

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512431
(P2025-512431A)

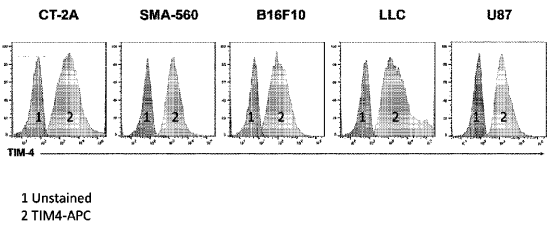
(43)公表日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 7
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全32頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-560536(P2024-560536)				(71)出願人 507189666
(86)(22)出願日	令和5年4月11日(2023.4.11)				デューク ユニバーシティ
(85)翻訳文提出日	令和6年12月11日(2024.12.11)				アメリカ合衆国 2 7 7 0 8 ノースカロライナ州ダーラム、アーウィン・ロード 2 8 1 2、スウィート 4 0 6、ボックス 9 0 0 8 3
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065619				(74)代理人 100103610
(87)国際公開番号	WO2023/201221				弁理士 ▲吉▼田 和彦
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)				(74)代理人 100109070
(31)優先権主張番号	63/329,551				弁理士 須田 洋之
(32)優先日	令和4年4月11日(2022.4.11)				(74)代理人 100119013
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 山崎 一夫
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				(74)代理人 100111796
				最終頁に続く	(74)代理人 弁理士 服部 博信
				最終頁に続く	(74)代理人 100123766

(54)【発明の名称】 組換え T I M－4 タンパク質、キメラ抗原受容体 (C A R) T細胞送達システム及びそれを作製し、使用する方法

(57)【要約】

本発明は、T I M－4 のドメイン及びC D 3 に特異的な s c F v を含む組換え T I M－4 融合タンパク質並びにそれを作製及び使用する方法を提供する。本明細書に提供される融合タンパク質は、C A R T細胞と組み合わせて投与されてもよい。加えて、本明細書に記載される T I M－4 融合タンパク質を発現するように操作された C A R T細胞も提供され、本明細書に記述される方法に使用されうる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 3 に特異的な一本鎖可変断片 (s c F v) に連結された T I M - 4 ドメインを含む T I M - 4 融合タンパク質であって、T I M - 4 ドメインが、配列番号 3 又は配列番号 3 に対して 9 5 % 同一性を有する配列を含み、C D 3 に特異的な s c F v が、配列番号 2 2 ~ 2 7 又は配列番号 2 2 ~ 2 7 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する配列の相補性決定領域 (C D R) を含む、T I M - 4 融合タンパク質。

【請求項 2】

C D 3 に特異的な s c F v が、配列番号 5 又は配列番号 5 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 3】

N 末端シグナル配列を更に含み、前記 N 末端シグナル配列は分泌シグナル配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

分泌シグナル配列が、配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する配列のシグナル配列を含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

T I M - 4 ドメインが、リンカーペプチドを介して C D 3 に特異的な s c F v に連結され、前記リンカーはグリシンセリンリンカーでもよい、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 6】

リンカーが、配列番号 4 の少なくとも 1 つのコピーを含む、請求項 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

タグを更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

タグが、融合タンパク質を精製、追跡又は画像化するために使用できる、請求項 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 1 又は配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 10】

配列番号 3 の T I M - 4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー、配列番号 2 2 ~ 2 7 の C D 3 に特異的な s c F v を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

配列番号 3 の T I M - 4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー、配列番号 5 の C D 3 に特異的な s c F v を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

H i s タグ、F L A G タグ及び蛍光タグからなる群から選択されるタグを更に含む、請求項 10 又は 11 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 13】

配列番号 2 のシグナル配列を更に含む、請求項 10 ~ 12 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組換え T I M - 4 融合タンパク質並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の T I M - 4 融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む構築物。

【請求項 16】

T I M - 4 融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された

50

プロモーターを更に含む、請求項 15 に記載の構築物。

【請求項 17】

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする配列を更に含み、前記 CAR は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項 15 又は 16 に記載の構築物。

【請求項 18】

CAR が、野生型 EGFR と EGFR V I I I バリエーションの両方に結合する抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含む、請求項 17 に記載の構築物。

【請求項 19】

抗原結合領域が、配列番号 10 又は配列番号 10 と少なくとも 95 % 同一性を有する配列の scFv を含む、請求項 18 に記載の構築物。

【請求項 20】

抗原結合領域が、配列番号 17 又は配列番号 17 と少なくとも 95 % 同一性を有する配列の scFv を含む、請求項 18 に記載の構築物。

【請求項 21】

CAR をコードする配列に作動可能に接続された異種プロモーターを更に含む、請求項 17 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 22】

CAR と TIM-4 融合タンパク質が、自己切断部位を介して接続される、請求項 17 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 23】

レンチウイルス、レトロウイルス又は AAV ベクターに含まれる、請求項 15 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 24】

請求項 15 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む、キメラ抗原受容体（CAR）-T 細胞。

【請求項 25】

構築物が、配列番号 10 の EGFR V I I I CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、リンカー及び配列番号 22 ～ 27 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は構築物が、配列番号 10、3、22、24、25、26 及び 27 と少なくとも 95 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 26】

構築物が、配列番号 10 の EGFR V I I I CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、リンカー及び配列番号 5 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は構築物が、配列番号 10、3 及び 5 と少なくとも 95 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 27】

構築物が、配列番号 17 の D2C7 CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、リンカー及び配列番号 22 ～ 27 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は構築物が、配列番号 17、3、22、23、24、25、26 及び 27 と少なくとも 95 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 28】

構築物が、配列番号 17 の D2C7 CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、リンカー及び配列番号 5 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は構築物が、配列番号 17、3 及び 5 と少なくとも 95 % 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

自己切断部位が、配列番号 11 又は配列番号 11 と少なくとも 95 % 配列同一性を有する配列を含む、請求項 24 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 30】

シグナル配列が、配列番号 2 又は配列番号 2 と少なくとも 95 % 配列同一性を有する配列を含む、請求項 24 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 31】

リンカーが、配列番号 4 を含む、請求項 24 ～ 30 のいずれか 1 項に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 32】

構築物が、配列番号 10 の CAR、配列番号 11 の自己切断部位、配列番号 2 のシグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー及び配列番号 22 ～ 27 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 33】

構築物が、配列番号 10 の CAR、配列番号 11 の自己切断部位、配列番号 2 のシグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー及び配列番号 5 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 34】

構築物が、配列番号 17 の CAR、配列番号 11 の自己切断部位、配列番号 2 のシグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー及び配列番号 22 ～ 27 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 35】

構築物が、配列番号 17 の CAR、配列番号 11 の自己切断部位、配列番号 2 のシグナル配列、配列番号 3 の TIM-4 ドメイン、配列番号 4 のリンカー及び配列番号 5 の CD3 に特異的な scFv をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 24 に記載の CAR-T 細胞。

【請求項 36】

配列番号 20 又は配列番号 20 と少なくとも 95 % 配列同一性を有する配列をコードするポリヌクレオチドを含む、CAR-T 細胞。

【請求項 37】

配列番号 21 又は配列番号 21 と少なくとも 95 % 配列同一性を有する配列をコードするポリヌクレオチドを含む、CAR-T 細胞。

【請求項 38】

がんを処置するための方法であって、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の組換え TIM-4 融合タンパク質の治療上有効な量、並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 39】

T リンパ球を投与する工程を更に含み、T リンパ球は、TIM-4 融合タンパク質に結合すると活性化される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

T リンパ球が、CAR-T 細胞である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

CAR-T 細胞が、配列番号 10 の EGFR VIII CAR 又は配列番号 17 の D2C7 CAR 又は配列番号 10 若しくは配列番号 17 と少なくとも 95 % 同一性を有する配列を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

がんを処置するための方法であって、請求項 24 ～ 37 のいずれか 1 項に記載の CAR

10

20

30

40

50

ー T 細胞の治療上有効な量、並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を投与する工程を含む、方法。

【請求項 43】

がんを処置するための方法であって、請求項 15～23 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む細胞を投与する工程を含む、方法。

【請求項 44】

がんが、EGFR 関連がんである、請求項 38～43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

がんが、PS 関連がんである、請求項 38～43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

EGFR 関連がんが、神経膠腫、神経膠芽腫、髄芽細胞腫、上衣細胞腫、びまん性橋膠腫（DIPG）、脳転移、頭頸部、卵巣、頸部、膀胱又は食道がんを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

がんの処置が、EGFR 関連がんに対する抗腫瘍応答の誘導をもたらす、請求項 44又は 46 に記載の方法。

【請求項 48】

がんを診断する方法であって、請求項 7 又は 8 又は 12 に記載の融合タンパク質を投与する工程と、がんの疑いがある対象においてタグの存在又は蓄積を検出する工程とを含み、タグにより、がんの *in vivo* での検出が可能になる、方法。

【請求項 49】

がんを診断する方法であって、細胞若しくは組織を含む試料を、請求項 7 又は 8 又は 12 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質又はタグに連結された配列番号 3 の TIM-4 ドメインと接触させる工程と、タグを検出することによって試料に対する融合タンパク質又は TIM-4 ドメインの結合を検出する工程とを含み、試料に対する TIM-4 の結合が、試料ががん細胞を含む指標となる、方法。

【請求項 50】

診断されるがんが、神経膠腫、神経膠芽腫、髄芽細胞腫、上衣細胞腫、びまん性橋膠腫（DIPG）、脳転移、頭頸部、卵巣、頸部、膀胱又は食道がんである、請求項 48 又は 49 に記載の方法。

【請求項 51】

がんを患う対象において T 細胞応答を誘導する方法であって、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質又は請求項 14 に記載の医薬組成物の治療上有効な量を対象に投与する工程であって、がんに対する抗腫瘍応答が誘導される、工程を含む、方法。

【請求項 52】

がんを患う対象において T 細胞応答を誘導する方法であって、請求項 24～37 のいずれか 1 項に記載の CAR-T 細胞の治療上有効な量を対象に投与する工程であって、がんに対する抗腫瘍応答が誘導される、工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 11 日に出願の米国特許仮出願第 63／329,551 号の優先権を主張し、その内容を全体として参照により組み込む。

電子配列表に対する参照

本出願は、サイズ 36,976 バイトであり、2023 年 4 月 10 日に作成されたタイトル「155554.00691.xml」の XML 形式の配列表を含む。配列表は、Patent Center によって本出願と共に電子的に提出され、その全体を参照により本明細書に組み込む。

【背景技術】

【0002】

免疫チェックポイント遮断（ICB）及びキメラ抗原受容体（CAR）T細胞のようなT細胞リダイレクト戦略などの免疫に基づく療法は、特定の一部のがんにおける成功により、過去20年間にわたって興奮を集めている。しかしながら、固形腫瘍に対する成功は限定的であり、欠点は、固形腫瘍抗原の異質性にしばしば起因した。免疫療法が有効ながんのレパートリーを広げることは、世界的にがん免疫学グループの主要な目的であり続けている。多重特異性融合タンパク質は、2つのドメインからなり：一方のドメインは、腫瘍抗原に対する特異性を付与し、他方のドメインは、内在性T細胞受容体を介してT細胞を活性化する抗CD3 1本鎖可変断片（scFv）からなる。したがって、多重特異性融合タンパク質は、T細胞受容体の特異性に関わらず、選択された腫瘍抗原へT細胞をリダイレクトする。全ての腫瘍細胞が、標的可能な同じ抗原を発現している場合、T細胞リダイレクト療法は成功する。例えば、悪性細胞のほとんど全てがCD19を発現するため、CAR T細胞及び多重特異性融合タンパク質は、B細胞がんの処置に革命をもたらした。残念なことに、T細胞リダイレクト療法は、固形腫瘍の状況ではうまくいっていない。これらの失敗は、固形腫瘍によって示される豊富な抗原異質性にしばしば起因する。

