

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 5월 27일 (27.05.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/101244 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/016264

(22) 국제출원일:

2020년 11월 18일 (18.11.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0147496 2019년 11월 18일 (18.11.2019) KR

10-2020-0154076 2020년 11월 17일 (17.11.2020) KR

(71) 출원인: 주식회사 센트릭스바이오 (CENTRICS BIO)

[KR/KR]; 05836 서울시 송파구 법원로11길 28, BK타워 3층, Seoul (KR).

(72) 발명자: 전재원 (JEON, Jaewon); 16512 경기도 영통구 법조로 134, Gyeonggi-do (KR). 이수인 (LEE, Suin); 11949 경기도 구리시 장자호수길 71, Gyeonggi-do (KR). 정준구 (JUNG, Joongoo); 30098 세종특별자치시 보람로 15, Sejong-si (KR). 김우창 (KIM, Woochang); 24434 강원도 춘천시 영서로 2317, Gangwon-do (KR). 윤민지 (YOON, Minji); 33121 충청남도 부여군 규암면 호수로 19, Chungcheongnam-do (KR). 염준호 (YEOM, Junho); 21943 인천시 연수구 미추홀대로 251번길 9, Incheon (KR). 서정은 (SEO, Jeongeun); 01451 서울시 도봉구 우이천로 323-7, Seoul (KR). 한재웅 (HAN, Jaewoong); 12767 경기도 광주시 고불로 453, Gyeonggi-do (KR).

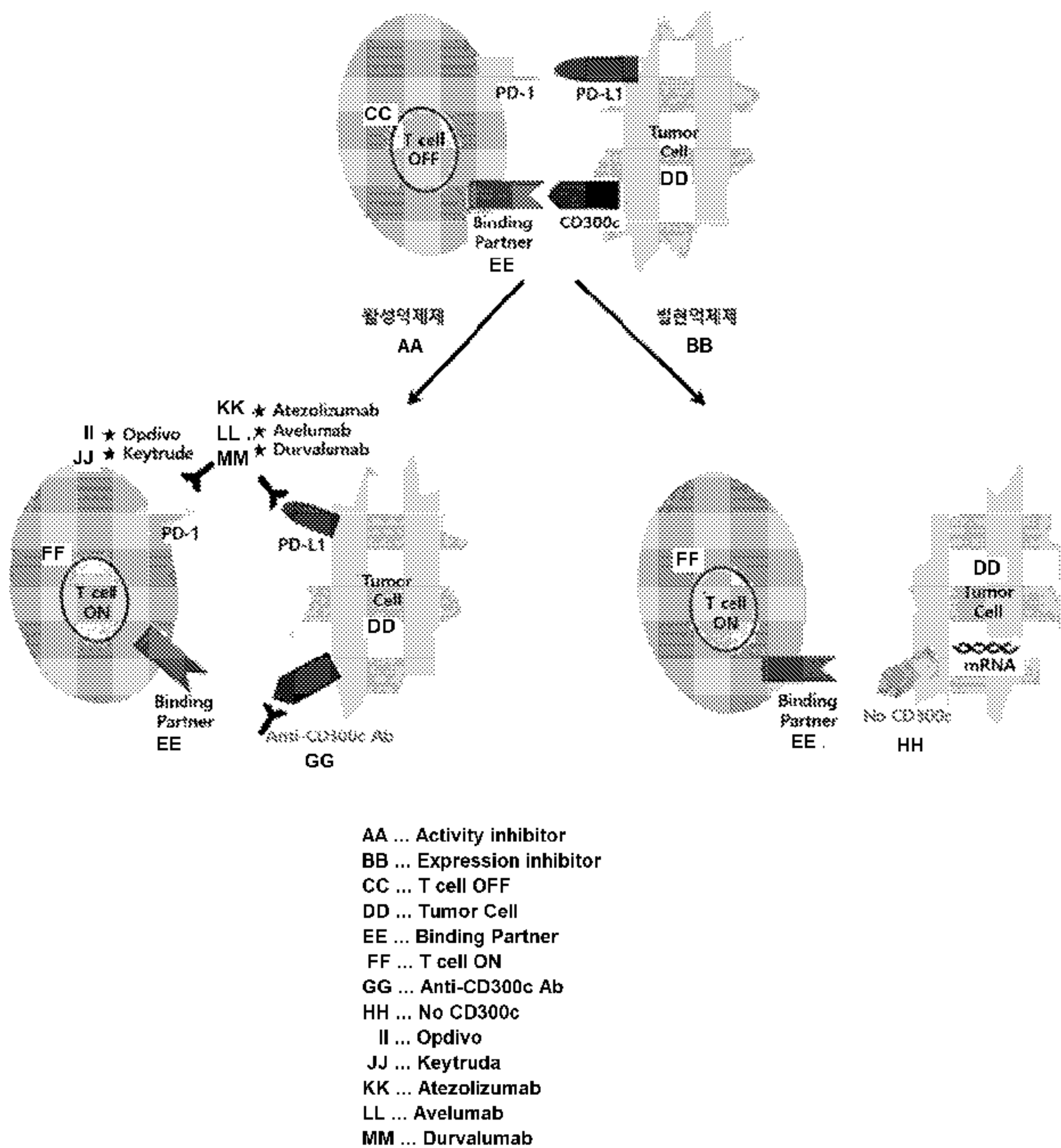
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER, COMPRISING ANTI-CD300C MONOCLONAL ANTIBODIES

(54) 발명의 명칭: 항-CD300C 단클론 항체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to: anti-CD300C monoclonal antibodies; a composition for preventing or treating cancer, comprising same; an anticancer immunotherapy composition comprising same; and the like. Anti-CD300C monoclonal antibodies according to the present invention bind to a CD300c antigen with high specificity and also promote anticancer immune effects, and thus are expected to be effectively used against various cancer growth, development, metastasis and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 항-CD300c 단클론 항체, 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 항암 면역 치료용 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c 항원에 높은 특이성을 가지고 결합할 뿐만 아니라, 항암 면역 작용을 촉진시킴으로 다양한 암의 성장, 발달, 전이 등에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항-CD300C 단클론 항체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항-CD300c 단클론 항체, 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 항암 면역 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 현대인의 사망원인에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 질환 중 하나로서 여러가지 원인에 의하여 발생된 유전자의 돌연변이로 인하여 정상세포가 변화하여 발생된 질병으로서, 정상적인 세포의 분화, 증식, 성장 형태 등을 따르지 않는 종양 중 악성인 것을 지칭한다. 암이란, “제어되지 않은 세포성장”으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포 성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투되고, 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 약물 요법 등으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 특히, 최근에는 노년 인구의 증가, 환경 악화 등으로 인하여 세계 암 발생률은 매년 5% 이상 증가되고 있는 추세이며, WHO 보고서에 따르면 향후 25년 내 암 발생 인구는 3천 만명으로 증가되고, 이중 2천 만명의 인구는 암으로 사망할 것으로 추정되고 있다.
- [3] 암의 약물 치료, 즉, 항암제는 일반적으로 세포 독성을 가지고 있는 화합물로서 암세포를 공격해 사멸시키는 방식으로 암을 치료하는데, 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 손상을 주기 때문에 높은 부작용을 나타낸다. 따라서 부작용을 감소시키기 위하여 표적 항암제들이 개발되었다. 그러나 이러한 표적 항암제들의 경우에는 부작용은 낮출 수 있었으나, 높은 확률로 내성이 생긴다는 한계점을 나타내었다. 따라서, 최근에는 체내의 면역체계를 이용하여 독성 및 내성으로 인한 문제점을 감소시키는 면역 항암제에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이다. 이러한 면역 항암제의 일례로서 암세포 표면의 PD-L1에 특이적으로 결합하여 T 세포의 PD-1과의 결합을 억제하여 T 세포를 활성화시키고, 암세포를 공격하도록 만드는 면역관문억제제가 개발된 바 있다(대한민국공개특허 10-2018-0099557). 그러나 이러한 면역관문억제제의 경우에도 효과를 나타내는 암의 종류가 다양하지 않기 때문에, 다양한 암에서 동일하게 치료 효과를 나타내는 새로운 항암 면역 치료제의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,

항-CD300c 단클론 항체, 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물, 및 이를 포함하는 항암 면역 치료용 조성물 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

- [5] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

기술적 해결방법

- [6] 본 발명은 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 및 50으로 이루어진 군으로 선택된 어느 하나 이상의 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 포함하는, 항-CD300c 단클론 항체를 제공한다. 상기 CDR 서열은 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 및 50으로 이루어진 군으로 선택된 어느 하나 이상의 CDR 서열과 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상, 가장 바람직하게는 98 % 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 아미노산 서열에 대한 “서열 상동성의 %”는 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서 아미노산 서열의 일부는 더 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [7] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 항-CD300c 단클론 항체는 중간 교차 반응성을 가질 수 있으며, 상기 중간 교차 반응은 바람직하게는 인간 유래 CD300c 항원과 포유류 유래 CD300c 항원에 대한 교차 반응성을 의미할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간 항원과 마우스 항원에 대한 교차 반응성일 수 있다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [9] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 암은 바람직하게는 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 혈액암 등이나, 암 세포의 표면에 CD300c 단백질을 발현하는 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.
- [10] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 다른 기존의 면역항암제 또는 항암제를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 면역항암제는 바람직하게는 anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-KIR, anti-LAG3, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD276, anti-CD27, anti-GITR, anti-TIM3, anti-41BB, anti-CD226, anti-CD40, anti-CD70, anti-ICOS, anti-CD40L, anti-BTLA, anti-TCR, anti-TIGIT 등이나, 현재 면역항암제로 사용되고 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 항암제는 바람직하게는 독소루비신, 시스플라틴, 젬시타빈, 옥살리플라틴, 5-FU, 세톡시맵, 파니투무맵, 니모투주맵, 네시투무맵, 암 항원,

항암 바이러스 등이나 현재 항암제로 사용되고 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 상기 암 항원은 암종에 특이적인 암 백신(cancer vaccine)으로서, 바람직하게는 방광암 특이적인 암 항원으로서 NY-ESO-1, 유방암 특이적인 암 항원으로서 HER2, 대장암 특이적인 암 항원으로서 CEA, 폐암 특이적인 암 항원으로서 VEGFR1, VEGFR2 등일 수 있으나, 암 백신으로 알려져 있는 암 항원의 종류라면 이에 제한되지 않는다. 항암 바이러스의 일례로 임리직, 펙사벡 등이 있으나, 알려져 있는 항암 바이러스라면 이에 제한되지 않는다. 상기 항암제를 추가로 포함하는 것은 바람직하게는 병용투여이거나, 본 발명의 단클론 항체에 결합된 형태일 수도 있으며, 항암제의 전달체 내에 함께 포함되어 있는 형태일 수도 있다.

- [11] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암 또는 암 줄기세포의 증식, 생존, 전이, 재발, 항암제 내성 등을 억제하는 것을 특징으로 하나, 본 발명의 약학적 조성물에 의하여 발생하는 효과라면 이에 제한되지 않는다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 면역항암제를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 항암 치료 요법의 보조제를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 보조제는 면역 세포의 면역 기능을 활성화시켜 항암 치료 효과를 향상시킬 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 항암 치료 요법은 방사선 치료 요법, 항암제 치료 요법, 면역항암제 치료 요법 등일 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 항-CD300c 단클론 항체의 암 치료에 이용되는 약제를 생산하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명에 따른 항-CD300c 단클론 항체는 다양한 암의 표면에서 발현되는 CD300c에 특이적으로 높은 결합력을 가지고 결합됨으로써, T 세포를 활성화시키는 동시에 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시키기 때문에, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제함으로써 다양한 암의 면역 치료제로서 효과적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항-CD300c 단클론 항체는 기존의 면역항암제와의 병용 투여를 통하여 그 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 중간 교차반응성을 가지고 있으므로, 다양한 포유류에 폭넓게 적용할 수 있다. 그리고, 세포사멸에 저항하는 능력을 보이는 저항성 암 세포에 본 발명의

항-CD300c 단클론 항체를 처리할 경우, 암 세포의 저항성을 현저하게 약화시켜 암 재발 방지에도 우수한 효능을 보일 것으로 기대된다. 또한, 일반적으로 암세포는 proinflammatory cytokine인 IL-2의 생성을 저해함으로써 면역계를 회피하는데, 항-CD300c 단클론 항체는 이러한 암세포에 의해 차단된 IL-2의 생산량을 회복시킴으로써 활성화된 면역계를 통하여 암세포 사멸을 유도시킴이 확인되어 보다 근본적인 면역항암제로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체 및/또는 CD300c siRNA의 항암 효과를 나타내는 기작을 간략하게 나타낸 개략도이다.
- [21] 도 2는 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체가 각 Monocyte, T cell, 암 세포에 작용하는 기작을 간략하게 나타낸 개략도이다.
- [22] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 non-reducing 조건에서의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.
- [23] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 reducing 조건에서의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도면이다.
- [24] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 CD300c 항원과의 결합력을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [25] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 T 세포 활성화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [26] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [27] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [28] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 농도별 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [29] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 농도별 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [30] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지로의 분화능을 세포 형태로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [31] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 CL7 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [32] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.
- [33] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 CL7 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.
- [34] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 CL7 항-CD300c 단클론 항체와

면역항암제의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[35] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 CL7 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[36] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M0 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[37] 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지로의 분화능을 ELISA를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[38] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[39] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[40] 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[41] 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 M0, M1, 및 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능을 ELISA를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[42] 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제와의 병용투여 효과를 M1 마크로파지 분화능으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[43] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 병용투여 효과를 M1 마크로파지 분화능으로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[44] 도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 0% FBS의 조건에서의 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[45] 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 0.1% FBS의 조건에서의 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[46] 도 27은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 암세포(폐암) 성장 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[47] 도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 암세포(유방암) 성장 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

[48] 도 29는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 농도별 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

- [49] 도 30은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 병용투여에 따른 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [50] 도 31은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 병용투여에 따른 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [51] 도 32는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 병용투여에 따른 작용 기전을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [52] 도 33은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 결합 특이성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [53] 도 34는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 마우스에서의 교차반응성을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [54] 도 35는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 마우스에서의 항암 효과(대장암)를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [55] 도 36은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 *in vivo*에서 암 성장에 미치는 영향을 확인한 실험 방법을 간략하게 나타낸 도면이다.
- [56] 도 37은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 *in vivo*에서 암 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [57] 도 38은 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 *in vivo*에서 종양미세환경에서의 종양침윤림프구의 증가에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도면이다. Scale bar는 50 um를 나타낸다.
- [58] 도 39는 본 발명의 일 실시예에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 *in vivo*에서 M1 마크로파지 증가에 미치는 영향을 확인할 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [59] 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c 단백질에 특이적으로 높은 결합력을 가지고 결합하여, CD300c의 기작을 효과적으로 억제함으로써 T 세포를 활성화시키고, M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킴으로써 암 세포의 성장, 암의 발달, 암의 전이 등을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에, CD300c 항원을 표면에 발현하고 있는 다양한 암의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [60] 본 명세서에 있어서, "항체(antibody)"란 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미하며, 다클론 항체(polyclonal antibody), 단클론 항체(monoclonal antibody) 및 이의 기능적인 단편(fragment)를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함할 수 있다. 이중 단클론항체는 단일 항원성 부위(에피통, epitope)에 대해서 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 항체로서, 상이한 에피통들에 대해 특이성을 나타내는 항체들을 포함하는 다클론 항체와 다르게, 단클론 항체는 항원 상의 단일 에피통에 대해서만 결합 특이성 및 친화도를 나타내기 때문에, 치료제로서의 품질 관리가 용이하다. 특별히, 본 발명의 항-CD300c 단클론

항체는 CD300c를 발현하는 암 세포에 특이적으로 결합하여 그 자체적으로도 항암 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 면역세포를 자극함으로써 암세포 의존성 항암 활성을 최대화시킬 수 있다. 상기 항체는 구성 중 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄(light chain)의 가변 영역(variable region)을 포함하며, 상기 가변 영역은 1차 구조로서 항체 분자의 항원 결합 부위를 형성하는 부분을 포함하며, 본 발명의 항체는 상기 가변 영역을 포함하는 일부 단편으로 구성될 수 있으며, 바람직하게는 상기 가변 영역은 CD300c에 대한 가용성 수용체로 대체될 수 있으나, 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체와 동일한 효과를 나타낸다면 이에 제한되지 않는다.

- [61] 본 명세서에 있어서, "면역글로불린(immunoglobulin)"이란 항체와 구조적 특성이 동일하며, 항원 특이성이 없는 항체 유사 분자와 항체를 모두 포함하는 개념이다.
- [62] 본 명세서에 있어서, "단쇄가변분절(single-chain variable fragment; scFv)"이란 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 서열로 이루어진 링커(linker)로 연결한 단백질로서, 경쇄 가변 영역-링커-중쇄 가변 영역, 또는 중쇄 가변 영역-링커-경쇄 가변 영역의 순서 모두 가능하며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원 특이성을 가진다. 연결부위는 주로 글리신(glycine)과 세린(serine)으로 이루어진 친수성의 유연한 펩타이드 사슬로서 "(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃"의 15개의 아미노산 서열 또는 이와 유사한 서열이 주로 사용된다.
- [63] 본 명세서에 있어서, "면역항암제"란 인체가 가지고 있는 면역 세포의 면역 기능을 활성화시켜 암 세포와 싸우게 하는 암 치료 방법을 총칭하며, 그 일례로 anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-KIR, anti-LAG3, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD276, anti-CD27, anti-GITR, anti-TIM3, anti-41BB, anti-CD226, anti-CD40, anti-CD70, anti-ICOS, anti-CD40L, anti-BTLA, anti-TCR, anti-TIGIT 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 본 명세서에 있어서, "보조제(adjutant)"란 주 약물, 즉, 항암제의 약효를 보조하여 치료 효과를 개선 및/또는 향상시키거나, 주 약물에 대한 내성을 억제하여 치료 효과를 개선 및/또는 향상시키거나, 주 약물의 유해한 작용을 막거나 완화하는 목적으로 사용되는 보조 약물을 의미하며, 본 발명의 보조제는 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하고 있다면 제한이 없다.
- [65] 본 명세서에 있어서, "예방(prevention)"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암 등의 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [66] 본 명세서에 있어서, "치료(treatment)"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암 등의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [67] 본 명세서에 있어서, "개체(individual)"란 본 발명의 약학적 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.

- [68] 본 명세서에 있어서, “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”이란 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [69] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 “비경구”는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [71] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 500 mg/kg 또는 0.001 내지 500 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적

조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

[72]

[73] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[74]

[75] 실시예

[76] 실시예 1: 항-CD300c 단클론 항체 선별

[77] **1.1. 항-CD300c 단클론 항체 라이브러리 제작**

[78] 항-CD300c 단클론 항체를 선별하기 위하여, 람다 파지 라이브러리, 카파 파지 라이브러리, VH3VL1 파지 라이브러리, 및 OPALTL 파지 라이브러리를 이용하여 바이오패닝(biopanning)을 실시하였다. 보다 자세하게는, 면역 시험관(immunotube)에 5 µg/mL 농도의 CD300c 항원을 첨가하고, 1시간 동안 반응시켜 시험관 표면에 항원을 흡착시켰다. 그리고 3%의 스킴 밀크(skim milk)를 첨가하여 비특이적 반응을 억제시킨 후, 다시 3%의 스킴 밀크에 분산되어 있는 10^{12} PFU의 항체 파지 라이브러리를 각각의 면역 시험관에 첨가하여 항원과 결합시켰다. 그리고 TBST(tris buffered saline-Tween20) 용액을 이용하여 3회 세척하여, 비특이적으로 결합되어 있는 파지를 제거한 후, CD300c 항원 특이적으로 결합되어 있는 단쇄가변분절(single-chain variable fragment; scFv) 파지 항체를 100 mM의 트리에틸아민 용액을 이용하여 용출시켰다. 용출된 차지는 1.0 M의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.8)을 이용하여 중화시킨 후에, 대장균 ER2537에 처리하여 37°C에서 1 시간 동안 감염시키고, 감염시킨 대장균은 카르베니실린이 포함되어 있는 LB 한천 배지에 도포하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 그리고 형성된 대장균 콜로니를 3 mL의 SB(super broth)-카르베니실린 배양액을 이용하여 현탁시키고, 일부는 15% 글리세롤을 첨가하여 -80°C에서 사용 전까지 보관하였으며, 나머지는 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 재접종하여 37°C에서 배양하였다. 그리고 획득된 배양액을 원심분리하여 파지 입자가 포함되어 있는 상층액을 이용하여 다시 바이오패닝을 3회 반복함으로써 항원 특이적인 항체를 확보 및 농축하였다.

[79] 바이오패닝을 3회 반복한 후에 항체 유전자를 포함하고 있는 대장균을 카르베니실린을 포함하는 LB 한천 배지에 도포하여 37°C에서 16 시간 동안 배양하고, 형성된 대장균 콜로니를 다시 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 재접종하여 37°C에서 흡광도(OD_{600nm})가 0.5가 될 때까지 배양한 후에, IPTG를 첨가하고 30°C에서 16 시간 동안 추가 배양하였다. 이후, periplasmic extraction을 실시하였으며, 상기 결과를 통하여 CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 라이브러리 풀(library pool)을 일차적으로 확보하였다.

[80]

[81] **1.2. 항-CD300c 단클론 항체 선별**

- [82] CD300c 항원에 높은 결합력을 가지고 특이적으로 결합하는 항-CD300c 단클론 항체를 선별하기 위하여, 실시예 1.1과 동일한 방법으로 확보된 라이브러리 풀을 이용하여 ELISA를 실시하였다. 보다 자세하게는, 코팅 완충용액(coating buffer; 0.1 M의 sodium carbonate, pH 9.0)에 CD300c 항원과 CD300a 항원을 각각 웰 당 5 µg/mL의 농도가 되도록 ELISA 플레이트에 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 반응시켜 항원을 플레이트에 결합시켰다. 그리고 PBST(phosphate buffered saline-Tween20)를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항원을 깨끗이 제거해준 후에, 각각의 웰에 2% BSA(bovine serum albumin)이 첨가되어 있는 PBST를 350 µL 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, PBST를 이용하여 다시 세척하였다. 그리고 실시예 1.1과 동일한 방법으로 확보된 scFv를 포함하고 있는 periplasmic extract를 25 µg씩 첨가하고, 1 시간 동안 실온에서 반응시켜 항원과 결합시켰다. 1 시간 후에 PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 scFv를 제거해준 후에, 4 µg/mL의 검출용 항체를 첨가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, PBST를 이용하여 결합되지 않은 검출용 항체를 제거해준 후에 HRP가 결합되어 있는 anti-rabbit IgG를 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 다시 PBST를 이용하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 그리고 TMB 용액을 첨가하고 10 분 동안 반응시켜 발색시킨 후에, 2 N의 황산 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하였다.

[83]

[84] **1.3. 항-CD300c 단클론 항체 서열 확인**

- [85] 실시예 1.2와 동일한 방법을 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체의 염기서열을 확인하였다. 보다 자세하게는, 선별된 항체 클론들을 plasmid miniprep kit를 이용하여 plasmid DNA를 추출한 후에, DNA sequencing을 실시하여 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 분석하였다. 그 결과, 서로 다른 아미노산 서열을 가지고 있는 25종의 항-CD300c 단클론 항체를 확보하였다.

- [86] 람다 파지 라이브러리를 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체는 3종류로서, 서열번호 36의 CDR 서열을 포함하는 SL18(DNA 서열은 서열번호 35), 서열번호 8의 CDR 서열을 포함하는 CL4(DNA 서열은 서열번호 7), 및 서열번호 10의 CDR 서열을 포함하는 CL5(DNA 서열은 서열번호 9)이었다.

- [87] 카파 파지 라이브러리를 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체는 10종류로서, 서열번호 2의 CDR 서열을 포함하는 CK1(DNA 서열은 서열번호 1), 서열번호 4의 CDR 서열을 포함하는 CK2(DNA 서열은 서열번호 3), 서열번호 6의 CDR 서열을 포함하는 CK3(DNA 서열은 서열번호 5), 서열번호 22의 CDR 서열을 포함하는 SK11(DNA 서열은 서열번호 21), 서열번호 24의 CDR 서열을 포함하는 SK12(DNA 서열은 서열번호 23), 서열번호 26의 CDR 서열을 포함하는 SK13(DNA 서열은 서열번호 25), 서열번호 28의 CDR 서열을 포함하는

SK14(DNA 서열은 서열번호 27), 서열번호 30의 CDR 서열을 포함하는 SK15(DNA 서열은 서열번호 29), 서열번호 32의 CDR 서열을 포함하는 SK16(DNA 서열은 서열번호 31), 및 서열번호 34의 CDR 서열을 포함하는 SK17(DNA 서열은 서열번호 33)이었다.

- [88] VH3VL1 파지 라이브러리를 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체는 10종류로서, 서열번호 37의 CDR 서열을 포함하는 CB301_H3L1_A10(DNA 서열은 서열번호 38), 서열번호 40의 CDR 서열을 포함하는 CB301_H3L1_A12(DNA 서열은 서열번호 39), 서열번호 12의 CDR 서열을 포함하는 CL6(DNA 서열은 서열번호 11), 서열번호 42의 CDR 서열을 포함하는 CB301_H3L1_E6(DNA 서열은 서열번호 41), 서열번호 14의 CDR 서열을 포함하는 CL7(DNA 서열은 서열번호 13), 서열번호 44의 CDR 서열을 포함하는 CB301_H3L1_F4(DNA 서열은 서열번호 43), 서열번호 16의 CDR 서열을 포함하는 CL8(DNA 서열은 서열번호 15), 서열번호 46의 CDR 서열을 포함하는 CB301_H3L1_G11(DNA 서열은 서열번호 45), 서열번호 18의 CDR 서열을 포함하는 CL9(DNA 서열은 서열번호 17), 및 서열번호 20의 CDR 서열을 포함하는 CL10(DNA 서열은 서열번호 19)이었다.

