

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2022/240260 A1

2022년 11월 17일 (17.11.2022) WIPO | PCT

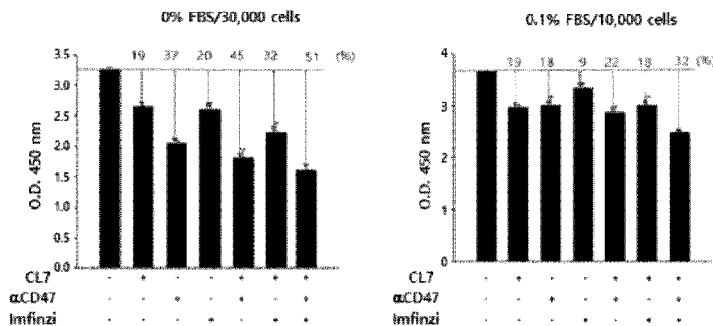
- (51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/006938
- (22) 국제출원일: 2022년 5월 13일 (13.05.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0062311 2021년 5월 13일 (13.05.2021) KR
10-2021-0062312 2021년 5월 13일 (13.05.2021) KR
10-2021-0062313 2021년 5월 13일 (13.05.2021) KR
10-2021-0114297 2021년 8월 27일 (27.08.2021) KR
10-2022-0042680 2022년 4월 6일 (06.04.2022) KR
- (71) 출원인: 주식회사 센트릭스바이오 (CENTRICSBIO, INC.) [KR/KR]; 05836 서울특별시 송파구 법원로11길 28, 3층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 전재원 (JEON, Jae Won); 16512 경기도 수원시 영통구 법조로 134, Gyeonggi-do (KR). 김하늘 (KIM, Ha Neul); 12226 경기도 남양주시 평내로 104, Gyeonggi-do (KR). 이수인 (LEE, Su In); 11949 경기도 구리시 장자호수길 71, Gyeonggi-do (KR). 김우창 (KIM, Woo Chang); 24434 강원도 춘천시 영서로 2317, Gangwon-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 세움 (SEUM IP); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로 211, 13층, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMBINED THERAPY USING ANTI-CD300C ANTIBODY

(54) 발명의 명칭: 항-CD300C 항체를 이용한 병용 요법



(57) Abstract: The present invention relates to an anti-CD300c antibody and a combined therapy using same. More specifically, the present invention relates to a pharmaceutical composition, a kit, or a method for prevention or treatment of cancer, including an anti-CD300c monoclonal antibody and one or more additional anticancer agents as active ingredients.

(57) 요약서: 본 발명은 항-CD300c 항체 및 이의 병용 요법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-CD300c 단클론 항체 및 하나 이상의 추가 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 키트 또는 방법에 관한 것이다.

WO 2022/240260 A1

명세서

발명의 명칭: 항-CD300C 항체를 이용한 병용 요법

기술분야

- [1] 본 발명은 항-CD300c 항체 및 항-CD300c 항체를 이용한 병용 요법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-CD300c 단클론 항체 및 하나 이상의 추가 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료를 위한 조성물, 키트 및 병용 요법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근의 암 치료로 인체의 면역체계를 활성화시켜 암세포와 싸우게 하는 면역항암 요법이 각광받고 있다. 이전의 암 치료제는 암 세포의 특징인 빠르게 분열하는 세포를 죽이는데 초점을 맞추었기 때문에 암 세포뿐만 아니라 정상 세포 중 빠르게 분열하는 세포에도 작용하여 부작용이 나타났다. 반면, 면역항암제는 암 환자의 면역체계를 활용해 암세포에 영향을 주어 기존 항암제의 전형적인 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 또한, 면역항암제는 체내 면역체계를 활용하기 때문에, 암의 특정 변이나 신호를 표적하는 표적항암제와 달리, 다양한 암종에 적용이 가능하다. 면역항암제의 일종으로 키트루다(Keytruda®) 등과 같은 면역관문 억제제가 각광받고 있다.
- [3] 한편, CD300c(CD300 antigen-like family member C) 단백질은 인간에서 CD300c 유전자에 의해 코딩되는 단백질로서, 다양한 암 세포의 표면에 존재하고, CD300c 단백질의 활성화 또는 발현을 저해함으로써 T 세포를 활성화하고 암 세포의 증식을 감소시킬 수 있음이 밝혀졌다(한국 특허공개공보 제10-2019-0136949호).
- [4] 또한, 많은 종양은 종종 다중 면역관문 단백질을 동시에 발현하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 키트루다(Keytruda®) 등과 같은 면역관문 억제제의 유망한 임상 활성화에도 불구하고, 치료 활성을 증가시키거나, 독성을 감소시키거나 또는 둘 다에 의해 치료 효과를 증가시키는 것은 여전히 면역항암제 개발의 중심 목표이다.
- [5] [선행기술문헌]
- [6] [특허문헌]
- [7] (특허문헌 1) 한국 특허공개공보 제10-2019-0136949호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상술한 문제점을 모두 해결하는 것을 그 목적으로 한다.
- [9] 본 발명은 암 예방 또는 치료를 위한 항-CD300c 항체를 이용한 병용 요법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [10] 본 발명은 암 예방 또는 치료를 위한 항-CD300c 항체를 이용한 병용 요법을

위한 약학 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[11] 본 발명은 암 예방 또는 치료를 위한 항-CD300c 항체를 이용한 병용 요법에 사용되는 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[12] 본 발명은 CD300c 발현 수준 또는 항-CD300c 항체 투여에 따른 마커 단백질의 변화에 기초한 진단 또는 치료 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[13] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않는다. 본 발명의 목적은 이하의 설명으로 보다 분명해질 것이며, 특허청구범위에 기재된 수단 및 그 조합으로 실현될 것이다.

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 대표적인 구성은 다음과 같다.

[15] 본 발명의 일 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 그의 암 예방 또는 치료용 용도가 제공된다.

[16] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 암 예방 또는 치료를 위한 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제의 조합 사용이 제공된다.

[17] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제를 유효 성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물이 제공된다.

[18] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제를 암의 예방 또는 치료가 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법이 제공된다.

[19] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효량 포함하는 조성물, 및 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제의 조합 사용을 지시하는 지시서를 포함하는, 암의 예방 또는 치료를 위한 키트가 제공된다.

[20] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 대상체로부터 수득된 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 치료 반응성 예측을 위한 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[21] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 암의 예방 또는 치료가 필요한 대상체로부터 수득된 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 CD300c 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[22] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 유효량 포함하는 조성물, 및 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 사용을 지시하는 지시서를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 키트가 제공된다.

발명의 효과

[23] 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 및 추가 항암제의 병용 요법은 항-CD300c 항체

또는 상기 추가 항암제가 단독으로 사용되는 경우에 비해 암세포의 성장, 증식 및 전이 등을 효과적으로 또는 상승적으로 억제할 수 있다는 것이 시험관내 및 생체내 모두에서 확인되었다. 따라서, 그러한 항-CD300c 단클론 항체 및 추가 항암제의 병용은 다양한 암의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

- [24] 또한, 다양한 암 환자에서 CD300c 단백질의 발현 수준과 생존기간에 상당한 관련성이 있음을 밝힘으로써 CD300c 단백질의 발현 수준이 암 환자의 예후나 항-CD300c 항체를 이용한 치료 가능성 등의 예측에 활용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 항-CD300c 항체의 투여 후 면역 관문 단백질, 면역세포 활성화 인자, 종양 미세환경 등에 관한 마커 단백질의 변화를 확인하였는바, 이들 마커 단백질이 항-CD300c 항체에 대한 환자의 치료 반응성 확인 또는 다른 항암제와의 효과적인 병용 투여를 위해 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1a 내지 도 1y는 본 발명에 따른 25종의 항-CD300c 단클론 항체 각각의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열(핵산 및 아미노산 서열)을 나타낸다. 각각의 도면에서, CDR 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)를 순서대로 표시하였다.
- [26] 도 2는 실시예 1.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 비환원 조건에서의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- [27] 도 3은 실시예 1.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 환원 조건에서의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- [28] 도 4는 실험예 1.1에 따른 정상세포, 면역세포, 및 암 세포주에서 CD300c가 발현됨을 확인한 결과를 나타낸다.
- [29] 도 5a 및 도 5b는 실험예 1.2에 따른 암 조직(도 5a) 및 면역 세포(도 5b)에서 CD300c가 발현됨을 확인한 결과를 나타낸다.
- [30] 도 6a 및 도 6b는 실험예 1.3에 따른 편도 조직(도 6a) 및 암 조직(도 6b)에서 CD300c가 발현됨을 확인한 결과를 나타낸다.
- [31] 도 7은 실험예 2.1에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 CD300c 항원에 대한 결합력을 확인한 결과를 나타낸다.
- [32] 도 8은 실험예 2.2의 FACS 결합의 결과에 따른 S자형 곡선을 나타낸다.
- [33] 도 9는 실험예 2.3에 따른 결합 ELISA의 결과를 나타낸다.
- [34] 도 10은 실험예 2.4에 따른 표면 플라즈몬 공명의 결과를 나타낸다.
- [35] 도 11은 실험예 2.5에 따른 결합 ELISA의 결과를 나타낸다.
- [36] 도 12는 실험예 2.6에 따른 결합 ELISA의 결과를 나타낸다.
- [37] 도 13은 실험예 3.1에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킬 수 있는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [38] 도 14는 실험예 3.2에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 종양 관련 마크로파지에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [39] 도 15는 실험예 3.3에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 CD8+ T 세포에 미치는

- 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [40] 도 16은 실험예 3.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 종양 특이적인 방식으로 CD8+ T 세포 수를 증가시키는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [41] 도 17은 실험예 3.5에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 CD8+ T 세포의 활성화 증가에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [42] 도 18은 실험예 3.6에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 조절 T 세포 대비 세포독성 T 세포의 증가에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [43] 도 19는 실험예 3.7에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 세포독성 T 세포, 조절 T 세포 및 종양 관련 마크로파지에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸다.
- [44] 도 20은 실험예 3.8에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 항암 효과를 나타내는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [45] 도 21은 실험예 3.9에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 항암 효과를 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [46] 도 22는 실험예 4와 관련하여 CD300c 발현량에 따른 다양한 암 환자에서의 전체 생존 기간 비교 결과를 나타낸다.
- [47] 도 23은 실시예 2.1에 따라 고형암 모델에 CL7를 처리한 경우 얻어진 나노스트링 면역 프로파일링(Nanostring Immune profiling) 결과를 나타낸다.
- [48] 도 24는 실시예 2.1에 따라 고형암 모델에 CL7를 처리한 경우 얻어진 다양한 면역 세포 및 종양 미세 환경 관련 마커의 발현 변화를 나타낸다. *표시는 CL7를 처리하기 전과 비교하여 발현 수준이 통계적으로 유의하게 변화된 마커를 의미한다.
- [49] 도 25는 실시예 2.2에 따른 실시예 2.1에서 얻은 나노스트링 면역 프로파일링 결과에 기초하여 확인된 면역관문 마커의 발현 변화를 나타낸다. *표시는 CL7를 처리하기 전과 비교하여 발현 수준이 통계적으로 유의하게 변화된 마커를 의미한다.
- [50] 도 26은 실험예 5.1에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 의 단독 및 병용 처리에 의한 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화 결과(M1 마크로파지의 증가 여부)를 나타낸다.
- [51] 도 27은 실험예 5.2에 따른 항-CD300c 단클론 항체의 처리에 의한 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화 결과(M1 마크로파지 마커의 증가 여부를 나타냄)를 나타낸다.
- [52] 도 28은 실험예 5.2에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리에 의한 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화 결과(M1 마크로파지 마커의 증가 여부를 나타냄)를 나타낸다.
- [53] 도 29 내지 도 31은 실험예 5.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리 시 M1 마크로파지 분화의 신호인 MAPK(도 29), NF-kB(도 30), 및 IκB(도 31)의 신호 전달을 확인한 결과를 나타낸다.

- [54] 도 32는 실험예 6.1에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리 시 세포자멸 신호의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.
- [55] 도 33 및 도 34는 실험예 6.2에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리 시 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.
- [56] 도 35은 실험예 7.1에서 사용된 실험 방법을 개략적으로 나타낸다.
- [57] 도 36은 실험예 7.1에 따른 항-PD-1 항체 및 항-CD300c 단클론 항체를 단독 또는 병용으로 대장암 세포주 이식 마우스에 투여한 경우 관찰되는 생체내 암 성장 억제 효과를 나타낸다.
- [58] 도 37은 실험예 7.3에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 모델에서 암 조직 내의 M1 마크로파지를 증가시키는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [59] 도 38은 실험예 7.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 종양 모델에서 CD8+ T 세포 면역을 촉진하는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [60] 도 39는 실험예 8.1에서 사용된 실험 방법을 개략적으로 나타낸다.
- [61] 도 40은 실험예 8.1에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 CT26 대장암 마우스 모델 외에 추가로 다른 암종에서도 효과가 있는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [62] 도 41은 실험예 8.2에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 단독 또는 병용 투여(이중 및 삼중 병용 투여를 포함함)가 B16F10 흑색종 모델에서 CD8+ T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [63] 도 42는 실험예 8.3에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 단독 또는 병용 투여(이중 및 삼중 병용 투여를 포함함)가 B16F10 흑색종 모델에서 조절 T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [64] 도 43은 실험예 8.4에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 단독 또는 병용 투여(이중 및 삼중 병용 투여를 포함함)가 B16F10 흑색종 모델에서 마크로파지에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [65] 도 44a 및 도 44b는 실험예 9에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여에 의한 항암 효과를 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다. 도 44a는 종양 부피 감소율을 나타내고, 도 44b는 완전 관해율을 나타낸다.
- [66] 도 45는 실험예 10에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여에 의한 장기 생존율 향상 효과를 확인한 결과를 나타낸다.
- [67] 도 46은 실험예 11에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여에 의한 암 재발 방지 효과를 생체내 조건에서 확인한 결과를 나타낸다.
- [68] 도 47은 실험예 12에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여에 의한 면역 기억 효과를 확인한 결과를 나타낸다.
- [69] 도 48a 및 도 48b는 실험예 14에 따른 항-CD300c 단클론 항체와 면역항암제의 단독 또는 병용 투여(이중 및 삼중 병용 투여를 포함함) 단핵구에서 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킬 수 있는지 확인한 결과를 나타낸다.
- [70] 도 49a 및 도 49b는 실험예 15에 따른 항-CD300c 단클론 항체가 면역 항암제와의 병용 투여에 의해 암 세포 성장을 억제할 수 있는지 확인한 결과를

나타낸다.

[71] 도 50 내지 도 52는 각각 항-CD300c 단클론 항체와의 병용 처리를 위한 소라페닙(Sorafenib)(도 50), 젬시타빈(Gemcitabine)(도 51), 및 파클리탁셀(Paclitaxel)(도 52)의 최적 처리 농도가 선정된 그래프를 나타낸다.

[72] 도 53 내지 도 55는 각각 항-CD300c 단클론 항체와 병용 처리된 소라페닙(도 53), 젬시타빈(도 54), 및 파클리탁셀(도 55)의 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[73] 후술하는 본 발명에 대한 상세한 설명은, 본 발명이 실시될 수 있는 특정 구현예에 관하여 특정 도면을 참조하여 기술될 것이지만, 본 발명은 이에 한정되지 않고, 적절하게 설명된다면, 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다. 본 발명의 다양한 실시예는 서로 다르지만 상호 배타적일 필요는 없음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재되어 있는 특정 형상, 구조 및 특성은 본 발명의 정신과 범위를 벗어나지 않으면서 일 구현예에서 다른 구현예로 변경되거나 구현예들이 조합되어 구현될 수 있다. 본 명세서에 사용된 기술 및 학술 용어들은, 달리 정의되지 않는 한, 본 발명이 속하는 분야에서 일반적으로 사용되는 것과 같은 의미를 갖는다. 본 명세서를 해석할 목적으로 하기 정의들이 적용될 것이고, 단수로 사용된 용어는 적절한 경우에는 복수형을 포함할 것이며 그 반대도 마찬가지이다.

[74] 정의

[75] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 알려진 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 지칭한다.

[76] 본 명세서에서 용어 "항체"는 광의적으로 사용되며, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 임의의 아이소타입의 모노클로날 항체(전장(full length) 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 항체 융합체(예를 들어, 항체와 (폴리)펩티드의 융합체 또는 항체와 화합물의 융합체) 및 항체 단편(항원 결합 단편 포함)을 포함한다. 본 명세서에서, 접두사 "항-"은 항원과 관련된 경우, 해당 항체가 해당 항원과 반응성을 의미한다. 특정 항원과 반응성인 항체는 과지 또는 유사한 벡터에서 재조합 항체 라이브러리의 선별과 같은 합성 및/또는 재조합 방법에 의해, 또는 항원 또는 항원-코딩 핵산을 사용한 동물의 면역화에 의해 생성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 대표적인 IgG 항체는 이황화 결합에 의해 결합되는 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄로 구성된다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역을 포함한다. 중쇄 가변 영역(HVR) 및 경쇄 가변 영역(LVR)은 각각 "상보성 결정 영역"("CDR") 또는 "초가변 영역"으로 칭해지는 3개의 절편을 포함하며, 이는 주로 항원 에피토프와의 결합에 관여한다. 이들은 N-말단으로부터 순차적으로

숫자가 매겨져서 통상 CDR1, CDR2 및 CDR3로 지칭된다. CDR 외부의 가변 영역 중에서 보다 잘 보존된 영역은 "골격 영역"("FR")으로 지칭된다. 본 명세서에서 항체는 예를 들어 동물 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다.

- [77] 용어 "인간화"(리쉐이핑(reshaping) 또는 CDR 그래프팅(grafting)이라고도 지칭됨)는 이중 공급원(통상적으로 설치류) 유래의 단클론 항체의 면역원성을 저하시키고, 친화도 또는 이펙터 기능(ADCC, 보체 활성화, Clq 결합)을 개선시키기 위한 확립된 기법을 포함한다.
- [78] 용어 "단클론 항체"는 "모노클로날 항체"와 상호교환적으로 사용되고, 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 얻어진 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 이루는 개별 항체들은 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 돌연변이 및/또는 번역 후 변형(예컨대 이성질화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 단클론 항체는 고도로 특이적이며, 하나의 항원성 부위에 대해 유도된다. 단클론 항체는 실질적으로 균일한 집단으로부터 수득된 것으로서 항체의 특성을 나타내고 임의의 특정한 방법에 의해 항체의 생산을 요구하는 것으로서 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 단클론성 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 기술, 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법 등의 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [79] 용어 "항원 결합 단편"은 항원에 대한 특이적 결합능을 갖는 항체의 일부 또는 이를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 문맥상 "항체"가 특별히 "항원 결합 단편"을 제외하는 것으로 이해되는 경우를 제외하고는 "항체"와 "항원 결합 단편"은 상호 교환적으로 사용될 수 있고, "항체"는 "항원 결합 단편"을 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 항원 결합 단편의 예에는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 크로스-Fab 단편, 선형 항체, 단일사슬 항체 분자(예를 들어, scFv), 항체 단편과 단일 도메인 항체로 형성된 다중특이성 항체가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.
- [80] 용어 "항암제"는 세포의 각종 대사경로에 작용하여 암세포에 대하여 세포독성(cytotoxic) 또는 세포증식억제(cytostatic) 효과를 나타내는 기존의 암 치료에 사용되는 공지의 약제를 총칭하는 것으로, 크게 화학 항암제, 표적 항암제, 및 면역 항암제를 포함한다.
- [81] 용어 "면역 항암제"는 면역세포를 활성화시켜서 암세포를 사멸시키는 약제를 지칭한다.
- [82] 용어 "화학 항암제"는 세포독성 항암제 또는 화학약물 항암제로도 불리는 암 치료제를 지칭한다.
- [83] 용어 "대상체"는 "환자"와 상호교환적으로 사용되고, 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 포유동물, 예를 들어, 영장류(예: 인간), 반려 동물(예: 개, 고양이 등), 가축 동물(예: 소, 돼지, 말, 양, 염소 등) 및 실험실 동물(예: 랫트, 마우스,

기니피그 등)일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[84] 용어 "치료"는 일반적으로 목적하는 약리학적 효과 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 의미한다. 이러한 효과는 질병 및/또는 이러한 질병으로 인한 유해 효과를 부분적으로 또는 완전히 치유하는 점에서 치료적 효과를 가진다. 바람직한 치료적 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 호전, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이의 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 "치료"는 이미 나타난 질환 또는 장애의 의료적 개입을 의미할 수 있다.

[85] 용어 "예방"은 예방적 치료, 즉 질병을 치료하기 보다는 예방하기 위한 목적의 조치 또는 절차에 관한 것이다. "예방"은 질병 또는 이의 증상을 부분적으로 또는 완전히 예방한다는 관점에서 목적하는 예방적인 약리학적 효과 및/또는 생리학적 효과를 수득함을 의미한다.

[86] 용어 "투여"는 대상체에 예방적 또는 치료적 목적(예컨대, 암의 예방 또는 치료)을 달성하기 위한 물질(예컨대, 항-CD300c 항체 및 그의 항원 결합 단편 또는 다른 항암제)을 제공하는 방법을 의미한다.

[87] 용어 "생물학적 시료"는 대상체로부터 얻어지는 다양한 샘플 유형을 포괄하며, 진단 또는 모니터링 분석법에 이용될 수 있다. 생물학적 시료는 혈액 및 기타 생물학적 기원의 액체 시료, 생체 검사 시료, 조직 배양물, 또는 이로부터 유래된 세포 및 이의 자손과 같은 고체 조직 시료를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 따라서, 생물학적 시료는 임상적 시료, 배양물 중의 세포, 세포 상층액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생물학적 유체 및 조직 시료, 특히 종양 시료를 포괄한다. 용어 "생물학적 자료"는 상기 생물학적 시료를 이용하여 얻은 임의의 분석 자료를 의미한다.

[88] 용어 "발현 수준"은 해당 마커의 mRNA 및 단백질 중 하나 이상의 발현 수준을 측정함에 의해 결정될 수 있고, mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법을 사용할 수 있다. 예컨대, mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 해당 마커 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있고, 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 해당 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드 또는 보조인자일 수 있다. mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소 반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소 반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[89] 용어 "치료 반응성"이란 암에 걸렸거나 걸린 것으로 의심되는 개체가 치료

유효 성분(예컨대 CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편)을 이용한 치료에 대해 유리하게 또는 불리하게 반응하는지 여부를 지칭하는 것으로, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 투여 후 나타나는 종양 치료와 관련된 면역 체계의 변화에 의해 평가될 수 있다.

[90] 항-CD300c 항체

[91] 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD300c 단백질에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자이다.

[92] 용어 "CD300c 단백질"은 "CD300c" 또는 "CD300c 항원"과 상호 교환적으로 사용되며, CD300c 유전자에 의해 코딩되는 단백질로서 B7 패밀리 단백질과 상당한 서열 동일성을 나타내고 항원 제시 세포의 막에 발현되는 것으로 알려져 있다. CD300c 단백질의 발현 또는 활성 억제는 T 세포의 활성화 및/또는 M1 마크로파지로의 분화 촉진을 유도할 수 있다.

[93] 또한, 용어 "항-CD300c 항체"는 CD300c 단백질에 결합하는 폴리펩타이드와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 용어 "폴리펩타이드"는 길이와 무관하게 펩타이드 결합을 통해 서로 연결된 아미노산들로 구성된 임의의 폴리머를 의미하는 것으로 의도된다. 즉, 본 명세서에서 폴리펩타이드는 또한 펩타이드 및 단백질을 포함한다.

[94] 일 구현예에서, 항-CD00c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 CD300c 단백질의 세포외 도메인(extracellular domain; ECD)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 CD300c의 세포외 도메인은 인간 CD300c 단백질의 세포외 도메인일 수 있으며, 서열번호 402로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[95] 일 실시예에서, CD300c 단백질의 발현 수준은 다양한 암 환자의 생존기간과 매우 높은 연관성을 나타냄을 확인하였다. 구체적으로, 암 환자의 평균 CD300c 발현 수준 대비, CD300c 발현 수준이 높은 암 환자는 CD300c 발현 수준이 낮은 암 환자에 비해 생존기간이 짧음을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용한 CD300c의 발현 또는 활성의 억제가 암 치료 효과 또는 암 환자의 생존기간 증가 효과를 가져올 수 있음을 의미한다.

[96] 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다양한 암세포의 표면에서 발현되는 CD300c에 특이적으로 결합하여 항암 효과를 나타낼 수 있다. 항-CD300c 항체의 CD300c로의 결합은 T 세포를 활성화시키는 동시에 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시켜 암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있으며, 이는 항-CD300c 항체가 다양한 암의 면역 치료제로서 효과적으로 사용될 수 있게 한다. 또한, 이러한 항-CD300c 항체는 기존의 항암제와의 병용 투여를 통해 그 치료 효과가 더욱 증가될 수 있을 뿐만 아니라, 종간 교차반응성(예컨대 인간 항원과 마우스 항원)을 가지고 있으므로 다양한 포유류에 폭넓게 적용될 수 있다. 또한, 이러한 항-CD300c 항체를 세포사멸에 저항하는 능력을 보이는 저항성 암 세포에 처리한 경우, 암 세포의 저항성을 현저하게 약화시키므로 암 재발 방지에도 우수한 효능을 보일 것으로 기대된다.

또한, 일반적으로 암 세포는 전염증성 사이토카인인 IL-2의 생성을 저해함으로써 면역계를 회피하는데, 항-CD300c 항체는 이러한 암세포에 의해 차단된 IL-2의 생산량을 회복시킴으로써 활성화된 면역계를 통하여 암세포 사멸을 유도시킴이 확인되었다. 따라서, 보다 근본적인 면역 항암제로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. CD300c 단백질 또는 항-CD300c 항체에 대한 내용은 또한 한국 특허공개공보 제10-2019-0136949호를 참조할 수 있고, 이의 내용은 모두 본 명세서에 포함된다.

- [97] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은,
- [98] (i) 서열번호 7, 서열번호 19, 서열번호 31, 서열번호 43, 서열번호 55, 서열번호 67, 서열번호 79, 서열번호 91, 서열번호 103, 서열번호 115, 서열번호 127, 서열번호 139, 서열번호 151, 서열번호 163, 서열번호 175, 서열번호 187, 서열번호 199, 서열번호 211, 서열번호 223, 서열번호 235, 서열번호 247, 서열번호 259, 서열번호 271, 서열번호 283 및 서열번호 295로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1;
- [99] 서열번호 8, 서열번호 20, 서열번호 32, 서열번호 44, 서열번호 56, 서열번호 68, 서열번호 80, 서열번호 92, 서열번호 104, 서열번호 116, 서열번호 128, 서열번호 140, 서열번호 152, 서열번호 164, 서열번호 176, 서열번호 188, 서열번호 200, 서열번호 212, 서열번호 224, 서열번호 236, 서열번호 248, 서열번호 260, 서열번호 272, 서열번호 284 및 서열번호 296으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2; 및
- [100] 서열번호 9, 서열번호 21, 서열번호 33, 서열번호 45, 서열번호 57, 서열번호 69, 서열번호 81, 서열번호 93, 서열번호 105, 서열번호 117, 서열번호 129, 서열번호 141, 서열번호 153, 서열번호 165, 서열번호 177, 서열번호 189, 서열번호 201, 서열번호 213, 서열번호 225, 서열번호 237, 서열번호 249, 서열번호 261, 서열번호 273, 서열번호 285 및 서열번호 297로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [101] (ii) 서열번호 10, 서열번호 22, 서열번호 34, 서열번호 46, 서열번호 58, 서열번호 70, 서열번호 82, 서열번호 94, 서열번호 106, 서열번호 118, 서열번호 130, 서열번호 142, 서열번호 154, 서열번호 166, 서열번호 178, 서열번호 190, 서열번호 202, 서열번호 214, 서열번호 226, 서열번호 238, 서열번호 250, 서열번호 262, 서열번호 274, 서열번호 286 및 서열번호 298로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1;
- [102] 서열번호 11, 서열번호 23, 서열번호 35, 서열번호 47, 서열번호 59, 서열번호 71, 서열번호 83, 서열번호 95, 서열번호 107, 서열번호 119, 서열번호 131, 서열번호 143, 서열번호 155, 서열번호 167, 서열번호 179, 서열번호 191, 서열번호 203, 서열번호 215, 서열번호 227, 서열번호 239, 서열번호 251, 서열번호 263, 서열번호 275, 서열번호 287 및 서열번호 299로 이루어진 군으로부터 선택되는

- 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2; 및
- [103] 서열번호 12, 서열번호 24, 서열번호 36, 서열번호 48, 서열번호 60, 서열번호 72, 서열번호 84, 서열번호 96, 서열번호 108, 서열번호 120, 서열번호 132, 서열번호 144, 서열번호 156, 서열번호 168, 서열번호 180, 서열번호 192, 서열번호 204, 서열번호 216, 서열번호 228, 서열번호 240, 서열번호 252, 서열번호 264, 서열번호 276, 서열번호 288 및 서열번호 300으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [104] 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은,
- [105] (i) 서열번호 43, 서열번호 79, 서열번호 115 및 서열번호 211로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1;
- [106] 서열번호 44, 서열번호 80, 서열번호 116 및 서열번호 212로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2; 및
- [107] 서열번호 45, 서열번호 81, 서열번호 117 및 서열번호 213으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [108] (ii) 서열번호 46, 서열번호 82, 서열번호 118 및 서열번호 214로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1;
- [109] 서열번호 47, 서열번호 83, 서열번호 119 및 서열번호 215로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2; 및
- [110] 서열번호 48, 서열번호 84, 서열번호 120 및 서열번호 216으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [111] 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 다음의 항체 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다:
- [112] 서열번호 79로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 80으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 81로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 82로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 83으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 84로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [113] 서열번호 115로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 116으로 표시되는 아미노산 서열을 구성하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 117로 표시되는 아미노산 서열을 구성하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 118로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 119로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 120으로 표시되는 아미노산

서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및

- [114] 서열번호 211로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 212로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 213으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 214로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 215로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 216으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.
- [115] 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 서열번호 79로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 80으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 81로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 82로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 83으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 84로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [116] 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 서열번호 115로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 116으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 117로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 118로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 119로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 120으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [117] 또 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 서열번호 211로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 212로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 213으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 214로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1, 서열번호 215로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR2, 및 서열번호 216으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR3을 포함할 수 있다.
- [118] 또 다른 구현예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 331, 335, 339, 343, 347, 351, 355, 359, 363, 367, 371, 375, 379, 383, 387, 391, 395, 및 399로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336, 340,

344, 348, 352, 356, 360, 364, 368, 372, 376, 380, 384, 388, 392, 396, 및 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[119] 또 다른 구현예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 315, 327, 339, 및 371로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 316, 328, 340, 및 372로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[120] 또 다른 구현예에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 315로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 316으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 327로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 328로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 339로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 340으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나; 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 371로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 372로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[121] 또 다른 구현예에서, 상기 항-CD300c 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 아래 식 (1) 내지 (3)으로 각각 표현되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 아래 식 (4) 내지 (6)으로 각각 표현되는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다(각 아미노산 서열은 N→C 방향임):

[122] FTFX1X2X3X4MX5WVR (1) (서열번호 403)

[123] 상기 식에서,

[124] X1= G 또는 S

[125] X2= S, R 또는 D

[126] X3= N 또는 Y

[127] X4= Y, A, G 또는 H

[128] X5= S 또는 H

[129] X1ISX2SGX3X4TYYAX5 (2) (서열번호 404)

[130] 상기 식에서,

[131] X1= T 또는 A

[132] X2= G 또는 S

[133] X3= T 또는 G

[134] X4= S 또는 Y

[135] X5= D 또는 E

[136] YCAX1X2X3X4X5X6X7X8X9W (3) (서열번호 405)

[137] 상기 식에서,

[138] X1= R 또는 S

- [139] X2= G 또는 S
- [140] X3= M, S, Y 또는 I
- [141] X4= W, Q, G 또는 R
- [142] X5= G 또는 L
- [143] X6= M, I 또는 P
- [144] X7= D, F 또는 L
- [145] X8= V 또는 D
- [146] X9= I, Y 또는 존재하지 않음
- [147] CX1X2X3X4X5X6X7X8X9X10X11VX12W (4) (서열번호 406)
- [148] 상기 식에서,
- [149] X1= T 또는 S
- [150] X2= G 또는 R
- [151] X3= K, N 또는 S
- [152] X4= H, N 또는 S
- [153] X5= R, I 또는 G
- [154] X6= H, G 또는 I
- [155] X7= T, I 또는 S
- [156] X8= R, A, K, 또는 존재하지 않음
- [157] X9= R, S, G, 또는 존재하지 않음
- [158] X10= N 또는 존재하지 않음
- [159] X11= Y 또는 존재하지 않음
- [160] X12= N, H 또는 Q
- [161] X1X2X3X4RPSGVX5 (5) (서열번호 407)
- [162] 상기 식에서,
- [163] X1= L, S, R 또는 E
- [164] X2= D, K 또는 N
- [165] X3= S 또는 N
- [166] X4= E, N, Q 또는 K
- [167] X5= P 또는 R
- [168] YCX1X2X3X4X5X6X7X8X9X10VF (6) (서열번호 408)
- [169] 상기 식에서,
- [170] X1= Q, A, 또는 S
- [171] X2= S 또는 A
- [172] X3= Y 또는 W
- [173] X4= D 또는 A
- [174] X5= S, D 또는 G
- [175] X6= S, N 또는 T
- [176] X7= S, L, N 또는 K

- [177] X8= V, S, N 또는 G
- [178] X9= G, L, V 또는 존재하지 않음
- [179] X10 = P 또는 존재하지 않음.
- [180] 특정 구현예에서, 상기 항-CD300c 항체 또는 항원 결합 단편은 상기 CDR 서열 또는 하기 표 4와 표 5 및 표 6에 제시된 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 98% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.
- [181] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 내로 적절한 변형을 도입함으로써 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그러한 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실, 및/또는 그러한 아미노산 서열 내로의 잔기의 삽입 및/또는 그러한 아미노산 서열 내에서의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구성물에 도달하도록 결실, 삽입 및 치환을 포함하는 다양한 변경의 임의의 조합이 수행될 수 있지만, 최종 구성물은 원하는 특성, 예를 들어, 항원-결합 특성을 보유해야 한다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심있는 부위는 중쇄 가변 영역(HVR) 및 골격 영역(FR)을 포함한다. 보존적 치환은 표 1에 "바람직한 치환"이라는 항목 아래에 제공되어 있으며, 이하에 아미노산 측쇄 부류 (1) 내지 (6)과 관련하여 추가로 기술되어 있다. 아미노산 치환은 관심있는 분자 및 원하는 활성, 예를 들어, 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 혹은 CDC에 대해 스크리닝된 생성물에 도입될 수 있다.

[182] [표1]

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala(A)	Val;Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu(L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Ile
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신(Norleucine)	Leu

[183] 아미노산들은 통상적인 측쇄 성질에 따라 다음과 같이 그룹화될 수 있다:

[184] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[185] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[186] (3) 산성: Asp, Glu;

[187] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[188] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[189] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[190] 비-보존적 치환은 이러한 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반한다.

[191] 본 명세서에서 용어 “아미노산 서열 변이체”는 모 항체 결합 분자(예를 들어,

인간화 혹은 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기에 아미노산 치환이 존재하는 실질적인 변이체를 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체는 모 항체 결합 분자에 비해 특정한 생물학적 특성의 변형, 예컨대 개선(예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)을 갖고/갖거나 모 항원 결합 분자의 특정한 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이며, 이는, 예를 들어, 당업계에 공지된 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기법을 이용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간략하게 말하면, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항원 결합 분자가 파지 상에 디스플레이되어 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)이 스크리닝된다. 특정 구현예에서, 치환, 삽입 또는 결실은 그러한 변경이 항원에 결합하는 항원 결합 분자의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본 명세서에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다.

[192] 아미노산 서열 삽입은, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입뿐만 아니라, 길이가 하나의 잔기에서 백 개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드에 이르는 범위인 아미노-말단 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함할 수 있다. 말단 삽입의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단으로의 융합을 포함할 수 있다. 또한, 분자의 다른 삽입 변이체는 뇌 혈관 장벽(blood-brain barrier, BBB)의 통과를 용이하게 하기 위한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단으로의 융합을 포함할 수 있다.

[193] 또한, CD300c 항원에 대해 개선된 친화도를 갖는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 변이체가 제공된다. 그러한 변이체는 CDR 돌연변이(문헌[Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995]), 사슬 셔플링(chain shuffling)(문헌[Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992]), E.coli의 돌연변이유발(mutator) 균주의 사용(문헌[Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996]), DNA 셔플링(문헌[Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997]), 파지 디스플레이(phage display)(문헌[Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996]) 및 유성(sexual) PCR(문헌[Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998])을 비롯한 다수의 친화도 성숙 프로토콜에 의해 얻어질 수 있다. 문헌[Verhoeyen et al., Science, 239, 1534-1536, 1988]에는 이러한 친화도 성숙 방법들이 논의되어 있다.

[194] 일 구현예에서, 상기 항-CD300c 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중간 교차 반응성을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 항-CD300c 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 및 마우스 CD300c 항원 둘 모두에 대한 교차 반응성일 수 있다. 이러한 교차 반응성은 실험예 3.1 및 실험예 3.8에서 확인된다.

[195] 다른 구현예에서, 상기 항-CD300c 단클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

다른 약물과 결합된 항체-약물 결합체의 형태를 포함하거나 이러한 형태로 제공될 수 있다.

- [196] 본 명세서에서 용어 "항체-약물 결합체"란, 항체와 약물의 생물학적 활성을 저하시키지 않으면서 항체와 약물을 화학적으로 연결한 형태를 지칭한다. 본 명세서에서, 상기 항체-약물 결합체는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단의 아미노산 잔기에 약물이 결합된 형태, 구체적으로는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단, α -아민기에 약물이 결합된 형태를 지칭한다.
- [197] 상기 "약물"은 세포(예를 들어, 암세포)에 대해 특정 생물학적 활성을 갖는 임의의 물질을 의미할 수 있으며, 이는 DNA, RNA 또는 펩타이드를 포함하는 개념이다. 상기 약물은 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를 포함하는 형태일 수 있으며, α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기를 포함하는 링커가 연결되어 있는 형태를 또한 포함한다.
- [198] 상기 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있는 반응기는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단의 α -아민기와 반응하여 가교할 수 있다면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 당업계에서 공지된 아민기와 반응하는 종류를 모두 포함한다. 그 예에는 아이소티오시아네이트(Isothiocyanate), 아이소시아네이트(Isocyanates), 아실 아자이드(Acyl azide), NHS 에스터(NHS ester), 설폰일 클로라이드(Sulfonyl chloride), 알데하이드(Aldehyde), 글리옥살(Glyoxal), 에폭사이드(Epoxyde), 옥시레인(Oxirane), 칼보네이트(Carbonate), 아릴 할라이드(Aryl halide), 이미도에스터(Imidoester), 카보이미드(Carbodiimide), 안하이드라이드(Anhydride) 및 플루오로페닐 에스터(Fluorophenyl ester) 중 어느 하나가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [199] 상기 약물은 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 표적으로 하는 질환을 치료할 수 있는 약물이라면 그 종류에 관계없이 포함되나, 바람직하게는 항암제일 수 있다.
- [200] 본 발명자들은 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 하나 이상의 다른 항암제와 병용되어 증강된 항암 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하나 이상의 다른 항암제와 병용되어 암 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하나 이상의 다른 면역 항암제 및/또는 하나 이상의 화학 항암제와 병용될 수 있다. 다른 구현예에서, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하나 이상의 다른 면역항암제 및 하나 이상의 화학 항암제와 병용될 수 있다.
- [201] 면역 항암제와의 병용
- [202] 면역 항암제는 인체의 면역세포를 활성화시켜서 암세포를 사멸시키는 새로운 기전을 가지므로, 특정 유전자 변이가 없어도 대부분의 암에 폭넓게 사용될 수 있다는 장점을 갖는다. 또한, 면역 항암제는 환자 자신의 면역체계의 강화를 통해 암을 치료한다는 점에서 부작용이 적고 환자의 삶의 질을 높이고

생존기간도 대폭 연장되는 효과를 가져온다. 이러한 면역 항암제는 면역 관문 억제제를 포함하고, 공지의 방법에 의해 제조된 것이거나 시판되는 제품일 수 있다. 면역 항암제의 예에는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-CD47, 항-KIR, 항-LAG3, 항-CD137, 항-OX40, 항-CD276, 항-CD27, 항-GITR, 항-TIM3, 항-41BB, 항-CD226, 항-CD40, 항-CD70, 항-ICOS, 항-CD40L, 항-BTLA, 항-TCR 및 항-TIGIT 항체가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, 면역 항암제의 예에는 더발루맙(임핀지(Imfinzi)), 아테졸리주맙(테센트릭(Tecentriq)), 아벨루맙(바벤시오(Bavencio)), 펨브롤리주맙(키트루다(Keytruda)), 니블루맙(옵디보(Opdivo)), α CD47, 세미플리맙(리브타요(Libtayo)), 마그롤리맙(Hu5F9-G4), 및 이필리무맙(여보이(Yervoy))이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

- [203] 일 구현예에서, 면역 항암제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-CD47, 항-KIR, 항-LAG3, 항-CD137, 항-OX40, 항-CD276, 항-CD27, 항-GITR, 항-TIM3, 항-41BB, 항-CD226, 항-CD40, 항-CD70, 항-ICOS, 항-CD40L, 항-BTLA, 항-TCR 및 항-TIGIT 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 일례로, 면역 항암제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 및 항-CD47 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [204] 다른 구현예에서, 면역 항암제는 더발루맙(임핀지(Imfinzi)), 아테졸리주맙(테센트릭(Tecentriq)), 펨브롤리주맙(키트루다(Keytruda)), 니블루맙(옵디보(Opdivo)), α CD47, 및 이필리무맙(여보이(Yervoy))으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [205] 화학 항암제와의 병용
- [206] 화학 항암제는 세포독성 항암제 또는 화학약물 항암제로도 불리는 암 치료제를 지칭한다. 이러한 화학 항암제는 암 세포뿐 아니라 주변의 정상 세포도 공격해 구토, 탈모, 백혈구 감소 같은 부작용을 초래하는 단점을 가지므로, 단독으로 사용하기보다는 함께 사용된 경우에 상승 효과를 가져오는 다른 면역 항암제와 병용하는 것이 바람직하다. 이러한 화학 항암제는 소분자(small molecule) 치료제를 포함하고, 공지의 방법에 의해 제조된 것이거나 시판되는 제품일 수 있다. 예를 들어, 화학 항암제에는 미세소관 조립 억제제, DNA 인터칼레이터(intercalator) 또는 복제 억제제, 멀티키나제(multikinase) 억제제, 혈관형성 억제제, 항대사물질, 및 택솔(Taxol)류가 포함될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [207] 일 구현예에서, 화학 항암제는 미세소관 조립 억제제, DNA 인터칼레이터 또는 복제 억제제, 멀티키나제 억제제, 및 혈관형성 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [208] 화학 항암제의 구체적인 예를 하기 표 2에 나타낸다.

[209] [표2]

항암제	작용 기전(MoA)
독소루비신	미세소관 조립 억제제
파클리탁셀	
도세탁셀	
빈블라스틴	
빈크리스틴	
비노렐빈	
에스트라무스틴 포스페이트(EMP)	
NAB-파클리탁셀(아브락산)	

독소루비신	DNA 인터칼레이터(intercalator) 또는 복제 억제제
시클로포스파미드	
에피루비신	
5-플루오로우라실	
에토포사이드	
이포스파미드	
젬시타빈	
테옥시아데노신	
클라드리빈	
클로파라빈	
플루다라빈	
펜토스타틴	
테옥시시티딘	
시토신 아라비노사이드(ara-C)	
5-아자-2'-데옥시시티딘(테시타빈)	
테자시타빈	
카페시타빈	
시타라빈	
메토트렉세이트	
페메트렉세드	
메르캅토피린	
닥티노마이신	
다우노루비신	
미토마이신	
블레오마이신	
이다루비신	
미독산트론 HCL	
메클로레타민	
멜팔란	
클로람부실	
티오테파	

알트레타민	멀티키나제 억제제 또는 혈관형성 억제제
프로카바진	
부설판	
스트렙토조토신	
카르무스틴	
로무스틴	
다카르바진(DTI)	
클로람부실	
토포테칸	
이리노테칸	
테모졸로마이드	
시스플라틴	
카보플라틴	
옥살리플라틴	
소라페닙	
레고라페닙	
바탈라닙	
악시티닙	
마시티닙	
파조파닙	
수니티닙	
토세라닙	
세디라닙	
렌마티닙	
닌테다닙	
세막사닙	
티보자닙	
반데타닙	
레블리미드(레날리도마이드)	

[210] 그러나, 화학 항암제는 표 2에 나타난 항암제로 한정되지 않으며, 이러한 항암제와 동일하거나 유사한 작용 기전을 통해 동일하거나 유사한 효과를

발휘하는 한 어떠한 화학 항암제라도 사용될 수 있다.

