(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0001484
(43) 공개일자 2022년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G16H 50/20* (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01) *G16H 50/70* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
G01N 33/57488 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0083276
(22) 출원일자 2021년06월25일
심사청구일자 2021년06월25일
(30) 우선권주장
1020200079370 2020년06월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김병수
서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 201동 603호
박용
서울특별시 성북구 정릉 4동 풍림아이원아파트 116동 402호
이병현
서울특별시 중구 다산로 258 A동 1503호(흥인동, 리마크빌동대문)
(74) 대리인
공병욱

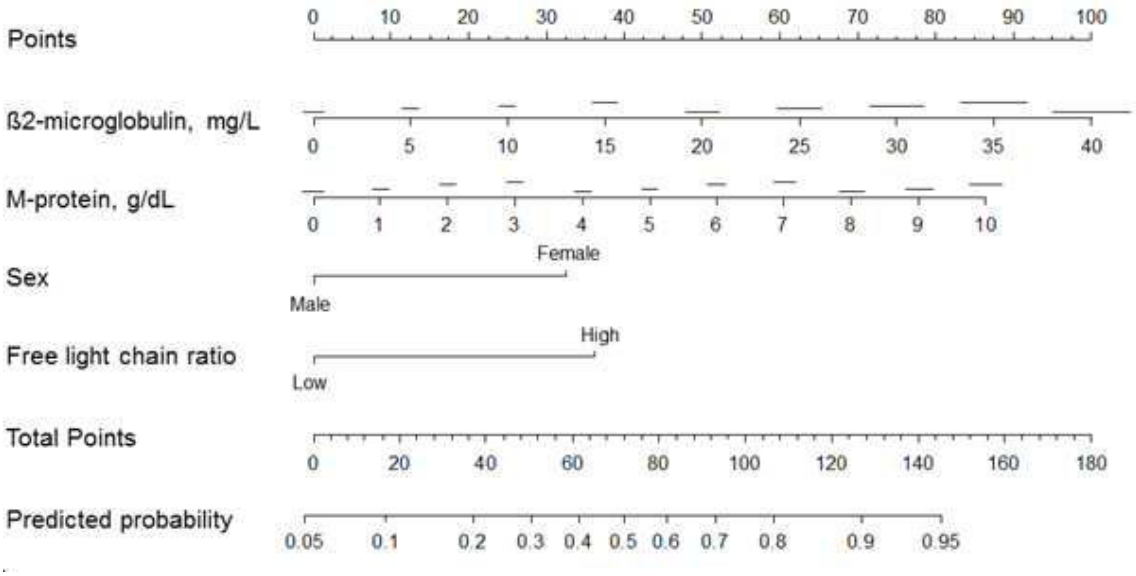
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **다발골수종에서 혈액 표지자를 이용한 세레블론 발현 예측 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈액 표지자(blood marker)를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현 정도 예측 방법 및 다발골수종(multiple myeloma)의 면역조절제 투약에 따른 예후에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면 골수 검사 없이 세레블론 고발현군(25% 이상)을 예측할 수 있으며, 면역치료제에 효과가 작을 것으로(혹은 클 것으로) 생각되는 환자들을 효과적으로 선별하여 이를 바탕으로 다발골수종 환자에서 면역조절제 투약 여부를 결정할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
G16H 50/20 (2018.01)
G16H 50/30 (2018.01)
G16H 50/70 (2018.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082359
과제번호	2017M3A9C8060403
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명	신규 면역세포치료제의 다발 골수종 임상 적용 가능성 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.01.30 ~ 2019.12.31

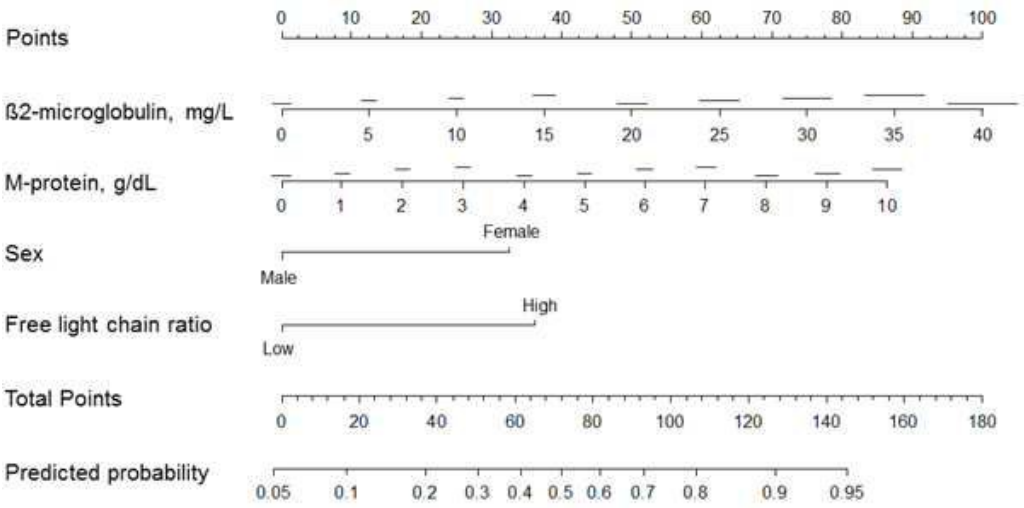
명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 혈액 표지자(blood marker)를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현 정도 예측 방법:

(a) 다발골수종 환자에서 채취한 혈액 시료에서 b2-MG, serum M-protein, 및 FLC ratio의 측정 및 다발골수종 환자의 성별을 확인하는 단계;



(b) 상기 노모그램에 따른 하기 기준에 따른 점수를 부여하는 점수 배점 단계:

i) 성별, ii) 혈중 FLC ratio(0.01 초과~100 미만은 low, 0.01 이하 및 100 이상은 high, iii) 혈중 b2-MG 농도, iv) 혈청 M-단백질 농도를 기준으로 상기 노모그램(nomogram)에서 상응하는 점수(points)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

(c) 상기 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)를 구한 후 78점 미만이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 미만으로 발현된 군으로 예측하고, 78점 이상이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 예측하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골수 형질세포 내 세레블론의 발현 정도는 전체 골수 내 형질세포 중 세레블론을 발현하는 형질세포의 비율(%)인, 방법.

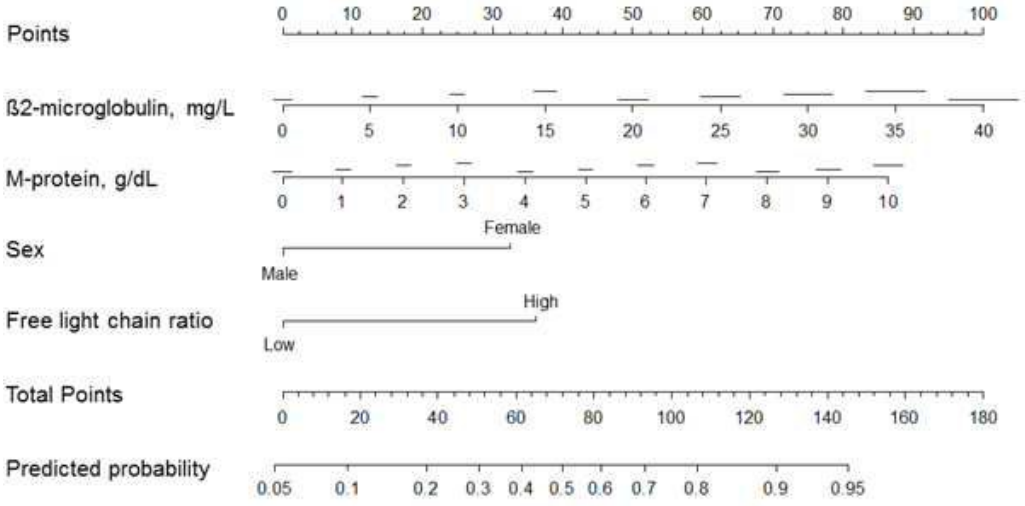
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 예측되는 세레블론의 발현 정도는 세레블론에 특이적인 항체를 이용한 면역화학염색법에 의하여 측정된 발현 정도인, 방법.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 다발골수종(multiple myeloma)의 면역조절제 투약에 따른 예후에 대한 정보를 제공하는 방법:

