

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 12월 5일 (05.12.2024)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/248490 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/007365

(22) 국제출원일:

2024년 5월 30일 (30.05.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0069070 2023년 5월 30일 (30.05.2023) KR

10-2024-0069767 2024년 5월 29일 (29.05.2024) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김미란 (KIM, Mi Ran); 16952 경기도 용인시 기흥구 중부대로55번길 60, 105-103, Gyeonggi-do (KR). 이상래 (LEE, Sang Rae); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 164, Gyeonggi-do (KR). 김주희 (KIM, Joo Hee); 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR). 박춘호 (PARK, Choon Ho); 37667 경상북도 포항시 남구 지곡로 260, 106-205, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동,한라원엔원타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, 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, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, 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.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR TARGETING PD-L1 AND T CELL THERAPEUTIC AGENT EXPRESSING SAME

(54) 발명의 명칭: PD-L1을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체 및 이를 발현하는 T 세포 치료제



(57) Abstract: The present invention relates to a chimeric antigen receptor (CAR) binding to PD-L1 of tumor cells and a composition for treating cancer using T cells transformed with an anti-PD-L1 CAR and provides T cells expressing a chimeric antigen receptor binding specifically to PD-L1 overexpressed in various solid cancers. Moreover, in the present invention, T cells are provided with a means capable of selectively expressing a cytokine increasing anticancer efficacy together with a site encoding an anti-PD-L1 chimeric antigen receptor. In addition, the present invention provides a cell therapeutic composition for preventing or treating cancer, the composition comprising T cells expressing the anti-PD-L1 chimeric antigen receptor prepared according to the present invention.

(57) 요약서: 본 발명은 종양세포의 PD-L1 과 결합하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen Receptor, CAR) 및 anti-PD-L1 CAR 로 형질 전환된 T 세포를 이용한 암 치료용 조성물에 관한 것으로, 다양한 고형암에서 과발현되는 PD-L1 에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명에서는 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체를 암호화하는 하는 부위와 더불어 항암 효능을 높이는 사이토카인을 선택적으로 발현할 수 있는 수단을 T 세포에게 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따라 제작된 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 세포 치료제 조성물을 제공한다.

WO 2024/248490 A1

발명의 설명

발명의 명칭: PD-L1을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체 및 이를 발현하는 T 세포 치료제

기술분야

- [1] 본 발명은 종양세포의 PD-L1과 결합하는 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen Receptor, CAR) 및 anti-PD-L1 CAR로 형질 전환된 T 세포를 이용한 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen Receptor, CAR)-T 세포는 혈액암에서 효과적이고 지속적인 임상 치료효과를 나타내어 세포치료제 분야의 혁신을 가져왔다. 키메라 항원 수용체는 특정 표적 항원을 발현하는 암세포를 인식하고 제거하기 위해 T 림프구의 기능을 활성화시키기 위한 조작된 합성 수용체로서 세포 표면에 발현된 표적 항원에 대한 CAR의 결합은 활발한 T 세포 활성화 및 강력한 항암 효과를 나타낸다.
- [3] B 세포 혈액암에 대한 Anti-CD19 CAR-T 세포의 획기적인 성공을 기반으로 미국식품의약국(FDA)은 2017년 키메라 항원 수용체 기반 세포치료제를 승인하기에 이르렀다. 하지만 CAR-T 세포치료제는 환자의 생명을 위협할 수 있는 CAR-T 세포유 발 독성의 문제, 혈액암에 비해 고형암에 대한 제한된 효능, B세포 악성종양에 대한 내성, 제한된 지속성 등 여전히 해결해야 할 많은 과제를 안고 있다. 따라서 CAR-T 세포 요법을 다른 항암요법과 병행하거나 혁신적인 CAR 엔지니어링 전략을 사용하여 항암 효능을 개선하고 임상효과와 지속성의 확장 및 독성을 약화시키는 것을 포함하는 여러 다양한 접근법이 최근에 시도되고 있다.
- [4] PD-L1(Programmed death-ligand 1)은 40 kDa의 내재성 막 단백질(integral membrane protein)로서 특히 암세포는 PD-L1을 과발현하여 종양 항원 특이적 T 세포(tumor antigen-specific T cells)의 공격을 회피하게 된다. 암세포에서 과발현된 PD-L1은 종양항원 특이적으로 활성화된 T 세포에서 발현되는 PD-L1의 수용체인 PD-1과 결합하여, PD-1/PD-L1 신호전달을 통하여 종양 항원 특이적 T 세포의 활성을 억제한다. 따라서 PD-1/PD-L1 신호전달을 억제할 수 있는 항체치료제(면역관문 억제제, immune checkpoint inhibitor)가 개발되어 고형암을 좀 더 효과적으로 제거할 수 있는 치료제로 현재 활발히 사용되고 있다. 더불어서 CAR-T 세포의 고형암에 대한 효능을 높이기 위하여 종양세포 항원과 결합하는 키메라 항원 수용체만 아니라 항암효능을 가지는 다양한 인터루킨(interleukin)이나 케모카인(chemokine)을 함께 발현하도록 하여 면역억제된 고형암의 종양세포 미세환경(tumor microenvironment)을 극복하기 위한 새로운 개념의 CART-T 세포치료제의 개발도 활발해지고 있다.