[211] 다른 구현예에서, 화학 항암제는 소라페닙, 켄시타빈 및 파클리탁셀로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[212] 투여용량

[213] 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 추가 항암제(예컨대 면역 항암제 또는 화학 항암제) 각각의 유효량 또는 효과적인 무독성 양은 통상적인 실험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항암제의 치료 활성량은 질환 단계, 질환의 중증도, 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증, 및 체중, 그리고 대상체에서 요망되는 반응을 유발하는 성분의 능력과 같은 요인 및 함께 사용되는 항암제의 투여량에 따라 변할 수 있다. 항-CD300c 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 추가 항암제 각각의 투여량 및 투여요법은 최적 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 분할 용량이 매일, 매주, 2주마다, 3주마다, 4주마다 등으로 투여될 수 있고/거나, 용량이 치료 상황의 긴박함에 따라 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다.

[214] 암의 예방 또는 치료 방법

[215] 본 발명의 일 태양에 따르면, 대상체에서 암을 예방 또는 치료하거나, 암의 적어도 하나의 증상 또는 징후의 중증도를 개선 또는 감소시키거나, 전이를 억제하거나, 암의 성장을 억제하는 방법이 제공된다. 본 명세서에서 "암을 예방 또는 치료"한다는 것은 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을 억제하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법은 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 하나 이상의 추가 항암제의 병용을 포함한다. 구체적으로, 상기 방법은 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료적 유효량을 하나 이상의 추가 항암제의 치료적 유효량과 함께 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나 이상의 추가 항암제는 하나 이상의 면역 항암제, 하나 이상의 화학 항암제, 또는 하나 이상의 면역 항암제 및 하나 이상의 화학 항암제를 포함할 수 있다.

[216] 용어 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 생리적 상태를 지칭한다. 본 발명에서 예방 또는 치료의 대상이 되는 암에는 그 발생 부위에 따라 대장암, 소장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 내분비선암, 구강암, 혀암, 인두암, 후두암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암, 나팔관암, 난소암, 뇌암, 두경부암, 폐암, 임파선암, 담낭암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암(또는 흑색종), 유방암, 위암, 골암, 혈액암 등이 포함될 수 있으나, 암세포의 표면에 CD300c 단백질을 발현하는 한 모든 암이 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서 상기 암은 고형암일 수 있다.

- [217] 일 구현예에서, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 하나 이상의 추가 항암제는 동시에 투여되거나 순차적으로 투여될 수 있다.
- [218] "순차적으로 투여"된다는 것은 하나의 성분이 투여되고, 투여 직후 또는 투여 후 일정 간격을 두고 다른 성분이 투여됨을 의미하며, 이때 성분들은 어떠한 순서로도 투여될 수 있다. 즉, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 투여된 직후 또는 투여 후 일정 간격을 두고 하나 이상의 추가 항암제가 투여될 수 있거나, 그 반대도 마찬가지로 적용된다. 또한, 하나 이상의 추가 항암제 중 어느 하나가 먼저 투여되고, 이어서 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 투여되고, 이어서 하나 이상의 추가 항암제 중 다른 하나가 투여될 수 있다.
- [219] 일 구현예에서, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 둘 이상의 추가 항암제와 함께 투여될 수 있다. 일례로, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 두 개의 추가 항암제(예컨대, 항-PD-L1 항체 및 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체)와 병용된 경우에 가장 높은 암세포 증식 억제 효과 등을 나타내는 것으로 확인되었다.
- [220] 본 발명에 따른 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제 각각은 국소 또는 전신 치료가 요망되는지 여부 및 치료될 영역에 따라 여러 방식으로 투여될 수 있다. 이러한 성분들을 대상체에 투여하는 방법은 투여 목적, 발병 부위, 대상체의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입, 국소 또는 국부 투여(예컨대 병변내 투여)일 수 있다. 예컨대 비경구 투여는 정맥내, 피하, 복강내, 폐내, 동맥내, 근육내, 직장, 질내, 관절내, 전립선내, 비내, 안구내, 방광내, 척추강내 투여 또는 심실내 투여(예를 들어 뇌실내 투여)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 항-CD300c 항체와 추가 항암제는 동일한 경로로 투여될 수 있거나 서로 상이한 경로로 투여될 수 있다.
- [221] 상기 방법에서, 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제 각각의 유효량은 개체(환자)의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 약 0.01 mg 내지 100 mg, 또는 5 mg 내지 약 50 mg이 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로 및 기간, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 본 발명의 범위는 이에 한정되지 않는다.
- [222] 본 발명에 따른 방법은 대상체로부터 미리 CD300c 단백질의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 그 발현 수준에 따라 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여할지 여부를 결정할 수 있다.
- [223] 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 투여 전에, 대상체의 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 CD300c 단백질의 발현 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [224] 또한, 상기 방법은 상기 대상체의 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 결정된 CD300c 단백질의 발현 수준이 대조군(예컨대, 암에 걸리지 않은 정상인에서의

발현 수준 또는 암환자에서의 평균 발현 수준)과 비교하여 통계적으로 유의미하게 높은 경우(예컨대 10% 이상 높은 경우)에 상기 대상체는 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용한 치료에 적합한 대상체라고 판단하는 단계를 포함할 수 있다. 그러나, 상기 제시된 CD300c 단백질의 발현 수준 차이는 단지 예시적인 것이며, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게 대조군은 동종의 암 환자에서의 평균 발현 수준일 수 있다.

- [225] 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여한 후 특정 마커의 발현 수준 변화를 측정함으로써 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 병용하기에 적합한 추가 항암제를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [226] 구체적으로, 상기 방법은 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받은 대상체의 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 하기 마커로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다:
- [227] Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf, Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4, IL-6, IL-13, PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr, Hvem, CD27, CD28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a.
- [228] 상기 마커에 대한 설명은 하기 표 3를 참조한다.

[229] [표3]

순번	명칭	완전한 명칭	간략한 설명
1	Bst2	bone marrow stromal antigen 2	테더린(Tetherin) 또는 CD137로도 알려져 있으며, BST2 유전자에 의해 인코딩되는 지질 래프트(lipid raft) 관련 단백질임.
2	CD40	Cluster of differentiation 40	항원 제시 세포에서 발견되는 보조자극 단백질이며, 그의 활성화에 필요함. TH 세포 상의 CD154(CD40L)의 CD40에 대한 결합은 항원 제시 세포를 활성화하고 다양한 다운스트림 효과를 유도함.
3	CD70	Cluster of differentiation 70	인간에서 CD70 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임. CD70은 CD27의 리간드임.
4	CD86	Cluster of differentiation 86	B7-2로 알려져 있으며, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 마크로파지, B 세포(기억 B 세포를 포함함), 및 기타 항원 제시 세포에서 항시적으로 발현되는 단백질임.
5	Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	MCP2(monocyte chemoattractant protein 2)로 알려져 있으며, 인간에서 CCL8 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
6	Xcl1	X-C Motif Chemokine Ligand 1	림포타틴으로도 알려진 C 케모카인 패밀리에 속하는 작은 사이토카인임.
7	Ccr7	C-C chemokine receptor type 7	인간에서 CCR7 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임. 이 수용체에 대해 다음과 같은 2개의 리간드가 확인되었음: 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 19(CCL19/ELC) 및 (C-C 모티프) 리간드 21(CCL21).
8	CD80	Cluster of differentiation 80	세포외 면역글로불린 불변 유사 도메인 및 수용체 결합에 필요한 가변 유사 도메인을 갖는, 면역글로불린

			수퍼패밀리에 속하는 B7 I형 막 단백질임. 이는 또 다른 B7 단백질(B7-2)인 CD86과 밀접한 관련이 있으며, 종종 탠덤(tandem) 상태로 작용하여 동일한 수용체에 결합함으로써 T 세포를 프라이밍함.
9	CD206	Cluster of differentiation 206	만노스 수용체로 알려져 있으며, 주로 마크로파지, 미성숙 수지상 세포 및 간 동모양(sinusoidal) 내피 세포의 표면에 존재하는 C-타입 렉틴이지만, 인간 피부 섬유아세포 및 각질세포와 같은 피부 세포의 표면에서도 발현됨.
10	Msr1	Macrophage scavenger receptor 1	인간에서 MSR1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임. MSR1은 또한 CD204(cluster of differentiation 204)로도 명명됨.
11	Arg1	Arginase 1	인간 ARG1 유전자는 단백질 아르기나제를 인코딩함.
12	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	인간에서 VEGFA 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
13	Pdgfrb	Platelet-derived growth factor receptor beta	인간에서 PDGFRB 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
14	Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1	인간에서 13번 염색체 상의 COL4A1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
15	Hif1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF-1-알파로 알려져 있으며, HIF1A 유전자에 의해 인코딩되는 HIF-1(heterodimeric transcription factor hypoxia-inducible factor 1)의 서브유닛임.
16	Vcam1	Vascular cell adhesion protein 1	VCAM-1(vascular cell adhesion molecule 1) 또는 CD106(cluster of differentiation 106)으로 알려져 있으며, 인간에서 VCAM1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
17	Icam1	Intercellular Adhesion	CD54(Cluster of Differentiation 54)로

		Molecule 1	알려져있으며, 인간에서 ICAM1 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
18	Gzma	Granzyme A	Gzma 유전자에 의해 인코딩되는 단백질인 그랜자임 A는 세포독성 T 림프구 과립에 존재함.
19	Gzmb	Granzyme B	Gzmb 유전자에 의해 인코딩되는 단백질인 그랜자임 B는 세포독성 T 림프구 및 자연 살해(NK) 세포에 의해 발현됨.
20	Icos	Inducible T-cell COstimulator	인간에서 ICOS 유전자에 의해 인코딩되는 면역 관문 단백질임.
21	Cd69	Cluster of Differentiation 69	Cd69 유전자에 의해 인코딩되는 인간 트랜스멤브레인 C-타입 렉틴 단백질로서, 조혈 줄기 세포, T 세포 등에서 발현되는 초기 활성화 마커임.
22	Ifng	Interferon gamma	타입 II 인터페론 부류의 유일한 구성원인 이량체화 가용성 사이토카인임.
23	Tnf	Tumor Necrosis Factor	Tnf 유전자에 의해 인코딩되며, 종양 괴사 인자(TNF) 수퍼패밀리에 속하는 다기능성 전염증 사이토카인으로서 주로 매크로파지에 의해 분비됨.
24	Cd1d1	CD1d1 antigen	T 세포 수용체 결합 활성화 및 내인성 지질 항원 결합 활성을 가능하게 함. 자연 살해 T(NKT) 세포 분화 및 미성숙 T 세포 증식의 조절에 관여함.
25	Cd1d2	CD1d2 antigen	T 세포로의 지질 항원의 제시에 관여하는 MHC 클래스 I-유사 분자를 인코딩하며, 자연 살해 T 세포의 활성화에 관여함.
26	Cd38	Cluster of Differentiation 38	CD4+, CD8+, B 림프구 및 자연 살해 세포를 비롯한 많은 면역 세포(백혈구 세포)의 표면에서 발견되는 당단백질임.

27	Cxcr6	C-X-C chemokine receptor type 6	CD186로도 일컬어지며, 표적 세포로 진입하기 위해 CD4와 함께 HIV-1 및 SIV에 의해 사용되는 진입 보조수용체로 확인되었음.
28	Xcr1	X-C motif chemokine receptor 1	G 단백질-결합 수용체 수퍼패밀리에 속하는 케모카인 수용체임.
29	Tbx21	T-box transcription factor TBX21	T-bet (T-box expressed in T cells)로도 일컬어지며, 인간에서 TBX21 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
30	Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1	인간에서 STAT1 유전자에 의해 인코딩되는 전사 인자임. 이는 STAT 단백질 패밀리의 구성원임.
31	Stat4	Signal transducer and activator of transcription 4	STAT 단백질 패밀리에 속하는 전사 인자임.
32	Cxcr3	C-X-C Motif Chemokine Receptor 3	CXC 케모카인 수용체 패밀리의 Gai 단백질 결합 수용체임.
33	IL-12b	Subunit beta of interleukin 12	자연 살해 세포 자극 인자 2, 세포 독성 림프구 성숙 인자 p40 또는 인터루킨-12 서브유닛 p40으로 알려져 있으며, 인간에서 IL12B 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
34	IL4	Interleukin 4	미경험(naive) 헬퍼 T 세포(Th0 세포)의 Th2 세포로의 분화를 유도하는 사이토카인임. IL-4에 의해 활성화되면, Th2 세포는 후속하여 양성 피드백 루프에서 추가 IL-4를 생성함.
35	IL6	Interleukin 6	전염증성 사이토카인 및 항염증성 마이오카인 둘 모두로 작용하는 인터루킨임. 인간에서, 이는 IL6 유전자에 의해 인코딩됨.
36	IL13	Interleukin 13	인간에서 IL13 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
37	PD-1	Programmed cell death protein 1	CD279(분화 클러스터 279)로 알려져 있으며, T 세포 염증 활성을 억제하여

			면역계를 하향 조절하고 자기-관용을 촉진함으로써 인체 세포에 대한 면역계의 반응을 조절하는 역할을 하는 단백질임. 이는 자가면역 질환을 방지하지만, 또한 면역계가 암세포를 죽이지 못하게 할 수 있음.
38	PD-L1	Programmed death-ligand 1	CD274(cluster of differentiation 274) 또는 B7-H1(B7 homolog 1)로 알려져 있으며, 인간에서 CD274 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
39	CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	CD152(분화 클러스터 152)로 알려져 있으며, 면역 관문으로 기능하고 면역 반응을 하향 조절하는 단백질 수용체임.
40	Lag3	Lymphocyte-activation gene 3	인간에서 LAG3 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
41	Tim3	immunoglobulin and mucin-domain containing-3	HAVCR2(Hepatitis A virus cellular receptor 2)로도 알려져 있으며, 인간에서 HAVCR2 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
42	Ox40	(CD134, TNFRSF4)	CD28과는 달리, 휴지 상태의 미경험 T 세포에서 항시적으로 발현되지 않는 TNFR 수용체 슈퍼패밀리의 구성원임.
43	Gitr	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor	인간에서 TNFRSF18 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
44	Hvem	Herpesvirus entry mediator	TNF 수용체 슈퍼패밀리의 인간 세포 표면 수용체임.
45	CD27	Cluster of differentiation 27	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼 패밀리의 구성원임.
46	CD28	Cluster of differentiation 28	T 세포 활성화 및 생존에 필요한 보조자극 신호를 제공하는 T 세포에서 발현되는 단백질들 중 하나임.

47	Cma1	Chymase 1	인간에서 CMA1 유전자에 의해 인코딩되는 효소임.
48	Timd4	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4	TIM-4(T-cell membrane protein 4)로 알려져 있으며, 인간에서 TIMD4 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
49	Bcl6	B-cell lymphoma 6 protein	인간에서 BCL6 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임. BCL2, BCL3, BCL5, BCL7A, BCL9 및 BCL10과 마찬가지로, 림프종에서 임상적 의의를 가짐.
50	Cxcl5	C-X-C Motif Chemokine Ligand 5	인간에서 CXCL5 유전자에 의해 인코딩되는 단백질임.
51	Ccl21a	Chemokine (C-C motif) ligand 21	CC 케모카인 패밀리에 속하는 작은 사이토 카인임.

[230] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 확인된 마커의 발현 수준에 기초하여 추가 항암제를 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 마커에는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Icos, Ox40, Gitr, Hvem, CD27 및 CD28이 포함될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[231] 또 다른 구현예에서, 상기 마커는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Icos, Ox40, Gitr, Hvem, CD27 및 CD28로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 마커는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3 및 Tim3로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 마커는 Icos, Ox40, Gitr, Hvem, CD27 및 CD28로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.

[232] 이러한 마커의 발현 수준 변화는 본 발명의 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 개체에 투여하였을 때 나타나는 종양 억제 효과에 영향을 미치는 종양/면역 관련 마커의 변화를 의미한다. 예컨대, 상기 마커의 발현 수준 변화는 면역 세포(예를 들어, 수지상 세포, 마크로파지, T 세포, NKT 세포)의 활성화와 관계된 단백질 마커 또는 면역관문 단백질 마커, 종양 증식에 영향을 미치는 종양 미세환경(TME) 단백질 마커, Th1 반응 및 Th2 반응과 관련된 마커의 발현 양상을 변화를 포함할 수 있다. 마커의 구체적인 예에 대해서는 상기 설명을 참조한다. 이러한 발현 양상의 변화를 통해 환자가 약물에 반응할 확률을 예측하거나 항암 효과를 극대화할 수 있는 다른 면역관문 억제제를 포함한 항암제를 선택할 수 있다. 또한, 상기 마커를 활용하면 환자가 상기 항체로 치료 가능한지 여부를 판단할 수 있다. 또한, 약물 치료 효과를 모니터링할 수 있다. 또한, 약물 용량, 용법, 병용 요법 등을 포함한 치료 방법을 위한 정보를 제공할

수 있다.

- [233] 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명의 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 투여 후 개체에서 관찰된 상기 마커의 발현 수준 변화에 의해 선별된 다른 면역관문 억제제(항-PD-L1 항체인 더발루맵(임핀지(Imfinzi)), 항-PD-1 항체인 니볼루맵(옵디보(Opdivo)), 항-PD-1 항체인 펨브롤리주맵(키트루다(Keytruda)), 항-CTLA-4 항체 및 항-CD47 항체(α CD47) 중 하나 이상)와 병용한 결과, 증강된 항종양 효과를 나타냄이 확인되었다.
- [234] 또 다른 구현예에서, 상기 확인된 마커의 발현 수준에 기초하여 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 마커에는 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, IL-6, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, CD27 및 CD28이 포함될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 마커는 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, IL-6, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38 및 Cxcr6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 상기 마커는 vegfa, pdgfrb, Col4a1 및 Hif1a로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 추가로, 상기 마커는 Bst2, CCL8 및 Xcl1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 상기 마커는 CCR7, CD80 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 마커는 Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [235] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 상기 마커들 중 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 감소된 경우, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 방법은 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 감소된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정할 수 있다. 이때, 발현 수준의 감소는 통계적으로 유의미한 감소를 의미하고, 발현 수준 감소율은 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 100% 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [236] 또한, 상기 방법은 상기 마커들 중 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 증가된 경우, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 방법은 Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, Gzma, Icos, Cd69,

Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, Cd27 및 Cd28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 증가된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정할 수 있다. 이때, 발현 수준의 증가는 통계적으로 유의미한 증가를 의미하고, 발현 수준 증가율은 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 100% 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[237] 약학 조성물

[238] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물이 제공된다. 이때, 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 상기 하나 이상의 추가 항암제는 조성물에 예방적 또는 치료적 유효량으로 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 추가 항암제는 면역 항암제, 화학 항암제 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물은 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을 억제하기 위해 대상체에 투여될 수 있다.

[239] 일 구현예에서, 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 상기 추가 항암제는 각각 제제화되어 동시 또는 순차적으로 별개로 투여될 수 있다.

[240] 일 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 상기 추가 항암제는 동일한 조성물에 포함되거나 각각 별개의 조성물에 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 상기 추가 항암제는 각각 별개의 조성물에 포함될 수 있다.

[241] 본 발명의 약학 조성물을 제조하기 위해, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및/또는 추가 항암제는 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제와 혼합될 수 있다. 약학 조성물은 동결건조 제제 또는 수성 용액의 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)]을 참조한다.

[242] 허용되는 담체 및/또는 부형제(안정화제 포함)는 사용되는 용량 및 농도에서 대상체에게 무독성이고, 버퍼(예를 들어 포스페이트, 시트레이트 또는 다른 유기산); 항산화제(예를 들어 아스코르브산 또는 메티오닌); 방부제(예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 이하의 잔기) 폴리펩티드; 단백질(예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린); 친수성 중합체(예를 들어 폴리비닐피롤리돈); 아미노산(예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신); 단당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린; 킬레이팅제(예를 들어 EDTA); 당(예를 들어 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨); 염 형성 반대 이온(예를 들어

- 나트륨); 금속 착체(예를 들어 Zn-단백질 착체); 및(또는) 비이온계 계면활성제(예를 들어 TWEEN(등록상표), PLURONICS(등록상표) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG))을 포함할 수 있고, 이에 제한되지 않는다.
- [243] 본 발명의 약학 조성물은 그 투여 경로에 따라 당업계에 공지된 적합한 형태로 제제화될 수 있다.
- [244] 본 명세서에서 용어 "예방적 또는 치료적 유효량" 또는 "유효량"은 대상체의 암을 예방 또는 치료하는 데 유효한 조성물의 유효 성분의 양으로서, 의학적 처치에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 암을 예방 또는 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 이때, 상기한 요소들을 모두 고려하여 최소한의 부작용 또는 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [245] 구체적으로, 본 발명의 약학 조성물에서 유효 성분 각각의 유효량은 개체(환자)의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 약 0.01 mg 내지 100 mg, 또는 5 mg 내지 약 50 mg이 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로 및 기간, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 본 발명의 범위는 이에 한정되지 않는다.
- [246] 암 예방 또는 치료용 키트
- [247] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편인 제1 유효 성분과 상기 추가 항암제인 제2 유효 성분을 포함하는, 암 예방 또는 치료용 키트가 제공된다.
- [248] 일 구현예에서, 상기 제1 유효 성분과 제2 유효 성분은 혼합하여 제제화된 후 동일한 용기에 넣어질 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 제1 유효 성분과 제2 유효 성분은 개별적으로 제제화된 후 동일한 용기에 넣어지거나 별도의 용기에 넣어져, 동시에 투여되거나 시간 간격을 두고 순서에 관계없이 순차적으로 투여될 수 있다.
- [249] 일 구현예에서, 상기 키트는 유효 성분들의 복약 또는 투여 지침을 포함하는 지시서를 추가로 포함할 수 있다. 선택적으로, 각각의 유효 성분을 투여하는 데 필요한 기기 또는 장치가 키트에 포함될 수 있다.
- [250] 또한, (i) 본 발명에 따른 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물, 및 (ii) 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제의 조합 사용을 지시하는 지시서를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 키트가 제공된다. 이때, 상기 조성물은 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 예방적 또는 치료적 유효량을 함유할 수 있다.
- [251] 치료 반응성 예측 방법 및 키트

- [252] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체로부터 수득된 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 치료 반응성 예측을 위한 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 마커는 Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf, Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4, IL-6, IL-13, PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr, Hvem, CD27, CD28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 상기 마커는 Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf, Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4, IL-6, IL-13, Pd-1, Pd-11, CtlA-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr, Hvem, Cd27, Cd28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 마커는 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, IL-6, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, Cd27 및 Cd28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [253] 또한, 상기 방법은 상기 마커들 중 하나 이상의 마커의 발현 수준이 대조군, 예컨대 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 감소된 경우, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 대조군, 예컨대 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 감소된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정할 수 있다. 이때, 발현 수준의 감소는 통계적으로 유의미한 감소를 의미하고, 발현 수준 감소율은 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 100% 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [254] 또한, 상기 방법은 상기 마커들 중 하나 이상의 마커의 발현 수준이 대조군, 예컨대 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 증가된 경우, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, Cd27 및 Cd28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 증가된 경우에,

항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정할 수 있다. 이때, 발현 수준의 증가는 통계적으로 유의미한 증가를 의미하고, 발현 수준 증가율은 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 100% 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[255] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료반응성 예측을 위한 상기 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 물질을 포함하는 키트가 제공된다. 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 상기 키트는 단백질 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 키트일 수 있고, 예컨대 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트일 수 있다. 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 필요한 것으로 당업계에 알려진 다른 시약을 포함할 수 있다.

[256] 암의 예방 또는 치료를 위한 정보의 제공 방법 및 키트

[257] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 암의 예방 또는 치료가 필요한 대상체로부터 취득된 생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 CD300c 단백질의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[258] 일 구현예에서, 상기 방법은 측정된 CD300c 단백질의 발현 수준을 대조군(암에 걸리지 않은 정상인에서의 발현 수준 또는 암환자에서의 평균 발현 수준)과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, CD300c 단백질의 발현 수준이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 높은 경우, 예컨대 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상 또는 1.5배 이상인 경우, 대상체는 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 이용하여 암을 예방하거나 치료하기에 적합하다고 판단할 수 있다. 그러나, 상기 발현 수준의 차이는 이에 한정되지 않는다.

[259] 또한, 상기 암의 예방 또는 치료를 위한 정보는 CD300c 단백질과 관련된 치료제(예컨대, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편)의 치료 반응성, 치료제의 선택, 치료 대상체의 선택, 대상체의 예후, 및 대상체의 생존기간 중 어느 하나 이상에 관한 정보를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는 상기 암의 예방 또는 치료를 위한 정보는 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 암 치료 반응성, 대상체의 생존기간, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.

[260] 본 발명의 또 다른 태양에 따르면, 암의 예방 또는 치료가 필요한 대상체로부터 취득된 생물학적 시료를 이용하여 CD300c 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 물질을 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 정보를 제공하기 위한 키트가 제공된다. 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 상기 키트는 단백질 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 키트일 수 있고, 예컨대 ELISA(Enzyme-linked

immunosorbent assay) 키트일 수 있다. 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 필요한 것으로 당업계에 알려진 다른 시약을 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [261] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [262] **I. CD300c에 특이적으로 결합하는 단클론 항체**
- [263] 실시예 1. 항-CD300c 단클론 항체의 제조
- [264] 실시예 1.1. 항-CD300c 단클론 항체 라이브러리 제작
- [265] 항-CD300c 단클론 항체를 선별하기 위하여, 람다 파지 라이브러리, 카파 파지 라이브러리, VH3VL1 파지 라이브러리, 및 OPALTL 파지 라이브러리를 이용하여 바이오패닝(biopanning)을 실시하였다. 구체적으로, 면역 시험관(immunotube)에 5 µg/mL 농도의 CD300c 항원을 첨가하고, 1시간 동안 반응시켜 시험관 표면에 항원을 흡착시켰다. 그 후, 3%의 탈지유(skim milk)를 첨가하여 비특이적 반응을 억제시킨 후, 다시 3%의 스킴 밀크에 분산되어 있는 10¹² PFU의 항체 파지 라이브러리를 각각의 면역 시험관에 첨가하여 항원과 결합시켰다. 이어서, TBST(tris buffered saline-Tween20) 용액을 이용하여 3회 세척하여, 비특이적으로 결합되어 있는 파지를 제거한 후, CD300c 항원 특이적으로 결합되어 있는 단쇄가변분절(single-chain variable fragment; scFv) 파지 항체를 100 mM의 트리에틸아민 용액을 이용하여 용출시켰다. 용출된 파지는 1.0 M의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.8)을 이용하여 중화시킨 후에, 대장균 ER2537에 처리하여 37°C에서 1 시간 동안 감염시키고, 감염시킨 대장균은 카르베니실린이 포함되어 있는 LB 한천 배지에 도포하여 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 이어서, 형성된 대장균 콜로니를 3 mL의 SB(super broth)-카르베니실린 배양액을 이용하여 현탁시키고, 일부는 15% 글리세롤을 첨가하여 -80°C에서 사용 전까지 보관하였으며, 나머지는 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 재접종하여 37°C에서 배양하였다. 획득된 배양액을 원심분리하여 파지 입자가 포함되어 있는 상층액을 이용하여 다시 바이오패닝을 3회 반복함으로써 항원 특이적인 항체를 확보 및 농축하였다.
- [266] 바이오패닝을 3회 반복한 후에 항체 유전자를 포함하고 있는 대장균을 카르베니실린을 포함하는 LB 한천 배지에 도포하여 37°C에서 16 시간 동안 배양하고, 형성된 대장균 콜로니를 다시 SB-카르베니실린-2% 포도당 용액에 재접종하여 37°C에서 흡광도(OD_{600nm})가 0.5가 될 때까지 배양한 후에, IPTG를 첨가하고 30°C에서 16시간 동안 추가 배양하였다. 이후, 원형질막 추출(periplasmic extraction)을 실시하였으며, 상기 결과를 통하여 CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 라이브러리 풀(library pool)을 일차적으로 확보하였다.

[267] 실시예 1.2. 항-CD300c 단클론 항체 선별

[268] CD300c 항원에 높은 결합력을 가지고 특이적으로 결합하는 항-CD300c 단클론 항체를 선별하기 위하여, 실시예 1.1과 동일한 방법으로 확보된 라이브러리 풀을 이용하여 ELISA를 실시하였다. 보다 자세하게는, 코팅 완충용액(coating buffer; 0.1 M 탄산나트륨, pH 9.0)에 CD300c 항원과 CD300a 항원을 각각 웰 당 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 ELISA 플레이트에 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 반응시켜 항원을 플레이트에 결합시켰다. 그 후, PBST(phosphate buffered saline-Tween20)를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항원을 깨끗이 제거해준 후에, 각각의 웰에 2% BSA(bovine serum albumin)가 첨가되어 있는 PBST를 350 μL 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, PBST를 이용하여 다시 세척하였다. 이어서, 실시예 1.1과 동일한 방법으로 확보된 scFv를 포함하고 있는 원형질막 추출물을 25 μg 씩 첨가하고, 1 시간 동안 실온에서 반응시켜 항원과 결합시켰다. 1 시간 후에 PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 scFv를 제거해준 후에, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 검출용 항체를 첨가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, PBST를 이용하여 결합되지 않은 검출용 항체를 제거해준 후에 HRP가 결합되어 있는 항-토끼 IgG를 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 다시 PBST를 이용하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 이어서, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 용액을 첨가하고 10 분 동안 반응시켜 발색시킨 후에, 2 N의 황산 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하였다.

[269] 실시예 1.3. 항-CD300c 단클론 항체 서열 확인

[270] 실시예 1.2와 동일한 방법을 이용하여 선별된 항-CD300c 단클론 항체의 염기 서열을 확인하였다. 보다 자세하게는, 선별된 항체 클론들을 플라스미드 미니프렙 키트(plasmid miniprep kit)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출한 후에, DNA 시퀀싱을 실시하여 CDR(complementarity-determining regions) 서열을 분석하였다. 그 결과, 서로 다른 아미노산 서열을 가지고 있는 25종의 항-CD300c 단클론 항체를 확보하였다. 이러한 25종의 항-CD300c 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 하기 표 4 및 표 5에 나타내었다.

[271] [표4]

항체 명칭	기원(파지 라이브러리)	중쇄 가변 영역(핵산)	경쇄 가변 영역(핵산)	중쇄 가변 영역(아미노산)	경쇄 가변 영역(아미노산)
CK1	카파	도 1aa(서열번호 301)	도 1ab(서열번호 302)	도 1ac(서열번호 303)	도 1ad(서열번호 304)
CK2	카파	도 1ba(서열번호 305)	도 1bb(서열번호 306)	도 1bc(서열번호 307)	도 1bd(서열번호 308)
CK3	카파	도 1ca(서열번호 309)	도 1cb(서열번호 310)	도 1cc(서열번호 311)	도 1cd(서열번호 312)
CL4	람다	도 1da(서열번호 313)	도 1db(서열번호 314)	도 1dc(서열번호 315)	도 1dd(서열번호 316)
CL5	람다	도 1ea(서열번호 317)	도 1eb(서열번호 318)	도 1ec(서열번호 319)	도 1ed(서열번호 320)
CL6	VH3VL1	도 1fa(서열번호 321)	도 1fb(서열번호 322)	도 1fc(서열번호 323)	도 1fd(서열번호 324)
CL7	VH3VL1	도 1ga(서열번호 325)	도 1gb(서열번호 326)	도 1gc(서열번호 327)	도 1gd(서열번호 328)
CL8	VH3VL1	도 1ha(서열번호 329)	도 1hb(서열번호 330)	도 1hc(서열번호 331)	도 1hd(서열번호 332)
CL9	VH3VL1	도 1ia(서열번호 333)	도 1ib(서열번호 334)	도 1ic(서열번호 335)	도 1id(서열번호 336)
CL10	VH3VL1	도 1ja(서열번호 337)	도 1jb(서열번호 338)	도 1jc(서열번호 339)	도 1jd(서열번호 340)
SK11	카파	도	도 1kb	도 1kc	도 1kd

		1ka(서열번호 341)	(서열번호 342)	(서열번호 343)	(서열번호 344)
SK12	카파	도 11a(서열번호 345)	도 11b (서열번호 346)	도 11c (서열번호 347)	도 11d (서열번호 348)
SK13	카파	도 11ma(서열번호 349)	도 11mb (서열번호 350)	도 11mc (서열번호 351)	도 11md (서열번호 352)
SK14	카파	도 11na(서열번호 353)	도 11nb (서열번호 354)	도 11nc (서열번호 355)	도 11nd (서열번호 356)
SK15	카파	도 11oa(서열번호 357)	도 11ob (서열번호 358)	도 11oc (서열번호 359)	도 11od (서열번호 360)
SK16	카파	도 11pa(서열번호 361)	도 11pb (서열번호 362)	도 11pc (서열번호 363)	도 11pd (서열번호 364)
SK17	카파	도 11qa(서열번호 365)	도 11qb (서열번호 366)	도 11qc (서열번호 367)	도 11qd (서열번호 368)

[272] [표5]

항체 명칭	기원(과지 라이브러리)	중쇄 가변 영역(핵산)	경쇄 가변 영역(핵산)	중쇄 가변 영역(아미노산)	경쇄 가변 영역(아미노산)
SL18	람다	도 1ra(서열번호 369)	도 1rb(서열번호 370)	도 1rc(서열번호 371)	도 1rd(서열번호 372)
CB301_H3L1_A10	VH3VL1	도 1sa(서열번호 373)	도 1sb(서열번호 374)	도 1sc(서열번호 375)	도 1sd(서열번호 376)
CB301_H3L1_A12	VH3VL1	도 1ta(서열번호 377)	도 1tb(서열번호 378)	도 1tc(서열번호 379)	도 1td(서열번호 380)
CB301_H3L1_E6	VH3VL1	도 1ua(서열번호 381)	도 1ub(서열번호 382)	도 1uc(서열번호 383)	도 1ud(서열번호 384)
CB301_H3L1_F4	VH3VL1	도 1va(서열번호 385)	도 1vb(서열번호 386)	도 1vc(서열번호 387)	도 1vd(서열번호 388)
CB301_H3L1_G11	VH3VL1	도 1wa(서열번호 389)	도 1wb(서열번호 390)	도 1wc(서열번호 391)	도 1wd(서열번호 392)
CB301_OPAL_TL_B5	OPALTL	도 1xa(서열번호 393)	도 1xb(서열번호 394)	도 1xc(서열번호 395)	도 1xd(서열번호 396)
CB301_OPAL_TL_E6	OPALTL	도 1ya(서열번호 397)	도 1yb(서열번호 398)	도 1yc(서열번호 399)	도 1yd(서열번호 400)

[273] 상기 표 4 및 표 5에 언급된 각각의 도면에서, CDR 부위(CDR1, CDR2 및 CDR3)에 밑줄을 그어 순서대로 표시하였다(즉, CDR1이 먼저 표시되고, 이어서 CDR2가 표시되고, 이어서 CDR3이 표시됨). 또한, 각각의 도면에 제시된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 포함된 CDR 부위를 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 서열번호로 표시하였다.

[274] [표6]

	항체	중쇄/ 경쇄	아미노산 /핵산	CDR1	CDR2	CDR3
도 1aa	CK1	중쇄	핵산	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
도 1ab		경쇄	핵산	서열번호 4	서열번호 5	서열번호 6
도 1ac		중쇄	아미노산	서열번호 7	서열번호 8	서열번호 9
도 1ad		경쇄	아미노산	서열번호 10	서열번호 11	서열번호 12
도 1ba	CK2	중쇄	핵산	서열번호 13	서열번호 14	서열번호 15
도 1bb		경쇄	핵산	서열번호 16	서열번호 17	서열번호 18
도 1bc		중쇄	아미노산	서열번호 19	서열번호 20	서열번호 21
도 1bd		경쇄	아미노산	서열번호 22	서열번호 23	서열번호 24
도 1ca	CK3	중쇄	핵산	서열번호 25	서열번호 26	서열번호 27
도 1cb		경쇄	핵산	서열번호 28	서열번호 29	서열번호 30
도 1cc		중쇄	아미노산	서열번호 31	서열번호 32	서열번호 33
도 1cd		경쇄	아미노산	서열번호 34	서열번호 35	서열번호 36
도 1da	CL4	중쇄	핵산	서열번호 37	서열번호 38	서열번호 39
도 1db		경쇄	핵산	서열번호 40	서열번호 41	서열번호 42
도 1dc		중쇄	아미노산	서열번호 43	서열번호 44	서열번호 45
도 1dd		경쇄	아미노산	서열번호 46	서열번호 47	서열번호 48

도 1ea	CL5	중쇄	핵산	서열번호 49	서열번호 50	서열번호 51
도 1eb		경쇄	핵산	서열번호 52	서열번호 53	서열번호 54
도 1ec		중쇄	아미노산	서열번호 55	서열번호 56	서열번호 57
도 1ed		경쇄	아미노산	서열번호 58	서열번호 59	서열번호 60
도 1fa	CL6	중쇄	핵산	서열번호 61	서열번호 62	서열번호 63
도 1fb		경쇄	핵산	서열번호 64	서열번호 65	서열번호 66
도 1fc		중쇄	아미노산	서열번호 67	서열번호 68	서열번호 69
도 1fd		경쇄	아미노산	서열번호 70	서열번호 71	서열번호 72
도 1ga	CL7	중쇄	핵산	서열번호 73	서열번호 74	서열번호 75
도 1gb		경쇄	핵산	서열번호 76	서열번호 77	서열번호 78
도 1gc		중쇄	아미노산	서열번호 79	서열번호 80	서열번호 81
도 1gd		경쇄	아미노산	서열번호 82	서열번호 83	서열번호 84
도 1ha	CL8	중쇄	핵산	서열번호 85	서열번호 86	서열번호 87
도 1hb		경쇄	핵산	서열번호 88	서열번호 89	서열번호 90
도 1hc		중쇄	아미노산	서열번호 91	서열번호 92	서열번호 93
도 1hd		경쇄	아미노산	서열번호 94	서열번호 95	서열번호 96

도 1ia	CL9	중쇄	핵산	서열번호 97	서열번호 98	서열번호 99
도 1ib		경쇄	핵산	서열번호 100	서열번호 101	서열번호 102
도 1ic		중쇄	아미노산	서열번호 103	서열번호 104	서열번호 105
도 1id		경쇄	아미노산	서열번호 106	서열번호 107	서열번호 108
도 1ja	CL10	중쇄	핵산	서열번호 109	서열번호 110	서열번호 111
도 1jb		경쇄	핵산	서열번호 112	서열번호 113	서열번호 114
도 1jc		중쇄	아미노산	서열번호 115	서열번호 116	서열번호 117
도 1jd		경쇄	아미노산	서열번호 118	서열번호 119	서열번호 120
도 1ka	SK11	중쇄	핵산	서열번호 121	서열번호 122	서열번호 123
도 1kb		경쇄	핵산	서열번호 124	서열번호 125	서열번호 126
도 1kc		중쇄	아미노산	서열번호 127	서열번호 128	서열번호 129
도 1kd		경쇄	아미노산	서열번호 130	서열번호 131	서열번호 132
도 1la	SK12	중쇄	핵산	서열번호 133	서열번호 134	서열번호 135
도 1lb		경쇄	핵산	서열번호 136	서열번호 137	서열번호 138
도 1lc		중쇄	아미노산	서열번호 139	서열번호 140	서열번호 141
도 1ld		경쇄	아미노산	서열번호 142	서열번호 143	서열번호 144

도 1ma	SK13	중쇄	핵산	서열번호 145	서열번호 146	서열번호 147
도 1mb		경쇄	핵산	서열번호 148	서열번호 149	서열번호 150
도 1mc		중쇄	아미노산	서열번호 151	서열번호 152	서열번호 153
도 1md		경쇄	아미노산	서열번호 154	서열번호 155	서열번호 156
도 1na	SK14	중쇄	핵산	서열번호 157	서열번호 158	서열번호 159
도 1nb		경쇄	핵산	서열번호 160	서열번호 161	서열번호 162
도 1nc		중쇄	아미노산	서열번호 163	서열번호 164	서열번호 165
도 1nd		경쇄	아미노산	서열번호 166	서열번호 167	서열번호 168
도 1oa	SK15	중쇄	핵산	서열번호 169	서열번호 170	서열번호 171
도 1ob		경쇄	핵산	서열번호 172	서열번호 173	서열번호 174
도 1oc		중쇄	아미노산	서열번호 175	서열번호 176	서열번호 177
도 1od		경쇄	아미노산	서열번호 178	서열번호 179	서열번호 180
도 1pa	SK16	중쇄	핵산	서열번호 181	서열번호 182	서열번호 183
도 1pb		경쇄	핵산	서열번호 184	서열번호 185	서열번호 186
도 1pc		중쇄	아미노산	서열번호 187	서열번호 188	서열번호 189
도 1pd		경쇄	아미노산	서열번호 190	서열번호 191	서열번호 192

도 1qa	SK17	중쇄	핵산	서열번호 193	서열번호 194	서열번호 195
도 1qb		경쇄	핵산	서열번호 196	서열번호 197	서열번호 198
도 1qc		중쇄	아미노산	서열번호 199	서열번호 200	서열번호 201
도 1qd		경쇄	아미노산	서열번호 202	서열번호 203	서열번호 204
도 1ra	SL18	중쇄	핵산	서열번호 205	서열번호 206	서열번호 207
도 1rb		경쇄	핵산	서열번호 208	서열번호 209	서열번호 210
도 1rc		중쇄	아미노산	서열번호 211	서열번호 212	서열번호 213
도 1rd		경쇄	아미노산	서열번호 214	서열번호 215	서열번호 216
도 1sa	CB301_H3L1_ A10	중쇄	핵산	서열번호 217	서열번호 218	서열번호 219
도 1sb		경쇄	핵산	서열번호 220	서열번호 221	서열번호 222
도 1sc		중쇄	아미노산	서열번호 223	서열번호 224	서열번호 225
도 1sd		경쇄	아미노산	서열번호 226	서열번호 227	서열번호 228
도 1ta	CB301_H3L1_ A12	중쇄	핵산	서열번호 229	서열번호 230	서열번호 231
도 1tb		경쇄	핵산	서열번호 232	서열번호 233	서열번호 234
도 1tc		중쇄	아미노산	서열번호 235	서열번호 236	서열번호 237
도 1td		경쇄	아미노산	서열번호 238	서열번호 239	서열번호 240

도 1ua	CB301_H3L1_E6	중쇄	핵산	서열번호 241	서열번호 242	서열번호 243
도 1ub		경쇄	핵산	서열번호 244	서열번호 245	서열번호 246
도 1uc		중쇄	아미노산	서열번호 247	서열번호 248	서열번호 249
도 1ud		경쇄	아미노산	서열번호 250	서열번호 251	서열번호 252
도 1va	CB301_H3L1_F4	중쇄	핵산	서열번호 253	서열번호 254	서열번호 255
도 1vb		경쇄	핵산	서열번호 256	서열번호 257	서열번호 258
도 1vc		중쇄	아미노산	서열번호 259	서열번호 260	서열번호 261
도 1vd		경쇄	아미노산	서열번호 262	서열번호 263	서열번호 264
도 1wa	CB301_H3L1_G11	중쇄	핵산	서열번호 265	서열번호 266	서열번호 267
도 1wb		경쇄	핵산	서열번호 268	서열번호 269	서열번호 270
도 1wc		중쇄	아미노산	서열번호 271	서열번호 272	서열번호 273
도 1wd		경쇄	아미노산	서열번호 274	서열번호 275	서열번호 276
도 1xa	CB301_OPALTL_B5	중쇄	핵산	서열번호 277	서열번호 278	서열번호 279
도 1xb		경쇄	핵산	서열번호 280	서열번호 281	서열번호 282
도 1xc		중쇄	아미노산	서열번호 283	서열번호 284	서열번호 285
도 1xd		경쇄	아미노산	서열번호 286	서열번호 287	서열번호 288

도 1ya	CB301_OPALT L_E6	중쇄	핵산	서열번호 289	서열번호 290	서열번호 291
도 1yb		경쇄	핵산	서열번호 292	서열번호 293	서열번호 294
도 1yc		중쇄	아미노산	서열번호 295	서열번호 296	서열번호 297
도 1yd		경쇄	아미노산	서열번호 298	서열번호 299	서열번호 300

- [275] 상기와 같이, CD300c 항원에 높은 결합력을 가지고 특이적으로 결합하는 항체의 예방 또는 치료에 사용할 수 있는 25종의 항-CD300c 단클론 항체가 확인되었다.
- [276] 실시예 1.4. 항-CD300c 단클론 항체의 제작 및 정제
- [277] 실시예 1.3을 통해 확인한 항-CD300c 단클론 항체의 염기서열을 이용하여 항체를 발현할 수 있는 중쇄와 경쇄를 분리한 발현용 벡터를 제작하였다. 보다 자세하게는, 분석한 CDR 서열을 이용하여 pCIW3.3 벡터에 각각 중쇄와 경쇄를 발현할 수 있도록 유전자를 삽입하여 제작하였다. 제작한 중쇄와 경쇄 발현용 벡터를 PEI(polyethylenimine)와 1:1의 질량비로 섞어 293T 세포에 트랜스펙션하여 항체의 발현을 유도한 후 8일차에 배양액을 원심분리하여 세포를 제거하고 배양액을 획득하였다. 획득한 배양액은 여과 과정을 거친 후 0.1 M NaH_2PO_4 및 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 7.0)이 혼합되어 있는 용액을 이용하여 재현탁시켰다. 재현탁시킨 용액은 단백질 A 비드(GE healthcare)를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하고, 최종적으로 용리 완충액(ThermoFisher)를 이용하여 용출시켰다.
- [278] 제작된 항체를 확인하기 위하여, 정제된 항체 5 μg 에 각각 환원성 샘플 완충액과 비환원성 샘플 완충액에 첨가하고, pre-made SDS PAGE(Invitrogen)을 이용하여 전기영동을 실시하였고, 이후 쿠마시 블루를 이용하여 단백질을 염색하였다. 비환원 조건의 결과는 도 2에, 환원 조건의 결과는 도 3에 나타내었다.
- [279] 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이, 순도 높은 항-CD300c 단클론 항체가 제작 및 정제되었음이 확인되었다.
- [280] 실험예 1. 암세포 및 면역세포에서 CD300c의 발현
- [281] 실험예 1.1. 암 세포주에서 CD300c의 발현 확인
- [282] CD300c가 다양한 암세포에서 발현되고 있는지를 평가하기 위하여, 암세포주 MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주) 등의 다양한 세포주를 배양하여 mRNA 및 단백질 수준에서 CD300c의 발현을 평가하였다. 또한, 면역 세포인

THP-1(인간 단핵구 세포주)에 대해서도 평가를 수행하였다. 이때, HEK293T(일반 세포주)를 대조군으로 사용하였다.

