(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월08일
(11) 등록번호 10-2200431
(24) 등록일자 2021년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 27/14* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0063566
(22) 출원일자 2019년05월30일
심사청구일자 2019년09월18일
(65) 공개번호 10-2019-0136987
(43) 공개일자 2019년12월10일
(30) 우선권주장
1020180062068 2018년05월30일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
J Immunol May 1, 2018, 200 (1 Supplement) 109.1;
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
주식회사 지놈앤컴퍼니
경기도 성남시 분당구 판교로 253 ,A동801,806호(삼평동,판교이노밸리)
(72) 발명자
윤경완
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
허윤경
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

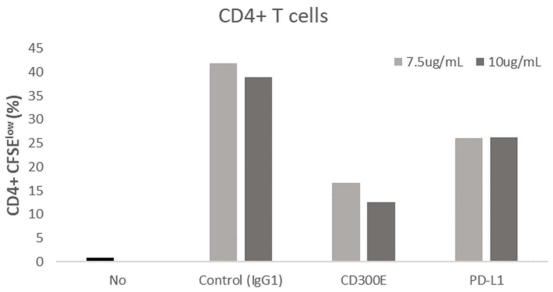
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **CD300E 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CD300E 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CD300E 억제제는 면역세포의 활성을 증가시킬 수 있으므로, 면역증강제로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CD300E 억제제는 개체의 면역력을 증강시켜 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/6811 (2017.08)
A61P 27/14 (2018.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자
전부남
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
손진영
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
김윤연
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
이수노
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
정주연
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)
정아름
경기도 성남시 분당구 판교로 253, A동 801호, 806호(삼평동, 판교이노밸리)

(56) 선행기술조사문헌
J Biol Chem. 2018 Mar 9; 293(10): 3793-3805.
Frontiers in Immunology, 8권, 논문번호:1288, 페이지1-12 (2017. 10. 12.)
Blood, Vol.121(11):1951-1960. (2013).
European Journal of Immunology, Vol.40:722-732. (2010).
EP3211069 A1

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD300E(CD300 Antigen Like Family Member E) 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하며,

상기 CD300E 단백질에 결합하는 물질은 CD300E 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이고,

상기 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질은 CD300E 유전자의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 또는 리보자임인 것인, 면역증강제.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CD300E 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인, 면역증강제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 단편이 모노클로날 항체, scFv, Fab, Fab' 및 F(ab)'으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 면역증강제.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 CD300E 유전자의 DNA가 서열번호 2 또는 서열번호 4의 염기 서열을 갖는 것인, 면역증강제.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 7 내지 18의 염기서열 중 어느 하나인 것인, 면역증강제.

청구항 8

CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하며,

상기 CD300E 단백질에 결합하는 물질은 CD300E 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편이고,

상기 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질은 CD300E 유전자의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 또는 리보자임인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 CD300E 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 단편이 모노클로날 항체, scFv, Fab, Fab' 및 F(ab)'으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 CD300E 유전자의 DNA가 서열번호 2 또는 서열번호 4의 염기 서열을 갖는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 7 내지 18의 염기서열 중 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제8항에 있어서,

상기 암은 방광암, 골암, 혈액암, 유방암, 흑색종양, 갑상선암, 부갑상선암, 골수암, 직장암, 인후암, 후두암, 폐암, 식도암, 췌장암, 대장암, 위암, 설암, 피부암, 뇌종양, 자궁암, 두부 또는 경부암, 담낭암, 구강암, 결장암, 항문 부근암, 중추신경계 종양, 간암 및 대장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CD300E 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] T 세포는 인체의 면역에 중요한 역할을 하는 세포이다. T 세포는 살해 T 세포, 도움 T 세포, 조절 T 세포, 기억 T 세포로 구분된다. 특히, 살해 T 세포는 CD8이 세포 표면에 발현되며, 도움 T 세포는 CD4가 세포 표면에 발현되며, 조절 T 세포의 경우 CD4와 CD25가 세포 표면에 발현된다.

[0003] 외부에서 세균과 같은 항원이 들어왔을 때, 도움 T 세포가 사이토카인과 같은 물질을 분비하여 살해 T 세포와 B 세포를 활성화시킨다. 활성화된 살해 T 세포는 병원체에 감염된 세포들을 죽이게 되며, B 세포는 항체를 분비하여 항원의 활성을 저해한다. 최근, 이와 같은 T 세포의 면역조절 능력을 활성화시켜 암과 같은 질환을 치료하려는 시도가 이루어지고 있다.

[0004] 또한, T 세포 매개성 질병이 다수 면역계 질환들을 대표하는 질병으로 인식되고 있다. 특히 T 세포는 자가면역질환(autoimmune disease)을 발생시키고 영속시키는 것으로 간주되고 있다. 자기(self)항원에 대한 면역 반응은 자가 반응성 T 세포의 지속적인 활성화 또는 정기적인 활성화에 의해 이루어진다. 또한, 자가 반응성 T 세포는 직, 간접적으로 자가면역질환에서 확인되는 특징적인 조직 상해 및 조직 파괴의 원인으로 주목받고 있다.

[0005] 한편, PD-L1(programmed cell death ligand 1)은 PD-1(programmed cell death-1)에 대한 리간드인 1형 막관통

단백질이다. PD-L1은 T 림프구, B 림프구, 수지상 세포, 또는 대식 세포와 같은 조혈 세포에서 발현된다. PD-1은 T 세포의 이차 신호 활성을 조절하는 면역 체크포인트(immune check point) 인자 또는 면역 조절자로서 알려져 있다. 또한, PD-1은 활성화된 T 세포나 수지상 세포와 같이 세포 표면에서 발현하는 PD-L1 등과 결합을 통해, T 세포의 증식을 억제하고, 사이토카인 발현을 감소시키는 등 T 세포의 기능을 억제하는 작용을 할 수 있다고 보고된 바 있다(Krzysztof M. Zak, et al., 2015).

[0006] 최근, PD-1 및 PD-L1과 같이, T 세포의 면역 기능을 조절하는 물질을 이용하여 항암제나 면역 조절제를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Krzysztof M. Zak, et al., 2015. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. Structure 23. pp. 2341-2348.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 면역세포의 활성을 억제하거나 증가시킬 수 있는 물질을 연구하던 중, CD300E 세포 신호체계가 T 세포의 활성을 조절할 수 있다는 점을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 실시예는 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 면역증강제를 제공한다.

[0010] 또한, 실시예는 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 CD300E 억제제는 면역세포의 활성을 증가시킬 수 있으므로, 면역증강제로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 CD300E 억제제는 개체의 면역력을 증강시켜 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 CD300E 단백질에 의해 저해되는 CD4+ T 세포의 증식률(%)을 나타낸 것이다.

도 2는 CD300E 단백질에 의해 저해되는 CD8+ T 세포의 증식률(%)을 나타낸 것이다.

도 3a 내지 도 3d는 폐암세포주 A549와 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)를 CD300E 억제제(항체 또는 siRNA)로 처리하였을 때 그룹별 PBMC의 세포독성(%)을 나타낸 것이다.

도 4a 내지 도 4d는 결장암세포주 HCT-116과 PBMC를 CD300E 억제제(항체 또는 siRNA)로 처리하였을 때 그룹별 PBMC의 세포독성(%)을 나타낸 것이다.

도 5a 내지 도 5d는 유방암세포주 MDA-MB-231과 PBMC를 CD300E 억제제(항체 또는 siRNA)로 처리하였을 때 그룹별 PBMC의 세포독성(%)을 나타낸 것이다.

도 6a 내지 도 6d는 위암세포주 MKN-74와 PBMC를 CD300E 억제제(항체 또는 siRNA)로 처리하였을 때 그룹별 PBMC의 세포독성(%)을 나타낸 것이다.

도 7a 내지 도 7d는 혈액암세포주 U937과 PBMC를 CD300E 억제제(항체 또는 siRNA)로 처리하였을 때 그룹별 PBMC의 세포독성(%)을 나타낸 것이다.

도 8a 내지 도 8d는 CD300E 억제제(3가지 타입의 siRNA)로 처리한 마우스에서 종양 크기의 변화를 그룹별로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 실시예는 CD300E(CD300 Antigen Like Family Member E) 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 면역증강제를 제공한다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 용어, "CD300E"는 "CD300 Antigen Like Family Member E"의 약자로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질일 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.

[0015] 구체적으로, 상기 서열번호 1로 표시되는 205개의 아미노산 서열은, 1번 내지 173번 위치의 아미노산(서열번호 3)으로 구성되는 세포외도메인(extracellular domain), 174번 내지 194번 위치의 아미노산으로 구성되는 막관통영역(transmembrane domain) 및 195번 내지 205번 위치의 아미노산으로 구성되는 세포내영역(intracellular domain)으로 구성될 수 있다. 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 CD300E 세포외도메인은 서열번호 4의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에서 CD300E는 human IgG constant Kappa tag이 결합된 형태일 수 있다. 분리, 정제를 위해 상기 human IgG constant Kappa tag가 결합된 CD300E는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 5의 융합단백질은 CD300E의 세포외도메인(1번 내지 173번)과 human IgG constant Kappa tag(179번 내지 285번)이 결합된 단백질일 수 있다.

[0017] 본 발명에서, CD300E 단백질에 결합하는 물질은 CD300E 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 앱타머(aptamer), 펩타이드 또는 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 상기 항체 또는 이의 단편은 모노클로날 항체, scFv, Fab, Fab' 및 F(ab)'으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0018] 본 발명에서, CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질은 CD300E 유전자의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 또는 리보자임일 수 있다. 상기 CD300E siRNA는 서열번호 7 내지 18의 염기서열 중 어느 하나일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는, CD300E를 타겟하여 활성을 억제하는 항-CD300E 항체 또는 CD300E siRNA가 PBMC(peripheral blood mononuclear cell)의 암세포에 대한 세포독성을 증가시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, CD300E 억제제를 처리한 PBMC 및 암세포주의 혼합물에서 암세포주에 대한 PBMC의 세포독성이 대조군에 비해 높게 나타났다. 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는, CD300E의 활성을 억제하는 CD300E siRNA가 마우스 종양의 성장을 억제시키는지를 확인하였다. 그 결과, CD300E siRNA가 처리되어 CD300E가 넉다운된 마우스의 종양은 대조군에 비해 성장속도가 현저하게 억제되었다. 상기 결과를 통해, CD300E를 타겟하여 활성을 억제하는 항-CD300E 항체 또는 CD300E siRNA는 CD300E를 블로킹 또는 넉다운시켜 그 활성 또는 발현을 억제함으로써 암의 발달을 지연 또는 중지시키는 것을 알 수 있다.

[0020] 또한, 실시예는 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질은 전술한 바와 같다. 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, 암은 방광암, 골암, 혈액암, 유방암, 흑색종양, 갑상선암, 부갑상선암, 골수암, 직장암, 인후암, 후두암, 폐암, 식도암, 췌장암, 대장암, 위암, 설암, 피부암, 뇌종양, 자궁암, 두부 또는 경부암, 담낭암, 구강암, 결장암, 항문 부근암, 중추신경계 종양, 간암 및 대장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에 따른 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 ug/kg ~ 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg ~ 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다.

[0024] 또한, 실시예는 CD300E 단백질에 결합하는 물질 또는 CD300E 유전자의 발현을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0025] 상기 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 피하, 복강내, 소동맥내, 심실내, 병변내, 척추강내, 국소 및 이들의

조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0027] **제조예 1. 버퍼 제조**

[0028] 실시예에서 사용되는 버퍼를 다음과 같이 제조하였다:

[0029] 1X PBS(Thermo Fisher gibco #10010)는 155 mM의 염화나트륨, 2.96 mM의 인산나트륨 용액, 및 1.05 mM의 pH 7.4 인산칼륨 용액을 혼합하여 제조하였다.

[0030] FACS 버퍼는 1X PBS(Thermo Fisher gibco #10010), 10 ml의 2% FBS(Thermo fisher gibco #16000-044), 및 1 mM의 1 ml EDTA(Fisher 15575020)를 혼합하여 제조하였다.

[0031] 1X RBC lysis 버퍼는 10X RBC solution(Biolegend #420301)을 3차 증류수에 1/10으로 희석하여 제조하였다.

[0032] 10% FBS RPMI1640은 RPMI medium(Cellgrow #10-040-CVR), 50 ml의 10% FBS(Thermo fisher gibco #16000-044), 5 ml의 1% antibiotics(Thermo fisher gibco #15140-122), 및 0.5 ml의 2-mercaptoethanol(Thermo fisher gibco #21985-023)을 혼합하여 제조하였다.

[0033] MACS 버퍼는 1X PBS(Thermo Fisher gibco #10010), 0.5% BSA(bovine serum albumin)(Milipore #82-100-6), 2 mM의 2 ml EDTA(Fisher 15575020)를 혼합하여 제조하였다.