- [5] 이러한 배경하에서 본 발명자들은 다양한 종양세포에서 PD-L1이 과발현된다는 점을 이용하여 상기 PD-L1과 결합하는 항체를 이용한 키메라 항원 수용체에 항암 효과를 높여주는 인터루킨 유전자를 추가적으로 도입된 CAR-T세포를 제작하였다. 이 때 인터루킨 유전자는 항시적으로 발현되는 것이 아니라 T 세포가 활성화되는 시점에서 발현되어 T세포의 살상능력을 높이면서 다른 항종양 면역세포인 자연살해 세포나 대식세포를 함께 활성화시키면서도 사이토카인 방출 신드롬(cytokine release syndrome)등과 같은 부작용을 최소화시키도록 고안되었다. 이러한 향상된 기능을 가지도록 고안된 CAR-T 세포는 PD-L1을 발현하는 종양세포에 특이적으로 세포 독성 능력이 있음이 확인되었다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] 한국공개특허공보 제10-2019-0082241호 (2019. 07. 09. 공고)

발명의 내용

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 다양한 고형암에서 과발현되는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명에서는 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체를 암호화하는 하는 부위와 더불어 항암 효능을 높이는 사이토카인을 선택적으로 발현할 수 있는 수단을 T 세포에게 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따라 제작된 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 세포 치료제 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명은 anti-PD-L1 scFv 도메인 및 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포의 제작을 위한 벡터를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질감염된 anti-PD-L1 scFv을 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하면서 T 세포의 활성화 여부에 따라 선택적으로 사이토카인을 발현하는 T 세포 및 이를 이용한 암의 예방 또는 치료를 위한 세포 치료제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에 따르면, anti-PD-L1 scFv 도메인을 포함하는 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체는 암세포에서 특이적으로 발현하는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 도메인이며, 상기 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체로 형질전환된 T 세포는 종양 세포에 대한 특이성이 향상될 뿐만 아니라, 세포의 활성화 여부에 따라 선택적으로 사이토카인을 발현하는 유도성 사이토카인(inducible cytokine)

도메인이 함께 형질전환됨에 따라 세포 독성 효과가 현저히 향상된 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor)를 발현시키는 각 도메인의 DNA 구역을 나타내는 모식도이다.
- [14] 도 2는 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor)에 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 추가적으로 포함하는 각 도메인의 DNA 구역을 나타내는 모식도이다.
- [15] 도 3는 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor) 컨스트럭트(construct)를 발현하기 위한 렌티 바이러스 벡터의 모식도이다.
- [16] 도 4은 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor)가 T 세포의 표면에 발현되는 모식도이다.
- [17] 도 5는 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor)를 발현하는 T 세포가 PD-L1 발현 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 대한 세포 독성 효과를 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [18] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [19] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [20] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [21] 본 발명은 anti-PD-L1 scFv 도메인 및 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포의 제작을 위한 벡터를 제공한다.
- [22] 상기 키메라 항원 수용체는 anti-PD-L1 scFv 영역, CD8 TM(transmembrane) 영역, 4-1BB 영역 및 CD3 ζ (zeta) 영역을 포함하며, PD-L1과 결합하는 항체 부위, 세포막 관통 도메인 및 T 세포 신화전달 및 활성화를 위한 도메인을 포함하는 벡터로 제작된다.

- [23] 상기 anti-PD-L1 scFv 영역은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어지거나, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어지거나, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어진 것일 수 있다.
- [24] 상기 anti-PD-L1 scFv 도메인은, 서열번호 8로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 9로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하거나, 서열번호 10으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 11로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하거나, 서열번호 12로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 13으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함할 수 있다.
- [25] 상기 벡터는 상기 anti-PD-L1 scFv 도메인 이후로 순차적으로 CD8 TM(transmembrane) 도메인, 4-1BB 도메인, 및 CD3 ζ (zeta) 도메인을 추가로 포함한다. 상기 CD8 TM(transmembrane) 도메인은 서열번호 18로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 4-1BB 도메인은 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 CD3 ζ (zeta) 도메인은 서열번호 20으로 표시되는 염기서열로 이루어진다.
- [26] 상기 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인은 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프 및 사이토카인을 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함한다. 상기 사이토카인은 IL-2, IL-12, IL-7, IL-15 또는 IL-18 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [27] 구체적으로 상기 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인은 IL-2를 선택적으로 발현할 수 있도록 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프 및 IL-2를 암호화하는 뉴클레오타이드를 순차적으로 포함하는 서열번호 14로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질감염된 anti-PD-L1 scFv를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하면서 T 세포의 활성화 여부에 따라 선택적으로 사이토카인을 발현하는 T 세포를 제공한다.
- [29] 상기 T 세포는 단핵 세포에서 분리된 CD4⁺/CD8⁺ 유형에서 anti-CD3 및 anti-hCD28 로 자극된 T 세포이다.
- [30] 또한, 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 anti-PD-L1 scFv를 포함하는 키메라 항원 수용체를 표면에 발현하면서, 및 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 포함하는, 형질전환된 T 세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약학적조성물을 제공한다.