(a) 다발골수종 환자에서 채취한 혈액 시료에서 b2-MG, serum M-protein, FLC ratio의 측정 및 성별을 확인하는 단계;



(b) 상기 노모그램에 따른 하기 기준에 따른 점수를 부여하는 점수 배점 단계:

i) 성별, ii) 혈중 FLC ratio(0.01 초과~100 미만은 low, 0.01 이하 및 100 이상은 high, iii) 혈중 b2-MG 농도, iv) 혈청 M-단백질 농도를 기준으로 상기 노모그램(nomogram)에서 상응하는 점수(points)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

(c) 상기 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)를 구한 후 78점 미만이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 미만으로 발현된 군으로 예측하고, 78점 이상이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 예측하는 단계; 및

(d) 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 분류된 환자에게 면역조절제 투여 여부 결정에 필요한 정보를 제공하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 정보는 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상 발현된 군으로 분류된 환자에게 면역조절제 투여 시 생존율이 향상된다는 정보인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 골수 형질세포 내 세레블론의 발현 정도는 전체 골수 내 형질세포 중 세레블론을 발현하는 형질세포의 비율(%)인, 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 예측되는 세레블론의 발현 정도는 세레블론에 특이적인 항체를 이용한 면역화학염색법에 의하여 측정된 발현 정도인, 방법.

청구항 8

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 면역조절제는 탈리도마이드(thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide), 및 포말리도마이드(pomalidomide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈액 표지자를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현 정도 예측 방법 및 면역조절제 투약에 따른 다발골수종 환자의 예후에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 보다 구체적으로, 본 발명은 다발골수종 환자의 골수 내 형질세포(골수종세포)에서 발현되는 세레블론을 혈액 표지자를 이용하여 예측하는 모형과 이를 이용하여 면역조절제 투약 대상을 선정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 세레블론(cereblon)은 탈리도마이드(thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide) 등 면역조절제의 타겟 단백질로 밝혀져 있다. 이에 따라, 세레블론(cereblon)의 발현에 따른 환자의 예후와 면역조절제 투약 반응에 대한 연구들이 진행되어 왔으며 특히 면역조절제가 치료의 중심인 다발골수종에서 관련 연구 결과가 다수 보고되어 있다. 기존 연구 결과 세레블론의 발현이 높은 환자에서 면역조절제를 투약하였을 때 좋은 치료반응과 예후를 보였으나 프로테아좀 억제제 등의 다른 약제로 치료한 군에서는 세레블론의 발현에 따른 치료 반응과 예후에 차이가 없었다.

[0005] 본 연구자들은 다발골수종 환자의 진단 시 골수조직을 이용하여 골수종세포에서 세레블론의 발현을 면역조직화학염색법으로 측정하였고, 세레블론의 발현이 다발골수종 환자의 예후에 미치는 영향을 통계적 방법으로 분석하였다. 분석 결과 세레블론 고발현군에서 면역조절제를 투약할 경우 생존 예후가 좋음을 확인하였고 고발현의 기준을 25%로 하였을 때 생존 예후를 가장 잘 예측할 수 있음도 확인하였다.

[0006] 하지만 일반적으로 다발골수종 진단 시 골수 조직에서 세레블론의 발현을 측정하지는 않으며 골수 조직에서 면역조직화학염색법으로 세레블론의 발현을 확인할 경우 진단까지 시간과 비용이 많이 소모되는 문제가 있다.

[0007] 이에 본 연구자들은 골수 내 골수종세포에서의 세레블론 고발현(25% 이상 발현) 여부를 골수검사를 시행하지 않고 혈액 검사로 측정 가능한 혈액 표지자(blood marker)들을 이용하여 예측할 수 있는 모형을 개발하였다. 기존에는 세레블론 발현을 혈액 표지자(blood marker)를 이용하여 예측하는 방법은 개발되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) PCT 특허출원 제PCT/US2012/035429호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허출원 제10-2013-7031674호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 골수 내 골수종세포에서의 세레블론 고발현(25% 이상 발현) 여부를 골수검사를 시행하지 않고 혈액 검사로 측정 가능한 혈액 표지자(blood marker)들을 이용하여 예측할 수 있는 모형을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명에서 개발한 모형에 따르면 골수검사의 시행 없이 혈액 검사 결과로 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론 발현 정도 및 그에 따른 면역조절제 투약에 따른 예후에 관한 예측이 가능함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 혈액 표지자를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현

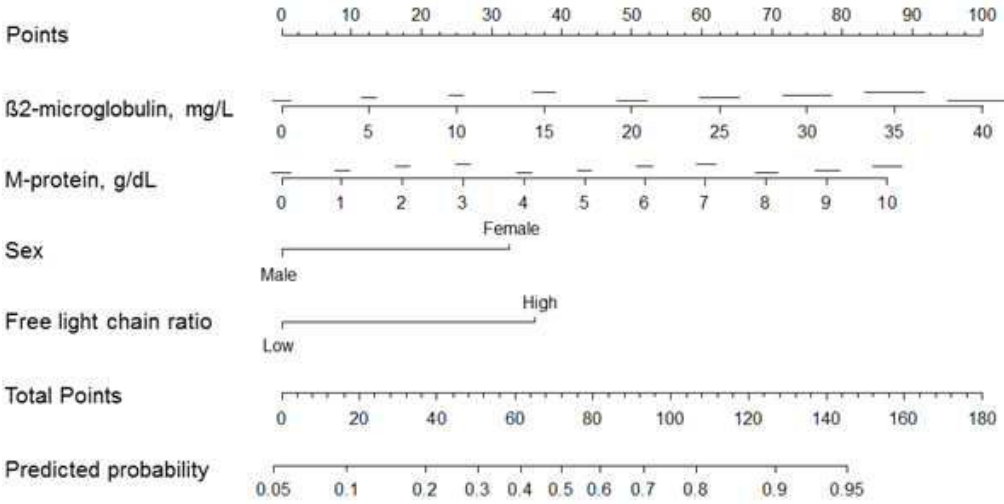
정도 예측 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 다발골수종(multiple myeloma)의 면역조절제 투약에 따른 예후에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 혈액 표지자를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현 정도 예측 방법을 제공한다:

[0015] (a) 다발골수종 환자에서 채취한 혈액 시료에서 b2-MG, serum M-protein, 및 FLC ratio의 측정 및 다발골수종 환자의 성별을 확인하는 단계;

[0016] 

[0017] (b) 상기 노모그램에 따른 하기 기준에 따른 점수를 부여하는 점수 배점 단계:

[0018] i) 성별, ii) 혈중 FLC ratio(0.01 초과~100 미만은 low, 0.01 이하 및 100 이상은 high, iii) 혈중 b2-MG 농도, iv) 혈청 M-단백질 농도를 기준으로 상기 노모그램(nomogram)에서 상응하는 점수(points)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

[0019] (c) 상기 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)를 구한 후 78점 미만이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 미만으로 발현된 군으로 예측하고, 78점 이상이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 예측하는 단계.

[0020] 본 명세서에서 용어 "세레블론(cereblon)"은 CRBN 유전자에 의해 인코딩되는 인간의 단백질이다. CRBN 유전자는 인간의 3번 염색체의 short arm 상에 p26.3 위치에 존재하며, CRBN의 ortholog는 식물에서 인간에 이르기까지 보존성이 높다고 알려져 있다. 상기 세레블론은 탈리도마이드(thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide) 등 면역조절제의 타겟 단백질로 밝혀져 있다

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 골수 형질세포 내 세레블론의 발현 정도는 전체 골수 내 형질세포 중 세레블론을 발현하는 형질세포의 비율(%)을 뜻한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 예측되는 세레블론의 발현 정도는 세레블론에 특이적인 항체를 이용한 면역화학염색법에 의하여 측정된 발현 정도를 나타내는 것이다.

