

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7301264号

(P7301264)

(45)発行日 令和5年7月3日(2023.7.3)

(24)登録日 令和5年6月23日(2023.6.23)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	Z N A
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	45/00(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00(2006.01)	A 6 1 P	35/00	

請求項の数 6 (全16頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-517168(P2021-517168)

(86)(22)出願日 令和1年5月27日(2019.5.27)

(65)公表番号 特表2021-525283(P2021-525283  
A)

(43)公表日 令和3年9月24日(2021.9.24)

(86)国際出願番号 PCT/KR2019/006307

(87)国際公開番号 WO2019/231188

(87)国際公開日 令和1年12月5日(2019.12.5)

審査請求日 令和3年1月20日(2021.1.20)

(31)優先権主張番号 10-2018-0062620

(32)優先日 平成30年5月31日(2018.5.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
韓国(KR)

(31)優先権主張番号 10-2019-0061067

(32)優先日 令和1年5月24日(2019.5.24)

最終頁に続く

(73)特許権者 520469745

セントリックスバイオ インコーポレイ  
テッド  
CentricsBio, Inc.  
大韓民国 05836 ソウル、ソンバ  
グ、ポボン-ロ 11-ギル、28、  
ピーケイ タワー、3階

(74)代理人 110000729

弁理士法人ユニアス国際特許事務所

(72)発明者 チョン、ジェ-ウォン

大韓民国 16512 キョンギ-ド、ス  
ウォン-シ、ヨントン-グ、ボジヨ-  
ロ 134

(72)発明者 イ、ソイン

大韓民国 12275 キョンギ-ド、ナ  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD300cの発現抑制剤または活性抑制剤を含む癌の予防または治療用薬学的組成物

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

CD300cの発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分として含む、癌の予防または治療用薬学的組成物であって、

前記CD300cの発現抑制剤が、CD300c遺伝子のmRNAに相補的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、短ヘアピンRNA、低分子干渉RNA(sRNA)およびボザイムからなる群より選ばれたいずれか1つ以上であり、

前記CD300cの活性抑制剤が、CD300cタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体および抗体断片からなる群より選ばれるいずれか1つ以上である、薬学的組成物。

## 【請求項2】

前記癌は、大腸癌、直腸癌、結腸癌、甲状腺癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、子宮頸癌、脳癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝癌、すい臓癌、前立腺癌、皮膚癌、舌癌、乳癌、子宮癌、胃癌、骨癌および血液癌からなる群より選ばれるいずれか1つ以上であることを特徴とする、請求項1に記載の薬学的組成物。

## 【請求項3】

前記薬学的組成物は、他の抗癌剤をさらに含むことを特徴とする、請求項1又は2に記載の薬学的組成物。

## 【請求項4】

前記薬学的組成物は、癌の増殖、生存、転移、再発または抗癌剤耐性を抑制することを

特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

( a ) C D 3 0 0 c タンパク質が発現する癌細胞を培養するステップと；  
 ( b ) 前記培養された癌細胞を候補物質で処理するステップと；  
 ( c ) 前記候補物質で処理された細胞の C D 3 0 0 c 発現量を測定するステップと；  
 ( d ) 前記 C D 3 0 0 c 発現量を減少させた候補物質を選別するステップと；を含む、  
 癌の予防または治療用物質を選別する方法。

【請求項 6】

( a ) C D 3 0 0 c タンパク質を候補物質で処理するステップと；  
 ( b ) 前記 C D 3 0 0 c タンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、C D 3 0 0 c  
 の活性を抑制する候補物質を選別するステップと；を含む、癌の予防または治療用物質  
 を選別する方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C D 3 0 0 c タンパク質の発現抑制剤または活性抑制剤を含む薬学的組成物  
 等に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は、現代人の死亡原因において最も大きい比重を占めている疾患の一つであり、様々  
 な原因によって発生した遺伝子の突然変異により正常細胞が変化して発生した疾病であっ  
 て、正常な細胞の分化、増殖、成長形態等に従わない腫瘍のうち悪性のものを指す。癌と  
 は、「制御されない細胞成長」と特徴づけられ、このような異常な細胞成長によって腫瘍  
 と呼ばれる細胞塊が形成されて、周囲の組織に浸透し、ひどい場合には、身体の他の器官  
 に転移したりする。癌は、手術、放射線および薬物療法等で治療をしても、多くの場合に  
 、根本的な治癒にならず、患者に苦痛を与え、究極的には、死に至らしめる難治性慢性疾  
 患である。

20

【0003】

癌の薬物治療、すなわち、抗癌剤は、一般的に細胞毒性を有する化合物であり、癌細胞  
 を攻撃して死滅させる方式で癌を治療するが、癌細胞だけでなく、正常細胞にも損傷を  
 与えるので、大きい副作用を示す。そこで、副作用を減少させるために標的抗癌剤が開発さ  
 れた。しかしながら、このような標的抗癌剤の場合には、副作用を低減することができる  
 が、高い確率で耐性が生じるという限界点を示した（韓国特許公開 1 0 - 2 0 1 8 - 0 0  
 9 9 5 5 7 号）。したがって、最近では、体内の免疫系を用いて毒性および耐性による問  
 題点を減少させる免疫抗癌剤に対する関心が急増している傾向にある。このような免疫抗  
 癌剤の一例として、癌細胞表面の P D - L 1 に結合して T 細胞の P D - 1 との結合を抑制  
 して T 細胞を活性化させ、癌細胞を攻撃する免疫チェックポイント抑制剤が開発された。  
 しかしながら、このような免疫チェックポイント抑制剤の場合にも、効果を示す癌の種類  
 が多様でないため、多様な癌において同一の治療効果を示す新しい免疫チェックポイント  
 抑制剤の開発が必要とされているのが現状である。

30

40

【0004】

したがって、本発明者らは、多様な癌において P D - L 1 のように癌細胞の表面に発現  
 して T 細胞の発現を抑制するタンパク質について鋭意研究した結果、本発明を完成させた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記のような従来技術上の問題点を解決するために案出されたものであって  
 、多様な癌細胞の表面に存在する C D 3 0 0 c タンパク質の発現または活性を抑制させる  
 ことによって、T 細胞の活性を増加させ、癌細胞の増殖を抑制できることを確認し、C D  
 3 0 0 c の発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分として含む癌の予防または治療用薬学

50

的組成物などを提供することをその目的とする。

【0006】

しかしながら、本発明が達成しようとする技術的課題は、以上で言及した課題に制限されず、言及されていない他の課題は、下記の記載から当業界における通常の知識を有する者に明確に理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、CD300cの発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分として含む癌の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【0008】

