(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0069061
(43) 공개일자 2025년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/658 (2023.05)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0155305
(22) 출원일자 2023년11월10일
심사청구일자 2023년11월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
오상철
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호 (대치동, 개포1,2차우성아파트)
김부겸
서울특별시 구로구 가마산로27길 11-7, 2동 403호 (구로동, 그린플러스 구로 해담채2)
(74) 대리인
특허법인 무한

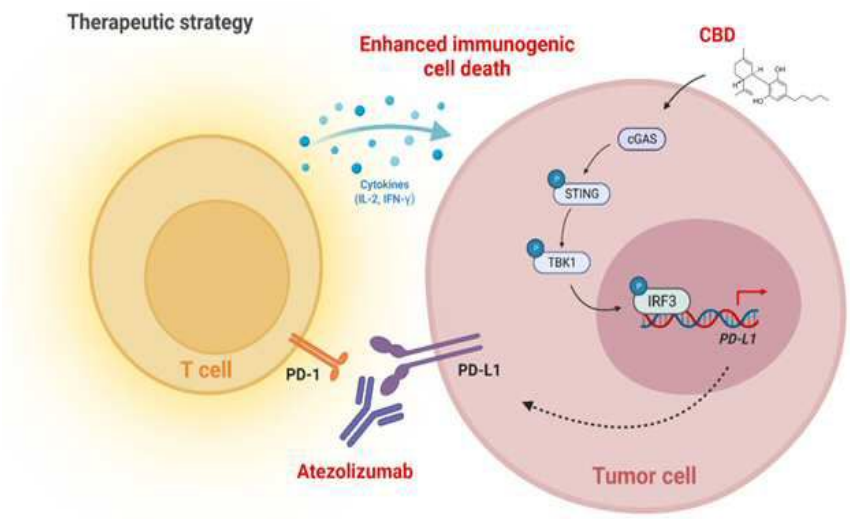
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 칸나비디올을 포함하는 항-PD-L1 면역항암제의 면역항암 보조제 또는 칸나비디올과 항-PD-L1 면역항암제를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105) 으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 암은 고형암인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 암은 담관암, 결장암, 선암, 직장암, 유방암, 활막육종, 연골육종, 갑상선암, 위암, 흉선암, 자궁경부암, 신경교종, 뇌암, 흑색종, 폐암, 방광암, 전립선암, 신장암, 간암, 대장암, 췌장암, 난소암, 임파종, 자궁암, 구강암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 암은 삼중음성유방암인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 삼중음성유방암은 PD-L1 양성인, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

칸나비디올을 유효성분으로 포함하는 항-PD-L1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상인, 면역항암 보조제.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 면역항암 보조제는 항-PD-L1 면역항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있는 것인, 면역항암 보조제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 칸나비디올을 유효성분으로 포함하는 항-PD-L1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아테졸리주맙은 삼중 음성 유방암 환자에게 임상적으로 유익한 것으로 입증되었다. 그러나 상당수의 PD-L1 환자는 여전히 아테졸리주맙에 반응하지 않으며, TNBC 환자에서 아테졸리주맙의 효능을 향상시키기 위해 여러 가지 병용 전략이 조사되고 있다. 아테졸리주맙을 포함한 면역관문억제제는 PD-L1이 있는 TNBC 환자에게 이미 승인되어 이용되고 있으나, ICI 치료는 TNB 환자의 반응률이 낮다.

[0004] 삼중음성유방암(TNBC)은 매우 공격적이며 예후도 좋지 않은 것으로 알려져 있다[Yin, L.; Duan, J.-J.; Bian, X.-W.; Yu, S.-c. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Breast Cancer Research 2020, 22, 1-13.]. 결과적으로, TNBC 진단은 호르몬 요법이나 이러한 수용체가 부족하여 표적 요법이 제한되기 때문에 여전히 화학요법에 주로 의존한다. 결과적으로 TNBC 환자를 위한 효율적인 치료법을 개발하는 것이 긴급한 의학적 우선순위이다.

[0005] 프로그래밍된 사멸 리간드 1(PD-L1)은 종양 세포의 세포 표면에 위치한 중요한 면역 체크포인트 분자이다. 이는 T 세포의 리간드인 프로그래밍된 세포사멸 1(PD-1)과 상호작용한다. [Chen, D.S.; Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature 2017, 541, 321-330.] PD-1과 PD-L1의 상호작용은 세포독성 T 세포 활성화를 방지하고, T 세포 고갈을 유발하며, 세포독성 사이토카인의 생성을 감소시켜 암에 대한 면역반응을 감소시킨다. 그러나 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하면 T 세포의 반응을 향상시켜 항암 효과를 발휘할 수 있다[Li, C.; Zhang, N.; Zhou, J.; Ding, C.; Jin, Y.; Cui, X.; Pu, K.; Zhu, Y. Peptide Blocking of PD-1/PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy Cancer Immunology Research 2018, 6, 178-188.]. PD-1/PD-L1 상호작용을 차단할 수 있는 면역관문억제제(ICI)로 알려진 단일클론항체(mAb)의 사용은 흑색종, 폐암, 호지킨 림프종, 방광암종, 신장암을 포함한 여러 악성종양의 치료에 혁명인 결과를 가져왔다. [Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crinò, .; berhardt, .E.; oddubskaya, .; ntonia, .; luzanski, .; okes, .E.; olgado, . ivolumab ersus ocetaxel n dvanced quamous-cell on-small-cell lung cancer. New England Journal of Medicine 2015, 373, 123-135.]

[0006] 최근 보고서에 따르면 TNBC는 종양 미세환경(TME)에 높은 수준의 PD-L1과 높은 수의 종양 침윤 림프구(TIL)가 있는 가장 면역원성이 높은 유방암 유형으로 ICI 기반의 매력적인 후보가 되는 것으로 나타났다. 아테졸리주맙은 잠재적인 임상적 이점을 보여주었지만 PD-L1이 있는 TNBC 환자의 약 5~20%만이 아테졸리주맙에 반응한다.

[0007] 칸나비디올(CBD)은 대마초 식물에서 발견되는 비정신자극 화합물이다. 신경퇴행성 질환, 간질, 불안 및 통증에 대한 치료 효과가 알려져있다[Hampson, A.; Grimaldi, M.; Axelrod, J.; Wink, D. Cannabidiol and () Δ9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998, 95, 8268-8273.]. 그러나 종양 세포에서 면역 조절제로서 CBD의 역할은 아직 보고되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 칸나비디올을 유효성분으로 포함하는 항-PD-L1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다

른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 암은 고형암일 수 있고, 바람직하게는 담관암, 결장암, 선암, 직장암, 유방암, 활막육종, 연골육종, 갑상선암, 위암, 흉선암, 자궁경부암, 신경교종, 뇌암, 흑색종, 폐암, 방광암, 전립선암, 신장암, 간암, 대장암, 췌장암, 난소암, 임파종, 자궁암, 구강암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 삼중음성유방암일 수 있고, 더욱 바람직하게는 PD-L1 양성인 삼중음성유방암일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 칸나비디올을 유효성분으로 포함하는 항-PD-L1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제가 제공된다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 면역항암 보조제는 항-PD-L1 면역항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 CBD가 cGAS-STING 경로 활성화를 유발하고 PD-L1 상향 조절을 유도하여 TNBC 세포에서 아테졸리주맙의 효능 향상에 기여할 수 있음을 확인하였다. 또한 CBD로 유도된 PD-L1 상향 조절은 동계 마우스 모델에서 항-PD-L1 단일클론항체의 항암 효과를 강화하였다. 이는 PD-L1 양성 TNBC 환자를 위한 새로운 병용 요법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 아니한 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 CBD가 TNBC 세포에서 PD-L1을 상향조절함을 보여준다.

도 2는 CBD가 4T1 세포에서 PD-L1을 상향조절함을 보여준다.

도 3은 CBD가 다른 유방암 서브타입에서 PD-L1 발현을 조절하지 않음 및 PD-L1 양성 폐암, 위암 세포주에서 PD-L1 발현을 조절함을 보여준다.

도 4는 CBD가 TNBC 세포에서 세포 증식을 억제하고 세포사멸을 유도함을 보여준다.

도 5는 CBD가 TNBC 세포에서 cGAS-STING 경로의 활성화를 통해 PD-L1 상향 조절을 촉진함을 보여준다.

도 6은 CBD와 아테졸리주맙의 병용투여가 공동 배양 시스템에서 항암 면역 반응을 자극함을 보여준다.

도 7은 CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료가 항암 면역 반응을 유발함을 보여준다.

도 8은 IRF3가 TNBC 세포의 PD-L1 유전자 프로모터 영역에 직접 결합함을 보여준다.

도 9는 생체 내 실험에서 CBD와 항-PD-L1 단일클론항체의 시너지 효과를 나타낸다.

도 10은 CBD와 아테졸리주맙의 조합이 공동배양시스템에서 항암면역반응을 자극함을 마우스 체중 및 유세포분석 결과로 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 작용기전을 도식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 CBD가 PD-L1 양성 암세포에서 PD-L1 발현을 유도할 수 있음을 발견하고, CBD의 투여가 항-PD-L1 단일클론항체 면역항암제와 시너지효과를 발휘하여 T세포매개 종양사멸활성을 강화하며 시험관 내와 동물실험 모두에서 종양성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 보다 구체적으로, 본 발명은 칸나비디올 및 항-PD-L1 면역항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 발생, 확산 또는 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "약학적 조성물"은 상기 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명에서, "유효성분으로 포함"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

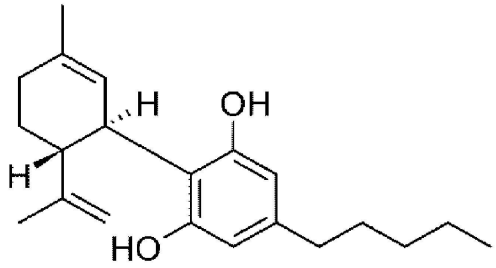
[0029] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은, 각각의 제형에 따라 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.

[0030] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적정한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수도 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 약학적으로 유효한 양으로 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 본 발명의 용어 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0033] 상기 칸나비디올은 대마 유래 칸나비노이드의 주 성분을 차지하는 물질로서, 하기 화학식1의 화학구조를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0034] [화학식 1]

[0035] 

[0036] 일 측에 따르면, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 종양세포 표면에서 발현하는 PD-L1과 결합하여 T세포 활성화에 기여할 수 있다. 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 아테졸리주맙일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 하기 실시예 3 등에서 나타나듯이, 본 발명자들은 칸나비디올과 아테졸리주맙을 병용 투여하는 경우 각각을 투여하는 경우보다 상승된 시너지효과가 발생함을 확인하였다.