- [283] 한편, 단백질의 발현은 웨스턴 블랏과 형광표지된 세포를 유세포분석(FACS)을 이용하여 확인하였다. 구체적으로, 배양한 각 세포주를 4% 포름알데히드로 고정시킨 후에, 5% 노말(normal) 우혈청 알부민을 이용하여 차단하였다. 이어서, 0.5 μg 의 eFluor660 표지된 항-CD300c 항체(Invitrogen)를 이용하여 염색하였다. 그 후, 형광표지된 세포를 유세포분석기(FACS)를 이용하여 확인하였다.
- [284] 그 결과, 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 암세포에서 CD300c 항원이 mRNA 및 단백질 수준에서 발현됨을 확인하였다. 또한, 도 4에 도시된 바와 같이, 유세포분석기(FACS)를 이용한 분석 결과, 일반 세포주(HEK293T)와 비교하여 인간 폐암 세포주(A549) 및 인간 단핵구 세포주(THP-1)에서 훨씬 많은 CD300c가 발현됨을 확인하였다.
- [285] **실례 1.2. 암 조직 및 면역 세포에서의 CD300c의 발현 확인 (I)**
- [286] 환자의 암 조직에서 CD300c의 발현을 확인하기 위하여, 조직 마이크로어레이를 다음과 같이 시행하였다. 대장암 환자의 조직을 포르말린 고정하고, 파라핀으로 블록을 제작한 후, 미세조직배열기로 지름 2.0 mm, 두께 3 내지 5 μm 두께로 박절하였다. 이어서, 슬라이드에 일정 방향으로 부착시켜 건조시켰다. H&E 염색을 통해 암 조직을 염색한 후, 항-CD300c 항체(Invitrogen)를 1:500으로 처리하여 CD300c를 염색하였다. 그 결과, 도 5a에 도시된 바와 같이, 환자의 대장암 조직에서 CD300c가 발현되고 있음을 확인하였다.
- [287] CD300c가 대장암 환자의 조직뿐만 아니라 암 조직 내의 면역세포에서도 발현되는지 여부를 확인하기 위하여, 2×10^5 개의 CT26 세포를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사(subcutaneous injection)로 이식하였다. 종양 이식 후 25일차(D25)에 희생시켜 항-CD300c 항체를 투여하지 않은 대조군 마우스 6마리에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 μm 세포 스트레이너(strainer)로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32 항체(입수처: Invitrogen) 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액(입수처: Invitrogen), 및 총 마크로파지 마커인 F4/80(Abcam), CD11b(입수처: Abcam), CD11c(입수처: Abcam), CD3(입수처: Abcam), CD4(입수처: Thermofisher), CD8(입수처: Thermofisher)에 대한 항체와 CD300c 항체(입수처: Sino Biological)로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.
- [288] 그 결과, 도 5b에 도시된 바와 같이, 마우스의 종양 조직 내에 CD300c를 발현하는 면역 세포가 존재함을 확인하였다. 이는 CD11b와 CD11c 마커를 동시에 발현하고 있는 면역 세포이며, 그 예로는 수지상 세포, 마크로파지 등이

있다. 이러한 결과로부터, 암 조직과 면역 세포 모두에서 CD300c가 발현됨을 확인하였다.

[289] 실험예 1.3. 암 조직 및 면역 세포에서의 CD300c의 발현 확인 (II)

[290] 인간의 면역 조직과 암세포에서 CD300c가 발현되는지 여부를 확인하기 위하여, 다음과 같이 조직 마이크로어레이를 시행하였다. 정상 편도 조직과 대장암 환자의 조직을 포르말린 고정하고, 파라핀으로 블록을 제작하였다. 그 후, 정상 편도 조직과 대장암 환자의 조직 중 조직 마이크로어레이를 시행할 위치를 찾은 후, 미세조직배열기로 지름 2.0 mm, 두께 3 내지 5 μ m 두께로 박절하였다. 이어서, 슬라이드에 일정 방향으로 부착시켜 건조시켰다. H&E 염색을 통해 암 조직을 염색한 후, 항-CD300c 항체(Invitrogen)를 1:500으로 처리하여 CD300c를 염색하였다.

[291] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 도시된 바와 같이, 면역 조직인 정상 편도 조직(도 6a)과 환자의 대장암 조직(도 6b) 모두에서 CD300c가 발현되고 있음을 확인하였다. 편도에는 T 세포, 단핵구 등 다수의 면역 세포가 분포하고 있으므로 편도 조직에서 CD300c가 발현된다는 것은 면역 세포에서 CD300c가 발현된다는 것을 의미한다. 본 실험예는 실험예 1.2에서와 마찬가지로 대장암 환자 조직에서 CD300c가 발현됨을 확인한 것이지만, 4명의 대장암 환자 조직 모두에서 CD300c의 발현을 관찰한 것으로 다수의 대장암 조직에서 CD300c가 발현됨을 확인하였다는 의미를 가진다.

[292] 실험예 2. 항-CD300c 단클론 항체의 CD300c 항원 인식 및 그에 대한 결합 확인

[293] 실험예 2.1. 항-CD300c 단클론 항체의 항원 결합능(binding affinity) 확인

[294] 실시예 1에서 제작된 항-CD300c 단클론 항체의 항원 결합능을 확인하기 위하여 결합 ELISA를 실시하였다. 구체적으로, 코팅 완충 용액(0.1M의 탄산나트륨, pH 9.0)에 CD300c 항원(11832-H08H, Sino Biological) 또는 CD300a 항원(12449-H08H, Sino Biological)을 각각 웰 당 8 μ g/mL의 농도가 되도록 ELISA 플레이트에 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 반응시켜 항원을 플레이트에 결합시켰다. 그리고, PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항원을 깨끗이 제거해 준 후에, 각각의 웰에 각각의 웰에 5% BSA(bovine serum albumin)가 첨가되어 있는 PBST를 300 μ L 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, PBST를 이용하여 다시 세척하였다. 그리고 항-CD300c 단클론 항체를 4배 희석하여 넣고 1 시간 동안 실온에서 반응시켜 항원과 결합시켰다. 1 시간 후에 PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항-CD300c 단클론 항체를 제거해준 후에, 4 μ g/mL의 검출용 항체(HRP conjugated anti-Fc IgG)를 첨가하고 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후, PBST를 이용하여 결합되지 않은 검출용 항체를 제거해준 후에 TMB 용액을 첨가하고 10 분 동안 반응시켜 발색 시킨 후에, 2 N의 황산 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하였다. 그 결과는 표 7 및 도 7에 나타내었다.

[295] [표7]

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

[296] 표 7에 나타난 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 EC50(The effective concentration of drug that causes 50% of the maximum response)을 측정한 결과, 4개 클론(CK3, CL8, SK15, SK16)을 제외하고 나머지 14개 클론 모두 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 이하로서 결합 친화력(Binding affinity)이 높은 것을 확인하였다. 또한, 도 7에 도시된 바와 같이, 결합 ELISA의 결과에 따른 S자형 곡선(sigmoid curve)에서도 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체가 강한 결합력으로 CD300c 항원에 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[297] 실험예 2.2. 항-CD300c 단클론 항체의 세포 항원 인식 확인

[298] 항-CD300c 단클론 항체(CL7)가 세포 항원을 인식하는 것을 확인하기 위하여, FACS 결합을 실시하였다.

[299] 293T 세포(ATCC)와 THP-1 세포(ATCC)에서 CD300c를 과발현시킨 후 이 세포를 각 미세 원심분리 튜브당 2×10^5 개의 세포로 분주하였다. 그 후, 10 $\mu\text{g/mL}$ 부터 3배로 연속 희석한 항-CD300c 단클론 항체를 30분간 CO_2 인큐베이터에서 반응시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하였다. 그 후, 1:100으로 FACS 완충액에 희석한 FITC-접합 항 인간 IgG(H+L)을 30분간 CO_2 인큐베이터에서 반응시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하였다. 이어서, Beckman coulter 사의 CytoFLEX 기기로 FITC 신호를 측정한 후, CytExpert 프로그램을 사용하여 MFI 값을 구하였다. 이렇게 얻은 MFI 값을 사용하여 sigmaplot 프로그램에 의해 S자형 곡선을 그려 EC50(The effective concentration of drug that causes 50% of the maximum response)를 계산하였다. 그 결과, 293T

세포의 경우 2.7 nM, THP-1 세포의 경우 2.6 nM의 EC50을 얻었다.

- [300] 도 8에 도시된 바와 같이, FACS 결합의 결과에 따른 S자형 곡선에서 실시예 1에서 제조한 항-CD300c 단클론 항체는 강한 결합력으로 THP-1 및 293T 세포 표면에서 과발현된 CD300c에 결합하였다. 따라서, 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c에 항원 특이적으로 결합한다는 것이 확인되었다.
- [301] **실험예 2.3. CD300c 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 결합력 확인 (I): 결합 ELISA**
- [302] CD300c 항원(250 ug/mL)을 코팅 완충용액(0.1 M 탄산나트륨, pH 9.0)에 800 ng/mL의 농도로 희석하여 96-웰 마이크로플레이트에 100 uL씩 넣고, 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 다음날, PBST 200 uL로 3회 세척하였다. 그 후, 차단 완충용액(5% 스킵 밀크)을 200 uL씩 넣고, 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 항-CD300c 단클론 항체 CL7을 PBS에 200 ug/mL로 희석하여 나노드롭(Nanodrop, 제품명: NanoDrop One/One, 제조사: Thermo Fisher Scientific)으로 측정하여 농도를 확인하였다. 그 후, CL7을 PBS로 10 ug/mL로부터 4진 희석하여 각각 100 uL씩 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST 200 uL로 3회 세척하였다. 2차 항체(접합 항-Fc IgG)를 차단 완충용액에 1:10,000으로 희석하여 100 uL를 첨가한 후, 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, PBST 200 uL를 첨가하여 3회 세척하였다. 이어서, TMB와 과산화수소를 1:1로 섞고 각 웰에 100 uL씩 넣은 후 실온에서 7분 내지 9분 동안 반응시켰다. 그 후, 1 N 황산 50 uL를 첨가하여 발색을 멈춘 후, 마이크로플레이트 리더(제품명: Varioskan LUX)를 이용하여 450 nm에서 측정하여 결합 친화도 결과를 얻었다.
- [303] 그 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체가 농도 의존적인 방식으로 CD300c에 결합하는 것을 확인하였고, 이는 항-CD300c 단클론 항체가 항원인 CD300c에 대해 우수한 결합력과 특이성을 가짐을 나타낸다.
- [304] **실험예 2.4. CD300c 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 결합력 확인 (II): 표면 플라즈몬 공명(SPR)**
- [305] 항원인 CD300c와 항-CD300c 단클론항체 CL7간의 결합 친화도를 확인하기 위하여 표면 플라즈몬 공명 실험을 진행하였다.
- [306] CD300c를 CM5 칩에 고정하기 위하여 5 ug/ml의 CD300c를 10 mM 아세트이트 완충용액(pH 5.5)에 희석하였다. 그 후, 유량을 모두 동일하게 10 ml/분으로 하고, 각각 목표 RU를 300 RU로 설정하였다. 0.2 M EDC와 0.05 M NHS의 혼합물로 활성화를 진행하고 1 M 에탄올아민으로 차단하여, CD300c의 최종 RU가 399.2 RU가 되도록 고정화하였다. 그 후, CL7을 PBSP에 각각 0, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25 ug/ml 농도로 희석하고, 결합 시간을 240초로 하고, 해리 시간을 900초로 하고, 유량을 30 ul/분으로 설정하여 카이네틱스/친화도(Kinetics/Affinity) 시험을 진행하였다. 그 후, 50 mM NaOH를 30 ul/분의 속도로 30초 동안 흘려보내 표면을 재생시켰다.
- [307] 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이, KD 값은 5.199E-10 M로 분석되었고,

항-CD300c 단클론 항체의 결합 친화도는 나노몰 이하(subnanomol) 수준인 0.52 nM로 확인되었다. 이는 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 결합력이 높음을 의미한다.

[308] 실험예 2.5. CD300c 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 결합 특이성 확인 (I)

[309] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 다른 B7 패밀리 단백질에는 결합하지 않고, CD300c에만 특이적으로 결합하는 것을 확인하기 위해 결합 ELISA를 실시하였다. 보다 자세하게는, 코팅 완충용액(0.1 M 탄산나트륨, pH 9.0)에 CD300c 항원, CD300a 항원 또는 B7 패밀리 단백질 항원 7종(PD-L1[B7-H1](Sino Biological), ICOS Ligand[B7-H2](Sino Biological), CD276[B7-H3](Sino Biological), B7-H4(Sino Biological), CD80[B7-1](Sino Biological), CD86[B7-2](Sino Biological), CD273[PD-L2](Sino Biological))을 각각 웰당 8 µg/mL의 농도가 되도록 ELISA 플레이트에 코팅한 후, 2°C내지 8°C에서 밤새 인큐베이션하여 항원을 플레이트에 결합시켰다. PBST를 이용하여 3회 세척하여 결합되지 않은 항원을 깨끗이 제거한 후, 각각의 웰에 차단 완충용액(PBST 중의 5% 탈지유) 300 ml를 첨가하였다. 이어서, 실온에서 1 시간 동안 차단한 후, PBST를 이용하여 다시 세척하였다. 그 후, CL7을 PBS에 4진 희석하고, 1 시간 동안 실온에서 반응시켜 항원과 결합시켰다. 1 시간 후, PBST를 이용하여 3회 세척하였다. 이어서, 차단 완충용액에 4 µg/mL로 희석한 2차 항체(HRP-접합 항-Fc IgG)를 첨가하고, 다시 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 후, PBST를 이용하여 결합되지 않은 검출용 항체를 제거한 후, TMB 용액을 첨가하고 10 분 동안 반응시켜 발색시켰다. 이어서, 2 N 황산 용액을 첨가하여 발색 반응을 종료시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하여, CD300c 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하였다.

[310] 그 결과, 도 11에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체는 다른 유사 단백질에는 결합하지 않고, CD300c만을 특이적으로 인식하는 것을 확인하였다.

[311] 실험예 2.6. CD300c 항원에 대한 항-CD300c 단클론 항체의 결합 특이성 확인 (II)

[312] 항-CD300c 단클론 항체 CL7의 CD300c 항원에 대한 특이성을 확인하기 위하여, CL7이 기존에 CD300c 항원과 길항 작용을 하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 그와 단백질 서열이 유사한 CD300a 항원에 대해 교차반응성을 나타내는지 여부를 추가로 확인하였다. 보다 자세하게는, CD300a 항원(입수처: Sino Biological)을 0.039, 0.63, 및 10 µg/mL의 농도로 처리한 후, 실험예 2.1과 동일한 방법으로 결합 ELISA를 실시하였다.

[313] 그 결과, 도 12에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체는 CD300c 이외의 항원에는 결합하지 않아 CD300c 항원에만 높은 결합 특이성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[314] 실험예 3. 항-CD300c 단클론 항체의 투여에 따른 항암 효과 확인

- [315] 실험예 3.1. 마우스에서 M1 마크로파지 분화능의 증가 확인
- [316] 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 마우스 마크로파지(Raw264.7)를 1×10^4 세포/웰의 농도로 분주한 후에, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 CL7을 함께 처리하고 인큐베이션하였다. 그 후, TNF- α 의 생성량을 ELISA 키트(Human TNF- α Quantikine kit, R&D Systems)로 확인하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [317] 도 13에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서 TNF- α 의 생성량이 증가된 것을 확인하였으며, 이로부터 항-CD300c 단클론 항체는 마우스에서 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킴을 알 수 있다.
- [318] 이와 관련하여, 후술하는 실험예 5.2를 참조하면, 항-CD300c 단클론 항체는 인간에서도 M1 마크로파지로의 분화를 촉진하였다. 이로부터 항-CD300c 단클론 항체가 인간뿐만 아니라 마우스에서도 동일하게 작용하여 M1 마크로파지로의 분화를 촉진하는 교차반응성(cross-reactivity)을 가짐을 알 수 있다.
- [319] 실험예 3.2. 종양 관련 마크로파지(TAM)의 증가 확인
- [320] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 종양 관련 마크로파지에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식(syngeneic) 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF(specific pathogen free) 시설에서 진행하였다. 대장암 세포주를 이식하고 12일 후에, 종양 크기가 50 내지 100 mm^3 인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체를 각각 투여하고, 대조군(control)으로는 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)을 동량 주사하였다. 1주일에 2회씩 2주간 총 4회에 걸쳐 마우스에 복강내 주사(Intraperitoneal injection)로 25 mg/kg 의 용량으로 주사하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각 6마리 마우스에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, $70 \mu\text{m}$ 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액, 및 총 마크로파지 마커인 F4/80 및 M1 마크로파지 마커인 iNOS에 대한 항체(입수처: Abcam)로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.
- [321] 그 결과, 도 14에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때, 마우스 암 조직에서 M1 형태의 종양 관련 마크로파지의 발현량이 증가함을 확인하였다. 이는 항-CD300c 단클론 항체의 투여를 통해 암 조직 내의 종양 관련 마크로파지가 증가하여 암의 성장을 억제함을 의미한다.

[322] 실험예 3.3. 세포독성 T 세포의 증가 확인

[323] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 CD8+ T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 3.2.에서와 같이 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하여 같은 농도로 투여하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각 6마리 마우스에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액 및 CD8+ 항체(입수처: Abcam) 및 CD4+ 항체(입수처: Abcam)로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[324] 그 결과, 도 15에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때 종양 내 CD8+ T 세포의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 이는 항-CD300c 단클론 항체의 투여가 종양내 세포독성 T 세포를 증가시켜 암 치료 효과를 나타냄을 의미한다.

[325] 실험예 3.4. 세포독성 T 세포의 종양 특이적 증가 확인

[326] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 종양 특이적인 방식으로 CD8+ T 세포 수를 증가시키는지 확인하기 위하여, 실험예 3.2.에서와 같이 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하여 같은 농도로 투여하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각 6마리 마우스에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액 및 AH1 테트라머 항체(입수처: Abcam)로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[327] 그 결과, 도 16에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 투여하였을 때 CD8+ T 세포에서 CT26 종양 마커 인자인 AH1-테트라머의 발현이 증가함에 따라 CD8+ T 세포는 종양(CT26) 특이적인 방식으로 그 수가 증가하였음을 확인하였다. 이는 항-CD300c 단클론 항체의 투여가 CT26 암세포를 표적으로 하여 이를 억제하기 위해 CD8+ T 세포를 증가시켰음을 의미한다.

[328] 실험예 3.5. 세포독성 T 세포의 활성 증가 확인

[329] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 CD8+ T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 3.2.에서와 같이 동종이식 마우스 종양 모델을

제작하여 같은 농도로 투여하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각 6마리 마우스에서 비장을 채취하였다. 이어서, ELISPOT 분석법을 통해 IFN-g를 측정하여 결과를 확인하였다. 구체적으로, R&D Systems(#EL485)의 Mouse IFN-g ELISpot 키트를 구매하여 키트의 프로토콜에 따라 IFN-g를 측정하였다.

[330] 그 결과, 도 17에 도시된 바와 같이, 항-CD300C 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때 IFN-g의 발현이 증가함을 확인하였다. 이는 항-CD300C 단클론 항체의 단독 투여가 CD8+ T 세포 수 증가를 가져옴(도 15 참조)에 더해 CD8+ T 세포의 활성 증가를 또한 가져옴으로써, 다방면에서 암 성장을 억제하여 암 치료 효과를 나타냄을 의미한다.

[331] 실험예 3.6. 조절 T 세포 대비 세포독성 T 세포의 증가 확인

[332] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 조절 T 세포 대비 세포독성 T 세포의 증가에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 3.2에서와 같이 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하여 같은 농도로 투여하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각 6마리 마우스에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액, Treg 마커 단백질인 CD25(입수처: Sino Biological)와 Foxp3(입수처: Abcam)에 대한 항체(입수처: Sino Biological), CD3+ 항체 및 CD8+ 항체로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[333] 그 결과, 도 18에 도시된 바와 같이, 항-CD300C 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때 CD8+ T 세포가 Treg T 세포 대비 증가하는 것을 확인하였다. 이는 항-CD300C 단클론 항체의 투여로 그 수가 증가한 CD8+ T 세포가 암 성장을 더욱 억제함을 의미한다.

[334] 실험예 3.7. 세포독성 T 세포, 조절 T 세포 및 종양 관련 마크로파지에 대한 영향 확인

[335] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 세포독성 T 세포, 조절 T 세포 및 종양 관련 마크로파지에 대해 미치는 영향을 확인하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 실험예 3.2에서와 같이 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 대장암 세포주를 이식하고 12일 후에, 종양 크기가 50 내지 100 mm³인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체를 각각 투여하고, 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 동량 주사하였다. 1주일에 2회씩 2주간 총 4회에 걸쳐 마우스에 복강내 주사로 25 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 희생시켜 대조군과 비교하여 항종양 효과가 가장 높았던 CL7 25 mg/kg 투여군의 각각

6마리 마우스에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액, 및 CD8+ T cell 마커인 CD8+ 항체 및 CD4+ 항체로 세포를 염색하거나, Treg cell 마커인 Foxp3 항체 및 CD4+ 항체로 세포를 염색하거나, 종 마크로파지 마커인 F4/80 및 M1 마크로파지 마커인 iNOS에 대한 항체(입수처: Abcam)로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[336] 도 19에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체(CL7)는 활성화된 CD8+ T 세포를 유의하게 증가시키고, 조절 T 세포를 억제하고, 종양 관련 마크로파지를 M1 표현형쪽으로 재분극시키는 것으로 확인되었다.

[337] 실험예 3.8. 마우스 암세포 성장 억제 효과의 확인

[338] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7, CL10 및 SL18이 항암 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, CT26(마우스 대장암 세포주)을 96-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 농도로 분주하고, 10 µg/mL의 단클론 항체를 처리하여 5일 동안 배양한 후, CCK-8 검출을 통해 세포 증식 분석을 실시하였다.

[339] 도 20에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체는 각각 대조군 대비 66%(CL7), 15%(CL10), 및 38%(SL18)의 암세포 증식 억제 효과를 발휘하므로 마우스에서 암 치료 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[340] 이와 관련하여, 후술하는 실험예 6.2를 참조하면, 항-CD300c 단클론 항체는 인간에서도 항암 효과를 나타내는바, 항-CD300c 단클론 항체가 인간과 마우스 CD300c 둘 모두에 작용하는 교차반응성을 가짐을 알 수 있다.

[341] 실험예 3.9. 생체내 암 성장 억제 효과 확인

[342] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7의 항암효과를 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF 시설에서 진행하였다. 대장암 세포주를 이식한 후 11일차(D11)에, 종양 크기가 50 내지 100 mm³인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체를 각각 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg 또는 25 mg/kg으로 투여하고, 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 동량 주사하였다. 구체적으로, 마우스에 복강내 주사로 각각의 용량을 1주일 2회, 2주간 총 4회(D11, D14, D18 및 D21) 주사하였다. 25일간 종양 부피를 측정하였다. 그 결과를 도 21에 나타내었다.

[343] 도 21에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체인 CL7은 CT26 대장암 성장을 용량 의존적인 방식으로 지연시키는 것으로 확인되었다.

[344] 실험예 4. CD300c 발현량에 따른 다양한 암 환자의 전체 생존 기간 비교

[345] 미국 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터베이스에서 얻은 신장암(530명),

췌장암(177명) 및 간암(370명) 환자의 데이터를 이용하여 CD300c의 발현 수준에 따른 전체 생존기간(Overall survival)을 비교하였다. 먼저, 각 암환자를 CD300c 발현량의 높고 낮음에 따라 분류하였다. 이러한 높고 낮음은 암종별 CD300c 발현량의 평균과 비교하여 구분한 것이다. 신장암 환자의 경우, 394명은 낮은 CD300c의 발현 수준을 나타냈고, 136명은 높은 CD300c의 발현 수준을 나타냈다. 췌장암 환자의 경우, 57명은 낮은 CD300c의 발현 수준을 나타냈고, 120명은 높은 CD300c의 발현 수준을 나타냈다. 한편, 간암 환자의 경우, 192명은 낮은 CD300c의 발현 수준을 나타냈고, 178명은 높은 CD300c의 발현 수준을 나타냈다. 각 암환자의 CD300c 발현량에 따른 전체 생존기간을 Kaplan-Meier 방법으로 분석하였다. 이어서, log-순위 검정으로 CD300c 발현 수준이 높은 환자군과 낮은 환자군의 생존기간을 비교하였다.

[346] 그 결과, 도 22에 도시된 바와 같이, CD300c 발현 수준이 낮은 환자에 비해 CD300c 발현 수준이 높은 환자가 생존기간이 짧은 것을 확인하였고, 이는 P 값을 고려해 볼 때 유의미한 결과임을 나타낸다. 이러한 결과는 CD300c의 발현이 암환자의 생존기간과 매우 연관성이 있음을 의미할 뿐만 아니라, CD300c의 발현 또는 활성을 억제하였을 때 암 치료 효과 또는 생존기간 증가 효과를 기대할 수 있음을 의미한다.

[347] **II. 항-CD300c 단클론 항체의 투여에 따른 바이오마커의 발현 변화**

[348] 실시예 2. 항-CD300c 단클론 항체의 투여에 따른 면역 세포 관련 마커 및 종양 미세 환경 관련 마커의 발현 변화

[349] 실시예 2.1. 나노스트링 면역 프로파일링

[350] 실시예 1에서 제조한 항-CD300c 단클론 항체(CL7)를 고형암 모델에 투여하였을 때 면역 세포 및 종양 미세 환경 관련 마커의 발현 변화를 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF 시설에서 진행하였다. 대장암 세포주를 이식하고 12일 후에, 종양 크기가 50 내지 100 mm³인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체를 각각 투여하고, 대조군으로는 인산염완충용액(phosphate buffered saline; PBS)을 동량 주사하였다. 1주일에 2회씩 2주간 총 4회에 걸쳐 마우스에 복강내 주사(Intraperitoneal injection)로 25 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 주사 후 25일째에 마우스를 안락사시켜 종양 조직을 준비하였다. 이로부터 RNA를 추출하여 정제한 후, 나노스트링 면역 프로파일링을 통해 수지상 세포(dendritic cell) 마커, 매크로파지(macrophage) 마커, 종양 미세 환경(TME) 마커, Th1 반응 마커, 또는 Th2 반응 마커의 변화를 확인하였다.

[351] 상기 나노스트링 면역 프로파일링 결과를 도 23에 나타내었다. 이로부터 항-CD300c 단클론 항체의 투여는 종양 면역 미세 환경을 광범위하게 리프로그래밍(reprogramming)함을 확인하였다.

[352] 또한, 항-CD300c 단클론 항체의 투여에 따른 수지상 세포 마커, 매크로파지

마커, 종양 미세 환경 마커, Th1 반응 마커, 또는 Th2 반응 마커의 변화를 대조군과 대비하여 관찰한 결과를 도 24에 나타내었다. 도 24에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 투여 시, 수지상 세포 마커인 Bst2, CCL8, Xcl1의 발현이 유의하게 증가했고; M1 마크로파지 마커인 CCR7, CD80의 발현이 유의하게 증가했고; 종양 미세 환경에서 암의 성장을 돕는 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a의 발현이 감소했고; Th1 반응을 확인할 수 있는 마커인 Tbx21, Stat1, Stat4, Ifn-g, Cxcr3의 발현이 증가한 것으로 확인되었다.

[353] 실시예 2.2. 면역 관문 마커의 발현 변화

[354] 실시예 2.1에서 얻은 나노스트링 면역 프로파일링 결과에 기초하여, 항-CD300c 단클론 항체를 동종이식 마우스 종양 모델에 투여하였을 때 어떤 면역 관문 마커의 발현이 대조군에 비해 유의한 차이를 보이는지 확인하였다.

[355] 그 결과를 도 25에 나타내었다. 항-CD300c 단클론 항체가 투여된 경우, 억제성 면역관문(inhibitory IC)인 PD-1, CTLA-4, Lag3의 발현이 증가했고, 작용성 면역관문(agonistic IC)인 ICOS, OX40, Gitr, Cd27 및 Cd28의 발현도 증가한 것으로 확인하였다.

[356] 이러한 결과는, 더 향상된 항암 효능을 얻기 위해 항-CD300c 단클론 항체와 추가의 면역 항암제를 병용 투여하는 경우, 어떤 면역관문의 면역 항암제를 선택해야 하는지에 대한 유용한 정보를 제공할 수 있다는 점에서 상당한 의의를 갖는다.

[357] **III. 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용**

[358] 실시예 3. 항-CD300c 단클론 항체(CL7)와 면역 항암제의 병용 투여

[359] 실시예 1에서 제조된 항-CD300c 단클론 항체(CL7)를 다른 면역항암제, 예를 들어 항-PD-L1 항체인 임핀지(Imfinzi®)와 옵디보(Opdivo®), 항-PD-1 항체인 키트루다, 항-CD47 항체(α CD47), 항-CTLA-4 항체와 병용하여 그 결과를 관찰하였다.

[360] 상기 면역 항암제 각각의 입수처는 다음과 같다: 임핀지(AstraZeneca); 옵디보, 항-CTLA-4 항체(Bristol Myers Squibb Company), 키트루다(Merck Sharp & Dohme), 및 항-CD47 항체(Abcam).

[361] 실험예 5. 병용에 의한 마크로파지 활성의 (상승적) 증가 확인

[362] 실험예 5.1. M1 마크로파지의 증가 확인

[363] 실시예 1에서 제조한 항-CD300c 단클론 항체인 CL7을 항-PD-L1 항체인 임핀지, 항-PD-1 항체인 키트루다, 항-CD47 항체(α CD47) 등의 면역 항암제와 병용으로 단핵구 세포에 처리하였을 때 M1 마크로파지로의 분화 양상을 세포 형태로 확인하기 위하여, THP-1(인간 단핵구 세포주)에 각각 10 μ g/ml의 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제를 단독 또는 병용으로 처리하고, 48시간 동안 배양한 후에 세포의 형태를 현미경 하에서 관찰하였다.

[364] 그 결과, 도 26에 도시된 바와 같이, 면역 항암제를 단독 처리한 경우와 비교하여 항-CD300c 단클론 항체와 함께 병용으로 처리한 경우에 THP-1 세포의

형태가 부유 세포(suspension cell)에서 M1 마크로파지의 형태인 원형의 부착 세포로 변하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리에 의하여 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화가 더 촉진되는 것이 확인되었다.

[365] 실험예 5.2. M1 마크로파지 마커의 증가 확인

[366] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7을 항-PD-L1 항체인 임핀지, 항-PD-1 항체인 옵디보, 항-PD-1 항체인 키트루다, 항-CD47 항체, 항-CTLA-4 항체의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화 유도가 증가하는지를 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1.5×10^4 세포/웰의 THP-1을 분주하고, 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제를 각각 $10 \mu\text{g/mL}$ 로 단독 또는 병용으로 처리하였다. 48시간 동안 반응시킨 후에, M1 마크로파지의 분화 마커인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α), IL-1b, IL-8의 생성량을 ELISA 키트(Human TNF- α Quantikine kit, R&D Systems)를 이용하여 측정하였다.

[367] 그 결과, 도 27에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체가 단독으로 처리된 경우 3가지 분화 마커 모두의 생성량이 증가하였으며, 특히 IL-8의 생성량이 현저히 증가한 것으로 확인되었다. 또한, 도 28에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리했을 때에 비해, 키트루다, αCD47 과 병용으로 처리하였을 때에 M1 마크로파지의 마커인 TNF- α 의 생성량이 더 증가하는 것으로 확인되었다. 이로부터, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체 및/또는 항-CD47 항체와 병용으로 처리하였을 때에 단핵구 세포가 M1 마크로파지로 더 많이 분화되는 것으로 확인되었다.

[368] 실험예 5.3. M2 마크로파지 마커의 감소 확인

[369] 항-CD300c 단클론 항체를 임핀지, 옵디보, 키트루다, 항-CTLA-4 또는 αCD47 등의 면역 항암제와 병용으로 투여하였을 때 단핵구 세포의 M2 마크로파지로의 분화 유도가 감소하는지를 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1.5×10^4 세포/웰의 THP-1을 분주하고, 320 nM의 PMA를 6 시간 동안 전처리한 후에, 20 ng/mL의 IL-4(Interleukin-4) 및 IL-13(Interleukin-13)와 함께 각각 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제를 단독 또는 병용으로 처리하고 48시간 동안 반응시켰다. 그 후, M2 마크로파지의 분화 마커인 IL-10, IL-12의 생성량을 ELISA 키트(R&D Systems)를 이용하여 측정하였다.

[370] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리했을 때보다, 임핀지, 옵디보, 키트루다, αCD47 과 병용으로 처리하였을 때에 IL-10, IL-12의 생성량이 30% 이상 더 감소하는 것으로 확인되었다.

[371] 실험예 5.4. M1 마크로파지 분화능의 증가 확인

[372] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7을 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 단핵구 세포의 M1 마크로파지로의 분화가 증가한다는 것을 확인하기 위하여, M1 마크로파지 분화의 대표적인 신호인 MAPK(mitogen-activated protein kinase), I κ B

및 NF- κ B의 신호 전달을 확인하였다. 구체적으로, 6-웰 플레이트에 8.8×10^5 세포/웰의 THP-1을 분주하고, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 임핀지, 및/또는 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 키트루다를 처리하였다. 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 동량 처리하였다. 48 시간 동안 배양한 후에, MAPK 신호의 경우 인산화된 SAPK/JNK, 인산화된 ERK, 인산화된 p38를, NF- κ B 신호의 경우 인산화된 NF- κ B를, I κ B 신호의 경우 인산화된 I κ B를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 29 내지 도 31에 나타내었다.

[373] 도 29, 도 30 및 도 31은 각각 MAPK, NF- κ B 및 I κ B의 신호 전달을 확인한 결과를 도시한다. 항-CD300c를 단독으로 처리하였을 때와 비교하여, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 인산화된 MAPK, I κ B, NF- κ B의 양이 증가하는 것으로 확인되었다. 이로부터, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 M1 마크로파지로 분화하는 세포 신호전달이 증가하는 것을 확인하였다.

[374] 실험예 6. 병용에 의한 암세포 성장 억제 효과의 (상승적) 증가 확인(*In vitro*)

[375] 실험예 6.1. 세포자멸 신호 확인

[376] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7을 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 세포자멸 신호가 증가하는지를 확인하였다. 구체적으로, 6-웰 플레이트에 8×10^5 세포/웰의 A549를 분주하고, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체, $10 \mu\text{g/mL}$ 의 임핀지, 키트루다, 오피디보, 항-CD47 항체를 단독 또는 병용으로 처리하였다. 48 시간 동안 배양한 후에, 세포자멸 신호 또는 세포 주기 신호를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 확인한 세포자멸 신호의 마커로는 절단된(cleaved) caspase-9, caspase-3, caspase-2, caspase-8을 확인하였고, 세포 주기 신호의 마커로는 사이클린 D1, CDK2, p27kip1, CDK6, 사이클린 D3, P21 Waf1, Cip1 등을 확인하였다.

[377] 도 32에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1인 임핀지와 병용 처리하였을 때 세포자멸신호가 증가하였고, 항-CD300c 단클론 항체를 항-PD1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-CD47 등의 면역 항암제와 함께 병용으로 처리하였을 때에 cleaved-caspase9, p21의 양이 증가하고, 사이클린 D1은 감소하였다. 이로부터, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 암세포의 세포자멸이 더 잘 유도되는 것으로 확인되었다.

[378] 실험예 6.2. 암 세포주의 성장 억제 효과 확인

[379] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7과 면역 항암제의 병용 투여에 의한 암 세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주)와 MDA-MB-231(인간

유방암 세포주)를 이용하여 암세포 성장 억제 효과를 비교하였다. 구체적으로, 96-웰 플레이트에 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 없는 조건에서는 2×10^4 세포(A549) 또는 3×10^4 세포(MDA-MB-231)를 분주하였고, 0.1% 우태아혈청 조건에서는 6×10^3 세포(A549) 또는 1×10^4 세포(MDA-MB-231)를 분주하였다. 이어서, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD300c 단클론 항체와 임핀지를 단독으로 처리하거나 병용으로 처리하여 5 일 동안 배양하였다. 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 동량 처리하였다. 이어서, CCK-8(DOJINDO)을 처리하고, OD 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 33(A549)와 도 34(MDA-MB-231)에 나타내었다.

[380] A549 세포주에 처리한 경우, 도 33에 도시된 바와 같이, FBS가 없는 조건에서는 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 세포 성장 억제 효과는 17% 높았고, 임핀지와 병용으로 처리하였을 때에는 34% 높은 것으로 확인되었다.

[381] MDA-MB-231 세포주에 처리한 경우, 도 34에 도시된 바와 같이, 0.1% FBS 조건에서는 대조군과 비교하여 항-CD300c 단클론 항체의 단독 처리시 19% 높은 암세포 성장 억제 효과가 관찰되었고, 항-CD300c 단클론 항체와 항-CD47 항체를 병용으로 처리하였을 때에는 45% 높은 억제 효과가 관찰되었으며, 항-CD300c 단클론 항체와 항-CD47 항체, 임핀지를 함께 처리하였을 때에는 51% 높은 억제 효과가 관찰되었다. 0.1% FBS 조건에서는 항-CD300c 단클론 항체의 처리시 19% 높은 암세포 성장 억제 효과를 보았고, 항-CD47 항체와 병용으로 처리하였을 때에는 22% 높은 억제 효과가 관찰되었고, 항-CD300c 단클론 항체와 항-CD47 항체, 임핀지를 모두 병용으로 처리하였을 때에는 32% 높은 억제 효과가 관찰되었다.

[382] 위 결과로부터, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역항암제와 병용으로 처리하였을 때 암세포의 성장이 더욱 억제된 것으로 확인되었다.

[383] 실험예 7. 병용에 의한 생체내 항암 효과의 (상승적) 증가 확인 (대장암 마우스 모델)

[384] 실험예 7.1. 생체내 암 성장 억제 효과 확인

[385] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7의 항암 효과를 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF 시설에서 진행하였다. 대장암 세포주를 이식한 후 12일차(D12)에, 종양 크기가 50 내지 100 mm^3 인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체와 각각 BioXcell에서 구매한 항-PD-1 항체를 단독 또는 병용하여 투여하고, 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 동량 주사하였다. 개략적인 실험 방법도 도 35에 나타내었다. 구체적으로, 마우스에 복강내 주사로 각각의 항체를 단독

또는 병용하여 1주일 2회, 2주간 총 4회(D12, D15, D19 및 D22) 주사하였다(CL7: 10 mg/kg; 항-PD-1 항체: 10 mg/kg). 25일간 종양 부피를 측정하였다. 그 결과를 도 36에 나타내었다.

[386] 도 36으로부터 알 수 있는 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독 투여한 실험군에서도 대조군과 비교하여 암의 성장이 억제되지만, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 암의 성장이 더욱 효과적으로 억제된 것으로 확인되었다.

[387] 실험예 7.2. 생체내 종양 미세 환경에서의 종양 침윤 림프구 증가 확인

[388] 항-CD300c 단클론 항체가 종양 미세 환경(TME)에서 종양침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험예 7.1과 동일한 방법으로 실험한 25일차 마우스를 안락사시키고, 1%

PFA(para-formaldehyde)를 마우스에 혈관내 주입하여 관류시킨 후, 암 조직을 획득하였다. 획득된 암 조직을 1% PFA를 이용하여 고정시키고, 순차적으로 10%, 20%, 30% 수크로즈 용액을 이용하여 탈수하였다. 탈수된 암 조직을 OCT 컴파운드(Optimal cutting temperature compound)에서 냉동시킨 후

냉동조직절편기(Cryotome)를 이용하여 암 조직을 50 μ m 두께의 절편으로

만들었다. 20 mg/ml의 콜라게나제 D와 2 mg/ml의 DNaseI 혼합 용액에서

37°C에서 1시간 동안 조직을 인큐베이션시킨 다음, 70 μ m 세포 스트레이너로

여과하고, 적혈구를 용해시킨 다음 세포를 단일 세포로 만들어주기 위해 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 단일 세포 부유액에서 비특이적 반응을 억제하기 위해 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 1시간 반응시키고, 세포 생존도를 확인하고 종양침윤 림프구 표지자인 CD8+ T 세포와 CD31+ 암 혈관 세포를 염색하였다.

[389] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체를 단독 투여한 실험군과 비교하여, 항-CD300c 단클론 항체를 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체와 병용 투여한 실험군에서 CD8+ T 세포가 증가된 것으로 확인되었으며, 이를 통하여, 항-CD300c를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 종양 미세 환경에서 종양침윤 림프구를 증가시켜 항암 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[390] 실험예 7.3. 생체내에서의 M1 마크로파지 증가 효과 확인

[391] 항-CD300c 단클론 항체가 마우스 모델에서 암 조직 내의 M1 마크로파지를 증가시키는지 확인하기 위하여, 실험예 7.2와 동일한 방법으로 준비한 암 조직 절편을 M1 마크로파지 마커인 iNOS와 M2 마크로파지 마커인 CD206에 대한 항체로 염색하여 FACS로 확인하였다.