[0023] 형질세포에 의해 생성된 면역글로불린은 두 개의 중쇄(Heavy chain)와 두 개의 경쇄(Light chain)가 결합되어 있다. Heavy chain에는 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE가 있고 Light chain에는 Kappa (κ), Lambda (λ)가 있는데 이 과정 중 Heavy chain과 결합하지 못한 것을 유리형 경쇄(Free Light chain, FLC)라고 한다. 최근 다발골수종을 진단 및 추적 검사하는 방법으로 기존의 PEP, IFE방법 외에 FLC와 κ/λ 비의 측정이 주목받고 있다. 특히 새로 개정된 다발골수종의 진단기준에서는 M-protein을 검출할 수 없는 경우 비정상적인 κ/λ비를 진단기준에 포함하고 있어 그 중요성이 높아지고 있으며, 2008년 12월 국제골수종협회(IMWG)에서는 MGUS 환자의 혈청 FLC 농도의 Kappa (κ)형과 Lambda (λ)형의 비정상적인 비율을 악성질환으로 진행될 위험 인자로 간주해 6개월, 1

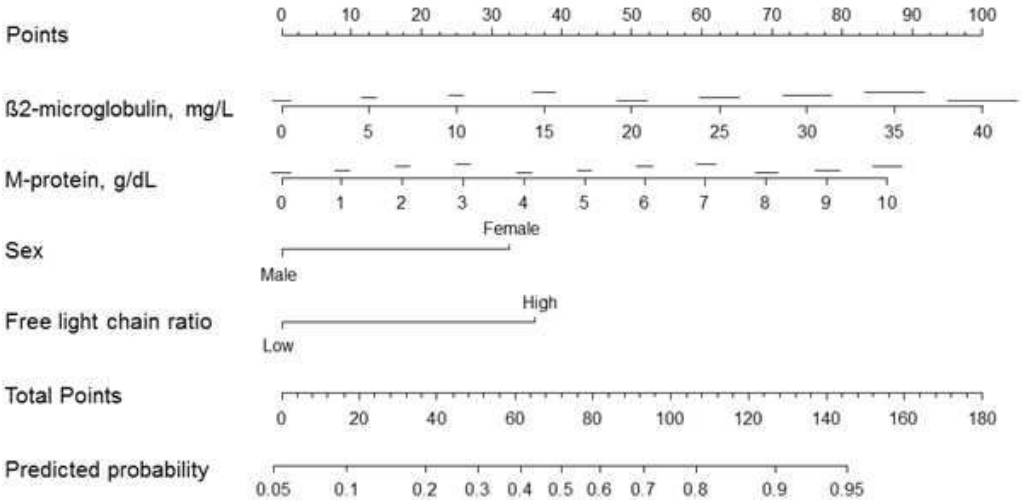
년마다의 정기적인 검진을 권고한 바 있다.

[0024] 명세서에서 용어 b2-MG (beta2 microglobulin)는 인체 내 거의 모든 세포의 표면에 존재하는 단백질이다. b2-MG는 대부분의 체액에 존재하며, 다발골수종, 백혈병, 및 림프종과 같은 암이나 염증성 질환이 있을 때 혈액 내 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0025] 형질세포(Plasma cell)는 B 림프구(B cell)에서 성숙하고 분화된 것으로, 항원의 자극에 의해서 면역글로불린을 합성하고 분비하는 역할을 한다. 면역글로불린은 통상 다수의 클론(clone)에 의해 생성되기 때문에 혈청 혹은 소변의 단백 전기영동검사로 분획하면 이동도가 가장 느린 음극축 영역인 베타 및 감마-globulin 분획에 IgG, IgM, IgA 등 모든 class의 면역글로불린이 폭넓게 분포하게 된다. 그러나 병적 상태에서는 단일 클론에서 단일 면역글로불린을 생성하므로 균일하게 증가하게 되는데, 이를 단일클론성 단백(Monoclonal protein, M-protein)이라고 한다. 이러한 M-protein이 과다하게 생산되는 병적상태 즉 형질세포의 증식 이상에 의해서 발생하는 질환군을 일괄하여 단클론 감마글로불린병증(Monoclonal gammopathy, plasma cell dyscrasia, M-단백혈증, MG)이라고 하고, 다발골수종(Multiple myeloma, MM), 의미불명 단클론 감마글로불린병증(Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), 무증상 다발골수종 (Smoldering multiple myeloma, SMM), 원발성 전신성유전분증(Primary systemic amyloidosis) 등이 이에 속하는 것으로 알려져 있다.

[0026] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 다발골수종(multiple myeloma)의 면역조절제 투약에 따른 예후에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0027] (a) 다발골수종 환자에서 채취한 혈액 시료에서 b2-MG, serum M-protein, FLC ratio의 측정 및 성별을 확인하는 단계;

[0028] 

[0029] (b) 상기 노모그램에 따른 하기 기준에 따른 점수를 부여하는 점수 배점 단계:

[0030] i) 성별, ii) 혈중 FLC ratio (0.01 초과~100 미만은 low, 0.01 이하 및 100 이상은 high, iii) 혈중 b2-MG 농도, iv) 혈청 M-단백질 농도를 기준으로 상기 노모그램(nomogram)에서 상응하는 점수(points)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

[0031] (c) 상기 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)를 구한 후 78점 미만이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 미만으로 발현된 군으로 예측하고, 78점 이상이면 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 예측하는 단계; 및

[0032] (d) 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 예측된 환자에게 면역조절제 투여 여부 결정에 필요한 정보를 제공하는 단계.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역조절제 투여 여부 결정에 필요한 정보는 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 이상으로 발현된 군으로 분류된 환자에게 면역조절제 투여시 생존율이 향상된다는 정보이다.

[0034] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 면역조절제 투여 여부 결정에 필요한 정보는 골수 형질세포 내 세레블론이 25% 미만으로 발현된 군으로 분류된 환자에게 면역조절제 투여시 생존율의 향상 효과에 통계적 유의성이 없다는 정보이다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 골수 형질세포 내 세레블론의 발현 정도는 전체 골수 내 형질세포 중 세레블론을 발현하는 형질세포의 비율(%)을 뜻한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 예측되는 세레블론의 발현 정도는 세레블론에 특이적인 항체를 이용한 면역화학염색법에 의하여 측정된 발현 정도를 나타낸다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역조절제는 탈리도마이드(thalidomide), 레날리도마이드(lenalidomide), 및 포말리도마이드(pomalidomide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에 따른 예측 방법은 세레블론(cereblon) 고발현군(25% 이상)으로 예측한 환자들에서 면역조절제를 투약에 대한 생존 분석을 시행하였을 때 높은 예후 판별력을 보였으며 두 개의 외부 코호트 자료에서 validation을 시행하여 정확도가 높음이 확인되었다. 따라서, 이로부터 면역치료제에 효과가 작을 것으로(혹은 클 것으로) 생각되는 환자들을 효과적으로 선별할 수 있으며 이를 바탕으로 다발골수종 환자에서 면역조절제 투약 여부 결정에 도움이 되는 정보를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명은 혈액 표지자를 이용한 다발골수종 환자의 골수 형질세포 내 세레블론(cereblon) 발현 정도 예측 방법 및 다발골수종(multiple myeloma)의 면역조절제 투약에 따른 예후에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면 골수 검사를 하지 않고서도 세레블론 고발현군(25% 이상)을 예측할 수 있으며, 면역치료제에 효과가 작을 것으로(혹은 클 것으로) 생각되는 환자들을 효과적으로 선별하여 이를 바탕으로 다발골수종 환자에서 면역조절제 투약 여부를 결정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a, 도 1b는 현미경을 이용하여 다발골수종 환자의 골수 내 형질세포(골수종세포)에서 세레블론(cereblon)이 발현되는 것을 확인한 도이다.

도 2a 내지 도 2c는 전체 환자 130명의 샘플과, cut-off 25%를 기준으로 세레블론 고발현군 64명, 세레블론 저발현군 66명 환자에서 면역조절제(탈리도마이드, 레날리도마이드 및/또는 포말리도마이드)가 포함된 요법과 포함되지 않은 요법으로 치료받은 군 간의 전체생존율(overall survival)을 나타낸 도이다.

도 3a 내지 도 3c는 전체 환자 130명의 샘플과, cut-off 25%를 기준으로 세레블론 고발현군 64명, 세레블론 저발현군 66명 환자에서 면역조절제(탈리도마이드, 레날리도마이드 및/또는 포말리도마이드)가 포함된 요법과 포함되지 않은 요법으로 치료받은 군 간의 무진행생존율(progression-free survival)을 나타낸 도이다.