- [89] OPALTL 파지 라이브러리를 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체는 2종류로써, 서열번호 48의 CDR 서열을 포함하는 CB301_OPALTL_B5(DNA 서열은 서열번호 47) 및 서열번호 50의 CDR 서열을 포함하는 CB301_OPALTL_E6(DNA 서열은 서열번호 49)이었다.

- [90] 상기 결과들을 통하여, CD300c 항원에 높은 결합력을 가지고 특이적으로 결합하는 항의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 25종의 항-CD300c 단클론 항체를 확인할 수 있었다.

[91]

[92] 1.4. 항-CD300c 단클론 항체의 제작 및 정제

- [93] 실시예 1.3을 통해 확인한 항-CD300c 단클론 항체의 염기서열을 이용하여 항체를 발현할 수 있는 중쇄와 경쇄를 분리한 발현용 벡터를 제작하였다. 보다 자세하게는, 분석한 CDR 서열을 이용하여 pCIW3.3 벡터에 각각 중쇄와 경쇄를 발현할 수 있도록 유전자를 삽입하여 제작하였다. 제작한 중쇄와 경쇄 발현용 벡터를 PEI(polyethylenimine)와 1:1의 질량 비율로 섞어 293T 세포에 트랜스펙션하여 항체의 발현을 유도한 후 8 일차에 배양액을 원심분리 하여 세포를 제거하고 배양액을 획득하였다. 획득한 배양액은 여과 과정을 거친 후 0.1 M NaH₂PO₄ 및 0.1 M Na₂HPO₄(pH 7.0)이 혼합되어 있는 용액을 이용하여 재현탁시켰다. 그리고 재현탁시킨 용액은 protein A bead(GE healthcare)를 이용한 affinity chromatography 방법을 통하여 정제하였으며, 최종적으로 Elution buffer(Thermofisher)를 이용하여 용출시켰다.

- [94] 제작된 항체를 확인하기 위하여, 정제된 항체 5 µg에 각각 Reducing sample buffer와 Non-reducing sample buffer에 첨가한 후에, pre-made

SDS-PAGE(Invitrogen)을 이용하여 전기영동을 실시하였고, 이후 쿠마지 블루를 이용하여 단백질을 염색하였다. 각 Non-reducing 조건의 결과는 도 3에, Reducing 조건의 결과는 도 4에 나타내었다.

[95] 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, 순도 90% 이상의 항-CD300c 단클론 항체가 제작 및 정제되었음을 확인하였다.

[96]

[97] **1.5. 항-CD300c 단클론 항체의 항원 결합력(Binding affinity) 확인**

[98] 실시예 1.4와 동일한 방법으로 제작된 항-CD300c 단클론 항체 중에서 CD300c 항원에 더 우수한 결합력을 가지고 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 선별하기 위하여 Binding ELISA를 실시하였다. 보다 자세하게는, 코팅 완충용액(coating buffer: 0.1M의 sodium carbonate, pH 9.0)에 CD300c 항원 또는 CD300a 항원을 각각 웰 당 8 µg/mL의 농도가 되도록 ELISA 플레이트에 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 반응시켜 항원을 플레이트에 결합시켰다. 그리고 PBST(phosphate buffered saline-Tween20)를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항원을 깨끗이 제거해준 후에, 각각의 웰에 5% BSA(bovine serum albumin)를 첨가되어 있는 PBST를 300 µL 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, PBST를 이용하여 다시 세척하였다. 그리고 항-CD300c 단클론 항체를 4진 희석하여 넣고 1 시간 동안 실온에서 반응시켜 항원과 결합시켰다. 1 시간 후에 PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항-CD300c 단클론 항체를 제거해준 후에, 4 µg/mL의 검출용 항체(HRP conjugated anti-Fc IgG)를 첨가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, PBST를 이용하여 결합되지 않은 검출용 항체를 제거해준 후에 TMB 용액을 첨가하고 10 분 동안 반응시켜 발색 시킨 후에, 2 N의 황산 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하였다. 그 결과는 표 1 및 도 5에 나타내었다.

[99]

[표 1]

CB301 항체	EC50 (μg/mL)
CK1	0.056
CK2	0.033
CK3	0.793
CL4	0.031
CL5	0.032
CL6	0.148
CL7	0.047
CL8	49.7
CL9	0.094
CL10	0.039
SK11	0.052
SK12	0.067
SK13	0.044
SK14	0.065
SK15	14.74
SK16	2.42
SK17	0.054
SL18	0.17

- [100] 표 1에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 EC50(The effective concentration of drug that causes 50% of the maxium response)을 측정한 결과, 4개 클론(CK3, CL8, SK15, SK16)을 제외하고 나머지 14개 클론 모두 0.2vg/mL 이하로서 결합친화력(Binding affinity)이 높은 것을 확인하였다.
- [101] 도 5에 나타난 바와 같이, Binding ELISA의 결과에 따른 sigmoid curve에서도 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체가 강한 결합력으로 CD300c 항원에 결합하는 것을 확인할 수 있었다.
- [102]
- [103] **실시예 2: 항-CD300c 단클론 항체의 T 세포에서의 항암 효과 확인**
- [104] 실시예 1.5의 방법으로 선별된 항-CD300c 단클론 항체가 T 세포를 활성화시킴으로써 항암 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, IL-2(Interleukin-2)의 생산량을 확인하였다. IL-2는 T 세포의 성장, 증식 및 분화를 도와주는 면역 인자로서, IL-2의 생성량이 증가하는 것은 T 세포의 분화, 증식, 및

성장이 증가하도록 유도하는 자극이 증가됨으로써 T 세포를 활성화시킨다는 것을 의미한다. 보다 자세하게는, 각각 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도가 되도록 항-CD3 단클론 항체와 항-CD28 단클론 항체를 96-웰 플레이트에 첨가하고 24 시간 동안 고정시킨 후에, 1×10^5 cells/well의 Jurkat T 세포(인간 T 림프구 세포주)와 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 함께 처리하였다. 그리고 IL-2의 생성량을 ELISA kit(IL-2 Quantikine kit, R&D systems)를 이용하여 측정한 후에, 항-CD300c 단클론 항체를 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

- [105] 도 6에 나타난 바와 같이, 항-CD3 단클론 항체, 항-CD28 단클론 항체를 처리하여 활성화시킨 Jurkat T 세포에 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 경우에 IL-2의 생성량이 증가된 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 T 세포를 활성화시킬 수 있다는 것과, 이를 통하여, 항암 면역 작용을 유발하여 암 조직의 성장을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[106]

[107] **실시예 3: 항-CD300c 단클론 항체의 마크로파지 분화능에 의한 항암 효과 확인**

[108] **3.1. 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지 분화능 확인**

- [109] 실시예 1.5의 방법으로 선별된 항-CD300c 단클론 항체가 단핵구 세포를 M1 마크로파지로의 분화로 유도하는 것을 확인하기 위하여, 96-well plate에서 1.5×10^4 cells/well의 THP-1(인간 단핵구 세포주)을 분주하고, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체 및/또는 100 ng/mL의 LPS를 처리하였다. 그리고 48시간 동안 반응시킨 후에, M1 마크로파지의 분화 마커인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 생성량을 ELISA kit(Human TNF- α Quantikine kit, R&D systems)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 7 및 8에 나타내었다.

- [110] 도 7에 나타난 바와 같이, LPS를 단독으로 처리한 대조군(Con)과 비교하여 CL4, CL7, CL10, 및 SL18 항-CD300c 단클론 항체가 약 2배 이상 TNF- α 의 생성량이 증가된 것을 확인하였다.

- [111] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, LPS를 단독으로 처리한 대조군(Con)과 비교하여 LPS의 처리 없이 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리한 실험군들에서 모두 대조군과 비교하여 TNF- α 의 생성량이 증가된 것을 확인하였다.

[112]

[113] **3.2. 항-CD300c 단클론 항체의 농도별 M1 마크로파지 분화능 확인**

- [114] 항-CD300c 단클론 항체가 M1 마크로파지로의 분화를 유도하는 것이 농도에 따라 증가된다는 것을 확인하기 위하여, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 TNF- α 의 생성량을 확인하였다. 항-CD300c 단클론 항체는 10, 1, 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.

- [115] 도 9에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 처리 농도가 증가할수록 TNF- α 의 생성량 또한 증가되는 것을 확인하였다.

[116] 보다 세부적인 농도를 확인하기 위하여, CL7 항-CD300c 단클론 항체를 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.157, 및 0.079 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고, TNF- α 의 생성량을 확인하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[117] 도 10에 나타난 바와 같이, TNF- α 의 생성량이 항-CD300c 단클론 항체의 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다.

[118]

[119] **3.3. 항-CD300c 단클론 항체에 의한 M1 마크로파지 분화 세포 양상 확인**

[120] 항-CD300c 단클론 항체를 단핵구 세포에 처리하였을 때 M1 마크로파지로의 분화 양상을 세포 형태로 확인하기 위하여, THP-1에 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하고, 48시간 동안 배양한 후에 세포의 형태를 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

[121] 도 11에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군(CL7)의 경우에 THP-1 세포의 형태가 부유 세포(suspension cell)에서 M1 마크로파지의 형태인 원형의 부착 세포로 변하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체의 처리에 의하여 단핵구 세포가 M1 마크로파지로 분화가 촉진되는 것을 확인하였다.

[122]

[123] **3.4. CL7 항-CD300c 단클론 항체의 M1 마크로파지 분화능 확인**

[124] CL7 항-CD300c 단클론 항체가 인간 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시키는지 재확인하기 위하여, TNF- α , IL-1 β (Interleukin-1 β), 및 IL-8(Interleukin-8)의 분비량을 ELISA kit(R&D systems)를 이용하여 측정하였다. 보다 자세하게는 96-well plate에서 1.5×10^4 cells/well의 THP-1을 분주하고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하였다. 그리고 48 시간 동안 반응시킨 후에, M1 마크로파지의 분화 마커인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8의 생성량을 ELISA kit(Human TNF- α Quantikine kit, R&D systems)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[125] 도 12에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 처리하지 않은 대조군(Con)의 경우와 비교하여 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서 세 종류의 M1 마크로파지 분화 마커가 모두 증가된 것을 확인하였다.

[126]

[127] **3.5. 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 M1 마크로파지 분화능 비교**

[128] 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지 분화능을 비교하기 위하여, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 TNF- α 의 생성량을 ELISA kit로 확인하였다. 항-PD-L1 면역항암제로는 임핀지(Imfinzi)를 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.

[129] 도 13에 나타난 바와 같이, 면역항암제로 알려져 있는 임핀지(Imf)를 단독으로 처리한 비교군보다 항-CD300c 단클론 항체가 TNF- α 의 생성량을 현저히 증가시키는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 기존에 알려져 있는

면역항암제보다 항-CD300c 단클론 항체가 M1 마크로파지로의 분화능을 현저히 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[130] 다른 면역항암제와의 비교를 위하여, 항-PD-L1 면역항암제인 임핀지, 항-PD-1 면역항암제인 키트루다(Keytruda), 그리고 Isotype control(Immunoglobulin G) 항체를 각각 10 µg/mL의 농도로 처리하고, TNF-α, IL-1β 및 IL-8의 생성량을 ELISA kit로 확인하였다. 그 결과는 도 14 내지 16에 나타내었다.

[131] 도 14 내지 16에 나타난 바와 같이, 임핀지, 키트루다, IgG 항체와 비교하여 CL7 항-CD300c 단클론 항체가 TNF-α, IL-1β 및 IL-8의 생성량을 현저히 증가시키는 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 기존의 면역항암제와 비교하여 M1 마크로파지로의 분화 촉진을 현저히 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[132]

[133] **3.6. 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제와의 M0 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화능 비교**

[134] 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M0 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화능을 비교하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1.5×10^4 cells/well의 THP-1을 분주하고, 10 µg/mL의 항-CD300c 단클론 항체, 10 µg/mL의 임핀지, 및/또는 200 nM의 PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate)를 처리하였다. 그리고 48 시간 동안 반응시킨 후에, TNF-α의 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 도 17에 나타내었다.

[135] 도 17에 나타난 바와 같이, 면역항암제인 임핀지를 단독으로 처리한 비교군의 경우에는 TNF-α가 생성되지 않았지만, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리한 실험군에서는 TNF-α의 생성량이 증가된 것을 확인하였다. 또한, THP-1 세포에 PMA를 처리하여 M0 마크로파지로 분화시켰을 때에도, 임핀지를 처리한 실험군과 비교하여, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서 현저히 높은 TNF-α 생성량을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 기존의 면역항암제와 비교하여 M0 마크로파지의 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.

[136]

[137] **3.7. 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제와의 M1 마크로파지로의 분화능 비교**

[138] 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 M1 마크로파지로의 분화능을 비교하기 위하여, 실시예 3.1과 동일한 방법으로 TNF-α의 생성량을 확인하였다. 그 결과는 도 18에 나타내었다.

[139] 도 18에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하여 단핵구 세포를 M1 마크로파지로 분화시켰을 때, 임핀지와 LPS를 함께 처리한 실험군에서는 TNF-α의 생성량이 유의성있는 차이를 나타내지 않았으나, 항-CD300c 단클론 항체와 LPS를 함께 처리한 실험군에서는 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리한 실험군과

비교하여 TNF- α 의 생성량이 유의성있게 증가된 것을 확인하였다.

[140]

[141] **3.8. 항-CD300c 단클론 항체의 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능 확인**

[142] 항-CD300c 단클론 항체가 M2 마크로파지를 M1 마크로파지로 재분화시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1.5×10^4 cells/well의 THP-1을 분주하고, 320 nM의 PMA를 처리하고 6 시간 동안 전처리한 후에, 20 ng/mL의 IL-4(Interleukin-4) 및 IL-13(Interleukin-13), 그리고 10 μ g/mL의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하고 18 시간 동안 반응시켰다. 그리고 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8의 생성량을 ELISA kit로 확인하였다. 그 결과는 도 19 내지 21에 나타내었다.

[143] 도 19 내지 21에 나타난 바와 같이, PMA를 전처리하지 않은 실험군의 경우에는 IL-4 및 IL-13과 항-CD300c 단클론 항체를 함께 처리한 실험군에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8의 생성량이 증가되었으며, PMA를 전처리한 실험군에서도 동일하게 IL-4 및 IL-13과 항-CD300c 단클론 항체를 함께 처리한 실험군에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-8의 생성량이 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 M2 마크로파지를 다시 M1 마크로파지로 효과적으로 재분화시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[144]

[145] **3.9. 항-CD300c 단클론 항체의 M0, M1, 및 M2 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 재분화능 확인**

[146] 항-CD300c 단클론 항체가 M0, M1, 및 M2 마크로파지를 M1 마크로파지로 재분화시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1.5×10^4 cells/well의 THP-1을 분주하고, 10 μ g/mL의 항-CD300c 단클론 항체를 48 시간 동안 전처리하고, 100 ng/mL의 PMA, 100 ng/mL의 LPS, 그리고 20 ng/mL의 IL-4 및 IL-13을 처리하고 24 시간 동안 반응시켰다. 그리고 TNF- α 의 생성량을 ELISA kit로 확인하였다. 그 결과는 도 22에 나타내었다.

[147] 도 22에 나타난 바와 같이, PMA를 단독으로 처리한 M0 마크로파지 대조군, LPS를 단독으로 처리한 M1 마크로파지 대조군, 그리고 IL-4 및 IL-13을 단독으로 처리한 M2 마크로파지 대조군과 비교하여 항-CD300c 단클론 항체를 전처리한 실험군에서 모두 TNF- α 의 생성량이 유의성있게 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체는 M0, M1 및 M2 마크로파지를 M1 마크로파지로 분화시키는 능력이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[148]

[149] 상기 결과들을 통하여, 항-CD300c 단클론 항체는 기존의 면역항암제보다도 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시켜 항암 면역 작용을 유발하여, 암 조직의 성장을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 특별히, 암 세포의 증식 및 전이를 촉진시키는데 관여하는 것으로 알려져 있는 M2 마크로파지를 M1 마크로파지로 재분화시킴을 통해서 항암 효과를 나타낼 수 있다는 것을 확인할

수 있었다.

[150]

[151] **실시예 4: 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용투여 효과 확인**

[152] **4.1. 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제와의 병용투여 효과 확인**

[153] 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제와의 병용투여를 통한 암 치료 효과를 확인하기 위하여, NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 신호 전달을 확인하였다. 보다 자세하게는, 6-웰 플레이트에 8.8×10^5 cells/well의 THP-1을 분주하고, 10 μ g/mL의 CL7 항-CD300c 단클론 항체 및/또는 10 μ g/mL의 임핀지를 처리하였다. 그리고 24 시간 동안 배양한 후에 인산화된 NF- κ B(p-NF- κ B)를 웨스턴 블롯팅(Cell signaling)을 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 23에 나타내었다.

[154] 도 23에 나타난 바와 같이, 면역항암제인 임핀지를 단독으로 투여한 실험군과 비교하여, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서 p-NF- κ B의 양이 증가되었으며, 임핀지와 항-CD300c 단클론 항체를 병용투여한 실험군에서는 p-NF- κ B의 양이 더욱 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체와 임핀지를 병용투여할 경우에 M1 마크로파지로의 분화가 촉진된다는 것을 확인할 수 있었다.

[155]

[156] **4.2. 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제 및/또는 항-PD-1 면역항암제와의 병용투여 효과 확인**

[157] 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-L1 면역항암제 및/또는 항-PD-1 면역항암제와의 병용투여를 통한 암 치료 효과를 확인하기 위하여, p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinases)와 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 신호 전달을 확인하였다. 보다 자세하게는, 보다 자세하게는, 6-웰 플레이트에 8.8×10^5 cells/well의 THP-1을 분주하고, 10 μ g/mL의 CL7 항-CD300c 단클론 항체, 10 μ g/mL의 임핀지, 및/또는 10 μ g/mL의 키트루다를 처리하였다. 그리고 48 시간 동안 배양한 후에 인산화된 p38 MAPK(p-p38 MAPK), 인산화된 ERK(p-ERK)를 웨스턴 블롯팅(Cell signaling)을 이용하여 확인하였다. 그 결과는 도 24에 나타내었다.

[158] 도 24에 나타난 바와 같이, 면역항암제를 단독으로 처리한 실험군에서는 p-p38 MAPK와 p-ERK 단백질 모두 관찰되지 않았으나, 항-CD300c 단클론 항체의 경우에는 두 종류의 단백질이 모두 관찰되었다. 또한, 면역항암제와의 병용투여한 실험군에서는 p-p38 MAPK 단백질의 양이 더욱 증가되는 것을 확인하였다.

[159]

[160] 상기 결과들을 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 MAPK 신호 전달을 통하여, M1 마크로파지로의 분화를 촉진시키고, 면역항암제와 병용투여할 경우에 그 효과가 더욱 증가됨을 확인하였으며, 이를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체는

단독으로도 면역항암제로서 사용될 수 있지만, 기존의 면역항암제와의 병용투여를 통하여, 항암 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[161]

[162] **실시예 5: 항-CD300c 단클론 항체의 in vitro에서의 항암효과**[163] **5.1. 항-CD300c 단클론 항체의 암세포 성장 억제 효과 확인**

[164] CD300c를 표적으로 하는 단클론 항체가 암세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 A549(인간 폐암 세포주)를 이용하여 세포 증식 분석을 실시하였다. 보다 자세하게는, 96-웰 플레이트에 0% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 조건에서는 2×10^4 세포를 분주하였고, 0.1% 우태아혈청 조건에서는 6×10^3 세포를 분주하였다. 그리고 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하고 5 일 동안 배양하였다. 그리고 CCK-8(DOJINDO)을 처리하고 OD_{450nm}에서 흡광도를 측정하여 항-CD300c 단클론 항체의 암 세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 그 결과는 도 25 및 26에 나타내었다.

[165] 도 25에 나타난 바와 같이, 0% FBS 조건에서 SK11 및 SK14 항-CD300c 단클론 항체를 제외하고는, 모두 암 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[166] 도 26에 나타난 바와 같이, 0.1% FBS 조건에서는 실험에 사용한 모든 항-CD300c 단클론 항체가 암 세포의 증식을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[167]

[168] **5.2. 항-CD300c 단클론 항체의 면역항암제와의 암세포 성장 억제 효과 비교**

[169] 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제와의 암 세포 성장 억제 효과를 비교하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주)와 MDA-MB-231 (인간 유방암 세포주)를 이용하여 세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 보다 자세하게는, 96-웰 플레이트에 0% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 조건에서는 2×10^4 세포를 분주하였고, 0.1% 우태아혈청 조건에서는 6×10^3 세포를 분주하였다. 그리고 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하고 5 일 동안 배양한 후에, 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과는 도 27 및 28에 나타내었다.

[170] 도 27에 나타난 바와 같이, A549 세포주에서 면역항암제인 임핀지보다 항-CD300c 단클론 항체가 암 세포의 증식을 더욱 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[171] 도 28에 나타난 바와 같이, MDA-MB-231 세포주에서 면역항암제인 임핀지보다 항-CD300c 단클론 항체가 암 세포의 증식을 더욱 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[172]

[173] **5.3. 항-CD300c 단클론 항체의 농도별 암 세포 성장 억제 효과 확인**

[174] 항-CD300c 단클론 항체의 농도에 따른 암 세포 성장 억제 효과를 확인하기

위하여, 96-웰 플레이트에 0% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 조건에서는 2×10^4 A549 세포를 분주하고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 처리하여 5 일 동안 배양하였다. 그리고 CCK-8(DOJINDO)을 처리하고 3 시간 동안 반응시킨 후에, OD_{450nm}에서 흡광도를 측정하여 항-CD300c 단클론 항체의 암 세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 그 결과는 도 29에 나타내었다.

[175] 도 29에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 농도에 따라 의존적으로 암 세포의 성장이 억제되는 것을 확인하였다.

[176]

[177] **5.4. 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용 투여에 의한 암 치료 효과 확인**

[178] 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용 투여에 의한 암 치료 효과를 확인하기 위하여, 실시예 5.1과 동일한 방법으로 세포 증식 분석을 실시하였다. 면역항암제로는 임핀지를 사용하였다. 그 결과는 도 30에 나타내었다.

[179] 도 30에 나타난 바와 같이, 면역항암제의 단독 투여와 비교하여, 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용투여 시에 암 세포의 성장이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[180] 또한, 광학 현미경을 이용하여 암 세포 성장 억제 효과를 확인하였다. 그 결과는 도 31에 나타내었다.

[181] 도 31에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용투여 시에 암 세포의 성장이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[182]

[183] **5.5. 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용 투여에 대한 작용 기전 확인**

[184] 암 세포의 세포사멸 신호전달 기작에 있어서, 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 병용 투여에 의한 작용 기전을 확인하기 위하여, A549 세포에 항-CD300c 단클론 항체, 임핀지, 및/또는 키트루다를 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 세포사멸 마커인 Caspase-9 절단형(cleaved form)의 양을 웨스턴 블롯팅(Cell signaling)을 실시하여 확인하였다. 그 결과는 도 32에 나타내었다.

[185] 도 32에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리한 실험군과 비교하여 항-CD300c 단클론 항체와 임피진을 병용투여한 경우에 Caspase-9 절단형의 양이 증가되며, 항-CD300c 단클론 항체, 임피진 및 키트루다를 병용투여한 경우에 Caspase-9 절단형의 양이 더욱 증가되는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제를 병용투여할 경우에 암 세포의 세포사멸 신호전달 기작이 더욱 활성화되며, 이를 통하여, 암 세포의 증식이 효과적으로 억제될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[186]

[187] **실시예 6: 항-CD300c 단클론 항체의 인간 항원과 마우스 항원간의 우수한 교차반응성 확인**

[188] **6.1. 항-CD300c 단클론 항체의 특이성(specificity) 확인**

[189] 항-CD300c 단클론 항체의 인간 항원과 마우스 항원간의 교차반응성을 확인하기 이전에, 우선 항-CD300c 단클론 항체의 특이성을 확인하기 위하여, 기존에 CD300c 항원과 길항 작용을 하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 단백질 서열이 유사한 CD300a 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 교차반응성(cross-reactivity)을 확인하였다. 보다 자세하게는, CD300a 항원을 0.039, 0.63, 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 후, 실시예 1.5와 동일한 방법으로 Binding ELISA를 실시하였다. 그 결과는 도 33에 나타내었다.

[190] 도 33에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체들이 CD300a에 결합하지 않는 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 유사한 서열인 CD300a에 결합하지 않을 정도로 높은 결합 특이성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[191]

[192] **6.2 항-CD300c 단클론 항체의 마우스 마크로파지(Raw264.7)의 M1 분화능 확인**

[193] 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 마크로파지에서도 M1 마크로파지로의 분화능을 촉진시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 마우스 마크로파지(Raw264.7)를 1×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후에, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체를 함께 처리하고 배양하였다. 그리고 TNF- α 의 생성량을 ELISA kit로 확인하였다. 그 결과는 도 34에 나타내었다.

[194] 도 34에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군들에서는 TNF- α 의 생성량이 증가된 것을 확인하였으며, 상기 결과를 통하여, 인간뿐만 아니라 마우스에서도 동일하게 작용하여 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.

[195]

[196] **6.3 항-CD300c 단클론 항체의 마우스 대장암 세포(CT26)의 성장 억제 효과**

[197] 항-CD300c 단클론 항체가 마우스에서도 항암 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, CT26(마우스 대장암 세포주)를 이용하여 실시예 4.1과 동일한 방법으로 세포 증식 분석을 실시하였다. 그 결과는 도 35에 나타내었다.

[198] 도 35에 나타난 바와 같이, 마우스에서도 항-CD300c 단클론 항체는 암 치료 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[199]

[200] **실시예 7: 항-CD300c 단클론 항체의 in vivo에서의 항암효과**

[201] **7.1. 항-CD300c 단클론 항체의 in vivo에서의 암 성장 억제 효과 확인**

[202] 항-CD300c 단클론 항체의 항암효과를 생체내 조건(in vivo)에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하주사(subcutaneous injection)로 이식하여 동종이식 마우스 종양모델(Syngenic mouse model)을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF(specific pathogen free) 시설에서 진행하였다. 실험 방법은 도 36에 간략하게 나타내었다. 대장암 세포주를 이식하고 12일 후에, 종양 크기가 50 내지 100 mm^3 인 마우스에

항-CD300c 단클론 항체 CL7, 항-PD-1 항체, 및 단클론 항체 CL7와 항-PD-1 항체(Combo)를 각각 마우스에 주사하고, 대조군으로는 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)을 동량 주사하였다. 보다 자세하게는, 1주일에 2회, 2주간 총 4회를 마우스에 복강내 주사(Intra peritoneal injection)로 각각을 10mg/kg씩 주사하였다. 그리고 25일간 암의 크기를 측정하였다. 그 결과는 도 37에 나타내었다.