本発明の一具体例において、前記CD300cの発現抑制剤は、好ましくは、CD300c遺伝子のmRNAに相補的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、短ヘアピンRNA、低分子干渉RNA(sirna)、リボザイム等や、CD300c遺伝子の発現を減少または抑制する物質であれば、これに制限されない。前記物質がCD300cの発現を抑制させる機序は、特に制限されず、一例として転写、翻訳等の遺伝子発現を抑制する機序として作用することができる。

【0009】

本発明の他の具体例において、前記CD300cの活性抑制剤は、CD300cタンパク質に相補的に結合する化合物、ペプチド、ペプチドミメティクス、基質類似体、アプタマー、抗体等や、CD300cタンパク質に結合してCD300cの活性を減少または抑制する物質であれば、これに制限されない。前記物質がCD300cタンパク質の活性を抑制させる機序は、特に制限されず、一例として活性型を不活性型に転換させる機序として作用することができる。前記抗体の一例としては、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよく、好ましくは、ヒトモノクローナル抗CD300c抗体であってもよく、または抗体断片であってもよいが、CD300cに特異的に結合する抗体であれば、これに制限されない。前記可溶性受容体は、CD300cに結合する受容体であって、好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列に特異的に結合する配列を含むが、CD300cに結合する受容体であれば、これに制限されない。

【0010】

本発明のさらに他の具体例において、前記癌は、好ましくは、大腸癌、直腸癌、結腸癌、甲状腺癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、子宮頸癌、脳癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝癌、すい臓癌、前立腺癌、皮膚癌、舌癌、乳癌、子宮癌、胃癌、骨癌、血液癌等や、癌細胞の表面にCD300cタンパク質を発現する癌の種類であれば、これに制限されない。

【0011】

本発明のさらに他の具体例において、前記薬学的組成物は、他の従来の抗癌剤をさらに含むことができ、前記抗癌剤は、好ましくは、ドキソルビシン、シスプラチン、ゲムシタピン、オキサリプラチン、5-FU、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、ネシツムマブ、癌抗原、抗癌ウイルス等や現在抗癌剤として使用されている物質であれば、これに制限されない。前記癌抗原は、癌腫に特異的な癌ワクチンであって、好ましくは、膀胱癌特異的癌抗原としてNY-ESO-1、乳癌特異的癌抗原としてHER2、大腸癌特異的癌抗原としてCEA、肺癌特異的癌抗原としてVEGFR1、VEGFR2等であってもよいが、癌ワクチンとして知られている癌抗原の種類であれば、これに制限されない。抗癌ウイルスの一例としてイムリジック、ベクサベク等があるが、知られている抗癌ウイルスであれば、これに制限されない。前記抗癌剤をさらに含むことは、好ましくは、併用投与であるか、本願発明の抑制剤に結合された形態であってもよく、抗癌剤の送達体内に共に含まれている形態であってもよい。

【0012】

本発明のさらに他の具体例において、前記薬学的組成物は、癌または癌幹細胞の増殖、生存、転移、再発、抗癌剤耐性等を抑制することを特徴とするが、本発明の薬学的組成物

10

20

30

40

50

によって発生する効果であれば、これに制限されない。

【0013】

また、本発明は、(a) CD300c タンパク質が発現する癌細胞を培養するステップと；(b) 前記培養された癌細胞を候補物質で処理するステップと；(c) 前記候補物質で処理された細胞の CD300c 発現量を測定するステップと；(d) 前記 CD300c 発現量を減少させた候補物質を選別するステップと；を含む、癌の予防または治療用物質を選別する方法を提供する。

【0014】

また、本発明は、(a) CD300c タンパク質を候補物質で処理するステップと；(b) 前記 CD300c タンパク質に結合された候補物質を選別するステップと；を含む、癌の予防または治療用物質を選別する方法を提供する。

10

【0015】

本発明の一具体例において、前記発現量を測定するステップとは、mRNA および/またはタンパク質の発現水準を測定することであって、mRNA の発現水準を測定することは、生物学的試料で CD300c mRNA の存在有無および発現程度を確認することであって、mRNA の量を測定することによって確認することができる。このための分析方法としては、RT-PCR、競争的 RT-PCR (competitive RT-PCR)、リアルタイム RT-PCR、RNase プロテクションアッセイ法 (RPA)、ノーザンブロッティング、DNA マイクロアレイチップ等があるが、これらに限定されるものではない。また、タンパク質の発現水準を測定することは、生物学的試料から CD300c タンパク質の存在有無および発現水準を確認することであって、前記 CD300c タンパク質に対して特異的に結合する抗体を用いてタンパク質の量を確認したり、タンパク質の活性を測定することによって知ることができる。このための分析方法としては、ウェスタンブロッティング、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ法)、ラジオイムノアッセイ、放射免疫拡散法 (radioimmuno diffusion)、オクタロニー (Ouchterlony) 免疫拡散法、ロケット (Rocket) 免疫電気泳動、免疫組織化学染色、免疫沈降分析、補体結合分析、FACS、プロテインチップ等があるが、これらに限定されるものではない。

20

【0016】

本発明の他の具体例において、前記候補物質に結合する物質を選別するステップは、CD300c タンパク質に結合する物質を選別する方法であって、このための分析方法としては、ウェスタンブロッティング、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ法)、ラジオイムノアッセイ、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、免疫組織化学染色、免疫沈降分析、補体結合分析、FACS、プロテインチップ等があるが、これらに限定されるものではない。

30

【0017】

本発明のさらに他の具体例において、前記候補物質は、ヌクレオチド、DNA、RNA、アミノ酸、アプタマー、タンパク質、化合物、天然物、天然抽出物、ベクター等であって、制限されない。

【0018】

また、本発明は、CD300c の発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分として含む薬学的組成物を個体に投与するステップを含む癌の治療方法を提供する。

40

【0019】

また、本発明は、CD300c の発現抑制剤または活性抑制剤を有効成分として含む薬学的組成物の癌の予防または治療用途を提供する。

【発明の効果】

【0020】

本発明による CD300c の発現抑制剤または活性抑制剤は、多様な癌の表面で発現する CD300c に結合したり、CD300c の発現を抑制することによって、T 細胞を活性化させると同時に、癌細胞の増殖を抑制することによって、多様な癌の免疫治療剤とし