도 4a는 골수 내 형질세포 내에서 세레블론의 발현 정도(%)와 b2-MG, serum M-protein의 농도와의 상관관계를 분석한 도이다.

도 4b는 성별 및 FLC ratio와 골수 내 형질세포 내에서 세레블론의 발현 정도(%)와의 상관관계를 분석한 도이다.

도 5은 골수 형질세포 내 세레블론의 발현 정도 예측에 영향을 미치는 인자를 중심으로 단변수, 다변수 콕스 회귀분석을 시행하여 나타낸 도이다.

도 6은 상기 다변수 콕스 회귀분석 결과를 이용하여 작성한 노모그램을 나타낸 도이다.

도 7a은 상기 도 6에서 작성한 노모그램의 정확도를 calibration하여 나타낸 도이며 도 7b는 상기 도 6에서 작성한 노모그램의 예측성능을 AUC 커브를 작성하여 나타낸 도이다.

도 8a 및 도 8b는 본 발명의 예측 모형(노모그램)에 의한 점수가 78점 이상인 세레블론 고발현군과 78점 미만인 저발현군으로 예측된 환자를 대상으로 면역조절제 투약에 대한 생존 분석을 시행한 결과를 나타낸 도이다.

도 9a 및 도 9b는 2000년 1월부터 2019년 12월까지 고려대의료원 구로병원에서 치료를 받은 전체 다발골수종 환자에 본 발명의 예측 모형(노모그램)을 적용하여 78점 이상으로 세레블론 고발현(25% 이상 발현)으로 예측된 환

자 93명과 78점 미만으로 저발현(25% 미만 발현)으로 예측된 환자 121명을 대상으로 면역조절제 투약에 대한 생존분석을 시행한 결과를 나타낸 도이다.

도 10a 및 도 10b는 2000년 1월부터 2019년 12월까지 고려대의료원 안산병원에서 치료를 받은 전체 다발골수종 환자에 본 발명의 예측 모형(노모그램)을 적용하여 78점 이상으로 세레블론 고발현(25% 이상 발현)으로 예측된 환자 72명과 78점 미만으로 저발현(25% 미만 발현)으로 예측된 환자 70명을 대상으로 면역조절제 투약에 대한 생존분석을 시행한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] **실시예**

[0047] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0049] **실시예 1: 다발골수종 환자의 골수샘플 준비**

[0050] 실험에 사용된 환자의 샘플은 2010년 1월부터 2019년 5월까지 고려대학교 안암병원 혈액종양내과에서 골수검사 후 다발골수종으로 진단된 환자 143명으로부터 얻었다. 모든 샘플은 진단 시 사용된 골수 파라핀 cell block으로 IRB 승인 후 프로토콜에 따라 준비하였으며, 각 샘플당 적어도 2개 이상의 절편을 제작하여 확인하였다.

[0052] **실시예 2: 면역화학염색**

[0053] **2-1. 면역화학염색 과정**

[0054] 준비된 골수 파라핀 cell block에서 4-5um 두께의 절편을 잘라 슬라이드를 제작하였고 60° C에서 1시간 건조한 후 xylene으로 15분 동안 3회, 100%, 95%, 70% ethanol로 각각 5분 동안 2회 처리한 후 흐르는 물로 세척하여 탈파라핀화를 시행하였다. 이후 압력 쿠커를 이용하여 sodium EDTA buffer pH 9.0내에서 10분 동안 끓인 후 흐르는 물로 냉각시켜 항원성을 복원하였다. 이후 peroxidase blocking agent로 10분간 처리 후 TBS buffer로 5분간 3회 세척하고 일차항체로 rabbit anti-CD138 mAb [EP201] (Medaysis)와 mouse cereblon mAb [2A9D11] (Proteintech)를 4℃에서 overnight로 배양하였다. 이후 TBS로 5분 동안 3회 세척하고 HRP-Polymer anti-mouse IgG와 AP-Polymer anti-rabbit IgG를 1:1로 혼합하여 30분간 배양 후 TBS로 5분 동안 3회 세척하였다. 이후 Permanent Red Substrate, Permanent Red Activator, Permanent Red Chromogen를 혼합하여 10분간 배양 후 세척하였고 이어서 Emerald Chromogen으로 3분간 배양 후 흐르는 물로 1분간 세척하고 dehydration 후 mounting 하였다.

[0056] **2-2. 면역화학염색 분석**

[0057] 현미경을 이용하여 다발골수종 환자의 골수 내 형질세포(골수종 세포)에서 세레블론이 발현되는 것을 확인한 후, 형질세포에서 세레블론의 발현을 측정하였다 (도 1a, 도 1b). 세레블론의 발현은 전체 형질세포 중 세레블론이 염색되는 형질세포의 비율을 기준으로 0%에서 100% 범위로 측정하였고 Contal and O`Quigley method와 median value를 이용하여 optimal cut-off value를 결정하였다. 이를 기준으로 0%를 negative, 0에서 25% 미만을 저발현군(low expression), 25% 이상을 고발현군(high expression)으로 정의하였다.

[0059] **실시예 3: 생존분석**

[0060] 분석 가능한 전체 환자 130명의 샘플과, cut-off 25%를 기준으로 세레블론 고발현군 64명, 세레블론 저발현군

66명 환자에서 면역조절제(탈리도마이드, 레날리도마이드 및/또는 포말리도마이드)가 포함된 요법과 포함되지 않은 요법으로 치료받은 군 간의 전체생존율(overall survival)과 무진행생존율(progression-free survival)에 대한 분석을 시행하였다. 생존곡선은 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존분석을 이용하여 작성하였고 로그순위 검정(log-rank test)으로 두 군의 생존율을 비교하였다.

[0061] 결과는 도 2a 내지 2c 및 도 3a 내지 3c에 나타내었다.

[0062] 분석 결과 전체 환자에서는 면역조절제를 투약한 군에서 전체생존율이 높았다(도 2a). 세레블론 고발현군에서는 면역조절제 투약 군에서 유의하게 전체생존율이 높았으나(도 2b) 세레블론 저발현군에서는 면역조절제 투약에 따른 전체생존율의 차이가 없었다(도 2c). 무진행생존율 분석에서도 세레블론 고발현군에서는 면역조절제 투약을 한 군에서 유의하게 무진행생존율이 높았으나(도 3b) 세레블론 저발현군에서는 차이가 없었다 (도 3c).

[0064] **실시예 4: 혈액 표지자(blood marker) 기반의 세레블론(cereblon) 발현 예측 모형**

[0065] **실시예 4-1. 세레블론과 연관된 혈액 표지자 분석**

[0066] 골수 내 형질세포의 세레블론 발현과 다양한 혈액 표지자 간의 상관관계를 통계적으로 분석하였고 그 결과, b2-MG, serum M-protein, FLC ratio, 및 Sex가 골수 내 형질세포의 세레블론의 발현과 유의한 관련이 있음을 확인하였다 (도 4a 및 도 4b).

[0068] **실시예 4-2. 세레블론(cereblon) 발현 예측 모형**

[0069] 상관분석으로 확인된 상기 유의한 인자들을 중심으로 univariabla and multivariable Cox regression 분석을 시행하여(도 5), 성별, 혈중 FLC ratio(0.01 초과~100 미만은 low, 0.01 이하 및 100 이상은 high, 혈중 b2-MG 농도, 혈청 M-단백질 농도를 기준으로 상응하는 점수(points)를 가산하는 노모그램(nomogram)을 개발하였다 (도 6). 개발한 모형은 calibration이 잘 되었으며 (도 7a), 이 노모그램을 바탕으로 78점을 cut-off로 하여 세레블론 고발현을 예측하였을 때 AUC 0.796 (민감도 0.847, 특이도 0.662)으로 예측 성능이 좋음을 확인하였다(도 7b).

[0071] **실시예 5: 세레블론(cereblon) 예측 모형을 이용한 면역조절제 투약에 대한 예후 분석**

[0072] **실시예 5-1. 내부 자료 분석**

[0073] 세레블론 발현을 분석한 전체 143명의 환자 중 분석 가능한 130명의 환자에서 본 예측 모형에 의한 점수가 78점 이상으로 세레블론 고발현으로 예측된 53명의 환자들과 저발현으로 예측된 77명의 환자들을 대상으로 면역조절제 투약에 대한 생존분석을 시행하였다(도 8a 및 도 8b). 분석 결과, 상기 세레블론 고발현으로 예측된 53명의 환자들에서 전체생존율, 무진행생존율에서 모두 면역조절제를 투약할 경우 유의하게 생존율이 높음을 확인하였다. 그러나, 세레블론 저발현으로 예측된 77명의 환자들에서는 면역조절제 투약에 따른 생존 예후에 차이가 없었다.