[0034] **실시예 1. CD300E 단백질의 T세포 증식 및 활성 억제 효과 확인**

[0035] 본 실시예에서는 CD300E 단백질이 T 세포의 증식 및 활성을 저해하여 암세포로 하여금 T 세포 매개 면역시스템을 회피하도록 하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0036] **실시예 1.1. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 준비**

[0037] 인간 혈액을 채취하여 EDTA(또는 헤파린)로 코팅된 10 mL 튜브에 넣고 1:1의 비율로 PBS와 혼합하였다. 그리고 나서, 50 mL 튜브에 Ficoll-Paque PLUS를 넣고, 상기 혈액 시료를 첨가하였다. 원심분리한 후, 인간 PBMC를 수거하였다. 수거된 결과물을 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이어서, RBC lysis(1x) 버퍼를 첨가하고, 파이펫팅한 후 아이스에서 3분 동안 보관하였다. 이어서, 10% FBS RPMI1640 50 ml를 첨가하고, 혼합물을 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그리고 나서, FACS 버퍼를 첨가하고 상층액을 원심분리에 의해 제거하였다. 그 후, 50 ml의 MACS 버퍼(0.5% BSA 및 2mM EDTA 포함 PBS)를 첨가하고, 세포 수를 카운팅하고 원심분리에 의해 상층액을 제거하였다.

[0038] CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 1 x 10^7 세포 수 기준 40 μl MACS 버퍼를 이용하여 재현탁시키고, 항 CD4 및 항 CD8 바이오틴 항체를 튜브에 각각 10 μl 넣은 후 5분 동안 냉장고에 보관하였다. 그 후, 1 x 10^7 세포 수 기준 MACS 버퍼 30 μl를 상기 생성물에 첨가하고, 항-바이오틴 마이크로비드 20 μl를 첨가하여 혼합하였다. 이어서, LS 컬럼을 이용하여 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 분리하고 세포 수를 카운팅하였다.

[0039] 준비된 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 2 x 10^6 세포 수 기준 CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester) 1 μl와 혼합하고, 37℃에서 3분 동안 보관하였다. 그리고 나서, CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 각각 함유하고 있는 튜브에 FBS를 첨가하고, 10분 동안 아이스에서 보관하였다. 그 후, 원심분리에 의해 상층액을 제거하였다. 생성물에 FACS 버퍼 30 ml를 첨가한 후 파이펫팅하고, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그리고 나서, 10% FBS RPMI1640을 첨가한 후 파이펫팅하고, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 생성물을 10% FBS RPMI1640 10 ml와 혼합한 후, 세포 수를 카운팅하였다.

[0040] **실시예 1.2. CD300E 단백질에 의한 T세포의 활성 저해 확인**

[0041] 재조합 인간 IgG1 단백질(Cat. No. 110-HG) 및 재조합 인간 PD-L1/B7-H1 단백질(Cat. No. 156-B7)을 R&D systems에서 구입하였다. 재조합 인간 CD300E 단백질 (human CD300E with human IgG constant Kappa tag)은 하기와 같은 방법으로 생산하였다. 구체적으로, pCEP4(Invitrogen) 플라스미드 DNA를 벡터로 사용하여 MCS(multiple cloning site) 영역에 서열번호 6으로 표시되는 폴리뉴클레오티드를 클로닝하였다. 제작된 DNA 컨스트럭트를 HEK(human embryonic kidney) 293F 세포에 형질감염시키고 Kappa select 레진을 이용하여 배양 배지 내에 포함된 재조합 인간 CD300E 단백질(human CD300E with human IgG constant Kappa tag)을 정제하고 수

득하였다.

[0042] 상기 각 단백질 7.5 μg/ml 또는 10 μg/ml를 anti-CD3 항체(BioLegend, Cat. No. 317325) 2.5 μg/ml와 각각 혼합하였다. 생성된 혼합물로 96-웰 플레이트를 4℃에서 코팅하고 PBS로 3회 세척하였다. 상기 실시예 1.1에서 준비한 CD4+ T 세포를 96-웰 플레이트의 웰마다 200 μl씩 2 x 10^6개 첨가하고 인큐베이션하였다. anti-CD3 항체를 이용하여 CD4+ T 세포를 72시간 동안 활성화시켰다.

[0043] 또한, 상기 각 단백질 5 μg/ml 또는 7.5 μg/ml 를 anti-CD3 항체(BioLegend, Cat. No. 317325) 2.5 μg/ml와 각각 혼합하였다. 생성된 혼합물로 96-웰 플레이트를 4℃에서 코팅하고 PBS로 3회 세척하였다. 상기 실시예 1.1에서 준비한 CD8+ T 세포를 96-웰 플레이트의 웰마다 200 μl씩 2 x 10^6개 첨가하고 인큐베이션하였다. anti-CD3 항체를 이용하여 CD8+ T 세포를 72시간 동안 활성화시켰다.

[0044] 이때, 상기 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 증식은 CFSE 염색의 정도로 확인할 수 있었고, 이는 FACSDiVa 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 플로우 사이토메트리에 의해 분석하였다. 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0045] 도 1 및 도 2는 플로우 사이토메트리로 측정한 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 증식율(%)을 각각 막대그래프로 표현한 것이다. 도 1 및 도 2에서 나타난 바와 같이, PD-L1로 처리한 대조군은 IgG1로 처리한 대조군에 비해 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 증식이 모두 억제되었다.

[0046] 또한, CD300E로 처리한 군은 IgG1로 처리한 대조군에 비해 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 증식이 현저하게 억제되었으며, PD-L1로 처리한 대조군과 대비하여도 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 증식이 억제되었다. 이를 통해, CD300E를 블로킹하거나 넉다운시켜 중화시키면, CD300E의 T 세포 증식 억제능을 저하시킴으로써 효율적인 암 치료가 가능해짐을 알 수 있다.

[0047] **실시예 2. PBMC 세포독성 어세이**

[0048] 본 실시예에서는 CD300E를 CD300E 억제제를 이용하여 중화시켰을 때, PBMC의 암세포에 대한 세포독성(살상능)을 증가시킬 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0049] **실시예 2.1. PBMC 준비**

[0050] 인간 혈액을 채취하여 EDTA(또는 헤파린)로 코팅된 10 mL 튜브에 넣고 1:1의 비율로 PBS와 혼합하였다. 그리고 나서, 50 mL 튜브에 Ficoll-Paque PLUS를 넣고, 상기 혈액 시료를 첨가하였다. 원심분리한 후, 인간 PBMC를 수거하였다.

[0051] 96-웰 플레이트를 4℃에서 anti-CD3 항체(BioLegend, Cat. No. 317325) 1.0 μg/ml로 코팅하였다. 96-웰 플레이트의 웰은 PBMC를 첨가하기 전에 PBS로 3회 세척하였다. 앞서 수득한 PBMC를 10% FBS RPMI1640과 혼합하고, 96-웰 플레이트의 각 웰마다 6 x 10^5 개를 100 μl씩 첨가하였다. PBMC는 72시간 동안 anti-CD3 항체에 의해 활성화시켰다.

[0052] **실시예 2.2. 암세포 준비**

[0053] 폐암세포주 A549(ATCC®CCL-185), 결장암세포주 HCT-116(ATCC®CCL-247), 유방암세포주 MDA-MB-231(ATCC®HTB-26), 위암세포주 MKN-74(KCLB No.80104), 및 백혈병세포주 U937(ATCC®CRL-1593.2)을 각각 5 μM의 CFSE와 혼합하고, 37℃에서 5분 동안 보관하였다. 그 후, 각각의 세포주를 함유한 튜브에 FBS를 첨가하고, 10분 동안 아이스에서 보관하였다. 이어서, 상층액을 원심분리에 의해 제거하였다. 이에 따라 수득된 생성물에 FACS 버퍼 30 ml를 첨가한 후 파이펫팅하고, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그리고 나서, 10% FBS RPMI1640을 첨가한 후 파이펫팅하고, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이에 따라 수득된 생성물을 10% FBS RPMI1640 10 ml와 혼합한 후, 세포 수를 카운팅하였다.

[0054] 상기 암세포를 상기 실시예 2.1에서 준비한 96-웰 플레이트의 PBMC 함유 웰마다 3 x 10^4개/100 μl 첨가하고 인큐베이션하였다.

[0055] **실시예 2.3. 암세포주에 대한 PBMC의 세포독성 측정**

[0056] 상기 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 μg/mL의 anti-human CD300E 항체 또는 50 nM의 CD300E siRNA를 첨가하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. CD300E를 블로킹하기 위해 4종의 중화 항체를 사용한 실험군과 무처리 대조군은

하기 표 1에 나타내었으며, CD300E를 넉다운하기 위해 3종의 siRNA를 사용한 실험군과 무처리 대조군은 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

[0057]

	인간 CD300E 중화 항체
Control group	무처리
Group 1	anti-human CD300E 항체 (Lsbio 사, LS-C159307)
Group 2	anti-human CD300E 항체 (GeneTex 사, GTX34214)
Group 3	anti-human CD300E 항체 (R&D 사, MAB2705)
Group 4	anti-human CD300E 항체 (R&D 사, AF2705)

표 2

[0058]

	인간 CD300E siRNA
Control group	무처리
Group 5	Sense (5'-CA GCA UAG GAA GAA CUC UA-3') (서열번호 7) Antisense (5'-UA GAG UUC UUC CUA UGC UG-3') (서열번호 8)
Group 6	Sense (5'-GA GAA GUC AAG AGC CAU GA-3') (서열번호 9) Antisense (5'-UC AUG GCU CUU GAC UUC UC-3') (서열번호 10)
Group 7	Sense (5'-UG ACA GUG UGG UGU CAG UA-3') (서열번호 11) Antisense (5'-UA CUG ACA CCA CAC UGU CA-3') (서열번호 12)

[0059] PBMC 및 암세포주의 혼합물과 항체 또는 siRNA를 함께 인큐베이션하고, 24시간 후에 용균된 세포를 확인하기 위하여 7-아미노액티노마이신 D(7-AAD; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)로 세포를 염색하였다. FACSDiVa 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 CFSE 및 7-AAD에 대한 염색을 측정함으로써 암 세포주에 대한 PBMC의 암세포 용해능을 확인하였다. 그 결과를 도 3a 내지 도 7d에 나타내었다. 구체적으로, 폐암세포주 A549에 대해 CD300E 중화 항체 또는 siRNA로 처리하였을 때의 실험결과를 도 3a 내지 도 3d에 나타내었다. 결장암세포주 HCT-116에 대해 CD300E 중화 항체 또는 siRNA로 처리하였을 때의 실험결과를 도 4a 내지 도 4d에 나타내었다. 유방암세포주 MDA-MB-231에 대해 CD300E 중화 항체 또는 siRNA로 처리하였을 때의 실험결과를 도 5a 내지 도 5d에 나타내었다. 위암세포주 MKN-74에 대해 CD300E 중화 항체 또는 siRNA로 처리하였을 때의 실험결과를 도 6a 내지 도 6d에 나타내었다. 백혈병세포주 U937에 대해 CD300E 중화 항체 또는 siRNA로 처리하였을 때의 실험결과를 도 7a 내지 도 7d에 나타내었다.

[0060] 도 3a 내지 도 3d에 나타난 바와 같이, 폐암세포주 A549와 PBMC를 CD300E 중화 항체로 처리하였을 때, 항체의 종류에 따라 정도의 차이는 있으나 무처리 대조군에 비해 폐암세포 살상능이 유의적으로 증가하였다. 또한, 폐암세포주를 CD300E siRNA로 처리한 경우에도 폐암세포 살상능이 유의적으로 증가하였다.

[0061] 상기 폐암세포주에 대한 PBMC의 살상능이 증가하는 결과와 마찬가지로, CD300E 중화 항체 또는 siRNA를 이용하여 CD300E를 중화시켰을 때, 결장암세포주, 유방암세포주, 위암세포주 및 백혈병세포주에서도 PBMC의 살상능이 증가함을 확인하였다(도 4a 내지 도 7d).

[0062] **실시예 3. 종양 마우스 모델 실험**

[0063] 본 실시예에서는 CD300E를 CD300E 억제제를 이용하여 중화시켰을 때 마우스 종양의 성장이 억제되는지 여부를 *in vivo* 에서 확인하고자 하였다.

