



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월27일

(11) 등록번호 10-2403106

(24) 등록일자 2022년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/085 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7002714

(22) 출원일자(국제) 2015년06월09일

심사청구일자 2020년05월20일

(85) 번역문제출일자 2017년01월31일

(65) 공개번호 10-2017-0023174

(43) 공개일자 2017년03월02일

(86) 국제출원번호 PCT/FR2015/051518

(87) 국제공개번호 WO 2015/197934

국제공개일자 2015년12월30일

(30) 우선권주장

1456037 2014년06월27일 프랑스(FR)

(56) 선행기술조사문헌

MICHELOUD, DARIELA et al., '536: Serum levels of fibrosis progression biomarkers measured early after LT are associated to severe HCV recurrence', Hepatology AASLD Abstracts, 2007, Vol. 46, Suppl. 1,*

PATEL, KEYUR et al., 'Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C', Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2014, Vol. 12, pp 2113-212*

WU, YI-MING et al., 'A simple noninvasive index to predict significant liver fibrosis in patients with advanced schistosomiasis japonica', Parasitology International, 2013, Vol. 62, pp 283-288. 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오-라드 이노베이션스

프랑스 마르네-라-코케뜨(우편번호: 에프-92430)

블레바드 레이몽 뽀앙까르 3

아시스망스 퍼블리끄-오빠또 드 빠리

프랑스 에프-75004 빠리 아브뉴 빅토리아 3

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

롱베르, 내딘

프랑스 샤투 에프-78400 아브뉴 에르네스트 부종 5

바틀레, 베네딕트

프랑스 쟁 클레몽 드 리비에 에프-34980 르 드 라 마리 빌라 뉴메로 2 레 꾸투 듀 라크 4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 간 섬유증의 검출 및 평가를 위한 상승 작용의 조합

(57) 요약

대표도 - 도1

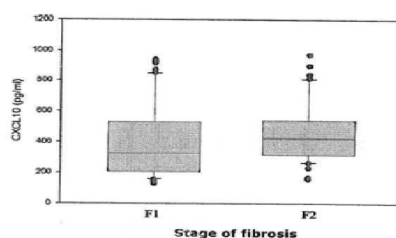


FIGURE 1

(52) CPC특허분류

G01N 2800/56 (2013.01)

(73) 특허권자

쎕뜨르 나쇼날르 드 라 르쉐르쎕 씨엥띠삐끄

프랑스, 75016 파리, 뤼 미셸-앙쥐 3

유니베르시티뎀 빠리 디데룣- 빠리 7

프랑스, 75013 파리, 뤼 토마스 만, 5

(72) 발명자

바테젤리, 이자벨, 까트린

프랑스 에그-뤼에 에프-30670 뉴메로 7 루티스몽
볼트-마스 쉐망 드 르 누아

아셀라, 타릭

프랑스 파리 에프-75012 아브뉴 듀 제네랄 미셸 비
조 112

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 하나 이상의 간염 바이러스에 감염된 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르(Metavir) 섬유증 스코어 시스템에 따른 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법:

i) 상이한 생물학적 마커를 선택하고, 상기 선택된 상이한 생물학적 마커는

a) 히알루론산 및 CXCL10 단백질; 및

b) 나이, 체질량지수, 바이러스 수치(viral load) 및 간 경직도를 포함하는 마커 목록에서 선택된 0, 1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커로 구성됨;

ii) 상기 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에 포함되어 있는 히알루론산과 CXCL10 단백질 각각의 농도를 시험관내에서 측정하고,

1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커가 상기 i) b)단계의 목록으로부터 선택되고, 상기 추가적인 마커(복수의 마커)가 나이, 체질량지수 및 간 경직도로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 마커이거나 이를 포함하는 경우에, 상기 환자에 대하여 미리 확인된 추가적인 마커 또는 복수의 마커들 각각에 대하여 정량화 값을 수집하거나,

1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커가 상기 i) b)단계의 목록으로부터 선택되고, 상기 추가적인 마커(복수의 마커)가 바이러스 수치이거나 이를 포함하는 경우에,

상기 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에 포함되어 있는 시험관내 바이러스 수치를 측정하거나, 상기 환자에 대하여 미리 확인된 바이러스 수치 값을 수집하여, 상기 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커를 정량화하는 단계; 및

iii) 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 상기 ii)단계에서 획득한 정량화 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 단계이며, 상기 참조 코호트는 다음과 같거나 포함한다:

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트; 및

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트;

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하지 않는 것을 나타내는 상기 첫 번째 코호트로의 분류,

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하는 것을 나타내는 상기 두 번째 코호트로의 분류,

상기 iii)단계의 비교는

- 기계 학습(machine learning); 또는

- 로지스틱 회귀분석(logistic regression); 또는

- mROC(multivariate receiver operating characteristics)로 수행되고

상기 iii)단계의 비교는 다음과 같이 수행되며:

$40 \leq h \leq 80$,

$150 \leq i \leq 300$,

400 ≤ j ≤ 620을 포함하는 결정 트리(decision tree)를 따르는 기계 학습; 또는

LOGIT₁ 함수에 의한 로지스틱 회귀분석으로, 상기 LOGIT₁ 함수는

LOGIT = 인터셉트(Intercept) + k(CXCL10) + l(HA)

-5 ≤ 인터셉트 ≤ -1,

0.001 ≤ k ≤ 0.010,

0.010 ≤ l ≤ 0.050이거나; 또는

함수 Z₁₃을 이용하는 mROC로, 상기 함수 Z₁₃은

$$Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t) + f(FS^t)$$

a 및 b는 각각 독립적으로 0을 제외한, +0.1에서 +0.6까지의 양의 실수이며; c, d, e 및 f는 각각 독립적으로 0을 제외한, -10.0에서 +10.0까지의 실수이며; 지수 t는 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 상기 측정된 값을 표준화하기 위하여 고려된 마커(BMQ)에 대한 측정 값의 Box-Cox 변환된 형태라는 것을 나타낸다.

$$BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda; \text{ 및}$$

CXCL10 (λ_{CXCL10}), HA (λ_{HA}), BMI (λ_{BMI}), Age (λ_{age}), VL (λ_{VL}) 및 FS (λ_{FS}) 마커 각각에 대한 λ 값은 독립적으로 0을 제외한, -6.0에서 1.2까지의 실수이며,

상기 iii)단계의 비교는 다음과 같이 이전에 구축된 분류 모델에서 상기 환자에 대하여 획득한 정량화 값을 조합함으로써 수행됨:

α) 상기 환자와 동일한 간염 바이러스(들)에 감염된, 상기 환자와 동일한 종의 환자 집단에 대하여 상기 집단의 환자 각각의 간 섬유증 단계를 결정하고,

상기 환자들을 환자들의 간 섬유증 단계에 따라서 하위 집단으로 분류하여, 상기 간 섬유증 단계에 따라서 생성된 참조 코호트를 제작하는 단계이며,

상기 참조 코호트는

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 섬유증 스코어 시스템에 따른 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트; 및

상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 섬유증 스코어 시스템에 따른 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트 인 것을 특징으로 한다.

β) 상기 환자들 각각에 대하여, 청구항 1의 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커를 정량화하는 단계; 및

γ) 상기 선택된 생물학적 마커의 정량화 값으로부터 상기 참조 코호트 중 하나로의 분류를 유도하는 분류 모델을 제작하기 위해 단계 β)에서 획득한 정량화 값의 코호트 또는 상기 정량화 값의 분포를 비교하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커는

a) 히알루론산과 CXCL10 단백질; 및

b) 나이, 체질량지수, 바이러스 수치 및 간 경직도를 포함하는 마커 목록에서 선택되는 0, 1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커는;

- 히알루론산과 CXCL10 단백질; 또는
- 히알루론산, CXCL10 단백질, 나이 및 체질량지수; 또는
- 히알루론산, CXCL10 단백질, 나이, 체질량지수 및 바이러스 수치; 또는
- 히알루론산, CXCL10 단백질 및 간 경직도로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 iii)단계의 비교는 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성 예측 값으로 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 iii)단계의 비교는 다음과 같은 1/과 2/ 두 개의 성능 중에서 적어도 하나로 상기 환자가 가장 속할 가능성이 높은 상기 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법:

- 1/ 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도,
- 2/ 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.800의 ROC 곡선 아래의 면적.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 iii)단계에서, 히알루론산 농도의 측정과 CXCL10 단백질 농도의 측정은 다중 검출에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

처리 장치의 메모리 또는 상기 처리 장치의 판독기와 협력하도록 의도된 고정식 데이터 캐리어(data carrier) 상에 저장되기 위한 컴퓨터 프로그램 제품으로, 제1항 또는 제3항의 방법을 수행하기 위한 명령을 포함하는 것을 특징으로 하는 컴퓨터 프로그램 제품.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 간 섬유증, 특히 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로 만성 간염으로 고통 받고 있는 환자에게 나타나는 간 섬유증에 관한 것이다.
- [0002] 본 발명은 간 섬유증 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)를 결정하기 위한 방법 및 수단을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명의 방법 및 수단은 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 결정할 수 있다.
- [0003] 본 발명의 방법 및 수단은 특히, CXCL10 및 히알루론산과 같은 바이오마커의 조합을 이용한다.