[0075] **실시예 5-2. 외부 데이터를 이용한 validation**

[0076] 고려대의료원 구로병원, 고려대의료원 안산병원에서 수집한 외부 데이터에 상기 실시예 4에서 개발한 모형을 적용하여 예후를 분석하였다.

[0077] 2000년 1월부터 2019년 12월까지 고려대의료원 구로병원에서 치료를 받은 전체 다발골수종 환자에 본 모형을 적용하여 78점 이상으로 세레블론 고발현으로 예측된 93명의 환자들과 저발현으로 예측된 121명의 환자들을 대상으로 면역조절제 투약에 대한 생존분석을 시행하였다. 분석 결과, 면역조절제를 투약한 환자들에서 유의하게 전체생존율과 무진행생존율이 높음을 확인하였다(도 9a 및 도 9b). 그러나, 세레블론 저발현으로 예측된 환자들에서는 면역조절제 투약에 따른 생존 예후에 차이가 없었다.

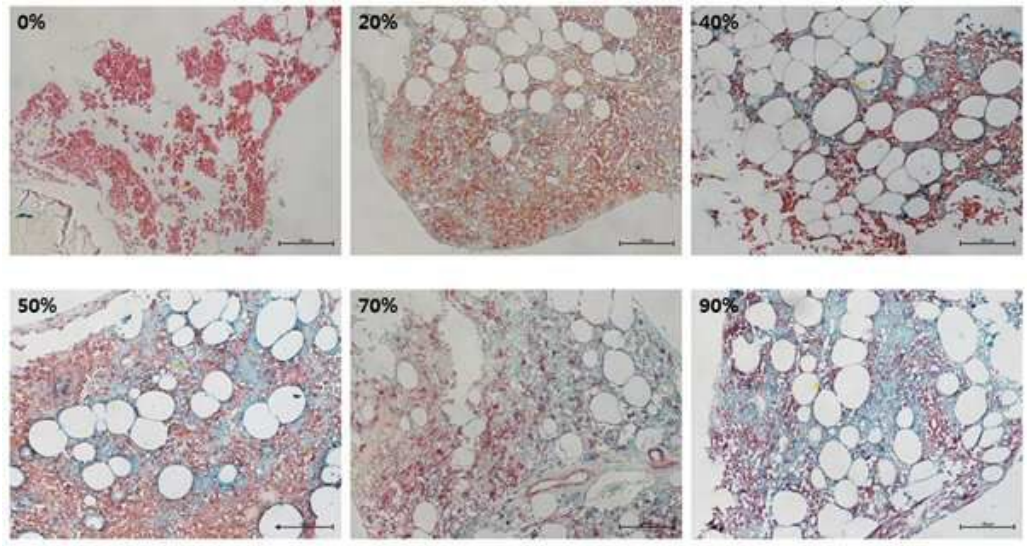
[0078] 이어 2000년 1월부터 2019년 12월까지 고려대의료원 안산병원에서 치료를 받은 전체 다발골수종 환자에 모형을 적용하여 78점 이상으로 세레블론 고발현으로 예측된 72명의 환자들과 저발현으로 예측된 70명의 환자들을 대상

으로 면역조절제 투약에 대한 생존분석을 시행하였다(도 10a 및 도 10b). 분석 결과, 세레블론 고발현으로 예측된 환자에서는 전체생존율, 무진행생존율에서 모두 면역조절제를 투약할 경우 유의하게 생존율이 높음을 확인하였다. 그러나, 세레블론 저발현으로 예측된 환자에서는 면역조절제 투약에 따른 생존 예후에 차이가 없었다.

