

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 5월 30일 (30.05.2025) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2025/110502 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 16/28 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/016336

(22) 국제출원일: 2024년 10월 24일 (24.10.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0161589 2023년 11월 20일 (20.11.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (KR).

(72) 발명자: 이경림 (LEE, Kyung Lim); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 약학관 B동 112호 (KR).
장은화 (JANG, Eun-Hwa); 04104 서울특별시 마포구 신촌로 160, 1511호 (KR). 배해득 (BAE, Headuk); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 약학관 B동 111호 (KR).

(74) 대리인: 김경교 등 (KIM, Kyeongkyo et al.); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로70길 13, 2층 (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

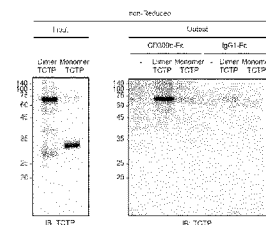
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: CD300C, WHICH IS RECEPTOR OF DIMERIC TCTP, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 이량체 TCTP의 수용체인 CD300C 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention identifies for the first time that the receptor of dimeric TCTP is CD300C, and relates to an anti-CD300C antibody, a pharmaceutical use thereof, and a drug screening method and a disease diagnosis method using CD300C. In the present invention, it was confirmed that an extracellular domain of CD300C interacts with dimeric TCTP. Accordingly, CD300C can be effectively used as a target for the development of preventive or therapeutic agents for allergic diseases, inflammatory diseases, or malaria. The anti-CD300C antibody of the present invention can be effectively used for preventing or treating allergic diseases, inflammatory diseases, or malaria, or can be effectively used for drug screening or diagnosis related to allergic diseases, inflammatory diseases, or malaria.

(57) 요약서: 본 발명은 이량체 TCTP의 수용체가 CD300c임을 최초로 규명한 것으로, 항-CD300c 항체, 이의 의약품용도, 그리고 CD300c를 이용한 약물 스크리닝 방법 및 질병의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 CD300c 세포 외 도메인 (extracellular domain) 이 이량체 TCTP와 상호작용하는 것을 확인하였으며, 이에 따라 CD300c는 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료제 개발의 타겟으로 유용하게 이용될 수 있고, 본 발명의 항-CD300c 항체는 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료에 유용하게 이용되거나 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 관련 약물 스크리닝 또는 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2025/110502 A1

발명의 설명

발명의 명칭: 이량체 TCTP의 수용체인 CD300C 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 이량체 TCTP의 수용체가 CD300c임을 최초로 규명한 것으로, 항-CD300c 항체, 이의 의약용도, 그리고 CD300c를 이용한 약물 스크리닝 방법 및 질병의 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)는 IgE-의존성 히스타민방출인자 (histamine-releasing factor)로 특정 IgE가 존재할 경우 호염구에서 히스타민을 분비하게 하는 것으로 알려졌으나, 이후 IgE의 수용체인 FcεR 존재 유무에 상관없이 염증세포에서 히스타민, IL-4 및 IL-13 등의 분비를 조절하는 것이 관찰되었다. 즉, TCTP가 IgE가 아닌 특이적인 세포막 수용체에 결합하여 작용할 수 있다는 가능성이 제시되었으나, 이러한 수용체는 아직까지 규명되지 않았다 (Blood 2000 Sep 15;96(6):2191-8).
- [3] 본 발명자들은 선행 연구를 통해 세포 밖으로 분비된 TCTP가 이량체를 형성하고, 기관지 상피세포 및 다른 염증세포를 활성화하여 다양한 사이토카인을 분비하고 염증 반응을 유발하는 것을 확인하였다. 그 결과, 이량체 TCTP가 알러지를 유발하는 물질임을 최초로 증명하였고 (대한민국 등록특허 제10-0780255호, 미국 등록 특허 제7772368호, 일본 등록특허 제4564926호, 유럽 등록특허 제1683866호), 이량체 TCTP를 표적으로 하여 관련된 알러지 및 염증성 질환의 치료를 위한 다양한 연구를 진행해왔다. 이량체 TCTP의 구조 부위로서 이량체 TCTP의 수용체에 결합하는 유연성 루프 (flexible loop) 도메인 (대한민국 등록특허 제10-1804291호) 또는 헬릭스 2 (helix 2) 도메인 (대한민국 등록특허 제10-1843051호) 및 C-말단 (대한민국 등록특허 제10-1804285호)을 규명하였으며, 이량체 TCTP에 결합하면서 항알러지 효능을 갖는 펩타이드, 천연물, 단클론항체를 규명하였다 (대한민국 등록특허 제10-1830838호, 대한민국 등록특허 제10-1875317호, 대한민국 특허출원 제10-2023-0087414호).
- [4] 이에 본 발명자들은 다양한 질환과 연관이 있는 이량체 TCTP의 수용체인 CD300c를 규명하고, CD300c를 억제함으로써 이량체 TCTP의 사이토카인 유사 활성을 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서 CD300c를 억제하여 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [5] 본 발명의 하나의 목적은, CD300c의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하고, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)와 CD300c의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 하나의 목적은, CD300c 억제제의 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용도를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자, 이를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, CD300c를 이용한 약물의 스크리닝 방법 및 질병의 진단 방법, 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CD300c 억제제의 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료를 위한 의약용도를 제공한다.
- [11] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명은 CD300c 억제제를 유효성분으로 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [12] 또한 본 발명의 일 구체예에 따르면, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, CD300c 억제제의 용도를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명은 CD300c 억제제의 치료학적으로 유효한 양을, 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [14] 본 발명에서 용어 "CD300c (CD300 antigen-like family member C)"는 CLM-6 (CMRF35-like molecule 6) 등으로도 명명되는 세포 막 단백질이다. 본 발명자들은 알러지 질환, 염증성 질환 또는 말라리아 등의 질환들에 직접적인 영향을 미치는 TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) 이량체의 수용체가 CD300c임을 확인하여, CD300c가 상기 질환들에 대한 치료 표적으로 유용하게 이용될 수 있음을 입증하였다. TCTP는 세포 밖으로 분비되는 특이한 단백질로, 작은 분비 소포체에 저장되었다가 비전형적 경로를 통하여 분비되며, 이 과정에서 TSAP6라는 p53 유도성 막단백질이 관여한다는 보고 (Amzallag et al., J Biol Chem, 279, 46104-46112, 2004)와 H,K-ATPase가 관여한다는 보고가 있다 (Choi et al., PLoS One, 4(6), 5732-5739, 2009). 이렇게 분비된 TCTP 이량체는 IgE-감작된 (sensitized) 호염구 (basophil)를 자극하여 히스타민, 인터루킨-4, 그리고 인터

루킨-13의 유리를 촉진시킴으로써 알려지성 비염, 천식 및 아토피성 피부염과 같은 후기반응 알러지 질환을 일으킨다고 보고되어 있다 (MacDonald et al., Science, 269, 688-690, 1995).

- [15] 본 발명에서는 구체적인 실시예를 통해, CD300c가 TCTP 이량체와의 결합을 통해 NF- κ B 신호전달 경로를 활성화시키고, IL-6, IL-8 등의 사이토카인을 분비할 수 있음을 확인하였다. 또한, CD300c의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체 또는 CD300c의 발현을 siRNA를 통해 억제함으로써 상기 신호전달경로와 사이토카인 분비가 억제되는 것을 확인하였다. 나아가, 천식질환 마우스 모델에 CD300c의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체를 투여하여 면역 세포 침윤, 점액 분비 및 사이토카인 분비 감소를 통한 기도 염증 반응 억제 효과를 확인하였다. 따라서 CD300c는 기존에 TCTP와 관련이 있는 것으로 알려졌던 다양한 질환들에 대하여 신규한 치료 표적이 될 충분한 가능성을 갖는다.
- [16] 본 발명에서 용어 "CD300c 억제제"는 CD300c의 발현 또는 활성을 감소시키는 제제를 모두 통칭하는 의미로 사용되며, 구체적으로는 CD300c에 직접적으로 작용하거나 그의 리간드에 간접적으로 작용하는 등의 방식으로, CD300c의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나 그 활성을 방해함으로써, CD300c의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 모든 제제를 포함할 수 있다. 단, 본 발명에서 CD300c 억제제는 TCTP에 대한 항체를 의미하는 것은 아니다.
- [17] 상기 CD300c 억제제는 CD300c를 표적으로 하여 CD300c의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 화합물, 천연물, 단백질, 핵산, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등 그 형태에 제한 없이 사용 가능하다. 상기 CD300c 억제제는 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로 CD300c의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오티드, 또는 CD300c 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 CD300c의 발현을 억제하는 올리고 뉴클레오티드는 CD300c mRNA에 특이적인 안티센스 올리고 뉴클레오티드, shRNA 또는 siRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [18] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고 뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고 뉴클레오티드 서열은 상기 CD300c mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 CD300c mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위 (translocation), 성숙 (maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고 뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고 뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고 뉴클레오티드를 합성하는 한 가지 예는 RNA 중합효소 I을

이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위 (MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용될 수 있는 안티센스 올리고 뉴클레오티드의 디자인은 CD300c의 염기서열을 참조하여 당업계에 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

- [19] 본 발명에서 용어, "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이서 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 CD300c에 특이적으로 작용하여 CD300c mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 CD300c를 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소 학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성 법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [20] 또한, 본 발명에서 CD300c 단백질의 활성을 억제하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD300c의 세포 외 도메인 (예컨대, 서열번호 3의 1 내지 183 번째 아미노산 또는 서열번호 56의 아미노산의 22 내지 188번째 아미노산)에 특이적으로 결합하고, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)와 CD300c의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

- [21] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 그 예로, 단클론항체, 다클론항체, 전장항체 (full-length antibody) 및 항체 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한 상기 용어는 이가 (bivalent) 또는 이중 특이성 분자 (예컨대, 이중특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디를 포함할 수 있다.

- [22] 본 발명에서 용어, "단클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 본 발명에서 용어, "전장항체"는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마 (γ), 뮤 (μ), 알파 (α), 델타 (δ) 및 엡실론 (ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마 1 ($\gamma 1$), 감마 2 ($\gamma 2$), 감마 3 ($\gamma 3$), 감마 4 ($\gamma 4$), 알파 1 ($\alpha 1$) 및 알파 2 ($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파 (κ) 및 람다 (λ) 타입을 가진다. IgG는 아형 (subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [23] 본 발명에서 용어, "단편", "항체 단편" 및 "항원 결합 단편"은 항체의 항원결합 기능을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로 호환적으로 사용된다. 예시적인 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [24] 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역 (CH1 도메인)을 가지는 구조로 1 개의 항원 결합 부위를 가진다. 항체 분자의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역 (hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체 조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344 등에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv (two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv (single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 단쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고 (예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있음), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [25] 본 발명에서 상기 알러지 질환은 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 또는 아나필락시스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명에서 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 기관지염, 폐렴, 관절염, 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광염, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 또는 폐섬유화증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [27] TCTP에 의해 증가되는 IL-8은 천식 또는 기관지염 (Chanez et al., *Int Arch Allergy Immunol*, 111, 83-88, 1996), 만성폐쇄성폐질환 (Nocker et al., *Int Arch Allergy Immunol*, 109, 183-191, 1996), 기관지 확장증 (bronchiectasis, Simpson et al., *Thorax*, 62, 211-218, 2007), 비염 (Benson et al., *Pediatr Allergy Immunol*, 10, 178-185, 1999; Kuna et al., *J Allergy Clin Immunol*, 97, 104-112, 1996), 아토피성 피부염 (Kimata & Lindley, *Arch Dis Child* 70,119-122, 1994), 두드러기 (urticaria, Choi et al., *J Clin Immunol*, 28, 244-249, 2008), 건초열 (hay fever, Ciprandi et al., *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133, 429-435, 2005), 결막염 (Miyoshi et al., *Cornea*, 20, 743-747, 2001) 아나필락시스 (anaphylaxis, Cho et al., *Front Pharmacol.*, 12, 764321-764329, 2021) 등의 여러 알러지성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [28] 또한, IL-8은 만성기관지염 등 만성 염증성 기관지 질환 (Richman-Eisenstat et al., *Am J Physiol*, 264, L413-418, 1993), 폐렴 등 염증성 폐질환 (Erger and Casale, *Eur Respir J*, 11, 299-305, 1998; Pease & Sabroe, *Am J Respir Med*, 1, 19-25, 2002), 관절염 또는 신장염 (Harada et al., *J Leukoc Biol*, 56, 559-564, 1994), 건선 (Schulz et al., *J Immunol*, 151, 4399-4406, 1993; Bruch-Gerharz et al., *J Exp Med*, 184, 2007-2012, 1996), 피부염 (Sticherling et al., *Arch Dermatol Res*, 284, 82-85, 1992), 크론병 (Izutani et al., *Inflamm Bowel Dis*, 1, 37-47, 1995), 염증성 장질환 (Mitsuyama et al., *Clin Exp Immunol*, 96, 432-436, 1994), 치은염 (Haake & Huang, *Clinical Periodontology*, 9th Edition. Philadelphia: W.B.Saunders Co. 2002. page 162), 동맥경화증, 관상동맥질환 등 심혈관계 질환 (Apostolakis et al., *Cardiovasc Res*, 84, 353-360, 2009; Boekholdt et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1503-1508, 2004), 만성간질환 (Zimmermann et al., *PLoS ONE*, 6, e21381, 2011), 베체트병 (Behcet's disease, Katsantonis et al., *Dermatology*, 201, 37-39, 2000), 방광암, 전립선염, 신우신염 또는 골수염 (Shahzad et al., *Int arch med*, 3, 11, 2010), 갑상선질환 (Kobawala et al., *J Thyroid Res*, 8, 270149, 2011), 포도막염 (uveitis, Klok et al., *Br J Ophthalmol*, 82, 871-874, 1998), 사구체 신염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증 (Harada et al., *Mol Med Today*, 2, 482-489, 1996)의 다양한 염증성 질환에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 폐질환, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 건선, 수장족저농포증 (palmoplantar pustulosis) 등 만성 염증성 피부질환, 안구 염증 등 염증성 질환에서 IL-8을 저해하는 것이 치료 전략으로 제시된 바 있다 (Mukaida, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284, L566-L577, 2003; Skov et al., *J Immunol*, 181, 669-679, 2008; Harada et al., *J Leukoc Biol*, 56, 559-564, 1994). IL-8의 차단항체 (blocking antibody)나 IL-8 수용체를 코딩하는 유전자를 저해하는 치료법은 염증 치료 효과가 있으며 (Harada et al., *Mol Med Today*, 2, 482-489, 1996), 일례로 만성 염증성 피부질환 환자에서 IL-8에 대한 항체를 투여하여 염증이 감소되었다 (Skov et al., *J Immunol*, 181, 669-679, 2008). TCTP에 의해 분비가 증가하는 GM-CSF도 다양한 염증성 질환과 관련성이 있어 (Hamilton, *Trends*