[0037] 일 측에 따르면, 상기 암은 고형암일 수 있고, 바람직하게는 담관암, 결장암, 선암, 직장암, 유방암, 활막육종, 연골육종, 갑상선암, 위암, 흉선암, 자궁경부암, 신경교종, 뇌암, 흑색종, 폐암, 방광암, 전립선암, 신장암, 간암, 대장암, 췌장암, 난소암, 임파종, 자궁암, 구강암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 피부암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 삼중음성유방암일 수 있고, 더욱 바람직하게는 PD-L1 양성인 삼중음성유방암일 수 있다. 본 발명의 조성물은 PD-L1 양성인 암에 대하여 더 우수한 효과를 보일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 칸나비디올을 유효성분으로 포함하는 항-PD-L1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제가 제공된다.

[0039] 상기 면역항암 보조제는 면역항암제의 효능을 증진시킬 수 있으며, 보다 구체적으로, 면역인자를 활성화 시키거나 면역항암제의 인식부위를 상향조절하여 면역항암제의 항암 작용을 보조함으로써 면역항암제의 효능을 증진시킬 수 있다. 상기 면역인자는 도움 T세포(helper T세포), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell), 자연살생세포(NK cell) 및 사이토카인(cytokine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 면역항암제의 인식부위는 암세포 표면의 PD-L1일 수 있다.

[0040] 일 측에 따르면, 상기 항-PD-L1 면역항암제는 아테졸리주맙, 마벨루맙, 더발루맙 및 BMS 936559 (MDX1105)으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0041] 일 측에 따르면, 상기 면역항암 보조제는 항-PD-L1 면역항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 순차적으로 투여할 시에는 면역항암 보조제 투입 후 면역항암제를 투입할 수 있고, 면역항암제 투입 후 면역항암 보조제를 투입할 수도 있다. 다만 상기 투여방법은 일례일 뿐, 면역항암효과를 증진시킬 수 있도록 투여방식은 변경될 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 상기 면역항암 보조제 또는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 보다 바람직하게는 비경구 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등 이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0043] 칸나비디올을 유효 성분으로 하는 면역항암 보조제는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 칸나비디올을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또

는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0044] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염 등과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0046] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0047] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0048] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0050] **실시예 1. 실험방법**

[0051] 실시예 1-1. 세포 배양

[0052] 모든 유방암 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입했다. 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)는 Stem Cell Technologies(Vancouver, BC, Canada)에서 구입했다. MDA-MB-231 세포를 10% 소태아혈청(FBS)과 100 mg/mL 페니실린 및 스트렙토마이신(P/S)을 함유하는 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. BT20 세포를 10% FBS 및 100mg/mL P/S가 포함된 EMEM 배지(ATCC)에서 배양했다. 4T1, Jurkat T 세포 및 인간 PBMC를 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 모든 세포를 5% CO_2가 포함된 습한 대기에서 37℃로 배양했다.

[0053] 실시예 1-2. 일시적 형질감염

[0054] 일시적인 형질감염을 위해 Lipofectamine RNA iMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)에서 구입한 대조군(sc-37007), cGAS(sc-95512) 및 IRF3(sc-35710)에 대해 인간 유방암 세포를 small interfering RNA(siRNA)로 형질감염시켰다.

[0056] 실시예 1-3. 생물정보학 분석

[0057] 삼중 음성 유방암 환자에서 PD-L1의 발현 및 PD-L1과 cGAS-STING 경로 관련 단백질의 상관관계는 The Breast Cancer Gene Expression Miner v4.9 웹 온라인 도구를 사용한 RNA 서열 분석을 사용하여 평가되었다.

[0059] 실시예 1-4. 웨스턴 블롯 분석

[0060] 세포를 수확하고 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제 칵테일이 포함된 방사선 면역침전 분석 완충액(RIPA 버퍼)(50mM Tris, 150nM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS 및 1% Na-데옥시콜레이트[pH 7.4])으로 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE를 수행했다. 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인(GE Healthcare Life Science)에 옮기고 0.2% Tween 20과 5% 탈지유를 함유한 Tris-buffered saline(TBS)으로 블록한 후 1차 항체와 함께 배양하고, HRP가 결합된 2차 항체와 함께 배양했다. 단백질 발현은 X-ray 필름과 화학발광 프로토콜(DoGEN ECL, Daeil Lab Service Co. Ltd, 서울, 한국)을 사용하여 평가되었다. 블롯은 로딩 대조군으로서 β-액틴에 대해 정규화되었고 Image J Software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 정량화되었다. 항체에 대한 정보는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0061]

항체	희석비	Cat Number	제조사
PD-L1	1:1000	#13684	Cell Signaling
PD-L1	1:1000	sc-518027	Santa Cruz
cGAS	1:1000	sc-515777	Santa Cruz
STING	1:1000	#13647	Cell Signaling
p-STING (Ser366)	1:1000	#50907	Cell Signaling
TBK1	1:1000	#38066	Cell Signaling
p-TBK1 (Ser172)	1:1000	#5483	Cell Signaling
IRF3	1:1000	#11904	Cell Signaling
p-IRF3 (Ser386)	1:1000	#37829	Cell Signaling
Cleaved PARP (Asp214)	1:1000	#9541	Cell Signaling
β-actin	1:10000	A5316	Sigma Aldrich
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:2000	#7074	Cell Signaling
Anti-Mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:2000	#1706516	BIO-RAD

[0062] 실시예 1-5. 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)

[0063] TRIzol 시약 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출했다. 역전사효소 폴리머라제 연쇄 반응 키트(Life Technologies)를 사용하여 트랜스크립트를 증폭시켰다. qRT-PCR은 QuantStudio 6 Flex 시스템을 사용하여 수행되었다. TaqMan 프로브에 대한 특정 유전자 프라이머를 사용하여 전사체의 증폭을 수행했다. 유전자 발현은 GAPDH 유전자의 발현에 대해 표준화되었다. TaqMan 프로브는 GAPDH(Hs99999905_m1) 및 PD-L1(Hs01125301_m1)이었다.

[0065] 실시예 1-6. 세포 표면 PD-L1 발현 측정

[0066] 세포를 트립신 처리하고 차가운 PBS로 세척한 후 1000rpm에서 5분간 원심분리했다. 세포를 200μl 1x 유세포 분석 염색 완충액(FC001, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)으로 재현탁하고 PD-L1 또는 Isotype Control에 대한 PE 결합 항체와 함께 암실에서 실온으로 30분 동안 배양했다. 그런 다음 유세포 분석을 통해 세포를 검출했다. 중앙 형광 강도(MFI)는 세포 표면의 PD-L1 발현 수준을 나타낸다. MFI는 FlowJo 소프트웨어(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 정량화되었다. 상대 MFI는 Isotype Control의 MFI로 정규화되었다. 항체에 대한 정보는 하기 표 3에 나타내었다.

표 2

[0067]

항체	Cat Number	제조사
Human PD-L1-PE	FAB1561P	R&D systems
Human IgG-PE	F0157	R&D systems
Mouse PD-L1-PE	12-5982-82	eBioscience
Mouse IgG-PE	12-4321-80	eBioscience

[0068] 실시예 1-7. 루시퍼라제 리포터 분석

[0069] 루시퍼라제 리포터 분석을 위해, 활성화된 T 세포의 핵 인자(NFAT)-루시퍼라제 리포터로 형질감염된 Jurkat T 세포를 Promega Corporation(J1622, Madison, WI, USA)에서 구입했다. MDA-MB-231($7x10^3$ 세포/웰) 및 BT20($1x10^4$ 세포/웰) 세포를 흰색 96 웰 플레이트에 시딩하고 2.5μM CBD 및/또는 50μg/ml Atezolizumab으로 1시간 동안 전처리했다. 그런 다음 Jurkat T 세포를 암세포 대 T 세포의 비율 1:10으로 웰에 첨가하였다. Jukrat T 세포를 자극하기 위해 0.1ug/ml 항-CD3 및 CD28 항체를 24시간 동안 공동 배양 시스템에 첨가했다. 24시간의 공동 배양 후, Bio-Glo Luciferase Assay System(G7941, Promega)을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하고 Luminescent microplate reader(Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA)를 사용하여 검출했다.

[0071] 실시예 1-8. 공동배양 시스템을 통한 항암 사이토카인 분비

[0072] MDA-MB-231($1x10^5$개 세포/웰) 및 BT20($2x10^5$개 세포/웰) 세포를 24웰 플레이트에 시딩하고 2.5μM CBD 및/또는 50μg/ml 아테졸리주맙으로 1시간 동안 전처리했다. 이후 이들 세포를 Jurkat T 세포 또는 인간 PBMC와 암세포 대 T 세포의 비율을 1:10으로 공동 배양했다. Jurkat T 세포와 인간 PBMC를 자극하기 위해 0.1ug/ml 항-CD3 및 CD28을 24시간 동안 공동 배양 시스템에 첨가했다. 24시간 후에 상청액을 수집하였다. IL-2 및 IFN-γ의 농도는 제조사의 지시에 따라 각각 Human IL-2 ELISA Kit(DY202-05, R&D Systems) 및 Human IFN-γ ELISA Kit(DY285B-05, R&D Systems)를 사용하여 검사했다. 분비된 사이토카인의 수준은 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices)를 사용하여 측정되었다.

[0074] 실시예 1-9. 인간 PBMC 매개 종양 살해 분석

[0075] MDA-MB-231($1x10^5$개 세포/웰) 및 BT20($2x10^5$개 세포/웰) 세포를 24웰 플레이트에 시딩하고 2.5μM CBD 및/또는 50ug/ml 아테졸리주맙으로 1시간 동안 전처리했다. 이어서 이들 세포를 암세포 대 인간 PBMC의 비율을 1:10으로 하여 인간 PBMC와 공동배양하였다. 인간 PBMC를 자극하기 위해 0.1ug/ml 항-CD3 및 CD28 항체를 24시간 동안 공동 배양 시스템에 첨가했다. 24시간의 공동 배양 후, PBS로 세척하여 세포 잔해와 인간 PBMC를 제거했다. 살아있는 암세포를 크리스탈 바이올렛 염색하고 현미경을 사용하여 이미지를 촬영했다. 그런 다음 세포를 10% 아세트산 용액으로 30분 동안 탈염색시킨 후 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 파장 570nm에서 광학 밀도를 정량화했다.

[0077] 실시예 1-10. 세포사멸 분석

[0078] 세포사멸은 Annexin V-FITC 세포사멸 검출 키트(LS-02-100; BioBud, SEOUL, Korea)를 사용하여 추정하였다. 세포를 트립신 처리하고 1000rpm에서 5분 동안 원심분리했다. 세포 펠릿을 현탁하고 Annexin V-FITC 및 1x 결합 완충액이 포함된 요오드화 프로피듐(PI) 용액으로 어둠 속에서 실온에서 30분 동안 염색했다. 염색된 세포는 유동 세포측정법을 사용하여 평가되었다. FlowJo 소프트웨어를 사용하여 세포 사멸의 정량을 측정했다.