10

したがって、腫瘍細胞を同定し、標的するための新規の手段が当業者には依然として必要である。本出願に記載の通り、本発明者らは、枠にとらわれずに考えることができ、通常と異なる、非タンパク質性の標的を利用して、腫瘍の異質性によってもたらされる課題を回避した。

20

【発明の概要】

【0003】

ヒト抗CD3 scFvに連結されたTIM-4ドメインで構成されるTIM-4融合タンパク質並びにその作製方法及び使用について、本明細書に記載される。本開示の一態様は、CD3に特異的な一本鎖可変断片（scFv）に連結されたTIM-4ドメインを含むTIM-4融合タンパク質を提供し、TIM-4ドメインは、配列番号3又は配列番号3に対して95%同一性を有する配列を含み、CD3に特異的なscFvは、配列番号22～27又は配列番号22～27と少なくとも95%同一性を有する配列の相補性決定領域（CDR）を含む。一部の実施形態において、CD3に特異的なscFvは、配列番号5又は配列番号5と少なくとも95%同一性を有する配列を含む。一部の実施形態は、本明細書に記載される組換えTIM-4融合タンパク質並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態は、本明細書に記載されるTIM-4融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む構築物を提供する。一部の実施形態は、本明細書に提供される構築物を含むキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を提供する。

30

本開示の別の態様は、がんを処置するための方法であって、本明細書に記載される組換えTIM-4融合タンパク質の治療上有効な量、並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を投与する工程を含む、方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、Tリンパ球をTIM-4融合タンパク質と共に投与する工程を更に含み、Tリンパ球は、TIM-4融合タンパク質に結合すると活性化される。一部の実施形態において、Tリンパ球はCAR T細胞である。なお更なる実施形態において、CAR T細胞は、TIM-4融合タンパク質及びCARを発現するために操作されてもよい。一部の実施形態において、がんはPS関連がん又はEGFR関連がんである。

40

【0004】

本開示の別の態様は、がんを診断する方法であって、本明細書に記載される融合タンパク質を投与する工程と、がんの疑いがある対象においてタグの存在又は蓄積を検出する工程とを含む、方法を提供する。タグにより、がんのin vivoでの検出が可能になる。TIM-4融合タンパク質は、タグを使用して細胞へのTIM-4の結合を検出することによってがんの疑いがある対象から得られた生検又は他の試料中のがんをin vitroで検出するために使用することもできる。

本開示の別の態様は、がんを患う対象においてT細胞応答を誘導する方法であって、本

50

明細書に記載される融合タンパク質又は医薬組成物の治療上有効な量を対象に投与する工程であって、がんに対する抗腫瘍応答が誘導される、工程を含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】TIM-4結合神経膠腫及び非神経膠腫腫瘍細胞を示す図である。マウス神経膠腫（CT-2A、SMA-560）、マウス非神経膠腫（B16F10、ルイス肺癌）及びヒト神経膠腫（U87）細胞を、APCコンジュゲートした組換えTIM-4で染色した。

【図2】放射線照射が、CT-2A神経膠腫細胞へのTIM-4結合を増大させることを示す図である。A. *in vitro*培養したCT-2A細胞を、10 Gyの照射に曝露し、放射線照射0時間及び24時間後にTIM-4結合についてアッセイした。B、C. CT-2A神経膠腫細胞 10^4 個を、C57BL/6マウスの頭蓋内に移植した。14日後、マウスは、10 Gyの全身放射線照射を受けた又は放射線照射を受けずにした。48時間後、腫瘍を外植し、TIM-4-APCで染色した。CT-2Aに対するTIM-4-APC結合の代表的な重複ヒストグラムをBに示し、TIM-4-APCの平均蛍光強度（MFI）をCに示す。

【図3】組換えTIM-4融合タンパク質の概要及び配列を示す図である。A. 組換えTIM-4融合タンパク質の腫瘍及びT細胞結合ドメインを図示するモデルである。B. 組換えTIM-4融合タンパク質のアミノ酸配列である。融合タンパク質は、シグナル配列（配列番号2）、抗ヒトCD3抗体OKT3（配列番号5）から得られるscFvに連結された（配列番号3）マウスTIM-4の細胞外ドメイン（配列番号7）及びタグ（配列番号28）からなる。

【図4】組換えTIM-4融合タンパク質が、腫瘍細胞及びヒトT細胞を結合することを示す図である。A. U87腫瘍細胞を、組換えTIM-4融合タンパク質発現上清又は模擬発現上清と30分間インキュベートした。細胞を、ビオチン化プロテインLとインキュベートする前に徹底的に洗浄した。更に広範に洗浄した後、細胞を、PE標識ストレプトアビジンとインキュベートし、次いでフローサイトメトリーによって分析した。B、C. ヒト（B）又はマウス（C）CD3⁺T細胞を、組換えTIM-4融合タンパク質発現上清又は模擬発現上清と30分間インキュベートし、続いて抗マウスTIM-4-PEとインキュベートした。

【図5】組換えTIM-4融合タンパク質が、*in vitro*で強力な腫瘍細胞毒性を媒介することを示す図である。ヒトT細胞100000個を、CellTrace Violet標識U87 10000個（A）又はCTV標識U87 5000個とCTV標識U87 vIII腫瘍細胞5000個の50：50混合物（B）と共培養した。組換えTIM-4融合タンパク質単独又はEGFRvIII抗CD3scFvを、共培養に滴定した。24時間後、生存腫瘍細胞を計数し、「融合タンパク質を含まない」対照に対して標準化して、腫瘍生存パーセントを得た。

【図6】EGFRvIII CAR T細胞と組み合わせた組換えTIM-4融合タンパク質が、異種性腫瘍を有するマウスの生存を延長することを示す図である。NOD-SCID-ガンマ（NSG）マウスに、U87とU87 vIII腫瘍細胞の80：20混合物25000個細胞を頭蓋内移植した。3日後、vIII CAR若しくはTIM-4融合タンパク質を分泌したvIII CAR 2×10^6 個を、頭蓋内投与した、又はマウスを無処置のままにした。マウスの生存を経過観察した。* $p < 0.05$

【図7】組換えTIM-4融合タンパク質を分泌するように修飾したEGFRvIII CARが、EGFRvIII異種性腫瘍を有するマウスにおいて生存を延長することを示す図である。CT2A：CT2A vIIIの50：50混合物を、C57BL/6マウスにIC投与した。7日後、vIII CAR又はvIII x TIM-4 CAR 2×10^6 個を、腫瘍部位に投与した。重要事項：CAR投与前にリンパ球枯渇前処理を実行しなかった。

【発明を実施するための形態】

【0006】

免疫チェックポイント遮断及びキメラ抗原受容体（CAR）T細胞のようなT細胞リダイレクト戦略などの免疫に基づく療法は、特定の一部のがんにおける成功により、過去20年にわたって興奮を集めている。しかしながら、固形腫瘍に対する成功は限定的であり、欠点は、固形腫瘍抗原の異質性にしばしば起因した。枠にとらわれずに考え、通常と異なる、非タンパク質性の標的を利用して腫瘍の異質性によってもたらされる課題を回避する、腫瘍細胞を同定し、標的するための新規の手段が必要とされている。ヒト抗CD3 s c F vに連結されたTIM-4ドメインで構成されるTIM-4融合タンパク質並びにその作製方法及び使用について、本明細書に記載される。

【0007】

融合タンパク質及び構築物：

本発明の一態様は、CD3に特異的な一本鎖可変断片（s c F v）にリンカーを介して連結されうるTIM-4ドメインを含む組換えTIM-4融合タンパク質を提供する。本明細書では、「融合タンパク質」は、キメラタンパク質と呼ばれる場合もあり、別々のタンパク質に元々コードされていた2つ以上の遺伝子又はその部分を接合することによって創出されるタンパク質である。融合遺伝子の翻訳の結果、元のタンパク質それぞれから得られる機能特性を持つ1つ又は複数のポリペプチドが生じる。融合タンパク質は、染色体間のDNAの移動によって体内で生じる場合があり、又は同じ若しくは異なる生物由来の両方のポリペプチドをインフレームでコードする単一の転写産物が形成されるように遺伝子若しくは遺伝子の部分を組み合わせることによって組換えにより作製される場合もある。

【0008】

T細胞膜タンパク質4又はTIM-4（T細胞膜タンパク質4又はT細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有4としても公知でありうる）は、TIMD4遺伝子にコードされるヒトタンパク質である。Tim-4は、様々な免疫細胞及びマクロファージサブセット上で発現されるホスファチジルセリン（PS）受容体である。PSは、原形質膜の細胞質に面する側に一般に存在するリン脂質であり、免疫系から隠れたままである。細胞のストレスは、PSが内面に向くように保つプロセスの異常調節をもたらし、代わりに細胞表面へのPSの露出を促進する場合がある。腫瘍細胞は、原形質膜を調節する能力をしばしば喪失しており、正常細胞がアポトーシスを受けている場合のように、表面に検出可能なレベルのPSを呈する。PSは、細胞表面に露出されると、免疫系に対する寛容効果を有する場合がある。したがってPSの露出によって腫瘍適応性になりうるが、それはまた、免疫学的又はそれ以外の方法で標的されうる「弱点」を腫瘍に残している。例えば、TIMファミリータンパク質は、多様な親和性でPSを結合し、最も強力な結合剤は、TIM-4である。

【0009】

本開示の組換えTIM-4融合タンパク質は、配列番号3又は配列番号3に対して95%同一性を有し、PSに結合可能な配列を含むTIM-4ドメインを含む。組換えTIM-4融合タンパク質は、CD3に特異的なs c F vにリンカーを介して連結されてもよい。ペプチドリンカーは、タンパク質ドメインを連結するために付加されうる短いペプチド配列である。リンカーは、グリシン及びセリンのような可動性残基でしばしば構成され、それにより隣接するタンパク質ドメインは、互いに対して自由に動く。リンカーは、必要に応じて長さ及び内容を変えることができる。一部の実施形態において、リンカーは、グリシン及び／又はセリンアミノ酸を組み合わせてもよい。リンカーは、配列番号4若しくは配列番号4のあらゆる数の連続する繰り返し又はその部分を含んでもよい。配列番号4のリンカーは、図3Bに示されるTIM4融合タンパク質を生成する実施例において使用された。したがって、配列番号4を使用して配列番号3のTIM4ドメインをCD3 s c F vに連結し、それによりヒトにおける使用に特異的なTIM4融合タンパク質を生成することができる。

【0010】

CD3（分化抗原群3）は、タンパク質複合体及び細胞障害性T細胞（CD8+naive T細胞）とヘルパーT細胞（CD4+naive T細胞）両方の活性化に関係するT細胞補助受容体である。CD3は、4本の固有の鎖で構成されている。哺乳動物において複合体は、CD3γ鎖、CD3δ鎖及び2本のCD3ε鎖を含有する。これら鎖は、T細胞受容体（TCR）及びCD3ゼータ（ζ鎖）と結合して、Tリンパ球における活性化シグナルを生成する。本開示の組換えTIM-4融合タンパク質は、リンカーを介してCD3に特異的な1本鎖可変断片（scFv）に連結されてもよい。scFvは、免疫グロブリンの重鎖（VH）及び軽鎖（VL）の可変領域を短いリンカーで接続した融合タンパク質である。CD3に特異的なscFvは、配列番号22（VH CDR1）、配列番号23（VH CDR2）、配列番号24（VH CDR3）、配列番号25（VL CDR1）、配列番号26（VL CDR2）及び配列番号27（VL CDR3）又は配列番号22～27と少なくとも95%同一性を有する配列の相補性決定領域（CDR）を含んでもよい。本開示の抗CD3 scFvは、配列番号5又は配列番号5と少なくとも95%同一性を有する配列を含みうる。CD3に特異的なscFvは、CD3を介してT細胞を結合し、活性化することができる。