- Immunol, 23, 403-408, 2002), GM-CSF 또한 류마티스성 관절염 등의 염증성 질환의 타겟으로 제시되고 있다 (Cornish et al., Nat Rev Rheumatol, 5, 554-559, 2009).
- [29] 또한, 1998년 항말라리아제인 아르테미시닌 (Artemisinin)이 말라리아 단백질인 TCTP에 결합하여 작용하는 것이 밝혀진 바 있다 (Bhisutthibhan et al., J Biol Chem, 273, 16192-16198, 1998). IL-8은 말라리아 환자에서도 분비되며 (Friedland et al., Trans R Soc Trop Med Hyg, 87, 54-55, 1993), 말라리아의 HRF가 IL-8 분비를 촉진시킨다고 보고되었다 (MacDonald et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 10829-32, 2001).
- [30] 위와 같은 선행 연구 결과들은, TCTP의 수용체인 CD300c를 표적으로 하여 다양한 알러지 질환, 염증성 질환, 말라리아를 예방 및 치료할 수 있음을 보여준다.
- [31] 본 발명에서 용어, "치료"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적으로 완화시키며, 차단시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 바람직하게 본 발명에서는 CD300c를 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 질병의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, "예방"은 본 발명에 따른 CD300c를 억제하는 물질을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [32] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [33] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [34]
- [35] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, CD300c의 세포 외 도메인 (서열번호 3의 1 내지 183 번째 아미노산 또는 서열번호 56의 아미노산의 22 내지 188번째 아미노산)에 특이적으로 결합하고, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)와 CD300c의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [36] 본 발명의 구체예에 따르면, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
- [37] (a) 서열번호 9 또는 서열번호 34로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 10 또는 서열번호 35로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 11 또는 서열번호 36으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 및 서열번호 12 또는 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 13 또는 서열번호 28로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 14, 서열번호 22, 서열번호 44 또는 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하거나, 또는
- [38] (b) 상기 (a)에서 적어도 하나의 아미노산 서열이 치환된 것으로, 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1의 2번째 위치의 F가 Y; 3번째 위치의 N이 T; 5번째 위치의 R이 G, T 또는 S; 6번째 위치의 N이 G 또는 S; 또는 8번째 위치의 A가 G로 치환; 서열번호 28로 기재된 중쇄 CDR2의 2번째 위치의 N이 S; 3번째 위치의 G가 W 또는 V; 4번째 위치의 R이 N, Y 또는 S; 5번째 위치의 G가 N; 6번째 위치의 D가 G; 7번째 위치의 T가 D, N 또는 S; 또는 8번째 위치의 T가 I로 치환; 또는 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3의 2번째 위치의 R이 S; 3번째 위치의 G가 E; 4번째 위치의 P가 A 또는 D; 5번째 위치의 Y가 S; 6번째 위치의 Y가 SS; 7번째 위치의 F가 Y; 8번째 위치의 D가 N로 치환되고, 여기서 중쇄 CDR1은 0 내지 5개, 중쇄 CDR2는 0 내지 6개, 중쇄 CDR3은 0 내지 4개의 치환을 포함하는 것 (단, 여기서 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 또는 중쇄 CDR3는 적어도 하나의 치환을 포함함)인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [39] 본 발명에서 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VH 및 3 개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명에서 상기 항체는 마우스로부터 생산된 마우스 항체 및 이로부터 항체의 친화도, 면역성 등을 개선시키기 위해 모항체의 아미노산 서열에 일부를 치

환, 부가 및/또는 결실시킨 변이체를 모두 포함할 수 있다. 상기 변이체는 이에 제한되지 않으나, 그 예로 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 최적화 항체 등을 포함할 수 있다.

- [41] 본 발명에서 상기 변이체는 모항체와 동일한 CDR을 포함하거나, 혹은 동일한 에피토프를 표적으로 하는 조건으로 모항체 CDR 아미노산 서열의 일부가 변이(치환, 부가 또는 결실)된 항체를 포괄적으로 지칭한다. 이러한 변이체는 동일한 에피토프에 대한 결합능이 유지되는 범위 내에서 항체의 친화도 및 면역성 등을 개선시키기 위하여 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [42] 다시 말해서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD300c를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 항-CD300c 항체의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [43] 본 발명에서 용어, "키메라 항체"는 생쥐 항체의 가변영역 및 인간 항체의 불변영역을 재조합시킨 항체로서, 생쥐 항체에 비하여 면역 반응이 크게 개선된 항체이다.
- [44] 본 발명에서 용어, "인간화 항체"는 인간이 아닌 종에서 유래한 항체의 단백질 서열을 인간에서 자연적으로 생산된 항체 변이체와 유사하도록 변형시킨 항체를 의미한다. 그 예로 상기 인간화 항체는 생쥐 유래의 CDR을 인간 항체 유래의 FR과 재조합시켜 인간화 가변영역을 제조하고 이를 바람직한 인간 항체의 불변영역과 재조합시켜 인간화 항체를 제조할 수 있다. 다만, 단순히 CDR 그래프팅만을 할 경우, 인간화 항체의 친화도가 떨어지게 되므로, CDR의 3 차원 구조에 영향을 줄 것으로 생각되는 몇 개의 중요한 FR 아미노산 잔기를 생쥐 항체의 것으로 친화시킴으로써 원래 생쥐 항체의 친화도와 같은 수준으로 올릴 수 있다.
- [45] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 항체는 서열번호 9 또는 서열번호 34로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 10 또는 서열번호 35로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 11 또는 서열번호 36으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 및 서열번호 12, 서열번호 20, 서열번호 27, 서열번호 37 또는 서열번호 49로 기재된 중쇄 CDR1; 서열번호 13, 서열번호 21, 서열번호 28, 서열번호 38 또는 서열번호 50으로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 14, 서열번호 22, 서열번호 29, 서열번호 39,

서열번호 44 또는 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [46] 본 발명의 다른 일 구현예로서, 상기 항체는 서열번호 7, 서열번호 18, 서열번호 25, 서열번호 32, 서열번호 42, 서열번호 47 또는 서열번호 54로 기재된 경쇄 가변영역, 및 서열번호 8, 서열번호 19, 서열번호 26, 서열번호 33, 서열번호 43, 서열번호 48 또는 서열번호 55로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명의 또 다른 일 구현예로서, 상기 항체는 서열번호 15로 기재된 링커를 더 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 서열번호 6, 서열번호 17, 서열번호 24, 서열번호 31, 서열번호 41, 서열번호 46 또는 서열번호 53에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명의 구체예에 따르면, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은,
 [49] 서열번호 61로 기재된 경쇄 CDR1;
 [50] 서열번호 62로 기재된 경쇄 CDR2; 및
 [51] 서열번호 63로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 및
 [52] 서열번호 64로 기재된 중쇄 CDR1;
 [53] 서열번호 65로 기재된 중쇄 CDR2; 및
 [54] 서열번호 66로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 항체는 서열번호 59로 기재된 경쇄 가변영역, 및 서열번호 60로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 본 발명의 다른 일 구현예로서, 상기 항체는 서열번호 15로 기재된 링커를 더 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 서열번호 58에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산분자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현벡터가 도입된 숙주 세포이다.
- [58] 상기 항체 및 이의 항원 결합 단편은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [59] 본 발명에서 사용되는 용어, "핵산 분자"는 DNA 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 상기 핵산 분자에서 기본 구성단위인 뉴클레오티드는 자연의 뉴클레오티드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, (1990) 90:543-584). 본 발명의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자의 서열은 변형될 수 있으며, 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [60] 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 본 발명에서 실질적

인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 80 %의 상동성, 구체적으로 최소 90 %의 상동성, 보다 구체적으로는 최소 95 %의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 의미한다.

- [61] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 그리고 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함하며, 구체적으로 플라스미드 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [62] 본 발명의 벡터에서 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자 및 중쇄 가변영역을 코딩하는 핵산 분자는 프로모터와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.
- [63] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된"은 핵산 발현조절서열 (예컨대, 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [64] 본 발명의 제조합 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예컨대, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [65] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [66] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 E. coli (예컨대, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, E. coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, (1984) 158:1018-1024), 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, (1980) 14:399-445)가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 슈린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터 (*Appl. Environ. Microbiol.* (1998) 64:3932-3938; *Mol. Gen. Genet.* (1996) 250:734-741) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.
- [67] 한편, 본 발명의 제조합 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9,

pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λ gt4- λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 재조합 벡터는 pCL 발현 벡터, 구체적으로 pCLS05 (대한민국 등록특허 제10-1420274호) 발현벡터를 조작하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [68] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 모로니 바이러스의 프로모터 엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다. 구체적으로, 본 발명의 재조합 벡터는 CMV 프로모터를 포함한다.
- [69] 본 발명의 재조합 벡터는 그로부터 발현되는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 또한, 본 발명의 벡터에 의해 발현되는 단백질이 항체이기 때문에 정제를 위한 추가적인 서열 없이도, 발현된 항체는 단백질 A 컬럼 등을 통하여 용이하게 정제할 수 있다.
- [70] 한편, 본 발명의 재조합 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자를 포함할 수 있다.
- [71] 본 발명의 항체를 발현하는 벡터는, 경쇄와 중쇄가 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 경쇄와 중쇄를 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 예컨대 동시 형질전환 (co-transformation) 또는 표적 형질전환 (targeted transformation)을 통하여 숙주 세포로 도입될 수 있다. 동시 형질전환은 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 각각의 벡터 DNA를 동시에 숙주 세포로 도입한 뒤 경쇄와 중쇄를 모두 발현하는 세포를 선별하는 방법이다. 표적 형질전환은 경쇄 (또는 중쇄)를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하고 선별된 세포를 중쇄 (또는 경쇄)를 포함하는 벡터로 다시 형질전환하여 경쇄 및 중쇄 모두를 발현하는 세포를 최종적으로 선별하는 방법이다.
- [72] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포라면 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 추링겐시스 (*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이

세스 (*Streptomyces*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)), 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*)(예를 들면, 스타필로코쿠스 카르노수스 (*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주 세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [73] 상기 벡터의 적합한 진핵 숙주 세포는 아스페르길러스 속 (*Aspergillus species*)과 같은 진균, 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스 (*Schizosaccharomyces*) 및 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*)와 같은 효모, 그 밖의 하등 진핵 세포, 곤충-유래 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포, 그리고 식물 또는 포유동물로부터 유래한 세포를 이용할 수 있다.
- [74] 구체적으로, 숙주 세포는 COS7 세포 (monkey kidney cells), NSO 세포, SP2/0, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO: Chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장 (BHK: baby hamster kidney) 세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 또는 293 세포일 수 있으며, 보다 구체적으로는 차이니즈 햄스터 난소 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [75] 본 발명에서, 숙주 세포로의 "형질전환" 및/또는 "형질감염"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 상기와 같은 방법에는 전기충격유전자전달법 (electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 (CaPO_4) 침전, 염화칼슘 (CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.
- [76]
- [77] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, (a) CD300c를 발현하는 분리된 세포에 dTCTP (dimeric Translationally Controlled Tumor Protein) 및 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 분리된 세포에서 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화 또는 IL-8 분비 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화 또는 IL-8 분비 수준을 후보물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서의 수준과 비교하여 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화 또는 IL-8 분비 수준을 감소시키는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법이다. 여기서, CD300c의 발현은 자연적으로 CD300c를 발현하는 것 또는 인공적으로 CD300c를 발현시킨 것을 모두 포함한다.
- [78] 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 예방 또는 치료할 수 있는 후보 물질의 부재 하에 세포에서의 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화 또는 IL-8 분비 수준을 측정하고, 또한, 상기 후보 물질의 존재 하에서 본 발명의 상기 신호전달 경로의 활성화 또는 IL-8의 분비 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 상기 후보 물질이 존

재할 때의 본 발명의 상기 신호전달 경로의 활성 또는 IL-8의 분비 수준을 상기 후보 물질의 부재 하에서의 수준보다 감소시키는 물질을 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용 제제로 예측할 수 있다.

[79] 후보 물질은 공지된 물질 또는 신규 물질일 수 있으며, 예를 들어 식물 추출물 또는 케미컬 라이브러리 (chemical library)를 통하여 대규모로 스크리닝을 수행할 수 있다.

[80]

[81] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 CD300c의 발현 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 발현 또는 분비 수준을 정상 대조군 시료의 CD300c 발현 또는 분비 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법이다.

[82] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 CD300c의 발현 또는 분비 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 진단용 조성물이다.

[83] 본 발명의 구체적 실시예를 통해 확인한 바와 같이, 이량체 TCTP를 처리함으로써 CD300c의 발현이 증가하고, 반대로 CD300c의 발현 또는 활성을 억제할 경우 TCTP 이량체에 의해 유도되는 신호전달경로 및 사이토카인 분비가 감소하므로, 분리된 생물학적 시료로부터 CD300c의 발현 또는 분비 수준을 확인함으로써 TCTP 연관 질환, 즉 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 진단이 가능하다.

[84] 본 발명에서 용어, "진단"은 생물학적 시료 또는 조직 샘플에서 본 발명의 CD300c의 존재 또는 부재를 측정함으로써, 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 또한, "마커 또는 진단 마커 (diagnosis marker)"란 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 가진 개체를 정상세포 또는 정상 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 가진 세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 (단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 진단 마커는 정상 세포 또는 조직의 세포에 비하여, 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 세포에서 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이는 CD300c이다.

[85] 본 발명에서 CD300c 발현 수준을 측정하는 것은 CD300c의 mRNA 발현 수준을 측정하거나 CD300c 단백질 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[86] 상기 "mRNA 발현 수준 측정"이란 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 알려지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (real-time RT-PCR), RNase 보호 분석

법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [87] 상기 "단백질 발현 수준 측정"이란 알리지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아를 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 알리지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인한다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (complement fixation assay), FACS, 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [88] 일 예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 본 발명의 CD300c의 mRNA에 대한 프라이머 (primer) 쌍, 프로브 (probe), 또는 안티센스 뉴클레오티드 (anti-sense nucleotide)일 수 있으며, 본 발명의 CD300c의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 당업자가 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 뉴클레오티드 서열을 용이하게 디자인할 수 있다. 다른 일 예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 항체일 수 있다.

[89]

- [90] 본 발명의 실시 형태는 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[91]

발명의 효과

- [92] 본 발명에서는 CD300c 세포 외 도메인 (extracellular domain)이 이량체 TCTP와 상호작용하는 것을 확인하였으며, 이에 따라 CD300c는 알리지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 항-CD300c 항체는 알리지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료에 유용하게 이용되거나 알리지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아 관련 약물 스크리닝 또는 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[93]

도면의 간단한 설명

- [94] 도 1는 풀-다운 (pull-down) 분석을 통하여 CD300c 세포 외 도메인 또는 대조군 단백질이 이량체 또는 단량체 TCTP와 상호작용하는 것을 웨스턴 블롯 (western blot)으로 분석한 결과이다.