[0080] 실시예 1-11. 염색질 면역침전(ChIP) 분석

[0081] ChIP 분석은 제조업체의 지시에 따라 ChIP 분석 키트(17-295, Millipore Corp, Billerica, MA, USA)를 사용하여 수행되었다. DNA와 단백질을 가교시키기 위해 1% 포름알데히드로 10분 동안 고정한 후, 세포 스크레이퍼를 사용하여 세포를 수확했다. 펠릿을 페닐메탄 설포닐 플루오라이드(PMSF) 및 프로테아제 억제제를 함유하는 SDS 용해 완충액으로 재현탁시켰다. 그런 다음 얼음 위에서 10분 동안 인큐베이션했다. 세포를 초음파 처리하여 200-1000 염기쌍 DNA 단편을 얻었다. 면역침전은 대조군 IgG 또는 IRF3 1차 항체를 사용하여 밤새 수행되었다. 다음날 염색질 복합체를 단백질 A/연어 정자 DNA로 4℃에서 1시간 동안 풀다운하였다. 이후 복합체를 세척하고 용리했다. 역가교는 95℃에서 15분 동안 수행하였다. 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올 추출을 사용하여 DNA를 정제했다. 하기 표 4에 나열된 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR로 DNA를 증폭했다.

표 3

[0082]

ChIP 프라이머			크기
IRF3 BS1	정방향	5'-TGCTTTAATCTTCGAAACTCTTCCC-3'	
	역방향	5'-CCCAAGGCAGCAAATCCAGT-3'	340
IRF3 BS2	정방향	5'-TTGGAAGCAAATGTCATAACCAA-3'	
	역방향	5'-GGCCCAAGATGACAGACGAT-3'	301
IRF3 BS3	정방향	5'-AGGAAGTGGTGGTATTCAAGATGA-3'	
	역방향	5'-GCTGCTCAGTGATTTGCGTAT-3'	201

[0084] 실시예 1-12. 동계 마우스 모델

[0085] 동물 실험의 모든 절차는 고려대학교 의과대학 동물실험연구위원회(IACUC)에서 승인한 동물 관리 지침(KOREA-2022-0088)을 기반으로 관리되었다. 8주령 암컷 BALB/c 마우스를 Orient Bio에서 구입하여 특정 병원균이 없는 환경에 보관했다. 4T1 쥐 TNBC 세포(5 x 10^5개 세포)를 종양 형성을 위해 오른쪽 네 번째 유방 지방 패드에 이식했다. 종양의 크기가 약 100mm^3에 도달할 때까지 종양 부피를 모니터링했다. 동물은 대조군(n=6), CBD(n=6), 항-PD-L1 항체(n=6) 및 CBD+항-PD-L1 항체(n=6)의 4가지 약물 치료 그룹으로 무작위 배정하였다. 마우스에게 2일마다 10mg/kg의 CBD 및/또는 3일마다 5mg/kg의 항-마우스 PD-L1 항체(10F.9G2, Bio X cell, West Lebanon, NH, USA)를 복강내(ip) 주사했다. 종양 부피는 디지털 캘리퍼를 사용하여 매일 측정되었다. 종양 부피는 다음 공식으로 계산되었다: 종양 부피(mm^3) V=1/2 x (길이 x 너비^2). 종양이 1,500mm^3에 도달하면 마우스를 안락사시켰다.

[0087] 실시예 1-13. 종양 조직에서의 PD-L1 발현 분석

[0088] 종양 조직을 절제하고 각각 조직병리학적 분석 및 유동 세포측정 분석을 위해 두 부분으로 나누었다. 유세포 분석을 위한 종양 조직을 작은 조각으로 절단하고 300 U/mL Type IV 콜라게나제(Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) 및 1 mg/mL DNase I(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)로 37℃에서 2시간동안 다이제스천하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 1000rpm에서 10분 동안 원심분리했다. 세포 펠렛을 트립신 처리한 후 5 mg/ml Dispase Ⅱ(Gibco)와 함께 37℃에서 5분 동안 배양하였다. 세포를 여과하여 단일 세포 현탁액으로 만들었다. 적혈구 용해 완충액(Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)을 사용하여 적혈구를 제거했다. 세포를 유동 세포측정법 염색 완충액으로 재현탁시키고 PD-L1 또는 이소타입 대조군에 대한 PE 결합 항체와 함께 암실에서 실온에서 30분 동안 배양했다. 이어서, 세포를 유동 세포측정법으로 측정하였다. 결과는 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0090] 실시예 1-14. 면역조직화학(IHC) 염색

[0091] PD-L1 발현 및 종양 부위로의 CD8 T 세포 침윤을 평가하기 위해 면역조직화학 염색을 수행하였다. 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPF) 조직 절편을 파라핀 제거하고 자일렌 및 등급별 에탄올 용액에서 탈수했다. 파라핀 제거 및 항원 회수 후, 조직 슬라이드를 3% 과산화수소(H2O2) 차단 시약과 함께 15분간 배양하고 100℃에서 20분간 가열했다. 다음으로 슬라이드를 차단 완충액(Dako, Glostrup, 덴마크)을 사용하여 실온에서 1시간 동안 전체적으로 차단(block)했다. 1차 항체를 4℃에서 밤새 배양하였다. 다음날 슬라이드를 HRP-접합 2차 항체와 함께 배양했다. 탈수 및 밀봉 후 슬라이드를 DAB 복합체 및 헤마톡실린으로 염색했다. 슬라이드는 현미경을 사용하여 관찰하고 고배율(200x 배율)로 스캐닝하여 평가했다. 항체에 대한 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 4

[0092]

항체	희석	Cat 번호	구입처
PD-L1	1:100	14-5982-82	Invitrogen
CD8a	1:100	14-0808-82	Invitrogen
그랜자임 B	1:100	sc-8022	Santa Cruz

말 항-마우스 IgG 항체(H+L), 퍼옥시다제	1:200	PI-2000	Vector Laboratories
염소 항-래트 IgG 항체(H+L), 퍼옥시다제	1:200	PI-9400	Vector Laboratories

[0093] PD-L1 발현은 염색 강도와 양성 세포의 백분율로 점수를 매겼다. 강도는 4가지 점수로 분류되었다: 표현이 전혀 없는 경우 "0", 약한 표현이 있는 경우 "1", 중간 정도의 표현이 있는 경우 "2", 높은 표현이 있는 경우 "3". 양성 세포의 비율도 4개의 점수로 나누어졌다: 0-5% 양성 세포는 "1", 6-25% 양성 세포는 "2", 26-50% 양성 세포는 "3", 51은 "4" -75% 양성 세포, "5"는 76~100% 양성 세포로 설정하였다. 이 두 점수는 염색 강도와 양성 세포의 비율을 곱하여 달성되었다. 그 범위는 0에서 15까지였다. CD8 및 Granzyme B 양성 염색이 있는 면역 세포는 T 림프구(TIL)가 종양 부위에 침윤된 것으로 계산되었다. TIL 평가를 위해 종양 내 영역이 선택되었다. 선택된 분야에서 CD8 또는 Granzyme B를 발현하는 양성 세포의 수를 계수하여 결과를 얻었다. 값은 평방밀리미터 당 셀 수(mm^2)로 표시되었다.

[0095] 실시예 1-15. 통계 분석

[0096] 모든 실험은 독립적으로 최소 3회 수행되었다. 통계의 유의성은 GraphPad Prism Software(La Jolla, CA, USA)를 사용하여 결정되었다. 모든 결과는 unpaired Student's t-test를 사용하여 평가되었으며 0.05 미만의 p-값은 유의미한 것으로 간주되었다. 각 *, **, ***는 각각 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001을 나타낸다.

[0099] **실시예 2. TNBC 세포에서 CBD의 PD-L1 발현 상향조절 확인**

[0100] 초기 실험에서 Breast Cancer Gene-Expression Miner v4.9와 같은 온라인 도구를 사용한 RNA 염기서열 분석을 기반으로 유방암 환자의 PD-L1 발현을 규명했다. PD-L1의 mRNA 수준이 다른 하위 유형보다 TNBC 환자에서 더 높다는 것을 확인할 수 있었다(도 1의 A). TNBC 하위 유형과 비-TNBC 하위 유형 간의 추가 비교를 통해 PD-L1 발현에 상당한 차이가 있음 또한 확인할 수 있었다(도 1의 B). 다음으로, TNBC 및 비-TNBC 세포를 포함한 다양한 인간 유방암 세포주에서 PD-L1 단백질 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. PD-L1의 단백질 발현 수준은 비-TNBC 세포에서보다 TBNC 세포에서 더 높았다(도 1의 C). 다음으로 TNBC 세포주에서 PD-L1 발현에 대한 CBD의 효과를 테스트했다. 인간 TNBC(MDA-MB-231 및 BT20)(도 1의 D) 및 쥐 TNBC(4T1) 세포주(도 2의 A)를 CBD(0-5μM)로 처리했다. 결과는 PD-L1의 단백질 수준이 CBD에 의해 용량 의존적으로 증가한다는 것을 보여주었다. 반면 CBD 치료는 PD-L1 음성 TNBC 세포주(MDA-MB-453) 또는 HER2 양성(BT474 및 SK-BR-3) 또는 호르몬 수용체 양성(MCF7 및 T47D) 세포주를 포함한 기타 하위 유형 세포주(도 3의 A 내지 C)에서 PD-L1 발현을 증가시키지 않았다. 더 나아가 PD-L1 양성 폐암 세포주(도 3의 D)에서 CBD에 의해 PD-L1의 단백질 수준이 증가한다는 것을 보여주었다. 이러한 발견은 CBD가 PD-L1 양성 TNBC 세포에서만 PD-L1 발현을 유도할 수 있음을 보여준다. 또한, 종양 세포의 대량 사멸을 피하기 위해 TNBC 세포주를 0 내지 5 μM의 CBD로 처리하여 세포 증식 및 세포 사멸을 측정했다(도 4의 A 내지 C). 이후 PD-L1 수준을 검사했다. CBD 농도가 증가함에 따라 세포 증식이 감소하고 세포 사멸과 PD-L1 발현 유도가 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 다음으로 PD-L1의 상향 조절이 전사 수준에서 시작되었는지 확인하기 위해 qRT-PCR 분석을 수행했다. 도 1의 E에 표시된 것처럼 PD-L1의 mRNA 수준은 CBD 처리에 의해 유도되었다. PD-L1은 종양 세포의 세포 표면에 위치하며, 이는 면역요법의 핵심 면역 체크포인트 분자로 알려져 있다. 또한 CBD로 유도된 PD-L1 유전자 전사가 기능적 및 임상적으로 표적 가능한 PD-L1 단백질의 생산으로 이어질 수 있는지 평가하기 위해 유세포 분석을 사용하여 PD-L1 발현의 세포 표면을 평가했다(도 5의 F 및 도 2의 B). CBD로 처리하면 인간 TNBC 세포 및 쥐 TNBC 세포의 세포 표면에서 PD-L1의 발현이 증가했다. 이러한 결과는 CBD가 PD-L1 양성 TNBC 세포에서 PD-L1 발현을 유도할 수 있음을 입증한다.