[392] 그 결과, 도 37에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 항체를 처리한 실험군에서는 M1 마크로파지가 대조군과 비교하여 일부 증가되었으나, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서는 M1 마크로파지가 현저히 증가되며, M2 마크로파지는 거의 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 또한, 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1

항체를 병용 투여한 실험군에서 더욱 M1 마크로파지가 증가한 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체 등의 면역항암제와 병용으로 처리하였을 때에 M1 마크로파지로의 분화를 효과적으로 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.

[393] **실험예 7.4. 생체내에서의 CD8+ T 세포 면역 촉진 효과 확인**

[394] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 마우스 종양 모델에서 CD8+ T 세포 면역을 촉진하는지 확인하기 위하여, 실험예 7.1과 동일한 방법으로 실험한 25일차 마우스를 안락사시킨 후, 1% PFA를 마우스에 혈관내 주입하여 관류시킨 후, 암 조직을 획득하였다. 획득된 암 조직을 1% PFA를 이용하여 고정시키고, 순차적으로 10%, 20%, 30% 수크로즈 용액으로 탈수하였다. 탈수된 암 조직을 OCT 컴파운드에서 냉동시킨 후 냉동조직절편기를 이용하여 암 조직을 50 μ m 두께의 절편으로 만들었다. 이어서, CD8+ 및 iNOS로 염색하였다.

[395] 도 38에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 항체를 처리한 실험군에서는 CD8+ T 세포가 대조군과 비교하여 일부 증가되었으나, 항-CD300c 단클론 항체를 처리한 실험군에서는 CD8+ T 세포가 현저히 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1 항체를 병용 투여한 실험군의 경우, CD8+ T 세포가 항-PD-1 단독 처리군보다 더 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, 항-CD300c 단클론 항체가 기존 면역항암제와 병용된 경우 CD8+ T 세포의 수를 더욱 효과적으로 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[396] **실험예 7.5. 생체내 면역 세포 활성의 증가 효과 확인**

[397] 항-CD300c 단클론 항체를 면역항암제와 병용투여하였을 때 면역 세포들의 활성이 증가하는지 확인하기 위해 실험예 7.1과 동일한 방법으로 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1, 항-CTLA-4, 항-KIR, 항-LAG3, 항-CD137, 항-OX40, 항-CD276, 항-CD27, 항-GITR, 항-TIM3, 항-41BB, 항-CD226, 항-CD40, 항-CD70, 항-ICOS, 항-CD40L, 항-BTLA, 항-TCR, 항-TIGIT, 항-CD47 항체를 병용 투여한 마우스의 비장을 수득하였다. 수득된 비장을 실험예 7.2에 설명된 바와 같이 T 세포의 활성화도 및 NKT 세포의 활성도를 알아볼 수 있는 다양한 마커들로 FACS 염색하고, MFI를 통해 확인하였다.

[398] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체를 위의 면역항암제와 병용 투여하였을 때 T 세포의 활성화 마커인 Gzma, Icos, CD69, Ifng가 증가하였고, 또한 NKT 세포의 활성화 마커인 Cd11, CD38, cxcr6가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 이로부터, 항-CD300c를 단독으로 처리하였을 때보다 면역항암제와 병용으로 처리하였을 때에 T 세포 및 NKT 세포가 더욱 활성화된 것으로 확인되었다.

[399] **실험예 7.6. 생체내 Treg 억제 효과 확인**

[400] 고형암 모델에서 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4, 항-KIR, 항-LAG3, 항-CD137, 항-OX40, 항-CD276, 항-CD27, 항-GITR, 항-TIM3, 항-41BB, 항-CD226, 항-CD40, 항-CD70, 항-ICOS, 항-CD40L, 항-BTLA, 항-TCR,

항-TIGIT, 항-CD47 항체 등의 면역 항암제를 병용으로 투여하였을 때 면역을 억제하는 반응을 일으키는 Treg 세포의 양상 변화를 확인하기 위하여 실험예 7.2와 동일한 방법으로 준비한 비장 조직으로부터 T 세포를 추출하여 CD3+ T 세포 중 FOXP3를 발현하는 Treg의 수를 FACS 염색을 통해 확인해보았다.

[401] CD3+ 세포에서 Treg의 비율을 보았을 때, 각 면역 항암제를 단독으로 투여했을 때보다 항-CD300c 단클론 항체와 병용으로 투여했을 때 Treg의 비율이 현저히 감소한 것으로 확인되었고, 이로부터 암세포를 공격하는 T 세포의 활성화가 유도됨을 알 수 있었다.

[402] 실험예 8. 병용에 의한 생체내 항암 효과의 (상승적) 증가 확인(흑색종 마우스 모델)

[403] 실험예 8.1. 생체내 암 성장 억제 효과 확인

[404] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7이 CT26 대장암 마우스 모델 외에 추가로 다른 암종에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여, 흑색종 마우스 모델로 추가 실험을 진행하였다. 8주령 수컷 C57BL/6 마우스에 B16F10 흑색종 세포 7×10^5 개를 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF 시설에서 진행하였다. 흑색종 세포주를 이식한 후 8일차에, 종양 크기가 50 내지 100 mm³인 마우스에 CL7 25 mg/kg, α -PD-1 10 mg/kg, α -CTLA4 4 mg/kg을 복강내 주사하였다. 개략적인 실험 방법을 도 39에 나타내었다. 보다 자세하게는, 1주일에 2회씩 2주간 총 4회에 걸쳐 항-CD300c 단클론 항체, 항-PD-1 항체, 항-CD300c 단클론 항체 + 항-PD-1 항체(Combo), 및 항-CD300c 단클론 항체 + 항-PD-1 항체 + 항-CTLA-4 항체(Triple)를 각각 마우스에 주사하고, 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 항-CD300c 단클론 항체와 동량으로 주사하였다. 20일간 암의 크기를 측정하였다.

[405] 그 결과, 도 40에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 단독 투여에 의해서도 암 성장이 억제되지만, 항-CD300c 단클론 항체를 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체와 병용 투여한 군에서 암 성장이 더욱 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[406] 실험예 8.2. 세포독성 T 세포의 증가 확인

[407] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7과 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체의 병용이 B16F10 흑색종 모델에서 CD8+ T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 8.1에서와 같이 마우스 종양 모델을 제작하여 동일한 농도로 각 시험 물질들을 주사하였다.

[408] 군당 각각 마우스 6 마리에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 μ m 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen)항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액 및 CD8+ 항체 및 CD4+ 항체로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포

분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[409] 그 결과, 도 41에 도시된 바와 같이, CT26 암종 모델에서와 마찬가지로(실험예 3.3) 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여(D군 및 T군)에 의해 B16F10 흑색종 모델에서도 CD8+ T 세포의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 여기서, D군은 CL7과 항-PD-1 항체의 병용을 나타내고, T군은 CL7, 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체의 병용을 나타낸다.

[410] 실험예 8.3. 조절 T 세포 대비 세포독성 T 세포의 증가 확인

[411] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7과 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체의 병용이 B16F10 흑색종 모델에서 조절 T 세포에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 8.1에서와 같이 마우스 종양 모델을 제작하여 동일한 농도로 각 시험 물질들을 주사하였다. 실험군은 (i) CL7 투여군, (ii) 항-PD-1 투여군, (iii) CL7 및 항-PD-1 투여군(D군), 및 (iv) CL7, 항-PD-1 항체 및 항-CTLA4 항체 투여군(T군)이다.

[412] 군당 각각 마우스 6 마리에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen)항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액, Treg 마커 단백질인 CD25와 Foxp3에 대한 항체, CD3+ 항체 및 CD8+ 항체로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

[413] 그 결과, 도 42에 도시된 바와 같이, CT26 암종 모델에서와 마찬가지로(실험예 3.6) 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여(D군 및 T군)에 의해 B16F10 흑색종 모델에서도 CD8+ T 세포가 조절 T 세포 대비 증가함을 확인하였다. 여기서, D군은 CL7과 항-PD-1 항체의 병용을 나타내고, T군은 CL7, 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체의 병용을 나타낸다.

[414] 실험예 8.4. 종양 관련 마크로파지(TAM)의 증가 확인

[415] 항-CD300c 단클론 항체 CL7과 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체의 병용이 B16F10 흑색종 모델에서 마크로파지에 미치는 영향을 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 실험예 8.1에서와 같이 마우스 종양 모델을 제작하여 동일한 농도로 각 시험 물질들을 주사하였다.

[416] 군당 각각 마우스 6 마리에서 종양 조직을 채취하였다. 종양 조직을 떼어낸 후, 콜라게나제 D(20 mg/ml)와 DNase I(2 mg/ml)의 혼합 용액 중에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 70 µm 세포 스트레이너로 여과하고, 적혈구를 용해시킨 후, 나일론 메쉬로 다시 여과하였다. 그 후, 단일 세포 부유액을 CD16/32(입수처: Invitrogen) 항체로 차단하고, 세포 생존도 확인용 염색액 및 F4/80와 iNOS에 대한 항체로 세포를 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.

- [417] 그 결과, 도 43에 도시된 바와 같이, CT26 암종 모델에서와 마찬가지로(실험예 3.2) 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여(D군 및 T군)에 의해 B16F10 흑색종 모델에서도 M1 형태의 종양 관련 마크로파지의 발현량이 증가함을 확인하였다. 여기서, D군은 CL7과 항-PD-1 항체의 병용을 나타내고, T군은 CL7, 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체의 병용을 나타낸다.
- [418] 종합하면, 도 41, 도 42 및 도 43에 제시된 결과는 다음과 같은 의미를 가진다. 항-CD300c 단클론 항체인 CL7은 B16F10 흑색종 마우스 모델에서도 CT26 대장암 마우스 모델(도 14, 도 15 및 도 18)에서와 동일한 기작으로 암을 치료하므로, CL7과 면역 항암제의 병용 투여가 여러 암종에서 동일한 효과를 발휘할 것임을 예측할 수 있다.
- [419] 실험예 9. 병용 투여에 의한 대장암 마우스 모델에서의 완전 관해 현상 확인
- [420] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7과 항-PD-1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체의 병용 투여에 의한 항암 효과를 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2×10^5 개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작하였다. 동물의 사육 및 실험은 모두 SPF 시설에서 진행하였다. 대장암 세포주를 이식한 후 11일차(D11)에, 종양 크기가 50 내지 100 mm³인 마우스에 항-CD300c 단클론 항체와 각 BioXcell에서 구매한 항-PD-1 항체 및 항-CTLA-4 항체를 단독 또는 병용하여 투여하고, 대조군으로는 인산염완충용액(PBS)을 CL7과 동량으로 주사하였다. 구체적으로, D11, D14 및 D18에 마우스에 복강내 주사로 각각의 항체를 단독으로 또는 병용하여 주사하고(CL7: 25 mg/kg; 항-PD-1 항체: 10 mg/kg; 항-CTLA-4 항체: 4 mg/kg), 종양 부피를 측정하였다.
- [421] 그 결과, 도 44a에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독 투여한 실험군에서도 대조군과 비교하여 암의 성장이 억제되었지만, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-CTLA-4 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 암의 성장이 더욱 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 특히, CL7 + α PD-1 + α CTLA-4의 삼중 병용 투여의 경우 종양 크기가 90%까지 감소하였다.
- [422] 또한, 도 44b에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 항-PD-1 항체와 병용 투여하였을 때 50%의 완전 관해(CR)가 달성되었고, 항-CTLA-4 항체까지 삼중으로 병용 투여하였을 때 70%의 완전 관해(complete remission, CR)가 달성되었으며, 이는 병용 투여가 우수한 항암 효과를 가져옴을 확인해준다.
- [423] 실험예 10. 병용 투여에 의한 장기 생존율 향상 효과 확인
- [424] 실험예 9에서 실험된 마우스들의 장기 생존율을 확인하였다. 그 결과, 도 45에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체를 단독으로 처리하였을 때보다 항-PD-1 항체, 항-CTLA-4 항체 등의 면역 항암제와 병용으로 처리하였을 때에 장기 생존율이 또한 향상됨을 확인하였다.
- [425] 실험예 11. 병용 투여에 의한 암 재발 방지 효과 확인

- [426] 항-CD300c 단클론 항체인 CL7과 면역 항암제의 병용 투여에 의한 암 재발 방지 효과를 생체내 조건에서 확인하기 위하여, 대장암 세포주(CT26) 2x10⁵개를 8주령 BALB/c 마우스에 피하 주사로 이식하여 동종이식 마우스 종양 모델을 제작한 후, 실험예 9에 설명된 바와 같이 실험을 진행하여 완전 관해가 일어난 마우스를 얻었다. 이렇게 얻은 마우스에 대장암 세포주(CT26) 2x10⁵개를 다시 이식하고(Re-challenge), 30일 동안 관찰하였다.
- [427] 그 결과, 도 46에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 투여에 의해 완전 관해가 일어난 군에서는 암의 재발이나 전이가 일어나지 않는 것을 확인하였다. 이는 항-CD300c 단클론 항체와 항-PD-1 항체의 병용 투여(CL7 + α PD-1; Combi) 또는 이에 항-CTLA-4 항체까지 더해진 삼중 병용 투여(CL7 + α PD-1 + α CTLA-4; Triple)를 통해 완전 관해가 일어난 개체는 지속적인 면역 기억을 통해 전신 방어 면역 반응을 나타냄으로써 암의 재발이나 전이를 억제할 것으로 예측하게 하였다.
- [428] 실험예 12. 병용 투여에 의한 면역 기억 효과 확인
- [429] 실험예 11에서 완전 관해가 일어난 마우스에서 효과기 기억 T 세포를 분석하기 위하여, 마우스를 희생시켜 비장을 채취하였다. 이어서, 비장세포를 얻고, 이를 T 세포 활성화와 관련된 마커인 CD44와 CD62L에 대한 항체(입수처: Invitrogen)로 염색하였다. 그 후, CytoFLEX 유세포 분석기로 데이터를 읽고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다.
- [430] 그 결과, 도 47에 도시된 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체와 면역 항암제의 병용 처리 시 효과기 기억 T 세포가 유의하게 증가함을 확인하였다. 이는 실험예 11에서 예측한 바와 같이 완전 관해가 일어난 마우스는 CL7과 항-PD-1 항체의 병용 투여(Combi) 또는 이에 항-CTLA-4 항체까지 더해진 삼중 병용 투여(Triple) 시 증가된 효과기 기억 T 세포를 통해 면역 기억을 갖게 되어 추가적으로 암세포가 생기더라도 그 성장을 억제함을 나타낸다.
- [431] 실시예 4. 항-CD300c 단클론 항체(CL10, SL18)와 면역 항암제의 병용 투여
- [432] 실시예 1에서 제조된 항-CD300c 단클론 항체(CL10, SL18)를 다른 면역항암제, 예를 들어 항-PD-L1 항체인 임핀지, 항-PD-1 항체인 키트루다와 병용하여 그 결과를 관찰하였다.
- [433] 상기 면역 항암제 각각의 입수처는 다음과 같다: 임핀지(AstraZeneca) 및 키트루다(Merck Sharp & Dohme).
- [434] 실험예 14. M1 마크로파지 분화능의 증가 확인
- [435] 항-CD300c 단클론 항체인 CL10 또는 SL18이 마크로파지에서 M1 마크로파지로의 분화를 촉진시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 96-웰 플레이트에 1x10⁴ 세포/웰의 THP-1 세포를 분주한 후에, 10 μ g/mL의 CL10 또는 SL18을 처리하였다. 또한, CL10 또는 SL18과 면역 항암제의 병용 처리에 따른 효과를 확인하기 위하여, 상기 항-CD300c 단클론 항체를 10 μ g/mL의 임핀지 및/또는 키트루다와 함께 처리하였다. 그 후 CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안

인큐베이션시킨 후에, M1 마크로파지의 분화 마커인 TNF- α 의 생성량을 ELISA 키트(Human TNF- α Quantikine kit, R&D Systems)로 확인하였다. 그 결과를 도 48a(CL10 병용) 및 도 48b(SL18 병용)에 나타내었다.

- [436] 도 48a 및 도 48b에 도시된 바와 같이, THP-1 세포에 CL10 또는 SL18을 단독으로 처리했을 때보다 임핀지 또는 키트루다와 병용으로 처리하였을 때 TNF- α 의 발현량이 증가한 것으로 확인되었다. 특히, CL10 또는 SL18을 임핀지 및 키트루다 두 항체와 한꺼번에 병용 투여하였을 때 TNF- α 의 발현량이 가장 높은 것으로 확인되었다.
- [437] **실험예 15. 암세포 성장 억제 효과 확인**
- [438] 항-CD300c 단클론 항체인 CL10 또는 SL18과 면역 항암제의 병용 투여에 의한 암 세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주) 세포를 이용하여 세포 성장 억제 효과를 비교하였다. 구체적으로, 96-웰 플레이트에 FBS가 없는 조건에서는 2×10^4 세포를 분주하였고, 0.1% FBS 조건에서는 6×10^3 세포를 분주하였다. 이어서, CL10 또는 SL18을 단독으로 또는 임핀지 및/또는 키트루다 와 병용으로 각각 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 5 일 동안 배양하였다. 이어서 CCK-8(DOJINDO)을 웰당 30 μL 씩 처리하고, CO₂ 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이션하면서 1시간 마다 O.D 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 49a(CL10 병용) 및 도 49b(SL18 병용)에 나타내었다.
- [439] 도 49a 및 도 49b에 도시된 바와 같이, 0.1% FBS 조건에서 A549 세포에 CL10 또는 SL18을 단독으로 처리하였을 때보다 임핀지 또는 키트루다와 병용으로 처리하였을 때 암세포 증식 억제 효과가 더 증가했고, CL10 또는 SL18을 임핀지 및 키트루다 두 항체와 한꺼번에 병용 투여하였을 때 암세포 증식 억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다.
- [440] 상기 실험예 14와 본 실험예를 통해 알 수 있는 바와 같이, CL10 및 SL18을 비롯한 실시예 1에서 제조된 나머지 항-CD300c 단클론 항체들도 CL7과 동일한 작용 기전을 통해 효능을 나타내며, CL7과 마찬가지로 그 효능이 면역 항암제와의 병용 투여에 의해 증가하였다.
- [441] **IV. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제의 병용**
- [442] **실시예 5. 병용 투여를 위한 각 항암제의 적정 농도 결정**
- [443] **실시예 5.1. 소라페닙(Sorafenib)**
- [444] 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제인 소라페닙의 병용 처리가 암세포 성장을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여, 일차적으로 소라페닙의 처리 농도를 선정하였다. 우선, 소라페닙을 다이메틸 설펍사이드에 용해하였다. 96 웰 플레이트에 A549 세포를, 0% FBS 배지 조건과 0.1% FBS 배지 조건에서 웰 당 20,000개 세포가 되도록 접종한 후에, 소라페닙의 농도를 높게는 180 μM 부터 낮게는 0.02 μM 까지 단계 희석하여 처리하고 5일간 배양하였다. 배양 이후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고 4시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 50에 나타내었다.

- [445] 도 50에 도시된 바와 같이, 소라페닙은 농도 의존적으로 암세포 성장 억제 효과를 보였고, 이에 항-CD300c와 소라페닙의 병용 처리를 위한 최적 처리 농도를 0% FBS 배지 조건에서 9 μM 로 선정하였다.
- [446] 실시예 5.2. 젬시타빈(Gemcitabine)
- [447] 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제인 젬시타빈의 병용 처리가 암세포 성장을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여, 일차적으로 젬시타빈의 처리 농도를 선정하였다. 우선, 젬시타빈을 다이메틸 설펍사이드에 용해하였다. 96 웰 플레이트에 A549 세포를, 0% FBS 배지 조건과 0.1% FBS 배지 조건에서 웰 당 20,000개 세포가 되도록 접종한 후에, 젬시타빈의 농도를 높게는 450 μM 부터 낮게는 0.07 μM 까지 단계 희석하여 처리하고 5일간 배양하였다. 배양 이후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고, 4 시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 51에 나타내었다.
- [448] 도 51에 도시된 바와 같이, 젬시타빈의 농도 의존적으로 암세포 성장 억제 효과를 보였고, 이에 항-CD300c와 젬시타빈의 병용 처리를 위한 최적 처리 농도를 0% FBS 배지 조건에서 1.9 μM 로 선정하였다.
- [449] 실시예 5.3. 파클리탁셀(Paclitaxel)
- [450] 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제인 파클리탁셀의 병용 처리가 암세포 성장을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여, 일차적으로 파클리탁셀의 처리 농도를 선정하였다. 우선, 파클리탁셀을 3차 증류수에 용해하였다. 96 웰 플레이트에 A549 세포를, 0% FBS 배지 조건과 0.1% FBS 배지 조건에서 웰 당 20,000개 세포가 되도록 접종한 후에, 파클리탁셀의 농도를 높게는 225 nM부터 낮게는 0.02 nM까지 단계 희석하여 처리하고 5일간 배양하였다. 배양 이후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고 4 시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 52에 나타내었다.
- [451] 도 52에 도시된 바와 같이, 파클리탁셀의 농도 의존적으로 암세포 성장 억제 효과를 보였고, 이에 항-CD300c와 파클리탁셀의 병용 처리를 위한 최적 처리 농도를 0% FBS 배지 조건에서 5 nM로 선정하였다.
- [452] 실험예 16. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제 병용에 의한 항암 효과(*in vitro*)
- [453] 실험예 16.1. 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙 병용 처리에 의한 암세포 성장 억제 효과 확인
- [454] 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙 병용 처리 시, 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주)를 이용하여 세포 증식 분석을 실시하였다. 96-웰 플레이트에 20,000개의 암세포를 접종하고 항-CD300c 단클론 항체 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 소라페닙 9 μM 을 병용 처리하고 5일 동안 배양하였다. 배양 이후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고 4 시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 53에 나타내었다.
- [455] 도 53으로부터 알 수 있는 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 단독 처리는

32%, 소라페닙의 단독 처리는 45%의 암세포 성장 억제율을 나타낸 반면, 병용 처리는 77%의 더 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다.

[456] 실험예 16.2. 항-CD300c 단클론 항체와 켄시타빈 병용 처리의 암세포 성장 억제 효과 확인

[457] 항-CD300c 단클론 항체와 켄시타빈 병용 처리 시, 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주)를 이용하여 세포 증식 분석을 실시하였다. 위와 동일한 방법으로, 켄시타빈 1.9 μM 을 병용 처리하고 5일 동안 배양 후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고 4 시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 54에 나타내었다.

[458] 도 54로부터 알 수 있는 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 단독 처리는 29%, 켄시타빈의 단독 처리는 38%의 암세포 성장 억제율을 나타낸 반면, 병용 처리는 57%의 더 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다.

[459] 실험예 16.3. 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀 병용 처리의 암세포 성장 억제 효과 확인

[460] 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀 병용 처리 시, 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, A549(인간 폐암 세포주)를 이용하여 세포 증식 분석을 실시하였다. 위와 동일한 방법으로, 파클리탁셀 95 nM을 병용 처리하고 5일 동안 배양하였다. 그 후, 각각의 웰에 CCK-8(DOJINDO)을 10 μL 씩 첨가하고, 4 시간 동안 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 55에 나타내었다.

[461] 도 55로부터 알 수 있는 바와 같이, 항-CD300c 단클론 항체의 단독 처리는 29%, 파클리탁셀의 단독 처리는 24%의 암세포 성장 억제율을 나타낸 반면, 병용 처리는 39%의 더 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다.

[462] 실험예 17. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제 병용 처리의 암세포 세포자멸사 저항능력 억제

[463] 실험예 17.1. 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙 병용 처리의 암세포 세포자멸사 저항능력 억제 효과 확인

[464] 항-CD300c 단클론 항체와 화학항암제의 병용 처리가 암 세포의 세포자멸사(apoptosis)에 저항하는 능력을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 각각의 암세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 개씩 접종하고 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제를 8시간 동안 병용 처리한 후에, 라파마이신(rapamycin)을 48시간 동안 처리하고, 암 세포의 생존 정도를 아넥신 V와 프로피디움 요오다이드(I)를 이용하여 형광 분석으로 확인하였다.

[465] 그 결과, hIgG1 아이소타입 대조군 대비, MFI의 증가폭이 항-CD300c 단클론

항체 단독 처리군의 경우 17%, 소라페닙 단독 처리군의 경우 21%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 60%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서 암세포의 세포자멸사 저항능력을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[466] 실험예 17.2. 항-CD300c 단클론 항체와 켈시타빈 병용 처리의 암세포 세포자멸사 저항능력 억제 효과 확인

[467] 항-CD300c 단클론 항체와 켈시타빈의 병용 처리가 암 세포의 세포자멸사에 저항하는 능력을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 각각의 암세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 개씩 접종하고 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 항-CD300c 단클론 항체와 켈시타빈을 8시간 동안 병용 처리한 후에, 라파마이신을 48시간 동안 처리하고, 암 세포의 생존 정도를 아넥신 V와 프로피디움 요오다이드(PI)를 이용하여 형광 분석으로 확인하였다.

[468] 그 결과, hIgG1 아이소타입 대조군 대비, MFI의 증가폭이 항-CD300c 단클론 항체 단독 처리군의 경우 14%, 켈시타빈 단독 처리군의 경우 29%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 52%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서 암세포의 세포자멸사 저항능력을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[469] 실험예 17.3. 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀 병용 처리의 암세포 세포자멸사 저항능력 억제 효과 확인

[470] 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀의 병용 처리가 암 세포의 세포자멸사에 저항하는 능력을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 각각의 암세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 개씩 접종하고 16시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀을 8시간 동안 병용 처리한 후에, 라파마이신을 48시간 동안 처리하고, 암 세포의 생존 정도를 아넥신 V와 프로피디움 요오다이드(PI)를 이용하여 형광 분석으로 확인하였다.

[471] 그 결과, hIgG1 아이소타입 대조군 대비 MFI의 증가폭이 항-CD300c 단클론 항체 단독 처리군의 경우 16%, 파클리탁셀 단독 처리군의 경우 19%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 49%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서의 암세포의 세포자멸사 저항능력을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[472] 실험예 18. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제 병용 처리에 의한 암세포 이동/침입 억제

[473] 실험예 18.1. 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과 확인

[474] 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과를

확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 6-웰 플레이트에 1×10^5 개의 암 세포를 접종하고 16시간 동안 배양한 후에, 피펫 팁으로 긁어 상처를 생성하였다. 탈착된 세포를 배지로 세척하여 제거한 후에, 항-CD300c 단클론 항체를 8시간 동안 처리하였다. 그 후, 24시간 동안 관찰하였다. 피펫 팁으로 긁어 형성된 상처의 면적을 기초로 하여, 암 세포가 이동한 거리를 측정하였으며, 이를 백분율(%)로 계산하여 이동 억제 정도를 확인하였다.

[475] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체 단독 처리군의 경우 27%, 소라페닙 단독 처리군의 경우 32%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 67%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서 암세포 이동 및 침입을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[476] **실험예 18.2. 항-CD300c 단클론 항체와 켄시타빈 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과 확인**

[477] 항-CD300c 단클론 항체와 켄시타빈 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과를 확인하기 위하여, MKN45, IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 6-웰 플레이트에 1×10^5 개의 암 세포를 접종하고, 16시간 동안 배양한 후에, 피펫 팁으로 긁어 상처를 생성하였다. 탈착된 세포를 배지로 세척하여 제거한 후에, 항-CD300c 단클론 항체를 8시간 동안 처리하였다. 그 후, 24시간 동안 관찰하였다. 피펫 팁으로 긁어 형성된 상처의 면적을 기초로 하여, 암 세포가 이동한 거리를 측정하였으며, 이를 백분율(%)로 계산하여 이동 억제 정도를 확인하였다.

[478] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체 단독 처리군의 경우 25%, 켄시타빈의 단독 처리군의 경우 28%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 60%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서의 암세포 이동 및 침입을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[479] **실험예 18.3. 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과 확인**

[480] 항-CD300c 단클론 항체와 파클리탁셀 병용 처리의 암세포 이동/침입 억제 효과를 확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 6-웰 플레이트에 1×10^5 개의 암 세포를 접종하고 16시간 동안 배양한 후에, 피펫 팁으로 긁어 상처를 생성하였다. 탈착된 세포를 배지로 세척하여 제거한 후에, 항-CD300c 단클론 항체를 8시간 동안 처리하였다. 그 후,

24시간 동안 관찰하였다. 피펫 팁으로 긁어 형성된 상처의 면적을 기초로 하여, 암 세포가 이동한 거리를 측정하였으며, 이를 백분율(%)로 계산하여 이동 억제 정도를 확인하였다.

[481] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체 단독 처리군의 경우 25%, 파클리탁셀 단독 처리군의 경우 20%를 보인 반면, 병용 처리군의 경우 57%를 보이므로 대장암, 폐암, 유방암 등 다양한 세포주에서 암세포 이동 및 침입을 현저하게 억제함을 확인하였다.

[482] **실험예 19. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제 병용 처리의 암세포 성장 신호전달 억제 효과 확인**

[483] 암세포의 성장에 영향을 미치는 신호전달 기작에 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제인 소라페닙, 켄시타빈 및 파클리탁셀 각각의 병용 처리가 미치는 영향을 확인하기 위하여, MKN45(인간 위암 세포주), IM95(인간 위암 세포주), HT-29(인간 대장암 세포주), A549(인간 폐암 세포주), HCT116(인간 대장암 세포주), MDA-MB-231(인간 유방암 세포주), HepG2(인간 간암 세포주)를 이용하여 확인하였다. 각각의 암 세포주에 항-CD300c 단클론 항체와 각각의 화학 항암제를 병용 처리하고, 다운스트림 신호전달의 활성화 기작인 AKT, MAPKs의 인산화 과정을 확인하였다.

[484] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체 또는 각각의 화학 항암제를 단독처리한 암세포보다, 항-CD300c 단클론 항체와 각각의 화학 항암제를 병용 처리한 암세포에서 AKT, MAPKs 단백질의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며, 이는 항-CD300c 단클론 항체와 소라페닙, 켄시타빈, 파클리탁셀 각각의 병용 처리가 암세포의 성장 신호전달 기전을 효과적으로 억제하여 암세포의 성장을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[485] **실험예 20. 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제 병용 처리의 마우스에서의 항암 효과 확인**

[486] 항-CD300c 단클론 항체와 화학 항암제의 병용투여 시, 항암효과를 생체내 조건에서 확인하기 위하여, CT26(마우스 대장암 세포주) 1×10^6 개를 인간화 마우스 모델(huCD34-NSG 마우스)에 피하 주사로 투여하여 인간 고형암 이종 모델을 제작하였다. 암세포 투여 3일 이후부터 항-CD300c 단클론 항체 25 mg/kg 단독 투여군, 화학 항암제인 소라페닙, 켄시타빈, 파클리탁셀 각각의 10 mg/kg 투여군, 항-CD300c 단클론 항체와 각각의 화학 항암제의 병용 투여군, 및 비투여군으로 나누고, 항-CD300c 단클론 항체와 각각의 화학 항암제를 주 2회로 단독 혹은 병용으로 총 4회 복강 투여한 후, 고형암 조직을 마우스로부터 분리하여 크기를 측정해 항-CD300c 단클론 항체 단독의 치료 효과 및 기존 화학 항암제와의 병용 투여의 효과를 확인하였다.

[487] 그 결과, 항-CD300c 단클론 항체 단독 투여군의 경우 26%, 화학 항암제 단독 투여군의 경우에는 소라페닙이 22%, 켄시타빈이 25%, 파클리탁셀이 21%의 종양 억제율을 보인 반면, 병용 투여군의 경우 각각 50%, 52%, 61%로 높은 종양

억제율을 보여 병용 투여에 의한 우수한 암세포 사멸능을 확인하였다. 해당 결과는 일원 분산분석(One-way ANOVA) 분석을 통해 p-값이 0.05 이하로 확인되었으며, 이는 단독 처리군 대비 각 병용 처리군의 종양 크기의 감소가 유의미함을 나타낸다.

[488] 상기 결과로부터, 본 발명의 항-CD300c 단클론 항체는 소라페닙, 켈시타빈, 파클리탁셀 각각의 화학 항암제와 병용되는 경우 유리한 효과를 나타냄을 알 수 있으므로, 이러한 병용이 다양한 개체에 적용될 수 있음을 확인하였다. 즉, 항-CD300c 단클론 항체 또는 각각의 화학 항암제의 단독 처리보다 각각의 병용 처리가 암세포의 성장, 증식 및 전이 등을 효과적으로 억제할 수 있음이 시험관내 및 생체내 모두에서 확인되었는 바, 이는 기존의 화학 항암제와의 병용 처리되는 경우에 항-CD300c 단클론 항체의 치료 효과가 더욱 높아져서 CD300c 항원을 발현하는 다양한 암의 항암 면역치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[489] 통계 처리

[490] 실험을 통해 얻어진 결과는 일원 분산분석에 이은 Bonferroni 사후 검정을 이용하여 실험 그룹간 비교 분석을 수행하였으며, p값이 0.05 이하일 때 그룹간의 차이가 유의미하였다.

청구범위

- [청구항 1] 항-CD300c(CD300 antigen-like family member C) 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 추가 항암제는 면역 항암제, 화학 항암제 또는 이들의 조합을 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은
(i) 서열번호 7, 서열번호 19, 서열번호 31, 서열번호 43, 서열번호 55, 서열번호 67, 서열번호 79, 서열번호 91, 서열번호 103, 서열번호 115, 서열번호 127, 서열번호 139, 서열번호 151, 서열번호 163, 서열번호 175, 서열번호 187, 서열번호 199, 서열번호 211, 서열번호 223, 서열번호 235, 서열번호 247, 서열번호 259, 서열번호 271, 서열번호 283 및 서열번호 295로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 8, 서열번호 20, 서열번호 32, 서열번호 44, 서열번호 56, 서열번호 68, 서열번호 80, 서열번호 92, 서열번호 104, 서열번호 116, 서열번호 128, 서열번호 140, 서열번호 152, 서열번호 164, 서열번호 176, 서열번호 188, 서열번호 200, 서열번호 212, 서열번호 224, 서열번호 236, 서열번호 248, 서열번호 260, 서열번호 272, 서열번호 284 및 서열번호 296으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열번호 9, 서열번호 21, 서열번호 33, 서열번호 45, 서열번호 57, 서열번호 69, 서열번호 81, 서열번호 93, 서열번호 105, 서열번호 117, 서열번호 129, 서열번호 141, 서열번호 153, 서열번호 165, 서열번호 177, 서열번호 189, 서열번호 201, 서열번호 213, 서열번호 225, 서열번호 237, 서열번호 249, 서열번호 261, 서열번호 273, 서열번호 285 및 서열번호 297로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
(ii) 서열번호 10, 서열번호 22, 서열번호 34, 서열번호 46, 서열번호 58, 서열번호 70, 서열번호 82, 서열번호 94, 서열번호 106, 서열번호 118, 서열번호 130, 서열번호 142, 서열번호 154, 서열번호 166, 서열번호 178, 서열번호 190, 서열번호 202, 서열번호 214, 서열번호 226, 서열번호 238, 서열번호 250, 서열번호 262, 서열번호 274, 서열번호 286 및 서열번호 298로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열번호 11, 서열번호 23, 서열번호 35, 서열번호 47, 서열번호 59,

서열번호 71, 서열번호 83, 서열번호 95, 서열번호 107, 서열번호 119, 서열번호 131, 서열번호 143, 서열번호 155, 서열번호 167, 서열번호 179, 서열번호 191, 서열번호 203, 서열번호 215, 서열번호 227, 서열번호 239, 서열번호 251, 서열번호 263, 서열번호 275, 서열번호 287 및 서열번호 299로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2;

및
서열번호 12, 서열번호 24, 서열번호 36, 서열번호 48, 서열번호 60, 서열번호 72, 서열번호 84, 서열번호 96, 서열번호 108, 서열번호 120, 서열번호 132, 서열번호 144, 서열번호 156, 서열번호 168, 서열번호 180, 서열번호 192, 서열번호 204, 서열번호 216, 서열번호 228, 서열번호 240, 서열번호 252, 서열번호 264, 서열번호 276, 서열번호 288 및 서열번호 300으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는
약학 조성물.

[청구항 4]

제1항에 있어서,

상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

(i) 서열번호 79, 서열번호 115 및 서열번호 211로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;

서열번호 80, 서열번호 116 및 서열번호 212로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및

서열번호 81, 서열번호 117 및 서열번호 213으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
및

(ii) 서열번호 82, 서열번호 118 및 서열번호 214로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;

서열번호 83, 서열번호 119 및 서열번호 215로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및

서열번호 84, 서열번호 120 및 서열번호 216으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는

약학 조성물.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

서열번호 79로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 80로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 81로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

서열번호 82로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 83으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 84로

표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편;
 서열번호 115로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 116으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 117로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 118로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 119로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 120으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편; 및
 서열번호 211로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 212로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 213으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 214로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 215로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 216으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로부터 선택되는
 약학 조성물.

[청구항 6]

제1항에 있어서,
 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은
 서열번호 79로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 80으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 81로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 82로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열번호 83으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열번호 84로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는
 약학 조성물.

[청구항 7]

제1항에 있어서,
 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 327의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 328의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는
 약학 조성물.

[청구항 8]

제1항에 있어서,
 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중간 교차 반응성을 갖는
 약학 조성물.

[청구항 9]

제1항에 있어서,
 상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편은,

아래 식 (1) 내지 (3)으로 각각 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
아래 식 (4) 내지 (6)으로 각각 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 내지 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는
항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

FTFX1X2X3X4MX5WVR (1)

상기 식에서,

X1= G 또는 S

X2= S, R 또는 D

X3= N 또는 Y

X4= Y, A, G 또는 H

X5= S 또는 H

X1ISX2SGX3X4TYYAX5 (2)

상기 식에서,

X1= T 또는 A

X2= G 또는 S

X3= T 또는 G

X4= S 또는 Y

X5= D 또는 E

YCAX1X2X3X4X5X6X7X8X9W (3)

상기 식에서,

X1= R 또는 S

X2= G 또는 S

X3= M, S, Y 또는 I

X4= W, Q, G 또는 R

X5= G 또는 L

X6= M, I 또는 P

X7= D, F 또는 L

X8= V 또는 D

X9= I, Y 또는 존재하지 않음

CX1X2X3X4X5X6X7X8X9X10X11VX12W (4)

상기 식에서,

X1= T 또는 S

X2= G 또는 R

X3= K, N 또는 S

X4= H, N 또는 S

X5= R, I 또는 G

X6= H, G 또는 I

X7= T, I 또는 S
 X8= R, A, K, 또는 존재하지 않음
 X9= R, S, G, 또는 존재하지 않음
 X10= N 또는 존재하지 않음
 X11= Y 또는 존재하지 않음
 X12= N, H 또는 Q
 X1X2X3X4RPSGVX5 (5)
 상기 식에서,
 X1= L, S, R 또는 E
 X2= D, K 또는 N
 X3= S 또는 N
 X4= E, N, Q 또는 K
 X5= P 또는 R
 YCX1X2X3X4X5X6X7X8X9X10VF (6)
 상기 식에서,
 X1= Q, A, 또는 S
 X2= S 또는 A
 X3= Y 또는 W
 X4= D 또는 A
 X5= S, D 또는 G
 X6= S, N 또는 T
 X7= S, L, N 또는 K
 X8= V, S, N 또는 G
 X9= G, L, V 또는 존재하지 않음
 X10= P 또는 존재하지 않음.

- [청구항 10] 제2항에 있어서,
 상기 면역 항암제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-CD47 항체, 항-KIR 항체, 항-LAG3 항체, 항-CD137 항체, 항-OX40 항체, 항-CD276 항체, 항-CD27 항체, 항-GITR 항체, 항-TIM3 항체, 항-41BB 항체, 항-CD226 항체, 항-CD40 항체, 항-CD70 항체, 항-ICOS 항체, 항-CD40L 항체, 항-BTLA 항체, 항-TCR 항체 및 항-TIGIT 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 11] 제2항에 있어서,
 상기 면역 항암제는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-CTLA-4 및 항-CD47 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서,

상기 면역 항암제는 더발루맙, 펌브롤리주맙, 니볼루맙, α CD47, 및 이필리무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 13] 제2항에 있어서,
상기 화학 항암제는 미세소관 조립 억제제, DNA 인터칼레이터(intercalator) 또는 복제 억제제, 멀티키나제(multikinase) 억제제, 및 혈관형성 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 14] 제2항에 있어서,
상기 화학 항암제는 독소루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 비노렐빈, 에스트라무스틴 포스페이트(EMP), NAB-파클리탁셀(아브락산), 시클로포스파미드, 에피루비신, 5-플루오로우라실, 에토포사이드, 이포스파미드, 쯤시타빈, 데옥시아데노신, 클라드리빈, 클로파라빈, 플루다라빈, 펜토스타틴, 데옥시시티딘, 시토신 아라비노사이드(ara-C), 5-아자-2'-데옥시시티딘(데시타빈), 테자시타빈, 카페시타빈, 시타라빈, 메토트렉세이트, 페메트렉세드, 메르캅토피린, 닥티노마이신, 다우노루비신, 미토마이신, 블레오마이신, 이다루비신, 미톡산트론 HCL, 메클로레타민, 멜팔란, 클로람부실, 티오테파, 알트레타민, 프로카바진, 부설판, 스트렙토조토신, 카르무스틴, 로무스틴, 다카르바진(DTI), 클로람부실, 토포테칸, 이리노테칸, 데모졸로마이드, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 소라페닙, 레고라페닙, 바탈라닙, 악시티닙, 마시티닙, 파조파닙, 수니티닙, 토세라닙, 세디라닙, 렌바티닙, 닌테다닙, 세막사닙, 티보자닙, 반데타닙, 및 레블리미드(레날리도마이드)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 15] 제2항에 있어서,
상기 화학 항암제는 소라페닙, 쯤시타빈 및 파클리탁셀로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암 및 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 약학 조성물.

[청구항 17] 제1항에 있어서,

- 상기 암은 고행암인
약학 조성물.
- [청구항 18] 제1항에 있어서,
상기 암은 대장암, 폐암, 흑색종, 및 유방암으로 이루어진 군으로부터
선택된 하나 이상을 포함하는
약학 조성물.
- [청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 약학 조성물은 암의 증식, 생존, 전이, 재발 또는 항암제 내성을
억제하는 것인
약학 조성물.
- [청구항 20] 제1항에 있어서,
상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 상기 추가 항암제는
각각 제제화되어 동시 또는 순차적으로 별개로 투여되는 형태인
약학 조성물.
- [청구항 21] 항-CD300c(CD300 antigen-like family member C) 항체 또는 그의 항원 결합
단편 및 하나 이상의 추가 항암제를 암의 예방 또는 치료가 필요한
대상체에 투여하는 단계를 포함하는
암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 상기 하나 이상의 추가
항암제는 동시에 투여되거나 순차적으로 투여되는
방법.
- [청구항 23] 제21항에 있어서,
상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 투여 전에, 대상체의
생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 CD300c 단백질의 발현 수준을
확인하는 단계를 추가로 포함하는
방법.
- [청구항 24] 제21항에 있어서,
상기 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받은 대상체의
생물학적 시료 또는 자료에 기초하여 하기 마커로부터 선택된 하나
이상의 마커의 발현 수준을 확인하는 단계를 추가로 포함하는
방법:
Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa,
Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf,
Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4,
IL-6, IL-13, PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr, Hvem, CD27,
CD28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a.
- [청구항 25] 제24항에 있어서,

상기 확인된 마커의 발현 수준에 기초하여 상기 추가 항암제를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

- [청구항 26] 제24항에 있어서,
상기 확인된 마커의 발현 수준에 기초하여 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [청구항 27] 제25항에 있어서,
상기 마커는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Icos, Ox40, Gitr, Hvem, CD27 및 CD28로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 방법.
- [청구항 28] 제26항에 있어서,
상기 마커는 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, IL-6, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, CD27 및 CD28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 방법.
- [청구항 29] 제28항에 있어서,
상기 마커 중 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 통계적으로 유의미하게 감소된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [청구항 30] 제28항에 있어서,
상기 마커 중 Icos, Ox40, Gitr, Hvem, CD27, CD28, Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, Gzma, Cd69, Cd1d1, Cd38 및 Cxcr6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 통계적으로 유의미하게 증가된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [청구항 31] 항-CD300c(CD300 antigen-like family member C) 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물, 및
상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 항암제의 조합 사용을 지시하는 지시서를 포함하는
암의 예방 또는 치료를 위한 키트.