- [95] 도 2는 이량체 TCTP와 다양한 농도의 CD300c 세포 외 도메인을 전배양 (preincubation) 한 후 기관지 상피세포에 처리하여 IL-8 분비능을 확인한 그래프이다.
- [96] 도 3는 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP를 처리하고 시간 경과에 따른 CD300c의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.
- [97] 도 4a는 기관지 상피세포에서 CD300c의 녹다운 효율성을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- [98] 도 4b는 기관지 상피세포에서 CD300c의 녹다운에 따른 이량체 TCTP 처리에 의한 사이토카인 분비능을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [99] 도 5는 NF- κ B 활성 의존적 리포터 유전자가 발현된 세포주에서 CD300c의 과발현에 따른 이량체 TCTP 처리에 의한 NF- κ B 활성을 측정된 결과이다.
- [100] 도 6a는 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP에 대한 항-CD300c scFv-Fc 항체의 저해 효과를 확인하기 위해 1 차 스크리닝한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [101] 도 6b는 CD300c 단백질에 대한 4 종의 항-CD300c scFv-Fc 항체의 결합력을 ELISA를 통해 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [102] 도 7a는 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP에 대한 항-CD300c scFv-Fc 항체의 저해 효과를 확인하기 위해 2 차 스크리닝한 결과를 보여주는 그래프이다.
- [103] 도 7b는 CD300c 단백질에 대한 3 종의 항-CD300c scFv-Fc 항체의 결합력을 JEW-195 항체와 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [104] 도 8는 7 종의 항-CD300c scFv-Fc 항체의 아미노산 서열을 나타낸 도이다.
- [105] 도 9는 JEW-195 항체를 환원 및 비환원조건에서 SDS-PAGE 및 쿠마시 브릴리언트 블루 (Coomassie brilliant blue) 염색한 결과를 나타낸 도이다.
- [106] 도 10는 CD300c를 과발현하는 HEK293T 세포에서 JEW-195 항체가 세포 표면의 CD300c에 결합하는 것을 유세포 분석 (flow cytometry)을 통해 확인한 결과이다.
- [107] 도 11는 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP의 NF- κ B 신호전달 경로에 대한 JEW-195 항체의 작용을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.
- [108] 도 12는 마우스 CD300c 단백질에 대한 4 종의 항-CD300c scFv-Fc 항체의 결합력을 ELISA를 통해 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [109] 도 13는 JEW-M10 항체를 환원 및 비환원조건에서 SDS-PAGE 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색한 결과를 나타낸 도이다.
- [110] 도 14는 천식 마우스 모델의 제작 방법과 JEW-M10 항체 투여 시기를 나타낸 도이다.
- [111] 도 15는 마우스의 기관지폐포세척액 내 세포를 Diff-Quick으로 염색한 결과 및 총 세포수를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [112] 도 16a는 마우스의 폐 조직을 PAS 염색법으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [113] 도 16b는 마우스의 기관지폐포세척액 내 MUC5AC 생성량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[114] 도 17a는 마우스의 폐 조직 내 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[115] 도 17b는 마우스의 기관지폐포세척액 내 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성량을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[116] 본 발명자들은 이량체 TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)의 수용체로 세포막에 존재하는 CD300c를 최초로 규명하였다. CD300c를 억제할 경우 이량체 TCTP와의 상호작용을 저해함으로써 이량체 TCTP의 사이토카인 유사 활성을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에, CD300c를 발현하고 있는 다양한 세포를 표적으로 하여 알러지 질환, 염증성 질환, 말라리아와 같은 이량체 TCTP 관련 질환의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[117]

[118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[119]

[120] <실시예 1> 재조합 이량체 TCTP 단백질의 발현 및 정제

[121] 이량체 TCTP 단백질을 제작하기 위하여, TCTP (서열번호 1)의 N-말단 아미노산 10 개가 결실된 유전자 (서열번호 2)가 삽입된 pRSET A (Invitrogen) 발현 벡터를 제작하고, 이를 *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Merck)에 형질전환시킨 후 배양하여 재조합 단백질의 합성을 유도하였다.

[122] 배양액을 원심분리한 후 생성된 펠렛을 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 1 mM PMSF (pH 8.0) 용액에 재현탁하고, 초음파 파쇄기를 통해 세포를 파쇄하였다. 이후, 원심분리를 통하여 얻은 상층액을 Ni-NTA Agarose (Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 순도 높은 단백질을 얻기 위하여 HiTrap Q HP 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (Cytiva)을 사용하여 단백질을 추가 정제하였다. 칼럼은 3 차 증류수를 흘려주어 세척한 후 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4)를 약 20 분간 흘려주어 안정화시켰다. 앞서 정제한 단백질을 칼럼에 주입하고 0~1 M NaCl의 농도 구배에 따라 0.8 ml/min의 속도로 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질은 비환원 조건의 SDS-PAGE 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색을 통해 이량체 TCTP가 확인되는 분획을 선별하였다. PD-10 칼럼 (cytiva)을 사용하여 버퍼 (buffer)를 PBS (phosphate buffered saline)로 교환하고, Amicon Ultra Centrifugal Filters (Millipore)를 사용하여 단백질을 농축하였다.

[123]

[124] <실시예 2> 이량체 TCTP와 CD300c 단백질 간의 상호작용 확인

[125] 이량체 TCTP와 CD300c 단백질 간의 상호작용을 확인하기 위해 Dynabeads Protein A (Invitrogen)을 사용하여 풀-다운 분석을 진행하였다. 분석을 위하여 제

조합 인간 CD300c-Fc 키메라 단백질 (BioLegend)을 사용하였다. 이 단백질은 CD300c (서열번호 3)의 세포 외 도메인에 해당하는 서열 Met29-Arg183와 C-말단에 hIgG Fc를 포함하고, 293E 세포에서 발현된 것이다. 대조군으로는 재조합 인간 IgG1 Fc 단백질 (BioLegend)을 사용하였다. 인간 면역글로불린 (Ig)이 단백질 A 비드 (protein A bead)와 결합하기 때문에 비드와 상기의 단백질들을 상온에서 30 분 동안 배양하였다. 0.02 % Tween-20이 포함된 PBS로 3 번 세척한 후 단백질이 결합된 비드를 재조합 이량체 또는 단량체 TCTP와 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 3 번의 세척으로 결합하지 않은 단백질을 제거하고, 비드에 결합한 단백질들을 용출하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 비환원조건에서 수행되었으며 항-TCTP 항체 (Santa Cruz Biotechnology)로 검출하였다.

[126] 도 1에서 나타난 바와 같이, CD300c-Fc 단백질이 결합된 비드에 단량체 TCTP 보다 이량체 TCTP가 높은 수준으로 검출되는 것을 통해 CD300c 세포 외 도메인과 이량체 TCTP가 상호작용하는 것을 확인하였다. 대조군인 IgG1-Fc 단백질이 결합된 비드에는 단량체와 이량체 TCTP 모두 거의 검출되지 않았다.

[127]

[128] <실시예 3> 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP에 대한 CD300c 세포 외 도메인의 IL-8 분비 억제 효능 확인

[129] 상기 결과를 통하여 이량체 TCTP와 CD300c 단백질이 결합하는 것을 확인하였다. 기관지 상피세포주인 BEAS-2B 세포는 이량체 TCTP에 의해 활성화되어 IL-8 사이토카인을 분비하기 때문에, 이를 이용하여 이량체 TCTP에 대한 CD300c 세포 외 도메인의 억제 효능을 평가하였다. BEAS-2B 세포는 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에서 37 °C, 5 % 이산화탄소 존재 하에 배양하였다. 재조합 CD300c 단백질 (Sino Biological)은 CD300c (서열번호 3)의 세포 외 도메인 Met1-Arg183으로 HEK293 세포에서 발현하였다. CD300c 세포 외 도메인 (0~32 µg/ml)을 이량체 TCTP (8 µg/ml)와 상온에서 30 분 동안 전 배양하고 BEAS-2B 세포에 처리하여 20 시간 동안 배양하였다. IL-8 ELISA 키트 (Biolegend)를 이용해 세포 상층액 내에 분비된 IL-8 수준을 정량하였다.

[130] 도 2에서 나타난 바와 같이, BEAS-2B 세포에 이량체 TCTP 단독 처리시 증가한 IL-8 분비량은 CD300c 세포 외 도메인과 전배양함으로써 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이로부터, CD300c 세포 외 도메인은 이량체 TCTP와 세포막의 CD300c 간의 상호작용을 저해함으로써 세포 내 활성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

[131]

[132] <실시예 4> 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP의 처리에 따른 CD300c의 발현 변화 확인

[133] 이량체 TCTP의 처리에 의한 CD300c 단백질의 발현 변화를 확인하기 위해 BEAS-2B 세포를 6-웰 플레이트에 배양하고, 이량체 TCTP (8 µg/ml)를 각각 0.5, 1, 2, 4, 8, 20, 24 시간 동안 처리하였다. 이후, PBS로 세척하고, 50 mM Tris-

HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.25 % 디옥시콜레이트, 1 % Triton X-100, 인산화효소 억제제 콕테일 (Sigma-Aldrich), 단백질을 분해효소 억제제 (Roche)를 포함하는 버퍼로 세포를 용해하였다. 원심분리를 통하여 얻은 상층액은 브래드포드 (bradford) 분석을 통해 농도를 측정하였고, 항-CD300c 항체 (Abcam)와 항-GAPDH 항체 (Cell Signaling Technology)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석하였다.

[134] 도 3에서 나타난 바와 같이, 이량체 TCTP 처리에 의해 CD300c의 발현이 시간의 경과에 따라 증가하는 것을 확인하였다.

[135]

[136] <실시예 5> CD300c의 녹다운에 따른 이량체 TCTP에 의한 사이토카인 분비 변화 확인

[137] 이량체 TCTP에 의한 염증 반응이 CD300c를 매개로 발생하는지 확인하기 위해 BEAS-2B 세포에서 CD300c를 녹다운하였다. CD300c siRNA (Thermo Fisher Scientific) 또는 control siRNA (Santa Cruz Biotechnology)를 Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 제조사의 권장 절차에 따라 세포에 형질주입하였고, 24 시간 후 이량체 TCTP (0, 5 또는 10 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 후 20 시간 동안 배양하였다. ELISA 키트를 사용하여 세포 상층액 내에 분비된 IL-8 및 IL-6 수준을 정량하였다.

[138] 도 4a에서 나타난 바와 같이, BEAS-2B 세포에서 CD300c의 녹다운으로 CD300c의 발현이 50 % 감소하였다.

[139] 도 4b에서 나타난 바와 같이, 대조군인 siCtrl에서 이량체 TCTP 처리로 인해 증가한 IL-8 및 IL-6의 분비량은 CD300c의 녹다운으로 인해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 상기 결과로부터, 이량체 TCTP는 CD300c 수용체를 매개로 염증 반응을 유발한다는 것을 확인하였다.

[140]

[141] <실시예 6> CD300c의 과발현에 따른 이량체 TCTP에 의한 NF- κ B 활성화 확인

[142] CD300c의 과발현에 따른 이량체 TCTP의 세포 신호전달 경로의 조절을 확인하기 위해 NF- κ B 활성화 의존적 리포터 유전자가 발현된 HEK293 세포주를 이용하였다. 세포는 10 % FBS, 1 % 비필수아미노산, 1 mM Na 피루브산염, 1 % 페니실린/스트렙토마이신, 50 $\mu\text{g/ml}$ 하이그로마이신 B를 포함한 MEM 배지 (cytiva)에서 37 °C, 5 % 이산화탄소 존재 하에 배양하였다. CD300c (서열번호 4)를 포함하는 pCMV6-CD300c 벡터 (ORIGENE)를 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 제조사의 권장 절차에 따라 세포에 형질주입시켰고, 24 시간 후 400 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 G418이 첨가된 배지에서 배양하였다. 선별된 세포를 96-웰 화이트 플레이트에 배양하고, 이량체 TCTP (0, 8 또는 16 $\mu\text{g/ml}$)로 6 시간 동안 처리한 후, ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)을 이용해 제조사의 권장 절차에 따라 루시페라아제 활성을 측정하였다.

[143] 도 5에서 나타난 바와 같이, CD300c를 과발현하는 세포에서 이량체 TCTP 처리 농도에 따른 NF- κ B 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 이량체 TCTP는 CD300c를 통해 NF- κ B 신호전달체계를 활성화하는 것을 확인하였다.

[144]

[145] <실시예 7> 항-CD300c 단클론항체의 제조

[146] 7-1. 항-CD300c 단클론항체 선별

[147] scFv (single-chain variable fragment) 클론은 인간 CD300c 세포 외 도메인 Met1-Arg183인 재조합 CD300c 단백질 (Sino Biological)을 사용한 패닝 과정을 통해 인간 scFv 파지 라이브러리로부터 분리되었다. 5 μ g의 CD300c 세포 외 도메인 항원을 면역 시험관 표면에 흡착시켰다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline-Tween20)로 3 회 세척하고, 3 % 스킴 밀크로 상온에서 1 시간 동안 블락킹한 후 10^{13} pfu 항체 파지 라이브러리를 첨가하여 항원과 반응시켰다. PBST로 세척한 후 100 mM TEA를 첨가하여 정치함으로써 항원 특이적으로 결합되어 있는 파지를 회수하였고, 1 M Tris-HCl (pH 7.4)로 중화시킨 후 회수된 파지의 수를 확인하기 위하여 대장균에 감염시킨 다음 SB 배양 배지에 보관하였다. 전 회차 파지 용액을 취해 대장균에 재접종 후 헬퍼 파지를 첨가하여 증폭 작업을 진행하였다. 패닝 과정을 3 회 반복함으로써 CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체 후보군을 확보하였다. 항원에 결합하는 클론을 확인하기 위하여 96-웰 플레이트에 1 μ g/ml 농도의 항원을 중탄산나트륨 완충액 (pH 9.6)으로 코팅하였다. PBST로 3 회 세척하고, 3 % 스킴 밀크로 1 시간 동안 블락킹하였다. 이후, 확보한 주변세포질 부위 추출물을 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시켜 항원과 결합하였다. 검출용 2 차 항체를 1 : 2,000 희석하여 1 시간 동안 배양하고, TMB 기질을 첨가하여 반응시켰다. 5 분 후 1 N HCl로 반응을 멈추고, 450 nm의 흡광도를 측정하여 양성 클론을 선별하였다. 상기 결과를 통하여 480 개의 클론에서 CD300c에 양성 반응을 보이는 148 개의 클론을 선별하였다. 선별된 양성 클론은 DNA 시퀀싱을 실시하여 클론의 염기 서열을 분석하였다. 그 결과, 서로 다른 아미노산 서열을 가지고 있는 20 종의 항-CD300c 단클론항체를 확보하였다.

[148] 세포 실험을 통해 효능이 우수한 7 종의 항-CD300c scFv 항체를 확인하였으며, 도 8에 이들의 서열을 나타내었다.

[149] 또한, 7 종의 항-CD300c scFv 항체의 DNA 서열 및 아미노산 서열을 표 1에 나타내었다.