[203] 도 37에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독 투여한 실험 군에서 대조군과 비교하여 암의 성장이 억제되는 것을 확인하였으며, 항-PD-1 항체와 병용투여한 경우에는 암의 성장이 더욱 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[204]

[205] **7.2. 항-CD300c 단클론 항체의 in vivo에서의 종양미세환경에서의 종양침윤림프구 증가 효과 확인**

[206] 항-CD300c 단클론 항체가 종양미세환경(tumor microenvironment; TME)에서 종양침윤림프구(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시예 7.1과 동일한 방법으로 실험한 25일차 마우스를 안락사시킨 후에, 1% PFA(para-formaldehyde)를 마우스 혈관내 주입 후 관류시키고, 암 조직을 획득하였다. 그리고 획득된 암 조직을 1% PFA를 이용하여 고정시키고, 순차적으로 10%, 20%, 30% 수크로즈 용액을 이용하여 탈수하였다. 탈수된 암 조직은 OCT 컴파운드(Optimal cutting temperature compound)에서 냉동시킨 후 냉동조직절편기(Cryotome)를 이용하여 암 조직을 50 μ m 두께로 절편하고, 종양침윤림프구 표지자인 CD8 + T 세포와 CD31 + 암 혈관 세포를 염색하였다. 그 결과는 도 38에 나타내었다.

[207] 도 38에 나타난 바와 같이, 항-PD-1 항체를 단독 투여한 실험군과 비교하여, 항-CD300c 단클론 항체를 투여한 실험 군에서 CD8 + T 세포가 증가된 것을 확인하였으며, 이를 통하여, CD300c 단클론 항체가 종양미세환경에서 종양침윤림프구를 증가시켜 항암 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[208]

[209] **7.3. 항-CD300c 단클론 항체의 in vivo에서의 M1 마크로파지 증가 효과 확인**

[210] 항-CD300c 단클론 항체가 in vivo에서 암 조직 내의 M1 마크로파지를 증가시키는지 확인하기 위하여, 실시예 7.2와 동일한 방법으로 준비한 암 조직 절편을 이용하여 M1 마크로파지 마커인 iNOS와 M2 마크로파지 마커인 CD206을 염색하였다. 그 결과는 도 39에 나타내었다.

[211] 도 39에 나타난 바와 같이, 항-PD-1 항체를 처리한 실험군에서는 M1 마크로파지가 대조군과 비교하여 일부 증가되었으나, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서는 M1 마크로파지가 현저히 증가되며, M2 마크로파지는 거의 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 또한, 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1 항체를 병용투여한 실험군에서도 M1 마크로파지가 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 기존의 면역항암제와 비교하여

M1 마크로파지로의 분화를 효과적으로 촉진시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[212]

[213] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c 항원에 대해 높은 특이성을 가지고 결합할 수 있으며, 마우스 등과 같은 중간 교차반응성을 나타내는 것을 확인하였으므로, 다양한 개체에 사용할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 항-CD300c 단클론 항체는 T 세포를 활성화시키고, M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킴으로써 면역항암제의 작용을 함으로써 암 세포의 증식, 전이 등을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 in vitro 및 in vivo에서 모두 확인하였을 뿐만 아니라, 기존의 면역항암제와의 병용투여를 통하여 그 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였으므로 CD300c 항원을 발현하는 다양한 암의 항암면역치료에 효과적으로 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[214]

[215] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[216] 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c 항원에 특이적으로 결합하기 때문에, CD300c 항원을 분비하는 모든 암의 치료에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 중간 교차반응성을 가짐으로써 다양한 개체의 항암 치료에 사용할 수 있다. 또한, 면역항암제로서의 작용을 통하여 항암 효과를 나타내므로, 암의 증식, 발달, 전이 등을 효과적으로 억제하여, 다양한 암의 면역 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 및 50으로 이루어진 군으로 선택된 어느 하나 이상의 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 포함하는, 항-CD300c 단클론 항체.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 항-CD300c 단클론 항체는 종간 교차 반응성을 가지는 것을 특징으로 하는, 항-CD300c 단클론 항체.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 교차 반응성은 인간 항원과 마우스 항원에 대한 교차 반응성인 것을 특징으로 하는, 항-CD300c 단클론 항체.
- [청구항 4] 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 항체는 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 및 50으로 이루어진 군으로 선택된 어느 하나 이상의 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 4 항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 면역항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 면역항암제는 anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4, anti-KIR, anti-LAG3, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD276, anti-CD27, anti-GITR, anti-TIM3, anti-41BB, anti-CD226, anti-CD40, anti-CD70, anti-ICOS, anti-CD40L, anti-BTLA, anti-TCR, 및 anti-TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 4 항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는, 면역항암제.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 및 50으로 이루어진 군으로 선택된 어느 하나 이상의 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제.

[청구항 12] 제 10 항에 있어서,
상기 면역항암제는 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 면역항암제.

[청구항 13] 제 10 항에 있어서,
상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 면역항암제.

[청구항 14] 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는, 항암 치료 요법의 보조제.

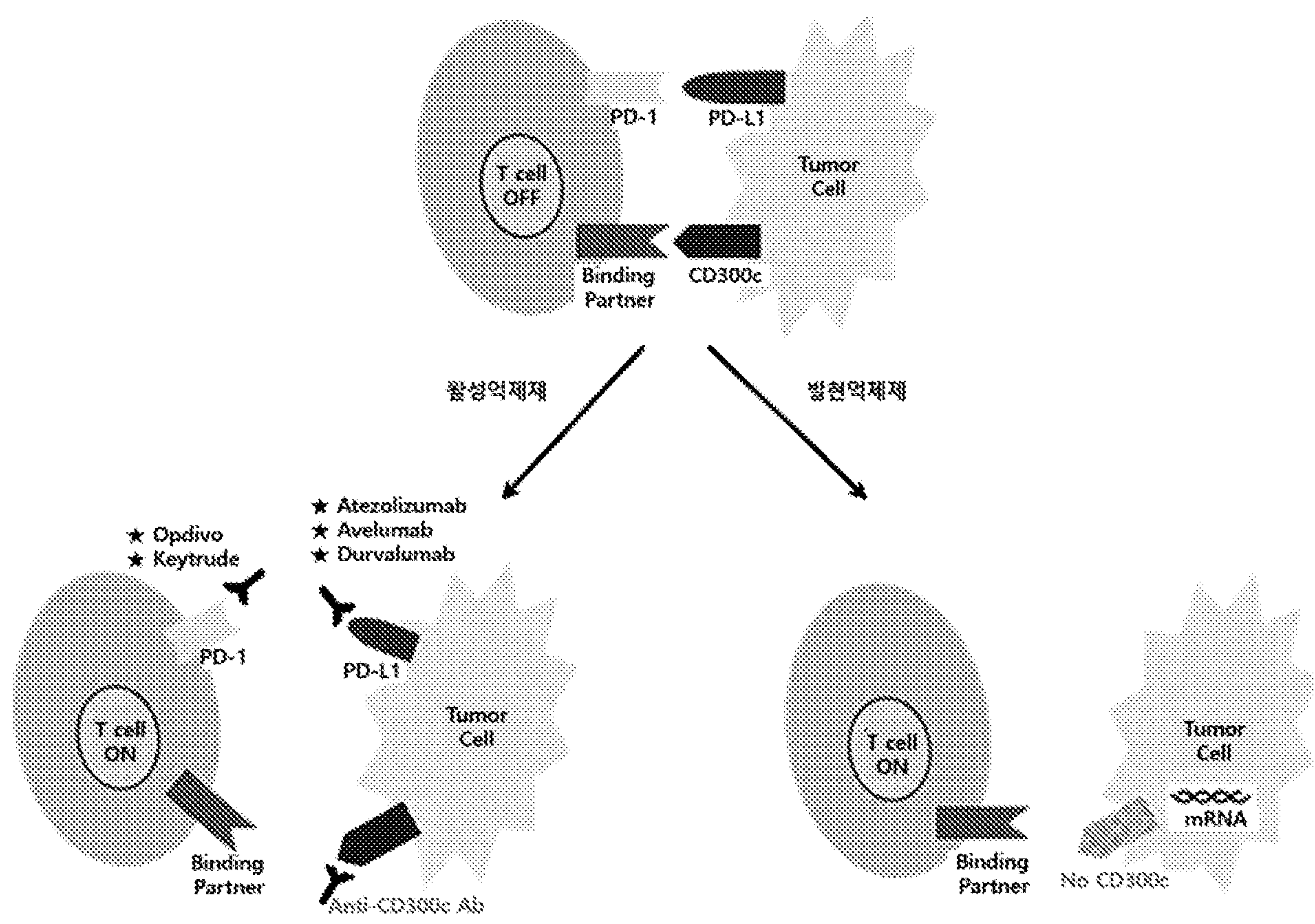
[청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 보조제는 면역 세포의 면역 기능을 활성화 시켜 항암 치료 효과를 향상시키는 것을 특징으로 하는, 보조제.

[청구항 16] 제 14 항에 있어서,
상기 항암 치료 요법은 방사선 치료 요법, 항암제 치료 요법 또는 면역항암제 치료 요법인, 보조제.

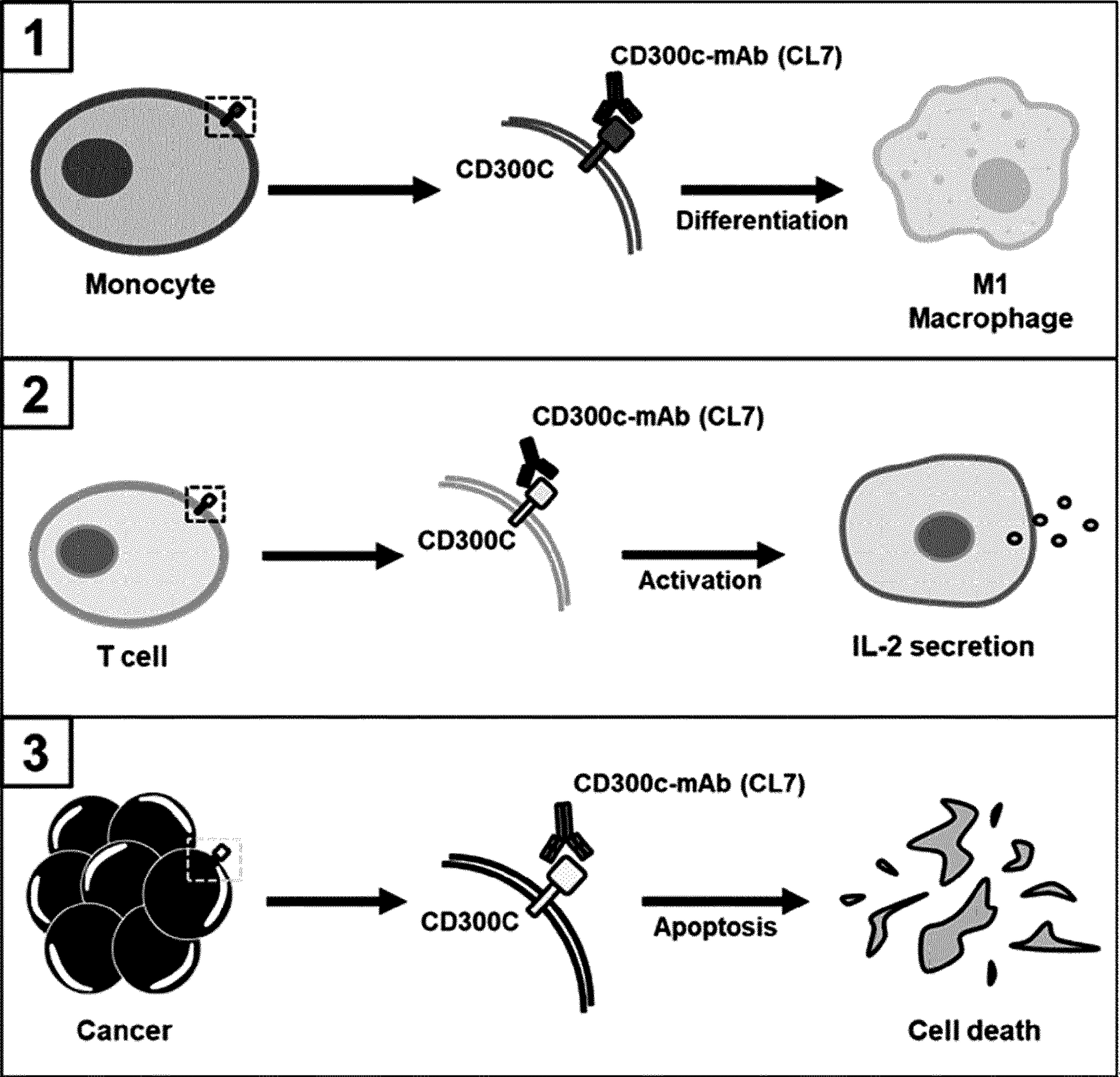
[청구항 17] 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 18] 항-CD300c 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도.

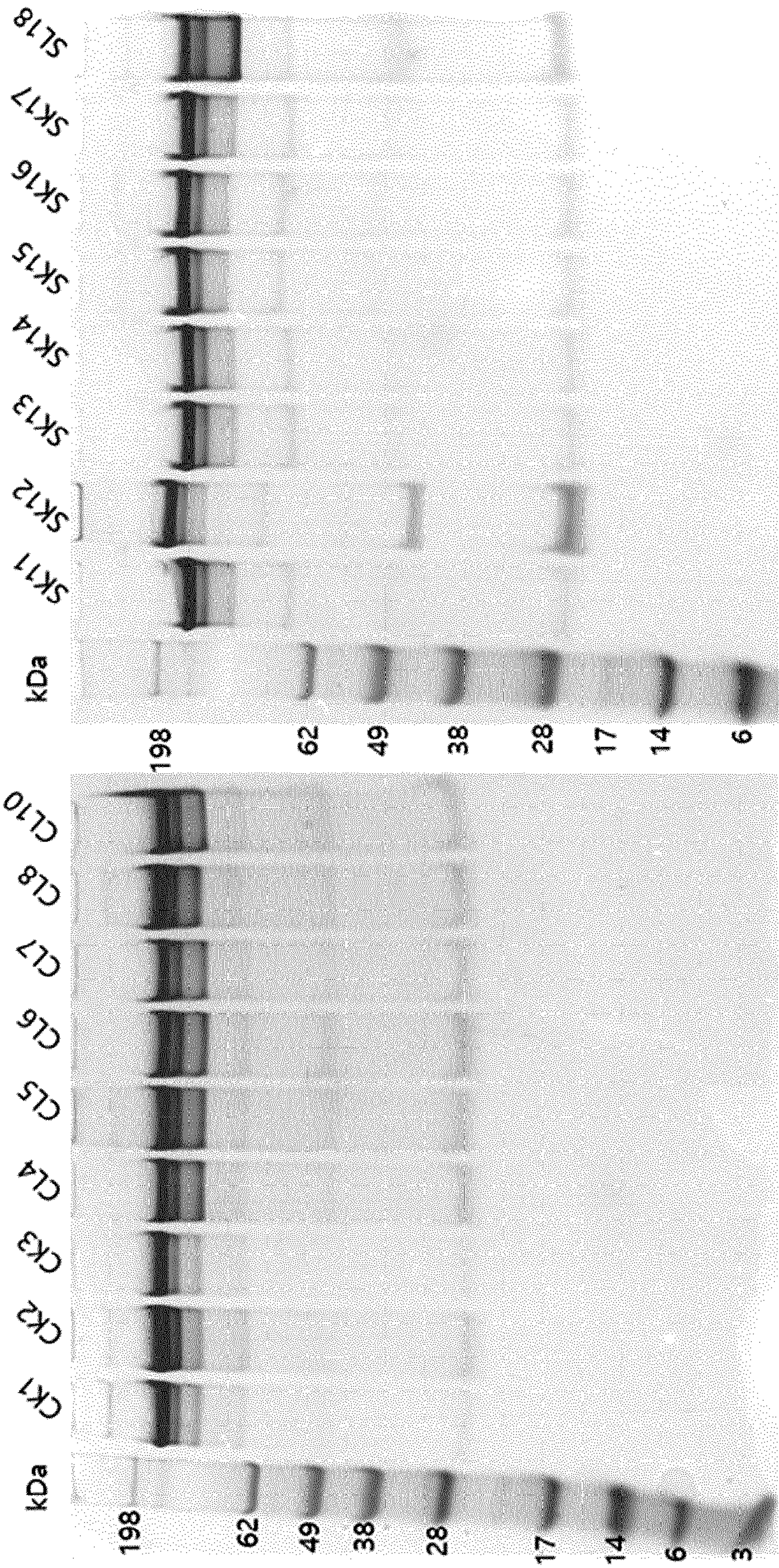
[도1]



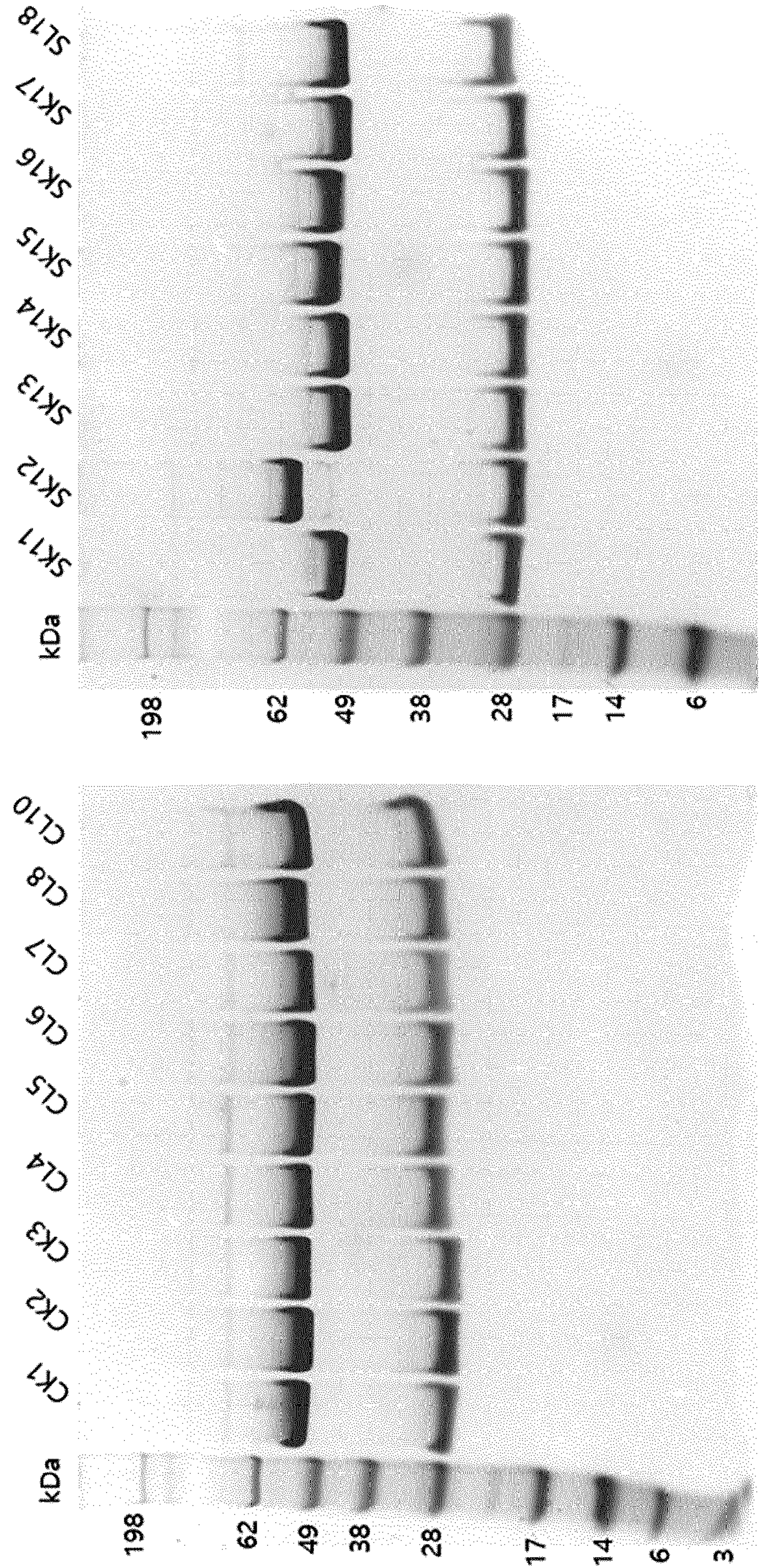
[도2]



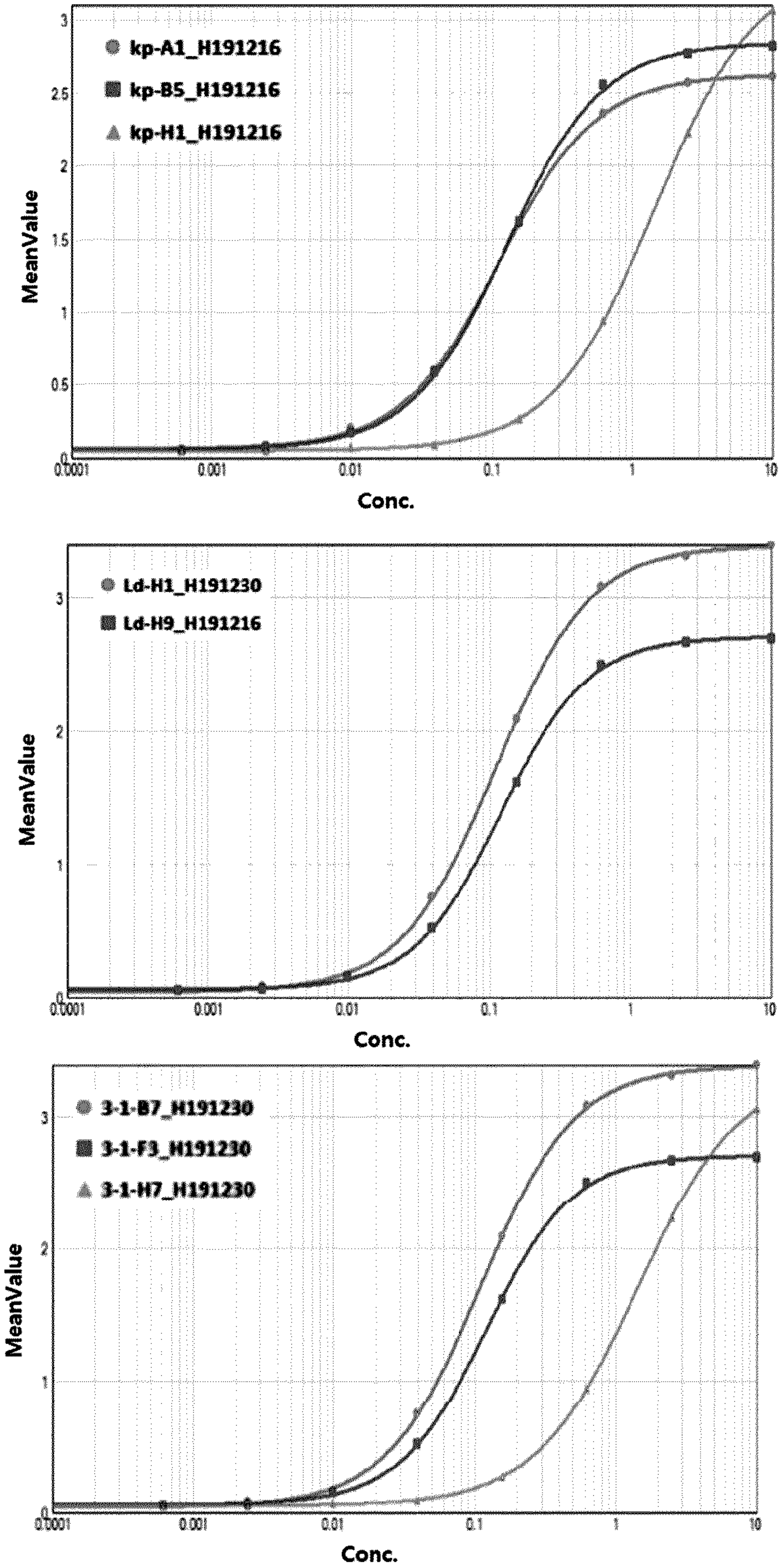
[도3]