- [31] 상기 암은 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 진성 다혈구성, 림프종, 호지킨(Hodgkin) 병, 비-호지킨 병, 다발성 골수종, 발덴스트롬(Waldenstrom) 거대글로불린 혈증, 중쇄 질환, 섬유 육종, 점액 육종, 지방 육종, 연골 육종, 골육종, 척삭종, 혈관 육종, 내피 육종, 림프관 육종, 림프관 내피 육종(lymphangioendotheliosarcoma), 활막종, 중피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근 육종, 횡문근 육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 용모 암종, 고환종, 태생성 암종, 윌름(Wilm) 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐암종, 소세포 폐암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종 중에서 선택된 어느 하나 이상의 질병일 수 있다.
- [32] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [33] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [35] 본 발명에서 벡터는 세포의 안정적인 형질 감염을 가능하게 하는 도구로 상기 벡터는 전이 유전자(들)의 세포 게놈 내로의 편입을 가능하게 한다. 바람직하게는, 이러한 벡터는 양성 선택 마커를 갖고 적합한 양성 선택 마커는 유전자를 발현하지 않는 세포를 살해하는 조건 하에서 세포가 성장하도록 하는 임의의 유전자를 포함한다. 비-제한적인 예에는 항생제 저항성이 포함될 수 있다. 추가적으로 상기 벡터는 플라스미드 벡터이며, 보다 구체적으로 상기 벡터는 바이러스 벡터이고, 당업자에 의해 임의로 적합한 벡터로 대체하여 사용될 수 있으며, 바람직하게 상기 벡터는 렌티 바이러스 벡터, 레트로 바이러스 벡터, DNA 벡터, 플라스미드, RNA 벡터, 아데노 바이러스 벡터, 또는 아데노 바이러스 연관 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 본 발명에서 단백질은 "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"와 상호 교환적으로 사용되며, 펩타이드 결합에 의해 공유 연결된 아미노산 잔기를 갖는 화합물을 가리킨다. 단백질 또는 펩타이드는 적어도 2 개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질 또는 펩타이드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 수에 대한 제한은 없다. 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 서로 결합된 2 개 이상의 아미노산을 갖는 임의의 펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 여기서 사용된 용어는 두가지 사슬을 모두 가리키며, 짧은 사슬은 또한 통상 당 업계에서의 펩타이드, 올리고펩타이드 및 올리고머를 예를 들어 지칭되며 더 긴 사슬에 대해서는 일반적으로 당 업계에서의 단백질로 지칭되는 데 많은 종류가 거기에 속한다. "폴리펩타이드"는 예를 들어 생물학적으로 활성 단편, 실질적으로 동종의 폴리 펩타이드, 올리고펩타이드, 동종이합체, 이질이합체, 폴리펩타이드의 변이체, 변형된 폴리펩타이드, 유도체, 유사체, 융합단백질, 등을 포함한다. 폴리펩타이드는 천연 펩타이드, 재조합 펩타이드, 합성 펩타이드, 또는 이들의 조합물을 포함한다.

[37] 본 발명에서 뉴클레오타이드는 통상적으로 폴리뉴클레오타이드와 동일한 의미로 사용되며, DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 핵산으로 뉴클레오타이드의 중합체이며, 폴리뉴클레오타이드는 단량체인 뉴클레오타이드로 가수분해 될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수단, 즉 통상적인 클로닝 기술 및 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 등을 사용한 재조합 라이브러리 또는 세포유전체로부터의 핵산 서열 클로닝을 포함하는 당 업계에서 이용 가능한 임의의 수단 그리고 합성 수단에 의해 획득된 모든 핵산 서열을 포함 하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[38] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예 및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[39]

[40] 실시예 1. Anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor)의 제작

[41] 본 발명에 따른 anti-PD-L1 키메라 항원 수용체(Chimeric antigen receptor, 이하 CAR)는 유전자 데이터베이스를 토대로 도 1에 나타난 바와 같이, anti-CD-19 CAR 구성을 참고하여 anti-PD-L1 CAR 암호화하는 유전자 컨스트럭트(construct)를 제작하였다. 본 실시예에서는 상기 CAR의 하나의 양태로서 순차적으로 PD-L1과 결합하는 단일사슬 가변 단편(single chain variable fragment, scFv) 영역, CD8 TM(transmembrane) 영역, 4-1BB 영역, 및 CD3 ζ (zeta) 영역을 포함하도록 설계되었다. 상기 scFv 도메인은 세포

밖으로 노출되도록 설계되었으며, 하기 표 1과 같은 구성을 갖도록 3 종류로 제작되었다. 구체적으로 본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR는 anti-PD-L1 scFv 영역으로 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어진 A 타입이거나, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어진 B 타입이거나, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어진 C 타입일 수 있다.