10

【0011】

TIM-4融合タンパク質は、N末端シグナル配列を更に含むことができる。N末端シグナル配列は、分泌シグナル配列を含むことができる。分泌シグナル配列又はペプチドは、分泌経路に向けて運命づけられているタンパク質のN末端に存在する短いペプチドを含む。これらタンパク質は、特定のオルガネラ内部に存在するもの、細胞から分泌されるもの、又は細胞膜内へ挿入されるもののいずれかを含む。シグナル配列は、融合タンパク質から除去又は切除されてもよい。したがって、タンパク質として投与される場合、TIM-4融合タンパク質はシグナル配列を一般に欠くことになるが、シグナル配列は、タンパク質の適切な発現及び分泌を可能にするのに必要な場合がある。タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、シグナル配列を一般にコードすることになる。一部の実施形態において、分泌シグナル配列は、配列番号2又は配列番号2と少なくとも90%同一性を有する配列のシグナル配列を含む。シグナルは、一般に長さ15～22アミノ酸であり、当業技術者は、1つのシグナル配列が除去され、別のシグナル配列がその場所に使用されうること認識しよう。

20

本明細書に提供される融合タンパク質は、タグを更に含んでもよい。タグは、様々な目的でタンパク質に付加されうる。タグは、当業者に公知のあらゆるタグを含んでもよく、融合タンパク質の精製、追跡又は画像化の目的で使用されうる。タグの型は、親和性タグ、可溶化タグ、クロマトグラフィータグ、エピトープタグ、蛍光タグ又は酵素的修飾タグを含みうる。一部の実施形態において、タグは、Hisタグ、FLAGタグ、蛍光タグ及びMycタグを含んでもよい。本実施例において、Hisタグが使用された。

30

【0012】

融合タンパク質は、TIM4ドメイン、リンカー及びCD3 scFvを含むことができる。TIM4ドメイン及びCD3 scFvは、互いと比較してあらゆる順序であってもよい。例えば、TIM4ドメインは、融合タンパク質のN末端上にあってもよく、CD3 scFvは、C末端上にあってもよい。或いは、CD3 scFvは、N末端上にあってもよく、TIM4ドメインは、C末端上にあってもよい。例えば、融合タンパク質は、配列番号3、4及び5又は配列番号3、4及び5と少なくとも95%同一性を有する配列を含むことができ、配列番号3及び配列番号5は、配列番号4を介して互いと比較してあらゆる順序で連結される。融合タンパク質は、配列番号2、3、4及び5又は配列番号2、3、4及び5と少なくとも95%同一性を有する配列を含むことができる。融合タンパク質は、配列番号1を含むことができる。融合タンパク質は、配列番号3、4及び5と少なくとも95%同一性を有する配列並びにタグ、又は配列番号2、3、4及び5と少なくとも95%同一性を有する配列並びにタグ、又は配列番号1と少なくとも95%同一性を有する配列及びタグを含んでもよい。

40

【0013】

50

別の実施形態において、組換えTIM-4融合タンパク質は、PSに特異的な抗体部分又はscFvを含んでもよい。一部の実施形態において、抗体部分は、細胞表面に存在するPSに特異的に結合する。PSが細胞の表面上に見られる場合、TIM4又はPSに結合することが可能な他の領域は、PSに特異的に結合する。TIM4ドメイン又はPSに結合することが可能な領域は、表面にPSを一般に発現しない正常で健康な細胞を有意に結合しない。細胞が、PSが適切に調節されておらず、細胞膜の細胞外側に見られるがん細胞である場合、融合タンパク質のTIM4領域は、細胞に結合することが可能である。PSの局在化が調節されていないがん細胞は、転移性がん細胞などの固形腫瘍内にある場合がある。

TIM-4融合タンパク質は、CD3に特異的なscFv又はCD3に特異的な別の抗原結合断片を含むことができる。例えば、抗原結合性断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化されたFv断片(dsFv)及び一本鎖抗体分子(scFv)からなる群から選択される。一部の実施形態において、組換えTIM-4融合タンパク質は、CD3に特異的なscFvを含む。一部の実施形態において、CD3に特異的なscFvは、配列番号22(VH CDR1)、配列番号23(VH CDR2)、配列番号24(VH CDR3)、配列番号25(VL CDR1)、配列番号26(VL CDR2)及び配列番号27(VL CDR3)の相補性決定領域(CDR)を含む。一部の実施形態において、CD3に特異的なscFvは、配列番号5を含む。組換えTIM-4融合タンパク質はヒト、ヒト化、又は半合成でありうる。

【0014】

本開示は、本明細書に記載の組成物又は融合タンパク質のうちの1つ若しくは複数及び適切な担体、賦形剤若しくは希釈剤を含む医薬組成物を提供する。担体、賦形剤又は希釈剤の正確な性質は、組成物の所望の使用によって決まることになり、獣医学的使用に適切又は許容可能なものからヒト使用に適切又は許容可能なものまでの範囲でありうる。組成物は、1つ又は複数の追加の化合物を含んでもよい。

がんなどの疾患若しくは疾患の病徴を処置又は防止するために使用される場合、本明細書に記載される組成物は、単独で、1つ若しくは複数の化合物の混合物として又はそのような疾患及び／若しくはそのような疾患に関連する病徴を処置するのに有用な他の薬剤（例えば、治療的薬剤）との混合物若しくは組合せで投与されてもよい。化合物は、化合物（即ちタンパク質）自体の形態、又は化合物を含む医薬組成物として投与されうる。

組成物を含む医薬組成物は、従来通りの混合、溶解、造粒、糖衣丸を作製する粉末化、乳化、カプセル化、封入又は凍結乾燥プロセスによって製造されうる。組成物は、組成物を薬学的に使用されうる調剤に加工することを容易にする1つ若しくは複数の生理的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤又は添加剤を使用して従来通りの方式で処方されうる。医薬組成物は、例えば、外用、眼、経口、口腔、全身、経鼻、注射、経皮、直腸、経膈、等を含めた実質的にあらゆる様式の投与に適切な形態又は吸引若しくは吸入による投与に適切な形態をとりうる。

【0015】

本明細書に記載される組成物は、意図した結果を達成するのに有効な量、例えばがんを処置又は防止するのに有効な量で一般に使用されることになる。治療利益とは、患者が根本的障害に依然として罹患している可能性があるにも関わらず、患者が気分若しくは症状の改善を報告するような、処置される根本的障害の根絶若しくは改善及び／又は根本的障害に関連する病徴の1つ若しくは複数の根絶若しくは改善を意味する。改善が実現されるか否かを問わず、治療利益は、疾患の進行を停止させる又は減速することにも一般に含む。がんを処置することは、対象においてがん細胞の数若しくは腫瘍のサイズを減少させる、より悪性な形態へのがんの進行を減少させる、がん細胞の増殖を減少させる、又は腫瘍成長の速度を減少させる、がん細胞を死滅させる、がん細胞の転移を減少させる或いは対象においてがんの再発の可能性を減少させることを含むが、これに限定されない。本明細書では対象を処置するとは、対象の症状（例えば、1つ又は複数の病徴）を改善する、疾患の進行を遅延させる、病徴の発現を遅延させる、又は病徴の進行を減速すること等を含む

、疾患に罹患している又は疾患を発症する危険性がある対象に有益性をもたらすあらゆる型の処置のことを指す。

【0016】

投与される組成物の量は、例えば、処置される特定の徴候、投与様式、所望の利益が予防的か治療的に関わらず、処置される徴候の重症度及び患者の年齢及び体重、特定の組成物の生物学的利用能、変換率並びに選択された投与経路下での送達効率、等、を含めた種々の因子によって決まることになる。

特定の使用に対する有効な投薬量及び投与様式の決定は、当業技術者の能力の十分範囲内である。有効な投薬量は、*in vitro* 活性及び代謝アッセイから最初は推定される。例えば、動物に使用する場合の初回投薬量は、*in vitro* アッセイにおいて測定される特定の組成物の IC_{50} 以上である組成物の循環血液又は血清中濃度を達成するように処方される。所望の投与経路を経る特定の組成物の生物学的利用能を考慮に入れてそのような循環血液又は血清中濃度を達成するように投薬量を算出することは、当業者の能力の十分範囲内である。また、初回投薬量は、動物モデルなどの *in vivo* データから推定される。上に記載の様々な疾患を処置又は防止するための活性代謝物の有効性を試験するのに有用な動物モデルは、当業者に周知である。組成物の生物学的利用能及び／又は代謝を試験するのに適切な動物モデルも周知である。当業者は、そのような情報を常法通り適合させてヒト投与に適切な投薬量を決定することができる。

【0017】

投与量は、一般に約 0.0001 mg/kg/day 、 0.001 mg/kg/day 又は 0.01 mg/kg/day ～約 100 mg/kg/day の範囲にあることになるが、他の因子の中でも、上述の、活性組成物の活性、組成物の生物学的利用能、その代謝動態及び他の薬物動態特性、投与様式並びに他の様々な因子に応じてより高い又は低い場合がある。投与量及び間隔は、治療又は予防効果を維持するのに十分な血漿レベルを提供するように個々に調整される。例えば、組成物は、とりわけ、投与様式、処置される特定の徴候及び処方医師の判断に応じて、1週間に1回、1週間に数回（例えば、1日おき）、1日に1回又は1日に複数回投与されてもよい。局所外用投与のような、局所投与又は選択的取り込みの場合、組成物の有効な局所濃度は、血漿中濃度に関係しない場合がある。当業者は、必要以上の実験をすることなく有効な投薬量を最適化することができることになる。

個体（ヒトなど）に投与される組換えTIM-4融合タンパク質の用量は、特定の組成物、投与様式及び処置される疾患の型によって変動しうる。一部の実施形態において、組成物の量は、客観的奏功（部分奏功又は完全奏功など）をもたらすのに有効である。一部の実施形態において、組成物中の組換えTIM-4融合タンパク質の量は、例えば、約 0.001 pg ～約 1000 pg に含まれる。上記の態様のいずれかの一部の実施形態において、組成物中の組換えTIM-4融合タンパク質の有効な量は、全体重の約 0.1 pg/kg ～約 100 mg/kg である。

【0018】

組換えTIM-4融合タンパク質は、例えば、静脈、動脈内、腹膜内、肺内、口腔、吸入、膀胱内、筋肉内、気管内、皮下、真皮内、眼内、くも膜下腔内、経粘膜、及び経皮を含めた様々な経路によって個体（ヒトなど）に投与される。一部の実施形態において、組成物の持続的連続放出製剤が、使用されてもよい。

一部の実施形態において、本明細書に記載されるあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む構築物が、提供される。用語「構築物」又は「ポリヌクレオチド構築物」は、標的細胞中でコードされている配列が複製及び／又は発現することを可能にする、DNA若しくはRNAいずれかのポリヌクレオチドである。構築物は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのいずれか1つに作動可能に連結された外来のプロモーターを含有してもよい。本明細書では、ポリヌクレオチドが、第2のポリヌクレオチド配列と機能的な関係で配置される場合、それは「作動可能に接続される」又は「作動可能に連結される」。用語「作動可能に連結される」とは、調節配列と異種核酸配列の機能的な連結のことを指し、後者の発現をもたらす。例えば、第1の核酸配列が

、第2の核酸配列と機能的な関係で配置されている場合、第1の核酸配列は、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターが、コード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は隣接しており、2つのタンパク質コード領域を接続する必要がある場合、同じ読み枠である。