[150] [표1]

항체	서열				
JEW-22	DNA 서열		GAGCTCGCACTCAGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAAGCGAGTCACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTATCAACAGAAATCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGGTCCAATTTGGAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGGTGGTTCTCTAGATCTTCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGAAGTGGAGTGGATTGGGCGTATTTATAGTAGTGGGAGCAACAAGTACAACCCCTCCCTCAAGAGCGAGTCAACATATCAAAGGACACGTCCAAGAATCAGTTCTCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTTCAGTGGCTGGACAGAACGTCGACTACTGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 5)		
	아미노산 서열	전장	ELALTQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNNWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKGGSSRSSSSGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQPAGKLEWIGRIYSSGSTKYNPSLKSRYTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCASSVAGQNVDFWGQGLTVTVSS (서열번호 6)		
		가변영역	경쇄 가변영역		
			TQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNNWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIK (서열번호 7)		
			중쇄 가변영역		
		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGSYYWSWIRQPAGKLEWIGRIYSSGSTKYNPSLKSRYTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCASSVAGQNVDFWGQGLTVTVSS (서열번호 8)			
		CDR	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
			HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)
	중쇄 CDR1		중쇄 CDR2	중쇄 CDR3	
		GGSISSGSYY (서열번호 12)	IYSSGST (서열번호 13)	ASSVAGQNVDF (서열번호 14)	
링커	GGSSRSSSSGGGSGGGG (서열번호 15)				

JEW-139	DNA 서열		GAGCTCGTGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCAAGCAGTCAACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTATCAACAGAAATCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCGTCCAATTTGGAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGCGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACTTTGGCGGAGGGACAGACTGGAGATTAAAGGTGGTTCTCTAGATCTTCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCGCTGGATTACCTTTGGTGGTTATGCCATGCACTGGGTCGGCAAGCTCCAGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATGGTGGTGATATAGCCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGGGAGCTGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCAAAATCTAGCTGGTGAAGGAGATGCCTTCGATATCTGGGGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 16)		
	아미노산 서열	전장	ELVMTQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNIWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSATDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTRLEIKGGSSRSSSSGGGGSGGGQITLKESGGGLVQPGRLRLSCAAAGFTFGGYAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNGGDIAYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLGAEDTALYYCAKSSWWKGAFDIWGQGTMTVSS (서열번호 17)		
		가변 영역	경쇄 가변영역		
			MTQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNIWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSATDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTRLEIK (서열번호 18)		
			중쇄 가변영역		
			QITLKESGGGLVQPGRLRLSCAAAGFTFGGYAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNGGDIAYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLGAEDTALYYCAKSSWWKGAFDIWGQGTMTVSS (서열번호 19)		
		CDR	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
			HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)
			중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3
			GFTFGGYA (서열번호 20)	ISWNGGDI (서열번호 21)	AKSSWWKGAFDI (서열번호 22)
		링커	GGSSRSSSSGGGGSGGGG (서열번호 15)		
JEW-195	DNA 서열		GAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGCCAAGCAAGTCAACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTATCAACAGAAATCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCGTCCAATTTGGAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT		

		CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTAACCCGCTCACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGAACCGTCCTAGGCGGTGGTTCTCTAGATCTTCTCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTTAGGAATTATGCCATGAGCTGGTTCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAATGGTAGAGGTGATACCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATACTACTGTGCAAGTGGCGCCTACTATTACAACACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 23)		
아미노산 서열	전장	ELQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVTVLGGGSSRSSSSGGGGSGGGGVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFRNYAMSWVRQTPGKGLEWWSAINGRGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGAYYYNYWQGTLVTVSS (서열번호 24)		
	가변영역	경쇄 가변영역		
		QMTQSPSSLSASVGRVTITCQASHDISKYLNWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVTVLG (서열번호 25)		
		중쇄 가변영역		
		QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFRNYAMSWVRQTPGKGLEWWSAINGRGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGAYYYNYWQGTLVTVSS (서열번호 26)		
	CDR	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
		HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)
중쇄 CDR1		중쇄 CDR2	중쇄 CDR3	
GFNFRNYA (서열번호 27)		INGRGDTT (서열번호 28)	ASGAYYYNY (서열번호 29)	
링커	GGSSRSSSSGGGGSGGGG (서열번호 15)			
JEW-235	DNA 서열	GAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCTCAAAGTCTGCGACCCCGGGCAGACGGTCACCATCTCCTGTTCTGGAAGCCACTCCAACATCGGGACTAATACTGTGAAGTGGTACCAGCAACTCCAGGGGCGGCCCCAAGCTCCTCATCTACAGTGATTCTTTTCGAOCCACTGGGGTCCCTGGCCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCGGCTCCCTGGTCATCAGTGGGCTCCGTCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCCGGTGTTGGCGGAGGGACCCAGCTGACCGTCTCGGGGGTGGTTCTCTAGATCTTCTCTCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGG		

JEW-314		GCCTCAGTAAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACGTTTAAOCAGTTATGGT ATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC AGTGTTTACAATGGTAACACAACTCCGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACC ATGACCACAGACACATCCACGAGCAGAGCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGA TCTGACGACAAGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGATAGCAGCTCGTTTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 30)				
	아미노산 서열	전장	ELVLTQPPSTSATPGQTVTI SCSGSHSNI GTNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSDSF RPTGVPGRFSGSKSGTSASLVI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTQLT VLGGSSSRSSSSGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYG ISWVRQAPGGGLEWMGWISVYNGNTNSAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCAREDSSTFDYWGQGLTVTVSS (서열번호 31)			
			가변 영역	경쇄 가변영역 VLTQPPSTSATPGQTVTI SCSGSHSNI GTNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSDSFRP TGVPGRFSGSKSGTSASLVI SGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTQLTVL G (서열번호 32) 중쇄 가변영역 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISVY NGNTNSAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREDSSTFDYWG QGLTVTVSS (서열번호 33)		
		CDR		경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
				HSNIGTNT (서열번호 34)	SDS (서열번호 35)	AAWDDSLNGPV (서열번호 36)
		링커	중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3	
	GYTFTSYG (서열번호 37)		ISVYNGNT (서열번호 38)	AREDSSTFDY (서열번호 39)		
		GGSSSRSSSSGGGSGGGG (서열번호 15)				
		DNA 서열	GAGCTCGTGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAAGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCAAGCGAGTCACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTAT CAACAGAAATCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCGTCCAATTG GAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAG AGTTACAGTACCCCGTCACTTTGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAAGGT GGTTCCCTCTAGATCTTCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAG GTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGGAATTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGACTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAATGGTAGAGGT GATACCACATACTACGCAGACTCOGTGAAGGACCGATTACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACTCACTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG			

아미노산 서열		GCCGTGTATTACTGTGCGGCCGGTGCTTATAGCAGCTCGTTTGCGGAAGAGGGC CAGGGAACCTGGTCATCGTCTCCTCA (서열번호 40)		
	전장	ELVMTQSPSSLSASVRDRVITTCQASHDISKYLNIWYQQKSGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTQVDIKG GSSRSSSSGGGSGGGGQVQLQESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNFRNYAMSWV RQTPGKGLEWVSAINGRGDTTYADSVKDRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAGAYSSSFGEEGGTLVIVSS (서열번호 41)		
		가변 영역	경쇄 가변영역	
			MTQSPSSLSASVRDRVITTCQASHDISKYLNIWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTQVDIK (서열번호 42)	
			중쇄 가변영역	
			QVQLQESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNFRNYAMSWVRQTPGKGLEWVSAINGR GDTTYADSVKDRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGAYSSSFGEE GGTLVIVSS (서열번호 43)	
	CDR	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
		HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)
		중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3
		GFNFRNYA (서열번호 27)	INGRGDTT (서열번호 28)	AAGAYSSSFG (서열번호 44)
	링커	GCSSRSSSSGGGSGGGG (서열번호 15)		
JEW-332	DNA 서열		GAGCTCAGACTCAGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCAAGCGAGTCACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTAT CAACAGAAATCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCGTCCAATTTG GAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAATTTACTACTGTCAACAG AGTTACAGTACCCGCTCACTTTGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGGT GGTTCTCTAGATCTTCTCTCTGCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAG GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCCATGACCTGGGT CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGT GGTAGCACATACTACGAGACTCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGAC AACGCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACAG GCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGCCCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 45)	
	아미	전장	ELTLTQSPSSLSASVDRVTITTCQASHDISKYLNIWYQQKSGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFAIYYCQQSYSTPLTFGGGTQKLEIKG	

	노산 서열		GSSRSSSSGGGGSGGGGQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMTWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGPYFDYWGQGLTVTVSS (서열번호 46)		
		가변 영역	경쇄 가변영역		
			TQSPSSLSASVGDRTITCQASHDISKYLNWYQQKSGKAPKLLIYDASNLETGV PSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFAIYYCQQSYSTPLTFGGGKLEIK (서열번호 47)		
			중쇄 가변영역		
			QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPYFDYWGQ GTLTVTVSS (서열번호 48)		
	CDR		경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
			HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)
			중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3
			GFTFSSYA (서열번호 49)	ISGSGGST (서열번호 50)	ARGPYFDY (서열번호 51)
	링커		GGSSRSSSSGGGGSGGGG (서열번호 15)		
JEW-375	DNA 서열		GAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGCCAAGCGAGTCACGACATTAGCAAATATTTAAATTGGTAT CAACAGAAATCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGOGTCAATTTG GAAACAGGAGTCCCGTCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTACTACTGTCAACAG AGTTACAGTACCCCGCTCACTTTGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAAGGT GGTTCTCTAGATCTTCTCTCTGTTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAG GTGCAGCTACAGCAGTGGGGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGGGGCTCCCTGAGA CTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGGAATTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAATGGTAGAGGT GATACCACATACTACGCAGACTCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGGACACACTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGCCCGTACTACTTTGACTACGGGGGCCAGGGA ACCCTGGTCACGTCTCCTCA (서열번호 52)		
	아미 노산 서	전장	ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASHDISKYLNWYQQKSGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVDIKG GSSRSSSSGGGGSGGGGQVQLQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWV RQTPGKGLEWVSAINGRGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGPYFDYGGQGLTVTVSS (서열번호 53)		
		가변	경쇄 가변영역		

	열	영역	QMTQSPSSLSASVGDRTITCQASHDISKYLHWYQQKSGKAPKLLIYDASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVDIK (서열번호 54)		
		중쇄 가변영역			
		QVQLQQWGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFRNYAMSWVRQTPGKGLEWVSAINGR GDTTYYADSVKGRFTISRDNSKDTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPYFDFYGGQ GTLVTVSS (서열번호 55)			
	CDR	경쇄 CDR1	경쇄 CDR2	경쇄 CDR3	
		HDISKY (서열번호 9)	DAS (서열번호 10)	QQSYSTPLT (서열번호 11)	
		중쇄 CDR1	중쇄 CDR2	중쇄 CDR3	
		GFNFRNYA (서열번호 27)	INGRGDTT (서열번호 28)	ARGPYFDFY (서열번호 51)	
	링커	GGSSRSSSSGGGGSGGGG (서열번호 15)			

[157]

[158] 7-2. 항-CD300c 단클론항체의 제작 및 정제

[159] 항-CD300c 단클론항체를 제작하기 위해 인간 scFv와 IgG1이 융합된 벡터에 삽입하였고, 293F 세포에 형질전환 하여 발현을 유도하였다. 50 ml의 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 protein G agarose (GE) 레진을 이용해 정제하였고, 염기서열 분석 및 제작 과정을 통해 서로 다른 아미노산 서열을 가진 20 종의 항체가 선별 및 정제되었다. 항체의 순도를 확인하기 위해 2 µg의 항체를 SDS-PAGE 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색을 진행하였다.

[160] 도 9에서 예시적으로 나타난 바와 같이, 7 종의 항-CD300c scFv-Fc 항체들에 대하여 환원 및 비환원 상태에서의 항체의 순도가 95 % 이상으로 제작 및 정제되었음을 확인하였다.

[161] 7-3. 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP에 대한 항-CD300c 단클론항체의 IL-8 분비 억제 효능 확인

[162] 단클론항체의 효능을 확인하기 위하여 BEAS-2B 세포를 이용하였다. BEAS-2B 세포에 항-CD300c 단클론항체 (50 µg/ml)를 37 °C에서 30 분 동안 전처리하고, 이량체 TCTP (4 µg/ml)을 추가하여 20 시간 동안 배양하였다. 세포 상층액을 회수하고 분비된 IL-8의 수준을 ELISA를 통해 확인하였다.

[163] 도 6a 및 도 7a에서 나타난 바와 같이, 1 차 스크리닝을 통해 4 종의 항-CD300c 단클론항체인 JEWR-22, JEWR-139, JEWR-195, JEWR-235 항체 (도 6a), 2차 스크리닝을 통해 3 종의 항-CD300c 단클론항체인 JEWR-314, JEWR-332, JEWR-375 항체 (도 7a)가 이량체 TCTP에 의한 IL-8 분비를 억제하는 효능을 가지는 것을 확인하였다.

[164] 7-4. 항-CD300c 단클론항체의 항원 결합력 확인

[165] 상기 실시예에서 정제된 항체 중에서 높은 항원 결합력을 갖는 단클론항체를 선별하기 위하여 ELISA 통해 결합 분석 실험을 수행하였다. 96-웰 플레이트에

1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CD300c 항원을 PBS로 코팅하였다. 다음날 PBST로 3 회 세척 후, 1 % 스킴밀크로 상온에서 1 시간 동안 블락킹하였고, 7 종의 항-CD300c 항체를 0~1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, HRP 결합된 항-인간 IgG 항체를 1 : 20,000 희석하여 1 시간 동안 반응시킨 후 TMB 기질을 추가하여 발색을 유도하고, 1 N의 HCl 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료하였다. 450 nm의 흡광도를 측정해 항체의 결합력을 확인하였으며, 7 종의 항-CD300c 항체에 대한 결과는 표 2에 나타내었다.

[166] [표2]

항-CD300c 항체	EC ₅₀ (ng/ml)
JEWR-22	60.2
JEWR-139	67.1
JEWR-195	7.5
JEWR-235	180.1
JEWR-314	31
JEWR-332	14.6
JEWR-375	29.5

[167]

[168] 도 6b 및 도 7b에 나타난 바와 같이, CD300c에 대한 결합력은 1 차 스크리닝을 통해 JEWR-195 > JEWR-22 > JEWR-139 > JEWR-235 순으로 높음을 확인하였으며 (도 6b), 결합력이 가장 높았던 JEWR-195 항체를 포함한 2 차 스크리닝을 통하여 JEWR-195 > JEWR-332 > JEWR-375 > JEWR-314 순으로 높음을 확인하였다 (도 7b).

[169] 세포막에 존재하는 CD300c와 단클론항체의 결합력을 확인하기 위하여 CD300c를 과발현하는 HEK293T 세포주를 이용하였다. 인간 CD300c를 과발현하는 세포주는 pCMV6-CD300c 벡터를 Lipofectamine 2000을 이용하여 제조사의 권장 절차에 따라 형질주입시켰고, 24 시간 배양한 후 세포를 accutase (Innovative Cell Technologies)로 플레이트에서 분리하였고 1 % BSA로 세척하여 항-CD300c 단클론항체 (10 $\mu\text{g/ml}$)를 4 °C, 30 분 동안 반응시켰다. 이후 결합하지 않은 항체를 세척한 후 FITC 표지된 항-인간 IgG Fc 2 차 항체 (Invitrogen)를 4 °C, 30 분 동안 염색하고, 세척한 후 유세포 분석을 통하여 분석하였다.

[170] 도 10에서 나타난 바와 같이, CD300c의 과발현은 PE 항-CD300c TX45 항체 (BD Biosciences)를 통해 확인되었으며, 증가된 형광강도를 통해 JEWR-195 항체가 세포막에 발현된 CD300c와 결합함을 확인하였다.