[0064] C57BL/6 결장 선암종 세포에서 유래된 MC38 세포주를 50 μl PBS 중에 2.0 x 10^5 세포수 농도로 재현탁시키고, 6주령 암컷 C57BL/6 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. CD300E를 넉다운시키기 위해 siRNA를 사용한 실험군과 무처리 대조군을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0065]

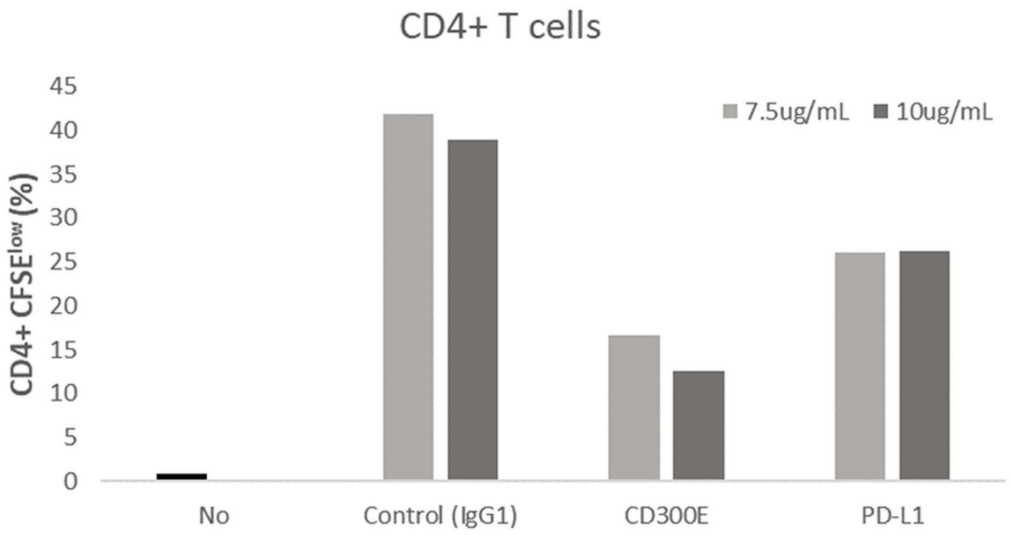
	마우스 CD300E siRNA
대조군	무처리

Group 8	Sense (5'-GU GUC AAU AUA GUC CAU CA-3') (서열번호 13) Antisense (5'-UG AUG GAC UAU AUU GAC AC-3') (서열번호 14)
Group 9	Sense (5'-GA GGA UUG UUC CAC CAU CA-3') (서열번호 15) Antisense (5'-UG AUG GUG GAA CAA UCC UC-3') (서열번호 16)
Group 10	Sense (5'-AC GUG AUC CAU CGG UCA GU-3') (서열번호 17) Antisense (5'-AC UGA CCG AUG GAU CAC GU-3') (서열번호 18)

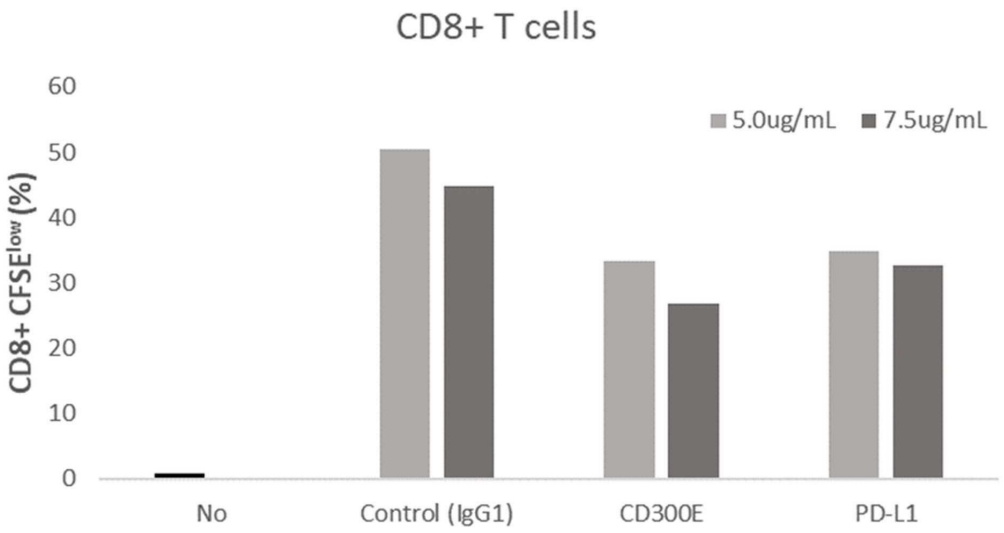
[0066] 모든 실험군은 MC38 세포주를 주사한지 11일째 되는 날부터 마우스 CD300E를 타겟하는 각각의 siRNA를 5일 간격으로 총 3회 마우스의 종양에 주사하였다. 구체적으로, siRNA 10 μg을 PBS 중 올리고펙타민(Invitrogen사) 7.5 μl 와 제조사 지시에 따라 혼합한 후, 마우스에 유도한 종양 조직에 직접 0.5 mg/kg의 투여량으로 주사하였다. 무처리 대조군과 CD300E가 넉다운된 실험군에서 마우스의 종양 크기를 측정한 결과를 도 8a 내지 도 8d에 나타내었다. 도 8a 내지 도 8d에 나타난 바와 같이, 무처리 대조군은 마우스에서 종양이 생성된 이후 지속적으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, CD300E가 넉다운된 마우스의 종양은 무처리 대조군에 비해 그 성장속도가 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 이는 CD300E를 블로킹 또는 넉다운시켜 그 활성 또는 발현을 억제할 경우 암의 발달이 지연 또는 중지되고 암의 발생이 억제됨을 보여 준다. 따라서, CD300E 억제제는 암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

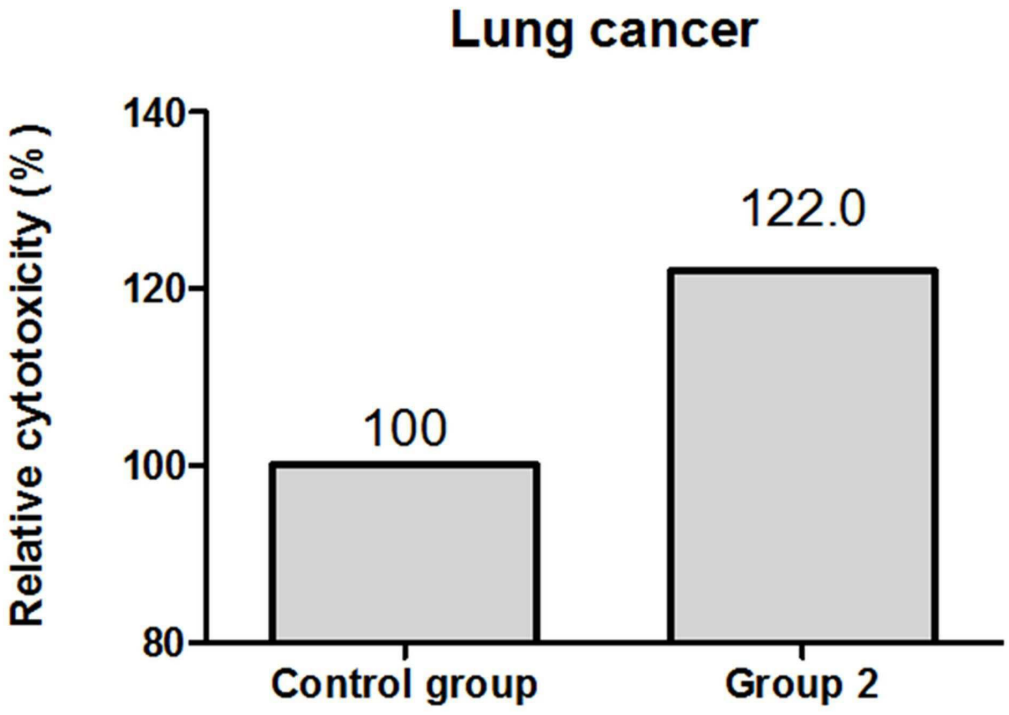
도면1



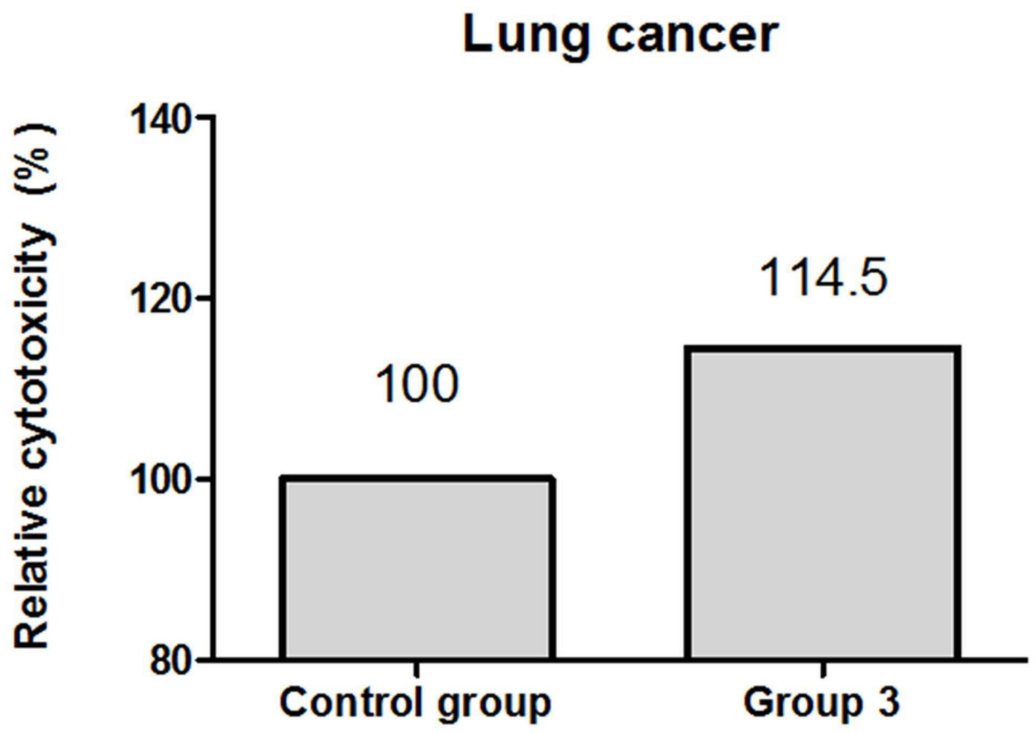
도면2


CD8+ T cells
5.0ug/mL
7.5ug/mL
CD8+ CFSE^low (%)
60
50
40
30
20
10
0
No
Control (IgG1)
CD300E
PD-L1

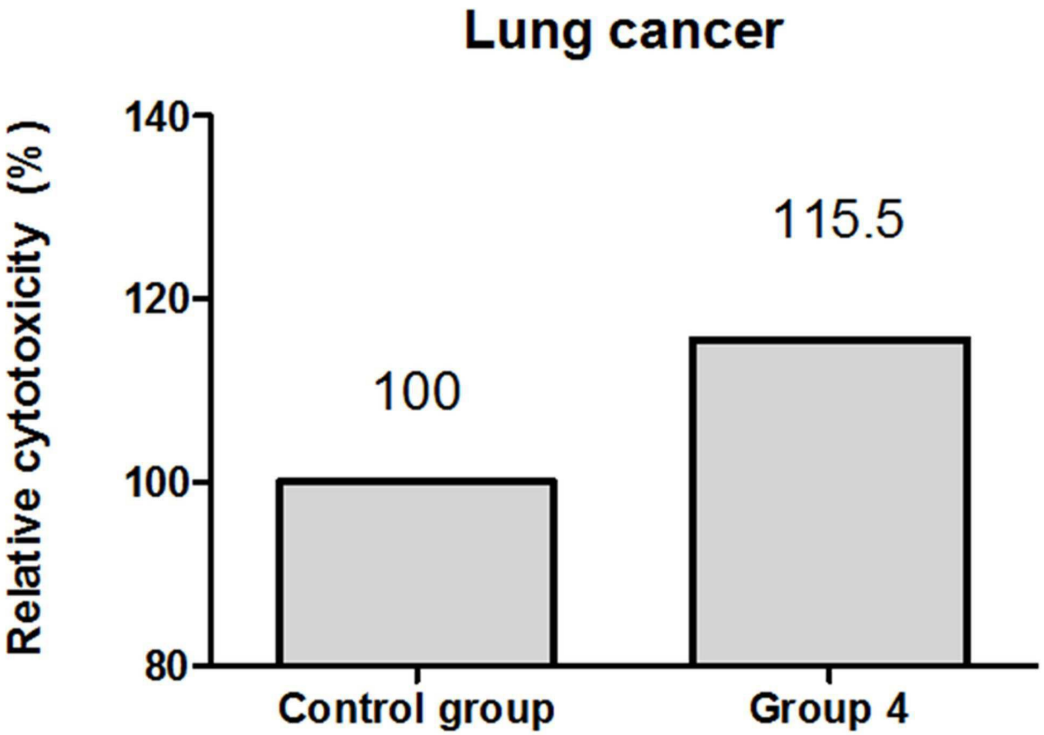
도면3a


Lung cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
122.0
100
Control group
Group 2