【0019】

本明細書では、用語「異種プロモーター」、「プロモーター」、「プロモーター領域」又は「プロモーター配列」とは、遺伝子の転写調節領域のことを一般に指し、本明細書に記載されるポリヌクレオチドの5'若しくは3'側、又は前記ポリヌクレオチドのコード領域内に見られうる。一般に、プロモーターとは、細胞内でRNAポリメラーゼを結合し、下流(3'方向)のコード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。典型的な5'プロモーター配列は、その3'終端において転写開始部位に隣接しており、バックグラウンドより高い検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最少の数の塩基又はエレメントを含むように上流に伸びている(5'方向)。プロモーター配列内には、転写開始部位(ヌクレアーゼS1を用いるマッピングによって都合よく定義される)及びRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン(共通配列)がある。

【0020】

一部の実施形態において、構築物は、発現構築物、ベクター又はウイルス性ベクター内にある。ベクターは、一般にDNAである外来核酸配列を、それが複製及び／又は発現されうる別の細胞へ人為的に運ぶための媒体として使用されるあらゆる粒子である。外来DNAを含有するベクターは、組換えDNAと称される。ベクターの4つの主要な型は、プラスミド、ウイルス性ベクター、コスミド及び人工染色体である。発現構築物は、異種プロモーター及び導入された細胞内で発現する能力がある対象となるタンパク質(例えば、組換えTIM-4、CD3 scFv)をコードする核酸配列を含む。発現構築物は、作動可能に連結された外来性遺伝子の発現を指令することが可能なベクターを含む。本明細書においてそのようなベクターは、「組換え構築物」、「発現構築物」、「組換え発現ベクター」(又は単に、「発現ベクター」若しくは「ベクター」)と称され、互換的に使用されうる。適切なベクターは、当業者に公知であり、宿主細胞内でタンパク質として発現されるベクター内にコードされている遺伝子に必要なエレメントを含有する。用語「ベクター」とは、連結される別の核酸を輸送する能力がある核酸分子のことを指す。ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、追加のDNA断片、特に変異体α-galタンパク質をコードする外来のDNA断片がライゲートされうる環状二本鎖DNAループのことを指す。別の型のベクターは、ウイルス性ベクターであり、追加のDNA断片は、ウイルスゲノムにライゲートされてもよい。ウイルス性ベクターは、標的細胞へ対象となるタンパク質をコードするウイルスポリヌクレオチドを輸送するために次いで使用されるウイルス粒子に組み込まれる。特定のベクターは、導入された宿主細胞内で自己複製する能力がある。他のベクターは、宿主細胞に導入すると宿主細胞のゲノムに組み込まれえ、それにより宿主ゲノムと一緒に複製される(例えば、レンチウイルスベクター)。更に、特定のベクターは、作動可能に連結された外来性遺伝子の発現を指令することが可能である。一般に、組換えDNA技術に有用なベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「ベクター」には、同等の機能に役立つウイルス性ベクター[例えば、複製欠損レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス(AAV)]などの発現ベクターがある。

【0021】

ベクターは、2つ以上の異なる供給源由来の配列を含有する異種性外来構築物である。適切なベクターには、プラスミド、発現ベクター、レンチウイルス(レンチウイルスベクター)、アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV)があるが、これに限定されず、とりわけ細胞内で対象となるタンパク質を発現することが可能な構築物を含む。好ましいベクターは、レンチウイルスベクター又はアデノ随伴ベクターである。細胞を形質転換して、細胞内で対象となるタンパク質を発現させることができるウイルス粒子を作製する適切な方

法は、当業者に公知である。細胞は、T細胞でもよく、自家T細胞又は以下でより詳細に記載されるCAR T細胞でもよい。CAR T細胞は、配列番号10を含みうるEGFR ν IIICAR T細胞又は配列番号17を含みうるD2C7 CAR T細胞など、がんを標的することができるCAR T細胞でもよい。当業技術者は、本明細書に提供されるTIM4融合タンパク質及びTIM4融合タンパク質をコードする構築物と組み合わせ使用されうる他のCAR T細胞を決定することができる。

【0022】

本発明の実施において有用な異種プロモーターには、構成的、誘導可能、時間的に調節されている、発達上調節されている、化学的に調節されている、組織優先的、組織特異的プロモーター及び細胞型特異的があるが、これに限定されない。異種プロモーターは、植物、動物、細菌、真菌又は合成プロモーターでもよい。適切なプロモーターは、公知であり、当業者に記載されている。哺乳動物細胞において、典型的なプロモーターには、ニワトリ肉腫ウイルス(RSV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)、サイトメガロウイルス(CMV)、SV40ウイルスプロモーター及び翻訳伸長因子EF-1 α プロモーター又はユビキチンプロモーターがあるがこれに限定されない。

【0023】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含む構築物は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする配列を更に含むことができる。CAR及びTIM4融合タンパク質は、固有のプロモーターを使用して発現されてもよく又は下記の通り単一のプロモーターを使用して発現されてもよく、及びT細胞にトランスフェクト若しくは導入するために単一の構築物若しくは発現ベクター上にあってもよく、又は別々の構築物若しくは発現ベクター上にあってもよい。本明細書では用語「キメラ抗原受容体」若しくは「キメラ受容体」又は「CAR」若しくは「CARs」は、所望の標的に対してあらかじめ定義された結合特異性を有し、T細胞活性化ドメインの細胞内部分に作動可能に接続された(例えば、融合として又は1つ若しくは複数のジスルフィド結合によって連結された別々の鎖として、等)ポリペプチドのことを指す。より具体的には、CARは、操作された受容体であり、発現されると、細胞傷害性細胞、例えばT細胞、NK細胞又はマクロファージ上に抗原特異性を付与する。例えば、CARタンパク質は、特定のタンパク質を標的する新たな能力をT細胞に与えるように操作される。本発明のCARは、単一のタンパク質上に天然では一緒に見られない組合せで、少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を持つ細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン(TM)、及び1つ又は複数の共刺激ドメイン(CSD)を含む細胞内ドメイン(ID)を含んでもよい。CARは、受容体を特に含み、細胞外ドメイン及び細胞質ドメインは、天然には単一の受容体タンパク質上に一緒に見られない。更に、キメラ受容体は、生来のT細胞リンパ球において発現されるTCRとは異なる。

【0024】

本明細書では用語「CAR-T細胞」とは、T細胞又はその集団のことを指し、T細胞表面上でキメラ抗原受容体(CAR)を発現するために分子生物学的方法によって修飾されている。CARは、T細胞活性化ドメインの細胞内部分に作動可能に接続されて発現される(例えば、融合、1つ又は複数のジスルフィド結合によって連結された別々の鎖として、等)所望の標的に対してあらかじめ定義された結合特異性を有するポリペプチドである。MHCクラスI及びクラスII制限を回避することによって、CD8⁺とCD4⁺サブセット両方のCAR操作されたT細胞は、リダイレクトされた標的細胞認識に動員される。最も一般的なCARは、免疫グロブリン結合機能[例えば、モノクローナル抗体から得られる1本鎖可変断片(scFv)として]の、CD3ゼータ(CD3 ζ)膜貫通及びエンドドメインへの融合である。そのような分子は、その標的の免疫グロブリン結合機能による認識に応じてゼータシグナルの伝達をもたらす。しかしながら、多くの代替物が存在する。例として、天然のT細胞受容体(TCR)アルファ及びベータ一本鎖由来の抗原認識ドメインが、結合機能として使用されてもよい。別法として、受容体細胞外ドメイン(例えばCD4細胞外ドメイン)又はサイトカイン(同族のサイトカイン受容体を有す

る細胞の認識をもたらす)が利用されてもよい。結合機能に必要とされることは、特定の様式で高い親和性で所与の標的を結合することである。

【0025】

膜貫通ドメインは、天然又は合成いずれの供給源から得られてもよい。供給源が天然の場合、ドメインは、あらゆる膜結合又は膜貫通タンパク質から得ることができる。本発明における特定の使用の膜貫通領域は、T細胞受容体のa、b、d若しくはg鎖、CD28、CD3イプシロン、CD3z、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137又はCD154(即ち、少なくとも膜貫通領域を含む)から得ることができる。一部の実施形態において、膜貫通ドメインは、合成でもよく、その場合、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を主に含む。一部の実施形態において、フェニルアラニン、トリプトファン及びバリンの3つ組みが、合成膜貫通ドメインの各末端に見られてもよい。一部の実施形態において、例えば、長さ約2〜約10アミノ酸(2、3、4、5、6、7、8、9又は10のいずれかなど)の長さを有する短いオリゴ又はポリペプチドリンカーは、本明細書に提供されるCARの膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインの間の連結を形成する。一部の実施形態において、リンカーは、グリシン-セリンの2つ組みである。

10

【0026】

本明細書に提供されるCAR-T細胞の細胞内シグナル伝達ドメインは、本明細書に提供されるCAR-T細胞が配置されている免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に参与する。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含めたヘルパー活性でありうる。したがって、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞が特定の機能を実行することを指令するタンパク質部分のことを指す。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が通常利用されるが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮部分が使用される限りにおいて、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、そのような短縮部分は完全な鎖の代わりに使用される。したがって、用語「細胞内シグナル伝達配列」は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆる短縮部分を含むことが意味される。

20

本開示によるCAR-T細胞における使用のための細胞内シグナル伝達ドメインの例には、一緒に作用して抗原受容体の会合後にシグナル伝達を開始するT細胞受容体(TCR)及び補助受容体の細胞質配列、並びにこれら配列のあらゆる誘導体又はバリエーション及び同じ機能的能力を有するあらゆる合成配列がある。

30

【0027】

本開示は、本明細書に記載のあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質の構築物を含むCAR-T細胞及びあらゆる特異性のCARを含むことができる。したがって、TIM-4組換え融合タンパク質は、PSを標的化することが望まれるあらゆるCARと組み合わせ使用される。本明細書に記載されるあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質は、1つ又は複数の構築物中のCARと組み合わせられてもよい。組換えTIM-4融合タンパク質が、CARと共に単一の構築物中に含まれる場合、2A自己切断性ペプチドなどの自己切断部位を含む場合がある。TIM-4融合タンパク質と組み合わせたCARは、野生型EGFRとEGFR V11Iバリエーションの一方又は両方と結合する抗原結合領域を含む細胞外ドメインを含むことができる。細胞外抗原結合領域は、配列番号10若しくは配列番号10と少なくとも95%同一性を有する配列のscFv又は配列番号17若しくは配列番号17と少なくとも95%同一性を有する配列のscFvを含むことができる。一部の実施形態において、CARとTIM-4融合タンパク質は、自己切断部位を介して接続される。一部の実施形態において、自己切断配列は、2A自己切断性ペプチドを損なう場合がある。一実施形態において、2A自己切断性ペプチドは、配列番号11又は配列番号11と少なくとも95%同一性を有する配列である。

40

【0028】

50

本開示は、本明細書に記載のあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質の構築物を含むCAR-T細胞及び本明細書又は他に記載のあらゆるCARを含むことができる。CAR-Tは、配列番号10のEGFR V11I CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、リンカー及び配列番号22～27のCD3に特異的なscFvをコードするポリヌクレオチドを含む構築物を含んでもよく、又は構築物は、配列番号10、3、22、24、25、26及び27と少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。CAR-Tは、配列番号10のEGFR V11I CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、リンカー及び配列番号5のCD3に特異的なscFvをコードするポリヌクレオチドを含む構築物を含んでもよく、又は構築物は、配列番号10、3及び5と少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、CAR-Tは、配列番号17のD2C7 CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、リンカー及び配列番号22～27のCD3に特異的なscFvをコードするポリヌクレオチドを含む構築物を含んでもよく、又は構築物は、配列番号17、3、22、23、24、25、26及び27と少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、CAR-Tは、配列番号17のD2C7 CAR、自己切断部位、シグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、リンカー及び配列番号5のCD3に特異的なscFvをコードするポリヌクレオチドを含む構築物を含んでもよく、又は構築物は、配列番号17、3及び5と少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。構築物は、配列番号11又は配列番号11と少なくとも95%配列同一性を有する配列を含む自己切断部位を含むことができる。構築物は、配列番号2又は配列番号2と少なくとも95%配列同一性を有する配列を含むシグナル配列を含むことができる。構築物は、配列番号4のリンカーを含むことができる。