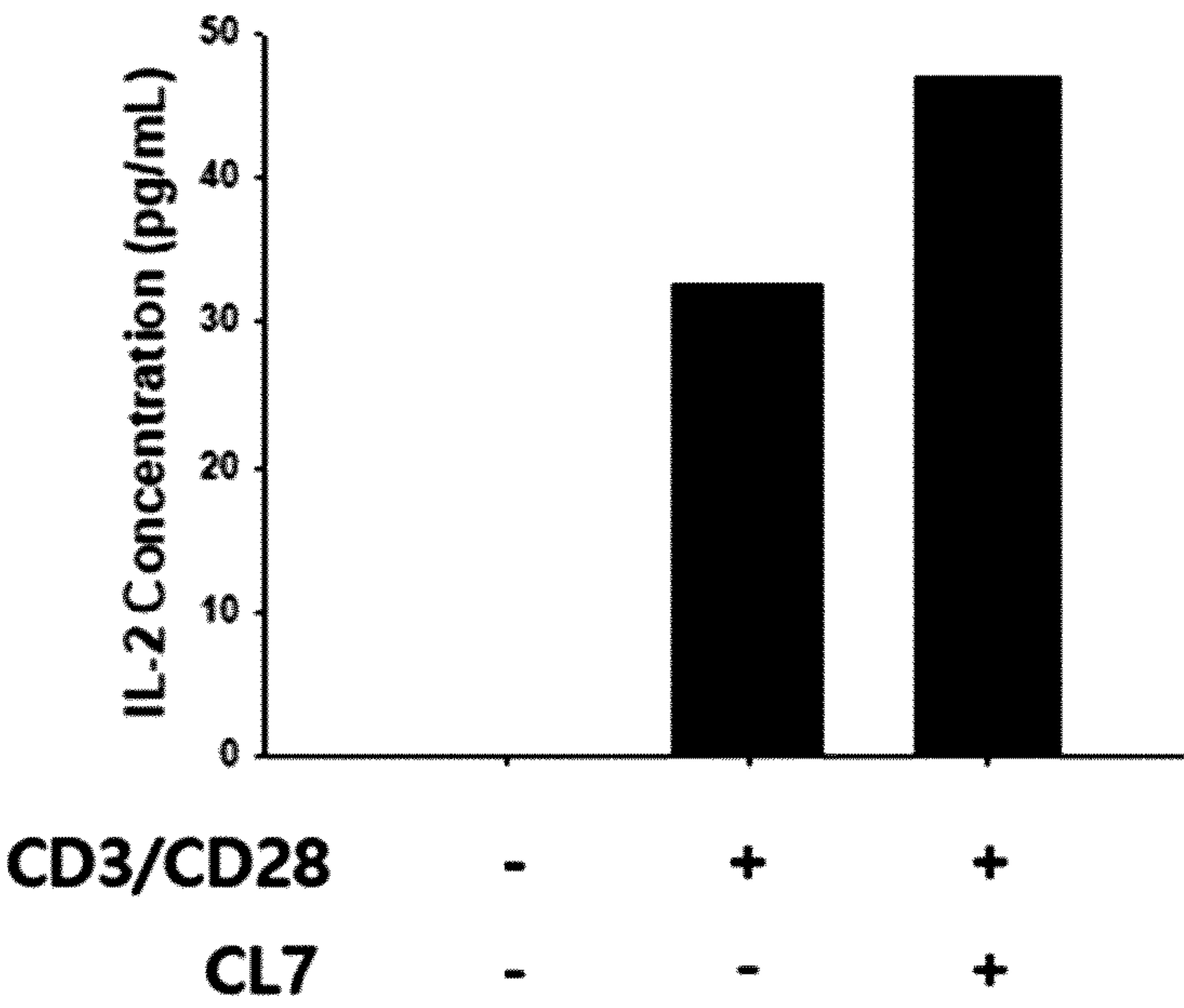
[도4]



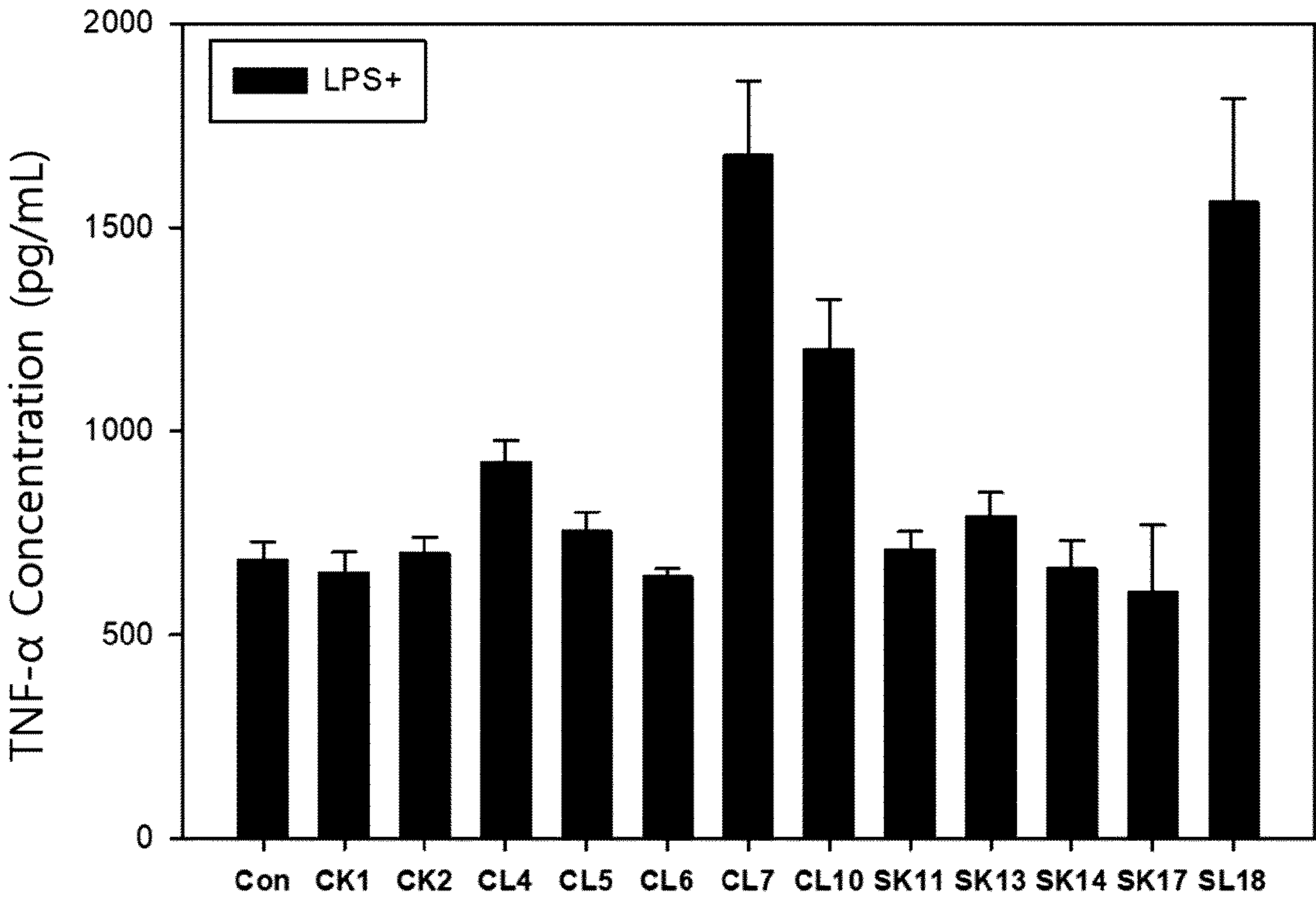
[도5]



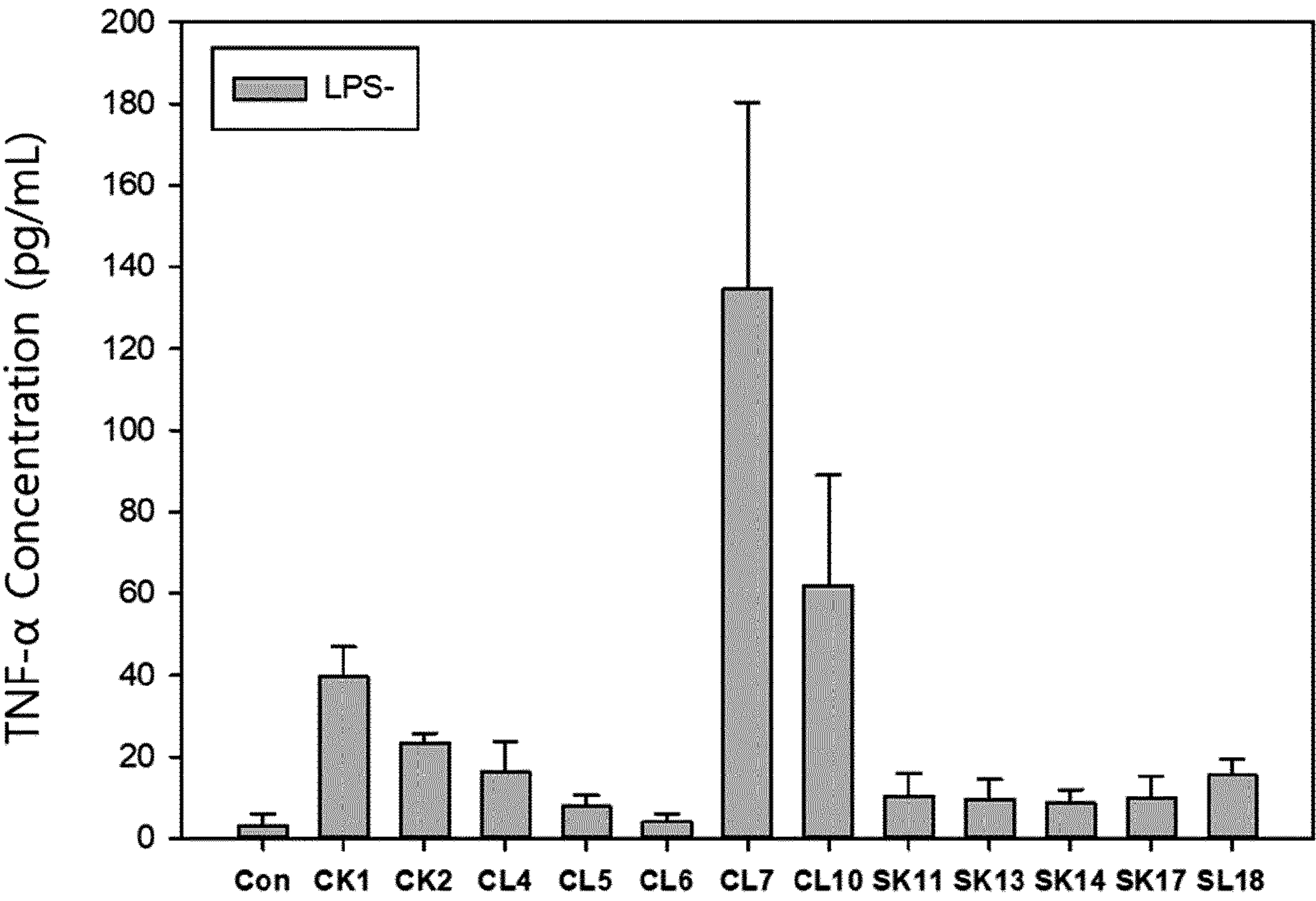
[도6]



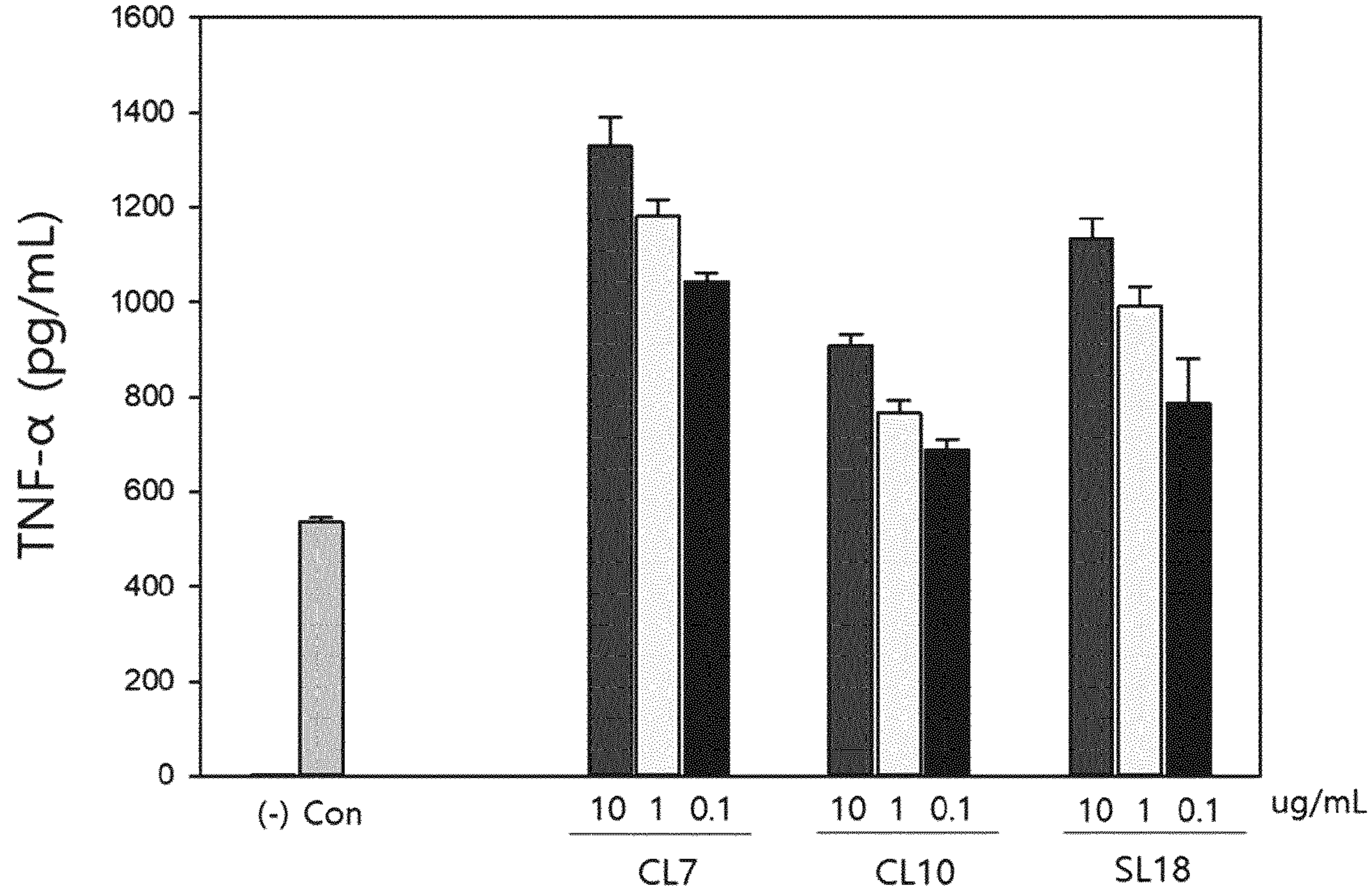
[도7]



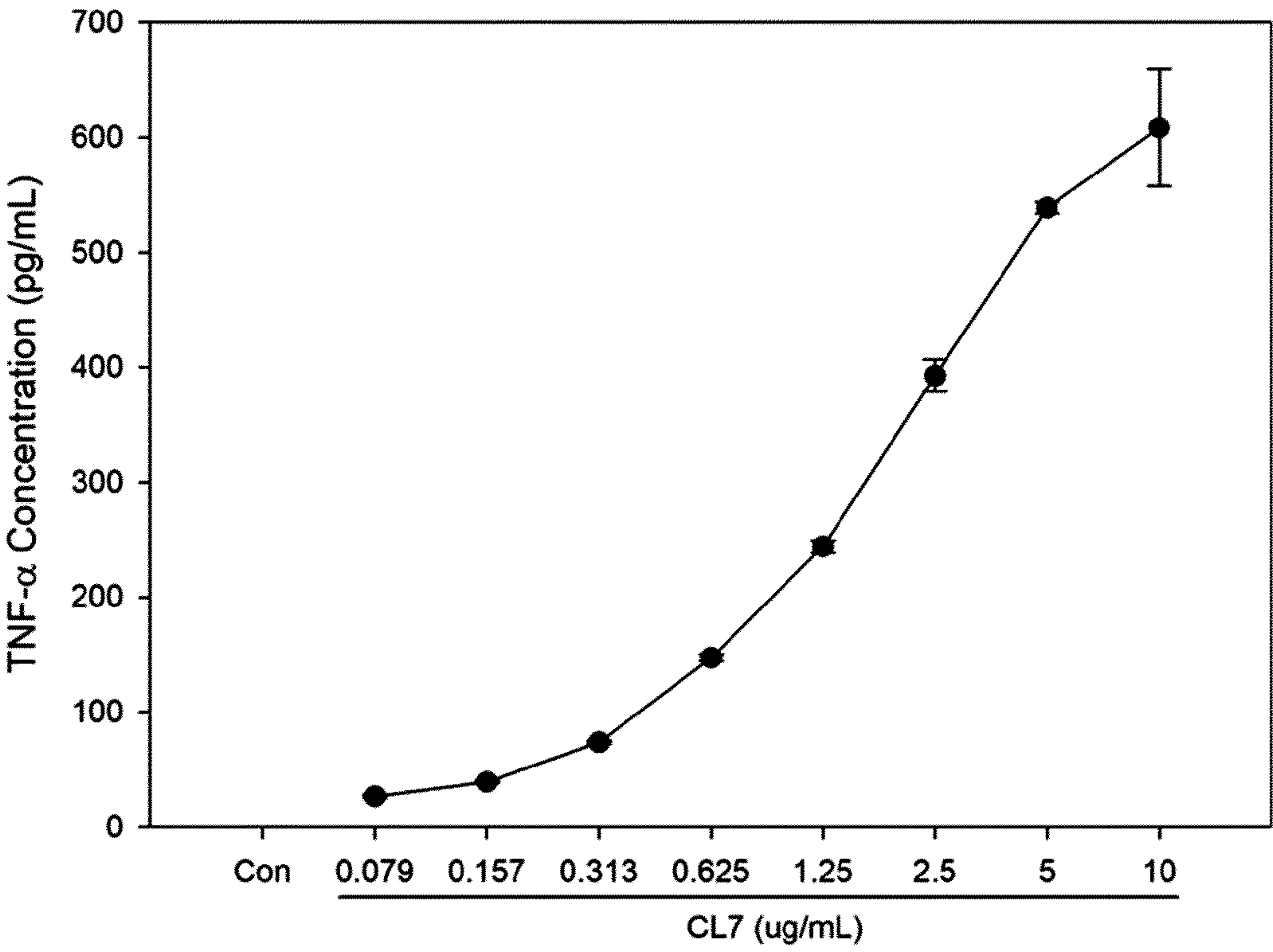
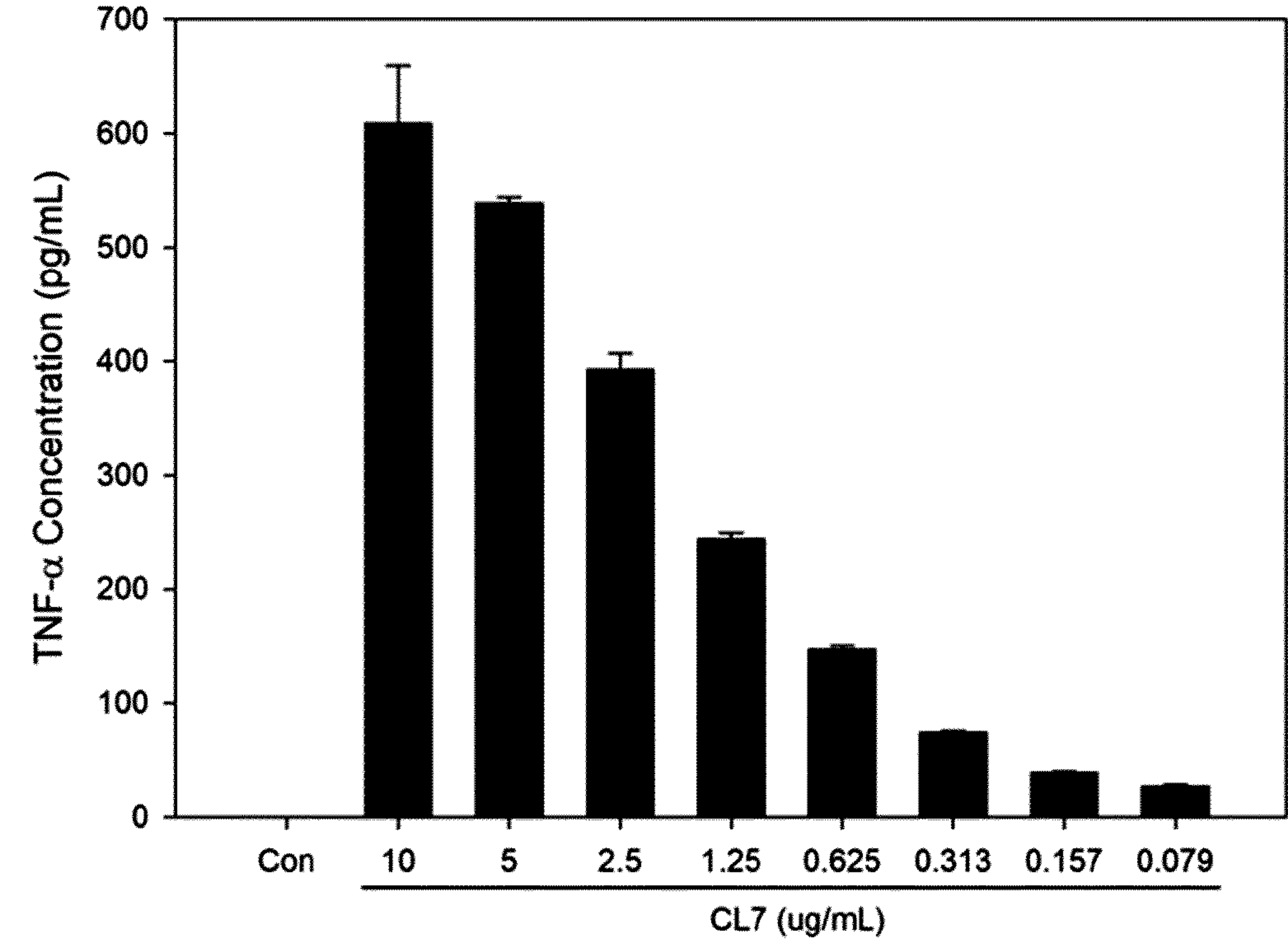
[도8]



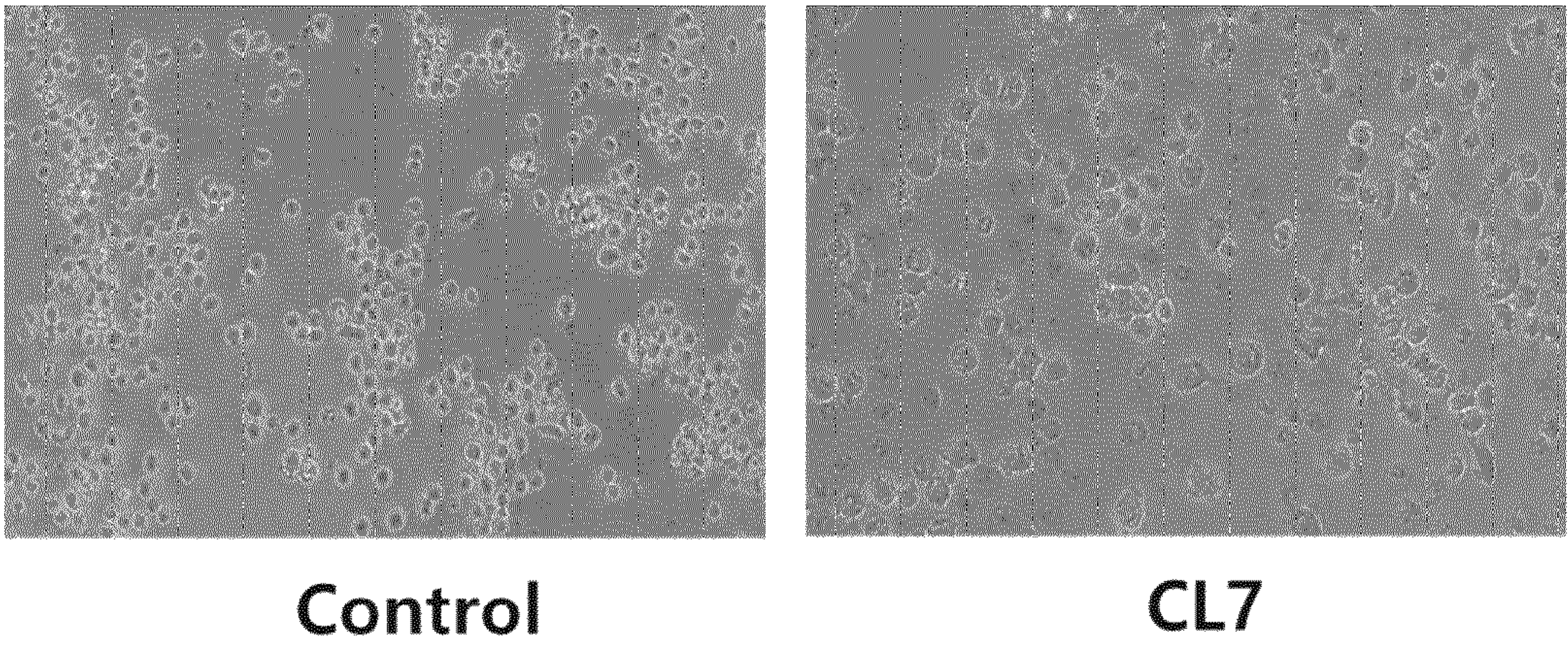
[도9]