[42] [표1]

타입		아미노산 서열	SEQ . No.
A	경쇄 (light chain)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGGTKVEIK	1
	중쇄 (heavy chain)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHW VRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFD YWGQGTLLTVSS	2
B	경쇄 (light chain)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLPWTFGQGGTKVEIK	3
	중쇄 (heavy chain)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFG ELAFDYWGQGTLLTVSS	4
C	경쇄 (light chain)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSW YQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTA SLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGKVTVL	5
	중쇄 (heavy chain)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMW VRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVD YWGQGTLLTVSS	6

[43]

[44]

본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR는 세포막관통 영역으로 CD8 TM(transmembrane) 영역을 포함한다. CD8 TM(transmembrane) 영역은 서열번호

15로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR는 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 4-1BB 영역 및 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 CD3 ζ (zeta) 영역을 포함하며, 상기 4-1BB 영역 및 CD3 ζ (zeta) 영역은 세포 내부에 발현되도록 설계되었다.

[45] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR 유전자 컨스트럭트는 순차적으로 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 링커 서열, anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자, CD8 TM(transmembrane) 도메인, 4-1BB 도메인, 및 CD3 ζ (zeta) 도메인을 포함되도록 제작되었다.

[46] 상기 CAR 유전자 컨스트럭트 A 타입은 서열번호 8로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 9로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 포함한다.

[47] 상기 CAR 유전자 컨스트럭트 B 타입은 서열번호 10으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 11로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 포함한다.

[48] 상기 CAR 유전자 컨스트럭트 C 타입은 서열번호 12로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 13으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 포함한다.

[49] 상기 CD8 TM(transmembrane) 도메인은 서열번호 18로 표시되는 염기서열로 구성된다. 상기 4-1BB 도메인은 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 구성된다. 상기 CD3 ζ (zeta) 도메인은 서열번호 20으로 표시되는 염기서열로 구성된다.

[50] 추가적으로 본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR 유전자 컨스트럭트는 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 유도성 사이토카인 도메인은 항상 발현되는 것이 아니라 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체에 감염된 T 세포의 활성화에 따라 발현되도록 고안되었으며, 과도한 사이토카인으로 인한 독성 및 염증 발생을 방지할 수 있도록 설계되었다.

[51] 본 발명의 일 실시의 양태에서는 도 2에 나타난 바와 같이, anti-PD-L1 CAR 구성의 3' 말단으로 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프 및 IL-2를 암호화하는 뉴클레오타이드를 순차적으로 포함하는 유도성 IL-2(inducible IL-2) 도메인을 포함한다. 상기 유도성 IL-2(inducible IL-2) 도메인을 암호화하는 유전자는 서열번호 14로 표시되는 염기서열로 구성된다. 상기 유도성 IL-2(inducible IL-2) 도메인을 암호화하는 유전자는 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프를 포함함으로써, IL-2(interleukin-2)의 발현을 선택적으로 유도할 수 있으며, 상기 유도성 IL-2(inducible IL-2) 도메인을 통해 발현된 IL-2는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 구성된다.

[52]

[53] 실시예 2. Anti-PD-L1 CAR 발현용 벡터 및 렌티바이러스의 제작

- [54] 본 발명에 따른 anti-PD-L1 CAR를 발현시키기 위한 벡터를 제작하고 이를 전달하는 수단으로 렌티 바이러스를 사용하였다. 도 3에 나타난 바와 같이 3세대 렌티바이러스 벡터인 pSL-BBZ를 기본 백본(backbone)으로 사용하였다. 벡터에 본 발명의 anti-PD-L1 CAR 컨스트럭트(construct)를 삽입하였다.
- [55] 상기 anti-PD-L1 CAR 컨스트럭트(construct)에서 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자가 Bam H1 위치와 Xho I 위치 사이에 위치한다. 또한, 실험상 발현 여부를 확인할 수 있도록 상기 CAR 컨스트럭트(construct)의 말단으로 EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein) 서열이 발현되도록 설계되었다.
- [56] 합성한 유전자는 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 통해 렌티바이러스 플라스미드 벡터에 서브클로닝(subcloning) 하였다. 최종적으로 유전자 서열의 정확성은 클로닝된 플라스미드의 특이적 프라이머를 통한 염기서열 시퀀싱을 통하여 확인하였다. 또한 IL-2, IL-12, IL-7, IL-15 또는 IL-18 등의 사이토카인 유전자들의 뉴클레오타이드 서열과 그 조절부위들도 유전자데이터베이스에서 확인하여 합성하였고 상기와 같은 방법으로 렌티바이러스 플라스미드 벡터에 서브클로닝하여 최종적으로 anti-PD-L1 CAR 컨스트럭트(construct)로 제작하였다.
- [57] 본 실시예에서는 상기 CAR 유전자 컨스트럭트 C 타입에 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프 및 IL-2를 암호화하는 뉴클레오타이드를 순차적으로 포함하는 유도성 IL-2 (inducible IL-2) 도메인을 순차적으로 포함하도록 anti-PD-L1 CAR 컨스트럭트(construct)를 제작하였다.
- [58] 상기 anti-PD-L1 CAR 컨스트럭트(construct)가 포함되도록 설계된 렌티 바이러스 벡터 3 μ g을 Lipofectamine(Thermo Scientific #R0531)를 이용하여 HEK293T 세포(5×10^6 cells)에 감염시켰다. 48 시간 동안 배양한 후 상등액을 회수하여 0.45 μ m 필터를 통해 바이러스 입자만을 정제하였다. 정제된 바이러스 입자는 28000 rpm에서 2시간 동안 초원심분리하여 농축하였다.
- [59]
- [60] **실시예 3. 인간 T 세포 분리 및 활성화**
- [61] 본 발명에 따른 상기 anti-PD-L1 CAR를 발현하는 T 세포를 제작하기 위해 사람의 말초 혈액으로부터 단핵 세포를 분리하였다. 말초혈액 단핵세포로부터 자력이용 세포분리법(MACS)으로 CD8⁺ T 세포를 분리하였으며, 1:1의 비드 대 세포 비율로 anti-hCD3 및 anti-hCD28-코팅된 면역비드로 24 시간 내지 36 시간 동안 자극하여 분리된 CD4⁺/CD8⁺/CD3⁺ T 세포로 준비하였다.
- [62]
- [63] **실시예 4. Anti-PD-L1 CAR 발현 T 세포 제작**
- [64] 상기 실시예 3에서 활성화된 T 세포를 32°C에서 Novo Nectin(Novoprotein) 코팅된 48well plate 플랫 플레이트에서 농축된 anti-CAR 렌티바이러스 벡터와

