



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107530419 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201580068724.2

PTA-8670 2007.09.28

(22) 申请日 2015.10.30

PTA-9549 2008.10.15

(65) 同一申请的已公布的文献号

PTA-9547 2008.10.15

申请公布号 CN 107530419 A

PTA-9548 2008.10.15

(43) 申请公布日 2018.01.02

PTA-9405 2008.08.07

(30) 优先权数据

(73) 专利权人 昂考梅德药品有限公司

62/073,634 2014.10.31 US

地址 美国加利福尼亚州

62/127,172 2015.03.02 US

(72) 发明人 C·L·穆雷尔

62/192,133 2015.07.14 US

蒂莫西·查尔斯·霍伊
奥斯丁·L·格尼 J·M·罗达

62/242,567 2015.10.16 US

M·K·斯里瓦斯塔瓦 朴仁京

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

J·杜邦

2017.06.14

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(86) PCT国际申请的申请数据

代理人 庞东成 张培源

PCT/US2015/058327 2015.10.30

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 35/00 (2006.01)

W02016/070051 EN 2016.05.06

C07K 16/18 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

审查员 夏向东

PTA-8425 2007.05.10

权利要求书2页 说明书77页 附图26页

PTA-8427 2007.05.10

PTA-8424 2007.05.10

PTA-8426 2007.05.10

(54) 发明名称

治疗疾病的组合疗法

(57) 摘要

本发明提供包括用于调节免疫响应、用于抑制肿瘤生长和/或用于治疗癌症的组合疗法的方法。具体而言，本发明提供用于治疗癌症和其它疾病的与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂。

1. Notch途径抑制剂在制备用于治疗癌症或抑制肿瘤生长的药物中的应用,其中,所述Notch途径抑制剂是抗δ样配体4(DLL4)的抗体,并且其中所述治疗癌症或抑制肿瘤生长包括施用特异性结合PD-1或PD-L1的抗体。

2. Notch途径抑制剂在制备用于抑制调节性T细胞(Treg)或骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的活性的药物中的应用,其中,所述Notch途径抑制剂是抗δ样配体4(DLL4)的抗体,并且其中所述抑制调节性T细胞(Treg)或骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的活性包括施用特异性结合PD-1或PD-L1的抗体。

3. Notch途径抑制剂在制备用于增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的药物中的应用,其中,所述Notch途径抑制剂是抗δ样配体4(DLL4)的抗体,并且其中所述增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应包括施用特异性结合PD-1或PD-L1的抗体。

4. Notch途径抑制剂在制备用于诱导、激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的药物中的应用,其中,所述Notch途径抑制剂是抗δ样配体4(DLL4)的抗体,并且其中所述诱导、激活或增强对肿瘤的持续免疫响应包括施用特异性结合PD-1或PD-L1的抗体。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的应用,其中,所述抗DLL4的抗体包含:含有TAYYIH(SEQ ID NO:1)的重链CDR1、含有YISSYNGATNYNQKFKG(SEQ ID NO:3)的重链CDR2、含有RDYDYDVGMDY(SEQ ID NO:5)的重链CDR3、含有RASESVDNYGISFMK(SEQ ID NO:6)的轻链CDR1、含有AASNQGS(SEQ ID NO:7)的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG(SEQ ID NO:8)的轻链CDR3。

6. 如权利要求5所述的应用,其中,所述抗DLL4的抗体包含:含有SEQ ID NO:10的重链可变区和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。

7. 如权利要求5所述的应用,其中,所述抗DLL4的抗体是单克隆抗体、重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG4抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、包含抗原结合位点的抗体片段或包含抗原结合位点的经修饰的免疫球蛋白分子。

8. 如权利要求5所述的应用,其中,所述抗DLL4的抗体是包含抗原结合位点的双特异性抗体,其包含:

- a) 特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和
- b) 特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,

其中所述第一抗原结合位点包含:含有NYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;

其中所述第二抗原结合位点包含:含有TAYYIH(SEQ ID NO:1)的重链CDR1、含有YISYNRATNYNQKFKG(SEQ ID NO:25)的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY(SEQ ID NO:5)的重链CDR3;

并且

其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含:含有RASESVDNYGISFMK(SEQ ID NO:6)的轻链CDR1、含有AASNQGS(SEQ ID NO:7)的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG(SEQ ID NO:8)的轻链CDR3。

9. 如权利要求5所述的应用,其中,所述抗DLL4的抗体是包含抗原结合位点的双特异性抗体,其包含:

- a) SEQ ID NO:30的第一重链可变区；
- b) SEQ ID NO:29的第二重链可变区；和
- c) SEQ ID NO:12的第一轻链可变区和第二轻链可变区。

10. 如权利要求5所述的应用，其中，所述癌症/肿瘤选自肺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、胃肠癌、胃癌症、肾癌症、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胃癌、膀胱癌、头颈癌、以及肝细胞癌。

11. 如权利要求5所述的应用，其中，所述癌症/肿瘤是结肠直肠癌。

12. 如权利要求5所述的应用，其中，所述癌症/肿瘤是卵巢癌。

13. 如权利要求5所述的应用，其中，所述治疗癌症或抑制肿瘤生长包括施用至少一种另外的治疗剂。

14. 如权利要求13所述的应用，其中，所述至少一种另外的治疗剂是化疗剂。

15. 抗DLL4的抗体在制备用于增强正在接受特异性结合PD-1或PD-L1的抗体治疗的受试者的治疗的药物中的应用。

治疗疾病的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年10月31日提交的美国临时申请号62/073,634、2015年3月2日提交的美国临时申请号62/127,172、2015年7月14日提交的美国临时申请号62/192,133和2015年10月16日提交的美国临时申请号62/242,567的优先权权益，在此通过援引将其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本发明提供包括用于调节免疫响应和治疗癌症及其它疾病的组合疗法的方法。具体而言，本发明提供用于治疗癌症的与至少一种另外的免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂，包括DLL4拮抗剂和Notch受体拮抗剂。

背景技术

[0004] 癌症是发达国家中死亡的主要原因之一，仅在美国超过一百万的人诊断有癌症，并且每年500,000人死亡。总体而言，据估计超过1/3的人在其一生中会发展某些形式的癌症。存在超过200种不同类型的癌症，其中四种-乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌和前列腺癌-占有新病例的超过一半(Siegel等, 2012, CA:Cancer J.Clin., 62:10-29)。

[0005] 信号传导途径将细胞外信号连接到细胞核，导致直接或间接控制细胞生长、分化、存活和死亡的基因的表达。在多种癌症中，信号转导途径失调，并且可能与肿瘤发生和/或发展相关。在人肿瘤发生中涉及的信号传导途径包括，但不限于，Wnt途径、Ras-Raf-MEK-ERK或MAPK途径、PI3K-AKT途径、CDKN2A/CDK4途径、Bcl-2的/TP53途径和Notch途径。

[0006] Notch途径参与血管发育的多个方面，包括增殖、迁移、平滑肌分化、血管生成和动脉-静脉分化(Iso等, 2003, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 23:543)。Notch受体配体DLL4(8样配体4)是Notch途径的重要成分，并在血管生成中起重要作用。DLL4的杂合损失导致动脉发育和卵黄囊血管化中的严重缺陷，引起胚胎致死(Duarte等, 2004, Genes Dev., 18:2474-78; Gale等, 2004, PNAS, 101:15949-54; Krebs等, 2004, Genes Dev., 18:2469-73)。此外，肿瘤细胞和肿瘤脉管系统经常过表达DLL4，表明DLL4表达是肿瘤血管生成中的重要参与者(Patel等, 2005, Cancer Res., 65:8690-97; Yan等, 2001, Blood, 98:3793-99)。因此，阻断DLL4信号传导和/或Notch信号传导已经作为新抗癌疗法开发的有前景途径出现。

[0007] 阻断Notch途径信号传导(例如通过抗-DLL4抗体阻断)，已经显示出通过多种不同的机制减少肿瘤生长(Ridgway等, 2006, Nature, 444:1083-87; Noguera-Troise等, Nature, 444:1032-37; Hoey等, 2009, Cell Stem Cell, 5:168-77)。例如，已报告DLL4阻断抗体导致内皮细胞增殖和血管的发育，然而，这些血管缺乏功能性管腔。这血管生成障碍效果已报告通过促进非功能性血管的发育而阻断肿瘤生长(Ridgway等, 2006, Nature, 444:1083-87; Noguera-Troise等, Nature, 444:1032-37; Scehnet等, 2007, Blood, 109:4753-60)。另外，DLL4阻断抗体已经显示通过减少肿瘤细胞增殖和降低癌干细胞频率而抑制肿瘤生长。虽然减少癌干细胞或CSC背后的机制尚不知道，但是推测DLL4是CSC的自体更新所需的，并将这

些细胞保持在未分化状态(Hoey等,2009,Cell Stem Cell,5:168-77)。

[0008] 与试图阻断肿瘤血管生成因子的信号传导的治疗途径不同,以抗-人DLL4抗体阻断DLL4信号传导可以导致内皮肥大和非功能性微血管的形成。因此,即使在肿瘤血管生成因子的存在下,通过施用抗-人DLL4抗体阻断DLL4信号传导可以导致血管生成障碍,其抑制肿瘤诱导支持肿瘤生长所需的功能性血管形成的能力。

[0009] 免疫疗法的基础是对免疫系统的操作和/或调节,包括先天免疫响应和适应性免疫响应。免疫疗法的一般目的是通过控制对“外源物质”(例如病原体或肿瘤细胞)的免疫响应来治疗疾病。然而,在一些情况下,免疫疗法用于治疗自体免疫疾病,所述自体免疫疾病可以因针对体内正常存在的蛋白质、分子和/或组织的异常免疫响应而引起。免疫疗法可以包括诱导或增强特异性免疫响应、或者抑制或降低特异性免疫响应。免疫系统是许多细胞类型构成的高度复杂的系统,包括但不限于,T细胞、B-细胞、天然杀手细胞、抗原呈递细胞、树突细胞、单核细胞、粒细胞和巨噬细胞。这些细胞具有用于控制其相互作用和响应的复杂微妙的系统。细胞同时利用激活和抑制机制以及反馈环,以保持检查时的响应且不容许不受控制的免疫响应的负面后果(例如,自体免疫疾病)。

[0010] 通常,免疫响应通过由T细胞受体(TCR)识别抗原发起并且通过刺激性信号和抑制性信号之间的平衡(即,免疫检查点)调节。在正常条件下,需要免疫检查点来保持激活信号和抑制信号之间的平衡,并确保有效免疫响应的发展,同时当免疫系统响应于外源物质或病原体时保护免受自体免疫发展的影响或免受对组织的损伤。重要的免疫检查点受体是CTLA-4,其在T细胞上表达并在调节性T细胞(Treg)上高度表达。CTLA-4被认为充当抑制性分子或免疫响应“制动器”,并主要调节T细胞激活的幅度。CTLA-4抵消了共刺激性受体CD28的活性,CD28与TCR一起作用以激活T细胞。CTLA-4和CD28共享相同的配体或反受体B7-1(CD80)和B7-2(CD86),并且免疫响应的平衡可能涉及CTLA-4和CD28竞争与配体的结合。另一种重要的免疫检查点受体是在激活后于T细胞上表达的PD-1,在Treg上高度表达,并且在其它激活细胞(包括B细胞和天然杀手(NK)细胞)上表达。与CTLA-4类似,PD-1被认为充当免疫响应的抑制性分子和“制动器”。存在PD-1的两种配体/反受体,即PD-L1(也称为B7-H1和CD274)和PD-L2(也称作B7-DC和CD273)(参见,Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer,12:252-264)。

[0011] 癌症免疫监视的概念是基于这样的理论,即免疫系统能够识别肿瘤细胞,激发免疫响应,并抑制肿瘤的发展和/或进展。然而,显然许多癌细胞已经开发机制来逃避免疫系统,这可以使得肿瘤不受限制的生长。免疫检查点可以由于肿瘤而失调,并且可以被肿瘤操纵以用作耐免疫机制。癌免疫疗法聚焦于可以激活和/或增强免疫系统的试剂的开发,以实现更有效的响应来抑制肿瘤生长和/或杀死肿瘤细胞。

[0012] 本发明的目的之一在于提供癌症治疗的改善方法,特别是使用与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂的方法。

发明内容

[0013] 本发明提供治疗诸如癌症等疾病的方法,其中所述方法包括对有需要的受试者施用Notch途径抑制剂(例如DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与第二试剂的组合,其中所述第二试剂是免疫治疗剂。利用至少两种治疗剂的组合疗法经常使用通过不同作用机制起作

用、和/或靶向不同途径的试剂，并可能导致加成或协同效应。组合疗法可以允许各个试剂的剂量比单一疗法中使用的剂量低，由此降低毒副作用和/或提高试剂的治疗指数。组合疗法可以降低发展对试剂的抗性的可能性。组合治疗可以允许一种试剂使肿瘤细胞（包括癌干细胞）对第二试剂增强的活性敏感。包括免疫治疗剂的组合疗法允许一种试剂增强对肿瘤或肿瘤细胞的免疫响应，同时第二试剂可以更直接地有效地杀死肿瘤细胞。此外，各治疗剂的施用顺序和/或时机可以影响药物组合的整体功效。

[0014] 本发明提供Notch途径抑制剂，包括但不限于， δ 样配体4 (DLL4) 拮抗剂和Notch受体拮抗剂。DLL4拮抗剂包括但不限于结合DLL4的抗体和其它多肽、结合DLL4的小分子和可溶性Notch蛋白。本文使用的“DLL4拮抗剂”包括双特异性抗体、异源二聚双特异性分子、同源二聚双特异性分子，和/或包含抗DLL4抗体和免疫治疗剂的双功能分子。Notch受体拮抗剂包括但不限于结合Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4的抗体和其它多肽，结合Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4的小分子，以及可溶性Notch配体 (DLL1、DLL3、DLL4、Jag1和Jag2)。本文使用的“Notch受体拮抗剂”包括双特异性抗体、异源二聚双特异性分子、同源二聚双特异性分子，和/或包括抗Notch抗体和免疫治疗剂的双功能分子。

[0015] 本发明提供免疫治疗剂，包括但不限于，PD-1活性的调节剂、PD-L1活性的调节剂、PD-L2活性的调节剂、CTLA-4活性的调节剂、CD28活性的调节剂、CD80活性的调节剂、CD86活性的调节剂、4-1BB活性的调节剂、OX40活性的调节剂、KIR活性的调节剂、Tim-3活性的调节剂、LAG3活性的调节剂、CD27活性的调节剂、CD40活性的调节剂、GITR活性的调节剂、TIGIT活性的调节剂、CD20活性的调节剂、CD96活性的调节剂、IDO1活性的调节剂、细胞因子、趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员和免疫刺激性寡核苷酸。

[0016] 提供包含Notch途径抑制剂（例如，DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂）和/或至少一种另外的免疫治疗剂的组合物。提供包含所述Notch途径抑制剂和/或所述免疫治疗剂的药物组合物。

[0017] 随着药物发现和开发的进展，特别是在癌症领域，“一种药物适合所有”方式正在转向“个性化医疗”策略。个性化医疗策略可以包括基于生物标志物（包括预后标志物、药代动力学标志物和预测标志物）的治疗方案。通常，预测生物标志物评估肿瘤或癌症将对特定治疗剂或试剂组合响应或敏感的可能性，并且可以允许鉴定和/或选择最有可能受益于使用该试剂或试剂组合的患者。本发明提出了使用PD-L1作为对与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应的预测生物标志物。还提供了使用预测生物标志物来将肿瘤和/或癌症患者鉴定和/或选择为可能对治疗响应或非响应的方法。还提供了用于治疗患者的方法，所述患者被预测和/或鉴定为对与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂的治疗响应。

[0018] 在一个方面，本发明提供抑制肿瘤生长的方法。在一些实施方式中，方法包括使肿瘤细胞与有效量的途径抑制剂和有效量的第二试剂的组合接触，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。所述方法可以是体内或体外的。在某些实施方式中，肿瘤位于患者中，并且使肿瘤细胞与Notch途径抑制剂和免疫治疗剂接触包括对受试者施用治疗有效量的各试剂。在一些实施方式中，抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并

且所述第二试剂是免疫治疗剂。

[0019] 在另一方面，本发明提供一种治疗癌症的方法。在一些实施方式中，治疗癌症的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，治疗癌症的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，治疗癌症的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。

[0020] 在另一方面，本发明提供下述方法。在一些实施方式中，调节免疫响应的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，免疫响应是抗肿瘤响应。在一些实施方式中，免疫响应被增强、增加、激活和/或诱导。在一些实施方式中，免疫响应的调节包括增加的Th1型响应。在一些实施方式中，免疫响应的调节包括降低的Th2型响应。在一些实施方式中，免疫响应的调节包括降低的Th17型响应。

[0021] 在另一方面，本发明提供一种抑制调节性T细胞(Treg)的活性的方法。在一些实施方式中，抑制Treg的活性的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制Treg的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制Treg的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，Treg活性的抑制包括对免疫响应阻遏的抑制。在一些实施方式中，Treg活性的抑制导致对免疫响应阻遏的抑制。

[0022] 在另一方面，本发明提供一种抑制骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的活性的方法。在一些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，MDSC活性的抑制包括对免疫响应阻遏的抑制。在一些实施方式中，MDSC活性的抑制导致对免疫响应阻遏的抑制。

[0023] 在另一方面，本发明提供一种增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法。在一些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所

述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。

[0024] 在另一方面，本发明提供一种激活或增强对肿瘤的持续或长期免疫响应的方法。在一些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。

[0025] 在另一方面，本发明提供一种诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续或长期免疫力的方法。在一些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续免疫力的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续免疫力的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续免疫力的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且所述第二试剂是免疫治疗剂。

[0026] 在另一方面，本发明提供一种增加免疫检查点调节剂的功效的方法。在一些实施方式中，增加免疫检查点调节剂的功效的方法包括对受试者施用与治疗有效量的免疫检查点调节剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，增加免疫检查点调节剂的功效的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫检查点调节剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，增加免疫检查点调节剂的功效的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫检查点调节剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是免疫检查点增强剂或刺激剂。

[0027] 在另一方面，本发明提供一种降低或预防受试者中的转移的方法。在一些实施方式中，降低或预防受试者中的转移的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，降低或预防受试者中的转移的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫治疗剂，其中所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，降低或预防受试者中的转移的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫治疗剂，其中所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。

[0028] 在另一方面，本发明提供一种增强正在接受免疫检查点调节剂治疗的受试者的治疗方法，所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。

[0029] 在另一方面，本发明提供一种增强或诱导受试者中的抗肿瘤免疫响应的方法，所

述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，所述Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，所述Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。

[0030] 在另一方面，本发明提供一种鉴定可能响应于Notch途径抑制剂与第二试剂的组合治疗的人肿瘤的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括确定获自所述肿瘤的样品中PD-L1的表达水平。在一些实施方式中，鉴定可能响应于Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合治疗的人肿瘤的方法包括：a) 获得所述人肿瘤的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于PD-L1的表达水平，将所述肿瘤鉴定为可能对Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合治疗响应或非响应。

[0031] 在另一方面，本发明提供一种确定人肿瘤对与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗的响应性(或敏感性)的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 获得所述人肿瘤的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于PD-L1的表达水平，确定肿瘤对治疗的响应性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对与至少一种另外的治疗剂组合的DLL4拮抗剂治疗的响应性或敏感性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对与至少一种另外的治疗剂组合的Notch受体拮抗剂治疗的响应性或敏感性。

[0032] 在另一方面，本发明提供一种鉴定可能对与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应的癌症患者的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 获得来自所述患者的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定可能对与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂治疗响应的癌症患者。

[0033] 在另一方面，本发明提供一种选择用与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗的肿瘤受试者的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 确定获自所述受试者的样品中PD-L1的表达水平；b) 基于PD-L1的表达水平，将所述肿瘤鉴定为可能对Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的治疗响应或非响应；和c) 如果所述肿瘤鉴定为可能对治疗响应，则选择所述受试者以用于治疗。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。

[0034] 在另一方面，本发明提供一种治疗患者中的癌症的方法，所述方法包括：(a) 鉴定所述患者是否可能响应于与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，其中所述鉴定包括：(i) 获得来自所述患者的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和(iii) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者；和(b) 向可能对治疗响应的患者施用有效量的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂的组合。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定所述患者是否响应于与化疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗。在一些实施方式中，所述方法包括向所述患者施用与至少一种另外的治疗剂(例如化疗剂)组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0035] 在另一方面，本发明提供一种治疗患者中的癌症的方法，所述方法包括：对所述患者施用与第二试剂组合的有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂；其中基于来自所述患者的样品中PD-L1的表达水平，预测所述患者对用Notch途径抑制剂和/

或免疫治疗剂治疗响应。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，预测所述患者响应于与化疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂治疗。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂(例如化疗剂)组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0036] 在另一方面，本发明提供一种增加与第二试剂组合的Notch途径抑制剂的有效治疗的可能性的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：(a) 鉴定患者是否具有可能响应Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂的治疗的肿瘤，其中所述鉴定包括(i) 获得来自所述患者的样品；ii) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和(iii) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者；和(b) 对所述患者施用与免疫治疗剂组合的有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定患者是否具有可能响应与化疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗的肿瘤。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂(例如化疗剂)组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0037] 在另一方面，本发明提供一种增加与第二试剂组合的Notch途径抑制剂的有效治疗的可能性的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：对患者施用有效量的Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂，其中基于样品中PD-L1的表达水平将患者鉴定为可能响应Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂治疗。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述患者鉴定为可能对与化疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂(例如化疗剂)组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0038] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中，所述抗体特异性结合人DLL4的胞外域。在一些实施方式中，所述抗体特异性结合人DLL4的胞外域的27-217位氨基酸(SEQ ID NO:17)内的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)和139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合人DLL4的解离常数(K_d)为约10nM~约0.1nM。

[0039] 在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗体，所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISCYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2)、YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 或YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3；和/或含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗体，所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3；以及含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。

[0040] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，DLL4

拮抗剂是抗体,所述抗体包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的重链可变区,和/或与SEQ ID NO:12具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。

[0041] 在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是由质粒编码的抗体,所述质粒具有ATCC保藏号PTA-8425,其根据布达佩斯条约的条件于2007年5月10日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的美国典型培养物保藏中心(ATCC)。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是由质粒DNA编码的抗体,所述质粒DNA具有ATCC保藏号PTA-8427,其根据布达佩斯条约的条件于2007年5月10日保藏于ATCC。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是包含由杂交瘤产生的抗体的CDR的抗体,所述杂交瘤根据布达佩斯条约的条件于2007年9月28日保藏于ATCC。在一些实施方式中,抗-DLL4抗体是登西珠单抗(demcizumab)(OMP-h21M18)。

[0042] 在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH(SEQ ID NO:20)的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR(SEQ ID NO:21)的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY(SEQ ID NO:22)的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH(SEQ ID NO:1)的重链CDR1、含有YISNYNRATNYNQKFKG(SEQ ID NO:25)的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY(SEQ ID NO:5)的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK(SEQ ID NO:6)的轻链CDR1、含有AASNQGS(SEQ ID NO:7)的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG(SEQ ID NO:8)的轻链CDR3。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含SEQ ID NO:30的第一重链可变区;SEQ ID NO:29的第二重链可变区;和SEQ ID NO:12的第一轻链可变区和第二轻链可变区。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是双特异性抗体,所述双特异性抗体包含SEQ ID NO:32的第一重链;SEQ ID NO:31的第二重链;和SEQ ID NO:33的第一轻链和第二轻链。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是OMP-305B83。

[0043] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中,Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,所述抗体特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体的胞外域。

[0044] 在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体的胞外域,并且包含含有SSSGMS(SEQ ID NO:34)的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:35)的重链CDR2和含有SIFYTT(SEQ ID NO:36)的重链CDR3;和/或含有RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:37)的轻链CDR1、含有GASSRAT(SEQ ID NO:38)的轻链CDR2和含有QQYSNFPI(SEQ ID NO:39)的轻链CDR3。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SSSGMS(SEQ ID NO:34)的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:35)的重链CDR2和含有SIFYTT(SEQ ID NO:36)的重链CDR3;以及含有RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:37)的轻链CDR1、含有GASSRAT(SEQ ID NO:38)的轻链CDR2和含有QQYSNFPI(SEQ ID NO:39)的轻链CDR3。

[0045] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约90%、至少约95%或

100%序列同一性的重链可变区,和/或与SEQ ID NO:41具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:40的重链可变区和含有SEQ ID NO:41的轻链可变区。

[0046] 在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是由质粒DNA编码的抗体,所述质粒DNA具有ATCC保藏号PTA-10170,其根据布达佩斯条约的条件于2009年7月6日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的美国典型培养物保藏中心(ATCC)。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体他瑞妥单抗(tarextumab)(OMP-59R5)。

[0047] 在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的抗体。在一些实施方式中,所述抗体特异性结合Notch1的胞外域的非配体结合膜近端区。在一些实施方式中,特异性结合Notch1的抗体包含含有RGYWIE(SEQ ID NO:46)的重链CDR1、含有QILPGTGRTNYNEKFKG(SEQ ID NO:47)的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY(SEQ ID NO:48)的重链CDR3;和/或含有RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:49)的轻链CDR1、含有GTNNRAP(SEQ ID NO:50)的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTKL(SEQ ID NO:51)的轻链CDR3。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有RGYWIE(SEQ ID NO:46)的重链CDR1、含有QILPGTGRTNYNEKFKG(SEQ ID NO:47)的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY(SEQ ID NO:48)的重链CDR3;以及含有RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:49)的轻链CDR1、含有GTNNRAP(SEQ ID NO:50)的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTKL(SEQ ID NO:51)的轻链CDR3。

[0048] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的重链可变区,和/或与SEQ ID NO:53具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:52的重链可变区和含有SEQ ID NO:53的轻链可变区。

[0049] 在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是由质粒DNA编码的抗体,所述质粒DNA具有ATCC保藏号PTA-9549,其根据布达佩斯条约的条件于2008年10月15日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的美国典型培养物保藏中心(ATCC)。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体博尼替珠单抗(brontictuzumab)(OMP-h52M51)。

[0050] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中,Notch途径抑制剂是抗体。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体。在一些实施方式中,所述抗体是重组抗体。在一些实施方式中,所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方式中,所述抗体是包含抗原结合位点的抗体片段。在某些实施方式中,抗体或抗体片段是单价的、单特异性的、双价的、双特异性的或多特异性的。在一些实施方式中,所述抗体是IgG1抗体。在一些实施方式中,所述抗体是IgG2抗体。在一些实施方式中,所述抗体是IgG4抗体。在一些实施方式中,抗体或抗体片段是双特异性试剂的一部分。在一些实施方式中,抗体或抗体片段是异源二聚双特异性分子的一部分。在一些实施方式中,抗体或抗体片段是同源二聚双特异性分子的一部分。在某些实施方式中,抗体或抗体片段是分离的。在其它实施方式中,抗体或抗体片段是基本上纯的。

[0051] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中,免疫

治疗剂是调节免疫响应的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增强抗肿瘤免疫响应的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增加细胞介导的免疫性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增加T细胞活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增加细胞溶解性T细胞(CTL)活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增加NK细胞活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是对免疫响应阻遏进行抑制的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制阻遏细胞或阻遏细胞活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制Treg活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制MDSC活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是对抑制性免疫检查点受体的活性进行抑制的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制PD-1的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制PD-L1和/或PD-L2的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制CTLA-4的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制CD80和/或CD86的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制TIGIT的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制KIR的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是抑制IDO1的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是对激活免疫检查点受体的活性进行增强或刺激的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增强或刺激GITR的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增强或刺激OX40的活性的试剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是增强或刺激CD40的活性的试剂。

[0052] 在本文所述方法的一些实施方式中，免疫治疗剂是PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、PD-L2拮抗剂、CTLA-4拮抗剂、CD80拮抗剂、CD86拮抗剂、TIGIT拮抗剂、KIR拮抗剂、Tim-3拮抗剂、LAG3拮抗剂、CD96拮抗剂、CD20拮抗剂或IDO1拮抗剂。在一些实施方式中，PD-1拮抗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中，结合PD-1的抗体是派姆单抗(KEYTRUDA; MK-3475)、吡替珠单抗(pidilizumab)(CT-011)或尼莫单抗(nivolumab)(OPDIVO; BMS-936558)。在一些实施方式中，PD-L1拮抗剂是特异性结合PD-L1的抗体。在一些实施方式中，结合PD-L1的抗体是RG7446(MPDL3280A)、度伐鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736)或BMS-936559。在一些实施方式中，CTLA-4拮抗剂是特异性结合CTLA-4的抗体。在一些实施方式中，结合CTLA-4的抗体是依匹木单抗(ipilimumab)(YERVOY)或曲美木单抗(tremelimumab)(CP-675,206)。在一些实施方式中，KIR拮抗剂是特异性结合KIR的抗体。在一些实施方式中，结合KIR的抗体是利来罗单抗(lirilumab)。

[0053] 在本文所述方法的一些实施方式中，免疫治疗剂是CD28激动剂、4-1BB激动剂、OX40激动剂、CD27激动剂、CD80激动剂、CD86激动剂、CD40激动剂或GITR激动剂。

[0054] 在本文所述方法的一些实施方式中，免疫治疗剂是细胞因子。在一些实施方式中，细胞因子是趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子或肿瘤坏死因子家族的成员。在一些实施方式中，细胞因子是IL-2、IL15或干扰素- γ 。

[0055] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，方法包括施用至少一种另外的治疗剂。在一些实施方式中，至少一种另外的治疗剂是化疗剂。

[0056] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，方法包括施用与特异性结合人PD-1的抗体组合的特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗组合的登西珠单抗。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗以及至少一种化疗剂组合的登西珠单抗。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗、卡铂以及培美曲塞组合的登西珠单抗。在一些实施方式中，方法包括施用与特异性结合

人PD-1的抗体组合的特异性结合人DLL4和人VEGF的双特异性抗体。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗组合的OMP-305B83。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗以及至少一种化疗剂组合的OMP-305B83。在一些实施方式中，方法包括施用与派姆单抗、卡铂以及培美曲塞组合的OMP-305B83。

[0057] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，癌症是选自由以下癌症组成的组中的癌症：肺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、胃肠癌、胃癌症(gastric cancer)、肾癌症(renal cancer)、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、肾癌(liver cancer)、前列腺癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、子宫颈癌、胃癌(stomach cancer)、膀胱癌、头颈癌、以及肝细胞癌。在一些实施方式中，癌症是肺癌。在一些实施方式中，癌症或癌细胞表达PD-L1。在一些实施方式中，癌症或癌细胞过表达PD-L1。在一些实施方式中，癌症或癌细胞表达PD-L2。在一些实施方式中，癌症或癌细胞过表达PD-L2。在一些实施方式中，与预定的PD-L1表达水平相比，癌症或癌细胞具有增加的PD-L1表达水平。

[0058] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，肿瘤是选自由以下肿瘤组成的组中的肿瘤：肺癌、胰腺瘤、乳腺瘤、结肠瘤、结肠直肠瘤、黑色素瘤、胃肠瘤、胃肿瘤(gastric tumor)、肾肿瘤(renal tumor)、卵巢瘤、肝瘤、子宫内膜瘤、肾瘤(liver tumor)、前列腺瘤、甲状腺瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、子宫颈瘤、胃瘤(stomach tumor)、膀胱瘤、头颈瘤、以及肝细胞瘤。在一些实施方式中，肿瘤是肺癌。在一些实施方式中，肿瘤表达PD-L1。在一些实施方式中，肿瘤过表达PD-L1。在一些实施方式中，肿瘤表达PD-L2。在一些实施方式中，肿瘤过表达PD-L2。在一些实施方式中，与预定的PD-L1表达水平相比，肿瘤具有增加的PD-L1表达水平。

[0059] 在上述各方面以及其它方面的某些实施方式和本文它处所述的实施方式中，所述方法还包括施用至少一种另外的治疗剂。在一些实施方式中，另外的治疗剂是化疗剂。在一些实施方式中，另外的治疗剂是抗体。

[0060] 在一些上述方面和实施方式中，方法包括从受试者或患者获得样品。在一些实施方式中，样品是活组织检查样品。在一些实施方式中，样品来自肿瘤。在一些实施方式中，样品包括肿瘤细胞、肿瘤浸润免疫细胞、基质细胞和它们的任意组合。在一些实施方式中，样品是福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)样品。在一些实施方式中，样品是存档的(archival)、新鲜的或冷冻的组织。在一些实施方式中，样品是血液或血浆。在一些实施方式中，将样品中PD-L1的表达水平与PD-L1的预定表达水平进行比较。在一些实施方式中，PD-L1表达的预定表达水平是参照样品、参照肿瘤样品、参照正常组织样品、一系列参照肿瘤样品或一系列参照正常组织样品中PD-L1的表达水平。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用免疫组织化学(IHC)检验确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用包含H-评分的检验确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用ELISA确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用特异性结合PD-L1的抗体确定。在一些实施方式中，PD-L1在肿瘤细胞上检测。在一些实施方式中，PD-L1在肿瘤浸润免疫细胞上检测。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用基于PCR的检验确定。在一些实施方式中，PD-L1在细胞裂解物中检测。

[0061] 还提供药物组合物，其包含本文所述的Notch途径抑制剂(例如，DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)和药学上可接受的载剂，其与包含本文所述的免疫治疗剂和药学上可接

受的载剂的药物组合物组合使用。

[0062] 当发明的方面或实施方式采用马库什类群或者其它可替换的类群来描述时，本发明不仅涵盖了作为整体列出的整个类群，也涵盖单独类群的各成员以及主要类群的所有可能的亚类群，也还该缺少一个或多个类群成员的主要类群。本发明还设想明确排除所要求保护的发明中的一种或多种任何类群成员。

附图说明

[0063] 图1A和1B.抗-DLL4抗体对PD-1在来自CT26.WT肿瘤的细胞中表达的影响。图1A.在来自用抗-mDLL4抗体21R30、SIRP α -Fc蛋白或对照治疗的小鼠的肿瘤细胞裂解物中的PD-1水平。图1B.来自各治疗组的4个单独肿瘤的代表性蛋白质印迹分析。

[0064] 图2A、2B和2C.肿瘤生长的抑制。图2A和图2B.将CT26.WT肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-mDLL4抗体21R30 (-■-)、mIL-2-Fc (-▲-)、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合 (-X-) 或者对照 (-◆-) 治疗。数据显示为相对于治疗后天数的肿瘤体积 (mm^3)。图2C.将KP_LUN01肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-mDLL4抗体21R30 (-■-)、mIL-2-Fc (-▲-)、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合 (-X-) 或者对照 (-◆-) 治疗。数据显示为相对于治疗后天数的肿瘤体积 (mm^3)。

[0065] 图3A、3B和3C.NK细胞的细胞毒性检验。图3A和图3B.从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾收获细胞。将靶细胞 (YAC-1细胞或CT26.WT细胞) 用10 μM 钙黄绿素AM标记，并与脾细胞以25:1的效应子:靶标比率混合。收获上清液，并在荧光计上以485nm的激发和535nm的发射将钙黄绿素释放定量。图3C.从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的脾收获细胞。将靶细胞 (YAC-1细胞) 用10 μM 钙黄绿素AM标记，并与脾细胞以25:1的效应子:靶标比率混合。收获上清液，并在荧光计上以485nm的激发和535nm的发射将钙黄绿素释放定量。

[0066] 图4A和4B.T细胞的细胞毒性检验。图4A.从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾收获细胞。用AH-1肽刺激脾细胞。将靶细胞 (CT26.WT细胞) 用10 μM 钙黄绿素AM标记，并与经刺激的脾细胞混合。收获上清液，并在荧光计上以485nm的激发和535nm的发射将钙黄绿素释放定量。图4B.从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的脾收获细胞。用经丝裂霉素处理的KP_LUN01细胞刺激脾细胞。将靶细胞 (KP_LUN01细胞) 用10 μM 钙黄绿素AM标记，并与经刺激的脾细胞混合。收获上清液，并在荧光计上以485nm的激发和535nm的发射将钙黄绿素释放定量。

[0067] 图5.针对IFN- γ 的ELISpot检验。从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾收获细胞。显示产生IFN- γ 的细胞的数量。

[0068] 图6.CT26.WT肿瘤中的CD45 $^+$ PD-1 $^+$ 细胞。从用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合或者对照治疗的小鼠收获细胞，并制备单细胞悬浮液。通过FACS分析而分析细胞的CD45表达和PD-1表达。

[0069] 图7A、7B和7C.CT26.WT肿瘤生长的抑制。图7A.将CT26.WT肿瘤细胞皮下注入Balb/

C小鼠。小鼠用抗-mDLL4抗体21R30 (-▲-)、抗-PD-L1抗体 (-X-)、抗-CTLA-4抗体 (-■-)，抗-mDLL4抗体21R30和抗-CTLA-4抗体的组合 (-●-)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-L1抗体的组合 (-◆-) 或者对照 (-●-) 治疗。数据显示为相对于治疗后天数的肿瘤体积 (mm^3)。图7B和7C. 来自各治疗组的个体小鼠的结果。

[0070] 图8A和8B.CT26.WT肿瘤生长的抑制。图8A. 将CT26.WT肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-mDLL4抗体21R30 (-■-)、抗-PD-1抗体 (-▲-)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合 (-●-) 或者对照 (-◆-) 治疗。数据显示为相对于细胞注射后天数的肿瘤体积 (mm^3)。图8B. 来自各治疗组的个体小鼠的结果。

[0071] 图9. 用肿瘤再攻击 (rechallenge) 后在治疗小鼠中的CT26.WT肿瘤生长。小鼠事先用抗-PD-1抗体 (-▲-) 或者抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合 (-●-) 治疗，其肿瘤已经消退至不可检测的水平，将该小鼠用CT26.WT肿瘤细胞再攻击。数据显示为相对于再攻击后天数的肿瘤体积 (mm^3)。