배경 기술

- [0004] 각종 질병은 간 섬유증으로 알려진 간의 조직 병변을 일으키거나 유도한다. 간 섬유증은 특히, 간 실질에서 변형된 세포 외 기질의 분자 화합물의 과도한 축적이 원인이다.
- [0005] 간 조직의 손상 단계, 특히 간장 조직 병변의 성질 및 범위는 특히, F0에서 F4까지 5 단계로 구성된 에프 메타비르(F Metavir) 스코어 시스템(cf. 표 25)에 의한 간 섬유증 스코어에 의해 평가된다. 간 섬유증 스코어의 결정은 예후 스코어이기 때문에 의사에게 필수적이다.
- [0006] 실제로, 이러한 결정은 의사가 이러한 병변을 치료하거나 적어도 그 영향을 완화시키기 위한 치료를 시행 할지 또는 시행 하지 않을지를 결정할 수 있도록 하는 기준이다. 의사가 치료를 시작하기로 결정하는 것 또한 이러한 기준에 있다. 특히, 만약 메타비르 섬유증 스코어가 기껏해야 F1(경 섬유증)이라면, 의사는 일반적으로 치료를 시행 하지 않기로 결정하지만 반면에, 메타비르 섬유증 스코어가 적어도 F2라면, 변성 염증의 활성화에 관계없이 치료를 시행 하는 것이 바람직하다. 그러나, 가능한 치료법은 환자에게 주요 부작용을 초래하거나(인터페론을 포함하는 치료법), 치료 비용이 매우 높다(신규한 항바이러스제).
- [0007] 이런 맥락에서, 환자에게 환자가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 확실하게 확인 할 수 있도록 하는 것은 단연 중요하다.
- [0008] 예를 들어, 간 섬유증 스캔(transient elastography)(FIBROSCAN™)에 의해 간경화(메타비르 스코어 F4)의 단계를 확인하는 것이 상대적으로 쉬울지라도, 그럼에도 불구하고 비-침습적인, 그러나 여전히 임상적으로 신뢰할 수 있는 방법으로 다음을 구별하는 것은 훨씬 더 복잡하다:
- [0009] - 기껏해야 경 섬유증인 단계(메타비르 섬유증 스코어가 F0 또는 F1)
- [0010] - 진행된 섬유증 단계(메타비르 섬유증 스코어가 F2 또는 F3).
- [0011] 간 섬유증 단계를 결정하려고 시도하는 환자에게 적용될 수 있는 상이한 비-침습적인 검사가 있다. 그들은 상이한 바이오마커를 이용한다.
- [0012] 예를 들어, 히알루론산 바이오마커는 임상 실험 ELF™(US 7,141,380 B2), HEPAScore™ (Adams et al. 2005; US 2007/0225919 A1), FIBROSPECT™ (US 6,986,995 B2), FIBROMETER™ (US 8,489,335 B2), 및 SHASTA™ (Kelleher et al. 2005) 에서 이용되었다.
- [0013] 그러나, 이러한 실험에서 CXCL10 단백질은 이용되지 않았다.

- [0014] 실제로, CXCL10 단백질은 기본적으로 인터페론을 사용하는 항-C형간염(HCV) 치료법에 대한 반응의 바이오마커로 알려졌으며, 간 섬유증과 관련하여 거의 알려지지 않았다.
- [0015] 히알루론산은 CXCL10 단백질의 발현을 유도하는 능력을 갖고 있다. 그러므로, 히알루론산의 증가는 CXCL10의 증가를 유도한다. 두 분자의 농도는 동일한 경향으로 성장한다(히알루론산 농도의 증가는 CXCL10의 증가를 초래한다). 따라서, 처음부터 바이오마커로서의 이러한 두 분자의 조합이 두 분자 중 하나만으로 얻은 결과에 더하여 추가적인 결과를 가져올 것이라고 예상되지 않았다. 그러나, 본 발명은 바이오마커로서의 두 분자의 단순한 병렬을 넘어서 얻어진 상승 효과에 대해 기술한다.
- [0016] 게다가, 종래 기술은 CXCL10 단백질과 메타비르 섬유증 스코어 F2-F4로부터 메타비르 섬유증 스코어 F0-F1을 확실하게 구별시키고자 시도하는 다른 바이오마커를 결합시키려고 하는 실험을 기술하고 있으며, 그러한 실험은 효과가 없다고 보고하고 있다(Zeremski et al. 2009, 179페이지, 왼쪽 칼럼, 첫 번째 문장: "다중 파라미터의 조합은 최소 섬유증을 가지는 환자를 확인하는 능력을 향상시키지 못하였다"). 그러므로, 본 발명의 주제는 기술적인 편견을 극복하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) US 7141380 B2
- (특허문헌 0002) US 2007/0225919 A1
- (특허문헌 0003) US 6986995 B2
- (특허문헌 0004) US 8489335 B2

비특허문헌

- [0018] (비특허문헌 0001) Adams et al. 2005. Clinical Chemistry (10): 1867-1873.
- (비특허문헌 0002) Anastasiadis et al. 2005 ; New globally convergent training scheme based on the resilient propagation algorithm. Neurocomputing 64: 253-270.
- (비특허문헌 0003) Berkson 1944. Application of the Logistic Function to Bio-Essay. Journal of the American Statistical Association, volume 39, pages 357-365.
- (비특허문헌 0004) Berkson 1951. Why I Prefer Logits to Probits. Biometrics, vol 7, 1951, p. 327-329
- (비특허문헌 0005) Booth et al. 2002. Biochemistry 41(33) : 10418-10425.
- (비특허문헌 0006) Boursier et al. 2012. Hepatology 55(1): 58-67.
- (비특허문헌 0007) Box et Cox 1964. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 26: 211-243.
- (비특허문헌 0008) Breiman Friedman, Stone et Olshen 1984. Classification and regression trees.
- (비특허문헌 0009) Monterey, CA: Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software. ISBN 978-0-412-04841-8
- (비특허문헌 0010) Breiman 2001 ; Random Forests. Machine learning 45 : 5-32
- (비특허문헌 0011) Castera et al. 2005. Gastroenterology 128: 343-350.
- (비특허문헌 0012) Castera et al. 2010. Journal of Hepatology 52: 191-198.
- (비특허문헌 0013) Castera et al. 2014. Comparison of transient elastography (Fibroscan), Fibrotest, APRI and two algorithms combining these non-invasive tests for liver fibrosis staging in HIV/HCV coinfecting patients: ANRS C013 HEPAVIH and FIBROSTIC collaboration. HIV Medicine 15(1): 30-39.

- (비특허문헌 0014) Castera 2012. Gastroenterology 142: 1293-1302.
- (비특허문헌 0015) Chambers 2008 ; Software for data analysis : programming with R. Springer, New-York, ISBN 978-9-387-75935-7.
- (비특허문헌 0016) Efron 1979. Bootstrap methods: Another Look at the Jackknife. Annals of Statistics, Volume no7, no1, pages 1-26.
- (비특허문헌 0017) Falissard 2005 ; Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie, Masson.
- (비특허문헌 0018) Forns et al. 2002. Hepatology 36: 986-922.
- (비특허문헌 0019) Goodman 2007. Journal of Hepatology 47: 598-607.
- (비특허문헌 0020) Hastie, Tibishirani et Friedman, 2009 ; "The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction", 2nd Edition, Springer.
- (비특허문헌 0021) Imbert-Bismut et al. 2001. The Lancet 357: 1069-1075.
- (비특허문헌 0022) Intrator et Intrator 1993 ; Using Neural Nets for Interpretation of Nonlinear Models. Proceedings of the Statistical Computing Section, San Francisco: American Statistical Society (eds), pages 244-249.
- (비특허문헌 0023) Kelleher et al. 2005. Journal of Hepatology 43: 78-84.
- (비특허문헌 0024) Kramar et al. 1999 ; Criteres ROC generalises pour l'evaluation de plusieurs marqueurs Tumoraux. Revue d'Epidemiologie et Sante Publique 47: 376-383
- (비특허문헌 0025) Kramar et al. 2001. mROC: a computer program for combining tumour markers in predicting disease states. Computer methods and programs in biomedicine 66: 199-207.
- (비특허문헌 0026) Liaw et Wiener 2002 ; Classification and regression by Random Forest. R. News 2.3: 18-22.
- (비특허문헌 0027) Nakane et kawaoi 1974. J. Histochem. Cytochem. 22(12) : 1084-1091
- (비특허문헌 0028) Reiser et Faraggi 1997 ; Confidence intervals for the generalized ROC criterion. Biometrics 53: 644-652.
- (비특허문헌 0029) Riedmiller 1994 ; Rprop - Description and Implementation Details. Technical Report. University of Karlsruhe.
- (비특허문헌 0030) Riedmiller et Braun 1993 ; A direct adaptive method for faster backpropagation learning: the RPROP algorithm. Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks (ICNN), San Francisco, pages 586-591.
- (비특허문헌 0031) Shapiro 1999 ; The interpretation of diagnostic tests. Statistical Methods in Medical Research, 8: 113-134.
- (비특허문헌 0032) Su et Liu 1993 ; Linear combinations of multiple diagnostic markers. Journal of the American Statistical Association 88: 1350-1355.
- (비특허문헌 0033) Swaminathan et al. 2003. Structure 11(5) : 521-532.
- (비특허문헌 0034) Theodoridis et Koutroumbos 2009 ; Pattern Recognition. Academic Press, Elsevier.
- (비특허문헌 0035) Wai et al. 2003. Hepatology 38: 518-526.
- (비특허문헌 0036) Zeremski et al. 2009. The journal of Infectious Diseases 200: 1774-1780.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도), 특히 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 결정할 수 있는 방법 및 수단을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CXCL10(케모카인의 리간드10 (CXC 모티프)) 및 HA(히알루론산 또는 히알루로난)와 같은 특정 바이오마커의 조합을 이용한 간 섬유증 단계(또는 정도)를 결정할 수 있는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한, 다음과 같은 수단을 제공한다:

[0022] - 선택된 바이오마커들(히알루론산과 CXCL10과 같은)의 정량화에 특별히 적합한 제품 또는 시약;

[0023] - 그러한 제품 또는 시약을 포함하는 제조 물품, 조성물, 의약 조성물, 키트, 튜브, 고체 지지체 뿐만 아니라

[0024] - 본 발명의 수단의 적용에 특별히 적합한 컴퓨팅 시스템 (특히 컴퓨터 프로그램 및 컴퓨팅 장치 제품).

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따르면, 종래 기술의 비-침습적인 검사와 비교하여, CXCL10 바이오마커와 히알루론산 바이오마커의 조합이 간 섬유증 단계를 결정할 수 있는 방법에 있어서, 이들 각각의 개별적인 성능의 단순한 병렬을 뛰어 넘는 성능을 달성한다(ROC curve 아래의 면적(AUC) 성능 및/또는 정확 분류 비율 및/또는 민감도 및/또는 음성예측도(NPV) 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도(PPV)).

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 118명의 환자 집단에 대한 간 조직 생검(PBH)에 의해 결정되는 간 섬유증 스코어(메타비르 스코어 F1 또는 F2)에 따르는 CXCL10 단백질 혈청 농도의 분포를 나타낸다(cf. 아래의 실시예 1).