10

20

30

40

【0029】

本開示は、配列番号10のCAR、配列番号11の自己切断部位、配列番号2のシグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、配列番号4のリンカー及び配列番号22～27のCD3に特異的なscFvをコードする構築物を含むCAR-T細胞を提供する。本開示は、配列番号10のCAR、配列番号11の自己切断部位、配列番号2のシグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、配列番号4のリンカー及び配列番号5のCD3に特異的なscFvをコードする構築物を含むCAR-T細胞を提供する。本開示は、配列番号17のCAR、配列番号11の自己切断部位、配列番号2のシグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、配列番号4のリンカー及び配列番号22～27のCD3に特異的なscFvをコードする構築物を含むCAR-T細胞を提供する。本開示は、配列番号17のCAR、配列番号11の自己切断部位、配列番号2のシグナル配列、配列番号3のTIM-4ドメイン、配列番号4のリンカー及び配列番号5のCD3に特異的なscFvをコードする構築物を含むCAR-T細胞を提供する。配列番号20又は配列番号20と少なくとも95%配列同一性を有する配列をコードする構築物を含むCAR-T細胞が、提供される。配列番号21又は配列番号21と少なくとも95%配列同一性を有する配列をコードする構築物を含むCAR-T細胞も、提供される。

【0030】

ポリペプチド又はその部分の発現を評価するために、細胞に導入される発現ベクターは、ウイルス性ベクターによってトランスフェクト又は感染させようと試みた細胞集団から発現している細胞を同定し、選択することを容易にするための選択可能なマーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか若しくは両方を含有することもできる。他の態様において、選択可能なマーカーは、DNAの別々の断片に保有され、同時トランスフェクション手順に使用されてもよい。選択可能なマーカーとレポーター遺伝子の両方は、宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列に隣接することができる。有用な選択可能なマーカーには、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子、などがある。

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定し、調節配列の機能

50

を査定するために使用される。一般に、レポーター遺伝子とは、レシピエント生物若しくは組織に存在していない又は発現しておらず、その発現が、いくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって明らかになるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後、適切な時間でアッセイされる。これらレポーター遺伝子は、タグとして使用されても、TIM4融合タンパク質の一部としてコードされても、TIM4タンパク質が発現されていることを確認する手段として使用されてもよい。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ又は緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子がありうる（例えば、U i - T e しら、F E B S L e t t e r s、479頁、2000年）。これらレポーター
10
のいくつかは、分割レポーター機能を有しており、タグのサイズを有意に減少させるためにレポーターの一部をトランスで提供して、融合タンパク質の標識を達成することができる。そのような分割レポーターは市販されており、当業技術者に周知である。適切な発現系は周知であり、公知の技術を使用して調製又は商業的に入手することができる。一般に、レポーター遺伝子の最も高レベルの発現を示す最小限の5'隣接領域を持つ構築物は、プロモーターと同定される。そのようなプロモーター領域はレポーター遺伝子に連結され、プロモーターに駆動される転写をモジュレートする能力について薬剤を査定するために使用されうる。

【0031】

細胞に遺伝子を導入し、発現させる方法は、当業者に公知である。発現ベクターの文脈において、ベクターは、当業者におけるあらゆる方法によって宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母又は昆虫細胞に容易に導入されうる。例えば、発現ベクターは、物理、化学又は生物学的手段によって宿主細胞に運ばれうる。

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための物理的な方法には、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝突、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、などがある。ベクター及び／又は外来性核酸を含む細胞を生産する方法は、当業者に周知である。例えばSambrookら（2001年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York）を参照のこと。一部の実施形態において、宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクションによって
30
実施される。

【0032】

宿主細胞に対象となるポリヌクレオチドを導入するための生物学的方法には、DNA及びRNAベクターの使用がある。ウイルス性ベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使用される方法になった。他のウイルス性ベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス、などから得ることができる。例えば、米国特許第5,350,674号及び第5,585,362号を参照のこと。

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、微小球、ビーズ並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含めた脂質に基づく系などのコロイド分散体系がある。in vitro及びin vivoでの送達媒体としての使用に典型的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

【0033】

非ウイルス性送達システムが利用される場合、典型的な送達媒体は、リポソームである。脂質製剤の使用が、宿主細胞に核酸を導入する（in vitro、ex vivo又はin vivo）ために考えられている。別の態様において、核酸は脂質と会合されてもよい。脂質に会合される核酸は、リポソームの水性内部にカプセル化されても、リポソームの脂質二重層内に散在されても、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方に会合している連結分子を介してリポソームに結合されても、リポソーム内に捕捉されても、リポソ
50

ームと複合体形成されても、脂質を含有する溶液中に分散されても、脂質と混合されても、脂質と組み合わせられても、脂質中に懸濁液として含有されても、ミセルに含有される若しくはそれと複合体形成されても、又は別の方法で脂質と会合されてもよい。脂質、脂質／DNA又は脂質／発現ベクターに関連する組成物は、溶液中のどんな特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、ミセルとして二重層構造、又は「崩壊性」の構造で存在してもよい。それらは、溶液中に単に散在していてもよく、おそらく、サイズ又は形状が一様でない凝集体を形成する。脂質は、天然に存在する又は合成脂質の場合もある脂肪性物質である。例えば、脂質には、細胞質中に天然に存在する脂肪滴並びに長鎖脂肪族炭化水素を含有する化合物のクラス及び脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール及びアルデヒドのようなその誘導体がある。

10

【0034】

宿主細胞に外来性核酸を導入する、さもなければ本発明の阻害物質に細胞を曝露するために使用される方法に関係なく、宿主細胞中の組換えDNA配列の存在を確認するために、種々のアッセイが実行されうる。そのようなアッセイには、例えば、サザン及びノーザンブロッティング、RT-PCR並びにPCRなど、当業技術者に周知の「分子生物学的」アッセイ；例えば、免疫学的手段（ELISA及びウエスタンブロット）又はアッセイによって特定のペプチドの有無を検出するような「生化学」アッセイがある。

一部の実施形態において、本明細書に提供される配列のバリエーションが考えられる。例えば、抗体部分の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。融合タンパク質又は構築物のアミノ酸配列バリエーションは、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入する、又はペプチド合成によって調製されてもよい。そのような修飾には、例えば、抗体部分のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／又は挿入及び／又は置換がある。最終的な構築物が所望の特徴、例えば、抗原結合性を保有するならば、最終的な構築物に達するために欠失、挿入及び置換のあらゆる組合せを作製することができる。組換えTIM-4融合タンパク質を含めた本明細書に提供される組成物及び配列は、種特異的変形を含んでもよい。例えば、配列番号1、2、3、4、5、10及び17はヒト配列であり、配列番号7、8、14及び17はマウス配列である。種特異的配列及び変形は、所望の対象種及び結果に応じて使用されてもよい。

20

【0035】

方法：

30

本発明の第2の態様は、がんを処置するための方法であって、本明細書に記載されるあらゆる組換えTIM-4融合タンパク質の治療上有効な量、並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を投与する工程を含む、方法を提供する。

対象におけるがんの処置には、がんの増殖を減少、抑制、遅延若しくは防止すること、腫瘍容積を削減すること、及び／又は腫瘍の転移を防止、抑制、遅延若しくは減少することがある。対象におけるがんの処置は、対象内の腫瘍細胞数の削減も含む。用語「処置」は：（a）がん及びがん細胞の増殖を減少、減速又は阻害すること、転移性がん細胞の増殖を減速又は阻害することを含める；（b）腫瘍の更なる増殖を防止すること；（c）対象内のがん細胞の転移を減少又は防止すること；並びに（d）がんの少なくとも1つの病徴を減少又は改善すること、のうち少なくとも1つによって特徴付けることができる。一部の実施形態において、至適有効量は、日常の実験を使用して当業者によって容易に決定されうる。処置の目的は、病徴の緩和若しくは防止、疾患、障害若しくは症状の進行若しくは悪化を減速若しくは停止すること及び／又は疾患、障害若しくは症状の寛解を含む。用語「有効量」又は「治療上有効な量」とは、有益な若しくは望ましい生物学的及び／又は臨床結果をもたらすのに十分な量のことを指す。

40

【0036】

本明細書では、用語、動物又は細胞に本明細書に記載される組成物に対する治療的実体などの薬剤を「投与する」とは、意図する標的に物質を施与、送達又は適用することを指すものとする。治療的薬剤組成物に関して、用語「投与する」とは、動物の所望の場所に治療的薬剤を送達するのに適切なあらゆる経路によって対象に治療的薬剤を接触若しくは

50

施与、送達又は適用することを指すものとし、非経口若しくは口腔経路のいずれかによる送達、筋肉内注射、皮下／真皮内注射、静脈内注射、鞘内投与、口腔投与、経皮的送達、外用投与及び鼻腔内若しくは気道経路による投与を含む。

【0037】

本開示の方法は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫並びに白血病を含むがこれに限定されない、あらゆるがん及びそのあらゆる転移を処置するために使用されうる。一部の実施形態において、がんは、ホスファチジルセリン（PS）発現によって、又はそれに関連して（本明細書において、「PS関連がん」と称される）特徴付けられる。PSは、正常細胞の内葉に通常存在するリン脂質である。しかしながら、悪性黒色腫、白血病、神経芽細胞腫並びに胃癌などのアポトーシス及び非アポトーシス性がん細胞が、その表面にPSを広く発現することが示されてきた。腫瘍細胞の表面に露出したPSは、T細胞活性の抑制に寄与し、腫瘍クリアランスを遮断する。一部の実施形態において、がんは、細胞表面にPSを持つものを含む。一部の実施形態において、がんは、EGFR発現と関連するがんであるEGFR関連がんを含む。適切な例には、これに限定されないが、そのようながんには、乳がん、前立腺がん、大腸がん、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣がん、子宮頸がん、胃腸がん、膵臓がん、神経膠芽腫、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞腫、結腸直腸がん、子宮頸がん、子宮内膜癌種、唾液腺癌腫、中皮腫、腎臓がん、外陰部がん、膵臓がん、甲状腺がん、肝癌種、皮膚がん、黒色腫、脳がん、神経芽細胞腫、骨髄腫、様々な頭頸部がん、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、ユーイング肉腫及び末梢性神経上皮腫がある。一部の実施形態において、がんは神経膠芽腫を含む。

10

20

【0038】

一部の実施形態において、方法は、エフェクター細胞、特にTリンパ球を投与する工程を更に含み、Tリンパ球は、TIM-4融合タンパク質に結合すると活性化される。Tリンパ球は、幹若しくは多能性細胞由来の自家若しくは同種又は分化したT細胞でもよい。Tリンパ球は、標的又は抗原に非特異性でもよい。本開示に有用な典型的なエフェクター細胞には、樹状細胞（未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を含む）、Tリンパ球[native T細胞、エフェクターT細胞、メモリT細胞、細胞傷害性Tリンパ球、ヘルパーT細胞、ナチュラルキラーT細胞、Treg細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）及びリンホカイン活性化型キラー（LAK）細胞など]、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、マクロファージ、好中球、顆粒球及びその組合せがあるが、これに限定されない。エフェクター細胞の亜集団は、当業者に公知の1つ又は複数の細胞表面マーカー（例えば、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD11c、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33、等）の有無によって定義されうる。