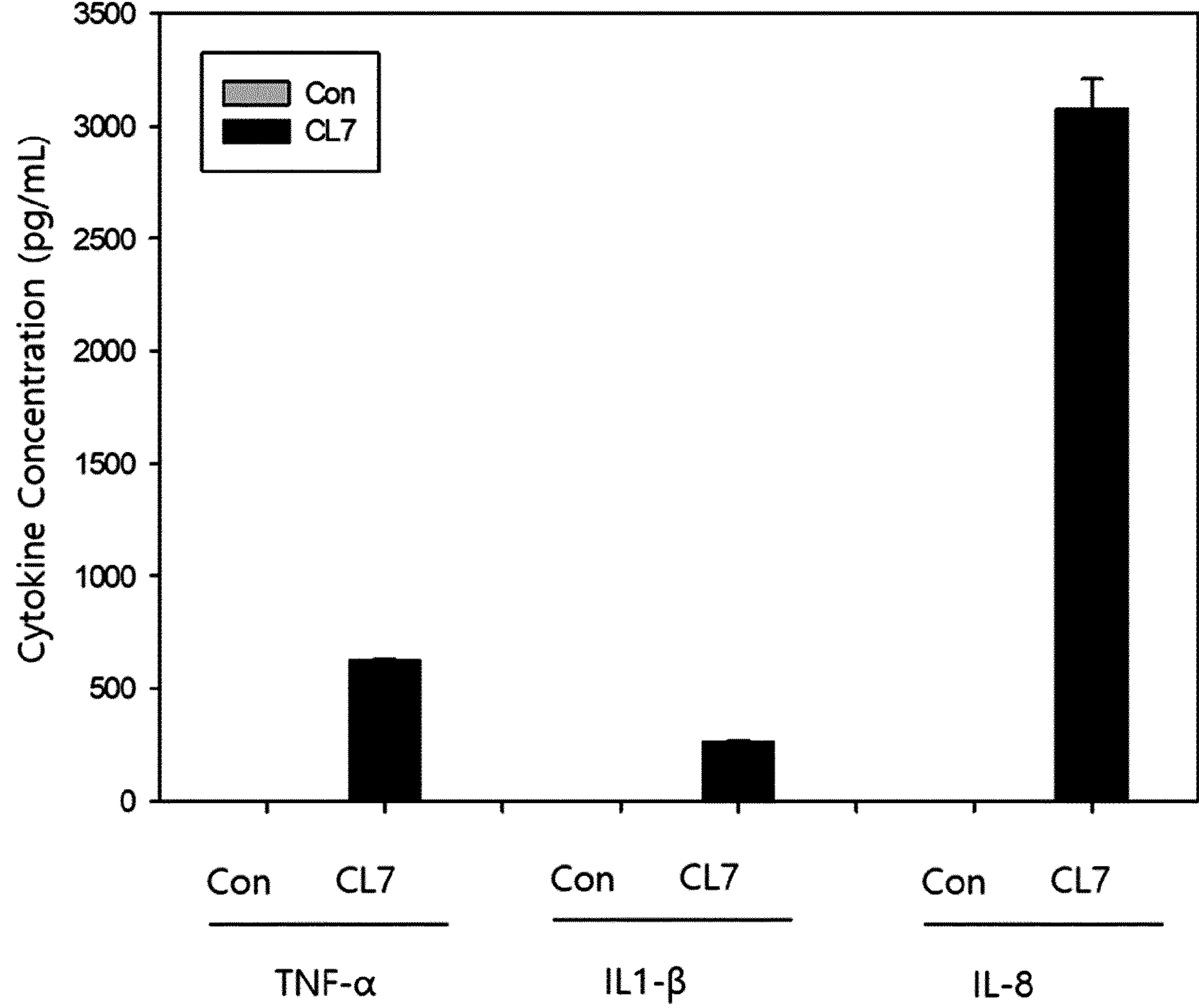
[도10]



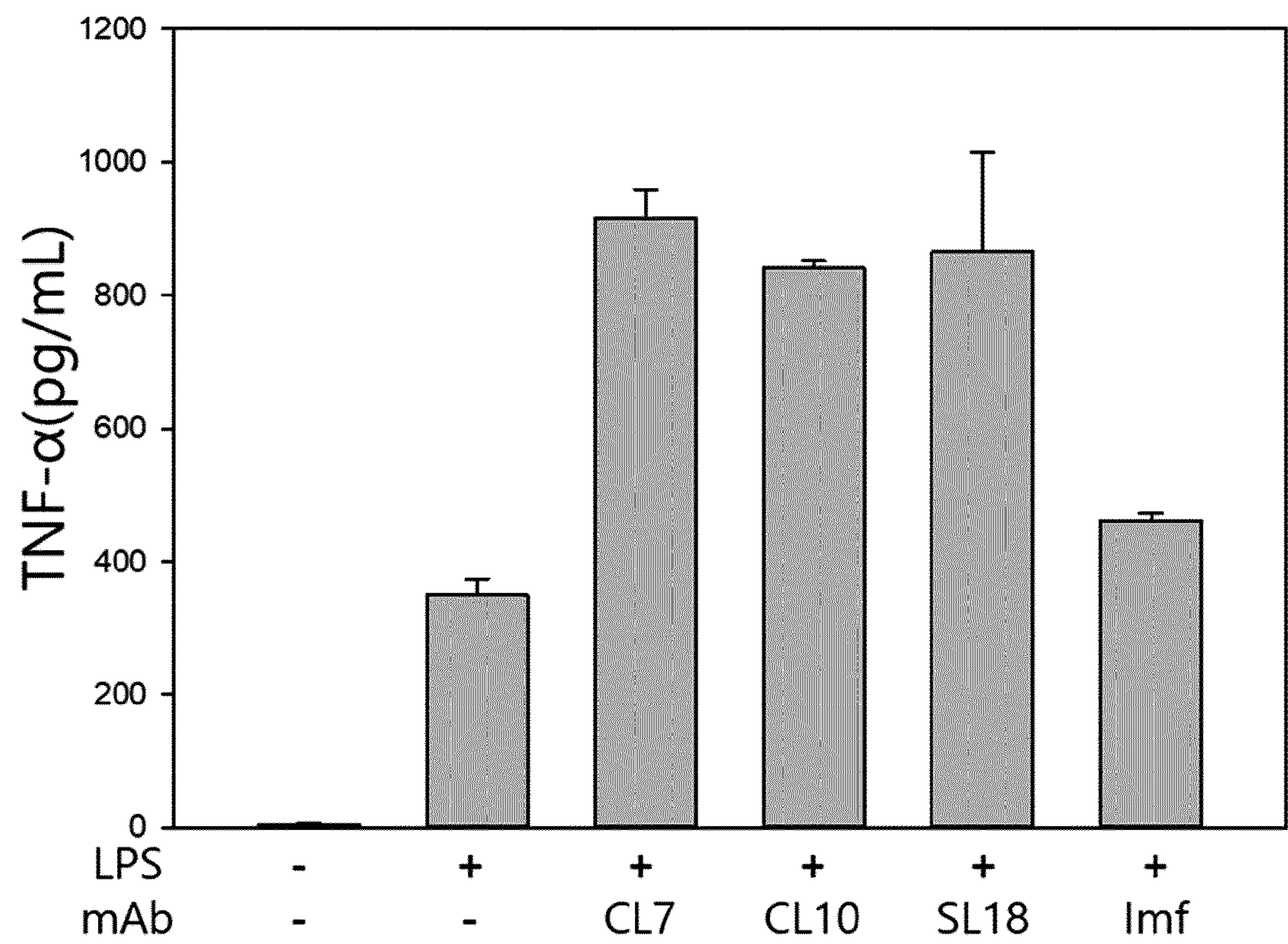
[도11]



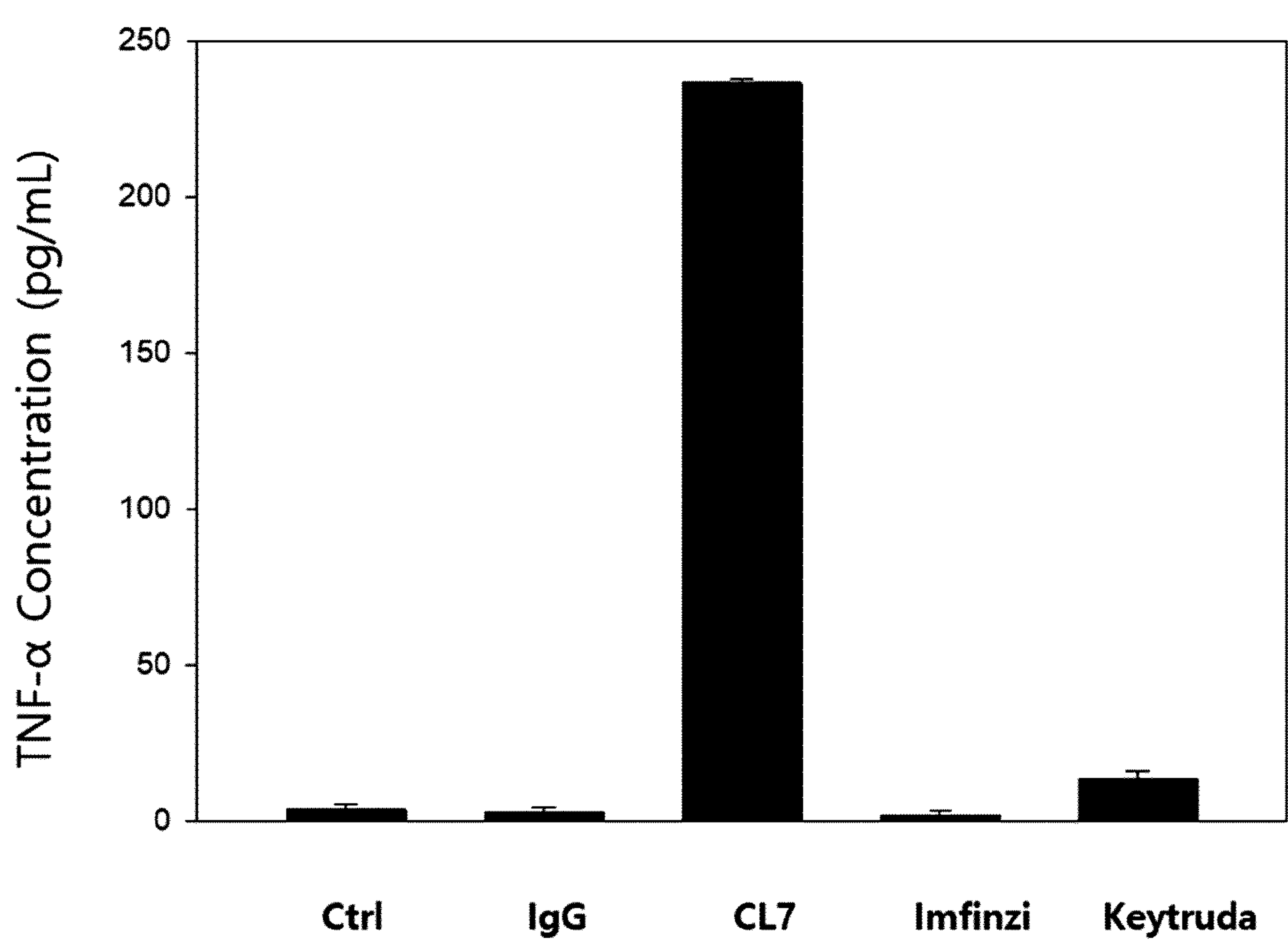
[도12]



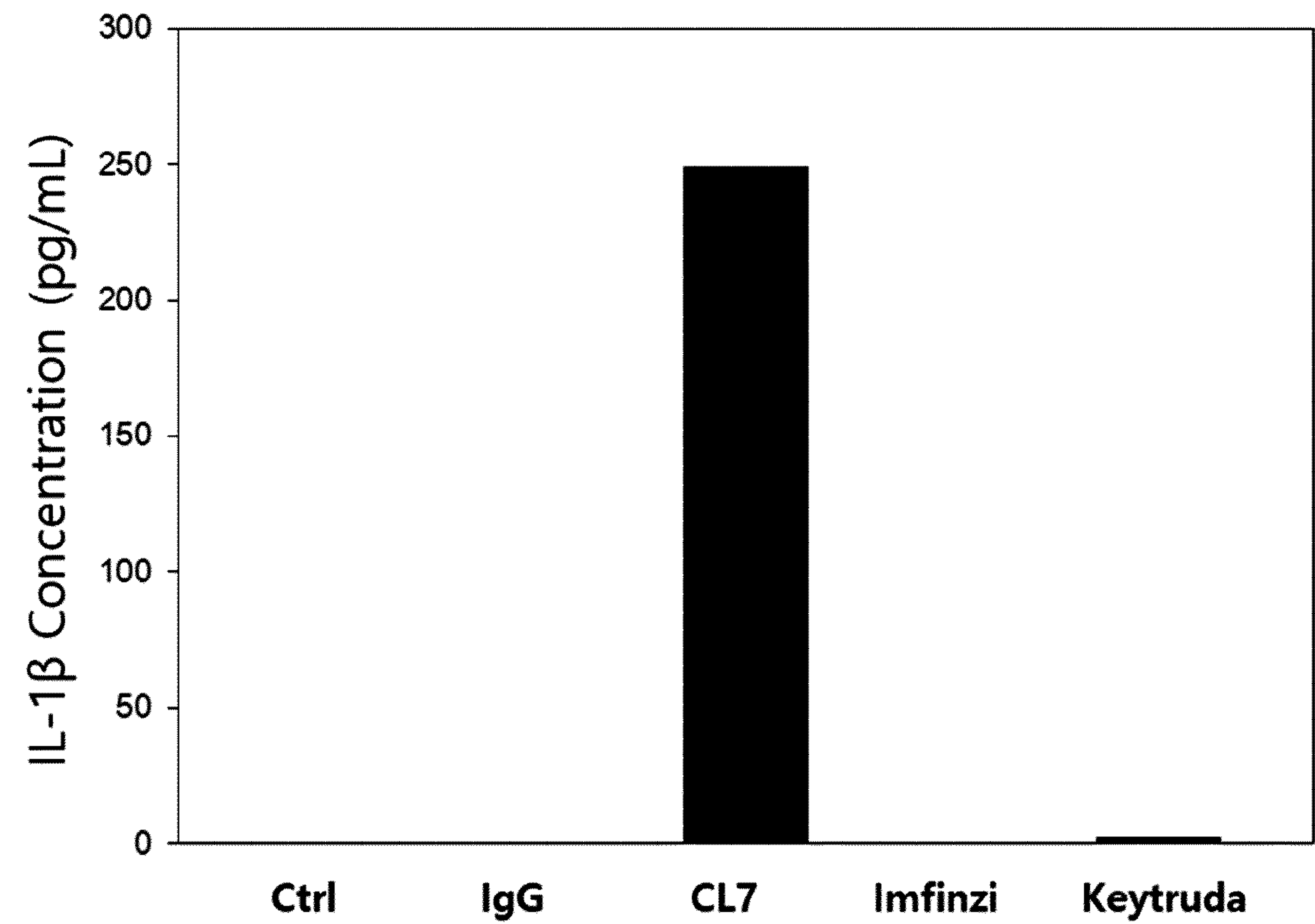
[도13]



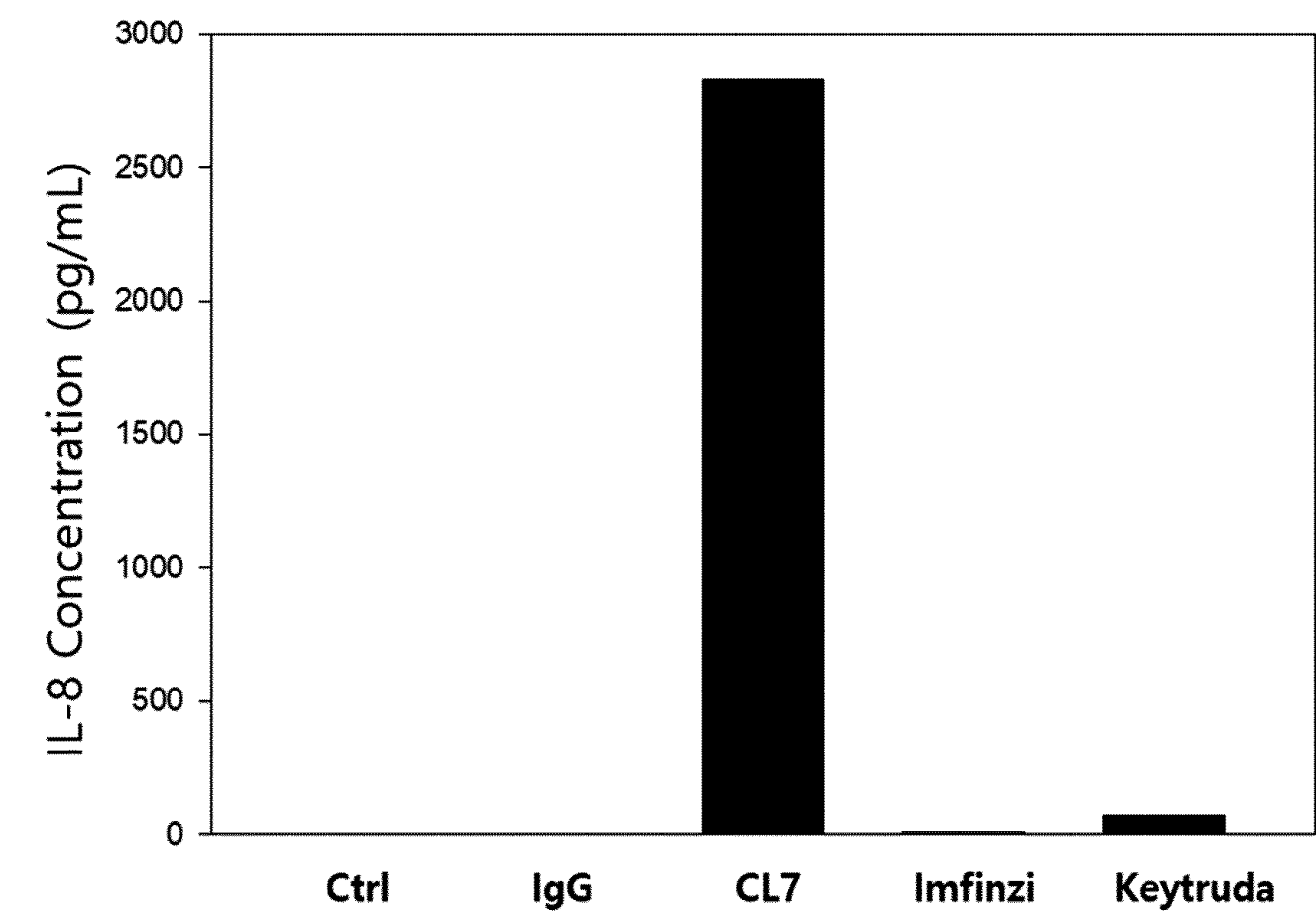
[도14]



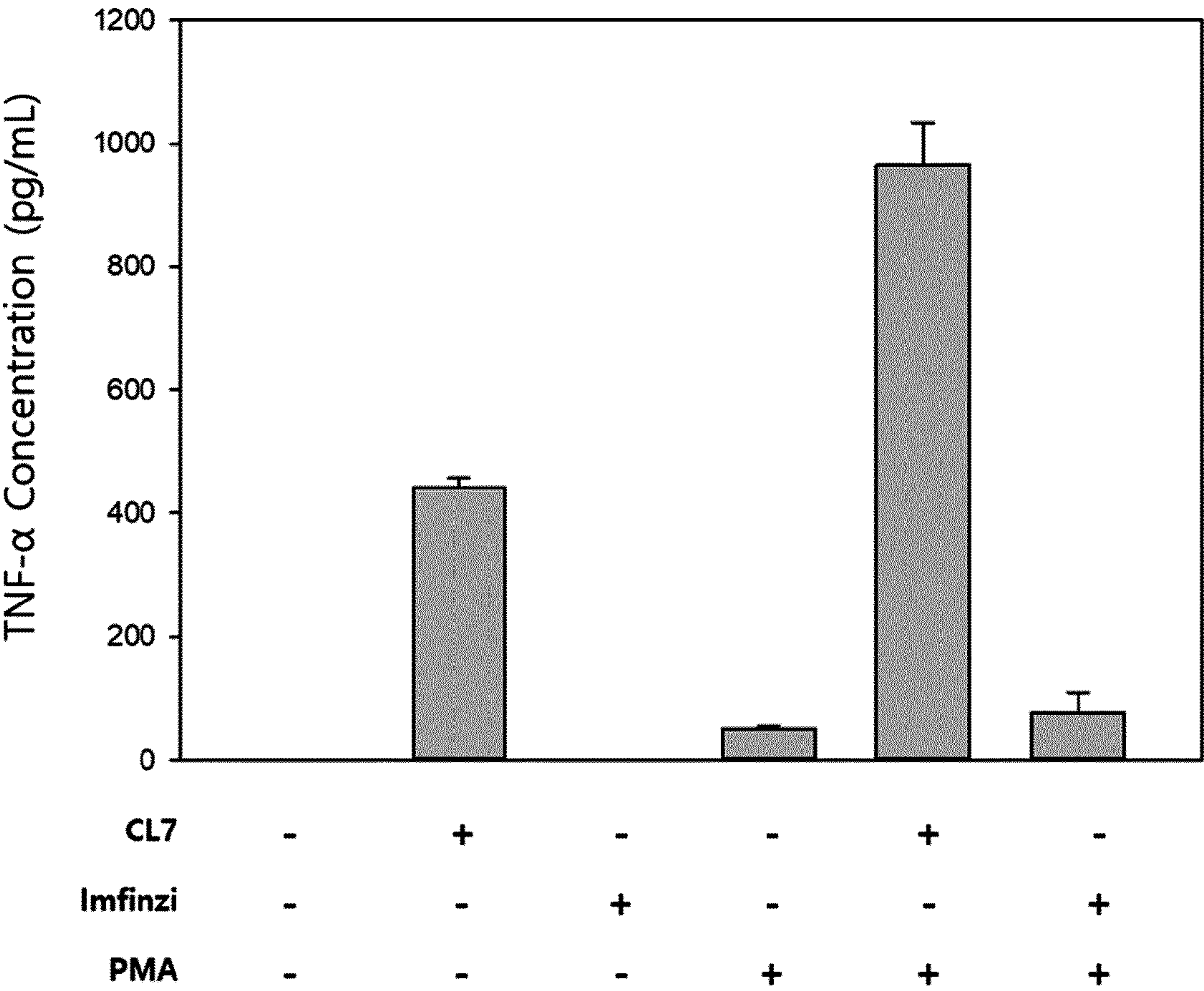
[도15]



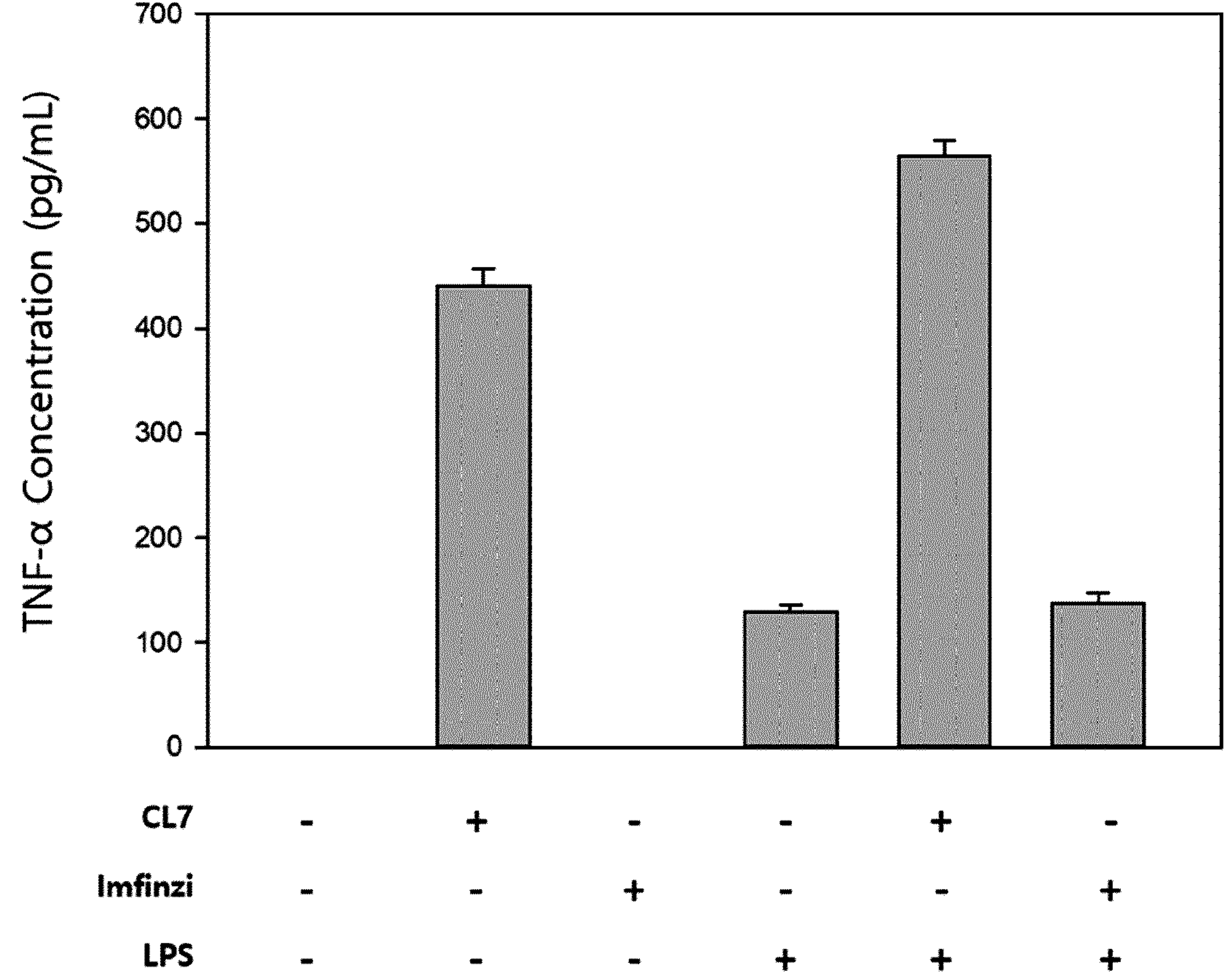
[도16]