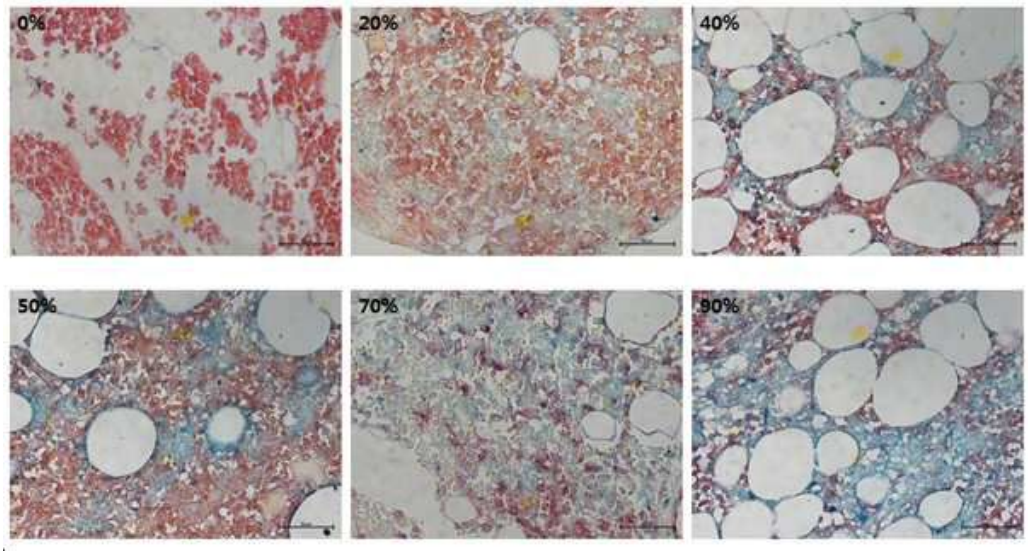
부호의 설명

도면

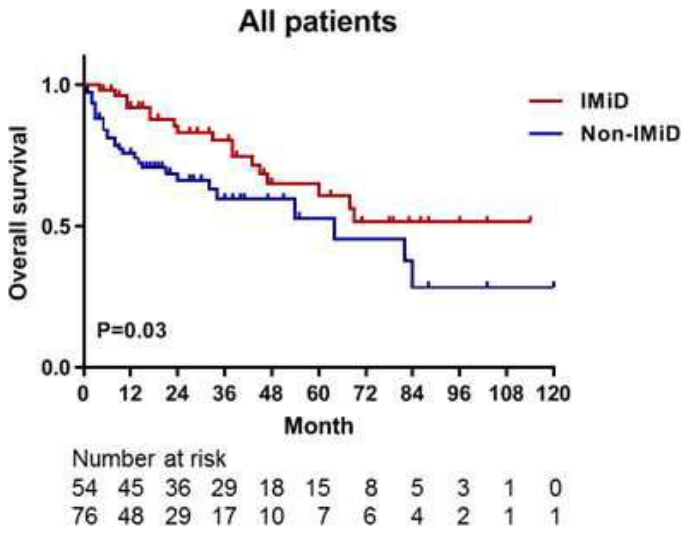
도면1a



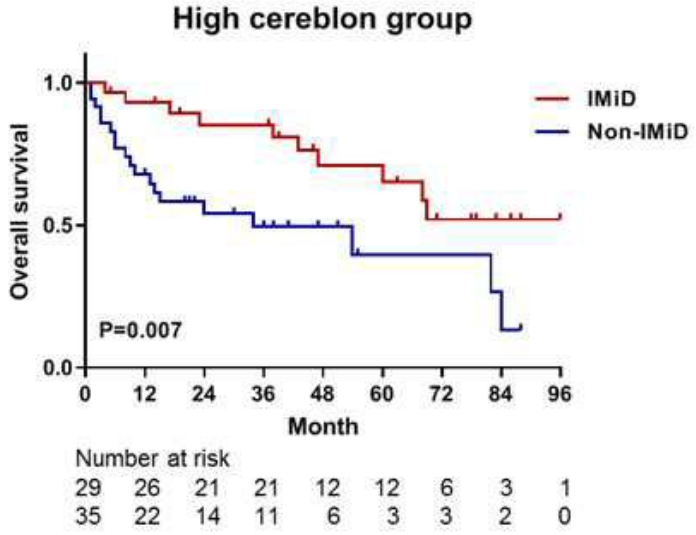
도면1b



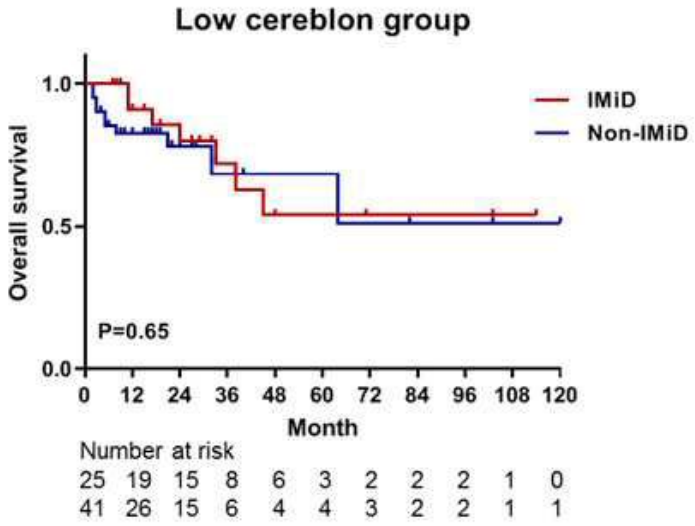
도면2a


All patients
IMiD
Non-IMiD
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P=0.03
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
Month
Number at risk
54 45 36 29 18 15 8 5 3 1 0
76 48 29 17 10 7 6 4 2 1 1

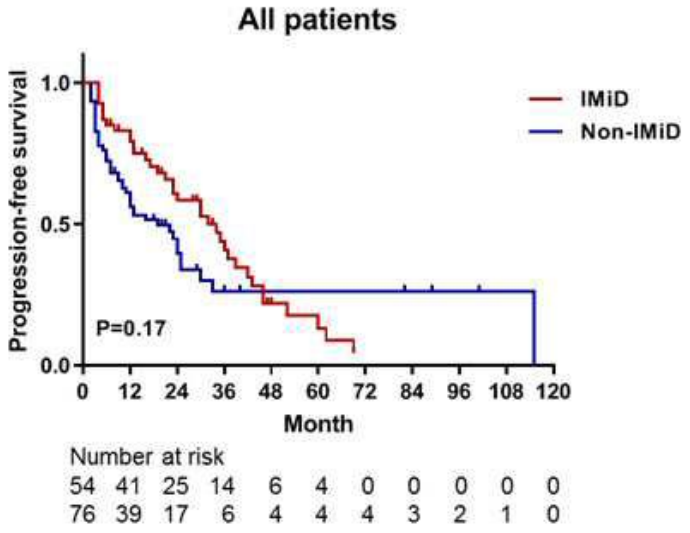
도면2b


High cereblon group
IMiD
Non-IMiD
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P=0.007
0 12 24 36 48 60 72 84 96
Month
Number at risk
29 26 21 21 12 12 6 3 1
35 22 14 11 6 3 3 2 0

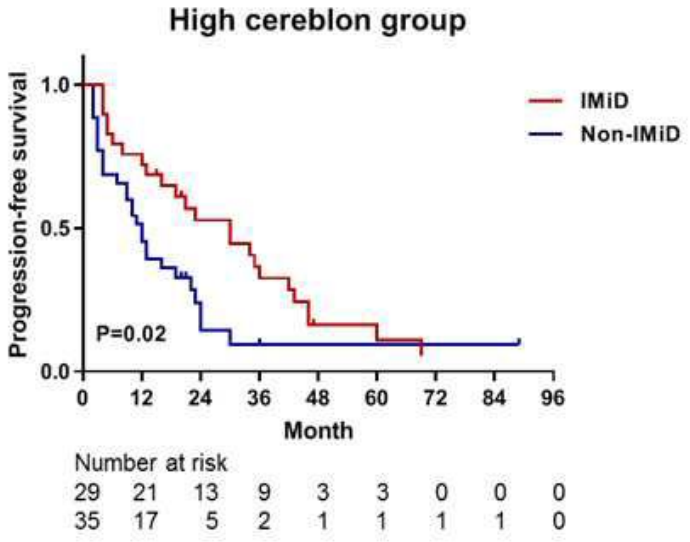
도면2c


Low cereblon group
IMiD
Non-IMiD
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P=0.65
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
Month
Number at risk
25 19 15 8 6 3 2 2 2 1 0
41 26 15 6 4 4 3 2 2 1 1

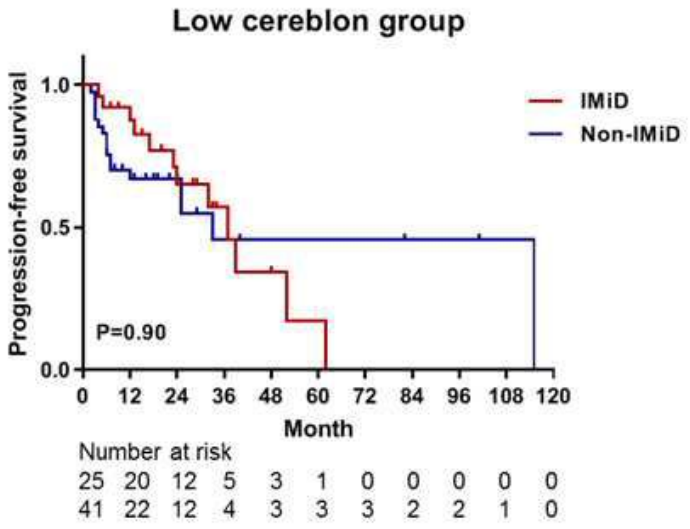
도면3a


All patients
IMiD
Non-IMiD
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P=0.17
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
Month
Number at risk
54 41 25 14 6 4 0 0 0 0 0
76 39 17 6 4 4 4 3 2 1 0

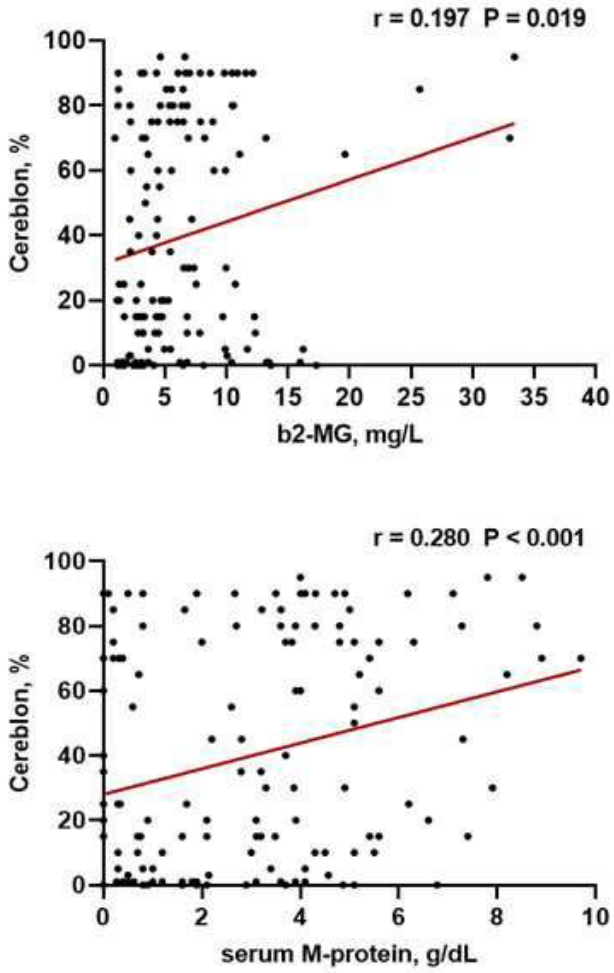
도면3b


High cereblon group
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P=0.02
0 12 24 36 48 60 72 84 96
Month
IMiD
Non-IMiD
Number at risk
29 21 13 9 3 3 0 0 0
35 17 5 2 1 1 1 1 0