50

て効果的に使用され得る。このような抑制剤は、癌環境内で腫瘍浸潤リンパ球および細胞毒性Tリンパ球の数を増加させ、骨髄由来抑制細胞の数を減少させると共に、癌の成長および発達を効果的に抑制できるので、本発明のCD300cの発現抑制剤または活性抑制剤は、新しい免疫治療剤として癌の治療に効果的に使用され得るものと期待される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、本発明の一実施例によるsCD300c-FcをSDS-PAGEで確認した結果を示す図である。

【図2】図2は、本発明の一実施例によるsCD300c-Fcが腫瘍浸潤リンパ球に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。

【図3】図3は、本発明の一実施例によるsCD300c-FcがNF- $\kappa$ Bのシグナル伝達機序に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。

【図4】図4は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体がヒトT細胞に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。

【図5】図5は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体の肺癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図6】図6は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体の乳癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図7】図7は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体の大腸癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図8】図8は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体が*in vivo*で癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図9】図9は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体が*in vivo*で癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図10】図10は、本発明の一実施例によるCD300c siRNAの癌成長抑制効果を確認した結果を示す図である。

【図11】図11は、本発明の一実施例による抗CD300c抗体が抗癌免疫反応に及ぼす影響を確認した結果を示す図である。

【図12】図12は、CD300cの機能および/または発現を抑制することによって抗癌効果を示す機序を簡略に示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明のCD300cの発現抑制剤または活性抑制剤は、癌環境内で腫瘍浸潤リンパ球および細胞毒性Tリンパ球の数を増加させ、骨髄由来抑制細胞の数を減少させると共に、多様な癌の成長および発達を効果的に抑制できるので、CD300cを表面に発現している多様な癌の治療に効果的に使用され得る。

【0023】

本明細書において、「抗体」とは、免疫学的に特定抗原と反応性を有する免疫グロブリン分子を含み、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびその機能的な断片を全部含む。また、前記用語は、キメラ抗体（例えば、ヒト抗マウス抗体）および異種結合抗体（例えば、二重特異性抗体）のような遺伝工学により生産された形態を含むことができる。このうち、モノクローナル抗体は、単一抗原性部位（エピトープ）に対する高度に特異的な抗体であって、異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは異なって、モノクローナル抗体は、抗原上の単一エピトープのみに対応するので、治療剤としての品質管理が容易である。前記抗体は、免疫グロブリン分子の構成のうち重鎖および/または軽鎖の変領域を含み、前記可変領域は、その1次構造として抗体分子の抗原結合部位を形成する部分を含み、本発明の抗体は、前記可変領域を含む一部断片で構成され得、好ましくは、前記可変領域は、CD300cに対する可溶性受容体に代替され得るが、本発明の抗CD300c抗体と同じ効果を示す限り、これに制限されない。

【0024】

10

20

30

40

50

本明細書において、「予防」とは、本発明による薬学的組成物の投与によって癌等の疾患を抑制させたり発病を遅延させるすべての行為を意味する。

【0025】

本明細書において、「治療」とは、本発明による薬学的組成物の投与によって癌等の症状が好転したり有利に変更されるすべての行為を意味する。

【0026】

本明細書において、「個体」とは、本発明の薬学的組成物が投与され得る対象を言い、その対象には制限がない。

【0027】

本明細書において、「薬学的組成物」とは、カプセル、錠剤、顆粒、注射剤、軟こう剤、粉末または飲料の形態であることを特徴とし、前記薬学的組成物は、ヒトを対象とすることを特徴とする。前記薬学的組成物は、これらに限定されるものではないが、それぞれ通常の方法によって散剤、顆粒剤、カプセル、錠剤、水性懸濁液等の経口型剤形、外用剤、坐剤および滅菌注射溶液の形態で剤形化して使用され得る。本発明の薬学的組成物は、薬剤的に許容可能な担体を含むことができる。薬剤的に許容される担体は、経口投与時には、結合剤、滑沢剤、崩解剤、賦形剤、可溶化剤、分散剤、安定化剤、懸濁化剤、色素、香料等を使用することができ、注射剤の場合には、緩衝剤、保存剤、無痛化剤、可溶化剤、等張化剤、安定化剤等を混合して使用することができ、局所投与用の場合には、基剤、賦形剤、潤滑剤、保存剤等を使用することができる。本発明の薬学的組成物の剤形は、上述したような薬剤的に許容される担体と混合して多様に製造され得る。例えば、経口投与時には、錠剤、トローチ、カプセル、エリクサー (elixir)、サスペンション、シロップ、ウェハー等の形態で製造することができ、注射剤の場合には、単位投薬アンブルまたは多数回投薬形態で製造することができる。その他、溶液、懸濁液、錠剤、カプセル、徐放型製剤等で剤形化することができる。

【0028】

一方、製剤化に適した担体、賦形剤および希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、デンプン、アカシアゴム、アルギネート、ゼラチン、カルシウムホスフェート、カルシウムシリケート、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾアート、プロピルヒドロキシベンゾアート、タルク、マグネシウムステアレートまたは鉱物油等が使用され得る。また、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤、防腐剤等をさらに含むことができる。

【0029】

本発明による薬学的組成物の投与経路は、これらに限定されるものではないが、口腔、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜内、心臓内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸管、局所、舌下または直腸が含まれる。経口または非経口投下が好ましい。本願に使用された用語「非経口」は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、硬膜内、病巣内および頭蓋骨内注射または注入技術を含む。本発明の薬学的組成物は、また、直腸投与のための坐剤の形態で投与され得る。

【0030】

本発明の薬学的組成物は、使用された特定化合物の活性、年齢、体重、一般的な健康、性別、食事、投与時間、投与経路、排出率、薬物配合および予防または治療される特定疾患の重症を含む様々な要因によって多様になり得、前記薬学的組成物の投与量は、患者の状態、体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路および期間によって異なるが、当業者により適切に選択され得、1日に0.0001~500mg/kgまたは0.001~5000mg/kgで投与することができる。投与は、一日に一回投与することもでき、数回に分けて投与することもできる。前記投与量は、いかなる点においても本発明の範囲を限定するものではない。本発明による薬学的組成物は、丸剤、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤で剤形化され得る。

【0031】

10

20

30

40

50

以下、本発明の理解を助けるために下記実施例を提示する。しかしながら、下記の実施例は、本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0032】

[実施例1：sCD300c-Fcの作製]