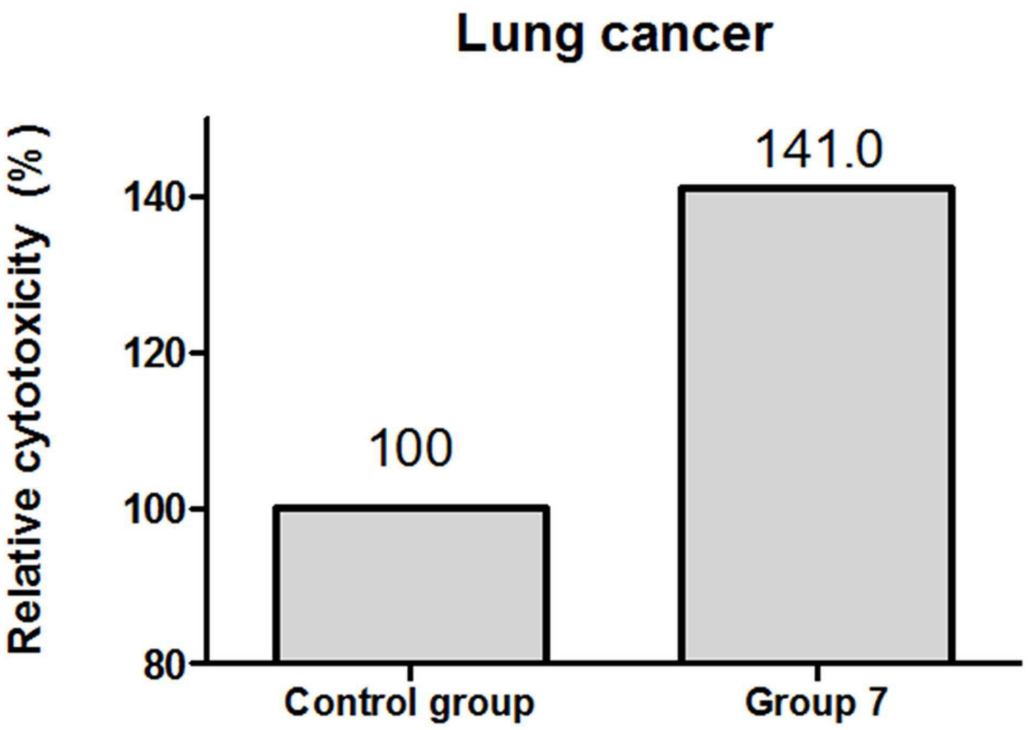
도면3b


Lung cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
100
114.5
Control group
Group 3

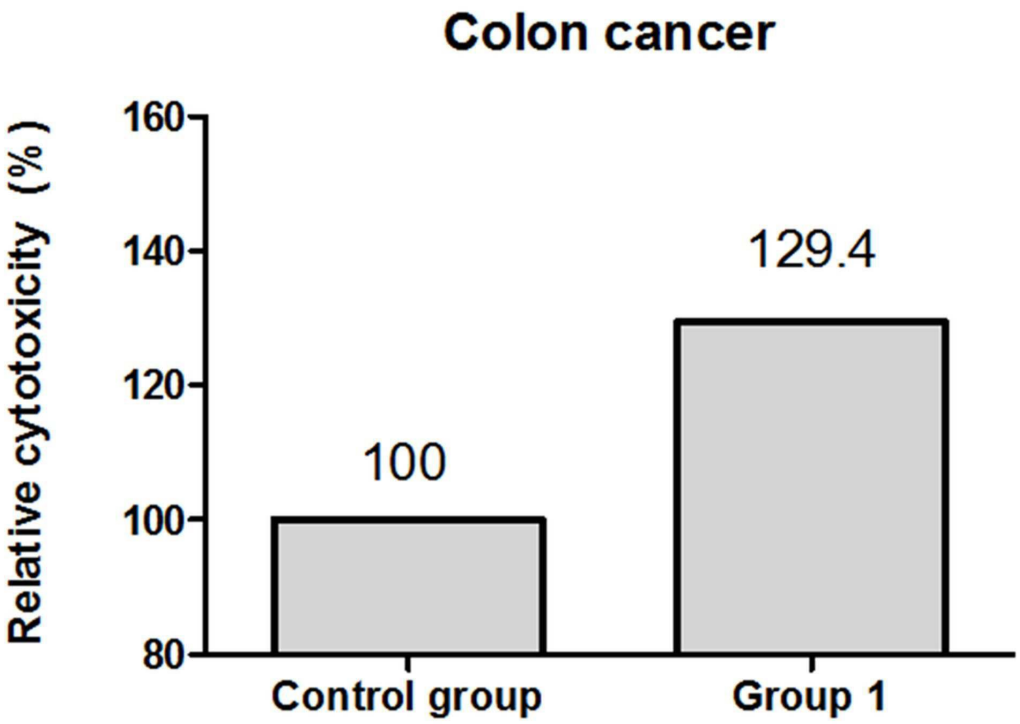
도면3c


Lung cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
100
115.5
Control group
Group 4

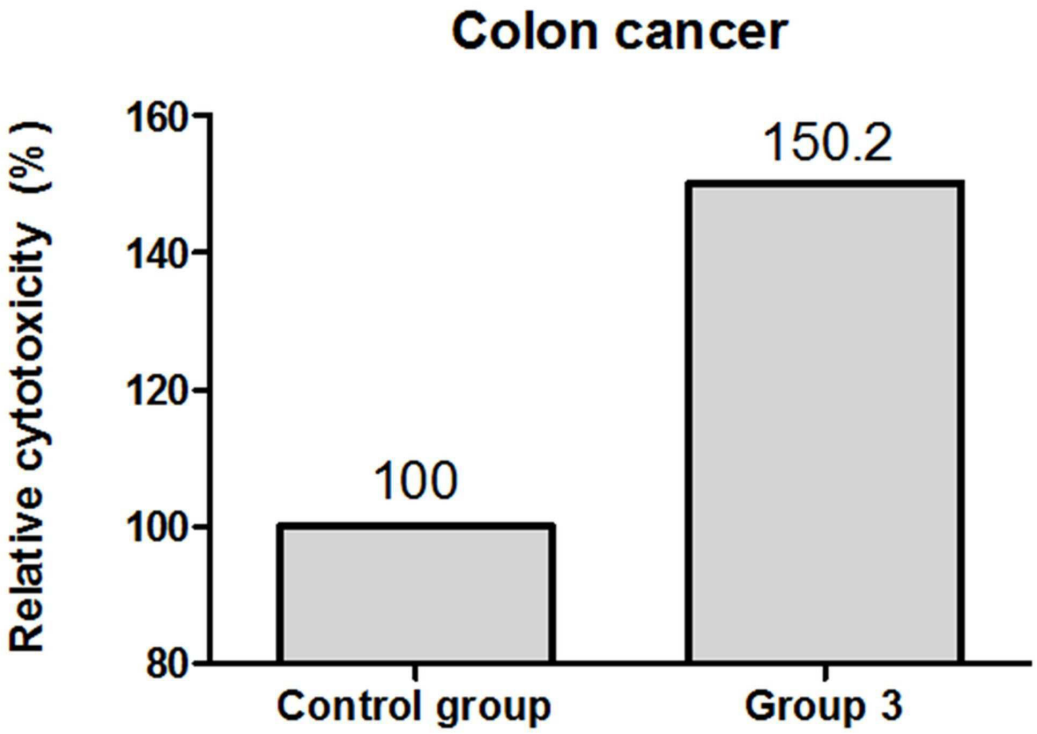
도면3d


Lung cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
141.0
100
Control group
Group 7

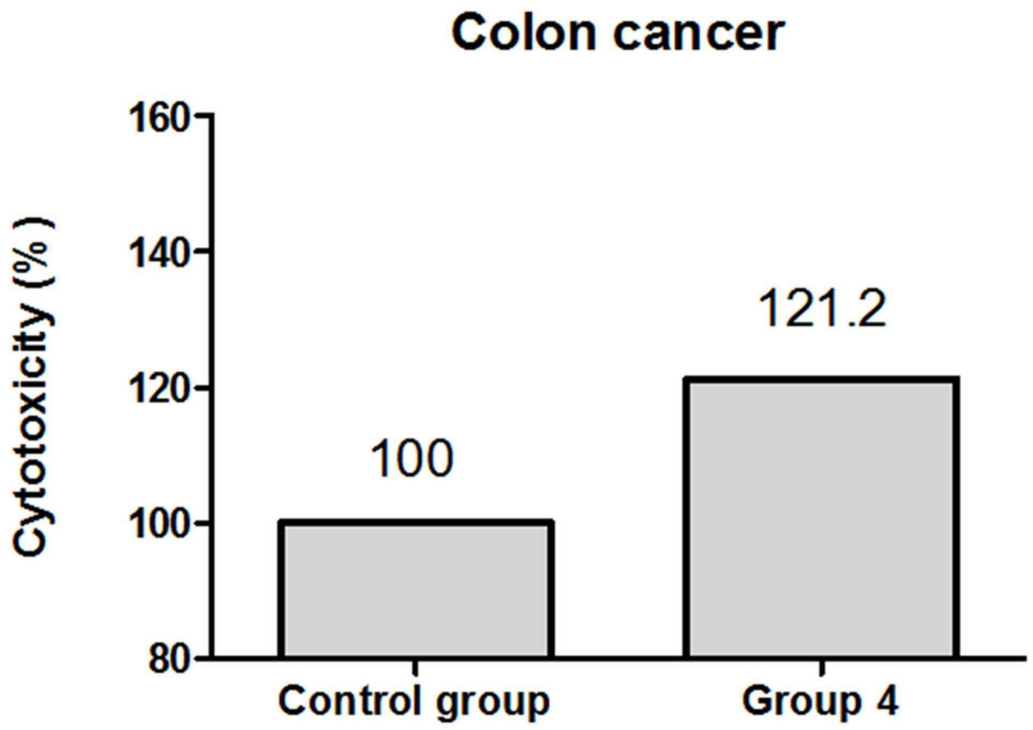
도면4a


Colon cancer
Relative cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
129.4
100
Control group
Group 1

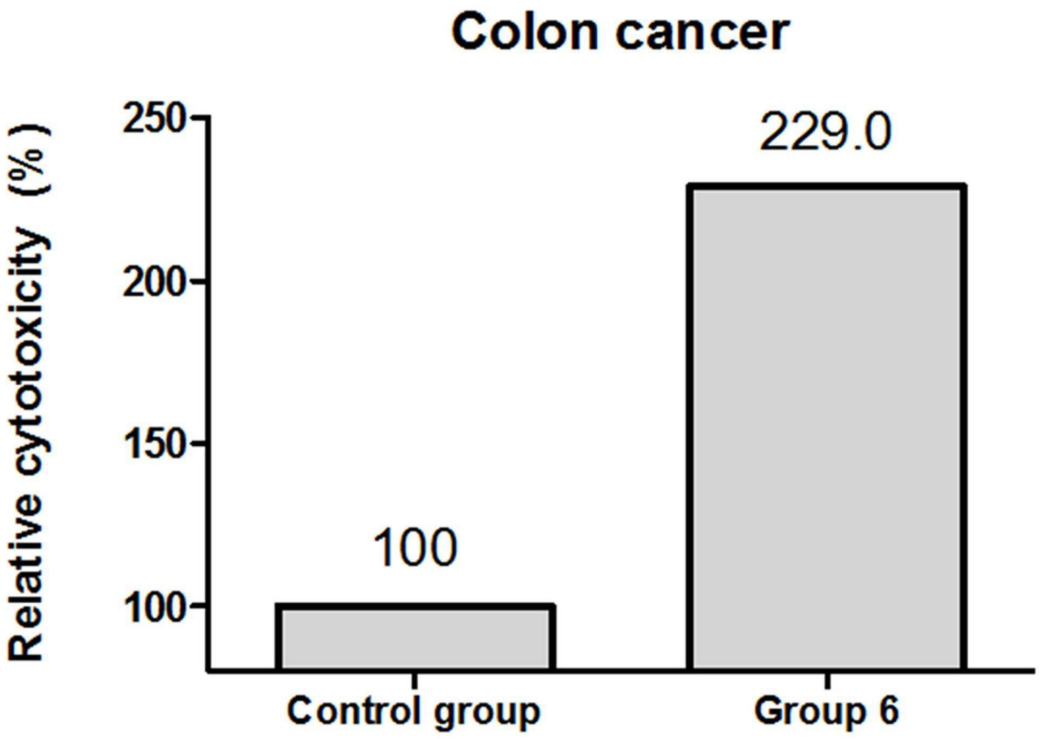
도면4b


Colon cancer
Relative cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
100
150.2
Control group
Group 3

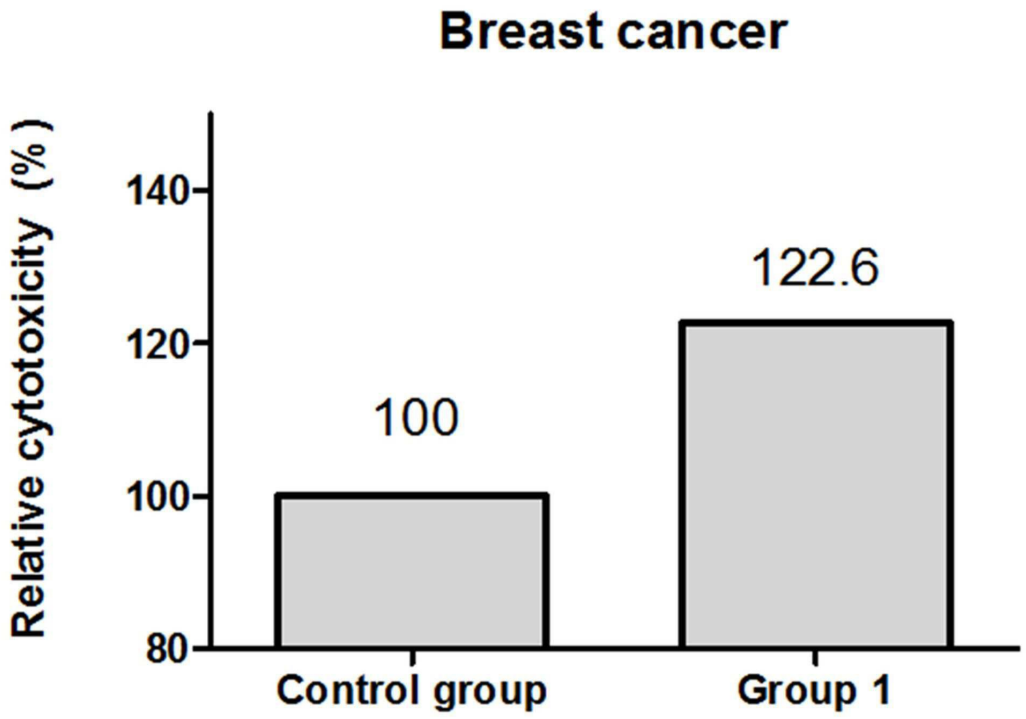
도면4c


Colon cancer
Cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
100
121.2
Control group
Group 4