함께 배양하였다. 형질도입 후 6일 내지 7일 후에 면역 비드를 제거하고, T 세포를 세포 밀도를 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 내지 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 로 3일 마다 조정하였다.

[65]

[66] 실시예 5. Anti-PD-L1 CAR T 세포의 PD-L1+ 암세포주에 대한 세포독성

[67] 본 발명에 따라 제조된 anti-PD-L1 CAR를 발현하는 T 세포의 암 세포에 대한 살상 효과를 확인하기 위해 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 대한 암세포 살상 효과를 평가하였다. 비교를 위해서 anti-CD-19 CAR를 발현하는 T 세포를 비교군을 사용하였다. 상기 anti-CD-19 CAR는 도 1에 나타난 바와 같이, anti-CD-19 CAR 구성을 사용하였으며, CAR 발현 T 세포는 anti-PD-L1 CAR와 동일하게 렌티 바이러스를 이용하여 제작하였다. MDA-MB-231 세포를 96 well 플레이트에 2×10^4 cell/mL로 넣고, FBS를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 각각의 CAR로 형질전환된 T 세포를 다양한 비율로 well에 첨가한 후 37°C 에서 4 시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 웰에서 배지를 제거하고 다시 0.2% MTT(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium)를 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고, 2 시간 동안 37°C_2 배양기에서 배양하였다. 상등액을 제거한 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어준 후 5분간 현탁시켜 생성된 formazan 용해시키고 마이크로 플레이트 판독기(microplate reader)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하 암세포의 사멸을 측정하였다.

[68] 도 5에 나타난 바와 같이, 각각의 CAR로 형질전환된 T 세포를 암세포와 반응한 경우 4시간에서는 효과기(Effector; E) T 세포와 타겟(Target; T) 암세포간의 비율(E:T ratio)의 변화에도 세포독성이 크게 변화되지 않는 것으로 확인되었다. 24 시간 반응한 경우에는 E:T 비율이 10:1 에서 1:4로 변화하는 경우 anti-CD-19 CAR T 세포와 반응한 암세포의 사멸율이 급격히 낮아지는 것으로 나타났다. 반면, anti-PD-L1 CAR T 세포와 반응한 암세포의 사멸율은 E:T 비율이 10:1 에서 1:4로 변화하여도 암세포의 사멸율이 현저히 우수하게 나타났다.

[69] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

[70] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이

명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

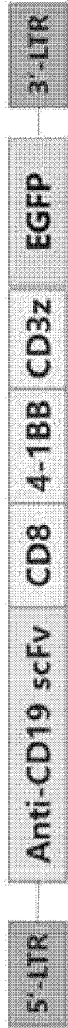
청구범위

- [청구항 1] anti-PD-L1 scFv 도메인 및 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포의 제작을 위한 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 anti-PD-L1 scFv 영역, CD8 TM(transmembrane) 영역, 4-1BB 영역 및 CD3 ζ (zeta) 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 anti-PD-L1 scFv 영역은, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어지거나, 서열번호 3로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어지거나, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 경쇄(light chain) 및 서열번호 6로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 중쇄(heavy chain)로 이루어진 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 anti-PD-L1 scFv 도메인은, 서열번호 8로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 9로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하거나, 서열번호 10으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 11로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하거나, 서열번호 12로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자, 및 서열번호 13으로 표시되는 anti-PD-L1 scFv의 중쇄(heavy chain)를 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 벡터는 상기 anti-PD-L1 scFv 도메인 이후로 순차적으로 CD8 TM(transmembrane) 도메인, 4-1BB 도메인, 및 CD3 ζ (zeta) 도메인을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 CD8 TM(transmembrane) 도메인은 서열번호 18로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 4-1BB 도메인은 서열번호 19로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상기 CD3 ζ (zeta) 도메인은 서열번호 20으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 벡터.