30

【0039】

T細胞の活性化とは、成熟したT細胞が、その表面に抗原特異的T細胞受容体を発現して、その同種抗原を認識し、細胞周期に入り、クローン的に拡大及び分化し、サイトカイン又は溶菌酵素を分泌し、免疫系の細胞に基づく機能を開始することによって応答することができるプロセスのことを指す。サイトカイン放出は、T細胞活性化及び有効性の結果であり、活性化型T細胞の少なくとも一部が、IL-1、IL-1 IL-2、IL-4、IFN-IL-10、IL-12、TNF-及びGM-CSFからなる群から選択されるサイトカインなど、1つ又は複数のサイトカインを産生することが好ましい。更に、活性化型T細胞の少なくとも一部は、CD2、CD28、CTLA4、CD40リガンド(gp39)、CD18、CD25、CD69、CD16／CD56、MHCクラスI、MHCクラスII、CD8、CD4、CD3／TCR、CD54、LFA-1及びVLA-4からなる群から選択される表面マーカーの1つ又は複数を好ましくは発現する。T細胞は、投与前に当業者に公知のあらゆる方法で活性化されうる。Tリンパ球は、TIM-4融合タンパク質に結合することにより活性化する、又は特異的に活性化することができる。Tリンパ球は、TIM-4融合タンパク質のscFv抗CD3ドメインに結合しうる。Tリンパ球は、CAR T細胞でもよい。CAR T細胞は、配列番号10のEGFR V111 CAR又は配列番号17のD2C7 CAR又は配列番号10若しくは配列番

40

50

号 17 と少なくとも 95 % 同一性を有する配列を含みうる。

【0040】

一部の実施形態において、組換え TIM-4 融合タンパク質は、Tリンパ球又は CAR-T 細胞とは別に投与されてもよい。一部の実施形態において、組換え TIM-4 融合タンパク質は、Tリンパ球と一緒に及び／又は CAR-T 細胞を含めて投与されてもよい。本開示の組換え TIM-4 融合タンパク質は、Tリンパ球、CAR-T 細胞、又は他の免疫療法、化学療法、照射、手術若しくは他のあらゆるがん処置の標準的治療を含めた他のあらゆるがん療法を投与する前、同時若しくは後に投与されうる。本開示の組換え TIM-4 融合タンパク質は、あらゆる特異性の CAR-T 細胞と投与されてもよい。

本開示の一部の実施形態は、がんを処置するための方法であって、本明細書に記載される CAR-T 細胞のいずれかの治療上有効な量、並びに薬学的に許容可能な賦形剤、担体及び／又は希釈剤を投与する工程を含む、方法を提供する。一部の実施形態において、がんは本明細書に記載されるそれらを含めた PS 関連がん又は EGFR 関連がんである。本開示の一部の実施形態は、がんを処置するための方法であって、本明細書に記載されるあらゆる構築物を含む細胞を投与する工程を含む、方法を提供する。一部の実施形態において、がんは本明細書に記載されるそれらを含めた PS 関連がん又は EGFR 関連がんである。

【0041】

本開示の別の態様は、がんを診断する方法であって、本明細書に提供される TIM-4 融合タンパク質のいずれかと、がんの疑いがある対象においてタグの存在又は蓄積を検出する工程とを含み、タグは、対象由来の細胞を *in vivo* 又は *in vitro* で接触させることによってがんの検出を可能にする、方法を提供する。内科的診断は、どの疾患又は症状が人の病徴及び徴候を説明するか決定するプロセスである。がんは本明細書に記載されるそれらを含めた PS 関連がん又は EGFR 関連がんでありうる。

一部の実施形態において、本開示は、がんを患う対象において T 細胞応答を誘導する方法であって、本明細書に記載される融合タンパク質又は医薬組成物のいずれかの治療上有効な量を対象に投与する工程であって、がんに対する抗腫瘍応答が誘導される、工程を含む、方法を提供する。

本開示の別の実施形態は、がんを患う対象において T 細胞応答を誘導する方法であって、本明細書に記載される CAR-T 細胞のいずれかの治療上有効な量を対象に投与する工程であって、がんに対する抗腫瘍応答が誘導される、工程を含む、方法を提供する。

【0042】

追加の定義

文脈によって指定又は示されない限り、用語「a」、「an」及び「the」は、「1 つ又は複数」を意味する。例えば、「分子 (a molecule)」は、「1 つ又は複数の分子 (one or more molecule)」を意味すると解釈されるべきである。

本明細書では、「約」、「およそ」、「実質的に」及び「有意に」は、当業者によって理解されることになり、使用される文脈によってある程度変動することになる。使用される文脈を踏まえて当業者にとって明確でない用語の使用がある場合、「約」及び「およそ」は、特定の用語のプラスマイナス $\leq 10\%$ を意味することになり、「実質的に」及び「有意に」は、特定の用語のプラスマイナス $> 10\%$ を意味することになる。

本明細書では、用語「含む (include)」及び「含む (including)」は、用語「含む (comprise)」及び「含む (comprising)」と同じ意味を有する。用語「含む (comprise)」及び「含む (comprising)」は、特許請求の範囲に列挙される成分に更に追加の成分を内包することを許容する「開いた」移行用語であると解釈されるべきである。用語「からなる (consist)」及び「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲に列挙される成分以外の追加成分を内包することを許容しない「閉じた」移行用語であると解釈されるべきである。用語「本質的になる」は、部分的に閉じていると解釈されるべきであり、請求される

主題の性質を基本的に改変しない追加成分だけを内包することを可能にする。

【0043】

本明細書では、用語「特異的に」又は「選択的に」結合するは、リガンド／受容体、核酸／相補的核酸、抗体／抗原又は他の結合対（例えば、サイトカインとサイトカイン受容体）について言及する場合、タンパク質及び他のバイオ医薬品の不均一集団中のタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。したがって、指定した条件下で、特定のリガンドは、特定の受容体に結合し、試料中に存在する他のタンパク質に有意な量で結合しない。また、特異的結合とは、例えば、考えられた方法の、結合化合物、核酸リガンド、抗体、又は抗体の抗原結合部位から得られる結合組成物が、他のあらゆる結合化合物との親和性よりもしばしば少なくとも25%大きい、より頻繁には少なくとも50%大きい、ほとんどの場合少なくとも100%（2倍）大きい、通常少なくとも10倍大きい、より通常には少なくとも20倍大きい、最も通常には少なくとも100倍大きい親和性でその標的に結合することを意味する。

10

「配列同一性のパーセンテージ」又は「パーセント類似性」は、比較ウィンドウの間で最適に整列された2つの配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド又はペプチド配列部分は、2つの配列の最適な整列化のための参照配列（追加又は欠失を含まない）と比較して追加又は欠失（即ち、ギャップ）を含みうる。パーセンテージは、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定して一致する位置の数を得、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、その結果に100を乗算して配列同一性パーセンテージを得ることによって算出される。

20

【0044】

用語ポリヌクレオチド又はペプチド配列の「実質的同一性」若しくは「実質的類似性」とは、ポリヌクレオチド又はペプチドが少なくとも75%配列同一性を有する配列を含むことを意味する。別法として、パーセント同一性は、75%～100%の任意の整数であることができる。より好ましい実施形態は、：本明細書に記載されるプログラム；好ましくは、記載されている標準的なパラメータを使用するBLASTを使用して参照配列と比較して少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%を含む。これら値を適切に調整して、コドン縮重、アミノ酸類似性、読み枠の位置決め、等を考慮することによって2つのヌクレオチド配列にコードされるタンパク質の対応する同一性を決定することができる。

30

本明細書に記述される全ての方法は、本明細書において指示される又は文脈によって明確に否定されない限りあらゆる適切な順序で実行されうる。本明細書に提供されるあらゆる例又は典型的な語法（例えば「のような(such as)」）の使用は、本発明をより明確にすることを単に意図するものであり、特に主張されない限り本発明の範囲に対する限定を述べるものではない。本明細書内のどの語法も、主張されていないあらゆるエレメントを本発明の実施に不可欠であると示すものと解釈されるべきでない。人体を処置する方法は、第2の医学的使用若しくは他の関連する特許請求の範囲の形式に再フォーマットされ、がんの処置又はがんの診断に使用するための医薬を生産するための本明細書に提供される組成物の使用を含みうる。

40

【0045】

本開示は、本明細書に述べられる構築、成分の配置又は方法工程の特定の詳細に限定されない。本明細書に開示される組成物及び方法は、以下の開示の観点から当業者には明らかであろう様々な方法で作製、実行、使用、実施及び／又は形成されうる。本明細書に使用される言い回し及び用語は、単なる説明を目的とするものであり、特許請求の範囲を限定するものと考えられるべきではない。様々な構造又は方法工程のことを指す説明並びに特許請求の範囲に使用される、第1、第2及び第3のような序数の表示は、あらゆる特定の構造若しくは工程又はそのような構造若しくは工程に対するあらゆる特定の順序若しくは構成を示すものと解釈されることを意味しない。本明細書に記述される全ての方法は、本明細書において指示される又は文脈によって明確に否定されない限りあらゆる適切な順

50

序で実行されうる。本明細書に提供されるあらゆる例又は典型的な語法（例えば、「のよう（such as）」）の使用は、本開示を容易にすることを単に意図するものであり、特に主張されない限り本開示の範囲に対するどんな限定も意味しない。本明細書内のどの語法及び図面内に示されるどの構造も、主張されていないどんなエレメントも開示された主題の実行に不可欠であることを示すと解釈されるべきでない。用語「含む（including）」、「含む（comprising）」又は「有する（having）」及びその変形の明細書における使用は、その後挙げられるエレメント及びその等価物、並びに追加のエレメントを包含することが意味される。特定のエレメントを「含む（including）」、「含む（comprising）」又は「有する（having）」と挙げられる実施形態は、その特定のエレメント「から本質的になる」及び「からなる」とも考えられる。

10

【0046】

本明細書における値の範囲の列挙は、範囲内にある各別々の値を個々に参照する略記法として役立つことを単に意図するものであり、本明細書において指示されない限り、各別々の値は、それがあたかも本明細書に個々に列挙されているかのように、本明細書に組み込まれる。例えば、濃度範囲が、1%～50%と記載される場合、2%～40%、10%～30%又は1%～3%、等のような値が、本明細書において明示的に挙げられるものとする。これらは、特に意図される範囲の単なる例であり、挙げられる最低値と最高値の間及びその値を含めた数値の考え得る全ての組合せが本開示に明示的に記載されると見なされる。特定の列挙された量又は量の範囲について記載する単語「約」の使用は、測定値の形成における製造公差、機器及び人為的過誤などによって説明されうる又は必然的に説明されることになる値など、列挙された量に非常に近い値がその量に含まれることを示すことを意味する。量に関する全てのパーセンテージは、特に明記しない限り質量による。

20

【0047】

本明細書に引用されるあらゆる非特許又は特許文献を含めたいかなる参照も、先行技術を構成することを承認するものではない。特に、特に明記しない限り、本明細書のどの文献への言及も、これら文献のいずれかが、米国又は他のあらゆる国において当業者にとって共通の一般的な知見の一部を形成するという承認を構成するものでないことは理解されよう。参照に関するあらゆる議論は、その著者が主張するものを記載するものであり、本申請人は、本明細書に引用される文献のいずれかの正確性及び妥当性を検証する権利を留保する。本明細書に引用される全ての参照は、明確に示されない限り、参照により完全に組み込まれる。引用した参照に見られるいずれかの定義及び／又は説明の間に何らかの相違が存在する場合、本開示が支配するものとする。