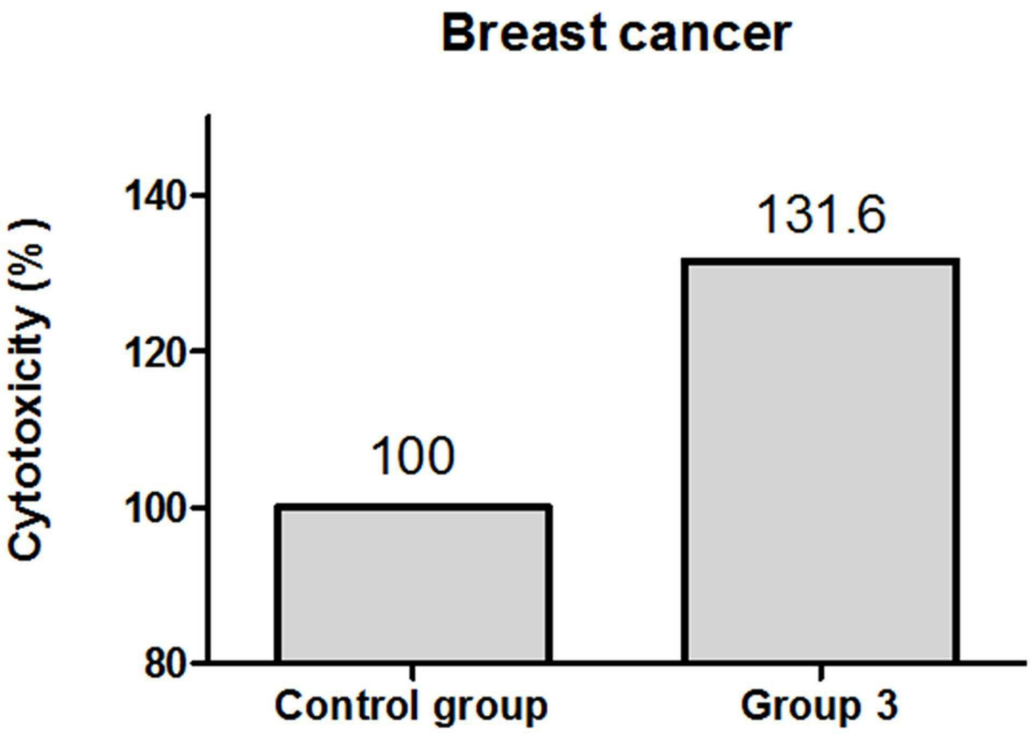
도면4d


Colon cancer
Relative cytotoxicity (%)
250
200
150
100
229.0
100
Control group
Group 6

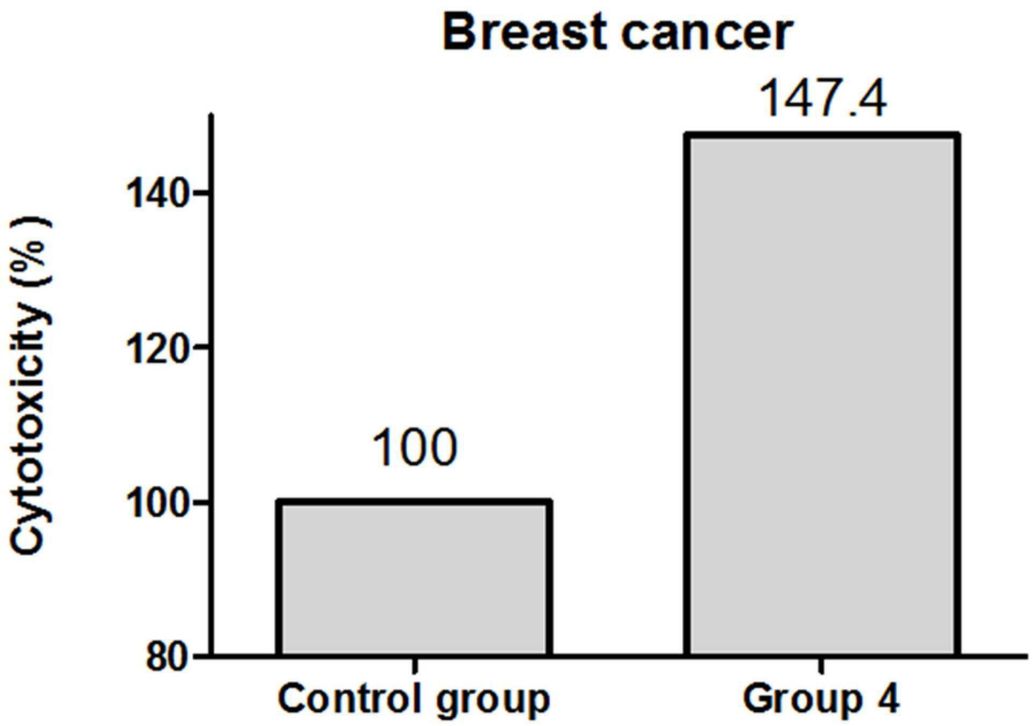
도면5a


Breast cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
122.6
100
Control group
Group 1