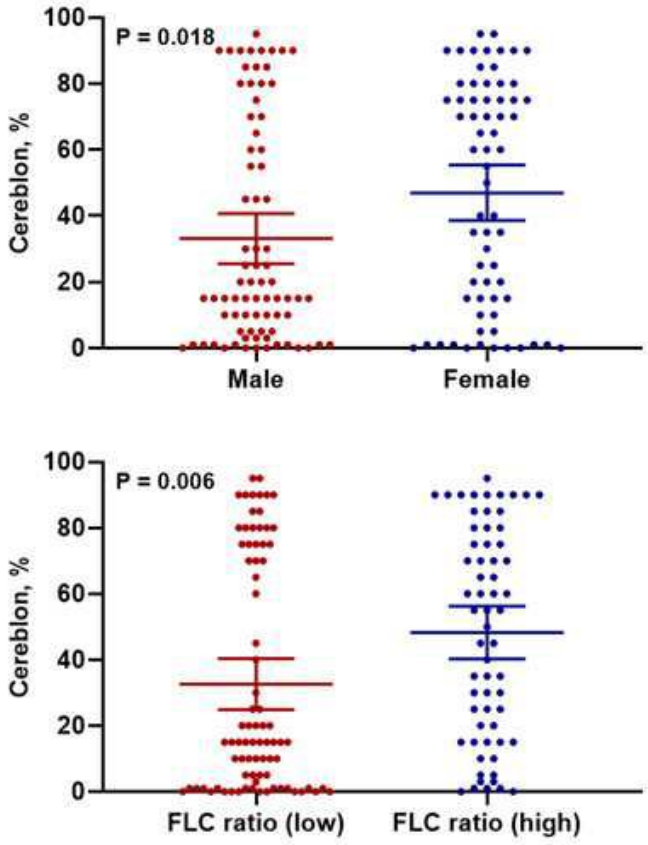
도면3c


Low cereblon group
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P=0.90
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
Month
IMiD
Non-IMiD
Number at risk
25 20 12 5 3 1 0 0 0 0 0
41 22 12 4 3 3 3 2 2 1 0

도면4a


r = 0.197 P = 0.019
Cereblon, %
b2-MG, mg/L
r = 0.280 P < 0.001
Cereblon, %
serum M-protein, g/dL

도면4b

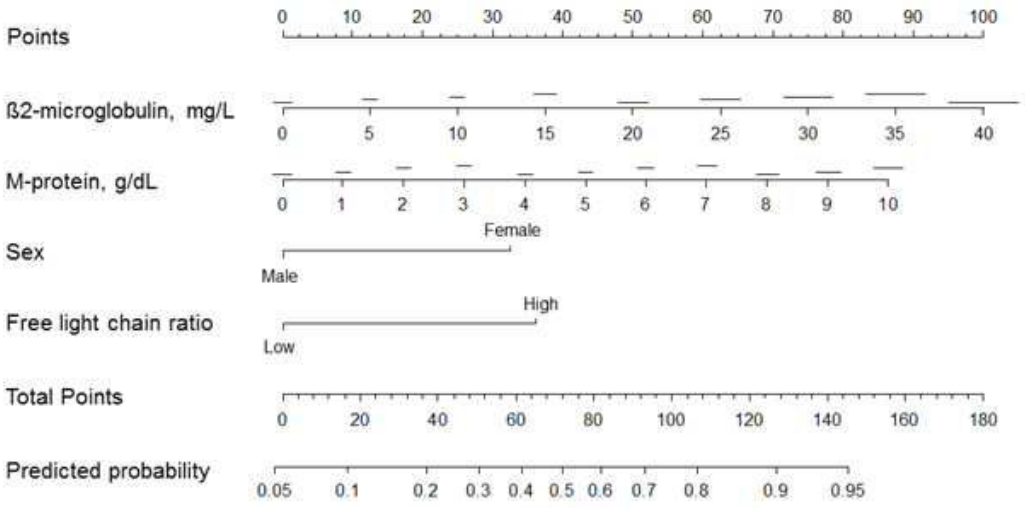


도면5

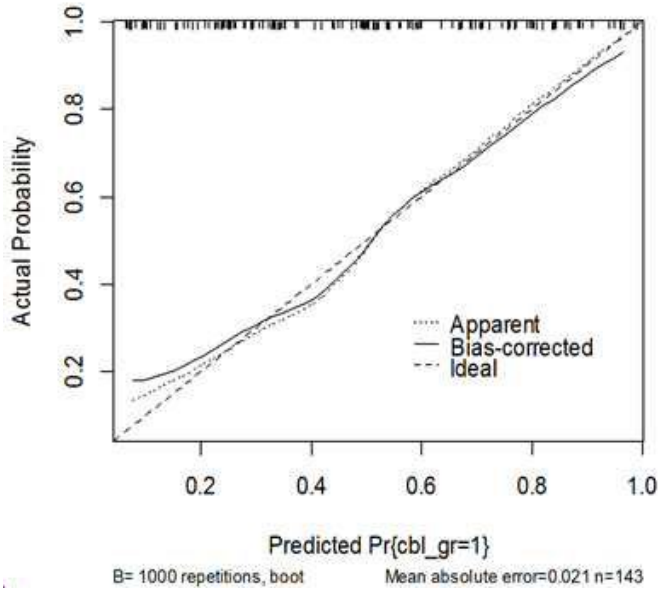
Prognostic factors	Univariate			Multivariate		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
Age, years	0.459	0.953, 1.022	0.987			
Sex, female	2.493	1.260, 4.935	0.009	3.387	1.540, 7.451	0.002
ECOG performance status, ≥ 2	1.149	0.295, 4.473	0.841			
BM plasma cells, %	1.021	1.008, 1.034	0.002			
Serum M-protein, mg/dL	1.254	1.083, 1.452	0.003	1.318	1.116, 1.555	0.001
Serum FLC ratio, ≤0.01 or ≥100	2.285	1.157, 4.513	0.017	2.314	1.077, 4.973	0.032
ß2-microglobulin, mg/L	1.094	1.016, 1.179	0.018	1.127	1.026, 1.237	0.012
LDH, ≥ upper normal range	0.774	0.389, 1.538	0.464			
Cytogenetics, high-risk*	1.295	0.609, 2.755	0.502			
R-ISS, Stage III	2.024	0.906, 4.523	0.086			

BM, bone marrow; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; FLC, free light chain; LDH, lactate dehydrogenase; R-ISS, Revised International Staging System.
* High-risk cytogenetics were defined as t(4;14), t(14;16), del(17/17p), TP53 deletion, or chromosome 1 abnormalities including gain(1q) and del(1p).

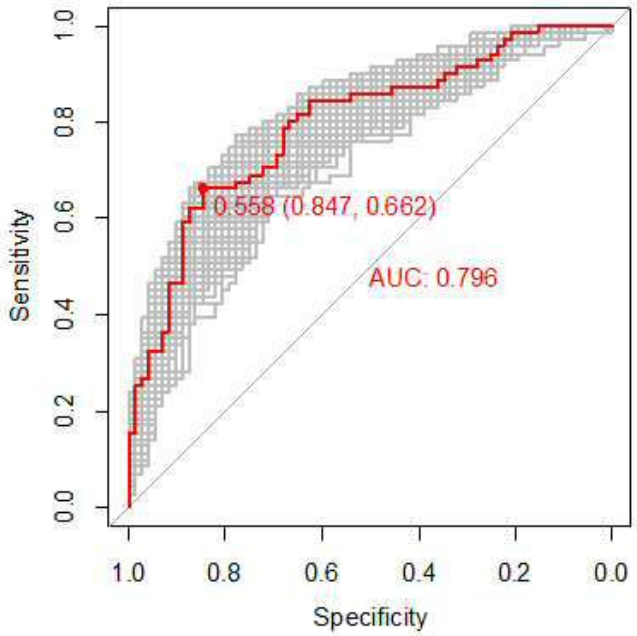
도면6


Points
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
ß2-microglobulin, mg/L
0 5 10 15 20 25 30 35 40
M-protein, g/dL
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Sex
Female
Male
Free light chain ratio
High
Low
Total Points
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
Predicted probability
0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 0.95