[171]

- [172] <실시예 8> 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP의 NF- κ B 신호전달 경로에 대한 항-CD300c 단클론항체의 작용 확인
- [173] 상기 실시예에서 항원에 대한 결합력과 이량체 TCTP의 활성 억제 효과가 우수한 JEW-195 항체의 작용 기전을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 진행하였다. BEAS-2B 세포를 6-웰 플레이트에 배양하고, JEW-195 항체 (0, 30 또는 50 μ g/ml)를 세포에 30 분 동안 전처리한 후 이량체 TCTP (4 μ g/ml)를 처리하여 1 시간 동안 배양하였다. 인산화된 I κ B α (p-I κ B α), I κ B α , 인산화된 p65, p65, GAPDH (Cell signaling)의 발현은 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다.
- [174] 도 11에서 나타난 바와 같이, 이량체 TCTP에 의해 증가된 p-I κ B α 와 p-p65는 JEW-195 항체의 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.
- [175] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 항-CD300c 단클론항체는 기관지 상피세포에서 이량체 TCTP에 의한 NF- κ B 신호 전달을 억제하고, IL-8 사이토카인의 분비를 감소시켜 알러지 반응을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [176]
- [177] <실시예 9> 천식 마우스 모델에서 항-CD300c 단클론항체의 항염증 효과 확인
- [178] 9-1. 항-마우스 CD300c 단클론항체 선별
- [179] 천식 마우스 모델에서 CD300c 억제가 항염증 효능을 발휘하는지 확인하기 위해 마우스 CD300c에 특이적으로 결합하는 항체를 새롭게 제작하였다.
- [180] 마우스 CD300c (서열번호 56)의 세포 외 도메인에 해당하는 서열 His22-His188인 재조합 CD300c 단백질 (MyBioSource)을 사용하여 패닝 과정을 수행하였으며, 인간 scFv 파지 라이브러리로부터 scFv 클론을 분리하였다. 이 과정은 실시예 7-1과 동일한 방법으로 진행되었으며, 총 288개의 클론 중 마우스 CD300c에 양성 반응을 보이는 14개의 클론을 선별하였다. 이후, 선별된 클론의 DNA 시퀀싱을 통해 염기 서열을 분석한 결과, 서로 다른 아미노산 서열을 가진 4종의 항-마우스 CD300c 단클론항체를 확보하였다.
- [181] 확보된 4종의 단클론항체는 실시예 7-2와 동일한 방법으로 제작 및 정제되었으며, 정제된 항체 중에서 높은 항원 결합력을 가진 단클론항체를 선별하기 위해 실시예 7-4와 동일한 방법으로 ELISA를 수행하였다. 도 12에서 나타난 바와 같이, 마우스 CD300c에 대한 결합력은 JEW-M10 > JEW-M161 > JEW-M79 > JEW-M116 순으로 높음을 확인하였다.
- [182] 또한, 도 13에서 나타난 바와 같이, 항원 결합력이 우수한 단클론항체 JEW-M10은 환원 및 비환원 상태에서의 순도가 95 % 이상으로 정제되었음을 확인하였다. 표 3에는 JEW-M10의 DNA 서열 및 아미노산 서열을 나타내었다.
- [183] [표3]

항체	서열				
JEW-R-M10	DNA 서열		GAGCTCGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATC ACCCTCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATATTGGTGATTATAACTATGTCTCC TGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAACTCATAATTTATGAGGTCAAT AATGGGCCCTCAGGGGTTTCTATTGGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACAAG GCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGC ACTTCATATACACCAGGAGCATTGTCTTCGGCGGAGGGACCCAGCTGACCGTC CTCGGTGGTGGTTCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGGGT GGTGGGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACCGCCTGGGGGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTGATGATTATGGCATG AGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAAT TGGAATGGTGGTAGCACAATTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTATCATC TCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCC GAGGACACGGCCCTGTATTATTGTGTTCTGTGGTCCCGACCTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCTGCTCATCGTCTCCTCA (서열번호 57)		
	아미노산 서열	전장	ELALTQPPSVSGSPGQSITLSCTGTSSDIGDYNVSWYQQHPGKAPKLI IYEVN NRPSGVS I RFGSKSGNTASLT I SGLQAEDEADYYCTSYTPRS IVFGGGTQLTV LGGSSRSSSSGGGSGGGGEVQLVQSGGQVWRPGSLRLSCAASGFTFDYGM SWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTIYADSVKGRFI I SRDIAKNSLYLQMNSLRA EDTALYYCVRGPDLDYWGQGTLLIVSS (서열번호 58)		
		가변 영역	경쇄 가변영역		
			ELALTQPPSVSGSPGQSITLSCTGTSSDIGDYNVSWYQQHPGKAPKLI IYEVN NRPSGVS I RFGSKSGNTASLT I SGLQAEDEADYYCTSYTPRS IVFGGGTQLTV LG (서열번호 59)		
			중쇄 가변영역		
		EVQLVQSGGQVWRPGSLRLSCAASGFTFDYGM SWVRQAPGKGLEWVSGINWNG GSTIYADSVKGRFI I SRDIAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRGPDLDYWGQ GTLLIVSS (서열번호 60)			
	CDR	경쇄 CDR1		경쇄 CDR2	경쇄 CDR3
		SSDIGDYNVVS (서열번호 61)		EVNN (서열번호 62)	TSYTPRS (서열번호 63)
		중쇄 CDR1		중쇄 CDR2	중쇄 CDR3
		DYQMS (서열번호 64)		GINWNGGST (서열번호 65)	GPDLV (서열번호 66)
링커	GGSSRSSSSGGGSGGGG (서열번호 15)				

[184]

[185] 9-2. 천식 마우스 모델의 제작

[186] 항-CD300c scFv-Fc 항체의 항염증 효과를 생체내 조건 (in vivo)에서 확인하
기 위해 도 14에 나타난 바와 같이 6주령 BALB/c 마우스를 사용하여 오발부민
(ovalbumin)으로 유도한 천식 모델을 제작하였다. 알러지성 천식을 유도하기 위
해 50 μ g 오발부민 (Thermo Scientific)과 1 mg alum (Invivogen)을 복강 내 주사하
여 1차 감작 (sensitization)을 진행하였고, 14일차에 동일한 방법으로 2차 감작을

통해 면역 반응을 유도하였다. 이후 21, 22, 23, 26일차에 20 µg 오발부민을 비강 내 투여하여 알러지 반응을 유도 (challenge)하였다. JEWR-M10 항체는 총 4회 투여되었으며, 항체 투여량은 200 µg/마우스로 오발부민 비강 내 투여 30분 전에 복강 내 투여하였다. 마지막 항체 투여 48시간 후, 마우스는 조레틸 (Zoletil®, Virbac)과 럼퐁 (Rompun®, Bayer)으로 마취 후 희생되었다.

[187] 9-3. 항-CD300c 단클론 항체의 투여에 의한 항염증 효과 확인

[188] 오발부민의 반복적인 감각에 의한 천식 마우스 모델에서는 기관지폐포세척액 및 폐 조직에서 면역 세포와 염증성 사이토카인이 증가한다. 이에 따라 JEWR-M10의 항염증 효과를 확인하기 위해 기관지폐포세척액 및 폐 조직을 확보하였다.

[189] 마우스를 마취 후 개흉한 다음, 기도 내로 20 게이지 혈관내튜브 카테터를 삽입하여 PBS 1 ml를 주입하고 흡입하기를 3회 반복하여 세척액을 회수하였다. 회수한 기관지폐포세척액은 2000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 상층액은 MUC5AC 및 Th2 사이토카인 측정을 위한 ELISA를 진행하였다. 세포침전물은 총 세포수 측정을 위해 PBS 100 µl로 재현탁하고, Cytospin을 사용해 세포를 슬라이드 글라스에 도말한 후, Diff-Quick staining kit (Sysmex)으로 염색하였다.

[190] 도 15에서 나타난 바와 같이, 기관지폐포세척액 내 총 세포수는 대조군 (control)과 비교하여 기도 염증 유발군 (OVA)에서 증가하였고, JEWR-M10의 투여로 세포수가 감소하는 것을 확인하였다.

[191] 폐 조직의 조직학적 분석을 위해 일부 조직을 4% 포르말린 용액에 고정하고, 에탄올에서 탈수한 후 파라핀 블록을 제작하였으며, 5 µm 두께로 절편하여 PAS (Periodic acid-Schiff) 염색을 진행하였다.

[192] 도 16a에서 나타난 바와 같이, 광학 현미경으로 확보한 이미지에서 오발부민으로 기도 염증 유도된 마우스의 폐 조직에서 기관지 주변 면역 세포 침윤 및 PAS 양성 세포의 증가가 확인되었으며, JEWR-M10의 투여로 이러한 변화가 완화되어 면역 세포 침윤과 슬잔세포 면적이 감소하는 것을 확인하였다.

[193] 상기의 결과와 일치하여, 도 16b에서 나타난 바와 같이, 기관지폐포세척액 내 MUC5AC 생성량은 기도 염증 유발군과 비교하여 항체 치료군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[194] 도 17a 및 17b에서 나타난 바와 같이, Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성량이 기도 염증 유발군에서 증가하였으며, JEWR-M10의 투여로 폐 균질액 (도 17a)과 기관지폐포세척액 (도 17b)에서 유의적으로 감소하는 것이 확인되었다.

[195] 상기 결과들을 통해 본 발명의 항-CD300c 단클론항체가 천식질환 마우스 모델에서 면역 세포 침윤, 점액 분비 및 사이토카인 분비를 감소시켜 기도 염증 반응을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[196]

[197] 이상의 설명으로부터, 본 발명의 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수

있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

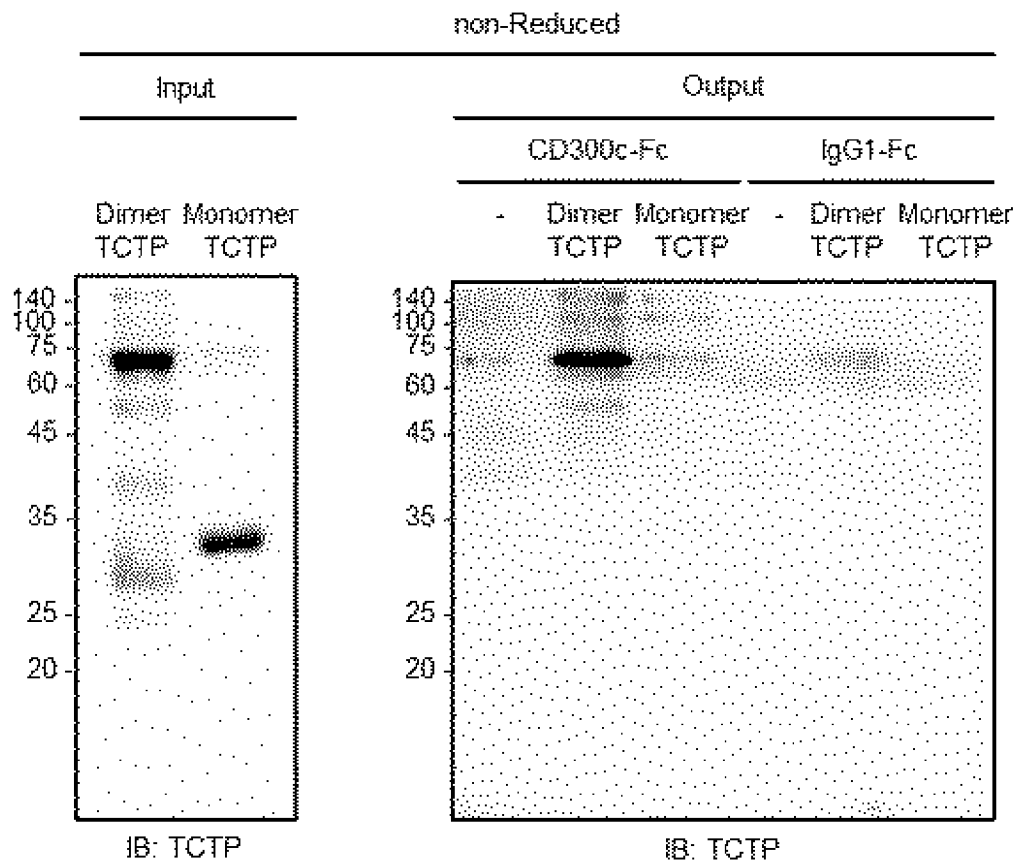
- [청구항 1] CD300c의 세포 외 도메인에 특이적으로 결합하고, TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)와 CD300c의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
 (a) 서열번호 9 또는 서열번호 34로 기재된 경쇄 CDR1;
 서열번호 10 또는 서열번호 35로 기재된 경쇄 CDR2; 및
 서열번호 11 또는 서열번호 36으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역, 및
 서열번호 12 또는 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1;
 서열번호 13 또는 서열번호 28로 기재된 중쇄 CDR2; 및
 서열번호 14, 서열번호 22, 서열번호 44 또는 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하거나, 또는
 (b) 상기 (a)에서 적어도 하나의 아미노산 서열이 치환된 것으로,
 서열번호 27로 기재된 중쇄 CDR1의 2번째 위치의 F가 Y; 3번째 위치의 N이 T; 5번째 위치의 R이 G, T 또는 S; 6번째 위치의 N이 G 또는 S; 또는 8번째 위치의 A가 G로 치환;
 서열번호 28로 기재된 중쇄 CDR2의 2번째 위치의 N이 S; 3번째 위치의 G가 W 또는 V; 4번째 위치의 R이 N, Y 또는 S; 5번째 위치의 G가 N; 6번째 위치의 D가 G; 7번째 위치의 T가 D, N 또는 S; 또는 8번째 위치의 T가 I로 치환; 또는
 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3의 2번째 위치의 R이 S; 3번째 위치의 G가 E; 4번째 위치의 P가 A 또는 D; 5번째 위치의 Y가 S; 6번째 위치의 Y가 SS; 7번째 위치의 F가 Y; 8번째 위치의 D가 N로 치환되고,
 여기서 중쇄 CDR1은 0 내지 5개, 중쇄 CDR2는 0 내지 6개, 중쇄 CDR3은 0 내지 4개의 치환을 포함하는 것 (단, 여기서 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 또는 중쇄 CDR3는 적어도 하나의 치환을 포함함)인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
 서열번호 9 또는 서열번호 34로 기재된 경쇄 CDR1;
 서열번호 10 또는 서열번호 35로 기재된 경쇄 CDR2; 및
 서열번호 11 또는 서열번호 36으로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 및
 서열번호 12, 서열번호 20, 서열번호 27, 서열번호 37 또는 서열번호 49로 기재된 중쇄 CDR1;
 서열번호 13, 서열번호 21, 서열번호 28, 서열번호 38 또는 서열번호 50로 기재된 중쇄 CDR2; 및

서열번호 14, 서열번호 22, 서열번호 29, 서열번호 39, 서열번호 44 또는 서열번호 51로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

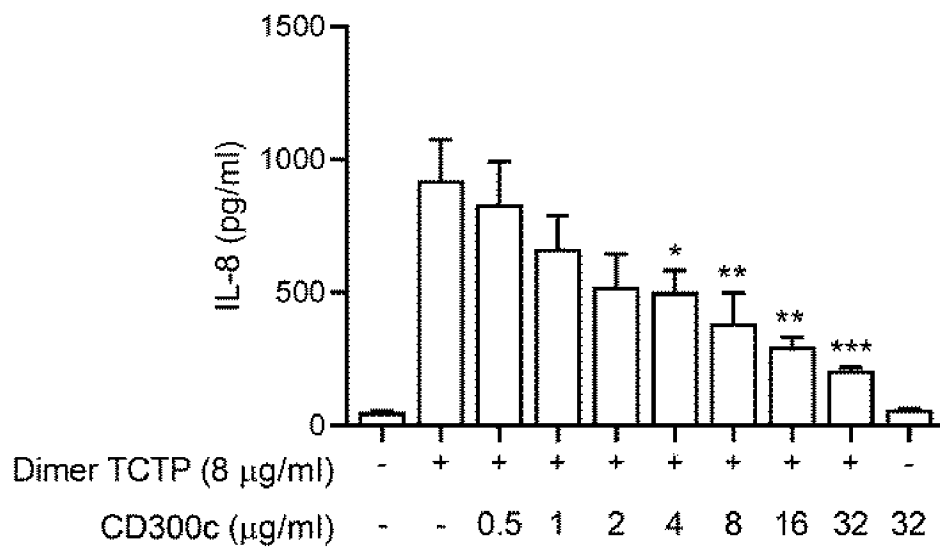
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
서열번호 7, 서열번호 18, 서열번호 25, 서열번호 32, 서열번호 42, 서열번호 47 또는 서열번호 54로 기재된 경쇄 가변영역, 및
서열번호 8, 서열번호 19, 서열번호 26, 서열번호 33, 서열번호 43, 서열번호 48 또는 서열번호 55로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
서열번호 15로 기재된 링커를 더 포함하는, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
서열번호 6, 서열번호 17, 서열번호 24, 서열번호 31, 서열번호 41, 서열번호 46 또는 서열번호 53에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
서열번호 61로 기재된 경쇄 CDR1;
서열번호 62로 기재된 경쇄 CDR2; 및
서열번호 63로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역; 및
서열번호 64로 기재된 중쇄 CDR1;
서열번호 65로 기재된 중쇄 CDR2; 및
서열번호 66로 기재된 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 8] 서열번호 59로 기재된 경쇄 가변영역, 및
서열번호 60로 기재된 중쇄 가변영역을 포함하는 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 9] 제 7 항에 있어서,
서열번호 58에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 10] 제 7 항에 있어서,
서열번호 15로 기재된 링커를 더 포함하는, 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산 분자.
- [청구항 12] 제 11 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 13] 제 12 항의 발현 벡터가 도입된 숙주 세포.