[0102] **실시예 3. CBD와 아테졸리주맙의 병용 효과 확인**

[0103] 종양 세포에서 PD-L1의 상향 조절은 세포독성 T 세포 매개 항종양 효과를 통해 면역 감시로 이어질 수 있다. T 세포 활성화는 ICI 치료의 중요한 지표로 알려져 있다. 종양 세포에서 CBD 매개 PD-L1 상향 조절이 T 세포에 의한 면역학적 감시를 강화하는지 여부를 조사하기 위해 조작된 Jurkat T 세포에서 루시퍼라제 활성을 사용하여 T 세포 활성화를 분석했다.

[0104] 먼저 TNBC 세포를 억제하는데 있어서 T 세포를 통한 아테졸리주맙의 면역학적 효능을 결정했다. 아테졸리주맙(0 내지 100 μg/ml)을 사용하여 MDA-MB-231 및 BT20 세포를 Jurkat T 세포와 공동 배양했다. 50μg/ml의 용량에서 아테졸리주맙은 공동 배양 시스템에서 T 세포 활성화를 미약하게 강화한 것으로 나타났다(도 6의 A). CBD 치료가 종양 세포의 PD-L1 발현 증가를 통해 Jurkat T 세포의 활성화를 크게 감소시키는 것을 확인하였다(도 6의 B). 대조적으로, CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료는 T 세포 활성화를 증가시켰다. 이러한 발견은 종양 세포에서 PD-L1 발현을 조절함으로써 TNBC에 대한 치료 요법으로 CBD와 ICI를 결합하는 치료방법의 잠재적인 임상적 유용성을 암시한다.

[0105] 다음으로 CBD와 아테졸리주맙의 잠재적 시너지 효과를 테스트하기 위해 TNBC 세포를 Jurkat T 세포 또는 인간 PBMC와 공동 배양하고 IL-2 및 IFN-γ를 포함한 방출된 항종양 사이토카인의 양을 평가했다(도 6의 C, D 및 도 7의 A, B). CBD 치료만으로도 T 세포 매개 사이토카인 분비가 유의하게 억제된다는 것을 발견했다. 그러나 CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료는 이러한 사이토카인의 분비를 현저하게 유도하여 T 세포의 활성화가 증가했음을 나타낸다. 또한, 병용 치료가 T 세포 활성화를 통해 항종양 살상 활성을 발휘할 수 있는지 확인하기 위해 공동 배양 시스템에서 CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료가 인간 PBMC 활성화에 미치는 영향을 조사했다(도 7의 C). CBD가 종양 세포에서 PD-L1 상향 조절을 통해 종양 살해 효과를 억제한다는 것을 확인하였다. 특히, CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료는 종양 세포에 상당한 세포독성 효과를 가져왔다. 또한, 면역 매개 항종양 반응이 종양 세포에서 면역원성 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 조사했다. 결과는 CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료가 종양 세포에서 면역원성 세포 사멸을 증가시키는 것으로 나타났다(도 7의 D 및 E).. 종합적으로 볼 때, 이러한 결과는 CBD 단독 치료가 T 세포 매개 사이토카인 분비 및 종양 살상 효과를 억제할 수 있는 반면, CBD와 아테졸리주맙의 병용 치료는 사이토카인 분비를 유도하고 T 세포 활성화를 통해 항종양 살해 활성을 발휘하여 종양 세포에서 세포사멸을 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 이러한 발견은 TNBC 환자 치료를 위해 CBD와 ICI를 결합하는 잠재적인 임상적 유용성을 시사한다.

[0107] **실시예 4. CBD의 TNBC 세포에서 cGAS-STING 경로의 활성화 확인**

[0108] 다음으로 CBD로 유발된 PD-L1 과발현의 기본 분자 메커니즘을 조사했다. RNA 서열 분석을 사용하여 PD-L1과 cGAS-STING 경로 사이의 상호 작용을 평가하기 위해 TNBC 환자의 상관 계수를 분석했다. TNBC 환자에서 PD-L1과 cGAS-STING 경로 사이에는 양의 상관관계가 있었다(도 5의 A). CBD가 TNBC 세포에서 cGAS-STING 경로를 활성화할 수 있는지 여부를 밝히기 위해 웨스턴 블롯 분석을 추가로 수행했다. 결과는 인산화된 STING, TBK1 및 IRF3 단백질이 CBD 처리에 의해 증가되었음을 나타낸다(도 5의 B). 또한 CBD는 cGAS 의존적 방식으로 TNBC 세포에서 cGAS-STING 경로를 자극했다(도 5의 C). 또한, MDA-MB-231 세포를 STING 작용제인 10 nM diABZI로 처리하여 PD-L1 발현 조절에 cGAS-STING 경로가 관여하는지 조사했다(도 5의 D 및 E). 그 결과, diABZI는 TNBC 세포에서 PD-L1 발현을 증가시켰다. 반대로, MDA-MB-231 세포를 STING 억제제인 1μg/ml H151로 처리한 경우, PD-L1의 CBD 매개 상승은 CBD 치료 조건과 비교하여 단백질 수준(도 5의 F) 및 세포 표면 발현(도 5의 G)의 감소로 나타난 것처럼 감소되었다. 이러한 발견은 cGAS-STING 경로가 TNBC 세포에서 CBD 유발 PD-L1 발현을 중재하는 데 필수적인 역할을 한다는 것을 보여준다.

[0110] **실시예 5. IRF3와 TNBC 세포의 PD-L1 유전자 프로모터 영역 결합 확인**

[0111] IRF3은 유형 I 인터페론 생산에 필수적인 전사인자이다. 이는 cGAS-STING 경로의 하류에서 확인된다. IRF3가 PD-L1 유전자 전사를 조절하는지 확인하기 위해 ChIP 분석을 수행했다. EPD(https://epd.epfl.ch/), PROMO(https://alggen.lsi.upc.es/) 및 JASPAR(https://jaspar.genereg.net/) 데이터베이스의 생물정보학 도구에 따르면 PD-L1 유전자 프로모터 영역에서 3개의 예측된 IRF3 결합 부위(BS1: -2033/-2025; BS2: -946/-938, BS3: -146/-138)가 확인된다(도 8의 A 내지 C). MDA-MB-231 세포를 CBD로 처리하고 특정 항-IRF3 항체 및 IgG 대조군의 면역침전으로 분리한 가교 염색질을 처리한 후 특정 프라이머를 사용하여 DNA 농축을 위한 PCR 분석을 수행했다. 결과는 IRF3가 CBD 처리된 MDA-MB-231 세포에서 PD-L1 유전자 프로모터 영역의 BS2에 풍부하다는 것을 확인할 수 있었다(도 8의 D). 반면, PD-L1 유전자의 프로모터 영역에는 BS1과 BS3이 풍부하지 않았다. 종합하면, 이러한 결과는 IRF3가 PD-L1 유전자 프로모터에 직접 결합하여 전사 활성화를 조절할 수 있음을 나타낸다. IRF3가 PD-L1 발현을 조절할 수 있는지 여부를 추가로 확인하고자 PD-L1 mRNA와 단백질 수준을 분석했다(도 8의 E 내지 G). IRF3 녹다운이 mRNA와 단백질 수준 모두에서 PD-L1 발현을 극적으로 감소시키는 것을 확인했다. 종합적으로 말하자면, 이러한 모든 발견은 IRF3가 PD-L1 유전자 프로모터에 직접 결합하여 TNBC 세포

에서 CBD 유발 PD-L1 발현을 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0113] **실시예 6. 생체 내 실험에서 CBD 및 항-PD-L1 단일클론항체의 시너지 효과**