- [청구항 32] 대상체로부터 수득된 생물학적 시료 또는 자료를 이용하여 치료 반응성 예측을 위한 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 상기 마커는 Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf, Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4, IL-6, IL-13, Pd-1, Pd-11, Ctl4-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr, Hvem, Cd27, Cd28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 33] 제32항에 있어서, 상기 마커는 Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Bst2, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, IL6, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, Cd27 및 Cd28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 방법.
- [청구항 34] 제32항에 있어서, 상기 마커 중 vegfa, pdgfrb, Col4a1, Hif1a 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 통계적으로 유의미하게 감소된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [청구항 35] 제32항에 있어서, 상기 마커 중 Bst2, CCL8, Xcl1, CCR7, CD80, Tbx21, Stat1, Stat4, Ifng, Cxcr3, Gzma, Icos, Cd69, Cd1d1, Cd38, Cxcr6, Ox40, Gitr, Cd27 및 Cd28로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 수준이 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 투여받지 않은 대상체와 비교하여 통계적으로 유의미하게 이상 증가된 경우에, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성이 양호 또는 우수한 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [청구항 36] 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성 예측을 위한 마커의 발현 수준을 측정하기 위한 물질을 포함하는 키트로서 상기 마커는 Bst2, Cd40, Cd70, Cd86, Ccl8, Xcl1, Ccr7, Cd80, Cd206, Msr1, Arg1, Vegfa, Pdgfrb, Col4a1, Hif1a, Vcam1, Icam1, Gzma, Gzmb, Icos, Cd69, Ifng, Tnf, Cd1d1, Cd1d2, Cd38, Cxcr6, Xcr1, Tbx21, Stat1, Stat4, Cxcr3, IL-12b, IL-4, IL-6, IL-13, PD-1, PD-L1, CTLA-4, Lag3, Tim3, Ox40, Gitr,

Hvem, CD27, CD28, Cma1, Timd4, Bcl6, Cxcl5 및 Ccl21a로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 치료 반응성 예측을 위한 키트.

[청구항 37] 암의 예방 또는 치료가 필요한 대상체로부터 수득된 생물학적 시료 또는 자료를 이용하여 CD300c 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 38] 제37항에 있어서, 상기 암의 예방 또는 치료를 위한 정보는 CD300c 단백질과 관련된 치료제(예컨대, 항-CD300c 항체 또는 그의 항원 결합 단편)의 치료 반응성, 치료제의 선택, 치료 대상체의 선택, 대상체의 예후, 및 대상체의 생존기간 중 어느 하나 이상에 관한 정보를 포함하는 방법.

[도 1a]

CDR1, CDR2 and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1aa)

CK1 Heavy Chain (DNA sequence):

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCCGCTATGCCATGACCTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCAGCATGAGCGGCACCGGCGGCACCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGTCGCTTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TGCCCCGCGGCGCCTATGGCTTTGATCATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCCTGAGCAGC

(1ab)

CK1 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CGCCAGCCAGAGCATCGGCAACTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGCTGCTGAT
CTATGATGCCAGCAACCTGGAAACCGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTTACC
 CTGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGATTATTGTCAGCAGAGTAGCGCCATCCCTTATAC
CTTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAATCAA

(1ac)

CK1 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMTWVRQAPGKLEWVSSMSGTGGTTYADSVKGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAYGFDHWGQGLTVSS

(1ad)

CK1 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGNYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASNLETGIPDRFSGSGSGTDFLTISRL
 EPEDFAVYYCQSSAIPYTFGQGTKVEIK

[도 1b]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ba)

CK2 Heavy Chain (DNA sequence):

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCAGCTATGGCATGCATTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCATCAGCGGCAGCGGCACCAGCATCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCCGCAGTCTACTACTG
TGCCCCGCGGCGGCACCGCCTTTGATTATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1bb)

CK2 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CGCCAGCCAGAGATCAGACAACTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGAT
CTATGATGCCAGCAACCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTTACC
 CTGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGATTATTGTCAGCAGAGCTATAGCACCCCTTTTAC
CTTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAACCAA

(1bc)

CK2 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGTSIYYADSVKGRFTISRDNS
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGTAFDYWGQGLTVTVSS

(1bd)

CK2 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRSDNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISR
 LEPEDFAVYYCQQSYSTPFTFGQGTKVETK

[도 1c]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ca)

CK3 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
CAGCGGATTCACCTTCAGCAGCTATGCCATCAGCTGGGTTTCGCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCACCAGCGGCAGCGGCCGCGCCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TGCGCGCGATACCTGGTGGGAAGGCTATTTTGATCTGTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1cb)

CK3 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCA
GGCCAGCCATATCAGCACCCATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGATCTAT
GGCGCCAGCAGCCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACCCTG
ACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGTATTATTGTCAGCAGTATAACACCTATCCTCCTACCTTC
GGTCAGGGCACTAAAGTGGAAATCAA

(1cc)

CK3 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAISWVRQAPGKGLEWVSATSGSRATYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTWWEGYFDLWGQGLTVVSS

(1cd)

CK3 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCQASHISTHLNWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQYNTYPTFGQGTKVEIK

[도 1d]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1da)

CL4 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCGGCAGCAACTATATGAGCTGGGTTCCGCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 GAGCACCATCAGCGGCAGCGGCACCAGCACCTATTATGCCGATAGCTTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
 TGCCCGCGGCATGTGGGGCATGGATGTGTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1db)

CL4 Light Chain (DNA sequence):

CAGAGCGTGCTGACCCAGCCTCCTAGCGCCTCCGGTACACCAGGACAGCGCGTGACTATTAGCTGTACCGGC
 AAACATCGGCACACCGTGAAGTGGTACCAGCTACTGCCTGGAAGTGCACCTAAGCTGCTGATCTATCTGGATA
 GCGAACGCCCTAGCGGGTACCTGATCGCTTTAGCGGTAGCAAATCAGGCACCAGCGCCAGCCTGGCCATCA
 GCGGCCTTCGCTCCGAAGATGAAGCCGATTATTATTGTCAGAGCTATGATAGCAGCAGCGTGGTGTGGTGG
 CGGTACCAAGCTGACCGTGCTG

(1dc)

CL4 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSNYMSWVRQAPGKLEWVSTISGSGTSTYYADSLKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGMWGMDVWGQGLVTVSS

(1dd)

CL4 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGKHRHTVNWYQLLPGTAPKLLIYLDSEKPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR
 SEDEADYYCQSYDSSSVVFGGGTKLTVL

[도 1e]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ea)

CL5 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCAGCTATGCCATGCATTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 GAGCAGCATCAGCGGCGGGCTATGGCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
 TGCCCGCAGCACCGTGTGGGCCTTTGATATCTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1eb)

CL5 Light Chain (DNA sequence):

CAGAGCGTGCTGACCCAGCCTCCTAGCGCCTCCGGTACACCAGGACAGCGCGTGACTATTAGCTGTAGCGGC
 AACAAATCGGCAGCAAAAGCGTGCATTGGTACCAGCAACTGCCTGGAAGTGCACCTAAGCTGCTGATCTAT
 GATGTGAGCAAACGCCCTAGCGAGCGTCTGATCGCTTAGCGGTAGCAAATCAGGCACCAGCGCCAGTCTG
 GCCATCAGCGACCTTCGCTCCGAAGATGAAGCCGATTATTATTGTCAGAGCTTTGATAGCAGCGGCACCTGGA
 TCTTTGGTGGCGGTACCAAGCTGACCGTGCTG

(1ec)

CL5 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSISGGGYGTYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTVWAFDIWGQTLTVSS

(1ed)

CL5 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNNIGSKSVHWYQQLPGTAPKLLIYDVSKRPSERPDRFSGSKSGTSASLAISD
 LRSEADYYCQSFDSSTWIFGGGKLTVL

[도 1f]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1fa)

CL6 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTCAGCAGCTACGGTATGCATTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
 CTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
CAGTCAGTGGTGCAGGTCGTGGTTCTTCGACTACTGGGGACAAGGTACTGGTCACTGTCTCCTCA

(1fb)

CL6 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGCGGTA
GCAGCAGCAACATTGGTAGCAACTACGTGTACTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGAT
 TTACGAGGACAACAAGCGTCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCT
 CTGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTTACTGCAGCAGCTACACTAGCAGCAGCACT
GTGATCTTCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1fc)

CL6 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVSGAGRGGFDYWGQGLVTVSS

(1fd)

CL6 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQLPGTAPKLLIYEDNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI
 SGLRSEDEADYYCSSYSSSTVIFGGGTKLTVL

[도 1g]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ga)

CL7 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCCTCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTCAGCCGCTACGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGC
 TCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGC
 GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGC
GCACGTAGCAGCCAGGGTATCTTCGACATCTGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCTCA

(1gb)

CL7 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGTGGTA
ACAATATCGGTACTAGACGCGTGCATTGGTATCAGCAACTCCCAGACACCGCTCCTAAGCTCCTGATTACAGT
AAGAACAACCGTCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCTGGCTAT
 CAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTTACTGCGCAGCATGGGACGACAGCCTGAGCGGTCTGT
GTTCCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1gc)

CL7 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSQGIFDIWGQGLTVTVSS

(1gd)

CL7 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNNIGTRRVHWYQQLPDTAPKLLIYSKNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGKLTVL

[도 1h]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ha)

CL8 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTTCAGCAGCTACGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTC
 TCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGCA
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
CACGTAGCGGTGTTACGCAGACTTGACATCTGGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCTCTCA

(1hb)

CL8 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGCGGTA
GCAACAGCAACATCGGTAACAACTACGTGAGCTGGTATCAGCAACTCCCAGACACCCCTCCTAAGCTCCTGAT
 TTACGACAACAACAAGCGTCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTC
 TGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCAGCAGCTACACTAGCAGCAGCACTG
TGATGTTCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1hc)

CL8 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRNN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGRYADLTSGGQGLLVTVSS

(1hd)

CL8 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGNNYVSWYQLPDTPPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
 AISGLRSEDEADYYCSSYTSSSTVMFGGGTKLTVL

[도 1i]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ia)

CL9 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTTCAGCAGCTACTACTGGAGCTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTC
 TCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGC
 GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGC
GCACGTATCGACGTGTACGGTTTCGACATCTGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

(1ib)

CL9 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGCGGTA
GCACTAGCAACATCGGTACTAACTACGTGTACTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGATT
 TACGACAACAACAACCGTCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCT
 GGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTTACTGCCAGACTTGGGACAGCAGCACTGACGT
AGTGTTCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1ic)

CL9 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYWSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIDVYGFDIWGQGLVTVSS

(1id)

CL9 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSTSNIGTNYVYWYQQLPGTAPKLLIYDNNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA
 ISGLRSEDEADYYCQTWDSSTDVVFGGGTKLTVL

[도 1j]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ja)

CL10 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTTCAGCAGCTACGGTATGCATTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
CTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
CAAGCGGTTACGGTCTGATGGACGTGTGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCTCTCA

(1jb)

CL10 Light Chain (DNA sequence):

TCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCACTCGTAGCA
GCGGTATCATCGCAAGCAACTACGTGCAGTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGATTA
CCGCAACAACCAGCGCCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCTG
 GCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCAGCAGCTACGCAGGTAACAACAACCTG
GTGTTCCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1jc)

CL10 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGYGLMDVWGQGLVTVSS

(1jd)

CL10 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTRSSGIIASNYVQWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI
 SGLRSEDEADYYCSSYAGNNLVFGGGTKLTVL

[도 1k]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ka)

SK11 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCACCTATGGCATGCATTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCATCAGCGGCAGCGGCAGCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TGCCCCGCGCCTGAGCGGCCTTGATTATTGGGGACAAGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1kb)

SK11 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CTCCAGCCAGGGCATCACCAACTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGATC
TATGATGCCAGCAACCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACCC
 TGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTGCCGTGTATTATTGTCAGCAGAGCTATAGACCCCTCTGACC
TTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAATCAAA

(1kc)

SK11 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLSGLDYWGQGLTVSS

(1kd)

SK11 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRSSQGITNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
 EPEDFAVYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK

[도 11]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1a)

SK12 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTCAGCAGCTATGCCATGCATTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCATCAGCGGCAGCGGCGGCGATACCTATCATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TACCCGCGGCCTGAGCGGCTTTGATTATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1b)

SK12 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGAT
CTATGATGCCAGCAACCGCGCCCCTGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACCC
 TGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGTATTATTGTCAGCAGAGCTATAGCATCCCTATCACC
TTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAAATCAAA

(1c)

SK12 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGDTYHADSVKGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLSGFDYWGQGLVTVSS

(1d)

SK12 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSISSYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLISR
 LEPEDFAVYYCQSYSIPITFGQGTKVEIKFSD

[도 1m]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ma)

SK13 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCGATTATGCCATGAGCTGGGTTCCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 GAGCAGCATCAGCAGCAGCAGCAGCTATATCTACTATACCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCGC
 GATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTGT
GCCCCGCGCGGCTATGGCTTTGATTATTGGGGACAAGGTACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

(1mb)

SK13 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGAT
CTATAGCGCCAGCAGCCGCCACAGGGCATCCCCGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACC
 CTGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGATTATTGTCAGCAGTATGATGATCTGCCTTTACC
TTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAAATCAAA

(1mc)

SK13 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYTDSVKGRFTISRDN
 S
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYGFDYWGGTLVTVSS

(1md)

SK13 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSYLNWYQQKPGQAPRLLIYSASSRPQGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
 EPEDFAVYYCQYDDLPTFGQGTKVEIK

[도 1h]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1na)

SK14 Heavy Chain (DNA sequence):

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCAACTTTGCGATCGCCTGGGTTCCGAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
 GAGCGCCATCAGCGGCCGCGGCACCAGCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG
 CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TGCCCCGCGCGTGAGCGGCTTTGATAGCTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCA

(1nb)

SK14 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCCATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGAT
CTATGATACCAGCAACCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGTTCTCAGGATCTGGGAGCGGTACCGATTTTACC
CTGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGTACTATTGTCAGCAGAGCTATAGCACCCCTTTTAC
CTTCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAATCAAA

(1nc)

SK14 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFAIAWVRQAPGKGLEWVSAISGRGTSTYYADSVKGRFTISRDN
 S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVSGFDSWGQGLTVTVSS

(1nd)

SK14 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSHLAWYQKPGQAPRLLIYDTSNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
 EPEDFAVYYCQQSYSTPFTFGQGTKVEIK

[도 10]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(10a)

SK15 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
CAGCGGATTCACCTCAGCAGCTATGCCATGCATTGGGTTCCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCATCAACGGCAGCGGGCGGCAGCACCTATTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCCG
CGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGACGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTG
TGCCCCGGCCTGCAGGGCTTTGATTATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGCA

(10b)

SK15 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCA
GGCCAGCCAGGATATCACCAACTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGATC
TATGATGCCAGCAGCCTGGAAACCGGCATCCCTGATCGTTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACCCT
GACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGATTATTGTCAGCAGAGCTATAGCACCCCTATCACCT
TCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAAATCAA

(10c)

SK15 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAINGSGGSTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQTNLRAEDTAVYYCARGLQGF~~Y~~WGQGLTVVSS

(10d)

SK15 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQDITNYLNWYQKPGQAPRLLIYDASSLETGIPDRFSGSGSGTDFLTISRL
EPEDFAVYYCQSYSTPITFGQGTKVEIK

[도 1p]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1pa)

SK16 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
CAGCGGATTCACCTTCAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTTCCGCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCGCCATCAACGGCAGCGGGCGGCAGCACCTGTATGCCGATAGCGTGAAAGGCCGCTTACCATCAGCC
GCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACT
GTGCCCCGCGCGTGAGCGGCTTTGATAGCTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGCG

(1pb)

SK16 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCG
CATCAGCCAGAGCATCAGCAGCTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGATC
TATGATGCCAGCCTGCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTACCCT
GACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGTATTATTGTCAGCAGAGCTATAAAACCCCTATCACCT
TCGGTCAGGGCACTAAAGTGGAATCAAA

(1pc)

SK16 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAINGSGGSTLYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCCARGVSGFDSWGQGLVTVSS

(1pd)

SK16 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRISQSISSYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDFAVYYCQSYKTPITFGQGTKVEIK

[도 1q]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1qa)

SK17 Heavy Chain (DNA sequence):

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTTCAGCAGCTATTATTGGAGCTGGGTTCCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGT
GAGCACCATCACCGGCAGCGGCGGCAGCACCGATTATGCCAACAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCC
 GCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACT
GTGCCACCGGCGGCGGCATCTTTGACTATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGCG

(1qb)

SK17 Light Chain (DNA sequence):

GAAATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAACGCGCAACACTGTCATGCCA
GGCCAGCCAGACCATCAGCAACTATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGTCAGGCTCCACGTCTGCTGAT
CTATGATGCCAGCAACCGCGCCACCGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGGATCTGGAAGCGGTACCGATTTTACC
 CTGACCATCAGCCGCTGGAACCTGAGGACTTTGCCGTGATTATTGTCAGCAGTACAACAGCTATCCTCCTAG
CTTCGGTCAGGGCACTAAAGTGAAATCAAA

(1qc)

SK17 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYWSWVRQAPGKLEWVSTITGSGGSTDYANSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGGGIFDYWGQGLTVSS

(1qd)

SK17 Light Chain (Amino acid sequence):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCQASQTISNYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
 EPEDFAVYYCQQYNSYPSPFSGQGTKVEIK

[도 1r]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ra)

SL18 Heavy Chain (DNA sequence):

CGAGTGCAGCTGCTGGAAAGTGGAGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCCGC
 CAGCGGATTCACCTCAGCGATTATCATATGCATTGGGTTCCGCCAAGCACCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTG
 AGCACCATCAGCAGCAGCGGCGGCTATACCTATTATGCCGAAAGCGTGAAAAGCCGCTTTACCATCAGCCGC
 GATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGGACACCGCAGTCTACTACTGT
GCCCGATCGATACGCCTGCCTCTGGATTATTGGGGACAAGGTACTCTGGTGACCGTGAGCAGCA

(1rb)

SL18 Light Chain (DNA sequence):

CAGAGCGTGCTGACCCAGCCTCCTAGCGCCTCCGGTACACCAGGACAGCGCGTGACTATTAGCTGTAGCGGC
AACAACATCGGCAGCAAAGGCGTGCATTGGTATCAGCAACTGCCTGGAAGTGCACCTAAGCTGCTGATCTAT
GAAGATAGCAAACGCCCTAGCGGCGTGCCTGATCGCTTTAGCGGTAGCAAATCAGGCACCAGCGCCAGCCT
 GGCCATCAGCGGCCTTCGCTCCGAAGATGAAGCCGATTATTATTGTCAGAGCTATGATAGCACCAAAGGCGTG
GTGTTTGGTGGCGGTACCAAGCTGACCGTGCTG

(1rc)

SL18 Heavy Chain (Amino acid sequence):

RVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYHMHVWRQAPGKGLEWVSTISSGGYTYAESVKSRFTISRDN
 SKNTLYQMNSLRAEDTAVVYCARSIRLPLDYWGQGLVTVSS

(1rd)

SL18 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNNIGSKGVHWYQQLPGTAPKLLIYEDSKRPSGVRDRFSGSKSGTSASLAISG
 LRSEDEADYYCQSYDSTKGVVFGGGTKLTVL

[도 1s]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1sa)

CB301_H3L1_A10 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGTCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTTCAGCAGCTACGGTATGCATTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
CTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
TGCGTGGTTACGGTGCAATGGACGTGTGGGGACAAGTACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

(1sb)

CB301_H3L1_A10 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCACTCGTA
GCAGCGGTAGCATCGCAAGCAACTACGTGCAGTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGA
TTTACCCGCAACAACCAGCGCCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC
 TCTGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCAGCAGCTACACTACTAGCAGCACT
CTGGTGTTCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1sc)

CB301_H3L1_A10 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGYGAMDVWGQGLTVVSS

(1sd)

CB301_H3L1_A10 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA
 ISGLRSEDEADYYCSSYTTSSTLVFGGGTKLTVL

[도 1t]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ta)

CB301_H3L1_A12 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTCAGCAGCTACGCAATGCATTGGGTGAGCAGGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
CTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAAAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
CAAGCGGCTACGGTCTGATGGACGTATGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCTCA

(1tb)

CB301_H3L1_A12 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCACTGGTA
CTAGCAGCGACGTGGGTAACTACAACCTGGTGGAGCTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCT
 GATTTACAGCAACAACCAGCGCCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCC
 TCTCTGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCAGCAGCTACACTGGTAGCAACG
CTCTGTTGTTCCGGCGGTGGGACCAACTGACCGTCCTA

(1tc)

CB301_H3L1_A12 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAKDTAVYYCASGYGLMDVWGQGLVTVSS

(1td)

CB301_H3L1_A12 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGTSSDVGNYNLVSWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
 AISGLRSEDEADYYCSSYTGSNALLFGGGTKLTVL

[도 1u]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ua)

CB301_H3L1_E6 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTCAGCAGCTACGCAATGAGCTGGGTGAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTC
 TCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGC
 GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGC
GCACGCTGGCATTACAGCTTCGACTACTGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

(1ub)

CB301_H3L1_E6 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCCGTGGTA
ACAACATCGGTAGCAAGCGTGTGCATTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGATTTACAG
CTACAACCACCGTCCTAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCTGGCTA
 TCACTGGACTTCGCTCCGAGGACGAAGCTGACTATTACTGCAACACTGGGACGACAGCCTGGAGGGTCTCTG
TGTTCCGGCGGTGGGACCAAACTGACCGTCCTA

(1uc)

CB301_H3L1_E6 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWHYFDYWGQGLVTVSS

(1ud)

CB301_H3L1_E6 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCRGNNIGSKRVHWYQLPGTAPKLLIYSYNHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIT
 GLRSEDEADYYCNTWDDSLEGPVFGGGTKLTVL

[도 1v]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1va)

CB301_H3L1_F4 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTTCAGCGGCTACGCAATGAGCTGGGTGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTC
 TCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCACGC
 GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGC
GCACGTAGTCTAGCGGTCTGTTGACTACTGGGGACAAGGACTCTGGTCACTGTCTCCTCAG

(1vb)

CB301_H3L1_F4 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCGGTGGTA
ACAACATCGGTAGCAAGCGTGTGCATTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGTCCTGATTACAA
CACTAGCAACAAGCATAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCTGGCT
 ATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCAGCAGCTACCTACAGCAGCACTCTCTGTTCCG
GCGGTGGACCAAATAACCGTCCTA

(1vc)

CB301_H3L1_F4 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSGLFDYWGGTGLTVSS

(1vd)

CB301_H3L1_F4 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGGNNIGSKRVHWYQLPGTAPKLLIYNTSNKHSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLRSEADYYCSSLQQHSLFGGGTKLTVL

[도 1w]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1wa)

CB301_H3L1_G11 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTCCGCCTCCTCCTGTGCAG
 CCTCCGGATTCACTTTCAGCAGCTACGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGG
 GTCTCTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCAC
 GCGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACT
GCACACGTTTCGTGGGTGCAATCGGTGCATTCGACTACTGGGGACAAGGTACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

(1wb)

CB301_H3L1_G11 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGTGGTA
ACAACATCGGTAGCCGTAGCGTGCATTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGATTTACCG
CAACAACCAGCGCCCTAGTGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCTCTGGCT
 ATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCGCAGCATGGGACGACAGCCTGAGCGGTCCCT
GTGTTCCGGCGGTGGGACCAAACCTGACCGTCCTA

(1wc)

CB301_H3L1_G11 Heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSSSASSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR
 D
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFVGAIGAFDYWGQGLTVTVSS

(1wd)

CB301_H3L1_G11 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGNNIGSRSVHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGKLTVL

[도 1x]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1xa)

CB301_OPALTL_B5 heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCAC¹TTTCAGCCATTACGCAATGAGCTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
 CTGCAATTAGCGGTAGCGGTGGTAGCACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
 CACGTGGTTGGGACAGCCCTACTCTGACATACTCGACAGCTGGGGACAAGGTA²CTCTGGTCACTGTCTCCTC
 A

(1xb)

CB301_OPALTL_B5 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGCGGTA
 CTAGCAGCAACATCGGTAACAACGACGTGAGCTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGAT
 TTACCAGGACACTAAGCGTCCTAGCGGTGTGCCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCT
 CTGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCGCAGCATGGGACGACAGCCTGAGC
 GGTCTGTGTTCGGCGGTGGGACCAA³ACTGACCGTCCTA

(1xc)

CB301_OPALTL_B5 heavy Chain (Amino acid sequence):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS⁴CAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGWDSPTLTYFDSWGQGLVTVSS

(1xd)

CB301_OPALTL_B5 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS⁵CSGTSSNIGNNDVSWYQQLPGTAPKLLIYQDTKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA
 ISGLRSEADYYCAAWDDSLSGP⁶VFGGGTKLTVL

[도 1y]

CDR1, CDR2, and CDR3 are underlined and appear sequentially

(1ya)

CB301_OPALTL_E6 Heavy Chain (DNA sequence):

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGTGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGTTCTCTTCGCCTCTCCTGTGCAGCCT
 CCGGATTCACCTTCAGCAGCTACGGTATGCATTGGGTCAGACAGGCACCAGGTAAGGGACTGGAGTGGGTCT
 CTGCAATCAGCGGTAGCGGTGGTTACACTTACTACGCAGACAGCGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCACGCG
 ACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTTCGCGCAGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCG
CACGCTGGCATTACAGCTTCGACTACTGGGGACAAGTACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

(1yb)

CB301_OPALTL_E6 Light Chain (DNA sequence):

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTCAGCATCTGGTACTCCAGGTCAGCGCGTCACCATCAGCTGCAGCGGTA
GCAGCAGCAACATCGGTAACAACACTACGTGAGCTGGTATCAGCAACTCCCAGGCACCGCTCCTAAGCTCCTGA
 TTTACCGCAACAACCAGCGCCCTAGTGGTGTGCTGATCGCTTTTCTGGGTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCT
 CTGGCTATCAGTGGACTTCGCTCCGAGGACGAGGCTGACTTACTGCCAGAGCTACGACAACAGCAACGTG
CTGTTCCGGCGGTGGGACCAAACACTGACCGTCCTA

(1yc)

CB301_OPALTL_E6 Heavy Chain (Amino acid sequence):

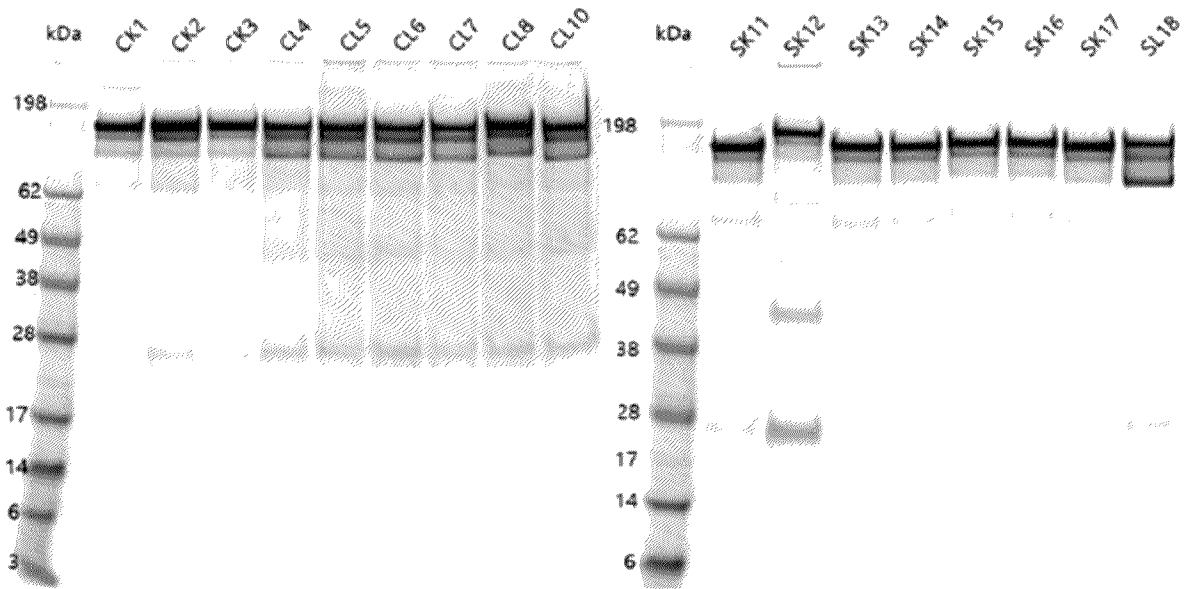
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGYTYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWHYSFDYWGQTLTVSS

(1yd)

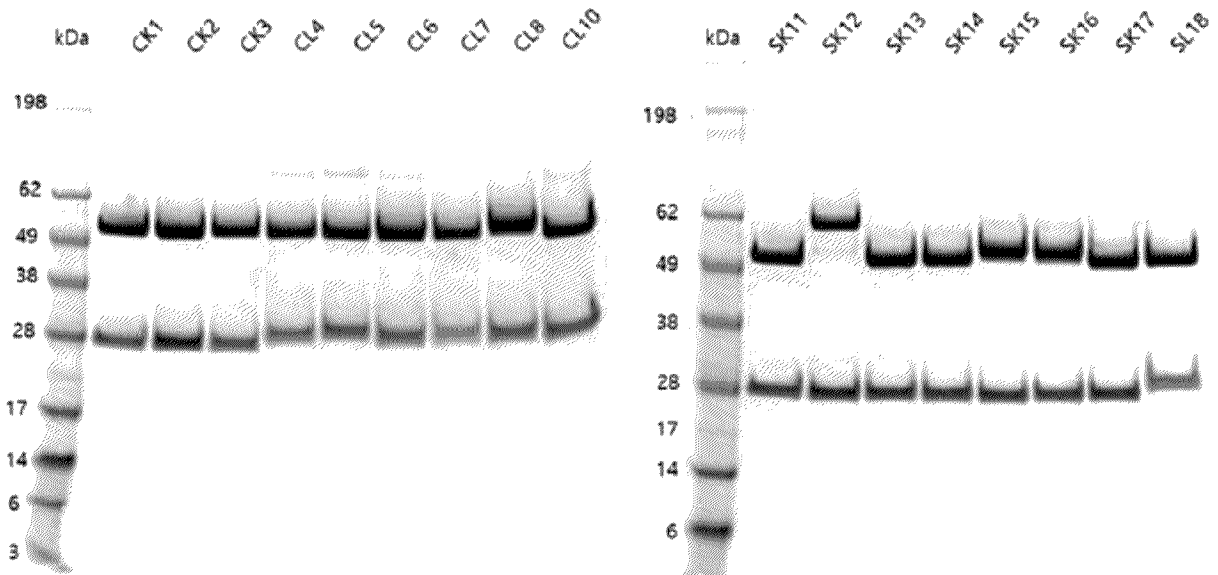
CB301_OPALTL_E6 Light Chain (Amino acid sequence):

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYSWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA
 ISGLRSEDEADYYCQSYDNSNVLFGGGTKLTVL

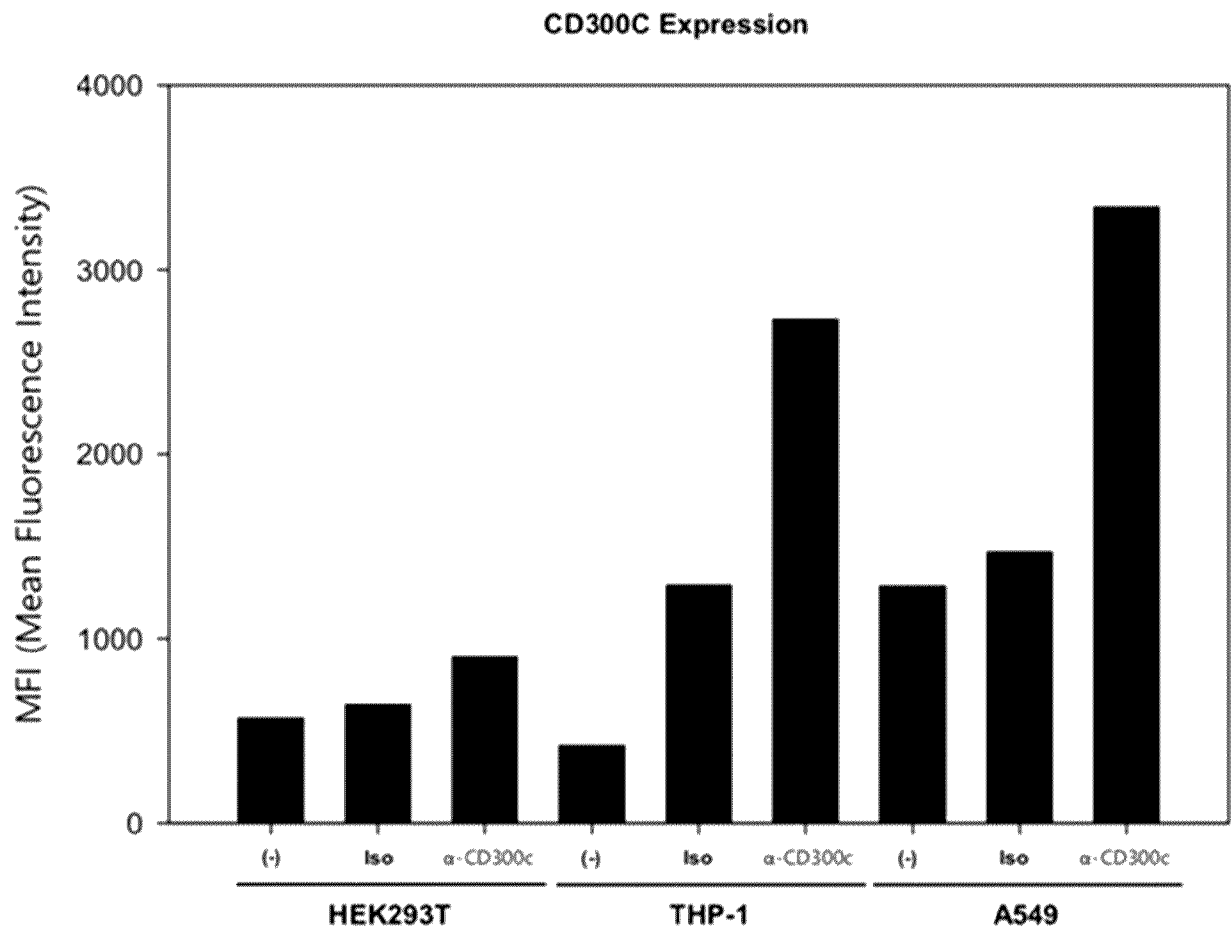
[도2]



[도3]

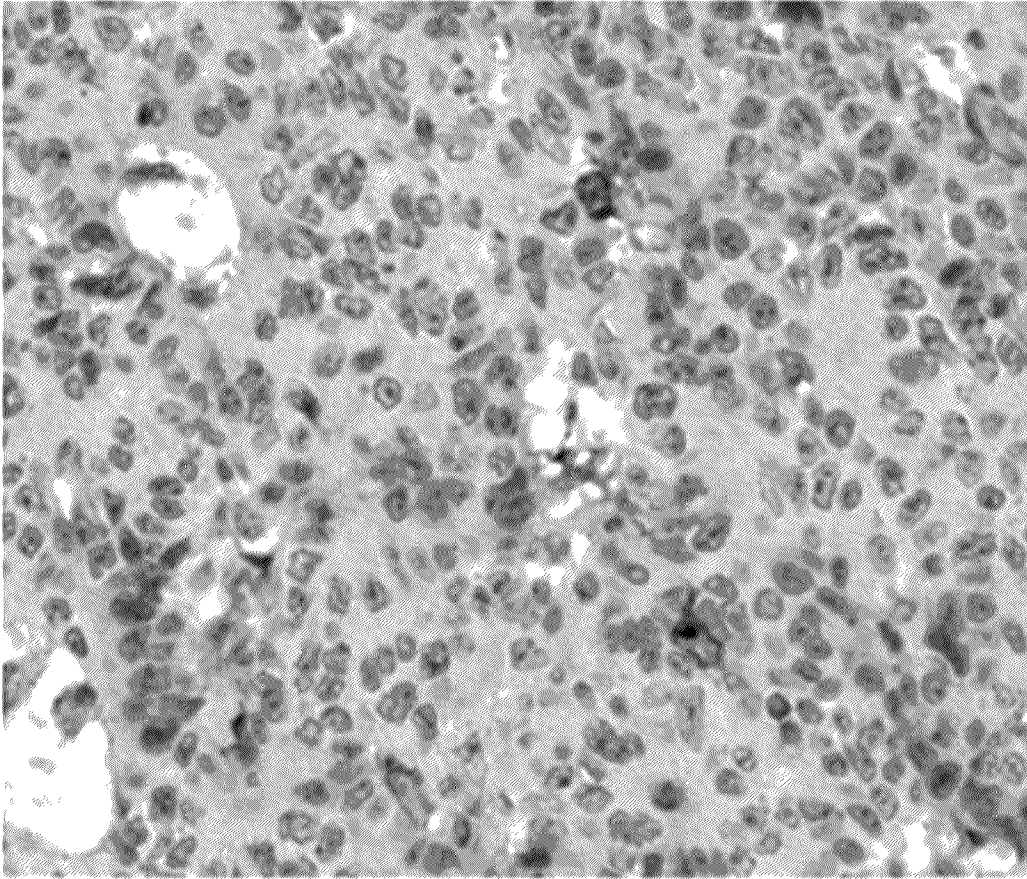


[도4]

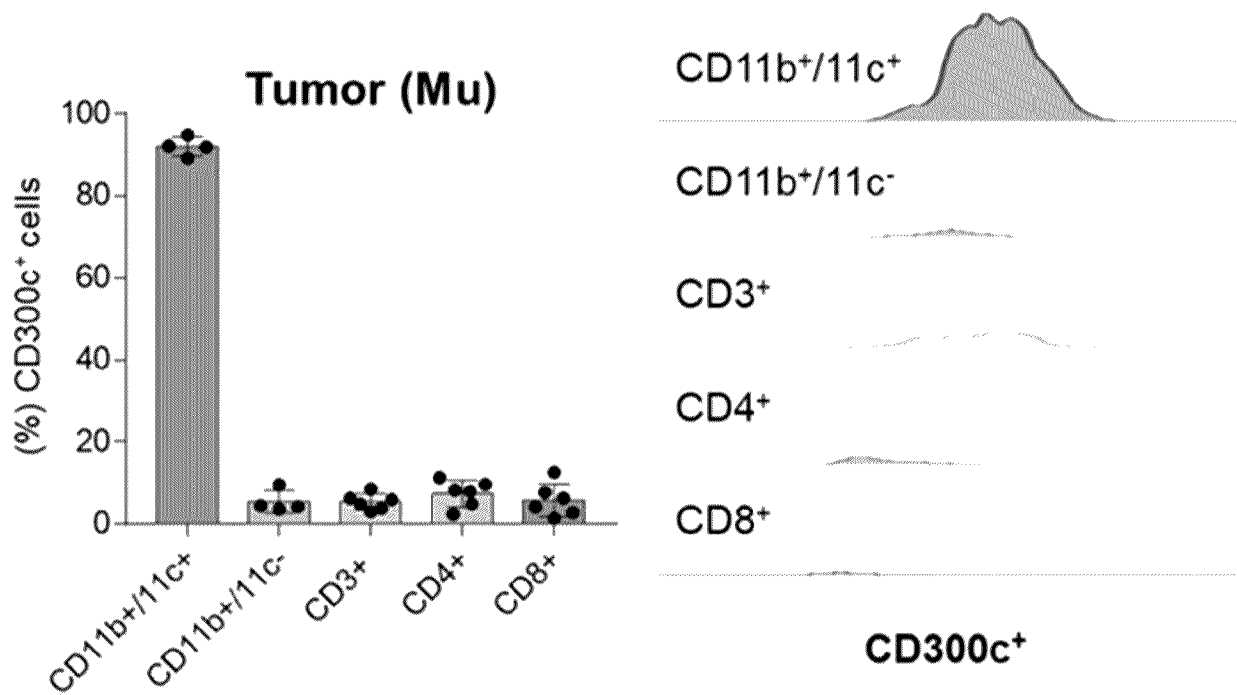


[도5a]

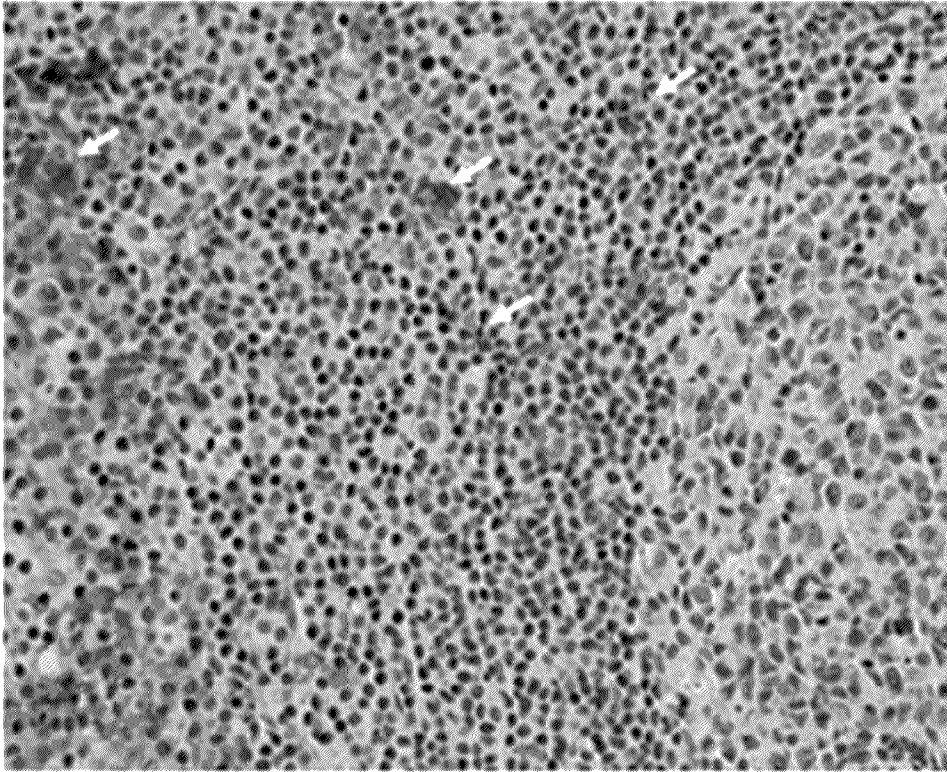
Colon cancer (Hu)



[도5b]

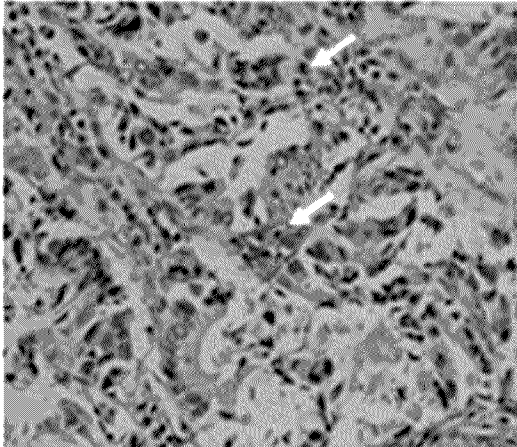


[도6a]

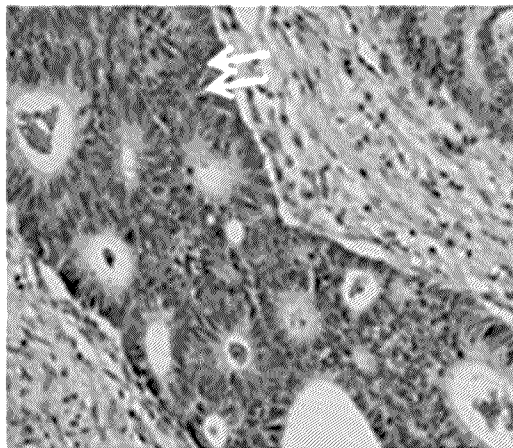
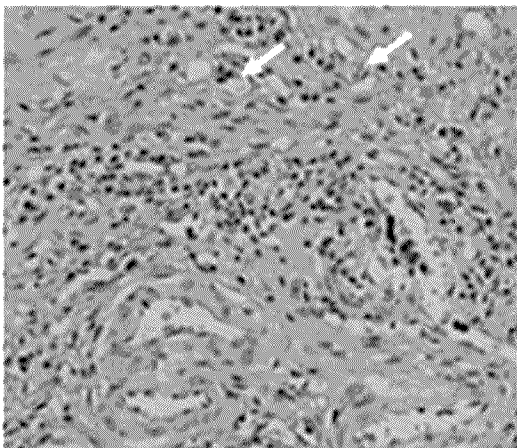
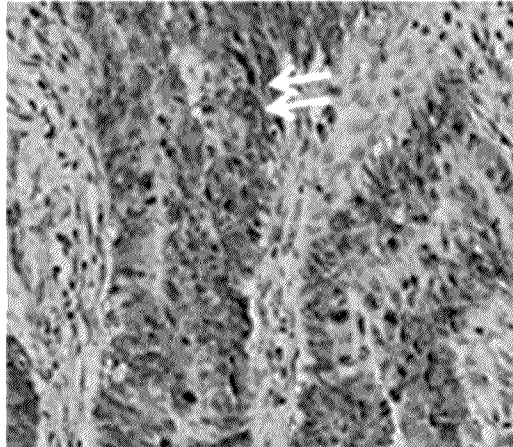