- [청구항 14] CD300c 억제제를 유효성분으로 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 CD300c 억제제는 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서, 상기 알러지 질환은 천식, 기관지염, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 건초열, 결막염 및 아나필락시스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제 15 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 기관지염, 폐렴, 관절염, 신장염, 건선, 피부염, 크론병, 장염, 치은염, 동맥경화증, 관상동맥염, 간염, 베체트병, 방광암, 전립선염, 신우신염, 사구체신염, 골수염, 갑상선염, 포도막염, 복강염, 수막염 및 폐섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.
- [청구항 18] (a) CD300c를 발현하는 분리된 세포에 dTCTP (dimeric Translationally Controlled Tumor Protein) 및 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 상기 후보물질이 처리된 분리된 세포에서 NF- κ B 신호전달 경로의 활성 또는 IL-8 분비 수준을 측정하는 단계; 및
 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 NF- κ B 신호전달 경로의 활성 또는 IL-8 분비 수준을 후보물질이 처리되지 않은 분리된 세포에서의 수준과 비교하여 NF- κ B 신호전달 경로의 활성 또는 IL-8 분비 수준을 감소시키는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법.
- [청구항 19] (a) 분리된 생물학적 시료로부터 CD300c의 발현 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및
 (b) 상기 발현 또는 분비 수준을 정상 대조군 시료의 CD300c 발현 또는 분비 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 20] CD300c의 발현 또는 분비 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알러지 질환, 염증성 질환, 또는 말라리아의 진단용 조성물.

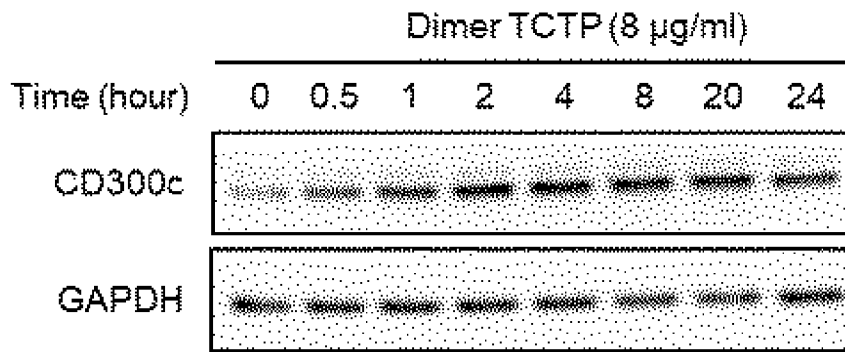
[도1]



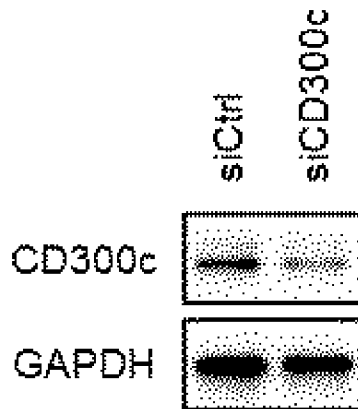
[도2]



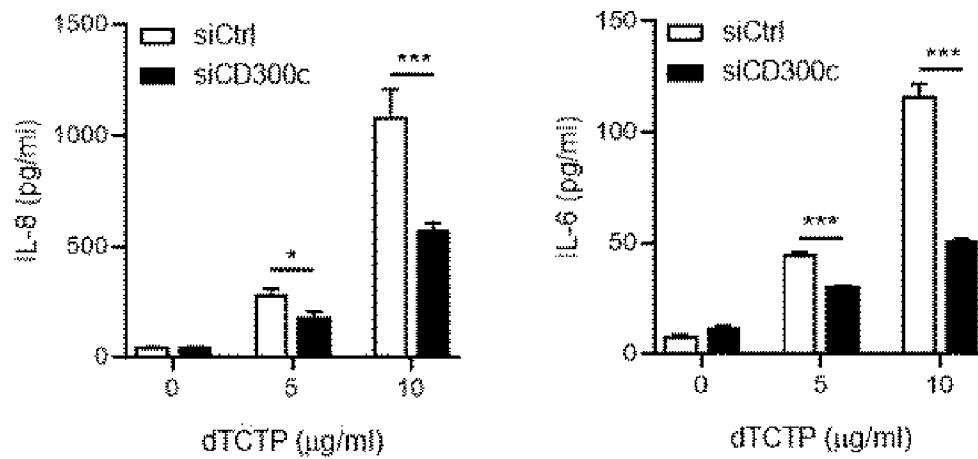
[도3]



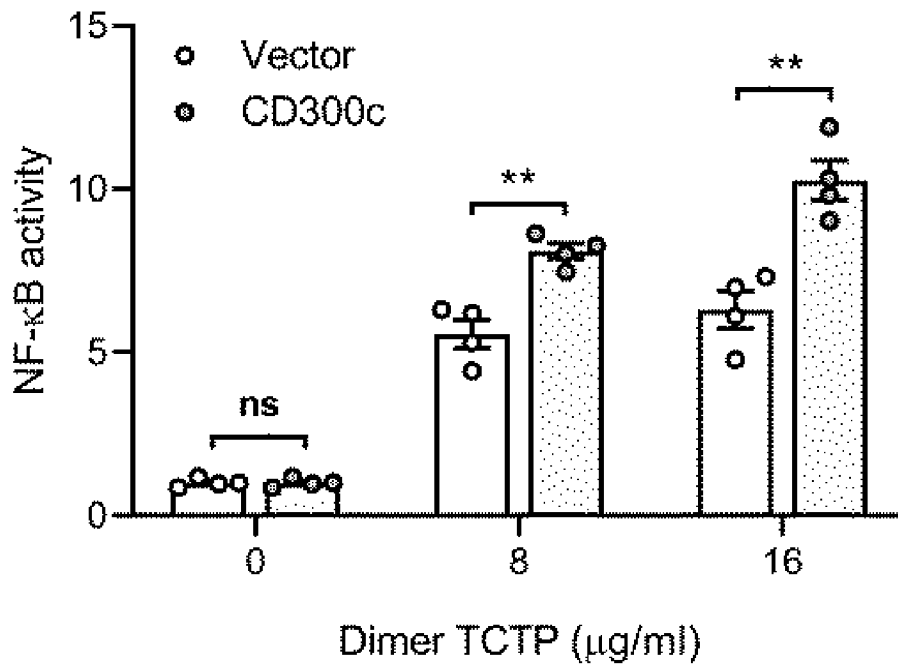
[도4a]



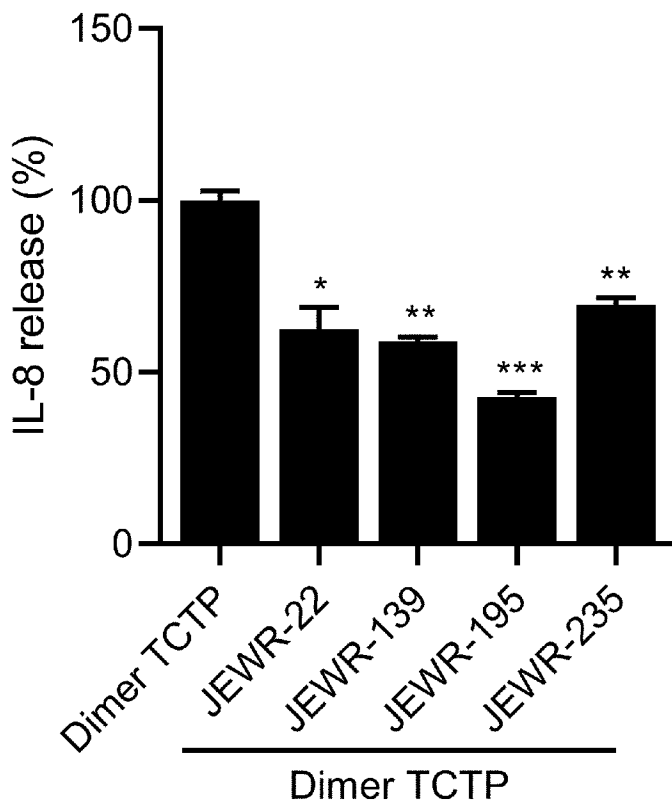
[도4b]

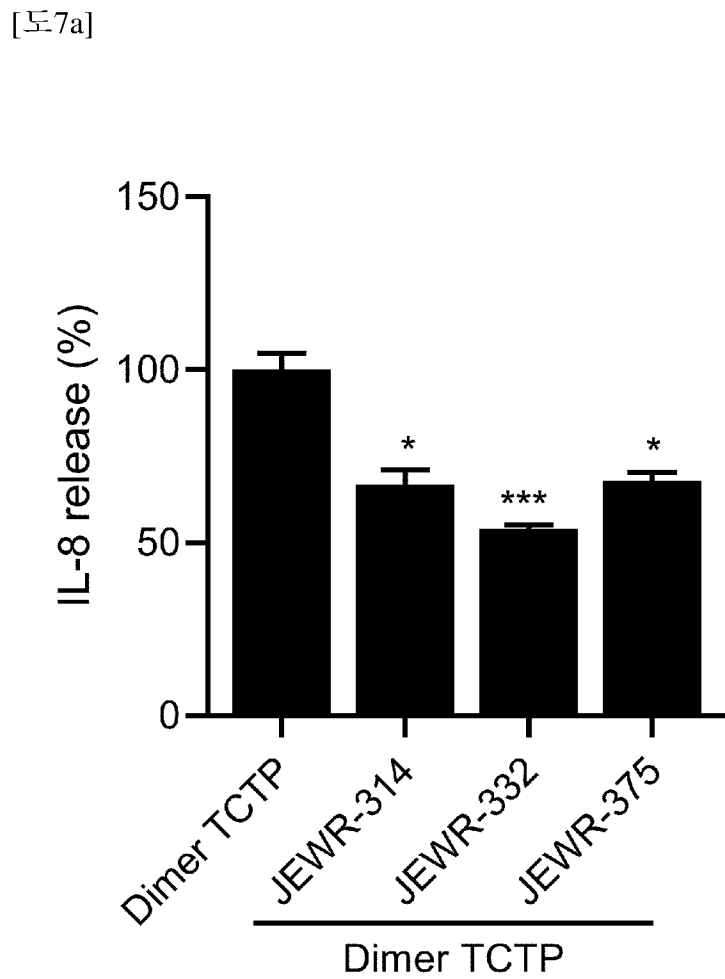
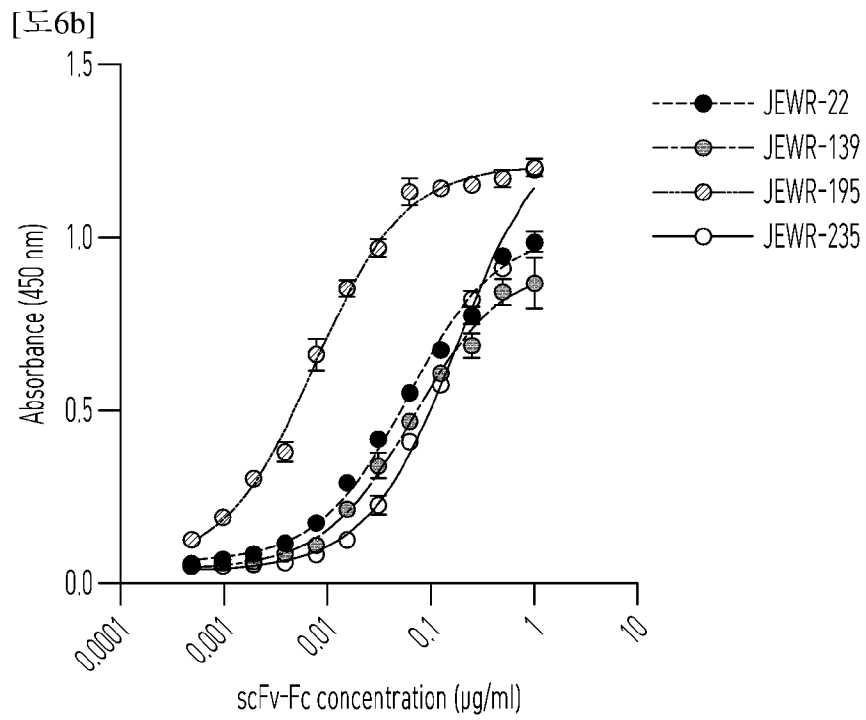


[도5]

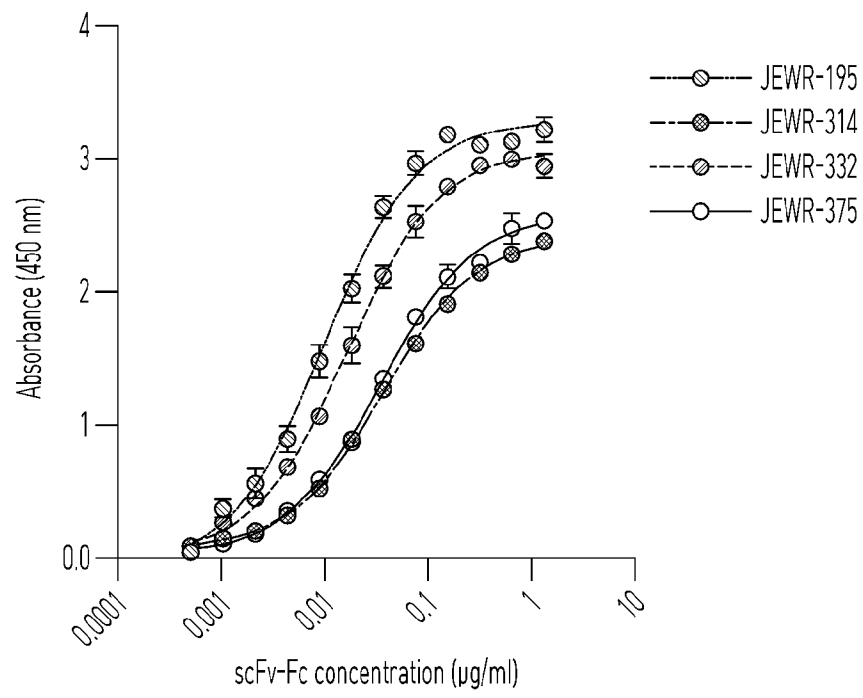


[도6a]