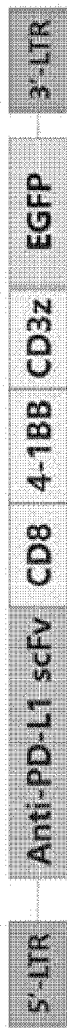
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인은 NFAT(Nuclear factor of activated T cells) 결합 모티프 및 사이토카인을 암호화하는 유전자를 순차적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-2, IL-12, IL-7, IL-15 또는 IL-18 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 유도성 사이토카인(inducible cytokine) 도메인은 서열번호 14로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 벡터는 렌티 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 벡터로 형질감염된 T 세포.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 T 세포는 단핵 세포에서 분리된 CD4⁺/CD8⁺ 유형에서 anti-CD3 및 anti-hCD28 로 자극된 T 세포인 것을 특징으로 하는 T 세포.
- [청구항 13] 제11항의 T 세포를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

[도1]

Anti-CD-19 CAR



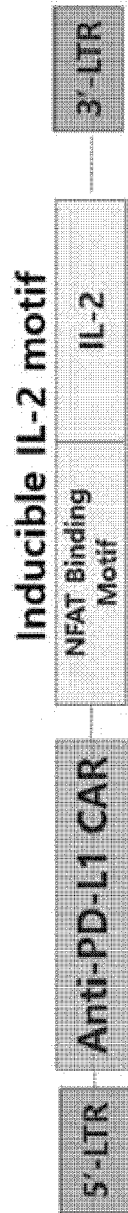
Anti-PD-L1 CAR



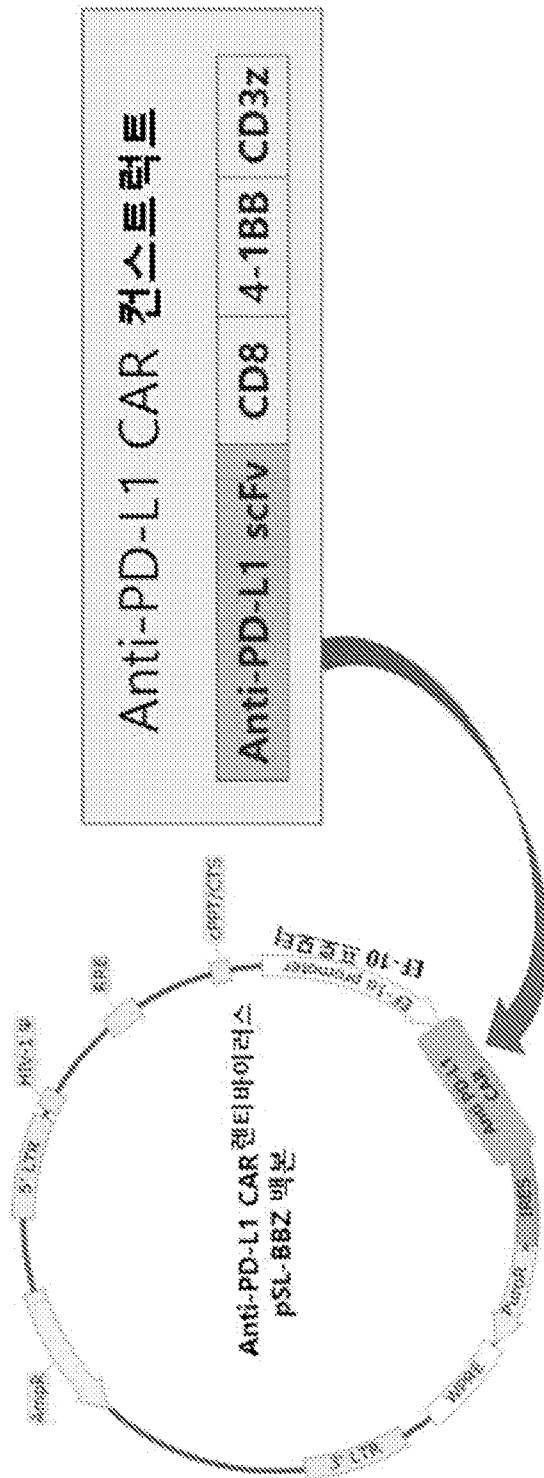
Anti-PD-L1 CAR IC(Inducible Cytokine)유도성 사이토카인