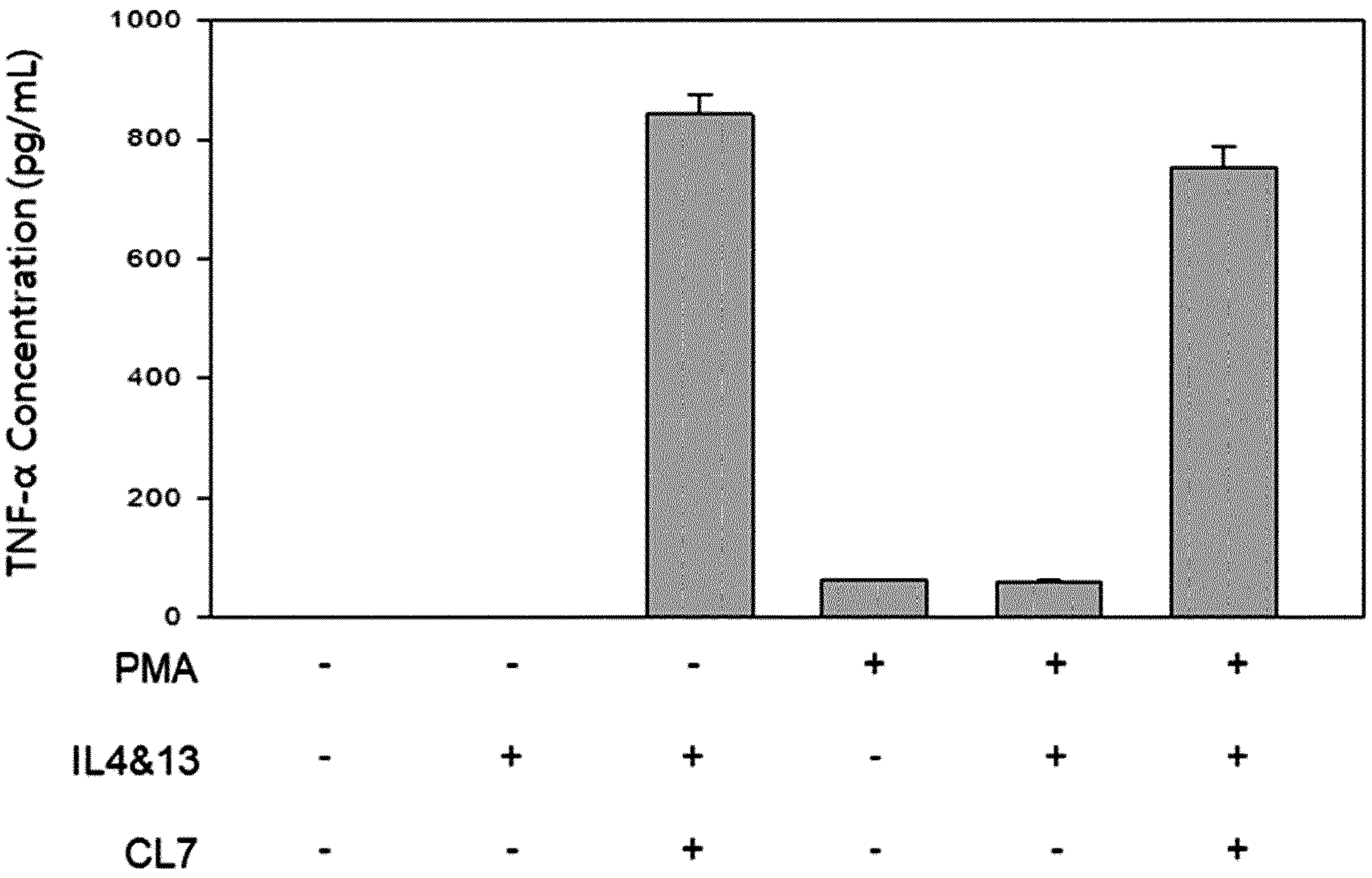
[도17]



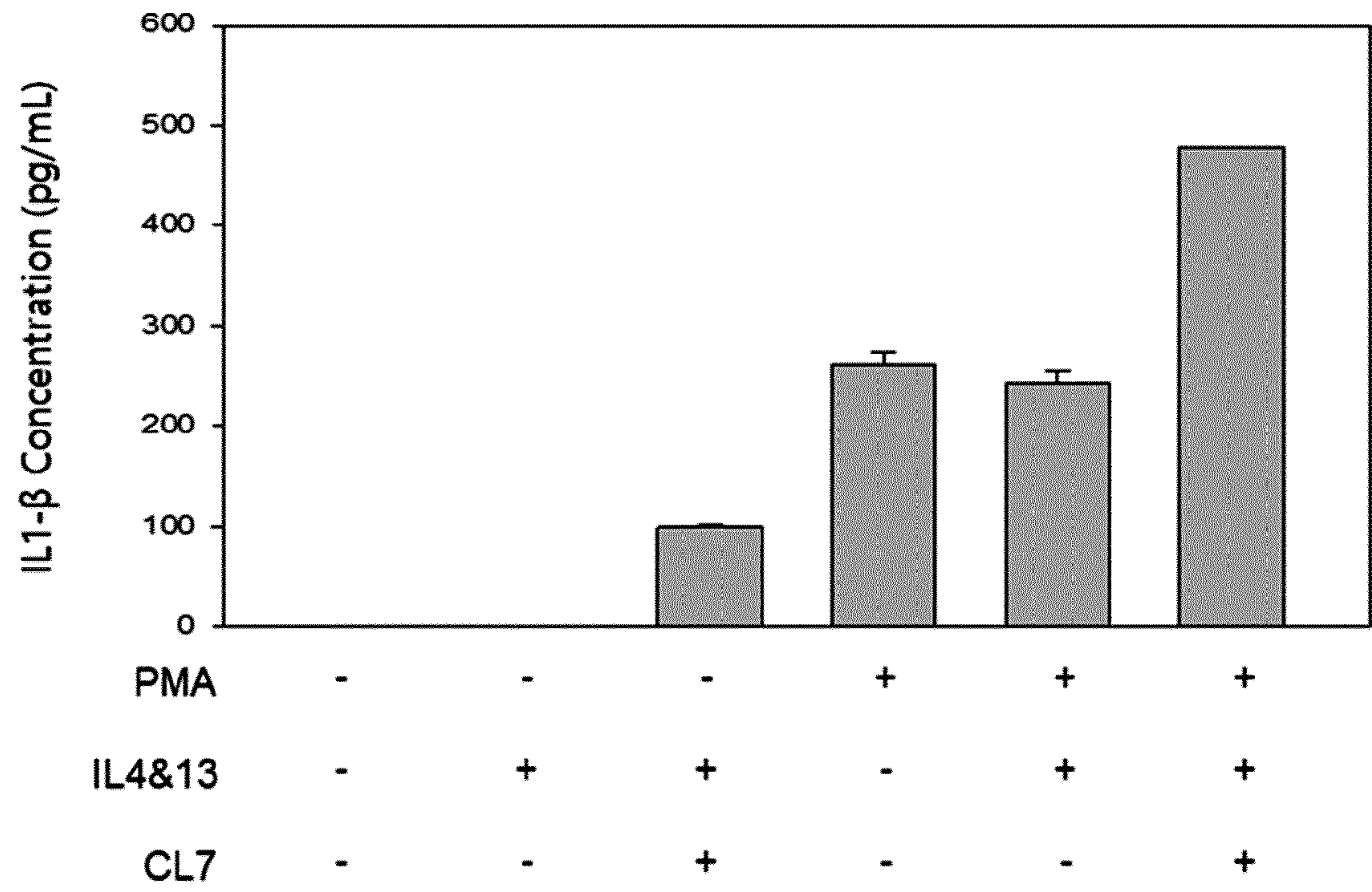
[도18]



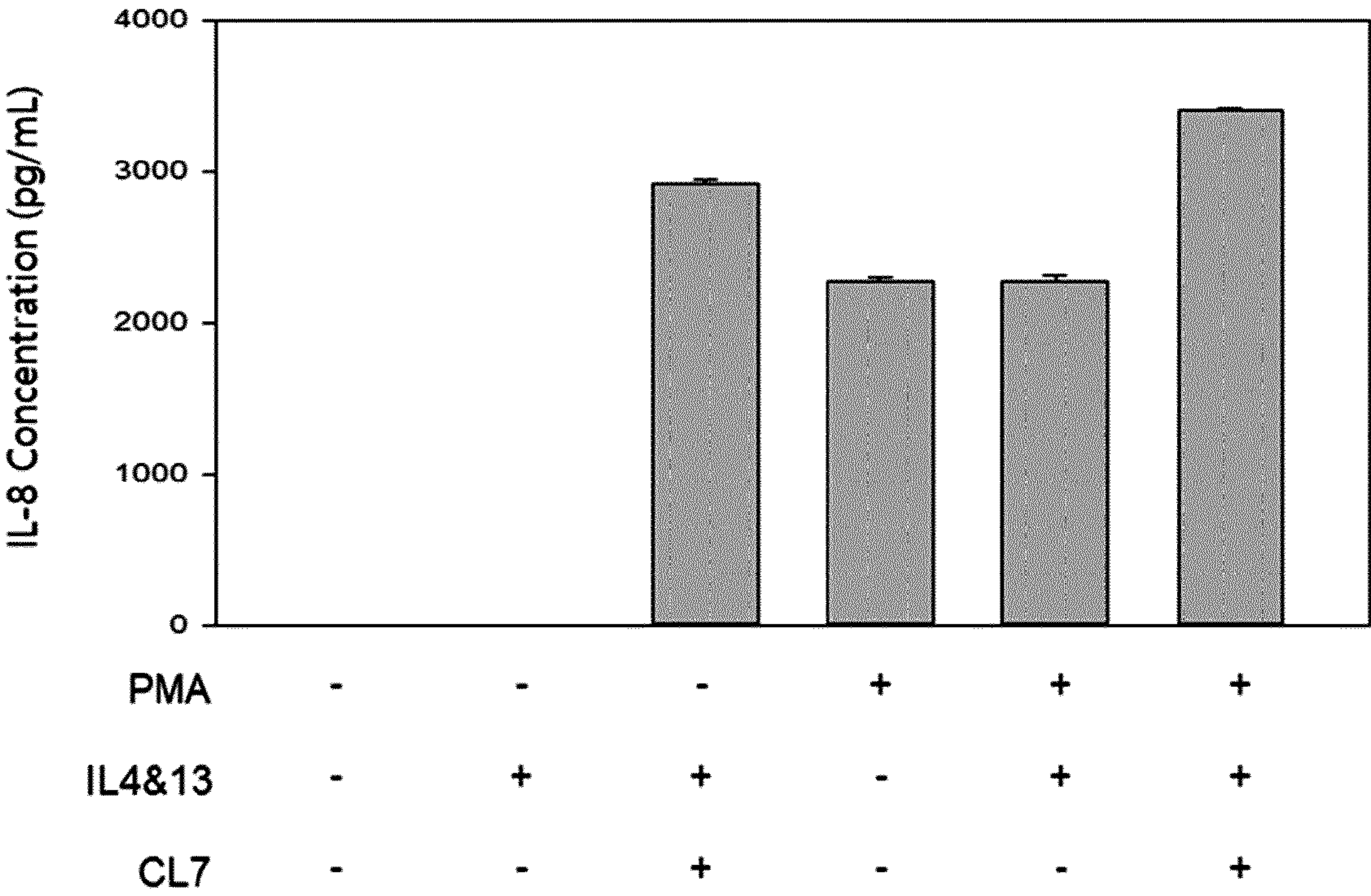
[도19]



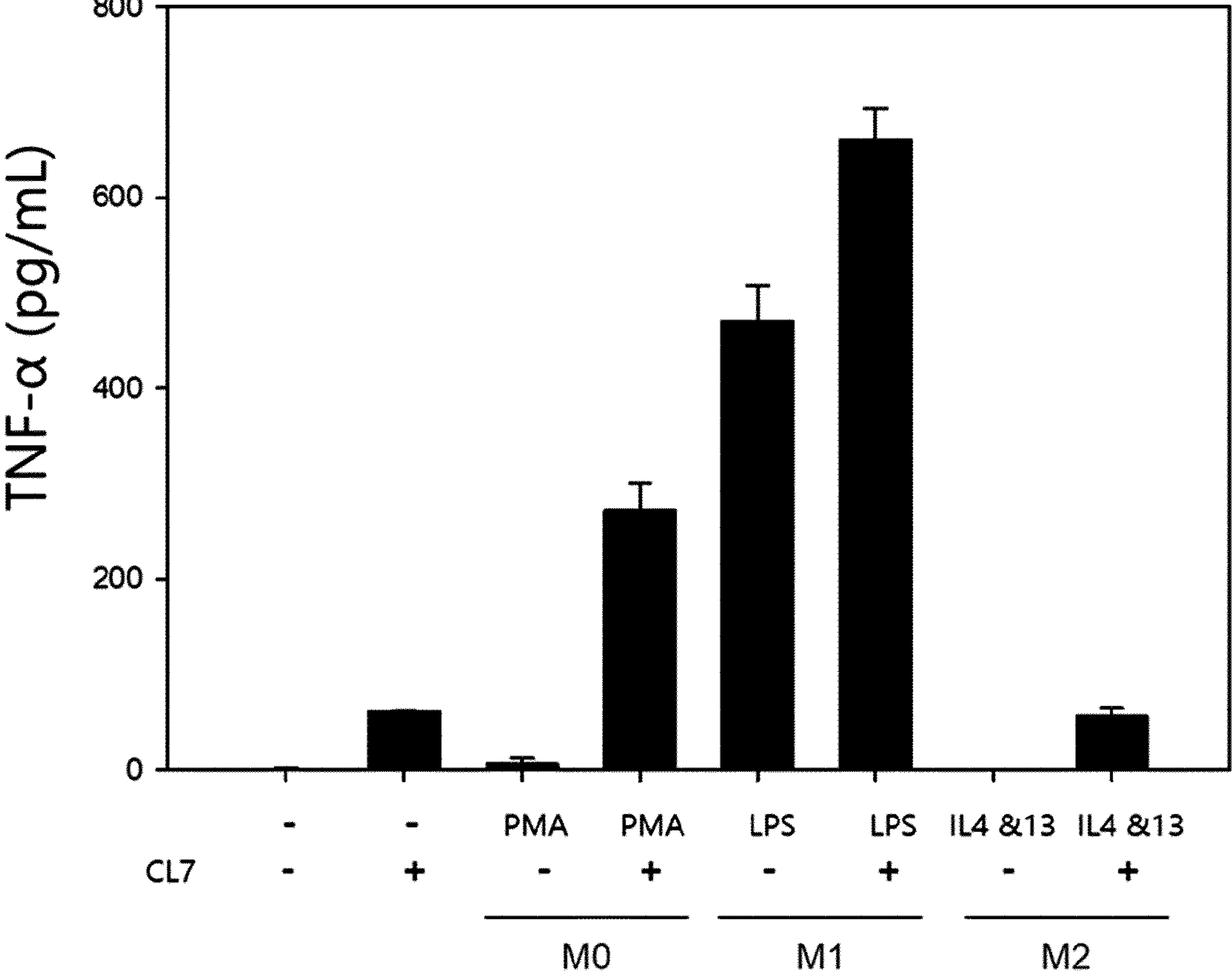
[도20]



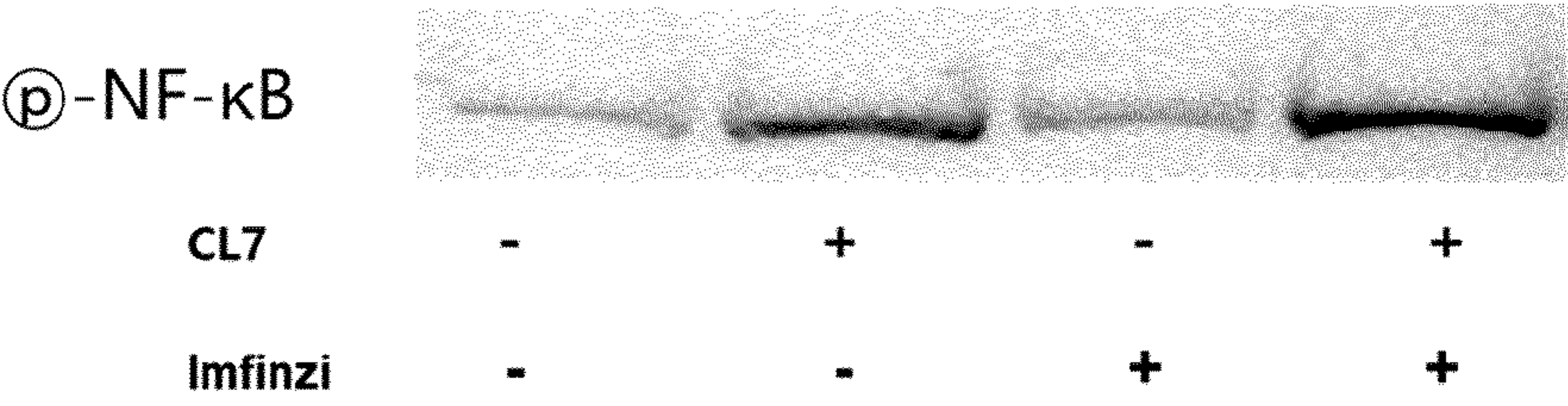
[도21]



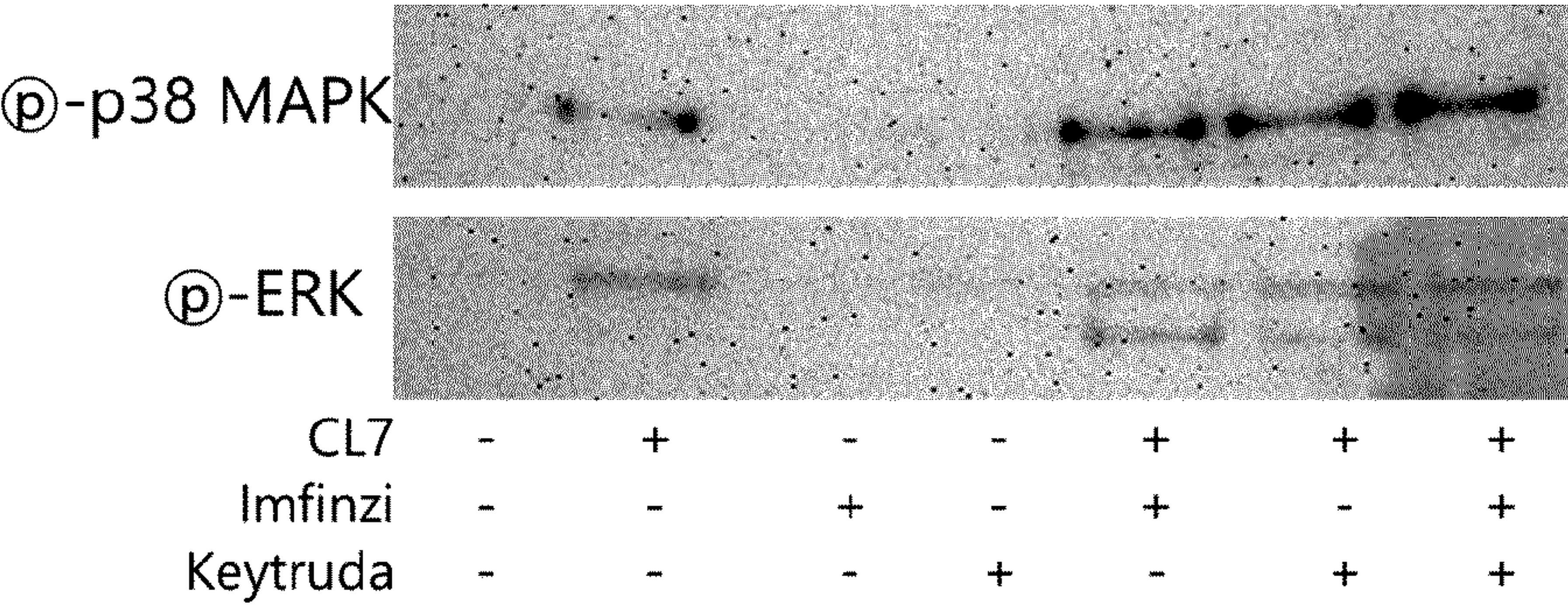
[도22]



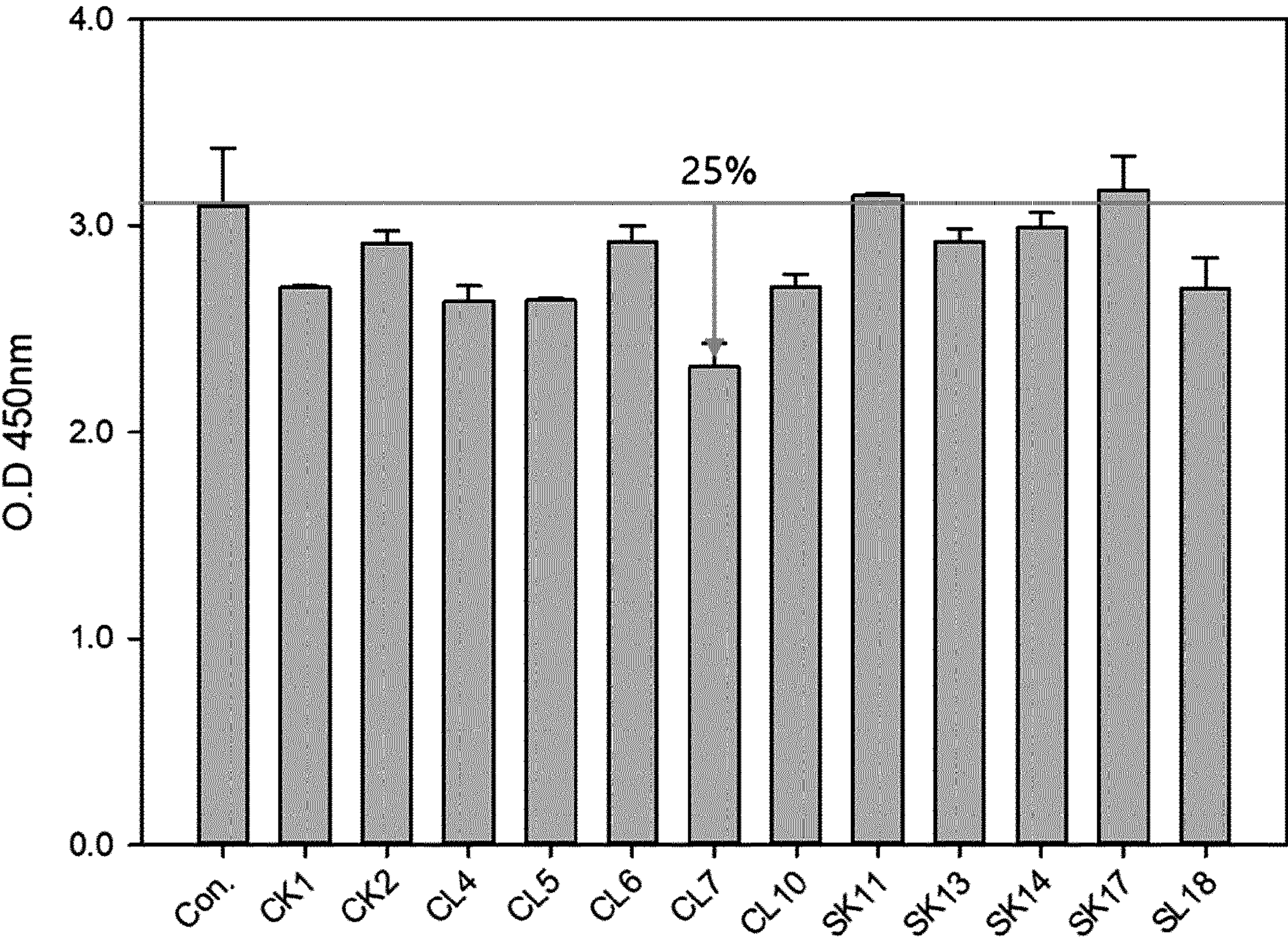
[도23]



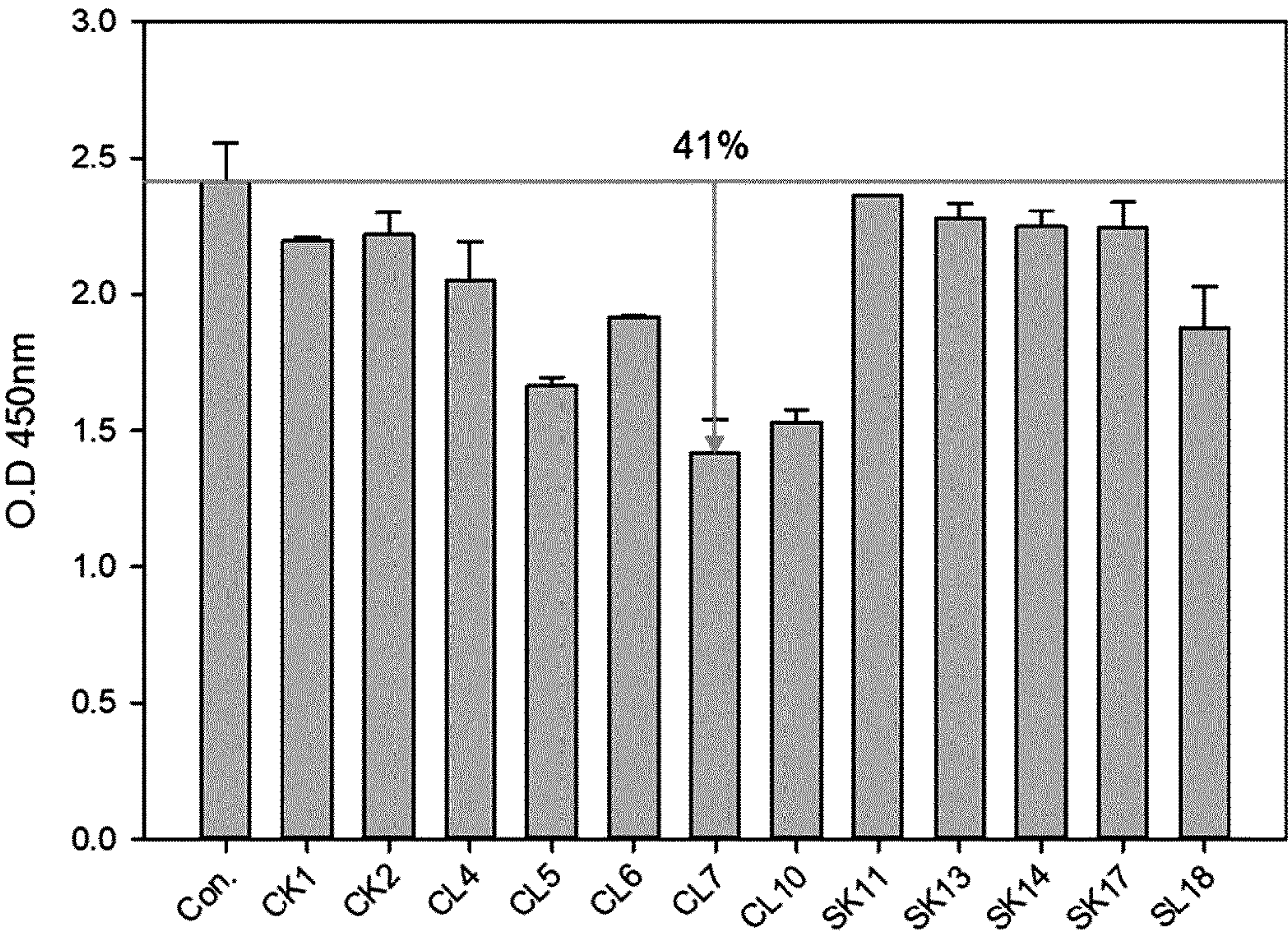
[도24]



