「からなる(consisting of)」および/または「から本質的になる(consisting essentially of)」という用語で説明される、それ以外の点では類似する態様も提供されると理解される。また、本明細書において「から本質的になる」という言葉を用いて態様が説明されている場合は常に、「からなる」という用語で説明される、それ以外の点では類似する態様も提供されると理解される。

40

#### 【0101】

本明細書において「Aおよび/またはB」などの表現で使用される「および/または」という用語は、AとBの両方、AまたはB、A(のみ)、およびB(のみ)を含むものとする。同様に、「A、B、および/またはC」などの表現で使用される「および/または」という用語は、以下の態様のそれぞれを包含するものとする：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(のみ)；B(のみ)；ならびにC(のみ)。

#### 【0102】

### II. 使用方法および薬学的組成物

免疫療法剤である第2の作用物質と併用した、本明細書に記載するNotch経路インヒビタ

50

ーは、がんのための免疫療法などの治療的処置法を含むがそれらに限定されるわけではない、さまざまな適用に有用である。一定の態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と、免疫療法剤である第2の作用物質との併用が、免疫応答を活性化する、促進する、増大させる、および/もしくは増強する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍体積を低減させる、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させる、ならびに/または腫瘍の腫瘍形成性を低減させるために有用である。使用方法は、インビトロ、エクスピボ、またはインピボの方法でありうる。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、免疫応答のアゴニストとして作用する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、免疫応答の増強物質、活性化物質、または刺激物質として作用する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、抗腫瘍免疫応答のアゴニストとして作用する。

10

20

30

40

50

**【 0 1 0 3 】**

いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、PD-1/PD-L1経路のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、PD-1またはPD-1活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、PD-L1またはPD-L1活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、CTLA-4経路のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、CTLA-4またはCTLA-4活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、Tim-3またはTim-3活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、LAG3またはLAG3活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、TIGITまたはTIGIT活性のアンタゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、KIRまたはKIR活性のアンタゴニストとして働く。

**【 0 1 0 4 】**

いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、CTLA-4/CD28経路のアゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、CD28またはCD28活性のアゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、4-1BBまたは4-1BB活性のアゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、OX40またはOX40活性のアゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、GITRまたはGITR活性のアゴニストとして働く。いくつかの態様では、Notch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）と免疫療法剤との併用が、CD40またはCD40活性のアゴニストとして働く。

**【 0 1 0 5 】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、腫瘍細胞を有効量のNotch経路インヒビターと、有効量の第2の作用物質と併用して接触させる工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。方法は、インビボまたはインビトロでありうる。一定の態様では、腫瘍が対象中にあり、腫瘍細胞をNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤と接触させる工程が、治療有効量の各作用物質を対象に投与することを含む。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Treg活性を阻害するかまたは抑制することによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、MDSC活性を阻害するかまたは抑制することによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、細胞溶解性細胞活性を増大させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、CD8+細胞溶解性T細胞活性を増大させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、NK細胞活性を増大させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、T細胞上のPD-1発現を減少させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、PD-1発現T細胞の数またはパーセンテージを減少させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、MDSCの数またはパーセンテージを減少させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、活性化骨髄細胞の数またはパーセンテージを増大させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、メモリーT細胞の数またはパーセンテージを増大させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Th1タイプ免疫応答を増大させるかまたは増強することによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IFN- $\gamma$ 産生を増加させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-2産生を増加させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Th17免疫応答を減少させるかまたは阻害することによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-17産生を減少させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Th2タイプ免疫応答を減少させるかまたは阻害することによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-6産生を減少させることによって腫瘍成長を阻害する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

#### 【0106】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、がんを処置する方法が、対象に、治療有

効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Treg活性を阻害するかまたは抑制することによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、MDSC活性を阻害するかまたは抑制することによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、細胞溶解性細胞活性を増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、NK細胞活性を増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、細胞溶解性T細胞活性を増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、CD8+細胞溶解性T細胞活性を増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、T細胞上のPD-1発現を減少させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、PD-1発現T細胞の数またはパーセンテージを減少させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、MDSCの数またはパーセンテージを減少させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、活性化骨髄細胞の数またはパーセンテージを増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、メモリーT細胞の数またはパーセンテージを増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、Th1タイプ免疫応答を増大させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IFN- $\gamma$ 産生を増加させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-2産生を増加させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-17産生を減少させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、IL-6産生を減少させることによってがんを処置する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

#### 【0107】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、がん免疫療法の方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤であり、該併用は、いずれかの作用物質のみの投与と比較した際に増強された治療有効性をもたらす。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

#### 【0108】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗D

LL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

【0109】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Tregによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、Tregによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

10

【0110】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、MDSCの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCの活性を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

20

【0111】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、MDSCによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、MDSCによる免疫応答の抑制を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

30

40

【0112】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する抗原特異的記憶応答を増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は

50

免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

【0113】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、腫瘍に対する持続的または長期の免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する持続的な免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍に対する持続的な免疫応答を活性化するかまたは増強する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

10

【0114】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的または長期の免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的な免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する持続的な免疫を誘発する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

20

30

【0115】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の第2の作用物質と併用して投与する工程を含み、該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、腫瘍再発または腫瘍再成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の第2の作用物質を投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストであり、かつ該第2の作用物質は免疫療法剤である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

40

【0116】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、免疫チェックポイントモジュレーターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターを治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターと併用して投与する工程を含む。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターを

50

投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターの有効性を増大させる方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターを投与する工程を含み、該Notch経路インヒビターはNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターが免疫チェックポイントインヒビターである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターが免疫チェックポイント増強物質または刺激物質である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

10

**【0117】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、免疫チェックポイントモジュレーターで処置されている対象のために処置を増強する方法が、該対象に治療有効量のNotch経路インヒビターを投与する工程を含む。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターで処置されている対象のために処置を増強する方法が、該対象に治療有効量のDLL4アンタゴニストを投与する工程を含む。一定の態様では、免疫チェックポイントモジュレーターで処置されている対象のために処置を増強する方法が、該対象に治療有効量のNotch受容体アンタゴニストを投与する工程を含む。いくつかの態様では、免疫チェックポイントモジュレーターが免疫チェックポイントインヒビターである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターがPD-1アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターが、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターがPD-L1アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターが、PD-L1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターがCTLA-4アンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫チェックポイントインヒビターが、CTLA-4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

20

**【0118】**

いくつかの態様では、腫瘍成長を阻害する方法が、腫瘍または腫瘍細胞をNotch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）および免疫療法剤とインビボで接触させる工程を含む。一定の態様では、腫瘍または腫瘍細胞をNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤と接触させる工程が、動物モデルにおいて着手される。例えば、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤は、腫瘍を有するマウスに投与されうる。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、マウスにおいて免疫細胞の活性を増大させるか、促進するか、かつ/または増強する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、腫瘍の成長を阻害するために動物に投与される。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、腫瘍細胞の動物中への導入と同時または直後に、投与される（防止的モデル）。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、腫瘍細胞が定着して特定のサイズの腫瘍に成長した後に、投与される（治療的モデル）。

30

40

**【0119】**

一定の態様では、腫瘍の成長を阻害する方法が、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビター（例えば、DLL4アンタゴニストまたはNotch受容体アンタゴニスト）および治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含む。一定の態様では、対象がヒトである。一定の態様では、対象が腫瘍を有するか、または腫瘍が除去されている。一定の態様では、腫瘍ががん幹細胞を含む。一定の態様では、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度が、Notch経路インヒビターの投与によって低減される。

**【0120】**

本発明はまた、対象において転移を低減させるかまたは防止する方法であって、該対象

50

に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、転移の低減または防止が、腫瘍の侵襲性を阻害することを含む。一定の態様では、対象がヒトである。一定の態様では、対象が腫瘍を有するか、または腫瘍が除去されている。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

#### 【0121】

加えて、本発明は、対象において腫瘍の腫瘍形成性を低減させる方法であって、該対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。一定の態様では、腫瘍ががん幹細胞を含む。いくつかの態様では、腫瘍の腫瘍形成性が、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減させることによって低減される。一定の態様では、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度が、Notch経路インヒビターの投与によって低減される。いくつかの態様では、腫瘍の腫瘍形成性が、腫瘍細胞のアポトーシスを誘発することによって低減される。いくつかの態様では、腫瘍の腫瘍形成性が、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させることによって低減される。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。

10

20

#### 【0122】

本発明はまた、がん幹細胞を含む腫瘍においてがん幹細胞頻度を低減させる方法であって、対象に、治療有効量のNotch経路インヒビターおよび治療有効量の免疫療法剤を投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗DLL4抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch2/3抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗Notch1抗体である。一定の態様では、免疫療法剤と併用したNotch経路インヒビターが、マウスモデルなどの動物モデルにおいてがん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低減させる能力を有する。一定の態様では、処置された腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度が、処置されていない腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度と比較した際に、少なくとも約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、約50分の1、約100分の1、または約1000分の1に低減される。一定の態様では、がん幹細胞の数または頻度の低減が、動物モデルを用いた限界希釈アッセイによって決定される。

30

#### 【0123】

本明細書に記載する方法のためのいくつかの態様では、Notch経路インヒビターが免疫療法剤の活性を増進する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、以前に免疫療法剤で処置されたことがない対象において免疫療法剤の活性を増進する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、以前に免疫療法剤で処置されたことがある対象において免疫療法剤の活性を増進する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗PD-1抗体の活性を増進する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗PD-L1抗体の活性を増進する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗PD-1抗体の活性を増進する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗PD-L1抗体の活性を増進する。

40

#### 【0124】

本明細書に記載する方法のためのいくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、以前に免疫療法剤で処置されたことがある対象であって、免疫療法剤に対して非感受性または耐性になっている対象において免疫療法剤の活性を増進する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、免疫療法剤の活性に対する対象の感受性を回復する。いくつか

50

の態様では、DLL4アンタゴニストが、抗PD-1抗体に対する対象の感受性を回復する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、抗PD-L1抗体に対する対象の感受性を回復する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、抗PD-1抗体に対する対象の感受性を回復する。いくつかの態様では、Notch受容体が、抗PD-L1抗体に対する対象の感受性を回復する。

【0125】

本明細書に記載する方法のためのいくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、免疫療法剤の活性に対する対象の感受性を増大させる。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、免疫療法剤に対して非感受性であるとみいだされている対象の、免疫療法剤の活性に対する感受性を増大させる。

10

【0126】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答性の可能性があるヒト腫瘍を特定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、腫瘍から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での併用処置に対して応答性の可能性があるヒト腫瘍を特定する方法が、a) ヒト腫瘍の試料を取得する工程；b) 試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；ならびにc) 試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での併用処置に対して応答性または非応答性の可能性があるとして腫瘍を特定する工程を含む。

20

【0127】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対するヒト腫瘍の応答性（または感受性）を決定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a) ヒト腫瘍の試料を取得する工程；(b) 試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；および(c) PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対する腫瘍の応答性を決定する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、方法が、DLL4アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤（例えば化学療法剤）と併用したDLL4アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、Notch受容体アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤（例えば化学療法剤）と併用したNotch受容体アンタゴニストでの処置に対するヒト腫瘍の応答性または感受性を決定する工程を含む。

30

【0128】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるがんを有する患者を特定する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a) 患者から試料を取得する工程；(b) 試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する工程；および(c) PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法が、少なくとも1種の追加の治療剤と併用したNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答する可能性があるがんを有する患者を特定する工程を含む。

40

【0129】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置のために腫瘍を有する対象を選択する方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、a) 対象から取得された試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する工程；b) 試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答性または非応答性の可能性があるとして腫瘍を特定する工程；ならびにc) 腫瘍が処置に対して応答性の可能性があるとして特定される場合には、処置のために対象を選択する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法が、有効量のNotch

50

経路インヒビターを有効量の免疫療法剤と併用して対象に投与する工程をさらに含む。

【0130】

本発明はまた、患者においてがんを処置する方法であって、(a)患者が、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるかどうかを特定する工程であり、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、該特定が(i)患者から試料を取得する段階；(ii)試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する段階；および(iii)PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する段階を含む工程；ならびに(b)処置に対して応答する可能性がある患者に、有効量のNotch経路インヒビターを免疫療法剤と併用して投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法は、追加の治療剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して患者が応答する可能性があるかどうかを特定する工程を含む。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤と併用して、患者に投与する工程を含む。

10

【0131】

本発明はまた、患者においてがんを処置する方法であって、有効量のNotch経路インヒビターを第2の作用物質と併用して該患者に投与する工程を含み、該第2の作用物質が免疫療法剤であり；該患者が、該患者由来の試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答すると予測される方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、患者が、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置に対して応答すると予測される。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤と併用して、患者に投与する工程を含む。

20

【0132】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの有効な処置の可能性を増大させるための方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、(a)患者が、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答する可能性がある腫瘍を有するかどうかを特定する工程であり、該特定が(i)患者から試料を取得する段階；(ii)試料におけるPD-L1の発現レベルを測定する段階；および(iii)PD-L1の発現レベルに基づいて、処置に対して応答する可能性がある患者を特定する段階を含む工程；ならびに(b)有効量のNotch経路インヒビターを免疫療法剤と併用して患者に投与する工程を含む方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、方法は、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して患者が応答する可能性がある腫瘍を有するかどうかを特定する工程を含む。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤と併用して、患者に投与する工程を含む。

30

【0133】

本発明はまた、第2の作用物質と併用したNotch経路インヒビターでの有効な処置の可能性を増大させるための方法であって、該第2の作用物質が免疫療法剤であり、有効量のNotch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤を患者に投与する工程を含み；該患者が、試料におけるPD-L1の発現レベルに基づいて、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤での処置に対して応答する可能性があるとして特定される方法も提供する。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、患者が、化学療法剤と併用したNotch経路インヒビターでの処置に対して応答する可能性があるとして特定される。いくつかの態様では、方法は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を、少なくとも1種の追加の治療剤と併用して、患者に投与する工程を含む。

40

【0134】

50

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、試料が生検試料である。いくつかの態様では、試料が血液または血漿試料である。いくつかの態様では、試料が腫瘍試料である。いくつかの態様では、試料が、腫瘍細胞、腫瘍浸潤免疫細胞、間質細胞、およびそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様では、試料がホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料である。いくつかの態様では、試料が、保存組織、新鮮組織、または凍結組織である。いくつかの態様では、試料におけるPD-L1の発現レベルが、PD-L1のあらかじめ決定された発現レベルと比較される。いくつかの態様では、PD-L1発現のあらかじめ決定された発現レベルが、参照腫瘍試料、参照正常組織試料、一連の参照腫瘍試料、または一連の参照正常組織試料におけるPD-L1の発現レベルである。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、免疫組織化学（IHC）アッセイを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、Hスコア評価を含むアッセイを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、ELISAを用いて決定される。いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、PCRベースのアッセイを用いて決定される。

10

## 【0135】

いくつかの態様では、PD-L1の発現レベルが、PD-L1に特異的に結合する抗体を用いて決定される。いくつかの態様では、ヒトPD-L1に特異的に結合する抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、マウス抗体、ウサギ抗体、ラット抗体、または抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。

## 【0136】

いくつかの態様では、PD-L1が腫瘍細胞上に検出される。いくつかの態様では、PD-L1が腫瘍浸潤免疫細胞上に検出される。いくつかの態様では、腫瘍浸潤免疫細胞がリンパ球である。いくつかの態様では、腫瘍浸潤免疫細胞がT細胞である。いくつかの態様では、PD-L1が抗原提示細胞（APC）上に検出される。いくつかの態様では、PD-L1がマクロファージおよび/または樹状細胞上に検出される。いくつかの態様では、APC、マクロファージ、および/または樹状細胞が、腫瘍微小環境内にある。

20

## 【0137】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、腫瘍が、肺腫瘍、膵臓腫瘍、乳房腫瘍、結腸腫瘍、結腸直腸腫瘍、メラノーマ、胃腸腫瘍、胃腫瘍、腎腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、子宮内膜腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、甲状腺腫瘍、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸部腫瘍、胃腫瘍、膀胱腫瘍、頭頸部腫瘍、および肝臓腫瘍からなる群より選択される腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が乳房腫瘍である。一定の態様では、乳房腫瘍が三種陰性乳房腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍が卵巣腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が肺腫瘍である。一定の態様では、肺腫瘍が非小細胞肺腫瘍である。一定の態様では、肺腫瘍が小細胞肺腫瘍である。一定の態様では、腫瘍が膵臓腫瘍である。いくつかの態様では、腫瘍が腎臓腫瘍である。いくつかの態様では、腎臓腫瘍が腎細胞癌腫である。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L1を発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L1を過剰発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L2を発現する。いくつかの態様では、腫瘍がPD-L2を過剰発現する。いくつかの態様では、腫瘍が、あらかじめ決定されたレベルと比較した際に増大したPD-L1発現のレベルを有する。いくつかの態様では、PD-L1発現の「あらかじめ決定されたレベル」が、正常免疫細胞におけるPD-L1発現の量である。いくつかの態様では、PD-L1発現の「あらかじめ決定されたレベル」が、正常組織におけるPD-L1発現の量である。いくつかの態様では、PD-L1発現の「あらかじめ決定されたレベル」が、類似した腫瘍タイプにおけるPD-L1発現の量である。いくつかの態様では、PD-L1発現の「あらかじめ決定されたレベル」が、腫瘍タイプの混合物におけるPD-L1発現の量である。

30

40

## 【0138】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、がんが、肺がん、膵臓がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃腸がん、胃がん、腎がん、卵巣がん、肝臓がん、子宮内膜がん、腎臓がん、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、胃がん、膀胱がん、頭頸部がん、および肝がんからな

50

る群より選択されるがんである。いくつかの態様では、がんが肺がんである。いくつかの態様では、がんが卵巣がんである。

【 0 1 3 9 】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが抗体である。いくつかの態様では、抗体がモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体がヒト化抗体である。いくつかの態様では、抗体が、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、または抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。いくつかの態様では、抗体が単一特異性抗体である。いくつかの態様では、抗体が二重特異性抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG1抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG2抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG4抗体である。

10

【 0 1 4 0 】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4の細胞外ドメインのアミノ酸27~217 (SEQ ID NO:17) 内のエピトープに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4のN末端領域 (SEQ ID NO:14) 内に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4のアミノ酸66~73 (QAVVSPGP、SEQ ID NO:18) を含むエピトープに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4のアミノ酸139~146 (LISKIAIQ、SEQ ID NO:19) を含むエピトープに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、約10nM~約0.1nMの解離定数 ( $K_D$ ) でヒトDLL4に結合する抗体である。

20

【 0 1 4 1 】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、YISCYNGATNYNQKFKG

30

(SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), または YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3、ならびに / または

RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特

40

異的に結合する抗体であり、該抗体は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、

YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【 0 1 4 2 】

50

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) を含む重鎖CDR2、およびRDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR3、ならびに RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) を含む軽鎖CDR3を含み、免疫療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-L1に特異的に結合する抗体である。

10

## 【0143】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、もしくはSEQ ID NO:11に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:10に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

20

## 【0144】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターが二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体は、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、DINPSNGRRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) を含む重鎖CDR2、およびHYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、

30

YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。

40

## 【0145】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch経路インヒビターが二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体は、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、DINPSNGRRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) を含む重鎖CDR2、およびHYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

50

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、  
YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25)

を含む重鎖CDR2、および  
RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、  
RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および  
QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含み、免疫療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-L1に特異的に結合する抗体である。 10

【0146】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch経路インヒビターが二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体は、ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、SEQ ID NO:30の第1の重鎖可変領域を含み、該第2の抗原結合部位は、SEQ ID NO:29の第2の重鎖可変領域を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位は、SEQ ID NO:12の第1の軽鎖可変領域および第2の軽鎖可変領域を含む。

【0147】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが二重特異性抗体305B83である。 20

【0148】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L2アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCTLA-4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD86アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がKIRアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTim-3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がLAG3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTIGITアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD96アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がIDO1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD28アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤が4-1BBアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がOX40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD27アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり 40 50

、かつ免疫療法剤がCD86アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がGITRアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がサイトカインである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がインターフェロンである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がリンホカインである。

【0149】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1、Notch2、および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2およびNotch3に特異的に結合する抗体である。

【0150】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体であり、該抗体は、SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3、ならびに/または

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3 ; ならびに

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含む。

【0151】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch受容体アゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3 ; ならびに/または

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含み、免疫療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-L1に特異的に結合する抗体である。

【0152】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:41に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約90%、少なくとも約95

10

20

30

40

50

%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:41に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

【0153】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが抗体タレクスツマブ (OMP-59R5) である。

【0154】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L2アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCTLA-4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD86アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がKIRアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTim-3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がLAG3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTIGITアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD96アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がIDO1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD28アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤が4-1BBアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がOX40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD27アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD86アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がGITRアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がサイトカインである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がインターフェロンである。いくつかの態様では、Notch経

10

20

30

40

50

路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がリンホカインである。

【0155】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、RGYWIE (SEQ ID NO:46) を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3、ならびに/または

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50) を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、RGYWIE (SEQ ID NO:46) を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50) を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0156】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、RGYWIE (SEQ ID NO:46) を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3、ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50) を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含み、免疫療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-L1に特異的に結合する抗体である。

【0157】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、該抗体は、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:53に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:53に対して少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SEQ ID NO:52を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域を含む抗体である。

【0158】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが抗体ブロンチクツズマブ (OMP-52M51)

10

20

30

40

50

である。

【0159】

本明細書に記載する方法のいずれかの一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がPD-L2アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCTLA-4アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD86アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がKIRアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTim-3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がLAG3アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がTIGITアンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD96アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がIDO1アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD28アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤が4-1BBアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がOX40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD27アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD80アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD86アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がCD40アゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がGITRアゴニストである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がサイトカインである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がインターフェロンである。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体であり、かつ免疫療法剤がリンホカインである。

【0160】

本発明は、さらに、Notch経路インヒビターを含む組成物および免疫療法剤を含む組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載するDLL4アンタゴニストを含む。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載するDLL4に特異的に結合する抗体を含む。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載するNotch受容体アンタゴニストを含む。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載するNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体を含む。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載するNotch1に特異的に結合する抗体を含む。いくつかの態様では、組成物が、本明細書に記載する免疫療法剤を含む。

【0161】

いくつかの態様では、組成物が、Notch経路インヒビターおよび薬学的に許容されるピ

ヒクルを含む薬学的組成物である。いくつかの態様では、組成物が、免疫療法剤および薬学的に許容されるビヒクルを含む薬学的組成物である。薬学的組成物は、ヒト患者における免疫応答、特に腫瘍に対する免疫応答の調整において用途を見いだす。薬学的組成物は、ヒト患者における腫瘍細胞成長の阻害において用途を見いだす。薬学的組成物は、ヒト患者におけるがんの処置において用途を見いだす。薬学的組成物は、本明細書に記載する方法のいずれかにおいて用途を見いだす。いくつかの態様では、本明細書に記載するNotch経路インヒビターが、少なくとも1種の免疫療法剤と併用したがんの処置用の薬剤の製造において用途を見いだす。いくつかの態様では、本明細書に記載するDLL4アンタゴニストが、少なくとも1種の免疫療法剤と併用したがんの処置用の薬剤の製造において用途を見いだす。いくつかの態様では、本明細書に記載するNotch受容体アンタゴニストが、少なくとも1種の免疫療法剤と併用したがんの処置用の薬剤の製造において用途を見いだす。

10

#### 【0162】

本発明の治療剤を薬学的に許容される担体、賦形剤、および/または安定剤と、滅菌凍結乾燥粉末、水溶液などとして組み合わせることによって、製剤および/または薬学的組成物を保存および使用のために調製する (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London)。当業者は、一般に、薬学的に許容される担体、賦形剤、および/または安定剤を、製剤または薬学的組成物の不活性成分であると考ええる。

#### 【0163】

適切な担体、賦形剤、または安定剤は、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの非毒性緩衝剤；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド（約10アミノ酸残基未満など）；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンなどの糖質；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体（例えばZnタンパク質複合体）；ならびに/またはポリソルバート（TWEEN）もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

20

30

#### 【0164】

治療用製剤は、単位剤形であることができる。そのような製剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、水もしくは非水性媒体中の溶液もしくは懸濁液、または、経口、非経口、もしくは直腸投与のため、もしくは吸入による投与のための坐剤が含まれる。錠剤などの固体組成物において、主要な活性成分は薬学的担体と混合されている。本明細書に記載する場合、薬学的担体は、製剤または組成物の不活性成分であると考えられる。従来の錠剤化成分には、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガム、および、本発明の化合物またはその非毒性の薬学的に許容される塩の均一混合物を含有する固体の製剤前 (pre-formulation) 組成物を形成するための他の希釈剤（例えば水）が含まれる。次いで、固体の製剤前組成物を、上記のタイプの単位剤形に細分する。新規組成物の錠剤、丸剤などは、長期の作用の利点をもたらす剤形を提供するために、コーティングするかまたは他の形で調合することができる。例えば、錠剤または丸剤は、外部構成要素によって覆われた内部組成物を含むことができる。さらにまた、2つの構成要素を、崩壊に抵抗するように働き、内部組成物が無傷で胃を通過するかまたは放出が遅延されることを可能にする腸溶層によって分離することができる。いくつかのポリマー酸、ならびに、ポリマー酸とシェラック、セチルアルコール、および酢酸セルロースなどの材料との混合物を

40

50

含むさまざまな材料を、そのような腸溶層またはコーティングのために使用することができる。

【0165】

薬学的製剤は、リポソームと複合体化されたNotch経路インヒビターおよび/または本発明の免疫療法剤を含みうる。リポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジリエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物との逆相蒸発によって生成することができる。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを生じるために、画定された孔サイズのフィルターを通して押し出し成形される。