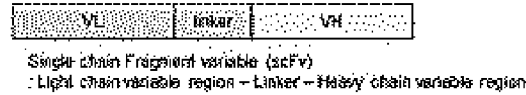




[도 7b]



[도8]



1. JEW-22

ELALTSQSPSSLSASVGDRTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
 YCQDSYSTPLTFGGGKLEIKGSSRSSSSSGGGSGGGGGQVQLQESGGGLVKPQDTLSLTCTVSQGGSSSSSYWWSWROPA
 GKGLEWVGRHTYSSGSTRYNPSLKSRVTISKDTSEKQFSLKLSVTAADTAVYCASSVAGQWVDYWGQGTLVTVSS

2. JEW-139

ELVMTQSPSSLSASVGDRTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSATDFTLTISSLQPEDFAT
 YYCQDSYSTPLTFGGGKLEIKGSSRSSSSSGGGSGGGGGQITLKESSGGGLVQPGRLRLSCAAAGFTFGGYAMHWVROAP
 GKGLEWVSGISWNGGDIYADSVKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLGAEDTAVYCAKSSVWVKGPDAFDWGGSTMTVTVSS

3. JEW-195

ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
 YYCQDSYSTPLTFGGGKLVTLVGGSSRSSSSSGGGSGGGGGQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFNFRNYAMSWVRQ
 TPGKGLEWVAINGRGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAAGAYYNYWGQGTMTVTVSS

4. JEW-235

ELVLTQPPSTSATPQQTIVTISCSSSHSNGITNWNWYQQLPGAAPKLLYDSSFRPTGVPGRFSGSGSGTSASLVISGLRSEDEA
 DYYCAAWDQSLNGPVEGGGTQITVLGGSSRSSSSSGGGSGGGGGEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISW
 VRQAPQGGLEWMIWISVYNGITNSAQKLCGRVTMTTDTSTSTAYMELRLRSDDTAVYVCAREDSSTFDYWGQGTMTVTVSS

5. JEW-314

ELVMTQSPSSLSASVDRVTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA
 TYYCQDSYSTPLTFGGGKLVKKGSSRSSSSSGGGSGGGGGQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASQFNFRNYAMSWVR
 QTPGKGLEWVAINGRGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAAGAYSSSPGEEGGGTMTVTVSS

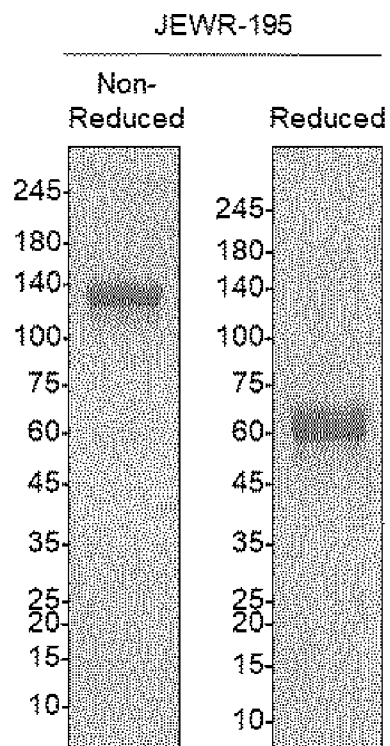
6. JEW-332

ELTLTSQSPSSLSASVGDRTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAI
 YYCQDSYSTPLTFGGGKLEIKGSSRSSSSSGGGSGGGGGQVQLVQSGGQVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQ
 APGKGLEWVAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAKSPYYFDYWGQGTMTVTVSS

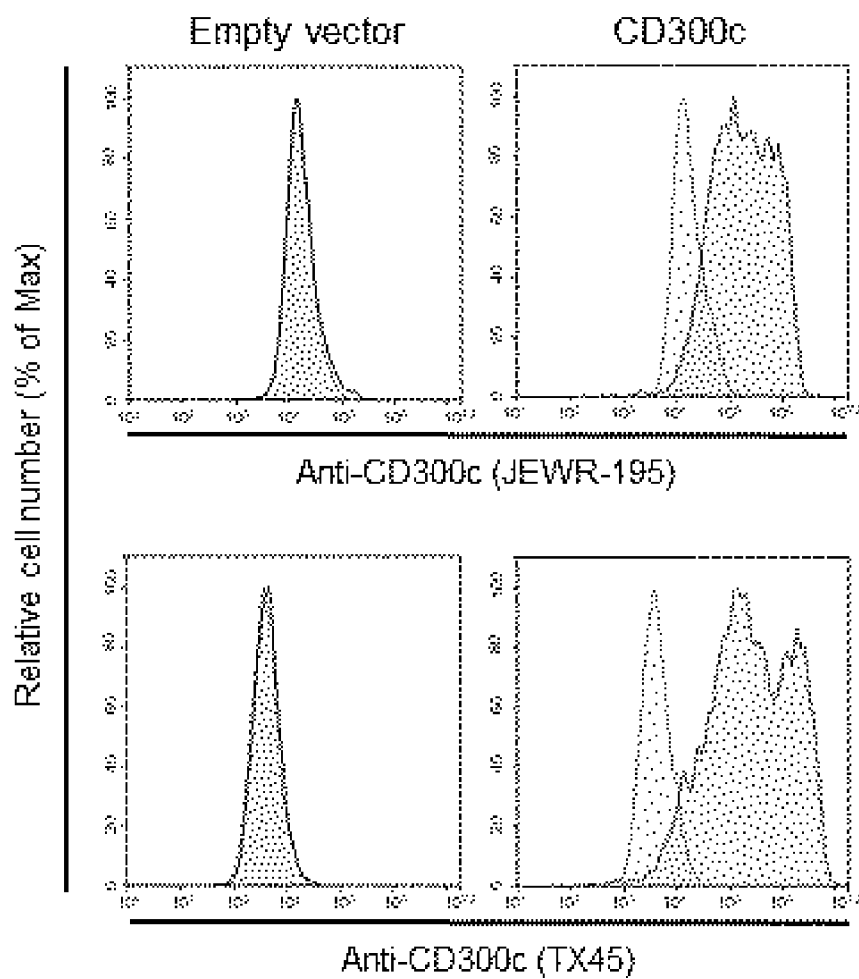
7. JEW-375

ELQMTQSPSSLSASVGDRTITCCASHDISKYLNNWYQOKSGKAPKLLYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
 ATYYCQDSYSTPLTFGGGKLVKKGSSRSSSSSGGGSGGGGGQVQLQWGGGLVKPGGSLRLSCAASQFNFRNYAMSWV
 RQTPGKGLEWVAINGRGDTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAAGPYFFDYGGGQGTMTVTVSS

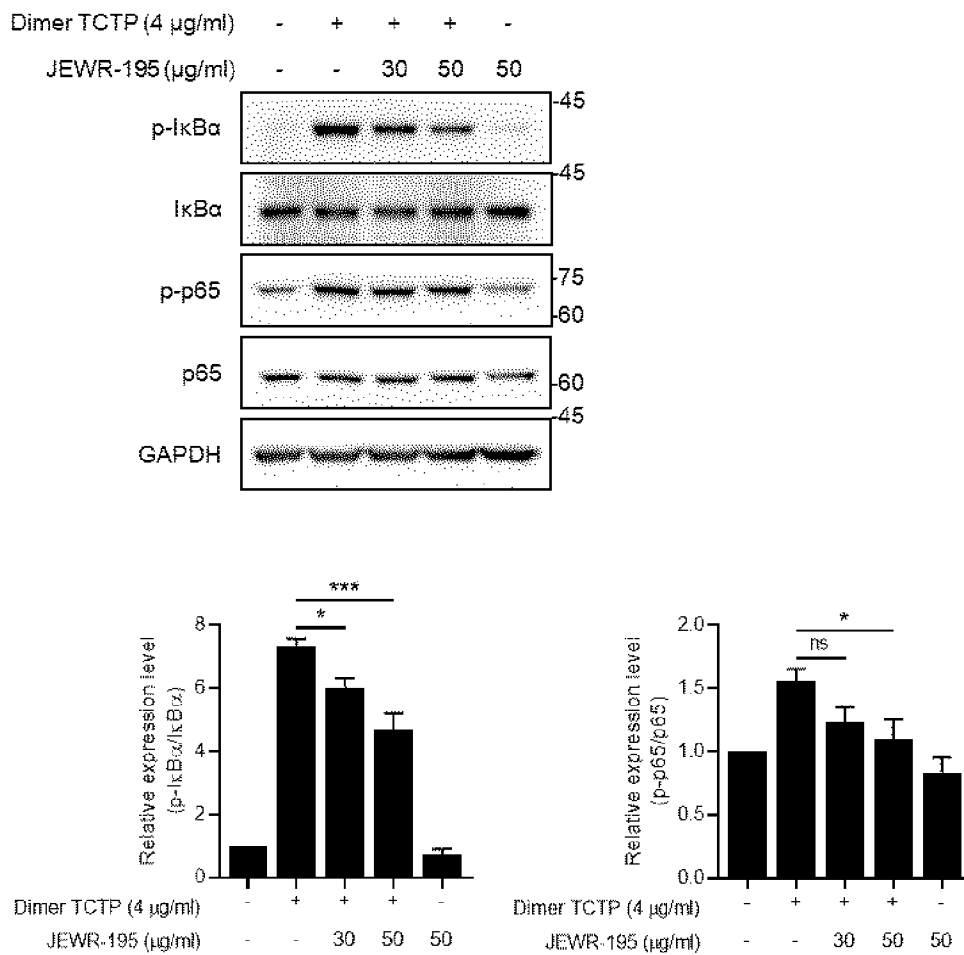
[도9]



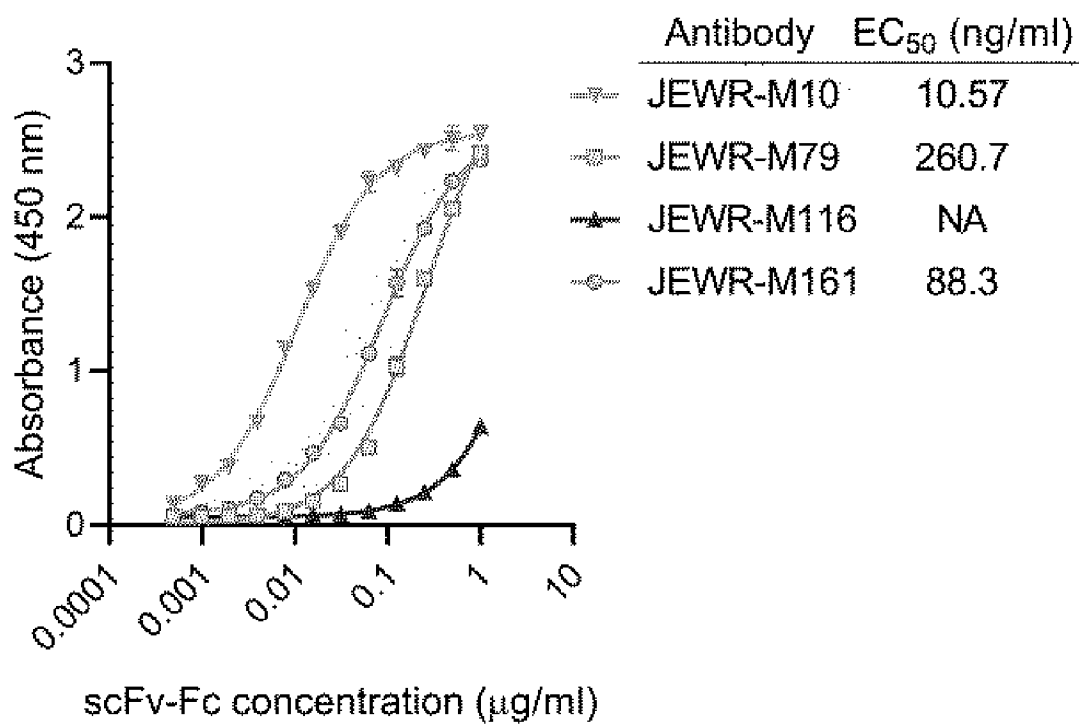
[도10]



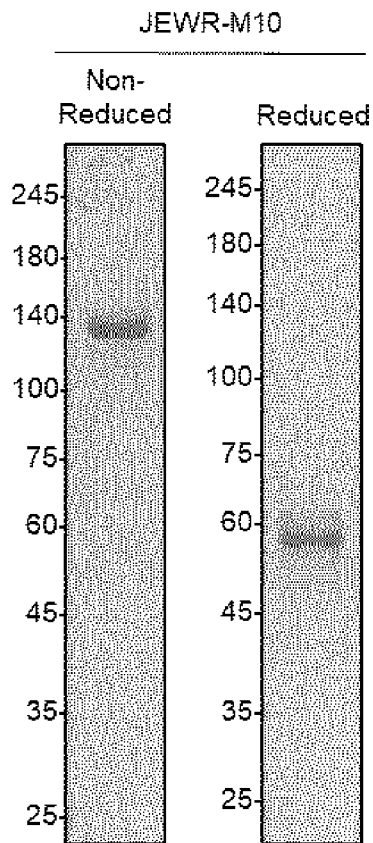
[도11]



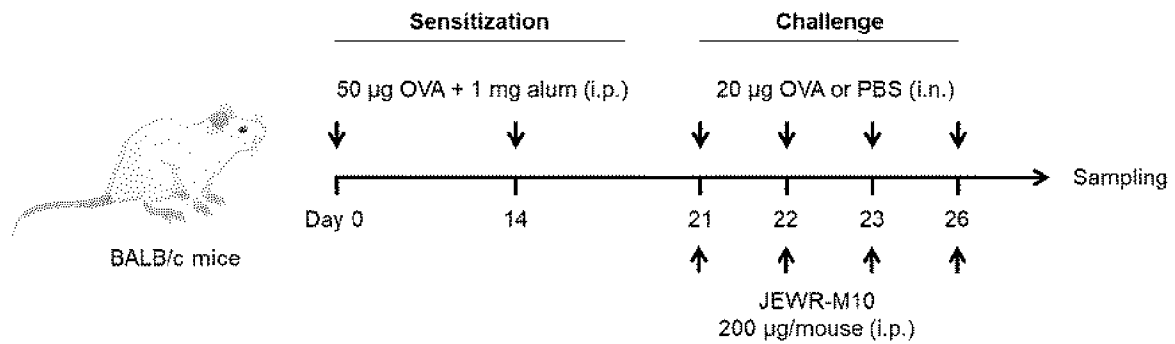
[도12]