도 2는 118명의 환자 집단에 대한 PBH에 의해 결정되는 간 섬유증 스코어(스코어 F1 또는 F2)에 따르는 히알루론산(HA) 혈청 농도의 분포를 나타낸다(cf. 아래의 실시예 1).

도 3은 PBH를 되풀이하지 않고 간 섬유증 단계를 결정할 수 있는 분류 모델 또는 알고리즘(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$ 또는 $\geq F2$)을 나타낸다. 이러한 모델 또는 알고리즘은 Castera et al에서 개시되어 있는 알고리즘의 수정에 의해 개발되었다. (Castera et al. 2010 and Castera et al. 2014). 첫 번째 분석 레벨(FIBROTEST™ 및 FIBROSCAN™) 외에도, 이러한 수정된 모델 또는 알고리즘은 첫 번째 분석 레벨에서 부적합한 결과를 주는 샘플의 치료(PBH 없이)에 대한 두 번째 분석 레벨을 포함한다(cf. 아래의 실시예 3).

도 4는 310명의 환자 집단에 대한 간 섬유증 정도(메타비르 스코어 $< F2$ 또는 $\geq F2$)에 따르는 CXCL10 단백질 혈청 농도의 분포를 나타낸다(cf. 아래의 실시예 3).

도 5는 310명의 환자 집단에 대한 간 섬유증 정도(메타비르 스코어 $< F2$ 또는 $\geq F2$)에 따르는 히알루론산(HA) 혈청 농도의 분포를 나타낸다[cf. 아래의 실시예 3].

도 6은 PBH에 되풀이하지 않고 간 섬유증 단계를 정확하게 결정할 수 있는 분류 모델 또는 알고리즘(메타비르 간 섬유증 스코어 F0-F1 또는 F2-F3 또는 F4)을 나타낸다. 이러한 모델 또는 알고리즘은 Boursier et al에서 개시되어 있는 알고리즘의 수정에 의해 개발되었다. (Castera et al. 2010 and Castera et al. 2014). 첫 번째 분석 레벨(FIBROTEST™ 및 FIBROSCAN™) 외에도, 이러한 수정된 모델 또는 알고리즘은 첫 번째 분석 레벨에서 부적합한 결과를 주는 샘플의 치료(PBH 없이)에 대한 두 번째 분석 레벨을 포함한다(cf. 아래의 실시예 6).

도 7은 310명의 환자 집단에 대한 간 섬유증 정도(메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3 또는 F4)에 따르는 CXCL10 단백질 혈청 농도의 분포를 나타낸다(cf. 아래의 실시예 6).

도 8은 310명의 환자 집단에 대한 간 섬유증 정도(메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3 또는 F4)에 따르는 히알루론산(HA) 혈청 농도의 분포를 나타낸다(cf. 아래의 실시예 6).

도 9, 10 및 11 각각은 간 섬유증 단계(메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3)의 함수로서 환자의 분류를 위한 히알루론산 마커와 CXCL10 마커의 조합을 포함하는 분류 모델 또는 알고리즘을 나타낸다.

이러한 모델 또는 알고리즘은 추가적으로 예를 들어, FIBROSCAN™에 의해 예를 들어, 간 경직도를 측정하여 환자의 간 섬유증 스코어가 F4보다 낮거나 같은지 여부에 따라서 환자를 분류할 수 있는 예비 단계를 포함할 수 있다.

도 9: 히알루론산과 CXCL10의 조합.

도 10 및 11: 히알루론산, CXCL10 및 하나 이상의 다른 추가적인 마커의 조합.

도 10: 히알루론산, CXCL10 및 하나 이상의 또 다른 추가적인 마커의 조합[임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)], 이 경우에 있어서: 체질량지수(BMI), 샘플링 날짜에서의 나이(Age), 샘플링 날짜에서의 바이러스 수치(VL).

도 11: 히알루론산, CXCL10 및 예를 들어, FIBROSCAN™에 의해 측정된, 간 경직도 측정(FS)의 조합.

도 12는 선형 함수를 기반으로 하지 않는 분류 모델 또는 알고리즘을 나타낸다: 이러한 모델 또는 알고리즘은 CART(분류 및 회귀분석 트리) 분류 모델을 기반으로 하고 히알루론산 마커 및 CXCL10 마커의 조합을 포함한다(cf. 아래의 실시예 7).

도 13A에서 16B는 Bootstrap이라는 이름으로 알려진 방법에 의하여 히알루론산 + CXCL10 조합의 성능을 보여준다(cf. 아래의 실시예 3; 310명 환자의 집단에서 무작위로 선택된 동일한 크기의 1000개의 하위 집단; 대체물로 뽑아냈다).

AUC 값과 정확 분류 비율은 다음과 같이 측정되었다:

- 한편으로, 적용된 mROC 판별 규칙이 310명의 환자 집단에 대해 초기에 결정된 계수("고정 계수" 또는 "계수 고정")를 가지는 경우에; 및
- 다른 한편으로는, 적용된 mROC 판별 규칙이 1000개의 하위 집단 각각에 대하여 결정된 계수("최적화된 계수" 또는 "계수 최적화")를 가지는 경우.

AUC = ROC curve 아래의 면적

정확 분류 비율 = 정확하게 분류된 환자의 백분율

도 13A 및 13B는 한편으로, "고정 계수 (또는 "계수 고정")를 가지는 mROC 판별 규칙과 다른 한편으로는, "최적화된 계수 (또는 "계수 최적화")를 가지는 mROC 판별 규칙에서 측정된 AUC와 정밀도의 차이 값을 히스토그램의 형태로 나타낸다.

도 13A 및 13B에서, mROC 판별 규칙은 히알루론산 + CXCL10 조합을 이용하였다.

도 13A는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대하여 고정 또는 최적화된 계수를 가지는 AUC 차이의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.000; 0.005; 0.010].

도 13B는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대하여 고정 또는 최적화된 계수를 가지는 분류 정확 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 차이의 히스토그램을 나타낸다.

도 13A 및 13B는 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합과 다른 한편으로는, 히알루론산 마커 단독의 "고정 계수 (또는 "계수 고정")를 가지는 mROC 판별 규칙에 대하여 측정된 AUC와 정밀도의 차이 값을 히스토그램의 형태로 나타낸다.

도 14A는 "고정 계수 (또는 "계수 고정")를 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합과 다른 한편으로는, 단독의 히알루론산 마커의 AUC 차이의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10; 0.12].

도 14B는 "고정 계수 (또는 "계수 고정")를 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합과 다른 한편으로는, 단독의 히알루론산 마커의 정확 분류 비율 차이의 히스토그램을 나타낸다.

도 15는 "고정 계수(또는 "계수 고정")를 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대한 AUC의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.84; 0.86; 0.88; 0.90; 0.92; 0.94; 0.96]; cf. 아래의 실시예 9.

도 16A 및 16B는 실시예 1(히알루론산 + CXCL10 마커들; 함수 Z1; cf. 아래의 표 2)의 118명의 환자 집단에서 획득한 mROC 함수 성능을 실시예 3(히알루론산 + CXCL10 마커들; 함수 Z4; cf. 아래의 표 7)의 310명의 환자 집

단에서 획득한 mROC 함수 성능과 둘 다 118명의 환자 집단에 적용되는 경우에, 비교한다; cf. 아래의 실시예 9.

도 16A: 세로 좌표, 실시예 1의 함수 $Z1 [\lambda CXCL10 = 0.013 \text{ 및 } \lambda HA = 0.099 \text{인, } Z = (0.3686) \times CXCL10^t + (0.3064) \times HA^t]$; 가로 좌표, 실시예 3의 함수 $Z4 [\lambda CXCL10 = 0.116 \text{ 및 } \lambda HA = 0.288 \text{인, } Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.852) \times HA^t]$.

도 16B. 세로 좌표, 민감도; 가로 좌표, 특이도; Z1 및 Z4의 커브(두 커브는 합쳐진다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 제출한 청구항에 정의된 주제, 상기 기재되어 있는 주제 및 “실시예” 부분에서 예시되어 있는 주제와 관련되어 있다.
- [0028] 본 발명에서, 별도로 명시하거나 문맥에 의해 달리 지정되지 않는 한, 모든 용어는 본 발명이 속하는 해당 분야에서의 일반적인 의미를 갖는다.
- [0029] 본 발명은 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로 만성 간염으로 고통 받고 있는 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)를 결정하기 위한, 특히 높은 확률로 결정하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0030] 예를 들어, 바이러스 중 간염 바이러스는 하나 이상의 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스, 특히 C형 간염 바이러스 일 수 있다.
- [0031] 상기 C형 간염 바이러스는 임의의 유전자형 일 수 있다. 예를 들어, 상기 C형 간염 바이러스의 유전자형은 유전자형 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7, 특히 유전자형 1 또는 4 일 수 있다.
- [0032] 상기 환자는 포유 동물, 특히 인간이다.
- [0033] 본 발명의 방법은 모두 본질적으로 비-침습적인 방법으로 측정되거나 결정될 수 있는 상이한 마커의 정량화를 이용한다(환자의 신체에 대한 침습적인 개입의 정도는 생물학적 체액의 단순한 샘플링을 넘지 않는다). 본 발명의 방법은 생체 외에서 수행될 수 있다.
- [0034] 특히, 본 발명의 방법은 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 결정하기 위한, 특히 높은 확률로 결정하기 위한 방법이다.
- [0035] 상기 “간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하지 않았다”라는 것은 경 섬유증 보다 낮거나 동일한 단계를 의미한다.
- [0036] 상기 “간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하였다”라는 것은 경 섬유증 보다 높은 단계를 의미한다.
- [0037] 상이한 간 섬유증 단계는 다음과 같다(약한 정도에서 강한 정도의 순서로):
- [0038] - 섬유증 부재,
- [0039] - 격막이 없는 간문맥 섬유증,
- [0040] - 격막이 있는 간문맥 섬유증(즉, 적어도 하나 이상의 격막이 있는),
- [0041] - 간경화가 없는 격막 섬유증, 및
- [0042] - 간경화.
- [0043] 상기 경 섬유증 단계는 격막이 없는 간문맥 섬유증이다.
- [0044] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하지 않는 경우에, 이 환자의 간은 섬유증이 없거나(섬유증 부재), 또는 격막이 없는 간문맥 섬유증으로 고통 받고 있다.
- [0045] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하는 경우에, 이 환자의 간은 격막이 있는 간문맥 섬유증, 간경화가 없는 격막 섬유증, 또는 간경화로 고통 받고 있다.
- [0046] 간 섬유증 스코어의 각종 시스템이 존재한다. 가장 일반적인 것은 메타비르 스코어 시스템이다.