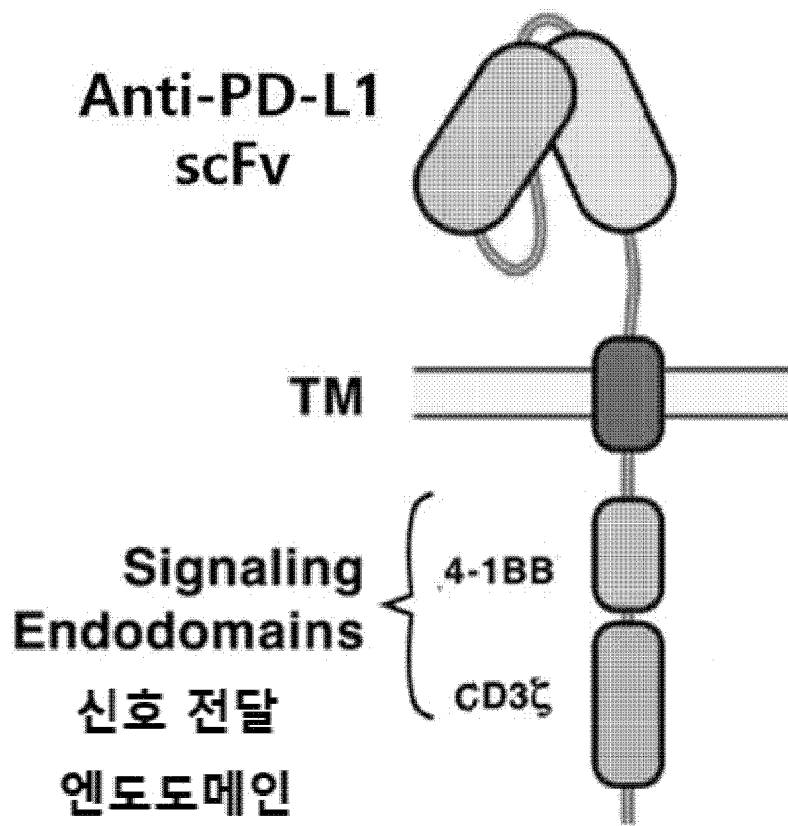
[도2]



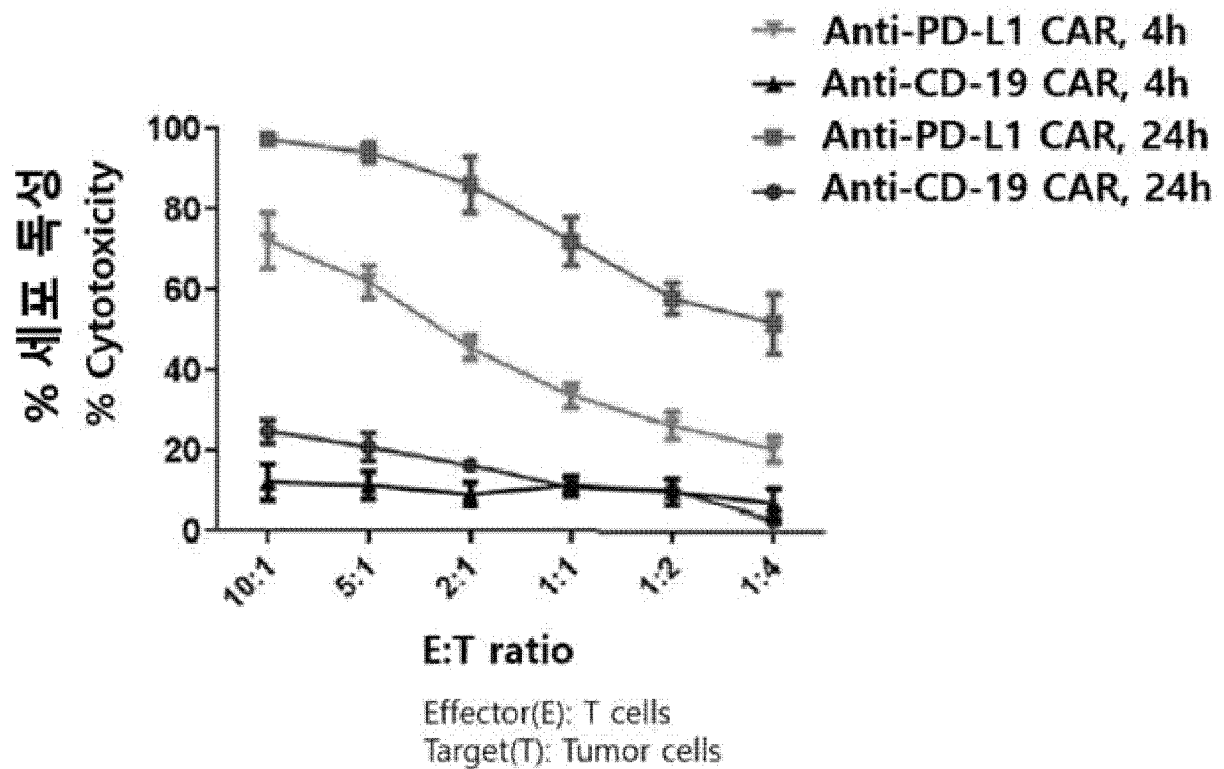
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007365

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/86(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i;
C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

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)

C12N 15/86(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 38/21(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 47/68(2017.01);
A61P 35/00(2006.01); C07K 16/28(2006.01)