[0072] 图10A、10B、10C和10D. ELISpot和ELISA检验。从用抗-mDLL4抗体21R30、抗-PD-1抗体、抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合或者对照抗体治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾收获细胞。图10A. 显示产生IFN- γ 的细胞的数量。图10B. 显示产生IL-2的细胞的数量。图10C. 显示产生IL-17的细胞的数量。图10D. 显示产生的IL-6的量。

[0073] 图11. 骨髓来源的抑制细胞、和激活的骨髓细胞的FACS分析。

[0074] 图12. 记忆T细胞的FACS分析。

[0075] 图13. 调节性T细胞 (Treg) 检验。

[0076] 图14. CD8⁺T细胞的细胞毒性检验。

[0077] 图15A和15B.CT26.WT肿瘤生长的抑制和Renca肿瘤生长的抑制。图15A. 将CT26.WT肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-PD-1抗体 (-▲-)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-mVEGF抗体的组合 (-■-)、抗-mDLL4抗体21R30、抗-mVEGF抗体和抗-PD-1抗体的组合 (-X-) 或者对照 (-◆-) 治疗。数据显示为相对于细胞注射后天数的肿瘤体积 (mm^3)。图15B. 将Renca肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-PD-1抗体 (-■-)、抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体B20的组合 (-X-)、抗-mDLL4抗体21R50与抗-mVEGF抗体B20与抗-PD-1抗体的组合 (-●-)、或者对照 (-◆-) 治疗。数据显示为相对于细胞注射后天数的肿瘤体积 (mm^3)。

[0078] 图16. 中枢记忆CD4+和CD8+T细胞的FACS分析。

[0079] 图17A和17B. 肿瘤位置处的细胞因子表达。

[0080] 图18.CT26.WT肿瘤生长的抑制。将CT26.WT肿瘤细胞皮下注入Balb/C小鼠。小鼠用抗-Notch2/3抗体59R5 (-▲-)、抗-PD-1抗体 (-■-)、抗-Notch2/3抗体59R5和抗-PD-1抗体的组合 (-○-) 或者对照 (-●-) 治疗。数据显示为相对于细胞注射后天数的肿瘤体积 (mm^3)。

具体实施方式

[0081] 本发明提供调节免疫响应、特别是抗-肿瘤免疫响应的方法，抑制肿瘤生长的方法，和治疗癌症的方法。本文提供的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式

中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体。在一些实施方式中,免疫治疗剂包括但不限于,PD-1活性的调节剂、PD-L1活性的调节剂、PD-L2活性的调节剂、CTLA-4活性的调节剂、CD28活性的调节剂、CD80活性的调节剂、CD86活性的调节剂、4-1BB活性的调节剂、OX40活性的调节剂、KIR活性的调节剂、Tim-3活性的调节剂、LAG3活性的调节剂、CD27活性的调节剂、CD40活性的调节剂、GITR活性的调节剂、TIGIT活性的调节剂、CD20活性的调节剂、CD96活性的调节剂、IDO1活性的调节剂、细胞因子、趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员和免疫刺激性寡核苷酸。本发明还提供鉴定可能对用Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合治疗响应的肿瘤的方法,所述方法包括确定获自所述肿瘤的样品中PD-L1的表达水平。本发明提供选择用Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合进行治疗的受试者或患者的方法,所述方法包括确定获自所述受试者的样品中PD-L1的表达水平。

[0082] 定义

[0083] 为了便于理解本发明,许多术语和短语如下定义。

[0084] 本文所用的术语“拮抗剂”和“拮抗性”是指部分或完全阻断、抑制、降低或中和靶标和/或信号传导途径的生物学活性的任何分子。术语“拮抗剂”在本文中用于包括部分或完全阻断、抑制、降低或中和蛋白质活性的任何分子。合适的拮抗剂分子包括但不限于:拮抗剂抗体、抗体片段、可溶性受体和小分子。

[0085] 本文所用的术语“激动剂”和“激动性”是指或描述能够直接或间接地实质性诱导、激活、促进、增加或增强靶标和/或信号传导途径的生物学活性的试剂。术语“激动剂”在本文中用于包括部分或全部诱导、激活、促进、增加或增强蛋白质活性的任何试剂。合适的激动剂具体包括但不限于:激动剂抗体或其片段,可溶性受体,其它融合蛋白和小分子。

[0086] 本文所用的术语“生物标志物”可以包括但不限于核酸和蛋白质,及其变体和片段。生物标志物可以包括包含编码生物标志物的全部或部分核酸序列或这种序列的互补序列的DNA。用于本发明的生物标志物核酸被认为包括包含任何目的核酸序列的全部或部分序列的DNA和RNA。认为生物标志物蛋白包含任何生物标志物蛋白或多肽的全部或部分氨基酸序列。

[0087] 本文所用的术语“抗体”是指通过在免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原结合位点识别并特异性结合靶标,例如蛋白质、多肽、肽、糖、多核苷酸,脂质或前述物质的组合。如本文所用,该术语包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、包含抗原结合位点(例如Fab,Fab',F(ab')₂和Fv片段)的抗体片段、单链Fv(scFv)抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单特异性抗体、单价抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原结合位点的融合蛋白、以及包含抗原结合位点的任何其它经修饰的免疫球蛋白分子,只要所述抗体表现出所需的生物活性即可。抗体可以是五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM或其亚类(同种型)中的任何一种(例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1和IgA2),基于其重链恒定域的身份,分别将其分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同的和充分表征的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸露的或与其它分子缀合,其它分子包括但不限于毒素和放射性同位素。

[0088] 本文所用的术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且通常包括完整抗体的抗原决定性可变区或抗原结合位点。抗体片段的实例包括但不限于由抗体片段形成的Fab、

Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、单链抗体和多特异性抗体。本文所用的“抗体片段”包含至少一个抗原结合位点或表位结合位点。

[0089] 本文所用的抗体的术语“可变区”是指单独的或者组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重链或轻链的可变区通常由通过三个互补决定区(CDR)连接的四个框架区组成,也称为“高变区”。每个链中的CDR被框架区域紧密地保持在一起,并且与来自另一个链的CDR共同有助于抗体的抗原结合位点的形成。至少存在两种用于确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即Kabat等,1991,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,5th Edition,National Institutes of Health,Bethesda MD),和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(A1-Lazikani等,1997,*J.Mol.Biol.*,273:927-948)。在本领域中有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0090] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指涉及单个抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合中涉及的同源抗体群体。这与通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体混合物的多克隆抗体形成对比。术语“单克隆抗体”包括完整抗体和全长抗体以及抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv),单链(scFv)抗体,包含抗体部分的融合蛋白,以及包含至少一个抗原结合位点的任何其它经修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指通过任何数量的技术制造的抗体,所述技术包括但不限于杂交瘤生产、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0091] 本文所用的术语“人源化抗体”是指下述抗体,其为特异性免疫球蛋白链,嵌合免疫球蛋白,或者含有最少非人序列的其片段。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中CDR的氨基酸残基被具有期望的特异性、亲和力和/或结合能力、来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔或仓鼠)的CDR的氨基酸残基替换。

[0092] 本文所用的术语“人抗体”是指由人产生的抗体,或者使用本领域已知的任何技术制造的、具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。

[0093] 本文所用的术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列衍生自两个以上物种的抗体。通常,轻链和重链的可变区都对应于具有所需特异性、亲和力和/或结合能力的、源自一个哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区,而恒定区与源自另一物种(通常是人的)抗体中的序列是同源的。

[0094] 本文所用的术语“亲和力成熟的抗体”是指在一个或多个CDR中具有一个或多个改变的抗体,与不具有这些改变的亲本抗体相比,其导致抗体对抗原的亲和力的改善。在一些情况下,在框架区域中进行了改变。优选的亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的方法产生,包括重链和轻链可变区改组,CDR和/或构架残基的随机诱变,或CDR和/或构架残基的定点诱变。

[0095] 术语“表位”和“抗原决定簇”在本文中可互换使用,是指能够被特定抗体识别并特异性结合的抗原部分。当抗原是多肽时,表位可以由连续氨基酸以及通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在蛋白质变性时保留,而通过三级折叠形成的表位(也称为构象表位)通常在蛋白质变性时丧失。表位通常在独特的空间构象中包括至少3个,更通常至少5个或8~10个氨基酸。

[0096] 如本文所用,术语“选择性结合”或“特异性结合”是指与结合剂或抗体和替代性物质(包括不相关或相关的蛋白质)相比,结合剂或抗体与表位、蛋白质或靶分子更频繁、更快

速、以更长的持续时间、以更大的亲和力或以上述的某种组合反应或相关。在某些实施方式中，“特异性结合”是指例如抗体与靶标结合的KD为约0.1mM以下，但更通常小于约1μM。在某些实施方式中，“特异性结合”是指抗体与靶标结合的KD为至少约0.1μM以下，至少约0.01μM以下，或至少约1nM以下。由于不同物种中同源蛋白质之间的序列同一性，特异性结合可包括识别多于一个物种中的蛋白质的抗体。类似地，由于不同蛋白质的多肽序列的某些区域内的同源性，特异性结合可以包括识别多于一种蛋白质的抗体（或其它多肽或结合剂）。应当理解，在某些实施方式中，特异性结合第一靶标的抗体或结合剂可能或可能不特异性地结合第二靶标。因此，“特异性结合”不必然地需要（尽管它可以包括）排他性结合，即结合单个靶标。因此，在某些实施方式中，抗体可特异性结合多于一种的靶标。在某些实施方式中，多个靶标可以被抗体上相同的抗原结合位点结合。例如，在某些情况下，抗体可以包含两个相同的抗原结合位点，每个抗原结合位点特异性结合两种以上蛋白质上相同的表位。在某些替代实施方式中，抗体可以是双特异性的并且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位点。一般而言，但不必然，提到结合是指特异性结合。

[0097] 本文所用的术语“可溶性受体”是指能够以可溶形式从细胞中分泌的、在受体的第一跨膜域之前的受体蛋白质的细胞外片段（或其部分）。

[0098] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，是指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的，它可以包含经修饰的氨基酸，并且它可以是被非氨基酸中断。该术语还包括自然或通过干预修饰的氨基酸聚合物；例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰，例如与标记成分的缀合。还包括在定义内的是例如含有一个或多个氨基酸类似物（包括例如非天然氨基酸）以及本领域已知的其它修饰的多肽。应当理解，由于本发明的多肽可以基于抗体，在某些实施方式中，多肽可以以单链或关联链的形式出现。

[0099] 本文所用的术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸类似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸，以及稍后经过修改的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。短语“氨基酸类似物”是指具有与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构（例如与氢结合的α碳、羧基、氨基和R基团）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。这些类似物可以具有经修饰的R基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。短语“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但是功能与天然存在的氨基酸类似的化学化合物。

[0100] 术语“多核苷酸”和“核酸”和“核苷酸序列”在本文中可互换使用，是指任何长度的核苷酸的聚合物，并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸，核糖核苷酸，经修饰的核苷酸或碱基，和/或其类似物，或者可通过DNA或RNA聚合酶引入聚合物的任何底物。

[0101] 在两个以上核酸或多肽的情况下术语“相同”或百分比“同一性”是指两个以上的序列或子序列，它们相同，或当针对最大对应进行比较和比对（必要时引入空位），并且不考虑任何保守性氨基酸取代作为序列同一性的部分时，具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基。可以使用序列比较软件或算法或目视检查来测量同一性百分比。可用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件是本领域公知的。这些包括但不限于BLAST和BLAST变体，ALIGN和ALIGN变体，Megalign，BestFit，GCG Wisconsin Package等。在一些实

施方式中,本发明的两个核酸或多肽实质上具有同一性,意味着如使用序列比较算法或目视检查而测量的,当针对最大对应进行比较和比对时,它们至少具有70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,以及在一些实施方式中为至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方式中,同一性存在于长度为至少约10个、至少约20个、至少约40-60个、至少约60-80个或者其中任何整数值的核苷酸或氨基酸残基的序列区域中。在一些实施方式中,同一性存在于比60-80个核苷酸或氨基酸残基更长的区域上,例如至少约80-100个核苷酸或氨基酸残基,并且在一些实施方式中,这些序列在被比较的序列(例如核苷酸序列的编码区)的全长上是基本相同的。

[0102] 本文所用的术语“保守性氨基酸取代”是指其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基替换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经定义,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸),不带电的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸), β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守性取代。优选的是,本发明的多肽和抗体的序列中的保守性取代不消除含有所述氨基酸序列的多肽或抗体与抗原的结合。鉴定不消除抗原结合的氨基酸保守性取代的方法在本领域中是公知的。

[0103] 本文所用的术语“载体”是指能够在宿主细胞中递送和通常表达一种或多种感兴趣的基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于不限于,病毒载体,裸DNA或RNA表达载体,质粒,粘粒或噬菌体载体,与阳离子缩合剂相关联的DNA或RNA表达载体,以及包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体。

[0104] 如本文所用,“分离的”的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是在自然界中未发现的形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括那些纯化程度达到不再处于在自然界中被发现时的形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。在一些实施方式中,分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物基本上是纯的。

[0105] 本文所用的术语“基本上纯的”是指至少50%纯(即,不含污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或在至少99%纯。

[0106] 本文所用的术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中的生理状况,其中细胞群体的特征在于不受调节的细胞生长。癌症的实例包括但不限于癌、母细胞瘤(blastoma)、肉瘤和血液癌,如淋巴瘤和白血病。

[0107] 本文所用的术语“增殖性障碍”和“增殖性疾病”是指与异常细胞增殖相关的疾病,例如癌症。

[0108] 本文所用的术语“肿瘤”和“瘤”是指由过度的细胞生长或增殖(良性(非癌性)或恶性(癌性))引起的任何组织块,包括癌前病变。

[0109] 本文所用的术语“转移”是指癌从原始位置扩散或转移至身体其它区域的过程,并伴随着在新位置处发生类似的癌性损伤。“转移”或“转移中”的细胞通常是与相邻细胞失去粘合接触并从疾病的原发位置迁移从而侵入相邻组织位置的细胞。

[0110] 术语“癌干细胞”和“CSC”和“肿瘤干细胞”和“肿瘤初始细胞”在本文中可互换使

用,是指来自癌症或肿瘤的细胞,其(1)具有广泛的增殖能力;2)能够不对称细胞分裂以产生一种或多种类型的分化细胞后代,其中分化细胞具有降低的增殖或发育潜能;(3)能够对称细胞分裂以自我更新或自我维护。与大多数不能形成肿瘤的肿瘤细胞相比,这些性质赋予癌干细胞在连续移植到免疫受损宿主(例如,小鼠)中形成或建立肿瘤或癌症的能力。癌干细胞以混乱的方式进行自我更新与分化,形成具有异常细胞类型的肿瘤,所述细胞类型随着突变的发生可随时间而变化。

[0111] 本文所用的术语“癌细胞”和“肿瘤细胞”是指衍生自癌症或肿瘤或癌前病变(包括非致瘤细胞)的细胞的总群体,其包含大量癌症细胞群和致瘤细胞(癌干细胞)。如本文所用,术语“癌细胞”或“肿瘤细胞”将仅在提到缺乏能够更新和分化的能力的那些细胞时被术语“非致瘤性”修饰,以将这些肿瘤细胞与癌干细胞区分。

[0112] 本文所用的术语“受试者”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物等,其将是特定治疗的接受者。通常,提到人受试者时,术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0113] 术语“药学上可接受的”是指由联邦政府、州政府的管理机构批准、和/或在美国药典或其它普遍认可的药典中列出以用于动物(包括人)的试剂、化合物、分子等。

[0114] 短语“药学上可接受的赋形剂、载剂或佐剂”和“可接受的药物载体”是指可以与治疗剂一起施用于受试者的赋形剂、载剂或佐剂,其不破坏治疗剂的药理学活性,当以足以递送治疗效果的剂量施用时是无毒的。通常,本领域技术人员和FDA认为药学上可接受的赋形剂、载剂或佐剂是任何制剂或药物组合物的无活性成分。

[0115] 本文所用的术语“有效量”和“治疗有效量”和“治疗效果”是指结合剂、抗体、多肽、多核苷酸、小分子或其它治疗剂有效治疗受试者或哺乳动物的疾病或病症的量。在癌症的情况下,治疗有效量的试剂(例如,抗体)具有治疗作用,因此可以增强免疫响应,增强抗肿瘤响应,增加免疫细胞的细胞溶解活性,减少癌细胞的数量;降低致瘤性、致瘤性频率或致瘤能力;减少癌干细胞的数量或频率;减少肿瘤尺寸;减少癌细胞群体;抑制和/或停止癌细胞浸润到周围器官,包括例如癌症扩散到软组织和骨骼中;抑制和停止肿瘤或癌细胞转移;抑制和/或停止肿瘤或癌细胞生长;在某种程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;提高生活品质;或这些效果的组合。在该试剂预防癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的情况下,其可被称为具有细胞生长抑制性和/或细胞毒性。

[0116] 术语“治疗中”和“治疗”和“待治疗”和“缓解”和“待缓解”是指1)治愈、减缓、减轻所诊断的病例状况或疾病的症状和/或停止其进展的治疗措施,2)预防或预防措施,预防或减缓目标病理状况或疾病的发展。因此,需要治疗的那些患者包括已经患有疾病的那些患者;那些倾向于具有疾病的那些患者;以及要预防其中的疾病的那些患者。在一些实施方式中,如果患者显示一种或多种以下情形,则受试者根据本发明的方法成功地得到“治疗”:增加的免疫响应,增加的抗肿瘤响应,免疫细胞的细胞溶解活性增加,免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤增加,癌细胞数量减少或完全不存在;肿瘤尺寸减少;癌细胞向外周器官的浸润(包括癌细胞向软组织和骨骼中的扩散)得到抑制或不存在;肿瘤或癌细胞转移的抑制或不存在;癌症生长的抑制或不存在;肿瘤生长的抑制或不存在;与特定癌症相关的一种或多种症状的减轻;发病率和死亡率降低;生活品质改善;致瘤性降低;癌干细胞的数量或频率的减少;或效果的一些组合。

[0117] 如本公开内容和权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。

[0118] 应当理解,每当在本文用措辞“包含”来描述实施方式时,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似实施方式。还应当理解的是,每当在本文用措辞“基本上由……组成”来描述实施方式时,还提供了以“由……组成”描述的其它类似实施方式。

[0119] 本文在诸如“A和/或B”等短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B;A或B;A(单独);以及B(单独)。类似地,在诸如“A、B和/或C”等短语中使用的术语“和/或”旨在包括以下实施方式中的每一种:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0120] 使用方法和药物组合物

[0121] 与第二试剂组合(其中第二试剂是免疫治疗剂)的本文所述的Notch途径抑制剂可用于各种应用,包括但不限于治疗性质治疗方法,例如用于癌症的免疫疗法。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与第二试剂的组合(其中第二试剂是免疫治疗剂)可用于:激活、促进、增加和/或增强免疫响应,抑制肿瘤生长,减少肿瘤体积,增加肿瘤细胞凋亡和/或降低肿瘤的致瘤性。使用方法可以是体外、离体或体内方法。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当免疫响应的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当免疫响应的增强剂、激活剂或刺激剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当抗肿瘤免疫响应的激动剂。

[0122] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当PD-1/PD-L1途径的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当PD-1或PD-1活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当PD-L1或PD-L1活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当CTLA-4途径的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当CTLA-4或CTLA-4活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当Tim-3或Tim-3活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当LAG3或LAG3活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当TIGIT或TIGIT活性的拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当KIR或KIR活性的拮抗剂。

[0123] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当CTLA-4/CD28途径的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当CD28或CD28活性的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治

疗剂的组合充当4-1BB或4-1BB活性的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当OX40或OX40活性的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当GITR或GITR活性的激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)与免疫治疗剂的组合充当CD40或CD40活性的激动剂。

[0124] 在本文所述方法的某些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括使肿瘤细胞与和有效量的第二试剂组合的有效量的Notch途径抑制剂接触,其中所述第二试剂是免疫治疗剂。所述方法可以是体内方法或体外方法。在某些实施方式中,使肿瘤细胞与Notch途径抑制剂和免疫治疗剂接触包括对受试者施用治疗有效量的各试剂。在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂,其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂,并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中,抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂,其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂,并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过抑制或阻遏Treg活性而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过抑制或阻遏MDSC活性而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加细胞溶解性细胞活性而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加CD8+细胞溶解性T细胞活性而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加NK细胞活性而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低T细胞上PD-1的表达而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低表达PD-1的T细胞的数量或百分比而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低MDSC的数量或百分比而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加激活的骨髓细胞的数量或百分比而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加记忆T细胞的数量或百分比而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加或增强Th1型免疫响应而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加IFN- γ 产生而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加IL-2产生而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低或抑制Th17免疫响应而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低IL-17产生而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低或抑制Th2型免疫响应而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低IL-6产生而抑制肿瘤生长。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0125] 在本文所述方法的某些实施方式中,治疗癌症的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂,其中所述第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中,治疗癌症的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂,其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂,并且第二试剂是免疫治疗

剂。在一些实施方式中，治疗癌症的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过抑制或阻遏Treg活性而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加细胞溶解性细胞活性而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加NK细胞活性而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加细胞溶解性T细胞活性而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加CD8+细胞溶解性T细胞活性而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低T细胞上PD-1的表达而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低表达PD-1的T细胞的数量或百分比而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低MDSC的数量或百分比而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加激活的骨髓细胞的数量或百分比而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加记忆T细胞的数量或百分比而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加或增强Th1型免疫响应而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加IFN- γ 产生而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过增加IL-2产生而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低IL-17产生而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂通过降低IL-6产生而治疗癌症。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0126] 在本文所述方法的某些实施方式中，癌症免疫疗法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂，并且其中所述组合与单独施用任一试剂相比产生增强的治疗功效。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0127] 在本文所述方法的某些实施方式中，抑制Treg活性的方法包括受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制Treg活性的方法包括受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制Treg活性的方法包括受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0128] 在本文所述方法的某些实施方式中，通过Treg对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，通过Treg对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受

试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，通过Treg对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0129] 在本文所述方法的某些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制MDSC的活性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0130] 在本文所述方法的某些实施方式中，通过MDSC对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，通过MDSC对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，通过MDSC对免疫响应阻遏的抑制的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0131] 在本文所述方法的某些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，增强对肿瘤的抗原特异性记忆响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0132] 在本文所述方法的某些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续或长期免疫响应的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，激活或增强对肿瘤的持续免疫响应的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。

量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0133] 在本文所述方法的某些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续或长期免疫性的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续免疫性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，诱导抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的持续免疫性的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0134] 在本文所述方法的某些实施方式中，抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的方法包括对受试者施用与治疗有效量的第二试剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂，其中第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，抑制肿瘤复发或肿瘤再生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的第二试剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂，并且第二试剂是免疫治疗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0135] 在本文所述方法的某些实施方式中，增加免疫检查点调节剂的功效的方法包括对受试者施用与治疗有效量的免疫检查点调节剂组合的治疗有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，增加免疫检查点抑制剂的功效的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫检查点调节剂，其中Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，增加免疫检查点抑制剂的功效的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫检查点调节剂，其中Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是免疫检查点增强剂或刺激剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0136] 在本文所述方法的某些实施方式中，增强对正在接受免疫检查点调节剂治疗的受试者的治疗方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，增强对正在接受免疫检查点调节剂治疗的受试者的治疗方法包括对受试者施用治疗有效量的DLL4拮抗剂。在某些实施方式中，增强对正在接受免疫检查点调节剂治疗的受试者的治疗方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方式中，免疫检查点抑制剂是PD-1拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点抑制剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中，免疫

检查点抑制剂是PD-L1拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点抑制剂是特异性结合PD-L1的抗体。在一些实施方式中，免疫检查点抑制剂是CTLA-4拮抗剂。在一些实施方式中，免疫检查点抑制剂是特异性结合CTLA-4的抗体。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0137] 在一些实施方式中，抑制肿瘤生长的方法包括使肿瘤或肿瘤细胞与Notch途径抑制剂(例如，DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)和免疫治疗剂在体内接触。在某些实施方式中，使肿瘤或肿瘤细胞与Notch途径抑制剂和免疫治疗剂接触在动物模型中进行。例如，可以对具有肿瘤的小鼠施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂增加、促进和/或增强小鼠中免疫细胞的活性。在一些实施方式中，对动物施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂以抑制肿瘤生长。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂在将肿瘤细胞引入动物的同时施用或者之后不久施用(预防性模型)。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂在肿瘤细胞已经建立并且生长至特定尺寸的肿瘤后施用(治疗性模型)。

[0138] 在某些实施方式中，抑制肿瘤生长的方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂(例如DLL4拮抗剂或Notch受体拮抗剂)和治疗有效量的免疫治疗剂。在某些实施方式中，受试者是人。在某些实施方式中，受试者具有肿瘤或者具有已被除去的肿瘤。在某些实施方式中，肿瘤包括癌干细胞。在某些实施方式中，在肿瘤中癌干细胞的频率通过施用Notch途径抑制剂而减少。

[0139] 本发明还提供一种减少或预防受试者中的转移的方法，所述方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，减少或预防转移包括抑制肿瘤的侵袭。在某些实施方式中，受试者是人。在某些实施方式中，受试者具有肿瘤或者具有已被除去的肿瘤。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0140] 此外，本发明还提供一种降低受试者中肿瘤的致瘤性的方法，所述方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在某些实施方式中，肿瘤包含癌干细胞。在一些实施方式中，肿瘤的致瘤性通过降低肿瘤中癌干细胞的频率而降低。在某些实施方式中，肿瘤中癌干细胞的频率通过施用Notch途径抑制剂而降低。在一些实施方式中，肿瘤的致瘤性通过诱导肿瘤细胞的凋亡而降低。在一些实施方式中，肿瘤的致瘤性通过增加肿瘤细胞的凋亡而降低。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。

[0141] 本发明还提供一种减少包含癌干细胞的肿瘤中癌干细胞频率的方法，所述方法包括对受试者施用治疗有效量的Notch途径抑制剂和治疗有效量的免疫治疗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，the Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗-DLL4抗体。在一些实施方式中，

Notch受体拮抗剂是抗-Notch2/3抗体。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗-Notch1抗体。在某些实施方式中，与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂能够减少在动物模型(例如小鼠模型)中包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性。在某些实施方式中，与未经治疗肿瘤中癌干细胞的数量和频率相比，经治疗肿瘤中癌干细胞的数量和频率减少至少约2倍、至少约3倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍或至少约1000倍。在某些实施方式中，癌干细胞的数量和频率的减少使用动物模型通过有限稀释检验而确定。

[0142] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂增强免疫治疗剂的活性。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂增强之前尚未用免疫治疗剂治疗的受试者中免疫治疗剂的活性。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂增强之前已经用免疫治疗剂治疗的受试者中免疫治疗剂的活性。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂增强抗-PD-1抗体的活性。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂增强抗-PD-L1抗体的活性。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂增强抗-PD-1抗体的活性。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂增强抗-PD-L1抗体的活性。

[0143] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂增强之前已经用免疫治疗剂治疗的受试者中免疫治疗剂的活性，其中所述受试者已经变得对所述免疫治疗剂不敏感或具有抗性。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂恢复受试者对免疫治疗剂活性的敏感性。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂恢复受试者对抗-PD-1抗体的敏感性。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂恢复受试者对抗-PD-L1抗体的敏感性。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂恢复受试者对抗-PD-1抗体的敏感性。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂恢复受试者对抗-PD-L1抗体的敏感性。

[0144] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂增加受试者对免疫治疗剂活性的敏感性。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂增加受试者对免疫治疗剂活性的敏感性，其中，已经发现受试者对免疫治疗剂不敏感。

[0145] 本发明还提供一种鉴定可能响应于与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗的人肿瘤的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括确定获自所述肿瘤的样品中PD-L1的表达水平。在一些实施方式中，鉴定可能响应于Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合治疗的人肿瘤的方法包括：a) 获得所述人肿瘤的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于所述样品中PD-L1的表达水平，将所述肿瘤鉴定为可能对Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合治疗响应或非响应。

[0146] 本发明还提供一种确定人肿瘤对与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗的响应性(或敏感性)的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 获得所述人肿瘤的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于PD-L1的表达水平，确定所述肿瘤对治疗的响应性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对DLL4拮抗剂治疗的响应性或敏感性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对与至少一种另外的治疗剂(例如，化疗剂)组合的DLL4拮抗剂治疗的响应性或敏感性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对Notch受体拮抗剂治疗的响应性或敏感性。在一些实施方式中，所述方法包括确定人肿瘤对与至少一种另外的治疗剂(例如，化疗剂)组合的Notch受体拮抗剂治疗的响应性或敏感性。

[0147] 本发明还提供一种鉴定可能响应于与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗的癌症患者的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 获得来自所述患者的样

品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和c) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定可能响应于与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂治疗的癌症患者。

[0148] 本发明还提供一种选择用与第二试剂组合的Notch途径抑制剂进行治疗的肿瘤受试者的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：a) 确定获自所述受试者的样品中PD-L1的表达水平；b) 基于所述样品中PD-L1的表达水平，将所述肿瘤鉴定为可能对用Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的治疗响应或非响应；和c) 如果所述肿瘤鉴定为可能对治疗响应，则选择所述受试者以用于治疗。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法还包括对所述受试者施用与有效量的免疫治疗剂组合的有效量的Notch途径抑制剂。

[0149] 本发明还提供一种治疗患者中的癌症的方法，所述方法包括：(a) 鉴定所述患者是否可能响应于与第二试剂组合的Notch途径抑制剂治疗，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，其中所述鉴定包括：(i) 获得来自所述患者的样品；b) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和(iii) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者；和(b) 向可能对治疗响应的患者施用与免疫治疗剂组合的有效量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定所述患者是否可能对用与另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0150] 本发明还提供一种治疗患者中的癌症的方法，所述方法包括：对所述患者施用与第二试剂的组合的有效量的Notch途径抑制剂，其中所述第二试剂是免疫治疗剂；其中基于来自所述患者的样品中PD-L1的表达水平，预测所述患者对用Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂治疗响应。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，预测所述患者对与化疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂治疗响应。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0151] 本发明还提供一种增加与第二试剂组合的Notch途径抑制剂的有效治疗的可能性的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：(a) 鉴定患者是否具有可能对Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂治疗响应的肿瘤，其中所述鉴定包括(i) 获得来自所述患者的样品；ii) 测量所述样品中PD-L1的表达水平；和(iii) 基于PD-L1的表达水平，鉴定可能对治疗响应的患者；和(b) 对所述患者施用有效量的Notch途径抑制剂与免疫治疗剂的组合。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述方法包括鉴定患者是否具有可能对与化疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应的肿瘤。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0152] 本发明还提供一种增加与第二试剂组合的Notch途径抑制剂的有效治疗的可能性的方法，其中所述第二试剂是免疫治疗剂，所述方法包括：对患者施用有效量的Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂；其中基于样品中PD-L1的表达水平将患者鉴定为可能对Notch途

径抑制剂和/或免疫治疗剂治疗响应。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述患者鉴定为可能对与化疗剂组合的Notch途径抑制剂治疗响应。在一些实施方式中，所述方法包括对所述患者施用与至少一种另外的治疗剂组合的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。

[0153] 在本文所述方法的一些实施方式中，所述样品是生物活组织检查样品。在一些实施方式中，所述样品是血液或血浆样品。在一些实施方式中，所述样品是肿瘤样品。在一些实施方式中，所述样品包含肿瘤细胞、肿瘤浸润免疫细胞、基质细胞和它们的任意组合。在一些实施方式中，样品是福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)样品。在一些实施方式中，样品是存档的(archival)、新鲜的或冷冻的组织。在一些实施方式中，将样品中PD-L1的表达水平与PD-L1的预定表达水平进行比较。在一些实施方式中，PD-L1表达的预定表达水平是参照肿瘤样品、参照正常组织样品、一系列参照肿瘤样品或一系列参照正常组织样品中PD-L1的表达水平。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用免疫组织化学(IHC)检验确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用包含H-评分的检验确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用ELISA确定。在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用基于PCR的检验确定。

[0154] 在一些实施方式中，PD-L1的表达水平使用特异性结合PD-L1的抗体确定。在一些实施方式中，特异性结合人PD-L1的抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、小鼠抗体、兔抗体、大鼠抗体或包含抗原结点位点的抗体片段。

[0155] 在一些实施方式中，在肿瘤细胞上检测PD-L1。在一些实施方式中，在肿瘤浸润免疫细胞上检测PD-L1。在一些实施方式中，肿瘤浸润免疫细胞是淋巴细胞。在一些实施方式中，肿瘤浸润免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中，在抗原呈递细胞(APC)上检测PD-L1。在一些实施方式中，在巨噬细胞和/或树突细胞上检测PD-L1。在一些实施方式中，APC、巨噬细胞和/或树突细胞在肿瘤微环境内。

[0156] 在本文所述方法的一些实施方式中，肿瘤是选自由以下组成的组中的肿瘤：肺癌、胰腺瘤、乳腺瘤、结肠瘤、结肠直肠瘤、黑色素瘤、胃肠瘤、胃肿瘤、肾肿瘤、卵巢瘤、肝瘤、子宫内膜瘤、肾瘤、前列腺瘤、甲状腺瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、子宫颈瘤、胃瘤、膀胱瘤、头颈瘤、以及肝细胞瘤。在某些实施方式中，肿瘤是乳腺瘤。在某些实施方式中，肿瘤是三阴性乳腺瘤。在一些实施方式中，肿瘤是卵巢瘤。在某些实施方式中，肿瘤是肺癌。在某些实施方式中，肿瘤是非小细胞肺癌。在某些实施方式中，肿瘤是小细胞肺癌。在某些实施方式中，肿瘤是胰腺瘤。在一些实施方式中，肿瘤是肾瘤。在一些实施方式中，肾瘤是肾细胞癌。在一些实施方式中，肿瘤表达PD-L1。在一些实施方式中，肿瘤过表达PD-L1。在一些实施方式中，肿瘤表达PD-L2。在一些实施方式中，肿瘤过表达PD-L2。在一些实施方式中，与预定水平相比，肿瘤具有增加的PD-L1表达水平。PD-L1表达的“预定水平”是在正常免疫细胞中PD-L1的表达量。在一些实施方式中，PD-L1表达的“预定水平”是在正常组织中PD-L1的表达量。在一些实施方式中，PD-L1表达的“预定水平”是在相似的肿瘤类型中PD-L1的表达量。在一些实施方式中，PD-L1表达的“预定水平”是肿瘤类型的混合物中PD-L1的表达量。

[0157] 在本文所述方法的一些实施方式中，癌症是选自由以下组成的组中的癌症：肺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、胃肠癌、胃癌症、肾癌症、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成

胶质细胞瘤、子宫颈癌、胃癌、膀胱癌、头颈癌、以及肝细胞瘤。在一些实施方式中，癌症是肺癌。在一些实施方式中，癌症是卵巢癌。

[0158] 在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是抗体。在一些实施方式中，所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中，所述抗体是人源化抗体。在一些实施方式中，所述抗体是重组抗体、嵌合抗体、人抗体或者包含抗原结合位点的抗体片段。在一些实施方式中，所述抗体是单特异性抗体。在一些实施方式中，所述抗体是双特异性抗体。在一些实施方式中，所述抗体是IgG1抗体。在一些实施方式中，所述抗体是IgG2抗体。在一些实施方式中，所述抗体是IgG4抗体。

[0159] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的胞外域的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的胞外域的27-217位氨基酸(SEQ ID NO:17)内的表位的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合在人DLL4的N末端区(SEQ ID NO:14)内的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)的表位的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合包含人DLL4的139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)和139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位的抗体。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是以约10nM~约0.1nM的解离常数(K_d)结合人DLL4的抗体。

[0160] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体，其中所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISCYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2)、YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 或YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3；和/或含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体，其中所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3；以及含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。

[0161] 在本文所述方法的某些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体，其中所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3；以及含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3，并且与免疫治疗剂组合施用。在一些实施方式中，免疫治疗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中，免疫治疗剂是特异性结合PD-L1的抗体。

[0162] 在本文所述任何方法的某些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的重链可变区，和/或与SEQ ID NO:12具有至少约

90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体包含与SEQ ID NO:10具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区,和与SEQ ID NO:12具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。

[0163] 在本文所述方法的一些实施方式中,Notch途径抑制剂是双特异性抗体,其中双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。

[0164] 在本文所述方法的某些实施方式中,Notch途径抑制剂是双特异性抗体,其中双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3,并且与免疫治疗剂组合施用。在一些实施方式中,免疫治疗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中,免疫治疗剂是特异性结合PD-L1的抗体。

[0165] 在本文所述任何方法的某些实施方式中,Notch途径抑制剂是双特异性抗体,其中所述双特异性抗体包含特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含SEQ ID NO:30的第一重链可变区,所述第二抗原结合位点包含SEQ ID NO:29的第二重链可变区,并且其中所述第一和第二抗原结合位点包含SEQ ID NO:12的第一和第二轻链可变区。

[0166] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是双特异性抗体305B83。

[0167] 在本文所述任何方法的某些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是PD-1拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是PD-L1拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是PD-L2拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CTLA-4拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD80拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD86拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是KIR拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂

是Tim-3拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是LAG3拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是TIGIT拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD96拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是IDO1拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD28激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是4-1BB激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是OX40激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD27激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD80激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD86激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是CD40激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是GITR激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是细胞因子。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是干扰素。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人DLL4的抗体,并且免疫治疗剂是淋巴因子。

[0168] 在本文所述方法的一些实施方式中,Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1、Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和Notch3的抗体。