[0047] : 섬유증 단계와 메타비르 섬유증 스코어의 상응 관계.

섬유증 단계	메타비르 섬유증 스코어
섬유증 부재	F0
격막이 없는 간문맥 섬유증	F1
격막이 있는 간문맥 섬유증	F2
간경화가 없는 격막 섬유증	F3
간경화	F4

[0048] 상기 경 섬유증 단계는 메타비르 스코어 시스템에서 F1 스코어를 갖는 간 섬유증 정도이다.

[0049] 따라서, 상기 환자의 간이 경 섬유증 단계를 초과하지 않는다는 것을 나타내는 간 섬유증 스코어는 메타비르 스코어 시스템에서 기껏해야 F1 스코어이다, 즉, F0 또는 F1 스코어.

[0050] 따라서, 상기 환자의 간이 경 섬유증 단계를 초과하였다는 것을 나타내는 간 섬유증 스코어는 메타비르 스코어 시스템에서 적어도 F2 스코어이다, 즉, F2, F3 또는 F4 스코어.

[0051] 또 다른 간 섬유증 스코어 시스템은 Ishak's 시스템이다(Goodman 2007).

표 26

[0052] : 섬유증 단계와 Ishak's 섬유증 스코어의 상응 관계

섬유증 단계	메타비르 섬유증 스코어
섬유증 부재	F0
격막이 없는 간문맥 섬유증	F1/F2
격막이 있는 간문맥 섬유증	F3
간경화가 없는 격막 섬유증	F4
간경화	F5/F6

[0053] 상기 경 섬유증 단계는 Ishak's 스코어 시스템에서 F1/F2 스코어를 갖는 간 섬유증 정도이다.

[0054] 따라서, 상기 환자의 간이 경 섬유증 단계를 초과하지 않는다는 것을 나타내는 간 섬유증 스코어는 Ishak's 스코어 시스템에서 기껏해야 F2 스코어이다, 즉, F0, F1, 또는 F2 스코어.

[0055] 따라서, 상기 환자의 간이 경 섬유증 단계를 초과하였다는 것을 나타내는 간 섬유증 스코어는 Ishak's 스코어 시스템에서 적어도 F3 스코어이다, 즉, F3, F4, F5, 또는 F6 스코어.

[0056] 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로 만성 간염으로 고통 받고 있는 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부를 결정하는 것은 특히 의사에게 필수적이다.

[0057] 실제로, 대부분의 치료(항 간염, 항-C형간염 또는 항-간 섬유증 치료이든), 및 보다 구체적으로 인터페론의 투여를 포함하는 치료는, 매우 심한 부작용이 나타난다. 그러므로 이런 치료는 일반적으로 상기 환자의 간이 경 섬유증(적어도 F2의 메타비르 스코어)을 초과하는 경우에만 시행된다.

[0058] 따라서, 본 발명의 방법은 간 섬유증의 진단 또는 간 섬유증 단계 뿐만 아니라, 간 질병의 치료, 특히 환자에게 치료를 시행해야 하는 시기를 결정하기 위해서도 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 본 발명의 수단을 사용하여, 환자가 경 섬유증 단계를 초과하였다고 결정된 경우에만, 항 간염 및/또는 항-C형간염 및/또는 항-간 섬유증 치료를 시행하는 것을 포함하는, 본 발명의 수단을 사용하여 결정된 바와 같이, 환자의 간 조직 반응의 기능에 따라 항 간염 및/또는 항-C형간염 및/또는 항-간 섬유증 치료를 조절하는 것을 포함하는, 환자의 치료를 위한 방법도 될 수 있다. 특히, 상기 치료는 바이러스(특히 C형 간염의 경우)를 제거하거나 및/또는 바이러스(특히 B형 간염의 경우)의 복제를 차단시킴으로써 간 섬유증의 진행을 차단하거나 지연시키는 것을 목적으로 하는 치료가 될 수 있다.

[0059] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 환자의 간 섬유증 단계에 관계없이 적용 가능하다: 이 단계는 간 섬유증의 부재부터 간경화까지 될 수 있다.

[0060] 따라서, 상기 환자의 간 섬유증 스코어는 메타비르 스코어 시스템에서, F0, F1, F2, F3 또는 F4, 특히 F0, F1, F2 또는 F3, 특히 F0, F1 또는 F2, 특히 F1, F2 또는 F3, 특히 F1 또는 F2일 수 있다.

- [0061] 상기 환자는 특히, 간 섬유증 스캔(예를 들어, FIBROSCAN™에 의해)과 같은 비-침습적인 방법에 의해, 미리 간 경직도가 측정된 환자 일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 방법은 바이오마커(또는 변수)의 정량화, 특히 검출 및 정량화를 이용한다.
- [0063] 상기 방법을 수행하기 위해 선택된 생물학적 마커(또는 바이오마커)는 여러 상이한 순환 분자를 포함한다.
- [0064] 순환 분자
- [0065] “순환 분자” 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 일반적인 의미를 갖는 것으로 이해된다. 일반적으로, 순환 분자는 포유 동물, 특히 인간의 혈액 내에, 무세포 형태로 존재하는 분자이다: 그들은 순환 세포 또는 조직 세포에는 함유되지 않는다. 일반적으로, 혈액 내에서 순환하는 분자는 혈장 내에서 순환한다. 일반적으로, 혈액 내에서 순환하는 분자는 혈청 내에서 순환한다. 순환 분자는, 예를 들어, 단백질, 당단백질, 효소, 다당류, 지질, 글리세리드, 호르몬 일 수 있다. 순환 분자는, 예를 들어, 상기 환자의 유기 세포에 의해 생성된 분자 또는 대사물질 일 수 있다. 특히, 순환 분자는, 예를 들어, 상기 환자의 유기 세포에 의해 생성되지만, 바이러스 특히, 간염 바이러스에 의해서는 생성되지 않는 분자(또는 대사물질) 일 수 있다. 혈소판과 같은, 혈액의 형성 요소는 간염 바이러스와 같은 바이러스와 마찬가지로 순환하지만, 분자는 아니다. 따라서, 그들은 본 발명의 의미 내에서 순환 분자의 일부가 아니다. 상기 환자가 인간인 경우에, 이런 순환 분자는 인간의 순환 분자이다. 특히, 순환 분자의 예는 다음을 포함한다:
- [0066] - CXCL10 단백질 (완전한 형태 및 분열된 형태),
 - [0067] - 히알루론산 및 히알루로난 (HA),
 - [0068] - 감마-글루타밀 전달효소 (GGT),
 - [0069] - 아스파르트산 아미노기전달효소 (AST),
 - [0070] - 알라닌 아미노기전달효소 (ALT),
 - [0071] - apolipoprotein A1 (ApoA1),
 - [0072] - alpha-2-macroglobuline (A2M),
 - [0073] - inhibitor 1 of metalloproteinase (TIMP1),
 - [0074] - 비멘틴 (VIM),
 - [0075] - secreted phosphoprotein-1 (SPP1),
 - [0076] - interleukin-6 signal transducer (IL6ST),
 - [0077] - cyclin-dependent kinase 2A inhibitor (p14ARF),
 - [0078] - matrix metalloproteinase 9 (MMP9),
 - [0079] - angiopoietin 2 (ANGPT2),
 - [0080] - chemokine ligand 11 motif CXC (CXCL11),
 - [0081] - matrix metalloproteinase 2 (MMP2),
 - [0082] - matrix metalloproteinase 7 (MMP7),
 - [0083] - S100 calcium binding protein A4 (S100A4),
 - [0084] - inhibitor 1 of metalloproteinase (TIMP1),
 - [0085] - chitinase-3 type protein 1 (CHI3L1),
 - [0086] - collagen alpha-1(I) chain (COL1A1),
 - [0087] - chemokine 1 of the growth-controlling protein alpha motif CXC (CXCL1),
 - [0088] - chemokine ligand 6 motif CXC (CXCL6),

- [0089] - "Indian hedgehog" protein (IHH),
- [0090] - interferon-stimulated transcription factor 3G (IRF9),
- [0091] - matrix metalloproteinase 1 (MMP1).
- [0092] 하나 이상의 순환 분자를 정량화, 특히 검출하고 정량화 하기 위해서, 생물학적 샘플, 특히 생물학적 체액의 샘플이 환자로부터 채취되거나 채취되었어야 한다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 방법을 수행하기 위해 선택된 순환 분자는 적어도 두 개의 상이한 순환 분자를 포함한다(또는 구성된다).
- [0094] 특히, 선택된 순환 분자는 적어도 히알루론산(HA)과 CXCL10 단백질(CXCL10)을 포함한다(또는 구성된다).
- [0095] 본 발명자들은 CXCL10 마커와 히알루론산 마커의 조합은 상승 효과, 즉, 그들 각각의 개별적인 성능의 단순한 병렬을 뛰어 넘는 성능에 이른다는 것을 증명하였다(AUC 성능 및/또는 정확 분류 비율 및/또는 민감도 및/또는 음성예측도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도). 특히, 실험적인 증명은 아래의 실시예에 기재되어 있다:
- [0096] - 실시예 1(cf. 표 3),
- [0097] - 실시예 3(cf. 표 8 및 10), 및
- [0098] - 실시예 7(cf. 표 20 및 21).
- [0099] 종래 기술의 비-침습적인 검사와의 비교는 아래의 실시예 2 및 4에 기재되어 있다.
- [0100] 히알루론산(HA) 및 CXCL10 단백질(CXCL10)은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.
- [0101] 히알루론산은 세포 외 기질의 주요 성분 중 하나이다. 그것은 $C_{14}H_{23}NO_{12}$ ($C_{14}H_{21}NO_{11}$)_n 실험식의 글리코사미글리칸이다(CAS number는 9004-61-9). 분자량은 약 776.647 g/mol이다. 히알루론산은 hyalobiuronic acid의 중합체이며; 구조식은 다음과 같다:
-
- [0102] .
- [0103] CXCL10는 케모카인에 대한 리간드 10 (CXC 모티프)[C-X-C 모티프 케모카인 10]이며, 또한 C7의 명칭; IFI10; INP10; IP-10; SCYB10; crg-2; gIP-10 또는 mob-1으로도 알려져 있다.
- [0104] 그것의 인간 염기서열은 수탁 번호 NM_001565으로 데이터베이스에 개시되어 있다.
- [0105] CXCL10 단백질(인간)의 전구체 형태는 다음과 같은 서열의 98개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질이다:
- [0106] 서열번호1: MNQTAILICCLIFLTLSGIQGVPLSRTVRCTCISISNPVNPRSLKLEIIPASQFCPRV
- [0107] EIIATMKKKGEKRLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP
- [0108] 또는
- [0109] 서열번호2: MNQTAILICCLIFLTLSGIQGVPLSRTVRCTCISISNPVNPRSLKLEIIPASQFCPRV
- [0110] EIIATMKKKGEKRLNPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP
- [0111] 이 두 개의 서열은 C-말단 부분에 위치한 오직 하나의 아미노산(서열번호 1의 C-말단 부분에 있는 ERS 대 서열번호 2의 C-말단 부분에 있는 EMS)에서만 차이가 있다.
- [0112] CXCL10 단백질의 전구체 형태의 신호 펩타이드는 서열번호 1 또는 2의 서열의 1-21 단편과 동일한 21개의 아미노산으로 구성되어 있는 펩타이드이다, 즉:

- [0113] 서열번호3: MNQTAILICC LIFLTLSGIQG
- [0114] CXCL10 단백질의 순환 형태가 적어도 3개 존재한다, 즉:
- [0115] - 77개의 아미노산으로 구성된, 아고니스트(agonist)로 불리는 형태;
- [0116] - 75개의 아미노산으로 구성된, 안타고니스트(antagonist)로 불리는 형태; 및
- [0117] - 73개의 아미노산으로 구성된, 분비 후에 분열(케라틴세포에 의한 단백질 가수 분해성 분열)로 생성된 형태.
- [0118] CXCL10의 아고니스트 형태는 다음과 같은 서열의 77개의 아미노산의 단백질이다:
- [0119] 서열번호4: VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPES
- [0120] KAIKNLLKAVSKERSKRSP
- [0121] 또는
- [0122] 서열번호5: VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPES
- [0123] KAIKNLLKAVSKEMSKRSP
- [0124] 77개의 아미노산의 단백질의 구조는 NMR(PDB identity = 1LV9, published on September 18, 2002; cf. Booth et al. 2002), 및 X rays (PDB identity at 3 Å = 107Y; PDB identity at 2 Å = 1080; PDB identity at 1.92 Å = 107Z; Swaminathan et al. 2003)에 의해 결정된다.
- [0125] CXCL10의 안타고니스트 형태는 2개의 N-말단 아미노산에 의해 절단된 아고니스트 형태의 서열을 갖는 75개의 아미노산의 단백질이다. 따라서 CXCL10의 안타고니스트 형태는 다음과 같은 서열을 갖는다:
- [0126] 서열번호6: LSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPESKAI
- [0127] KNLLKAVSKERSKRSP
- [0128] 또는
- [0129] 서열번호7: LSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPESKAI
- [0130] KNLLKAVSKEMSKRSP
- [0131] 분비 후에 분열로 생성된, CXCL10 형태는 4개의 C-말단 아미노산에 의해 절단된 아고니스트 형태의 서열을 갖는 73개의 아미노산의 단백질이다. 따라서 분비 후에 분열로 생성된, CXCL10 형태는 다음과 같은 서열을 갖는다:
- [0132] 서열번호8: VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPES
- [0133] KAIKNLLKAVSKERS
- [0134] 또는
- [0135] 서열번호9: VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEI IATMKKKGEKRLNPES
- [0136] KAIKNLLKAVSKEMS
- [0137] 특히, CXCL10 단백질(인간)의 순환 형태는 서열번호 4에서 9의 단백질을 포함한다:
- [0138] -서열번호 4 및/또는 5,
- [0139] -서열번호 6 및/또는 7, 및
- [0140] -서열번호 8 및/또는 9.
- [0141] 본 발명에 있어서, 상기 CXCL10의 정량화, 특히 검출 및 정량화에는 적어도 하나, 특히 하나 이상, 특히 CXCL10 단백질의 모든 순환 형태의 정량화 또는 검출 및 정량화가 포함된다.
- [0142] 본 발명에 있어서, 상기 CXCL10의 정량화, 특히 검출 및 정량화에는 적어도 하나, 특히 하나 이상, 특히 서열번호 4에서 9까지의 단백질의 모든 순환 형태의 정량화 또는 검출 및 정량화가 포함된다.
- [0143] 상기 방법을 수행하기 위해 선택된 순환 분자는 CXCL10 단백질 및 히알루론산으로 구성될 수 있다. 이 경우에, CXCL10 및 히알루론산은 바이오마커로서 선택되거나 사용된 오직 두 개의 순환 분자이다.

- [0144] 대신에, 하나 이상의 다른(상이한) 순환 단백질이 히알루론산 및 CXCL10 외에도 선택될 수 있다.
- [0145] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 alpha-2 macroglobulin (A2M)을 포함하지 않는다. 실제로, 히알루론산 및 CXCL10 단백질과 대조적으로, A2M 단백질은 인간 환자의 혈액 내에 다량으로 존재한다. 그러므로, 히알루론산 및 CXCL10 단백질의 다중 검출에서 A2M의 농도를 측정하는 것은 불가능하거나, 적어도 일반적으로 매우 어렵다.
- [0146] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 “과립구-대식세포-콜로니 자극 인자” (GMCSF)를 포함하지 않는다.
- [0147] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 인터루킨12 (IL 12)를 포함하지 않는다.
- [0148] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 인터루킨 2 (IL 2)를 포함하지 않는다.
- [0149] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 matrix metalloproteinase 13 (MMP13)를 포함하지 않는다.
- [0150] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 알라닌 아미노기전달효소 (ALT)를 포함하지 않는다.
- [0151] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 감마-글루타밀 전달효소 (GGT)을 포함하지 않는다.
- [0152] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 “세포간 부착 분자” (ICAM1) 단백질을 포함하지 않는다.
- [0153] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 인터루킨 4 (IL 4)를 포함하지 않는다.
- [0154] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 모티프 CXC케모카인에 대한 리간드6 (CXCL9)를 포함하지 않는다.
- [0155] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 “혈관 세포 부착 분자 1” (VCAM 1)를 포함하지 않는다.
- [0156] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 “레티놀 결합 단백질 4” (RBP4)를 포함하지 않는다.
- [0157] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 inhibitor 1 of metalloproteinase (TIMP1)를 포함하지 않는다.
- [0158] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 비멘틴 (VIM)를 포함하지 않는다.
- [0159] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 secreted phosphoprotein 1 (SPP1)을 포함하지 않는다.
- [0160] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 아스파르트산 아미노기전달효소 (AST)를 포함하지 않는다.
- [0161] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 apolipoprotein A1 (ApoA1)을 포함하지 않는다.
- [0162] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 interleukin-6 signal transducer (IL6ST)를 포함하지 않는다.
- [0163] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 inhibitor of cyclin-dependent kinase 2A (p14ARF)를 포함하지 않는다.
- [0164] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 matrix metalloproteinase 9 (MMP9)을 포함하지 않는다.

- [0165] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 angiopoietin 2 (ANGPT2)을 포함하지 않는다.
- [0166] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 모티프 CXC케모카인에 대한 리간드 11 (CXCL11)를 포함하지 않는다.
- [0167] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 matrix metalloproteinase 2 (MMP2)을 포함하지 않는다.
- [0168] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 matrix metalloproteinase 7 (MMP7)을 포함하지 않는다.
- [0169] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 S100 calcium binding protein A4 (S100A4)을 포함하지 않는다.
- [0170] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 inhibitor 1 of metalloproteinase (TIMP1)을 포함하지 않는다.
- [0171] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 protein 1 of the chitinase-3 type (CHI3L1)을 포함하지 않는다.
- [0172] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 alpha-1(I) chain of collagen (COL1A1)을 포함하지 않는다.
- [0173] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 chemokine 1 of the growth-controlling protein alpha motif CXC (CXCL1)을 포함하지 않는다.
- [0174] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 모티프 CXC케모카인에 대한 리간드6 (CXCL6)를 포함하지 않는다.
- [0175] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 "Indian hedgehog" 단백질 (IHH)를 포함하지 않는다.
- [0176] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 interferon-stimulated transcription factor 3G (IRF9)를 포함하지 않는다.
- [0177] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 matrix metalloproteinase 1 (MMP1)을 포함하지 않는다.
- [0178] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 GMCSF, IL-12, IL-2 및 MMP13 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0179] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 A2M, GMCSF, IL-12, IL-2 및 MMP13 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0180] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 ALT, GGT, ICAM1, IL-4, CXCL9, VCAM1 및 RBP4 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0181] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 A2M, ALT, GGT, ICAM1, IL-4, CXCL9, VCAM1 및 RBP4 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0182] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 A2M, TIMP1, VIM 및 SPP1 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0183] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 단 A2M, AST, ApoA1, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 및 MMP1 단백질 중에서 어느 것도 포함하지 않는다.
- [0184] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 이러한 다른 선택된 순환 분자는 A2M, GMCSF, IL-12, IL-2, MMP13, ALT, GGT, ICAM1, IL4, CXCL9, VCAM1, RBP4, TIMP1, VIM, SPP1, AST, ApoA1, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 및 MMP1 단백질 중에서 어느

것도 포함하지 않는다.