【0166】

Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤はまた、マイクロカプセルに封入することもできる。そのようなマイクロカプセルは、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルによって、それぞれ、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, 2012, Pharmaceutical Press, Londonに記載されているようなコロイド状薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)においてまたはマクロエマルジョンにおいて、調製される。

【0167】

加えて、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤を含む徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の適切な例は、作用物質を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、該マトリクスは、成形物品(例えばフィルムまたはマイクロカプセル)の形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)などのヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成されている注射可能なマイクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、スクロースアセタートイソブチレート、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

【0168】

Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤は、公知の方法にしたがって、適当な薬学的組成物としてヒト患者に投与される。薬学的組成物は、局所処置または全身処置のいずれかのための任意の数のやり方で投与することができる。投与の適切な方法には、静脈内(ボラスとしてのもしくはある期間にわたる連続注入による投与)、動脈内、筋肉内(注射もしくは注入)、腫瘍内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液包内、頭蓋内(例えばクモ膜下腔内もしくは脳室内)、または経口が含まれるが、それらに限定されるわけではない。加えて、投与は、局所(例えば、経皮貼付剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液体および粉末剤)または肺(例えば、ネブライザーによるものを含む、粉末剤もしくはエアロゾルの吸入または吹送による;気管内、鼻内、表皮性および経皮)であることができる。

【0169】

疾患の処置のために、本発明の免疫療法剤と併用するNotch経路インヒビターの適当な投薬量は、処置されるべき疾患のタイプ、疾患の重篤度および経過、疾患の応答性、インヒビターが治療目的で投与されるかまたは予防目的で投与されるか、事前の療法、患者の臨床歴などに依存し、すべてが処置する医師の自由裁量である。Notch経路インヒビターは、一度にもしくは数日から数か月にわたる一連の処置として、または、治癒がもたらされるかもしくは疾患状態の減退が達成される(例えば腫瘍サイズの低減)まで投与することができる。免疫療法剤は、一度にもしくは数日から数か月にわたる一連の処置として、または、治癒がもたらされるかまたは疾患状態の減退が達成される(例えば腫瘍サイズの低減)まで投与することができる。各作用物質のための最適な投薬スケジュールは、患者の身体における薬物蓄積の測定値から算出することができ、個々の作用物質の相対的な効

10

20

30

40

50

力に依存して変動することになる。投与する医師は、最適投薬量、投薬方法論、および反復率を決定することができる。

【0170】

いくつかの態様では、併用投与が、単一の薬学的製剤における共投与を含む。いくつかの態様では、併用投与が、別個の製剤の使用、および、いずれかの順序であるが、一般にすべての活性作用物質がその生物学的活性を同時に発揮することができる期間内での連続的投与を含む。いくつかの態様では、併用投与が、別個の製剤の使用および時間差投薬レジメンを含む。いくつかの態様では、併用投与が、別個の製剤の使用および特定の順序での投与を含む。いくつかの態様では、併用投与が、別個の製剤の使用、ならびに、特定の順序および時間差投薬レジメンでの作用物質の投与を含む。

10

【0171】

一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が、約0.01  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約0.1  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約1  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約1mg ~ 約80mg/kg体重、約10mg ~ 約100mg/kg体重、約10mg ~ 約75mg/kg体重、または約10mg ~ 約50mg/kg体重である。一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が約0.01mg ~ 約10mg/kg体重である。一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が約0.01mg ~ 約5mg/kg体重である。一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が約0.05mg ~ 約5mg/kg体重である。一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が約0.1mg ~ 約20mg/kg体重である。一定の態様では、Notch経路インヒビターの投薬量が約0.5mg ~ 約10mg/kg体重である。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、約2mg/kg ~ 約15mg/kgの投薬量で対象に投与される。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、約5mg/kg ~ 約15mg/kgの投薬量で対象に投与される。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、毎日、毎週、毎月、または毎年、1回またはそれより多く投与される。一定の態様では、Notch経路インヒビターが1週間ごとに1回投与される。一定の態様では、Notch経路インヒビターが2週間ごとに1回投与される。一定の態様では、Notch経路インヒビターが3週間ごとに1回投与される。一定の態様では、Notch経路インヒビターが4週間ごとに1回投与される。

20

【0172】

一定の態様では、免疫療法剤の投薬量が、約0.01  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約0.1  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約1  $\mu\text{g}$  ~ 約100mg/kg体重、約1mg ~ 約80mg/kg体重、約10mg ~ 約100mg/kg体重、約10mg ~ 約75mg/kg体重、または約10mg ~ 約50mg/kg体重である。一定の態様では、免疫療法剤の投薬量が約0.01mg ~ 約10mg/kg体重である。一定の態様では、免疫療法剤の投薬量が約0.01mg ~ 約5mg/kg体重である。一定の態様では、免疫療法剤の投薬量が約0.05mg ~ 約10mg/kg体重である。一定の態様では、免疫療法剤の投薬量が約0.1mg ~ 約20mg/kg体重である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、約2mg/kg ~ 約15mg/kgの投薬量で対象に投与される。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、約5mg/kg ~ 約15mg/kgの投薬量で対象に投与される。一定の態様では、免疫療法剤が、毎日、毎週、毎月、または毎年、1回またはそれより多く投与される。一定の態様では、免疫療法剤が1週間に2回投与される。一定の態様では、免疫療法剤が1週間ごとに1回投与される。一定の態様では、免疫療法剤が2週間ごとに1回投与される。一定の態様では、免疫療法剤が3週間ごとに1回投与される。一定の態様では、免疫療法剤が4週間ごとに1回投与される。

30

40

【0173】

いくつかの態様では、免疫療法剤の投薬量が、当業者（例えば、処置する医師）により特定の作用物質について「標準治療」と考えられるものによって決定される。

【0174】

いくつかの態様では、インヒビターが、その後に1回または複数回のより低い用量が続く、初回のより高い「負荷」用量で投与されうる。いくつかの態様では、投与の頻度もまた、変化しうる。いくつかの態様では、投薬レジメンが、その後に1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、または1か月ごとに1回の追加用量（または「維持」用量）が続く、初回用量の投与を含みうる。例えば、投薬レジメンは、その後に例えば初回用量の半分の毎週

50

の維持用量が続く、初回負荷用量の投与を含みうる。または、投薬レジメンは、その後例えば1週間おきの初回用量の半分の維持用量が続く、初回負荷用量の投与を含みうる。または、投薬レジメンは、その後例えば1週間おきの同じ量の維持用量が続く、3週間にわたる3回の初回用量の投与を含みうる。

【0175】

当業者に公知であるように、いずれの治療剤の投与も、副作用および/または毒性につながりうる。いくつかの場合には、副作用および/または毒性があまりに重篤であるために、治療有効用量での特定の作用物質の投与ができない。いくつかの場合には、薬物療法を中断しなければならず、他の作用物質が試されるかもしれない。しかし、同じ治療クラスの中の多くの作用物質は、類似する副作用および/または毒性を示すことが多く、患者は、治療を停止するか、またはもし可能であれば、治療剤に伴う不快な副作用を辛抱するかのいずれかでなければならないことになる。

10

【0176】

本発明は、対象においてがんを処置する方法であって、2種以上の作用物質を投与するための投薬戦略を使用する工程を含み、それが、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤の投与に伴う副作用および/または毒性を低減しうる方法を提供する。いくつかの態様では、ヒト対象においてがんを処置するための方法が、対象に、治療有効用量の免疫療法剤と併用して治療有効用量のNotch経路インヒビターを投与する工程を含み、ここで、インヒビターの1つまたは両方は、間欠的投薬戦略にしたがって投与される。いくつかの態様では、間欠的投薬戦略が、初回用量のNotch経路インヒビターを対象に投与する工程、および、後続用量のNotch経路インヒビターを約2週間に1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬戦略が、初回用量のNotch経路インヒビターを対象に投与する工程、および、後続用量のNotch経路インヒビターを約3週間に1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、間欠的投薬戦略が、初回用量のNotch経路インヒビターを対象に投与する工程、および、後続用量のNotch経路インヒビターを約4週間に1回投与する工程を含む。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、間欠的投薬戦略を用いて投与され、免疫療法剤が、週に1回、2週間毎に1回、または3週間毎に1回投与される。

20

【0177】

2種以上の治療剤での併用療法は、異なる作用機序によって働く作用物質を使用することが多いが、これが必要なわけではない。異なる作用機序を有する作用物質を用いる併用療法は、相加効果または相乗効果をもたらしうる。併用療法では、各作用物質の用量を、単剤療法で使用される用量より低くすることが可能になり、それによって毒性の副作用が低減し、および/または作用物質の治療係数が増大しうる。併用療法では、耐性がん細胞が発生する可能性が減少しうる。免疫療法剤を含む併用療法により、1種の作用物質が腫瘍または腫瘍細胞に対する免疫反応を向上させることができ、その一方で第二の作用物質は、腫瘍細胞をより直接的に死滅させることにおいて有効であり得る。

30

【0178】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の併用が、相加的または相乗的な結果をもたらす。いくつかの態様では、併用療法が、Notch経路インヒビターの治療係数の増大をもたらす。いくつかの態様では、併用療法が、免疫療法剤の治療係数の増大をもたらす。いくつかの態様では、併用療法が、Notch経路インヒビターの毒性および/または副作用の減少をもたらす。いくつかの態様では、併用療法が、免疫療法剤の毒性および/または副作用の減少をもたらす。

40

【0179】

処置する医師は、測定された滞留時間および体液または組織中の薬物の濃度に基づいて、投薬についての反復率を見積もることができる。治療の進捗は、従来の技法およびアクセスによってモニタリングすることができる。

【0180】

一定の態様では、免疫療法剤と併用してNotch経路インヒビターを投与する工程に加えて、処置法が、Notch経路インヒビターおよび/または免疫療法剤の投与の前に、それと

50

並行して、および/またはその後少なくとも1種の追加の治療剤を投与する工程を、さらに含む。

【0181】

いくつかの態様では、追加の治療剤が、Notch経路インヒビターまたは免疫療法剤と実質的に同時にまたは並行して投与されることになる。例えば、対象は、追加の治療剤（例えば化学療法剤）での処置クールを受けながら、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤を与えられうる。一定の態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、追加の治療剤での処置の1年以内に投与されることになる。一定の代替態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、追加の治療剤での任意の処置の10、8、6、4、または2か月以内に投与されることになる。一定の他の態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、追加の治療剤での任意の処置の4、3、2、または1週間以内に投与されることになる。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、追加の治療剤での任意の処置の5、4、3、2、または1日以内に投与されることになる。作用物質または処置が、Notch経路インヒビターまたは免疫療法剤とほんの数時間または数分のうちに（すなわち実質的に同時に）対象に投与されることが、さらに理解されるであろう。

10

【0182】

Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤と併用して投与されうる治療剤は、化学療法剤を含む。したがって、いくつかの態様では、方法または処置が、化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルと併用したNotch経路インヒビターおよび本発明の免疫療法剤の投与を含む。Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置は、化学療法の投与の前に、それと並行して、またはその後に行うことができる。そのような化学療法剤についての調製および投薬スケジュールは、製造者の説明書にしたがって、または熟練した医療実務者が経験的に決定するように使用することができる。そのような化学療法についての調製および投薬スケジュールは、Chemotherapy Service, 1992, M. C. Perry, Editor, Williams & Wilkins, Baltimore, MDにも記載されている。

20

【0183】

本発明において有用な化学療法剤にはまた、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホナート、例えばブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン（methylamelamines）；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（chlorophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabycin）、カミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗物質、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリ

30

40

50

ジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5-FU；アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオナート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎薬（antiadrenal）、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えばフロリン酸（frolinic acid）；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジコン；エルフォルミチン（elformithine）；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキサソ；シゾフラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体または白金複合体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；xeloda；イバンドロナート；CPT11；トポイソメラーゼインヒビター-RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン；カベシタピン；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も含まれるが、それらに限定されるわけではない。化学療法剤にはまた、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェンを例えば含む抗エストロゲン；ならびに、抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0184】

一定の態様では、化学療法剤がトポイソメラーゼインヒビターである。トポイソメラーゼインヒビターは、トポイソメラーゼ酵素（例えばトポイソメラーゼIまたはII）の作用を妨害する化学療法剤である。トポイソメラーゼインヒビターには、ドキシソルピシンHCl、クエン酸ダウノルピシン、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシド（VM-26）、およびイリノテカンが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0185】

一定の態様では、化学療法剤が代謝拮抗物質である。代謝拮抗物質は、正常な生化学反応に必要とされる代謝産物に類似しているが、細胞分裂などの1つまたは複数の正常な細胞の機能を妨害しうるほど異なる構造を有する化学物質である。代謝拮抗物質には、ゲムシタピン、フルオロウラシル、カベシタピン、メトトレキサートナトリウム、ラルイトレキセド（ralitrexed）、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザシチジン、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリピン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0186】

一定の態様では、化学療法剤が、チューブリンに結合する作用物質を含むがそれらに限定されるわけではない、抗有糸分裂作用物質である。いくつかの態様では、作用物質がタキサールである。一定の態様では、作用物質が、パクリタキセルもしくはドセタキセル、または、パクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体である。一定の態様では、作用物質が、パクリタキセル（TAXOL）、ドセタキセル（TAXOTERE）、アルブミン結合パクリタキセル（nab-パクリタキセル；ABRAXANE）、DHA-パクリタキセル、またはPG-パクリタキセルである。一定の代替態様では、抗有糸分裂作用物

質が、ピンカルカロイド、例えばピンクリスチン、ピンプラスチン、ピノレルピン、もしくはピンデシン、または、それらの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体を含む。いくつかの態様では、抗有糸分裂作用物質が、キネシンEg5のインヒビター、または、Aurora AもしくはPlk1などの有糸分裂キナーゼのインヒビターである。

【0187】

いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、免疫チェックポイントインヒビターおよび少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、抗DLL4抗体が、抗PD-1抗体および少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、ペムプロリズマブおよび少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、ペムプロリズマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、肺がんの処置のために、ペムプロリズマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、NSCLCの処置のために、ペムプロリズマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、ニボルマブおよび少なくとも1種の化学療法剤と併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、ニボルマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、肺がんの処置のために、ニボルマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。いくつかの態様では、デムシズマブが、NSCLCの処置のために、ニボルマブ、カルボプラチン、およびペメトレキセドと併用して投与される。

10

20

【0188】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤と併用して投与される追加の治療剤が、小分子などの作用物質である。例えば、処置は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の、EGFR、HER2 (ErbB2)、および/またはVEGFを含むがそれらに限定されるわけではない腫瘍関連タンパク質に対するインヒビターとして作用する小分子との併用投与を含むことができる。いくつかの態様では、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤が、ゲフィチニブ (IRESSA)、エルロチニブ (TARCEVA)、スニチニブ (SUTENT)、ラパタニブ (lapatanib)、パンデタニブ (ZACTIMA)、AEE788、CI-1033、セジラニブ (RECENTIN)、ソラフェニブ (NEXAVAR)、メレレチニブ (AZD9291)、およびパゾパニブ (GW786034B) からなる群より選択されるタンパク質キナーゼインヒビターと併用して投与される。いくつかの態様では、追加の治療剤がmTORインヒビターを含む。

30

【0189】

いくつかの態様では、追加の治療剤が、抗体などの生体分子を含む。例えば、処置は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の、EGFR、HER2/ErbB2、および/またはVEGFに結合する抗体を含むがそれらに限定されるわけではない、腫瘍関連タンパク質に対する抗体との併用投与を含むことができる。一定の態様では、追加の治療剤が、がん幹細胞マーカーに特異的な抗体である。一定の態様では、追加の治療剤が、がん幹細胞経路を阻害する抗体である。一定の態様では、追加の治療剤が、血管新生インヒビターである抗体 (例えば、抗VEGFまたはVEGF受容体抗体) である。一定の態様では、追加の治療剤が、ペバシズマブ (AVASTIN)、ラムシルマブ、トラスツズマブ (HERCEPTIN)、ペルツズマブ (OMNITARG)、パニツムマブ (VECTIBIX)、ニモツズマブ、ザルツムマブ、またはセツキシマブ (ERBITUX) である。

40

【0190】

さらにまた、処置は、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の、1種または複数種のサイトカイン (例えば、リンホカイン、インターロイキン、腫瘍壊死因子、および/または成長因子) などの他の生体分子との併用投与を含むことができるか、または、腫瘍の外科的除去、がん細胞の除去、もしくは処置する医師が必要とみなす任意の他の療法を伴うことができる。

【0191】

いくつかの態様では、処置が、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の、アドレノ

50

メデュリン (AM)、アンジオポエチン (Ang)、BMP、BDNF、EGF、エリスロポエチン (EPO)、FGF、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GDF9、HGF、HDGF、IGF、遊走刺激因子、ミオスタチン (GDF-8)、NGF、ニューロトロフィン、PDGF、トロンボポエチン、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF、PIGF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、およびIL-18からなる群から選択されるが、それらに限定されるわけではない成長因子との併用投与を含むことができる。

#### 【0192】

一定の態様では、処置が、Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤の、放射線療法との併用投与を含むことができる。Notch経路インヒビターおよび免疫療法剤での処置は、放射線療法の施与の前に、それと並行して、またはその後に行うことができる。そのような放射線療法についての施行スケジュールは、熟練した医療実務者が決定することができる。

10

#### 【0193】

##### III. Notch経路インヒビター

本発明は、免疫療法剤である第2の作用物質と併用した、免疫応答を調整する方法における、腫瘍成長を阻害する方法における、および/またはがんを処置する方法における使用のための、本明細書に記載するNotch経路インヒビターを提供する。

#### 【0194】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターがDLL4アンタゴニストである。DLL4アンタゴニストは、本明細書において「DLL4結合作用物質」と呼ぶことができる。一定の態様では、DLL4結合作用物質がヒトDLL4に特異的に結合する。一定の態様では、DLL4結合作用物質が、DLL4に特異的に結合することに加えて、少なくとも1種の追加の標的または抗原に特異的に結合する。いくつかの態様では、DLL4結合作用物質がポリペプチドである。いくつかの態様では、DLL4結合作用物質が抗体である。一定の態様では、DLL4結合作用物質が二重特異性抗体である。一定の態様では、DLL4結合作用物質がヘテロ二量体二重特異性分子である。いくつかの態様では、DLL4結合作用物質がホモ二量体二重特異性分子である。いくつかの態様では、DLL4結合作用物質が、DLL4結合作用物質および免疫療法剤を含む二機能性分子である。

20

#### 【0195】

一定の態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4の細胞外ドメインのアミノ酸27~217 (SEQ ID NO:17) 内のエピトープに特異的に結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のN末端領域 (SEQ ID NO:14) 内に特異的に結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸66~73 (QAVVSPGP; SEQ ID NO:18) を含むエピトープに結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸139~146 (LISKIAIQ; SEQ ID NO:19) を含むエピトープに結合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4のアミノ酸66~73 (QAVVSPGP; SEQ ID NO:18) およびアミノ酸139~146 (LISKIAIQ; SEQ ID NO:19) を含むエピトープに結合する。

30

#### 【0196】

一定の態様では、DLL4アンタゴニスト (例えば抗体) がヒトDLL4に、約1 $\mu$ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下の解離定数 ( $K_D$ ) で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下の $K_D$ で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約1nMの $K_D$ で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約0.8nMの $K_D$ で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約0.6nMの $K_D$ で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約0.5nMの $K_D$ で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約0.4nMの $K_D$ で結合する。いくつかの態様では、 $K_D$ が表面プラズモン共鳴によって測定される。いくつかの態様では、DLL4に対するアンタゴニストの解離定数が、Biacoreチップ上に固定化されたDLL4細胞

40

50

外ドメインを含むDLL4融合タンパク質（例えばDLL4 ECD-Fc融合タンパク質）を用いて決定される解離定数である。

【0197】

一定の態様では、DLL4アンタゴニスト（例えば抗体）がDLL4に、約1  $\mu$ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下の最大半減有効濃度（EC<sub>50</sub>）で結合する。一定の態様では、DLL4アンタゴニストがヒトDLL4に、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下のEC<sub>50</sub>で結合する。

【0198】

本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターがNotch受容体アンタゴニストである。Notch受容体アンタゴニストは、本明細書において「Notch結合作用物質」と呼ぶことができる。一定の態様では、Notch結合作用物質が、ヒトNotch1、Notch2、および/またはNotch3に特異的に結合する。一定の態様では、Notch結合作用物質が、少なくとも1種のNotch受容体に特異的に結合することに加えて、少なくとも1種の追加の標的または抗原に特異的に結合する。いくつかの態様では、Notch結合作用物質がポリペプチドである。いくつかの態様では、Notch結合作用物質が抗体である。一定の態様では、Notch結合作用物質が二重特異性抗体である。一定の態様では、Notch結合作用物質がヘテロ二量体二重特異性分子である。いくつかの態様では、Notch結合作用物質がホモ二量体二重特異性分子である。いくつかの態様では、Notch結合作用物質が、Notch結合作用物質および免疫療法剤を含む二機能性分子である。

10

【0199】

一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1、Notch2、および/またはNotch3に特異的に結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2およびNotch3に特異的に結合する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが抗体である。

20

【0200】

一定の態様では、Notch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）が、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約1  $\mu$ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下の解離定数（K<sub>D</sub>）で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下のK<sub>D</sub>で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約1nMのK<sub>D</sub>で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約0.8nMのK<sub>D</sub>で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約0.6nMのK<sub>D</sub>で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約0.5nMのK<sub>D</sub>で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約0.4nMのK<sub>D</sub>で結合する。いくつかの態様では、K<sub>D</sub>が表面プラズモン共鳴によって測定される。いくつかの態様では、1種または複数種のヒトNotch受容体に対するアンタゴニストまたは抗体の解離定数が、Biacoreチップ上に固定化されたNotch受容体細胞外ドメインを含むNotch受容体融合タンパク質（例えばNotch2 ECD-Fc融合タンパク質）を用いて決定される解離定数である。

30

40

【0201】

一定の態様では、Notch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）が、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約1  $\mu$ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下の最大半減有効濃度（EC<sub>50</sub>）で結合する。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、1種または複数種のヒトNotch受容体に、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、または約1nM以下のEC<sub>50</sub>で結合する。

【0202】

一定の態様では、Notch経路インヒビターがポリペプチドである。一定の態様では、Not

50

ch経路インヒビターが抗体である。一定の態様では、抗体がIgG抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG1抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG2抗体である。いくつかの態様では、抗体がIgG4抗体である。一定の態様では、抗体がモノクローナル抗体である。いくつかの態様では、抗体が二重特異性抗体である。一定の態様では、抗体がヒト化抗体である。一定の態様では、抗体がヒト抗体である。一定の態様では、抗体が、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。

#### 【0203】

本発明のNotch経路インヒビター（例えば抗体）は、当技術分野において公知である任意の方法により、特異的結合についてアッセイすることができる。使用することができるイムノアッセイには、Biacore解析、FACS解析、免疫蛍光、免疫細胞化学、ウェスタンブロット解析、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、およびプロテインAイムノアッセイなどの技法を用いる競合アッセイ系および非競合アッセイ系が含まれるが、それらに限定されるわけではない。そのようなアッセイは、当技術分野ではルーチンであり、周知である（例えばAusubel et al. 編, 1994～現在, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照されたい）。

#### 【0204】

非限定的な例において、DLL4アンタゴニスト（例えば抗体）のヒトDLL4への特異的結合は、ELISAを用いて決定されうる。ELISAアッセイは、DLL4抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングする工程、ウェルに、酵素基質（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートされたDLL4アンタゴニストまたは抗体を添加する工程、ある期間にわたってインキュベートする工程、および結合作用物質または抗体の存在を検出する工程を含む。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストまたは抗体が、検出可能な化合物にコンジュゲートされていないが、その代わりに、DLL4アンタゴニストまたは抗体を認識する第2のコンジュゲート抗体をウェルに添加する。いくつかの態様では、ウェルをDLL4抗原でコーティングする代わりに、DLL4アンタゴニストまたは抗体をウェル上にコーティングすることができ、コーティングされたウェルに抗原を添加し、次いで、検出可能な化合物にコンジュゲートされた第2の抗体を添加する。当業者は、検出されるシグナルを増大させるために変更および/または最適化することができるパラメータ、ならびに使用することができるELISAの他のバリエーションについて熟知しているであろう（例えば、Ausubel et al. 編, 1994～現在, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照されたい）。

#### 【0205】

代替の非限定的な例において、DLL4アンタゴニスト（例えば抗体）のヒトDLL4への特異的結合は、FACSを用いて決定されうる。FACSスクリーニングアッセイは、抗原を融合タンパク質として発現させるcDNAコンストラクトを生成させる工程、コンストラクトを細胞中にトランスフェクトする工程、抗原を細胞の表面上に発現させる工程、DLL4アンタゴニストをトランスフェクト細胞と混合する工程、およびある期間にわたってインキュベートする工程を含みうる。DLL4アンタゴニストが結合した細胞は、検出可能な化合物にコンジュゲートされた二次抗体（例えばPEコンジュゲート抗Fc抗体）およびフローサイトメーターを用いることによって同定されうる。当業者は、検出されるシグナルを最適化するために変更することができるパラメータ、およびスクリーニングを増強しうるFACSの他のバリエーションについて熟知しているであろう。

#### 【0206】

アンタゴニスト（例えば抗体）のその標的（例えば、DLL4またはNotch受容体）に対する結合親和性、および結合作用物質-抗原相互作用のオン-オフ速度は、競合結合アッセイによって決定することができる。いくつかの態様では、競合結合アッセイが、標識抗原（例えば、 $^3\text{H}$ または $^{125}\text{I}$ ）、またはそのフラグメントもしくは変異体と、関心対象の作用物