[도25]

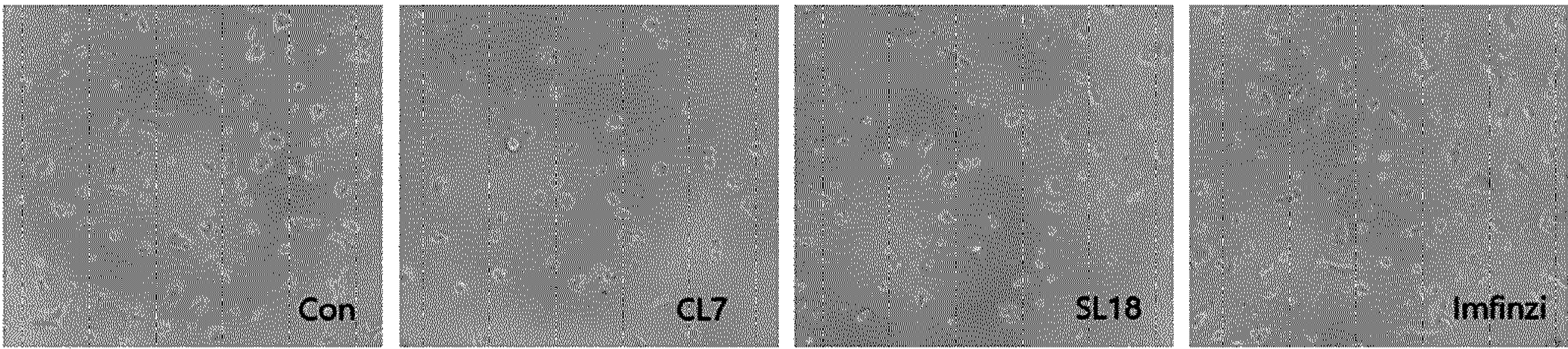


[도26]

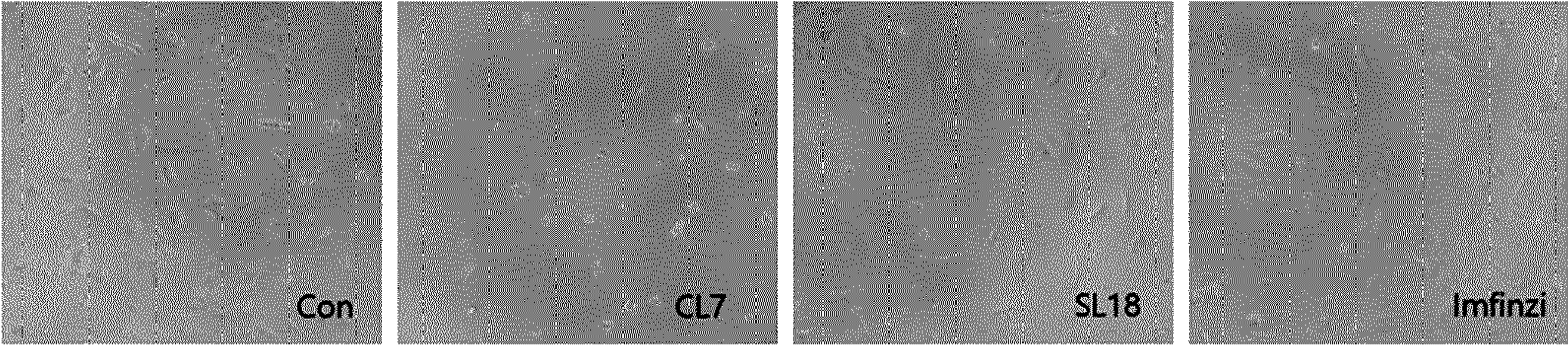


[도27]

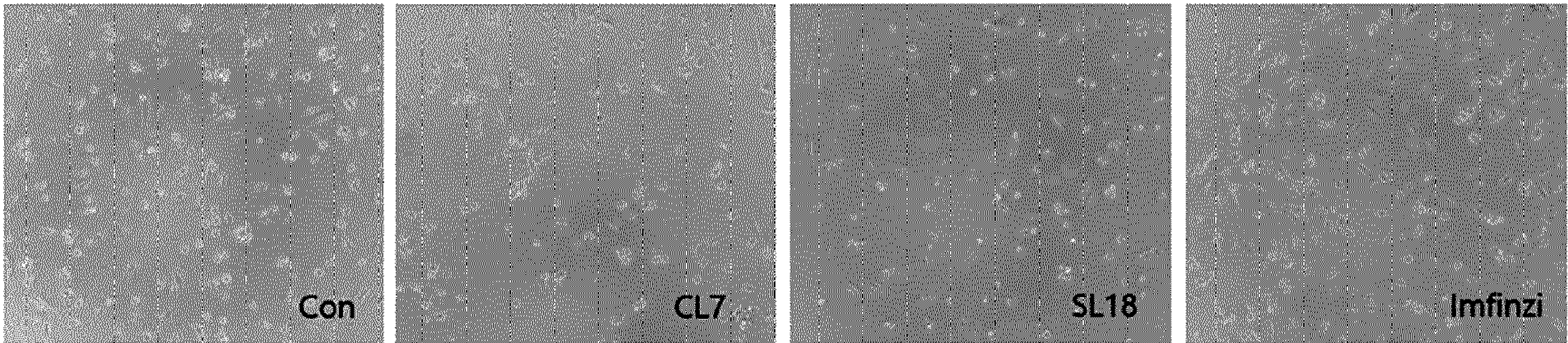
0% FBS



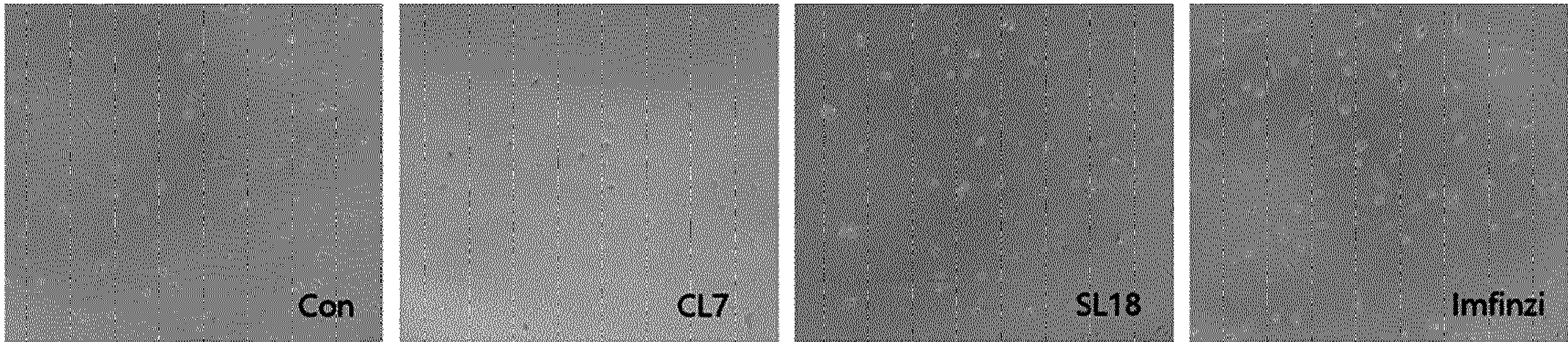
0.1% FBS



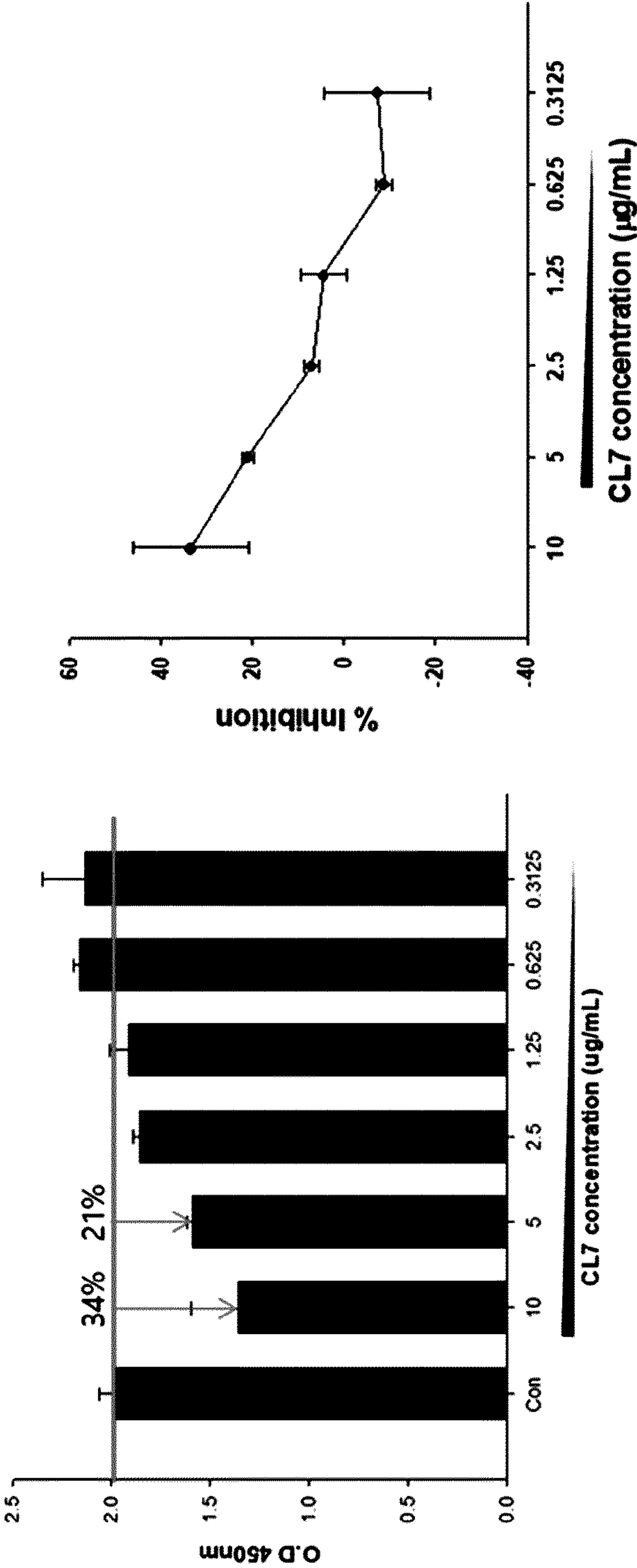
[도28]
0% FBS



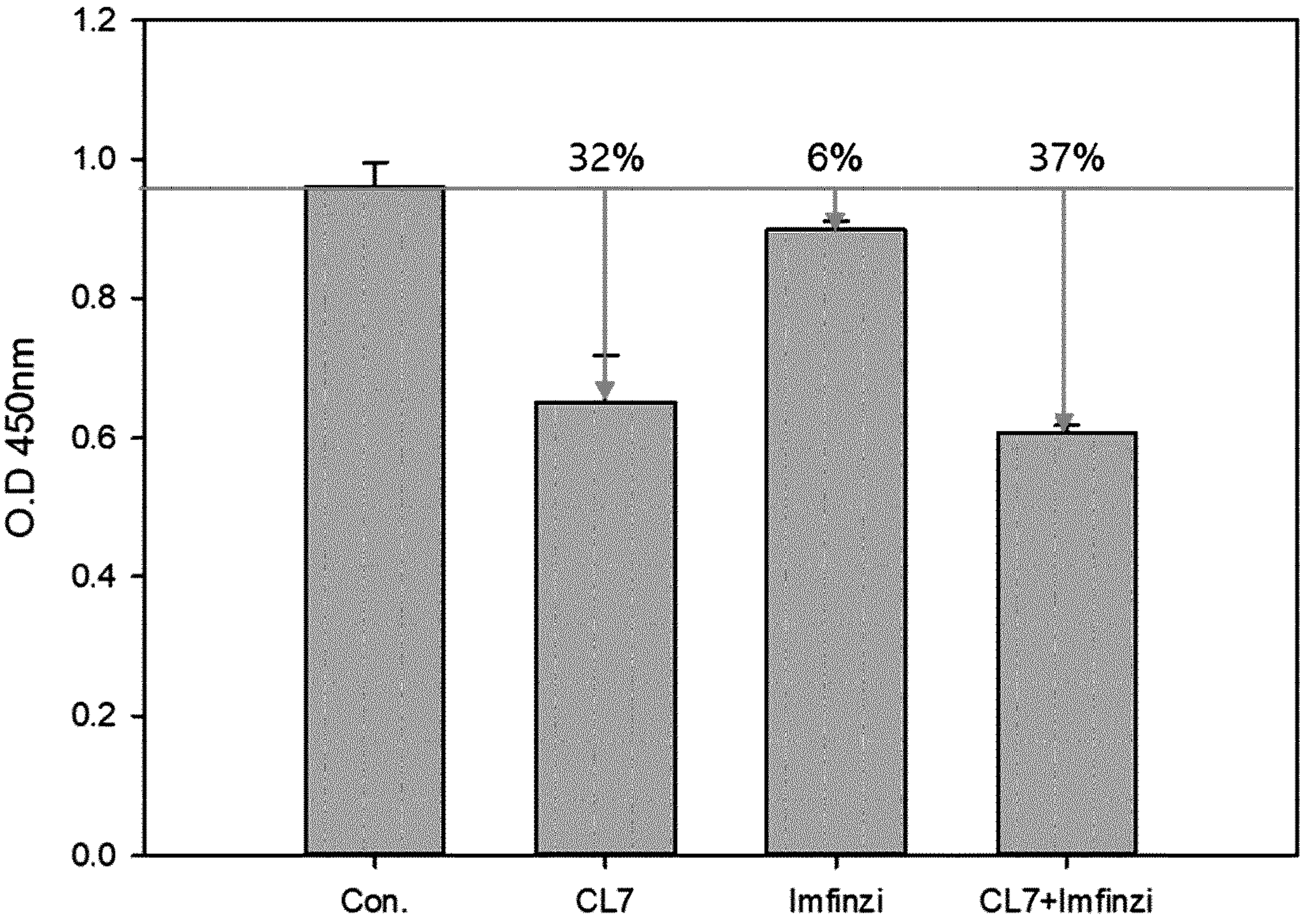
0.1% FBS



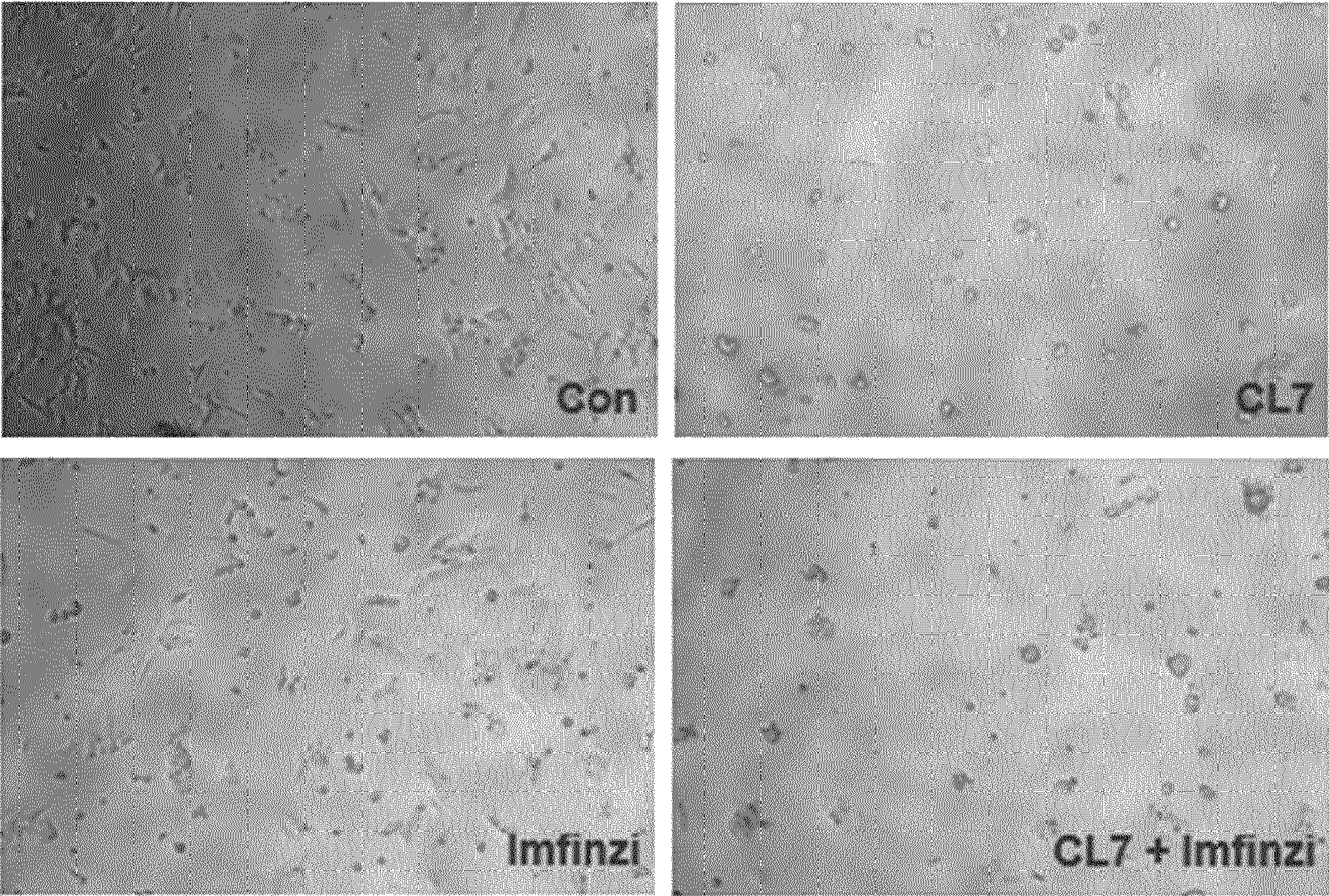
[도29]



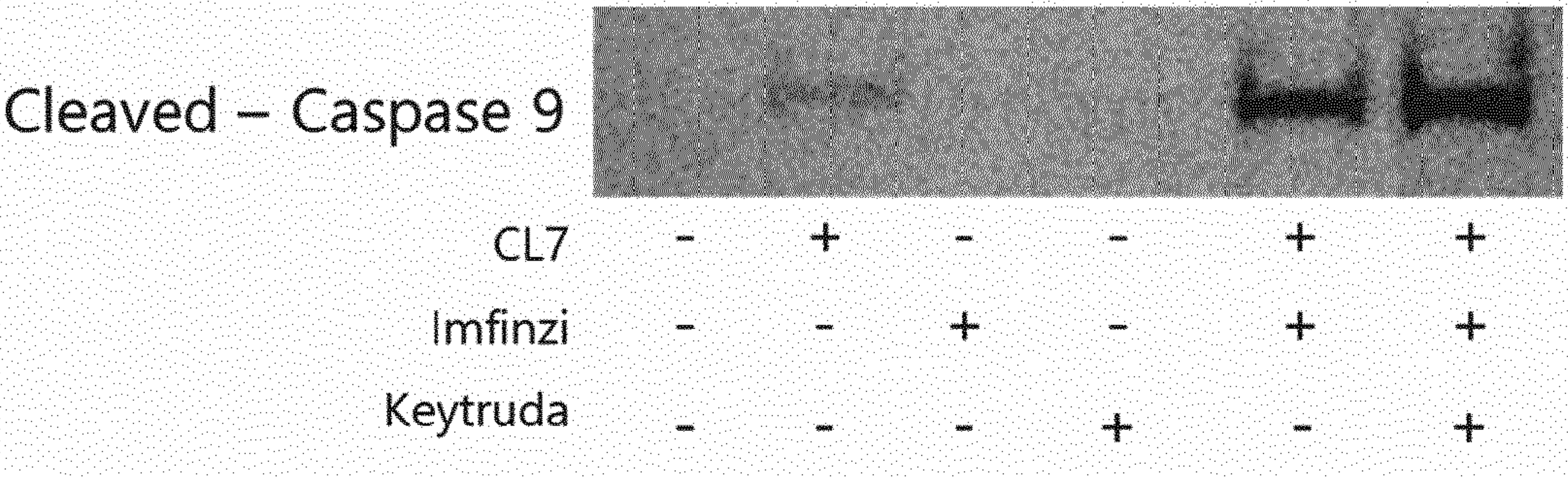
[도30]



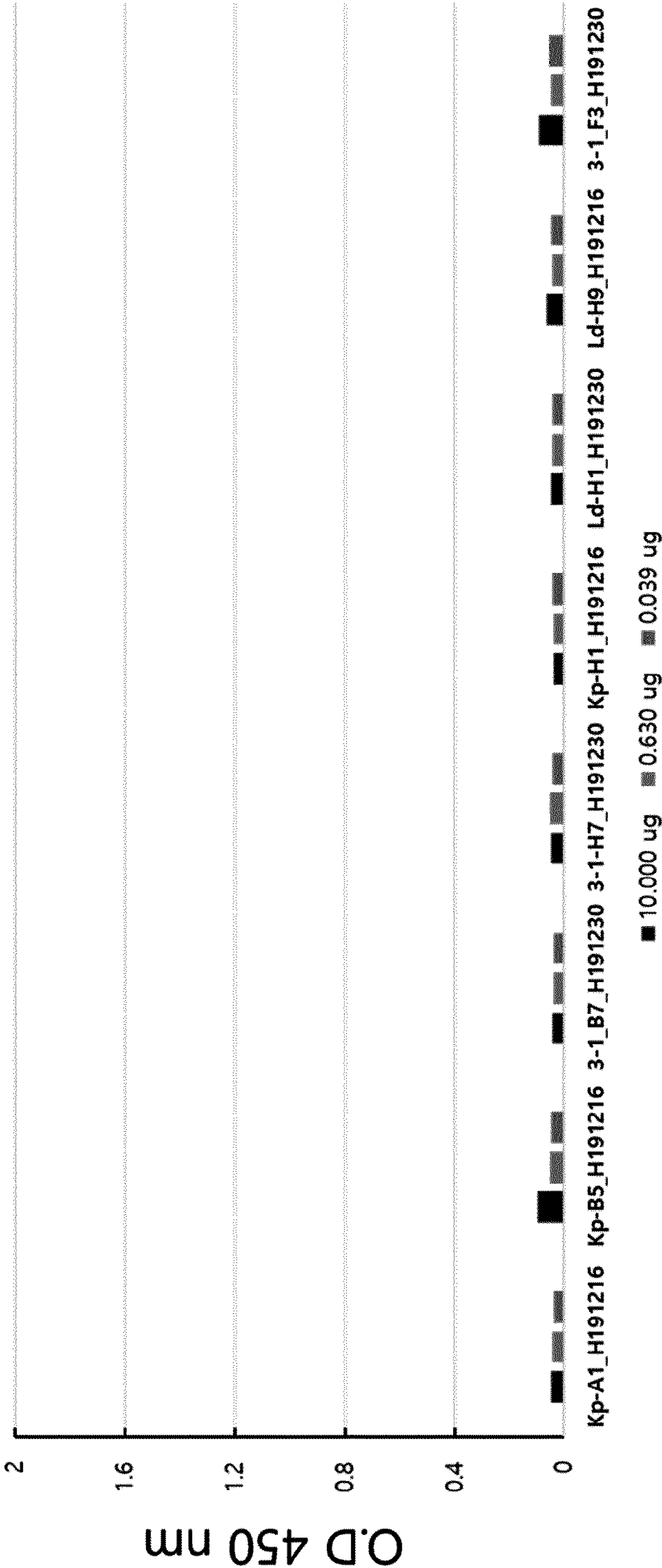
[도31]