- [0185] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, (상이한) 순환 분자의 전체 개수는 6, 5, 4, 3 또는 2개, 특히 5, 4, 3 또는 2개, 특히 4, 3 또는 2개, 특히 3 또는 2개, 특히 2개 중에서 선택된다.
- [0186] 선택적 추가 마커(들)[순환 분자가 아닌]
- [0187] 순환 분자(및 특히 히알루론산과 CXCL10) 외에도, 선택된 생물학적 마커는 순환 분자가 아닌, 특히, 인간의 순환 분자가 아닌, 0, 또는 하나 이상의 추가적인 마커(들)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0188] 본 명세서에서 “추가적인 마커(들) (또는 “선택된 추가적인 마커(들)”) 용어는 순환 분자 중에서 하나가 아닌, 특히, 인간의 순환 분자 중에서 하나가 아닌 선택된 생물학적 마커를 의미한다.
- [0189] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 상기 순환 분자(및 특히 히알루론산과 CXCL10) 외에도, 다음과 같은 군에서 선택된 하나 이상의 추가적인 마커를 포함할 수 있다:
- [0190] - 혈액의 형성 요소(예를 들어, 혈소판),
- [0191] - 상기 환자의 임상적인 또는 해부학적인 특성(또는 마커), 및
- [0192] - 상기 환자의 바이러스학적인 특성(또는 마커).
- [0193] 특히, 추가적인 마커는 다음과 같은 군에서 선택된다:
- [0194] - 상기 환자의 임상적인 또는 해부학적인 특성(또는 마커), 및
- [0195] - 상기 환자의 바이러스학적인 특성(또는 마커).
- [0196] 임상적인 또는 해부학적인 특성(또는 마커)은 바람직하게는 상기 환자의 생물학적 체액 샘플 내에서 검출 또는 정량화를 필요로 하지 않고 측정하는 특성이며, 보다 일반적으로 상기 환자로부터 생물학적 샘플의 채취 없이도 측정 할 수 있는 특성이다. 예를 들어, 나이, 체질량지수(BMI), 성별 및 간 경직도는 생물학적 체액 샘플의 채취 없이도, 그리고 보다 일반적으로 상기 환자로부터 생물학적 샘플의 채취 없이도 간 섬유증 스캔(간 경직도는 간 섬유증 스캔 특히, FIBROSCAN™에 의해서 측정될 수 있다), 그리고 보다 일반적으로 어떠한 침습적인 개입 없이도, 체외 측정으로 정량화 가능한 임상적인 또는 해부학적인 특성(또는 마커)이다.
- [0197] 상기 환자의 임상적인 또는 해부학적인 특성의 예는 특히, 상기 환자의 나이, 상기 환자의 체질량지수, 상기 환자의 성별, 상기 환자의 간 경직도 (FS), 보다 구체적으로 상기 환자의 나이, 상기 환자의 체질량지수 및 상기 환자의 간 경직도 (FS)를 포함한다.
- [0198] 특히, “상기 환자의 나이” 마커는 다음을 포함한다:
- [0199] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이;
- [0200] - 간염 바이러스 감염의 진단이 행해진 날짜의 상기 환자의 나이;
- [0201] - 처음으로 항 간염 치료를 받은 날짜의 상기 환자의 나이;
- [0202] 보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이.
- [0203] 특히, “상기 환자의 체질량지수” 마커는 다음을 포함한다:
- [0204] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수;
- [0205] - 간염 바이러스 감염의 진단이 행해진 날짜의 상기 환자의 체질량지수;
- [0206] - 처음으로 항 간염 치료를 받은 날짜의 상기 환자의 체질량지수;
- [0207] 보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수.
- [0208] 따라서, 보다 구체적으로, 상기 환자의 임상적인 또는 해부학적인 특성은 다음을 포함한다:
- [0209] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이;

- [0210] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수;
- [0211] - 상기 환자의 성별 (남성 또는 여성), 및
- [0212] - 상기 환자의 간 경직도 (FS);
- [0213] 보다 구체적으로:
- [0214] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이;
- [0215] - 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수;
- [0216] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).
- [0217] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 추가적인 마커로서 선택된 (상이한) 임상적인 또는 해부학적인 마커의 전체 개수는 0, 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 예를 들어, 0개, 예를 들어, 1개, 예를 들어, 2개, 예를 들어 1, 2 또는 3개, 예를 들어, 1 또는 2개이다.
- [0218] 예를 들어, 다음과 같은 군에서 선택된, 임상적인 또는 해부학적인 마커, 1, 2 또는 3개의 (상이한) 마커, 보다 구체적으로 1 또는 2개의 (상이한) 마커, 예를 들어, 1개의 마커, 예를 들어 2개의 상이한 마커이다:
- [0219] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0220] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수); 및
- [0221] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).
- [0222] 반면에, 상기 환자의 바이러스학적 특성(또는 마커)는 상기 환자의 생물학적 체액 샘플 내의 검출 또는 정량화가 요구되는 특성이다. 바람직하게는, 생물학적 체액 샘플은 상기 순환 분자(CXCL10 및 히알루론산)를 검출하거나 정량화하는데 이용되는 것과, 동일하거나, 적어도 동일한 성질이다.
- [0223] 특히, 상기 환자의 바이러스학적 특성의 예는 다음을 포함한다:
- [0224] - 상기 환자의 혈액 내에 함유되어 있는 바이러스(들)의 성질;
- [0225] -상기 환자의 바이러스 수치(VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스의 바이러스 수치;
- [0226] -상기 환자가 감염된 간염 바이러스(들)의 유전자형.
- [0227] “상기 환자의 혈액 내에 함유되어 있는 바이러스(들)의 성질” 마커는 특히, 상기 환자의 혈액 내에 함유되어 있는 간염 바이러스(들)의 성질을 포함한다: 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스.
- [0228] “상기 환자의 바이러스 수치” 마커(VL)는 특히, 상기 환자의 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들면 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치를 포함한다.
- [0229] “상기 환자가 감염된 간염 바이러스(들)의 유전자형” 마커는 특히, 상기 환자가 감염된 간염 바이러스(들)의 유전자형, 예를 들어 유전자형 1 및/또는 2 및/또는 3 및/또는 4 및/또는 5 및/또는 6 및/또는 7을 포함한다.
- [0230] 상기 환자의 바이러스학적 특성의 예는, 보다 구체적으로, 간염 바이러스에서의 상기 환자의 바이러스 수치, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 상기 환자의 바이러스 수치를 포함한다.
- [0231] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 추가적인 마커로서 선택된 (상이한) 바이러스학적 마커의 전체 개수는 0, 1, 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 보다 구체적으로 1 또는 2개, 보다 구체적으로 1개, 보다 구체적으로 0개이다.

- [0232] 예를 들어, 바이러스학적 마커가 선택되지 않거나, 하나의 바이러스학적 마커만 선택되고, 상기 환자의 바이러스 수치이다 (보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치).
- [0233] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 순환 분자(및 특히 히알루론산과 CXCL10) 외에도 선택된 상이한 추가적인 마커의 전체 개수는 0, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상이다.
- [0234] 보다 구체적으로, 위에 기재된 바와 같은 상이한 추가적인 마커의 전체 개수는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 0, 1, 2, 3 또는 4개, 보다 구체적으로 0, 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 보다 구체적으로 0개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 또는 4개, 보다 구체적으로 1, 2, 또는 3개, 보다 구체적으로 1 또는 2개, 보다 구체적으로 1개, 보다 구체적으로 2개, 보다 구체적으로 3개, 보다 구체적으로 4개, 보다 구체적으로 5개이다.
- [0235] 따라서, 상기 순환 분자(및 특히 히알루론산과 CXCL10)외에도, 상기 추가적인 마커는 예를 들어, 다음을 포함할 수 있다(또는 구성될 수 있다):
- [0236] - 위에 기재된 바와 같은 0, 1, 2 또는 3개의 (상이한) 임상적인 또는 해부학적인 마커; 및
- [0237] - 위에 기재된 바와 같은 0 또는 1개의 바이러스학적 마커.
- [0238] 따라서, 상기 순환 분자(및 특히 히알루론산과 CXCL10)외에도, 상기 추가적인 마커는 예를 들어, 다음을 포함할 수 있다(또는 구성될 수 있다):
- [0239] - 0개의 임상적인 또는 해부학적인 마커, 또는 나이, 체질량지수, 간 경직도로 이루어진 군에서 선택된 1, 2, 또는 3개의 (상이한) 마커; 및
- [0240] - 위에 기재된 바와 같은 0개의 바이러스학적인 마커, 또는 바이러스학적 마커 바이러스 수치.
- [0241] 선택된 생물학적 마커:
- [0242] 따라서, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함 할 수 있다(또는 구성될 수 있다):
- [0243] - 위에 기재된 바와 같은 6, 5, 4, 3 또는 2개의 상이한 순환 분자, 보다 구체적으로 위에 기재된 바와 같은 5, 4, 3 또는 2개의 순환 분자, 보다 구체적으로 위에 기재된 바와 같은 4, 3 또는 2개의 순환 분자, 보다 구체적으로 위에 기재된 바와 같은 3 또는 2개의 순환 분자, 보다 구체적으로 위에 기재된 바와 같은 2개의 순환 분자, 적어도 히알루론산 및 CXCL10을 포함하는 상기 상이한 순환 분자: 및
- [0244] - 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 0, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 상이한 추가적인 마커:
- [0245] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0246] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취 된 날짜의 상기 환자의 체질량지수);
- [0247] - 상기 환자의 간 경직도 (FS); 및
- [0248] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.
- [0249] 위와 같이 선택된 상이한 추가적인 마커의 전체 개수는 보다 구체적으로 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 0, 1, 2, 3 또는 4개, 보다 구체적으로 0, 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 보다 구체적으로 0개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 또는 4개, 보다 구체적으로 1, 2, 또는 3개, 보다 구체적으로 1 또는 2개, 보다 구체적으로 1개, 보다 구체적으로 2개, 보다 구체적으로 3개, 보다 구체적으로 4개, 보다 구체적으로 5개이다.
- [0250] 따라서, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(또는 구성될 수 있다):