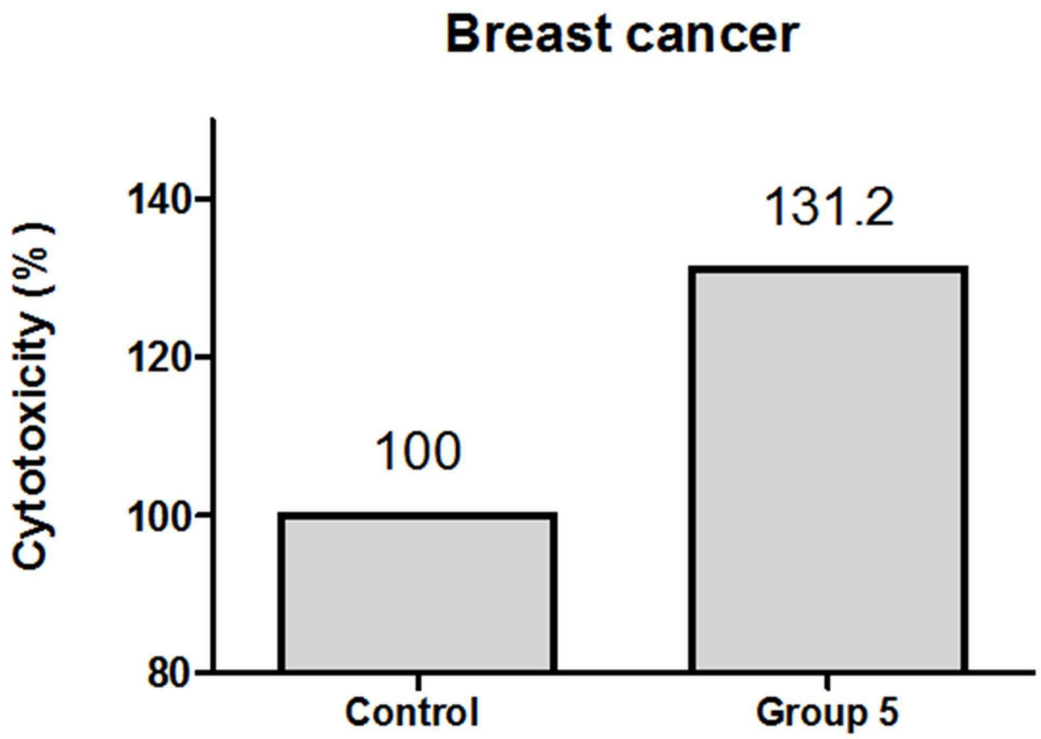
도면5b


Breast cancer
Cytotoxicity (%)
140
120
100
80
131.6
100
Control group
Group 3

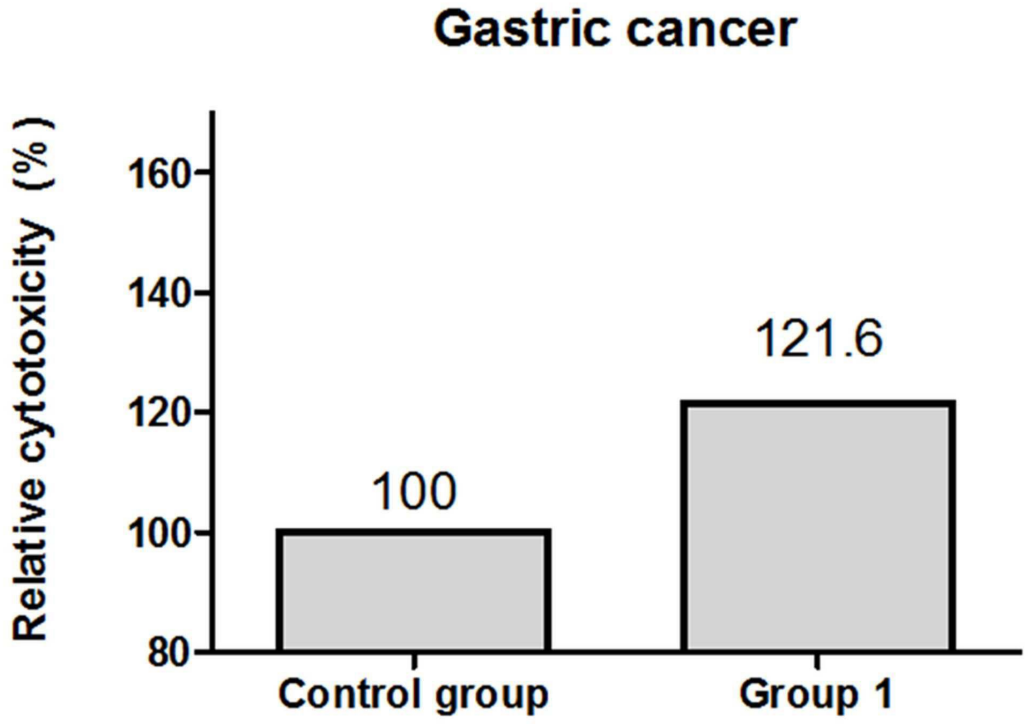
도면5c


Breast cancer
Cytotoxicity (%)
140
120
100
80
147.4
100
Control group
Group 4

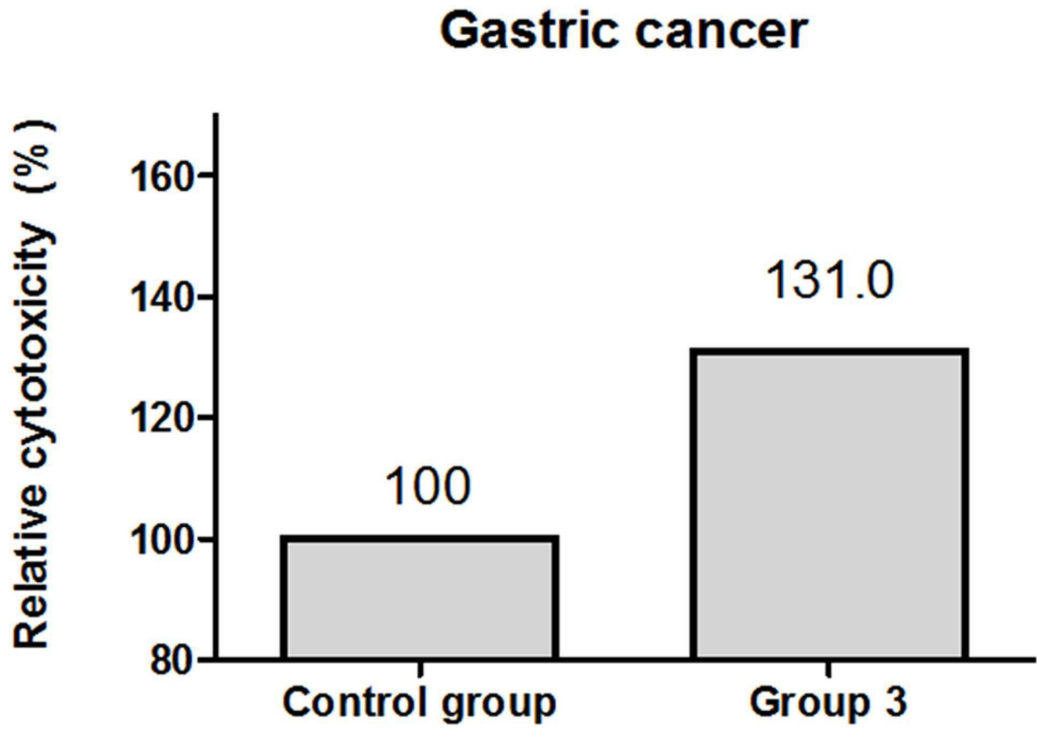
도면5d


Breast cancer
Cytotoxicity (%)
140
120
100
80
131.2
100
Control
Group 5

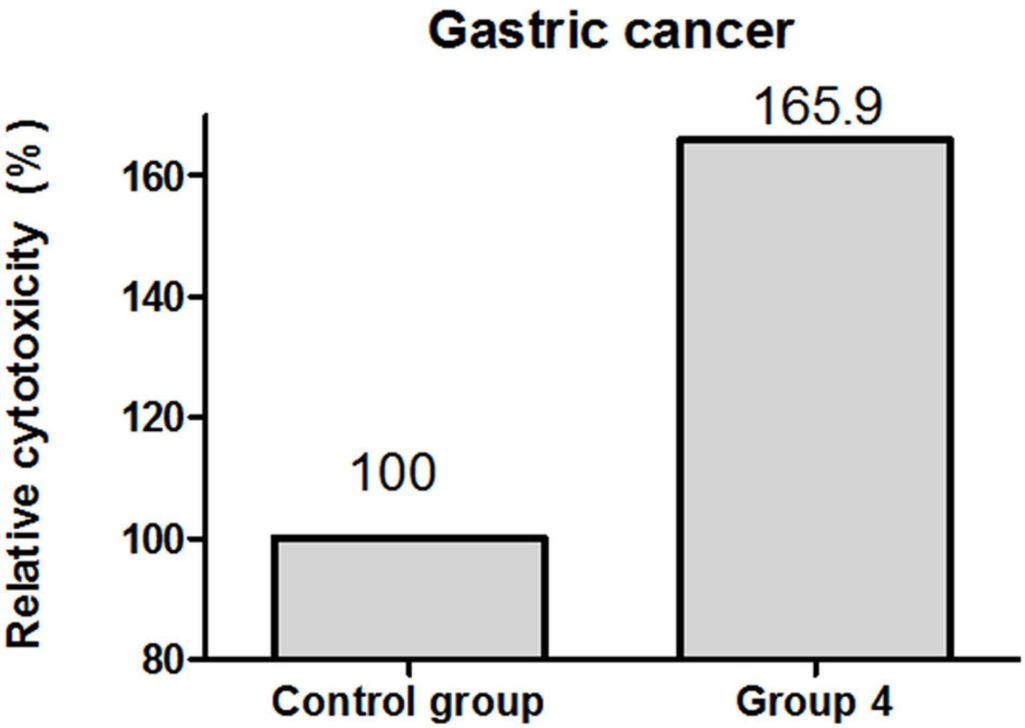
도면6a


Gastric cancer
Relative cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
121.6
100
Control group
Group 1

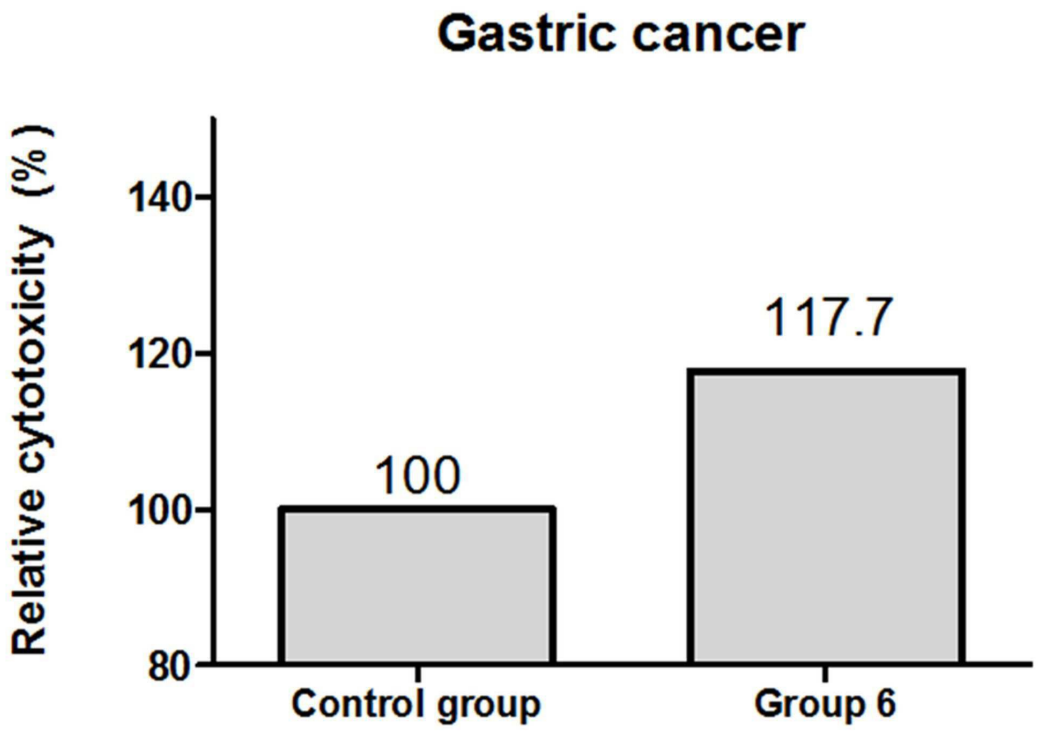
도면6b


Gastric cancer
Relative cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
131.0
100
Control group
Group 3

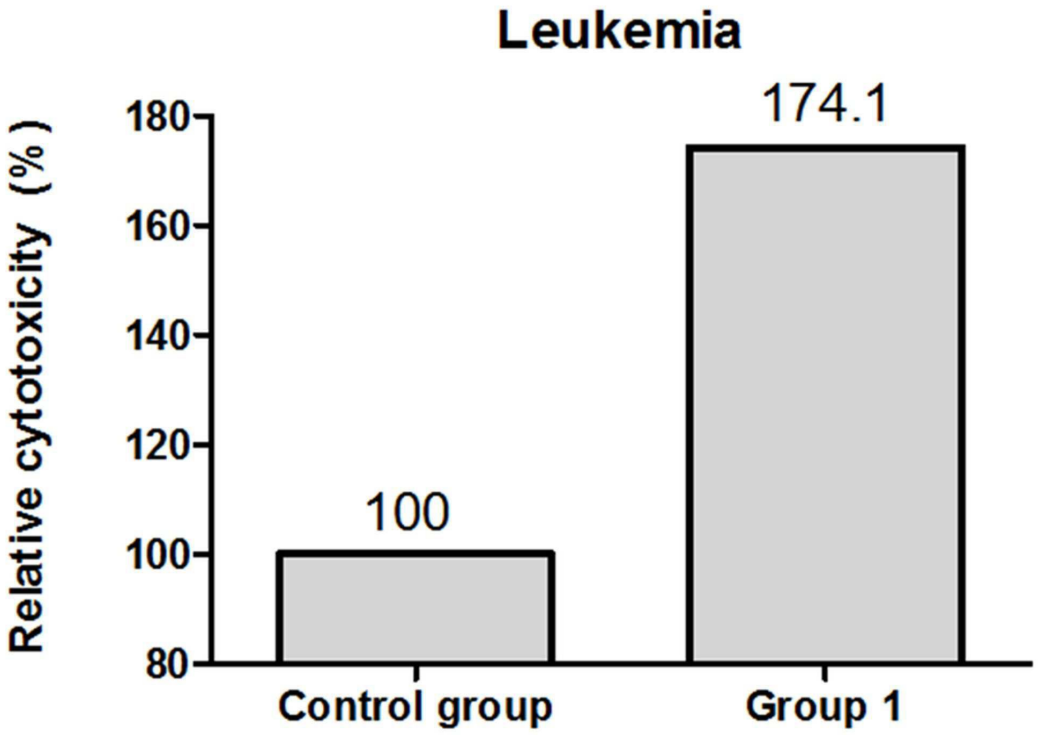
도면6c


Gastric cancer
Relative cytotoxicity (%)
160
140
120
100
80
165.9
100
Control group
Group 4

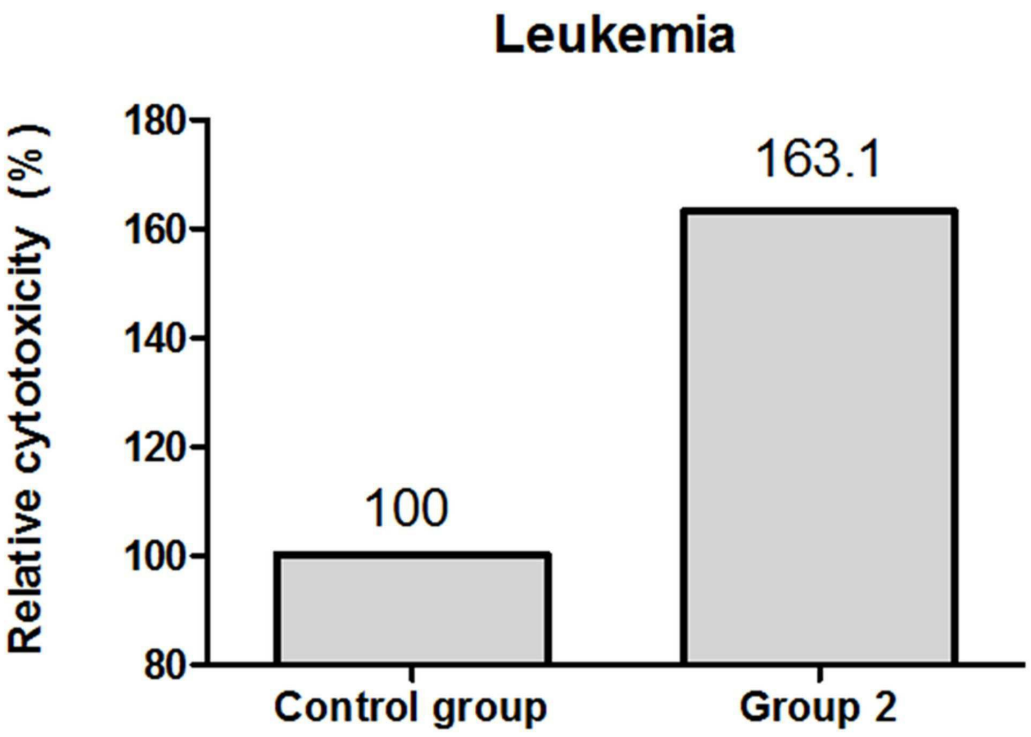
도면6d


Gastric cancer
Relative cytotoxicity (%)
140
120
100
80
100
117.7
Control group
Group 6

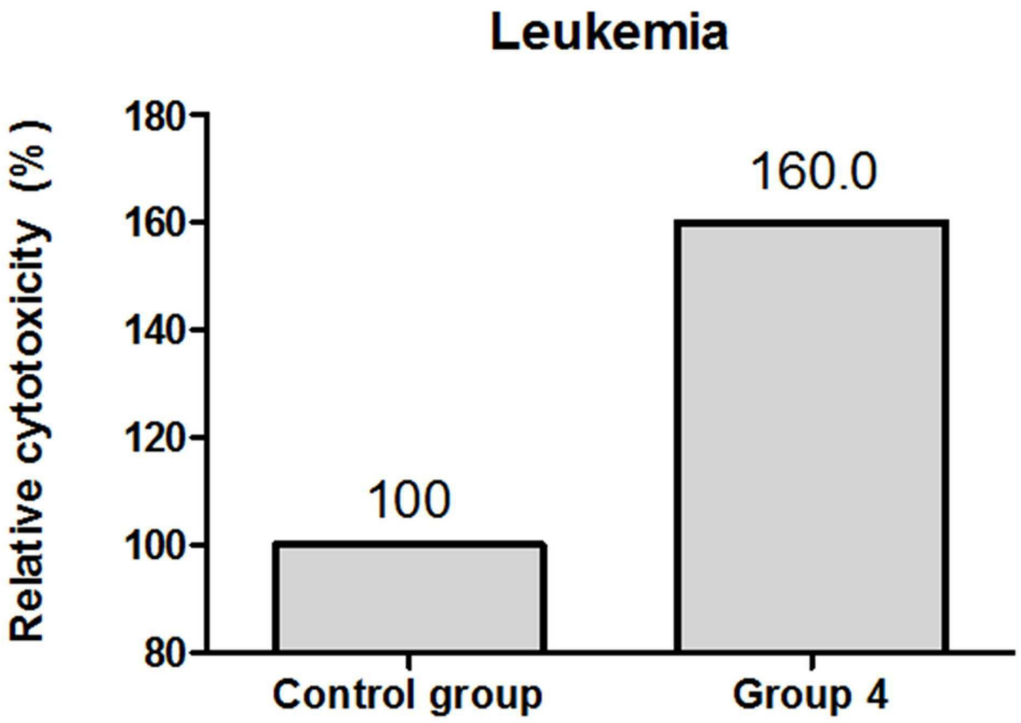
도면7a


Leukemia
Relative cytotoxicity (%)
180
160
140
120
100
80
100
174.1
Control group
Group 1