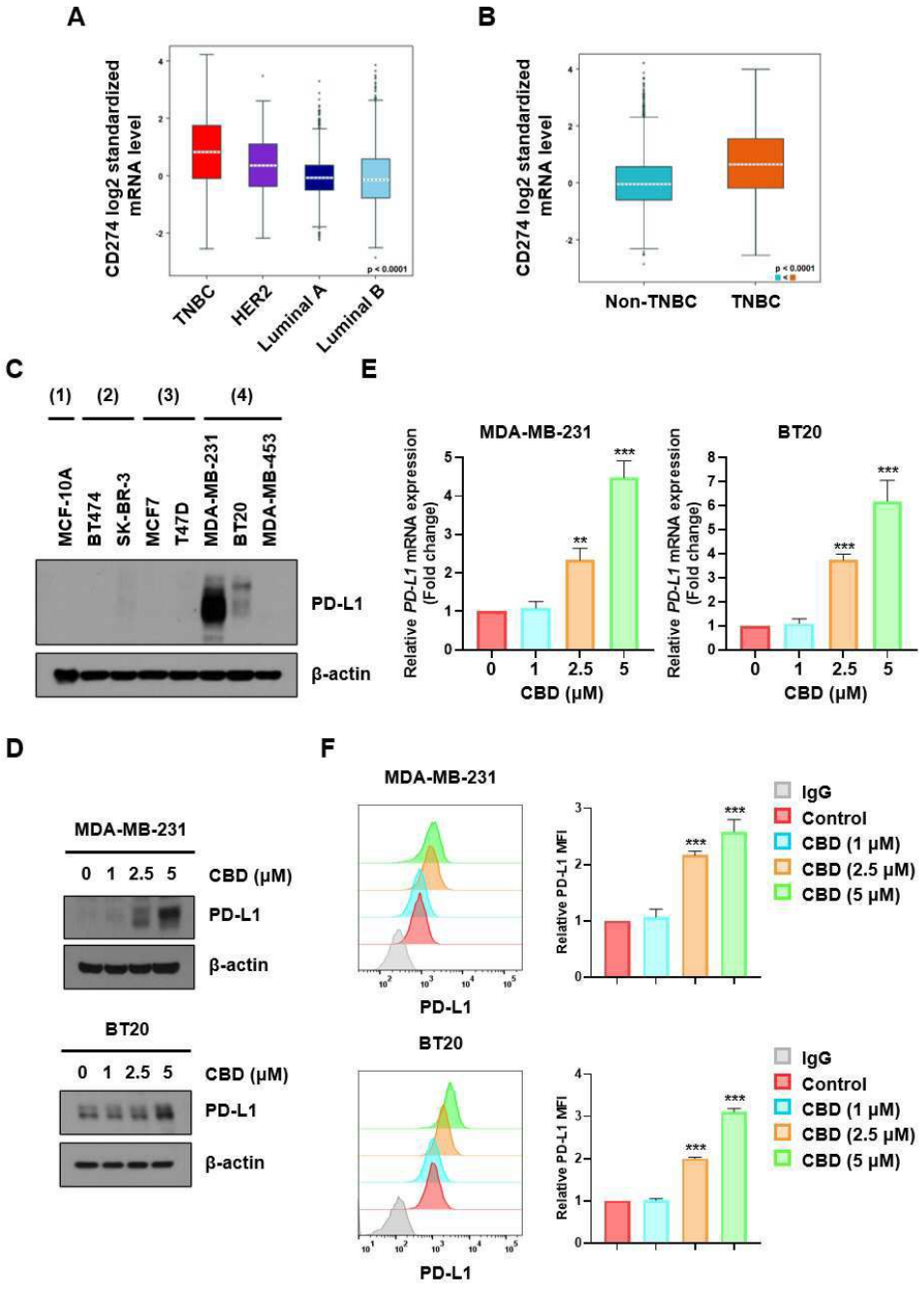
[0114] 시험관 내 실험 결과에 기초하여, 동계 마우스 모델을 사용하여 종양 성장 및 주변 종양 미세 환경을 모니터링함으로써 생체 내 실험에서 CBD 및 항-PD-L1 항체의 시너지 효과를 평가했다(도 9의 A). 생체 내 실험을 활용하기 전에 4T1 TNBC 쥐 세포를 사용하여 4T1 세포가 상향 조절된 PD-L1 발현으로 CBD에 반응한다는 것을 확인했다(도 2의 A 내지 B). 동계 마우스 모델은 암컷 BALB/c 마우스의 유방 지방 패드에 4T1 TNBC 쥐 세포를 피하 이식하여 확립되었다. 종양 성장을 관찰한 후, 마우스를 비히클 대조군, 10 mg/kg CBD, 5 mg/kg 항-PD-L1 mAb 또는 CBD와 항-PD-L1 mAb의 조합으로 치료했다. 치료는 2~3일마다 복강내 주사를 통해 시행되었다. 종양 크기는 약 30일 동안 매일 측정되었다. 연구가 끝나면 마우스를 희생시키고 종양을 절제했다. 결과적으로 CBD와 항-PD-L1 mAb의 병용 치료가 대조군과 단일 그룹에 비해 종양 성장을 유의하게 억제한다는 것을 확인할 수 있었다(도 9의 B). 각 그룹마다 체중의 뚜렷한 차이는 치료 기간 동안 나타나지 않았다(도 10의 A). 종양 크기는 다른 그룹에 비해 병용 치료 그룹에서 현저히 작았다(도 9의 C 및 D). 면역조직화학 염색 결과는 CBD 단독 또는 CBD와 항-PD-L1 mAb의 조합을 받은 종양이 종양 조직 내에서 PD-L1 발현의 현저한 증가를 나타냄을 나타낸다(도 9의 E 및 도 10의 B). 더욱이, 병용 치료는 그랜자임 B 발현 증가와 함께 CD8 T 세포의 종양 영역으로의 침윤을 유의하게 유발했다. 이러한 발견은 CBD와 항PD-L1 mAb의 병용 치료가 항종양 면역을 효과적으로 촉진하고 암 면역요법에 유리한 종양 미세환경을 조성할 수 있음을 강력하게 보여준다.

[0117] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0118] 그러므로, 다른 구현들, 다른 제조예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

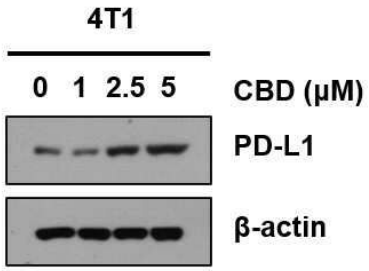
도면

도면1

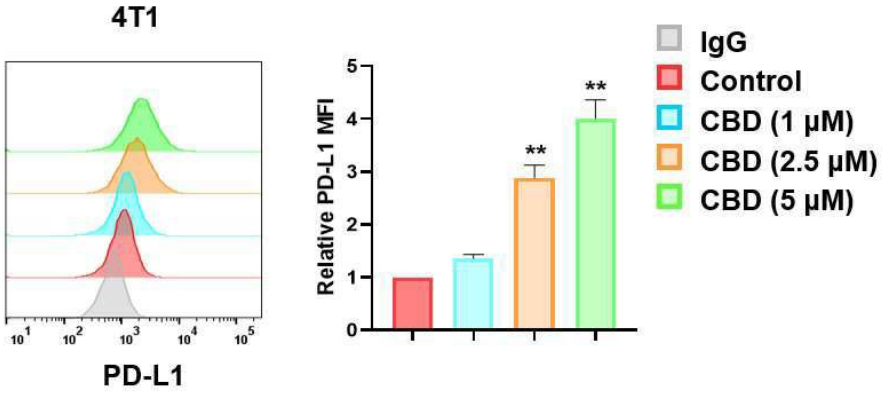

A
CD274 log2 standardized mRNA level
TNBC
HER2
Luminal A
Luminal B
B
CD274 log2 standardized mRNA level
Non-TNBC
TNBC
C
(1) (2) (3) (4)
MCF-10A
BT474
SK-BR-3
MCF7
T47D
MDA-MB-231
BT20
MDA-MB-453
PD-L1
β-actin
D
MDA-MB-231
0 1 2.5 5
CBD (μM)
PD-L1
β-actin
BT20
0 1 2.5 5
CBD (μM)
PD-L1
β-actin
E
MDA-MB-231
BT20
Relative PD-L1 mRNA expression (Fold change)
CBD (μM)
F
MDA-MB-231
BT20
PD-L1
Relative PD-L1 MFI
IgG
Control
CBD (1 μM)
CBD (2.5 μM)
CBD (5 μM)