[0169] 在本文所述方法的一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的胞外域的抗体,其中所述抗体包含含有SSSGMS (SEQ ID NO:34) 的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35) 的重链CDR2和含有SIFYTT (SEQ ID NO:36) 的重链CDR3;和/或含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:38) 的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体包含含有SSSGMS (SEQ ID NO:34) 的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35) 的重链CDR2和含有SIFYTT (SEQ ID NO:36) 的重链CDR3;以及含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:38) 的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) 的轻链CDR3。

[0170] 在本文所述方法的某些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体,其中所述抗体包含含有SSSGMS (SEQ ID NO:34) 的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35) 的重链CDR2和含有SIFYTT (SEQ ID NO:36) 的重链CDR3;和/或含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:38) 的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) 的轻链CDR3,并且与免疫治疗剂组合施用。在一些实施方式中,免疫治疗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中,免疫治疗剂是特异性结合PD-L1的抗体。

[0171] 在本文所述任何方法的某些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人

Notch2和/或Notch3的抗体，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的重链可变区，和/或与SEQ ID NO:41具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区，和与SEQ ID NO:41具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体包含含有SEQ ID NO:40的重链可变区和含有SEQ ID NO:41的轻链可变区。

[0172] 在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是抗体他瑞妥单抗(OMP-59R5)。

[0173] 在本文所述任何方法的某些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是PD-1拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是PD-L1拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是PD-L2拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CTLA-4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD80拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD86拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是KIR拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是Tim-3拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是LAG3拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是TIGIT拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD96拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是IDO1拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD28激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是4-1BB激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是OX40激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD27激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD80激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD86激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是CD40激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是GITR激动剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是细胞因子。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是干扰素。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是淋巴因子。

[0174] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的

抗体，其中所述抗体包含含有RGYWIE (SEQ ID NO:46) 的重链CDR1、含有QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47) 的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48) 的重链CDR3；和/或含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3。在一些实施方式中，所述抗体包含含有RGYWIE (SEQ ID NO:46) 的重链CDR1、含有QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47) 的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48) 的重链CDR3；以及含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3。

[0175] 在本文所述方法的某些实施方式中，Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的抗体，其中所述抗体包含含有RGYWIE (SEQ ID NO:46) 的重链CDR1、含有QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47) 的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48) 的重链CDR3；以及含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3，并且与免疫治疗剂组合施用。在一些实施方式中，免疫治疗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中，免疫治疗剂是特异性结合PD-L1的抗体。

[0176] 在本文所述任何方法的某些实施方式中，Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的抗体，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的重链可变区，和/或与SEQ ID NO:53具有至少约90%、至少约95%或100%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区，和与SEQ ID NO:53具有至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在一些实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体包含含有SEQ ID NO:52的重链可变区和含有SEQ ID NO:53的轻链可变区。

[0177] 在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是抗体博尼替妥珠单抗(brontictuzumab) (OMP-52M51)。

[0178] 在本文所述任何方法的某些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是PD-1拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是PD-L1拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是PD-L2拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是CTLA-4拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是CD80拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是CD86拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是KIR拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是Tim-3拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体，并且免疫治疗剂是LAG3拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是TIGIT拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗剂是CD96拮抗剂。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体，并且免疫治疗

剂是ID01拮抗剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是CD28激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是4-1BB激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是OX40激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是CD27激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是CD80激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是CD86激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是CD40激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是GITR激动剂。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是细胞因子。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是干扰素。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是特异性结合人Notch1的抗体,并且免疫治疗剂是淋巴因子。

[0179] 本发明还提供包含Notch途径抑制剂的组合物和包含免疫治疗剂的组合物。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的DLL4拮抗剂。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的特异性结合DLL4的抗体。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的特异性结合Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的特异性结合Notch1的抗体。在一些实施方式中,组合物包含本文所述的免疫治疗剂。

[0180] 在一些实施方式中,组合物是包含Notch途径抑制剂和药学上可接受的载剂的药物组合物。在一些实施方式中,组合物是包含免疫治疗剂和药学上可接受的载剂的药物组合物。所述药物组合物用于调节人患者中的免疫响应,特别是对肿瘤的免疫响应。所示药物组合物用于抑制人患者中的肿瘤细胞生长。所述药物组合物用于治疗人患者中的癌症。所示药物组合物用于本文所述的任何方法。在一些实施方式中,发现本文所述的Notch途径抑制剂用于与至少一种免疫治疗剂组合制造用于治疗癌症的药物。在一些实施方式中,发现本文所述的DLL4拮抗剂用于与至少一种免疫治疗剂组合制造用于治疗癌症的药物。在一些实施方式中,发现本文所述的Notch受体拮抗剂用于与至少一种免疫治疗剂组合制造用于治疗癌症的药物。

[0181] 通过将本发明的治疗剂与药学上可接受的载剂、赋形剂和/或稳定剂组合为灭菌冻干粉末、水性溶液等,而制备制剂和/或药物组合物以用于贮存和使用(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第22^版, 2012, Pharmaceutical Press, London)。本领域技术人员通常认为药学上可接受的载剂、赋形剂和/或稳定剂是制剂和/或药物组合物的非活性成分。

[0182] 合适的载剂、赋形剂或稳定剂包括无毒缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;盐,例如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁基醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽(如小于约10个氨基酸残基);蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨

酸、精氨酸或赖氨酸；糖，例如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇，海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，例如钠；金属络合物（例如Zn-蛋白络合物）；和/或非离子性表面活性剂，例如聚山梨醇酯（TWEEN）或聚乙二醇（PEG）。

[0183] 治疗性制剂可以是单位剂型。此类制剂包括在片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂、颗粒剂、水性或非性水介质中的溶液或悬浮液、或栓剂，用于口服、肠胃外或直肠施用或通过吸入施用。在固体组合物如片剂中，主要活性成分与药物载体混合。如本文所述，药物载体被认为是制剂或组合物的非活性成分。常规压片成分包括玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶，以及其他稀释剂（例如水），以形成含有本发明化合物或其无毒的药学上可接受的盐的均匀混合物的固体预制剂组合物。然后将固体预制剂组合物分成上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂、丸剂等可以被包衣或以其它方式复合以提供具有延长作用的优点的剂型。例如，片剂或丸剂可以包含被外部组分覆盖的内部组合物。此外，两种组分可以被肠溶层分开，肠溶层用于抵抗崩解并允许内部组分完整地通过胃部或延迟释放。对于此类肠溶层或涂层可以使用各种材料，包括许多聚合酸，以及聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素等材料的混合物。

[0184] 药物制剂可以包括与脂质体复合的本发明的Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂。脂质体可以通过脂质组合物的反相蒸发来产生，所述脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）。通过规定孔径的过滤器挤出脂质体以产生具有所需直径的脂质体。

[0185] Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂也可以包裹在微胶囊中。此类微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备，例如分别在胶体药物递送系统（例如，脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊）中或在Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第22版, 2012, Pharmaceutical Press, London中所述的大乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-（甲基丙烯酸甲酯）

[0186] 此外，可以制备包含Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂的缓释制品。缓释制品的合适实例包括含有所述试剂的固体疏水性聚合物的半透性基质，所述基质为成型品的形式（例如，膜或微胶囊）。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶如聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或聚（乙烯醇）、聚丙交酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸7乙酯的共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物如LUPRON DEPOT TM（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体）、异丁酸蔗糖乙酸酯和聚-D-（-）-3-羟基丁酸。

[0187] Notch途径抑制剂和免疫治疗剂可以作为合适的药物组合物根据已知的方法施用至人患者。药物组合物可以以任何数量的方式施用以用于局部或全身治疗。合适的施用方法包括但不限于静脉内（作为推注施用或者通过连续输注一段时间施用）、动脉内、肌内（注射或输注）、肿瘤内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、颅内（例如，鞘内或室内）或口服。另外，施用可以是局部的（例如透皮贴剂、软膏、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂）或肺部（例如通过吸入或吹入粉末或气溶胶，包括通过喷雾器；气管内、鼻内、表皮和透皮）。

[0188] 对于疾病的治疗，本发明与免疫治疗剂的组合的Notch途径抑制剂的适当剂量取决于待治疗的疾病的类型、疾病的严重性和病程、疾病的响应性、抑制剂是用于治疗还是预防目的施用、以前的治疗、患者的临床病史等，都由治疗医师酌情决定。Notch途径抑制剂可

以一次施用或作为分散在数天至数月里的一系列治疗而施用,或直到实现治愈或达到减缓疾病状态(例如,肿瘤尺寸的减少)。免疫治疗剂可以一次施用或作为分散在数天至数月里的一系列治疗而施用,或直到实现治愈或达到减缓疾病状态(例如,肿瘤尺寸的减少)。各试剂的最佳给药方案可以根据患者体内的药物积累的测量计算,并且将根据个体药物的相对效力而变化。施用医师可以确定最佳剂量、给药方法和重复速率。

[0189] 在一些实施方式中,组合施用包括在单一药物制剂中共施用。在一些实施方式中,组合施用包括以任何顺序使用分开的制剂和连续施用,但通常在一段时间内,使所有活性剂可以同时发挥其作用。在一些实施方式中,组合施用包括使用分开的制剂和交错的给药方案。在一些实施方式中,组合施用包括以特定的顺序使用分开的制剂和施用。在一些实施方式中,组合施用包括使用分开的制剂和以特定顺序和交错给药方案施用试剂。

[0190] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.01 μ g~约100mg/kg体重,约0.1 μ g~约100mg/kg体重,约1 μ g~约100mg/kg体重,约1mg~约100mg/kg体重,约1mg~约80mg/kg体重,约10mg~约100mg/kg体重,约10mg~约75mg/kg体重,或约10mg~约50mg/kg体重。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.01mg~约10mg/kg体重。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.01mg~约5mg/kg体重。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.05mg~约5mg/kg体重。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.1mg~约20mg/kg体重。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂的剂量为约0.5mg~约10mg/kg体重。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂以约2mg/kg~约15mg/kg的剂量施用至受试者。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂以约5mg/kg~约15mg/kg的剂量施用至受试者。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂每天、每周、每月或每年施用一次以上。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂每周施用一次。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂每两周施用一次。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂每三周施用一次。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂每四周施用一次。

[0191] 在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约0.01 μ g~约100mg/kg体重,约0.1 μ g~约100mg/kg体重,约1 μ g~约100mg/kg体重,约1mg~约100mg/kg体重,约1mg~约80mg/kg体重,约10mg~约100mg/kg体重,约10mg~约75mg/kg体重,或约10mg~约50mg/kg体重。在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约0.01mg~约10mg/kg体重。在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约0.01mg~约5mg/kg体重。在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约0.05mg~约10mg/kg体重。在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约0.1mg~约20mg/kg体重。在某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约2mg~约15mg/kg体重。某些实施方式中,免疫治疗剂的剂量为约5mg~约15mg/kg体重。在一些实施方式中,免疫治疗剂每天、每周、每月或每年施用一次以上。在某些实施方式中,免疫治疗剂每周施用2次。在某些实施方式中,免疫治疗剂每隔一周施用一次。在某些实施方式中,免疫治疗剂每两周施用一次。在某些实施方式中,免疫治疗剂每三周施用一次。在某些实施方式中,免疫治疗剂每四周施用一次。

[0192] 在一些实施方式中,免疫治疗剂的剂量由本领域技术人员(例如,治疗医师)认为的特定药剂的“护理标准”确定。

[0193] 在一些实施方式中,抑制剂可以以最初较高的“负荷”剂量施用,其次是一个或多个较低剂量。在一些实施方式中,施用频率也可以改变。在一些实施方式中,给药方案可以包括施用初始剂量,随后是每周一次,每两周一次,每三周一次或每月一次的补充剂量(或

“维持”剂量)。例如,给药方案可以包括施用初始负荷剂量,然后是每周维持剂量,例如,初始剂量的一半。或者给药方案可以包括施用初始负荷剂量,然后维持剂量,例如每隔一周施用初始剂量的一半。或者给药方案可以包括3周施用三个初始剂量,然后维持剂量,例如每隔一周相同量的维持剂量。

[0194] 如本领域技术人员已知的,任何治疗剂的施用都可能导致副作用和/或毒性。在一些情况下,副作用和/或毒性非常严重,以致于排除以治疗有效剂量施用特定试剂。在一些情况下,必须停止药物治疗,并且可以尝试其它药物。然而,相同治疗类别中的许多试剂经常显示类似的副作用和/或毒性,意味着患者必须停止治疗,或者如果可能,遭受与治疗剂相关的不愉快的副作用。

[0195] 本发明提供治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括使用用于施用两种以上可减少与Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂的施用相关的副作用和/或毒性的试剂的给药策略。在一些实施方式中,用于治疗人受试者中的癌症的方法包括对受试者施用治疗有效剂量的Notch途径抑制剂与治疗有效剂量的免疫治疗剂的组合,其中根据间歇给药策略施用一种或两种抑制剂。在一些实施方式中,间歇给药策略包括对受试者施用初始剂量的Notch途径抑制剂,并且约每2周一次施用后续剂量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中,间歇给药策略包括对受试者施用初始剂量的Notch途径抑制剂,并且约每3周一次施用后续剂量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中,间歇给药策略包括对受试者施用初始剂量的Notch途径抑制剂,并且约每4周一次施用后续剂量的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中,使用间歇给药策略施用Notch途径抑制剂,并且每周一次、每两周一次或每三周一次施用免疫治疗剂。

[0196] 组合疗法与两种以上治疗剂通常使用通过不同作用机制起作用的试剂,尽管不是必需的。使用具有不同作用机制的试剂的组合疗法可以产生加成或协同效应。组合疗法可允许各试剂的剂量低于单一疗法中使用的剂量,从而减少毒副作用和/或增加试剂的治疗指数。组合疗法可降低耐性癌细胞发展的可能性。包含免疫治疗剂的组合疗法可以允许一种试剂增强对肿瘤或肿瘤细胞的免疫响应,而第二试剂可以更直接地有效杀死肿瘤细胞。

[0197] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂的组合产生了加成或协同的结果。在一些实施方式中,组合疗法导致Notch途径抑制剂的治疗指数增加。在一些实施方式中,组合疗法导致免疫治疗剂的治疗指数增加。在一些实施方式中,组合疗法导致Notch途径抑制剂的毒性和/或副作用降低。在一些实施方式中,组合疗法导致免疫治疗剂的毒性和/或副作用降低。

[0198] 治疗医师可以基于测量的体液或组织中的药物的停留时间和浓度来估计重复给药速率。可以通过常规技术和检验来监测疗法的进展。

[0199] 在某些实施方式中,除了与免疫治疗剂组合施用Notch途径抑制剂之外,治疗方法还可以包括在施用Notch途径抑制剂和/或免疫治疗剂之前、同时和/或之后施用至少一种另外的治疗剂。

[0200] 在一些实施方式中,另外的治疗剂将与Notch途径抑制剂或免疫治疗剂基本上同时或并行施用。例如,在用另外的治疗剂(例如,化疗剂)进行治疗过程的同时,可以给予受试者Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂将在用另外的治疗剂治疗1年内施用。在某些替代实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治

疗剂将在用另外的治疗剂进行任何治疗的10、8、6、4或2个月内施用。在某些其它实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂将在用另外的治疗剂进行任何治疗的4、3、2或1周内施用。在一些实施方式中,Notch途径抑制剂和免疫治疗剂将在用另外的治疗剂进行任何治疗的5、4、3、2或1天内施用。还将进一步了解,所述试剂或治疗可以在数小时或数分钟内(即基本上同时)与Notch途径抑制剂或免疫治疗剂一起对受试者施用。

[0201] 可以与Notch途径抑制剂和免疫治疗剂组合施用的治疗剂包括化疗剂。因此,在一些实施方式中,该方法或治疗包括与化疗剂或多种不同化疗剂的混合物(cocktail)组合施用本发明的Notch途径抑制剂和免疫治疗剂。使用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂进行治疗可以在化学疗法之前、同时或之后发生。此类化疗剂的制备和给药方案可以根据制造商的说明来使用或由本领域技术人员凭经验确定。此类化学疗法的制备和给药方案也描述于Chemotherapy Service, 1992, M.C.Perry, Editor, Williams&Wilkins, Baltimore, MD。

[0202] 用于本发明的化学治疗剂包括但不限于:烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡;氮丙啶,例如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌;乙烯亚胺类和甲基蜜胺类,包括六甲蜜胺、三乙烯蜜胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;氮芥类,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯代磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,例如阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博莱霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡拉比星(carabacin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢药,例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素类,例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;安吖啶;贝塔布新(bestrabucil);比生群;依达曲沙;地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;地吖啶;依氟鸟氨酸(el fornithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;硝氨丙吖啶;喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基肼;丙卡巴肼;PSK;丙亚胺;西佐非兰;堵螺胺;替奴佐酸;三亚胺醍;2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;盖拓新(gacytosine);阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物或铂络合物,例如顺铂和卡铂;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;诺消灵;替尼泊苷;柔红霉素;氨喋呤;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯波霉素;卡培他滨(XELODA);和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化疗剂还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,例如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制4(5)-咪唑的芳香酶、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、盐酸雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮

和托瑞米芬；以及抗雄激素，例如氟他胺、尼鲁替胺、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0203] 在某些实施方式中，化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶酶（例如，拓扑异构酶I或II）的作用的化疗剂。拓扑异构酶抑制剂包括但不限于盐酸多柔比星、柠檬酸柔红霉素、盐酸米托蒽醌、放线菌素D、依托泊苷、盐酸托泊替康、替尼泊苷（VM-26）和伊立替康。

[0204] 在某些实施方式中，化学治疗剂是抗代谢剂。抗代谢剂是这样的化学物质：结构与正常生物化学反应所需的代谢物相似，但足够不同从而干扰细胞的一种或多种功能，例如细胞分裂。抗代谢剂包括但不限于吉西他滨、氟尿嘧啶、卡培他滨、甲氨蝶呤钠、雷替曲塞、培美曲塞、替加氟、阿糖胞苷、硫鸟嘌呤、5-氮杂胞苷、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤、6-硫鸟嘌呤、喷司他丁、氟达拉滨磷酸盐和克拉屈滨，以及任何这些的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0205] 在某些实施方式中，化疗剂是抗有丝分裂剂，包括但不限于结合微管蛋白的试剂。在一些实施方式中，所述试剂是紫杉烷。在某些实施方式中，所述试剂是紫杉醇或多西他赛，或者紫杉醇或多西他赛的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方式中，所述试剂为紫杉醇（TAXOL）、多西他赛（TAXOTERE）、白蛋白结合紫杉醇（nab-paclitaxel；ABRAXANE），DHA-紫杉醇或PG-紫杉醇。在某些替代实施方式中，抗有丝分裂剂包含长春花生物碱，例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨或长春地辛，或者其药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中，抗有丝分裂剂是驱动蛋白Eg5的抑制剂或有丝分裂激酶的抑制剂，如Aurora A或Plk1。

[0206] 在一些实施方式中，DLL4拮抗剂与免疫检查点抑制剂和至少一种化疗剂组合施用。在一些实施方式中，抗-DLL4抗体与抗-PD-1抗体和至少一种化疗剂组合施用。在一些实施方式中，登西珠单抗与派姆单抗和至少一种化疗剂组合施用。在一些实施方式中，登西珠单抗与派姆单抗、卡铂和培美曲塞组合施用。在一些实施方式中，登西珠单抗与派姆单抗、卡铂和培美曲塞组合施用以治疗肺癌。在一些实施方式中，登西珠单抗与派姆单抗、卡铂和培美曲塞组合施用以治疗NSCLC。在一些实施方式中，登西珠单抗与尼莫单抗（nivolumab）和至少一种化疗剂组合施用。在一些实施方式中，登西珠单抗与尼莫单抗、卡铂和培美曲塞组合施用。在一些实施方式中，登西珠单抗与尼莫单抗、卡铂和培美曲塞组合施用以治疗肺癌。在一些实施方式中，登西珠单抗与尼莫单抗、卡铂和培美曲塞组合施用以治疗NSCLC。

[0207] 在一些实施方式中，可以与Notch途径抑制剂和免疫治疗剂组合施用的另外的治疗剂是诸如小分子等试剂。例如，治疗可以包括组合施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与充当针对肿瘤相关蛋白的抑制剂的小分子，所述肿瘤相关蛋白包括但不限于EGFR、HER2（ErbB2）和/或VEGF。在一些实施方式中，Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与蛋白激酶抑制剂组合施用，所述蛋白激酶抑制剂选自由下述组成的组：吉非替尼（IRESSA）、厄洛替尼（erlotinib）（TARCEVA）、舒尼替尼（SUTENT）、拉帕替尼、凡德他尼（ZACTIMA）、AEE788、CI-1033、塞地兰尼（cediranib）（RECENTIN）、索拉非尼（NEXAVAR）、迈瑞替尼（merefinib）（AZD9291）和帕唑帕尼（GW786034B）。在一些实施方式中，另外的治疗剂包含mTOR抑制剂。

[0208] 在一些实施方式中，另外的治疗剂包括生物分子，例如抗体。例如，治疗可以涉及组合施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与抗肿瘤相关蛋白的抗体，例如，但不限于，结合EGFR、HER2/ErbB2和/或VEGF的抗体。在某些实施方式中，另外的治疗剂是对癌干细胞标记

物特异的抗体。在某些实施方式中，另外的治疗剂是抑制癌干细胞途径的抗体。在某些实施方式中，另外的治疗剂是血管发生抑制剂(例如，抗-VEGF或VEGF受体抗体)。在某些实施方式中，另外的治疗剂是贝伐珠单抗(AVASTIN)、雷莫芦单抗、曲妥珠单抗(HERCEPTIN)、帕妥珠单抗(OMNITARG)、帕尼单抗(VECTIBIX)、尼妥珠单抗、扎芦木单抗或西妥昔单抗(ERBITUX)。

[0209] 此外，治疗可以涉及组合施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与其它生物分子，例如一种或多种细胞因子(例如淋巴因子、白介素、肿瘤坏死因子和/或生长因子)，或者可以伴随外科手术去除肿瘤、去除癌细胞或治疗医师认为必要的任何其它疗法。

[0210] 在一些实施方式中，治疗可以涉及组合施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与生长因子，所述生长因子选自由下述组成的组，但不限于其：肾上腺髓质素(AM)、血管生成素(Ang)、BMP、BDNF、EGF、促红细胞生成素(EPO)、FGF、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GDF9、HGF、HDGF、IGF、迁移刺激因子、肌生长抑制素(GDF-8)、NGF、神经营养蛋白、血小板生成素、TGF- α 、TGF- β 、TNF- α 、VEGF、PIGF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15和IL-18。

[0211] 在某些实施方式中，治疗可以涉及组合施用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂与放射疗法。用Notch途径抑制剂和免疫治疗剂进行的治疗可以在施用放射疗法之前、同时或之后进行。此类放射疗法的给药方案可由熟练的医学从业者确定。

[0212] Notch途径抑制剂

[0213] 本发明提供与第二试剂组合的本文所述的Notch途径抑制剂，其用于调节免疫应答的方法，用于抑制肿瘤生长的方法，和/或用于治疗癌症的方法，其中第二试剂是免疫治疗剂。

[0214] 在本文所述方法的一些实施方式中，Notch途径抑制剂是DLL4拮抗剂。DLL4拮抗剂在本文也可称为“DLL4结合剂”。在某些实施方式中，DLL4结合剂特异性结合人DLL4。在某些实施方式中，除了特异性结合DLL4之外，DLL4结合剂特异性结合至少一种另外的靶标或抗原。在一些实施方式中，DLL4结合剂是多肽。在一些实施方式中，DLL4结合剂是抗体。在某些实施方式中，DLL4结合剂是双特异性抗体。在某些实施方式中，DLL4结合剂是异二聚双特异性分子。在一些实施方式中，DLL4结合剂是同二聚双特异性分子。在一些实施方式中，DLL4结合剂是包含DLL4结合剂和免疫治疗剂的双功能分子。

[0215] 在某些实施方式中，DLL4拮抗剂特异性结合人DLL4的胞外域。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是抗体。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂特异性结合人DLL4的胞外域的27-217位氨基酸(SEQ ID NO:17)内的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂特异性结合在人DLL4的N末端区(SEQ ID NO:14)内。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂结合包含人DLL4的66-73位氨基酸(QAVVSPGP, SEQ ID NO:18)和139-146位氨基酸(LISKIAIQ, SEQ ID NO:19)的表位。

[0216] 在某些实施方式中，DLL4拮抗剂(例如，抗体)结合人DLL4的解离常数(K_D)为约1 μ M以下、约100nM以下、约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中，DLL4拮抗剂结合人DLL4的 K_D 为约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中，DLL4拮抗剂结合人DLL4的 K_D 为约1nM。在某些实施方式中，DLL4拮抗剂结合

人DLL4的 K_D 为约0.8nM。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂结合人DLL4的 K_D 为约0.6nM。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂结合人DLL4的 K_D 为约0.5nM。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂结合人DLL4的 K_D 为约0.4nM。在一些实施方式中,所述 K_D 通过表面等离子共振测量。在一些实施方式中,拮抗剂与DLL4的解离常数是使用固定在Biacore芯片上、包含DLL4胞外域的DLL4融合蛋白(例如,DLL4ECD-Fc融合蛋白)确定的解离常数。

[0217] 在某些实施方式中,DLL4拮抗剂(例如,抗体)结合DLL4的半最大有效浓度(EC_{50})为约1μM以下、约100nM以下、约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂结合人DLL4的 EC_{50} 为约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。

[0218] 在本文所述方法的一些实施方式中,Notch途径抑制剂是Notch受体拮抗剂。Notch受体拮抗剂在本文也可称为“Notch结合剂”。在某些实施方式中,Notch结合剂特异性结合人Notch1、Notch2和/或Notch3。在某些实施方式中,除了特异性结合至少一种Notch受体之外,Notch结合剂特异性结合至少一种另外的靶标或抗原。在一些实施方式中,Notch结合剂是多肽。在一些实施方式中,Notch结合剂是抗体。在某些实施方式中,Notch结合剂是双特异性抗体。在某些实施方式中,Notch结合剂是异二聚双特异性分子。在一些实施方式中,Notch结合剂是同二聚双特异性分子。在一些实施方式中,Notch结合剂是包含Notch结合剂和免疫治疗剂的双功能分子。

[0219] 在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂特异性结合人Notch1、Notch2和/或Notch3。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂特异性结合人Notch1。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂特异性结合人Notch2和/或Notch3。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂特异性结合人Notch2和Notch3。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体。

[0220] 在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂(例如,抗体)结合一种或多种人Notch受体的解离常数(K_D)为约1μM以下、约100nM以下、约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约1nM。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约0.8nM。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约0.6nM。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约0.5nM。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 K_D 为约0.4nM。在一些实施方式中,所述 K_D 通过表面等离子共振测量。在一些实施方式中,拮抗剂或抗体与一种或多种人Notch受体的解离常数是使用固定在Biacore芯片上、包含Notch受体胞外域的Notch融合蛋白(例如,Notch2ECD-Fc融合蛋白)确定的解离常数。

[0221] 在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂(例如,抗体)结合一种或多种人Notch受体的半最大有效浓度(EC_{50})为约1μM以下、约100nM以下、约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂结合一种或多种人Notch受体的 EC_{50} 为约40nM以下、约20nM以下、约10nM以下或约1nM以下。

[0222] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是多肽。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是抗体。在某些实施方式中,所述抗体是IgG抗体。在一些实施方式中所述抗体是IgG1抗体。在一些实施方式中,所述抗体是IgG2抗体。在一些实施方式中,所述抗体是IgG4抗体。在

某些实施方式中，所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中，所述抗体是双特异性抗体。在某些实施方式中，所述抗体是人源化抗体。在某些实施方式中，所述抗体是人抗体。在某些实施方式中，所述抗体是包含抗原结合位点的抗体片段。

[0223] 可以通过本领域已知的任何方法测定本发明的Notch途径抑制剂(例如，抗体)的特异性结合。可以使用的免疫检验包括但不限于：竞争性和非竞争性检验系统，其使用下述技术，例如Biacore分析，FACS分析，免疫荧光，免疫细胞化学，蛋白质印迹分析，放射免疫测定，ELISA，“夹心”免疫检验，免疫沉淀检验，沉淀反应，凝胶扩散沉淀素反应，免疫扩散检验，凝集检验，补体固定检验，免疫放射检验，荧光免疫测定和蛋白A免疫检验。这些检验是本领域常规的和已知的(例如，参见Ausubel等，Editors, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., New York, NY)。

[0224] 在非限制性实例中，可以使用ELISA确定DLL4拮抗剂(例如抗体)与人DLL4的特异性结合。ELISA检验包括制备DLL4抗原，用抗原包被96孔微量滴定板，向所述孔添加与可检测化合物如酶底物(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)缀合的DLL4拮抗剂或抗体，温育一段时间并检测结合剂或抗体的存在。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂或抗体不与可检测化合物缀合，而是将识别DLL4拮抗剂或抗体的第二缀合抗体添加到孔中。在一些实施方式中，作为对用DLL4抗原包被所述孔的替代方式，可以将DLL4拮抗剂或抗体包被在孔中，将抗原加入到包被的孔中，然后加入与可检测化合物缀合的第二抗体。本领域技术人员了解可以修改和/或优化以增加检测信号的参数，以及可以使用的其它ELISA变体(参见例如Ausubel等，Editors, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons, Inc., New York, NY)。

[0225] 在备选非限制性实例中，可以使用FACS确定DLL4拮抗剂(例如，抗体)与人DLL4的特异性结合。FACS筛选检验可以包括：产生表达抗原作为融合蛋白的cDNA构建体，将所述构建体转染到细胞中，在细胞表面上表达所述抗原，将DLL4拮抗剂与转染细胞混合，并温育一段时间。被DLL4拮抗剂结合的细胞可以通过使用与可检测化合物缀合的第二抗体(例如，PE-缀合的抗-Fc抗体)和流式细胞仪鉴定。本领域技术人员了解可修改以优化所检测信号的参数以及可以增强筛选的其它FACS变体。

[0226] 拮抗剂(例如，抗体)与其靶标(例如，DLL4或Notch受体)的结合亲和力和结合剂-抗原相互作用的开关速率(on-off rate)可以通过竞争性结合检验来确定。在一些实施方式中，竞争性结合检验是放射免疫检验法，其包括在增加量的未标记的抗原存在下，将经标记抗原(例如，³H或¹²⁵I)或其片段或变体与感兴趣的试剂温育，随后检测与经标记抗原结合的试剂。试剂对抗原的亲和力和开关速率可以通过Scatchard图分析从数据中确定。在一些实施方式中，使用Biacore动力学分析来确定拮抗剂或结合剂的结合亲和力和开关速率。Biacore动力学分析包括分析结合剂与已固定在Biacore芯片表面的抗原(例如，DLL4或Notch蛋白)的结合和解离。在一些实施方式中，Biacore动力学分析可用于研究不同结合剂在定性表位竞争结合检验中的结合。

[0227] 在本文所述方法的某些实施方式中，所述方法包括为DLL4结合剂的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，DLL4结合剂是DLL4拮抗剂。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是特异性结合人DLL4的抗体。在一些实施方式中，DLL4拮抗剂是特异性结合人DLL4的胞外域的抗体。在一些实施方式中，特异性结合人DLL4的胞外域的抗体包含含有TAYYIH(SEQ ID NO:

1) 的重链CDR1、含有YISCYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2)、YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 或YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体还包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;以及含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。

[0228] 在本文所述方法的某些实施方式中,所述方法包括特异性结合人DLL4的胞外域的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11具有至少约80%序列同一性的重链可变区,和/或与SEQ ID NO:12具有至少约80%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:12具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:9具有至少约95%序列同一性的重链可变区和/或与SEQ ID NO:12具有至少约95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区,和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:10具有至少约95%序列同一性的重链可变区和/或与SEQ ID NO:12具有至少约95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11的重链可变区,和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:11的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:12的轻链可变区。

[0229] 在本文所述方法的某些实施方式中,所述方法包含由杂交瘤产生的抗体,所述杂交瘤根据布达佩斯条约的条件,于2007年9月28日保藏在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的美国典型培养物保藏中心(ATCC),ATCC保藏号为PTA-8670,也称为鼠类21M18。鼠类21M18抗体也在2007年9月28日提交的美国专利第7,750,124号中详细地描述。

[0230] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括的抗体包含由杂交瘤产生的抗体的重链CDR和轻链CDR,所述杂交瘤于2007年9月28日保藏于ATCC,并且ATCC保藏号为PTA-8670。

[0231] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括的抗体包含由质粒DNA编码的重链可变区和轻链可变区,所述质粒DNA根据布达佩斯条约的条件,于2007年5月10日保藏在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的ATCC,ATCC保藏号为PTA-8425。

[0232] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括由质粒DNA编码的抗体,所述质粒DNA于2007年5月10日保藏在ATCC,ATCC保藏号为PTA-8425,也称为21M18H7L2和OMP-21M18。OMP-21M18抗体详细地描述于2007年9月28日提交的美国专利第7,750,124号。该抗体也称为登西珠单抗。

[0233] 在本文所述方法的某些实施方式中,Notch途径抑制剂是多肽。所述多肽包括但不限于特异性结合人DLL4的抗体。在某些实施方式中,多肽包含登西珠单抗(OMP-21M18)的1、2、3、4、5和/或6个CDR。在一些实施方式中,多肽包含的CDR具有至多4个(即,0、1、2、3或4)个氨基酸取代/CDR。在某些实施方式中,重链CDR包含在重链可变区内。在某些实施方式中,轻链CDR包含在轻链可变区内。

[0234] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂包含多肽,所述多肽含有选自由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12组成的组中的序列。

[0235] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含登西珠单抗的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含登西珠单抗(具有或不具有前导序列)的重链和轻链。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含登西珠单抗,基本上由登西珠单抗组成,或者由登西珠单抗组成。

[0236] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括DLL4拮抗剂(例如,抗体),其与包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区和含有SEQ ID NO:12的轻链可变区的抗体竞争对人DLL4的特异性结合。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂与登西珠单抗竞争对人DLL4的特异性结合。在一些实施方式中,在体外竞争结合检验中DLL4拮抗剂(例如,抗体)与登西珠单抗竞争对人DLL4的特异性结合。

[0237] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括DLL4拮抗剂(例如,抗体),其与本发明的抗体在人DLL4上结合相同的表位,或者基本上相同的表位。在另一个实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体所结合的人DLL4的表位与本发明抗体结合的DLL4上的表位重叠。在某些实施方式中,DLL4拮抗剂(例如,抗体)与登西珠单抗在人DLL4上结合相同的表位或基本相同的表位。在另一个实施方式中,DLL4拮抗剂是抗体,所述抗体所结合的人DLL4的表位与登西珠单抗结合的DLL4上的表位重叠。

[0238] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括为Notch结合剂的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中,Notch结合剂是Notch受体拮抗剂。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch2和/或Notch3的胞外域的抗体。在一些实施方式中,特异性结合人Notch2和/或Notch3的胞外域的抗体包含含有SSSGMS (SEQ ID NO:34) 的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35) 的重链CDR2和含有SIFYTT (SEQ ID NO:36) 的重链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体还包含含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:38) 的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体包含含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID NO:38) 的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有SSSGMS (SEQ ID NO:34) 的重链CDR1、含有VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35) 的重链CDR2和含有SIFYTT (SEQ ID NO:36) 的重链CDR3;以及含有RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37) 的轻链CDR1、含有GASSRAT (SEQ ID

NO:38)的轻链CDR2和含有QQYSNFPI (SEQ ID NO:39)的轻链CDR3。

[0239] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括特异性结合人Notch2和/或Notch3的胞外域的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约80%序列同一性的重链可变区和/或与SEQ ID NO:41具有至少约80%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:41具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:40具有至少约95%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:41具有至少约95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:40的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:41的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:40的重链可变区和含有SEQ ID NO:41的轻链可变区。

[0240] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括包含由质粒DNA编码的重链可变区和轻链可变区的抗体,所述质粒DNA根据布达佩斯条约的条件于2009年7月6日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的ATCC,并且ATCC保藏号为PTA-10170,也称为59R5和OMP-59R5。OMP-59R5抗体也在2009年7月8日提交的美国专利第8,226,943号中详细地描述。该抗体也称为他瑞妥单抗。

[0241] 在本文所述方法的某些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的抗体。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是特异性结合人Notch1的胞外域的非配体结合膜近端区的抗体。在一些实施方式中,特异性结合人Notch1的抗体包含含有RGYWIE (SEQ ID NO:46) 的重链CDR1、含有QILPGTGRNYNEKFKG (SEQ ID NO:47) 的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48) 的重链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体还包含含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述抗体包含含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体包含含有RGYWIE (SEQ ID NO:46) 的重链CDR1、含有QILPGTGRNYNEKFKG (SEQ ID NO:47) 的重链CDR2和含有FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48) 的重链CDR3;以及含有RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49) 的轻链CDR1、含有GTNNRAP (SEQ ID NO:50) 的轻链CDR2和含有ALWYSNHWVFGGGTLK (SEQ ID NO:51) 的轻链CDR3。

[0242] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括特异性结合人Notch1的抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约80%序列同一性的重链可变区和/或与SEQ ID NO:53具有至少约80%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:53具有至少约85%、至少约90%、至少约95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含与SEQ ID NO:52具有至少约95%序列同一性的重链可变区和/或与SEQ ID NO:53具有至少约95%序列同一性的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:52的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:53的轻链可变区。在某些实施方式中,所

述抗体包含含有SEQ ID NO:52的重链可变区和含有SEQ ID NO:53的轻链可变区。

[0243] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括的抗体包含由杂交瘤产生的抗体的重链CDR和轻链CDR,所述杂交瘤根据布达佩斯条约的条件于2008年8月7日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的美国典型培养物保藏中心(ATCC),并且ATCC保藏号为PTA-9405,也称为鼠类52M51。鼠类52M51抗体也在2009年7月8日提交的美国专利第8,435,513号中详细地描述。