癌細胞および免疫系でCD300cの機能を分析するために、可溶性CD300cに抗体の重鎖領域のうちFc部分が結合されたsCD300c-Fcを作製した。sCD300c-Fcの作製のために、配列番号3のアミノ酸配列をコードする遺伝子(配列番号4)をpCDNA3.1に挿入し、これをHEK293T細胞株に形質転換させた。そして、sCD300c-Fcの生産のために、形質転換された細胞、および細胞内遺伝子送達効率を増加させるポリマーを、IgG含量が非常に低いウシ胎児血清が添加されたRPMI培地に添加して、4日間細胞培養器で培養した。培養が完了した後は、遠心分離機を用いてsCD300c-Fcが含まれた上層液を分離し、0.22µmフィルターを用いて1回濾過させた。そして、組み換えプロテインAセファロースカラム(GE health care)を用いてsCD300c-Fcを分離および精製し、精製されたsCD300c-Fcの吸光度を測定して濃度を決定した。そして、精製されたsCD300c-Fc 2µgをそれぞれReducing sample bufferとNon-reducing sample bufferに添加した後に、pre-made SDS-PAGE gel(Invitrogen)を用いて電気泳動した。その後、クマシーブルーを用いてタンパク質を染色した。その結果は、図1に示した。

10

20

【0033】

図1に示されたように、純度90%以上のsCD300c-Fcが精製されたことを確認した。

【0034】

[実施例2：sCD300c-Fcが腫瘍浸潤リンパ球に及ぼす影響確認]

sCD300c-Fcが腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes; TIL)に及ぼす影響を確認するために、実施例1と同じ方法で作製されたsCD300c-Fcを使用して実験を進めた。より詳しくは、6ウェルプレートに1%のウシ胎児血清(FBS)が添加されたEBM培地(endothelial basal medium, Lonza)を分注し、 $1 \times 10^6$ 細胞/mLのヒト血管内皮細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞; HUVEC, PromoCell)と $1 \times 10^5$ 細胞/mLの末梢血液単核球(PBMC, CTL)を接種し、sCD300c-Fcを10、1、0.1、0.01、および0.001nMの濃度で処理した。そして、37、5%CO<sub>2</sub>条件で16時間の間培養した後に、OD450nmで吸光度を測定して、腫瘍浸潤リンパ球を測定した。その結果は、図2に示した。

30

【0035】

図2に示されたように、sCD300c-Fcの濃度が増加するほど腫瘍浸潤リンパ球の数が増加することを確認し、これを通じて、sCD300c-Fcの処理を通じて末梢血液単核球が分化してヒト血管内皮細胞に浸潤されるリンパ球の数が増加し、リンパ球の数は、処理されたsCD300c-Fcの濃度に依存的に増加することを確認した。前記結果を通じて、sCD300c-Fcの処理を通じて免疫細胞を活性化し得ることを確認することができた。

40

【0036】

[実施例3：sCD300c-FcがNF-βシグナル伝達機序に及ぼす影響確認]

sCD300c-FcがNF-βシグナリングに及ぼす影響を確認するために、実施例1と同じ方法で作製されたsCD300c-Fcを使用して実験を進めた。より詳しくは、THP-1 blue細胞(単球細胞, InvivoGen)を96ウェルプレートにウェル当たり5,000細胞になるように接種した後に、12時間の間培養して、細胞を安定化させた。そして、sCD300c-Fc、LPS(リポポリサッカライド)およ

50

び/またはIgGをそれぞれのウェルに処理した後に、37、5%CO<sub>2</sub>条件で48時間の間培養した。そして、培養上層液を分離して、SEAP発色試薬(Invivogen)を処理し、1時間の間反応させた後に、650nmで吸光度を測定して、NF- $\kappa$ Bのシグナル強度を測定した。その結果を図3に示した。

#### 【0037】

図3に示されたように、LPSのみを処理した対照群では、NF- $\kappa$ Bのシグナルが0.4程度を示し、sCD300c-Fcを処理した対照群では、0.8程度の基本値を示すことを確認した。反面、LPSおよびsCD300c-Fcを共に処理した実験群では、NF- $\kappa$ Bシグナルが顕著に増加することを確認した。また、加熱して不活性化させたsCD300c-Fc(h.i.sCD300c-Fc; heat inactivated sCD300c-Fc)の場合には、NF- $\kappa$ Bシグナルに影響を及ぼさないことを確認した。前記結果を通じて、sCD300c-FcがNF- $\kappa$ Bのシグナル伝達機序を活性化させて、免疫細胞であるTHP-1単球が活性化し、マクロファージに分化を促進させて、先天性免疫系を効率的に活性化し得ることを確認することができた。

10

#### 【0038】

[実施例4：抗CD300c抗体の作製]

(4.1.抗CD300cポリクローナル抗体の作製)

CD300cに対するポリクローナル抗体を作製するために、抗原に使用するCD300cの細胞外ドメインの遺伝子(配列番号2)を6xヒスチジンを発現するように、pET28a(Novagen)発現ベクターに挿入し、大腸菌に形質転換させた。そして、形質転換された大腸菌を100mg/mLのアmpiシリンが添加された100mLのLB培地に接種した後に、吸光度がOD<sub>600nm</sub>で0.8~1.0になるように培養し、IPTGを添加した。そして、25で16時間の間培養してHisタグを有するCD300cの発現を誘導した後に、培養液を遠心分離して上層液を除去し、細胞を獲得した。獲得された細胞は、50mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および500mMのNaCl(pH8.0)が混合されている溶液を用いて再懸濁させ、超音波を用いて細胞を破碎した。そして、遠心分離および濾過過程を経てタンパク質の精製のために使用する細胞溶解物を確保した。細胞溶解物内に含まれているHisタグを有するCD300c(配列番号5;CD300c-His)は、Ni-NTA Sepharose column(GE healthcare)を用いたaffinity chromatography方法を用いて精製し、step gradient elutionを通じてHisタグを有するCD300cを溶出させた。精製されたHisタグを有するCD300cは、実施例1と同じ方法でSDS-PAGEを実施し、純度90%以上のHisタグを有するCD300cが精製されたことを確認した。

20

30

#### 【0039】

そして、精製されたHisタグを有するCD300cを用いてニュージーランド白ウサギに抗原免疫を実施した。より詳しくは、精製されたHisタグを有するCD300c抗原を0.5mg/400 $\mu$ Lの濃度でリン酸塩緩衝液(PBS)を用いて希釈し、同量の完全フロイントアジュバント(Sigma)と混合して皮下注射する方法で1次免疫を行った。そして、2週後に0.5mg/400 $\mu$ Lの抗原と同量の不完全フロイントアジュバント(Sigma)を混合して同じ方法で2次免疫を実施した後に、2週間隔で同じ方法で最終4次免疫まで実施した。3次免疫後には、尾静脈で採血して血液を獲得し、獲得された血液を1/1,000で希釈してELISAを実施して抗体の活性度を評価し、最終4次免疫後には、麻酔後にウサギの全血を採血して血しょうを獲得した。