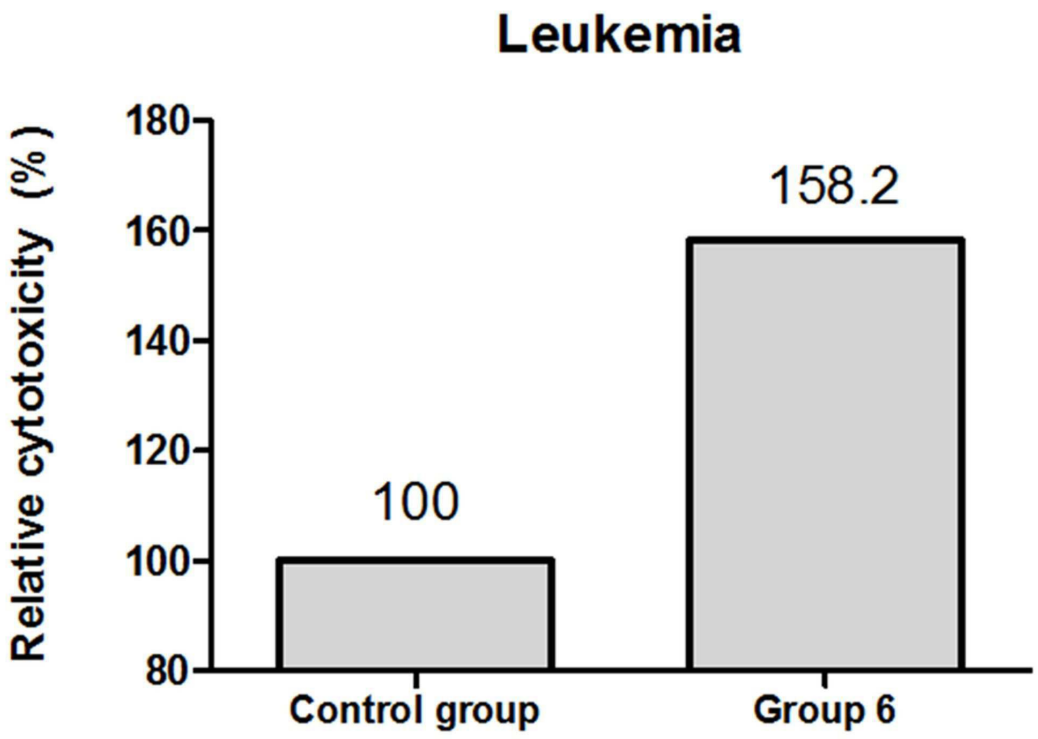
도면7b


Leukemia
Relative cytotoxicity (%)
180
160
140
120
100
80
163.1
100
Control group
Group 2

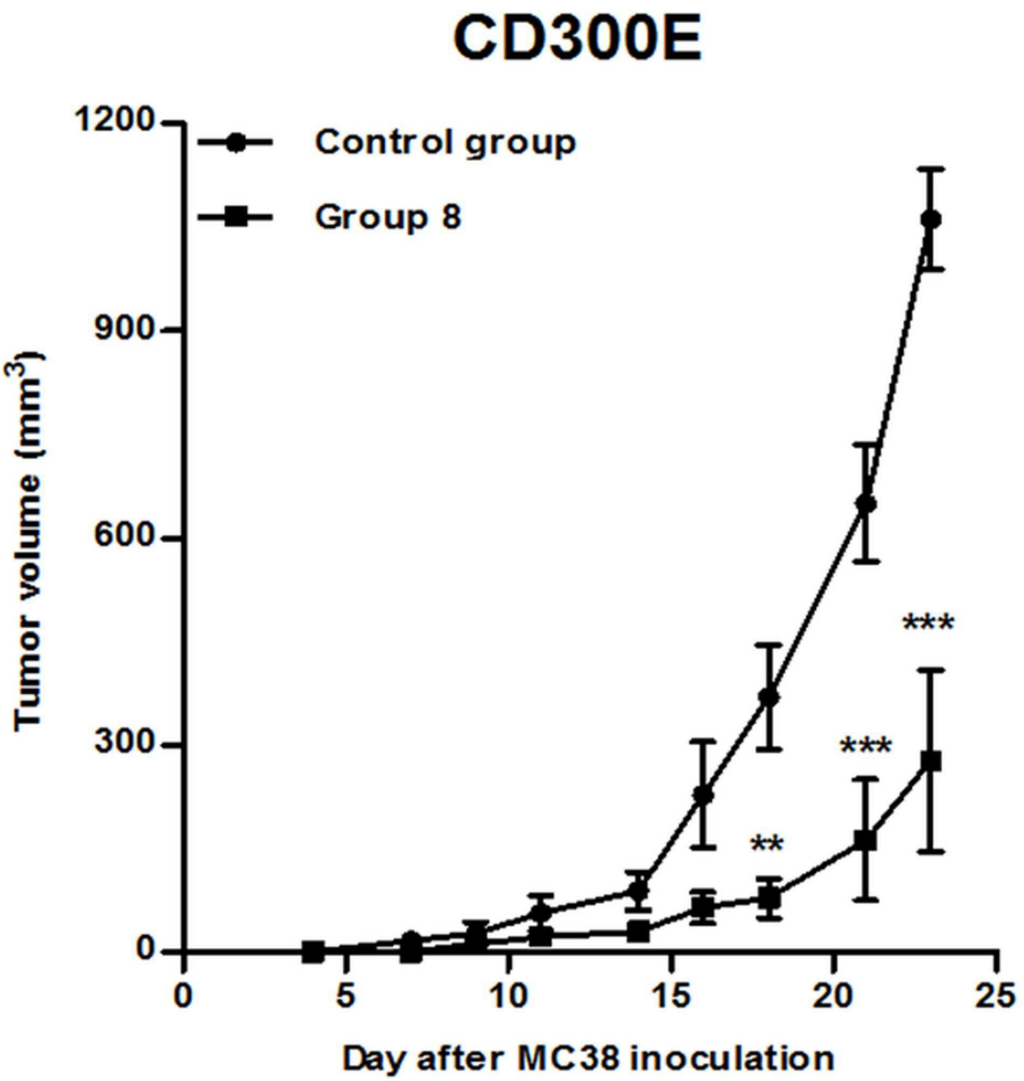
도면7c


Leukemia
Relative cytotoxicity (%)
180
160
140
120
100
80
160.0
100
Control group
Group 4

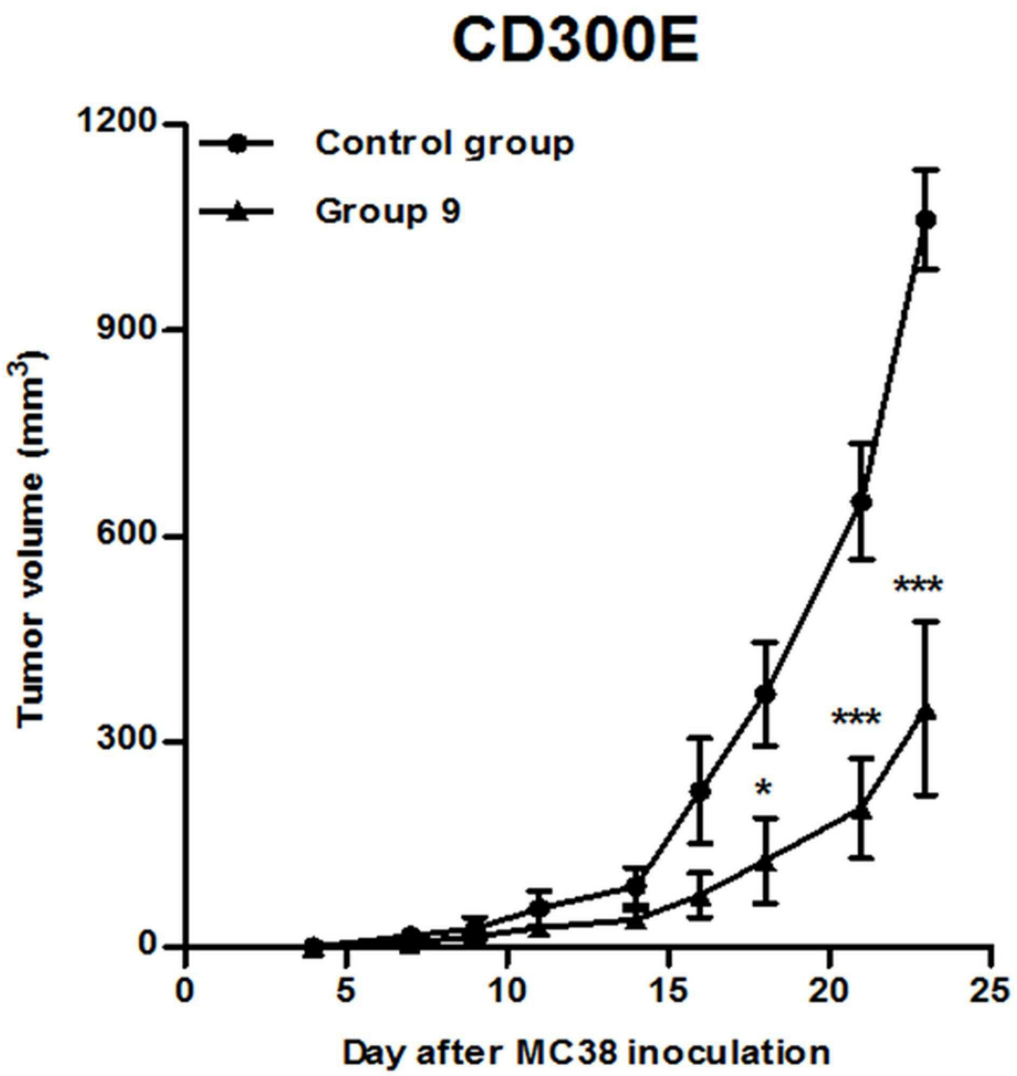
도면7d


Leukemia
Relative cytotoxicity (%)
180
160
140
120
100
80
158.2
100
Control group
Group 6

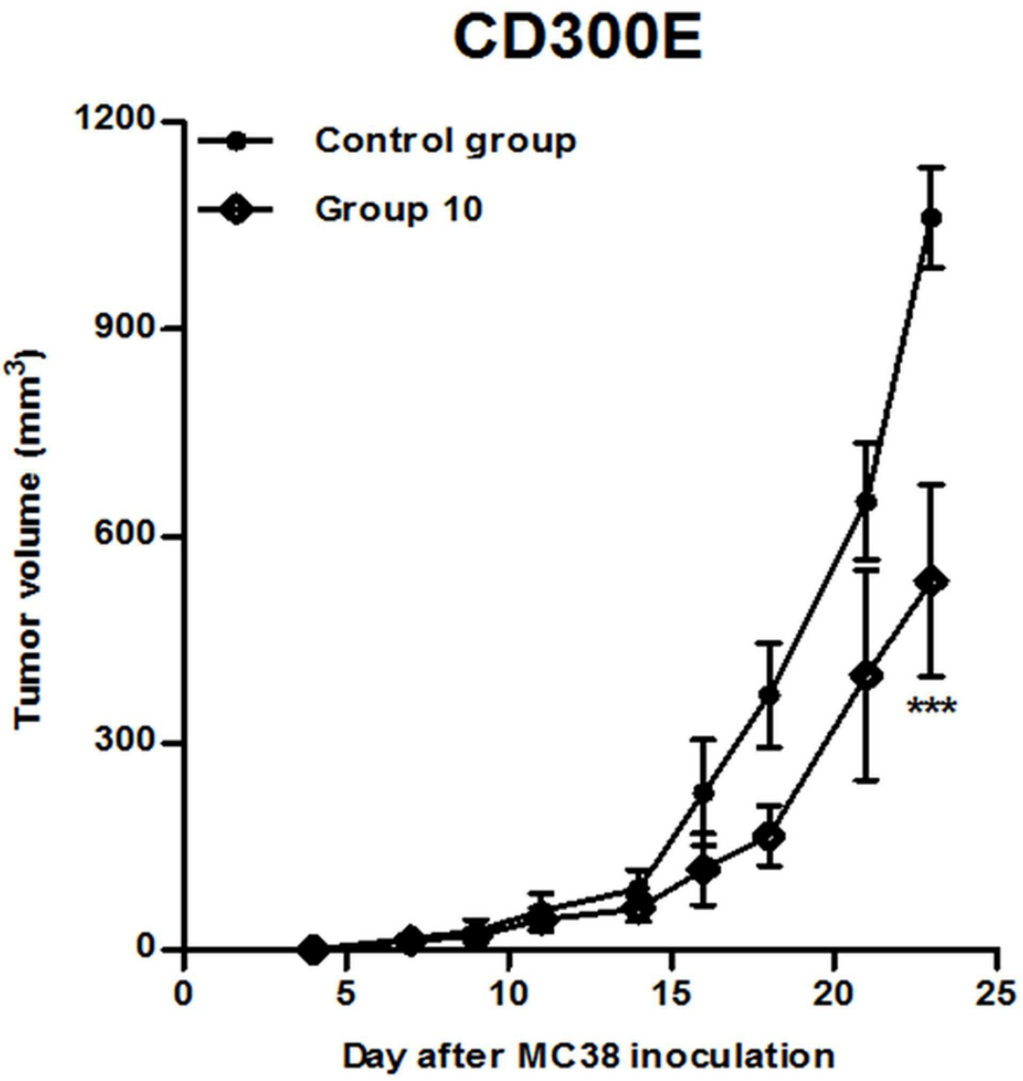
도면8a


CD300E
Control group
Group 8
Tumor volume (mm3)
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
Day after MC38 inoculation
**
***
***