[0244] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括的抗体包含由质粒DNA编码的重链可变区和轻链可变区,所述质粒DNA根据布达佩斯条约的条件于2008年10月15日保藏于在弗吉尼亚州20110,马纳萨斯市大学路10801的ATCC,并且ATCC保藏号为PTA-9549,也称为52M51-H4L3和OMP-h52M51。OMP-h52M51抗体也在2009年7月8日提交的美国专利第8,435,513号中详细地描述。该抗体也称为博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)。

[0245] 在本文所述方法的某些实施方式中,Notch途径抑制剂是多肽。所述多肽包括但不限于特异性结合人Notch2和/或Notch3的抗体,以及特异性结合人Notch1的抗体。在某些实施方式中,所述多肽包含他瑞妥单抗(OMP-59R5)的1、2、3、4、5和/或6个CDR。在某些实施方式中,所述多肽包含博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)(OMP-h52M51)的1、2、3、4、5和/或6个CDR。在一些实施方式中,多肽包含的CDR具有至多4个(即,0、1、2、3或4)个氨基酸取代/CDR。在某些实施方式中,重链CDR包含在重链可变区内。在某些实施方式中,轻链CDR包含在轻链可变区内。

[0246] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂包含含有SEQ ID NO:40和/或SEQ ID NO:41的序列的多肽。

[0247] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含他瑞妥单抗的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含他瑞妥单抗(具有或不具有前导序列)的重链和轻链。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含他瑞妥单抗,基本上由他瑞妥单抗组成,或者由他瑞妥单抗组成。

[0248] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括Notch受体拮抗剂(例如,抗体),其与包含含有SEQ ID NO:40的重链可变区和含有SEQ ID NO:41的轻链可变区的抗体竞争对人Notch2和/或Notch3的特异性结合。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂与他瑞妥单抗竞争对人Notch2和/或Notch3的特异性结合。在一些实施方式中,在体外竞争结合检验中Notch受体拮抗剂(例如,抗体)与他瑞妥单抗竞争对人Notch2和/或Notch3的特异性结合。

[0249] 在本文所述方法的某些实施方式中,方法包括Notch受体拮抗剂(例如,抗体),其与本发明的抗体在人Notch2和/或Notch3上结合相同的表位,或者基本上相同的表位。在另一个实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体所结合的人Notch2和/或Notch3的表位与本发明抗体结合的Notch2和/或Notch3上的表位重叠。在某些实施方式中,Notch受体拮抗剂(例如,抗体)与他瑞妥单抗在人Notch2和/或Notch3上结合相同的表位或基本相同的表位。在另一个实施方式中,Notch受体拮抗剂是抗体,所述抗体所结合的人Notch2和/或Notch3的表位与他瑞妥单抗结合的Notch2和/或Notch3上的表位重叠。

[0250] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂包含多肽,所述多肽含有SEQ ID NO:52和/或SEQ ID NO:53的序列。

[0251] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂包含博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)的

重链可变区和轻链可变区。在某些实施方式中，Notch途径抑制剂包含博尼替妥珠单抗(brontictuzumab) (具有或不具有前导序列) 的重链和轻链。在某些实施方式中，Notch途径抑制剂包含博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)，基本上由博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)组成，或者由博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)组成。

[0252] 在本文所述方法的某些实施方式中，方法包括Notch受体拮抗剂(例如，抗体)，其与包含含有SEQ ID N0:52的重链可变区和含有SEQ ID N0:53的轻链可变区的抗体竞争对人Notch1的特异性结合。在某些实施方式中，Notch受体拮抗剂与博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)竞争对人Notch1的特异性结合。在一些实施方式中，在体外竞争结合检验中Notch受体拮抗剂(例如，抗体)与博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)竞争对人Notch1的特异性结合。

[0253] 在本文所述方法的某些实施方式中，方法包括Notch受体拮抗剂(例如，抗体)，其与本发明的抗体在人Notch1上结合相同的表位，或者基本上相同的表位。在另一个实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体所结合的在人Notch1的表位与本发明抗体结合的在Notch1上的表位重叠。在某些实施方式中，Notch受体拮抗剂(例如，抗体)与博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)在人Notch1上结合相同的表位或基本相同的表位。在另一个实施方式中，Notch受体拮抗剂是抗体，所述抗体所结合的在人Notch1的表位与博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)结合的在Notch1上的表位重叠。

[0254] 在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是多克隆抗体。多克隆抗体可以通过任何已知的方法制备。在一些实施方式中，通过多次皮下或腹膜内注射相关抗原(例如，经纯化肽片段、全长重组蛋白或融合蛋白)而将动物(例如，兔、大鼠、小鼠、羊、驴)免疫，来培养多克隆抗体。抗原可以可选地缀合至载体，例如钥孔血蓝蛋白(KLH)或血清白蛋白。将抗原(具有或不具有载体蛋白)稀释在无菌盐水中，并且通常与佐剂(例如，完全或不完全弗氏佐剂)组合以形成稳定的乳液。经过足够的时间后，从经免疫动物的血液和/或腹水回收多克隆抗体。多克隆抗体可以根据本领域的标准方法从血清或腹水中纯化，所述标准方法包括但不限于亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳和透析。

[0255] 在一些实施方式中，Notch途径抑制剂是单克隆抗体。可以使用本领域技术人员已知的杂交瘤方法制备单克隆抗体。在一些实施方式中，使用杂交瘤方法，对小鼠、仓鼠、大鼠或其它合适的宿主动物如上所述进行免疫，以从淋巴细胞中产生将特异性结合免疫抗原的抗体。在一些实施方式中，淋巴细胞可以在体外免疫。在一些实施方式中，免疫抗原可以是人蛋白质或其一部分。在一些实施方式中，免疫抗原可以是小鼠蛋白质或其一部分。

[0256] 免疫后，分离淋巴细胞并使用例如聚乙二醇将其与合适的骨髓瘤细胞系融合，以形成杂交瘤细胞，杂交瘤细胞可以从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞中选出。产生特异性针对选定抗原的单克隆抗体的杂交瘤，可以通过多种方法鉴定，所述方法包括但不限于免疫沉淀、免疫印迹和体外结合检验(例如，流式细胞术、FACS、ELISA和放射免疫检验)。杂交瘤可以在使用标准方法的体外培养中繁殖或在动物体内作为腹水肿瘤繁殖。单克隆抗体可以根据本领域的标准方法从培养基或腹水中纯化，所述标准方法包括但不限于亲和色谱、离子交换色谱、凝胶电泳和透析。

[0257] 在某些实施方式中，单克隆抗体可以使用本领域技术人员已知的重组DNA技术制备。编码单克隆抗体的多核苷酸从成熟B细胞或杂交瘤细胞分离，例如通过使用寡核苷酸引

物的RT-PCR,所述引物特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因,并且其序列使用常规技术测定。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适的表达载体中,所述载体在转染至宿主细胞时产生单克隆抗体,所述宿主细胞如大肠杆菌、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。在其它实施方式中,重组单克隆抗体或其片段可以分离自噬菌体展示文库。

[0258] 编码单克隆抗体的多核苷酸可以使用重组DNA技术以多种不同的方式进一步修饰以产生替代抗体。在一些实施方式中,例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定域可以被取代例如人抗体的那些区域取代以产生嵌合抗体,或者被非免疫球蛋白多肽取代以产生融合抗体。在一些实施方式中,将恒定区截短或去除以产生单克隆抗体的所需抗体片段。在一些实施方式中,可以使用可变区的定点或高密度诱变来优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[0259] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂是人源化抗体。通常,人源化抗体是其中使用本领域技术人员已知的方法,CDR内的氨基酸残基被具有所需特异性、亲和力和/或结合能力的非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)的CDR替代的人免疫球蛋白。在一些实施方式中,人免疫球蛋白的构架区氨基酸残基被来自非人物种的抗体中的相应氨基酸残基替代。在一些实施方式中,人源化抗体可以通过在框架区和/或替代的非人残基中取代另外的氨基酸残基来进一步修饰,以进一步改进和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。通常,人源化抗体将包含含有对应于非人免疫球蛋白的全部或基本上全部CDR的可变域区域,而所有或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白序列的那些。在一些实施方式中,人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区或域(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的一部分。在某些实施方式中,在治疗上使用此类人源化抗体,因为当施用至人受试者时,它们可以降低抗原性和HAMA(人抗-小鼠抗体)响应。

[0260] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术直接制备。在一些实施方式中,可以产生在体外免疫或分离自经免疫个体的永生化人B淋巴细胞,所述经免疫个体产生针对靶抗原的抗体。在一些实施方式中,人抗体可以选自噬菌体文库,其中噬菌体文库表达人抗体。作为选择,可以使用噬菌体展示技术从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因库体外地产生人抗体和抗体片段。产生和使用抗体噬菌体文库的技术在本领域是公知的,并且抗体噬菌体文库是可商购的。包括但不限于链改组和定点诱变的亲和力成熟策略是本领域已知的,并且可用于产生高亲和力的人抗体。

[0261] 在一些实施方式中,可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备人抗体。这些小鼠在免疫后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的条件下产生人抗体的全部谱(repertoire)

[0262] 本发明还包括双特异性抗体。在一些实施方式中,双特异性抗体特异性识别人DLL4或人Notch受体。特异性抗体能够特异性识别和结合至少两种不同的表位。不同的表位可以在相同的分子(例如,人DLL4上的两个不同表位)内或在不同分子上(例如,DLL4上的一个表位和第二蛋白上的不同表位)。在一些实施方式中,双特异性抗体是单克隆人或人源化抗体。在一些实施方式中,双特异性抗体包含完整抗体。在一些实施方式中,双特异性抗体是抗体片段,在某些实施方式中,抗体是多特异性的。在一些实施方式中,抗体可以特异性识别并结合第一抗原靶(例如,DLL4或Notch受体)以及第二抗原靶(例如CD2、CD3、CD28、

CD80或CD86)或Fc受体(例如CD64、CD32或CD16)。在一些实施方式中,抗体可用于将细胞毒剂引导至表达特定靶抗原的细胞。这些抗体具有抗原结合臂和结合细胞毒素剂或放射性同位素螯合剂(例如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA)的臂。制备双特异性或多特异性抗体的技术是本领域技术人员已知的。

[0263] 在某些实施方式中,本发明的方法包括DLL4拮抗剂,其是特异性结合人DLL4和人VEGF的双特异性抗体。在一些实施方式中,所述双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YIX₁X₂YX₃X₄ATYNQKFKG (SEQ ID NO:26) (其中X₁是丝氨酸或丙氨酸,X₂是丝氨酸、天冬酰胺或甘氨酸,X₃是天冬酰胺或赖氨酸,X₄是甘氨酸、精氨酸或天冬氨酸)的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;以及含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YIANYNRATYNQKFKG (SEQ ID NO:24) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISSYNGATYNQKFKG (SEQ ID NO:3) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3;其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YIAGYKDATYNQKFKG (SEQ ID NO:23) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3;并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。在一些实施方式中,所述双特异性抗体包含:a)特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点,和b)特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含含有NYWMH (SEQ ID NO:20) 的重链CDR1、含

有DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21) 的重链CDR2和含有HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22) 的重链CDR3; 其中所述第二抗原结合位点包含含有TAYYIH (SEQ ID NO:1) 的重链CDR1、含有YISYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25) 的重链CDR2和含有RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5) 的重链CDR3; 并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点都包含含有RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6) 的轻链CDR1、含有AASNQGS (SEQ ID NO:7) 的轻链CDR2和含有QQSKKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) 的轻链CDR3。

[0264] 在一些实施方式中,本发明的方法包括双特异性抗体,其包含特异性结合人VEGF的第一抗原结合位点和特异性结合人DLL4的第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含SEQ ID NO:30的第一重链可变区,所述第二抗原结合位点包含SEQ ID NO:29的第二重链可变区; 并且其中所述第一抗原结合位点和第二抗原结合位点包含SEQ ID NO:12的第一轻链可变区和第二轻链可变区。

[0265] 在一些实施方式中,本发明的方法包括特异性结合人VEGF和特异性结合人DLL4的双特异性抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:32的第一重链和SEQ ID NO:31的第二重链; 以及SEQ ID NO:33的第一轻链和第二轻链。

[0266] 在某些实施方式中,双特异性抗体特异性结合DLL4和VEGF。在一些实施方式中,双特异性抗体是2012年9月24日提交的美国专利申请第13/625,417号中公开的双特异性抗体。在一些实施方式中,抗-VEGF/DLL4双特异性抗体是如2012年9月24日提交的美国专利申请第13/625,417号中公开的219R45-MB-21M18、219R45-MB-21R79、219R45-MB-21R75或219R45-MB-21R83(也称为305B83或OMP-305B83)。在一些实施方式中,双特异性抗体是OMP-305B83。

[0267] 在一些实施方式中,双特异性抗体特异性结合DLL4并且特异性结合PD-1。在一些实施方式中,双特异性抗体特异性结合DLL4并且特异性结合PD-L1。

[0268] 在某些实施方式中,本文所述的抗体(或其它多肽)可以是单特异性的。例如,在某些实施方式中,抗体包含的一个或多个抗原结点位点能够结合(或结合)不同蛋白质上的同源表位。

[0269] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是包含抗原结合位点的抗体片段。抗体片段可以具有与完整抗体不同的功能或能力; 例如,抗体片段可以具有增加的肿瘤穿透性。已知用于生产抗体片段的各种技术,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化。在一些实施方式中,抗体片段包含通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生的F(ab')₂片段。在一些实施方式中,抗体片段包括通过还原F(ab')₂片段的二硫桥产生的Fab片段。在其它实施方式中,抗体片段包括通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而产生的Fab片段。在某些实施方式中,抗体片段重组地产生。在一些实施方式中,抗体片段包括Fv或单链Fv(scFv)片段。Fab、Fv和scFv抗体片段可以在大肠杆菌或其它宿主细胞中表达和分泌,允许产生大量的这些片段。在一些实施方式中,抗体片段从本文所讨论的抗体噬菌体文库中分离。例如,方法可用于构建Fab表达文库以允许快速有效地鉴定对DLL4或Notch受体或其衍生物、片段、类似物或同源物具有所需特异性的单克隆Fab片段。在一些实施方式中,抗体片段是线性抗体片段。在某些实施方式中,抗体片段是单特异性或双特异性的。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是scFv。可以使用各种技术以生产对人DLL4或对人Notch受体具有特异性的单链抗体。

[0270] 特别是在抗体片段的情况下,可以进一步期望修饰抗体以增加其血清半衰期。这

可以通过下述实现：通过使抗体片段的合适区域突变而将补救受体结合表位引入抗体片段；或者将表位引入肽标签中，肽标签然后与抗体片段在任一端或在中间（例如通过DNA或肽合成）融合。在一些实施方式中，对抗体进行修饰以降低其血清半衰期。

[0271] 本发明还包括作为双特异性和/或双功能分子的Notch途径抑制剂。在一些实施方式中，双特异性和/或双功能分子是异二聚体分子。在一些实施方式中，双特异性和/或双功能分子是同二聚体分子。在一些实施方式中，同二聚体分子是多肽。在一些实施方式中，异二聚体分子是多肽。通常，同二聚体分子包含两个相同的多肽。通常异二聚体分子包含两个不同的多肽。在一些实施方式中，异二聚体分子能够结合至少两个靶标，例如双特异性试剂。靶标可以例如是在单个细胞上的两个不同蛋白质，或者在两个分开的细胞上的两个不同蛋白质。术语“臂”可以用于描述同二聚体分子、异二聚体分子和/或双特异性抗体的结构。在一些实施方式中，一个“臂”可以包含来自抗体的抗原结点位点。在一些实施方式中，一个“臂”可以包含受体的结合部分。在一些实施方式中，同二聚体双特异性分子包含两个相同的臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含两个不同的臂。如本文所用，异二聚体双特异性分子可以是双特异性抗体。

[0272] 在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和包含免疫治疗剂的第二臂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是靶标的激动剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是靶标的拮抗剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是淋巴因子或细胞因子。在一些实施方式中，免疫治疗剂是免疫粘附剂（immunoadhesion）。在一些实施方式中，免疫治疗剂选自由（但不限于）以下物质组成的组：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、白介素3（IL-3）、白介素12（IL-12）、白介素1（IL-1）、白介素2（IL-2）、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、4-1BB配体、GITRL、OX40配体、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抗体和抗-TIM-3抗体。

[0273] 在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合PD-1的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合PD-L1的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合CTLA-4的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合TIGIT的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合GITR的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合OX40的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合CD40的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合DLL4的第一臂和结合LAG-3的第二臂。

[0274] 在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和包含免疫治疗剂的第二臂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是靶标的激动剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂是靶标的拮抗剂，在一些实施方式中，免疫治疗剂是淋巴因子或细胞因子。在一些实施方式中，免疫治疗剂是免疫粘附剂。在一些实施方式中，免疫治疗剂选自由（但不限于）以下物质组成的组：粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、白介素3（IL-3）、白介素12（IL-12）、白介素1（IL-1）、白介素2（IL-2）、B7-1（CD80）、B7-2（CD86）、4-1BB配体、GITRL、OX40配体、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抗体和抗-TIM-3抗体。

[0275] 在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合PD-1的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合PD-L1的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合CTLA-4的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合TIGIT的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合GITR的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合OX40的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合CD40的第二臂。在一些实施方式中，异二聚体双特异性分子包含结合Notch受体的第一臂和结合LAG-3的第二臂。

[0276] 在一些实施方式中，异二聚体双特异性试剂包含两个臂，其中每个臂包含人CH3域，其中每个CH3域被修饰以促进异源二聚体的形成。在一些实施方式中，第一和第二个CH3域使用球-洞(knobs-into-holes)技术进行修饰。在一些实施方式中，第一和第二CD3域基于静电效应进行修饰。

[0277] 异源偶联抗体也在本发明的范围内。异源偶联抗体由两个共价连接的抗体组成。例如，已经提出此类抗体将免疫细胞靶向不被需要的细胞。还设想异源偶联抗体可以使用合成蛋白质化学中已知的方法制备，包括涉及交联剂的那些方法。例如，免疫毒素可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建。用于此目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐/酯和甲基-4-巯基丁酰亚胺酸盐/酯。

[0278] 为了本发明的目的，应当意识到，经修饰的抗体可以包含提供抗体与靶标(即人DLL4或Notch受体)的缔合的任何类型的可变区。在这点上，可变区可以包含或衍生自任何类型的哺乳动物，所述哺乳动物可被诱导产生体液响应，并针对所需的肿瘤相关抗原产生免疫球蛋白。因此，修饰抗体的可变区可以例如具有人、鼠类、非人灵长类(例如食蟹猴、猕猴等)或兔来源。在一些实施方式中，经修饰免疫球蛋白的可变区和恒定区都是人的。在其它实施方式中，相容抗体的可变区(通常衍生自非人来源)可以被设计或专门定制，以改善结合性质或降低分子的免疫原性。在这方面，用于本发明的可变区可通过包含输入氨基酸序列进行人源化或以其它方式改变。

[0279] 在某些实施方式中，重链和轻链中的可变域被至少部分替代一个或多个CDR，并且必要时通过部分框架区替换和序列修饰和/或改变来改变。尽管CDR可以衍生自与框架区所源自的抗体相同类别甚至亚类的抗体，但是设想CDR优选来自不同物种的抗体。可能不需要将全部CDR用来自供体可变区的全部CDR替换，以将一个可变域的抗原结合能力转移到另一个。相反，可能仅需要转移对于维持抗原结合位点活性所必需的那些氨基酸残基。

[0280] 尽管可以对可变区进行改变，本领域技术人员将意识到，本发明的经修饰抗体将包括下述抗体(例如全长抗体或其免疫反应性片段)，所述抗体中一个或多个恒定区域的至少一部分已经缺失或另外改变，从而当与包含天然或未改变的恒定区的大致相同的免疫原性的抗体相比时，提供所需的生物化学特性，例如增加的肿瘤定位和/或增加的血清半衰期。在一些实施方式中，经修饰抗体的恒定区将包含人恒定区。与本发明相容的恒定区的修饰包括一个或多个域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。本文公开的经修饰抗体可

以包括对三个重链恒定域 (CH1, CH2或CH3) 和/或对轻链恒定域 (CL) 中的一个或多个的改变或修饰。在一些实施方式中,一个或多个域部分或全部地从经修饰抗体的恒定区缺失。在一些实施方式中,经修饰抗体将包含其中已去除整个CH2域的构建体或变体 (Δ CH2构建体)。在一些实施方式中,省略的恒定区域被短氨基酸间隔物(例如,10个氨基酸残基)替代,其提供了通常由不存在的区域赋予的一些分子柔韧性。

[0281] 在一些实施方式中,将经修饰抗体工程化以将CH3域直接融合至抗体的铰链区。在其它实施方式中,将肽间隔物插入在铰链区和经修饰的CH2和/或CH3域之间。例如,可以表达这样的构建体:CH2域已经缺失,并且剩余的CH3域(经修饰的或未修饰的)通过5-20个氨基酸的间隔物连接至铰链区。可以添加此类间隔物以确保恒定域的调节元件保持自由和可接近,或者铰链区域保持柔性。然而,应当注意,在某些情况下氨基酸间隔物可证明具有免疫原性并引发不想要的针对构建体的免疫响应。因此,在某些实施方式中,添加到构建体中的任何间隔物将是相对非免疫原性的,以保持经修饰抗体的期望的生物学品质。

[0282] 在一些实施方式中,经修饰抗体可能仅具有恒定域的部分缺失或者几个或甚至单个氨基酸的取代。例如,CH2域的选定区域中的单个氨基酸的突变可以足以实质上降低Fc结合,从而增加癌细胞定位和/或肿瘤穿透。类似地,可能期望仅使控制特异性效应子功能(例如补体C1q结合)的一个或多个恒定区域域的部分缺失。恒定区的此类部分缺失可以改善抗体的选定特性(血清半衰期),同时与受试者恒定区域相关的其它所需功能保持完整。此外,如上所述,所公开的抗体的恒定区可以通过增强所得构建体的特性的一个或多个氨基酸的突变或取代来进行修饰。在这方面,可能破坏由保守性结合位点(例如,Fc结合)提供的活性,同时基本上保持经修饰抗体的构型和免疫原特性。在某些实施方式中,经修饰抗体包括向恒定区添加一个或多个氨基酸以增强所需特性(例如降低或增加的效应子功能)或提供更多的细胞毒素或糖附着位点。

[0283] 本领域已知恒定区介导几种效应子功能。例如,补体的C1组分与IgG或IgM抗体的Fc区的结合(结合至抗原)激活补体系统。补体的激活对于细胞病原体的调理作用和裂解是重要的。补体的激活也刺激炎症响应,并且可能也参与自身免疫性超敏反应。此外,抗体的Fc区可以结合表达Fc受体(FcR)的细胞。存在许多对不同类型的抗体具有特异性的Fc受体,包括IgG(γ 受体), IgE(ϵ 受体), IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合触发许多重要的多样化的生物响应,包括吞噬和破坏抗体包被的颗粒,清除免疫复合物,通过杀手细胞裂解抗体包被的靶细胞,释放炎性介质,胎盘转移和控制免疫球蛋白产生。

[0284] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是提供改变的效应子功能的抗体。这些改变的效应子功能可能影响所施用的抗体的生物学特性。例如,在一些实施方式中,恒定区域的缺失或失活(通过点突变或其它方式)可以减少循环经修饰抗体(例如,抗-DLL4抗体或抗-Notch受体抗体)的Fc受体结合,从而增加癌细胞定位和/或肿瘤穿透。在其它实施方式中,恒定区修饰增加或降低抗体的血清半衰期。在一些实施方式中,对恒定区进行修饰以消除二硫键或寡糖部分。根据本发明对恒定区进行修饰可以使用在本领域技术人员的所知范围内公知的生物化学或分子工程化技术容易地进行。

[0285] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是不具有一种或多种效应子功能的抗体。例如,在一些实施方式中,抗体不具有ADCC活性,和/或不具有CDC活性。在某些实施方式中,抗

体不结合Fc受体,和/或补体因子。在某些实施方式中,抗体不具有效应子功能。

[0286] 本发明还包括与本文所述的嵌合抗体、人源化抗体和人抗体或其抗体片段基本上同源的变体和等同物。这些可以含有例如保守性取代突变。

[0287] 在某些实施方式中,本文所述的抗体是分离的。在某些实施方式中,本文所述的抗体是基本上纯的。

[0288] 在本发明的一些实施方式中,Notch途径抑制剂是多肽。多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽(包括抗体或其片段),它们结合人DLL4或结合一种或多种人Notch受体。本领域技术人员会意识到,本发明的一些氨基酸序列可以变化而对蛋白质的结构或功能没有显著影响。因此,本发明还包括多肽的变体,其显示针对人DLL4或一种或多种人Notch受体的实质性活性或其包括针对人DLL4或一种或多种人Notch受体的抗体或其片段的区域。在一些实施方式中,DLL4-结合多肽或Notch-结合多肽的氨基酸序列变化包括缺失、插入、倒置、重复和/或其它类型的取代。

[0289] 可以对多肽、其类似物和变体进行进一步修饰以含有通常不是多肽一部分的另外的化学部分。衍生部分可以改善多肽的溶解度、生物半衰期和/或吸收。所述部分也可以减少或消除多肽和变体的任何不期望的副作用。化学部分的综述可见于Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第22版, 2012, Pharmaceutical Press, London。

[0290] 本文所述的分离的多肽可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。这些方法从直接蛋白质合成法到构建编码多肽序列的DNA序列并在合适的宿主中表达那些序列。在一些实施方式中,DNA序列通过分离或合成编码感兴趣的野生型蛋白质的DNA序列使用重组技术来构建。可选的是,所述序列可通过位点特异性诱变来诱变以提供其功能类似物。

[0291] 在一些实施方式中,编码感兴趣多肽的DNA序列可以使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来构建。寡核苷酸可以基于所需多肽的氨基酸序列设计,并选择在将产生感兴趣的重组多肽的宿主细胞中有利的那些密码子。可以应用标准方法来合成编码感兴趣的分离多肽的多核苷酸序列。例如,可以使用完整的氨基酸序列来构建反译(back-translated)基因。此外,可以合成含有编码特定的分离多肽的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如,可以合成编码所需多肽的一部分的数个小寡核苷酸然后将其连接。个体寡核苷酸通常含有5'或3'突出端以用于互补组装。

[0292] 一旦组装(通过合成,定点诱变或另一种方法),可以将编码感兴趣的特定多肽的多核苷酸序列插入到表达载体中,并且可操作地连接至适于在所需宿主中表达蛋白质的表达控制序列。正确的组装可以通过核苷酸测序、限制性酶作图和/或生物活性多肽在合适的宿主中的表达来确认。如本领域众所周知的,为了获得在宿主中转染基因的高表达水平,该基因必须可操作地连接到在选择的表达宿主中有功能的转录和翻译表达控制序列。

[0293] 在某些实施方式中,使用重组表达载体来扩增和表达结合人DLL4或一种或多种人Notch受体的多肽(例如,抗体)或其片段。例如,重组表达载体可以是具有合成或cDNA来源的DNA片段的可复制的DNA构建体,该DNA片段编码抗-DLL4抗体或其片段的多肽链,与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录和/或翻译调节元件可操作地连接。转录单位通常包含以下的组装体:(1)在基因表达中具有调节作用的遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列,和(3)合适的转录和翻译起始和终止序列。调控元件可以包括操纵子序列以控制转录。可以另外地引入通常由复制起

点赋予的宿主中的复制能力以及促进转化体识别的选择基因。当DNA区域在功能上彼此相关时,DNA区域“可操作地连接”。例如,如果信号肽的DNA(分泌型前导序列)表达为参与多肽分泌的前体,则信号肽的DNA与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子控制序列的转录,则启动子与编码序列可操作地连接;或者如果核糖体结合位点被定位以允许翻译则核糖体结合位点与编码序列可操作地连接。在一些实施方式中,旨在用于酵母表达系统的结构元件包括前导序列,所述前导序列允许宿主酵母细胞将所翻译蛋白细胞外分泌。在其中重组蛋白在没有前导序列或转运序列的情况下表达的其它实施方式中,其可以包括N-末端甲硫氨酸残基。可选的是该残基可随后从所表达的重组蛋白中切割下来,以提供最终产物。

[0294] 表达控制序列和表达载体的选择取决于宿主的选择。可以使用各种表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头状瘤病毒,腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包括已知的细菌质粒,例如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物,以及更宽范围的宿主质粒,例如M13和其它丝状单链DNA噬菌体。

[0295] 用于表达多肽的合适的宿主细胞包括原核生物、酵母细胞、昆虫细胞或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或芽孢杆菌。高等真核细胞包括如下所述的已建立的哺乳动物来源的细胞系。也可以采用无细胞翻译系统。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的合适的克隆和表达载体是本领域技术人员已知的。

[0296] 使用各种哺乳动物细胞培养系统来表达重组多肽。可以优选在哺乳动物细胞中表达重组蛋白,因为此类蛋白质通常正确折叠、适当修饰并具有生物功能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括COS-7(源自猴肾)、L-929(源自鼠类成纤维细胞)、C127(源自鼠类乳腺瘤)、3T3(源自鼠类成纤维细胞)、CHO(源自中国仓鼠卵巢)、HeLa(源自人子宫颈癌)、BHK(源自仓鼠肾成纤维细胞)、HEK-293(源自人胚肾)细胞系及其变体。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件,例如复制起点,与待表达基因连接的合适的启动子和增强子,以及其它5'或3'侧翼非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,例如必需的核糖体结合位点,聚腺苷酸化位点,剪接供体和受体位点,以及转录终止序列。

[0297] 重组蛋白在昆虫细胞培养系统(例如杆状病毒)中的表达也提供了用于生产正确折叠和具有生物功能的蛋白的稳健方法。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白的杆状病毒系统是本领域技术人员公知的。

[0298] 因此,本发明提供包含本文所述的Notch途径抑制剂的细胞。在一些实施方式中,所述细胞产生本文所述的Notch途径抑制剂(例如,抗体)。在某些实施方式中,所述细胞产生抗体。在某些实施方式中,所述细胞产生登西珠单抗。在某些实施方式中,所述细胞产生OMP-305B83。在某些实施方式中,所述细胞产生他瑞妥单抗。在某些实施方式中,所述细胞产生博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)。

[0299] 由转化宿主产生的蛋白质可以根据任何合适的方法纯化。标准方法包括色谱(例如离子交换,亲和色谱和尺寸柱色谱)、离心、溶解度差异,或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术。可以将如六组氨酸、麦芽糖结合域、流感衣壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标签连接到蛋白质上,以允许通过合适的亲和柱容易地纯化。分离的蛋白质也可以使用诸如蛋白水解、质谱(MS)、核磁共振(NMR)、高效液相色谱(HPLC)和x射线晶体学等技术进行

物理表征。

[0300] 在一些实施方式中,可以使用市售的蛋白质浓缩过滤器例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,首先将分泌重组蛋白到培养基中的表达系统中的上清液浓缩。浓缩步骤后,可以将浓缩物应用到合适的纯化基质。在一些实施方式中,可以使用阴离子交换树脂,例如具有悬垂式二乙基氨基乙基(DEAE)的基质或基底(substrate)。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或蛋白质纯化中常用的其它类型。在一些实施方式中,可以使用阳离子交换步骤。适用的阳离子交换剂包括各种不溶性基质,其包括磺丙基或羧甲基。在一些实施方式中,可以使用羟基磷灰石介质,包括但不限于陶瓷羟基磷灰石(HT)。在某些实施方式中,使用疏水性RP-HPLC介质(例如具有悬垂甲基或其它脂族基团的硅胶)的一个或多个反相HPLC步骤,可用于进一步纯化结合剂。一些或全部上述纯化步骤(以各种组合),也可用于提供均匀的重组蛋白。

[0301] 在一些实施方式中,可以分离细菌培养物中产生的重组蛋白,例如通过从细胞球团中初始提取,然后进行一次或多次浓缩,盐析,水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤。可以使用HPLC来进行最终纯化步骤。可以通过任何方便的方法破坏表达重组蛋白使用的微生物细胞,包括冻融循环、超声处理、机械破坏或使用细胞裂解剂。

[0302] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是小分子。

[0303] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂能够以多种缀合(即免疫缀合物或放射性缀合物)或非缀合形式中的任一种使用。在某些实施方式中,抗体能够以非缀合形式使用来控制受试者的天然防御机制(包括补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性),从而消除恶性细胞或癌细胞。

[0304] 在一些实施方式中,Notch途径抑制剂缀合至细胞毒性剂。在一些实施方式中,细胞毒性剂是一种化学治疗剂,包括但不限于甲氨蝶呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其它嵌入剂(intercalating agent)。在一些实施方式中,细胞毒性剂是细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素或其片段,包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、 α -八叠球菌素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹毒(dianthin)蛋白、垂序登陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜蛋白抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(Sapindus officinalis)抑制剂、白树毒素(gelonin)、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素(phomycin)、依诺霉素(enomycin)和新月毒素(tricothecenes)。在一些实施方式中,细胞毒性剂是用于产生放射性缀合物或放射缀合抗体的放射性同位素。各种放射性核素可用于生产放射性缀合抗体,包括但不限于, ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{131}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 和 ^{212}Bi 。在一些实施方式中,可以产生抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素例如为加利车霉素、美登木素生物碱、单端孢霉烯(trichothene)和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。在某些实施方式中,抗体和细胞毒性剂的缀合物使用各种双功能蛋白偶联剂制造,所述双功能蛋白偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(如二甲基己二酰亚胺盐酸盐)、活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(如戊二醛)、双-叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(例如双(对重氮基苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异

氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0305] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,抗体)是DLL4的拮抗剂。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂抑制DLL4的活性。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂抑制DLL4活性的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约50%、至少约75%、至少约90%或约100%。

[0306] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,抗体)抑制DLL4与合适的受体的结合。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂抑制DLL4与一种或多种人Notch蛋白的结合。在一些实施方式中,所述一种或多种人Notch蛋白选自由以下组成的组:Notch1、Notch2、Notch3和Notch4。在某些实施方式中,DLL4与Notch蛋白的结合被Notch途径抑制剂抑制至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约90%或至少约95%。在某些实施方式中,抑制DLL4与Notch蛋白的结合的Notch途径抑制剂也抑制Notch途径信号传导。在某些实施方式中,抑制人Notch途径信号传导的Notch途径抑制剂是登西珠单抗。

[0307] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,抗体)是一种或多种Notch受体的拮抗剂。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂抑制Notch1、Notch2和/或Notch3的活性。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂将Notch1、Notch2和/或Notch3的活性抑制至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约50%、至少约75%、至少约90%或约100%。

[0308] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂(例如,抗体)抑制Notch受体与合适的配体的结合。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂抑制Notch受体与一种或多种人Notch配体的结合。在一些实施方式中,所述一种或多种人Notch配体选自由以下组成的组:DLL1、DLL3、DLL4、JAG1和JAG2。在某些实施方式中,Notch受体与Notch配体的结合被Notch途径抑制剂抑制至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约90%或至少约95%。在某些实施方式中,抑制Notch受体与Notch配体的结合的Notch途径抑制剂也抑制Notch途径信号传导。在某些实施方式中,抑制人Notch途径信号传导的Notch途径抑制剂是他瑞妥单抗。在某些实施方式中,抑制人Notch途径信号传导的Notch途径抑制剂是博尼替妥珠单抗(brontictuzumab)。

[0309] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂具有以下一种或多种效应:抑制肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤生长,降低癌干细胞在肿瘤中的频率,降低肿瘤的致瘤性,通过降低癌干细胞在肿瘤中的频率而降低肿瘤的致瘤性,触发肿瘤细胞的细胞死亡,诱导肿瘤中的细胞分化,将致瘤细胞分化为非致瘤状态,诱导肿瘤细胞中分化标记物的表达,预防肿瘤细胞转移,减少肿瘤细胞存活或调节免疫响应。

[0310] 在某些实施方式中,Notch途径抑制剂能够降低肿瘤的致瘤性。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂能够在动物模型(例如小鼠模型)中降低包含癌干细胞的肿瘤的致瘤性。在某些实施方式中,癌干细胞在肿瘤中的数量或频率降低至少约2倍、约3倍、约5倍,约10倍、约50倍、约100倍或约1000倍。在某些实施方式中,癌干细胞的数量或频率的降低使用动物模型通过有限稀释检验确定。关于使用有限稀释检验来确定癌干细胞在肿瘤中的数量或频率的降低的另外的实例和指南可见例如国际公开第W0 2008/042236号,以及美国专利公开第2008/0064049和2008/0178305号。

[0311] 在某些实施方式中,本文所述的Notch途径抑制剂在体内具有活性至少1小时、至少约2小时、至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周

或至少约2周。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是IgG(例如,IgG1或IgG2)抗体,其在体内具有活性至少1小时、至少约2小时、至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周或至少约2周。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是融合蛋白,其在体内具有活性至少1小时、至少约2小时、至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周或至少约2周。

[0312] 在某些实施方式中,本文所述的Notch途径抑制剂在小鼠、食蟹猴(*cynomolgus monkey*)或人中具有的循环半衰期为至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周或至少约2周。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是IgG(例如,IgG1、IgG2或IgG4)抗体,其在小鼠、食蟹猴或人中具有的循环半衰期为至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周或至少约2周。在某些实施方式中,Notch途径抑制剂是融合蛋白,其在小鼠、食蟹猴或人中具有的循环半衰期为至少约5小时、至少约10小时、至少约24小时、至少约2天、至少约3天、至少约1周或至少约2周。增加(或减少)诸如多肽和抗体等试剂的半衰期的方法是本领域已知的。例如,增加IgG抗体的循环半衰期的已知方法包括在Fc区引入突变,其增加抗体与新生Fc受体(FcRn)的pH依赖性结合。增加缺乏Fc区的抗体片段的循环半衰期的已知方法包括诸如PEG化等技术。