40

#### 【0040】

(4.2.抗CD300c抗体の抗体特異性の確認)

実施例4.1と同じ方法で作製された抗CD300c抗体の特異性を確認するために、1ng、10ng、100ng、500ng、および1 $\mu$ gの濃度で希釈されたCD300c抗原に対する特異性を1,000倍で希釈された血しょうを用いてELISAおよびウェスタンブロッティングを実施した。その結果、抗CD300c抗体がCD300c抗

50

原に対して特異的に反応することを確認した。

【0041】

(4.3. 抗CD300c抗体の精製)

実施例4.1と同じ方法で獲得された血しょうから抗CD300c抗体を精製するために、affinity purification方法を用いた。より詳しくは、CD300c抗原とNHS activated sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare)をcoupling buffer (0.2MのNaHCO<sub>3</sub>, 0.5MのNaCl, pH8.3)を用いて共に混合してアフィニティゲルを作製し、これをポリプロピレンカラムにパッキングした。そして、カラムに獲得された血しょうを添加して抗原に特異的に結合する抗体のみをカラムに残した後に、0.1Mのグリシン (pH2.5) および0.1Mのクエン酸 (pH3.0) が混合された溶出緩衝液を使用して抗体を精製した。そして、精製された抗体は、リン酸塩緩衝液を用いて透析させた後に濃縮して、1.0mg/mLの濃度で分けて分注し、-80 で使用前まで保管した。

10

【0042】

(実施例5: 抗CD300c抗体がT細胞に及ぼす影響の確認)

抗CD300c抗体がヒトT細胞に及ぼす影響を確認するために実験を進めた。より詳しくは、一次的にヒトの末梢血液単核細胞 (PBMC) からT細胞分離キット (130-096-534, Miltenyi)を用いて全体T細胞 (pan T cells) を分離した。そして、分離したT細胞を96ウェルプレートにウェル当たり5,000細胞になるように接種した後に、6時間の間培養して細胞を安定化させ、抗CD3抗体 (Biolegend) および抗CD28抗体 (Biolegend) を処理した。そして、実施例4.3と同じ方法で精製された抗CD300cポリクローナル抗体を濃度別に処理した。そして、37 で48時間の間培養した後に、培養上層液を分離してIL-2の量を測定した。IL-2の量は、IL-2 Quantikineキット (R&D systems)を用いて確認した。その結果は、図4に示した。

20

【0043】

図4に示されたように、抗CD300c抗体を処理した実験群の場合には、処理濃度によってIL-2の量が増加することを確認した。これを通じて、抗CD300c抗体の場合には、IL-2の分泌量を増加させて適応性免疫系であるT細胞を活性化させることを確認することができた。

30

【0044】

[実施例6: 抗CD300c抗体のin vitroでの抗癌効果の確認]

(6.1. 抗CD300c抗体の肺癌成長抑制効果の確認)

抗CD300c抗体が肺癌の成長を抑制する効果があるかを確認するために、一次的にA549細胞表面にCD300c抗原を有しているかを確認した。より詳しくは、ヒト肺癌細胞株であるA549細胞を4%ホルムアルデヒドで固定させた後に、5%ヤギ正常血清を用いてブロッキングした。そして、1μgの抗CD300c抗体を処理し、反応させた後に、FITCラベル抗ウサギIgG抗体を用いて染色した。そして、蛍光標識された細胞を、フローサイトメーター (FACS)を用いて確認した。その結果は、図5Aに示した。

40

【0045】

図5Aに示されたように、ヒト肺癌細胞株には、CD300c抗原を有していることを確認した。

【0046】

また、肺癌の成長を抑制するかを確認するために、癌細胞の増殖抑制効果を確認した。より詳しくは、96ウェルプレートにA549細胞をウェル当たり10,000細胞になるように接種した後に、18時間の間培養して安定化させた。そして、0.1、1、および10μg/mLの抗CD300c抗体を処理し、72時間の間培養した。そして、顕微鏡を用いて写真を撮影した。その結果は、図5Bに示した。また、それぞれのウェルにC

50

CK-8 (DiJindo) を 10  $\mu$ L ずつ添加し、4 時間の間反応させた後に、450 nm で吸光度を測定した。その結果は、図 5 C に示した。

【0047】

図 5 B および図 5 C に示されたように、抗 CD300c 抗体の処理濃度が増加するほど肺癌細胞の増殖が抑制されることを確認し、これを通じて、抗 CD300c 抗体が肺癌の成長を抑制することを確認することができた。

【0048】

(6.2. 抗 CD300c 抗体の乳癌成長抑制効果の確認)

抗 CD300c 抗体が乳癌の成長を抑制する効果があることを確認するために、実施例 6.1 と同じ方法で乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞を使用して細胞増殖抑制効果を確認した。その結果は、図 6 に示した。

10

【0049】

図 6 に示されたように、抗 CD300c 抗体の処理濃度が増加するほど乳癌細胞の増殖が抑制されることを確認し、これを通じて、抗 CD300c 抗体が乳癌の成長を抑制することを確認することができた。

【0050】

(6.3. 抗 CD300c 抗体の大腸癌成長抑制効果の確認)

抗 CD300c 抗体が大腸癌の成長を抑制する効果があることを確認するために、実施例 6.1 と同じ方法で転移性大腸癌細胞株である CT-26 細胞を使用して細胞増殖抑制効果を確認した。その結果は、図 7 に示した。

20

【0051】

図 7 に示されたように、抗 CD300c 抗体の処理濃度が増加するほど大腸癌細胞の増殖が抑制されることを確認し、これを通じて、抗 CD300c 抗体が大腸癌の成長を抑制することを確認することができた。

【0052】

[実施例 7: 抗 CD300c 抗体の *in vivo* での抗癌効果確認]

(7.1. 抗 CD300c 抗体の大腸癌成長抑制効果の確認)

抗 CD300c 抗体が *in vivo* でも癌細胞の成長を抑制する効果があることを確認するために、8 週齢の BALB/c マウスに転移性大腸癌細胞株である CT-26 細胞株を  $5 \times 10^5$  細胞になるようにマウスの右側の側面に皮下注射し、餌と水を与えながら飼育した。動物の飼育およびすべての実験手続きは、動物実験に対する法規および規制に基づいて進めた。そして、腫瘍のサイズが約  $70 \text{ mm}^3$  に到達したとき、濃度 0.1、1、および  $10 \mu\text{g}$  の抗 CD300c 抗体を 0、1、および 5 日目に腹腔注射で投与した後に、腫瘍のサイズを確認した。対照群としては、リン酸塩緩衝液を注射した。その結果は、図 8 に示した。