30

以下の例は、例示的であることを単に意味するものであり、本発明又は添付の特許請求の範囲に対する限定を意味するものではない。

【実施例】

【0048】

下記の例において、本発明者らは、組換えTIM-4融合タンパク質及びそれを使用する方法について記載する。

TIM-4でPSを標的する戦略を検証するために、様々なマウス及びヒト腫瘍細胞系に対するTIM-4結合の程度を決定することを最初に試みた。これら研究のために、アロフィコシアニン（APC）で蛍光タグ付けした組換えTIM-4が、フローサイトメトリーによってTIM-4結合を検出するために使用された。無染色の対照と比較して、TIM-4は、試験した実質的に全ての腫瘍細胞系を結合した（図1）。これら腫瘍細胞系は、マウスCT-2A及びSMA-560神経膠腫、マウスB16F10黒色腫、マウスルイス肺癌種（LLC）及びヒトU87神経膠腫を含んだ。特に、TIM-4結合が、PSの公知の結合剤であるアネキシンVと重なることは、TIM-4が腫瘍細胞上のPSを実際に結合していることを示唆した（データ不掲載）。これらデータは、TIM-4が、種々のがん型に対する現実的な標的化部分であるという証拠を提供する。

40

【0049】

50

あらゆる標的療法に含まれる危険性の1つが、毒性である。PSの露出は、腫瘍細胞に限定されず、血小板、活性化型T細胞及びアポトーシス細胞上にも見ることができる。したがって、組換えTIM-4は、オンターゲット、オフ腫瘍毒性を潜在的に誘導する可能性がある。これら毒性を限定する試みにおいて、照射を使用して、腫瘍細胞の表面上へのPS露出を増強させた。これは、標的負荷を増大させ、組換えTIM-4融合タンパク質による腫瘍特異的死滅を理想的には一層もたす。これを試験するために、CT-2A腫瘍細胞を線量10Gyで*in vitro*において最初に放射線照射し、フラスコに次いで播種した。24時間後、細胞を培養から取り出し、APCコンジュゲートしたTIM-4で染色した。TIM-4結合の平均蛍光強度(MFI)が、非放射線照射腫瘍細胞と比較して放射線照射腫瘍細胞においてかなり高かったことは、放射線照射後のPSの露出の増強を示唆した(図2A)。次に、*in vivo*で腫瘍に放射線照射した後にPSの露出及びTIM-4結合が増大したかどうか決定することを試みた。これを試験するために、CT-2Aを、C57BL/6マウスに頭蓋内移植した。14日後、マウスを10Gyの全身放射線照射で放射線照射した又は放射線照射しないままにした。48時間後、腫瘍を、採取し、分離し、APCコンジュゲートしたTIM-4で染色した。*in vitro*観察と同様に、TIM-4結合及びPSの露出は、放射線照射後の腫瘍細胞上で増大した(図2B、図2C)。これらデータは、既にがん療法の要素である照射が、PSの露出を増強し、したがって本開示によるTIM-4標的化戦略と相乗効果をもたらすはずであるという証拠を提供する。

10

20

【0050】

多重特異性抗体は、腫瘍抗原が均一に発現されている状況において強い腫瘍細胞傷害能力を示す。残念ながら、均一な抗原発現は、特に固形腫瘍においてはまれである。しかしながら、本明細書に得られるデータに基づくと、PSは、普遍的で、標的可能な実体を表す。したがって、本発明者らは、表面に露出したPSを標的する多重特異性抗体技術に基づく新規のT細胞リダイレクト療法を開発しようと試みた。この趣旨で、アゴニスト抗ヒトCD3 s c F vに共有結合で連結されたTIM-4の細胞外ドメインを含む多重特異性抗体分子を設計し、発現させた。組換えTIM-4融合タンパク質の構造を図示する概略図を、本開示の一実施形態による組換えTIM-4融合タンパク質のアミノ酸配列と共に図3Bに示す。

30

組換えTIM-4融合タンパク質の各ドメインが、それぞれの標的に対する結合を保持しているかどうか決定することを最初に試みた。組換えTIM-4融合タンパク質(ヒト)を、U87腫瘍細胞とインキュベートし、続いてプロテインL(s c F vを結合する)を用いて検出した(図4A)。組換えTIM-4がU87細胞上で検出可能であったことは、組換えTIM-4融合タンパク質が、PSを介して腫瘍細胞を結合可能であることを示唆した。次に、組換えTIM-4融合タンパク質をヒトT細胞とインキュベートし、続いて蛍光標識抗マウスTIM-4抗体で検出した(図4B)。組換えTIM-4がヒトT細胞上で検出可能であったことは、組換えTIM-4融合タンパク質が、腫瘍細胞上のPSにT細胞をリダイレクトできることを示唆した。マウスT細胞とのインキュベーション後に組換えTIM-4を検出できなかったため、このT細胞結合は、ヒトT細胞に特異的であった(図4C)。

40

【0051】

組換えTIM-4融合タンパク質を武器に、組換えTIM-4が、*in vitro*細胞毒性アッセイにおいて腫瘍細胞の死滅を効率的に媒介できるかどうか決定することによって、機能を次に試験した。このアッセイにおいて、ヒト組換えTIM-4融合タンパク質を、濃度を増大させながら、ヒトT細胞と腫瘍細胞の共培養内で滴定した。腫瘍細胞を蛍光色素で標識して、24時間後のフローサイトメトリーによる腫瘍細胞の定量化を可能にした。各条件で残存する腫瘍細胞の数を、組換えTIM-4の非存在下における腫瘍細胞の数に対して標準化することによって、生存パーセントを算出することができる。組換えTIM-4は、U87の有効な、用量依存的死滅を実証する(図5A)。重要なことに、U87と腫瘍特異性抗原であるEGFR v I I I (U87 v I I I)でトランスフェク

50

トしたU87からなる異種性腫瘍集団において、組換えTIM-4は、EGFR VEGF標的化組換えTIM-4より有効であった（図5B）。これらデータは、腫瘍が抗原異質性を実証する場合でも、組換えTIM-4が強力な腫瘍細胞毒性を媒介することを示唆する。同様に、これは、組換えTIM-4が、目的：タンパク質抗原異質性に直面しても持続し、その能力において現在のプラットフォームより優れている有効な細胞毒性を達成可能であることを示唆する。

【0052】

多重特異性抗体のin vivo半減期は比較的短く、このことは、有効性に必要とされる全体的レベルを維持するには多重特異性抗体の慢性投与が必要であることを意味する。この問題を避け、組換えTIM-4によるオンターゲット、オフ腫瘍毒性の可能性を低下させるために、本発明者らは、腫瘍抗原（EGFR VEGF）特異的CAR T細胞を操作して、腫瘍部位において再生可能な様式で組換えTIM-4融合タンパク質を分泌することになる腫瘍限局媒体として用いた。したがって、組換えTIM-4融合タンパク質は、それ自身の抗腫瘍有効性も保有するCAR T細胞によって局所的に送達され、組合せ療法を提供する。概念を証明するために、組換えTIM-4を分泌するVEGF標的化CARを操作した。これらCAR T細胞を、U87とU87 VEGF細胞からなる異種性腫瘍を有するマウスに次いで頭蓋内投与した（図6）。VEGF CAR単独と比較して、組換えTIM-4を分泌するVEGF CARは、マウスの生存を有意に延長した。これらデータは、組換えTIM-4のin vivo有効性及び療法のための有効な送達媒体である、組換えTIM-4を分泌するCAR T細胞の使用の証拠を提供する。

【0053】

本明細書に示されるデータは、ヒトT細胞に加えて組換えマウス配列を含む異種生物種の組合せの例を提供する。図7は、マウスT細胞における完全マウス組換えTIM-4 VEGF CARベクターを示す。このin vivo実験は、VEGF CARによって分泌される組換えTIM-4が、リンパ球枯渇の再生なしに異種組織腫瘍を持つマウスの生存を延長することを示す。図7は、組換えTIM-4融合タンパク質、及び又はCARが、処置される種と同じ種のものである場合にこの同じ結果が達成されることを実証する。即ち、マウス組換えTIM-4とマウスVEGF CAR及びマウスT細胞が、マウス組換えTIM-4及びVEGF CARを持つヒトT細胞を含む図6と同様の又はより良好な生存の増大をもたらす。これらデータを総合すると、配列番号3、5、17及び10を含むものを含めた完全ヒト系において同様の結果が予想されることが示唆される。

熟練した当業者であれば、本開示が、その目的を実施し、記載されるその結果及び優位性、並びにその中に内在する結果及び優位性を得るようによく構成されていることを容易に認識することになる。本明細書に記載される本開示は、現在、好ましい実施形態の代表例であり、典型例であり、本開示の範囲に対する限定を意図するものではない。当業技術者であれば、特許請求の範囲に定義された本開示の精神に包含されるその中の変更及び他の使用を思い付くことになる。

【0054】

本明細書に引用されるあらゆる非特許又は特許文献を含めたいかなる参照も、先行技術を構成することを承認するものではない。特に、特に明記しない限り、本明細書のどの文献への言及も、これら文献のいずれかが、米国又は他のあらゆる国において当業者にとって共通の一般的な知見の一部を形成するという承認を構成するものでないことは理解されよう。参照に関するあらゆる議論は、その著者が主張するものを記載するものであり、本申請人は、本明細書に引用される文献のいずれかの正確性及び妥当性を検証する権利を留保する。本明細書に引用される全ての参照は、特に明確に示されない限り、参照により完全に組み込まれる。引用した参照に見られるいずれかの定義及び／又は説明の間に何らかの相違が存在する場合、本開示が支配するものとする。

【0055】

10

20

30

40

50

【表 1】

	全長 配列番号：	成分 配列番号：
組換えヒト Tim-4 融合タンパク質	1	2- SS 3- hTim-4 4- リンカー 5- hCD3
組換えマウス Tim-4 融合タンパク質	6	2- SS 7- mTim-4 4- リンカー 8- mCD3
H/M EGFRvIII CAR ヒト EGFRvIII CAR mTIM4 x hCD3	9	10- hEGFRvIII 11- P2A 12- mTIM4xhCD3 (さらに7 & 5)
M/M EGFRvIII CAR マウス EGFRvIII CAR mTIM4 x mCD3	13	14- mEGFRvIII 11- P2A 15- mTIM4xmCD3 (さらに7, 4, 8)
H/M D2C7 CAR ヒト D2C7 CAR mTim4 x hCD3	16	17- hD2C7 11- P2A 12- mTIM4xhCD3 (さらに7 & 5)
M/M D2C7 CAR マウス D2C7 CAR mTim4 x mCD3	18	19- mD2C7 11- P2A 15- mTIM4xmCD3 (さらに7, 4, 8)
H/H EGFRvIII CAR ヒト EGFRvIII CAR hTim4 x hCD3	20	10- hEGFRvIII 11- P2A 2- SS 3- hTim-4 4- リンカー 5- hCD3
H/H D2C7 CAR ヒト D2C7 CAR hTim4 x hCD3	21	17- hD2C7 11- P2A 2- SS 3- hTim-4 4- リンカー 5- hCD3