質との、増加する量の非標識抗原の存在下でのインキュベーション、およびその後の、標識抗原に結合した作用物質の検出を含むラジオイムノアッセイである。作用物質の抗原に対する親和性およびオン-オフ速度は、データからスキャッチャードプロット解析によって決定することができる。いくつかの態様では、Biacore速度論解析が、アンタゴニストまたは結合作用物質の結合親和性およびオン-オフ速度を決定するために使用される。Biacore速度論解析は、Biacoreチップの表面上に固定化されている抗原（例えば、DLL4またはNotchタンパク質）から、結合作用物質の結合および解離を解析する工程を含む。いくつかの態様では、Biacore速度論解析を、定性的エピトープ競合結合アッセイにおいてさまざまな結合作用物質の結合を研究するために使用することができる。

【 0 2 0 7 】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、DLL4結合作用物質であるNotch経路インヒビターを含む。いくつかの態様では、DLL4結合作用物質がDLL4アンタゴニストである。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体が、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、YISCYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), またはYISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびRDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、さらに、RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、およびQQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、およびQQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニストが、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1、

YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR2、およびRDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3 ; ならびに

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、およびQQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

【 0 2 0 8 】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトDLL4の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体を含み、該抗体は、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、もしくはSEQ ID NO:11に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、またはSEQ ID NO:11に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:12に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:9に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12に対し

10

20

30

40

50

て少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:9を含む重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:9を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:10に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:11に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:11を含む重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:11を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

50

**【0209】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、マウス21M18としても公知である、2007年9月28日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC寄託番号PTA-8670を有するハイブリドーマによって産生される抗体を含む。マウス21M18抗体は、2007年9月28日に出願された米国特許第7,750,124号に詳細に記載されている。

**【0210】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、2007年9月28日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-8670を有するハイブリドーマによって産生される抗体の重鎖CDRおよび軽鎖CDRを含む抗体を含む。

**【0211】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、2007年5月10日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-8425を有するプラスミドDNAによってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体を含む。

**【0212】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、21M18 H7L2およびOMP-21M18としても公知である、2007年5月10日にATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-8425を有するプラスミドDNAによってコードされる抗体を含む。OMP-21M18抗体は、2007年9月28日に出願された米国特許第7,750,124号に詳細に記載されている。この抗体はまた、デムシズマブとしても公知である。

**【0213】**

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch経路インヒビターがポリペプチドである。ポリペプチドには、ヒトDLL4に特異的に結合する抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。一定の態様では、ポリペプチドが、デムシズマブ (OMP-21M18) のCDRのうちの一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、および/または六つを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドが、CDRあたり4個まで (すなわち0、1、2、3、または4個) のアミノ酸置換を有するCDRを含む。一定の態様では、重鎖CDRが重鎖可変領域内に含有される。一定の態様では、軽鎖CDRが軽鎖可変領域内に含有される。

**【0214】**

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、およびSEQ ID NO:12からなる群より選択される配列を含むポリペプチドを含む。

**【0215】**

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、デムシズマブの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、デムシズマブの重鎖および軽鎖 (リーダー配列ありまたはリーダー配列なし) を含む。一定の態様では、Notch経

路インヒビターが、デムシズマブを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0216】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトDLL4への特異的結合について、SEQ ID NO:10を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:12を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合するDLL4アンタゴニスト（例えば抗体）を含む。一定の態様では、DLL4アンタゴニストが、ヒトDLL4への特異的結合についてデムシズマブと競合する。いくつかの態様では、DLL4アンタゴニスト（例えば抗体）が、インビトロ競合結合アッセイにおいて、ヒトDLL4への特異的結合についてデムシズマブと競合する。

【0217】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトDLL4上の、本発明の抗体と同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合するDLL4アンタゴニスト（例えば抗体）を含む。別の態様では、DLL4アンタゴニストが、本発明の抗体が結合するDLL4上のエピトープとオーバーラップする、ヒトDLL4上のエピトープに結合する抗体である。一定の態様では、DLL4アンタゴニスト（例えば抗体）が、ヒトDLL4上の、デムシズマブと同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合する。別の態様では、DLL4アンタゴニストが、デムシズマブが結合するDLL4上のエピトープとオーバーラップする、ヒトDLL4上のエピトープに結合する抗体である。

【0218】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、Notch結合作用物質であるNotch経路インヒビターを含む。いくつかの態様では、Notch結合作用物質がNotch受容体アンタゴニストである。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体が、SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、さらに、

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、SSSGMS (SEQ ID NO:34) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:36) を含む重鎖CDR3；ならびに

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT (SEQ ID NO:38) を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:39) を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

【0219】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch2および/またはNotch3の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体を含み、該抗体は、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:41に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:41に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では

、抗体が、SEQ ID NO:40に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:41に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域を含む。

【0220】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、59R5およびOMP-59R5としても公知である、2009年7月6日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-10170を有するプラスミドDNAによってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体を含む。OMP-59R5抗体は、2009年7月8日に出願された米国特許第8,226,943号に詳細に記載されている。この抗体はまた、タレクスツマブとしても公知である。

10

【0221】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1の細胞外ドメインの非リガンド結合膜近位領域に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体が、RGYWIE (SEQ ID NO:46)を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、さらに、

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50)を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体が、

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50)を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニストが、RGYWIE (SEQ ID NO:46)を含む重鎖CDR1、

QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47)

を含む重鎖CDR2、および

FDGNYGYAMDY (SEQ ID NO:48)

を含む重鎖CDR3 ; ならびに

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49)

を含む軽鎖CDR1、GTNNRAP (SEQ ID NO:50)を含む軽鎖CDR2、および

ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51)

を含む軽鎖CDR3を含む抗体である。

【0222】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch1に特異的に結合する抗体を含み、該抗体は、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:53に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:53に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:52に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:53に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SE

40

50

Q ID NO:52を含む重鎖可変領域、および/またはSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、抗体が、SEQ ID NO:52を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域を含む。

【0223】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、マウス52M51としても公知である、2008年8月7日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託され、ATCC寄託番号PTA-9405を有するハイブリドーマによって産生される抗体の重鎖CDRおよび軽鎖CDRを含む抗体を含む。マウス52M51抗体は、2009年7月8日に出願された米国特許第8,435,513号に詳細に記載されている。

10

【0224】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、52M51-H4L3およびOMP-h52M51としても公知である、2008年10月15日にブタペスト条約の条件下で10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110のATCCに寄託され、ATCC寄託番号PTA-9549を有するプラスミドDNAによってコードされる重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体を含む。OMP-h52M51抗体は、2009年7月8日に出願された米国特許第8,435,513号に詳細に記載されている。この抗体はまた、ブロンチクツスマブとしても公知である。

【0225】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、Notch経路インヒビターがポリペプチドである。ポリペプチドには、ヒトNotch2および/またはNotch3に特異的に結合する抗体、ならびにヒトNotch1に特異的に結合する抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。一定の態様では、ポリペプチドが、タレクスツマブ (OMP-59R5) のCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、および/または6つを含む。一定の態様では、ポリペプチドが、ブロンチクツスマブ (OMP-h52M51) のCDRのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、および/または6つを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドが、CDRあたり4個まで (すなわち0、1、2、3、または4個) のアミノ酸置換を有するCDRを含む。一定の態様では、重鎖CDRが重鎖可変領域内に含有される。一定の態様では、軽鎖CDRが軽鎖可変領域内に含有される。

20

【0226】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、SEQ ID NO:40および/またはSEQ ID NO:41の配列を含むポリペプチドを含む。

30

【0227】

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、タレクスツマブの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、タレクスツマブの重鎖および軽鎖 (リーダー配列ありまたはリーダー配列なし) を含む。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、タレクスツマブを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0228】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch2および/またはNotch3への特異的結合について、SEQ ID NO:40を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:41を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合するNotch受容体アンタゴニスト (例えば抗体) を含む。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch2および/またはNotch3への特異的結合についてタレクスツマブと競合する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニスト (例えば抗体) が、インビトロ競合結合アッセイにおいて、ヒトNotch2および/またはNotch3への特異的結合についてタレクスツマブと競合する。

40

【0229】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch2および/またはNotch3上の、本発明の抗体と同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合するNotch受容体アンタゴニスト (例えば抗体) を含む。別の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、本発明の抗体が結合するNotch2および/またはNotch3上のエピトープとオーバーラップする、ヒトNotch2および/またはNotch3上のエピトープに結合する抗体である。一定

50

の態様では、Notch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）が、ヒトNotch2および/またはNotch3上の、タレクスツマブと同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合する。別の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、タレクスツマブが結合するNotch2および/またはNotch3上のエピトープとオーバーラップする、ヒトNotch2および/またはNotch3上のエピトープに結合する抗体である。

【0230】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、SEQ ID NO:52および/またはSEQ ID NO:53の配列を含むポリペプチドを含む。

【0231】

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ブロンチクツズマブの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ブロンチクツズマブの重鎖および軽鎖（リーダー配列ありまたはリーダー配列なし）を含む。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、ブロンチクツズマブを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

10

【0232】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch1への特異的結合について、SEQ ID NO:52を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:53を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合するNotch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）を含む。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ヒトNotch1への特異的結合についてブロンチクツズマブと競合する。いくつかの態様では、Notch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）が、インビトロ競合結合アッセイにおいて、ヒトNotch1への特異的結合についてブロンチクツズマブと競合する。

20

【0233】

本明細書に記載する方法の一定の態様では、方法が、ヒトNotch1上の、本発明の抗体と同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合するNotch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）を含む。別の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、本発明の抗体が結合するNotch1上のエピトープとオーバーラップする、ヒトNotch1上のエピトープに結合する抗体である。一定の態様では、Notch受容体アンタゴニスト（例えば抗体）が、ヒトNotch1上の、ブロンチクツズマブと同じエピトープ、または本質的に同じエピトープに結合する。別の態様では、Notch受容体アンタゴニストが、ブロンチクツズマブが結合するNotch1上のエピトープとオーバーラップする、ヒトNotch1上のエピトープに結合する抗体である。

30

【0234】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は任意の公知の方法によって調製することができる。いくつかの態様では、関連する抗原（例えば精製されたペプチドフラグメント、完全長組換えタンパク質、または融合タンパク質）を皮下または腹腔内に複数回注射することで動物（例えばウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ロバ）を免疫することにより、ポリクローナル抗体を生じさせる。抗原は、任意で、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）または血清アルブミンなどの担体にコンジュゲートすることができる。抗原（担体タンパク質ありまたは担体タンパク質なし）を滅菌食塩水に希釈し、通常はアジュバント（例えば完全フロイントアジュバントまたは不完全フロイントアジュバント）と混和することで、安定なエマルションを形成させる。十分な期間の後、免疫された動物の血液および/または腹水からポリクローナル抗体が回収される。ポリクローナル抗体は当技術分野における標準的方法によって、例えば限定するわけではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析などによって、血清または腹水から精製することができる。

40

【0235】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知のハイブリドーマ法を使って調製することができる。ハイブ

50

リドーマ法を使用するいくつかの態様では、マウス、ハムスター、ラット、または他の適当な宿主動物を上述のように免疫することで、免疫抗原に特異的に結合するであろう抗体の生産をリンパ球に生じさせる。いくつかの態様では、リンパ球をインビトロで免疫することができる。いくつかの態様において、免疫抗原はヒトタンパク質またはその一部分であることができる。いくつかの態様において、免疫抗原はマウスタンパク質またはその一部分であることができる。

#### 【0236】

免疫後に、リンパ球を単離し、適切な骨髄腫細胞株と例えばポリエチレングリコールを使って融合させることで、ハイブリドーマ細胞を形成させ、次にそれを、未融合のリンパ球および骨髄腫細胞から選び出すことができる。選んだ抗原を特異的に指向するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマは、例えば限定するわけではないが、免疫沈降、免疫プロットティング、およびインビトロ結合アッセイ（例えばフローサイトメトリー、FACS、ELISA、およびラジオイムノアッセイ）を含むさまざまな方法によって同定することができる。ハイブリドーマは、インビトロ培養において標準的方法を使って増殖させるかまたはインビボで動物における腹水腫瘍として増殖させることができる。モノクローナル抗体は、例えば限定するわけではないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および透析を含む当該技術分野における標準的方法に従って、培養培地または腹水から精製することができる。

10

#### 【0237】

一定の態様では、当業者に公知の組換えDNA技術を使って、モノクローナル抗体を作ることができる。抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使ったRT-PCRなどによって、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、それらの配列を従来の技法を使って決定する。次に、重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを、本来であれば免疫グロブリンタンパク質を生産しない大腸菌（*E. coli*）、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトした時にモノクローナル抗体を生産する適切な発現ベクターにクローニングする。別の態様では、組換えモノクローナル抗体、またはそのフラグメントを、ファージディスプレイライブラリーから単離することができる。

20

#### 【0238】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、代替抗体を生成させるために、組換えDNA技術を使って、いくつかの異なる方法で、さらに修飾することができる。いくつかの態様では、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインで、例えばヒト抗体の同領域を置換することで、キメラ抗体を生成させるか、または非免疫グロブリンポリペプチドを置換することで、融合抗体を生成させることができる。いくつかの態様では、定常領域を切り詰めるか除去することで、モノクローナル抗体の所望の抗体フラグメントを生成させる。いくつかの態様において、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化するために、可変領域の部位指定変異導入または高密度変異導入を使用することができる。

30

#### 【0239】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターがヒト化抗体である。典型的には、ヒト化抗体は、CDR内のアミノ酸残基が、当業者に公知の方法を使って、所望の特異性、親和性、および/または結合能を有する非ヒト種（例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど）のCDR由来のアミノ酸残基で置き換えられているヒト免疫グロブリンである。いくつかの態様では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域アミノ酸残基を、非ヒト種由来の抗体における対応するアミノ酸残基で置き換える。いくつかの態様では、抗体の特異性、親和性、および/または能力をさらに精密化し最適化するために、フレームワーク領域中および/または置き換えられた非ヒト残基内のさらなるアミノ酸残基の置換によって、ヒト化抗体をさらに修飾することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDRの全てまたは実質的に全てを含有する可変ドメイン領域を含むであ

40

50

ろうが、その一方で、フレームワーク領域の全て、または実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域または定常ドメイン (Fc) の少なくとも一部分 (典型的にはヒト免疫グロブリンのもの) も含むことができる。一定の態様では、そのようなヒト化抗体が治療に使用される。なぜなら、それらはヒト対象に投与された場合の抗原性およびHAMA (ヒト抗マウス抗体) 応答を低減しうるからである。

#### 【0240】

一定の態様では、Notch経路インヒビターがヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技法を使って、直接的に調製することができる。いくつかの態様では、標的抗原に対する抗体を生産する、インビトロで免疫した、または免疫個体から単離した、不死化ヒトBリンパ球を、生成させることができる。いくつかの態様では、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから、ヒト抗体を選択することができる。あるいは、免疫されていないドナーの免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーから、ファージディスプレイ技術を使って、ヒト抗体および抗体フラグメントをインビトロで生産することもできる。抗体ファージライブラリーの生成と使用のための技法は、当技術分野において周知であり、抗体ファージライブラリーは市販されている。限定するわけではないが鎖シャフリングや部位指定変異導入などといった親和性成熟戦略は、当技術分野では公知であり、高親和性ヒト抗体の生成に使用することができる。

#### 【0241】

いくつかの態様では、ヒト免疫グロブリン座を持つトランスジェニックマウスにおいて、ヒト抗体を作ることができる。これらのマウスは、免疫すると、内在性免疫グロブリン生産の非存在下で、ヒト抗体の全レパートリーを生産する能力を有する。

#### 【0242】

本発明は、二重特異性抗体も包含する。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、ヒトDLL4またはヒトNotch受容体の特異的に認識する。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識し、それらに結合する能力を有する。異なるエピトープは同じ分子内であってもよいし (例えばヒトDLL4上の2つの異なるエピトープ)、異なる分子上であってもよい (例えばDLL4上の1つのエピトープと第2のタンパク質上の異なるエピトープ)。いくつかの態様では、二重特異性抗体はモノクローナルヒト抗体またはモノクローナルヒト化抗体である。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、インタクトな抗体を含む。いくつかの態様において、二重特異性抗体は、抗体断片である。特定の態様において、抗体は多重特異性である。いくつかの態様において、抗体は、第1抗原標的 (例えばDLL4またはNotch受容体) と、第2抗原標的 (例えばCD2、CD3、CD28、CD80、またはCD86) またはFc受容体 (例えばCD64、CD32、またはCD16) とを特異的に認識し、それらに結合することができる。いくつかの態様では、抗体を使って、細胞傷害性作用物質を、特定の標的抗原を発現する細胞に向かわせることができる。これらの抗体は、抗原結合アームと、細胞傷害性作用物質または放射性核種キレーター、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETAなどに結合するアームとを有する。二重特異性抗体および多重特異性抗体を作るための技法は、当業者には公知である。

#### 【0243】

一定の態様では、本発明の方法が、ヒトDLL4およびヒトVEGFに特異的に結合する二重特異性抗体であるDLL4アンタゴニストを含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1

、

10

20

30

40

50

YIX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:26)

(配列中、X<sub>1</sub>はセリンまたはアラニンであり、X<sub>2</sub>はセリン、アスパラギン、またはグリシンであり、X<sub>3</sub>はアスパラギンまたはリジンであり、およびX<sub>4</sub>はグリシン、アルギニン、またはアスパラギン酸である)を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3；ならびに

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20)を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1)を含む重鎖CDR1

、  
YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:24)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20)を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1)を含む重鎖CDR1

、  
YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、

RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20)を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1)を含む重鎖CDR1

、  
YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:23)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

50

10

20

30

40

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、  
 RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および  
 QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、a) ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびb) ヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含み、該第1の抗原結合部位は、NYWMH (SEQ ID NO:20) を含む重鎖CDR1、

DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21)

を含む重鎖CDR2、および

HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22)

を含む重鎖CDR3を含み；該第2の抗原結合部位は、TAYYIH (SEQ ID NO:1) を含む重鎖CDR1

、  
 YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25)

を含む重鎖CDR2、および

RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5)

を含む重鎖CDR3を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位の両方は、  
 RASEVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、AASNQGS (SEQ ID NO:7) を含む軽鎖CDR2、および

QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8)

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0244】

いくつかの態様では、本発明の方法が、ヒトVEGFに特異的に結合する第1の抗原結合部位、およびヒトDLL4に特異的に結合する第2の抗原結合部位を含む二重特異性抗体を含み、該第1の抗原結合部位は、SEQ ID NO:30の第1の重鎖可変領域を含み、該第2の抗原結合部位は、SEQ ID NO:29の第2の重鎖可変領域を含み；かつ該第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位は、SEQ ID NO:12の第1の軽鎖可変領域および第2の軽鎖可変領域を含む。

【0245】

いくつかの態様では、本発明の方法が、ヒトVEGFに特異的に結合し、かつヒトDLL4に特異的に結合する二重特異性抗体を含み、該抗体は、SEQ ID NO:32の第1の重鎖およびSEQ ID NO:31の第2の重鎖；ならびに、SEQ ID NO:33の第1の軽鎖および第2の軽鎖を含む。

【0246】

一定の態様では、二重特異性抗体が、DLL4ならびにVEGFに特異的に結合する。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、2012年9月24日に出願された米国特許出願第13/625,417号において開示されている二重特異性抗体である。いくつかの態様では、抗VEGF/DLL4二重特異性抗体が、2012年9月24日に出願された米国特許出願第13/625,417号において開示されているような219R45-MB-21M18、219R45-MB-21R79、219R45-MB-21R75、または219R45-MB-21R83 (305B83もしくはOMP-305B83とも呼ばれる) である。いくつかの態様では、二重特異性抗体がOMP-305B83である。

【0247】

いくつかの態様では、二重特異性抗体が、DLL4に特異的に結合し、かつPD-1に特異的に結合する。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、DLL4に特異的に結合し、かつPD-L1に特異的に結合する。

【0248】

一定の態様において、本明細書に記載する抗体 (または他のポリペプチド) は、単一特異性であることができる。例えば、一定の態様では、抗体が含有する1つまたは複数の抗原結合部位のそれぞれが、異なるタンパク質上の相同エピトープを結合する能力を有する (または結合する)。

【0249】

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。抗体フラグメントは、インタクトな抗体とは異なる機能または能力を有する。例

10

20

30

40

50

例えば抗体フラグメントは増加した腫瘍浸透性を有しうる。抗体フラグメントを生産するための技法は、例えば限定するわけではないがインタクトな抗体のタンパク質分解消化を含めて、種々知られている。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生産されるF(ab')<sub>2</sub>フラグメントが含まれる。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド橋を還元することによって生成するFabフラグメントが含まれる。別の態様において、抗体フラグメントには、抗体分子をパインと還元剤で処理することによって生成するFabフラグメントが含まれる。一定の態様では、抗体フラグメントが組換え生産される。いくつかの態様において、抗体フラグメントには、Fvフラグメントまたは一本鎖Fv (scFv) フラグメントが含まれる。Fab、Fv、およびscFv抗体フラグメントは、大腸菌または他の宿主細胞中で発現させ、そこから分泌させることができ、それにより、これらのフラグメントを大量に生産することが可能になる。いくつかの態様では、抗体フラグメントが、本明細書において論じる抗体ファージライブラリーから単離される。例えば、DLL4もしくはNotch受容体またはこれらの誘導体、フラグメント、類似体または相同体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にするために、Fab発現ライブラリーを構築するための方法を使用することができる。いくつかの態様では、抗体フラグメントが線状抗体フラグメントである。一定の態様では、抗体フラグメントが単一特異性または二重特異性である。一定の態様では、Notch経路インヒビターがscFvである。ヒトDLL4にまたはヒトNotch受容体に特異的な一本鎖抗体の生産には、さまざまな技法を使用することができる。

10

20

#### 【0250】

さらに、抗体をその血清中半減期を増加させるために修飾することが、抗体フラグメントの場合には特に、好ましい場合がある。これは、例えば、抗体フラグメント中の適当な領域への変異導入によって抗体フラグメントにサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことによって、または前記エピトープをペプチドタグに組み込んでから、それを抗体フラグメントの一端または中央に（例えばDNA合成またはペプチド合成で）融合することによって、達成することができる。いくつかの態様において、抗体は、その血清中半減期が減少するように、修飾される。

#### 【0251】

本発明はまた、二重特異性分子および/または二機能性分子であるNotch経路インヒビターも包含する。いくつかの態様では、二重特異性分子および/または二機能性分子がヘテロ二量体分子である。いくつかの態様では、二重特異性分子および/または二機能性分子がホモ二量体分子である。いくつかの態様では、ホモ二量体分子がポリペプチドである。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子がポリペプチドである。一般に、ホモ二量体分子は、2つの同一のポリペプチドを含む。一般に、ヘテロ二量体分子は、2つの同一ではないポリペプチドを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体分子が、少なくとも2つの標的に結合する能力を有し、例えば二重特異性作用物質である。標的は、例えば、単一細胞上の2つの異なるタンパク質、または2つの別個の細胞上の2つの異なるタンパク質でありうる。「アーム」という用語は、本明細書において、ホモ二量体分子、ヘテロ二量体分子、および/または二重特異性抗体の構造を説明するために使用されうる。いくつかの態様では、1つの「アーム」が抗体由来の抗原結合部位を含みうる。いくつかの態様では、1つの「アーム」が受容体の結合部分を含みうる。いくつかの態様では、ホモ二量体二重特異性分子が2つの同一のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が2つの異なるアームを含む。本明細書において使用する場合、ヘテロ二量体二重特異性分子は二重特異性抗体であることができる。

30

40

#### 【0252】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、および免疫療法剤を含む第2のアームを含む。いくつかの態様では、免疫療法剤が標的のアゴニストである。いくつかの態様では、免疫療法剤が標的のアンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫療法剤がリンホカインまたはサイトカインである。いくつかの態

50

様では、免疫療法剤が免疫接着分子（immunoadhesion）である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターロイキン3（IL-3）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン1（IL-1）、インターロイキン2（IL-2）、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、4-1BBリガンド、GITRL、OX40リガンド、CD40L、抗CD3抗体、抗CTLA-4抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗TIGIT抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、および抗TIM-3抗体からなる群より選択されるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0253】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびPD-1に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびPD-L1に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびCTLA-4に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびTIGITに結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびGITRに結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびOX40に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびCD40に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、DLL4に結合する第1のアーム、およびLAG-3に結合する第2のアームを含む。

10

20

#### 【0254】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、および免疫療法剤を含む第2のアームを含む。いくつかの態様では、免疫療法剤が標的のアゴニストである。いくつかの態様では、免疫療法剤が標的のアンタゴニストである。いくつかの態様では、免疫療法剤がリンホカインまたはサイトカインである。いくつかの態様では、免疫療法剤が免疫接着分子である。いくつかの態様では、免疫療法剤が、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターロイキン3（IL-3）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン1（IL-1）、インターロイキン2（IL-2）、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、4-1BBリガンド、GITRL、OX40リガンド、CD40L、抗CD3抗体、抗CTLA-4抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗TIGIT抗体、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、および抗TIM-3抗体からなる群より選択されるが、それらに限定されるわけではない。

30

#### 【0255】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびPD-1に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびPD-L1に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびCTLA-4に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびTIGITに結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびGITRに結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびOX40に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびCD40に結合する第2のアームを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性分子が、Notch受容体に結合する第1のアーム、およびLAG-3に結合する第2のアームを含む。