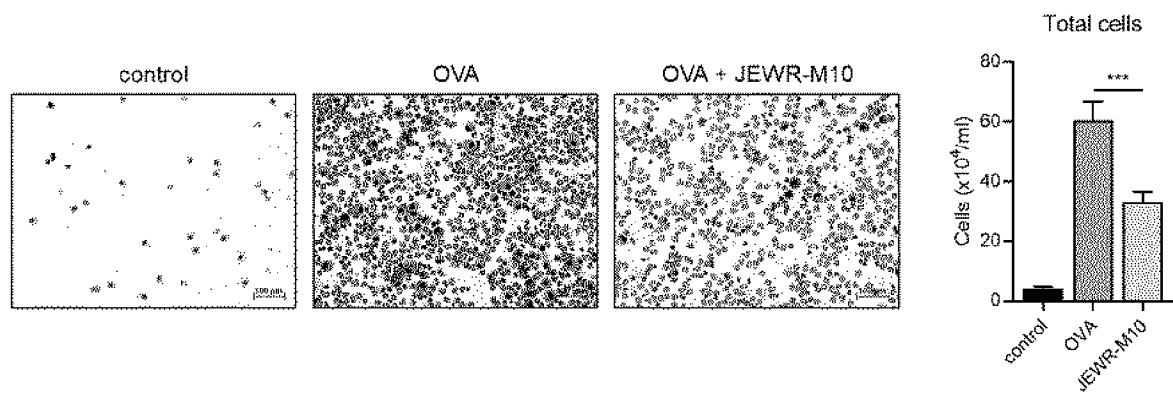
[도13]



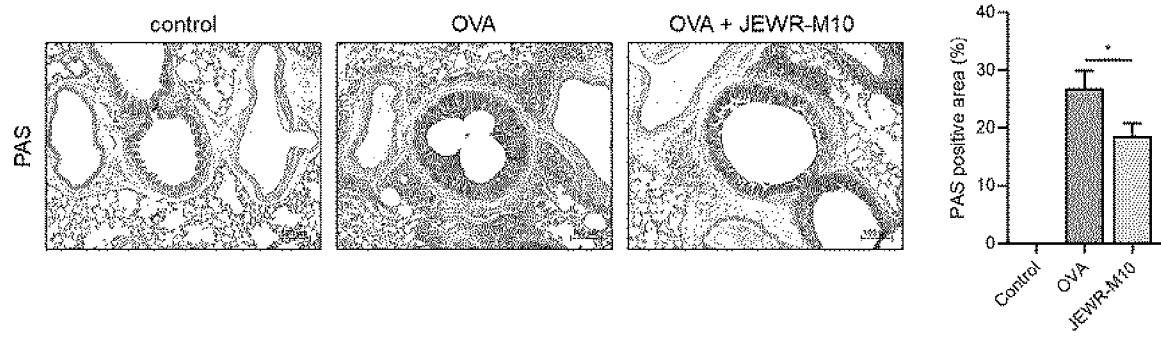
[도14]



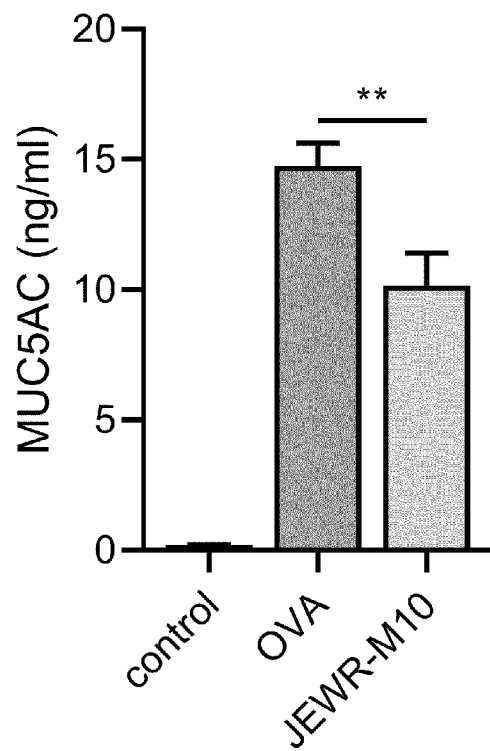
[도15]



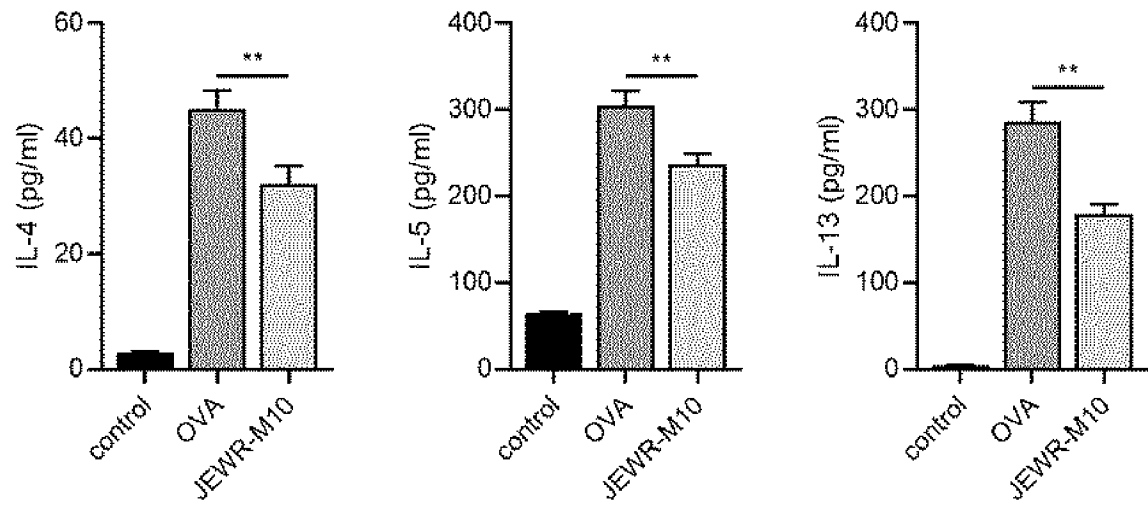
[도 16a]



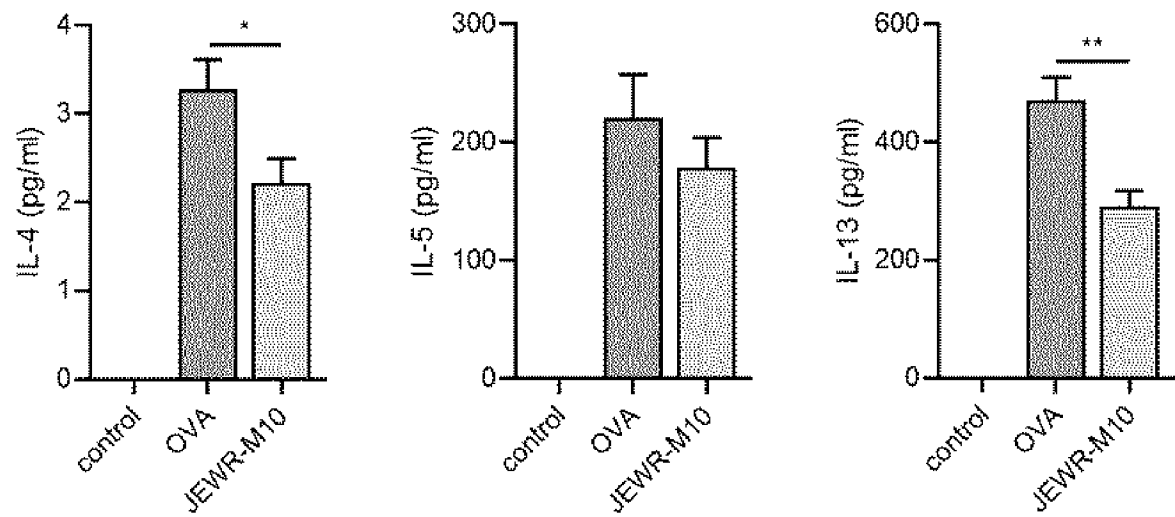
[도 16b]



[도17a]



[도17b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/016336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; **A61P 37/08**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A61P 19/10**(2006.01)i; **A61P 33/06**(2006.01)i;
G01N 33/50(2006.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28(2006.01); A23K 20/147(2016.01); A23L 33/17(2016.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 39/00(2006.01);
A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 14/705(2006.01); C07K 7/06(2006.01)

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: CD300c, 세포 외 도메인(extracellular domain), dTCTP(dimeric translationally controlled tumor protein), 항체(antibody), 알러지(allergy), 염증(inflammation), 말라리아(malaria), 스크리닝(screening), 진단(diagnosis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2019-0136949 A (CENTRICSBIO, INC.) 10 December 2019 (2019-12-10) See claims 1, 3 and 7; and paragraphs [0022], [0047] and [0049]-[0058].	1,11-13
Y		14-20
A		2-10
Y	GREGORCZYK, I. et al. Blockade of RANKL/RANK and NF-κB signalling pathways as novel therapeutic strategies for allergic asthma: A comparative study in a mouse model of allergic airway inflammation. European Journal of Pharmacology. (electronic publication) 25 April 2020, vol. 879, thesis no. 173129, pp. 1-12. See abstract.	14-20
X	KR 10-2023-0155978 A (CENTRICSBIO, INC.) 13 November 2023 (2023-11-13) See claim 1; and paragraphs [0131], [0192] and [0193].	1,11-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 February 2025

Date of mailing of the international search report

03 February 2025

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/KR2024/016336

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021-0206849 A1 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 08 July 2021 (2021-07-08) See claims 1 and 2; and paragraph [0030].	1,11-13
A	WO 2022-250433 A1 (CENTRICSBIO, INC.) 01 December 2022 (2022-12-01) See entire document.	1-20
A	KR 10-2016-0148362 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 26 December 2016 (2016-12-26) See entire document.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/016336

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/016336

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2019-0136949	A	10 December 2019	AU	2019-279311	A1	07 January 2021
				AU	2019-279311	B2	30 November 2023
				CA	3101974	A1	05 December 2019
				CN	112384241	A	19 February 2021
				EP	3808375	A1	21 April 2021
				JP	2021-525283	A	24 September 2021
				JP	2023-071898	A	23 May 2023
				JP	7301264	B2	03 July 2023
				JP	7577252	B2	05 November 2024
				KR	10-2021-0136894	A	17 November 2021
				KR	10-2320280	B1	29 November 2021
				KR	10-2462548	B1	03 November 2022
				KR	10-2462548	B9	19 September 2024
				US	2021-0238596	A1	05 August 2021
				US	2024-0368599	A1	07 November 2024
				WO	2019-231188	A1	05 December 2019
KR	10-2023-0155978	A	13 November 2023	AU	2023-265269	A1	21 November 2024
				WO	2023-214778	A1	09 November 2023
US	2021-0206849	A1	08 July 2021	CN	112469479	A	09 March 2021
				CN	112469479	B	13 August 2024
				EP	3820571	A1	19 May 2021
				US	11952419	B2	09 April 2024
				US	2024-0287179	A1	29 August 2024
				WO	2020-014097	A1	16 January 2020
				WO	2020-014097	A8	17 December 2020
WO	2022-250433	A1	01 December 2022	AU	2020-394279	A1	16 June 2022
				AU	2022-280586	A1	14 December 2023
				AU	2022-280586	B2	31 October 2024
				CA	3159889	A1	03 June 2021
				CA	3220226	A1	01 December 2022
				CN	115038719	A	09 September 2022
				CN	117651713	A	05 March 2024
				EP	4067379	A1	05 October 2022
				EP	4349858	A1	10 April 2024
				JP	2023-504149	A	01 February 2023
				JP	2024-522279	A	13 June 2024
				JP	7578869	B2	07 November 2024
				KR	10-2021-0066743	A	07 June 2021
				KR	10-2024-0005850	A	12 January 2024
				KR	10-2689877	B1	01 August 2024
				US	2022-0305082	A1	29 September 2022
				WO	2021-107726	A1	03 June 2021
KR	10-2016-0148362	A	26 December 2016	KR	10-1803078	B1	29 November 2017
				WO	2016-204541	A1	22 December 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 16/28(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 19/10(2006.01)i; A61P 33/06(2006.01)i;
G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 16/28(2006.01); A23K 20/147(2016.01); A23L 33/17(2016.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 39/00(2006.01);
A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 14/705(2006.01); C07K 7/06(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CD300c, 세포 외 도메인(extracellular domain), dTCTP(dimeric translationally controlled tumor protein), 항체(antibody), 알러지(allergy), 염증(inflammation), 말라리아(malaria), 스크리닝(screening), 진단(diagnosis)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2019-0136949 A (주식회사 센트릭스바이오) 2019.12.10 청구항 1, 3, 7; 단락 [0022], [0047], [0049]-[0058]	1,11-13
Y		14-20
A		2-10
Y	GREGORCZYK, I. 등, 'Blockade of RANKL/RANK and NF-κB signalling pathways as novel therapeutic strategies for allergic asthma: A comparative study in a mouse model of allergic airway inflammation', European Journal of Pharmacology, (전자공개)2020.04.25, 879권, 논문번호 173129, 1-12 페이지 초록	14-20
X	KR 10-2023-0155978 A (주식회사 센트릭스바이오) 2023.11.13 청구항 1; 단락 [0131], [0192], [0193]	1,11-13
X	US 2021-0206849 A1 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 2021.07.08 청구항 1, 2; 단락 [0030]	1,11-13

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2025년02월03일(03.02.2025)

국제조사보고서 발송일

2025년02월03일(03.02.2025)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2022-250433 A1 (CENTRICSBIO, INC.) 2022.12.01 전체 문헌	1-20
A	KR 10-2016-0148362 A (이화여자대학교 산학협력단) 2016.12.26 전체 문헌	1-20

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

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

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0136949 A	2019/12/10	AU 2019-279311 A1	2021/01/07
		AU 2019-279311 B2	2023/11/30
		CA 3101974 A1	2019/12/05
		CN 112384241 A	2021/02/19
		EP 3808375 A1	2021/04/21
		JP 2021-525283 A	2021/09/24
		JP 2023-071898 A	2023/05/23
		JP 7301264 B2	2023/07/03
		JP 7577252 B2	2024/11/05
		KR 10-2021-0136894 A	2021/11/17
		KR 10-2320280 B1	2021/11/29
		KR 10-2462548 B1	2022/11/03
		KR 10-2462548 B9	2024/09/19
		US 2021-0238596 A1	2021/08/05
		US 2024-0368599 A1	2024/11/07
		WO 2019-231188 A1	2019/12/05
KR 10-2023-0155978 A	2023/11/13	AU 2023-265269 A1	2024/11/21
		WO 2023-214778 A1	2023/11/09
US 2021-0206849 A1	2021/07/08	CN 112469479 A	2021/03/09
		CN 112469479 B	2024/08/13
		EP 3820571 A1	2021/05/19
		US 11952419 B2	2024/04/09
		US 2024-0287179 A1	2024/08/29
		WO 2020-014097 A1	2020/01/16
WO 2022-250433 A1	2022/12/01	WO 2020-014097 A8	2020/12/17
		AU 2020-394279 A1	2022/06/16
		AU 2022-280586 A1	2023/12/14
		AU 2022-280586 B2	2024/10/31
		CA 3159889 A1	2021/06/03
		CA 3220226 A1	2022/12/01
		CN 115038719 A	2022/09/09
		CN 117651713 A	2024/03/05
		EP 4067379 A1	2022/10/05
		EP 4349858 A1	2024/04/10
		JP 2023-504149 A	2023/02/01
		JP 2024-522279 A	2024/06/13
		JP 7578869 B2	2024/11/07
		KR 10-2021-0066743 A	2021/06/07
		KR 10-2024-0005850 A	2024/01/12
		KR 10-2689877 B1	2024/08/01
		US 2022-0305082 A1	2022/09/29
		WO 2021-107726 A1	2021/06/03
KR 10-2016-0148362 A	2016/12/26	KR 10-1803078 B1	2017/11/29
		WO 2016-204541 A1	2016/12/22