도면2

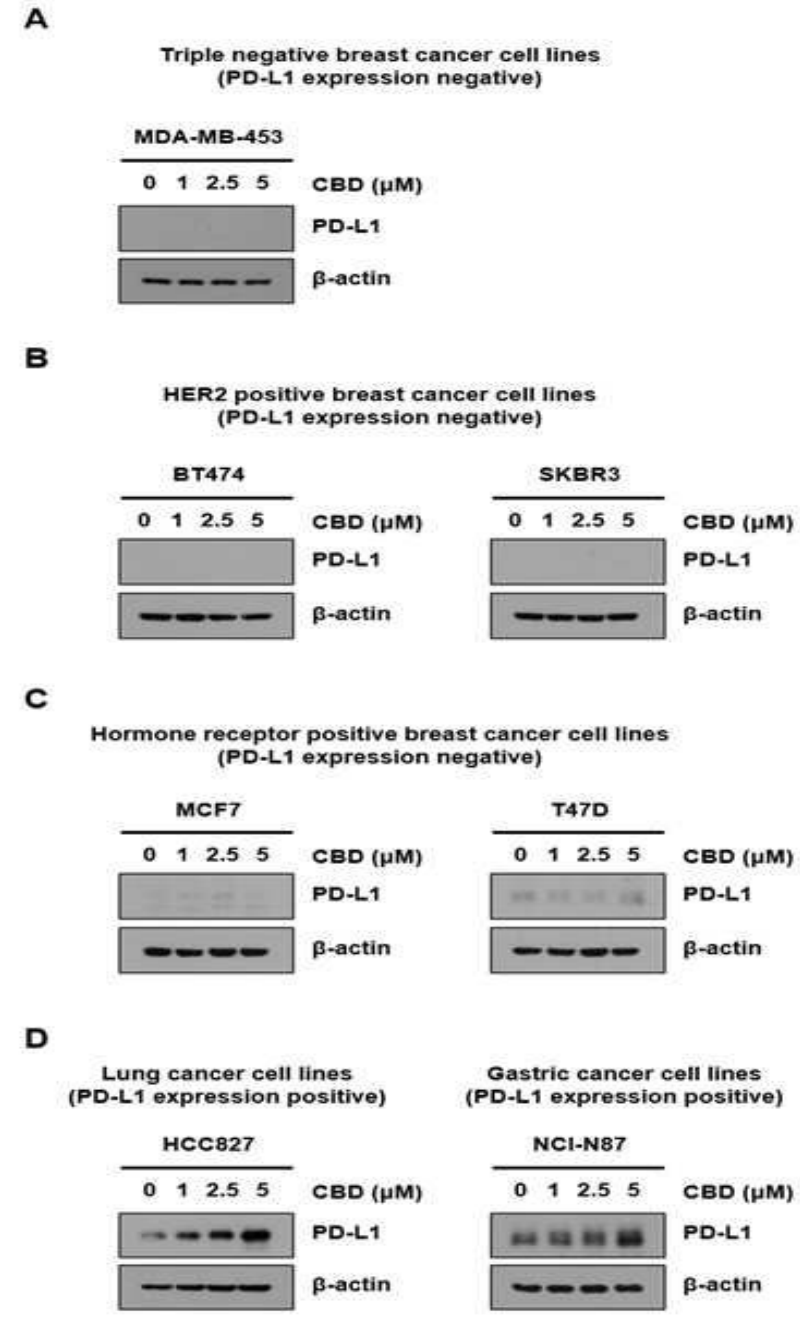
A


4T1
0 1 2.5 5
CBD (μM)
PD-L1
β-actin

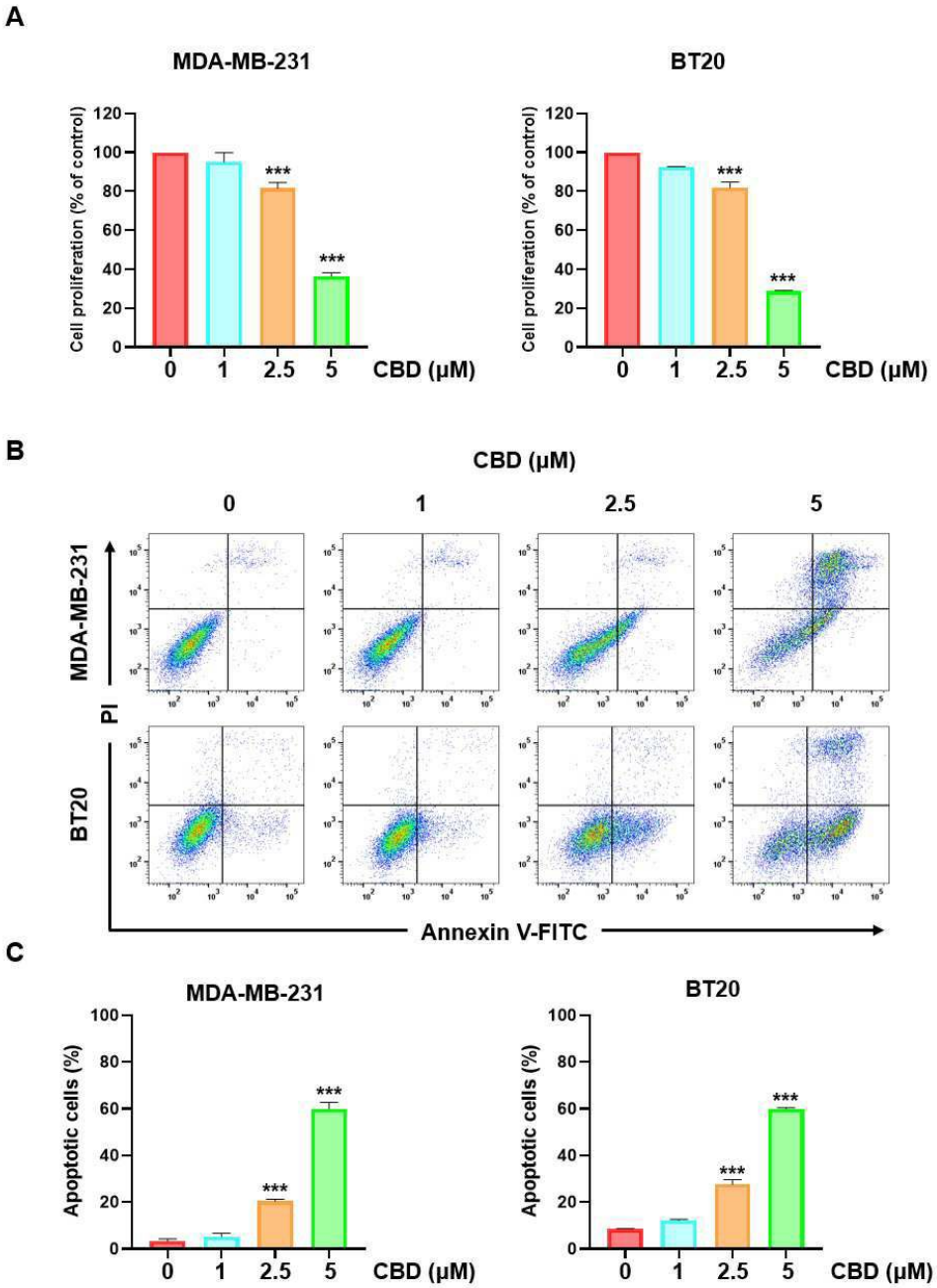
B


4T1
PD-L1
Relative PD-L1 MFI
IgG
Control
CBD (1 μM)
CBD (2.5 μM)
CBD (5 μM)
**
**

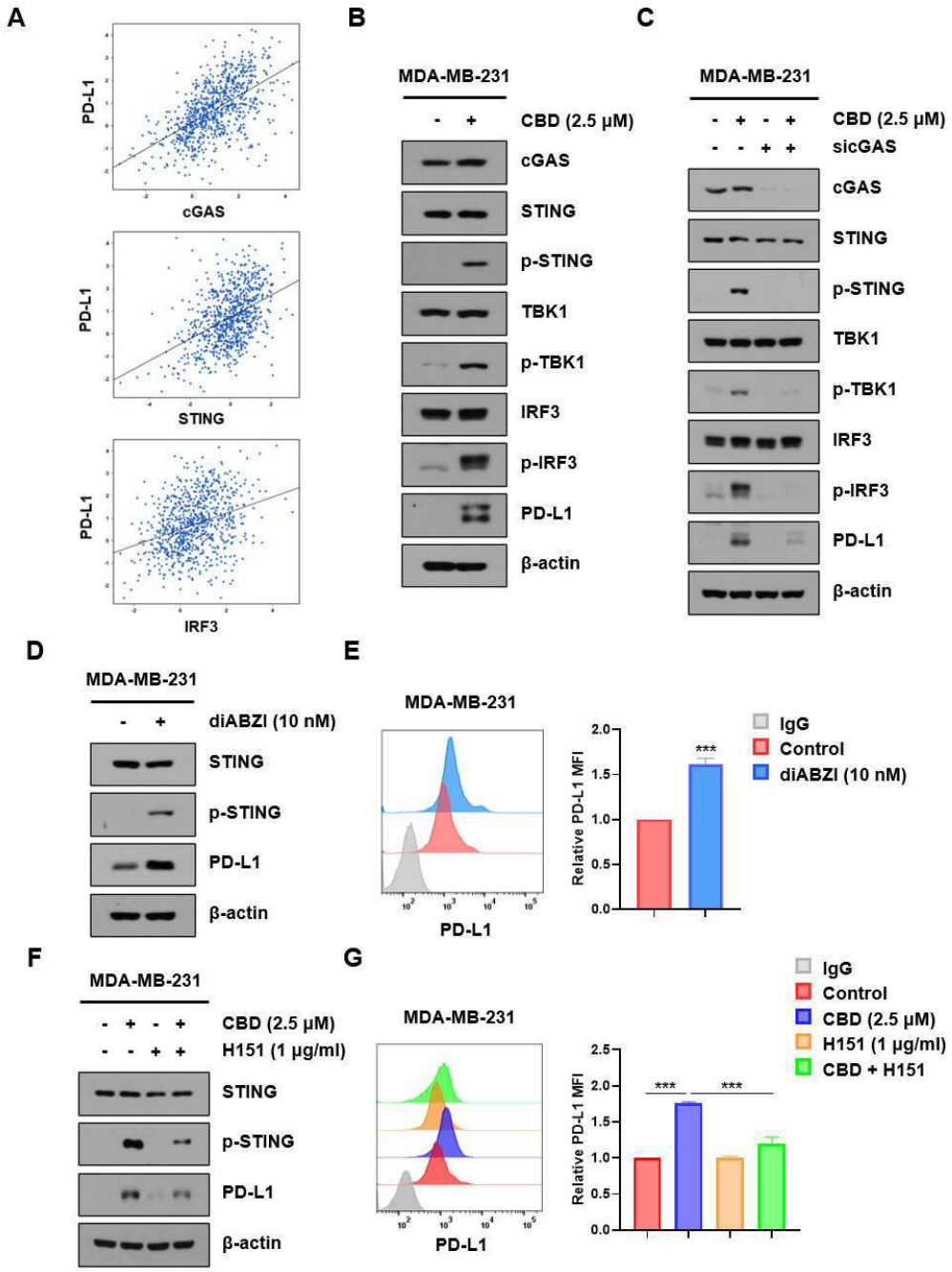
도면3


A
Triple negative breast cancer cell lines
(PD-L1 expression negative)
MDA-MB-453
0 1 2.5 5
CBD (μM)
PD-L1
β-actin
B
HER2 positive breast cancer cell lines
(PD-L1 expression negative)
BT474
SKBR3
C
Hormone receptor positive breast cancer cell lines
(PD-L1 expression negative)
MCF7
T47D
D
Lung cancer cell lines
(PD-L1 expression positive)
Gastric cancer cell lines
(PD-L1 expression positive)
HCC827
NCI-N87

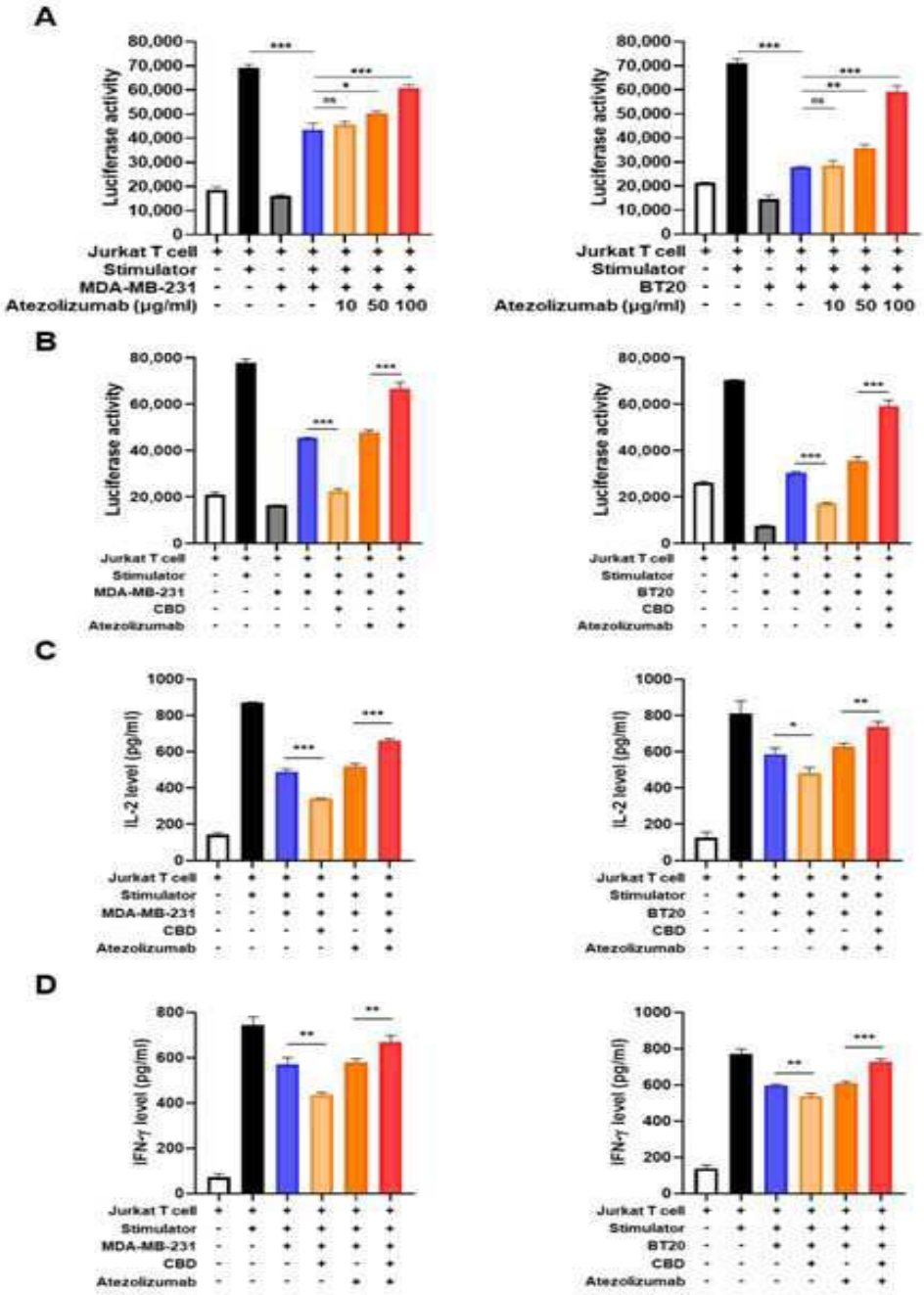
도면4


A
MDA-MB-231
BT20
Cell proliferation (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
***
0
1
2.5
5
CBD (μM)
B
CBD (μM)
0
1
2.5
5
MDA-MB-231
BT20
PI
Annexin V-FITC
C
MDA-MB-231
BT20
Apoptotic cells (%)
100
80
60
40
20
0
***
0
1
2.5
5
CBD (μM)