30

【0053】

図 8 に示されたように、抗 CD300c 抗体の濃度が増加するほど転移性大腸癌のサイズの増加が減少すると共に、 $10 \mu\text{g}$  を処理した実験群では、15 日まで腫瘍の成長が完全に抑制されて、これ以上腫瘍が成長しないことを確認した。

【0054】

(7.2. 抗 CD300c 抗体の肺癌成長抑制効果確認)

肺癌動物モデルを用いて実施例 7.1 と同じ実験を進めた。より詳しくは、4 ~ 6 週齢の BALB/c マウスにヒト肺癌細胞株である A549 細胞株を  $5 \times 10^6$  細胞になるようにマウスの右側脇に皮下注射し、餌と水を与えながら飼育した。そして、腫瘍の直径が約 3 ~ 5 mm に到達したとき、濃度 1、10、および  $100 \text{ mg/kg}$  の抗 CD300c 抗体を 0、1、および 5 日目に腹腔注射で投与した後に、腫瘍のサイズを確認した。対照群としては、リン酸塩緩衝液を注射した。その結果は、図 9 に示した。

40

【0055】

図 9 に示されたように、抗 CD300c 抗体の濃度が増加するほど肺癌の増殖が抑制されて腫瘍が成長しないことを確認した。前記結果を通じて、本発明の抗 CD300c 抗体

50

が *in vivo* でも癌の成長を効果的に抑制することを確認することができた。

【0056】

前記結果を通じて、抗CD300c抗体は、多様な癌の増殖を効果的に抑制することができ、抗CD300c抗体を抗癌剤として使用可能であることを確認することができた。

【0057】

[実施例8：CD300c siRNAの抗癌効果確認]

CD300cが癌細胞の増殖に及ぼす影響を追加で確認するために、CD300cの発現抑制が抗癌効果を示すかを確認した。より詳しくは、CD300cに対するsiRNA (sc-93646, SantaCruz) を用いて提供されるマニュアルに従って肺癌細胞株であるA549細胞でCD300cの発現を抑制した。対照群としては、Scrambled RNAを使用した。siRNAをLipofectamine RNAiMax (Life Technologies) を用いて細胞に形質感染させた後に、30時間培養した。そして、培養された細胞に細胞溶解溶液(20mMのTris-HCl (pH7.5)、150mMのNaCl、1mMのNa<sub>2</sub>EDTA、1mMのEGTA、1%のTriton、2.5mMのピロリン酸ナトリウム、1mMのグリセロリン酸、1mMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1μg/mLのロイペプチン、および1mMのPMSF)を処理して、細胞溶解物を回収した。そして、溶解物内に含まれているタンパク質の量を、BCA法を用いて定量した。そして、同量のCD300cに特異的に結合する抗体(PA5-87097, ThermoFisher)を用いてウェスタンブロッティングを実施した。その結果は、図10Aに示した。そして、癌細胞の増殖抑制効果を確認するために、96ウェルプレートにA549細胞をウェル当たり10,000細胞になるように接種した後に、18時間の間培養して安定化させた。そして、siRNAを処理した後に5日間培養し、CKK-8を用いて吸光度を測定した。その結果は、図10Bに示した。

【0058】

図10Aに示されたように、CD300c siRNAを用いて細胞でCD300cの発現を抑制できることを確認した。また、図10Bに示されたように、癌細胞株にsiRNAを処理すると、細胞増殖が抑制されることを確認した。

【0059】

前記結果を通じて、CD300cの発現を抑制させることによって、抗癌効果を示すことを確認することができ、siRNA(小分子干渉RNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、miRNA(マイクロRNA)等を用いてCD300cの発現を抑制し、またCD300cに特異的に結合する抗体、アプタマー等を用いてCD300cの活性を抑制することによって、多様な癌において抗癌治療効果を示すことができることを確認することができた。

【0060】

[実施例9：CD300c機能および/または発現抑制を通じた抗癌免疫効果の確認]

CD300cの機能および/または発現を抑制することによって、抗癌免疫効果を示すかを確認するために、実施例7.1と同じ方法で大腸癌細胞株が移植されたBALB/cマウスに濃度10μgの抗CD300c抗体を0、1、および5日目に腹腔注射で投与し、7日目に安楽死させた後に、マウスの骨髄を分離した。そして、分離した骨髄から骨髄由来抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cells; MDSC)、リンパ球、および細胞傷害性Tリンパ球を、フローサイトメーター(FACS)を用いて確認した。その結果は、図11に示した。

【0061】

図11に示されたように、抗CD300c抗体を処理したマウスの場合、リンパ球および細胞傷害性Tリンパ球(CD8+)の場合には、数が増加し、リンパ球は、分化誘導(CD4+)が促進されたことを確認した。反面、骨髄由来抑制細胞の数が減少したことを確認した。前記結果を通じて、CD300cの機能および/または発現を抑制することによって、癌動物モデルの血液内で免疫系の活性化が誘導され、T免疫細胞の活性または増殖を抑制させる骨髄由来抑制細胞の数を減少させることによって、抗癌免疫効果を顕著に

増加させて、癌治療効果を示すことを確認することができた。

【0062】

図12は、CD300cの活性および/または発現を抑制することによって抗癌効果を示す機序について簡略に示す図であって、従前に知られている免疫チェックポイントを形成しているB7ファミリー（例えば、PD-1/PD-L1相互作用等）のように腫瘍の表面に発現するCD300cは、T細胞表面の相互結合分子（Binding Partner）と結合してT細胞の活性化を抑制する作用をするが、CD300cに対して特異的に結合する抗CD300c抗体を処理することによって、T細胞の活性および増殖を刺激して抗癌効果を示すと同時に、腫瘍細胞表面のCD300cに結合して直接的に腫瘍の増殖を抑制することが確認される。これは、CD300cの発現を抑制するオリゴヌクレオチドを用いて、腫瘍表面のCD300cが発現しないようにしても、同じ効果を示すことが確認される。

10

【0063】

したがって、前記結果を通じて、CD300cの発現および/または機能を抑制することによって、癌環境内で腫瘍浸潤リンパ球および細胞毒性Tリンパ球の数を増加させ、骨髄由来抑制細胞の数を減少させて、体内の抗癌免疫反応を効果的に活性化させると共に、細胞の増殖を抑制して、癌の成長および発達を効果的に抑制できることを確認したので、CD300cの発現および/または機能を抑制する物質を多様な癌の増殖、再発、転移等を抑制するのに効果的に使用可能であることを確認することができた。