[도6b]

Colon cancer tissue 1



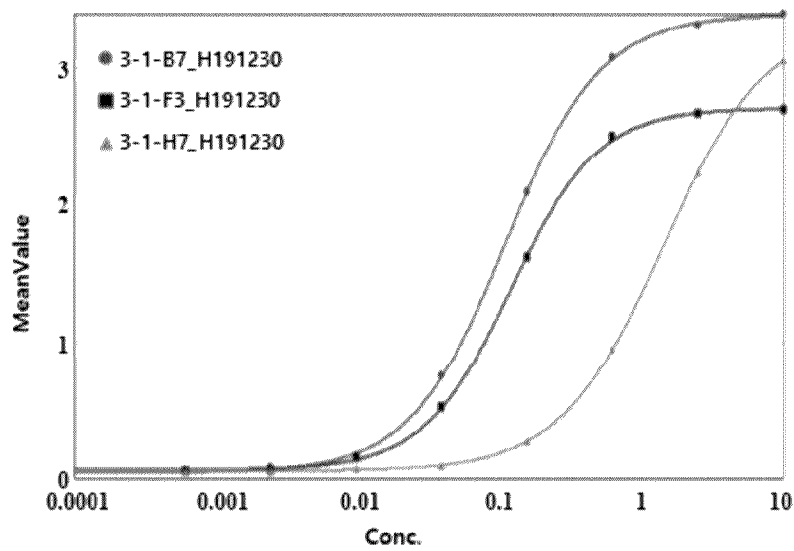
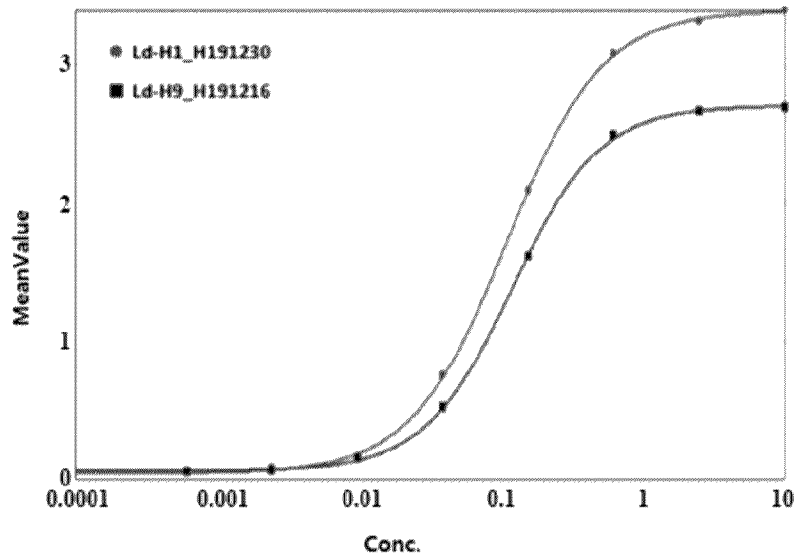
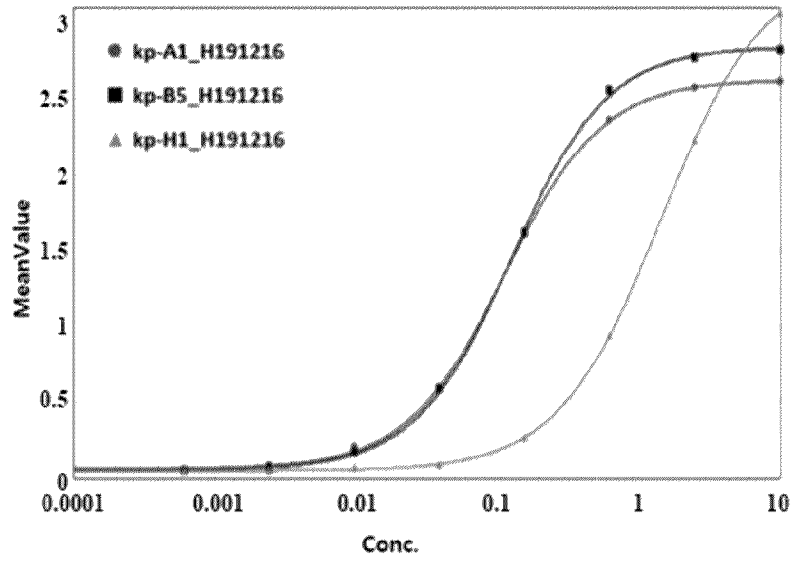
Colon cancer tissue 2



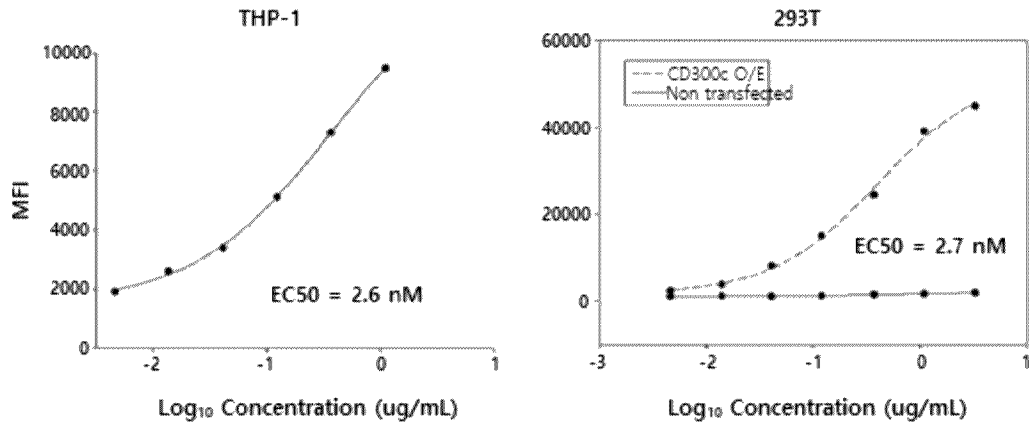
Colon cancer tissue 3

Colon cancer tissue 4

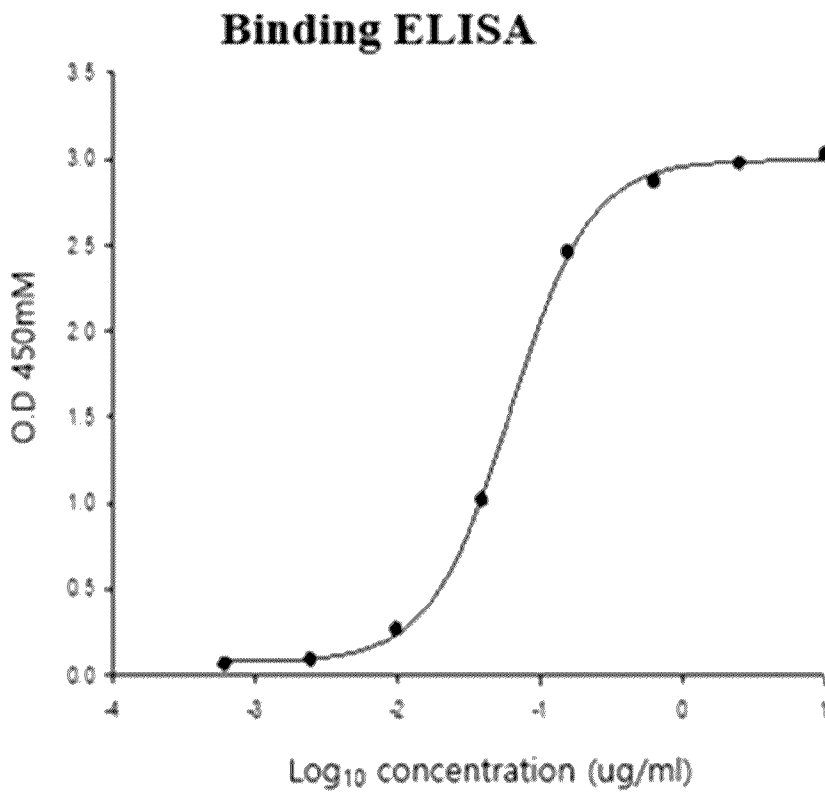
[도7]



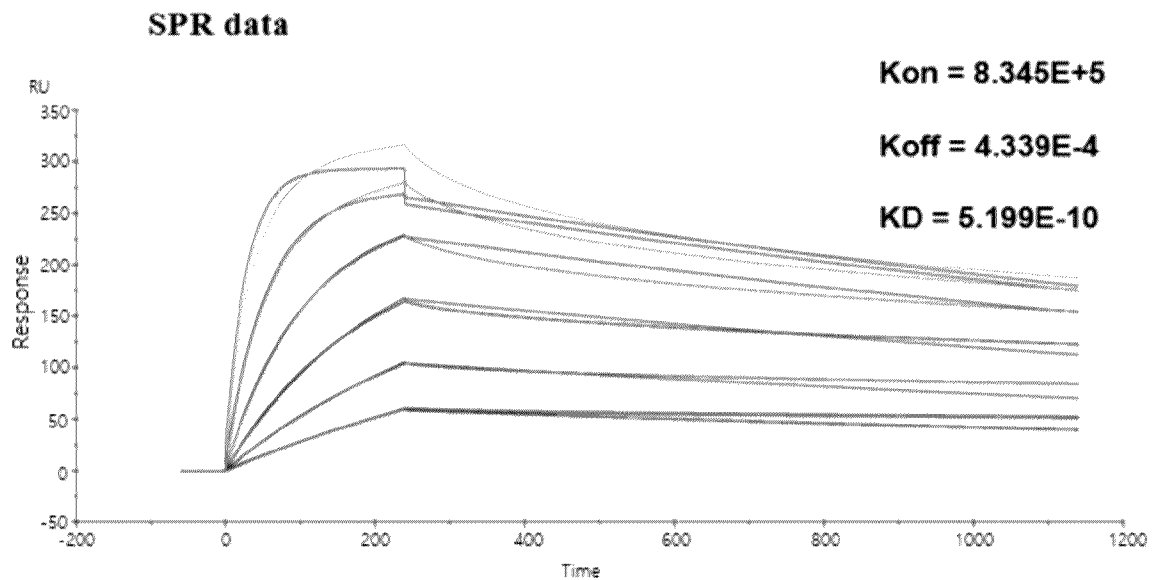
[도8]



[도9]

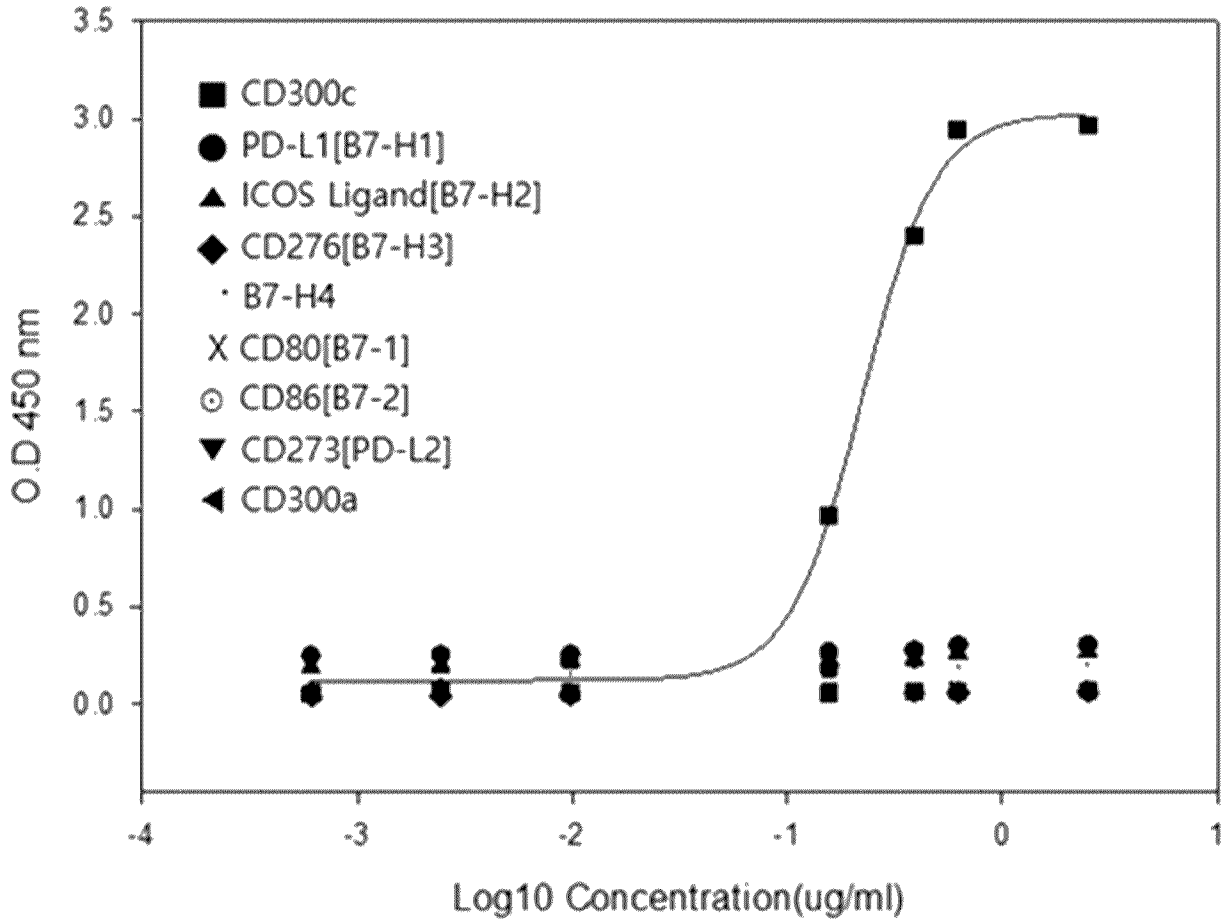


[도10]



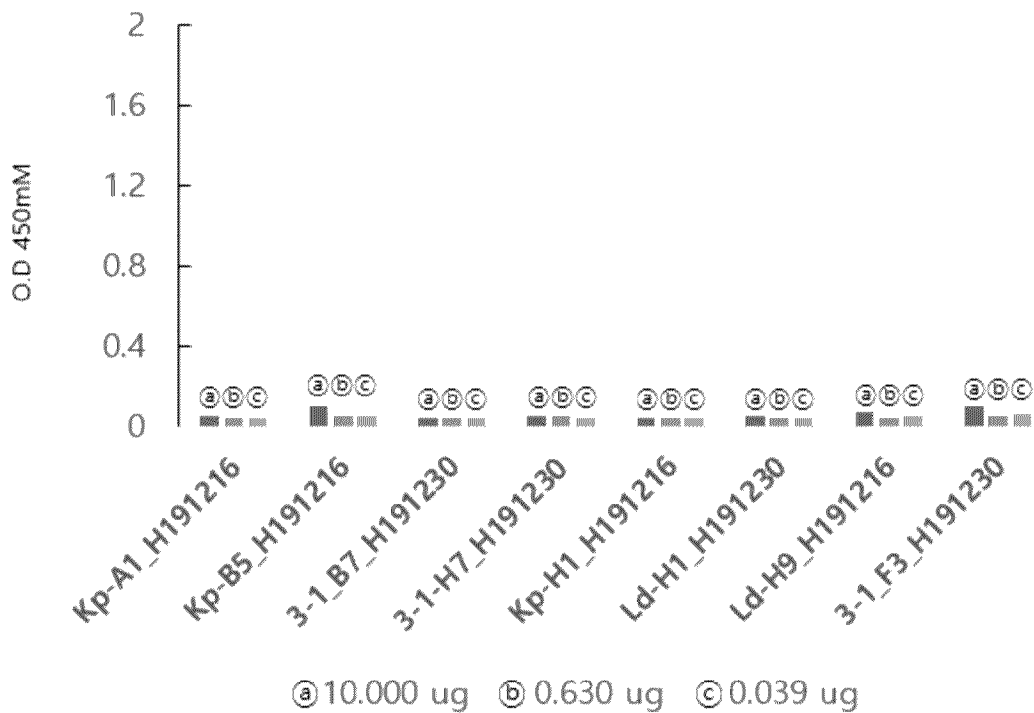
[도11]

Binding ELISA with B7 family protein

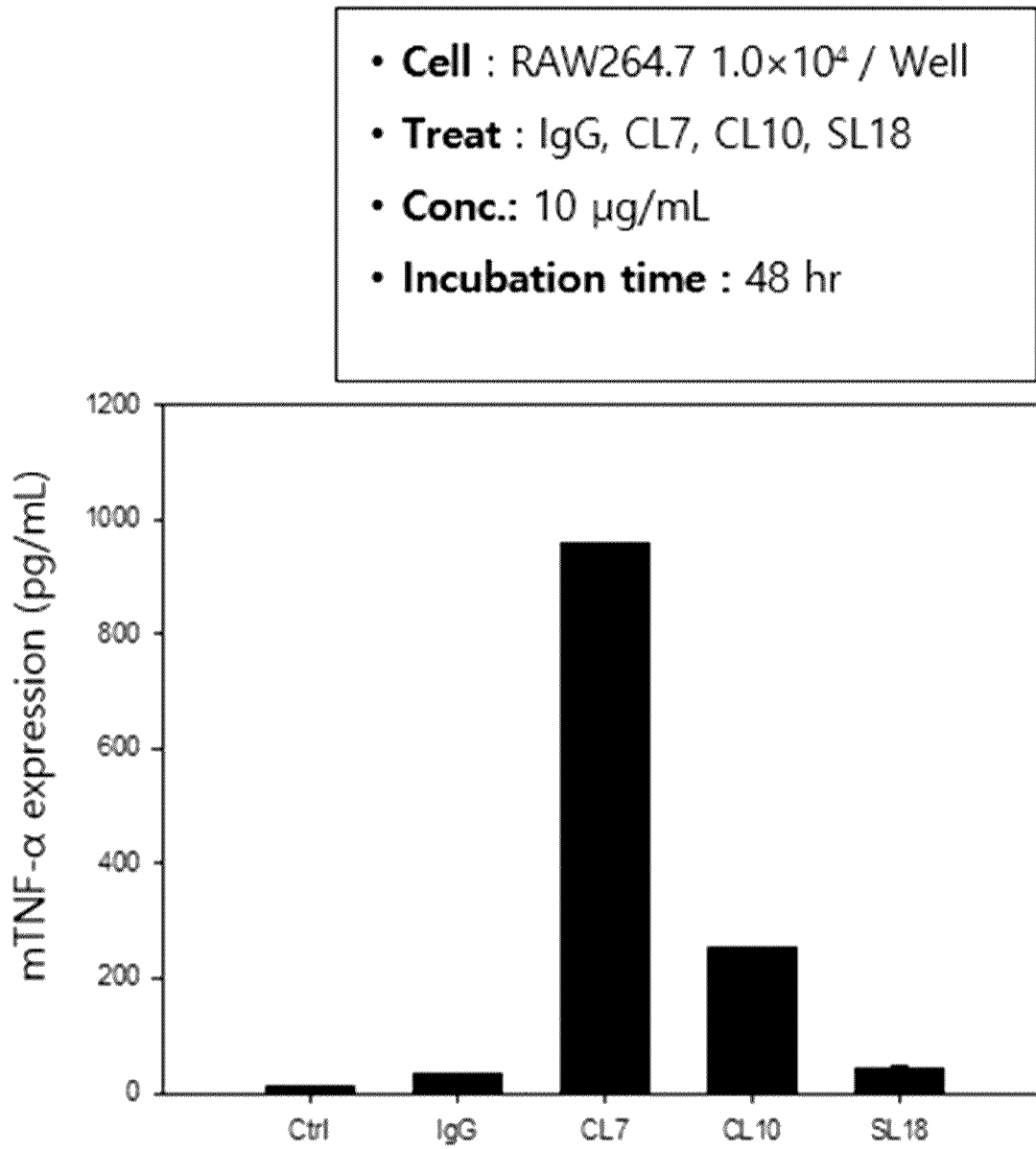


[도12]

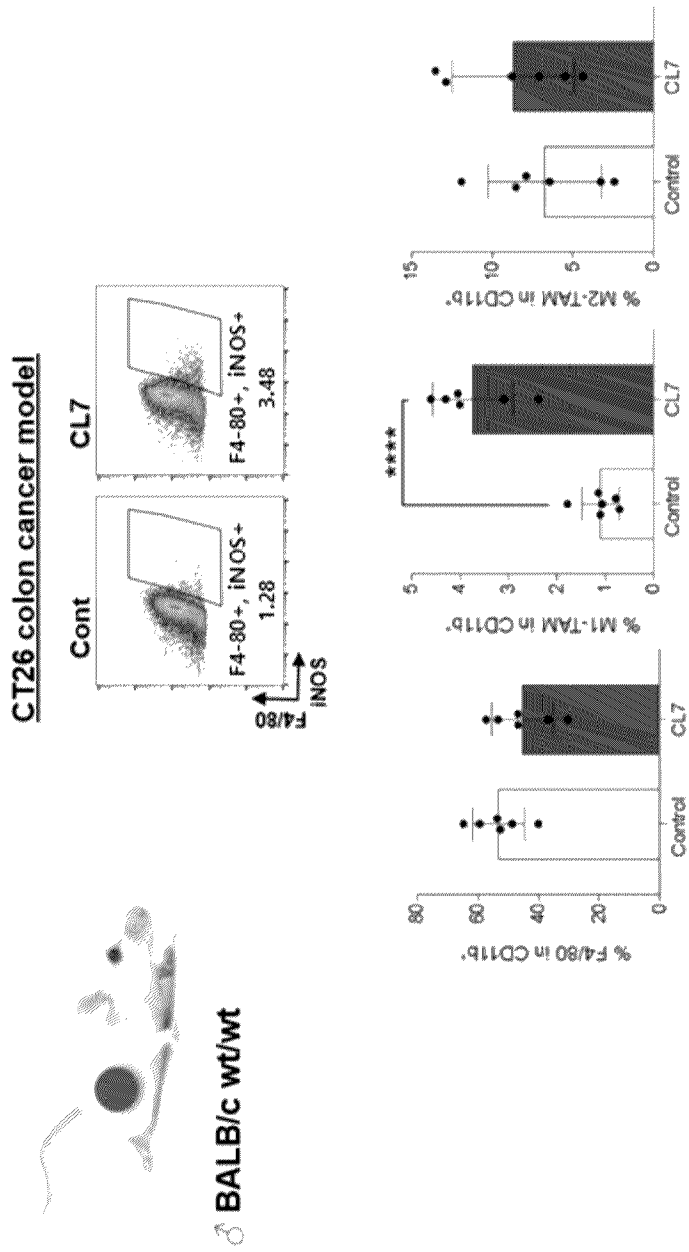
Binding ELISA with CD300a



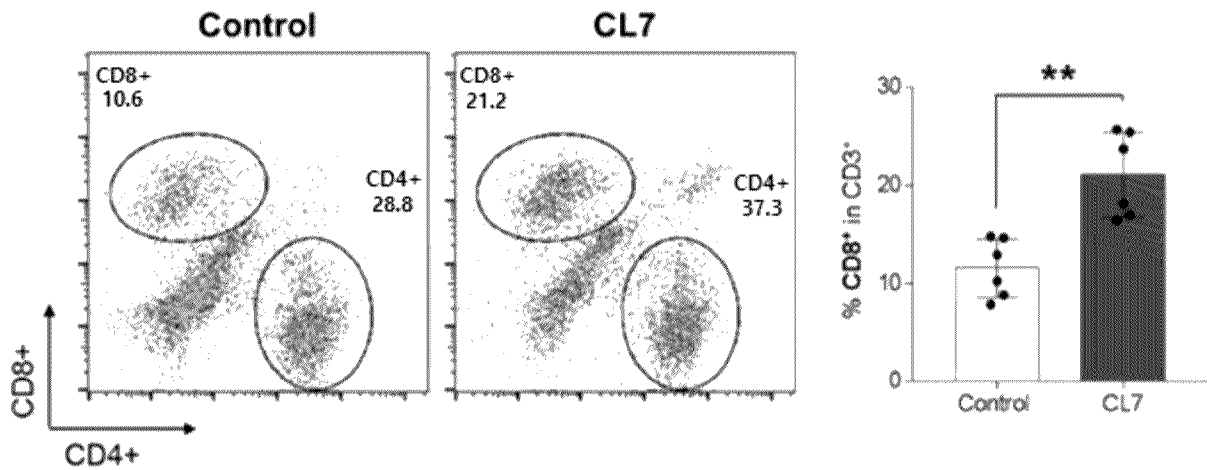
[도13]



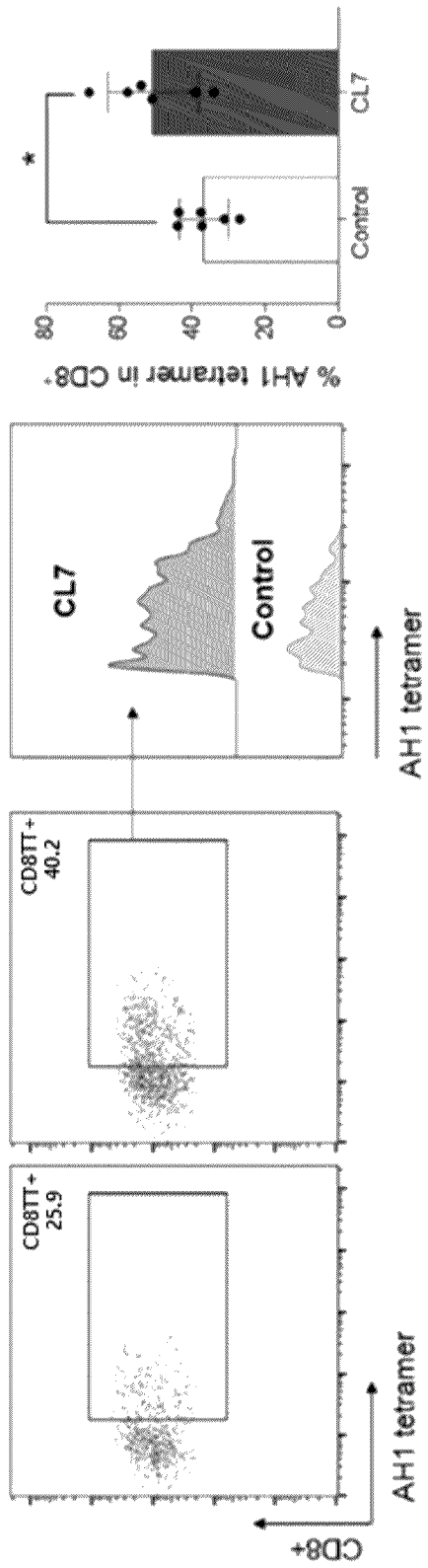
[도 14]



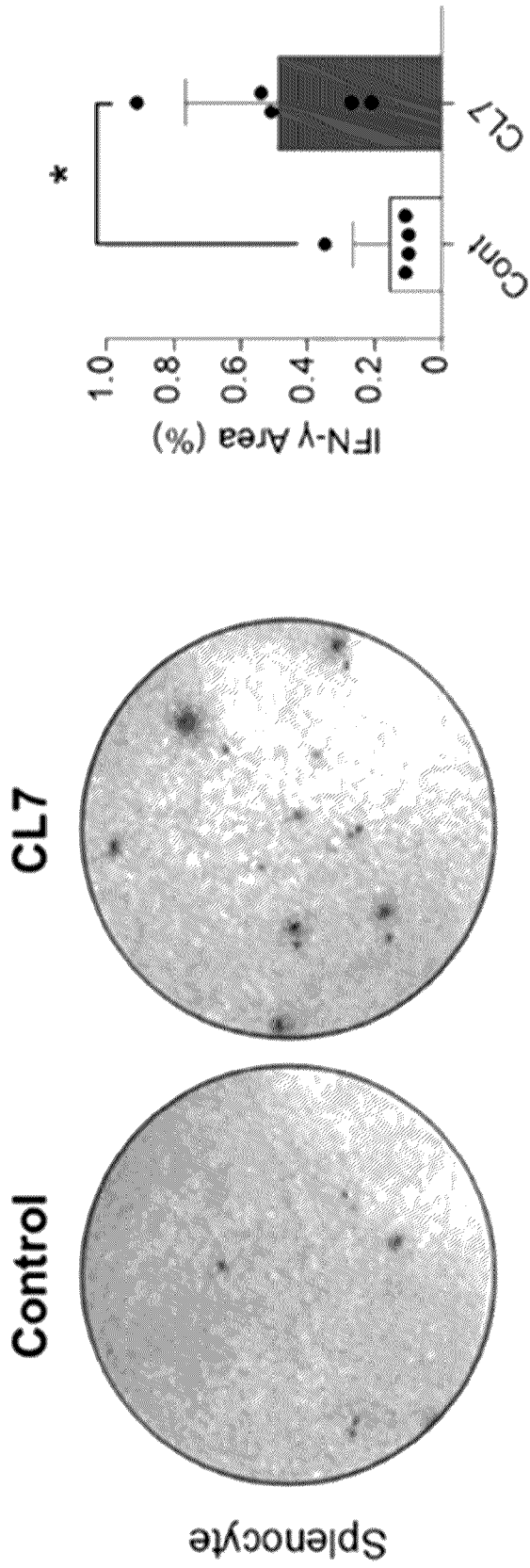
[도 15]



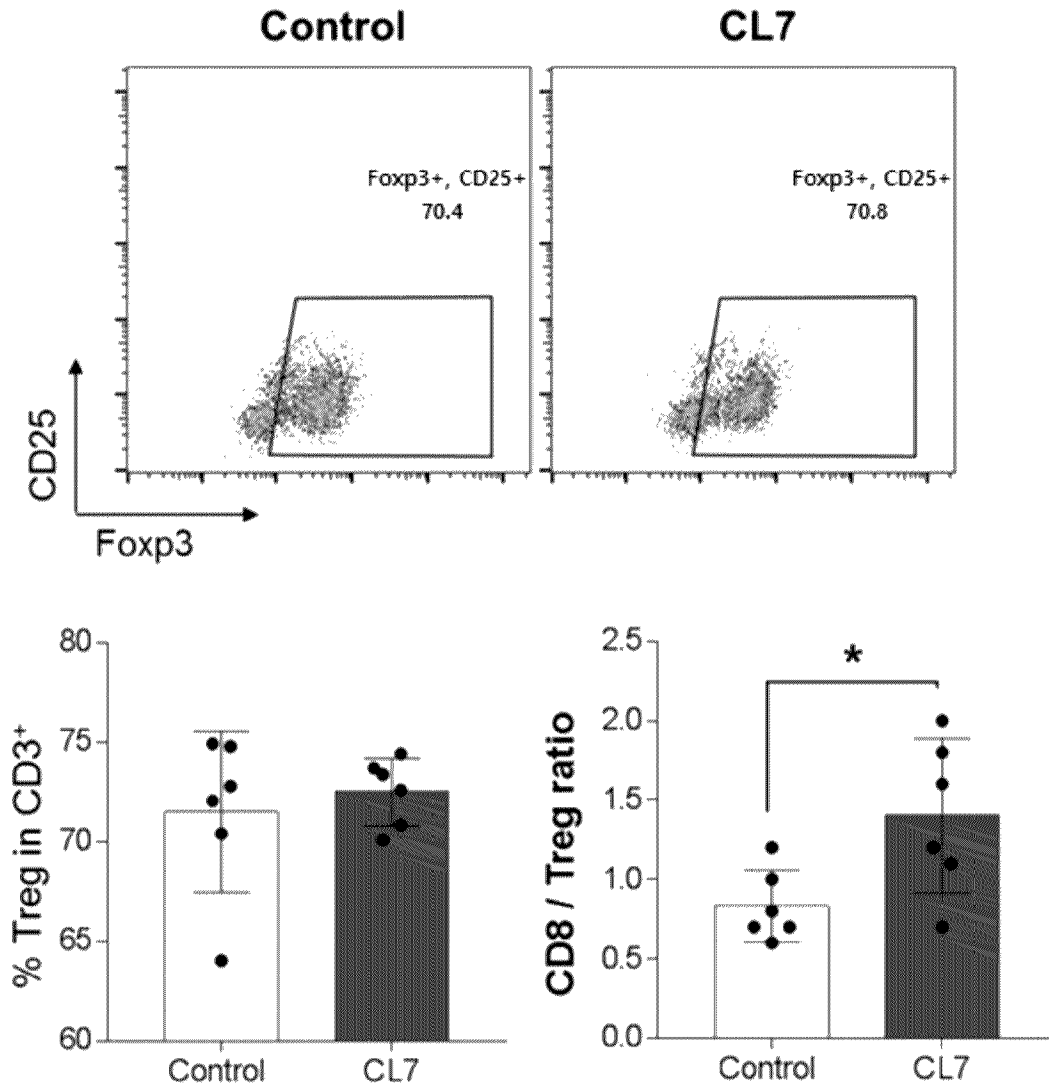
[도 16]



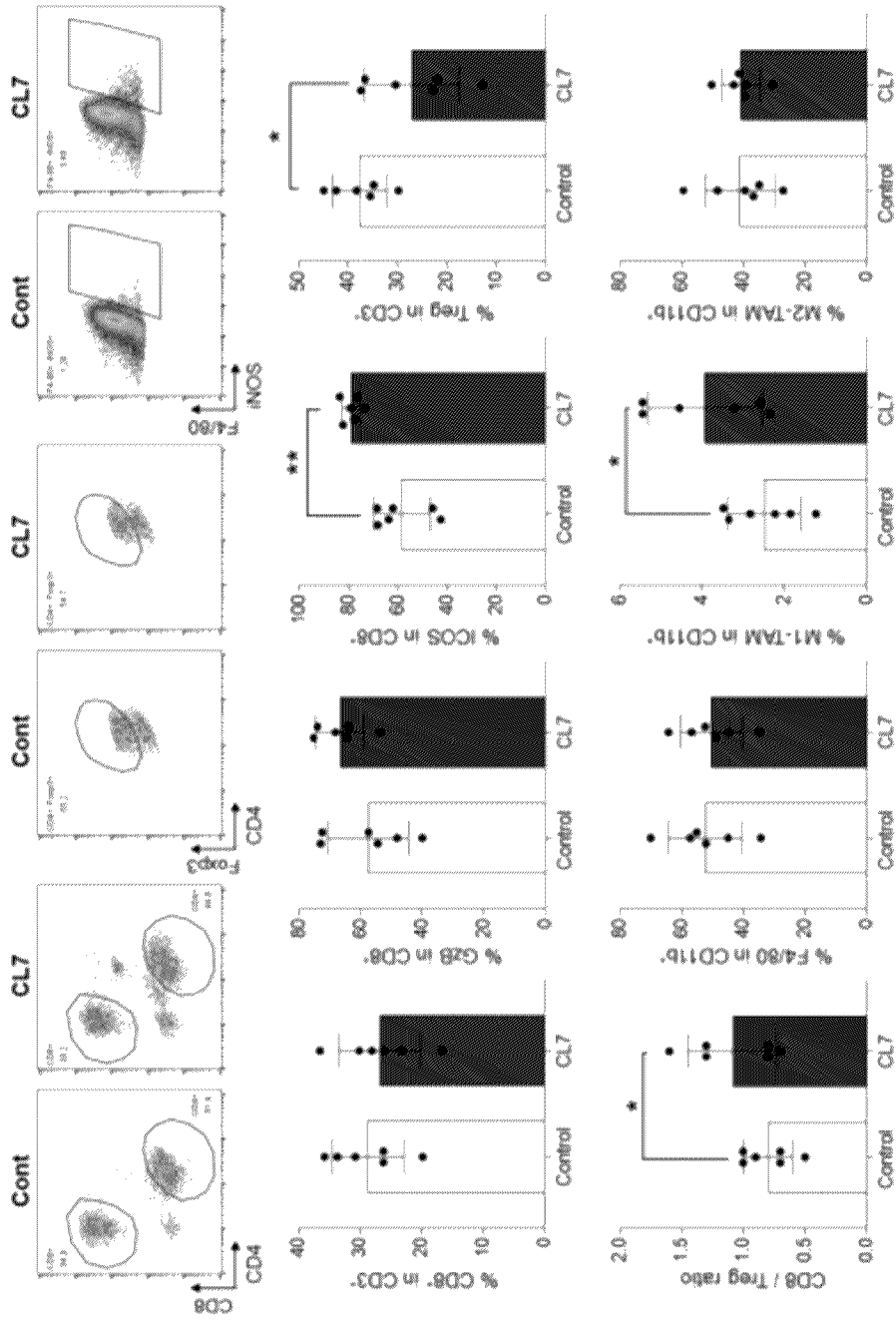
[도17]



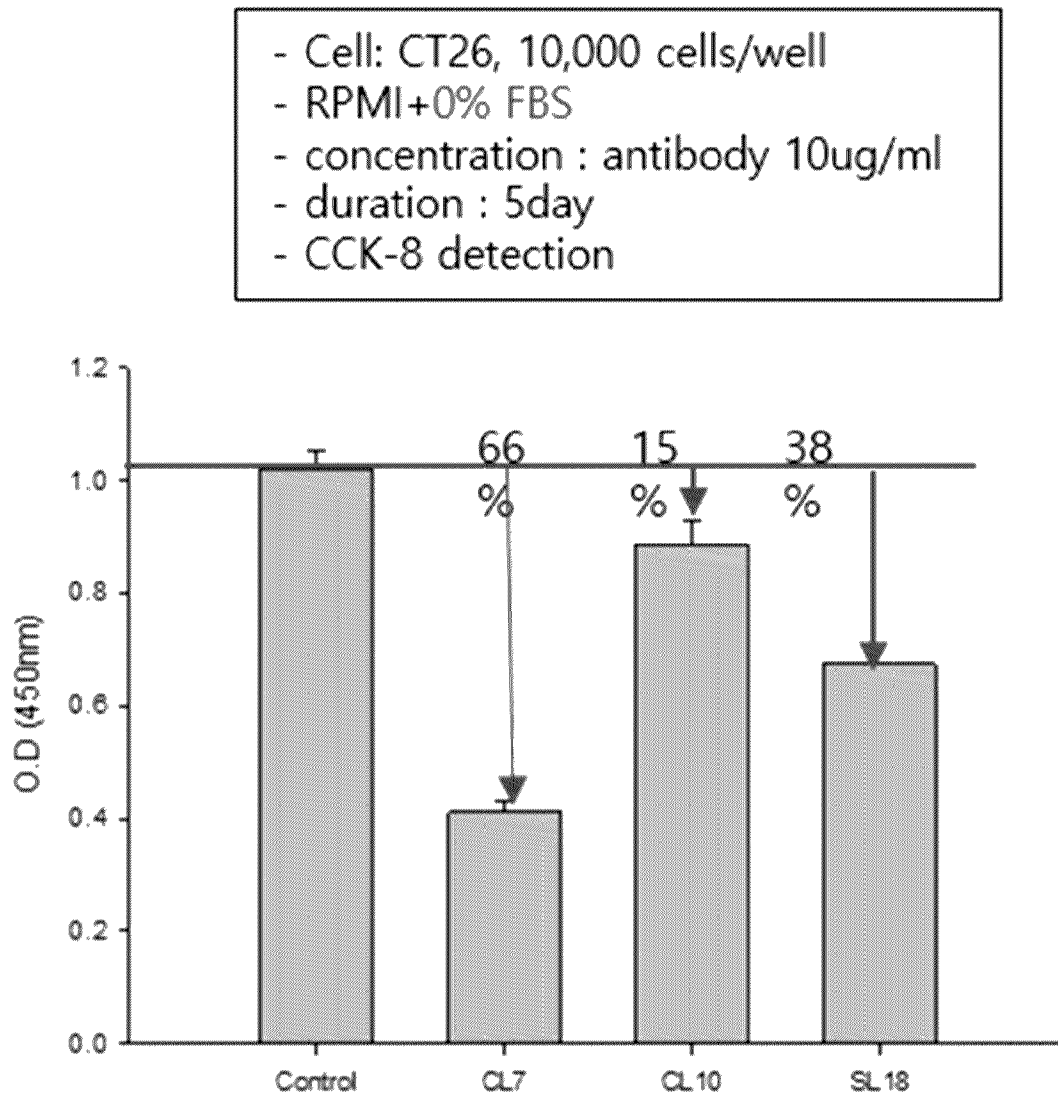
[도 18]



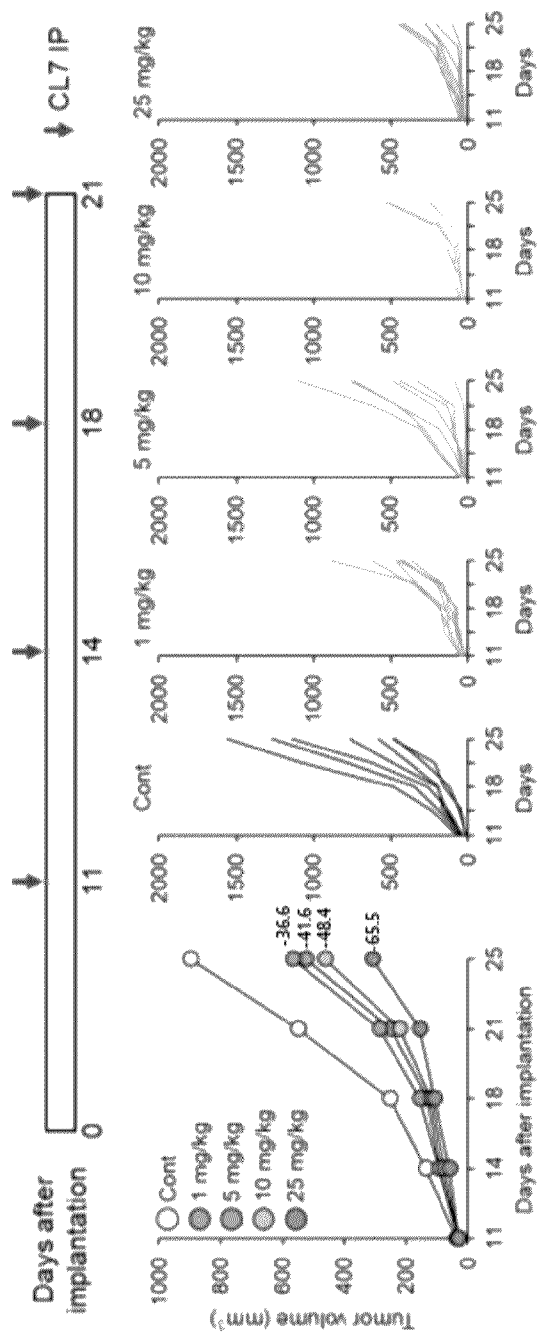
[도 19]