- [0251] - 위에 기재된 바와 같은 두 개의 상이한 순환 분자, 히알루론산 및 CXCL10로 구성되어있는 상기 두 개의 순환 분자; 및
- [0252] - 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 0, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 상이한 추가적인 마커:
- [0253] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0254] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수);
- [0255] - 상기 환자의 간 경직도 (FS); 및
- [0256] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.
- [0257] 위와 같이 선택된 상이한 추가적인 마커의 전체 개수는 보다 구체적으로 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 0, 1, 2, 3 또는 4개, 보다 구체적으로 0, 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 보다 구체적으로 0개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 4 또는 5개, 보다 구체적으로 1, 2, 3, 또는 4개, 보다 구체적으로 1, 2, 또는 3개, 보다 구체적으로 1 또는 2개, 보다 구체적으로 1개, 보다 구체적으로 2개, 보다 구체적으로 3개, 보다 구체적으로 4개, 보다 구체적으로 5개이다.
- [0258] 따라서, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(또는 구성될 수 있다):
- [0259] - 위에 기재된 바와 같은 두 개의 상이한 순환 분자, 히알루론산 및 CXCL10로 구성되어있는 상기 두 개의 순환 분자; 및
- [0260] - 다음과 같이 이루어진 군에서 선택된 0, 1, 2 또는 3 또는 4개의 상이한 추가적인 마커:
- [0261] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0262] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수);
- [0263] - 상기 환자의 간 경직도 (FS); 및
- [0264] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.
- [0265] 위와 같이 선택된 상이한 추가적인 마커의 전체 개수는 보다 구체적으로 0, 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 2 또는 3개, 보다 구체적으로 0, 1 또는 2개, 보다 구체적으로 0 또는 1개, 보다 구체적으로 0개, 보다 구체적으로 1, 2 또는 3개, 보다 구체적으로 1 또는 2개, 보다 구체적으로 1개, 보다 구체적으로 2개, 보다 구체적으로 3개, 보다 구체적으로 4개이다.
- [0266] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 히알루론산 및 CXCL10을 포함할 수 있다(구성될 수 있다).
- [0267] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 히알루론산, CXCL10 및 상기 환자의 나이(보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이)를 포함할 수 있다(구성될 수 있다).
- [0268] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 히알루론산, CXCL10 및 상기 환자의 체질량지수(보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수)를 포함할 수 있다(구성될 수 있다).
- [0269] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 히알루론산, CXCL10 및 상기 환자의 간 경직도 (FS)를 포함할 수 있다(구성될 수 있다).
- [0270] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 히알루론산, CXCL10 및 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로

간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치를 포함할 수 있다(구성될 수 있다).

[0271] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

[0272] - 히알루론산;

[0273] - CXCL10;

[0274] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이); 및

[0275] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수).

[0276] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

[0277] - 히알루론산;

[0278] - CXCL10;

[0279] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이); 및

[0280] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.

[0281] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

[0282] - 히알루론산;

[0283] - CXCL10;

[0284] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이); 및

[0285] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).

[0286] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

[0287] - 히알루론산;

[0288] - CXCL10;

[0289] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수); 및

[0290] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.

[0291] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

[0292] - 히알루론산;

[0293] - CXCL10;

[0294] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수); 및

[0295] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).

[0296] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):

- [0297] - 히알루론산;
- [0298] - CXCL10;
- [0299] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치; 및
- [0300] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).
- [0301] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):
- [0302] - 히알루론산;
- [0303] - CXCL10;
- [0304] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0305] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수); 및
- [0306] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치.
- [0307] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):
- [0308] - 히알루론산;
- [0309] - CXCL10;
- [0310] - 상기 환자의 나이 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이);
- [0311] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수); 및
- [0312] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).
- [0313] 예를 들어, 선택된 생물학적 마커는 다음을 포함할 수 있다(구성될 수 있다):
- [0314] - 히알루론산;
- [0315] - CXCL10;
- [0316] - 상기 환자의 체질량지수 (보다 구체적으로 순환 분자의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수);
- [0317] - 상기 환자의 바이러스 수치 (VL), 보다 구체적으로 간염 바이러스에서의 바이러스 수치, 예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 바이러스 수치; 및
- [0318] - 상기 환자의 간 경직도 (FS).
- [0319] 본 명세서에서 기재되어 있는 LOGIT, mROC 및 CART 함수(LOGIT₁에서 LOGIT₄까지, Z₁에서 Z₁₃까지, CART₁에서 CART₄까지; cf.아래)에서는, 바이오마커는 보다 구체적으로 다음과 같다:
- [0320] - CXCL10 바이오마커는 상기 환자에서의 CXCL10의 순환 형태, 보다 구체적으로 예를 들어, mg/mL, µg/mL, ng/mL 또는 pg/mL으로, 보다 구체적으로 pg/mL으로 표시된 CXCL10의 혈청 농도의 정량화 값이다;
- [0321] - 히알루론산 바이오마커는 상기 환자에서의 히알루론산, 보다 구체적으로 예를 들어, mg/mL, µg/mL, ng/mL 또는 pg/mL으로, 보다 구체적으로 pg/mL으로 표시된 히알루론산의 혈청 농도의 정량화 값이다;
- [0322] - 체질량지수 바이오마커는 상기 환자의 체질량지수, 보다 구체적으로 kg 단위에서의 상기 환자의 질량을 (m 단

위에서의 상기 환자의 신장)²으로 나눈 값, 보다 구체적으로 순환 분자 CXCL10 및 히알루론산의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 체질량지수이다;

[0323] - 나이 바이오마커는 예를 들어, 년 수(정수 또는 소수와 함께)로 표시된 상기 환자의 나이, 보다 구체적으로 순환 분자 CXCL10 및 히알루론산의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 상기 환자의 나이이다;

[0324] - 바이러스 수치 바이오마커는 예를 들어, copies/mL, 또는 IU/mL, 또는 10^3 copies/mL와 같이 이들 단위의 배수로 표시되는, 간염 바이러스에서의, 예를 들어 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 B형 간염 바이러스에서의, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스에서의 상기 환자의 바이러스 수치, 보다 구체적으로 순환 분자 CXCL10 및 히알루론산의 검출 또는 정량화를 위해 요구되는 생물학적 체액 샘플이 채취된 날짜의 바이러스 수치이다;

[0325] - 간 경직도 바이오마커는 예를 들어, kPA로 표시된 상기 환자의 간 경직도이다(측정은 간 섬유증 스캔, 특히 FIBROSCANTM에 의해 비-침습적으로 수행될 수 있다).

[0326] 바이오마커의 검출 및 정량화:

[0327] 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로 만성 간염으로 고통 받고 있는 환자의 간이, 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하지 않았는지 여부, 또는 이와는 반대로 이 단계를 초과하는 단계를 갖는지 여부를 결정하기 위한 본 발명의 방법은 이 환자에 대하여 선택된 생물학적 마커를 정량화, 보다 구체적으로 검출 및 정량화하는 단계를 포함한다(cf. 위).

[0328] 선택된 순환 분자(적어도 히알루론산 및 CXCL10을 포함하는)를 상기 환자의 생물학적 체액 샘플 내에서 정량화, 보다 구체적으로 검출 및 정량화한다.

[0329] 따라서 본 발명의 방법은 상기 환자로부터 생물학적 체액 샘플을 채취하는 단계를 포함할 수 있다. 그러나, 상기 방법이 생체 외 방법인 경우, 샘플을 채취하는 단계는 상기 방법에 앞서 수행되는 단계이다.

[0330] 상기 환자의 생물학적 체액 샘플은, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변 샘플, 보다 구체적으로 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플, 보다 구체적으로 혈청 또는 혈장, 보다 구체적으로 혈청 샘플이다. 생물학적 체액 샘플은 수집 후에 변형될 수 있다. 예를 들어, 혈청 단백질 및/또는 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드의 정제 및/또는 농축 및/또는 추출에 의한, 또는 단백질 절편의 정제 및/또는 추출 및/또는 농축에 의한, 예를 들어 정제 및/또는 농축 및/또는 추출과 같은 처리를 수행할 수 있다. 정제 및/또는 농축은 예를 들어, 여과 및/또는 밀도 구배법에 의해서 수행될 수 있다.

[0331] 순환 분자, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10의 정량화 값은 농도 또는 비율, 보다 구체적으로 농도의 값이다. 그들은 mg/mL, μ g/mL, ng/mL 또는 pg/mL로 표시될 수 있다. 예를 들어, 히알루론산의 정량화 값은 ng/mL로 표시된 농도 값이다. 예를 들어, CXCL10의 정량화 값은 pg/mL로 표시된 농도 값이다.

[0332] 농도 또는 비율 값은, 보다 구체적으로 농도의 값은, 상기 생물학적 체액 샘플 내에서 또는 이 샘플의 여과액의 추출물 내에서 측정된 값일 수 있다. 예를 들어, 수집된 생물학적 체액 샘플이 상기 농도 또는 비율의 측정 전에 여과에 의한 정제 처리된다면, 정량화 값은 상기 생물학적 샘플의 정제된 여과액 내에서 측정된 값일 수 있다. 예를 들어, 수집된 생물학적 체액 샘플이 혈액이고 이 혈액으로부터 혈청이 준비되었다면, 정량화 값은 혈청 내에서 측정된 값일 수 있다.

[0333] 따라서, 상기 순환 분자, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10의 각각의 정량화 값은 혈액, 혈장 또는 혈청, 보다 구체적으로 혈청 내의 농도(또는 비율) 값일 수 있다.

[0334] 바람직하게는, 모든 선택된 순환 분자의 정량화 값, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10은 동일한 샘플 내에서, 또는 적어도 동일한 성질의 샘플 내에서 측정된다. 예를 들어, 선택된 순환 분자 각각의 정량화 값은, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10은 수집 후에 어떠한 처리도 하지 않은 혈청 샘플 내에서 모두 측정되거나 또는 수집 후에 동일하게 처리(예를 들어, 동일한 정제 처리)된 혈청 샘플 내에서 모두 측정된다.

[0335] 바람직하게는, 모든 선택된 순환 분자, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10의 정량화 값은 희석되지 않은 혈청 샘플 내에서 측정될 수 있다.

[0336] 바람직하게는, 모든 선택된 순환 분자, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10의 정량화 값은 하나의 동일한 생

물학적 샘플 내에서, 보다 구체적으로 하나의 동일한 혈청 샘플내에서, 보다 구체적으로 하나의 동일한 희석되지 않은 혈청 샘플 내에서 측정 될 수 있다.