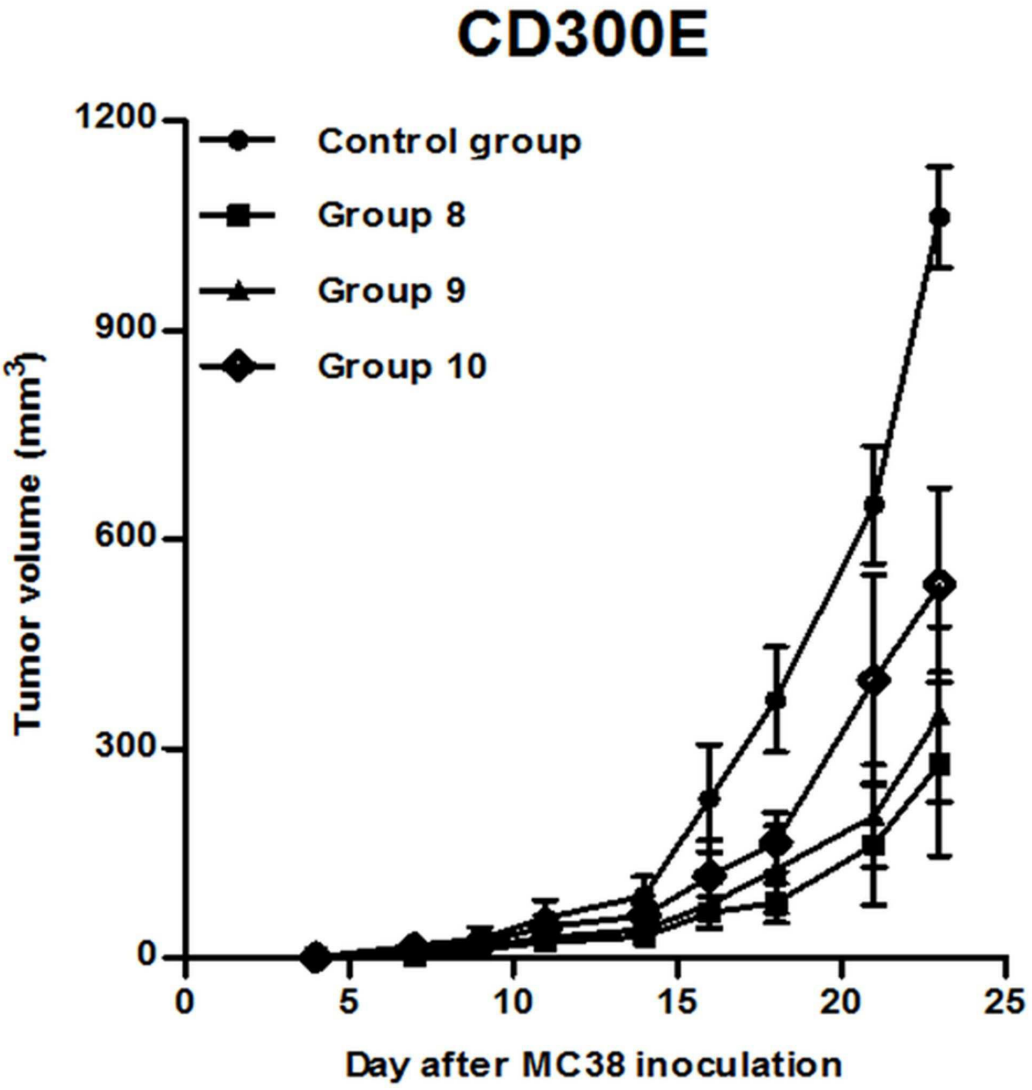
도면8b


CD300E
Control group
Group 9
Tumor volume (mm3)
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
Day after MC38 inoculation
***
***
*

도면8c


CD300E
Control group
Group 10
Tumor volume (mm3)
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
Day after MC38 inoculation
***

도면8d



서 열 목 록

<110> genomeandcompany

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER COMPRISING CD300E INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT

<130> FPD/201903-0031

<150> KR 10-2018-0062068

<151> 2018-05-30

<160> 18

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD300E(full length)

<400> 1

Met Trp Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ser Gly Cys Leu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Gly Pro Gly Ser Val Thr Gly Thr Ala Gly Asp Ser Leu
20 25 30

Thr Val Trp Cys Gln Tyr Glu Ser Met Tyr Lys Gly Tyr Asn Lys Tyr
35 40 45

Trp Cys Arg Gly Gln Tyr Asp Thr Ser Cys Glu Ser Ile Val Glu Thr
50 55 60

Lys Gly Glu Glu Lys Val Glu Arg Asn Gly Arg Val Ser Ile Arg Asp
65 70 75 80

His Pro Glu Ala Leu Ala Phe Thr Val Thr Met Gln Asn Leu Asn Glu

85 90 95

Asp Asp Ala Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Gln Thr Val Trp Val Leu
100 105 110

Asp Ser Trp Ser Arg Asp Pro Ser Asp Leu Val Arg Val Tyr Val Ser
115 120 125

Pro Ala Ile Thr Thr Pro Arg Arg Thr Thr His Pro Ala Thr Pro Pro
130 135 140

Ile Phe Leu Val Val Asn Pro Gly Arg Asn Leu Ser Thr Arg Glu Val
145 150 155 160

Leu Thr Gln Asn Ser Gly Phe Arg Leu Ser Ser Pro His Phe Leu Leu
165 170 175

Val Val Leu Leu Lys Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Leu Gly Ala Val
180 185 190

Phe Trp Val Asn Arg Pro Gln Trp Ala Pro Pro Gly Arg
195 200 205

<210> 2

<211> 618

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD300E(full length)

<400> 2

atgtggctgc tcccagctct actccttctc tgcctctcag gctgtttgtc tctgaagggc 60

cccggctctg tgactggcac tgcgggggac tctctgacag tgtggtgtca gtatgagagc 120

atgtacaagg gatataacaa gtactggtgc cgaggacagt acgacacgtc atgtgagagc 180

attgtggaga ccaagggaga agagaaggtg gagaggaatg gccgcgtgtc catcagagac 240

cacccggagg ctctcgcctt cactgtgacc atgcagaacc tcaatgaaga tgatgctgga 300

tcttactggt gcaaaattca gacagtgtgg gtcctggatt catggtcacg cgatccctcg 360

gacctggtta gggtgtatgt ttccccagca attacaaccc caaggaggac cacacatcca 420

gccacacctc ccatcttcct ggtggtgaac cctgggcgaa acctcagcac cagggaggtg 480

ttgacccaaa attcagggtt ccggctcagc agccctcact tcctgctcgt ggtccttctg 540

aagctgcctc tgctcctgag catgctgggt gctgttttct gggtgaacag gcctcagtgg 600

gctcctcctg gaagatag 618

<210> 3

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD300E extracellular domain

<400> 3

Met Trp Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ser Gly Cys Leu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Gly Pro Gly Ser Val Thr Gly Thr Ala Gly Asp Ser Leu

20 25 30

Thr Val Trp Cys Gln Tyr Glu Ser Met Tyr Lys Gly Tyr Asn Lys Tyr
35 40 45

Trp Cys Arg Gly Gln Tyr Asp Thr Ser Cys Glu Ser Ile Val Glu Thr
50 55 60

Lys Gly Glu Glu Lys Val Glu Arg Asn Gly Arg Val Ser Ile Arg Asp
65 70 75 80

His Pro Glu Ala Leu Ala Phe Thr Val Thr Met Gln Asn Leu Asn Glu
85 90 95

Asp Asp Ala Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Gln Thr Val Trp Val Leu

100 105 110

Asp Ser Trp Ser Arg Asp Pro Ser Asp Leu Val Arg Val Tyr Val Ser

115 120 125

Pro Ala Ile Thr Thr Pro Arg Arg Thr Thr His Pro Ala Thr Pro Pro

130 135 140

Ile Phe Leu Val Val Asn Pro Gly Arg Asn Leu Ser Thr Arg Glu Val

145 150 155 160

Leu Thr Gln Asn Ser Gly Phe Arg Leu Ser Ser Pro His

165 170

<210> 4

<211> 519

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD300E extracellular domain

<400> 4

atgtggctgc tcccagctct actccttctc tgcctctcag gctgtttgtc tctgaagggc 60

cccggctctg tgactggcac tgcgggggac tctctgacag tgtggtgtca gtatgagagc 120

atgtacaagg gatataacaa gtactggtgc cgaggacagt acgacacgtc atgtgagagc 180

attgtggaga ccaagggaga agagaaggtg gagaggaatg gccgcgtgtc catcagagac 240

cacccggagg ctctcgcctt cactgtgacc atgcagaacc tcaatgaaga tgatgctgga 300

tcttactggt gcaaaattca gacagtgtgg gtcctggatt catggtcacg cgatccctcg 360

gacctggtta gggtgtatgt ttccccagca attacaaccc caaggaggac cacacatcca 420

gccacacctc ccatcttcct ggtggtgaac cctgggcgaa acctcagcac cagggaggtg 480

ttgacccaaa attcagggtt ccggctcagc agccctcac 519

<210> 5

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E with Human IgG constant kappa tag

<400> 5

Met Trp Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ser Gly Cys Leu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Gly Pro Gly Ser Val Thr Gly Thr Ala Gly Asp Ser Leu

20 25 30

Thr Val Trp Cys Gln Tyr Glu Ser Met Tyr Lys Gly Tyr Asn Lys Tyr

35 40 45

Trp Cys Arg Gly Gln Tyr Asp Thr Ser Cys Glu Ser Ile Val Glu Thr

50 55 60

Lys Gly Glu Glu Lys Val Glu Arg Asn Gly Arg Val Ser Ile Arg Asp

65 70 75 80

His Pro Glu Ala Leu Ala Phe Thr Val Thr Met Gln Asn Leu Asn Glu

85 90 95

Asp Asp Ala Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ile Gln Thr Val Trp Val Leu

100 105 110

Asp Ser Trp Ser Arg Asp Pro Ser Asp Leu Val Arg Val Tyr Val Ser

115 120 125

Pro Ala Ile Thr Thr Pro Arg Arg Thr Thr His Pro Ala Thr Pro Pro

130 135 140

Ile Phe Leu Val Val Asn Pro Gly Arg Asn Leu Ser Thr Arg Glu Val

145 150 155 160

Leu Thr Gln Asn Ser Gly Phe Arg Leu Ser Ser Pro His Gly Gln Ala

165 170 175

Gly Gln Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser

180 185 190

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

195 200 205

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

210 215 220

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

225 230 235 240

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

245 250 255

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

260 265 270

Ser Leu Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser

275 280 285

<210> 6

<211> 858

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E with Human IgG constant kappa tag

<400> 6

atgtggctgc tcccagctct actccttctc tgcctctcag gctgtttgtc tctgaagggc 60

cccggctctg tgactggcac tgcgggggac tctctgacag tgtggtgtca gtatgagagc 120

atgtacaagg gatataacaa gtactggtgc cgaggacagt acgacacgtc atgtgagagc 180

attgtggaga ccaagggaga agagaaggtg gagaggaatg gccgcgtgtc catcagagac 240

cacccggagg ctctcgcctt cactgtgacc atgcagaacc tcaatgaaga tgatgctgga 300

tcttactggt gcaaaattca gacagtgtgg gtcctggatt catggtcacg cgatccctcg 360

gacctggtta gggtgtatgt ttccccagca attacaaccc caaggaggac cacacatcca 420

gccacacctc ccatcttcct ggtggtgaac cctgggcgaa acctcagcac cagggaggtg 480

ttgacccaaa attcagggtt ccggctcagc agccctcacg gccaggccgg ccagcgaact 540

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 600

gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag 660

gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 720

gacagcacct acagcctcag cagcaccctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac 780

aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag ggcctgagct tgcccgtcac aaagagcttc 840

aacaggggag agtcttga 858

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-sense(Group 5)

<400> 7

cagcauagga agaacucua 19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-antisense(Group 5)

<400> 8

uagaguucuu ccuaugcug 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-sense(Group 6)

<400> 9

gagaagucaa gagccauga 19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-antisense(Group 6)

<400> 10

ucauggcucu ugacuucuc 19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-sense(Group 7)

<400> 11

ugacagugug gugucagua 19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CD300E siRNA-antisense(Group 7)

<400> 12

uacugacacc acacuguca 19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> mouse CD300E siRNA-sense(Group 8)

<400> 13

gugucaauau aguccauca 19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CD300E siRNA-antisense(Group 8)

<400> 14

ugauggacua uauugacac 19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CD300E siRNA-sense(Group 9)

<400> 15

gaggauuguu ccaccauca 19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CD300E siRNA-antisense(Group 9)

<400> 16

ugauggugga acaauccuc 19

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CD300E siRNA-sense(Group 10)

<400> 17

acgugaucca ucggucagu 19

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CD300E siRNA-antisense(Group 10)

<400> 18

acugaccgau ggaucacgu 19