[0313] 免疫治疗剂

[0314] 本发明提供与免疫治疗剂一起用于组合疗法的Notch途径抑制剂,以用于调节免疫响应、抑制肿瘤生长和/或用于治疗癌症。在本文所述方法的一些实施方式中,免疫治疗剂选自由以下物质组成的组:PD-1活性的调节剂、PD-L1活性的调节剂、PD-L2活性的调节剂、CTLA-4活性的调节剂、CD28活性的调节剂、CD80活性的调节剂、CD86活性的调节剂、4-1BB活性的调节剂、OX40活性的调节剂、KIR活性的调节剂、Tim-3活性的调节剂、LAG3活性的调节剂、CD27活性的调节剂、CD40活性的调节剂、GITR活性的调节剂、TIGIT活性的调节剂、CD20活性的调节剂、CD96活性的调节剂、IDO1活性的调节剂、细胞因子、趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员和免疫刺激性寡核苷酸。

[0315] 在一些实施方式中,免疫治疗剂选自由以下组成的组:PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、PD-L2拮抗剂、CTLA-4拮抗剂、CD80拮抗剂、CD86拮抗剂、KIR拮抗剂、Tim-3拮抗剂、LAG3拮抗剂、TIGIT拮抗剂、CD20拮抗剂、CD96拮抗剂、IDO1拮抗剂和/或KIR拮抗剂。

[0316] 在一些实施方式中,免疫治疗剂选自由以下组成的组:CD28激动剂、4-1BB激动剂、OX40激动剂、CD27激动剂、CD80激动剂、CD86激动剂、CD40激动剂和GITR激动剂。

[0317] 在一些实施方式中,免疫治疗剂包括但不限于:诸如趋化因子等细胞因子、干扰素、白介素、淋巴因子或肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员。在一些实施方式中,免疫治疗剂包括免疫刺激性寡核苷酸,例如CpG二核苷酸。

[0318] 在一些实施方式中,免疫治疗剂包括但不限于: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抗体和抗-IDO1抗体。

[0319] 在一些实施方式中,PD-1拮抗剂是特异性结合PD-1的抗体。在一些实施方式中,结合PD-1的抗体是派姆单抗(KEYTRUDA,MK-3475)、吡替珠单抗(CT-011)、尼莫单抗(OPDIVO,BMS-936558,MDX-1106)、MEDI0680(AMP-514)、REGN2810、BGB-A317、PDR-001或STI-A1110。

在一些实施方式中，结合PD-1的抗体描述于PCT公开WO 2014/179664中，例如，鉴定为APE2058、APE1922、APE1923、APE1924、APE 1950或APE1963的抗体，或者包含任何这些抗体的CDR区的抗体。在其它实施方式中，PD-1拮抗剂是融合蛋白，其包含PD-L1或PD-L2的胞外域，例如AMP-224。在其它实施方式中，PD-1拮抗剂是肽抑制剂，例如AUNP-12。

[0320] 在一些实施方式中，PD-L1拮抗剂是特异性结合PD-L1的抗体。在一些实施方式中，结合PD-L1的抗体是阿特朱单抗(atezolizumab) (RG7446, MPDL3280A)、度伐鲁单抗(MEDI4736)、BMS-936559 (MDX-1105)、阿维鲁单抗(avelumab) (MSB-0010718C)、KD033、KD033的抗体部分或STI-A1014。在一些实施方式中结合PD-L1的抗体描述于PCT公开WO 2014/055897，例如Ab-14、Ab-16、Ab-30、Ab-31、Ab-42、Ab-50、Ab-52或Ab-55，或者包含任何这些抗体的CDR区的抗体。

[0321] 在一些实施方式中，CTLA-4拮抗剂是特异性结合CTLA-4的抗体。在一些实施方式中，结合CTLA-4的抗体是依匹木单抗(YERVOY) 或曲美木单抗(CP-675,206)。在一些实施方式中，CTLA-4拮抗剂是CTLA-4融合蛋白或可溶性CTLA-4受体，例如KAHR-102。

[0322] 在一些实施方式中，KIR拮抗剂是特异性结合KIR的抗体。在一些实施方式中，结合KIR的抗体是利来罗单抗(lirilumab)。

[0323] 在一些实施方式中，LAG3拮抗剂是特异性结合LAG3的抗体。在一些实施方式中，结合LAG3的抗体是IMP701、IMP731、BMS-986016、LAG525和GSK2831781。在一些实施方式中，LAG3拮抗剂是LAG3融合蛋白或可溶性LAG3受体，例如IMP321。

[0324] 在一些实施方式中，IDO1拮抗剂是印到四美(indoximad) (NLG-9189)、艾珀开度(epacadostat) (INCB024360) 或NLG0919。

[0325] 在一些实施方式中，免疫治疗剂是CD28激动剂、4-1BB激动剂、OX40激动剂、CD27激动剂、CD80激动剂、CD86激动剂、CD40激动剂或GITR激动剂。

[0326] 在一些实施方式中，OX40激动剂包含OX40配体，或其OX40-结合部分。在一些实施方式中，OX40激动剂是MEDI6383。在一些实施方式中，OX40激动剂是特异性结合OX40的抗体。在一些实施方式中，结合OX40的抗体描述于PCT公开WO 2012/027328，例如小鼠119-122、Ch119-122、Hu199-122或106-222抗体，或者包含任何这些抗体的CDR区的抗体。在一些实施方式中，OX40激动剂是能够表达OX40配体的载体(例如，表达载体或病毒，例如腺病毒)。在一些实施方式中，表达OX40L的载体是Delta-24-RGDOX或DNX2401。

[0327] 在一些实施方式中，4-1BB(CD137) 激动剂是结合分子，例如抗卡琳(anticalin，模拟抗体)。在一些实施方式中，所述抗卡琳是PRS-343。在一些实施方式中，4-1BB激动剂是特异性结合4-1BB的抗体。在一些实施方式中，结合4-1BB的抗体是PF-2566 (PF-05082566) 或尤乐罗单抗(urelumab) (BMS-663513)。

[0328] 在一些实施方式中，CD27激动剂是特异性结合CD27的抗体。在一些实施方式中，结合CD27的抗体是万丽罗单抗(varlilumab) (CDX-1127)。

[0329] 在一些实施方式中，GITR激动剂包含GITR配体或其GITR-结合部分。在一些实施方式中，GITR激动剂是特异性结合GITR的抗体。在一些实施方式中，结合GITR的抗体是TRX518、MK-4166或INBRX-110。

[0330] 实施例

[0331] 实施例1

[0332] 抗-DLL4抗体对PD-1在来自CT26.WT肿瘤的细胞中的表达的影响

[0333] 鼠类结肠癌CT26.WT获自ATCC。将CT26.WT细胞皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的后肋部(rear flanks)。使肿瘤生长直到平均尺寸为 200mm^3 。将小鼠随机分组($n=10$)，并用抗-小鼠DLL4(mDLL4)抗体21R30(10mg/kg，每周)、SIRPa-Fc蛋白(10mg/kg，每2周)或对照Fc蛋白(10mg/kg，每周)治疗。将试剂通过注射施用至腹膜内腔中。在初始剂量后的第14天，收获肿瘤，使用组织提取缓冲液(Life Technologies)从个体小鼠中分离总蛋白。通过SDS-PAGE凝胶电泳解析蛋白质(20 μg)，并且使用抗-PD-1抗体进行蛋白质印迹分析。

[0334] 如图1A中所示，来自用抗-mDLL4抗体21R30治疗的小鼠的肿瘤细胞裂解物中的PD-1表达相对于来自用对照治疗的小鼠的肿瘤细胞裂解物中的PD-1表达显著降低($p<0.05$)。该降低大于来自用SIRPa-Fc蛋白治疗的小鼠的肿瘤细胞裂解物中的降低。图1B显示来自各治疗组的4个个体肿瘤的代表性蛋白质印迹分析。

[0335] PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)在激活的T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞的表面上表达，并且已经显示出负向调节免疫响应，包括抗肿瘤响应。由于PD-1不在肿瘤细胞的表面上表达，这些结果表明用抗-DLL4抗体治疗可能直接或间接影响PD-1在肿瘤相关免疫细胞上的表达。这表明抗-DLL4抗体或其它DLL4拮抗剂可能潜在地抑制或阻断表达PD-1的细胞的抑制活性，并增强抗肿瘤免疫响应。

[0336] 实施例2

[0337] 小鼠IL-2-Fc和抗-mDLL4抗体对肿瘤生长的影响

[0338] 将鼠类结肠癌CT26.WT细胞皮下注射至6-8周龄Balb/C小鼠的肋部中。使肿瘤生长至平均肿瘤体积为 100mm^3 。将小鼠随机分组($n=10$)，并用抗-mDLL4抗体21R30(30mg/kg，每周)、mIL-2-Fc蛋白(1mg/kg，每周5天)或者抗-mDLL4抗体与mIL-2-Fc的组合治疗。分别使用抗-GFP抗体和鼠类Fc蛋白作为21R30和mIL-2-Fc的对照。试剂通过腹膜内注射施用。监视肿瘤生长，并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均肿瘤体积±SEM。

[0339] 如图2A所示，与对照相比，抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc作为单一试剂都抑制CT26.WT肿瘤生长。此外，抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合以比单独试剂更大的程度抑制肿瘤生长。

[0340] 重复该实验以评估试剂对较大的已确立肿瘤的影响。如上所述，将CT26.WT细胞皮下注射至6-8周龄Balb/C小鼠的后肋部，但使肿瘤生长至平均肿瘤体积为 400mm^3 。将小鼠随机分组($n=6$)，并用对照抗-GFP抗体(30mg/kg，每周)、抗-mDLL4抗体21R30(30mg/kg，每周)、mIL-2-Fc蛋白(1mg/kg，每周5天)，或者抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合治疗。试剂通过腹膜内注射施用。监视肿瘤生长，并使用电子卡尺在指定时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均肿瘤体积±SEM。

[0341] 如图2B所示，当肿瘤较大并且更加确立时，抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc的组合，与任一种试剂单独或对照相比，对抑制CT26.WT肿瘤的生长具有大的得多的影响。

[0342] 用鼠类肺肿瘤进行了类似的实验。在Oncomed建立了非小细胞肺癌(NSCLC)的小鼠模型，这里称为KP_LUN01。观察到该肿瘤细胞系具有不良的分化形态，在体内具有非常短的肿瘤潜伏期，并且是高度转移性的。

[0343] 将鼠类肺肿瘤KP_LUN01细胞(50,000个细胞)皮下注射至6-8周龄C57BL/6J小鼠的

胁部(第0天)。使肿瘤生长8天至平均肿瘤体积为 100mm^3 。将小鼠随机分组($n=10$)，并用对照抗-GFP抗体(20mg/kg)、抗-mDLL4抗体21R30(20mg/kg,第8、15和19天)、mIL-2-Fc蛋白(1mg/kg，在第11、12、13、14、15和19天)，或者抗-mDLL4抗体和mIL2-Fc的组合(相同剂量和作为单独试剂施用)治疗。通过腹膜内注射施用。监视肿瘤生长，并使用电子卡尺在指定时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均肿瘤体积±SEM。

[0344] 如图2C所示，与对照相比，抗-mDLL4抗体21R30和mIL-2-Fc作为单一试剂抑制KP_LUN01肿瘤的生长。此外，抗-mDLL4抗体21R30和mIL2-Fc的组合，与任一种试剂单独或对照相比，对抑制KP_LUN01肿瘤的生长具有更大的影响。

[0345] 这些结果表明抗-DLL4拮抗剂与免疫治疗剂的组合可以是潜在的抗肿瘤疗法。

[0346] 实施例3

[0347] 细胞的细胞毒性检验

[0348] 对于天然杀手(NK)细胞毒性检验，将小鼠成淋巴细胞细胞系YAC-1和小鼠结肠癌细胞系CT26.WT在补充有10%(v/v)胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY)中于37°C在5%CO₂的湿润气氛下培养。已知YAC-1细胞对于NK细胞活性是敏感的，并且是NK细胞检验的良好靶标。

[0349] 从实施例2中上述的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中收获细胞。将细胞在96孔V底板中于补充有10%(v/v)胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Gibco)的RPMI 1640培养基(Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY)中铺平板。靶细胞(YAC-1或CT26.WT)用10μM钙黄绿素AM(Life Technologies)在37°C下标记1小时，然后与脾细胞以25:1的效应子:靶标比例合并。在37°C下温育4小时后，收获无细胞的上清液，并将钙黄绿素释放在荧光计上在485nm的激发和535nm的发射处定量。将特定细胞裂解的百分比确定为：%裂解=100×(ER-SR)/(MR-SR)，其中ER、SR和MR分别代表实验释放、自发释放和最大钙黄绿素释放。自发释放是由在单独培养基(即，在没有效应子细胞的情况下)中温育的靶细胞发出的荧光，而最大释放通过用等体积的10%SDS裂解靶细胞来确定。

[0350] 当小鼠已经用mIL-2-Fc治疗过时，来自携带CT26.WT肿瘤的小鼠的NK细胞显现出增强的杀死YAC-1和CT26.WT靶细胞的能力。在该实验中用抗-mDLL4抗体治疗似乎对NK细胞毒性无影响，无论单独或还是mIL-2组合(图3A和3B)。

[0351] 使用从实施例2中上述的携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的脾脏收获的细胞进行类似的实验。在治疗后分离细胞，并使用YAC-1细胞作为靶标进行检验。当小鼠已经用作为单一试剂的抗-mDLL4抗体21R30或mIL-2-Fc治疗过时，来自携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的NK细胞显现出增加的杀死YAC-1靶细胞的能力。当将药剂组合时，NK活性没有增加(图3C)。

[0352] 对于T细胞的细胞毒性检验，在治疗后从携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中收获细胞，并将其在补充有30IU/mL重组鼠类IL-2(Peprotech, Rocky Hill, NJ)和0.1μg/ml AH-1肽(Anaspec, Fremont, CA)的培养基中培养。该肽的序列(SPSVYHQF)是CT26.WT细胞系内源性的亲嗜性鼠类白血病原病毒(provirus)的gp70包膜蛋白的H2-L^d-限制性表位(6-14位氨基酸)。将脾细胞在37°C下培养5天，收获，计数，并用于上述细胞毒性检验，使用CT26.WT肿瘤细胞作为靶标。在肽/IL-2刺激后通过FACS分析确认细胞的效应子CD8⁺表型(数据未显示)。

[0353] 如图4A所示,与来自用对照治疗的小鼠的细胞相比,在小鼠已经用抗-mDLL4抗体治疗过时来自携带CT26.WT肿瘤的小鼠的CD8⁺细胞毒性细胞表现出增加的杀死CT26.WT靶细胞的能力。与对照相比,来自用mIL-2-Fc治疗的携带肿瘤的小鼠的CD8⁺细胞也显示增加的杀死靶细胞的能力,尽管效果不如抗-mDLL4抗体那么强。此外,来自用抗-mDLL4和mIL-2-Fc的组合治疗的小鼠的细胞比单独的治疗具有更大的杀死靶细胞的能力。

[0354] 使用从实施例2中上述携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的脾收获的细胞进行类似地实验。CD8⁺T细胞特异性MHC I类肿瘤肽序列对于KP_LUN01肿瘤系而言是未知的,因此使用KP_LUN01肿瘤细胞作为刺激物。将KP_LUN01细胞用25μg/ml丝裂霉素C(Sigma-Aldrich)在37℃下治疗30分钟,洗涤,并以10⁷个细胞/ml重悬浮于含10%FCS、2mM L-谷氨酰胺和抗生素的RPMI-1640培养基中。将脾细胞与经丝裂霉素治疗的KP_LUN01细胞以20:1的比例共培养,在37℃下温育7天,收获,计数,并用于如上所述的细胞毒性检验。经钙黄绿素AM-标记的KP_LUN01肿瘤细胞以12.5:1的效应子:靶标比例用作靶标。4小时后确定钙黄绿素释放,并如上所述计算特定裂解。

[0355] 如图4B所示,当小鼠已经用抗-mDLL4抗体治疗过时,来自携带KP_LUN01肿瘤的小鼠的CD8⁺细胞毒性T细胞表现出增加的杀死KP_LUN01靶细胞的能力。与来自用对照治疗的小鼠的细胞相比,来自用mIL-2-Fc治疗的携带肿瘤的小鼠的CD8⁺T细胞仅显示细胞溶解活性的轻微增加。来自用抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合治疗的小鼠的细胞比任一单独治疗具有显著更大的杀死靶细胞的能力。

[0356] 这些结果证明,用DLL4拮抗剂治疗可能增加NK细胞和肿瘤特异性CD8⁺T细胞的细胞毒性活性。此外,DLL4拮抗剂和免疫治疗剂(例如IL-2)的组合治疗可进一步增强NK细胞和CTL的细胞溶解活性,因此提示更强的抗肿瘤响应。

[0357] 实施例4

[0358] 针对IFN-γ的ELISpot检验

[0359] ELISpot是用于检测细胞因子分泌细胞的高度灵敏的免疫检验。简言之,ELISpot检验使用预先包被到微孔板的孔上的所需细胞因子的特异性捕获抗体。将经刺激细胞等分到孔中,并且在任何细胞因子分泌细胞的近邻区域中的经固定抗体结合所分泌的细胞因子。然后是标准洗涤步骤、以及与合适的检测试剂一起温育。例如,通常使用生物素化检测抗体,然后是与碱性磷酸酶缀合的链亲和素和有色底物溶液。在细胞因子定位位点处形成有色沉淀物,并且其以斑点形式出现,每个个体斑点代表单独的细胞因子分泌细胞。可以用自动阅读器系统或手动使用显微镜对斑点计数。

[0360] 使用小鼠IFN-γ ELISpot试剂盒(小鼠IFN-γ ELISpot PLUS试剂盒,Mabtech,Cincinnati,OH)检测干扰素(IFN)-γ分泌细胞。如以上实施例2所述,从用抗-mDLL4抗体21R30和/或mIL-2-Fc治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。将来自各小鼠的脾细胞(2x 10⁵个细胞/孔)在所提供的板上铺平板,所述板预先包被有对鼠类IFN-γ具有特异性的捕获抗体。将细胞在存在或不存在肿瘤特异性CD8⁺T细胞肽(AH-1)的情况下培养,并温育48小时。根据制造商说明书检测分泌IFN-γ的细胞。使用6000F-z Bioreader(Biosys,Miami,FL)计数斑点。数据表示为平均值±S.E.M斑点/孔或总光密度。

[0361] 如图5所示,在用mIL-2-Fc作为单一试剂治疗的小鼠中,肿瘤特异性IFN-γ分泌CD8⁺T细胞增加。在用抗-mDLL4抗体21R30治疗的小鼠中也观察到:产生IFN-γ的CD8⁺T细胞

的适度但可检测的增加。另外,用抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合治疗的小鼠的肿瘤特异性IFN- γ 分泌CD8 $^{+}$ T细胞比任一单独试剂增加至更大的程度。

[0362] 这些数据表明DLL4拮抗剂可以诱导肿瘤特异性CD8 $^{+}$ T细胞活性,并加强了DLL4拮抗剂和T细胞靶向免疫治疗剂组合是良好的抗肿瘤疗法的假说。

[0363] 实施例5

[0364] 在CT26.WT肿瘤中的CD45 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞

[0365] 基于来自实施例1-4的结果,本发明人进一步研究了作为单一试剂的DLL4拮抗剂、或与免疫治疗剂组合的DLL4拮抗剂的治疗对在免疫细胞上的免疫检查点受体(例如PD-1)的影响。

[0366] 将CT26.WT细胞皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的胁部中。使肿瘤生长直至它们达到平均尺寸为100mm 3 。将小鼠随机分组(n=7),并用抗-mDLL4抗体21R30、mIL-2-Fc、抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合或对照蛋白治疗。抗-mDLL4抗体每周以30mg/kg给药,mIL-2-Fc每周以1mg/kg给药5天。通过注射施用至腹膜内腔中。在肿瘤细胞注射后21天和初次治疗后15天,收获肿瘤,并制备单细胞悬浮液。对CD45而言将细胞使用与FITC缀合的抗-CD45抗体染色,对PD-1而言将细胞使用与别藻蓝蛋白(APC)缀合的抗-PD-1抗体染色。使用FACSCanto II仪器(BD Biosciences, San Jose, CA)进行荧光激活细胞分选分析(FACS),并使用Diva软件处理数据。

[0367] CD45专一性地在血淋巴细胞上表达,并被称为“普通白细胞抗原”。它在所有有核造血细胞及其前体的细胞表面上以高水平表达,因此该蛋白可用于检测肿瘤相关免疫细胞。如上所述,PD-1是在通常参与抑制免疫响应的免疫细胞的细胞表面上的蛋白质。

[0368] 来自经治疗小鼠的肿瘤中CD45 $^{+}$ 细胞和CD45 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞的百分比如图6所示。尽管在个体小鼠之间存在高变化水平,但在来自用mIL-2-Fc治疗的小鼠的肿瘤中CD45 $^{+}$ 细胞的百分比增加。令人感兴趣的是,在来自用抗-mDLL4抗体治疗的小鼠和来自用mIL-2-Fc治疗的小鼠的肿瘤中CD45 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞的百分比减少。这些结果与实施例1中描述的蛋白质印迹分析的数据一致。在来自用抗-mDLL4抗体和mIL-2-Fc的组合治疗的小鼠的肿瘤中CD45 $^{+}$ PD-1 $^{+}$ 细胞的百分比进一步降低。

[0369] 这些结果表明,可以使用DLL4拮抗剂和免疫治疗剂(例如IL2)的组合来减少肿瘤相关PD-1 $^{+}$ 免疫细胞的数量,因此抑制这些细胞的抑制作用。

[0370] 实施例6

[0371] 抗-DLL4抗体、抗-CTLA-4抗体和抗-PD-L1抗体对CT26.WT肿瘤生长的影响

[0372] 将CT26.WT细胞皮下注射至6-8周龄Balb/C小鼠的胁部中。使肿瘤生长至平均肿瘤体积为100mm 3 。将小鼠随机分组(n=9)并用对照抗体(30mg/kg,每周)、抗-mDLL4抗体21R30(30mg/kg,每周)、抗-mPD-L1抗体(10mg/kg,每周3次)、抗-mCTLA-4抗体(10mg/kg,每周3次)、抗-mDLL4抗体和抗-mPD-L1的组合,或者抗-mDLL4抗体和抗-mCTLA-4的组合治疗。试剂通过腹膜内注射施用。监视肿瘤生长,并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均肿瘤体积±SEM。

[0373] 如图7A所示,作为单一试剂,抗-mDLL4抗体将CT26.WT肿瘤抑制至与抗-mPD-L1或抗-mCTLA-4抗体相似的程度。当作为平均肿瘤体积观察时,组合疗法没有明显好于单一试剂。然而,当以小鼠基础评估对小鼠的肿瘤生长的抑制作用时,抗-mDLL4抗体21R30与抗-

mCLTA-4抗体或抗-mPD-L1抗体的组合,与当以单独试剂使用所述抗体时相比,似乎在更多的个体小鼠中对肿瘤生长具有更大的抑制作用(图7B和7C)。

[0374] 这些结果表明,DLL4拮抗剂可以增强免疫检查点抑制剂(例如抗-CCTA-4和抗-PD-L1抗体),并且可以与其协同作用,从而进一步抑制肿瘤生长。

[0375] 实施例7

[0376] 体内CT26.WT结肠肿瘤生长的抑制

[0377] 将CT26.WT肿瘤细胞(20,000个细胞)的单细胞悬浮液皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的胁部中。在肿瘤细胞注射后一周,用抗-mPD-1抗体(250 μ g/小鼠)、抗-mDLL4抗体21R30(20mg/kg)、抗-mPD-1抗体和抗-mDLL4抗体21R30的组合,或者相同量的同种型对照抗体治疗具有可感知肿瘤的小鼠。通过腹膜内注射,对小鼠每周两次施用所述抗体3周。监视肿瘤生长,并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均值±SEM。

[0378] 如图8A所示,与用对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗显著地降低CT26.WT肿瘤生长。与对照组相比,在第23天肿瘤生长抑制78%, $p=0.0016$ 。在第28天对个体小鼠进行的评估在10只小鼠中的3只中未显示可检测的肿瘤(图8B)。在第二实验中,用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗的20只小鼠中的14只未显示可检测的肿瘤。

[0379] 评估抗肿瘤记忆细胞群体的存在和/或功能的一种方法是用新鲜的肿瘤细胞再攻击之前治疗的小鼠。将来自上述研究的、之前用抗-mPD-1抗体($n=11$)或者抗-mPD-1抗体与抗-mDLL4抗体21R30的组合($n=14$)治疗的小鼠用于再攻击研究。将在第一次肿瘤注射后至少85天肿瘤完全消退且不可检测的小鼠用CT26.WT肿瘤细胞(20,000个细胞)再攻击。进行肿瘤再攻击的小鼠在再攻击前66天接受最后一次治疗剂量。用CT26.WT肿瘤细胞(20,000个细胞)作为对照组注射天然(naive)Balb/C小鼠($n=10$)。监视肿瘤生长,并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均值±SEM。

[0380] 如图9所示,天然小鼠中CT26.WT肿瘤的平均肿瘤体积稳定增长直到第28天,此时处死小鼠。与之相对,在之前已经用抗-PD-1抗体或者抗-PD-1抗体与抗-mDLL4抗体21R30的组合治疗的小鼠中CT26.WT肿瘤的平均肿瘤体积非常小(分别为 46mm^3 和 27mm^3)。个体小鼠的评估显示,最初用抗-mPD-1抗体治疗的11只小鼠中的5只(46%)似乎被完全保护(没有可检测的肿瘤),最初用抗-PD-1与抗-mDLL4的组合治疗的小鼠的11/14(79%)被完全保护。

[0381] 将来自在第一次再攻击时未发展肿瘤的各组的5只小鼠用50,000个CT26.WT细胞进行第二次再攻击(2.5倍初始剂量的细胞数)。再次作为对照,用与CT26.WT细胞的数量(50,000细胞/小鼠)相同的CT26.WT细胞注射5只天然小鼠。与早期实验一样,对照组中的所有5只小鼠都发展了大的肿瘤,并在第21天处死。在最初用抗-mPD-1抗体治疗的5只小鼠中的3只中生长了小肿瘤(平均 56mm^3)。在最初用抗-DLL4抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗的小鼠中没有肿瘤生长。这些结果总结在表1中,并且表示为各组中无肿瘤小鼠的百分比。

[0382] 表1

	起始攻击 20,000 细胞	第一次再攻击 20,000 细胞	第二次再攻击 50,000 细胞	
[0383]	对照小鼠 用 抗 -mPD-1 Ab^1 治疗的小鼠 用 抗 -mPD-1 Ab 和 抗 -mDLL4 Ab^1 治疗的小鼠	0% (0/10) 55% (11/20) 70% (14/20)	0% (0/10) 46% (5/11) 79% (11/14)	0% (0/5) 40% (2/5) 100 (5/5)

[0384] ¹仅在起始肿瘤攻击后用抗体治疗的小鼠

[0385] 这些小鼠似乎被强烈的保护免受使用CT26.WT肿瘤细胞的再攻击。这些结果表明在用抗-mDLL4和抗-mPD-1抗体组合治疗后存在免疫原性记忆。

[0386] 实施例8

[0387] 针对IFN- γ 、IL-2和IL-17的ELISpot检验以及针对IL-6的ELISA

[0388] 使用小鼠IFN- γ ELISpot试剂盒(MabTech)检测IFN- γ 分泌细胞。从用抗-mDLL4抗体21R30($n=6$)、抗-mPD-1抗体($n=6$)、抗-mDLL4抗体21R30与抗-mPD-1抗体的组合($n=5$)、或者对照抗体($n=5$)治疗的携带肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。将来自各治疗组的各小鼠的脾细胞($5 \times 10^5/\text{孔}$)分配到用对小鼠IFN- γ 具有特异性的抗体包被的96孔板中。将细胞在存在或不存在肿瘤特异性CD8 $^+$ T细胞肽(AH-1)的情况下培养并温育48小时。按照制造商说明书检测分泌IFN- γ 的细胞。使用Bioreader 6000F-z仪器(BioSys)将斑点计数。数据表示为平均值±SEM。

[0389] 如图10A所示,在用抗-mPD-1抗体治疗的小鼠和在用抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合治疗的小鼠中肿瘤特异性IFN- γ 分泌CD8 $^+$ T细胞增加。

[0390] 使用小鼠IL-2ELISpot试剂盒(MabTech)检测IL-2分泌细胞。从用抗-mDLL4抗体21R30($n=6$)、抗-mPD-1抗体($n=6$)、抗-mDLL4抗体21R30与抗-mPD-1抗体的组合($n=5$)、或者对照抗体($n=5$)治疗的携带肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。将来自各治疗组的各小鼠的脾细胞($5 \times 10^5/\text{孔}$)分配到用对小鼠IL-2具有特异性的抗体包被的96孔板中。将细胞在存在或不存在AH-1肽的情况下温育48小时。按照制造商说明书检测分泌IL-2的细胞。使用Bioreader 6000F-z仪器(BioSys)将斑点计数。数据表示为平均值±SEM。

[0391] 如图10B所示,仅在用抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合治疗的小鼠中IL-2分泌细胞增加。

[0392] 使用小鼠IL-17ELISPOT试剂盒(MabTech)检测IL-17分泌细胞。从用抗-mDLL4抗体21R30($n=6$)、抗-mPD-1抗体($n=6$)、抗-mDLL4抗体21R30与抗-mPD-1抗体的组合($n=5$)、或者对照抗体($n=5$)治疗的携带肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。将来自各治疗组内的各小鼠的脾细胞($5 \times 10^5/\text{孔}$)分配到用对小鼠IL-17具有特异性的抗体包被的96孔板中。将细胞温育48小时。按照制造商说明书检测分泌IL-17的细胞。使用Bioreader 6000F-z仪器(BioSys)将斑点计数。数据表示为平均值±SEM。

[0393] 如图10C所示,在用抗-mDLL4抗体21R30治疗的小鼠中和在用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗的小鼠中IL-17分泌细胞减少。在随后的实验中,显示作为单一试剂的抗-mPD-1抗体,抗-mDLL4抗体与抗-mVEGF抗体的组合、以及抗-mDLL4抗体、抗-mVEGF抗体和抗-mPD-1抗体的三者组合在经治疗的小鼠的脾中不降低IL-17分泌细胞的数量(数据未显示)。这表明以与VEGF组合阻断DLL4或者与VEGF和PD-1组合阻断DLL4的机制相比,单独阻断DLL4可以具有调节免疫响应的不同机制。

[0394] 使用小鼠IL-6ELISA试剂盒(eBioscience)检测IL-6产生。从用抗-mDLL4抗体21R30(n=6)、抗-mPD-1抗体(n=6)、抗-mDLL4抗体21R30与抗-mPD-1抗体的组合(n=5)、或者对照抗体(n=5)治疗的携带肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。将来自各治疗组内的各小鼠的脾细胞(5x 10⁵/孔)分配到96孔板中。将细胞在肿瘤特异性CD8⁺T细胞肽(AH-1)的存在或不存在下培养,并温育48小时。按照制造商说明书在各细胞上清液中检测IL-6的水平。使用SpectraMax Plus仪器(Molecular Devices)对所述板读数。数据表示为平均值±SEM。

[0395] 在AH-1肽的存在或不存在下温育的细胞的上清液中的IL-6产生相同。如图10D所示,与来自仅用抗-mDLL4抗体21R30或对照抗体治疗的小鼠的脾细胞产生的IL-6相比,来自用抗-mPD-1抗体治疗的小鼠和在用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD1抗体的组合治疗的小鼠中的脾细胞产生的IL-6水平极大地降低。

[0396] IFN- γ 通常由NK细胞、Th1CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、抗原呈递细胞和B细胞产生。研究已经表明IFN- γ 在肿瘤免疫力中的作用,并且它可能是由其它细胞因子(特别是IL-12和IL-2)介导的抗肿瘤活性的调节剂。IL-2的主要来源是Th1CD4⁺T细胞,其主要作用是以自分泌和旁分泌的方式促进T细胞和NK的激活和增殖。特别是,NK细胞暴露于IL-2导致增殖并且增强细胞溶解活性。另外,IL-2是记忆T细胞的维持和存活所必需的。因此,用导致IFN- γ 和/或IL-2增加的DLL4拮抗剂和/或抗-mPD-1抗体进行治疗应该增强抗肿瘤免疫力。IL-17由T_H17细胞产生,TH17细胞是辅助T细胞的一个子集,被认为在自身免疫疾病中具有促炎作用。IL-17通过局部诱导趋化因子和刺激G-CSF和GM-CSF产生而有助于募集单核细胞和粒细胞谱系的骨髓细胞。针对肿瘤的免疫响应的失效或不存在的一个因素可以是同时存在源自单核细胞和粒细胞谱系的MDSC。肿瘤特异性T_H17细胞可以在促进骨髓细胞对肿瘤的吸引发挥作用,从而促进免疫抑制环境。因此DLL4拮抗剂降低肿瘤特异性T_H17细胞的频率和产生IL-17的能力可以减少MDSC的产生并提高抗肿瘤免疫力。IL-6通常由巨噬细胞、内皮细胞和一些激活的T细胞产生。与IFN- γ 和IL-2相反,IL-6的过表达似乎在许多癌症的发病机制中起作用。因此,用导致IL-6生产降低的DLL4拮抗剂和/或抗-PD-1抗体治疗应该增强抗肿瘤免疫力。

[0397] 实施例9

[0398] 骨髓来源的抑制细胞和激活的骨髓细胞的FACS分析

[0399] 研究已经鉴定骨髓来源细胞是肿瘤免疫力的有效抑制子,因此是癌症免疫疗法的重大障碍(参见,例如,Ostrand-Rosenberg等,2009,J. Immunol.,182:4499-4506)。大在多数具有癌症的患者和实验动物中MDSC累积在血液、淋巴结、骨髓和肿瘤部位处。MDSC已经显示抑制适应性和先天性免疫。

[0400] 认为MDSC通过抑制抗肿瘤免疫响应、促进血管生成和形成转移前的环境来促进癌症进展。MDSC抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的增殖和激活,从而抑制抗肿瘤免疫力。重要的是,

MDSC促进Treg细胞的产生。

[0401] MDSC是骨髓细胞的异质家族(heterogeneous family)。在小鼠中,MDSC的特征在于骨髓谱系分化抗原Gr1和CD11b的细胞表面表达。MDSC可以分为两个亚群:粒细胞性MDSC(G-MDSC)和单核细胞性MDSC(M-MDSC)。G-MDSC通常具有多叶核和CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^低表型,而M-MDSC具有单核细胞形态和CD11b⁺Ly6G^{+/-}Ly6C^高表型。MDSC的两个群体已显示通过多种机制抑制T细胞响应,所述机制包括精氨酸酶、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮和活性氧物质的产生增加。因此,MDSC有助于免疫抑制性肿瘤微环境,并可以限制抗肿瘤免疫响应的作用。

[0402] 评估了在用DLL4拮抗剂和/或抗-PD1抗体治疗的小鼠中MDSC的数量。从用抗-mDLL4抗体21R30(n=6)、抗-mPD-1抗体(n=6)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合(n=5)、或对照抗体(n=5)治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。

[0403] 使用阻断溶液将新鲜制备的单细胞悬浮液阻断10分钟,然后用在FACS缓冲液(HBSS加2%FCS)中的抗-小鼠Gr1(克隆RB6-8C5,BioLegend)和抗-小鼠CD11b(克隆M1/70,BioLegend)在冰上染色20分钟。通过用抗-小鼠CD11b和抗-小鼠MHC II类抗体染色脾细胞来分析激活的骨髓细胞群体。将细胞洗涤、用可固定细胞活力染料(eBiosciences)标记,并固定在2%多聚甲醛中以用于分析。使用FACSCanto II仪器(BD Sciences)并使用Diva软件分析细胞。使用活力染料排除死细胞,并使用双重鉴别门控排除细胞双峰和团块。就M-MDSC和激活的骨髓群体来分析细胞。

[0404] 如图11所示,与用抗-mPD-1抗体单独或者用对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R30单独或者抗体21R30与抗-mPD-1抗体组合治疗降低了在来自携带肿瘤的小鼠的脾中M-MDSC的百分比。与之相反,与对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R30单独、抗-mPD-1抗体单独或者抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗增加了激活骨髓细胞的百分比。

[0405] 这些数据表明,靶向DLL4可以有助于通过降低这些免疫抑制细胞的百分比和/或数量来抑制MDSC的抑制活性。该结果与我们的假设一致,即DLL4拮抗剂治疗可以通过降低肿瘤特异性T_H17细胞的频率来减少MDSC的产生并促进产生性(productive)抗肿瘤免疫力。在肿瘤微环境中MDSC数量的降低和/或骨髓细胞的激活可以甚至更大,但是由于治疗后的肿瘤尺寸小,在这点上这尚未及时评估。

[0406] 实施例10

[0407] 记忆T细胞的FACS分析

[0408] 记忆T细胞是一种异质T细胞群,并基于表型和功能分为两个不同的亚型(中央记忆T细胞和效应子记忆T细胞)。在小鼠中,中央和效应子记忆CD8⁺T细胞可以根据其各自的CD44和CD62L表达水平而分成两个不同的群体。CD44^高CD62L^低CD8⁺T细胞群体迅速获得构成效应子记忆的效应子功能,而表达CD44^高CD62L^高群体的CD8⁺T细胞在抗原识别时获得明显的增殖能力,并构成中央记忆T细胞。

[0409] 评估在用抗-PD1和/或抗-mDLL4抗体治疗的小鼠中的中央记忆细胞或效应子记忆CD8⁺T细胞的数量。从用抗-mDLL4抗体21R30(n=6)、抗-mPD-1抗体(n=6)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合(n=5)、或对照抗体(n=5)治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中分离细胞。