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

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 항-PD-L1 scFv(anti-PD-L1 scFv), 유도성 사이토카인(inducible cytokine), 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell, CAR T cell), CD8 TM(transmembrane), 4-1BB, CD3zeta, NFAT(Nuclear factor of activated T cells)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHENG, W. Improving CEA-Targeted CAR-T cell Therapy for Solid Tumours. A thesis submitted to the University of Manchester for the degree of Doctor of Philosophy in the Faculty of Biology, Medicine and Health. 2020, pp. 1-213. See pages 37, 160 and 200.	1-13
A	CHMIELEWSKI, M. et al. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. Immunological Review. 2014, vol. 257, pp. 83-90. See entire document.	1-13
A	STOCK, S. et al. Enhanced Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy through Co-Application of Synergistic Combination Partners. Biomedicines. 2022, vol. 10, thesis no.: 307, pp. 1-27. See entire document.	1-13
A	KR 10-2022-0012856 A (REMEGEN CO., LTD.) 04 February 2022 (2022-02-04) See entire document.	1-13



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

24 September 2024

Date of mailing of the international search report

25 September 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2023-023065 A1 (WEREWOLF THERAPEUTICS, INC.) 23 February 2023 (2023-02-23) See entire document.	1-13
A	WO 2018-057585 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 29 March 2018 (2018-03-29) See entire document.	1-13
A	WO 2021-161245 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 19 August 2021 (2021-08-19) See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007365

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/007365

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2022-0012856	A	04 February 2022	CN	113795510	A	14 December 2021
				EP	3858862	A1	04 August 2021
				JP	2022-521958	A	13 April 2022
				US	2022-0177590	A1	09 June 2022
				WO	2021-037007	A1	04 March 2021
WO	2023-023065	A1	23 February 2023	EP	4387649	A1	26 June 2024
				US	2024-0216505	A1	04 July 2024
WO	2018-057585	A1	29 March 2018	EP	3515475	A1	31 July 2019
				EP	3515475	B1	01 May 2024
				JP	2019-536469	A	19 December 2019
				JP	2021-052804	A	08 April 2021
				JP	6908710	B2	28 July 2021
				US	11077178	B2	03 August 2021
				US	11992519	B2	28 May 2024
				US	2019-0233526	A1	01 August 2019
				US	2021-0315985	A1	14 October 2021
WO	2021-161245	A1	19 August 2021	CN	115968299	A	14 April 2023
				EP	4103221	A1	21 December 2022
				JP	2023-513351	A	30 March 2023
				KR	10-2022-0141849	A	20 October 2022
				US	2021-0261636	A1	26 August 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/86(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/86(2006.01); A61K 38/20(2006.01); A61K 38/21(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 47/68(2017.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 16/28(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항-PD-L1 scFv(anti-PD-L1 scFv), 유도성 사이토카인(inducible cytokine), 키메라 항원 수용체 T 세포(chimeric antigen receptor T cell, CAR T cell), CD8 TM(transmembrane), 4-1BB, CD3zeta, NFAT(Nuclear factor of activated T cells)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ZHENG, W., "Improving CEA-Targeted CAR-T cell Therapy for Solid Tumours", A thesis submitted to the University of Manchester for the degree of Doctor of Philosophy in the Faculty of Biology, Medicine and Health, 2020, 페이지 1-213 페이지 37, 160, 200	1-13
A	CHMIELEWSKI, M. 등, "Of CARs and TRUCKS: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma", Immunological Review, 2014, 제 257권, 페이지 83-90 전체 문헌	1-13
A	STOCK, S. 등, "Enhanced Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy through Co-Application of Synergistic Combination Partners", Biomedicines, 2022, 제10권, 논문번호: 307, 페이지 1-27 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2022-0012856 A (레베젠 코, 리미티드) 2022.02.04 전체 문헌	1-13
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년09월24일 (24.09.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년09월25일 (25.09.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2023-023065 A1 (WEREWOLF THERAPEUTICS, INC.) 2023.02.23 전체 문헌	1-13
A	WO 2018-057585 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2018.03.29 전체 문헌	1-13
A	WO 2021-161245 A1 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 2021.08.19 전체 문헌	1-13

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0012856 A	2022/02/04	CN 113795510 A	2021/12/14
		EP 3858862 A1	2021/08/04
		JP 2022-521958 A	2022/04/13
		US 2022-0177590 A1	2022/06/09
		WO 2021-037007 A1	2021/03/04
WO 2023-023065 A1	2023/02/23	EP 4387649 A1	2024/06/26
		US 2024-0216505 A1	2024/07/04
WO 2018-057585 A1	2018/03/29	EP 3515475 A1	2019/07/31
		EP 3515475 B1	2024/05/01
		JP 2019-536469 A	2019/12/19
		JP 2021-052804 A	2021/04/08
		JP 6908710 B2	2021/07/28
		US 11077178 B2	2021/08/03
		US 11992519 B2	2024/05/28
		US 2019-0233526 A1	2019/08/01
		US 2021-0315985 A1	2021/10/14
WO 2021-161245 A1	2021/08/19	CN 115968299 A	2023/04/14
		EP 4103221 A1	2022/12/21
		JP 2023-513351 A	2023/03/30
		KR 10-2022-0141849 A	2022/10/20
		US 2021-0261636 A1	2021/08/26