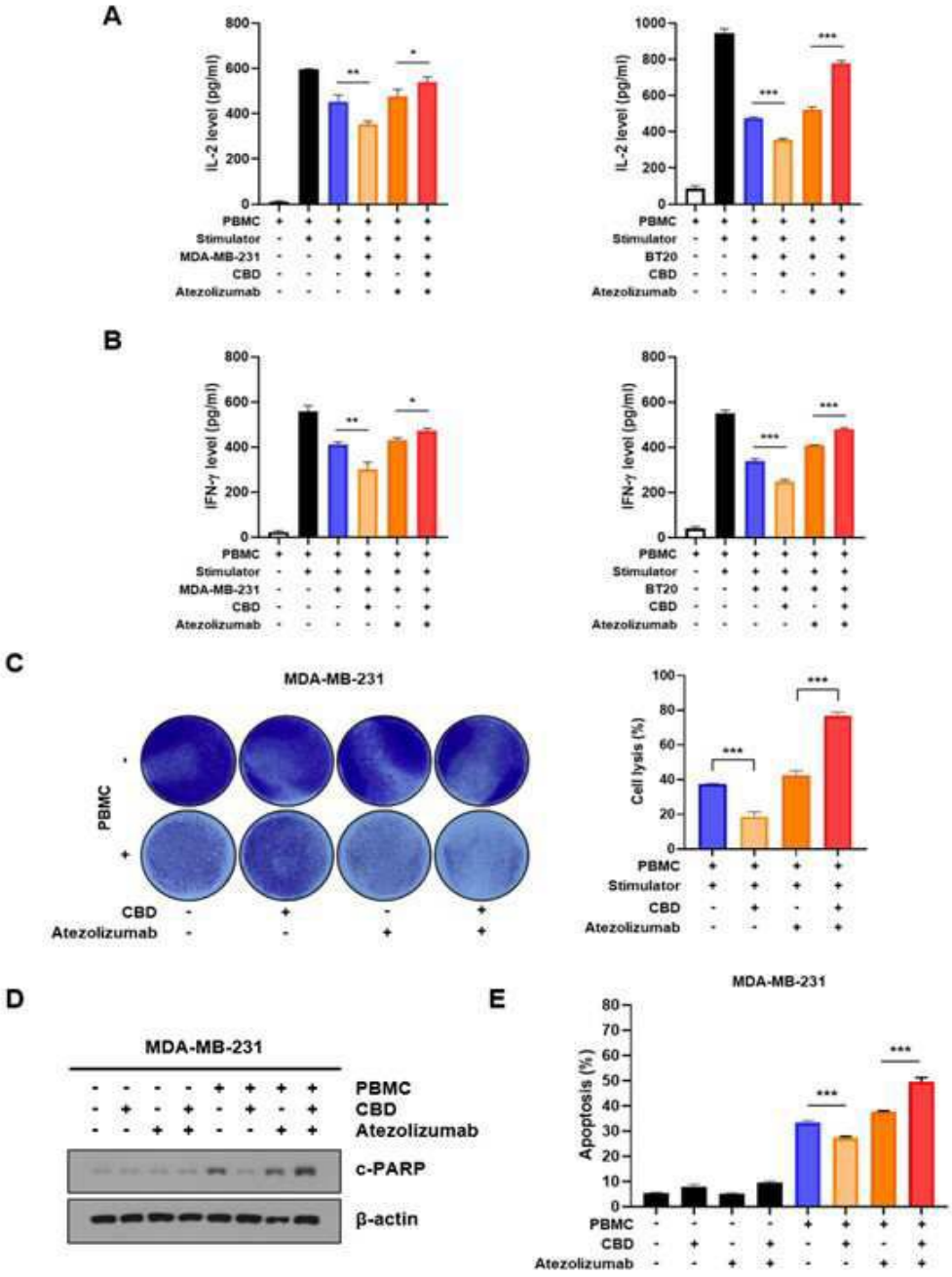
도면5


A
PD-L1
cGAS
PD-L1
STING
PD-L1
IRF3
B
MDA-MB-231
- +
CBD (2.5 μM)
cGAS
STING
p-STING
TBK1
p-TBK1
IRF3
p-IRF3
PD-L1
β-actin
C
MDA-MB-231
- + - +
CBD (2.5 μM)
- - + +
siCGAS
cGAS
STING
p-STING
TBK1
p-TBK1
IRF3
p-IRF3
PD-L1
β-actin
D
MDA-MB-231
- +
diABZI (10 nM)
STING
p-STING
PD-L1
β-actin
E
MDA-MB-231
PD-L1
Relative PD-L1 MFI
***
IgG
Control
diABZI (10 nM)
F
MDA-MB-231
- + - +
CBD (2.5 μM)
- - + +
H151 (1 μg/ml)
STING
p-STING
PD-L1
β-actin
G
MDA-MB-231
PD-L1
Relative PD-L1 MFI
***
***
IgG
Control
CBD (2.5 μM)
H151 (1 μg/ml)
CBD + H151

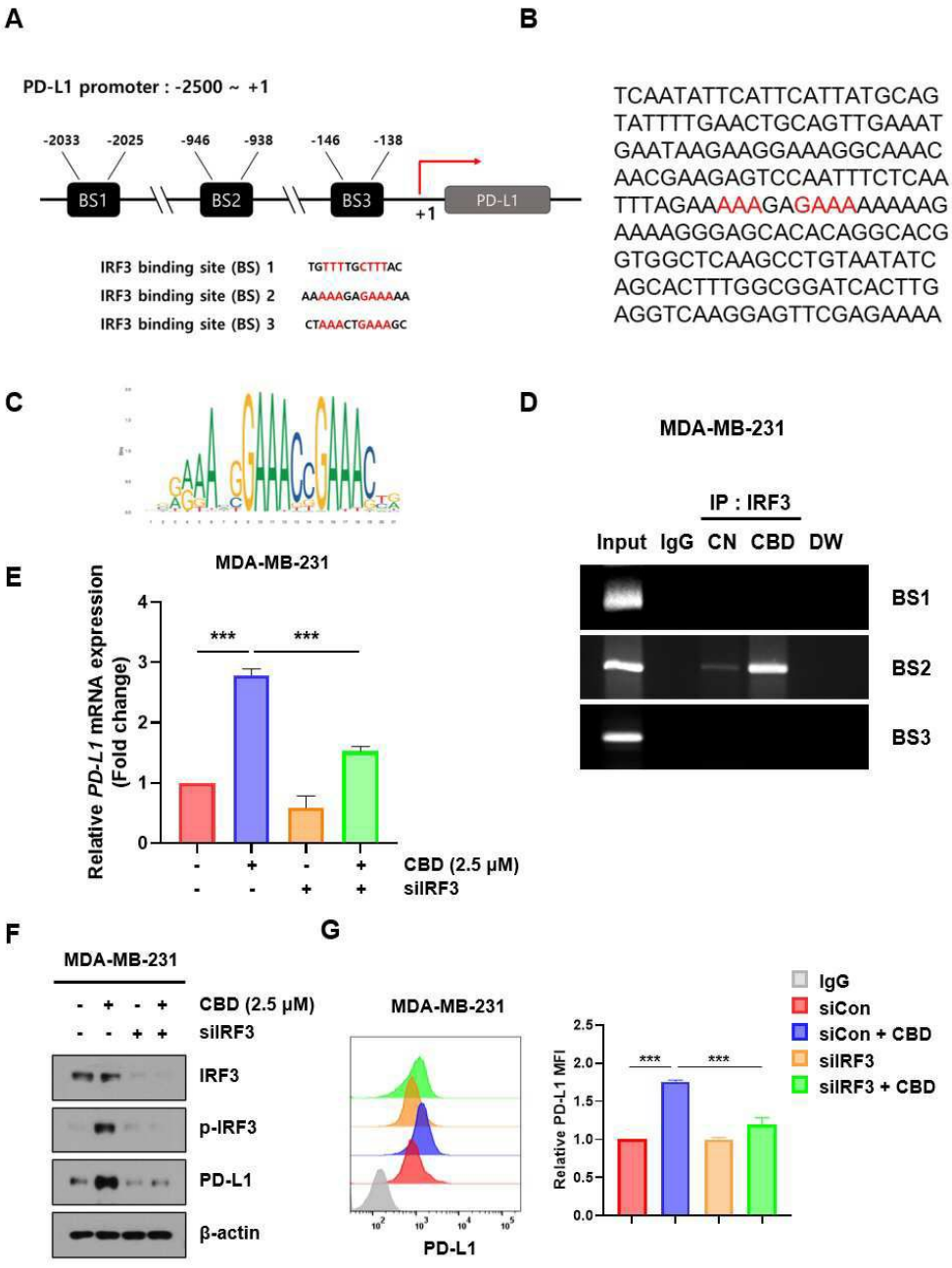
도면6


A
Luciferase activity
80,000
70,000
60,000
50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
Jurkat T cell
Stimulator
MDA-MB-231
BT20
Atezolizumab (μg/ml)
10 50 100
B
CBD
Atezolizumab
C
IL-2 level (pg/ml)
1000
800
600
400
200
D
IFN-γ level (pg/ml)