40

#### 【0256】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体二重特異性作用物質が2つのアームを含み、各アーム

50

ムはヒトCH3ドメインを含み、各CH3ドメインは、ヘテロ二量体の形成を促進するように修飾される。いくつかの態様では、第1のCH3ドメインおよび第2のCH3ドメインが、knobs-into-holes技法を用いて修飾される。いくつかの態様では、第1のCD3ドメインおよび第2のCD3ドメインが、静電効果に基づいて修飾される。

【0257】

ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の範囲に含まれる。ヘテロコンジュゲート抗体は、共有結合で接合された2つの抗体から構成される。そのような抗体は、例えば免疫細胞を望まれない細胞にターゲティングするために提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体を、合成タンパク質化学における公知の方法、例えば架橋剤を必要とするものを使って、インビトロで調製することもできると考えられる。例えば、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を使って、またはチオエーテル結合を形成させることによって、構築することができる。この目的に適した試薬の例には、イミノチオレートや、メチル-4-メルカプトブチルイミデートがある。

10

【0258】

本発明の目的のために、修飾抗体が、抗体と標的（すなわちヒトDLL4またはNotch受容体）との会合をもたらす任意のタイプの可変領域を含みうることは、理解されるはずである。これに関連して、可変領域は、体液性応答の開始と所望の腫瘍関連抗原に対する免疫グロブリンの生成とを誘発することができる任意のタイプの哺乳動物を含みうる、またはその哺乳動物に由来しうる。したがって、修飾抗体の可変領域は、例えばヒト、マウス、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル、マカクなど）由来またはウサギ由来であることができる。いくつかの態様では、修飾免疫グロブリンの可変領域と定常領域がどちらもヒトの領域である。別の態様では、その分子の結合特性を改良し、または免疫原性を低減するために、適合する抗体（通常は非ヒト供給源に由来するもの）の可変領域を工学的に操作または特異的に加工することができる。この点で、本発明に有用な可変領域は、ヒト化されたもの、またはインポートされたアミノ酸配列を含めることにより、他の形で改変されたものでありうる。

20

【0259】

一定の態様では、重鎖および軽鎖の可変ドメインがどちらも、1つまたは複数のCDRの少なくとも部分的な置き換えによって、そして必要であれば、部分的なフレームワーク領域の置き換えならびに配列修飾および/または配列改変によって、改変される。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラス、さらには同じサブクラスの抗体に由来するが、CDRは、好ましくは、異なる種からの抗体に由来するであろうと考えられる。一つの可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移すために、CDRの全てをドナー可変領域からのCDRの全てで置き換える必要はないであろう。むしろ、必要なのは、抗原結合部位の活性を維持するのに必要なこれらのアミノ酸残基を移すことだけであろう。

30

【0260】

可変領域の改変とは別に、本発明の修飾抗体が、ネイティブの、すなわち改変されていない定常領域を含む、ほぼ同じ免疫原性の抗体と比較した場合に、所望の生化学的特徴、例えば増加した腫瘍局在および/または増加した血清中半減期が得られるように、定常領域ドメインの1つまたは複数の少なくとも断片が欠失しているかまたは他の形で改変されている抗体（例えば完全長抗体またはその免疫反応性フラグメント）を含むであろうことは、当業者には理解されるだろう。いくつかの態様では、修飾抗体の定常領域はヒト定常領域を含むであろう。本発明と適合する定常領域の修飾は、1つまたは複数のドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む。本明細書において開示する修飾抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）の1つまたは複数への、かつ/または軽鎖定常ドメイン（CL）への改変または修飾を含みうる。いくつかの態様では、1つまたは複数のドメインを、修飾抗体の定常領域から部分的にまたは完全に欠失させる。いくつかの態様では、修飾抗体が、CH2ドメイン全体が除去されたドメイン欠失コンストラクトまたはドメイン欠失変異体（CH2コンストラクト）を含むであろう。いくつかの態様では、省かれた定常領域ドメインが、欠如している定常領域ドメインによって

40

50

通例付与されている分子の可動性の一部を提供する短いアミノ酸スペーサー（例えば10アミノ酸残基）で置き換えられる。

#### 【0261】

いくつかの態様において、修飾抗体は、CH3ドメインを抗体のヒンジ領域に直接融合するように、工学的に操作される。別の態様では、ヒンジ領域と修飾CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインの間にペプチドスペーサーが挿入される。例えば、CH2ドメインが欠失していて、残ったCH3ドメイン（修飾または無修飾）が5~20アミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に接合されているコンストラクトを、発現させることができる。そのようなスペーサーは、定常ドメインの調節要素が自由かつアクセス可能な状態を保っていることまたはヒンジ領域が可動性を保っていることを保証するために、付加することができる。しかし、アミノ酸スペーサーは、場合によっては、免疫原性であって、コンストラクトに対する望まれない免疫応答を誘発することになりうる点に注意すべきである。したがって一定の態様では、コンストラクトに付加されるスペーサーはいずれも、修飾抗体の望ましい生物学的品質が維持されるように、比較的非免疫原性であるだろう。

10

#### 【0262】

いくつかの態様では、修飾抗体が、定常ドメインの部分的でしかない欠失を有するか、小数の、あるいは一つだけのアミノ酸の置換を有しうる。例えば、CH2ドメインの選択された区域における単一アミノ酸の変異は、Fc結合を実質的に低減させ、よってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させるのに十分でありうる。同様に、一つまたは複数の定常領域ドメインのうち、特異的エフェクター機能（例えば補体C1q結合）を制御する部分を、単純に欠失させることが望ましい場合もありうる。そのような定常領域の部分的欠失は、対象定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能を損なわずに残したまま、抗体の選ばれた特徴（血清中半減期）を改良しうる。そのうえ、上記で言及したように、本開示の抗体の定常領域は、結果として得られるコンストラクトのプロファイル強化する一つまたは複数のアミノ酸の変異または置換によって修飾してもよい。この点で、修飾抗体の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持したまま、保存された結合部位が与える活性（例えばFc結合）を妨害することが可能になりうる。一定の態様では、修飾抗体が、エフェクター機能の減少または増加などといった望ましい特徴を強化するために、またはより多くの細胞毒もしくは糖質取り付け部位を設けるために、定常領域への一つまたは複数のアミノ酸の付加を含む。

20

30

#### 【0263】

定常領域が数種類のエフェクター機能を媒介することは、当技術分野において公知である。例えば（抗原に結合した）IgG抗体またはIgM抗体のFc領域への補体のC1構成要素の結合は、補体系を活性化する。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化は炎症応答も刺激し、自己免疫過敏症にも関与しうる。加えて、抗体のFc領域は、Fc受容体（FcR）を発現する細胞に結合することができる。IgG（ガンマ受容体）、IgE（イプシロン受容体）、IgA（アルファ受容体）およびIgM（ミュー受容体）など、異なる抗体クラスに特異的なFc受容体がいくつかある。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体被覆粒子の貪食と破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解、炎症性メディエーターの放出、胎盤移行、および免疫グロブリン生産の制御などといった、いくつかの重要で多様な生物学的応答を誘発する。

40

#### 【0264】

一定の態様において、Notch経路インヒビターは、改変されたエフェクター機能を与える抗体である。これらの改変されたエフェクター機能は、投与された抗体の生物学的プロファイルに影響を及ぼしうる。例えば、いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または（点変異もしくは他の手段による）不活化は、循環修飾抗体（例えば抗DLL4抗体または抗Notch受容体抗体）のFc受容体結合を低減し、それによってがん細胞局在および/または腫瘍浸透を増加させうる。別の態様では、定常領域修飾が抗体の血清中半減期を増加または低減させる。いくつかの態様では、ジスルフィド連結またはオリゴ糖部分が排除

50

されるように、定常領域が修飾される。本発明による定常領域の修飾は、当業者によく理解されている周知の生化学的技法または分子工学的手法を使って、容易に行うことができる。

【0265】

一定の態様では、Notch経路インヒビターが1つまたは複数のエフェクター機能を持たない抗体である。例えば、いくつかの態様では、抗体がADCC活性、および/またはCDC活性を持たない。一定の態様では、抗体がFc受容体および/または補体因子に結合しない。一定の態様では、抗体がエフェクター機能を持たない。

【0266】

本発明はさらに、本明細書に記載するキメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体、またはそれらの抗体フラグメントに実質的に相同な変異体および等価物を包含する。これらは、例えば保存的置換変異を含有することができる。

【0267】

一定の態様では、本明細書に記載する抗体が単離されている。一定の態様では、本明細書に記載する抗体が実質的に純粋である。

【0268】

本発明のいくつかの態様では、Notch経路インヒビターがポリペプチドである。ポリペプチドは、ヒトDLL4に結合するか、または1種もしくは複数種のヒトNotch受容体に結合する、抗体またはそのフラグメントを含む、組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであることができる。本発明のいくつかのアミノ酸配列を、タンパク質の構造または機能に著しい影響を及ぼさずに変化させることは、当技術分野では認識されるであろう。したがって本発明はさらに、ヒトDLL4または1種もしくは複数種のヒトNotch受容体に対する抗体またはそのフラグメントの実質的活性を示すか、同抗体またはそのフラグメントの領域を含む、ポリペプチドのバリエーションを包含する。いくつかの態様では、DLL4結合ポリペプチドまたはNotch結合ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーションが、欠失、挿入、逆位、反復、および/または他のタイプの置換を含む。

【0269】

ポリペプチド、その類似体および変異体はさらに、通常はポリペプチドの一部ではない追加の化学部分を含有するように修飾することができる。誘導体化された部分は、ポリペプチドの溶解度、生物学的半減期および/または吸収を改善することができる。これらの部分は、ポリペプチドおよび変異体の望ましくない任意の副作用を低減または排除することもできる。化学部分に関する総説は「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」22<sup>nd</sup> Edition, 2012, Pharmaceutical Press (ロンドン)に見いだすことができる。

【0270】

本明細書に記載する単離されたポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって生産することができる。そのような方法は、直接タンパク質合成法から、ポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築してその配列を適切な宿主中で発現させる方法まで、さまざまである。いくつかの態様では、関心対象の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することにより、組換え技術を使ってDNA配列を構築する。任意で、部位特異的変異導入法によって配列に変異を導入することで、その機能的類似体を得ることもできる。

【0271】

いくつかの態様では、関心対象のポリペプチドをコードするDNA配列を、オリゴヌクレオチド合成装置を使って、化学合成によって構築することができる。オリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、関心対象の組換えポリペプチドの生産を行う予定の宿主細胞において好まれるコドンを選択することによって設計される。標準的方法を適用することで、単離された関心対象のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使って、逆翻訳遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分にコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成してから、それらをライゲートすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的アセンブリのために、5'または3'オーバーハングを含有する。

#### 【0272】

(合成、部位指定変異導入法、または他の方法による)アセンブリが終わったら、関心対象の特定ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、発現ベクターに挿入して、所望の宿主におけるタンパク質の発現に適した発現制御配列に作動的に連結することができる。適正なアセンブリは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および/または適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確かめることができる。当技術分野においては周知であるように、宿主においてトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るには、選んだ発現宿主において機能的な転写および翻訳発現制御配列に遺伝子が作動的に連結されていなければならない。

#### 【0273】

一定の態様では、組換え発現ベクターを使って、ヒトDLL4または1種もしくは複数種のヒトNotch受容体に結合するポリペプチド(例えば抗体)またはそのフラグメントを増幅し、発現させる。例えば組換え発現ベクターは、哺乳動物遺伝子、微生物遺伝子、ウイルス遺伝子または昆虫遺伝子に由来する適切な転写および/または翻訳調節要素に作動的に連結された、抗DLL4抗体もしくはそのフラグメントのポリペプチド鎖をコードする、合成DNAフラグメントまたはcDNA由来のDNAフラグメントを有する、複製可能なDNAコンストラクトであることができる。転写単位は、一般に、(1)遺伝子発現において調節的役割を有する1つまたは複数の遺伝要素、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列、および(3)適当な転写および翻訳開始および終結配列のアセンブリを含む。調節要素には、転写を制御するためのオペレーター配列を含めることができる。通常は複製起点によって付与される宿主中で複製する能力と、形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子を、さらに組み込むことができる。DNA領域は、それらが互いに機能的な関係にある場合に、「作動的に連結」されている。例えば、シグナルペプチド(分泌性リーダー)のDNAは、それがあるポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現するのであれば、そのポリペプチドのDNAに作動的に連結されており、プロモーターは、それがあるコード配列の転写を制御するのであれば、そのコード配列に作動的に連結されており、あるいはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするような位置にあるのであれば、コード配列に作動的に連結されている。いくつかの態様では、酵母発現系における使用を意図した構造要素が、宿主酵母細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される別の態様では、それはN末端メチオニン残基を含みうる。この残基は、任意で、発現された組換えタンパク質から引き続いて切り離すことで、最終産物を与えることもできる。

#### 【0274】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを使用することができる。真核宿主用の有用な発現ベクターとしては、例えばSV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主用の有用な発現ベクターとしては、公知の細菌プラスミド、例えばpCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含む大腸菌由来のプラスミド、およびそれより宿主域が広いプラスミド、例えばM13ファージおよび他の線維状一本鎖DNAファージが挙げられる。

#### 【0275】

ポリペプチドを発現させるための適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母細胞、昆虫細胞、または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば大腸菌またはパチルス(Bacillus)が挙げられる。高等真核細胞としては、後述する哺乳動物由来の樹立細胞株が挙げられる。無細胞翻訳系も使用しうる。細

10

20

30

40

50

菌宿主、真菌宿主、酵母宿主、および哺乳動物細胞宿主と共に使用するための適当なクローニングベクターおよび発現ベクターは、当業者に公知である。

【0276】

組換えポリペプチドの発現には、さまざまな哺乳類細胞培養系が使用される。哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現は、そのようなタンパク質が一般に正しくフォールディングされ、適切に修飾され、生物学的に機能的であることから、好まれ得る。適切な哺乳動物宿主細胞株の例として、COS-7（サル腎臓由来）細胞株、L-929（マウス線維芽細胞由来）細胞株、C127（マウス乳房腫瘍由来）細胞株、3T3（マウス線維芽細胞由来）細胞株、CHO（チャイニーズハムスター卵巣由来）細胞株、HeLa（ヒト子宮頸がん由来）細胞株、BHK（ハムスター腎臓線維芽細胞由来）細胞株、HEK-293（ヒト胎児腎臓由来）細胞株およびそれらの変異体が挙げられる。哺乳類発現ベクターは、非転写要素、例えば複製起点、発現させようとする遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えば必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位およびスプライス受容部位、ならびに転写終結配列を含むことができる。

10

【0277】

昆虫細胞培養系（例えばバキュロウイルス）における組換えタンパク質の発現も、正しくフォールディングされた生物学的に機能的なタンパク質を生産するためのロバストな方法になる。昆虫細胞において異種タンパク質を生産するためのバキュロウイルス系は、当業者に周知である。

20

【0278】

したがって本発明は、本明細書に記載するNotch経路インヒビターを含む細胞を提供する。いくつかの態様では、細胞が、本明細書に記載するNotch経路インヒビター（例えば抗体）を生産する。一定の態様では、細胞が抗体を生産する。一定の態様では、細胞がデムシズマブ（demcizumab）を生産する。一定の態様では、細胞がOMP-305B83を生産する。一定の態様では、細胞がタレクスツマブ（tarextumab）を生産する。一定の態様では、細胞がブロンチクツズマブ（brontictuzumab）を生産する

【0279】

形質転換宿主によって生産されるタンパク質は、任意の適切な方法に従って精製することができる。標準的方法としては、クロマトグラフィー（例えばイオン交換、アフィニティー、およびサイズ分画カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差（differential solubility）、または他の標準的なタンパク質精製技法による方法が挙げられる。適当なアフィニティークラムを通すことによる安易な精製を可能にするために、ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニティータグをタンパク質に取り付けることができる。単離されたタンパク質は、タンパク質分解、質量分析（MS）、核磁気共鳴（NMR）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、およびx線結晶解析などの技法を使って、物理的に特徴づけることもできる。

30

【0280】

いくつかの態様では、培養培地中に組換えタンパク質を分泌する発現系からの上清を、まず、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットなどを使って濃縮することができる。濃縮工程に続いて、濃縮物を適切な精製マトリックスに適用することができる。いくつかの態様では、アニオン交換樹脂、例えばペンダントジエチルアミノエチル（DEAE）基を有するマトリックスまたは基材を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製によく使用される他のタイプであることができる。いくつかの態様では、カチオン交換工程を使用することができる。適切なカチオン交換体として、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含むさまざまな不溶性マトリックスが挙げられる。いくつかの態様では、例えば限定するわけではないがセラミックヒドロキシアパタイト（CHT）などのヒドロキシアパタイト媒体を使用することができる。一定の態様では、

40

50

ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルなどといった疎水性RP-HPLC媒体を使用する1つまたは複数の逆相HPLC工程を使って、結合作用物質をさらに精製することができる。均一な組換えタンパク質を得るために、前述の精製工程の一部または全部をさまざまな組合せで使用することもできる。

【0281】

いくつかの態様では、細菌培養において生産された組換えタンパク質を、例えば細胞ペレットからの初回抽出後に、1つまたは複数の濃縮工程、塩析工程、水性イオン交換クロマトグラフィー工程、またはサイズ排除クロマトグラフィー工程などを行うことによって単離することができる。最終精製工程にはHPLCを使用することができる。組換えタンパク質の発現に使用される微生物細胞は、凍結融解サイクリング、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用などといった任意の従来法で破碎することができる。

10

【0282】

一定の態様では、Notch経路インヒビターが小分子である。

【0283】

一定の態様では、Notch経路インヒビターを、いくつかのコンジュゲート（すなわちイムノコンジュゲートまたはラジオコンジュゲート）形態または非コンジュゲート形態のいずれか一つで使用することができる。一定の態様では、補体依存性細胞傷害および抗体依存性細胞傷害を含む対象の自然防御機構を利用して悪性細胞またはがん細胞を排除するために、抗体を非コンジュゲート形態で使用することができる。

20

【0284】

いくつかの態様では、Notch経路インヒビターが、細胞傷害性作用物質にコンジュゲートされる。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が化学療法剤、例えば限定するわけではないが、メトトレキサート、アドリアマイシン（adriamycin）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤である。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が、細菌、真菌、植物、または動物由来の酵素的に活性な毒素、またはそのフラグメント、例えば限定するわけではないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolaca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サボウソウ（*Sapaonaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）、およびトリコセシノール類である。いくつかの態様では、細胞傷害性作用物質が、ラジオコンジュゲートまたはラジオコンジュゲート抗体を生産するための放射性同位体である。ラジオコンジュゲート抗体の生産にはさまざまな放射性核種、例えば限定するわけではないが、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>131</sup>In、<sup>105</sup>Rh、<sup>153</sup>Sm、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>166</sup>Ho、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Reおよび<sup>212</sup>Biなどを利用することができる。いくつかの態様では、抗体と、1つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコテン（trichothene）、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体とのコンジュゲートを生産することができる。一定の態様では、抗体と細胞傷害性作用物質とのコンジュゲートが、さまざまな二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばジメチルアジポイミデートHCL）、活性エステル（例えばスベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えばトルエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を使って作られる。

30

40

【0285】

一定の態様では、Notch経路インヒビター（例えば抗体）が、DLL4のアンタゴニストで

50

ある。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、DLL4の活性を阻害する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、DLL4の活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%を阻害する。

**【0286】**

一定の態様では、Notch経路インヒビター（例えば抗体）が、適当な受容体へのDLL4の結合を阻害する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、1種または複数種のヒトNotchタンパク質へのDLL4の結合を阻害する。いくつかの態様では、1種または複数種のヒトNotchタンパク質が、Notch1、Notch2、Notch3、およびNotch4からなる群より選択される。一定の態様では、Notch経路インヒビターによるNotchタンパク質へのDLL4の結合の阻害が、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%である。一定の態様では、Notchタンパク質へのDLL4の結合を阻害するNotch経路インヒビターが、Notch経路シグナル伝達も阻害する。一定の態様では、ヒトNotch経路シグナル伝達を阻害するNotch経路インヒビターが、デムシズマブである。

10

**【0287】**

一定の態様では、Notch経路インヒビター（例えば抗体）が、1種または複数種のNotch受容体のアンタゴニストである。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、Notch1、Notch2、および/またはNotch3の活性を阻害する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、Notch1、Notch2、および/またはNotch3の活性の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または約100%を阻害する。

20

**【0288】**

一定の態様では、Notch経路インヒビター（例えば抗体）が、適当なリガンドへのNotch受容体の結合を阻害する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、1種または複数種のヒトNotchリガンドへのNotch受容体の結合を阻害する。いくつかの態様では、1種または複数種のヒトNotchリガンドが、DLL1、DLL3、DLL4、JAG1、およびJAG2からなる群より選択される。一定の態様では、Notch経路インヒビターによるNotchリガンドへのNotch受容体の結合の阻害が、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%である。一定の態様では、NotchリガンドへのNotch受容体の結合を阻害するNotch経路インヒビターが、Notch経路シグナル伝達も阻害する。一定の態様では、ヒトNotch経路シグナル伝達を阻害するNotch経路インヒビターが、タレクスツマブである。一定の態様では、ヒトNotch経路シグナル伝達を阻害するNotch経路インヒビターが、ブロンチクツズマブである。

30

**【0289】**

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、以下の効果のうちの1つまたは複数をも有する：腫瘍細胞の増殖を阻害する、腫瘍成長を阻害する、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減する、腫瘍の腫瘍形成性を低減する、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減することによって腫瘍の腫瘍形成性を低減する、腫瘍細胞の細胞死を引き起こす、腫瘍中の細胞の分化を誘発する、腫瘍形成性細胞を非腫瘍形成性状態へと分化させる、腫瘍細胞における分化マーカーの発現を誘導する、腫瘍細胞の転移を防止する、腫瘍細胞の生存を減少させる、または免疫反応を調整する。

40

**【0290】**

一定の態様では、Notch経路インヒビターが、腫瘍の腫瘍形成性を低減する能力を有する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、動物モデル、例えばマウスモデルにおいて、がん幹細胞を含む腫瘍の腫瘍形成性を低減する能力を有する。一定の態様では、腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度が、少なくとも約2分の1、約3分の1、約5分の1、約10分の1、約50分の1、約100分の1、または約1000分の1に低減する。一定の態様では、がん幹細胞の数または頻度の低減が、動物モデルを使った限界希釈アッセイによって決定される。限界希釈アッセイを使って腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度の低減を決定す

50

る工程に関するさらなる例と指針は、例えば国際公開公報第2008/042236号ならびに米国特許公報第2008/0064049号および同第2008/0178305号に見いだすことができる。

【0291】

一定の態様では、本明細書に記載するNotch経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性である。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性なIgG（例えばIgG1またはIgG2）抗体である。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、少なくとも1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間は、インビボで活性な融合タンパク質である。

10

【0292】

一定の態様では、本明細書に記載するNotch経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有する。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有するIgG（例えばIgG1、IgG2、またはIgG4）抗体である。一定の態様では、Notch経路インヒビターが、マウス、カニクイザル、またはヒトにおいて、少なくとも約5時間、少なくとも約10時間、少なくとも約24時間、少なくとも約2日、少なくとも約3日、少なくとも約1週間、または少なくとも約2週間の循環半減期を有する融合タンパク質である。ポリペプチドおよび抗体などの作用物質の半減期を増加（または減少）させる方法は、当技術分野において公知である。例えば、IgG抗体の循環半減期を増加させる公知の方法として、新生児型Fc受容体（FcRn）への抗体のpH依存的結合を増加させるFc領域への変異の導入が挙げられる。Fc領域を欠く抗体フラグメントの循環半減期を増加させる公知の方法として、PEG化などの技法が挙げられる。

20

【0293】

IV. 免疫療法剤

本発明は、免疫応答を調整するため、腫瘍成長を阻害するため、および/またはがんの処置のために、免疫療法剤との併用療法における使用のためのNotch経路インヒビターを提供する。本明細書に記載する方法のいくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1活性のモジュレーター、PD-L1活性のモジュレーター、PD-L2活性のモジュレーター、CTLA-4活性のモジュレーター、CD28活性のモジュレーター、CD80活性のモジュレーター、CD86活性のモジュレーター、4-1BB活性のモジュレーター、OX40活性のモジュレーター、KIR活性のモジュレーター、Tim-3活性のモジュレーター、LAG3活性のモジュレーター、CD27活性のモジュレーター、CD40活性のモジュレーター、GITR活性のモジュレーター、TIGIT活性のモジュレーター、CD20活性のモジュレーター、CD96活性のモジュレーター、IDO1活性のモジュレーター、サイトカイン、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーのメンバー、および免疫刺激オリゴヌクレオチドからなる群より選択される。

30

40

【0294】

いくつかの態様では、免疫療法剤が、PD-1アンタゴニスト、PD-L1アンタゴニスト、PD-L2アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、CD80アンタゴニスト、CD86アンタゴニスト、KIRアンタゴニスト、Tim-3アンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、TIGITアンタゴニスト、CD20アンタゴニスト、CD96アンタゴニスト、IDO1アンタゴニスト、および/またはKIRアンタゴニストからなる群より選択される。

【0295】

50

いくつかの態様では、免疫療法剤が、CD28アゴニスト、4-1BBアゴニスト、OX40アゴニスト、CD27アゴニスト、CD80アゴニスト、CD86アゴニスト、CD40アゴニスト、およびGITRアゴニストからなる群より選択される。

【0296】

いくつかの態様では、免疫療法剤が、サイトカイン、例えばケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、および腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーのメンバーを含むが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、免疫療法剤が、免疫刺激オリゴヌクレオチド、例えばCpGジヌクレオチドを含む。

【0297】

いくつかの態様では、免疫療法剤が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗KIR抗体、抗Tim-3抗体、抗LAG3抗体、抗CD27抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体、抗TIGIT抗体、抗CD20抗体、抗CD96抗体、および抗IDO1抗体を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0298】