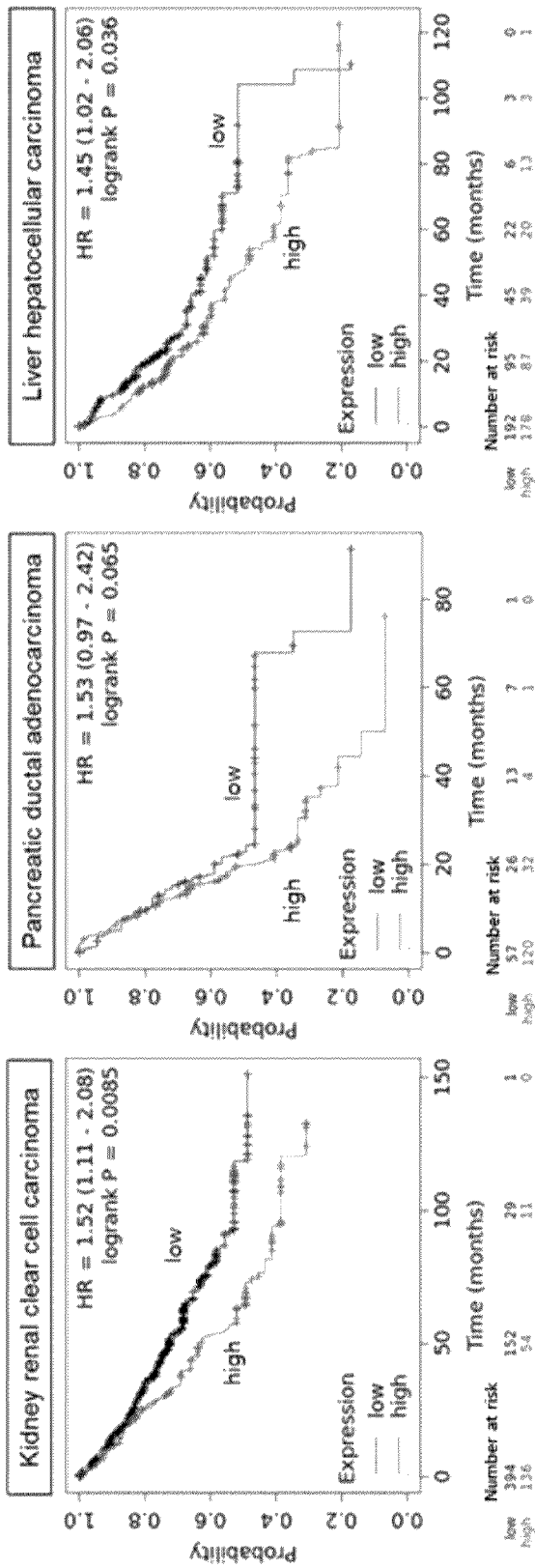
[도20]



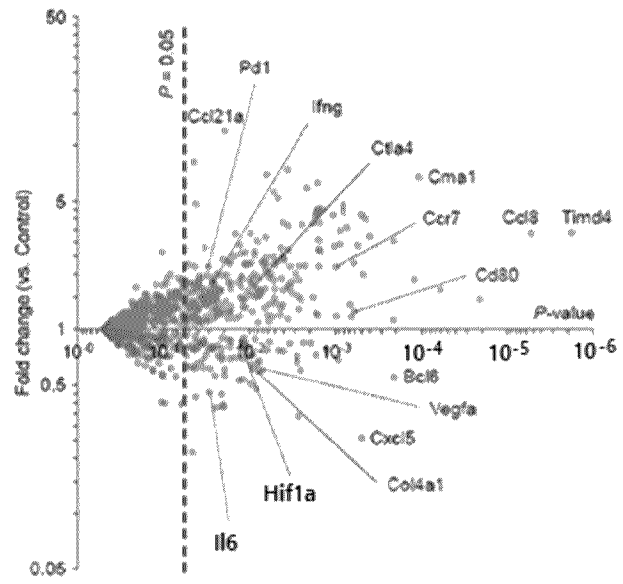
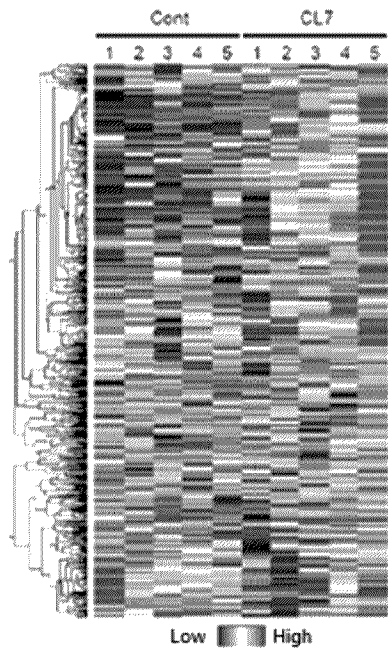
[도21]



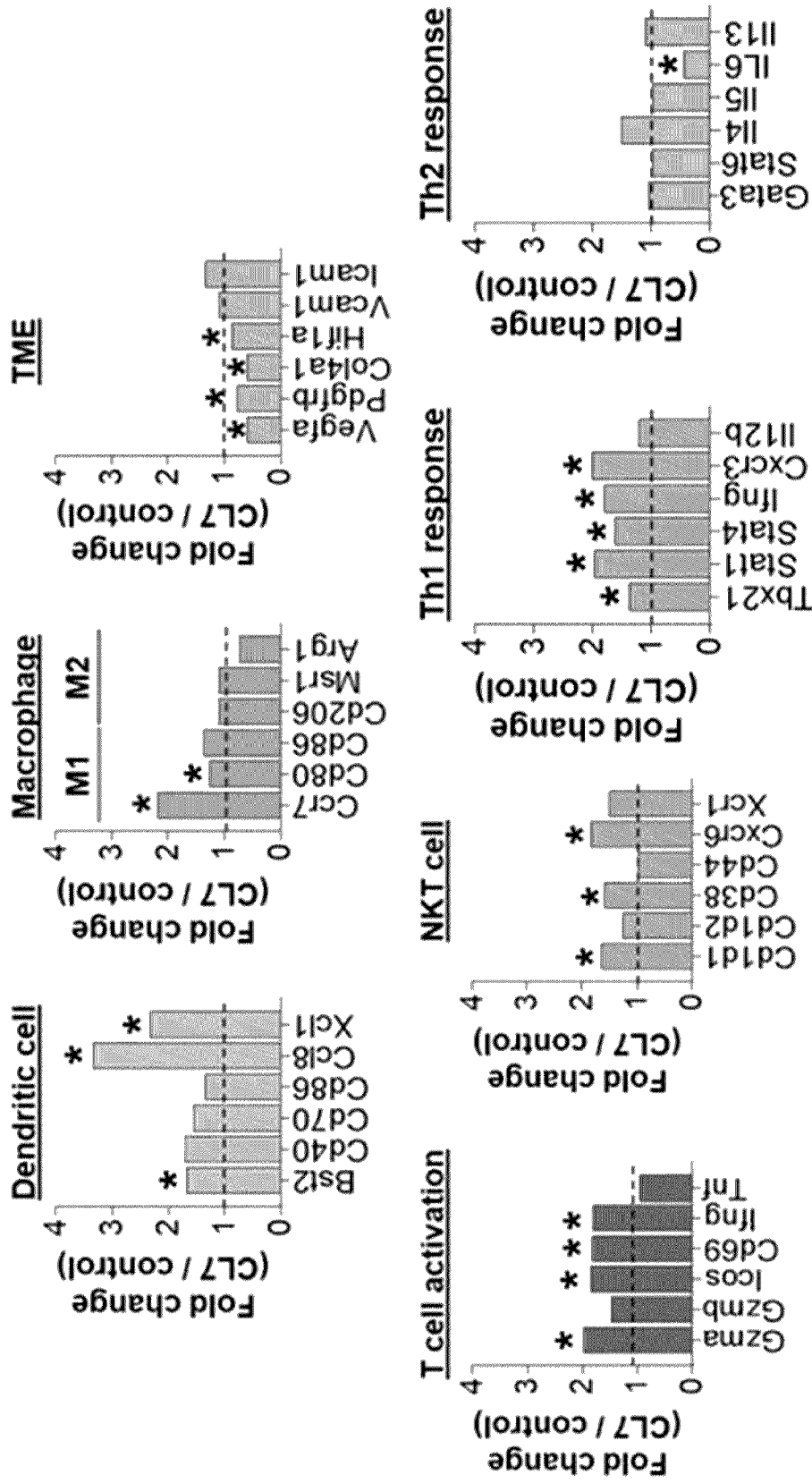
[도22]



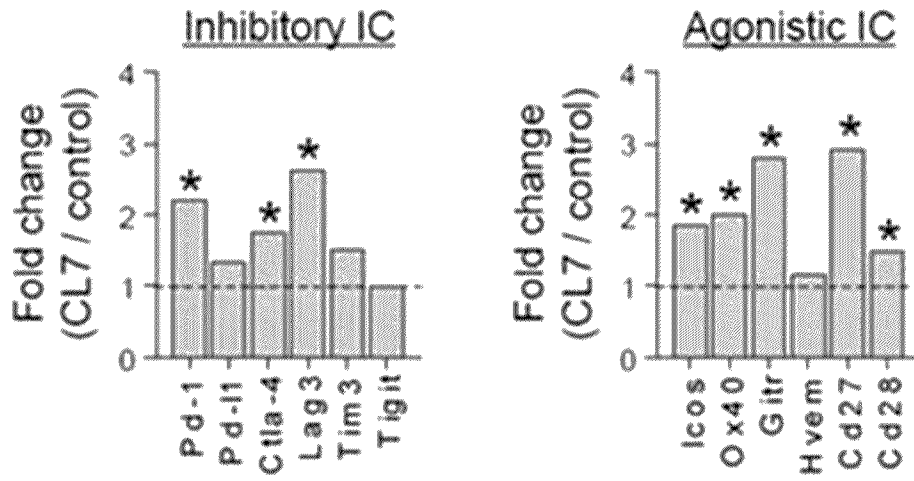
[도23]



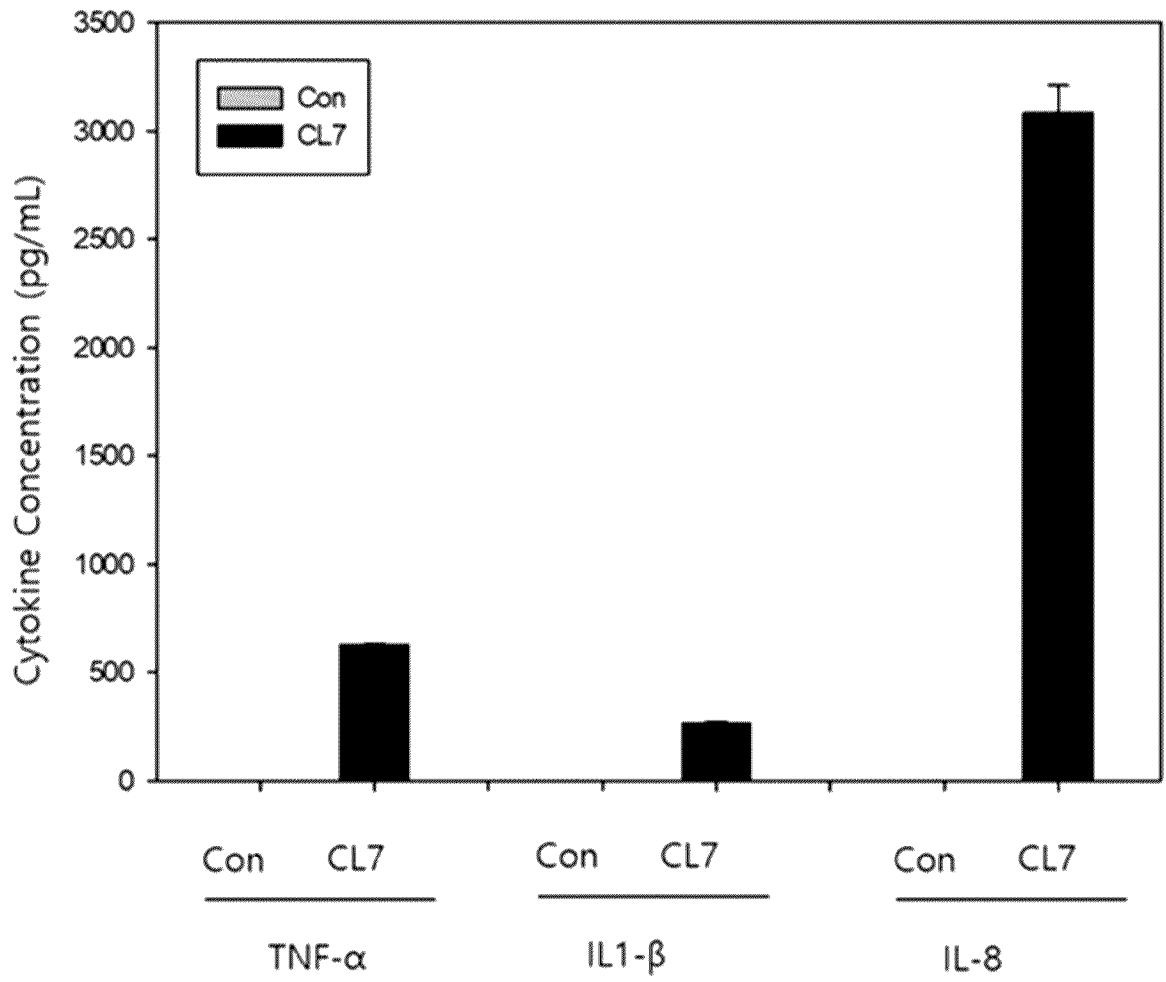
[도24]



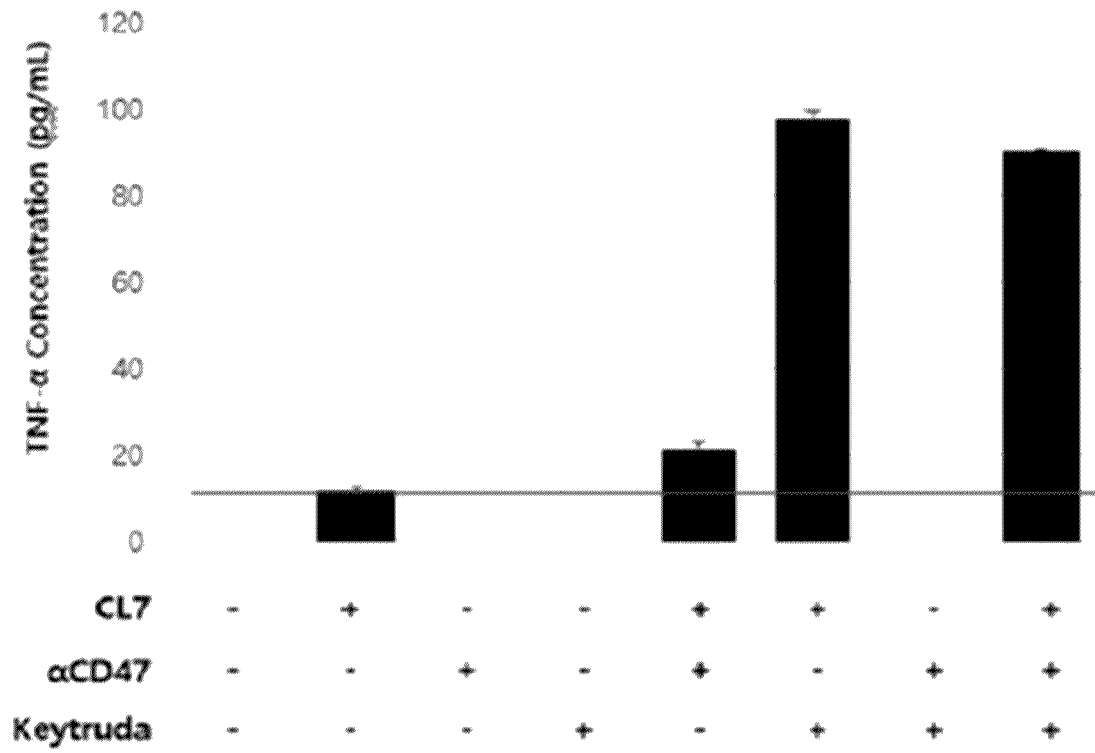
[도25]



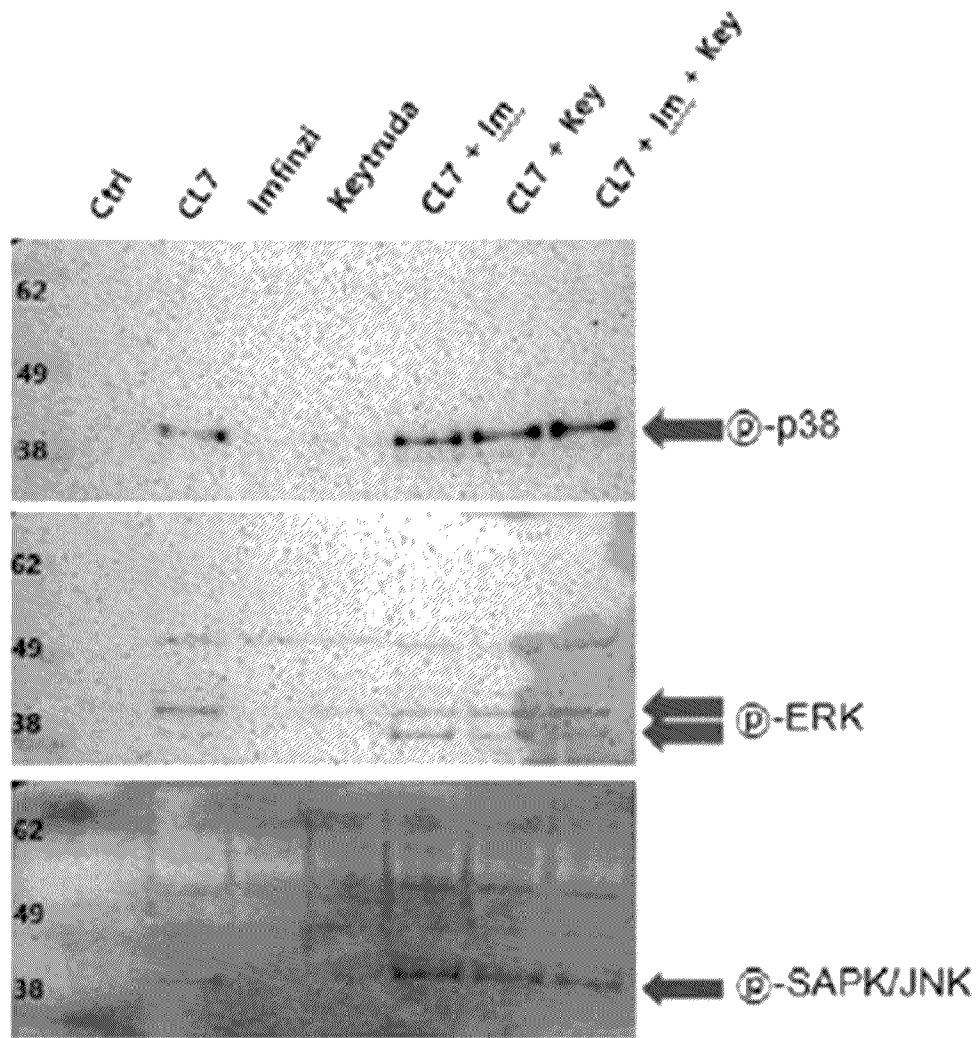
[도27]



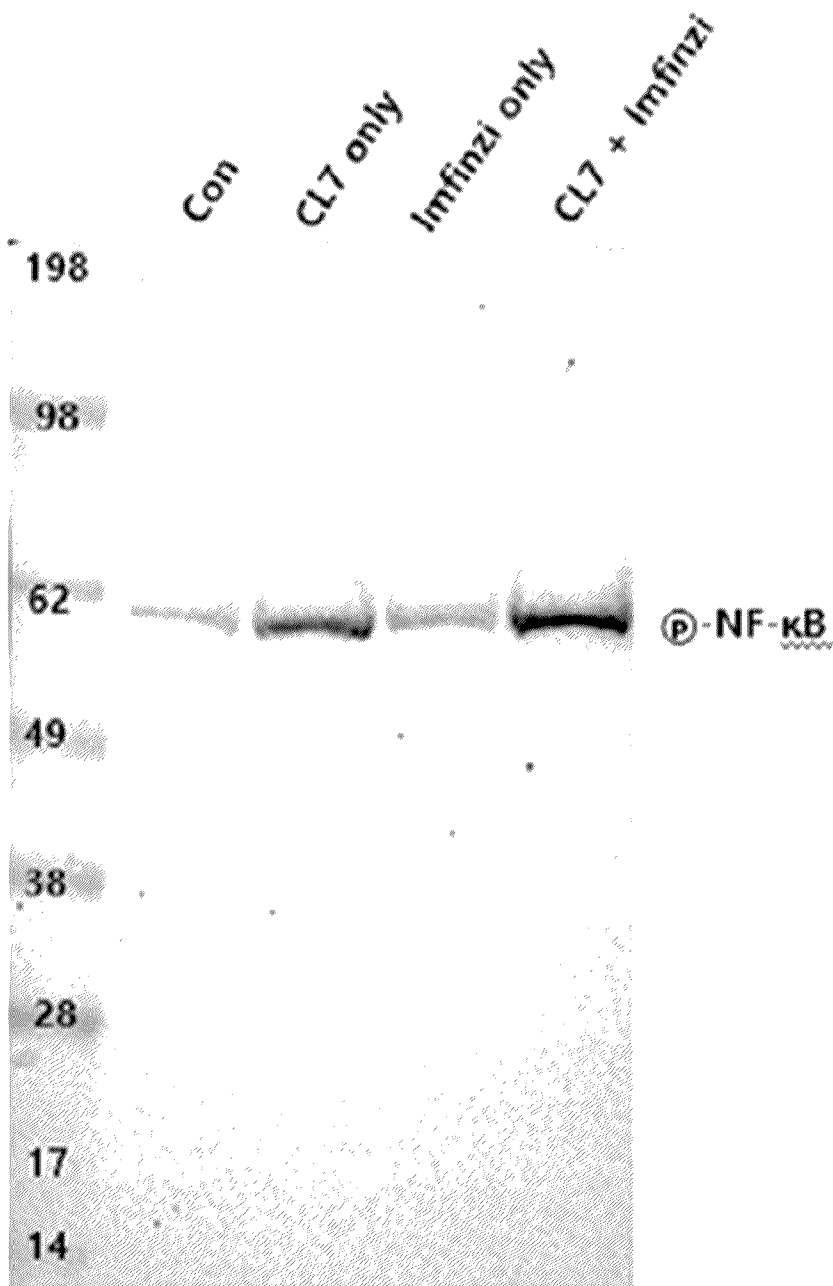
[도28]



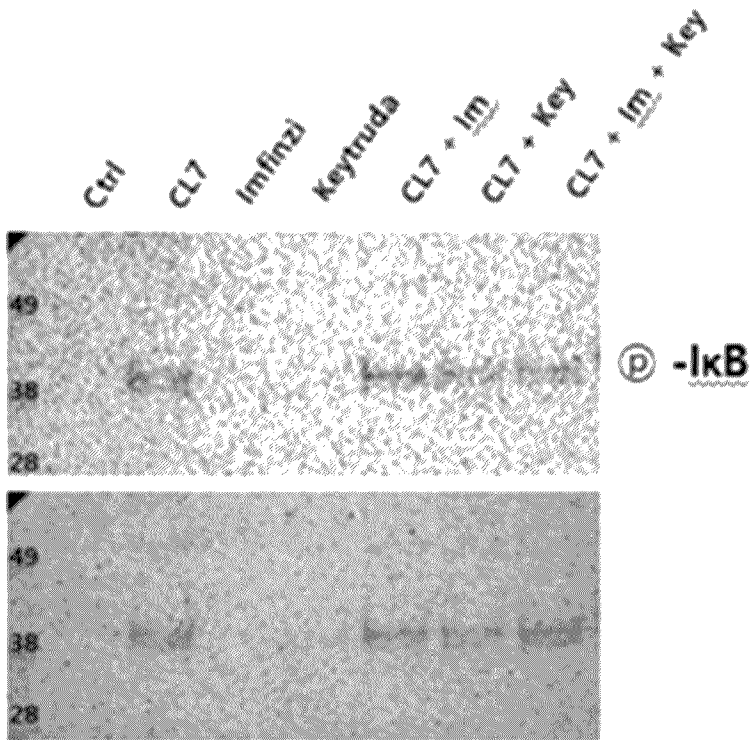
[도29]



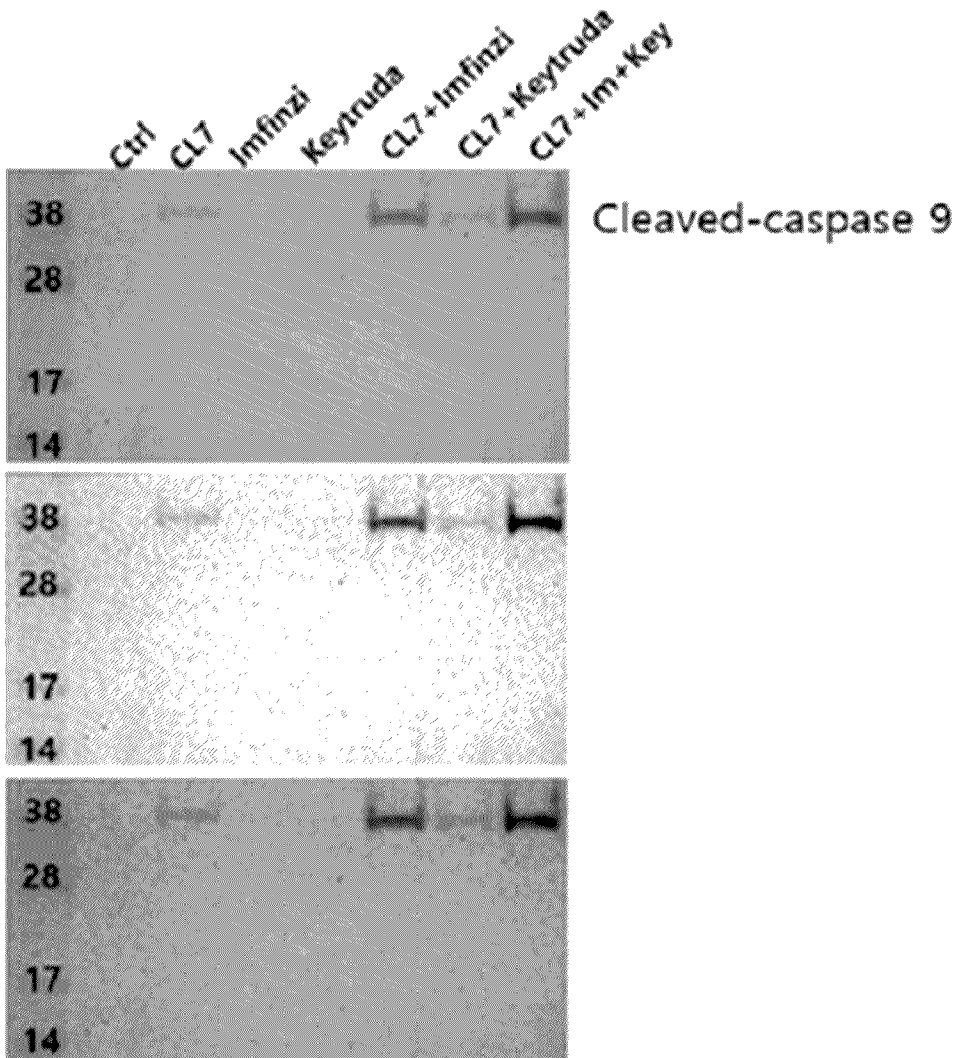
[도30]



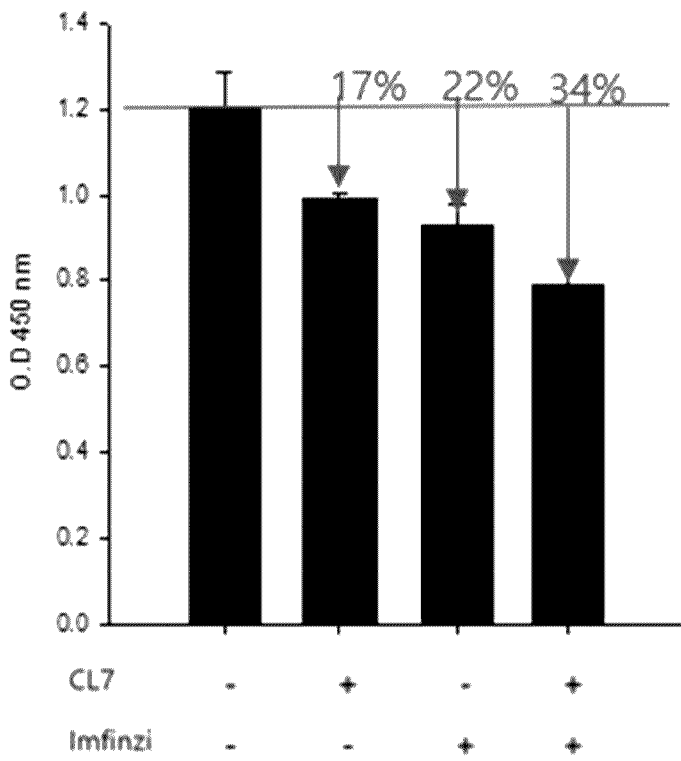
[도31]



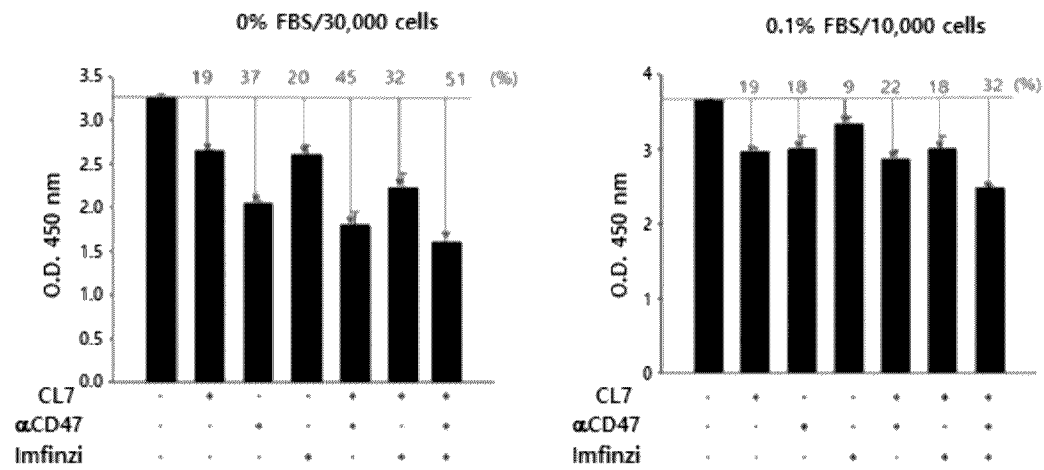
[도32]



[도33]

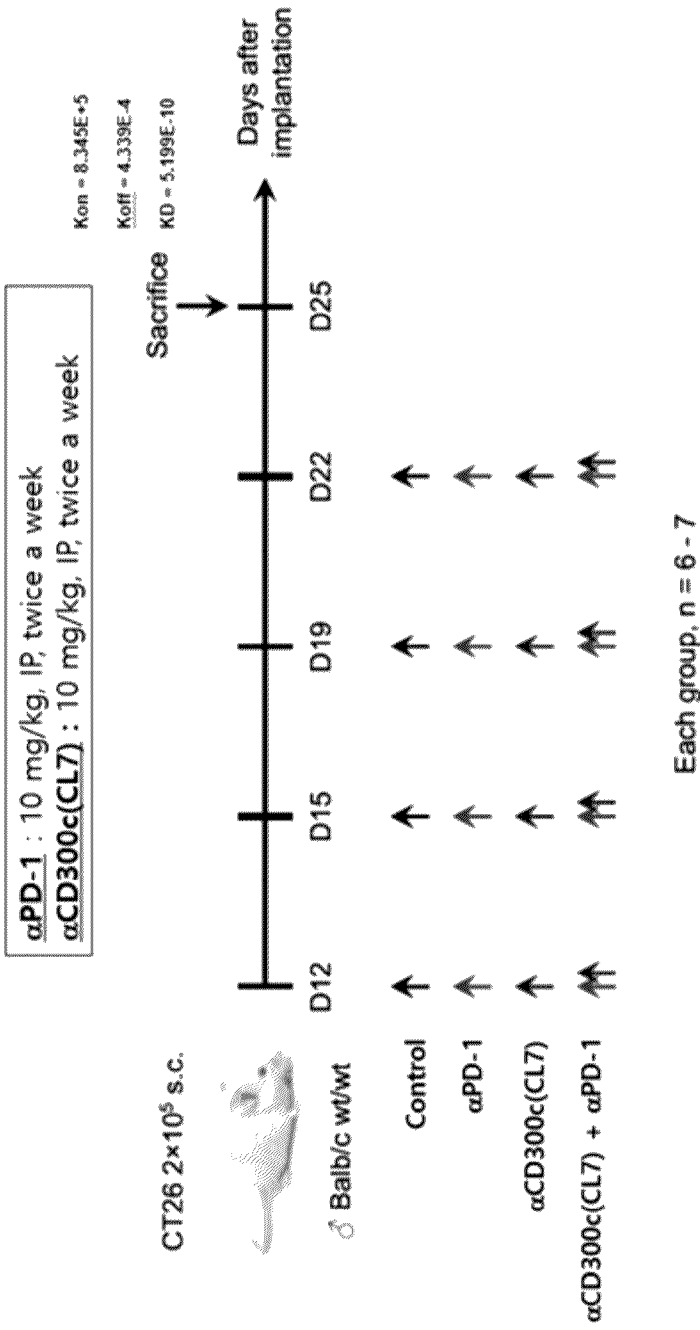


[도34]

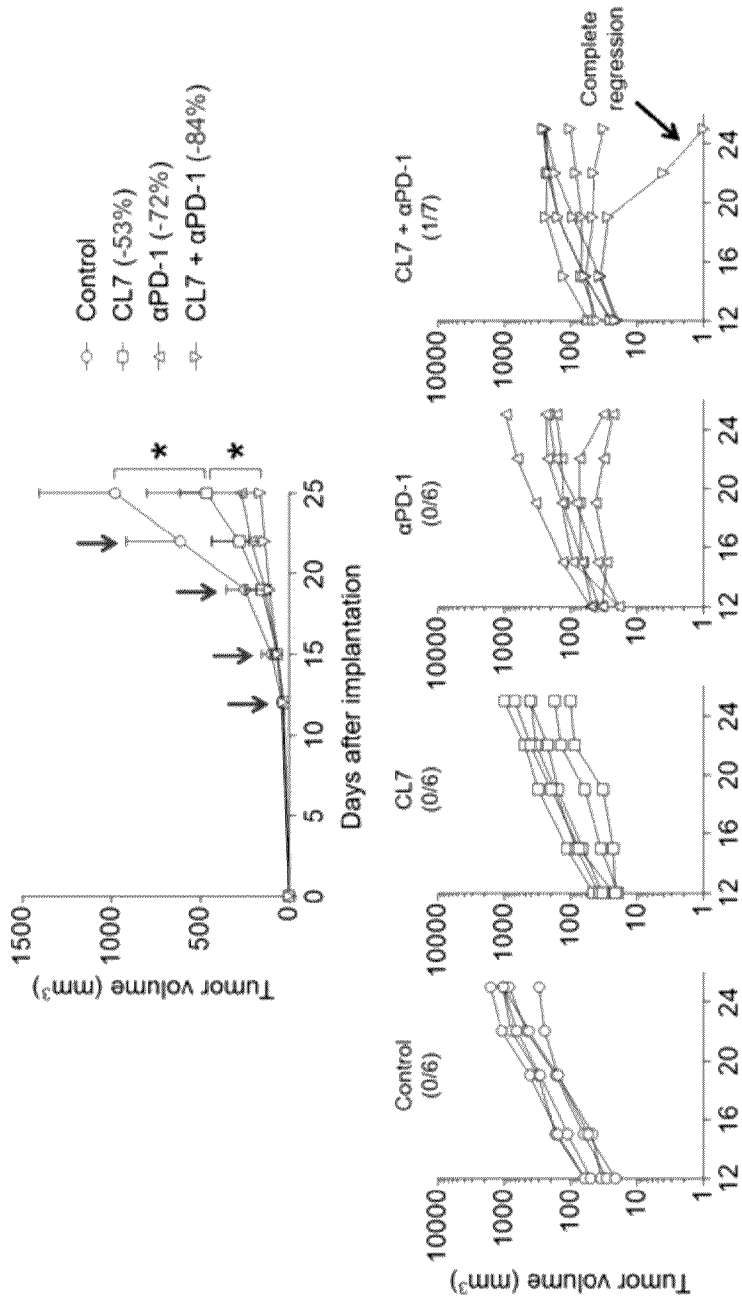


[도35]

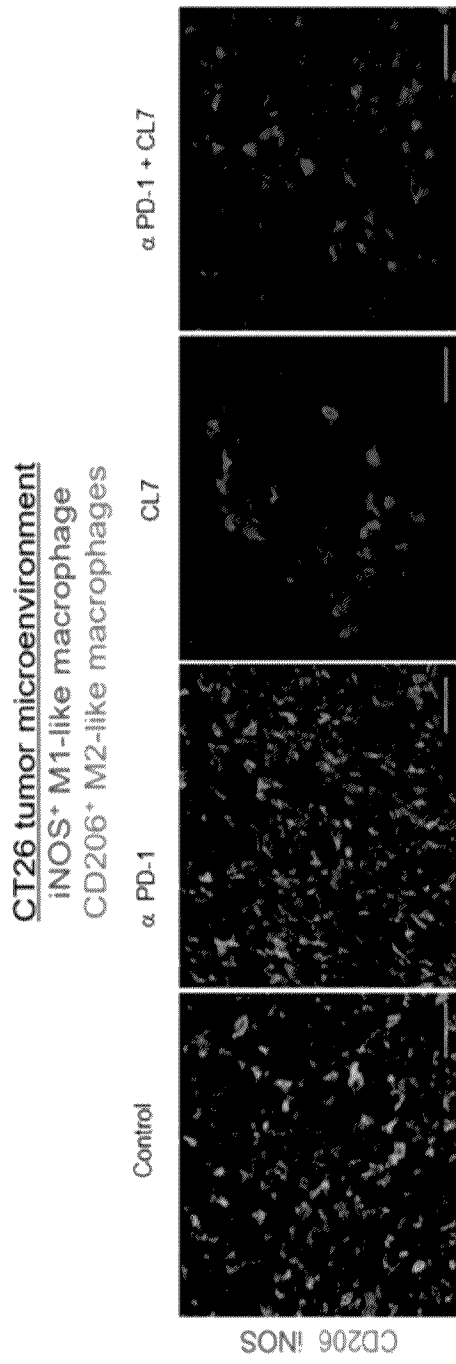
CL7의 항암효과를 생체내 조건(in vivo)에서 확인 - 대장암 세포주CT26



[도36]

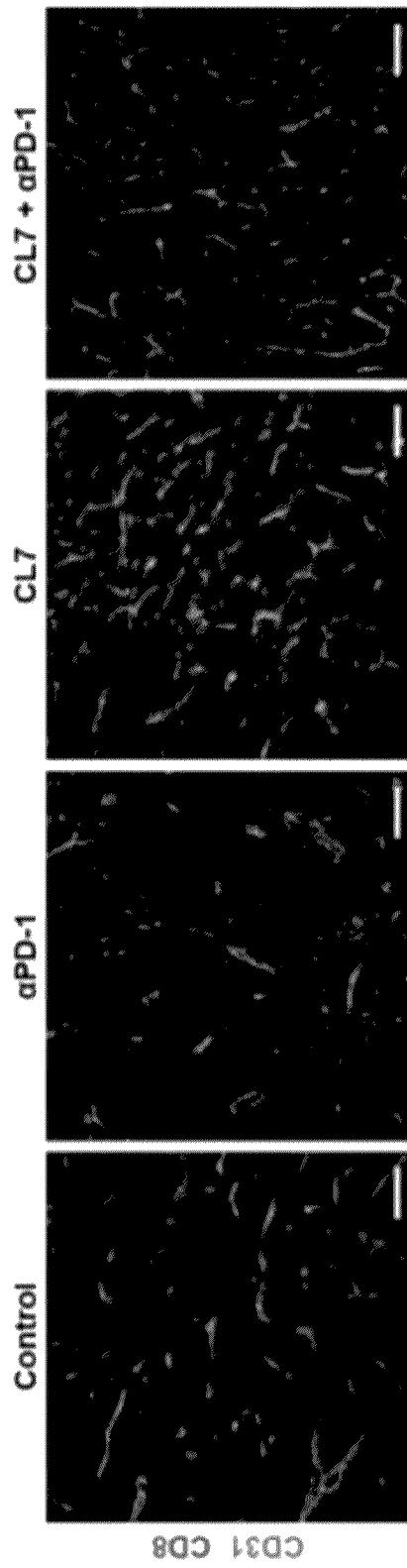


[도37]

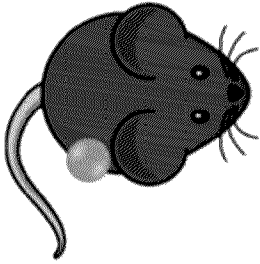


Scale bars, 50 μm

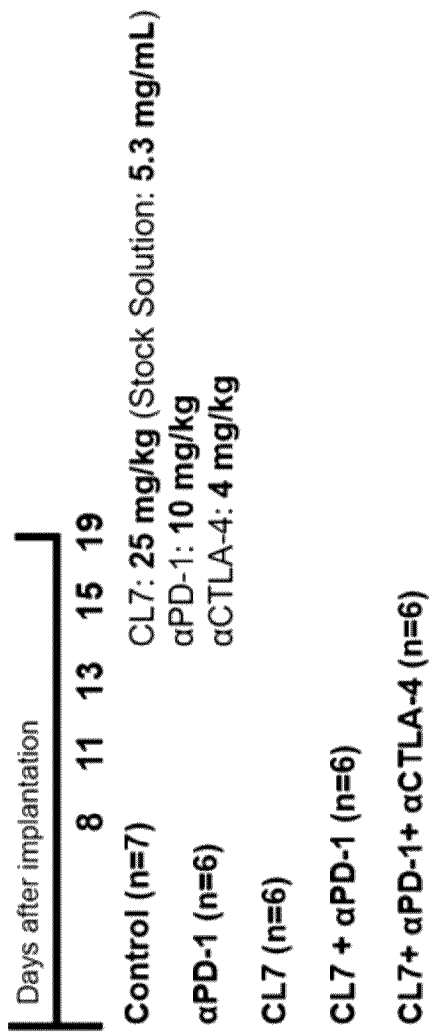
[도38]



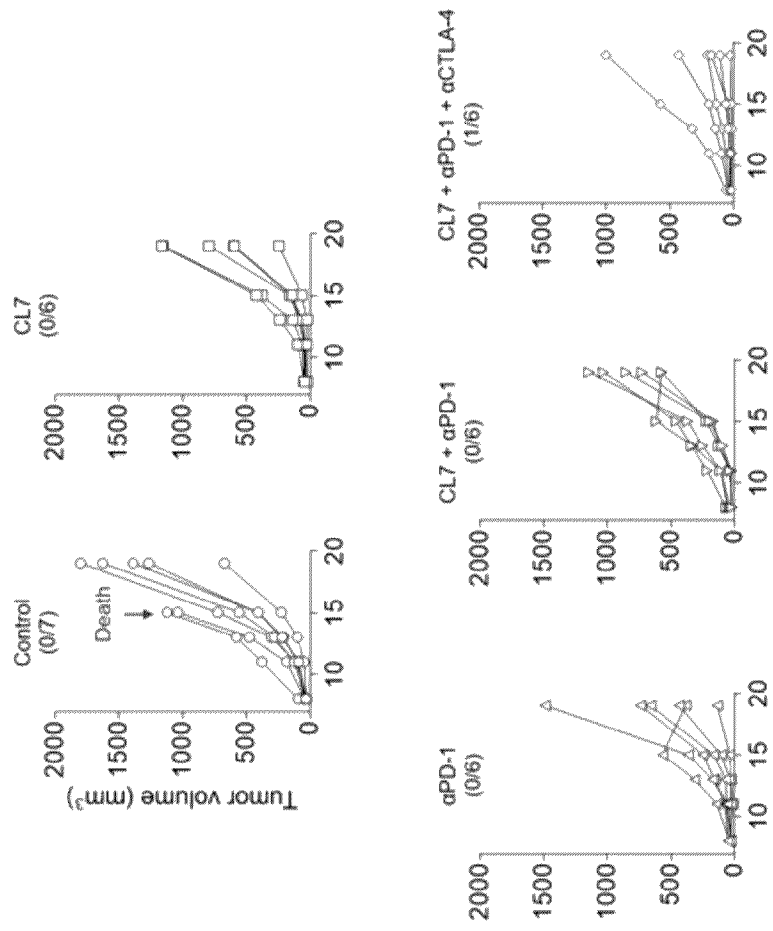
[도39]

B16F107 × 10⁵ /s.c.