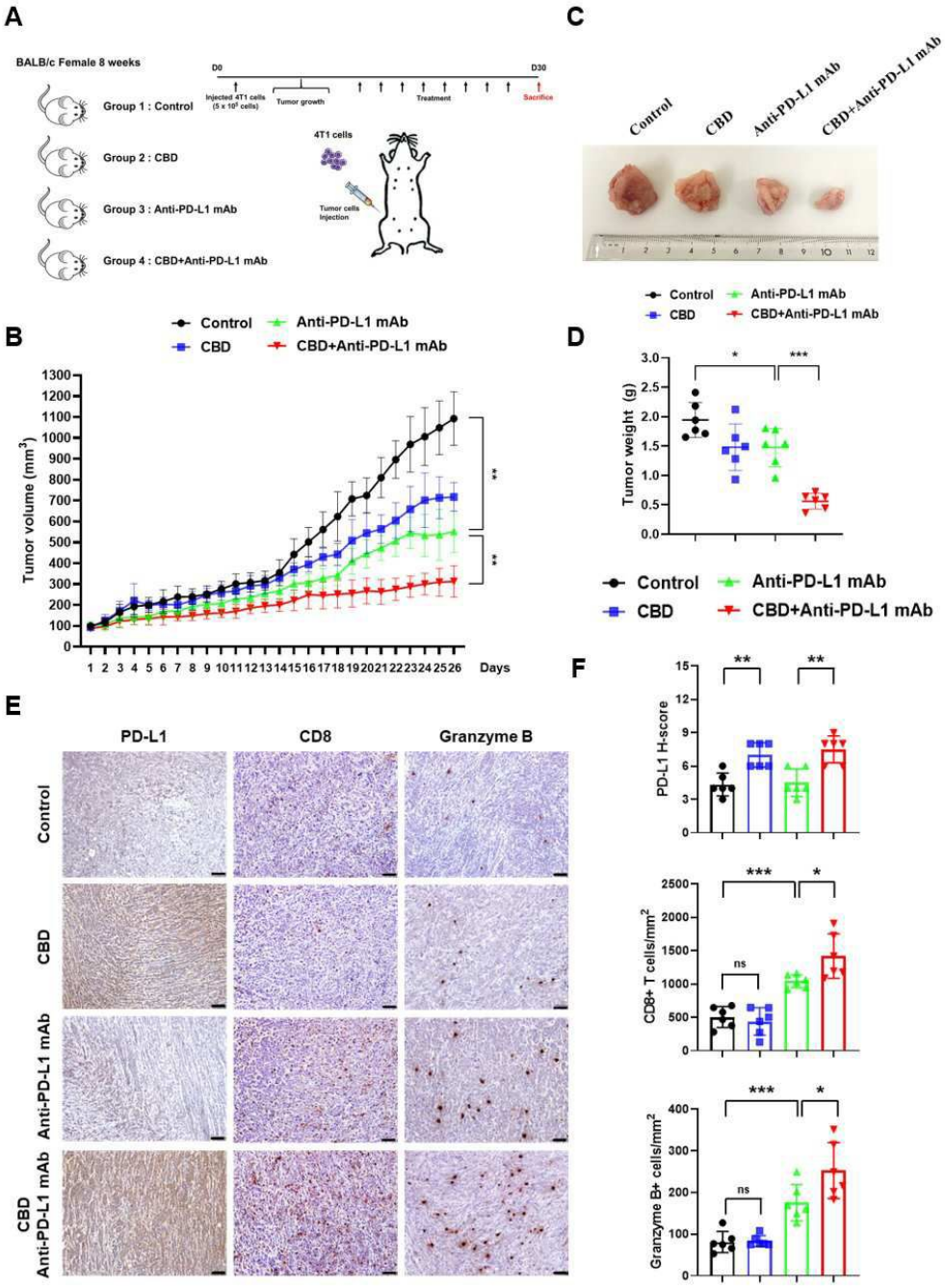
도면7


A
IL-2 level (pg/ml)
PBMC
Stimulator
MDA-MB-231
BT20
CBD
Atezolizumab
B
IFN-γ level (pg/ml)
C
MDA-MB-231
Cell lysis (%)
D
MDA-MB-231
PBMC
CBD
Atezolizumab
c-PARP
β-actin
E
MDA-MB-231
Apoptosis (%)

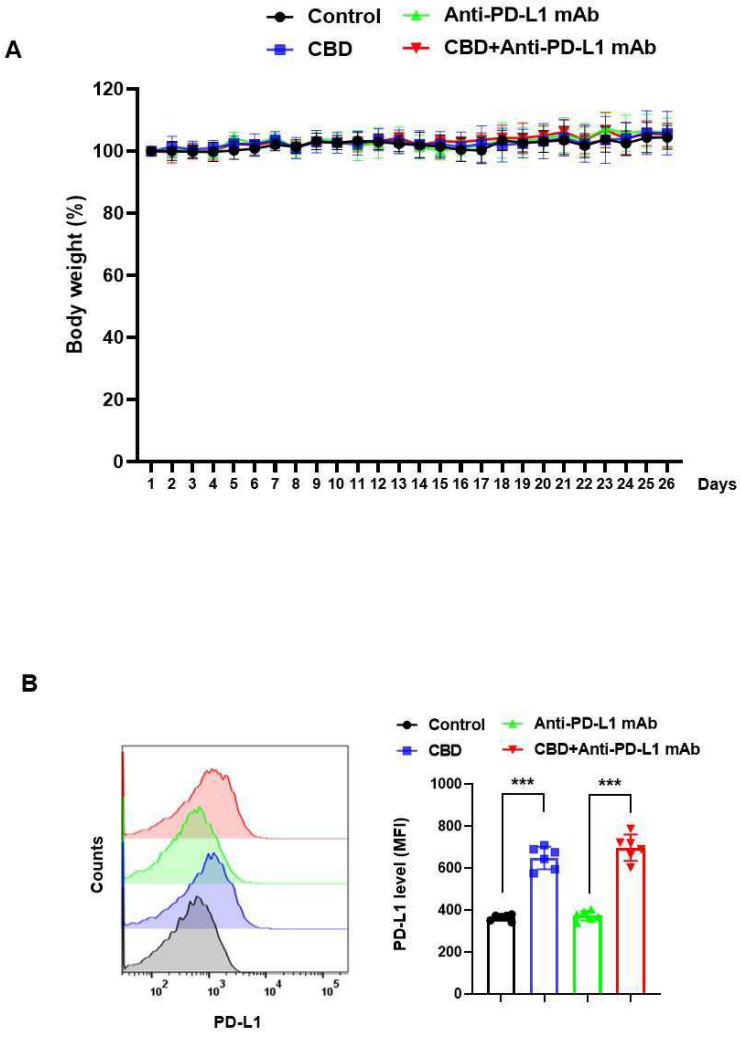
도면8


A
PD-L1 promoter : -2500 ~ +1
-2033
-2025
-946
-938
-146
-138
BS1
BS2
BS3
+1
PD-L1
IRF3 binding site (BS) 1 TGTTTTGCTTTAC
IRF3 binding site (BS) 2 AAAAAGAGAAAAA
IRF3 binding site (BS) 3 CTAAACTGAAAGC
B
TCAATATTCATTCATTATGCAG
TATTTTGAACTGCAGTTGAAAT
GAATAAGAAGGAAAGGCAAAC
AACGAAGAGTCCAATTTCTCAA
TTTAGAAAAAGAGAAAAAAAAG
AAAAGGGAGCACACAGGCACG
GTGGCTCAAGCCTGTAATATC
AGCACTTTGGCGGATCACTTG
AGGTCAAGGAGTTCGAGAAAA
C
D
MDA-MB-231
IP : IRF3
Input IgG CN CBD DW
BS1
BS2
BS3
E
MDA-MB-231
Relative PD-L1 mRNA expression (Fold change)
***
***
CBD (2.5 μM)
siIRF3
F
MDA-MB-231
CBD (2.5 μM)
siIRF3
IRF3
p-IRF3
PD-L1
β-actin
G
MDA-MB-231
PD-L1
IgG
siCon
siCon + CBD
siIRF3
siIRF3 + CBD
Relative PD-L1 MFI
***
***

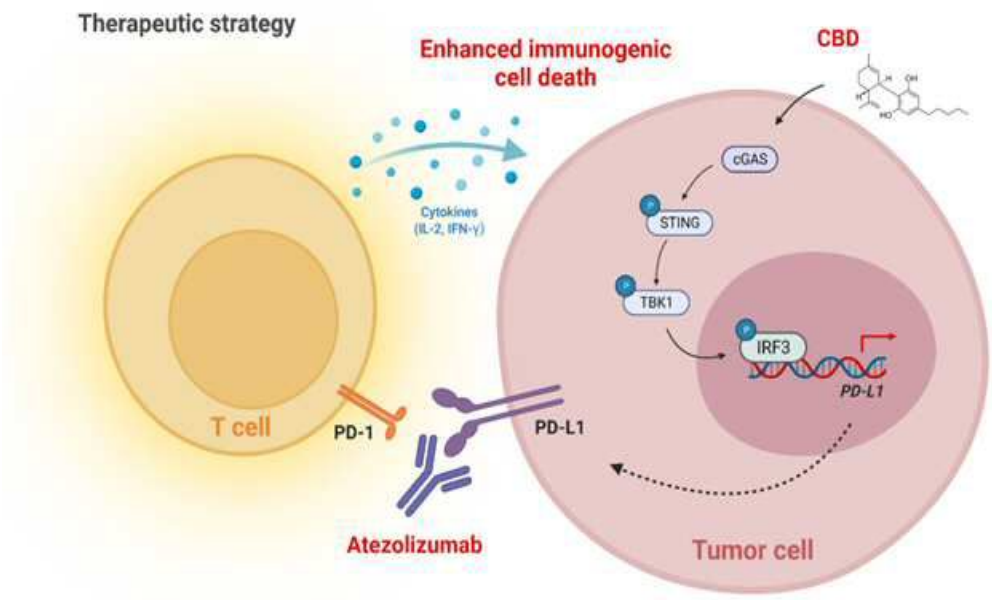
도면9


A
BALB/c Female 8 weeks
D0
D30
Injected 4T1 cells (5 x 10⁵ cells)
Tumor growth
Treatment
Sacrifice
Group 1 : Control
Group 2 : CBD
Group 3 : Anti-PD-L1 mAb
Group 4 : CBD+Anti-PD-L1 mAb
4T1 cells
Tumor cells injection
B
Control
Anti-PD-L1 mAb
CBD
CBD+Anti-PD-L1 mAb
Tumor volume (mm³)
Days
C
Control
CBD
Anti-PD-L1 mAb
CBD+Anti-PD-L1 mAb
D
Tumor weight (g)
E
PD-L1
CD8
Granzyme B
Control
CBD
Anti-PD-L1 mAb
CBD Anti-PD-L1 mAb
F
PD-L1 H-score
CD8+ T cells/mm²
Granzyme B+ cells/mm²
ns

도면10


A
Control
Anti-PD-L1 mAb
CBD
CBD+Anti-PD-L1 mAb
Body weight (%)
Days
B
Counts
PD-L1
PD-L1 level (MFI)
***
***

도면11


Therapeutic strategy
Enhanced immunogenic cell death
CBD
cGAS
STING
TBK1
IRF3
PD-L1
Cytokines (IL-2, IFN-γ)
T cell
PD-1
PD-L1
Atezolizumab
Tumor cell