[0410] 使用抗-小鼠CD8b(克隆53-5.8,BioLegend)、抗-小鼠CD4(克隆GK1.5,BioLegend,Clone)、抗-小鼠CD62L(克隆MEL-14,BioLegend)和抗-小鼠CD44(克隆1M7,BioLegend)如上所述完成FACS染色。分析细胞的CD44^高CD62L^高表达(中央记忆)和CD44^高CD62L^低CD8⁺表达(效应子记忆)。

[0411] 如图12所示,与用抗-mPD-1抗体单独或用对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R30单独或抗-mDLL4抗体21R30与抗-mPD-1抗体组合治疗增加了脾中央记忆和效应子记忆CD8⁺T细胞的百分比。

[0412] 这些结果表明,DLL4拮抗剂和抗-PD-1抗体的组合有助于产生中央和效应子记忆CD8⁺T细胞。这些记忆T细胞可以提供长期的免疫记忆功能,并且用于提供针对肿瘤复发和/或转移的免疫响应。这些结果也与我们的假设一致,通过降低肿瘤特异性T_H17细胞的频率,DLL4拮抗剂治疗减少了MDSC的产生,从而使T细胞能够产生(mount)更有生产性和实质性的抗肿瘤免疫响应。DLL4拮抗剂的不同机制能够补充和促进免疫检查点抑制剂(例如抗-PD-1抗体)促进的抗肿瘤响应。

[0413] 实施例11

[0414] 调节性T-细胞(Treg)检验

[0415] Treg是抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖性响应的免疫T细胞群。通过确定Treg对天然CD4⁺或CD8⁺T细胞的增殖具有的作用而评价在用DLL4拮抗剂和/或PD-1抗体治疗的小鼠中Treg的功能性。

[0416] 使用小鼠CD3⁺T细胞富集柱(R&D Systems)从未治疗的小鼠的脾中纯化天然T细胞。经纯化的T细胞用5μM紫色跟踪染料(VTD)(Life Technologies)标记。2x 10⁵个经VTD标记的T细胞用抗-CD3和抗-CD28抗体包被的珠刺激以刺激T细胞增殖。使用Treg分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从用抗-mDLL4抗体21R30(n=6)、抗-PD-1抗体(n=6)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-PD-1抗体的组合(n=5)、或对照抗体(n=5)治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中分离Treg。为了确定Treg对T细胞增殖的影响,将经VTD标记的天然T细胞与来自以下小鼠的分离脾Treg共培养:用抗-mDLL4抗体治疗的小鼠,用抗-mPD-1抗体治疗的小鼠,用抗-mDLL4抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗的小鼠,以及用对照抗体治疗的小鼠。将刺激的经VTD标记的细胞(效应子)与Treg细胞(效应子:Treg为1:0.5或1:0.25)共培养。在第4天,将细胞洗涤,用抗-mCD4和抗-mCD8抗体染色。通过FACS分析评估VTD浓度的变化,结果用于计算T细胞增殖。

[0417] 如图13所示,用抗-mPD-1抗体治疗降低了Treg对CD4⁺T细胞增殖的抑制功能。用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗也降低了Treg对CD4⁺T细胞增殖的抑制功能,但是程度较小。与之相对,用抗-DLL4抗体21R30治疗在降低Treg对CD8⁺T细胞增殖的抑制功能方面比抗-mPD-1抗体具有更大的效应。并且令人感兴趣的是,用抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗在降低Treg对CD8⁺T细胞增殖的抑制功能方面比任一抗体单独都具有显著更大的效应。

[0418] 这些结果表明,DLL4拮抗剂和抗-PD-1抗体的组合可以导致Treg功能降低。Treg功能的抑制可以增强总的抗肿瘤免疫响应。这些结果与我们的假设一致,即通过降低肿瘤特异性T_H17细胞的频率,DLL4拮抗剂治疗降低MDSC的产生,从而促进更稳健的免疫响应。MDSC通过PD-L1/B7-H1和精氨酸酶在内的数种机制而有助于Treg的维持和扩增。DDR4拮抗剂的

不同机制既能作为单一试剂促进抗肿瘤免疫力,又能补充检查点抑制剂(例如抗-PD-1)的作用。

[0419] 实施例12

[0420] T细胞的细胞毒性检验

[0421] 评估了用DLL4拮抗剂和/或抗-PD-1抗体治疗的小鼠中CD8⁺细胞毒性T细胞的功能。从用抗-mDLL4抗体21R30(n=6)、抗-mPD-1抗体(n=6)、抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合(n=5)、或对照抗体(n=5)治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中收获细胞。在补充有30IU/ml重组鼠类IL-2(Peprotech, Rocky Hill, NJ)和1μg/ml CD8⁺T细胞肽AH-1肽的培养基中培养脾细胞。脾细胞在37℃下温育7天,收获,计数,并与作为靶标的CT26.WT肿瘤细胞一起的细胞毒性检验。将CT26.WT靶细胞用10μM钙黄绿素AM(Life Technologies)在37℃下标记1小时,然后以效应子:靶标比例为50:1与脾细胞组合。在37℃下温育4小时后,收获无细胞上清液,在荧光计上于激发485nm和发射535nm下将钙黄绿素释放定量。特异性细胞裂解的百分比确定为:裂解% = 100x (ER-SR) / (MR-SR),其中ER、SR和MR分别代表实验释放、自发释放和最大钙黄绿素释放。自发释放是由在单独培养基(即,在没有效应子细胞的情况下)中温育的靶细胞发散的荧光,而最大释放通过用等体积的10% SDS裂解靶细胞来确定。

[0422] 如图14所示,与对照相比,来自用抗-mDLL4抗体21R30或者抗-mDLL4抗体21R30和抗-mPD-1抗体的组合治疗的小鼠的肿瘤特异性CD8⁺T细胞对亲本肿瘤细胞的细胞溶解活性水平增加,并且抗-mDLL4抗体和抗-mPD-1抗体的组合相对于单一试剂进一步增加CD8⁺T细胞活性。

[0423] 这些结果表明,DLL4拮抗剂和抗-PD-1抗体的组合增加细胞溶解性CD8⁺T细胞功能。该增加的细胞溶解性T细胞功能可以增强总抗肿瘤免疫响应。这些结果也与我们的假设一致:即,通过降低肿瘤特异性T_H17细胞的频率,DLL4拮抗剂治疗减少MDSC的产生,从而促进增加的细胞溶解性T细胞功能和更稳健的总抗肿瘤免疫响应。

[0424] 实施例13

[0425] 通过IHC评估的PD-L1蛋白表达

[0426] 使用PD-L1免疫组织化学(IHC)检验来确定样品中PD-L1的表达水平。切出FFPE切片并安装在包被的载玻片上。通过将其在二甲苯、100%乙醇、95%乙醇、70%乙醇和蒸馏水中连续温育而将组织脱石蜡和复水,以用于抗原恢复(antigen retrieval)。将载玻片置于恢复溶液中并置于修复液(decloaker)中以用于抗原恢复。为了阻断内源性过氧化物酶活性,将载玻片在6%过氧化氢中温育5分钟,并在PBS中洗涤。为了阻断非特异性背景染色,将载玻片在CAS-Block(Life Technologies)中于室温下温育30分钟。将载玻片与抗-PD-L1抗体一起温育。使用用辣根过氧化物酶标记的第二抗体检测抗-PD-L1抗体。抗体复合物用过氧化氢底物和3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)色素原可视化,其产生褐色沉淀。

[0427] 手动或使用自动化仪器分析载玻片。测量各肿瘤细胞的染色强度(0:无表达,1:弱表达,2:中等表达,3:强表达),将各染色水平的细胞计数,并计算各类型的百分比。将数据组合成各组织切片的加权H分数:H分数=[3x(%3+细胞)]+[2x(%2+细胞)]+[1x(%1+细胞)]。该计算允许最高H分数为300。阳性和阴性对照可以包括从商业供应商购买的人体组织切片以及具有已知PD-L1表达水平的来自OncoMed肿瘤库的源自患者的异种移植物样品。

[0428] 实施例14

[0429] 在具有实体肿瘤的受试者中,利用或不利用化疗法的登西珠单抗(OMP-h21M18)与派姆单抗(抗-PD-1;KEYTRUDA)组合的1期研究

[0430] 该研究是在具有晚期或转移性实体肿瘤的受试者中利用或不利用化疗法的登西珠单抗(OMP-h21M18)与派姆单抗(抗-PD-1;KEYTRUDA)组合的开放标签的1b期剂量递增和扩展研究。研究的主要目的是确定剂量限制性毒性(DLT),评估登西珠单抗与派姆单抗的最大耐受剂量(MTD),并鉴定DLT,和评估与培美曲塞和卡铂一起施用的登西珠单抗和派姆单抗的MTD。次要目标是确定与各单一试剂药物暴露相比登西珠单抗和派姆单抗的安全性,免疫原性发生率,药代动力学,通过基于免疫的标准评估的初步响应速率,以及初步功效。

[0431] 大约6-12名患者将参加与派姆单抗组合的登西珠单抗的剂量递增阶段。当与派姆单抗组合给予时,将进行剂量递增,以确定登西珠单抗的MTD。每个登西珠单抗剂量水平将测试约两个组。登西珠单抗的剂量水平为静脉内注射2.5和5mg/kg,每3周施用一次,直到63天。在没有疾病进展的情况下,如果受试者满足研究标准,则从第168天开始施用研究药物(登西珠单抗,1、2.5或5mg/kg)的第二疗程,每3周一次,4个剂量。在剂量组中不允许剂量递增或减少,并且可以添加中间剂量组。如果在单个组中两个以上患者经历≥2级归因于登西珠单抗或派姆单抗的不良事件或者观察到一种以上DLT,将有另外的组采用较小的增量剂量。

[0432] 最初将以2.5mg/kg登西珠单抗和2mg/kg派姆单抗剂量水平治疗3名患者。如果3名受试者中的1名经历DLT,该剂量水平将扩大至6名受试者。如果2名以上患者经历DLT,则不会对其他患者以该水平给药,另外3名患者将以1mg/kg登西珠单抗和2mg/kg派姆单抗剂量水平进行测试。从第一次给药的时间至第21天评估患者的DLT。如果合适,会在组中的所有患者完成其第21天DLT评估后进行剂量递增。测试的登西珠单抗的最大剂量为5mg/kg。一旦已经建立了登西珠单抗的MTD,患者被招募进入组扩大阶段(cohort expansion stage)。

[0433] 大约30名患者将参与指标特异性扩大阶段(indication specific expansion stage)。该阶段包括多个组,以更好地表征在不同癌症类型中与派姆单抗组合的登西珠单抗的安全性,耐受性,PK变化,抗肿瘤活性的生物标记物,以及初步疗效。计划的扩大组将包括但可以不限于:用多达2个之前系列(lines)化疗法治疗的具有非鳞状IIIB/IV期NSCLC的患者,对之前用抗-PD1或抗PDL-1抑制剂治疗具有进展的患有任何实体肿瘤的患者,对之前疗法具有进展的具有阉割抗性前列腺癌的患者,用多达3个之前系列化疗法治疗的具有结肠直肠癌的患者,以及用多达2个之前系列化疗法治疗的具有胰腺癌的患者。

[0434] 在包括NSCLC患者的扩大组中,加入卡铂和培美曲塞的剂量递增将以与2mg/kg派姆单抗组合的一个剂量水平低的登西珠单抗MTD开始。三名患者将以与培美曲塞和卡铂组合的-1剂量水平的登西珠单抗和2mg/kg派姆单抗剂量水平开始治疗。登西珠单抗通过静脉内输注施用,每3周一次,直到第63天。在没有疾病进展的情况下,如果受试者的第168天BNP≤100pg/mL,三尖瓣峰速度<3.0m/s并且LVEF≥50%,并且所述受试者满足标准,则在第168天开始将施用第二疗程的研究药物(登西珠单抗,1、2.5或5mg/kg),每3周1次,4个剂量。派姆单抗以每3周一次静脉内注射30分钟2mg/kg的剂量施用。500mg/m²的培美曲塞将每21天一次静脉内输注10分钟。6mg/m² x分钟的卡铂每21天一次静脉内输注15~60分钟,4个循环(如果疾病进展或毒性需要治疗中断或终止,则小于4个完整周期)。如果3名受试者中的1名

经历DLT,该剂量水平将扩大至6名受试者。如果2名以上患者经历DLT,则没有进一步的患者将以该水平给药,另外3名患者将以1mg/kg登西珠单抗和mg/kg派姆单抗剂量水平进行测试。患者将从第一剂量至第21天的时间评估DLT。如果合适,会在组中的所有患者完成其第21天DLT评估后进行剂量递增。测试的登西珠单抗的最大剂量为5mg/kg。一旦已经建立了与派姆单抗一起的登西珠单抗的MTD,大约10名具有之前未治疗的IIIB/IV期非鳞状NSCLC患者将参与组扩大阶段。设计该阶段以进一步表征登西珠单抗、派姆单抗、培美曲塞和卡铂组合的安全性和耐受性,以及以评估初步功效。对于其它指标(indications),化疗法会通常包括护理标准组合。

[0435] 实施例15

[0436] 使用抗-DLL4、抗-VEGF和抗-PD-1抗体的组合体内抑制肿瘤生长

[0437] 将CT26.WT肿瘤细胞(30,000细胞)的单细胞悬浮液皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的胁部。肿瘤接种后十天,具有可感知肿瘤(约125-130mm³)的小鼠用抗-mPD-1抗体(250μg/小鼠,1周2次),抗-mDLL4抗体21R50(5mg/kg,每周1次)和抗-mVEGF抗体(2.5mg/kg,每周1次)的组合,抗-mPD-1抗体、抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体的组合,或者对照抗体(20mg/kg,1周2次)治疗。通过腹膜内注射对小鼠施用抗体3周。监视肿瘤生长,并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均值±SEM。

[0438] 如图15A所示,与用对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R50、抗-mVEGF抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗显著降低CT26.WT肿瘤生长。在第27天在经治疗小鼠中的平均肿瘤生长与经对照抗体治疗的小鼠相比得到了89%抑制。与用对照抗体治疗相比,抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体的组合治疗显著降低CT26.WT肿瘤生长。在第27天在经治疗小鼠中的平均肿瘤生长与经对照抗体治疗的小鼠相比得到了86%抑制。作为单一试剂的抗-mPD-1抗体不是那么有效,并且与用对照抗体治疗的小鼠相比仅将肿瘤生长抑制了59%。

[0439] 在第27天用抗-mDLL4抗体21R50、抗-mVEGF抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗的个体小鼠的评估显示,20只小鼠中的10只(50%)具有的肿瘤与治疗之前肿瘤尺寸相同或已经消退至比治疗之前肿瘤尺寸小的尺寸。用抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体的组合治疗的个体小鼠的评估显示,10只小鼠中的5只(50%)具有的肿瘤与治疗之前肿瘤尺寸相同或已经消退至比治疗之前肿瘤尺寸小的尺寸,并且仅用抗-mPD-1抗体治疗的小鼠的评估显示,15只小鼠中的6只(40%)具有的肿瘤与治疗之前肿瘤尺寸相同或已经消退至比治疗之前肿瘤尺寸小的尺寸

[0440] 这些结果表明,CT26.WT肿瘤细胞中对DLL4、VEGF和PD-1的阻断具有抗肿瘤功效,并且功效可能优于单独的PD-1阻断。

[0441] 用鼠类肾腺癌Renca进行了类似的实验。将Renca肿瘤细胞(5x 10⁵个细胞)的单细胞悬浮液皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的胁部中。肿瘤接种后8天,将具有可感知肿瘤(约60mm³)的小鼠用抗-mPD-1抗体(10mg/kg,1周2次),抗-mDLL4 21R50(10mg/kg,每周1次),抗-mDLL4抗体21R50(10mg/kg,每周1次)和抗-mVEGF抗体(10mg/kg,每周1次)的组合,抗-mDLL4抗体21R50(10mg/kg,每周1次)和抗-mPD-1抗体(10mg/kg,1周2次)的组合,抗-mPD-1抗体、抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体的组合,或者对照抗体(20mg/kg,1周2次)治疗。通过腹膜内注射对小鼠施用抗体3周。监视肿瘤生长,并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均值±SEM。

[0442] 如图15B所示,与用对照抗体治疗相比,用抗-mDLL4抗体21R50、抗-mVEGF抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗显著降低Renca肿瘤生长。在第17天在经治疗小鼠中的平均肿瘤生长与经对照抗体治疗的小鼠相比得到了86%抑制。与用对照抗体治疗相比,抗-mDLL4抗体21R50和抗-mVEGF抗体的组合治疗也降低Renca肿瘤生长(78%)。与之相对,用抗-PD-1抗体作为单一试剂治疗不抑制肿瘤生长。

[0443] 与CT26.WT细胞中看到的相似,这些结果表明,肿瘤细胞中对DLL4、VEGF和PD-1的阻断具有抗肿瘤功效。

[0444] 实施例16

[0445] 中央记忆T细胞的FACS分析

[0446] 从上述(实施例15)携带CT26.WT肿瘤的小鼠的脾中收获细胞。在注射细胞后第30天分离脾细胞。将脾细胞(1×10^6)与重组Fc蛋白一起温育10分钟以阻断非特异性结合,然后与在100 μ l FACS染色缓冲液(HBSS加2%热灭活小牛血清)中的荧光染料缀合的抗体一起在冰上温育20分钟。通过洗涤除去未结合的抗体,将死细胞用可固定的活力染料(fixable viability dye)标记。将细胞在室温下在2%多聚甲醛中固定20分钟,并使用FACSCanto II仪器和FACSDiva Software v6.1.3(BD Biosciences)进行分析。

[0447] 总T细胞使用抗-小鼠CD3e抗体鉴定,CD4+T细胞使用抗-小鼠CD4抗体鉴定,并且CD8+T细胞使用抗-小鼠CD8抗体鉴定。中央记忆细胞使用抗-小鼠/人CD44抗体和抗-人CD62L抗体鉴定。使用抗-小鼠CD8b抗体(克隆53-5.8,BioLegend)、抗-小鼠CD4抗体(克隆GK1.5,BioLegend)、抗-小鼠CD62L抗体(克隆MEL-14,BioLegend)和抗-小鼠CD44抗体(克隆1M7,BioLegend)如上所述完成FACS染色。分析细胞的CD44^高CD62L^高表达,其指示中央记忆细胞(门控于CD8+T细胞)。

[0448] FACS分析表明,与用对照抗体治疗的小鼠相比,用抗-mDLL4抗体、抗-mVEGF抗体和抗-mPD-1抗体的组合治疗的携带CT26.WT肿瘤的小鼠在CD4+T细胞群体内和在CD8+T细胞群体内具有的中央记忆细胞的百分比增加(图16)。与之相对,用抗-mDLL4和抗-mVEGF的组合治疗的小鼠或者用抗-mPD1抗体作为单一试剂治疗的小鼠在中央记忆细胞的百分比方面不具有明显的变化。

[0449] 实施例17

[0450] 肿瘤样品中的细胞因子表达

[0451] 从以上实施例15中所述的携带CT26.WT肿瘤的小鼠获取肿瘤样品。对于免疫响应基因表达,对从肿瘤样品获得的总RNA进行定量实时RT-PCR。预期肿瘤样品包含肿瘤细胞、与肿瘤相关的免疫细胞以及附着至肿瘤样品的任何基质细胞。收获肿瘤试样,并立即快速冷冻并储存于-80°C,然后进行RNA分离。使用RNeasy Fibrous Mini Kit (Qiagen, Valencia CA, PN#74704) 利用TissueLyzer匀质化以及DNA酶I处理根据制造商策略提取总RNA。将RNA在Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) 上可视化,并验证为完整的,RIN值>6.0。所有RNA的A260/A280比率>1.8。

[0452] 使用随机六聚体从总RNA合成cDNA。将cDNA和PCR Master Mix添加到TaqMan阵列免疫响应板(Applied Biosystems/Life Technologies),并根据制造商策略在实时PCR仪器上运行反应。

[0453] 如图17A和17B所示,用抗-mDLL4、抗-mVEGF和抗-mPD-1的组合治疗增加肿瘤样品

中IL-2、粒酶B和CCL2的基因表达。用抗-mPD-1作为单一试剂治疗在肿瘤位点处增加IFN- γ 的基因表达，并且降低IL-6的基因表达。另外，所有治疗都降低IL-18的基因表达。

[0454] 已经显示IL-18具有多效性功能，并且似乎在癌症中起双重作用(参见例如,Palma等,2013,Biochimica et Biophysica Acta,1836:296-303)。IL-18通常被认为是Th1型响应的一部分，可以预期会看到增加的IL-18表达水平。这些结果将被进一步评估。IL-2是CD8+记忆T细胞继发性群体扩增(secondary population expansion)所必需的，因此这些结果表明对DLL4、VEGF和PD-1的三重阻断可以增加T细胞激活、T细胞维持和记忆T细胞功能。CCL2(CC基序配体2)是趋化因子，也称为单核细胞趋化蛋白1(MCP1)和小诱导性细胞因子A2。已经显示趋化因子将单核细胞、记忆T细胞和树突状细胞募集到炎症和肿瘤的部位。免疫细胞的募集可增强抗肿瘤响应。然而，在一些研究中，已经发现趋化因子促进肿瘤发生，因此，该结果将需要进一步研究。粒酶B是在CTL和NK细胞的颗粒中发现的丝氨酸蛋白酶。其与成孔蛋白穿孔素一起被这些细胞分泌，以介导靶细胞中的凋亡。粒酶B的增加表达表明在用抗-mDLL4、抗-mVEGF和抗-mPD-1治疗的小鼠中在肿瘤部位处存在活性肿瘤杀死细胞。

[0455] 实施例18

[0456] 体内CT26.WT结肠肿瘤生长的抑制

[0457] 将CT26.WT肿瘤细胞(30,000个细胞)的单细胞悬浮液皮下注射到6-8周龄Balb/C小鼠的胁部中。在肿瘤注射后第6天，具有平均尺寸约43mm³的肿瘤的小鼠随机分组(n=10)并用抗-mPD-1抗体(10mg/kg)、抗-Notch2/3抗体59R5(40mg/kg)、抗-mPD-1抗体和抗-Notch2/3抗体59R5的组合，或者同种型对照抗体治疗。通过腹膜内注射对小鼠每周2次施用抗-PD-1抗体3周，每周1次施用抗-Notch2/3抗体3周。监视肿瘤生长，并使用电子卡尺在指定的时间点测量肿瘤体积。数据表示为平均值±SEM。

[0458] 如图18中所示，与用对照抗体治疗相比，用抗-Notch2/3抗体59R5和抗-mPD-1抗体的组合治疗显著降低CT26.WT肿瘤生长。在第24天与对照相比，肿瘤生长得到了80%抑制。与之相对，与对照相比，作为单一试剂的抗-PD-1抗体仅将肿瘤生长抑制46%，并且与对照相比，观察到用抗-Notch2/3抗体59R5治疗增加肿瘤生长。在该实验中，在用抗-Notch2/3抗体和抗-PD-1抗体的组合治疗的10只小鼠中的3只中肿瘤消退至不可检测的水平，并且在第90天仍然不可检测。与之相对，在用抗-PD-1抗体作为单一试剂治疗的仅1只小鼠中观察到肿瘤消退。

[0459] 这些结果表明，用与免疫治疗剂组合的Notch途径抑制剂(包括Notch受体拮抗剂)以及DLL4拮抗剂治疗对于抑制肿瘤生长是有效的。此外，在一些受试者中，治疗成功地将肿瘤消退至不可检测的水平，无复发。

[0460] 应理解的是，本文描述的实施例和实施方式仅出于说明性目的，本领域技术人员据此可以想到多种修改或改变，且这些修改和改变也包含在本申请的主旨和范围内。

[0461] 本文引用的所有公开物、专利、专利申请、互联网网址以及登录号/数据库序列(包括多核苷酸和多肽序列)出于所有目的通过援引并入本文，其程度等同于每个单独的公开物、专利、专利申请、互联网网址或登录号/数据库序列均专门且单独地指明如此通过援引并入。

[0462] 本申请中公开的序列为：

[0463] 21M18重链CDR1 (SEQ ID NO:1)

- [0464] TAYYIH
- [0465] 21M18-H2重链CDR2 (SEQ ID NO:2)
- [0466] YISCYNGATNYNQKFKG
- [0467] 21M18-H7重链CDR2 (SEQ ID NO:3)
- [0468] YISSYNGATNYNQKFKG
- [0469] 21M18-H9重链CDR2 (SEQ ID NO:4)
- [0470] YISVYNGATNYNQKFKG
- [0471] 21M18重链CDR3 (SEQ ID NO:5)
- [0472] RDYDYDVGMDY
- [0473] 21M18轻链CDR1 (SEQ ID NO:6)
- [0474] RASESVDNYGISFMK
- [0475] 21M18轻链CDR2 (SEQ ID NO:7)
- [0476] AASNQGS
- [0477] 21M18轻链CDR3 (SEQ ID NO:8)
- [0478] QQSKKEVPWTFGG
- [0479] 21M18-H2重链可变区 (SEQ ID NO:9)
- [0480] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISCYNGATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0481] 21M18-H7重链可变区 (SEQ ID NO:10)
- [0482] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0483] 21M18-H9重链可变区 (SEQ ID NO:11)
- [0484] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISVYNGATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0485] 21M18轻链可变区 (SEQ ID NO:12)
- [0486] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESDVNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGS
GSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKKEVPWTFGGTKVEIK
- [0487] 具有加下划线的预测信号序列的人DLL4胞外域 (SEQ ID NO:13)
- [0488] MAAASRSASGW~~ALL~~LLVALWQQRAAGSGVFQLQLQE~~F~~INERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKH~~Q~~AVV
SPGPCTFGTVSTPVLG~~TNS~~FAVRDDSSGGRNPLQLPFNFTWPGTFS~~L~~IIEAWHAPGDDL~~R~~PEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWL~~D~~EQT~~ST~~LTRLRYSYRVICSDNYYGDNC~~SRL~~CKKRNDHFHYVCQPDGNLSC~~L~~PGWTGEYCQQP~~I~~C~~L~~
SGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIP~~H~~NGCRHGT~~C~~STPWQCT~~D~~EGWGLFC~~D~~QDLNYCTHSPCKNGATC
SNSGQR~~S~~YTCTCRPGY~~T~~VDCELE~~L~~SECDSN~~P~~CRNGSCKDQ~~E~~GYHCLCP~~G~~YYGLHCEH~~S~~TLSCADSPCFNG~~G~~
RERNQGAN~~Y~~ACECPPNFTGS~~N~~CEKKVDR~~C~~TSNP~~C~~ANGGQCLNRG~~P~~SRMC~~R~~PGFTGTYCELHVSDCARNPCA~~H~~GGT
CHDLENGLMCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFN~~R~~ATCY~~T~~DLSTD~~T~~FVCNC~~P~~YGFVGS~~R~~CEFPVG
- [0489] 具有加下划线的预测信号序列的人DLL4N-末端区 (SEQ ID NO:14)
- [0490] MAAASRSASGW~~ALL~~LLVALWQQRAAGSGVFQLQLQE~~F~~INERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKH~~Q~~AVV
SPGPCTFGTVSTPVLG~~TNS~~FAVRDDSSGGRNPLQLPFNFTWPGTFS~~L~~IIEAWHAPGDDL~~R~~PEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQN

- [0491] 人DLL4DSL区 (SEQ ID NO:15)
- [0492] WLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC
- [0493] 具有加下划线的预测信号序列的人DLL4氨基酸1-217 (SEQ ID NO:16)
- [0494] MAAASRSASGWALLLVALWQQRAAGSGVQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVV
SPGPCTFGTVSTPVLTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDL RPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWL DEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC
- [0495] 人DLL4氨基酸27-217 (SEQ ID NO:17)
- [0496] SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLTNSFAVRDD
SGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDL RPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWL DEQTSTLTRLRYSYR
VICSDNYYGDNCRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC
- [0497] 人DLL4氨基酸66-73 (SEQ ID NO:18)
- [0498] QAVVSPGP
- [0499] 人DLL4氨基酸139-146 (SEQ ID NO:19)
- [0500] LISKIAIQ
- [0501] 219R45重链CDR1 (SEQ ID NO:20)
- [0502] NYWMH
- [0503] 219R45重链CDR2 (SEQ ID NO:21)
- [0504] DINPSNGRTSYKEKFRR
- [0505] 219R45重链CDR3 (SEQ ID NO:22)
- [0506] HYDDKYYPLMDY
- [0507] 21R75重链CDR2 (SEQ ID NO:23)
- [0508] YIAGYKDATNYNQKFKG
- [0509] 21R79重链CDR2 (SEQ ID NO:24)
- [0510] YIANYNRATNYNQKFKG
- [0511] 21R83重链CDR2 (SEQ ID NO:25)
- [0512] YISNYNRATNYNQKFKG
- [0513] 抗-DLL4重链CDR2共有序列 (SEQ ID NO:26)
- [0514] YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG, 其中X₁是丝氨酸或丙氨酸,X₂是丝氨酸、天冬酰胺或甘氨酸,X₃是天冬酰胺或赖氨酸,且X₄是甘氨酸、精氨酸或天冬氨酸
- [0515] 21R75重链可变区 (SEQ ID NO:27)
- [0516] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0517] 21R79重链可变区 (SEQ ID NO:28)
- [0518] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0519] 21R83重链可变区 (SEQ ID NO:29)
- [0520] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNYNQKFKGRVT
FTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSS
- [0521] 219R45重链可变区 (SEQ ID NO:30)

- [0522] QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLTVSSA
 [0523] 不具有预测信号序列的21R83重链(异二聚体变体) (SEQ ID NO:31)
 [0524] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISYNRATNYNQFKGRVTFTTDTS TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAEWESNGQPENNYKTPPMMLSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 [0525] 不具有预测信号序列的219R45重链(异二聚体变体) (SEQ ID NO:32)
 [0526] QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRTSYKEKFKRRVTLSVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCEVCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 [0527] 不具有预测信号序列的轻链 (SEQ ID NO:33)
 [0528] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVNDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSTSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 [0529] 59R5重链CDR1 (SEQ ID NO:34)
 [0530] SSSGMS
 [0531] 59R5重链CDR2 (SEQ ID NO:35)
 [0532] VIASSGSNTYYADSVKG
 [0533] 59R5重链CDR3 (SEQ ID NO:36)
 [0534] SIFYTT
 [0535] 59R5轻链CDR1 (SEQ ID NO:37)
 [0536] RASQSVRSNYLA
 [0537] 59R5轻链CDR2 (SEQ ID NO:38)
 [0538] GASSRAT
 [0539] 59R5轻链CDR3 (SEQ ID NO:39)
 [0540] QQYSNFPI
 [0541] 59R5重链可变区 (SEQ ID NO:40)
 [0542] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLTVSSAST
 [0543] 59R5轻链可变区 (SEQ ID NO:41)
 [0544] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPIFGQGTLKVEIKR
 [0545] 具有加下划线的预测信号序列的59R5重链 (SEQ ID NO:42)

[0546] MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYLSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSSLSPGK

[0547] 不具有预测信号序列的59R5重链 (SEQ ID NO:43)

[0548] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYLSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSSLSPGK

[0549] 具有加下划线的预测信号序列的59R5轻链 (SEQ ID NO:44)

[0550] MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPIFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

[0551] 不具有预测信号序列的59R5轻链 (SEQ ID NO:45)

[0552] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPIFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

[0553] 52M51重链CDR1 (SEQ ID NO:46)

[0554] RGYWIE

[0555] 52M51重链CDR2 (SEQ ID NO:47)

[0556] QILPGTGRTNYNEKFKG

[0557] 52M51重链CDR3 (SEQ ID NO:48)

[0558] FDGNYGYYAMDY

[0559] 52M51轻链CDR1 (SEQ ID NO:49)

[0560] RSSTGAUTTSNYAN

[0561] 52M51轻链CDR2 (SEQ ID NO:50)

[0562] GTNNRAP

[0563] 52M51轻链CDR3 (SEQ ID NO:51)

[0564] ALWYSNHWFCCGCTKL

[0565] h52M51重链可变区 (SEQ ID NO:52)

[0566] QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFGRVMTADTSTDATYMEMLSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGTTVTVSSA

[0567] h52M51-L3轻链可变区 (SEQ ID NO:53)

[0568] SGVDSQAVVTQEPESLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARF
SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVLG

[0569] 具有加下划线的预测信号序列的h52M51重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:54)

[0570] MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVSGAEVKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQ
ILPGTGRTNYNEKFGRVTMTADTSTD**TAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGT**TVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTC
NVDHKPSNTKV**DKTVERKCC**VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWENSNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0571] 不具有预测信号序列的h52M51重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:55)

[0572] QVQLVQSGAEVKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFGRVT
MTADTSTD**TAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGT**TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK
C**VECP**CPAPPVAGPSVFLFPPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWENSNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0573] 具有加下划线的预测信号序列的h52M51轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:56)

[0574] MSVPTMAWMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPESLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQA
PRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
PSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKVGETTKPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCRVT
HEGSTVEKTVAPAECs

[0575] 不具有预测信号序列的h52M51轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:57)

[0576] SGVDSQAVVTQEPESLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARF
SGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSD
FYPGAVTVAWKADGSPVKVGETTKPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCRVTTHEGSTVEKTVAPAECs

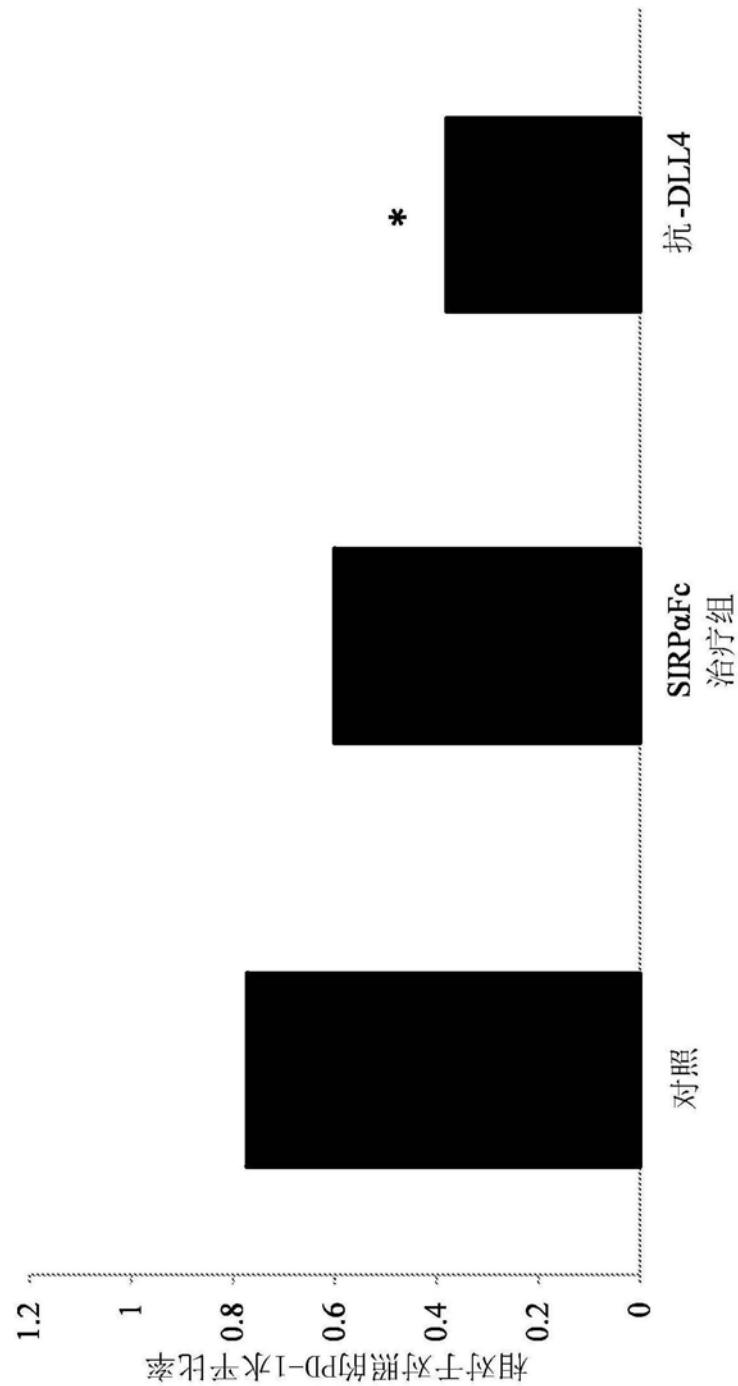


图1A

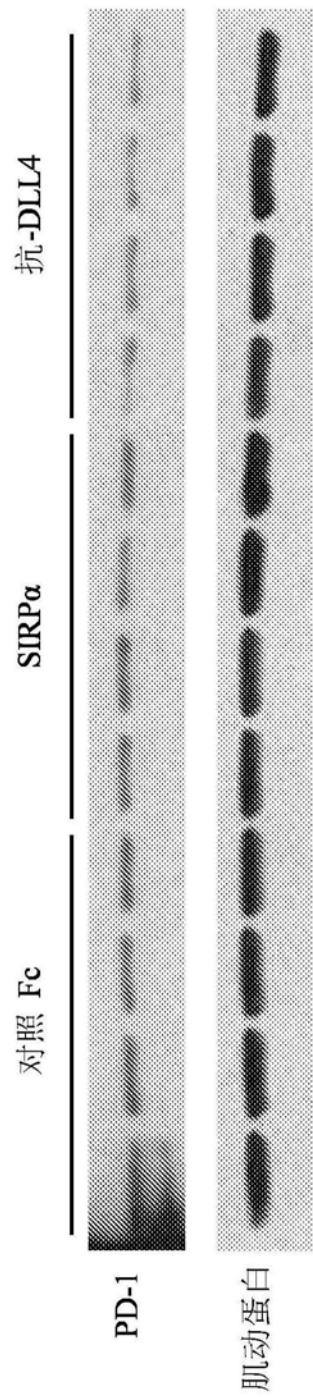


图1B

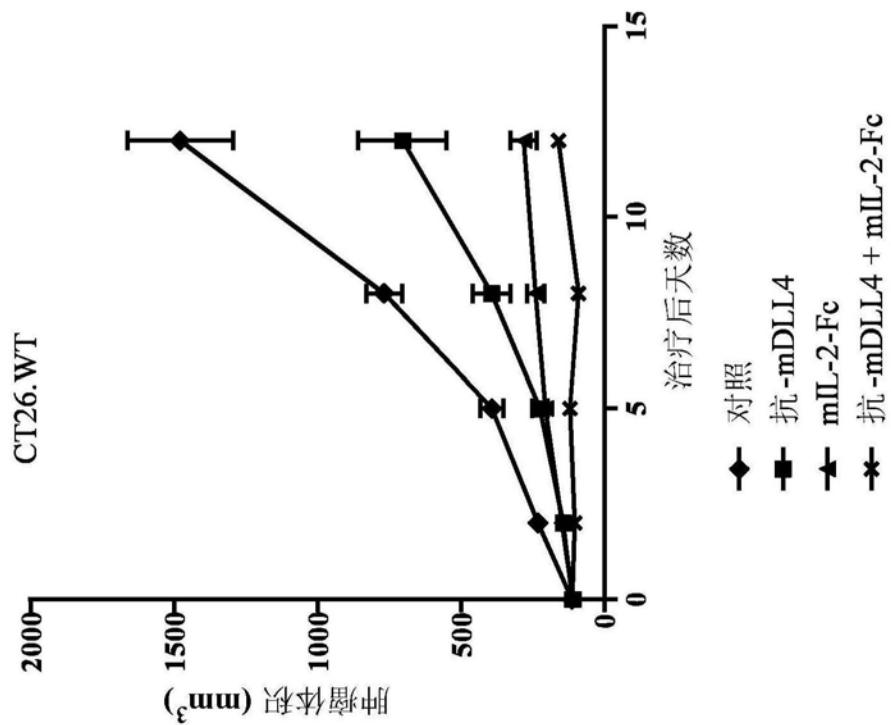


图2A

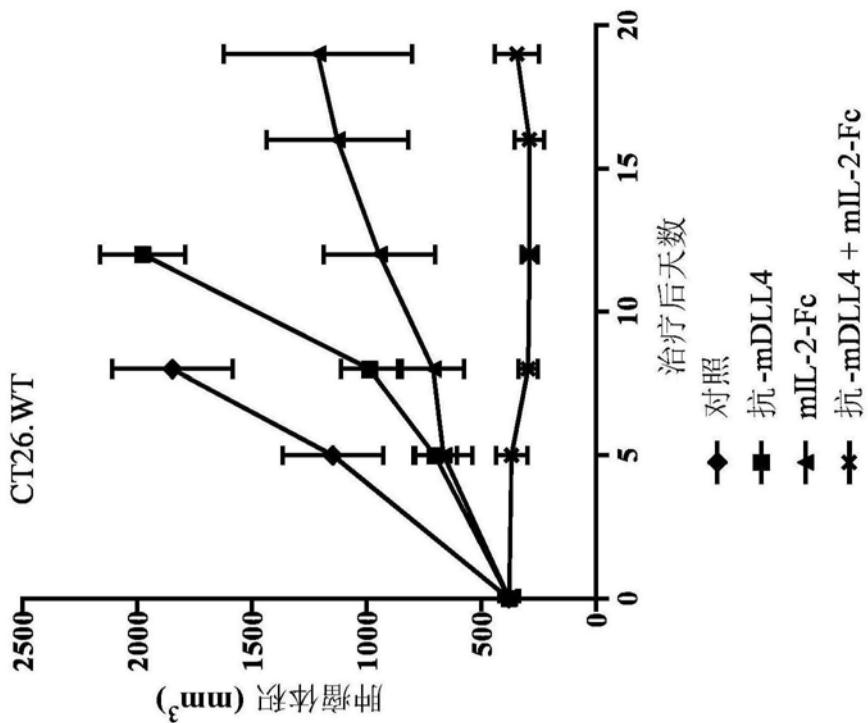


图2B

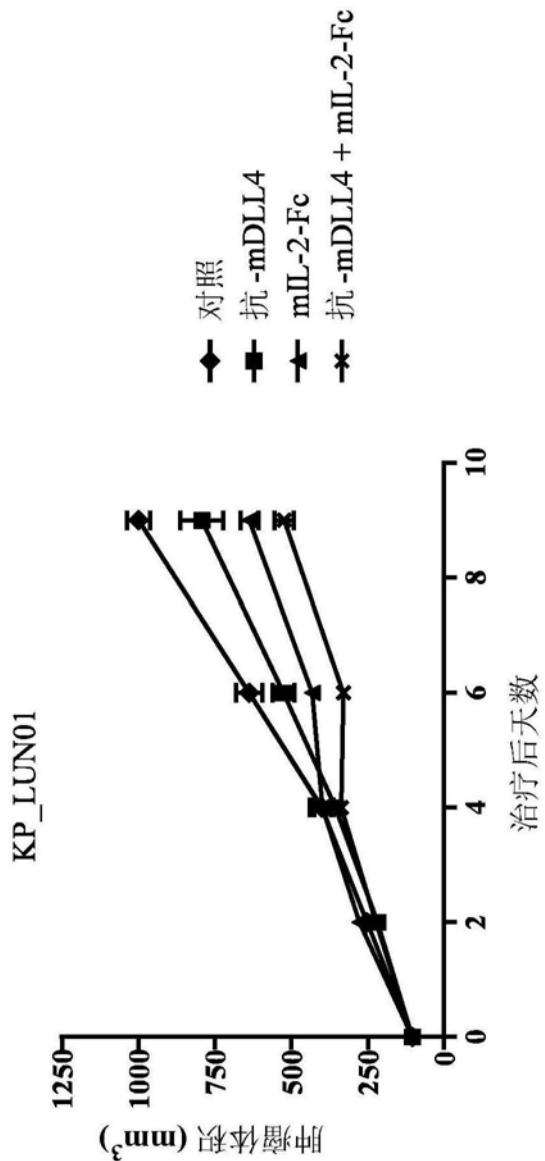


图2C

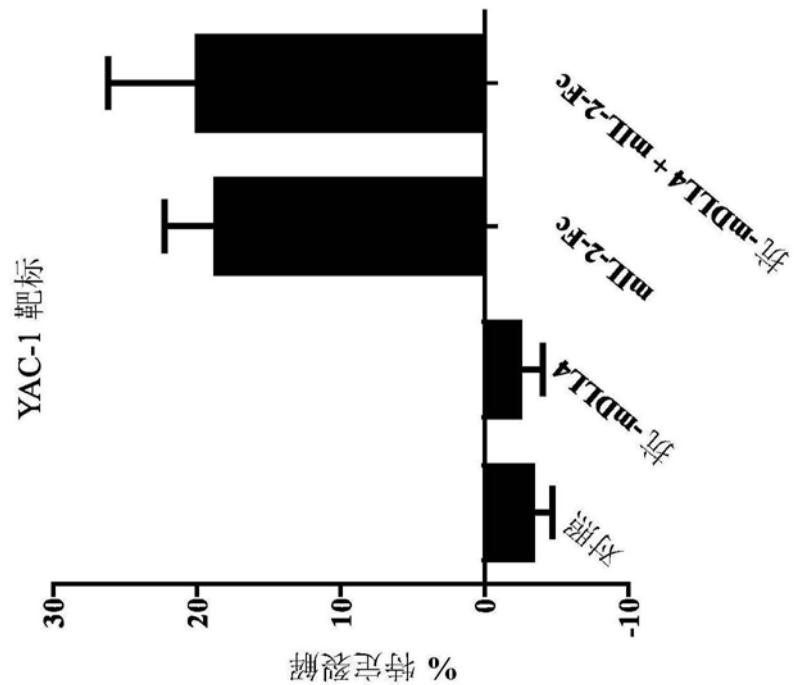


图3A

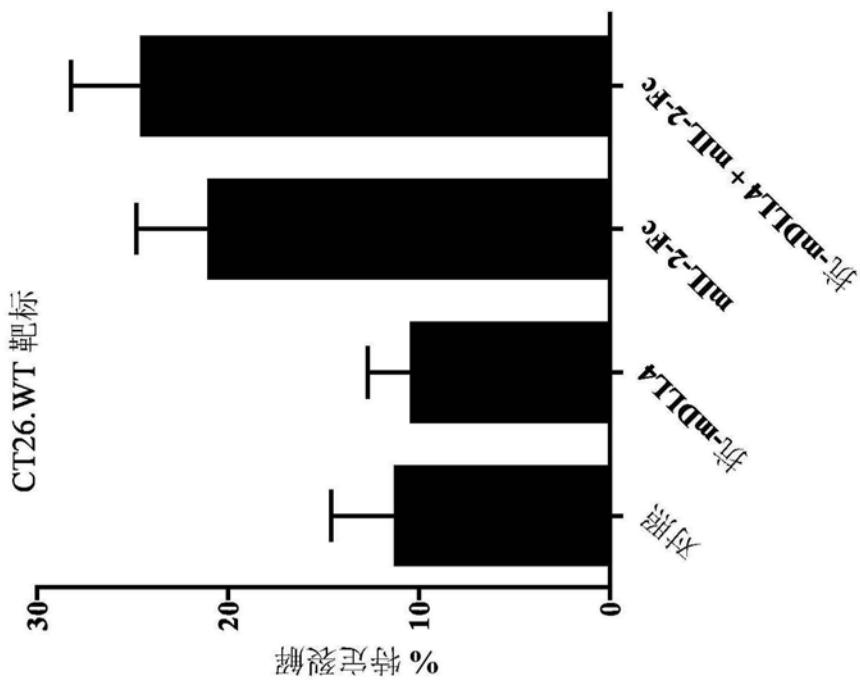


图3B

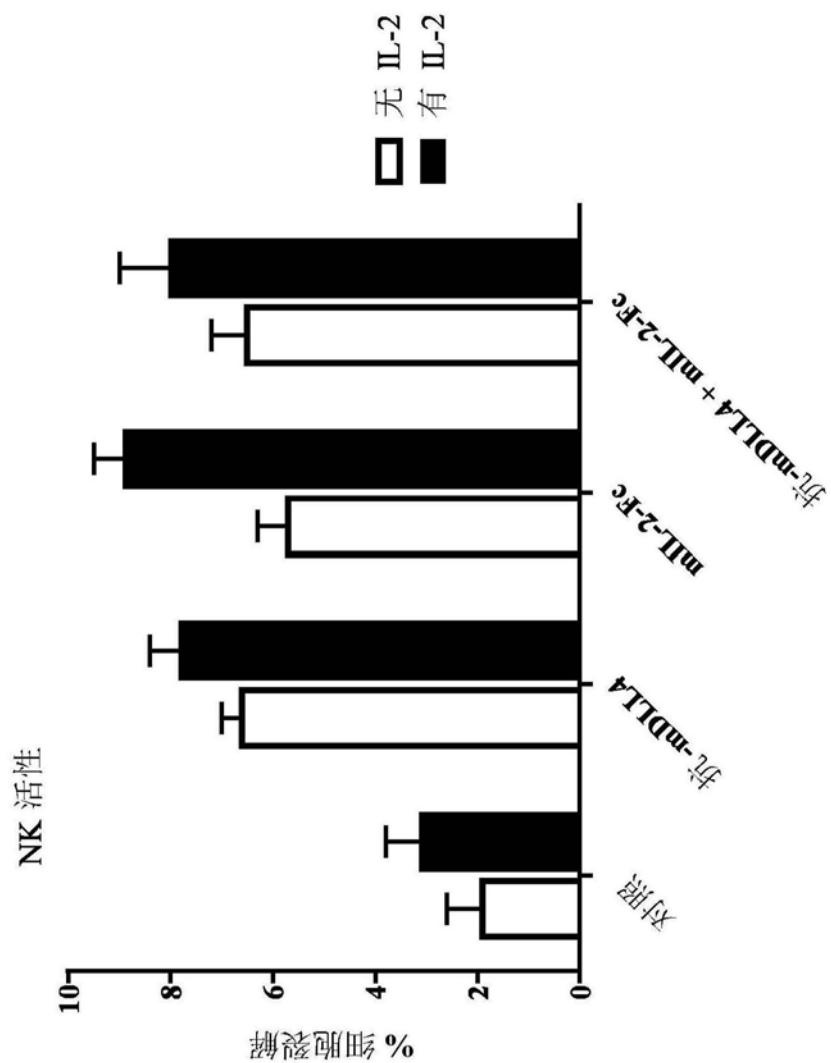


图3C

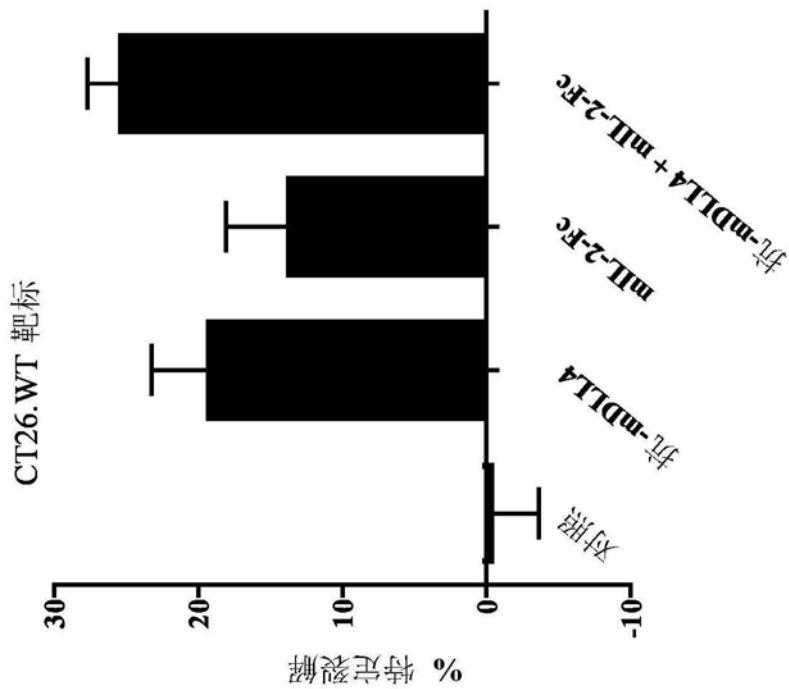


图4A

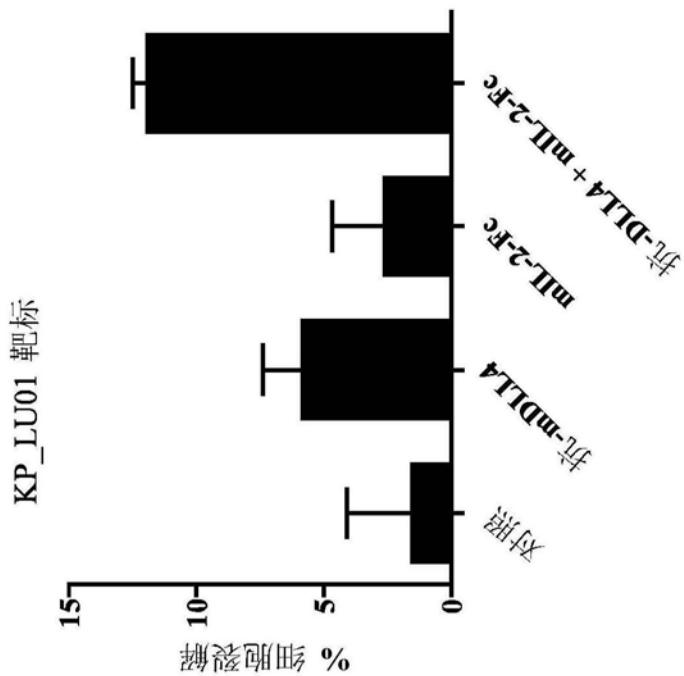


图4B

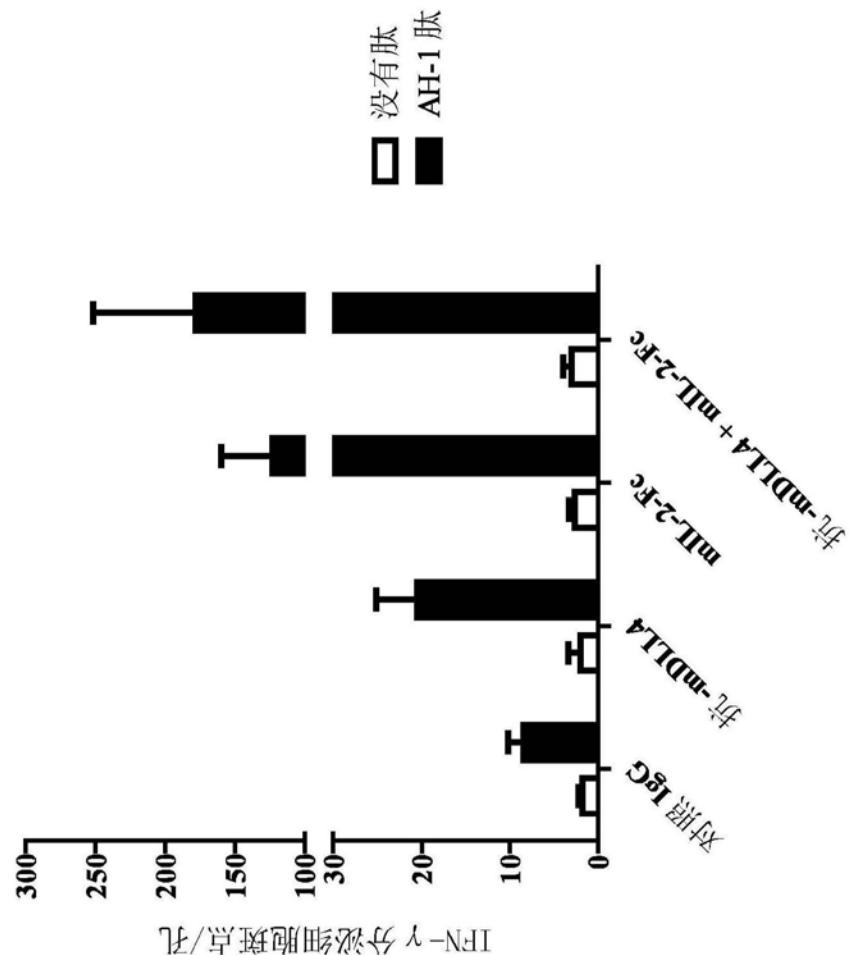


图5

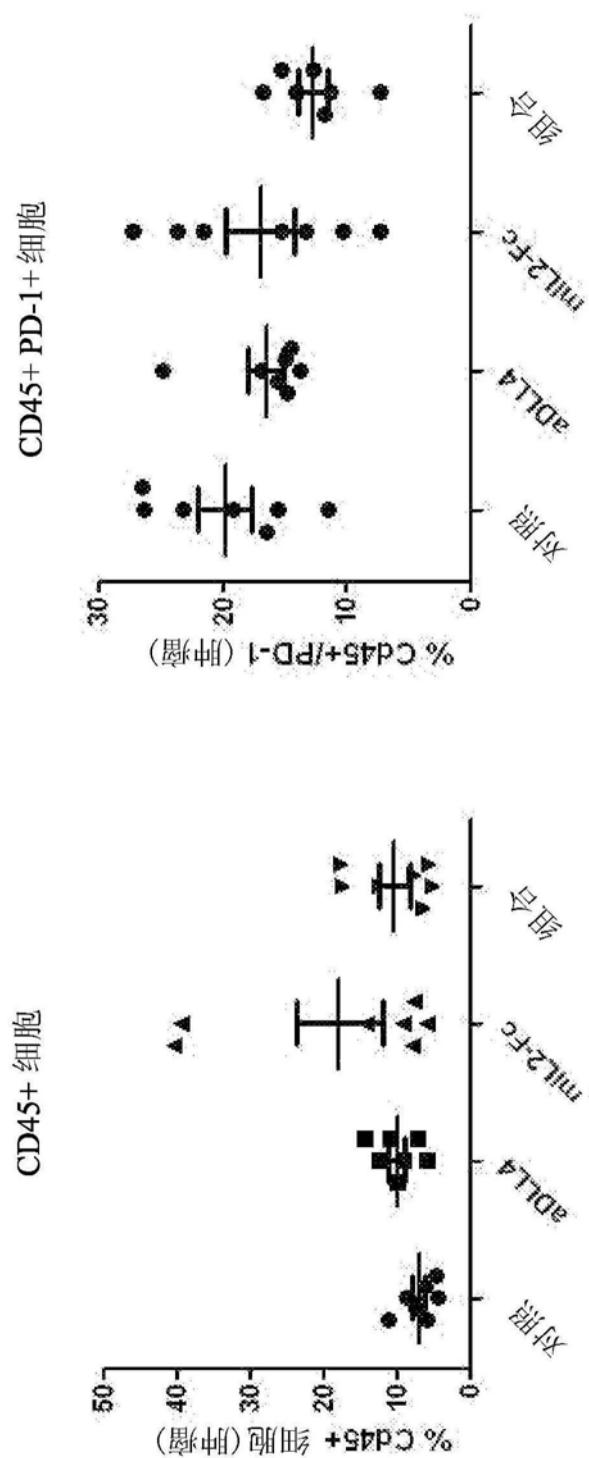


图6

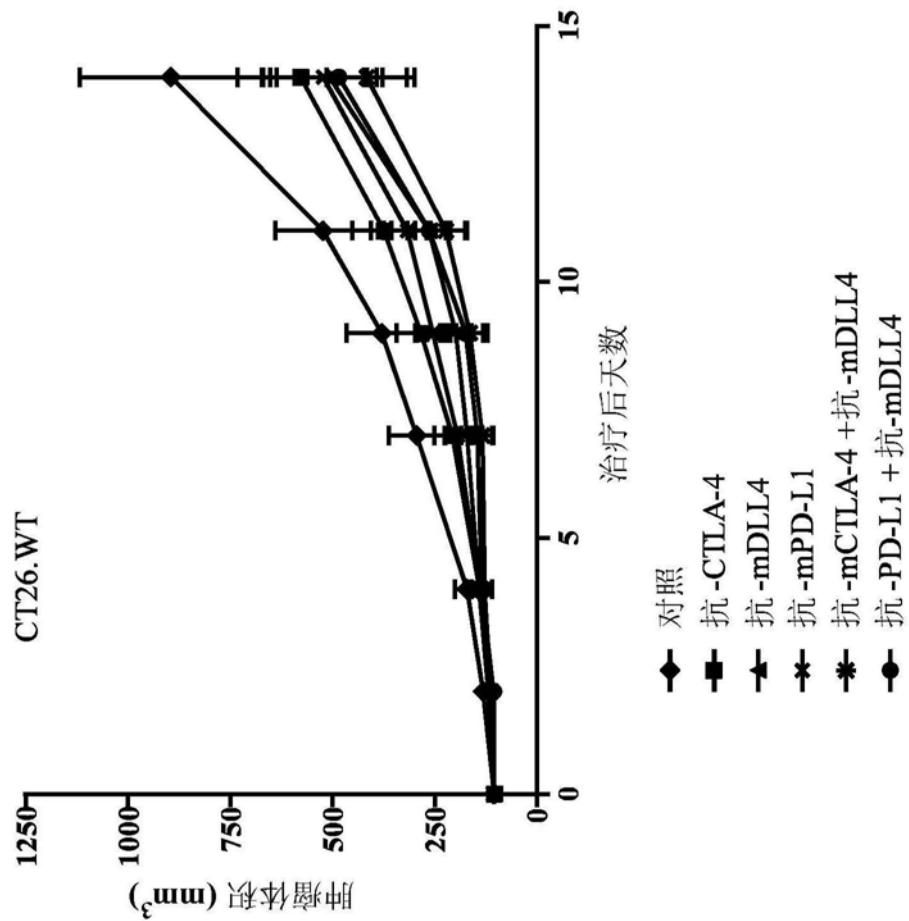


图7A

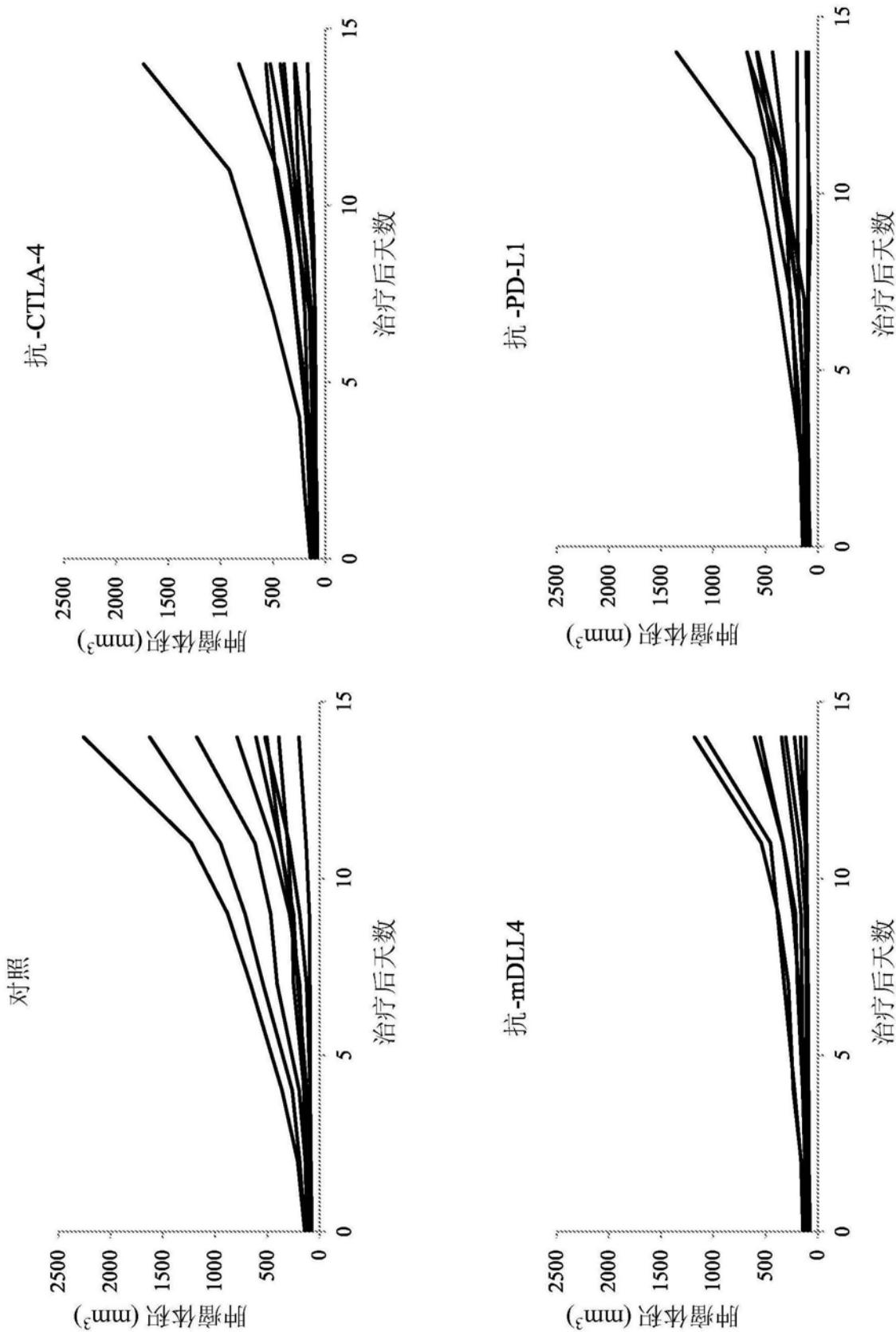


图7B

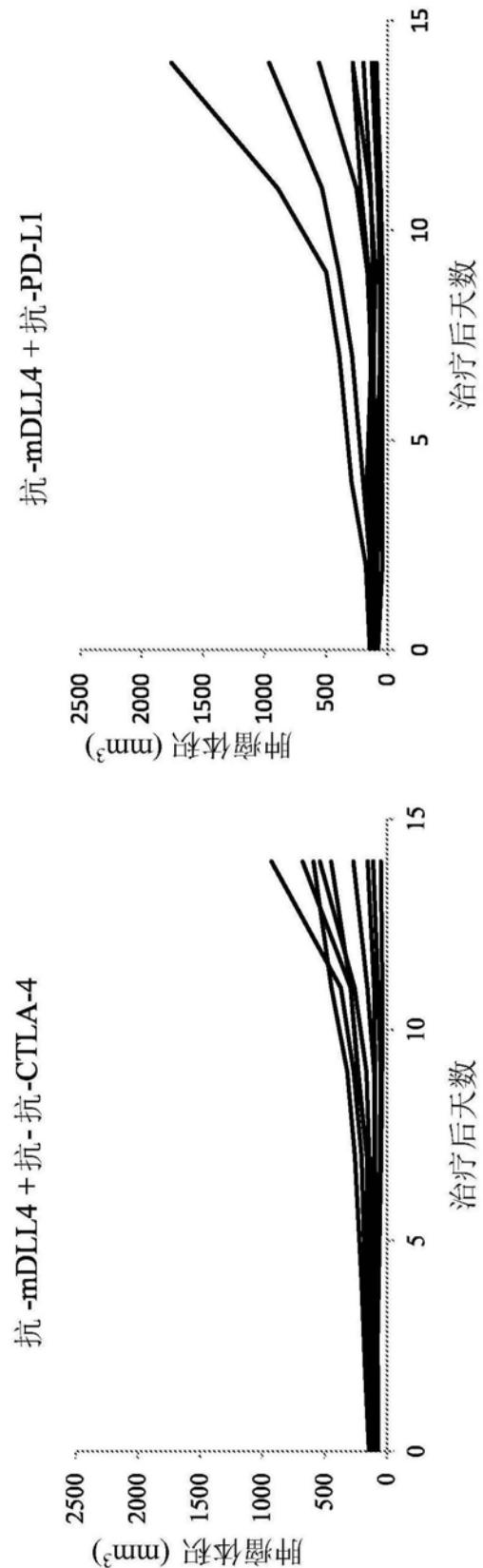


图7C

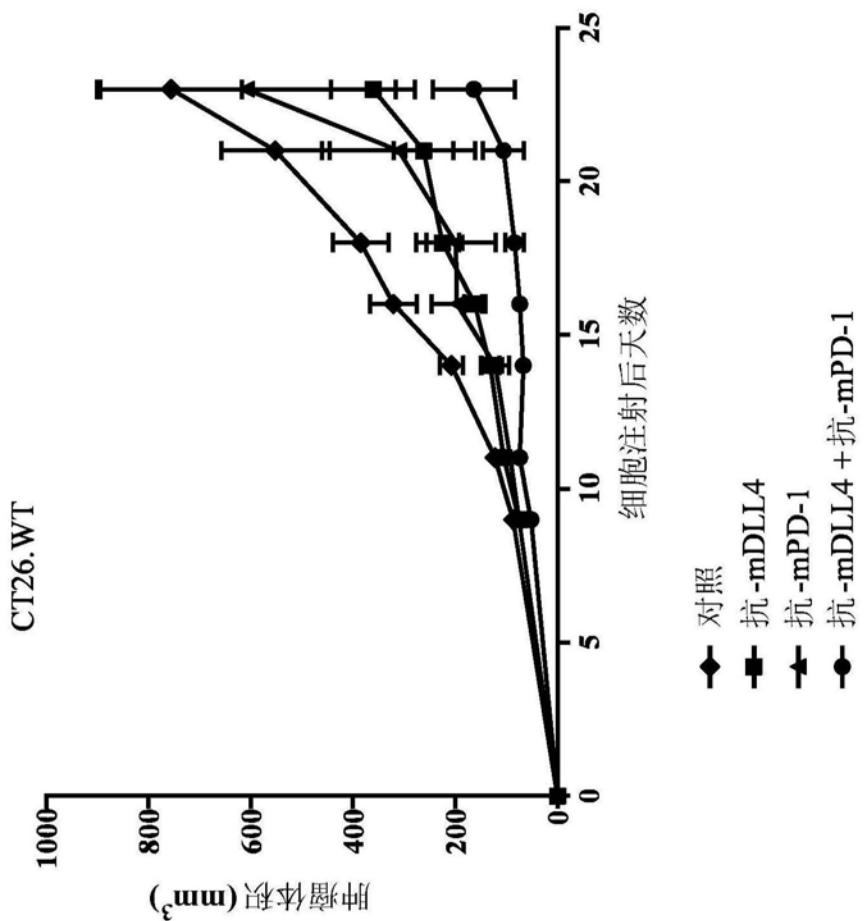