いくつかの態様では、PD-1アンタゴニストが、PD-1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、PD-1に結合する抗体が、ペムプロリズマブ（KEYTRUDA、MK-3475）、ピジリズマブ（CT-011）、ニボルマブ（OPDIVO、BMS-936558、MDX-1106）、MEDI0680（AMP-514）、REGN2810、BGB-A317、PDR-001、またはSTI-A1110である。いくつかの態様では、PD-1に結合する抗体が、PCT公開公報第WO 2014/179664号に記載されており、例えば、APE2058、APE1922、APE1923、APE1924、APE1950、もしくはAPE1963として特定されている抗体、または、これらの抗体のいずれかのCDR領域を含む抗体である。他の態様では、PD-1アンタゴニストが、PD-L1またはPD-L2の細胞外ドメインを含む融合タンパク質、例えばAMP-224である。他の態様では、PD-1アンタゴニストが、ペプチドインヒビター、例えばAUNP-12である。

【0299】

いくつかの態様では、PD-L1アンタゴニストが、PD-L1に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、PD-L1に結合する抗体が、アテゾリズマブ（RG7446、MPDL3280A）、デュルバルマブ（MEDI4736）、BMS-936559（MDX-1105）、アベルマブ（MSB-0010718C）、KD033、KD033の抗体部分、またはSTI-A1014である。いくつかの態様では、PD-L1に結合する抗体が、PCT公開公報第WO 2014/055897号に記載されており、例えば、Ab-14、Ab-16、Ab-30、Ab-31、Ab-42、Ab-50、Ab-52、もしくはAb-55、または、これらの抗体のいずれかのCDR領域を含む抗体である。

【0300】

いくつかの態様では、CTLA-4アンタゴニストが、CTLA-4に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、CTLA-4に結合する抗体が、イピリムマブ（YERVOY）またはトレメリムマブ（CP-675,206）である。いくつかの態様では、CTLA-4アンタゴニストが、CTLA-4融合タンパク質または可溶性CTLA-4受容体、例えばKAHR-102である。

【0301】

いくつかの態様では、KIRアンタゴニストが、KIRに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、KIRに結合する抗体がリリルマブである。

【0302】

いくつかの態様では、LAG3アンタゴニストが、LAG3に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、LAG3に結合する抗体が、IMP701、IMP731、BMS-986016、LAG525、およびGSK2831781である。いくつかの態様では、LAG3アンタゴニストが、LAG3融合タンパク質または可溶性LAG3受容体、例えばIMP321である。

【0303】

いくつかの態様では、IDO1アンタゴニストが、インドキシマド（indoximad）（NLG-9189）、エパカドスタット（INCB024360）、またはNLG0919である。

【0304】

いくつかの態様では、免疫療法剤が、CD28アゴニスト、4-1BBアゴニスト、OX40アゴニ

10

20

30

40

50

スト、CD27アゴニスト、CD80アゴニスト、CD86アゴニスト、CD40アゴニスト、またはGITRアゴニストである。

【0305】

いくつかの態様では、OX40アゴニストが、OX40リガンド、またはそのOX40結合部分を含む。いくつかの態様では、OX40アゴニストがMEDI6383である。いくつかの態様では、OX40アゴニストが、OX40に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、OX40に結合する抗体が、MEDI6469、MEDI0562、またはMOXR0916 (RG7888) である。いくつかの態様では、OX40に結合する抗体が、PCT公開公報第WO 2012/027328号に記載されており、例えば、抗体マウス119-122、Ch119-122、Hu199-122、もしくは106-222、または、これらの抗体のいずれかのCDR領域を含む抗体である。いくつかの態様では、OX40アゴニストが、OX40リガンドを発現する能力を有するベクター（例えば、アデノウイルスなどの発現ベクターまたはウイルス）である。いくつかの態様では、OX40L発現ベクターが、Delta-24-RGDOXまたはDNX2401である。

10

【0306】

いくつかの態様では、4-1BB (CD137) アゴニストが、アンチカリン (anticalin) などの結合分子である。いくつかの態様では、アンチカリンがPRS-343である。いくつかの態様では、4-1BBアゴニストが、4-1BBに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、4-1BBに結合する抗体が、PF-2566 (PF-05082566) またはウレルマブ (BMS-663513) である。

【0307】

いくつかの態様では、CD27アゴニストが、CD27に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、CD27に結合する抗体がバルリルマブ (CDX-1127) である。

20

【0308】

いくつかの態様では、GITRアゴニストが、GITRリガンド、またはそのGITR結合部分を含む。いくつかの態様では、GITRアゴニストが、GITRに特異的に結合する抗体である。いくつかの態様では、GITRに結合する抗体が、TRX518、MK-4166、またはINBRX-110である。

【実施例】

【0309】

実施例1

CT26.WT腫瘍由来の細胞におけるPD-1発現に対する抗DLL4抗体の効果

30

マウス結腸癌腫CT26.WTをATCCから取得した。CT26.WT細胞を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹後部に皮下注射した。腫瘍を、200mm<sup>3</sup>の平均サイズに達するまで成長させた。マウスを無作為化して群に分け (n=10)、抗マウスDLL4 (mDLL4) 抗体21R30 (10mg/kg、毎週)、SIRP -Fcタンパク質 (10mg/kg、隔週)、または対照Fcタンパク質 (10mg/kg、毎週) で処置した。作用物質を、腹腔内中への注射によって投与した。初回用量の14日後に、腫瘍を採取し、組織抽出緩衝液 (Life Technologies) を用いて個々のマウスから全タンパク質を単離した。タンパク質 (20 µg) を、SDS-PAGEゲル電気泳動によって分解し、抗PD-1抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【0310】

図1Aに示すように、抗mDLL4抗体21R30で処置したマウス由来の腫瘍細胞溶解物におけるPD-1発現は、対照で処置したマウス由来の腫瘍細胞溶解物におけるPD-1発現に対して有意に減少した (p<0.05)。この減少は、SIRP -Fcタンパク質で処置したマウス由来の腫瘍細胞溶解物における減少よりも大きかった。図1Bは、各処置群の4種の個々の腫瘍由来の代表的なウェスタンブロット解析を示す。

40

【0311】

PD-1 (プログラム細胞死タンパク質1) は、活性化T細胞、B細胞、NK細胞、およびマクロファージの表面上に発現し、抗腫瘍応答を含む免疫応答を負に調節することが示されている。PD-1は、腫瘍細胞の表面上には発現していないため、これらの結果は、抗DLL4抗体での処置が、腫瘍関連免疫細胞上のPD-1の発現に直接的または間接的に影響を及ぼしうることを示唆する。これは、抗DLL4抗体または他のDLL4アンタゴニストが、可能性を秘めて

50

、PD-1発現細胞の抑制活性を阻害または遮断し、抗腫瘍免疫応答を増強できたことを示唆する。

【0312】

実施例2

腫瘍成長に対するマウスIL-2-Fcおよび抗mDLL4抗体の効果

マウス結腸癌腫CT26.WT細胞を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍を、 $100\text{mm}^3$ の平均腫瘍体積まで成長させた。マウスを無作為化して群に分け ( $n=10$ )、抗mDLL4抗体21R30 (30mg/kg、毎週)、mIL-2-Fcタンパク質 (1mg/kg、各週に5日)、または抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置した。抗GFP抗体およびマウスFcタンパク質を、それぞれ、21R30およびmIL-2-Fcのための対照として使用した。作用物質を、腹腔内注射によって投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスを用いて測定した。データを平均腫瘍体積 $\pm$ 標準誤差として表す。

10

【0313】

図2Aに示すように、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcは両方とも、対照と比較した際に、単一作用物質としてCT26.WT腫瘍成長を阻害した。さらにまた、抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用は、いずれかの作用物質のみよりも大きい程度まで腫瘍成長を阻害した。

【0314】

より大きく確立された腫瘍に対する作用物質の効果を評価するために、この実験を繰り返した。上記のように、CT26.WT細胞を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹後部に皮下注射したが、腫瘍を、 $400\text{mm}^3$ の平均腫瘍体積まで成長させた。マウスを無作為化して群に分け ( $n=6$ )、対照の抗GFP抗体 (30mg/kg、毎週)、抗mDLL4抗体21R30 (30mg/kg、毎週)、mIL-2-Fcタンパク質 (1mg/kg、各週に5日)、または抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置した。作用物質を、腹腔内注射によって投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスを用いて測定した。データを平均腫瘍体積 $\pm$ 標準誤差として表す。

20

【0315】

図2Bに示すように、腫瘍がより大きくかつより確立されている時に、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcの併用は、CT26.WT腫瘍の成長の阻害に対して、いずれかの作用物質のみまたは対照よりもずっと大きな効果を有した。

【0316】

類似した実験を、マウス肺腫瘍で実施した。非小細胞肺癌 (NSCLC) のマウスモデルは、OncoMedで確立され、本明細書においてKP\_LUN01と呼ばれる。この腫瘍株は、低分化型形態を有し、インビボで非常に短い腫瘍潜伏期を有し、高度に転移性であることが観察された。

30

【0317】

マウス肺腫瘍KP\_LUN01細胞 ( $50,000$ 細胞) を、6~8週齢のC57BL/6Jマウスの側腹部に皮下注射した (0日目)。腫瘍を、 $100\text{mm}^3$ の平均腫瘍体積まで8日間成長させた。マウスを無作為化して群に分け ( $n=10$ )、対照の抗GFP抗体 (20mg/kg)、抗mDLL4抗体21R30 (20mg/kg、8、15、および19日目)、mIL-2-Fcタンパク質 (1mg/kg、11、12、13、14、15、および19日目)、または抗mDLL4抗体およびmIL2-Fcの併用 (単一作用物質と同じ用量および投与) で処置した。作用物質を、腹腔内注射によって投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスを用いて測定した。データを平均腫瘍体積 $\pm$ 標準誤差として表す。

40

【0318】

図2Cに示すように、抗mDLL4抗体21R30およびmIL-2-Fcは、対照と比較した際に単一作用物質としてKP\_LUN01腫瘍の成長を阻害した。加えて、抗mDLL4抗体21R30およびmIL2-Fcの併用は、KP\_LUN01腫瘍の成長の阻害に対して、いずれかの作用物質のみまたは対照よりも大きな効果を有した。

【0319】

これらの結果は、免疫療法剤と併用した抗DLL4アンタゴニストの組み合わせが、可能性

50

のある抗腫瘍療法でありうることを示唆する。

【0320】

実施例3

細胞の細胞傷害アッセイ

ナチュラルキラー（NK）細胞傷害アッセイのために、マウスリンパ芽球細胞株YAC-1およびマウス結腸癌腫細胞株CT26.WTを、10%（v/v）胎児ウシ血清（FBS）、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシン（Gibco）を補給したRPMI1640培養培地（Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY）中、37 °Cで、5%CO<sub>2</sub>の加湿された大気において培養した。YAC-1細胞は、NK細胞活性に対して感受性であることが公知であり、NK細胞アッセイの良好な標的である。

10

【0321】

細胞を、実施例2における上記のCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。細胞を、10%（v/v）胎児ウシ血清（FBS）、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、および100 μg/mlストレプトマイシン（Gibco）を補給したRPMI1640培養培地（Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY）において、96ウェルV底プレートにプレATINGした。標的細胞（YAC-1またはCT26.WT）を10 μMカルセインAM（Life Technologies）で1時間、37 °C

で標識し、次いで、25:1のエフェクター：標的比で脾細胞と組み合わせた。37 °Cでの4時間のインキュベーション後に、細胞を含まない上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計で485nmの励起および535nmの発光で定量した。特異的細胞溶解のパーセンテージを、 $\text{溶解\%} = 100 \times (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR})$ （式中、ER、SR、およびMRは、それぞれ、実験カルセイン放出、自然カルセイン放出、および最大カルセイン放出に相当する）として決定した。自然放出は、培地のみにおいて（すなわち、エフェクター細胞の非存在下で）インキュベートした標的細胞によって発光される蛍光であり、他方、最大放出は、等体積の10%SDSで標的細胞を溶解することによって決定される。

20

【0322】

CT26.WT腫瘍を有するマウス由来のNK細胞は、マウスをmIL-2-Fcで処置していた時に、YAC-1およびCT26.WT標的細胞を殺傷する増大した能力を示した。抗mDLL4抗体での処置は、単独またはmIL-2との併用のいずれでも、この実験においてNK細胞傷害性に対して効果を有さないように見られた（図3Aおよび図3B）。

【0323】

類似した実験を、実施例2における上記のKP\_LUN01腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した細胞で実施した。細胞を処置後に単離し、アッセイを、標的としてYAC-1細胞を用いて行った。KP\_LUN01腫瘍を有するマウス由来のNK細胞は、マウスを単一作用物質として抗mDLL4抗体21R30またはmIL-2-Fcで処置していた時に、YAC-1標的細胞を殺傷する増大した能力を示した。作用物質を組み合わせた時には、NK活性の増大はなかった（図3C）。

30

【0324】

T細胞の細胞傷害アッセイのために、細胞を、処置後のCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取して、30IU/mL組換えマウスIL-2（Peprtech, Rocky Hill, NJ）および0.1 μg/ml AH-1ペプチド（Anaspec, Fremont, CA）を補給した培地において培養した。このペプチドの配列（SPSYVYHQF）は、CT26.WT細胞株にとって内在性である環境栄養性マウス白血病プロウイルスのgp70エンベロープタンパク質のH2-L<sup>d</sup>拘束性エピトープ（アミノ酸6~14）である。脾細胞を、37 °Cで5日間培養し、採取し、計数して、標的としてのCT26.WT腫瘍細胞とともに上記のような細胞傷害アッセイにおいて使用した。細胞のエフェクターCD8<sup>+</sup>表現型を、ペプチド/IL-2刺激後にFACS解析によって確認した（データは示していない）。

40

【0325】

図4Aに示すように、CT26.WT腫瘍を有するマウス由来のCD8<sup>+</sup>細胞傷害性細胞は、対照で処置したマウス由来の細胞と比較した際に、マウスを抗mDLL4抗体で処置していた時、CT26.WT標的細胞を殺傷する増大した能力を示した。mIL-2-Fcで処置した腫瘍を有するマウス由来のCD8<sup>+</sup>細胞もまた、対照と比較した際に標的細胞を殺傷する増大した能力を示した

50

が、その効果は抗mDLL4抗体でのものほど強くはなかった。さらにまた、抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置したマウス由来の細胞は、いずれかの処置のみよりも大きい、標的細胞を殺傷する能力を有した。

#### 【0326】

類似した実験を、実施例2における上記のKP\_LUN01腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した細胞で実施した。CD8<sup>+</sup>T細胞特異的なMHCクラスI腫瘍ペプチド配列は、KP\_LUN01腫瘍株について公知ではないため、KP\_LUN01腫瘍細胞を刺激物質として使用した。KP\_LUN01細胞を、25 µg/ml マイトマイシンC (Sigma-Aldrich) で30分間、37 °C で処置し、洗浄して、10% FCS、2mM L-グルタミン、および抗生物質を含有するRPMI-1640培地中に10<sup>7</sup>細胞/ml で再懸濁した。脾細胞を、マイトマイシン処置したKP\_LUN01細胞と20:1の比で共培養し、37 °C で7日間インキュベートし、採取し、計数して、上記のような細胞傷害アッセイにおいて使用した。カルセインAM標識したKP\_LUN01腫瘍細胞を、12.5:1のエフェクター：標的比で標的として使用した。カルセイン放出を4時間後に決定し、特異的溶解を上記のように計算した。

10

#### 【0327】

図4Bに示すように、KP\_LUN01腫瘍を有するマウス由来のCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞は、マウスを抗mDLL4抗体で処置していた時に、KP\_LUN01標的細胞を殺傷する増大した能力を示した。mIL-2-Fcで処置した腫瘍を有するマウス由来のCD8<sup>+</sup>T細胞は、対照で処置したマウス由来の細胞と比較した際に、細胞溶解活性のわずかな増大のみを示した。抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置したマウス由来の細胞は、いずれかの処置のみよりも有意に大きい、標的細胞を殺傷する能力を有した。

20

#### 【0328】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストでの処置が、NK細胞および腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害活性を増大させることを実証する。さらにまた、DLL4アンタゴニストおよびIL-2などの免疫療法剤での併用処置は、さらにNK細胞およびCTLの細胞溶解活性を増強し、そのため、より強い抗腫瘍応答を促しうる。

#### 【0329】

#### 実施例4

#### IFN- $\gamma$ についてのELISpotアッセイ

ELISpotは、サイトカイン分泌細胞の検出のための高感度イムノアッセイである。簡潔に言うと、ELISpotアッセイは、マイクロプレートのウェル上にプレコーティングされた、所望のサイトカインに特異的な捕捉抗体を使用する。刺激した細胞をウェル中に分割すると、いずれかのサイトカイン分泌細胞のすぐ近くの固定化された抗体が、分泌されたサイトカインに結合する。標準的な洗浄工程および適当な検出試薬とのインキュベーションがその後に続く。例えば、ビオチン化された検出抗体、それに続くアルカリホスファターゼにコンジュゲートされたストレプトアビジン、および着色基質溶液が、一般に使用される。着色沈殿が、サイトカイン局在化の部位で形成してスポットとして現れ、各個々のスポットが、個々のサイトカイン分泌細胞に相当する。スポットは、自動化リーダーシステムで、または手動で顕微鏡を用いて計数されうる。

30

#### 【0330】

インターフェロン (IFN- $\gamma$ ) - 分泌細胞を、マウスIFN- $\gamma$  ELISpotキット (マウスIFN- $\gamma$  ELISpot PLUSキット, Mabtech, Cincinnati, OH) を用いて検出した。細胞を、実施例2における上記のように、抗mDLL4抗体21R30および/またはmIL-2-Fcで処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。各マウス由来の脾細胞 (2 × 10<sup>5</sup>細胞/ウェル) を、マウスIFN- $\gamma$  に特異的な捕捉抗体でプレコーティングされた、提供されたプレート上にプレコーティングした。細胞を、腫瘍特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞ペプチド (AH-1) の存在下または非存在下で培養し、48時間インキュベートした。IFN- $\gamma$  を分泌する細胞を、製造業者の説明書にしたがって検出した。スポットを、6000 F-z Bioreader (Biosys, Miami, FL) を用いて計数した。データを、平均 ± 標準誤差スポット/ウェルまたは全光学密度として表す。

40

50

## 【0331】

図5に示すように、腫瘍特異的なIFN- $\gamma$  分泌CD8<sup>+</sup>T細胞が、単一作用物質としてmIL-2-Fcで処置したマウスにおいて増加した。IFN- $\gamma$  産生CD8<sup>+</sup>T細胞の少なめであるが検出可能な増加がまた、抗mDLL4抗体21R30で処置したマウスにおいても観察された。さらにまた、抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置したマウス由来の腫瘍特異的なIFN- $\gamma$  分泌CD8<sup>+</sup>T細胞が、いずれかの作用物質のみでよりも大きい程度まで増加した。

## 【0332】

これらのデータは、DLL4アンタゴニストが、腫瘍特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞活性を誘発することができ、DLL4アンタゴニストおよびT細胞標的化免疫療法との併用が良好な抗腫瘍療法であろうという仮説を強くすることを示唆する。

## 【0333】

## 実施例5

CT26.WT腫瘍におけるCD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞

実施例1~4からの結果に基づいて、本発明者らは、単一作用物質としてまたは免疫療法剤との併用のいずれかでのDLL4アンタゴニストによる処置が、免疫細胞上のPD-1などの免疫チェックポイント受容体に対して有する効果を、さらに調査した。

## 【0334】

CT26.WT細胞を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍を、100mm<sup>3</sup>の平均サイズに達するまで成長させた。マウスを無作為化して群に分け(n=7)、抗mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用、または対照タンパク質で処置した。抗mDLL4抗体を、毎週30mg/kgで投与し、mIL-2-Fcを、各週に5日間、1mg/kgで投与した。投与は、腹腔内中への注射によった。腫瘍細胞注射の21日後、および初回処置の15日後に、腫瘍を採取して、単一細胞懸濁液を調製した。細胞を、FITCにコンジュゲートされた抗CD45抗体を用いてCD45について、およびアロフィコシアニン(APC)にコンジュゲートされた抗PD-1抗体を用いてPD-1について染色した。蛍光活性化細胞選別解析(FACS)を、FACSCanto II機器(BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて行い、Divaソフトウェアを用いてデータを加工処理した。

## 【0335】

CD45は、血液リンパ細胞上に排他的に発現しており、「共通白血球抗原」と呼ばれている。CD45は、すべての有核造血細胞およびその前駆体の細胞表面上に高レベルで発現しており、そのためこのタンパク質は、腫瘍関連免疫細胞を検出するために使用することができる。上記のように、PD-1は、免疫応答の抑制に一般に関与する免疫細胞の細胞表面上のタンパク質である。

## 【0336】

処置したマウス由来の腫瘍におけるCD45<sup>+</sup>細胞およびCD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを、図6に示す。CD45<sup>+</sup>細胞のパーセンテージは、mIL-2-Fcで処置したマウス由来の腫瘍において増大したが、個々のマウス間には高レベルの変動性があった。興味深いことに、CD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞のパーセンテージは、抗mDLL4抗体で処置したマウスおよびmIL-2-Fcで処置したマウス由来の腫瘍において低減した。これらの結果は、実施例1に記載したウェスタンブロット解析からのデータと一致している。CD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>細胞のパーセンテージは、抗mDLL4抗体およびmIL-2-Fcの併用で処置したマウス由来の腫瘍においてさらに減少した。

## 【0337】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストおよびIL2などの免疫療法剤の併用を、腫瘍関連PD-1<sup>+</sup>免疫細胞の数を減少させ、そのためそれらの細胞の抑制効果を阻害するために使用できることを示唆する。

## 【0338】

## 実施例6

## CT26.WT腫瘍の成長に対する抗DLL4抗体、抗CTLA-4抗体、および抗PD-L1抗体の効果

CT26.WT細胞を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍を、100mm<sup>3</sup>の

10

20

30

40

50

平均腫瘍体積まで成長させた。マウスを無作為化して群に分け (n = 9)、対照抗体 (30mg/kg、毎週)、抗mDLL4抗体21R30 (30mg/kg、毎週)、抗mPD-L1抗体 (10mg/kg、各週に3回)、抗mCTLA-4抗体 (10mg/kg、各週に3回)、抗mDLL4抗体および抗mPD-L1の併用、または抗mDLL4抗体および抗mCTLA-4の併用で処置した。作用物質を、腹腔内注射によって投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスを用いて測定した。データを平均腫瘍体積 ± 標準誤差として表す。

#### 【0339】

図7Aに示すように、単一作用物質として、抗mDLL4抗体は、CT26.WT腫瘍成長を抗mPD-L1抗体または抗mCTLA-4抗体と類似した程度まで阻害した。平均腫瘍体積として見た時に、併用療法は、単一作用物質よりも検出可能なように良好ではなかった。しかし、腫瘍成長の阻害をマウス基準によってマウス上で評価した時には、抗mCTLA-4抗体または抗mPD-L1抗体のいずれかと併用した抗mDLL4抗体21R30の組み合わせは、抗体を単一作用物質として使用した時よりも多くの個々のマウスにおいて、腫瘍成長に対してより大きい阻害効果を有するよう見られた (図7Bおよび図7C)。

10

#### 【0340】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストが、腫瘍成長をさらに阻害するように、抗CTLA-4抗体および抗PD-L1抗体などの免疫チェックポイントインヒビターを増強でき、かつそれらと相乗作用を示しうることを示唆する。

#### 【0341】

##### 実施例7

20

##### インビボでのCT26.WT結腸腫瘍成長の阻害

CT26.WT腫瘍細胞 (20,000細胞) の単一細胞懸濁液を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍細胞注射の1週間後に、触知可能な腫瘍を有するマウスを、抗mPD-1抗体 (250 μg/マウス)、抗mDLL4抗体21R30 (20mg/kg)、抗mPD-1抗体および抗mDLL4抗体21R30の併用、または同じ量のアイソタイプ対照抗体で処置した。マウスに、腹腔内注射により3週間にわたって1週間に2回、抗体を投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスで測定した。データを平均 ± 標準誤差として表す。

#### 【0342】

図8Aに示すように、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際にCT26.WT腫瘍成長を有意に低減させた。腫瘍成長は、23日目に対照と比較した際に78%阻害され、 $p = 0.0016$ であった。28日目の個々のマウスの評価により、10匹のマウスのうち3匹において検出可能な腫瘍が示されなかった (図8B)。第2の実験においては、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用で処置した20匹のマウスのうち14匹が、検出可能な腫瘍を示さなかった。

30

#### 【0343】

抗腫瘍メモリー細胞集団の存在および/または機能性を評価する1つの方法は、以前に処置したマウスを新鮮な腫瘍細胞で再攻撃することである。上記の研究由来の、抗mPD-1抗体 (n = 11) または抗mPD-1抗体および抗mDLL4抗体21R30の併用 (n = 14) で以前に処置したマウスを、再攻撃研究のために使用した、その腫瘍が完全に退縮しており、最初の腫瘍注射の少なくとも85日後に検出不可能であったマウスを、CT26.WT腫瘍細胞 (20,000細胞) で再攻撃した。腫瘍再攻撃に供したマウスは、再攻撃の66日前に最後の処置用量を受けていた。対照群として、未処置のBalb/Cマウス (n = 10) にCT26.WT腫瘍細胞 (20,000細胞) を注射した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスで測定した。データを平均 ± 標準誤差として表す。