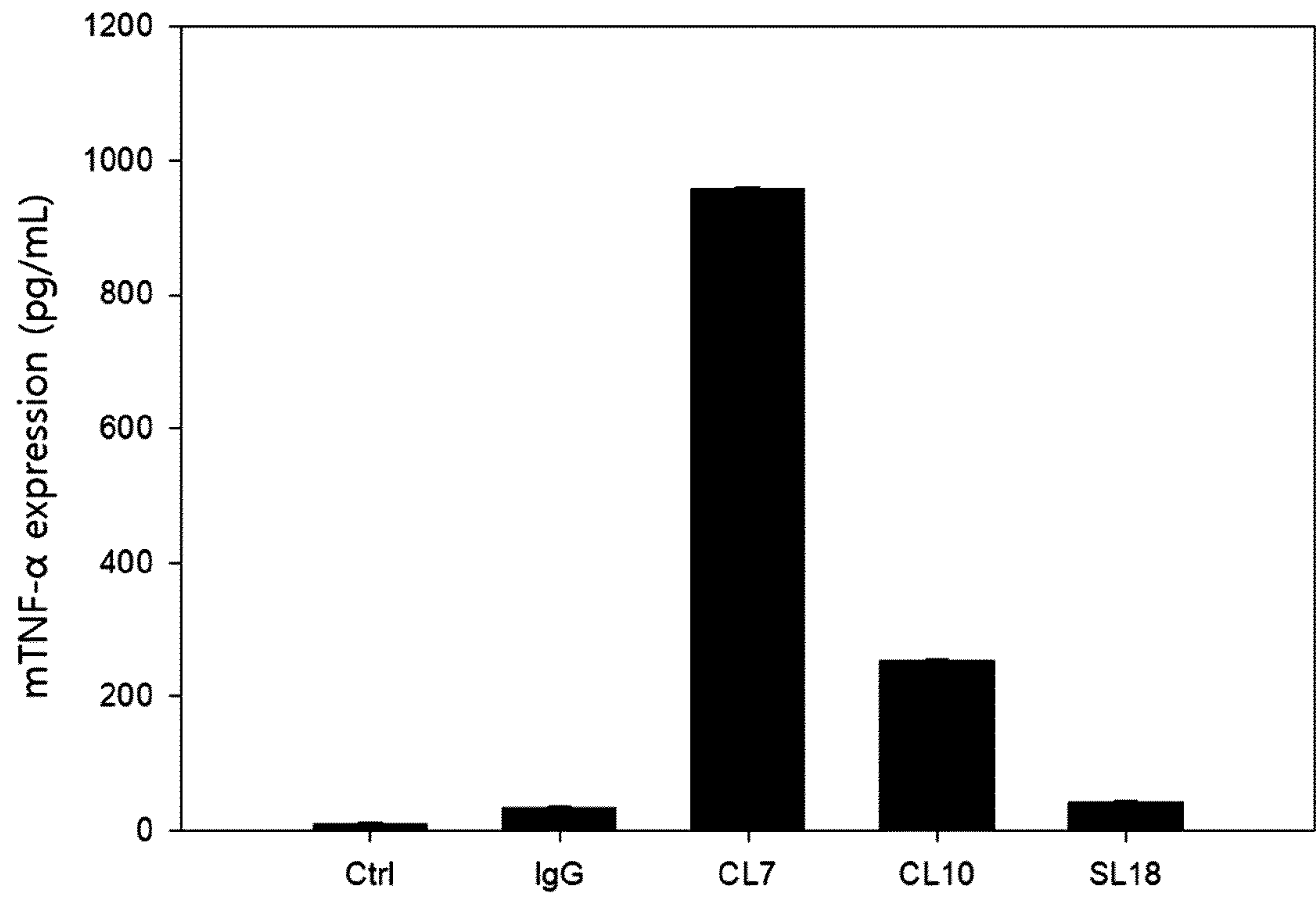
[도32]



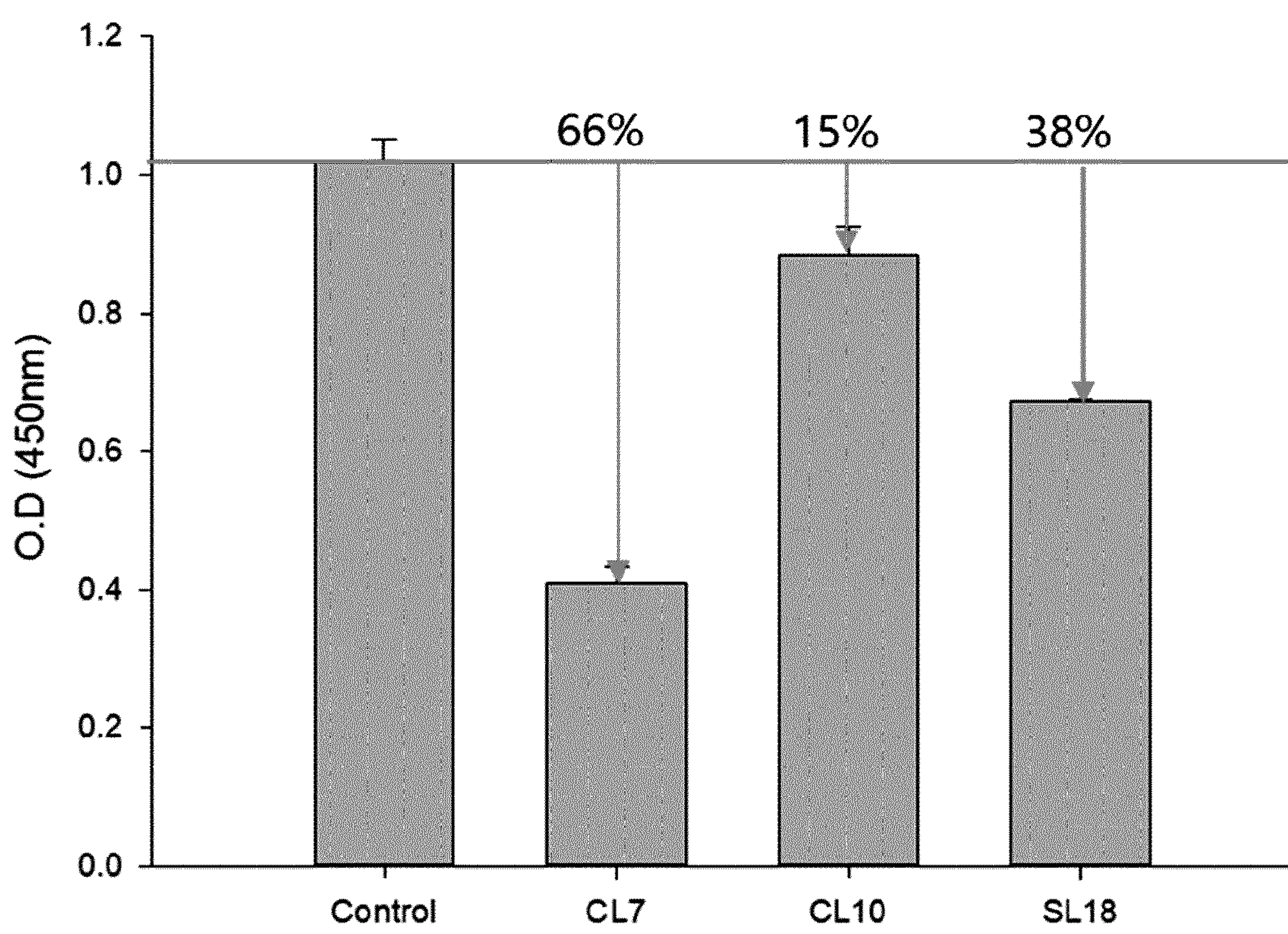
[도33]



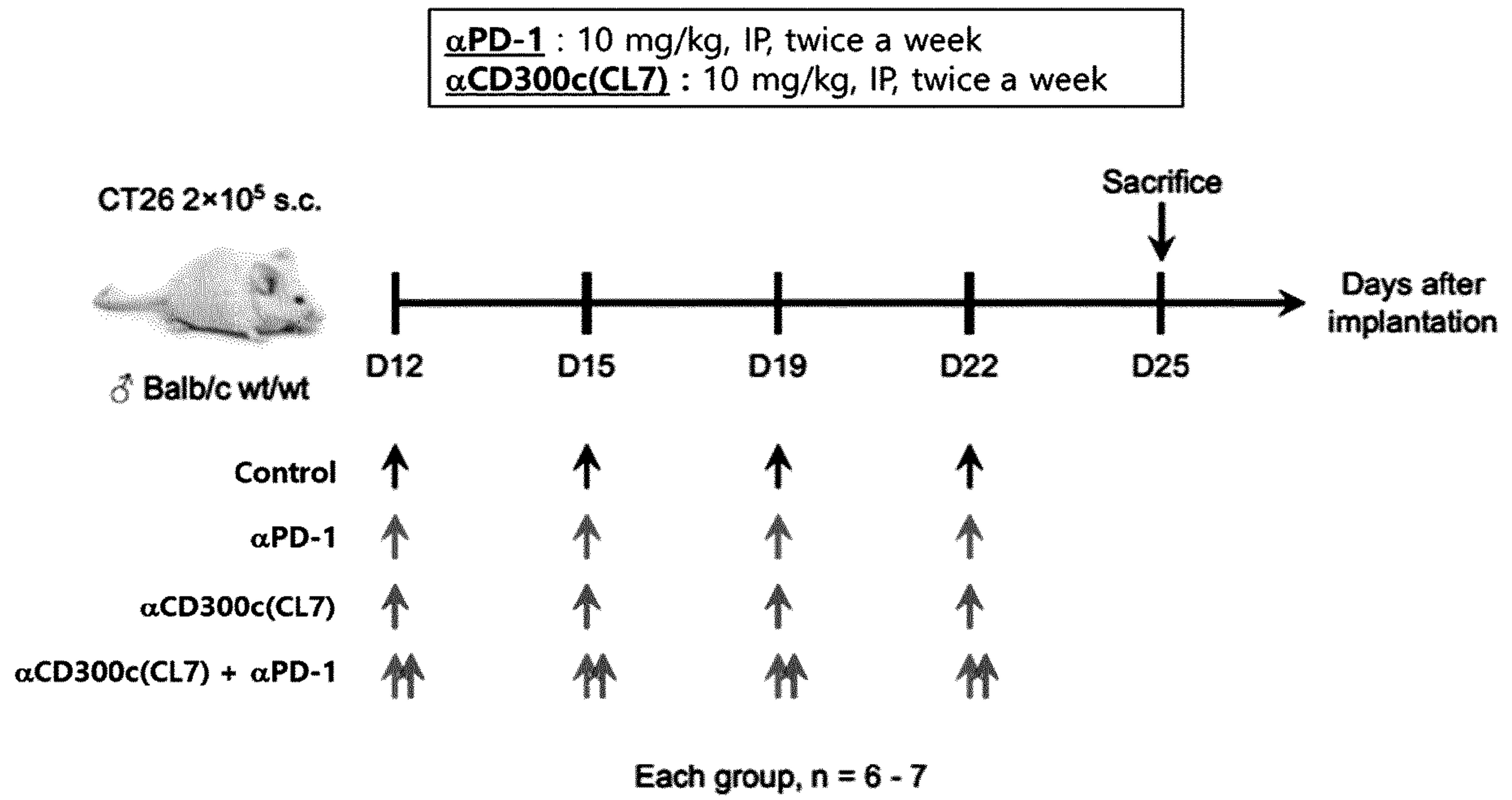
[도34]



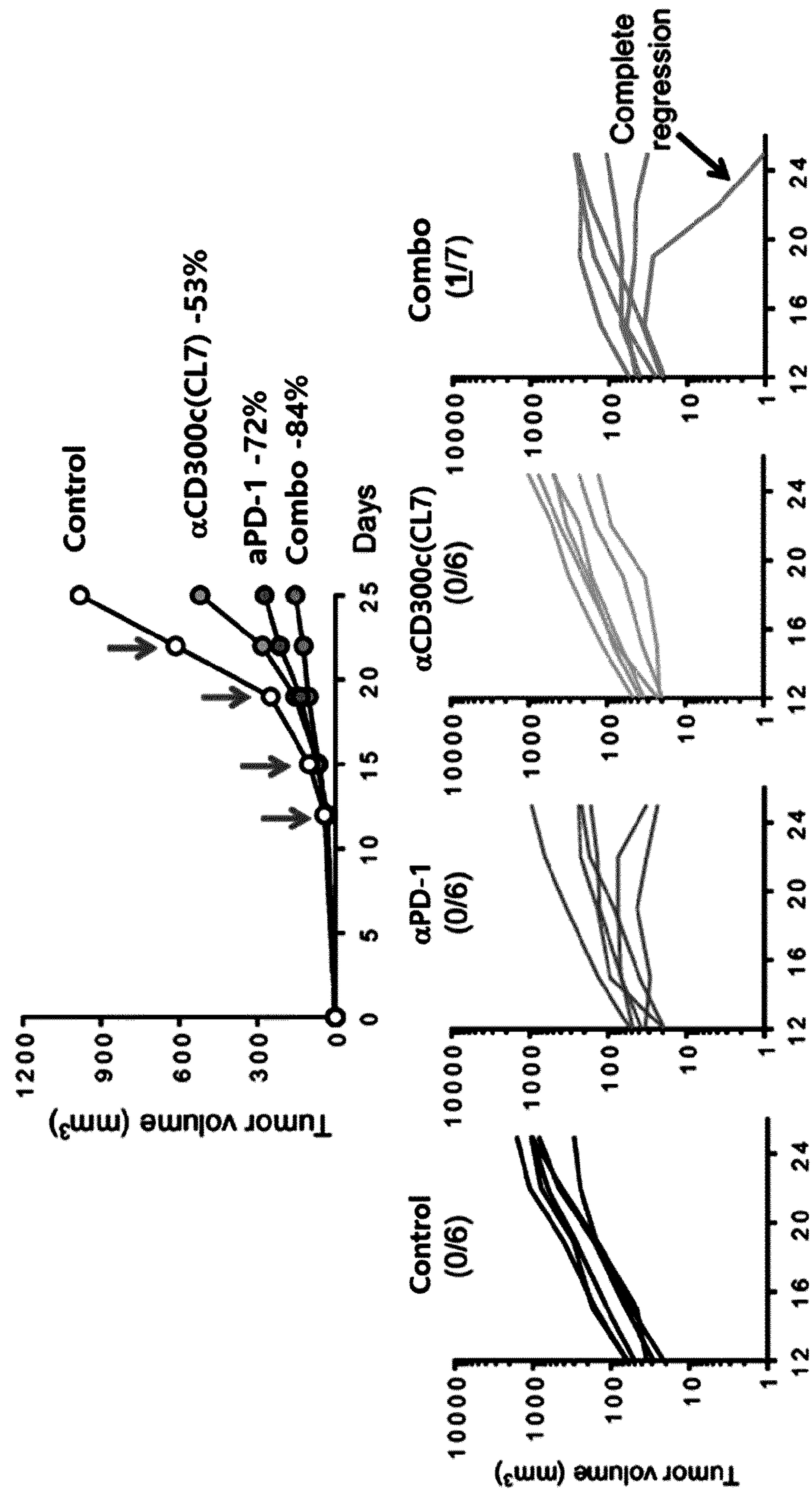
[도35]



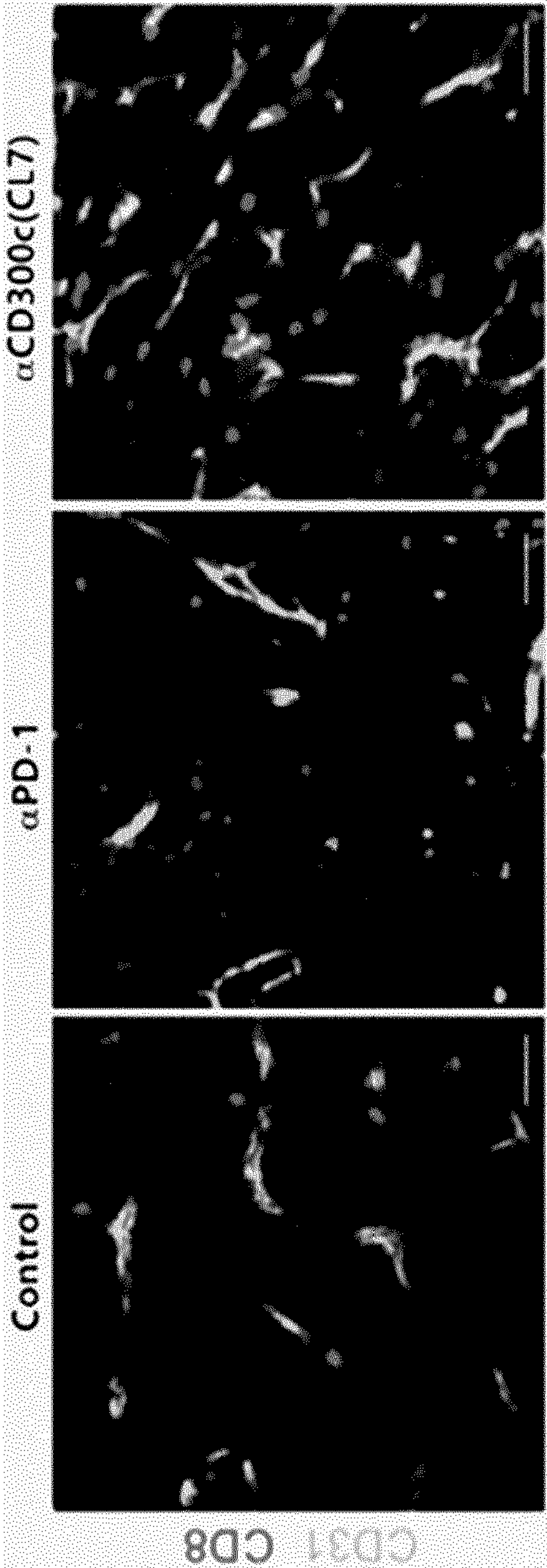
[도36]



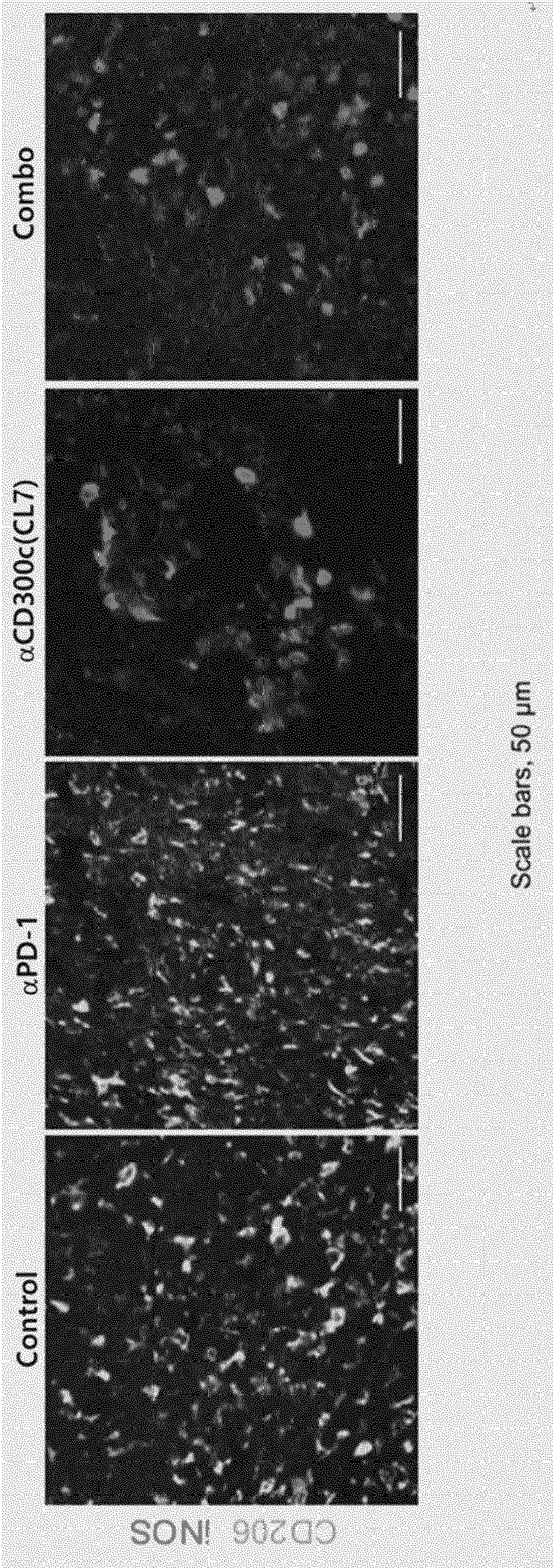
[도37]



[도38]



[도39]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(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)

A61K 39/395(2006.01); A61K 39/00(2006.01); C07K 16/22(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C12N 15/113(2010.01)

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-CD300c 단클론 항체(anti-CD300c monoclonal antibody), 항암(anti cancer), 종 간 교차반응(interspecific cross reaction), M1 마크로파지(M1 macrophage)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CUI, C. et al. A CD300c-Fc Fusion Protein Inhibits T Cell Immunity. Frontiers in Immunology. 2018, vol. 9, Article 2657, inner pp. 1-14. See abstract and inner pages 1, 3 and 11.	1-16,18
A	US 2016-0194631 A1 (HARVARD MEDICAL SCHOOL) 07 July 2016 (2016-07-07) See paragraphs [0096], [0122], [0130], [0184] and [0195] and claim 1.	1-16,18
A	SIMHADRI, V. R. et al. CD300c is an Activating Receptor Expressed on Human Monocytes. Journal of Innate Immunity. 2013, vol. 5, pp. 389-400. See entire document.	1-16,18
A	DIMITROVA, M. et al. CD300c is uniquely expressed on CD56bright Natural Killer Cells and differs from CD300a upon ligand recognition. Scientific Reports. 2016, vol. 6, Article number 23942, inner pp. 1-12. See entire document.	1-16,18
A	WO 2018-094460 A1 (DENDROCYTE BIOTECH PTY LTD) 31 May 2018 (2018-05-31) See entire document.	1-16,18

☒ 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

02 March 2021

Date of mailing of the international search report

02 March 2021

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016264

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2019-0136949 A (CENTRICSBIO, INC.) 10 December 2019 (2019-12-10) See paragraphs [0008]-[0013] and claim 1.	4,6,9,18

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

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.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 17 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/016264

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2016-0194631	A1	07 July 2016	AU	2010-300531	A1	24 May 2012
				AU	2010-300531	A1	07 April 2011
				AU	2016-201939	A1	21 April 2016
				BR	112012007137	A2	15 September 2015
				BR	112012007160	A2	13 March 2018
				CA	2774998	A1	07 April 2011
				CA	2774999	A1	07 April 2011
				CN	102639700	A	15 August 2012
				CN	102869775	A	09 January 2013
				EP	2483406	A2	08 August 2012
				EP	2483407	A2	08 August 2012
				JP	2013-506686	A	28 February 2013
				JP	2013-506687	A	28 February 2013
				JP	2016-040297	A	24 March 2016
				KR	10-2012-0082906	A	24 July 2012
				MX	2012003770	A	03 August 2012
				RU	2012117230	A	10 November 2013
				US	2012-0301463	A1	29 November 2012
				US	2012-0315244	A1	13 December 2012
				US	2014-0004108	A1	02 January 2014
				WO	2011-041582	A2	07 April 2011
				WO	2011-041582	A3	29 September 2011
				WO	2011-041584	A2	07 April 2011
				WO	2011-041584	A3	26 May 2011
WO	2018-094460	A1	31 May 2018	AU	2017-364473	A1	13 June 2019
				AU	2017-364473	A1	31 May 2018
				CA	3044457	A1	31 May 2018
				EP	3545000	A1	02 October 2019
				JP	2019-535753	A	12 December 2019
KR	10-2019-0136949	A	10 December 2019	WO	2019-231188	A1	05 December 2019

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 39/395(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i

B.조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 39/395(2006.01); A61K 39/00(2006.01); C07K 16/22(2006.01); C07K 16/28(2006.01); C12N 15/113(2010.01)

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-CD300c 단클론 항체(anti-CD300c monoclonal antibody), 항암(anti cancer), 중간 교차반응(interspecific cross reaction), M1 마크로파지(M1 macrophage)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CUI, C. 등, A CD300c-Fc Fusion Protein Inhibits T Cell Immunity, Frontiers in Immunology, 2018년, 9권, Article 2657, 내부페이지 1-14 초록 및 내부페이지 1, 3, 11	1-16,18
A	US 2016-0194631 A1 (HARVARD MEDICAL SCHOOL) 2016.07.07 단락 [0096], [0122], [0130], [0184], [0195] 및 청구항 1	1-16,18
A	SIMHADRI, V. R. 등, CD300c is an Activating Receptor Expressed on Human Monocytes, Journal of Innate Immunity, 2013년, 5권, 페이지 389-400 문헌 전체	1-16,18
A	DIMITROVA, M. 등, CD300c is uniquely expressed on CD56bright Natural Killer Cells and differs from CD300a upon ligand recognition, Scientific Reports, 2016년, 6권, Article number 23942, 내부페이지 1-12 문헌 전체	1-16,18
A	WO 2018-094460 A1 (DENDROCYTE BIOTECH PTY LTD) 2018.05.31 문헌 전체	1-16,18

☒ 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

2021년03월02일(02.03.2021)

국제조사보고서 발송일

2021년03월02일(02.03.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2020/016264

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2019-0136949 A (주식회사 센트릭스바이오) 2019.12.10 단락 [0008]-[0013] 및 청구항 1	4,6,9,18

제1기재란 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. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. ☐추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **17**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 17은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0194631 A1	2016/07/07	AU 2010-300531 A1	2012/05/24
		AU 2010-300531 A1	2011/04/07
		AU 2016-201939 A1	2016/04/21
		BR 112012007137 A2	2015/09/15
		BR 112012007160 A2	2018/03/13
		CA 2774998 A1	2011/04/07
		CA 2774999 A1	2011/04/07
		CN 102639700 A	2012/08/15
		CN 102869775 A	2013/01/09
		EP 2483406 A2	2012/08/08
		EP 2483407 A2	2012/08/08
		JP 2013-506686 A	2013/02/28
		JP 2013-506687 A	2013/02/28
		JP 2016-040297 A	2016/03/24
		KR 10-2012-0082906 A	2012/07/24
		MX 2012003770 A	2012/08/03
		RU 2012117230 A	2013/11/10
		US 2012-0301463 A1	2012/11/29
		US 2012-0315244 A1	2012/12/13
		US 2014-0004108 A1	2014/01/02
		WO 2011-041582 A2	2011/04/07
		WO 2011-041582 A3	2011/09/29
		WO 2011-041584 A2	2011/04/07
		WO 2011-041584 A3	2011/05/26
WO 2018-094460 A1	2018/05/31	AU 2017-364473 A1	2019/06/13
		AU 2017-364473 A1	2018/05/31
		CA 3044457 A1	2018/05/31
		EP 3545000 A1	2019/10/02
		JP 2019-535753 A	2019/12/12
KR 10-2019-0136949 A	2019/12/10	WO 2019-231188 A1	2019/12/05