图8A

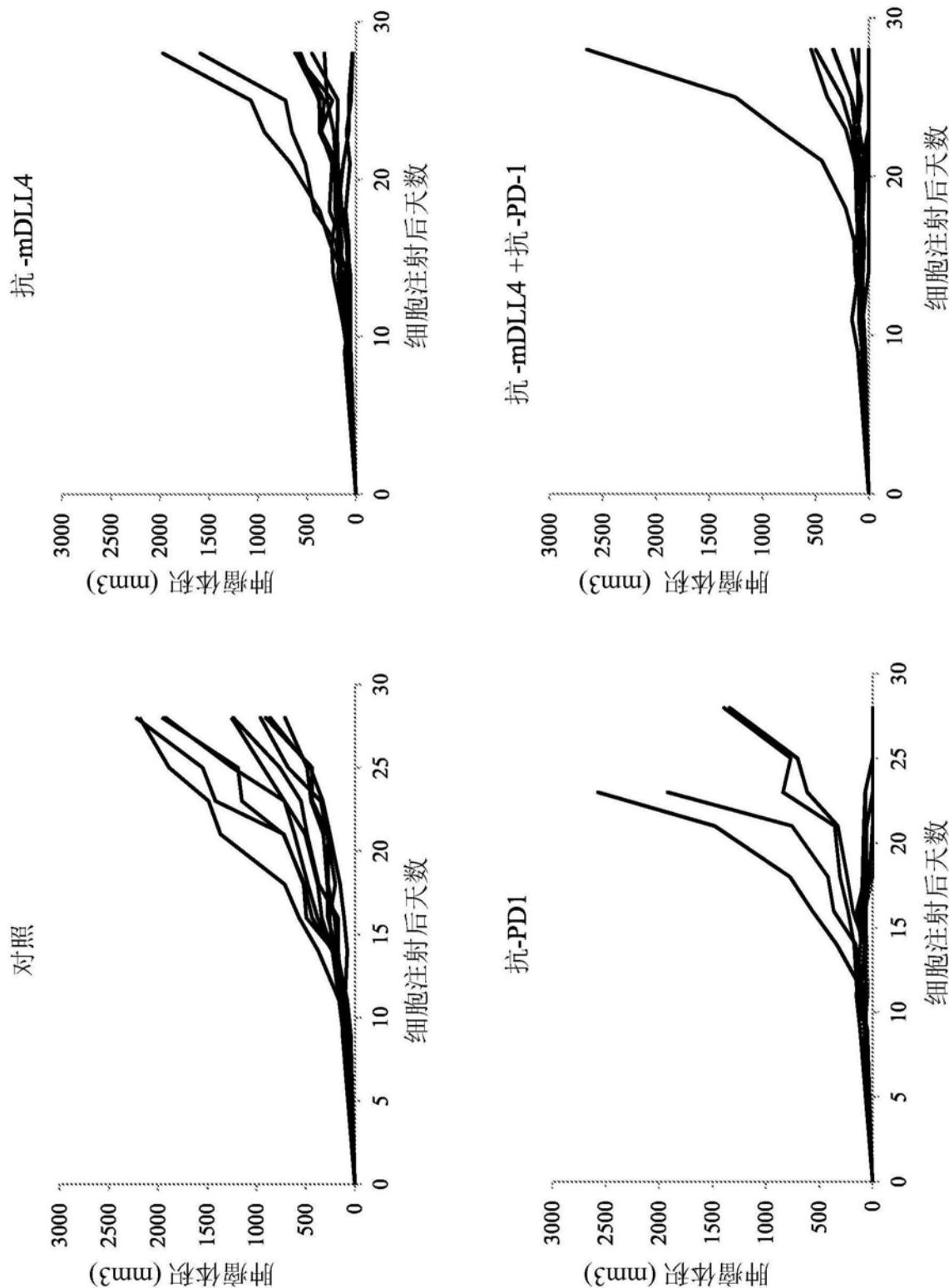


图8B

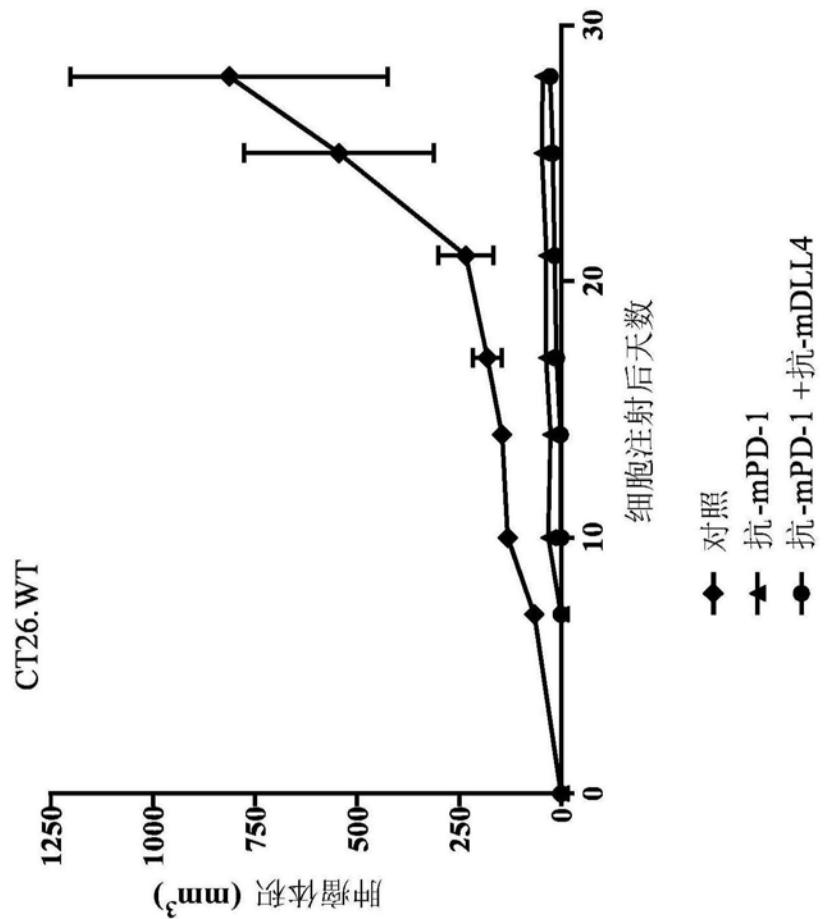


图9

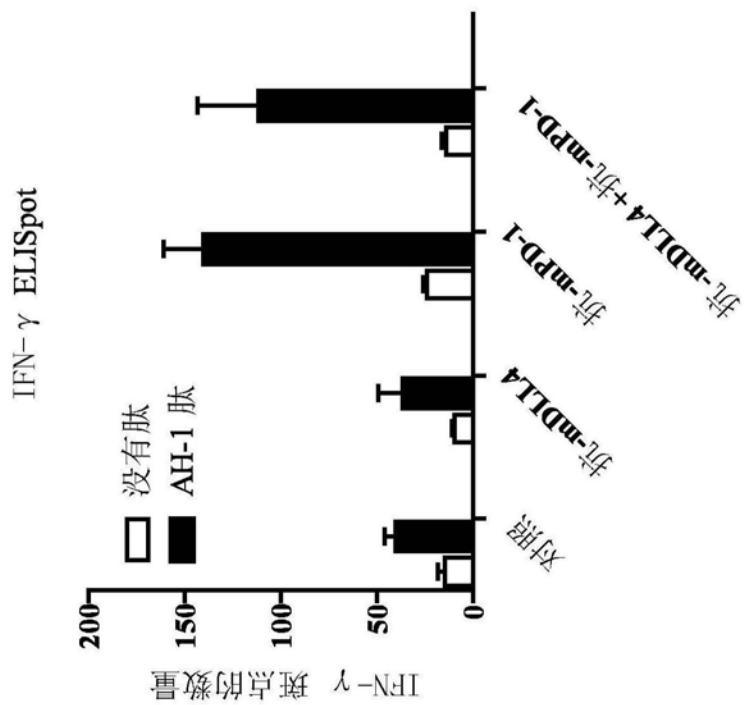


图10A

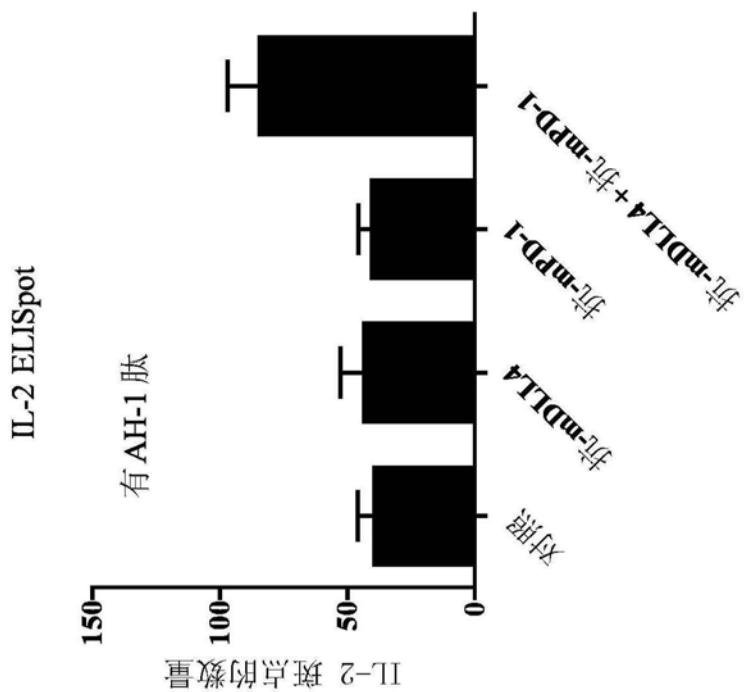


图10B

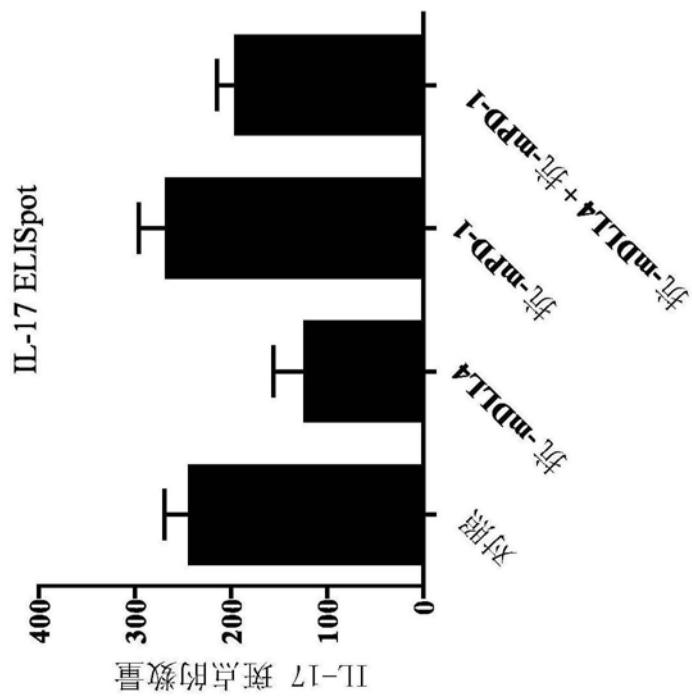


图10C

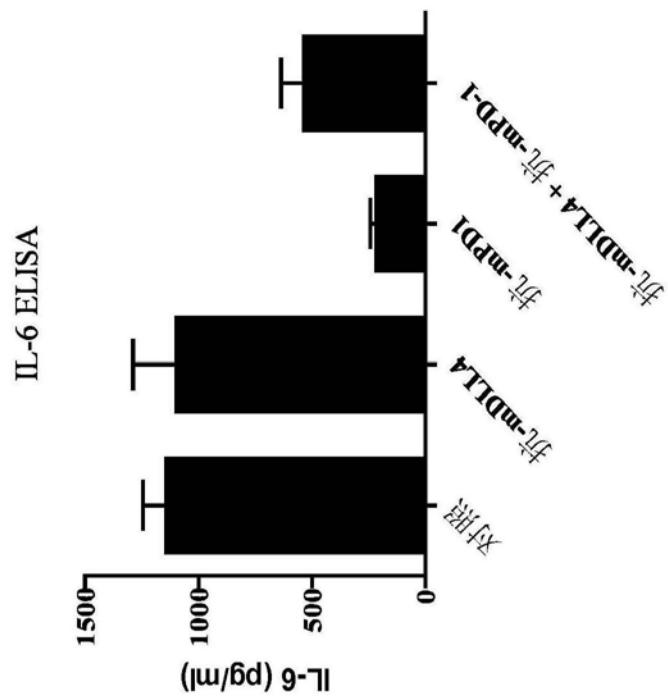


图10D

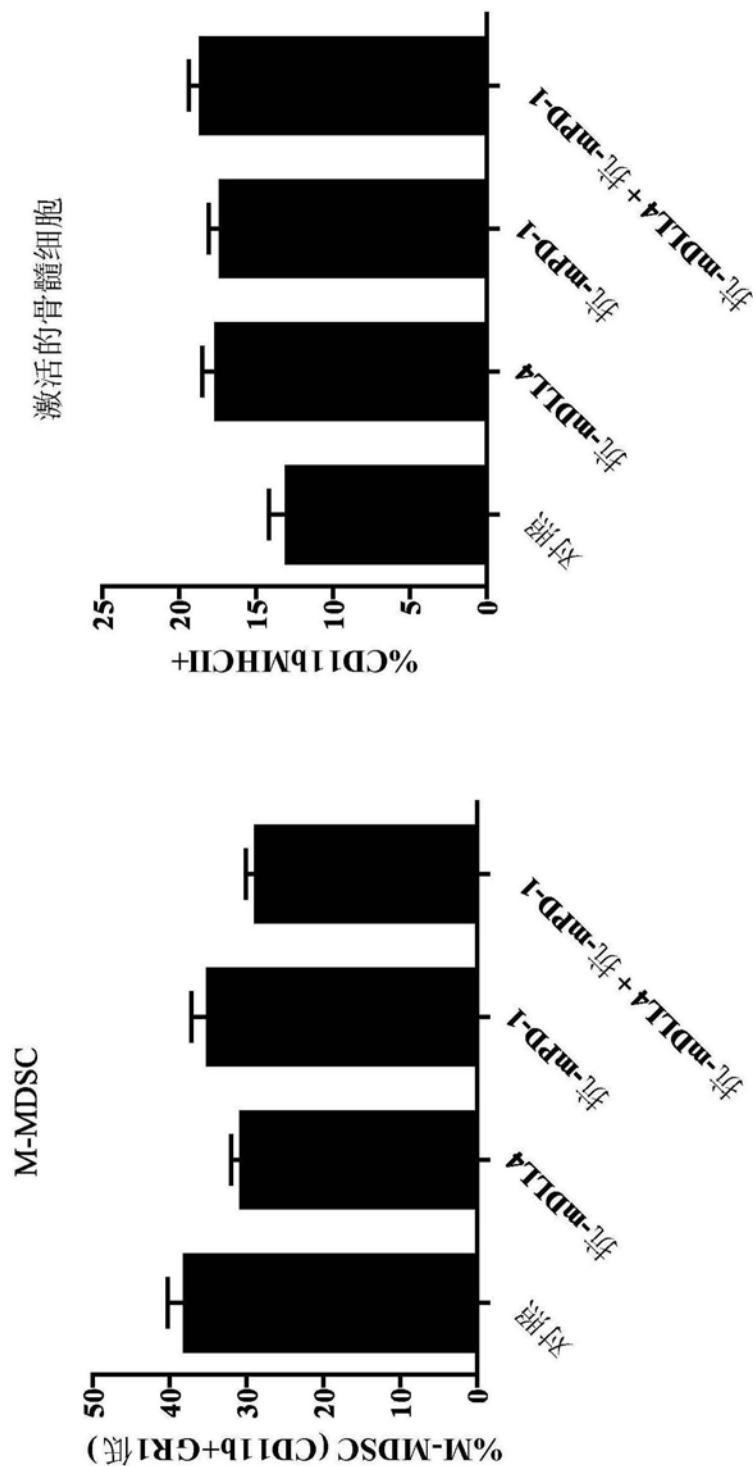


图11

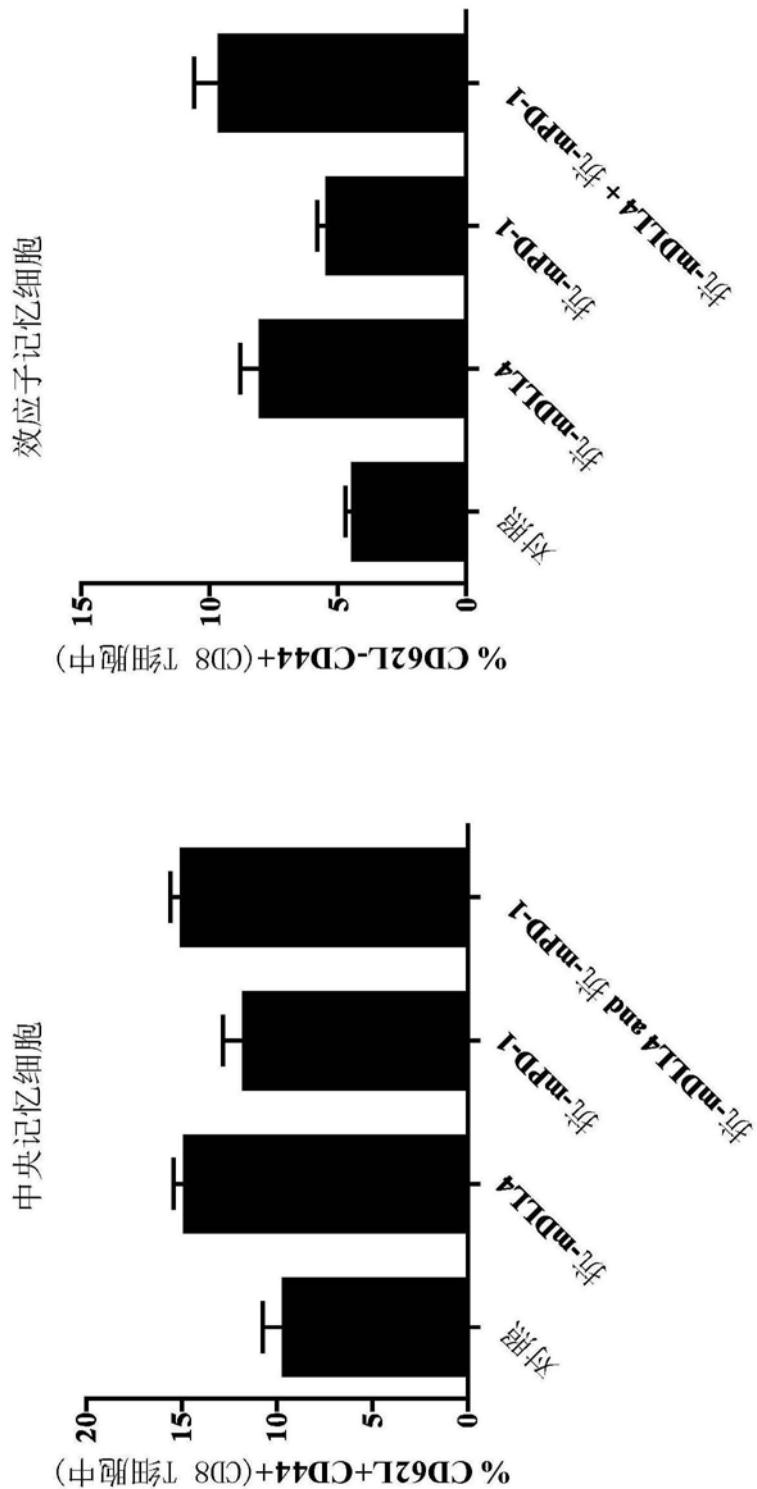


图12

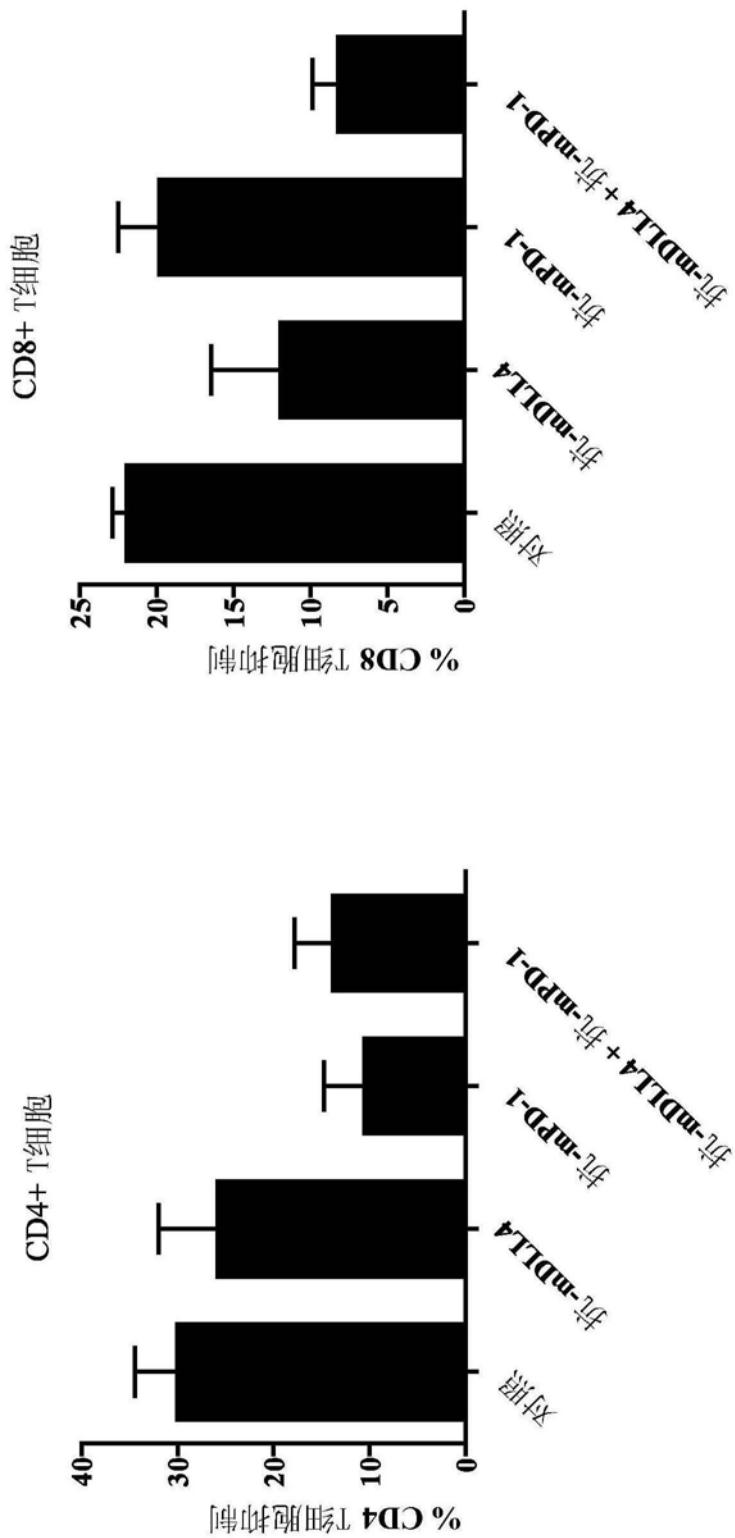


图13

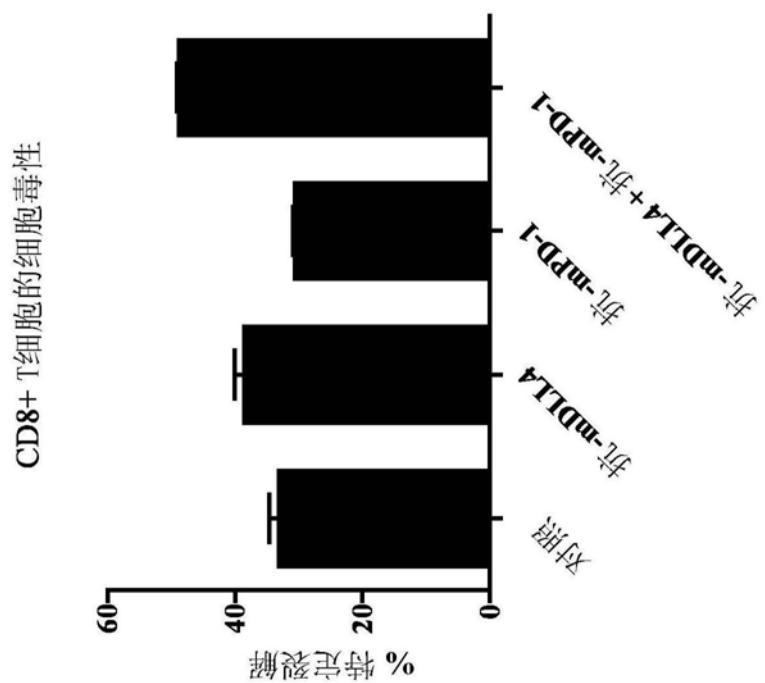
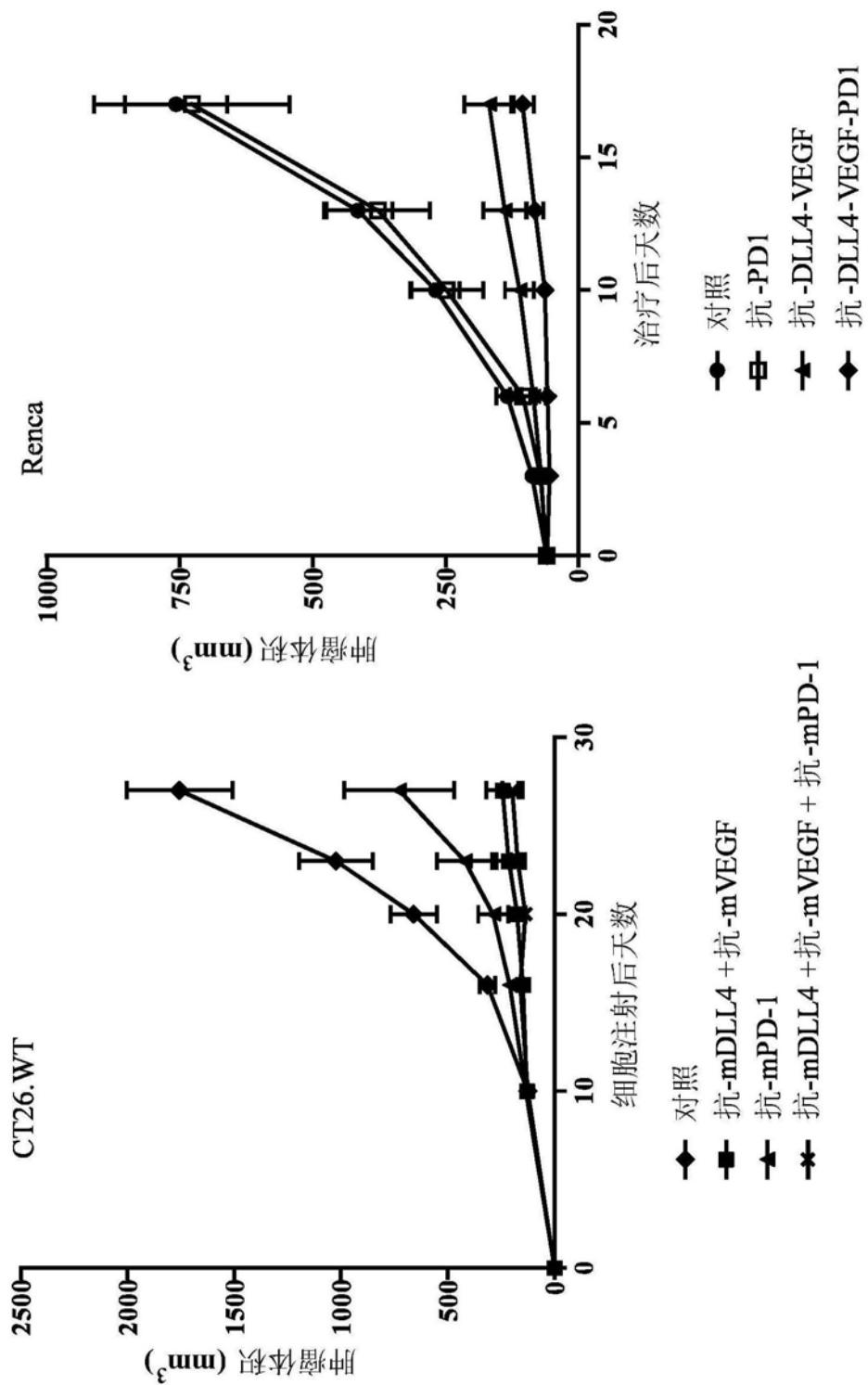


图14



图|15A

图|15B

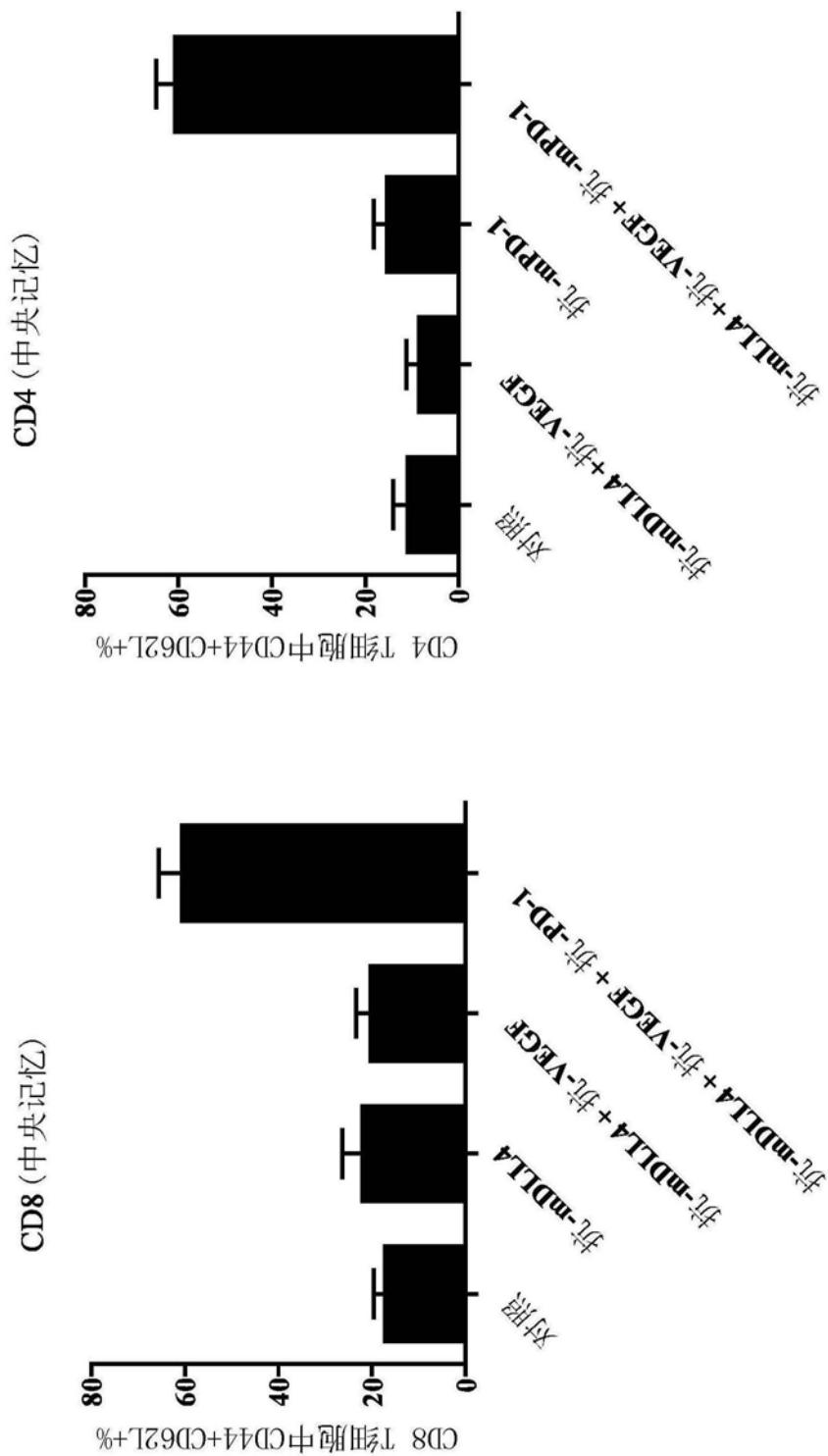


图16

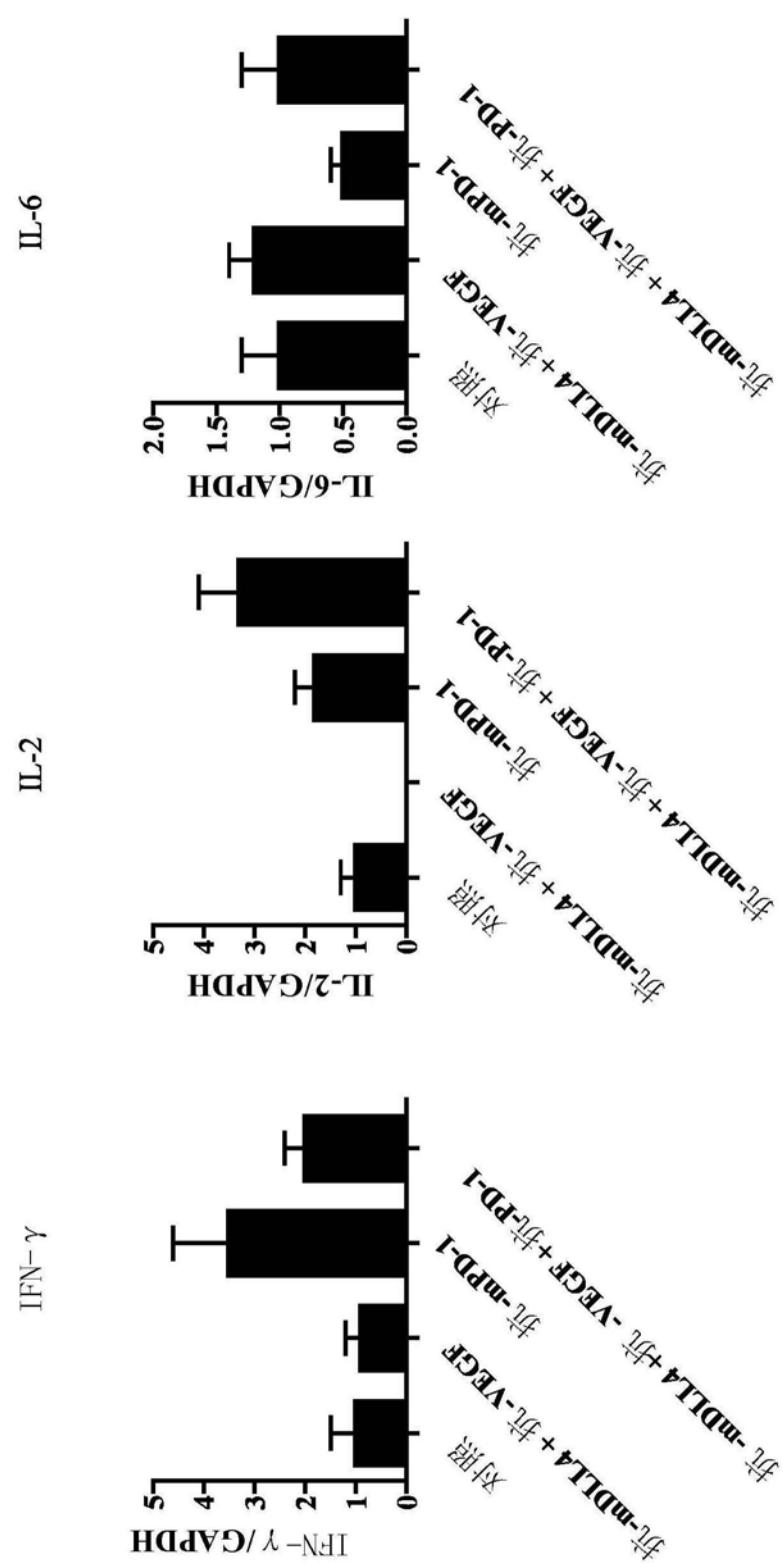


图17A

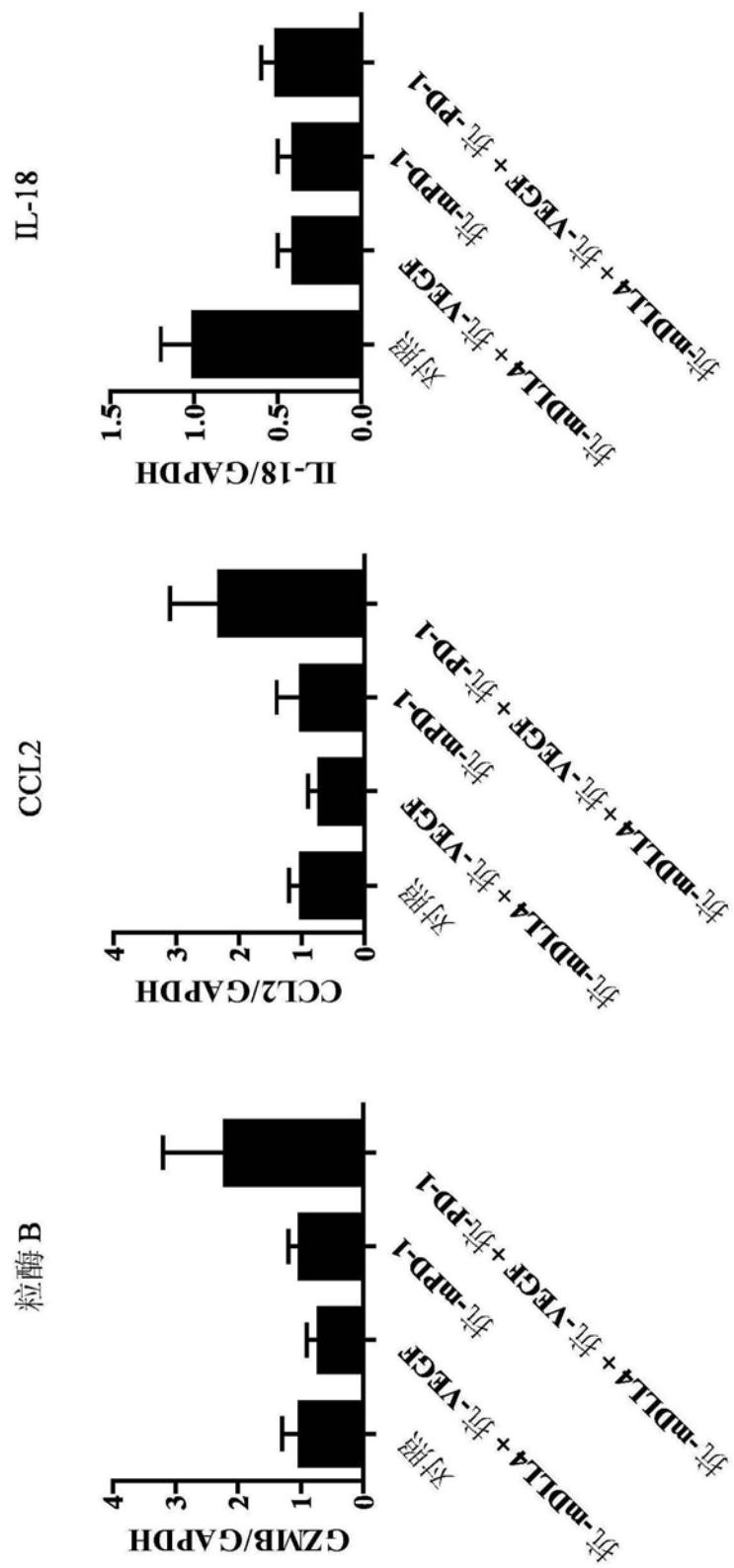


图17B

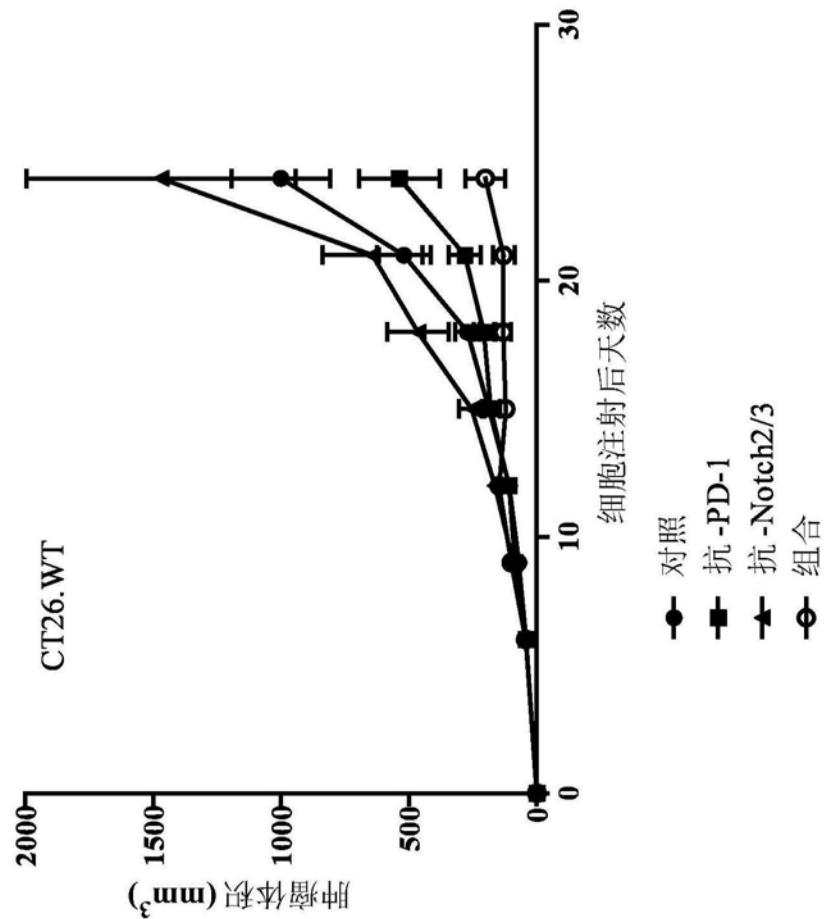


图18