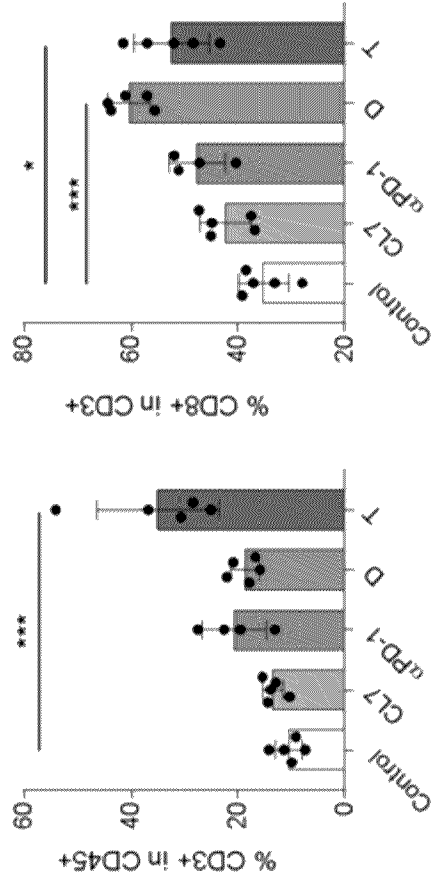
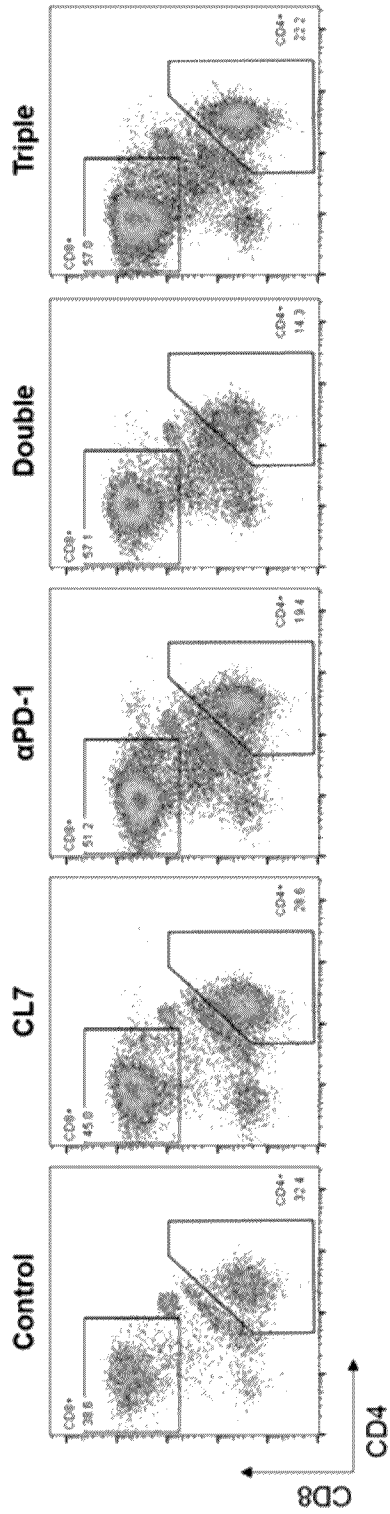
♂ C57BL/6



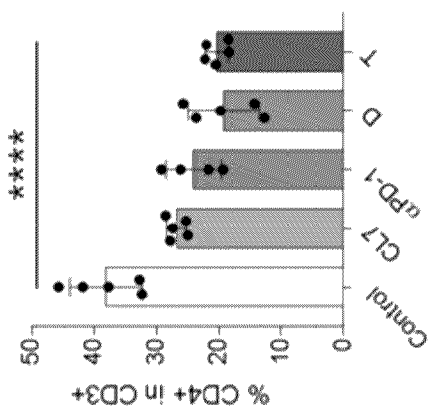
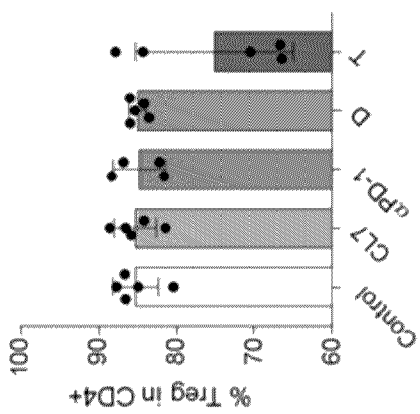
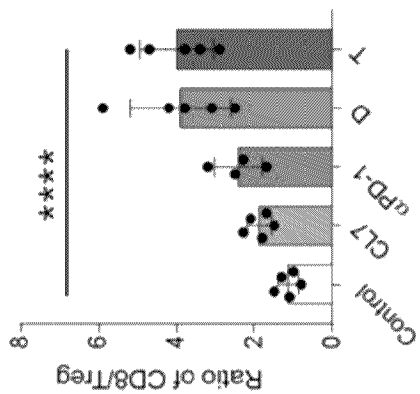
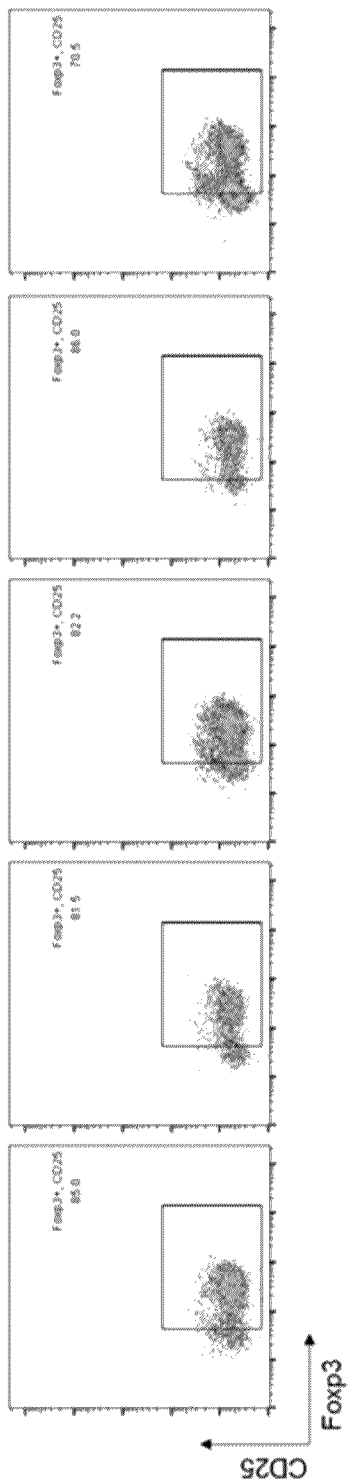
[도40]



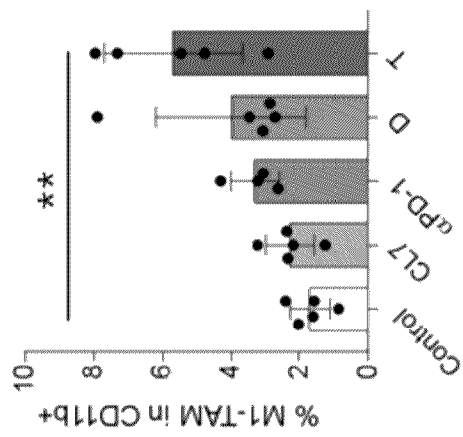
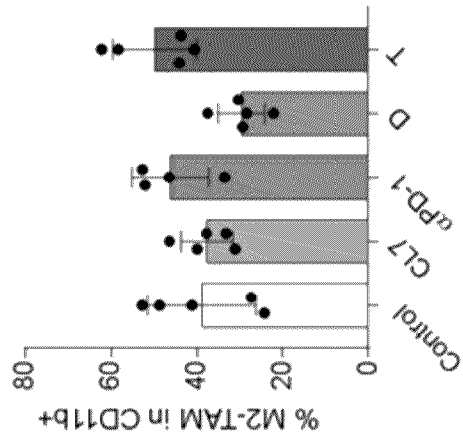
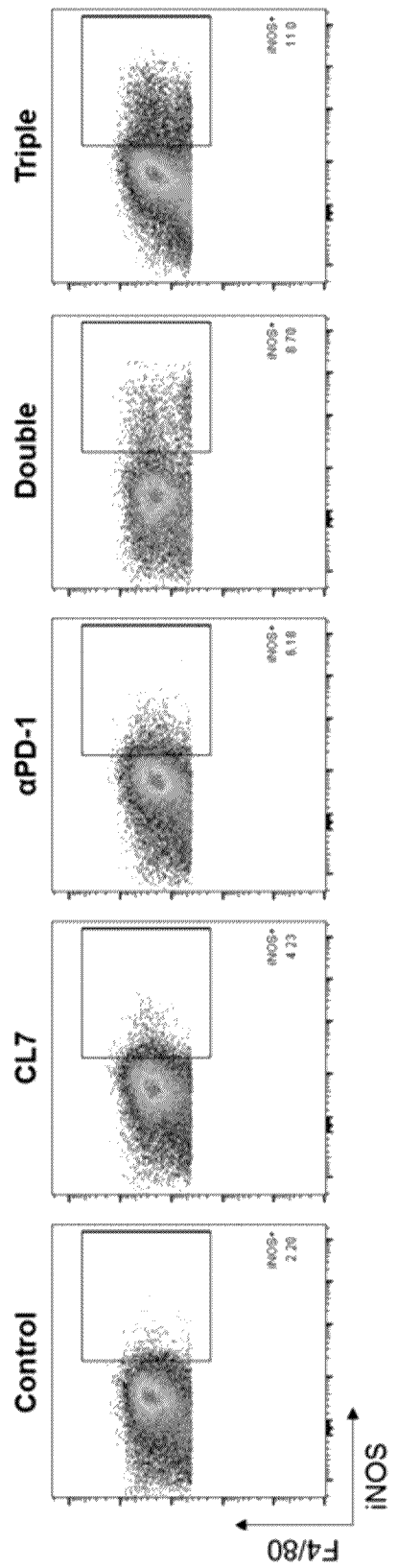
[도41]



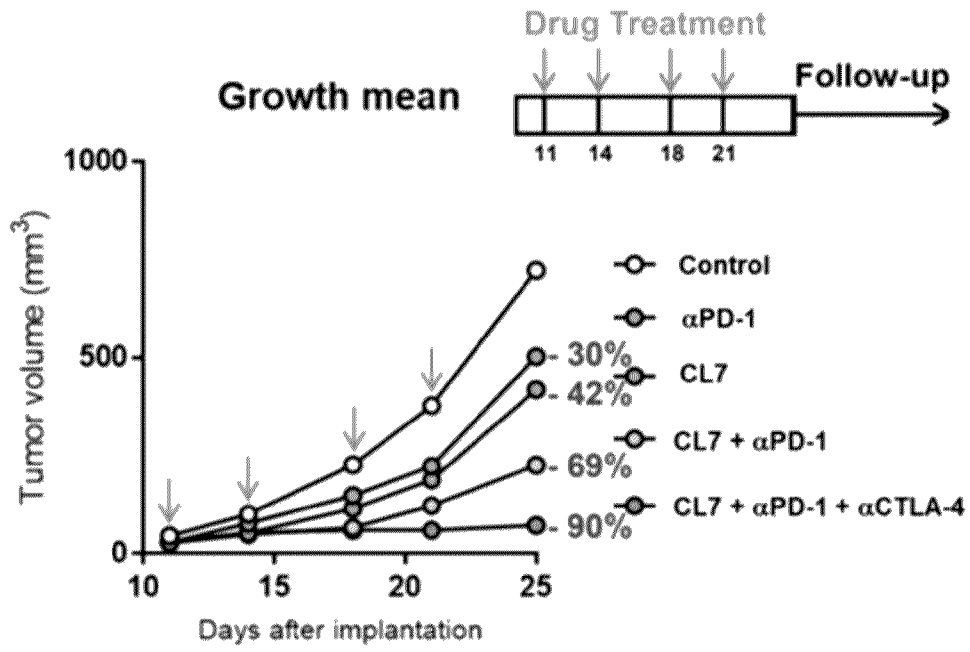
[도42]



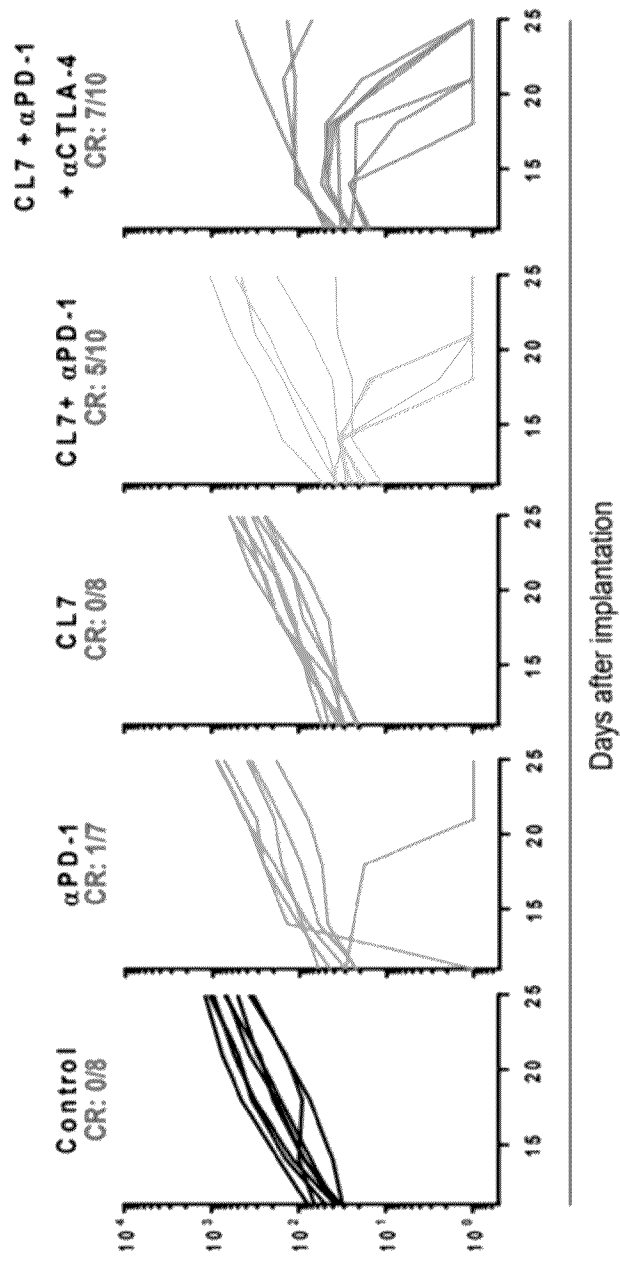
[도43]



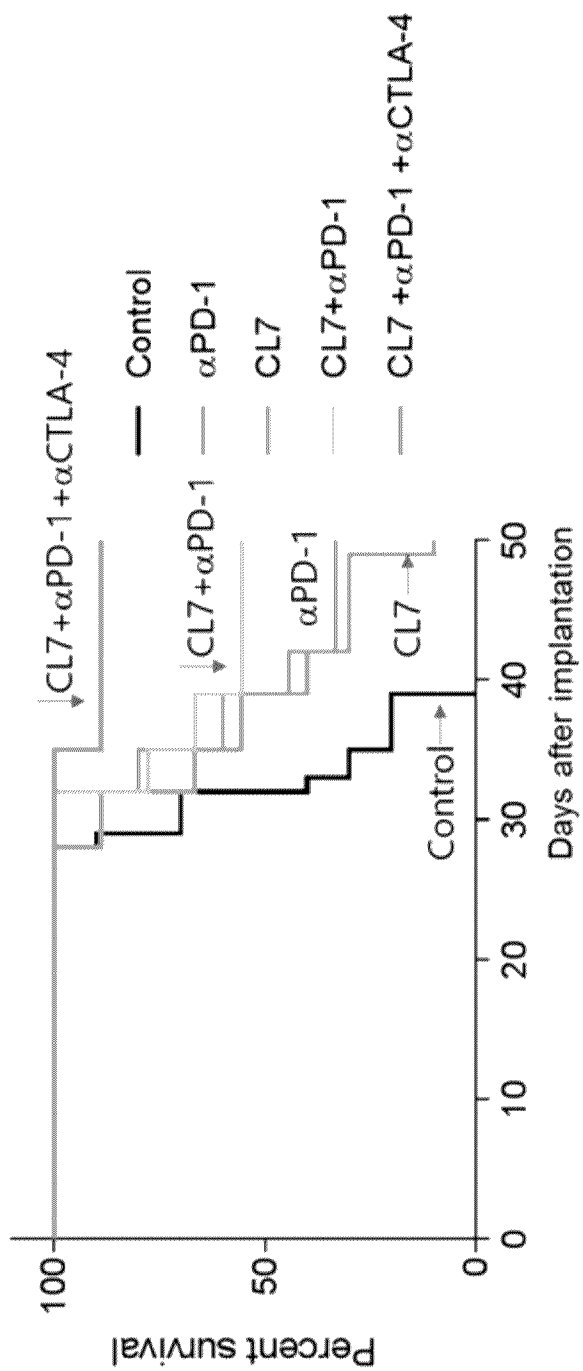
[도44a]



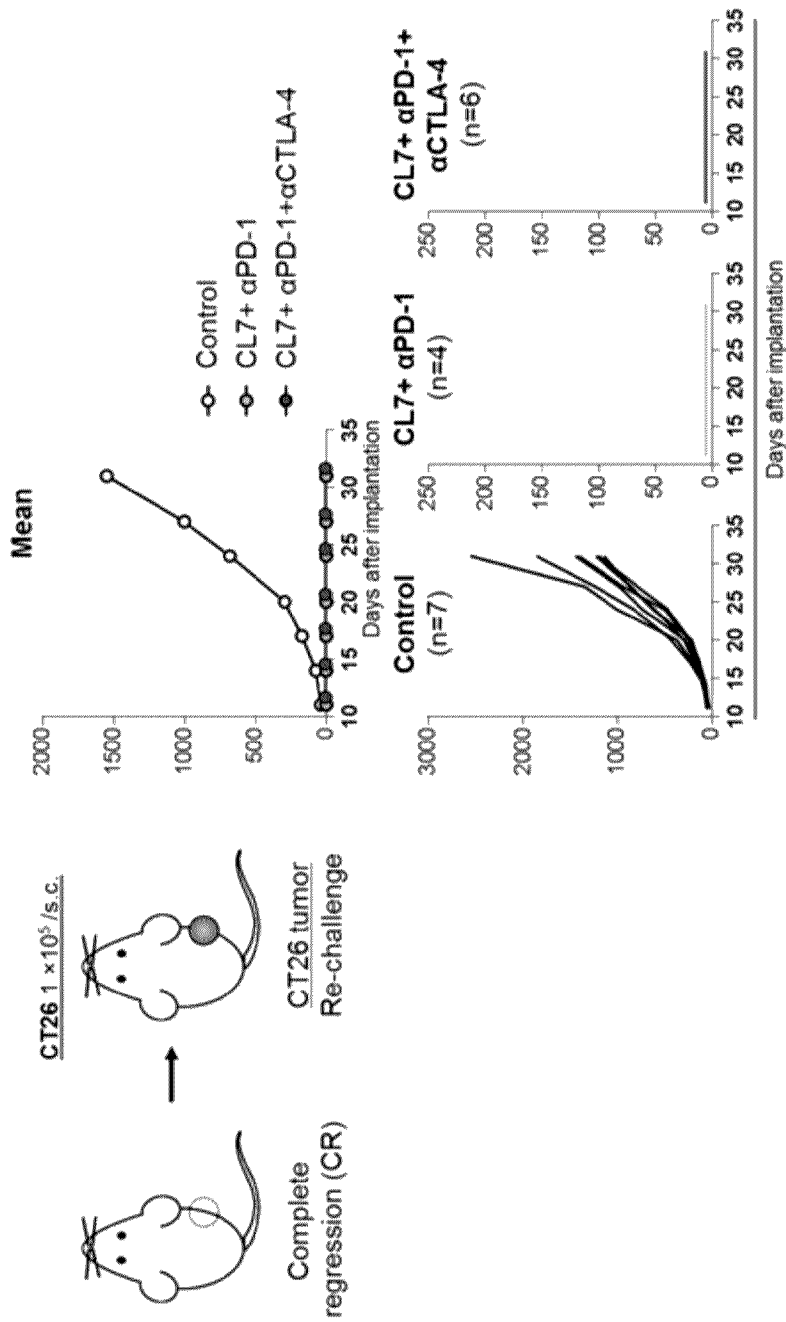
[도44b]



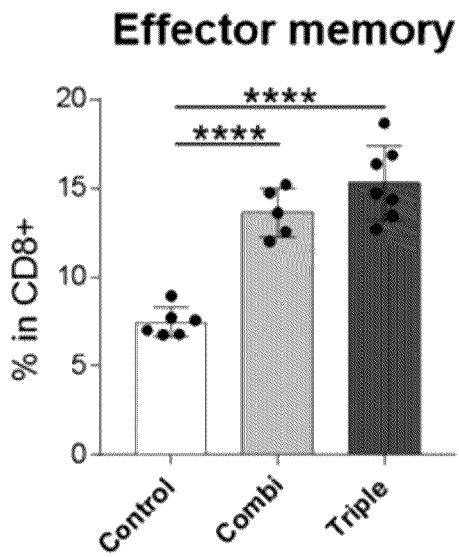
[도45]



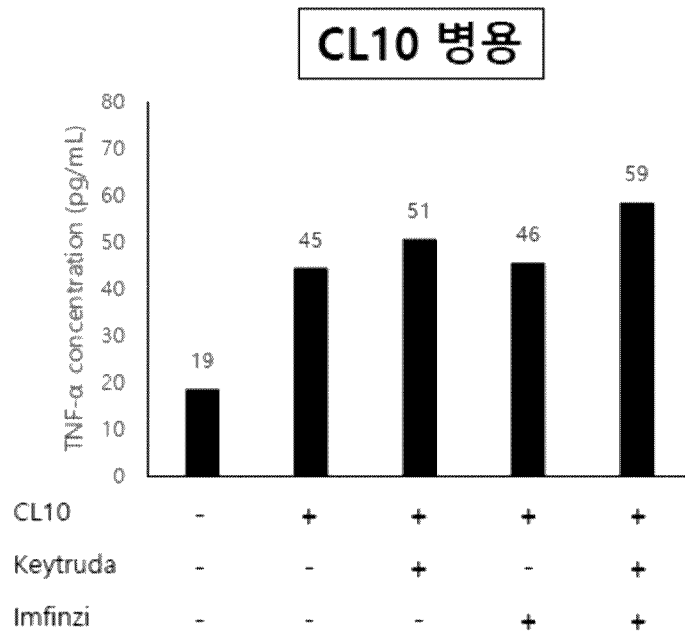
[도46]



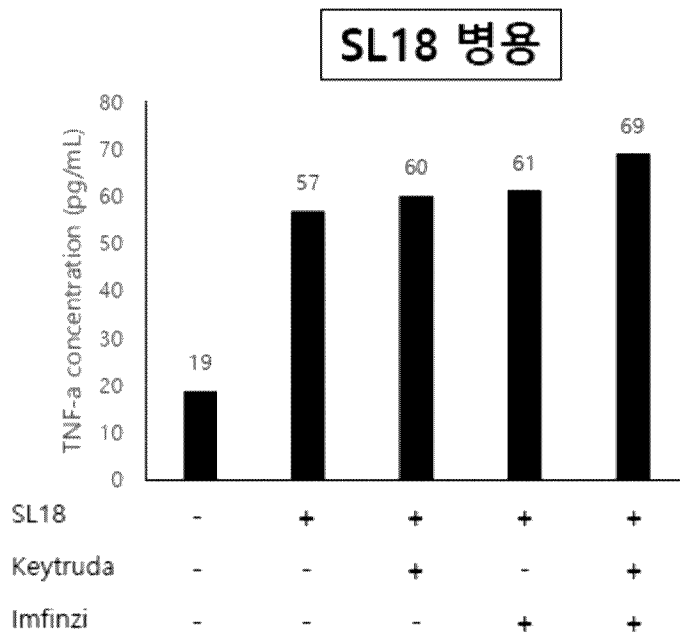
[도47]



[도48a]

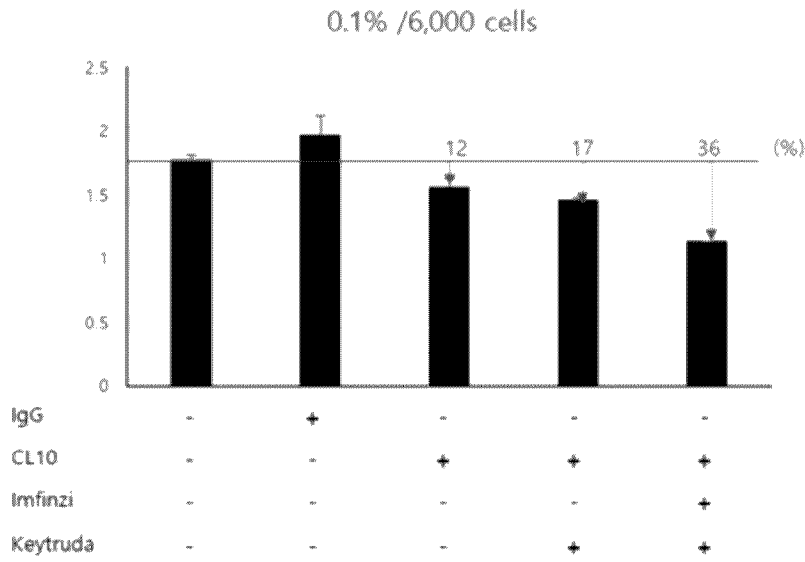


[도48b]



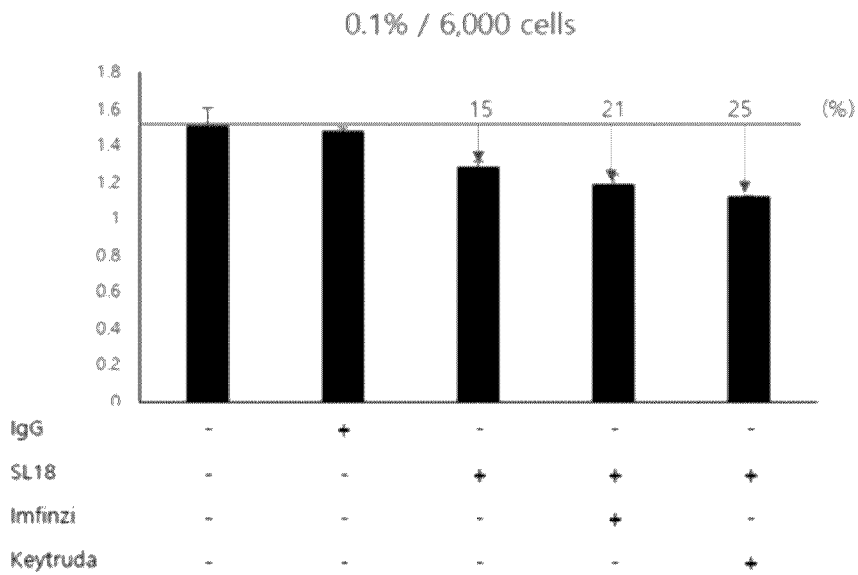
[도49a]

CL10 병용



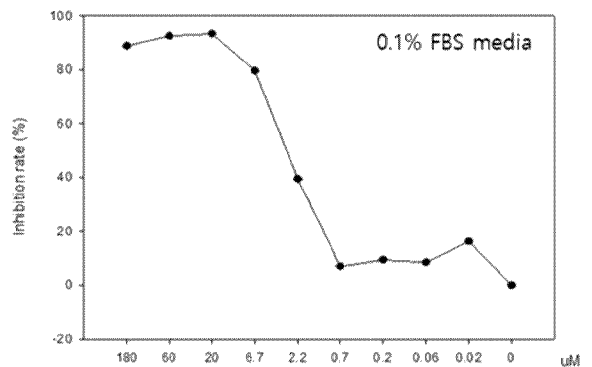
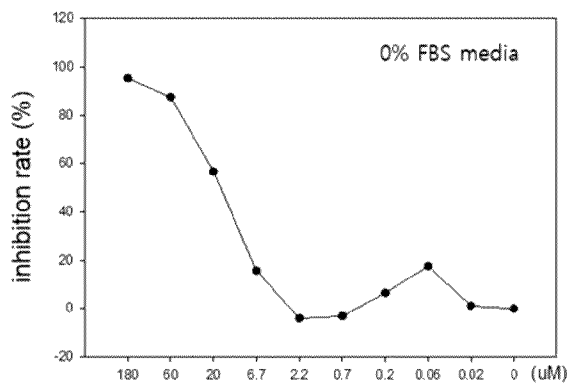
[도49b]

SL18 병용



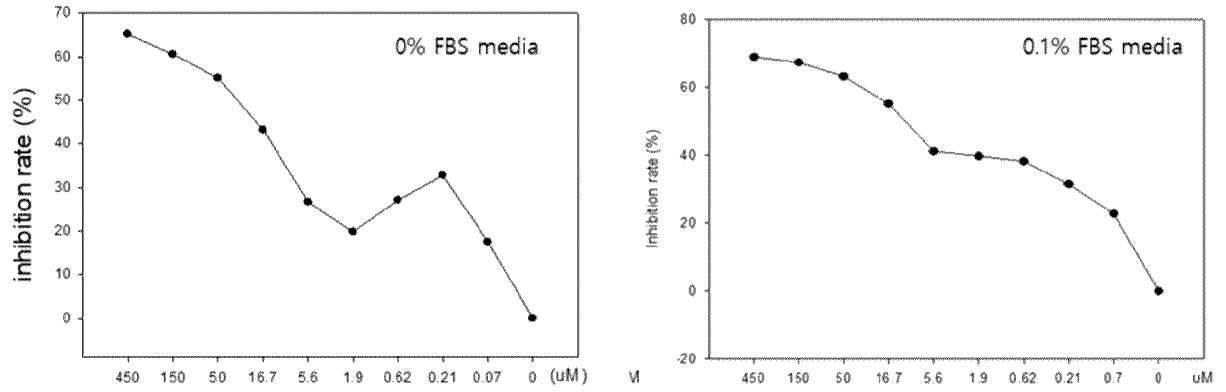
[도50]

Sorafenib



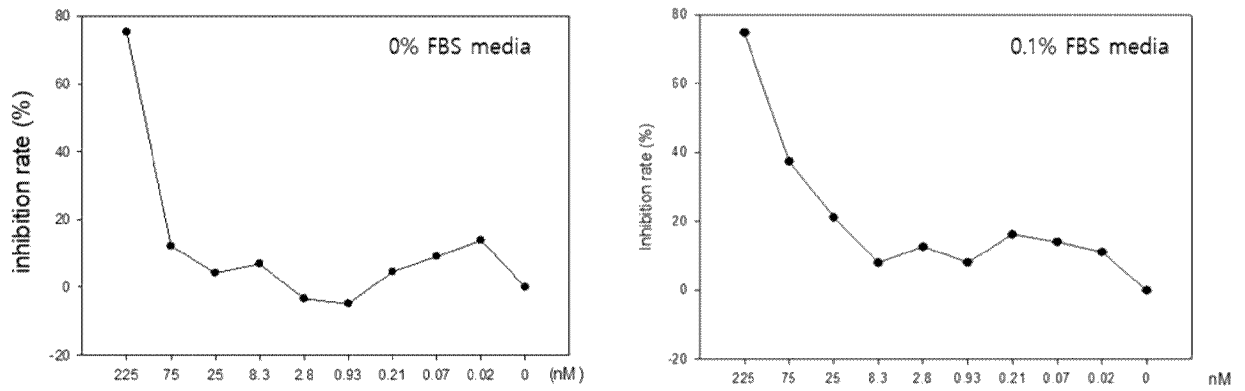
[도51]

Gemcitabine

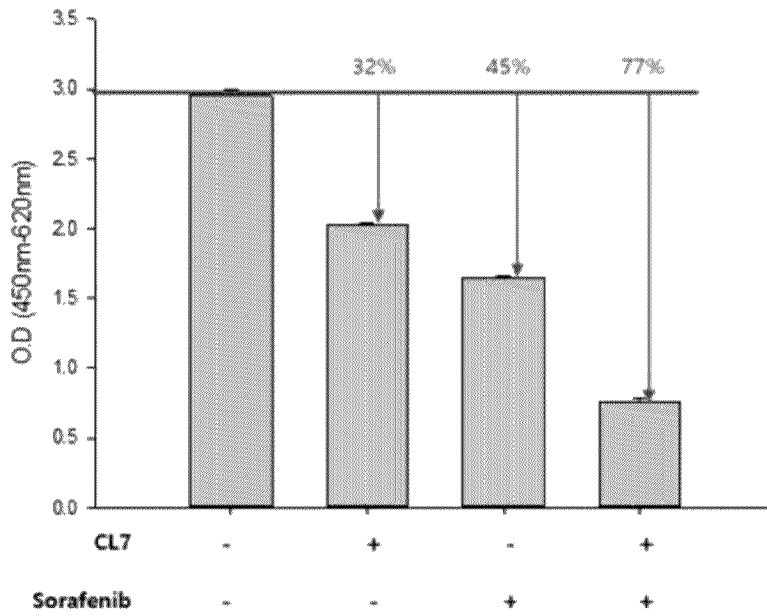


[도52]

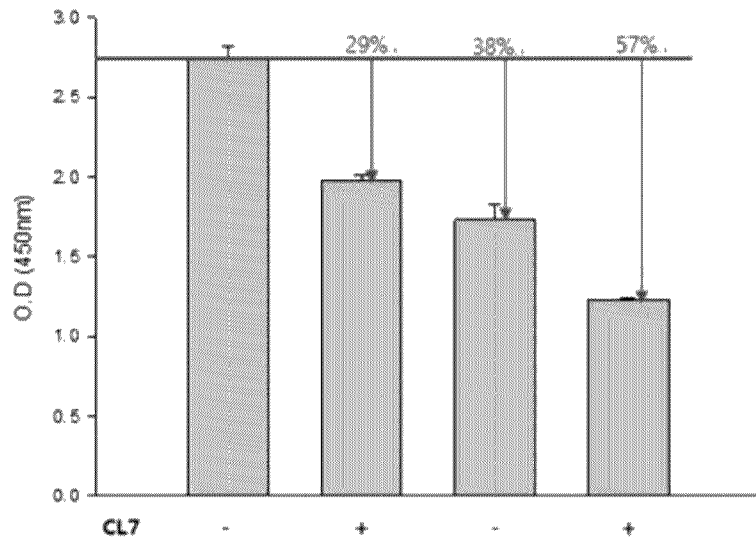
Paclitaxel



[도53]

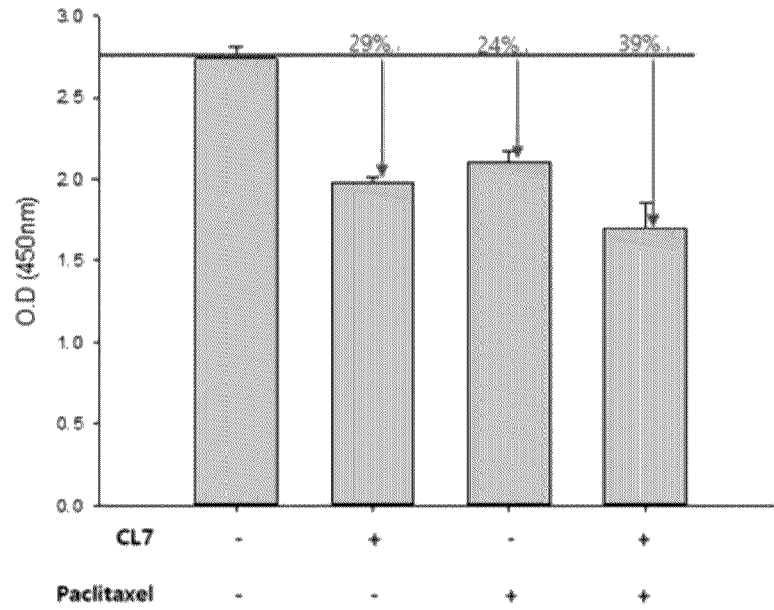


[도54]



Gemcitabine

[도55]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/006938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 45/06(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); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 16/22(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12Q 1/6886(2018.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 항-CD300c 항체(anti-CD300c antibody), 항암제(anti-cancer drug), CDR, 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region), 경쇄 가변 영역(light chain variable region), 치료 반응성(treatment responsiveness), 마커(marker), 발현(expression)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DX	KR 10-2019-0136949 A (CENTRICSBIO, INC.) 10 December 2019 (2019-12-10) See claims 1-7; and paragraphs [0003], [0010]-[0012] and [0049]-[0088].	1-2,8,10-20,31,37-38
DY		32-36
DA		3-7,9
Y	KR 10-2019-0016025 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) et al.) 15 February 2019 (2019-02-15) See abstract; claims 1-3 and 12-14; and paragraphs [0074]-[0081] and [0088].	32-36
X	WO 2020-014097 A1 (UNIVERSITY OF CONNETICUT) 16 January 2020 (2020-01-16) See claims 1-3 and 16; and page 24, line 27-page 26, line 16.	1-2,8,10-20,31,37-38
Y		32-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 18 August 2022		Date of mailing of the international search report 19 August 2022
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/KR2022/006938

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CUI, C. et al. A CD300c-Fc fusion protein inhibits t cell immunity. <i>Frontiers in Immunology</i> . 15 November 2018, vol. 9, thesis no. 2657, pp. 1-14. See abstract; and pages 1, 3 and 11.	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36
X Y	US 2016-0194631 A1 (HARVARD MEDICAL SCHOOL) 07 July 2016 (2016-07-07) See abstract; claims 1, 6-8 and 67; and paragraphs [0096], [0122], [0130] and [0184]-[0196].	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36
X Y	WO 2017-069958 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 27 April 2017 (2017-04-27) See claims 41, 48, 51-52, 58-59, 64 and 69; and table 13c.	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36

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

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

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **21-30**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 21-30 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/006938

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
		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
		KR 10-2021-0136894 A	17 November 2021
		KR 10-2320280 B1	29 November 2021
		US 2021-0238596 A1	05 August 2021
		WO 2019-231188 A1	05 December 2019
		KR 10-2019-0016025 A	15 February 2019
BR 112018072993 A2	06 March 2019		
CN 109690314 A	26 April 2019		
EP 3455631 A1	20 March 2019		
EP 3455631 B1	24 June 2020		
JP 2019-516979 A	20 June 2019		
JP 2022-027788 A	14 February 2022		
KR 10-2245021 B1	26 April 2021		
MX 2018013744 A	16 August 2019		
SG 11201809317 A	29 November 2018		
US 2019-0309369 A1	10 October 2019		
WO 2017-194556 A1	16 November 2017		
ZA 201807020 B	27 May 2020		
WO 2020-014097 A1	16 January 2020	CN 112469479 A	09 March 2021
		EP 3820571 A1	19 May 2021
		US 2021-0206849 A1	08 July 2021
		WO 2020-014097 A8	17 December 2020
US 2016-0194631 A1	07 July 2016	AU 2010-300531 A1	24 May 2012
		AU 2016-201939 A1	21 April 2016
		CA 2774998 A1	07 April 2011
		CA 2774999 A1	07 April 2011
		CN 102639700 A	15 August 2012
		CN 102869775 A	09 January 2013
		EP 2483406 A2	08 August 2012
		EP 2483407 A2	08 August 2012
		JP 2013-506686 A	28 February 2013
		JP 2013-506687 A	28 February 2013
		JP 2016-040297 A	24 March 2016
		KR 10-2012-0082906 A	24 July 2012
		US 2012-0301463 A1	29 November 2012
		US 2012-0315244 A1	13 December 2012
		US 2014-0004108 A1	02 January 2014
		WO 2011-041582 A2	07 April 2011
		WO 2011-041582 A3	29 September 2011
		WO 2011-041584 A2	07 April 2011
		WO 2011-041584 A3	26 May 2011
		WO 2017-069958 A2	27 April 2017
WO 2017-069958 A3	21 September 2017		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01); C07K 16/22(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12Q 1/6886(2018.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 항-CD300c 항체(anti-CD300c antibody), 항암제(anti-cancer drug), CDR, 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region), 경쇄 가변 영역(light chain variable region), 치료 반응성(treatment responsiveness), 마커(marker), 발현(expression)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DX	KR 10-2019-0136949 A (주식회사 센트릭스바이오) 2019.12.10 청구항 1-7; 단락 [0003], [0010]-[0012], [0049]-[0088]	1-2,8,10-20,31,37-38
DY		32-36
DA		3-7,9
Y	KR 10-2019-0016025 A (인스티튜트 내셔널 드 라 찬테 에 드 라 리세르세 베디칼르 (인 썸) 등) 2019.02.15 요약; 청구항 1-3, 12-14; 단락 [0074]-[0081], [0088]	32-36
X	WO 2020-014097 A1 (UNIVERSITY OF CONNETICUT) 2020.01.16 청구항 1-3, 16; 페이지 24, 라인 27-페이지 26, 라인 16	1-2,8,10-20,31,37-38
Y		32-36
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년08월18일(18.08.2022)	2022년08월19일(19.08.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	CUI, C. 등, 'A CD300c-Fc fusion protein inhibits t cell immunity', <i>Frontiers in Immunology</i> , 2018.11.15, 9권, 논문번호 2657, 1-14 페이지 초록; 페이지 1, 3, 11	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36
X Y	US 2016-0194631 A1 (HARVARD MEDICAL SCHOOL) 2016.07.07 요약; 청구항 1, 6-8, 67; 단락 [0096], [0122], [0130], [0184]-[0196]	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36
X Y	WO 2017-069958 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. 등) 2017.04.27 청구항 41, 48, 51-52, 58-59, 64, 69; 표 13c	1-2,8,10-20,31,37-38 32-36

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

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

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

- 1. 청구항: **21-30**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 21-30은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0136949 A	2019/12/10	AU 2019-279311 A1	2021/01/07
		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
		KR 10-2021-0136894 A	2021/11/17
		KR 10-2320280 B1	2021/11/29
		US 2021-0238596 A1	2021/08/05
		WO 2019-231188 A1	2019/12/05
		KR 10-2019-0016025 A	2019/02/15
BR 112018072993 A2	2019/03/06		
CN 109690314 A	2019/04/26		
EP 3455631 A1	2019/03/20		
EP 3455631 B1	2020/06/24		
JP 2019-516979 A	2019/06/20		
JP 2022-027788 A	2022/02/14		
KR 10-2245021 B1	2021/04/26		
MX 2018013744 A	2019/08/16		
SG 11201809317 A	2018/11/29		
US 2019-0309369 A1	2019/10/10		
WO 2017-194556 A1	2017/11/16		
ZA 201807020 B	2020/05/27		
WO 2020-014097 A1	2020/01/16		
		EP 3820571 A1	2021/05/19
		US 2021-0206849 A1	2021/07/08
		WO 2020-014097 A8	2020/12/17
US 2016-0194631 A1	2016/07/07	AU 2010-300531 A1	2012/05/24
		AU 2016-201939 A1	2016/04/21
		CA 2774998 A1	2011/04/07
		CA 2774999 A1	2011/04/07
		CN 102639700 A	2012/08/15
		CN 102869775 A	2013/01/09
		EP 2483406 A2	2012/08/08
		EP 2483407 A2	2012/08/08
		JP 2013-506686 A	2013/02/28
		JP 2013-506687 A	2013/02/28
		JP 2016-040297 A	2016/03/24
		KR 10-2012-0082906 A	2012/07/24
		US 2012-0301463 A1	2012/11/29
		US 2012-0315244 A1	2012/12/13
		US 2014-0004108 A1	2014/01/02
		WO 2011-041582 A2	2011/04/07
		WO 2011-041582 A3	2011/09/29
		WO 2011-041584 A2	2011/04/07
		WO 2011-041584 A3	2011/05/26
		WO 2017-069958 A2	2017/04/27
WO 2017-069958 A3	2017/09/21		