【0064】

上記に記述した本発明の説明は、例示のためのものであり、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者は、本発明の技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で容易に変形が可能であることを理解することができる。したがって、以上で記述した実施例は、すべての面において例示的なものであり、限定的でないものと理解すべきである。

20

【産業上の利用可能性】

【0065】

本発明は、多様な癌細胞の表面に存在するCD300cタンパク質の新規な用途に関し、CD300cタンパク質の発現または活性を抑制させることによって、T細胞の活性を増加させ、癌細胞の増殖を抑制できることを確認したので、本発明のCD300cの発現抑制剤または活性抑制剤は、多様な癌に適用可能であると共に、癌の予防および/または治療効果を顕著に増加させることができるので、多様な癌治療剤に適用されて幅広く使用可能なものと期待される。

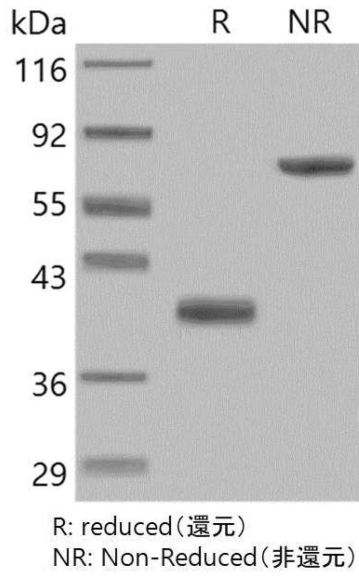
30

40

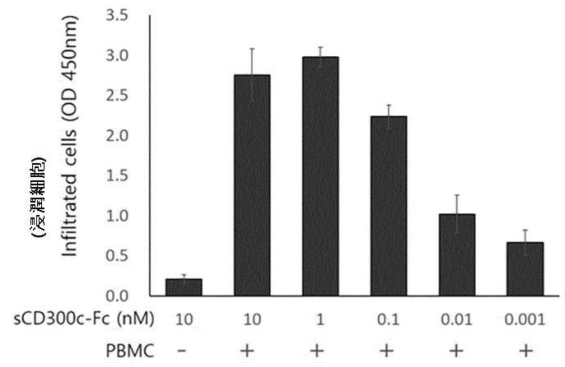
50

【 図面 】

【 図 1 】



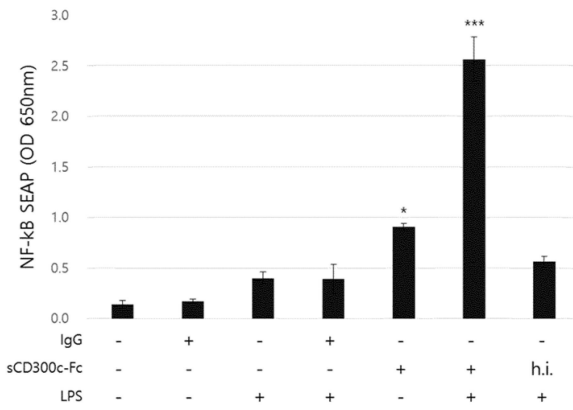
【 図 2 】



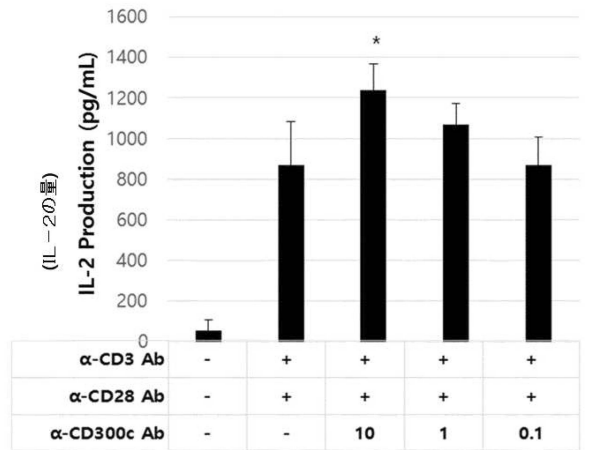
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