10

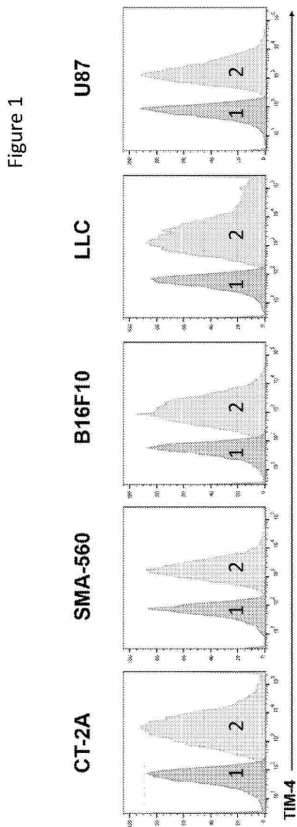
20

30

40

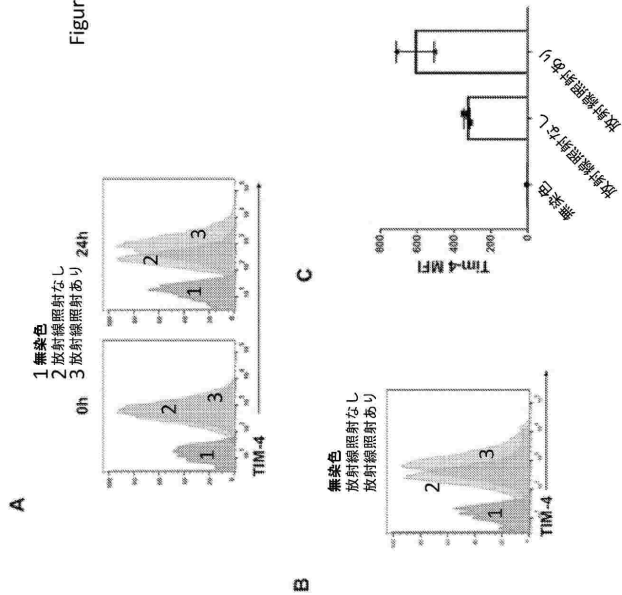
50

【図 1】
【図 2】



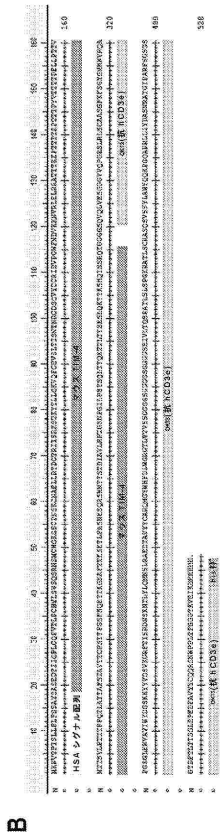
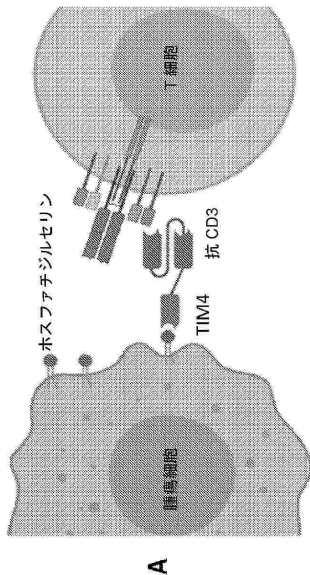
1 無染色
2 TIM4-APC

【図 2】
Figure 2



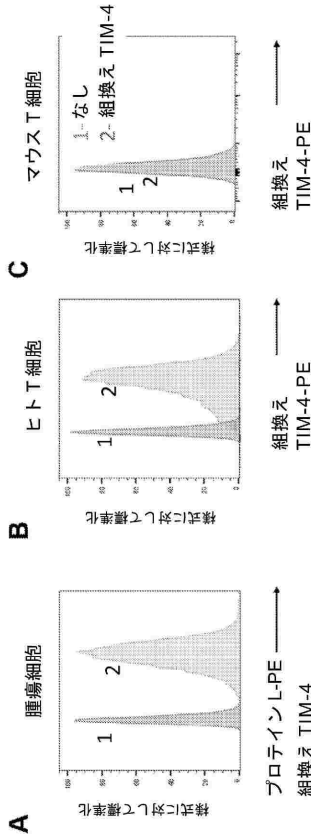
【図 3】

Figure 3



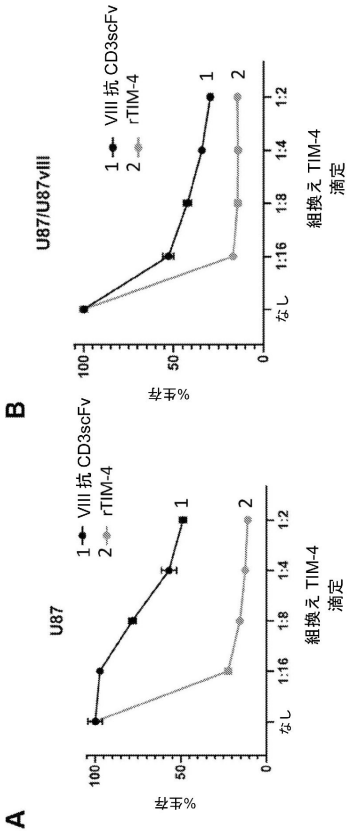
【図 4】

Figure 4



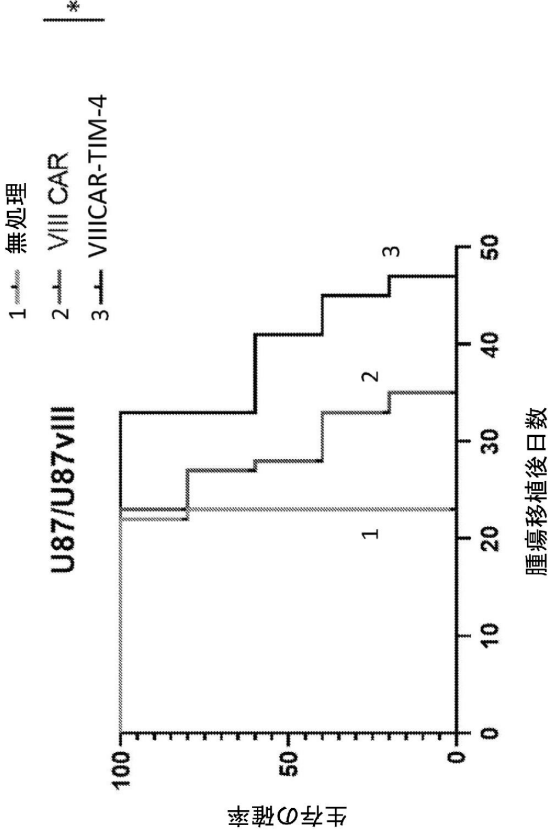
【 図 5 】

Figure 5



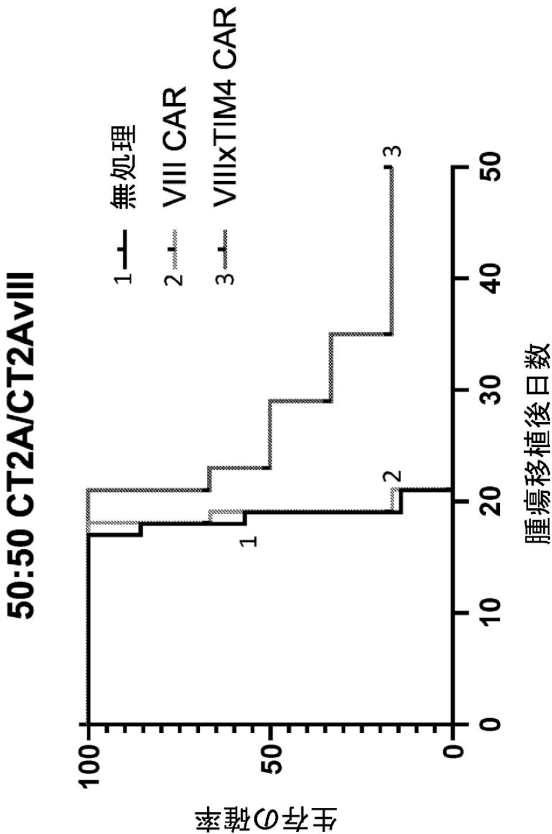
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



10

20

30

40

50

【配列表】
2025512431000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C07K 16/46, C07K 19/00, C07K 16/28, A61K 38/17, A61K 38/00 (2023.01)
ADD. C07K 16/18, A61K 39/395 (2023.01)

CPC - INV. C07K 16/46, C07K 16/468, C07K 19/00, C07K 16/2896, C07K 16/28

ADD. C07K 2317/569, A61K 38/17, A61K 38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/047473 A1 (HCW BIOLOGICS, INC.) 05 March 2020 (05.03.2020) p. 2, ln 16-17; p. 3, ln 17-28; p. 4, ln 25-29; p. 195, ln 26-27; p. 10, ln 1-2; p. 227, ln 12-24; SEQ ID NO: 62	1-4, 9
Y	US 2005/0276756 A1 (HOO et al.) 15 December 2005 (15.12.2005) abstract; para [0041]; SEQ ID NO: 41	1-4, 9
Y	US 2015/0118252 A1 (IMAGINAB, INC.) 30 April 2015 (30.04.2015) para [0007]; [0098]; [0113]; [0114]; SEQ ID NO: 59	1-4, 9
A	WO 2022/036287 A1 (CERO THERAPEUTICS, INC.) 17 February 2022 (17.02.2022) entire document, especially SEQ ID NO: 446	1-4, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2023

Date of mailing of the international search report

SEP 22 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Karl Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65619

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65619

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-8, 10-35, 38-52
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-4, 9, directed to a TIM-4 fusion protein comprising a TIM-4 domain linked to a single chain variable fragment (scFv) specific for CD3.

Group II, claims 36-37, directed to a CAR-T cell comprising a polynucleotide encoding a specific amino acid sequence.

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

—continued on extra sheet—

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 9

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/65619

--continued from: Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a TIM-4 fusion protein comprising a TIM-4 domain linked to a single chain variable fragment (scFv) specific for CD3, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a CAR-T cell comprising a polynucleotide, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical features of a TIM-4 fusion protein (or polynucleotide encoding the same) comprising a TIM-4 domain linked to a single chain variable fragment (scFv) specific for CD3, wherein the scFv specific for CD3 comprises six complementarity determining regions (CDR). However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is previously disclosed by WO 2020/047473 A1 to HCW Biologics, Inc. (hereinafter "HCW").

HCW teaches a TIM-4 fusion protein (or polynucleotide encoding the same) comprising a TIM-4 domain linked to a single chain variable fragment (scFv) specific for CD3 (p. 2, in 16-17 "a single-chain chimeric polypeptide comprising a first target-binding domain, a linker domain, and a second target-binding domain"; p. 3, in 17-18 "In some embodiments, antigen-binding domain comprises a scFv"; p. 3, in 24-26 "one or both of the first target-binding domain and the second target-binding domain bind to a target selected from the group consisting of...CD3"; p. 4, in 25-29 "In some embodiments, one or both of the first target-binding domain and the second target-binding domain is a ligand of a co-stimulatory molecule. In some embodiments, the ligand of a co-stimulatory molecule is a soluble...TIM4"), wherein the scFv specific for CD3 comprises six complementarity determining regions (CDR) (p. 195, in 26-27 "an anti-CD3 scFv can include the six CDRs").

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

Therefore, Groups I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

**Continuation of item 4 above: claims 5-8, 10-35, 38-52 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Notes:

-There is no claim numbered 12 in the application.

-Claim 13 is objected to for depending on claim 10-12. There is no claim numbered 12 in the claim set. For the purposes of this application, claim 13 is construed as though depending from claim 10-11.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	40/31 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 K	40/31	
G 0 1 N	33/536 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	G 0 1 N	33/536	D
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	G 0 1 N	33/536	E
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
		C 1 2 N	5/0783	
		C 1 2 N	15/62	Z

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

弁理士 松田 七重

(74)代理人 100137626

弁理士 田代 玄

(72)発明者 フェッチ ピーター

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 7 0 5 ダーラム アーウィン ロード 2 8 1 2 スイ
ト 4 0 6 デューク ユニバーシティ内

(72)発明者 ウィルキンソン ダニエル

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 7 0 5 ダーラム アーウィン ロード 2 8 1 2 スイ
ト 4 0 6 デューク ユニバーシティ内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C085 AA14 AA16 BB01 BB11 CC23
4C087 AA01 AA02 BB65 DA31 NA05 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
FA74