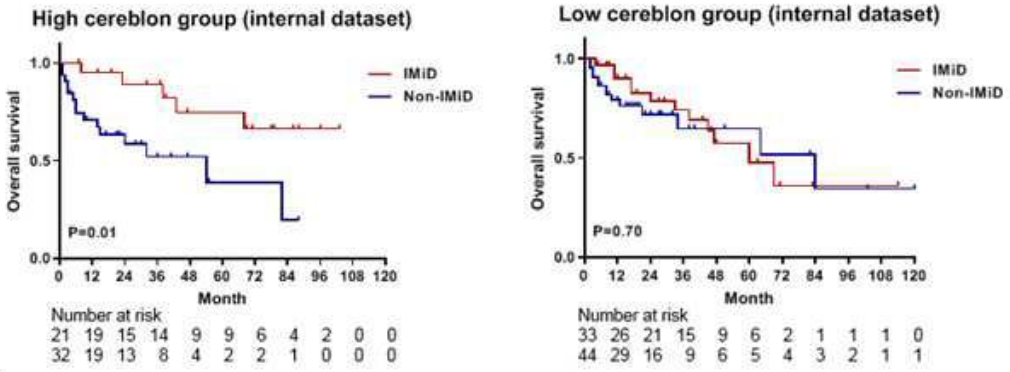
도면7a


Actual Probability
0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
Apparent
Bias-corrected
Ideal
0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
Predicted Pr{cbl_gr=1}
B= 1000 repetitions, boot
Mean absolute error=0.021 n=143

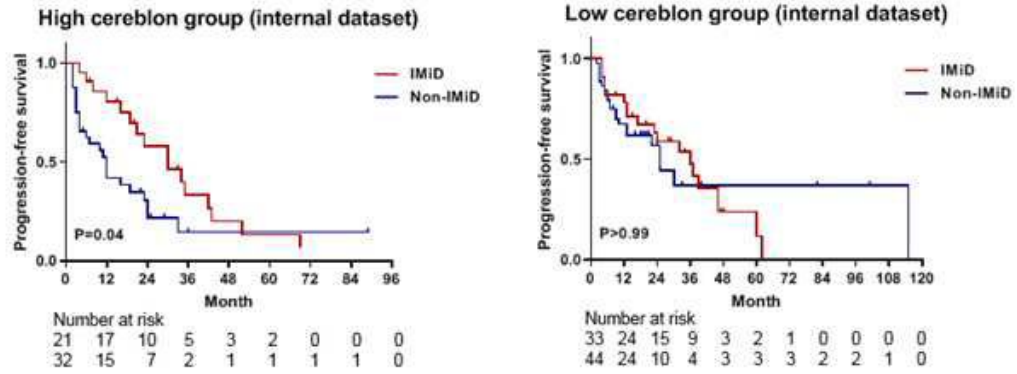
도면7b



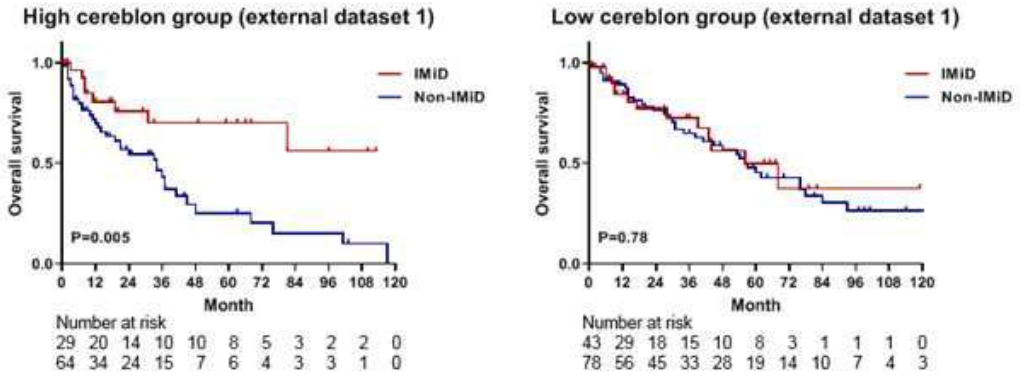
도면8a



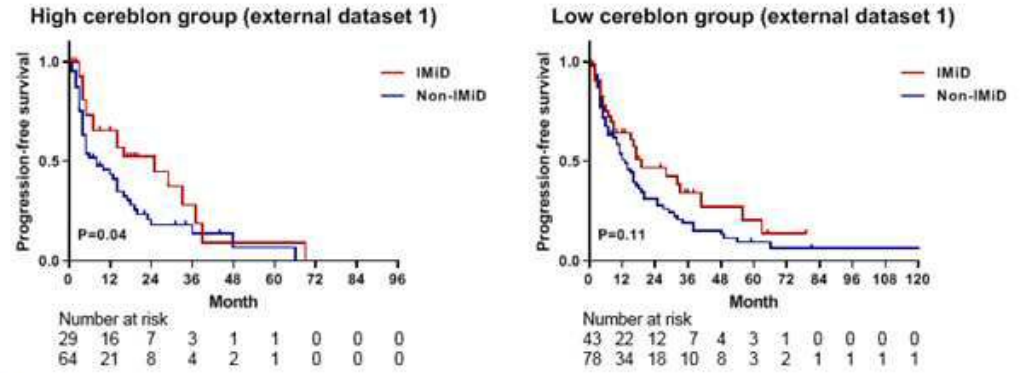
도면8b



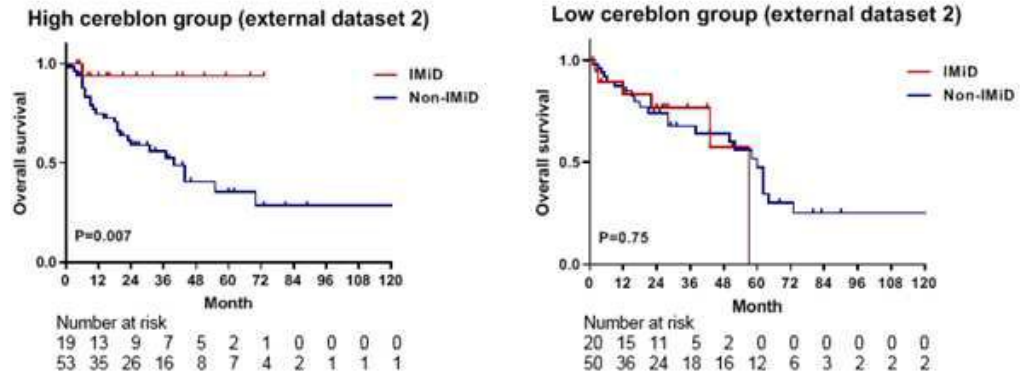
도면9a



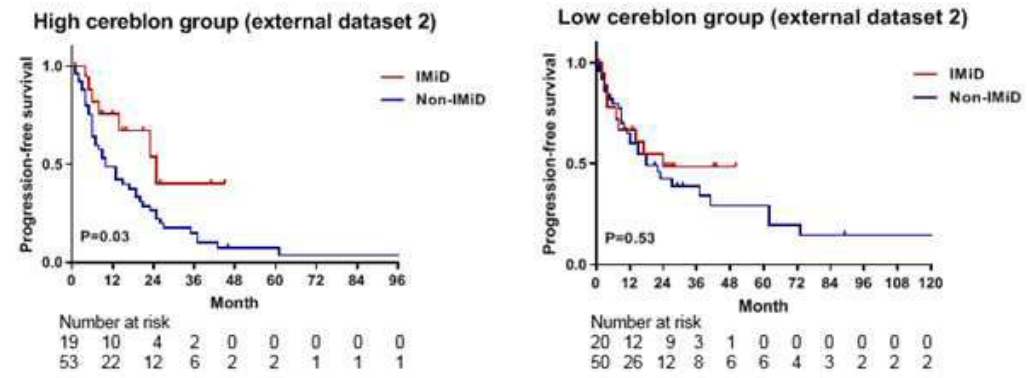
도면9b



도면10a



도면10b


High cereblon group (external dataset 2)
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P=0.03
IMiD
Non-IMiD
0 12 24 36 48 60 72 84 96
Month
Number at risk
19 10 4 2 0 0 0 0 0
53 22 12 6 2 2 1 1 1
Low cereblon group (external dataset 2)
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P=0.53
IMiD
Non-IMiD
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108 120
Month
Number at risk
20 12 9 3 1 0 0 0 0 0 0
50 26 12 8 6 6 4 3 2 2 2