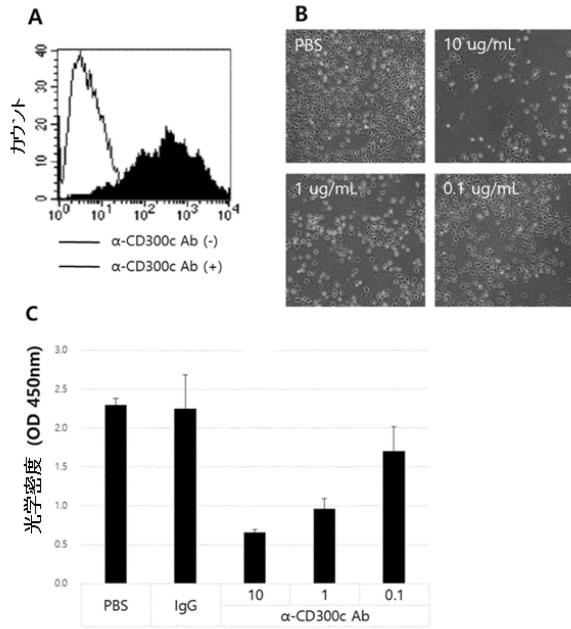


30

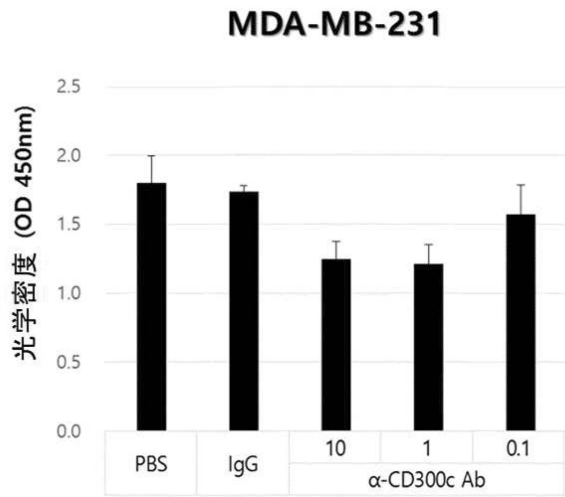
40

50

【 図 5 】



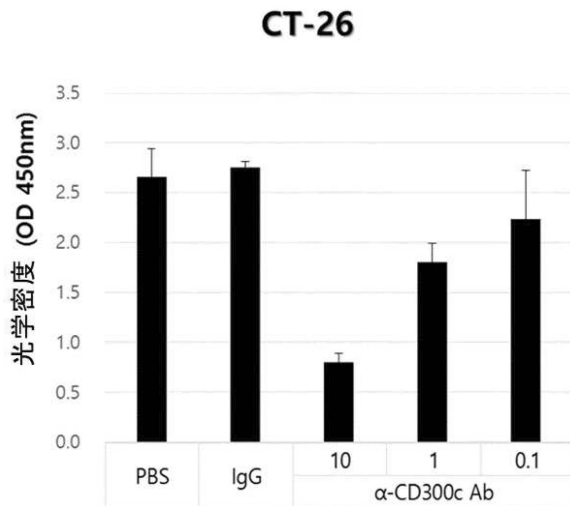
【 図 6 】



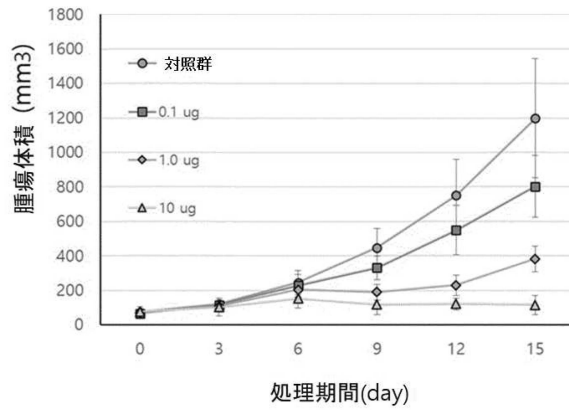
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

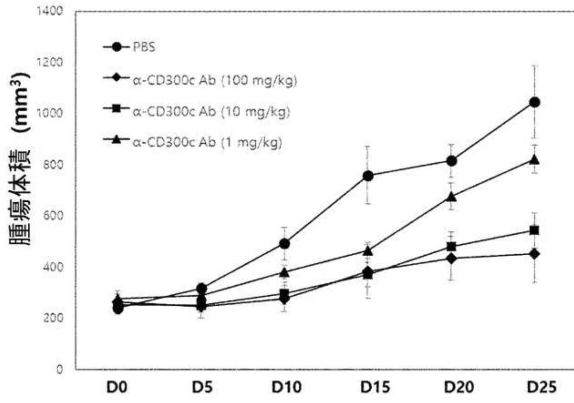


30

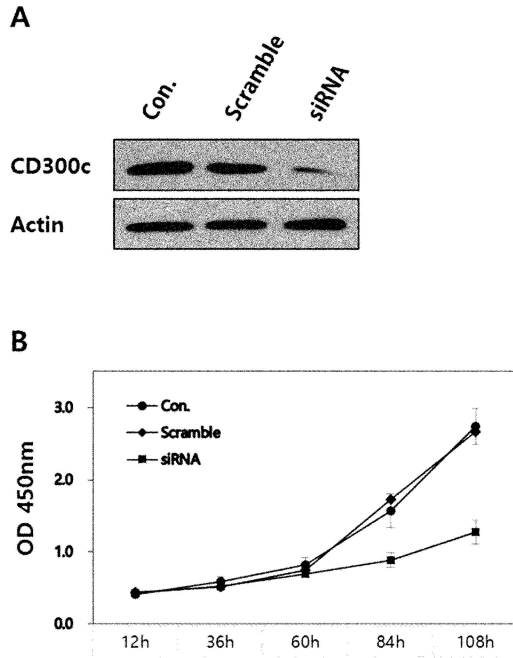
40

50

【 図 9 】



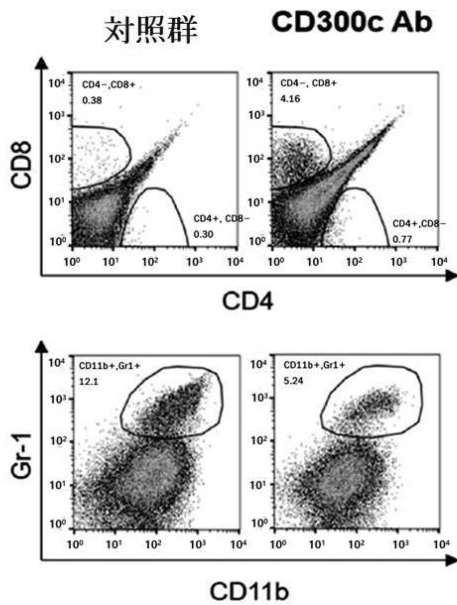
【 図 10 】



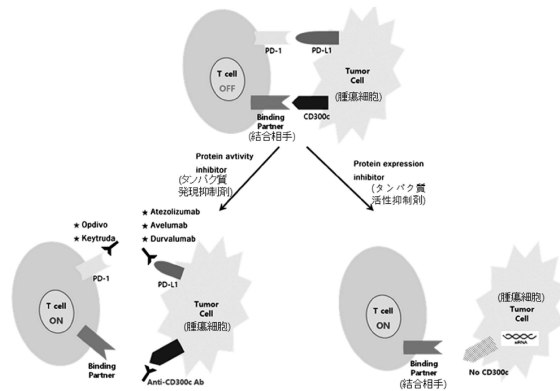
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】



30

40

【 配列表 】

0007301264000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)  
 C 1 2 N 15/115 (2010.01)

## F I

C 1 2 Q 1/02  
 G 0 1 N 33/15 Z  
 G 0 1 N 33/50 Z  
 A 6 1 K 48/00  
 C 0 7 K 16/28  
 C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z  
 C 1 2 N 15/115 Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

ムヤンジユ - シ、ワプ - ウプ、トクソ - ロ 2 7 0

## (72)発明者

キム、ハヌル

大韓民国 1 2 2 2 1 キョング - ド、ナムヤンジユ - シ、ピョンネ - ロ 1 4 6

## (72)発明者

チョン、ジュン - グ

大韓民国 3 0 0 9 8 セジョン - シ、ボラム - ロ 1 5

## 審査官

深草 亜子

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 0 7 1 5 7 6 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 3 - 5 0 6 6 8 6 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 6 7 6 0 ( W O , A 1 )

Eur.J.Immunol. , 2013年 , Vol.43 , pp.2151-2161

Scientific Reports , 2018年05月29日 , Vol.8 , Article8259

アレルギー , 2017年 , Vol.66 , pp.36-41

## (58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )