(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0010311
(43) 공개일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0063916
(22) 출원일자 2020년05월27일
심사청구일자 2020년05월27일
(30) 우선권주장
1020190087805 2019년07월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김병수
서울특별시 강남구 압구정로29길 69 현대아파트 201동 603호
박용
서울특별시 성북구 솔샘로25길 28 정릉풍림아이원아파트 116동 402호
이병현
서울특별시 중구 다산로 258 리마크빌동대문 A동 1503호
(74) 대리인
공병욱

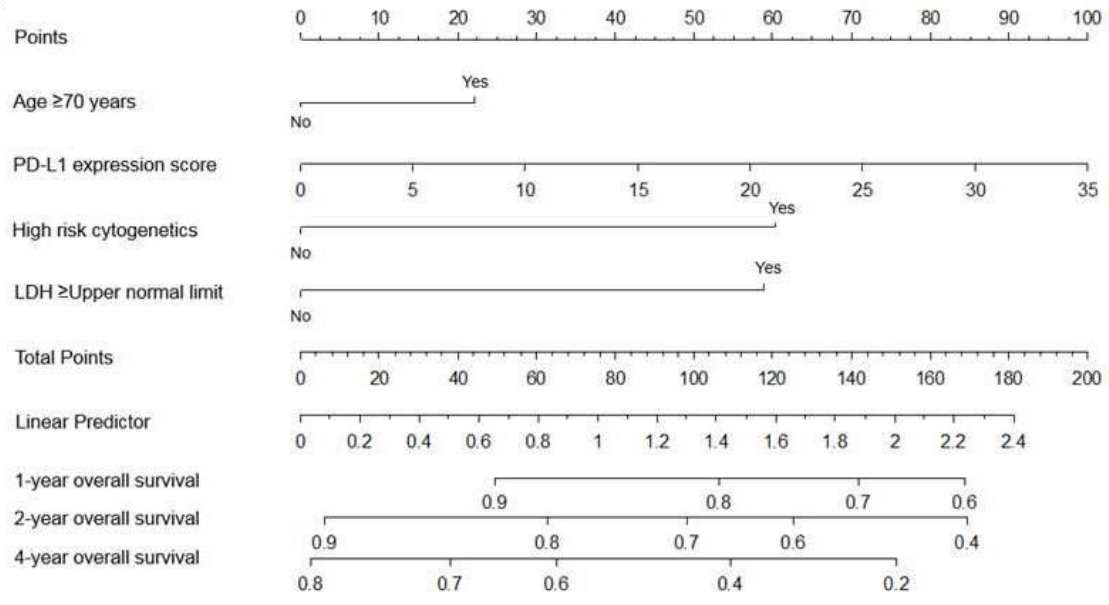
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **PD-L1 발현을 이용한 다발골수종 예후 예측을 위한 정보 제공 방법**

(57) 요 약

본 발명은 PD-L1 발현을 이용한 다발골수종 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 다발성 골수종 환자의 자가 조혈모세포이식 여부를 결정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 의하면 다발골수종의 예후 예측 및 치료방법의 결정을 보다 합리적으로 수행할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 2800/52 (2013.01)

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

다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종(multiple myeloma)의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법:

골수 형질세포를 포함하는 시료에서 CD138 및 PD-L1의 발현 정도를 정량적으로 측정하여 하기 식1에 따른 PD-L1의 정규화 MFI(normalized mean fluorescence intensity)를 도출하는 단계:

식1

Normalized MFI = (MFI in plasma cell compartments - Background intensity) / MFI from isotype-matched control;

하기 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값을 도출하는 단계:

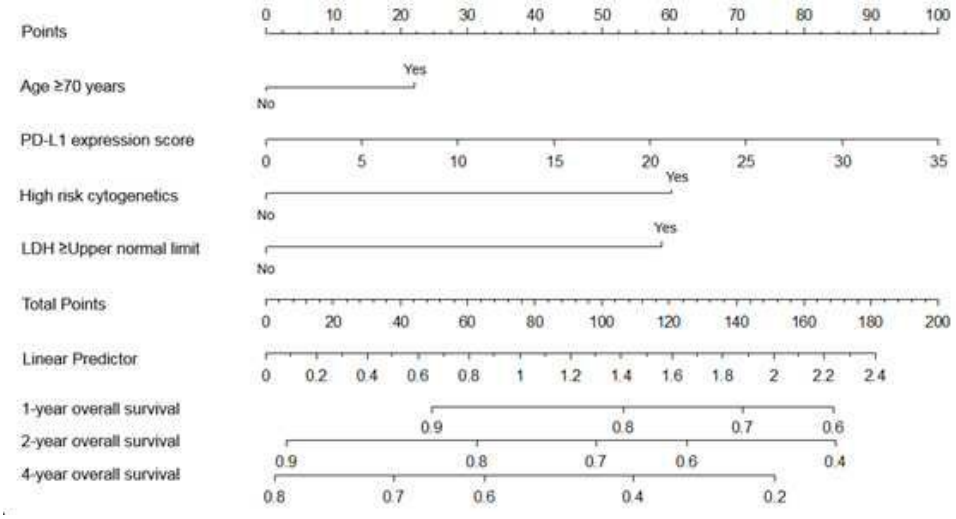
식2

PD-L1 expression MFI = Sum of normalized MFIs in all plasma cell compartments / Total number of plasma cells; 및

상기 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값이 7.65 미만이면 저위험군, 7.65 이상이면 고위험군으로 분류하는 단계.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법:

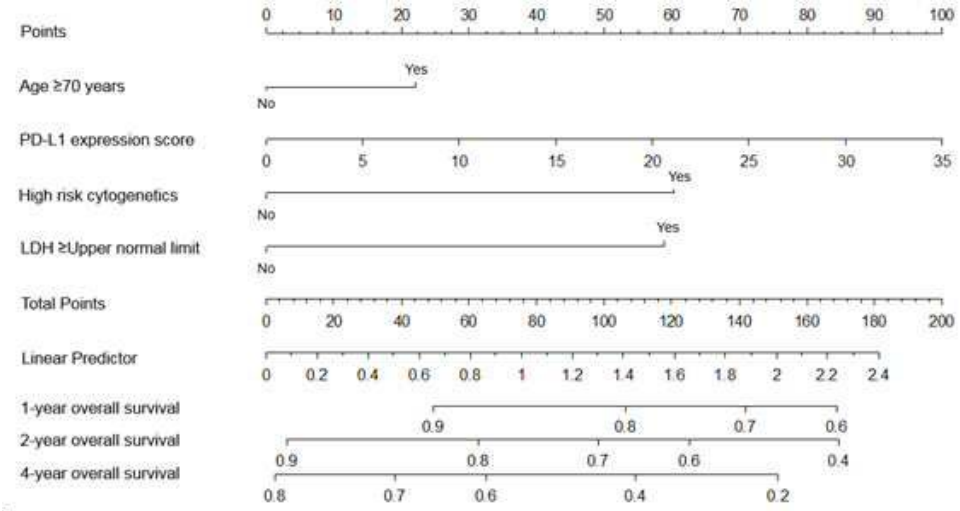


i) 제1항의 식1 및 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값(0~35), ii) 정상치 상한 초과의 혈중 LDH(serum lactate dehydrogenase) 여부, iii) high risk cytogenetics (karyotype에서 t(4;14), t(14;16), 17p deletion, chromosome 1 abnormality, FISH에서 IGH/FGFR3 rearrangement, IGH/MAF rearrangement, 및 TP53 mutation으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 양성인 경우) 여부, iv) 연령 70세 이상 여부를 기준으로 상기 nomogram에서 상응하는 점수(points, 0~100)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

상기 각 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)을 구한 후 상기 노모그램에서 상응하는 1년, 2년, 또는 4년 전체 생존기간에 대한 확률을 도출하는 단계.

청구항 3

다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종 환자의 자가 조혈모세포이식 여부를 결정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법:



i) 제1항의 식1 및 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값(0~35), ii) 정상치 상한 초과의 혈중 LDH(serum lactate dehydrogenase) 여부, iii) high risk cytogenetics (karyotype에서 t(4;14), t(14;16), 17p deletion, chromosome 1 abnormality, FISH에서 IGH/FGFR3 rearrangement, IGH/MAF rearrangement, 및 TP53 mutation으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 양성인 경우) 여부, iv) 연령 70세 이상 여부를 기준으로 상기 nomogram에서 상응하는 점수(points, 0~100)를 가산하는 점수 배점 단계;

상기 각 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)을 구한 후 50점 미만이면 저위험군, 50 내지 100점이면 중간위험군, 100점을 초과하면 고위험군으로 분류하는 분류 단계; 및

총점이 100점을 초과하는 고위험군으로 분류된 환자에게 자가조혈모세포 이식시 생존율이 향상된다는 정보를 제공하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PD-L1 발현을 이용한 다발골수종 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 PD-L1의 발현 수준을 측정하여 위험도를 결정하고, 이외의 공지된 위험인자와 결합된 점수 체계에 의해 다발골수종의 예후 예측을 보다 정확하게 수행할 수 있는 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] PD-L1은 대표적인 면역 회피 인자로 다양한 암종에서 예후 인자 및 치료의 타켓으로 연구가 진행되어 왔다. 고형암 중에서는 폐암, 유방암, 대장암 등 많은 암종에서 암세포에서 발현되는 PD-L1이 환자의 예후에 미치는 영향에 대한 연구 결과들이 있으며, 혈액암 중에서는 특히 림프종에서 관련 연구가 많이 진행되어 왔다.

[0004] 하지만 다발골수종(multiple myeloma)에서는 PD-L1 발현이 좋지 않은 예후와 관련이 있다는 기존의 연구 결과는 있지만 예후 인자로 확립된 바는 없으며 이를 이용한 예후 예측 모델은 개발되어 있지 않다. 다발골수종은 골수에서 항체를 생산하는 세포의 한 종류인 형질세포(plasma cell)가 비정상적으로 증식하는 혈액질환으로 특히 뼈를 침윤하는 것이 특징이고 면역장애, 조혈장애 및 신장장애를 일으키는 치명적인 질환이다.

[0005] 기존 연구들에서는 PD-L1 발현을 순환하는 형질세포 혹은 골수유래 혈액에서 획득한 형질세포에서 유세포분석법으로 측정하거나 혈장 내의 soluble PD-L1을 측정하여 사용하였다. 직접적으로 환자의 골수 샘플에서 면역조직

화학법(면역형광염색 포함)으로 형질세포에서 발현되는 PD-L1을 측정하여 예후를 분석한 연구는 제한적이다.

[0006] 암 조직에서 정량적 면역형광분석을 통해 특정 단백질(표지자) 발현을 측정하는 방법들은 현재 개발되어 있으며 대표적으로 AQUA (Automated Quantitative Analysis) 방법(method)이 고형암에서 단백질(표지자)의 발현을 측정하는 방법으로 사용되고 있다. 하지만 다발골수종은 골수에서 유래하는 혈액질환으로 암과 주변 조직의 경계를 구분하는 것이 명확하지 않아 AQUA 방법을 적용하기에는 제한이 있다.

[0007] 본 발명에서는 AQUA 방법을 참고하여 각각의 형질세포 영역을 기준으로 마스크(mask)를 만들어 MFI의 합을 구하였고 이를 이용하여 점수체계를 만들어 PD-L1의 발현을 측정하였다. 면역조직화학염색을 이용한 분석은 판독자에 따라 결과 해석에 차이가 있을 수 있으나 본 기술은 면역형광염색을 이용하여 이미지 프로그램에 의해 정해진 프로토콜에 따라 분석이 진행되어 일관된 예측이 가능한 장점이 있다.

[0008] 본 발명자들은 골수 내 형질세포에서 측정한 PD-L1의 MFI 점수체계에 의한 PD-L1 발현 정도가 multivariable Cox regression analysis를 통해 환자의 생존에 영향을 미치는 유의한 인자임을 확인하였고, Contal and O`Quigley method를 이용하여 PD-L1 발현의 optimal cut-off value (7.65)를 결정하였다. 이를 기준으로 cut-off value (7.65)보다 낮은 발현을 저위험군으로 높은 발현을 고위험군으로 구분하여 PD-L1 발현의 고위험군이 저위험군에 비해 예후가 좋지 않음을 확인하였다. 이후 least absolute shrinkage and selection operator (lasso) 변수 선택을 이용한 Cox regression analysis로 nomogram 모형을 수립하였고 이를 기반으로 저위험, 중간위험, 고위험군으로 분류하는 PD-L1 기반 새로운 다발골수종 예후 예측 모델을 개발하였다.

[0009] 새로운 예후 예측 모델은 기존의 예후 예측 모델과 비교하여 전체적으로 높은 예후 판별력을 보였으며, 특히 진단 후 24개월 이전에 사망한 고위험군의 환자를 예측하는데 기존의 예후 예측 모델에 비해 현저한 이점을 보였다. 이를 바탕으로 생존율이 낮을 것으로 예상되는 고위험군 환자들에게는 초기부터 적극적으로 치료를 하여 예후 개선에 도움을 줄 수 있으며, 새로운 예후 예측 모델의 고위험군 환자에서 조혈모세포 이식이 생존율을 높이는 방법이 될 수 있음을 확인하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Contal and O'Quigley, An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. Comput. Stat. Data An. 30, 253-270 (1999)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 PD-L1의 MFI를 이용한 점수체계를 바탕으로 lasso 변수 선택과 Cox regression analysis에 의해 수립된 PD-L1 발현과 임상인자를 결합한 모형이 예후 판별력이 높음을 확인하였다.

[0013] 이에, 본 발명의 목적은 PD-L1의 발현을 기반으로 한 다발성 골수종의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 다발성 골수종의 자가 조혈모세포이식 여부를 결정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 PD-L1 발현을 이용한 다발골수종(multiple myeloma) 예후 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 PD-L1 발현을 측정하여 다발골수종의 예후 예측의 정확성을 높이고, 기존의 예후 예측 모델에 대비해서도 유의하게 높은 판별력을 나타낸다.

[0017] 본 발명자들은 PD-L1의 MFI (mean fluorescence intensity)를 이용한 점수체계를 바탕으로 lasso 변수 선택과

Cox regression analysis에 의해 수립된 PD-L1 발현과 임상인자를 결합한 모형이 예후 판별력이 높음을 확인하였다.

[0018] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종(multiple myeloma)의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:

[0020] 골수 형질세포를 포함하는 시료에서 CD138 및 PD-L1의 발현 정도를 정량적으로 측정하여 하기 식1에 따른 PD-L1의 정규화 MFI(normalized mean fluorescence intensity)를 도출하는 단계:

[0021] **식1**

[0022] Normalized MFI = (MFI in plasma cell compartments - Background intensity) / MFI from isotype-matched control;

[0023] 하기 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값을 도출하는 단계:

[0024] **식2**

[0025] PD-L1 expression MFI = Sum of normalized MFIs in all plasma cell compartments / Total number of plasma cells; 및

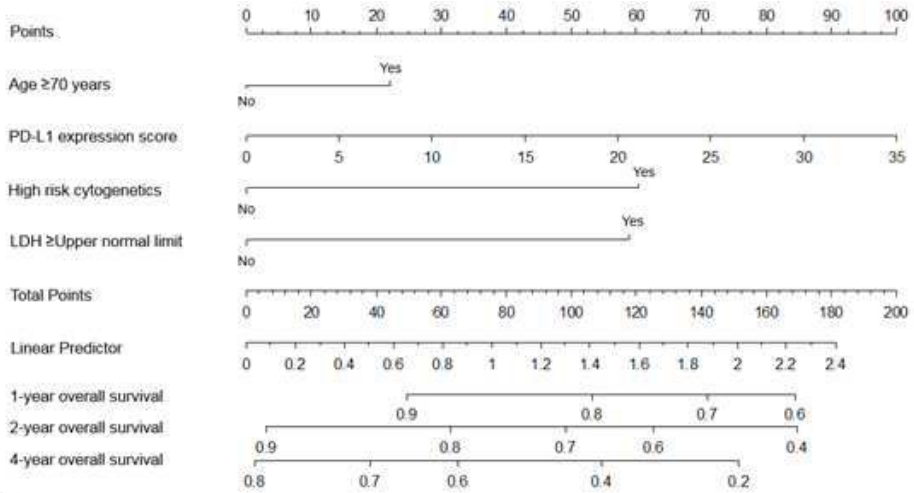
[0026] 상기 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값이 7.65 미만이면 저위험군, 7.65 이상이면 고위험군으로 분류하는 단계.

[0027] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 발현량 측정 단계는 골수 형질세포에서의 PD-L1 발현량을 확인하기 위하여 면역형광염색을 수행하고, 형질세포의 영역 내에서 식1에 따라 PD-L1의 정규화된 MFI를 계산하고, 이를 식2에 따라 모두 더한 후, 이를 상기 형질세포의 영역 수로 나눈 값을 도출한다.

[0028] 본 명세서상의 "형질세포의 영역 수"는 샘플 내에서 측정을 위한 형질세포의 영역을 설정하였을 때 그 개수를 의미하며, 형질세포의 수와 의미하는 개수는 동일하다.

[0029] 본 발명의 일구현예에서, 상기 CD138은 형질세포(plasma cell)를 검출하기 위한 마커이다. 상기 PD-L1의 정규화된 MFI는 상기 CD138의 검출로 인한 형질세포 내부 영역에서의 PD-L1의 발현량을 나타낸다.

[0031] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종의 예후 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다:



[0032]

[0033] i) 상기 식1 및 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값(0~35), ii) 정상치 상한(422 IU/L) 초과의 혈중 LDH(serum lactate dehydrogenase) 여부, iii) high risk cytogenetics (karyotype에서 t(4;14), t(14;16), 17p deletion, chromosome 1 abnormality 혹은 FISH에서 IGH/FGFR3 rearrangement, IGH/MAF rearrangement, TP53 mutation) 여부, iv) 연령 70세 이상 여부를 기준으로 상기 노모그램(nomogram)에서 상응하는 점수(points,

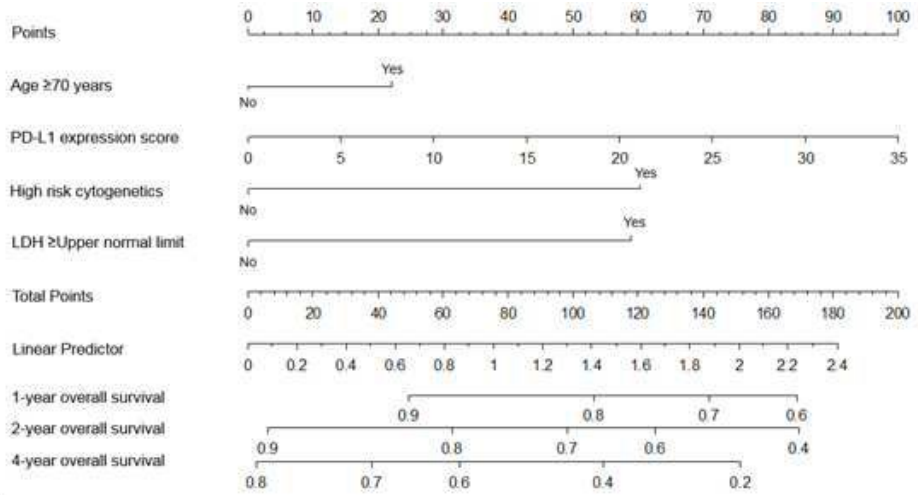
0~100)를 가산하는 점수 배점 단계; 및

[0034] 상기 각 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)을 구한 후 상기 노모그램에서 상응하는 1년, 2년, 또는 4년 전체 생존기간에 대한 확률을 도출하는 단계.

[0035] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 1년 전체 생존기간에 대한 확률은 0.9 내지 0.6이다. 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 2년 전체 생존기간에 대한 확률은 0.9 내지 0.4 이다. 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 4년 전체 생존기간에 대한 확률은 0.8 내지 0.2 이다.

[0036] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 혈중 LDH의 정상치 상한 값은 검사 기관, 방법에 따라 차이가 있을 수 있는 수치로, 본 발명자가 소속된 기관의 참고치(238-422 IU/L)의 상한 값인 422 IU/L 를 기준으로 적용하였다.

[0038] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 다발성 골수종의 자가 조혈모세포이식 여부를 결정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[0039] 

[0040] i) 상기 식1 및 식2에 따른 PD-L1 발현 MFI 측정값(0~35), ii) 정상치 상한(422 IU/L) 초과의 혈중 LDH(serum lactate dehydrogenase) 여부, iii) high risk cytogenetics (karyotype에서 t(4;14), t(14;16), 17p deletion, chromosome 1 abnormality, FISH에서 IGH/FGFR3 rearrangement, IGH/MAF rearrangement, 및 TP53 mutation으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 양성인 경우) 여부, iv) 연령 70세 이상 여부를 기준으로 상기 nomogram에서 상응하는 점수(points, 0~100)를 가산하는 점수 배점 단계;

[0041] 상기 각 가산된 점수를 합산하여 총점(total points)을 구한 후 50점 미만이면 저위험군, 50 내지 100점이면 중간위험군, 100점을 초과하면 고위험군으로 분류하는 분류 단계; 및

[0042] 총점이 100점을 초과하는 고위험군으로 분류된 환자에게 자가조혈모세포 이식시 생존율이 향상된다는 정보를 제공하는 단계.

발명의 효과

[0044] 본 발명은 PD-L1 발현을 이용한 다발골수종 예후 예측을 위한 정보 제공 방법 및 다발성 골수종 환자의 자가 조혈모세포이식 여부를 결정하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법에 의하면 다발골수종의 예후 예측 및 치료방법의 결정을 보다 합리적으로 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 다발골수종 환자의 골수 내 형질세포에서 PD-L1이 발현되는 것을 확인한 공초점현미경 사진이다.

도 2는 PD-L1의 발현을 측정하기 위해 형질세포의 영역을 정하고 MFI를 측정하는 방법을 나타낸 사진이다.

도 3a는 PD-L1 MFI(mean fluorescence intensity) 측정값 및 위험군에 따른 PD-L1 발현 정도를 보여주기 위해 대표적으로 선정한 사진이다.

도 3b는 PD-L1 MFI(mean fluorescence intensity) 측정값에 따른 PD-L1 발현 분포를 보여주는 그래프이다.

도 4a는 전체 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 전체생존율(overall survival)을 나타낸 그래프이다.

도 4b는 autologous stem cell transplantation (ASCT)를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 전체생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4c는 ASCT를 받지 않은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 전체생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4d는 VTD (bortezomib, thalidomide 및 dexamethasone), TD (thalidomide 및 dexamethasone), RD (lenalidomide 및 dexamethasone) 요법으로 치료를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 전체생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4e는 VMP (bortezomib(Velcade) plus melphalan 및 prednisone) 요법으로 치료를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 전체생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4f는 ASCT를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 무진행생존율(progression-free survival)을 나타낸 그래프이다.

도 4g는 ASCT를 받지 않은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 무진행생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4h는 VTD, TD, RD 요법으로 치료를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 무진행생존율을 나타낸 그래프이다.

도 4i는 VMP 요법으로 치료를 받은 환자군에서 PD-L1 MFI 측정값에 의한 PD-L1 발현에 기반한 위험군에 따른 무진행생존율을 나타낸 그래프이다.

도 5는 다변수 콕스회귀분석(multivariable Cox regression)을 통해 얻어진 유의한 위험인자를 나타낸 표이다. PD-L1 발현에 대한 위험인자는 PD-L1 MFI 측정값에 대한 optimal cut-off value를 이용한 이분형 변수로 정의되었다.

도 6a는 lasso 변수 선택과 Cox regression analysis에 의해 수립된 PD-L1 발현과 임상인자가 결합된 nomogram 모형이다. PD-L1 발현에 대한 위험인자는 PD-L1 MFI 측정값을 이용한 연속형 변수로 정의되었다.

도 6b는 수립된 nomogram 모형에 대한 calibration 그래프이다.

도 6c는 수립된 nomogram의 total score를 기준으로 세 그룹으로 나누어 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교한 그래프이다.

도 6d는 수립된 nomogram 모형을 평가하기 위한 time-dependent AUC 분석 그래프이다.

도 6e는 수립된 nomogram 모형을 test 하기 위해 test cohort에 적용하여 calibration한 그래프이다.

도 6f는 수립된 nomogram 모형을 test 하기 위해 test cohort에 적용하여 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교한 그래프이다.

도 6g는 수립된 nomogram 모형을 test 하기 위해 test cohort에 적용하여 time-dependent AUC를 분석한 그래프이다.

도 7a는 nomogram total score를 기준으로 세 그룹으로 구분한 새로운 예후 예측 모형에서 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교한 그래프이다.

도 7b는 기존의 R-ISS를 기준으로 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교한 그래프이다.

도 7c는 새로운 예후 예측 모형과 R-ISS의 성능을 time-dependent AUC 분석을 이용하여 비교한 그래프이다.

도 8a 내지 도 8f는 새로운 예후 예측 모형에서 위험군별 치료법에 대한 전체생존율과 무진행생존율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0048] 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.

[0050] **실시예 1: 골수 샘플의 준비**

[0051] 실험에 사용된 환자의 샘플은 2011년 1월부터 2019년 10월까지 고려대학교 안암병원 혈액종양내과에서 골수검사 후 다발골수종으로 진단된 환자 126명(후향적 83명, 전향적 43명)으로부터 얻었다. 모든 샘플은 진단 시 사용된 골수 파라핀 셀 블록(cell block)으로 IRB 승인 후 프로토콜에 따라 준비하였으며 각 샘플당 적어도 2개 이상의 절편을 제작하여 확인하였다.

[0053] **실시예 2: 면역형광염색을 통한 PD-L1 발현의 확인**

[0054] 준비된 골수 파라핀 셀 블록에서 4-5um 두께의 절편을 잘라 슬라이드를 제작하였고 60℃에서 1시간 동안 건조한 후 자일렌(xylene)으로 15분 동안 3회, 100%, 95%, 70% 에탄올(ethanol)로 각각 5분 동안 2회 처리한 후 흐르는 물로 세척하여 탈파라핀화를 시행하였다. 이후 압력 쿠커를 이용하여 pH 6.0의 버퍼(sodium citrate buffer) 내에서 10분 동안 끓인 후 흐르는 물로 냉각시켜 항원성을 복원하였고, 0.5% 트리톤(triton) X-100를 이용하여 세포막 투과화 과정을 진행하였다.

[0055] 이후 5% 세럼(normal donkey serum)으로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking) 후 PBS로 세척하고, 일차항체(goat CD138 Ab (R&D Systems), mouse anti-PD-L1 mAb [ABM4E54] (Abcam))를 사용하여 4℃에서 오버나잇(overnight)으로 배양하였다. 이후 PBS로 5분 동안 3회 세척하고 이차항체(alexa flour 488 conjugated donkey anti-goat IgG (Invitrogen), alexa flour 647 conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen))를 사용하여 실온에서 1시간 동안 배양 후 PBS로 5분 동안 3회 세척하고 DAPI가 포함된 마운트제(mountant, ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen))를 이용하여 처리하였다.

[0056] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 공초점현미경을 이용하여 다발골수종 환자의 골수 내 형질세포에서 PD-L1이 발현되는 것을 확인하였다. CD138, PD-L1의 이미지(8 bit raw)를 이미지 분석 프로그램(Celleste쪠 Image Analysis Software (Invitrogen))을 이용하여 분석하였다.

[0057] 샘플 당 3개 이상(평균 5개)의 필드에서 분석을 진행하였다. 도 2와 같이 CD138 발현을 기준으로 형질세포의 영역을 정하고 이미지 분석 프로그램(Celleste쪠 Image Analysis Software (Invitrogen))을 이용하여 각각의 형질세포 영역 내 PD-L1의 정규화된(normalized) MFI(mean fluorescence intensity)를 계산하여 더한 후 전체 형질세포의 영역 수로 나눈 값을 기준으로 반정량화된 PD-L1 발현MFI(PD-L1 expression MFI)을 측정하였다.

[0058] 상기 정규화된 MFI(normalized mean fluorescence intensity)를 계산하는 수식은 식1과 같고, 이로부터 PD-L1 발현 MFI를 계산하는 수식은 식2와 같았다.

[0059] **식1**

[0060] Normalized MFI = (MFI in plasma cell compartments - Background intensity) / MFI from isotype-matched control

[0061] **식2**

[0062] PD-L1 expression (MFI) = Sum of normalized MFIs in all plasma cell compartments / Total number of plasma cells

[0063] 상기 식1의 MFI from isotype-matched control은 동형대조군의 MFI 관찰값으로서 PD-L1을 타겟팅하지 않으나, 상기 PD-L1의 MFI를 측정하기 위하여 사용된 항체와 동일한 isotype 및 subclass를 가진 항체를 이용한 대조군

의 MFI를 말한다.

[0064] 도 3a 및 3b에서 확인할 수 있듯이, PD-L1 발현에 대한 MFI 측정값이 7.65 미만인 경우 저위험군, 7.65 이상인 경우 고위험군인 것으로 분류하였다(Reference: Contal and O'Quigley, An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput. Stat. Data An.* 30, 253-270 (1999)).

[0066] **실시예 3: PD-L1 발현에 대한 생존 분석**

[0067] 전체 환자를 i) 자가조혈모세포이식(ASCT)을 받은 환자와 ii) 받지 않은 환자, iii) frontline으로 면역조절제인 탈리도마이드(thalidomide) 및 레날리도마이드(lenalidomide)가 포함된 VTD (bortezomib, thalidomide 및 dexamethasone), TD (thalidomide 및 dexamethasone), RD (lenalidomide 및 dexamethasone) 요법으로 치료 받은 환자와 iv) 면역조절제가 포함되지 않은 VMP (bortezomib(Velcade) plus melphalan 및 prednisone) 요법으로 치료를 받은 환자로 나누어 전체생존율(overall survival)과 무진행생존율(progression-free survival)에 대한 분석을 시행하여 도 4a 내지 4i로 나타내었다.

[0068] 상기 도 4a 내지 도 4i의 생존곡선은 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존분석을 이용하여 작성하였고 로그순위검정(log-rank test)으로 두 군의 생존율을 비교하였다.

[0069] 도 4a 내지 도 4i에서 확인할 수 있듯이, 분석 결과 ASCT를 받은 그룹에서는 PD-L1 발현의 고위험군과 저위험군 간에 생존에 차이가 없었지만($p>0.05$), 이외 전체 환자, ASCT 받은 그룹, 면역조절제 치료 그룹, 면역조절제가 포함되지 않은 치료 그룹 모두에서는 고위험군에서 전체생존율과 무진행생존율이 좋지 않았다($p<0.05$).

[0071] **실시예 4: PD-L1 기반 새로운 예후 예측 모델**

[0072] 도 5 및 6a에서 나타나는 바와 같이 lasso (least absolute shrinkage and selection operator) 변수 선택과 Cox regression analysis에 의해 PD-L1 발현과 임상인자가 결합된 nomogram 모형을 수립하였고 이 과정에서 과적합을 피하기 위해 leave-one-out cross validation (LOOCV)에 의해 lasso의 lambda 값을 결정하였다.

[0073] 구체적으로 상기 임상인자는 70세 이상의 연령, 2 이상의 ECOG Performance Status, 3 mg/dL 이상의 혈청 M-단백질, non-IgG isotype, 100 이상의 serum Free Light Chain ratio, 60% 이상의 BM plasma cell, 5.5 mg/L 이상의 b2-microglobulin, 3.5 g/dL 이상의 알부민, 정상치 상한(422 IU/L) 초과의 LDH, 세포유전학적 고위험군(chromosome 1 abnormality), PD-L1 고위험군이 분석되었다.

[0074] 단변수 분석에서는 정상치 상한 초과의 LDH, 세포유전학적 고위험군, 및 PD-L1 고위험군이라는 임상인자가 유의한 것으로 나타났고, Cox regression analysis을 활용한 다변수 분석에서는 70세 이상의 고령, 정상치 상한 초과의 LDH, 세포유전학적 고위험군(karyotype에서 t(4;14), t(14;16), 17p deletion, chromosome 1 abnormality, FISH에서 IGH/FGFR3 rearrangement, IGH/MAF rearrangement, 및 TP53 mutation으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 양성인 경우), 및 PD-L1 고위험군의 임상인자가 유의한 것으로 분석되었다(도 5).

[0075] 상기 분석으로 선택된 임상인자 및 PD-L1 고발현 여부의 영향력을 점수화한 points, 각전수의 누적합계인 total points, 및 1년 전체생존율, 2년 전체생존율, 4년 전체생존율에 대한 확률을 계산한 노모그램을 작성하였다(도 6a).

[0076] 다음으로, 도 6b에서와 같이 1년, 2년, 4년 전체생존율에 대해 1000회 bootstrap을 이용하여 calibration을 시행하였고 calibration이 잘 되는 것을 확인하였다. 도 6c에서와 같이 수립된 nomogram의 total score를 기준으로 50미만을 저위험군, 50 내지 100을 중간위험군, 100 초과를 고위험군으로 하는 세 그룹으로 나누어 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교하였고, 로그 순위 분석 결과, $P<0.001$로 세 군의 전체생존율이 통계적으로 유의하게 구분되는 것을 확인하였다.

[0077] 도 6d에서와 같이 수립된 nomogram 모형을 평가하기 위해 1000회 bootstrap을 이용하여 time-dependent AUC 분석을 시행하였고 1-4년 AUC 값이 0.6 이상, 1년, 2년 AUC는 0.8 이상으로 확인되어 전체적으로 모형 성능이 양호하며 특히 1년, 2년 생존 평가에 우수함을 확인하였다(0.9-1.0 = excellent; 0.8-0.9 = very good; 0.7-0.8 = good; 0.6-0.7= sufficient; 0.5-0.6 = bad; < 0.5 = not useful (Muller et al., 2005)).

[0078] 도 6e에서와 같이 수립된 nomogram 모형을 prospective (test) cohort에 적용하여 test 하였고 nomogram에 의해 예측된 생존 확률과 관찰된 생존 확률이 서로 calibration이 잘 되는 것을 확인하였다. 도 6f에서와 같이 수립된 nomogram 모형을 prospective (test) cohort에 적용하여 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선으로 각 그룹의 생존을 비교하였고 P = 0.029로 세 군의 전체생존율이 통계적으로 유의하게 구분되는 것을 확인하였다. 도 6f에서와 같이 수립된 nomogram 모형의 성능을 평가하기 위해 prospective (test) cohort에 적용하여 time-dependent AUC를 분석하였고 6개월 AUC 0.724, 12개월 AUC 0.740으로 측정되어 test set에서도 본 발명의 nomogram이 다발성 골수종의 예후 판별에 우수함을 확인하였다.

[0079] 상기 cohort 환자의 샘플은 2011년 1월부터 2019년 10월까지 고려대학교 안암병원 혈액종양내과에서 골수검사 후 다발골수종으로 진단된 환자 126명(후향적 83명, 전향적 43명)의 결과로부터 얻었다. 후향적 83명은 2011년 1월부터 2018년 4월까지, 전향적 43명은 2018년 5월부터 2019년 10월까지 진단된 환자들의 결과였다.

[0081] **실시예 5: 기존의 예후 예측 모델과의 비교 분석**

[0082] 새로운 본 발명의 다발성 골수종의 예후 예측 모델과 종래 예후 예측 모델인 R-ISS(Revised multiple myeloma International Staging System)간의 예후 판별력과 일치도를 비교하였다.

[0083] 도 7a 및 7b에서 확인할 수 있듯이, R-ISS 대비 본 발명의 새로운 예후 예측 모델로부터 도출할 수 있는 각 군별 생존곡선의 통계적 유의성을 확인하였다. 또한 표 1에서와 같이 Harrell's c-index (Reference: Multivariable prognostic models: Issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat. Med.* 15, 361-387 (1996).)를 이용하여 새로운 예후 예측 모델이 기존의 R-ISS 모델보다 예후 예측에 높은 판별력을 보이는 것을 확인하였고, 도 7c에서와 같이 time-dependent AUC 분석에서 본 발명의 새로운 예후 예측 모형이 R-ISS에 비해 높은 판별력을 보이는 것을 확인하였다.

표 1

[0084]

구분	Harrell's C	95% CI	Difference	95% CI	*P*
본 발명의 예후 예측모델	0.775	0.717-0.833	0.125	0.037-0.213	0.005
R-ISS	0.650	0.568-0.732	-	-	-

[0085] CI, Confidence Interval; R-ISS, Revised International Staging System

[0086] 표 2에서 확인할 수 있듯이, R-ISS의 stage I 환자의 21.4%는 새로운 모델에서 중간위험군으로, R-ISS의 stage II 환자의 32.9%, 32.9%는 새로운 모델에서 각각 저위험군, 고위험군으로, R-ISS stage III 환자의 48.5%는 새로운 모델의 중간위험군으로 재분류되었고 이 차이는 통계적으로 유의하였다. 재분류에 의해 계산된 NRI (Net Reclassification Improvement)는 0.337으로 새로운 모형이 R-ISS에 비해 민감도와 특이도 측면에서 우수한 것으로 판단되었다.

표 2

[0088]

Total	R-ISS			-	-
본 발명의 예후 예측모델	Stage I	Stage II	Stage III	total	P
저위험군	11 (78.6%)	26 (32.9%)	0 (0.0%)	37 (29.4%)	<0.001
중위험군	3 (21.4%)	27 (34.2%)	16 (48.5%)	46 (36.5%)	-
고위험군	0	26 (32.9%)	17 (51.5%)	43 (34.1%)	-

[0090] **실시예 6: 새로운 예후 예측 모델의 각 군별 치료법에 대한 효과 분석**

[0091] 새로운 예후 예측 모델의 저위험군, 중간위험군, 고위험군에서 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 생존곡선과 다변수 콕스 회귀분석을 시행하여 전체생존율에 대한 자가조혈모세포이식과 frontline 면역조절제 투약 여부가 생존에

미치는 영향을 분석하였다. 도 8과 표 3에서 확인할 수 있듯이, 저위험군과 중간위험군에서는 frontline 면역조절제 투약과 자가조혈모세포 이식이 생존에 영향을 주지 않았으나 고위험군에서는 자가조혈모세포 이식이 높은 전체생존 및 무진행생존과 관련이 있는 것으로 확인되었다.

[0092] 따라서 본 발명의 새로운 예후 예측 모델을 이용하면 다발골수종의 예후 예측뿐만 아니라 고위험군 환자의 자가조혈모세포이식 여부를 결정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

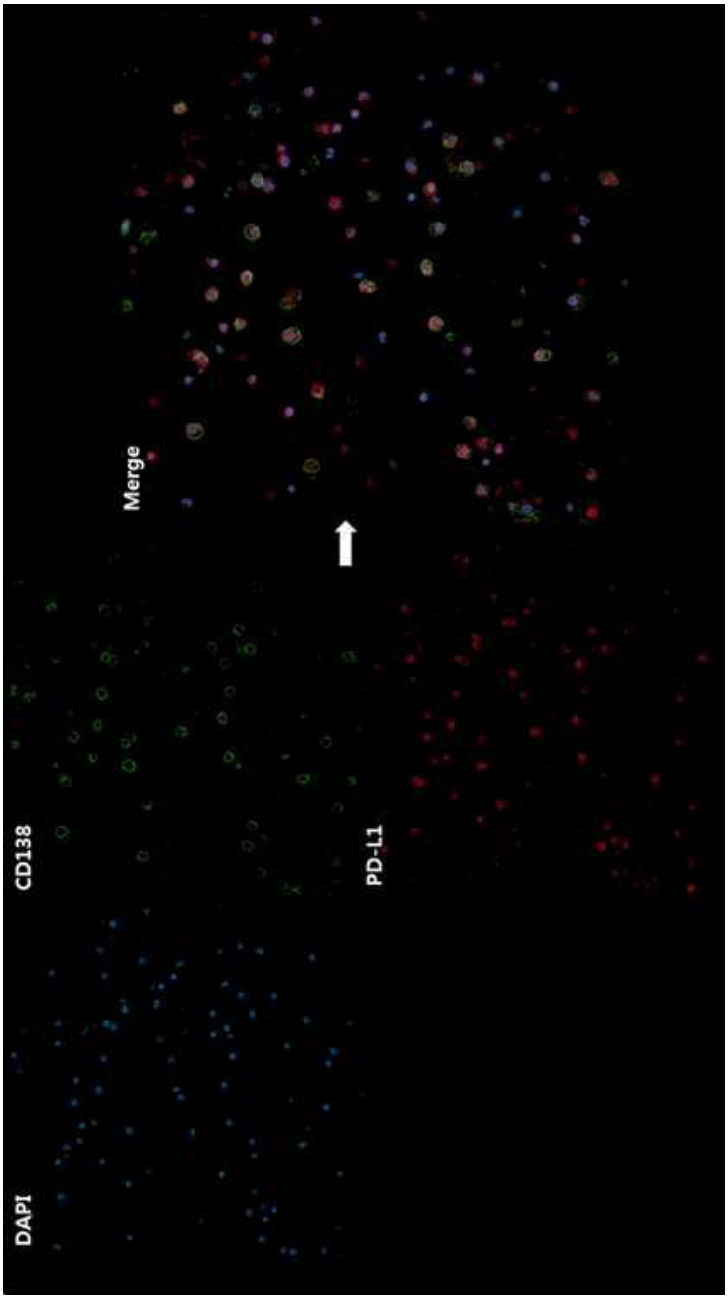
표 3

[0093]

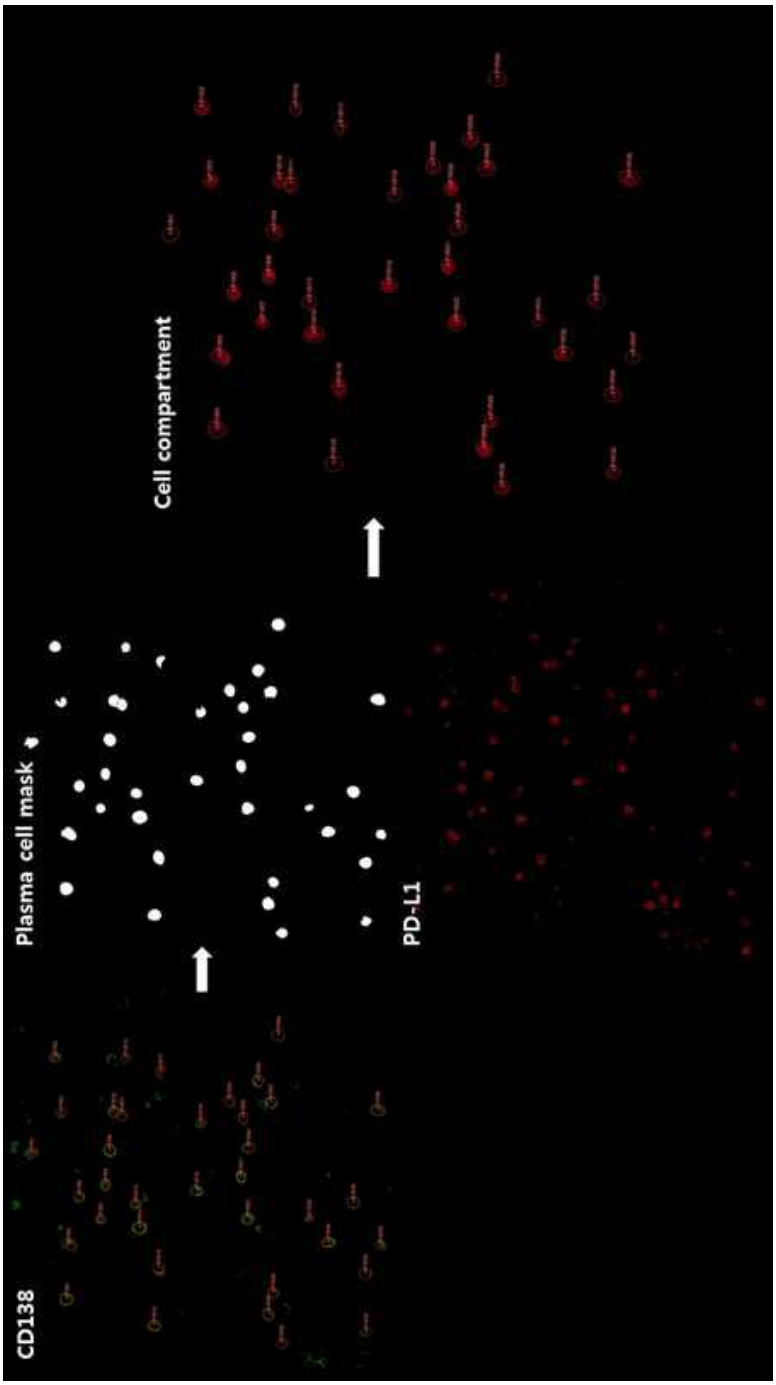
Risk category	Univariable (OS)			Multivariable (OS)			Univariable (PFS)			Multivariable (PFS)		
	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*	HR	95% CI	*P*
Low	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Frontline IMiD	1.569	0.161–15.295	0.698	3.908	0.238–64.150	0.340	1.130	0.400–3.196	0.817	5.486	0.600–50.171	0.132
- ASCT	0.756	0.105–5.427	0.781	0.310	0.028–3.481	0.342	0.480	0.163–1.415	0.183	0.180	0.020–1.637	0.128
Intermediate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Frontline IMiD	0.872	0.237–3.210	0.838	1.167	0.251–5.436	0.844	0.783	0.310–1.979	0.604	0.956	0.365–2.506	0.927
- ASCT	0.656	0.161–2.668	0.556	0.591	0.111–3.149	0.537	0.465	0.133–1.629	0.231	0.473	0.127–1.758	0.264
High	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Frontline IMiD	0.410	0.167–1.011	0.053	0.726	0.285–1.852	0.503	0.498	0.221–1.120	0.092	0.549	0.323–1.822	0.549
- ASCT	0.133	0.030–0.584	**0.008**	0.155	0.033–0.729	**0.018**	0.274	0.101–0.740	**0.011**	0.359	0.133–0.965	**0.030**

도면

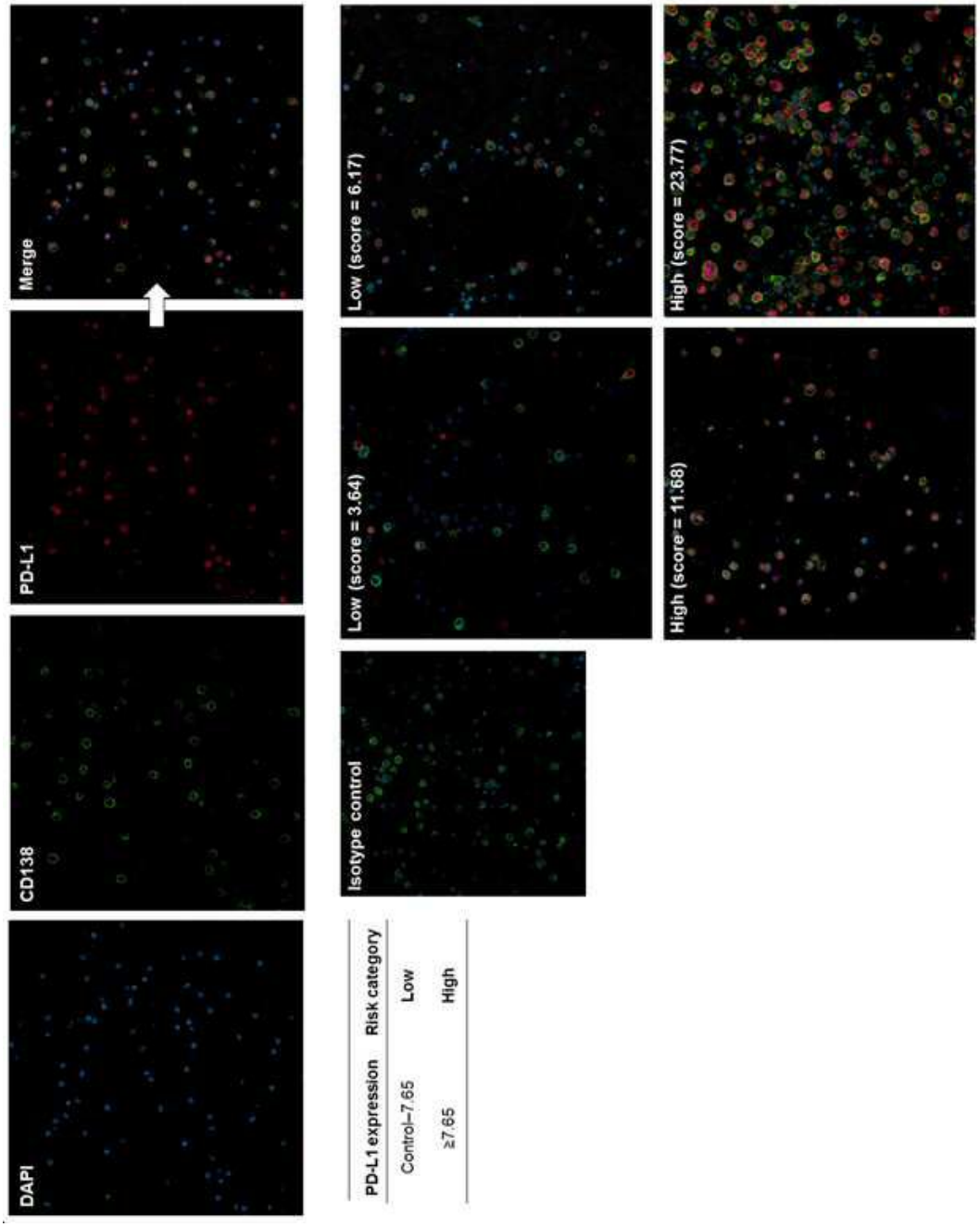
도면1



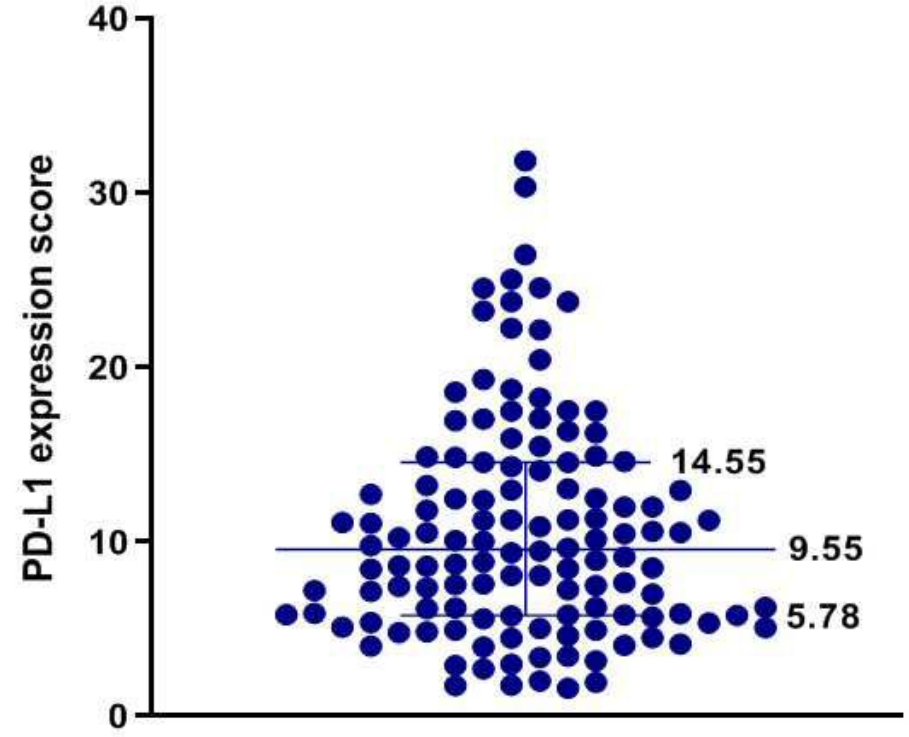
도면2



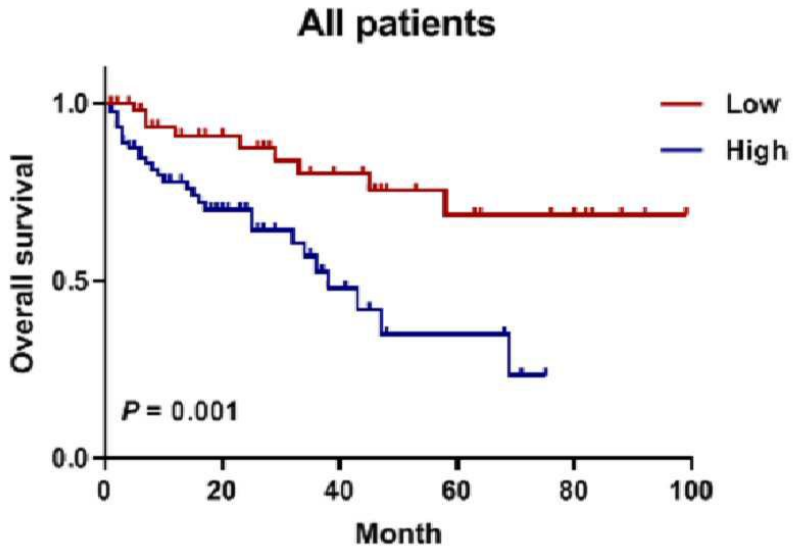
도면3a


DAPI
CD138
PD-L1
Merge
Isotype control
Low (score = 3.64)
Low (score = 6.17)
High (score = 11.68)
High (score = 23.77)
PD-L1 expression
Risk category
Control–7.65
Low
≥7.65
High

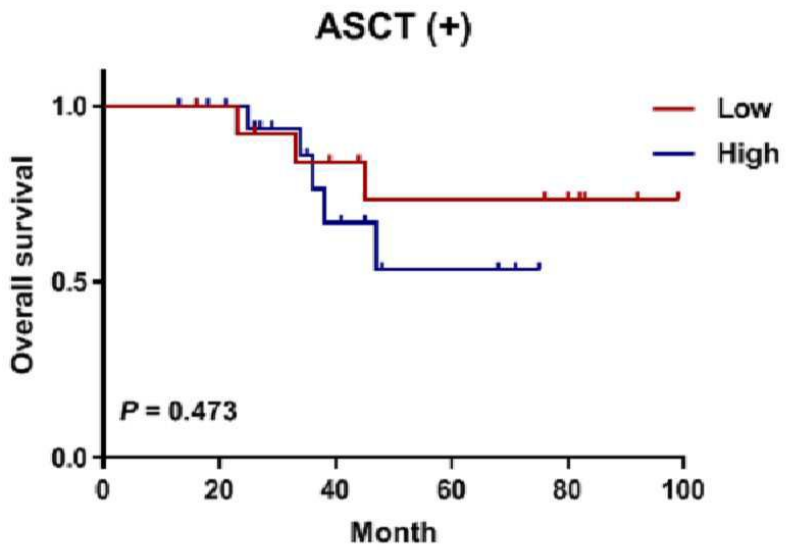
도면3b


PD-L1 expression score
40
30
20
10
0
14.55
9.55
5.78

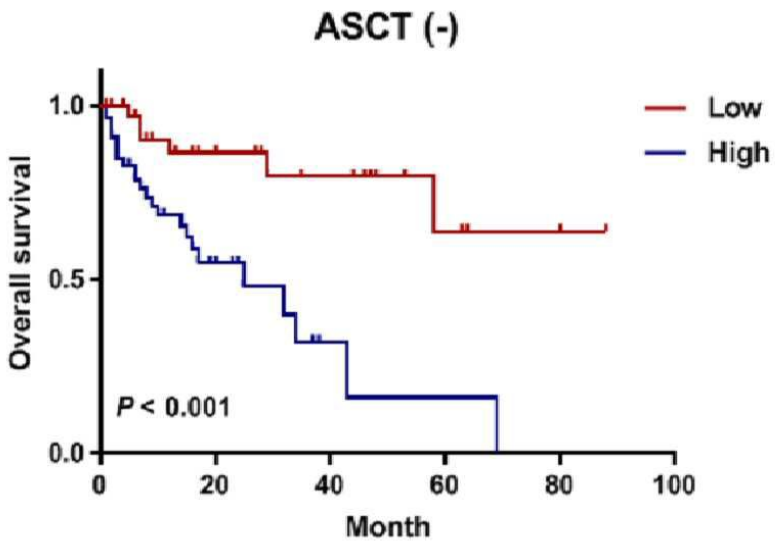
도면4a


All patients
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.001
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

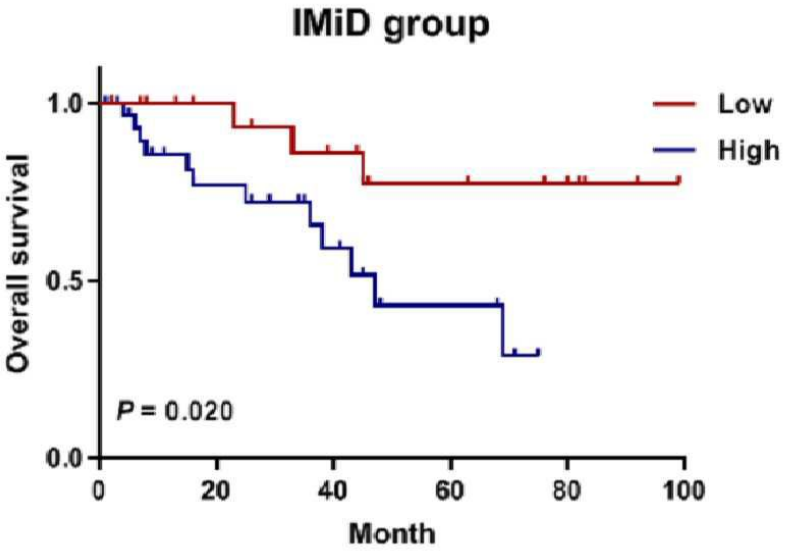
도면4b


ASCT (+)
Low
High
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.473
0
20
40
60
80
100
Month

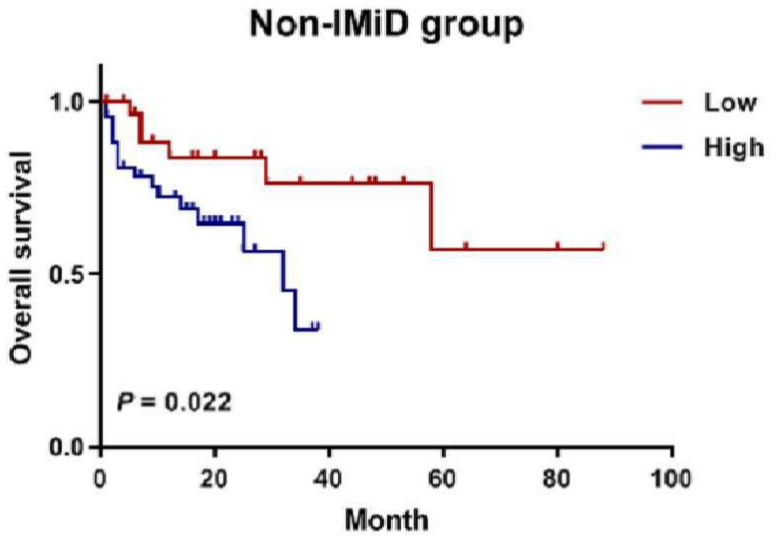
도면4c


ASCT (-)
Low
High
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P < 0.001
0
20
40
60
80
100
Month

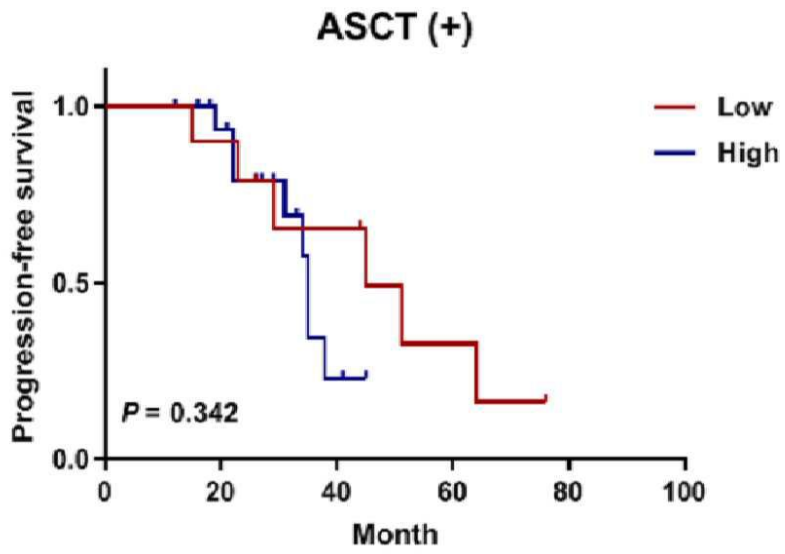
도면4d


IMiD group
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.020
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

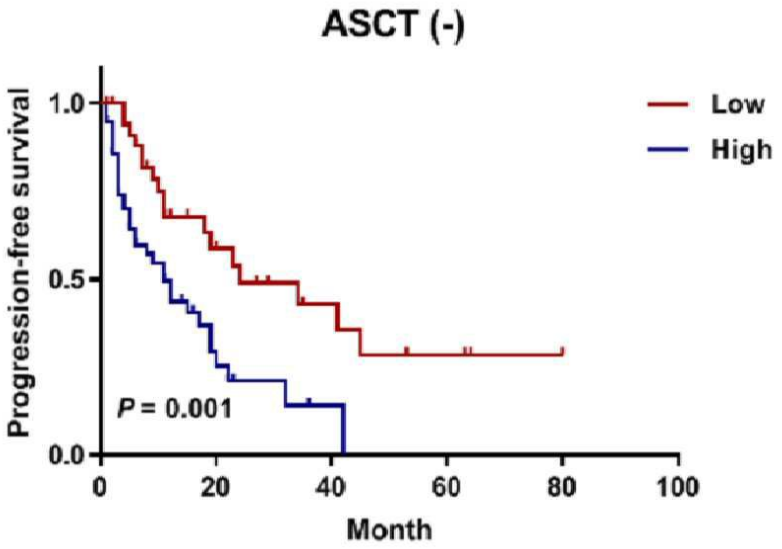
도면4e


Non-IMiD group
Overall survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.022
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

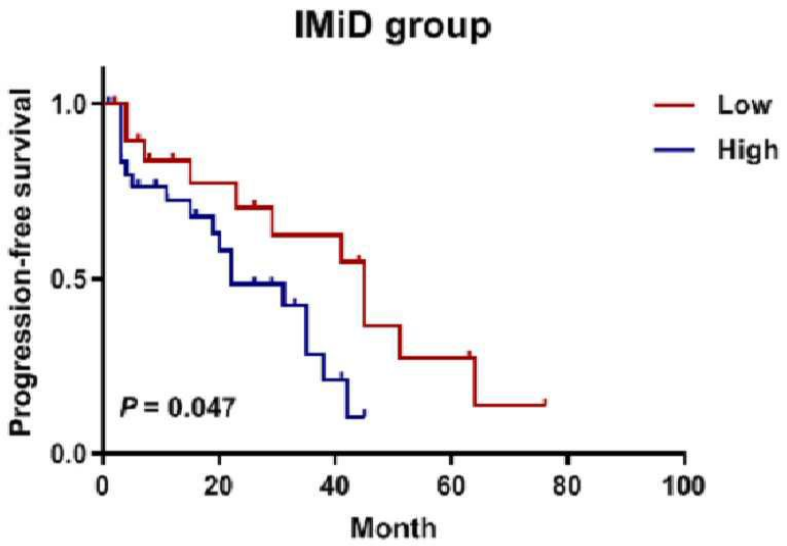
도면4f


ASCT (+)
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.342
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

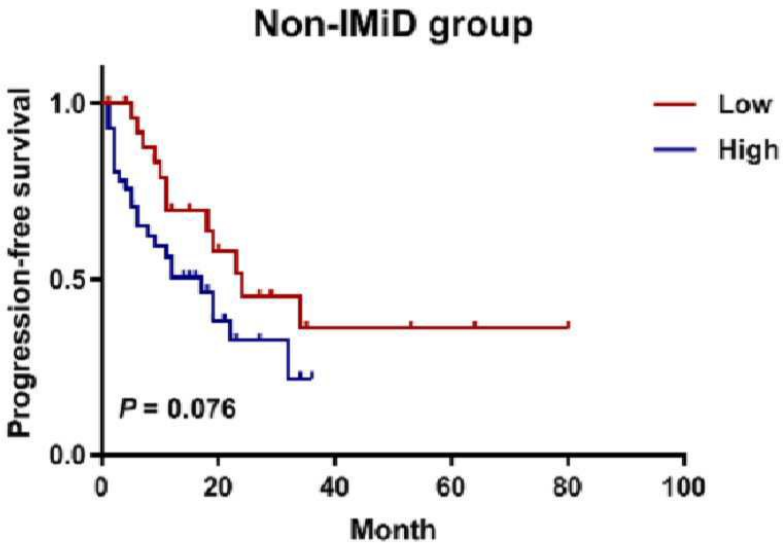
도면4g


ASCT (-)
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.001
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

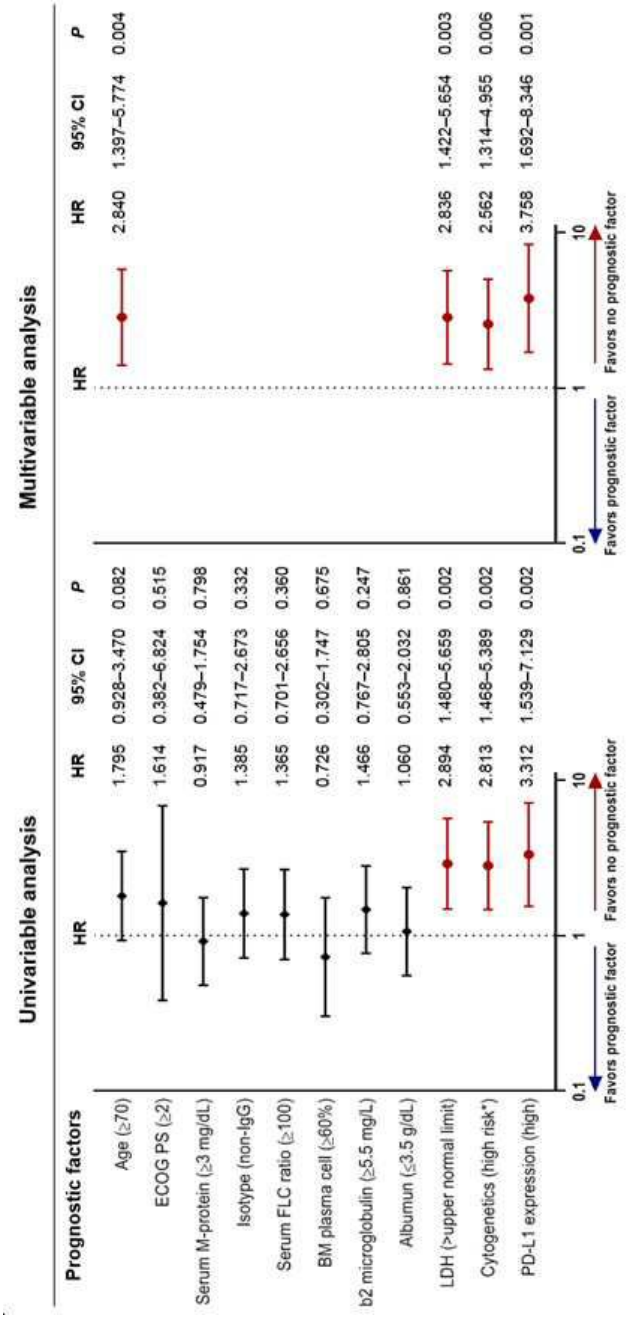
도면4h


IMiD group
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.047
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

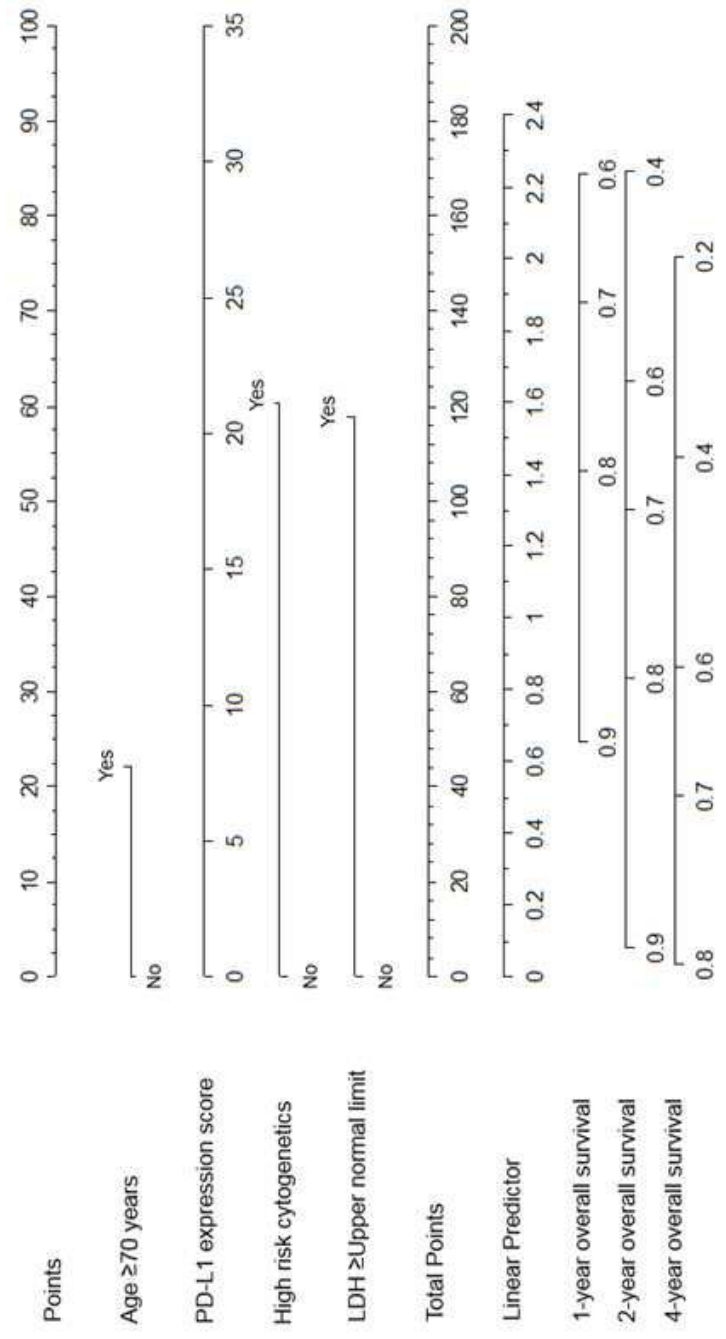
도면4i


Non-IMiD group
Progression-free survival
1.0
0.5
0.0
P = 0.076
0
20
40
60
80
100
Month
Low
High

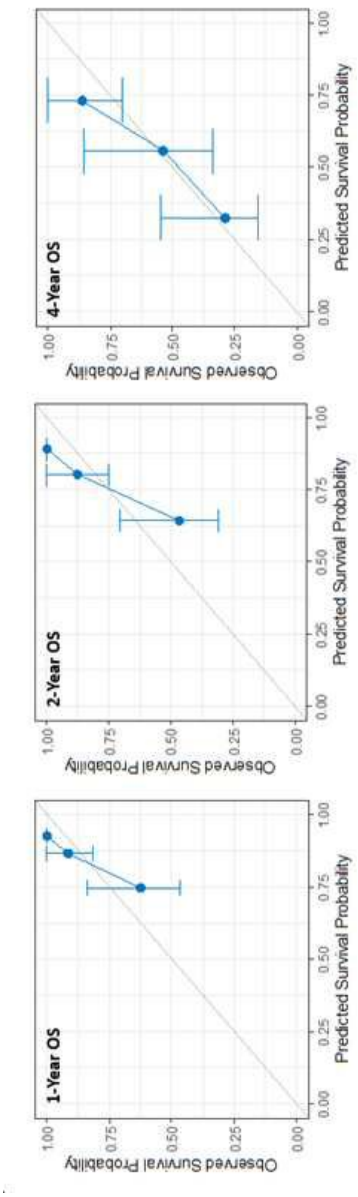
도면5


Univariable analysis
Multivariable analysis
Prognostic factors
HR
95% CI
P
Age (≥70)
ECOG PS (≥2)
Serum M-protein (≥3 mg/dL)
Isotype (non-IgG)
Serum FLC ratio (≥100)
BM plasma cell (≥60%)
b2 microglobulin (≥5.5 mg/L)
Albumun (≤3.5 g/dL)
LDH (>upper normal limit)
Cytogenetics (high risk*)
PD-L1 expression (high)
1.795 0.928–3.470 0.082
1.614 0.382–6.824 0.515
0.917 0.479–1.754 0.798
1.385 0.717–2.673 0.332
1.365 0.701–2.656 0.360
0.726 0.302–1.747 0.675
1.466 0.767–2.805 0.247
1.060 0.553–2.032 0.861
2.894 1.480–5.659 0.002
2.813 1.468–5.389 0.002
3.312 1.539–7.129 0.002
2.840 1.397–5.774 0.004
2.836 1.422–5.654 0.003
2.562 1.314–4.955 0.006
3.758 1.692–8.346 0.001
0.1
1
10
Favors prognostic factor
Favors no prognostic factor

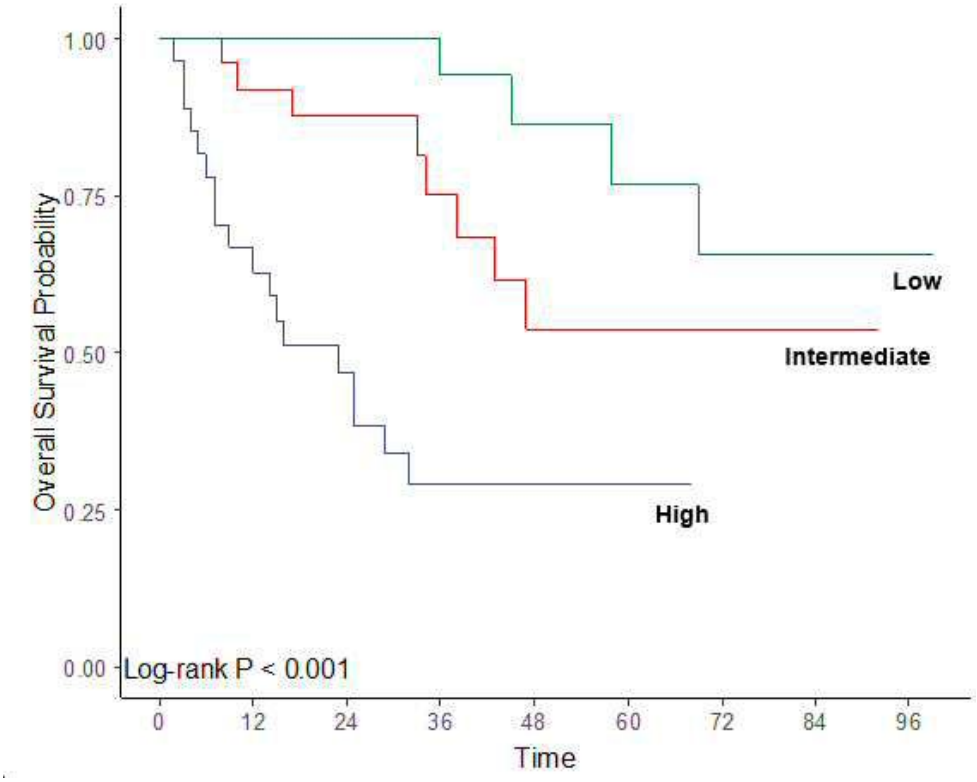
도면6a


Points
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Age ≥70 years
Yes
No
PD-L1 expression score
0 5 10 15 20 25 30 35
High risk cytogenetics
Yes
No
LDH ≥Upper normal limit
Yes
No
Total Points
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
Linear Predictor
0 0.2 0.4 0.6 0.8 1 1.2 1.4 1.6 1.8 2 2.2 2.4
1-year overall survival
0.9 0.8 0.7 0.6 0.4 0.2
2-year overall survival
0.9 0.8 0.7 0.6 0.4
4-year overall survival
0.8 0.7 0.6 0.4 0.2

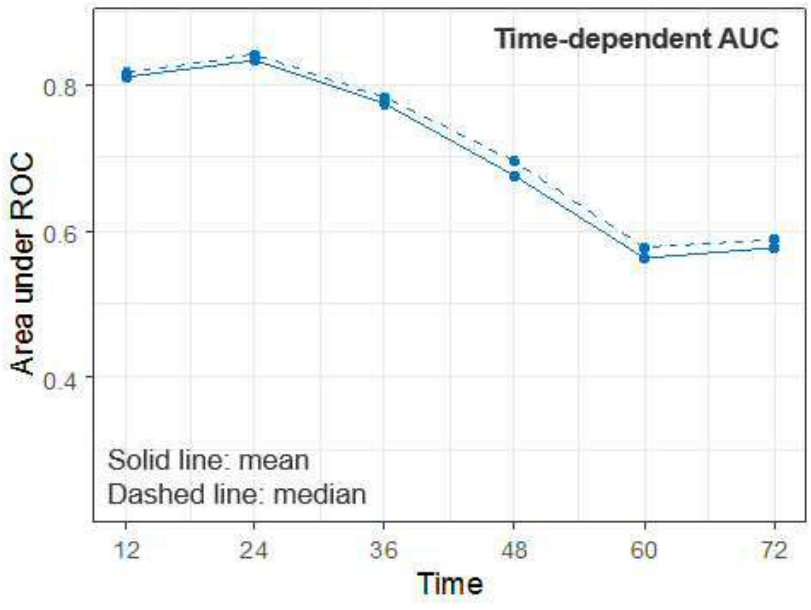
도면6b


1-Year OS
2-Year OS
4-Year OS
Observed Survival Probability
Predicted Survival Probability
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00

도면6c

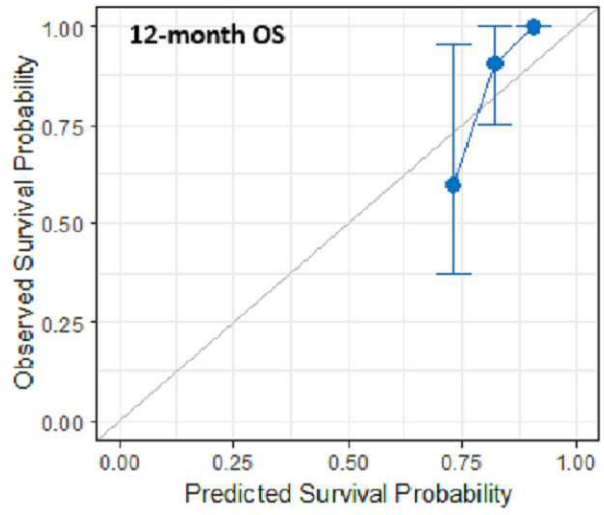


도면6d

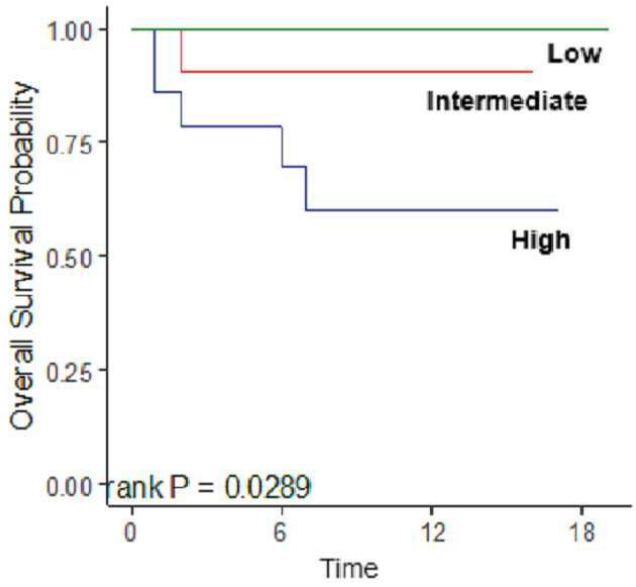


	1-year	2-year	3-year	4-year	5-year	6-year
Mean	0.809	0.833	0.775	0.676	0.562	0.576
Median	0.815	0.842	0.782	0.694	0.578	0.589

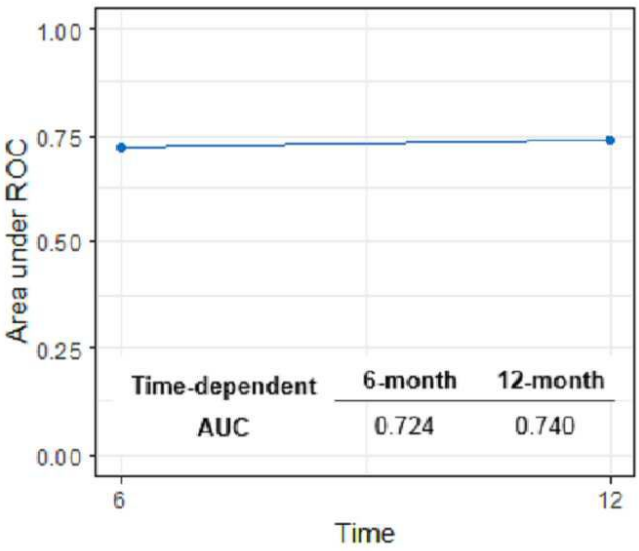
도면6e


12-month OS
Observed Survival Probability
Predicted Survival Probability
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00

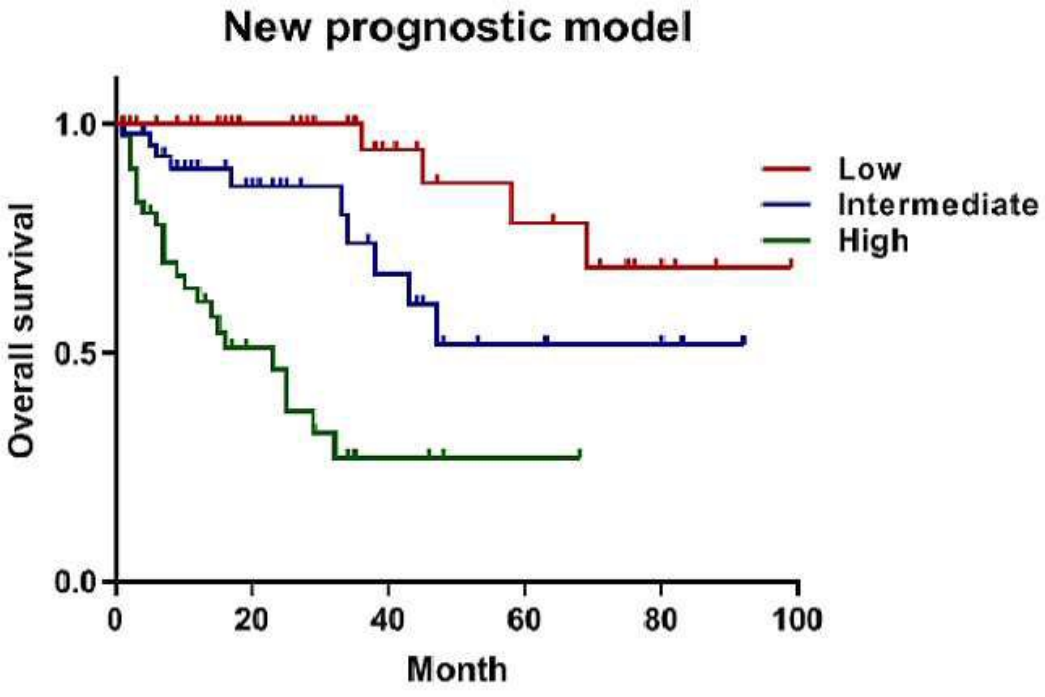
도면6f


Low
Intermediate
High
Overall Survival Probability
Time
rank P = 0.0289
0
6
12
18
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00

도면6g

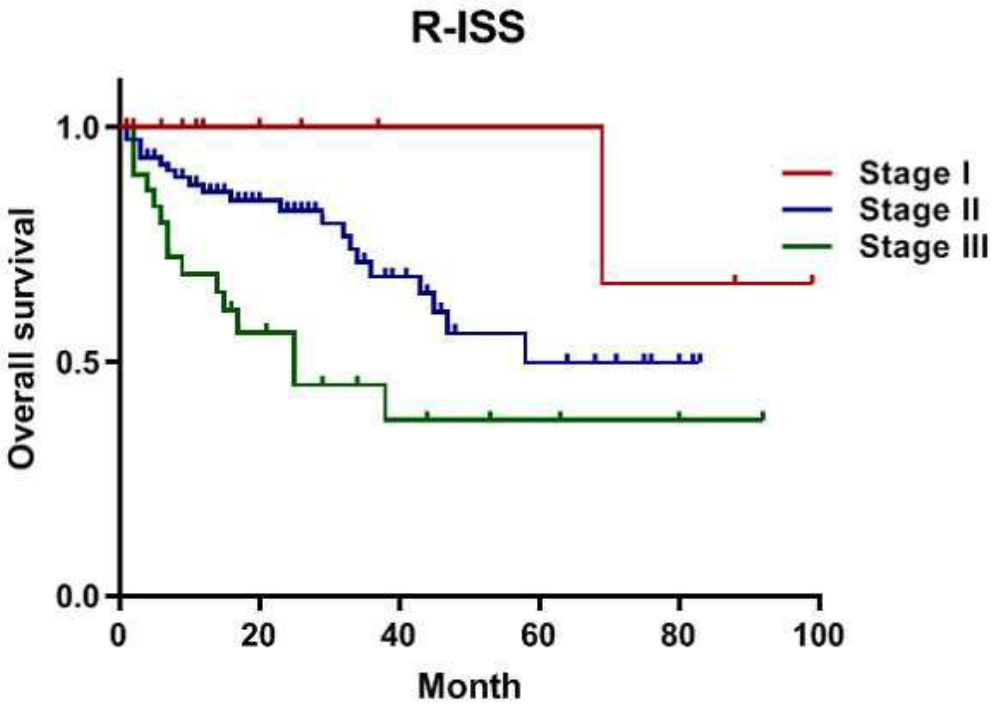


도면7a



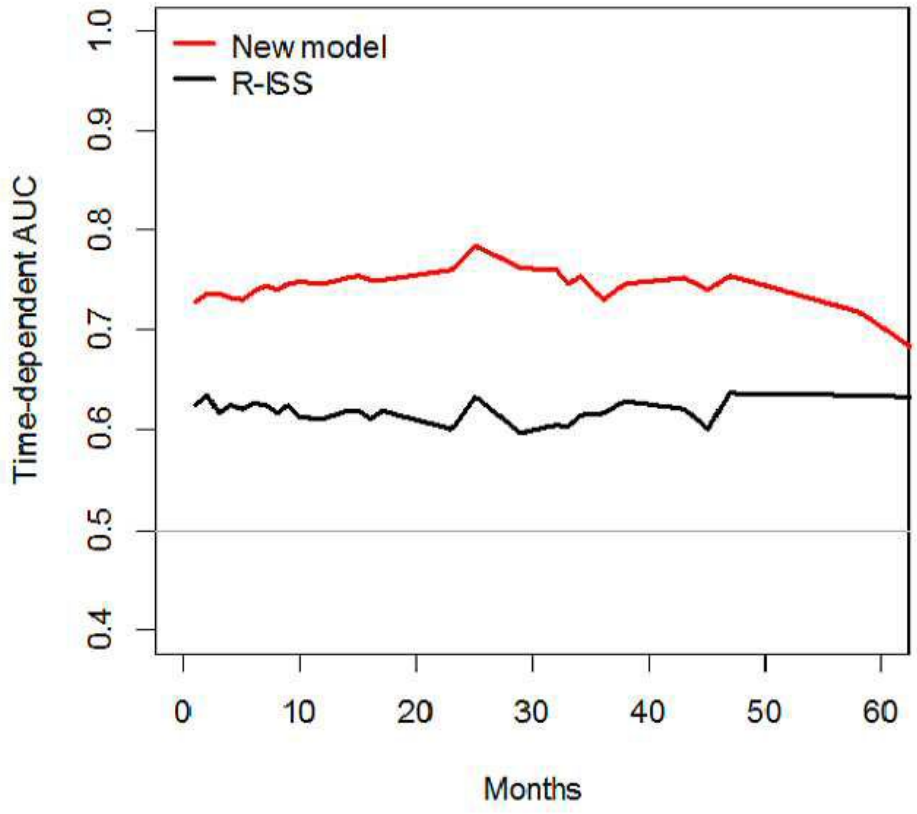
	n	Median, m	2-year	5-year	*P*
Low	37	not reached	100%	79%	<0.001
Intermediate	46	not reached	86%	52%	
High	43	23	47%	27%	

도면7b

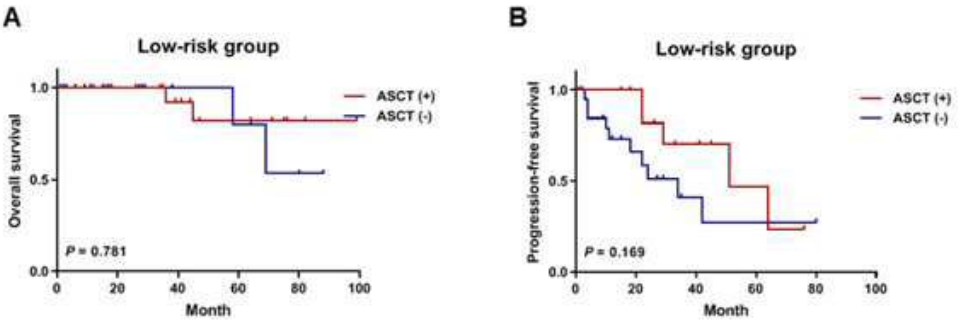


	n	Median, m	2-year	5-year	*P*
Stage I	14	not reached	100%	100%	0.011
Stage II	79	58	82%	50%	
Stage III	33	25	56%	38%	

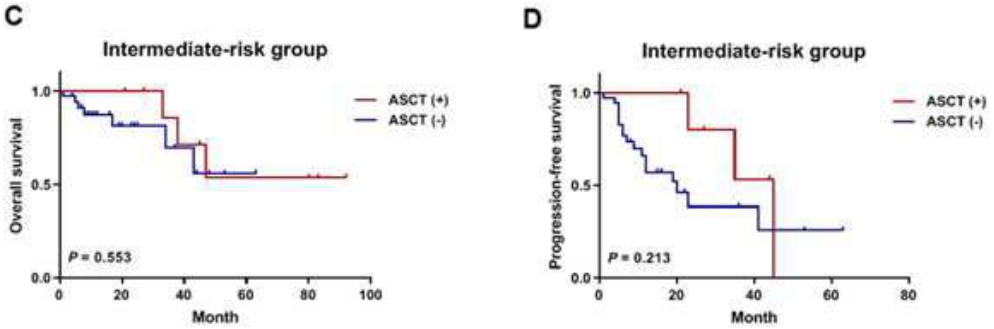
도면7c



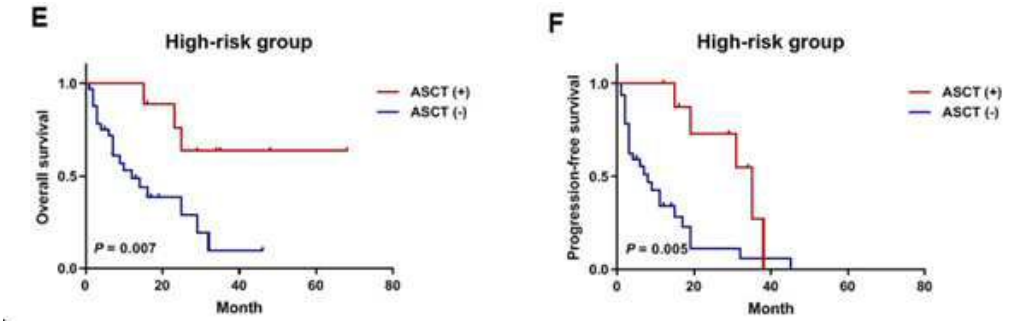
도면8a



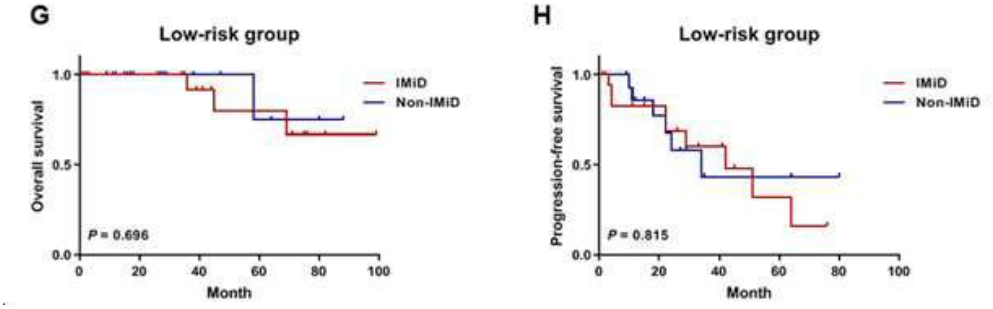
도면8b



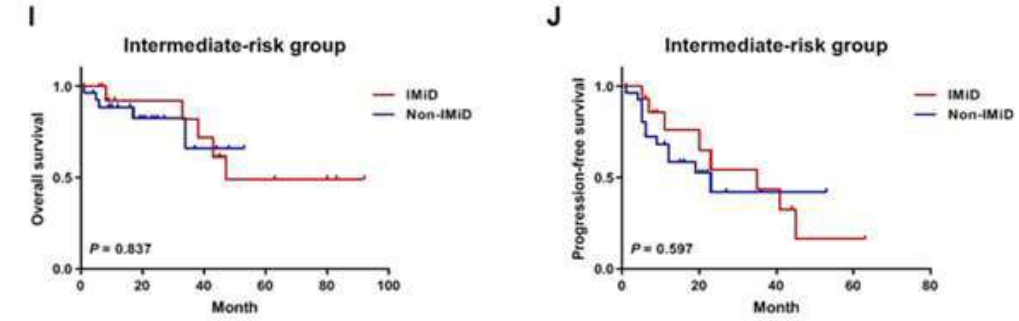
도면8c



도면8d



도면8e



도면8f