40

#### 【0344】

図9に示すように、未処置マウスにおけるCT26.WT腫瘍の平均腫瘍体積は、マウスを安楽死させた28日目まで絶え間なく成長した。対照的に、抗PD-1抗体または抗PD-1抗体および抗mDLL4抗体21R30の併用で以前に処置していたマウスにおけるCT26.WT腫瘍は、非常に小さかった (それぞれ、 $46\text{mm}^3$  および  $27\text{mm}^3$ )。個々のマウスの評価により、抗mPD-1抗体で

50

当初処置した11匹のマウスのうち5匹(46%)が、完全に防護されたように見られ(検出可能な腫瘍なし)、抗mPD-1および抗mDLL4の併用で当初処置した11/14(79%)のマウスが、完全に防護されたことが示された。

【0345】

最初の再攻撃時に腫瘍を発生しなかった各群由来の5匹のマウスを、2度目に50,000個のCT26.WT細胞(初回用量の細胞の数の2.5倍)で再攻撃した。再び対照として、5匹の未処置マウスに、同じ数のCT26.WT細胞(50,000細胞/マウス)を注射した。その前の実験におけるように、対照群における5匹のマウスのすべては大きな腫瘍を発生し、21日目に安楽死させた。小さな腫瘍(平均56mm<sup>3</sup>)が、抗mPD-1抗体で当初処置していた5匹のマウスのうち3匹において成長した。抗DLL4抗体および抗mPD-1抗体の併用で当初処置していたマウスにおいては腫瘍が成長しなかった。これらの結果を表1に要約し、各群における腫瘍を有さないマウスのパーセンテージとして示す。

10

【0346】

【表1】

	初回攻撃 20,000細胞	1回目の再攻撃 20,000細胞	2回目の再攻撃 50,000細胞
対照マウス	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/5)
抗mPD-1 Abで 処置したマウス <sup>1</sup>	55% (11/20)	46% (5/11)	40% (2/5)
抗mPD-1 Abおよび 抗mDLL4 Abで 処置したマウス <sup>1</sup>	70% (14/20)	79% (11/14)	100 (5/5)

20

<sup>1</sup>初回の腫瘍攻撃後にのみ、抗体で処置したマウス

【0347】

これらのマウスは、CT26.WT腫瘍細胞での再攻撃から強く防護されたように見られた。これらの結果は、抗mDLL4抗体および抗mPD-1抗体の併用での処置後の免疫原性記憶の存在を示唆する。

【0348】

実施例8

IFN- $\gamma$ 、IL-2、およびIL-17についてのELISpotアッセイ、ならびにIL-6についてのELISA IFN- $\gamma$ 分泌細胞を、マウスIFN- $\gamma$  ELISpotキット(MabTech)を用いて検出した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30(n=6)、抗mPD-1抗体(n=6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用(n=5)、または対照抗体(n=5)で処置した腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。各処置群における各マウス由来の脾細胞(5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ウェル)を、マウスIFN- $\gamma$ に特異的な抗体でコーティングされた96ウェルプレート中に分注した。細胞を、腫瘍特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞ペプチド(AH-1)の存在下または非存在下で培養し、48時間インキュベートした。IFN- $\gamma$ を分泌する細胞を、製造業者の説明書にしたがって検出した。スポットをBioreader 6000 F-z機器(BioSys)を用いて計数した。データを平均 $\pm$ 標準誤差として表示する。

30

40

【0349】

図10Aに示すように、腫瘍特異的なIFN- $\gamma$ 分泌CD8<sup>+</sup>T細胞が、抗mPD-1抗体で処置したマウスにおいて、ならびに抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用で処置したマウスにおいて増加した。

【0350】

IL-2分泌細胞を、マウスIL-2 ELISpotキット(MabTech)を用いて検出した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30(n=6)、抗mPD-1抗体(n=6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用(n=5)、または対照抗体(n=5)で処置した腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。各処置群における各マウス由来の脾細胞(5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ウェル)を、マウスIL-2に特異

50

的な抗体でコーティングされた96ウェルプレート中に分注した。細胞を、AH-1ペプチドの存在下で48時間インキュベートした。IL-2を分泌する細胞を、製造業者の説明書にしたがって検出した。スポットをBioreader 6000 F-z機器 (BioSys) を用いて計数した。データを平均 ± 標準誤差として表す。

#### 【 0 3 5 1 】

図10Bに示すように、IL-2分泌細胞が、抗mDLL4抗体21R30および抗PD1抗体の併用で処置したマウスにおいてのみ増加した。

#### 【 0 3 5 2 】

IL-17分泌細胞を、マウスIL-17 ELISPOTキット (MabTech) を用いて検出した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30 (n = 6)、抗mPD-1抗体 (n = 6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用 (n = 5)、または対照抗体 (n = 5) で処置した腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。各処置群内の各マウス由来の脾細胞 ( $5 \times 10^5$  / ウェル) を、マウスIL-17に特異的な抗体でコーティングされた96ウェルプレート中に分注した。細胞を48時間インキュベートした。IL-17を分泌する細胞を、製造業者の説明書にしたがって検出した。スポットをBioreader 6000 F-z機器 (BioSys) を用いて計数した。データを平均 ± 標準誤差として表す。

10

#### 【 0 3 5 3 】

図10Cに示すように、IL-17分泌細胞が、抗mDLL4抗体21R30で処置したマウスにおいて、ならびに抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用で処置したマウスにおいて減少した。その後の実験において、単一作用物質としての抗mPD-1抗体、抗mDLL4抗体および抗mVEGF F抗体の併用、ならびに抗mDLL4抗体、抗mVEGF抗体、および抗mPD-1抗体の三種併用が、処置したマウス由来の脾臓においてIL-17分泌細胞の数を低減させなかったことが示された (データは示していない)。これは、DLL4のみの遮断が、VEGFと組み合わせたDLL4の遮断、またはVEGFおよびPD-1と組み合わせたDLL4の遮断の機序と比較した際に、免疫応答を調節する異なる機序を有しうることを示唆する。

20

#### 【 0 3 5 4 】

IL-6産生を、マウスIL-6 ELISAキット (eBioscience) を用いて検出した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30 (n = 6)、抗mPD-1抗体 (n = 6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用 (n = 5)、または対照抗体 (n = 5) で処置した腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。各処置群内の各マウス由来の脾細胞 ( $5 \times 10^5$  / ウェル) を、96ウェルプレート中に分注した。細胞を、腫瘍特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞ペプチド (AH-1) の存在下または非存在下で培養し、48時間インキュベートした。IL-6のレベルを、製造業者の説明書にしたがって各細胞上清において検出した。プレートをSpectraMax Plus機器 (Molecular Devices) を用いて読み取った。データを平均 ± 標準誤差として表す。

30

#### 【 0 3 5 5 】

IL-6産生は、AH-1ペプチドの存在下または非存在下でインキュベートした細胞由来の上清において同じであった。図10Dに示すように、抗mPD-1抗体で処置したマウス由来の、ならびに抗mDLL4抗体21R30および抗mPD1抗体の併用で処置したマウスにおける脾細胞によって産生されたIL-6のレベルは、抗mDLL4抗体21R30のみまたは対照抗体で処置したマウス由来の脾細胞によって産生されたIL-6と比較した際に大きく低減した。

40

#### 【 0 3 5 6 】

IFN- $\gamma$  は、一般に、NK細胞、Th1 CD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞、抗原提示細胞、およびB細胞によって産生される。研究により、腫瘍免疫におけるIFN- $\gamma$  の役割、ならびにそれが、他のサイトカイン、特にIL-12およびIL-2によって媒介される抗腫瘍活性の調節物質でありうることを示唆されている。IL-2の主要な供給源は、Th1 CD4<sup>+</sup> T細胞であり、その主な役割は、オートクラインおよびパラクラインの様式でT細胞およびNK細胞の活性化および増殖を促進することである。特に、NK細胞のIL-2に対する曝露は、増殖および細胞溶解性の増強をもたらす。加えて、IL-2は、メモリーT細胞の維持および生存のために必要とされる。したがって、IFN- $\gamma$  および/またはIL-2の増加をもたらすDLL4アンタゴニストおよび/または抗mPD-1抗体での処置は、抗腫瘍免疫を増強するはずである。IL-17は、自己

50

免疫疾患において炎症誘発性の役割を有すると確信されているヘルパーT細胞のサブセットである、 $T_H17$ 細胞によって産生される。IL-17は、ケモカインの局所誘発、ならびにG-CSFおよびGM-CSF産生の刺激を通して、単球および顆粒球系列の骨髄細胞の動員に寄与する。腫瘍に対する免疫応答の無効性または欠如の要因は、単球系列および顆粒球系列の両方に由来するMDSCの存在である可能性がある。腫瘍特異的な $T_H17$ 細胞は、骨髄細胞の腫瘍への誘引の促進、およびしたがって免疫抑制性環境の促進において役割を果たしうる。腫瘍特異的な $T_H17$ 細胞の頻度およびIL-17の産生を低減させるDLL4アンタゴニストの能力は、そのため、MDSCの生成を低減させ、抗腫瘍免疫を促進しうる。IL-6は、一般に、マクロファージ、内皮細胞、およびいくつかの活性化T細胞によって産生される。IFN- $\gamma$  およびIL-2と対照的に、IL-6の過剰発現は、多くのがんの病因において役割を果たすように見られる。したがって、IL-6産生の減少をもたらすDLL4アンタゴニストおよび/または抗PD-1抗体での処置は、抗腫瘍免疫を増強するはずである。

10

【0357】

実施例9

骨髄由来サプレッサー細胞および活性化骨髄細胞のFACS解析

研究により、腫瘍免疫の強力なサプレッサーであり、そのため癌免疫療法にとって有意な障害である骨髄起源細胞が特定されている（例えば、Ostrand-Rosenberg et al., 2009, J. Immunol., 182:4499-4506を参照されたい）。MDSCは、がんを有する大部分の患者および実験動物において、血液、リンパ節、骨髄、および腫瘍部位に蓄積する。MDSCは、適応免疫および自然免疫の両方を阻害することが示されている。

20

【0358】

MDSCは、抗腫瘍免疫応答の阻害、血管新生の促進、および前転移環境の創出によってがんの進行を容易にすることが確信されている。MDSCは、 $CD4^+$  T細胞および $CD8^+$  T細胞の増殖および活性化を抑制し、それにより抗腫瘍免疫を阻害する。重要なことに、MDSCは、Treg細胞の生成を容易にする。

【0359】

MDSCは、骨髄細胞の不均質なファミリーである。マウスにおいて、MDSCは、骨髄系列分化抗原であるGr1およびCD11bの細胞表面発現を特徴とする。MDSCは、2種の亜集団：顆粒球系MDSC (G-MDSC) および単球系MDSC (M-MDSC) に分けることができる。G-MDSCは、典型的に、多くに分裂した核および $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$  表現型を有し、他方、M-MDSCは、単球系形態および $CD11b^+ Ly6G^+ / - Ly6C^{high}$  表現型を有する。MDSCの両方の集団は、アルギナーゼ、誘発性酸化窒素合成酵素 (iNOS)、酸化窒素、および反応性酸素種の産生の増大を含む複数の機序によって、T細胞応答を抑制することが示されている。したがって、MDSCは、免疫抑制性腫瘍微小環境に寄与し、抗腫瘍免疫応答の効果を限定しうる。

30

【0360】

DLL4アンタゴニストおよび/または抗PD1抗体で処置したマウスにおけるMDSCの数を評定した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30 (n=6)、抗mPD-1抗体 (n=6)、抗mDLL4抗体21R30 および抗mPD-1抗体の併用 (n=5)、または対照抗体 (n=5) で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。

【0361】

新しく調製した単一細胞懸濁液を、ブロッキング溶液を用いて10分間ブロッキングし、次いで、FACS緩衝液 (HBSS + 2% FCS) 中の抗マウスGr1 (クローンRB6-8C5, BioLegend) および抗マウスCD11b (クローンM1/70, BioLegend) で20分間、氷上で染色した。活性化骨髄細胞集団は、脾臓細胞を、抗マウスCD11bおよび抗マウスMHCクラスII抗体で染色することによって解析した。細胞を、洗浄し、固定可能な細胞生死判別色素 (eBiosciences) で標識して、解析のために2%パラホルムアルデヒドにおいて固定した。細胞を、FACScan to II機器 (BD Sciences) を用い、Divaソフトウェアを用いて解析した。死細胞を、生死判別色素を用いて排除し、細胞ダブレットおよび凝集塊を、ダブレット識別ゲーティングを用いて排除した。細胞を、M-MDSCおよび活性化骨髄集団について解析した。

40

【0362】

50

図11に示すように、抗mDLL4抗体21R30のみまたは抗mPD-1抗体と併用した抗体21R30での処置は、抗mPD-1抗体のみまたは対照抗体での処置と比較した際に、腫瘍を有するマウス由来の脾臓におけるM-MDSCのパーセンテージを低減させた。対照的に、抗mDLL4抗体21R30のみ、抗mPD-1抗体のみ、または抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際に活性化骨髄細胞のパーセンテージを増大させた。

#### 【0363】

これらのデータは、DLL4の標的化が、MDSCの抑制活性の、これらの免疫抑制性細胞のパーセンテージおよび/または数を低減させることによる障害に寄与していることを示唆する。この結果は、DLL4アンタゴニスト処置が、腫瘍特異的な $T_H17$ 細胞の頻度を低減させることによって、MDSCの生成を低減させ、生産的な抗腫瘍免疫を促進するという本発明者らの仮説と一致する。MDSC数の低減および/または骨髄細胞の活性化は、腫瘍微小環境内でさらにより大きい可能性があるが、これは、処置後の小さな腫瘍サイズのために現時点では評価されていない。

#### 【0364】

##### 実施例10

##### メモリーT細胞のFACS解析

メモリーT細胞は、不均質なT細胞集団であり、表現型および機能に基づいて2種の別個のサブセット(セントラルメモリーT細胞およびエフェクターメモリーT細胞)に分離される。マウスにおいて、セントラルメモリー $CD8^+$ T細胞およびエフェクターメモリー $CD8^+$ T細胞は、そのそれぞれのCD44およびCD62Lの発現レベルにしたがって2種の別個の集団に分離することができる。CD44<sup>高</sup>CD62L<sup>低</sup> $CD8^+$ T細胞集団は、エフェクターメモリーを構成するエフェクター機能を迅速に獲得し、他方、CD44<sup>高</sup>CD62L<sup>高</sup>集団を発現する $CD8^+$ T細胞は、抗原認識時に甚大な増殖能力を獲得し、セントラルメモリーT細胞を構成する。

#### 【0365】

抗PD1抗体および/または抗mDLL4抗体で処置したマウスにおいて、セントラルメモリー細胞またはエフェクターメモリー $CD8^+$ T細胞の数を評定した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30(n=6)、抗mPD-1抗体(n=6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用(n=5)、または対照抗体(n=5)で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。

#### 【0366】

FACS染色を、抗マウスCD8b(クローン53-5.8, BioLegend)、抗マウスCD4(クローンGK1.5, BioLegend, Clone)、抗マウスCD62L(クローンMEL-14, BioLegend)、および抗マウスCD44(クローン1M7, BioLegend)を用いて上記のように行った。細胞を、CD44<sup>高</sup>CD62L<sup>高</sup>発現(セントラルメモリー)およびCD44<sup>高</sup>CD62L<sup>低</sup> $CD8^+$ 発現(エフェクターメモリー)について解析した。

#### 【0367】

図12に示すように、抗mDLL4抗体21R30のみまたは抗mPD-1抗体と併用した抗mDLL4抗体21R30での処置は、抗mPD-1抗体のみまたは対照抗体での処置と比較した際に、脾臓におけるセントラルメモリー $CD8^+$ T細胞およびエフェクターメモリー $CD8^+$ T細胞のパーセンテージを増大させた。

#### 【0368】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストおよび抗PD-1抗体の併用が、セントラルメモリー $CD8^+$ T細胞およびエフェクターメモリー $CD8^+$ T細胞の生成を容易にすることを示唆する。これらのメモリーT細胞は、長期の免疫記憶機能を提供し、腫瘍の再発および/または転移に対する免疫応答を提供するように働きうる。これらの結果はまた、DLL4アンタゴニスト処置が、腫瘍特異的な $T_H17$ 細胞の頻度を低減させることによって、MDSCの生成を低減させ、それによってT細胞が、より生産的かつ実質的な抗腫瘍免疫応答を装備することを可能にするという本発明者らの仮説とも一致する。DLL4アンタゴニストの別個の機序は、抗PD-1抗体などの免疫チェックポイントインヒビターによって促進される抗腫瘍応答を相補および促進することができる。

#### 【0369】

## 実施例11

## 制御性T細胞 (Treg) アッセイ

Tregは、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖性応答を抑制する免疫T細胞集団である。DLL4アンタゴニストおよび/またはPD-1抗体で処置したマウスにおけるTregの機能性を、ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞の増殖に対してTregが有する効果を決定することによって評定した。

## 【0370】

ナイーブT細胞を、マウスCD3<sup>+</sup>T細胞濃縮カラム (R&D Systems) を用いて、処置していないマウスの脾臓から精製した。精製したT細胞を、5 μM violet tracking dye (VTD) (Life Technologies) で標識した。2 × 10<sup>5</sup>個のVTD標識T細胞を、T細胞増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体でコーティングされたビーズで刺激した。Tregを、Treg単離キット (Miltenyi Biotec) を用いて、抗mDLL4抗体21R30 (n = 6)、抗PD-1抗体 (n = 6)、抗mDLL4抗体21R30および抗PD-1抗体の併用 (n = 5)、または対照抗体 (n = 5) で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から単離した。T細胞増殖に対するTregの影響を判定するために、VTD標識ナイーブT細胞を、抗mDLL4抗体で処置したマウス、抗mPD-1抗体で処置したマウス、抗mDLL4抗体および抗mPD-1抗体の併用で処置したマウス、ならびに対照抗体で処置したマウスから単離した脾臓Tregと共培養した。刺激したVTD標識細胞 (エフェクター) を、Treg細胞と共培養した (1:0.5または1:0.25のエフェクター:Treg)。4日目に、細胞を洗浄して、抗mCD4抗体および抗mCD8抗体で染色した。VTD濃度における変化をFACS解析によって評定し、結果を用いてT細胞増殖を計算した。

10

20

## 【0371】

図13に示すように、抗mPD-1抗体での処置は、CD4<sup>+</sup>T細胞増殖に対するTregの抑制機能を低減させた。抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用での処置もまた、CD4<sup>+</sup>T細胞増殖に対するTregの抑制機能を低減させたが、より少ない程度であった。対照的に、抗DLL4抗体21R30での処置は、CD8<sup>+</sup>T細胞増殖に対するTregの抑制機能の低減に対して、抗mPD-1抗体よりも大きな効果を有した。そして興味深いことに、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用での処置は、CD8<sup>+</sup>T細胞増殖に対するTregの抑制機能の低減に対して、いずれかの抗体のみよりも有意により大きい効果を有した。

## 【0372】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストおよび抗PD-1抗体の併用が、Treg機能の低減につながりうることを示唆する。Treg機能の抑制は、全抗腫瘍免疫応答を増強することができた。これらの結果は、DLL4アンタゴニスト処置が、腫瘍特異的なT<sub>H</sub>17細胞の頻度を低減させることによって、MDSCの生成を低減させ、それによってより堅牢な免疫応答を促進するという本発明者らの仮説と一致する。MDSCは、PD-L1/B7-H1およびアルギナーゼを含むいくつかの機序を通して、Tregの維持および拡大に寄与する。DLL4アンタゴニストの別個の機序は、単一作用物質として抗腫瘍免疫を促進するし、かつまた、抗PD-1などのチェックポイントインヒビターの作用を称賛もする。

30

## 【0373】

## 実施例12

## T細胞の細胞傷害アッセイ

DLL4アンタゴニストおよび/または抗PD-1抗体で処置したマウスにおいて、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞の機能性を評定した。細胞を、抗mDLL4抗体21R30 (n = 6)、抗mPD-1抗体 (n = 6)、抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用 (n = 5)、または対照抗体 (n = 5) で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。脾細胞を、30IU/ml組換えマウスIL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) および1 μg/mlのCD8<sup>+</sup>T細胞ペプチドであるAH-1ペプチドを補給した培地において培養した。脾細胞を、37 °Cで7日間インキュベートし、採取し、計数して、標的としてのCT26.WT腫瘍細胞とともに細胞傷害アッセイにおいて使用した。CT26.WT標的細胞を10 μMカルセインAM (Life Technologies) で1時間、37 °Cで標識し、次いで、50:1のエフェクター:標的比で脾細胞と組み合わせた。37 °Cでの4時間のインキュベーション後に、細胞を含まない上清を採取して、カルセイン放出を、蛍光光度計

40

50

で485nmの励起および535nmの発光で定量した。特異的細胞溶解のパーセンテージを、溶解% =  $100 \times (ER - SR) / (MR - SR)$  (式中、ER、SR、およびMRは、それぞれ、実験カルセイン放出、自然カルセイン放出、および最大カルセイン放出に相当する)として決定した。自然放出は、培地のみにおいて(すなわち、エフェクター細胞の非存在下で)インキュベートした標的細胞によって発光される蛍光であり、他方、最大放出は、等体積の10%SDSで標的細胞を溶解することによって決定される。

#### 【0374】

図14に示すように、抗mDLL4抗体21R30または抗mDLL4抗体21R30および抗mPD-1抗体の併用のいずれかで処置したマウス由来の腫瘍特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞は、対照と比較した際に増大したレベルの、親腫瘍細胞に対する細胞溶解活性を有し、抗mDLL4抗体および抗mPD-1抗体の併用は、単一作用物質に対してさらにCD8<sup>+</sup>T細胞活性を増大させた。

10

#### 【0375】

これらの結果は、DLL4アンタゴニストおよび抗PD-1抗体の併用が、細胞溶解性CD8<sup>+</sup>T細胞機能を増大させることを示唆する。この増大した細胞溶解性T細胞機能は、全抗腫瘍免疫応答を増強することができた。これらの結果はまた、DLL4アンタゴニスト処置が、腫瘍特異的なT<sub>H</sub>17細胞の頻度を低減させることによって、MDSCの生成を低減させ、それによって細胞溶解性T細胞機能の増大およびより堅牢な全抗腫瘍免疫応答を促進するという本発明者らの仮説とも一致する。

#### 【0376】

##### 実施例13

20

##### IHCによって評価するPD-L1タンパク質発現

PD-L1の免疫組織化学(IHC)アッセイを用いて、試料におけるPD-L1の発現レベルを決定する。FFPE切片を切って、コーティングされたガラススライド上にマウントする。抗原回復のために、組織を、キシレン、100%エタノール、95%エタノール、70%エタノール、および蒸留水において連続的にインキュベートすることによって、脱パラフィン化して再水和する。抗原回復のために、スライドを回復溶液中に置き、デクローカー(decloaker)に置く。内在性のペルオキシダーゼ活性をブロックするために、スライドを、6%過酸化水素において5分間インキュベートし、PBSにおいて洗浄する。非特異的なバックグラウンド染色をブロックするために、スライドを、CAS-Block(Life Technologies)において30分間、室温でインキュベートする。スライドを、抗PD-L1抗体とインキュベートする。抗PD-L1抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼで標識した二次抗体を用いて検出する。抗体複合体を、過酸化水素基質、および茶色の沈殿を生じる3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド(DAB)色原体で可視化する。

30

#### 【0377】

スライドを、手動でまたは自動化機器を用いてのいずれかで解析する。各腫瘍細胞の染色強度(0:発現なし、1:弱い発現、2:中等度の発現、3:強い発現)を測定し、各染色レベルの細胞を計数して、各タイプのパーセンテージを計算した。各組織切片について、データを組み合わせて重み付けしたHスコアとする:  $Hスコア = [3 \times (3 + \text{細胞の割合}(\%))] + [2 \times (2 + \text{細胞の割合}(\%))] + [1 \times (1 + \text{細胞の割合}(\%))]$ 。この計算により、300の最高Hスコアが可能になる。陽性対照および陰性対照は、公知の発現レベルのPD-L1を有する、商業的供給業者から購入したヒト組織切片、ならびにOncoMed腫瘍バンクからの患者に由来する異種移植片試料を含みうる。

40

#### 【0378】

##### 実施例14

固形腫瘍を有する対象における化学療法を伴うかまたは伴わない、ペムプロリズマブ(抗PD-1; KEYTRUDA)と併用したデムシズマブ(OMP-h21M18)の第1相試験

この試験は、進行性または転移性の固形腫瘍を有する対象における、化学療法を伴うかまたは伴わない、ペムプロリズマブ(抗PD-1; KEYTRUDA)と併用したデムシズマブ(OMP-21M18)のオープンラベル第1b相用量漸増および拡大試験である。試験の主目的は、ペムプロリズマブを伴うデムシズマブの用量制限毒性(DLT)を特定して最大耐用量(MTD)を

50

概算すること、ならびに、ペメトレキセドおよびカルボプラチンとともに投与するペムプロリズマブを伴うデムシズマブのDLTを特定してMTDを概算することである。副次的目的は、安全性、免疫原性の発生率、デムシズマブおよびペムプロリズマブのそれぞれの単剤薬物曝露と比較した際の薬物動態、免疫ベースの基準によって評価した際の予備的な応答率、ならびに予備的な有効性を判定することである。

#### 【0379】

およそ6~12人の患者を、ペムプロリズマブと併用したデムシズマブの用量漸増段階に登録する。用量漸増は、ペムプロリズマブとともに与えられる時のデムシズマブのMTDを決定するために実施される。デムシズマブの用量レベルあたりおよそ2種のコホートが、試験される。デムシズマブの用量レベルは、63日目まで3週間ごとに1回、IV投与される2.5および5mg/kgである。疾患の進行がないと、第2のコースの試験薬物（1、2.5、または5mg/kgのデムシズマブ）が、対象が試験基準を満たす場合に、168日目に開始して4用量について、3週間ごとに1回投与される。用量の漸増または低減は、用量コホート内で許容されることはなく、中間の投与コホートが加えられうる。単一コホートにおいて2人以上の患者が、デムシズマブまたはペムプロリズマブに起因する2以上のグレードの有害事象を経験するか、または1つもしくは複数のDLTが観察される場合には、より小さな増分用量で追加のコホートが存在することになる。

10

#### 【0380】

3人の患者が、2.5mg/kgデムシズマブおよび2mg/kgペムプロリズマブの用量レベルで当初処置される。3人の対象のうち1人がDLTを経験する場合には、その用量レベルが6人の対象に拡大される。2人以上の患者がDLTを経験する場合には、さらなる患者はそのレベルで投与されず、3人の追加の患者が、1mg/kgデムシズマブおよび2mg/kgペムプロリズマブの用量レベルで試験される。患者は、最初の投与の時から21日目まで、DLTについて評価される。用量漸増は、適当な場合、コホート中のすべての患者がその21日目のDLT評価を完了した後に起こす。試験されるべきデムシズマブの最大用量は、5mg/kgである。ペムプロリズマブを伴うデムシズマブのMTDがひとたび確立されると、患者は、コホート拡大段階中に登録される。

20

#### 【0381】

およそ30人の患者が、適応症特異的拡大段階に登録される。この段階は、さまざまながんタイプにおいて、ペムプロリズマブと併用したデムシズマブの安全性、耐容性、PK変動性、抗腫瘍活性のバイオマーカー、および予備的な有効性をより良好に特徴決定するための複数のコホートを含む。計画される拡大コホートは、2種までの系統の事前の化学療法で処置された非落屑性の段階IIIB/IVのNSCLCを有する患者、抗PD1または抗PDL-1インヒビターでの事前の処置時に進行したいずれかの固形腫瘍を有する患者、事前の療法時に進行した去勢耐性前立腺がんを有する患者、3種までの系統の事前の化学療法で処置された結腸直腸がんを有する患者、および2種までの系統の事前の化学療法で処置された膵臓がんを有する患者を含むが、それらに限定されえない。

30

#### 【0382】

NSCLC患者を含む拡大コホートにおいて、カルボプラチンおよびペメトレキセドの追加を伴う用量漸増が、2mg/kgペムプロリズマブと併用したデムシズマブMTDのより低い1つの用量レベルで開始される。3人の患者が、ペメトレキセドおよびカルボプラチンと併用して、-1用量レベルのデムシズマブおよび2mg/kgペムプロリズマブの用量レベルで当初処置される。デムシズマブは、63日目まで3週間ごとに1回、IV注入によって投与される。疾患の進行がないと、第2のコースの試験薬物（1、2.5、または5 mg/kgのデムシズマブ）が、対象の168日目のBNPが100 pg/mL以下であり、ピーク三尖弁速度が3.0 m/s以下であり、かつLVEFが50%以上であり、対象が試験基準を満たす場合に、168日目に開始して4用量について、3週間ごとに1回投与される。ペムプロリズマブは、3週間ごとに30分にわたって2mg/kgの用量でIV投与される。ペメトレキセドは500 mg/m<sup>2</sup>で、21日ごとに1回、10分にわたって静脈内注入として投与される。カルボプラチンは6 mg/ml × 分で、4サイクル（または疾患進行もしくは毒性が処置の中断もしくは終結を正当化する場合には4回の完全サイク

40

50

ルに満たない)で21日ごとに1回、15~60分にわたって静脈内注入として投与される。3人の対象のうち1人がDLTを経験する場合には、その用量レベルが6人の対象に拡大される。2人以上の患者がDLTを経験する場合には、さらなる患者はそのレベルで投与されず、3人の追加の患者が、1mg/kgデムシズマブおよび2mg/kgペムプロリズマブの用量レベルで試験される。患者は、最初の投与の時から21日目まで、DLTについて評価される。用量漸増は、適当な場合、コホート中のすべての患者がその21日目のDLT評価を完了した後に起こす。試験されるべきデムシズマブの最大用量は、5mg/kgである。ペムプロリズマブを伴うデムシズマブのMTDがひとたび確立されると、以前に処置されていない段階IIIB/IVの非落屑性NSCLCを有するおよそ10人の患者が、コホート拡大段階中に登録される。この段階は、デムシズマブ、ペムプロリズマブ、ペメトレキセド、およびカルボプラチンの併用の安全性および耐容性をさらに特徴決定するため、ならびに予備的な有効性を評価するために設計されている。他の適応症について、化学療法は、一般に、標準治療の併用を含む。

10

## 【0383】

## 実施例15

抗DLL4抗体、抗VEGF抗体、および抗PD-1抗体の併用でのインビボでの腫瘍成長の阻害

CT26.WT腫瘍細胞(30,000細胞)の単一細胞懸濁液を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種の10日後に、触知可能な腫瘍(およそ125~130mm<sup>3</sup>)を有するマウスを、抗mPD-1抗体(250μg/マウス、1週間に2回)、抗mDLL4抗体21R50(5mg/kg、1週間に1回)および抗mVEGF抗体(2.5mg/kg、1週間に1回)の併用、抗mPD-1抗体、抗mDLL4抗体21R50、および抗mVEGF抗体の併用、または対照抗体(20mg/kg、1週間に2回)で処置した。マウスに、腹腔内注射により3週間にわたって抗体を投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスで測定した。データを平均±標準誤差として表す。

20

## 【0384】

図15Aに示すように、抗mDLL4抗体21R50、抗mVEGF抗体、および抗mPD-1抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際に有意にCT26.WT腫瘍成長を低減させた。27日目に、処置したマウスにおける平均腫瘍成長は、対照抗体で処置したマウスと比較した際に89%阻害された。抗mDLL4抗体21R50および抗mVEGF抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際に有意にCT26.WT腫瘍成長を低減させた。27日目に、処置したマウスにおける平均腫瘍成長は、対照抗体で処置したマウスと比較した際に86%阻害された。単一作用物質としての抗mPD-1抗体はそれほど有効ではなく、対照抗体で処置したマウスと比較した際に59%のみ腫瘍成長を阻害した。

30

## 【0385】

27日目に、抗mDLL4抗体21R50、抗mVEGF抗体、および抗mPD-1抗体の併用で処置した個々のマウスの評価により、20匹のマウスのうち10匹(50%)が、処置の前の腫瘍のサイズと同じサイズであるか、またはそのサイズよりも小さいサイズに退縮した腫瘍を有することが示された。抗mDLL4抗体21R50および抗mVEGF抗体の併用で処置した個々のマウスの評価により、10匹のマウスのうち5匹(50%)が、処置の前の腫瘍のサイズと同じサイズであるか、またはそのサイズよりも小さいサイズに退縮した腫瘍を有することが示され、抗mPD-1抗体だけで処置したマウスの評価により、15匹のマウスのうち6匹(40%)が、処置の前の腫瘍のサイズと同じサイズであるか、またはそのサイズよりも小さいサイズに退縮した腫瘍を有することが示された。

40

## 【0386】

これらの結果は、CT26.WT腫瘍細胞におけるDLL4、VEGF、およびPD-1の遮断が抗腫瘍有効性を有すること、ならびに、その有効性がPD-1遮断のみよりも良好でありうることを示唆する。

## 【0387】

類似した実験を、マウス腎腺癌であるRencaで実施した。Renca腫瘍細胞(5×10<sup>5</sup>細胞)の単一細胞懸濁液を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍接種の8日後に、触知可能な腫瘍(およそ60mm<sup>3</sup>)を有するマウスを、抗mPD-1抗体(10mg/kg、1週間

50

に2回)、抗mDLL4 21R50 (10mg/kg、1週間に1回)、抗mDLL4抗体21R50 (10mg/kg、1週間に1回)および抗mVEGF抗体 (10mg/kg、1週間に1回)の併用、抗mDLL4抗体21R50 (10mg/kg、1週間に1回)および抗mPD-1抗体 (10mg/kg、1週間に2回)の併用、抗mPD-1抗体、抗mDLL4抗体21R50、および抗mVEGF抗体の併用、または対照抗体 (20mg/kg、1週間に2回)で処置した。マウスに、腹腔内注射により3週間にわたって抗体を投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスで測定した。データを平均±標準誤差として表す。

#### 【0388】

図15Bに示すように、抗mDLL4抗体21R50、抗mVEGF抗体、および抗mPD-1抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際に有意にRenca腫瘍成長を低減させた。17日目に、処置したマウスにおける平均腫瘍成長は、対照抗体で処置したマウスと比較した際に86%阻害された。抗mDLL4抗体21R50および抗mVEGF抗体の併用での処置もまた、対照抗体での処置と比較した際にRenca腫瘍成長を低減させた(78%)。対照的に、単一作用物質としての抗PD-1抗体での処置は、腫瘍成長を阻害しなかった。

10

#### 【0389】

CT26.WT細胞において見られたものと同様に、これらの結果は、腫瘍細胞におけるDLL4、VEGF、およびPD-1の遮断が抗腫瘍有効性を有することを示唆する。

#### 【0390】

##### 実施例16

##### セントラルメモリーT細胞のFACS解析

細胞を、上記(実施例15)のCT26.WT腫瘍を有するマウスの脾臓から採取した。細胞注射の30日後に、脾細胞を単離した。脾細胞( $1 \times 10^6$ 個)を、非特異的結合をブロッキングするために組換えFcタンパク質と10分間インキュベートし、次いで、100  $\mu$ l FACS染色緩衝液(HBSS+2%の熱不活性化ウシ血清)中の蛍光色素コンジュゲート抗体と20分間、氷上でインキュベートした。結合していない抗体を洗浄によって除去し、死細胞を、固定可能な生死判別色素で標識した。細胞を、2%パラホルムアルデヒドにおいて20分間、室温で固定し、FACSCanto II機器およびFACSDivaソフトウェアv6.1.3(BD Biosciences)を用いて解析した。

20

#### 【0391】

抗マウスCD3e抗体を用いて全T細胞を、抗マウスCD4抗体を用いてCD4+T細胞を、および抗マウスCD8抗体を用いてCD8+T細胞を同定した。セントラルメモリー細胞は、抗マウス/ヒトCD44抗体および抗ヒトCD62L抗体を用いて同定した。FACS染色を、抗マウスCD8b抗体(クローン53-5.8, BioLegend)、抗マウスCD4抗体(クローンGK1.5, BioLegend)、抗マウスCD62L抗体(クローンMEL-14, BioLegend)、および抗マウスCD44抗体(クローン1M7, BioLegend)を用いて上記のように行った。細胞を、セントラルメモリー細胞を示すCD44<sup>高</sup>CD62L<sup>高</sup>発現について解析した(CD8+T細胞にゲーティング)。

30

#### 【0392】

FACS解析により、抗mDLL4抗体、抗mVEGF抗体、および抗mPD-1抗体の併用で処置したCT26.WT腫瘍を有するマウスが、対照抗体で処置したマウスと比較した際に、CD4+T細胞集団内およびCD8+T細胞集団内に増大したパーセンテージのセントラルメモリー細胞を有することが示された(図16)。対照的に、抗mDLL4および抗mVEGFの併用で処置したマウスまたは単一作用物質として抗mPD1抗体で処置したマウスは、セントラルメモリー細胞のパーセンテージにおいて注目すべき変化を有さなかった。

40

#### 【0393】

##### 実施例17

##### 腫瘍試料におけるサイトカイン発現

腫瘍試料を、実施例15における上記のCT26.WT腫瘍を有するマウスから取った。免疫応答遺伝子の発現について、定量リアルタイムRT-PCRを、腫瘍試料から取得した全RNAに対して行った。腫瘍試料は、腫瘍細胞、腫瘍と関連する免疫細胞、および腫瘍試料に付着した任意の間質細胞を含有することが期待される。腫瘍標本を採取し、即座に凍結して、RN

50

A単離の前に-80 で保存した。全RNAを、RNeasy Fibrous Mini Kit (Qiagen, Valencia CA, PN#74704) を用いて、TissueLyzerによる均質化およびDNアーゼI処置を伴い、製造業者のプロトコルにしたがって抽出した。RNAを、Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) 上で可視化し、6.0より大きいRIN値で無傷であると検証した。すべてのRNAは、1.8より大きいA260/A280比を有していた。

#### 【0394】

cDNAを、ランダムヘキサマーを用いて全RNAから合成した。cDNAおよびPCR Master Mix を、TaqMan Array Immune Response Plate (Applied Biosystems/Life Technologies) に添加し、製造業者のプロトコルにしたがって、反応をリアルタイムPCR機器で行った。

#### 【0395】

図17Aおよび図17Bに示すように、抗mDLL4、抗mVEGF、および抗mPD-1の併用での処置は、腫瘍試料においてIL-2、グランザイムB、およびCCL2の遺伝子発現を増大させた。単一作用物質としての抗mPD-1での処置は、腫瘍部位で、IFN- $\gamma$  の遺伝子発現を増大させ、IL-6の遺伝子発現を減少させた。加えて、すべての処置は、IL-18の遺伝子発現を減少させた。

#### 【0396】

IL-18は、多面発現性機能を有することが示されており、がんにおいて二重の役割を果たすように見られる(例えば、Palma et al., 2013, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836:296-303を参照されたい)。IL-18は一般に、Th1タイプ応答の一部と考えられており、増大したIL-18発現のレベルを見るのが期待されうる。これらの結果は、さらに評定されるであろう。IL-2は、CD8+メモリーT細胞の二次的集団拡大のために必要とされ、そのため、これらの結果は、DLL4、VEGF、およびPD-1の三重の遮断が、T細胞活性化、T細胞の維持、およびメモリーT細胞機能を増大させうることを示唆する。CCL2 (C-Cモチーフフリガンド2) は、単球化学走性タンパク質1 (MCP1) および小誘導性サイトカインA2とも呼ばれるケモカインである。ケモカインは、単球、メモリーT細胞、および樹状細胞を炎症および腫瘍の部位に動員することが示されている。免疫細胞の動員は、抗腫瘍応答を増強する可能性がある。しかし、いくつかの研究においては、ケモカインが腫瘍形成を促進することが見いだされており、そのため、この結果をさらに研究する必要があるであろう。グランザイムBは、CTLおよびNK細胞の顆粒中に見いだされるセリンプロテアーゼである。グランザイムBは、標的細胞におけるアポトーシスを媒介するために、孔形成タンパク質であるパーフォリンとともにこれらの細胞によって分泌される。グランザイムBの増大した発現は、抗mDLL4、抗mVEGF、および抗mPD-1で処置したマウスにおける腫瘍部位での、活性を有する腫瘍殺傷細胞の存在を示唆する。

#### 【0397】

##### 実施例18

##### インビボでのCT26.WT結腸腫瘍成長の阻害

CT26.WT腫瘍細胞(30,000細胞)の単一細胞懸濁液を、6~8週齢のBalb/Cマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍注射の6日後に、およそ43mm<sup>3</sup>の平均サイズの腫瘍を有するマウスを、無作為化して群に分け(n=10)、抗mPD-1抗体(10mg/kg)、抗Notch2/3抗体59R5(40mg/kg)、抗mPD-1抗体および抗Notch2/3抗体59R5の併用、またはアイソタイプ対照抗体で処置した。マウスに、腹腔内注射により、抗PD-1抗体を3週間にわたって1週間に2回、抗Notch2/3抗体を3週間にわたって1週間に1回投与した。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍体積を表示した時点で電子カリパスで測定した。データを平均±標準誤差として表す。

#### 【0398】

図18に示すように、抗Notch2/3抗体59R5および抗mPD-1抗体の併用での処置は、対照抗体での処置と比較した際に有意にCT26.WT腫瘍成長を低減させた。腫瘍成長は、24日目に、対照と比較した際に80%阻害された。対照的に、単一作用物質としての抗PD-1抗体は、対照と比較した際に46%のみ腫瘍成長を阻害し、抗Notch2/3抗体59R5での処置は、対照と比較した際に腫瘍成長を増大させることが観察された。この実験において、腫瘍は、抗No

10

20

30

40

50

tch2/3抗体および抗PD-1抗体の併用で処置した10匹のマウスのうち3匹において検出不可能なレベルに退縮し、90日目に依然として検出不可能であった。対照的に、腫瘍退縮は、単一作用物質として抗PD-1抗体で処置した1匹のマウスにおいてのみ観察された。

【0399】

これらの結果は、免疫療法剤と併用した、Notch受容体アンタゴニストならびにDLL4アンタゴニストを含むNotch経路インヒビターでの処置が、腫瘍成長の阻害に有効であることを示唆する。さらにまた、いくつかの対象において、処置は、再発を伴わずに腫瘍を検出不可能なレベルに退縮させることに成功する。

【0400】

本明細書に記載する実施例および態様は例示のために過ぎないこと、ならびに、それらに照らしてさまざまな変更または改変が当業者には示唆され、それらは本願の本旨および範囲内に含まれるべきものであることが、理解される。

10

【0401】

本明細書において言及するすべての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、ならびに、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の両方を含むアクセッション番号/データベース配列は、各個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、またはアクセッション番号/データベース配列が参照によりそのように組み入れられることを具体的にかつ個別に示した場合と同じ程度に、すべての目的でその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0402】

本願において開示される配列は、以下である。

20

21M18 重鎖 CDR1 (SEQ ID NO:1)

TAYYIH

21M18 – H2 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:2)

YISCYNGATNYNQKFKG

21M18 – H7 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:3)

YISSYNGATNYNQKFKG

21M18 – H9 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:4)

YISVYNGATNYNQKFKG

30

21M18 重鎖 CDR3 (SEQ ID NO:5)

RDYDYDVGMDY

21M18 軽鎖 CDR1 (SEQ ID NO:6)

RASESVDNYGISFMK

21M18 軽鎖 CDR2 (SEQ ID NO:7)

AASNQGS

21M18 軽鎖 CDR3 (SEQ ID NO:8)

QQSKEVPWTFGG

40

21M18 – H2 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISCYNGATNY

NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGT LVTVSS

21M18 – H7 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY  
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGT LVTVSS

21M18 – H9 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISVYNGATNY  
NQKFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGM DYWGQGT LVTVSS

21M18 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO:12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESDVNYGISFMKWFQOKPGQPPKLLIYAASNQGS  
GVPDRFSGSGSDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

10

ヒトDLL4細胞外ドメイン (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:13)

MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV  
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE  
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY  
GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL  
CRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHS PCKNGATC  
SNSGQRSYTCRCRPGYTGVDCLELSECDNPNCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGLHCE  
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANACECPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR  
GPSRMCRCRPGFTGT YCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCVRTS  
IDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFFPVG

20

ヒトDLL4 N末端領域 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:14)

MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV  
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE  
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY

ヒトDLL4 DSL領域 (SEQ ID NO:15)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG  
EYC

ヒトDLL4アミノ酸1~217(下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:16)

MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV  
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE  
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY  
GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC

30

ヒトDLL4アミノ酸 27~217 (SEQ ID NO:17)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT  
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQ  
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL  
SCLPGWTGEYC

ヒトDLL4アミノ酸 66~73(SEQ ID NO:18)

QAVVSPGP

40

ヒトDLL4アミノ酸 139~146(SEQ ID NO:19)

LISKIAIQ

## 219R45 重鎖 CDR1 (SEQ ID NO:20)

NYWMH

## 219R45 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:21)

DINPSNGRRTSYKEKFKR

## 219R45 重鎖 CDR3 (SEQ ID NO:22)

HYDDKYYPLMDY

## 21R75 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:23)

YIAGYKDATNYNQKFKG

10

## 21R79 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:24)

YIANYNRATNYNQKFKG

## 21R83 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:25)

YISNYNRATNYNQKFKG

## 抗DLL4重鎖CDR2コンセンサス配列 (SEQ ID NO:26)

YIX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>ATNYNQKFKG, (配列中、X<sub>1</sub> はセリンまたはアラニンであり、X<sub>2</sub> はセリン、アスパラギン、またはグリシンであり、X<sub>3</sub>はアスパラギンまたはリジンであり、およびX<sub>4</sub>はグリシン、アルギニン、またはアスパラギン酸である)

## 21R75 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:27)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY  
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSS

20

## 21R79 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY  
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSS

## 21R83 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY  
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSS

## 219R45 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:30)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRRTSY  
KEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGLVTVSS

30

## 21R83 重鎖 (ヘテロ二量体変異体) (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:31)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY  
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLVTVSSA  
STKGPSVFPFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV  
VSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSEFLYSELTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

## 219R45 重鎖 (ヘテロ二量体変異体) (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:32)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFITNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRRTSY

KEKFKRRVTLSDVKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLLVTVS  
 SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPVAGPSV  
 FLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF  
 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK  
 NQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLKSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

軽鎖 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:33)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS  
 TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

10

59R5 重鎖 CDR1 (SEQ ID NO:34)

SSSGMS

59R5 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:35)

VIASSGSNTYYADSVKG

59R5 重鎖 CDR3 (SEQ ID NO:36)

SIFYTT

20

59R5 軽鎖 CDR1 (SEQ ID NO:37)

RASQSVRSNYLA

59R5 軽鎖 CDR2 (SEQ ID NO:38)

GASSRAT

59R5 軽鎖 CDR3 (SEQ ID NO:39)

QQYSNFPI

59R5 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:40)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY  
 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLLVTVSSAST

30

59R5 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO:41)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP  
 ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPIITFGQGTKVEIKR

59R5 重鎖 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:42)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP  
 GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIF  
 YTTWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC  
 PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ  
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSEFFLY  
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

59R5 重鎖 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:43)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY  
 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPQVTVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL  
 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

59R5 軽鎖 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:44)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK  
 PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG  
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
 QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

59R5 軽鎖 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:45)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP  
 ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT  
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

52M51 重鎖 CDR1 (SEQ ID NO:46)

RGYWIE

20

52M51 重鎖 CDR2 (SEQ ID NO:47)

QILPGTGRTNYNEKFKG

52M51 重鎖 CDR3 (SEQ ID NO:48)

FDGNYGYAMDY

52M51 軽鎖 CDR1 (SEQ ID NO:49)

RSSTGAVTTSNYAN

52M51 軽鎖 CDR2 (SEQ ID NO:50)

GTNNRAP

30

52M51 軽鎖 CDR3 (SEQ ID NO:51)

ALWYSNHWWFGGGTKL

h52M51 重鎖可変領域 (SEQ ID NO:52)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY  
 NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGTTVTVS  
 SA

h52M51-L3 軽鎖可変領域 (SEQ ID NO:53)

SGVDSQAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN  
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWWFGGGTKLTVLG

40

h52M51 重鎖アミノ酸配列 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:54)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP  
 GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCARFDG

NYGYAMDYWGQGTTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR  
 KCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**h52M51 重鎖アミノ酸配列 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:55)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISKVSGYTLRGYIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRNTY  
 NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGTTVTSS  
 SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS  
 SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR KCCVECPCPAPPVAGPSV  
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF  
 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

**h52M51 軽鎖アミノ酸配列 (下線部は予測シグナル配列) (SEQ ID NO:56)**

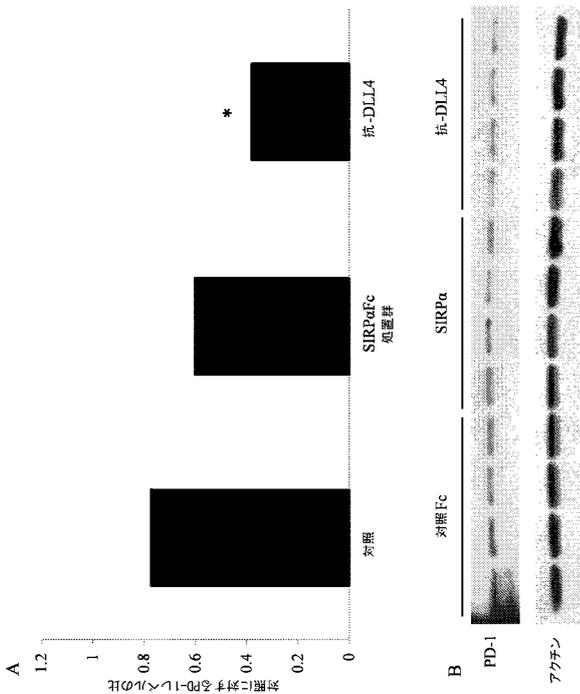
MSVPTMAWMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN  
WFQQKPGQAPRTLIGGTTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSN  
 HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS  
 PVKGVGNETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAACS

20

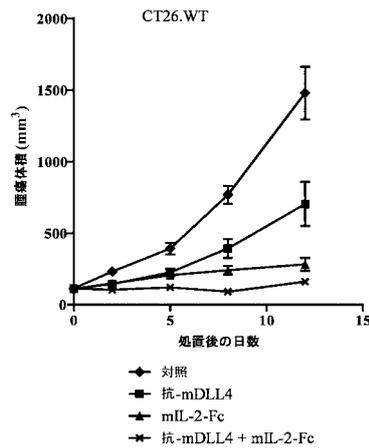
**h52M51 軽鎖アミノ酸配列 (予測シグナル配列なし) (SEQ ID NO:57)**

SGVDSQAVVTQEP~~SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN~~WFQQKPGQAPRTLIGGTNN  
 RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHVWVFGGGTKLTVLGQPKAA  
 PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKGVGNETTKPSKQSNKY  
 AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAACS

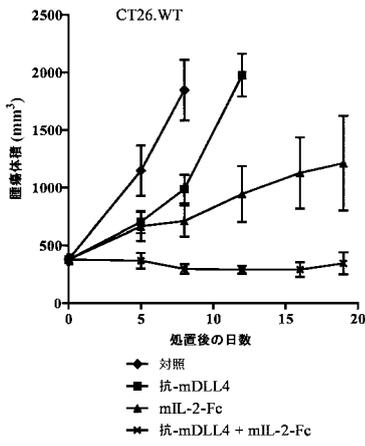
【 図 1 】



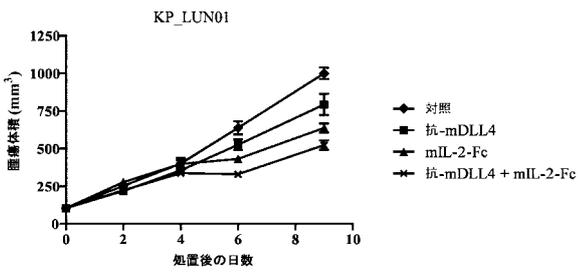
【 図 2 A 】



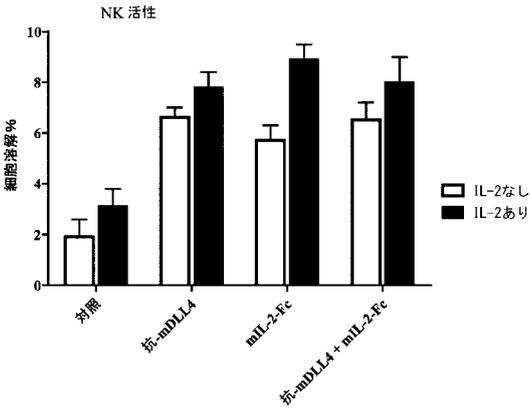
【 図 2 B 】



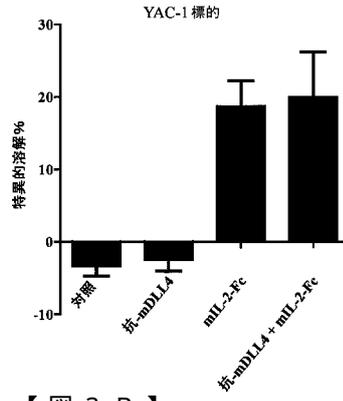
【 図 2 C 】



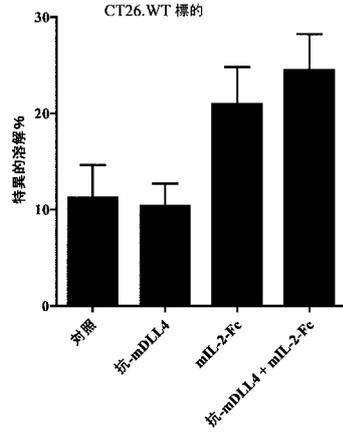
【 図 3 C 】



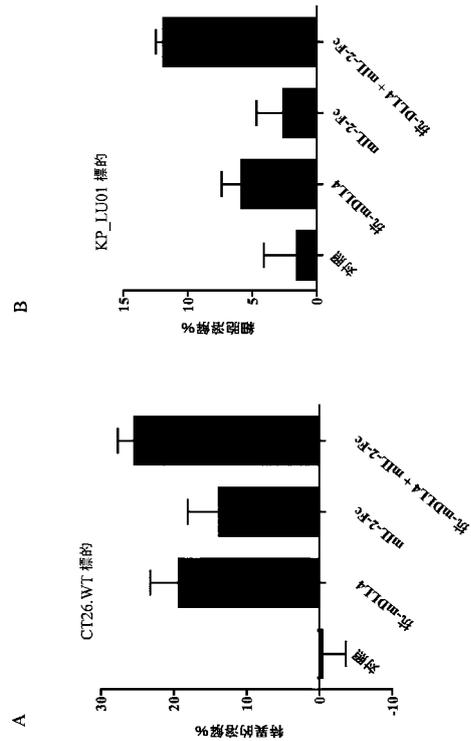
【 図 3 A 】



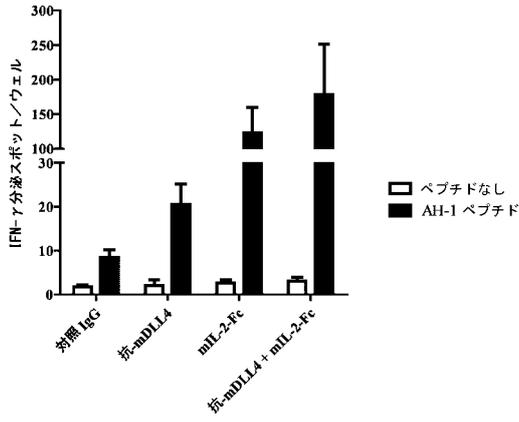
【 図 3 B 】



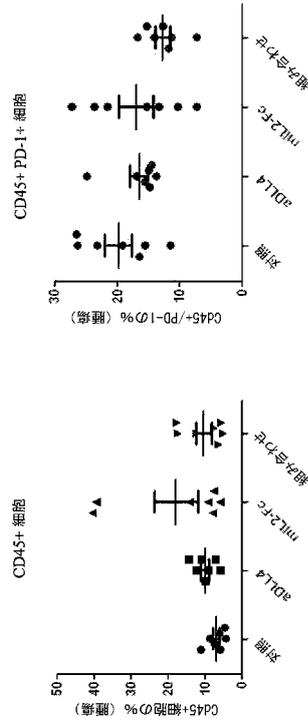
【 図 4 】



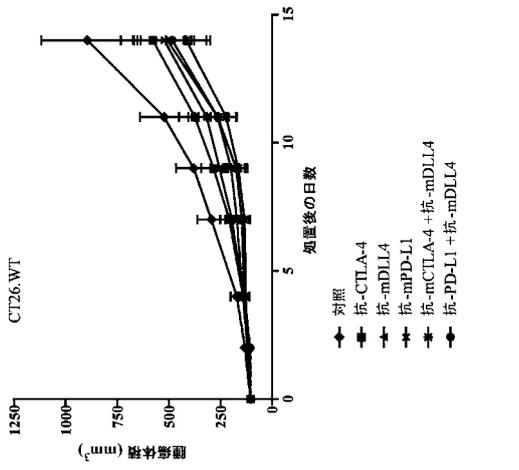
【 図 5 】



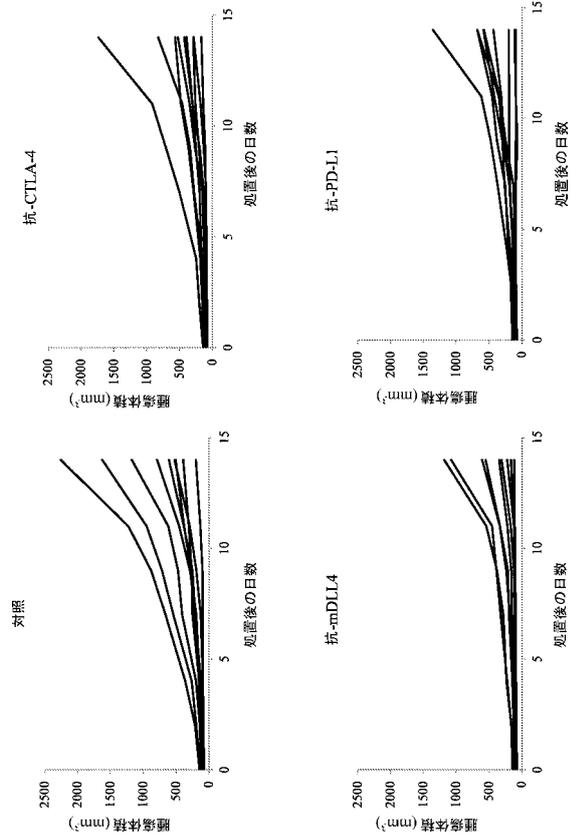
【 図 6 】



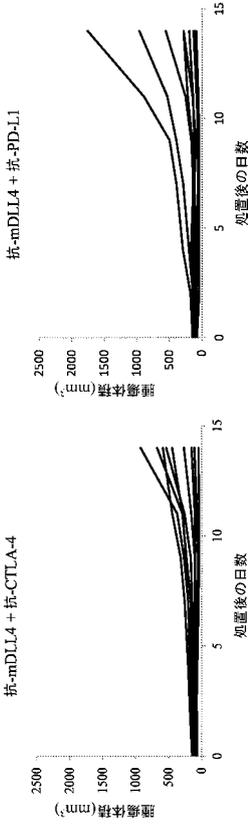
【 図 7 A 】



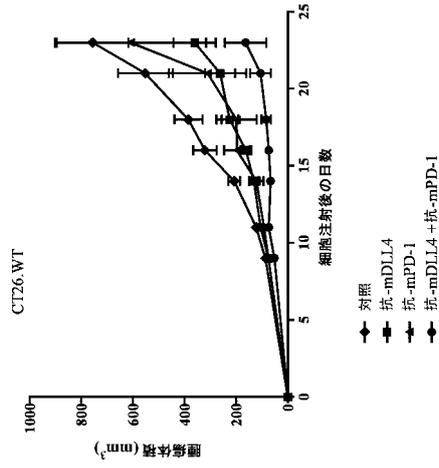
【 図 7 B 】



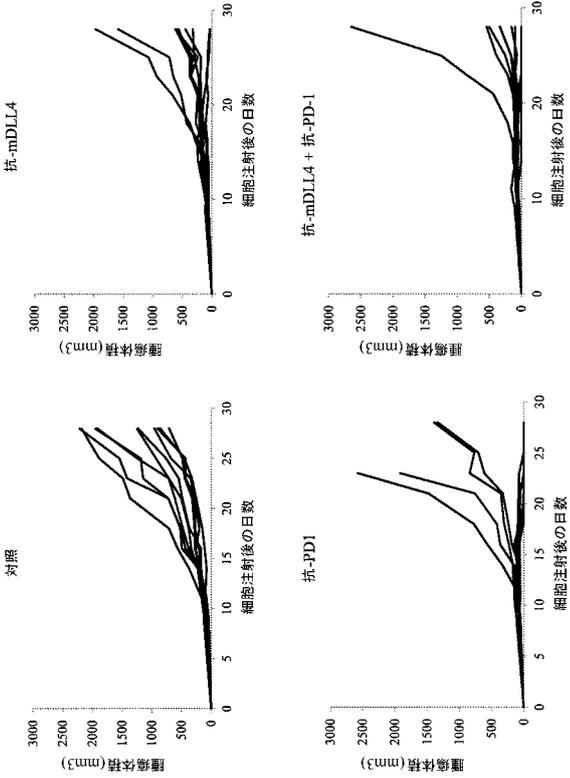
【図7C】



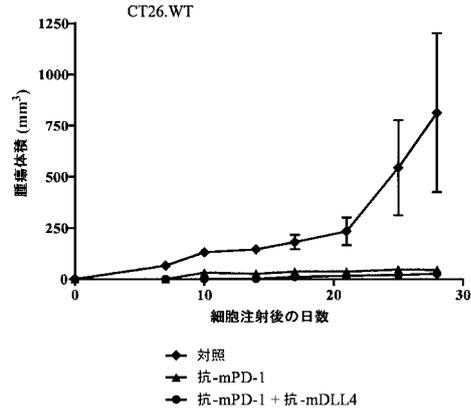
【図8A】



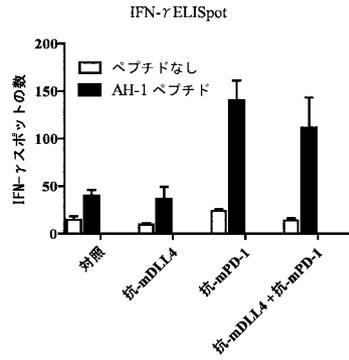
【図8B】



【図9】

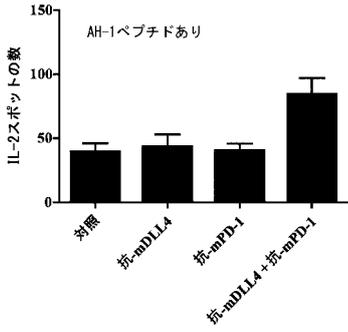


【図10A】



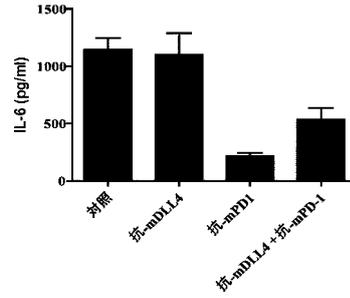
【図10B】

IL-2 ELISpot



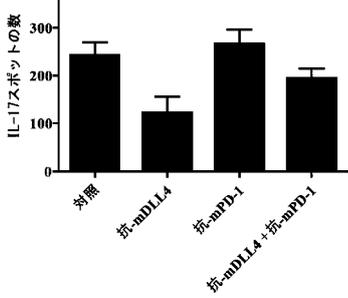
【図10D】

IL-6 ELISA

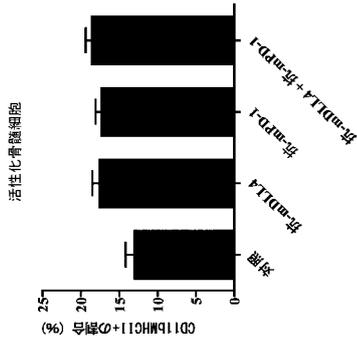


【図10C】

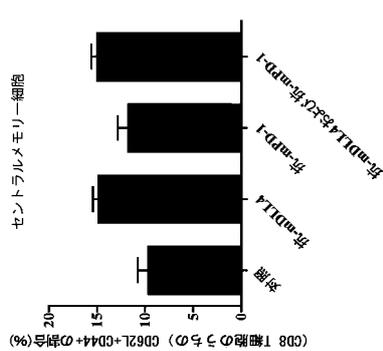
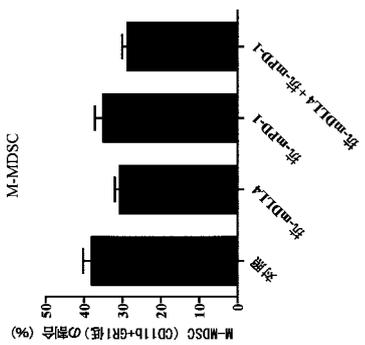
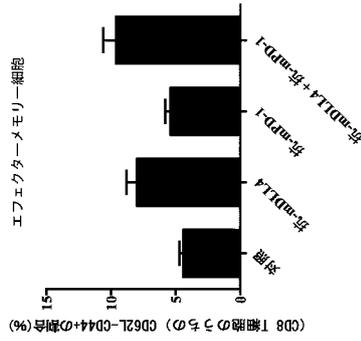
IL-17 ELISpot



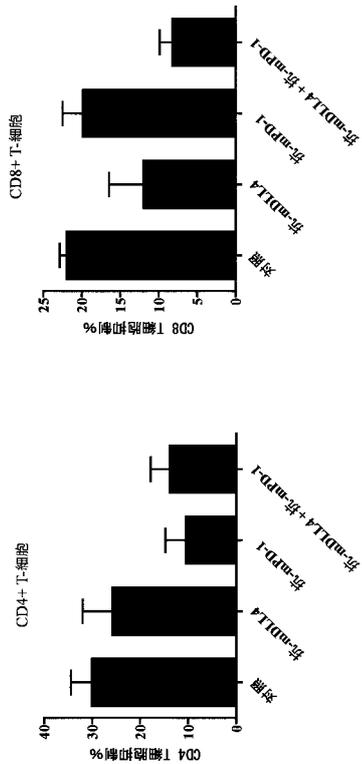
【図11】



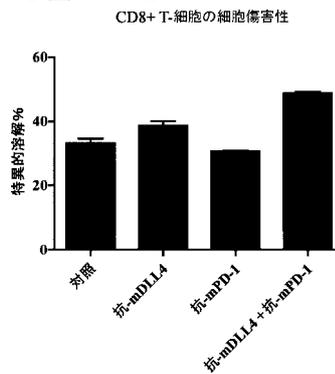
【図12】



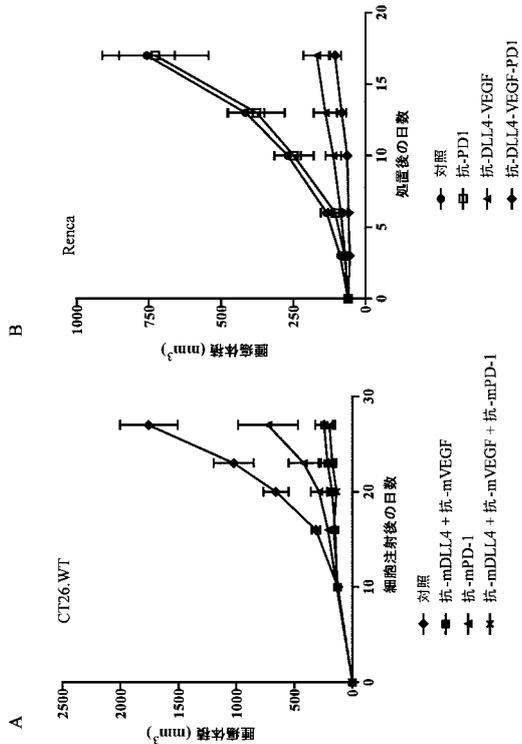
【図 13】



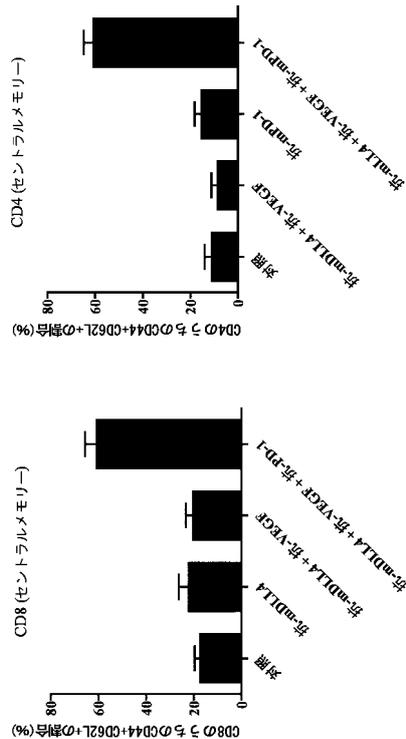
【図 14】



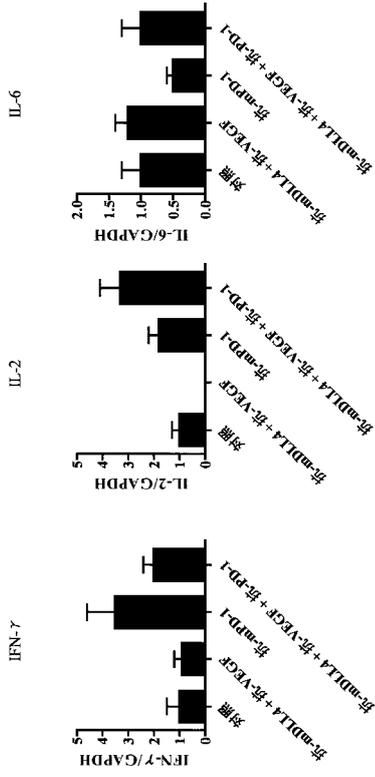
【図 15】



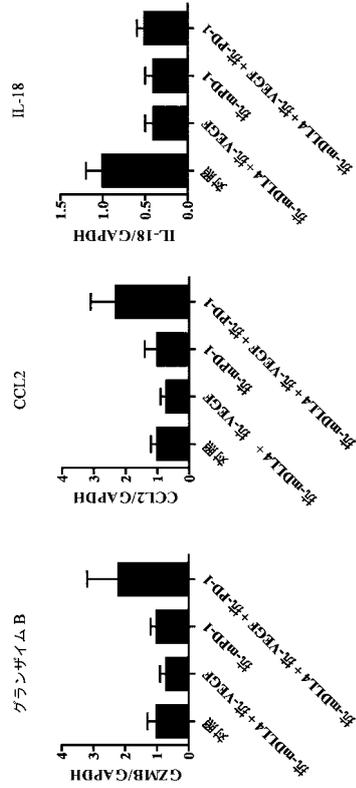
【図 16】



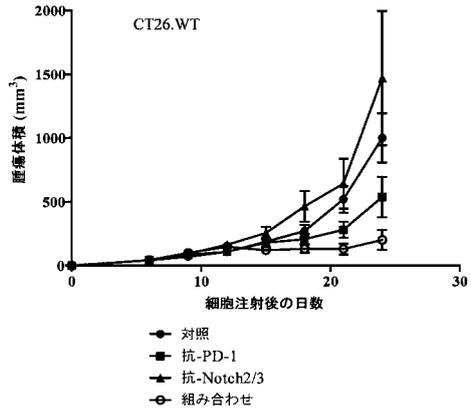
【 図 1 7 A 】



【 図 1 7 B 】



【 図 1 8 】



【手続補正書】

【提出日】平成29年7月3日(2017.7.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017537892000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/58327
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - A61K 39/395, A61P 35/00, C07K 16/18 (2016.01) CPC - A61K 2039/507, C07K 2317/76, A61K 2039/505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - A61K 39/395, A61P 35/00, C07K 16/18 (2016.01) CPC - A61K 2039/507, C07K 2317/76, A61K 2039/505 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/130.1, 424/142.1, 424/172.1, 424/277.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) pubWEST; PatBase; Google Scholar search terms - Antagon\$, inhib\$, anti, anti\$, notch, DLL4, DLL-4, Delta-Like 4, Delta4, Notch Ligand Delta-2, demcizumab, enoticumab, extracellular, Notch2, notch 2, notch 3, Notch3, PD-1, PD1, PDL1, PD-L1, B7H1 or B7-H1 or B7-H or CD274 or PDCD1 or B7 Homolog		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0206853 A1 (MEDIMMUNE, LLC) 24 July 2014 (24.07.2014) para [0009]; [0093]-[0097]; [0148]; [0149]; [0317]-[0327].	1-10, 51-53, 58, 59
Y	US 2012/0288496 A1 (GUHNEY et al.) 15 November 2012 (15.11.2012) para [0015]; [0033].	14, 18, 25, 54-57
Y	US 2013/0164295 A1 (OncoMed Pharmaceuticals, Inc.) 27 June 2013 (27.06.2013) para [0015]-[0020].	14, 18
Y	US 2013/0309250 A1 (COGSWELL et al.) 21 November 2013 (21.11.2013) abstract; para [0106]; [0107].	25
Y	US 2013/0309250 A1 (COGSWELL et al.) 21 November 2013 (21.11.2013) abstract; para [0106]; [0107].	54-57
A	US 2012/0245151 A1 (GAVAI et al.) 27 September 2012 (27.09.2012) abstract; para [0225]-[0228].	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 April 2016		Date of mailing of the international search report <b>19 MAY 2016</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58327

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 11-13, 15-17, 19-24, 26-50, 64-96  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-10, 14, 18, 25 and 51-59, directed to a therapeutic method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a Notch pathway inhibitor and a second agent

Group II, claims 60-63, directed to a method of identifying a human tumor/selecting a subject with a tumor for treatment likely to be responsive to treatment with a Notch pathway inhibitor in combination with a second agent.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

--continued on first extra sheet attached hereto--

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-10, 14, 18, 25 and 51-59

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/58327

--continuation of Box No III--

**Special technical features**

Group I has the special technical feature of a method of treating a disorder or disease, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a DLL4 antagonist or a Notch receptor antagonist and a second agent, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a method of identifying a human tumor/selecting a subject with a tumor for treatment likely to be responsive to treatment with a Notch pathway inhibitor in combination with a second agent, comprising measuring the expression level of PD-L1, that is not required by Group I.

**Common technical features:**

Groups I-II share the common technical feature of a method comprising tumor treatment with a Notch pathway inhibitor and an immunotherapeutic agent. Groups I-II further share the common technical feature of an immune checkpoint modulator (i.e. PD-L1 or CTLA-4 modulator). However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is made obvious by US 2012/0245151 A1 to Gavai et al., (hereinafter Gavai).

Gavai teaches a method comprising tumor treatment with a Notch pathway inhibitor (abstract) and an additional immunotherapeutic agent (abstract and para [0225]-[0226]), wherein the immunotherapeutic agent is an immune checkpoint modulator (CTLA-4 antibodies) (para [0226]).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I-II lack unity of invention under PCT Rule 13.

NOTE: claims 11-13, 15-17, 19-24, 26-50, 64-96 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/30	

(31)優先権主張番号 62/242,567  
 (32)優先日 平成27年10月16日(2015.10.16)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
 弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マリエル クリストファー ラモンド  
 アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア州 サンフランシスコ ミナ ストリート 7 0 1  
 アpartment 1 8

(72)発明者 ヘイ ティモシー チャールズ  
 アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア州 ヒルズボロー ダレル ロード 2 0 0

(72)発明者 ガーニー オースティン エル.  
 アメリカ合衆国 9 4 1 1 4 カリフォルニア州 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート  
 9 4 6

(72)発明者 ローダ ジュリー ミシェル  
 アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州 フォスター シティー イースト ヒルズデー  
 ル ブールバード 1 2 8 8 アpartment シー 3 1 9

(72)発明者 シュリーヴァスタヴァ ミヌ ケイ.  
 アメリカ合衆国 9 4 0 8 7 カリフォルニア州 サニーベール キングフィッシャー ウェー  
 1 3 7 1 ユニット 1

(72)発明者 バク インキョン

アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォルニア州 パロアルト クララ ドライブ 8 2 5  
(72)発明者 デュボン ヤコブ  
アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア州 ヒルズボロー カーディガン ロード 1 2 2  
9

F ターム(参考) 4C084 AA20 AA24 DA01 MA13 MA28 MA31 MA35 MA43 MA52 MA55  
MA60 MA63 MA65 MA66 NA14 ZB21 ZB26 ZC75  
4C085 AA14 AA16 GG01 GG03 GG04 GG08  
4H045 CA40 CA41 DA75 DA76 EA20