- [0337] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 정량화 단계는 특히, 히알루론산 및 CXCL10과 같은, 생물학적 마커로서 선택된 순환 분자 각각의 생체 외 검출을 포함한다.
- [0338] 바람직한 실시예에 따르면, 바이오마커로서 선택된 순환 분자 보다 구체적으로, 히알루론산 및 CXCL10(정량화 목적을 위한) 각각의 검출은 다중 검출 내에서 수행된다(하나의 동일한 생물학적 샘플 내에서의 동시 검출); cf. 아래의 실시예 10. A2M과 같은, 종래 기술의 특정 마커는 매우 높은 혈청 농도를 갖는다: 따라서 그들의 정량화는 히알루론산 및 CXCL10과 같은, 혈청 농도가 매우 낮은 마커를 통한 다중 검출 내에서 수행 될 수 없다. 반면에 본 발명에 기재되어 있는 바이오마커의 조합은 다중 성능이 가능하다.
- [0339] 히알루론산 및 CXCL10과 같은, 바이오마커로서 선택된 순환 분자 각각의 정량화, 보다 구체적으로 검출 및 정량화를 위하여, 순환 분자의 리간드 특이성을 사용할 수 있다. 리간드는 검출 마커 직접적으로 결합할 수 있다(예를 들어 화학 발광 마커 또는 형광 물질). 이 리간드는 포획 리간드 및/또는 검출 리간드로서 사용될 수 있다.
- [0340] 예를 들어, 이 리간드는 유기 분자 또는 복합체, 또는 무기 분자 또는 복합체 일 수 있다. 예를 들어, 이 리간드는 단백질(보다 구체적으로 항체, 보다 구체적으로 단일클론항체 또는 다중클론항체), 다당류, 지질, 또는 단백질 및/또는 다당류 및/또는 지질의 복합체 일 수 있다.
- [0341] 생물학적 체액 내에서 히알루론산의 정량화, 보다 구체적으로 검출 및 정량화를 위하여, 항-히알루론산 항체(단일클론성의 또는 다중클론성의)과 같은, 또는 재조합 인간 단백질 아그레칸(aggrecan)[R&D SYSTEMS, Inc. 회사(614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 시판 중인 단백질 G1-IGD-G2, 카탈로그 참조 1220-PG-025]과 같은, 히알루론산에 대하여 특이적으로 결합하는 단백질은 리간드로서 사용될 수 있다.
- [0342] 생물학적 체액 내에서 CXCL10 즉, CXCL10의 순환 형태의 정량화, 보다 구체적으로 검출 및 정량화를 위하여, 항체 또는 항체들(단일클론성의 또는 다중클론성의)은 리간드로서 사용될 수 있다. 항체(또는 항체들)은 하나, 그 이상 또는 모든 CXCL10의 순환 형태에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 하나, 그 이상 또는 서열번호 4에서 9까지의 모든 단백질, 보다 구체적으로 서열번호 4에서 9까지의 모든 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체(단일클론성의 또는 다중클론성의)가 이용될 수 있다[예를 들어, R&D SYSTEMS, Inc. 회사(614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 시판 중인 단일클론성 마우스 항-인간 CXCL10 항체, 카탈로그 참조 MAB266 (clone 33036, class IgG1)].
- [0343] 생물학적 마커가 추가로 순환 분자가 아닌 보다 구체적으로 인간 순환 분자가 아닌(cf. 위에) 하나 이상의 추가적인 마커를 포함한다면, 이 또는 이들 추가적인 마커 또한 정량화된다.
- [0344] 추가적인 마커 또는 복수의 마커 각각의 정량화 값은 예를 들어, 환자에 대하여 미리 측정된 추가적인 마커 또는 복수의 마커들 각각의 정량화 값을 수집하여, 상기 환자에 대하여 측정하거나 수집하여 결정될 수 있다.
- [0345] 예를 들어, 추가적인 마커 또는 복수의 마커가 나이 마커이거나 이를 포함하면, 이 마커의 정량화 값은 상기 환자의 나이 값을 수집하여 결정될 수 있다(또는 미리 결정될 수 있다)[예를 들어, 년 수로 표시된 값(정수 또는 소수와 함께)].
- [0346] 예를 들어, 추가적인 마커 또는 복수의 마커가 성별 마커이거나 이를 포함하면, 이 마커의 정량화 값은 상기 환자의 성별의 성질에 대한 정량화 값을 지정하여 결정될 수 있다(또는 미리 결정될 수 있다)[예를 들어, 여성 성별에 대하여 0, 남성 성별에 대하여 1].
- [0347] 예를 들어, 추가적인 마커 또는 복수의 마커가 체질량지수 마커이거나 이를 포함하면, 이 마커의 정량화 값은 신장의 제곱 값에 대한 질량의 비율을 계산하기 위하여, 상기 환자의 질량과 신장을 측정하여(예를 들어, m 단위의 신장과 kg 단위의 질량을 측정하여) 상기 환자에 대하여 결정될 수 있다(또는 미리 결정 될 수 있다)[BMI = 질량을 (신장)²으로 나눈 값, 보다 구체적으로 kg 단위의 질량을 (m 단위의 신장)²으로 나눈 값].
- [0348] 예를 들어, 추가적인 마커 또는 복수의 마커가 바이러스 수치 마커이거나 이를 포함하면, 이 마커의 정량화 값은 상기 환자(인간)로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에서 간염 바이러스(보다 구체적으로 C형 간염 바이러스 및/또는 C형 간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스, 보다 구체적으로 C형 간염 바이러스)의 수치 또는 농도 값을 생체 외에서 측정하고 이 바이러스 수치 또는 농도 값을 결정하여 결정될 수 있다(또는 미리 결정될 수 있다). 간염 바이러스 수치 값은 예를 들어, copies/mL, 또는 IU/mL, 또는 10³ copies/mL와같이 이들 단

위의 배수로 표시될 수 있다.

- [0349] 바람직하게는 추가적인 마커 또는 복수의 마커 각각의 값은 상기 (인간) 순환 분자 각각에 대하여 생체 외에서 농도를 측정하기 위하여 상기 생물학적 체액이 수집된 날짜의, 보다 구체적으로 히알루론산 및 CXCL10 단백질의 농도를 생체 외에서 측정하기 위하여 상기 생물학적 체액 샘플이 수집된 날짜의 상기 마커의 값이다.
- [0350] 생물학적 마커의 정량화 값으로부터 간 섬유증 단계의 결정
- [0351] 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 선택된 생물학적 마커의 정량화 값(특히 히알루론산 및 CXCL10의 정량화 값)을 간 섬유증 단계에 따라서 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값, 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교한다.
- [0352] 상기 참조 코호트는 다음을 포함하거나 다음과 같다:
- [0353] - 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트(즉, 상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트); 및
- [0354] - 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트 (즉, 상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F1 스코어인 간 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트).
- [0355] 다시 말해서, 선택된 바이오마커의 정량화 값(특히 히알루론산 및 CXCL10의 정량화 값)을 첫 번째 코호트 또는 두 번째 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여 미리 결정된 참조 값(컷오프 또는 임계 값)과 비교한다.
- [0356] 첫 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 간계를 초과하지 않았음을 결정하거나 나타낸다.
- [0357] 두 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 간계를 초과하였음을 결정하거나 나타낸다.
- [0358] 본 발명의 한 측면에 있어서, 상기 참조 코호트의 환자는 상기 환자와 동일한 종의 환자이고[예를 들어, 상기 환자의 인간은 인간이다], 상이한 유전자형에 속하는 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되었다.
- [0359] 예를 들어, 상기 참조 코호트의 환자는 C형 간염 바이러스에 감염된 인간이고, 환자들의 C형 간염 바이러스 균주는 적어도 두 개의 상이한 유전자형, 보다 구체적으로 적어도 3개, 보다 구체적으로 적어도 4개, 보다 구체적으로 적어도 5개, 보다 구체적으로 적어도 6개, 보다 구체적으로 적어도 7개의 상이한 유전자형에 속한다.
- [0360] 예를 들어, 상기 참조 코호트의 환자는 C형 간염 바이러스에 감염된 인간이고, 환자들의 C형 간염 바이러스 균주는 유전자형 1, 2, 3 및 4를 포함하는 적어도 4개의 상이한 유전자형에 속한다.
- [0361] 예를 들어, 상기 참조 코호트의 환자는 C형 간염 바이러스에 감염된 인간이고, 환자들의 C형 간염 바이러스 균주는 유전자형 1, 2, 3, 4 및 5를 포함하는 적어도 5개의 상이한 유전자형에 속한다.
- [0362] 예를 들어, 상기 참조 코호트의 환자는 C형 간염 바이러스에 감염된 인간이고, 환자들의 C형 간염 바이러스 균주는 유전자형 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 포함하는 적어도 6개의 상이한 유전자형에 속한다.
- [0363] 상기 참조 코호트의 환자는 적어도 간 섬유증 단계가 격막이 없는 섬유증(메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F1 스코어)인 환자를 포함한다.
- [0364] 따라서 상기 첫 번째 코호트의 환자는 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증[메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F1 스코어]인 환자로 구성된다.
- [0365] 따라서 상기 첫 번째 코호트의 환자는 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증인 환자 및 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염(구체적으로는 만성 간염)으로 고통 받는, 그러나 간 섬유증이 없는[메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F0 또는 F1 스코어] 환자로 구성된다.
- [0366] 상기 두 번째 참조 코호트의 환자는 적어도 간 섬유증 단계가 격막이 있는 간문맥 섬유증(메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F2 스코어)인 환자를 포함한다.
- [0367] 상기 두 번째 참조 코호트의 환자는 간 섬유증 단계가 격막이 있는 간문맥 섬유증인 환자로 구성된다[메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F2 스코어].

- [0368] 상기 두 번째 참조 코호트의 환자는 간 섬유증 단계가 격막이 있는 간문맥 섬유증인 환자 및 간 섬유증 단계가 간경화가 없는 격막 섬유증인 환자로 구성된다[메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F2 또는 F3 스코어].
- [0369] 상기 두 번째 참조 코호트의 환자는 간 섬유증 단계가 격막이 있는 간문맥 섬유증인 환자 및 간 섬유증 단계가 간경화가 없는 격막 섬유증인 환자, 및 간 섬유증 단계가 간경화인 환자로 구성된다[메타비르 섬유증 스코어 시스템에서 F2, F3 또는 F4 스코어].
- [0370] 상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트를 구성하는 환자의 전체 수는 적어도 100, 보다 구체적으로 적어도 200, 바람직하게는 적어도 300명 일 수 있다.
- [0371] 상기 두 코호트 각각은 다수의 환자로 구성되며 환자 전체 집단 중에서 30에서 70%를 나타낸다(상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트의 환자의 전체는 100%이다). 예를 들어, 상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트를 구성하는 환자의 수는 총 100명이며, 상기 첫 번째 코호트는 30명의 환자로 구성되고, 상기 두 번째 코호트는 70명의 환자로 구성된다.
- [0372] 보다 구체적으로, 상기 두 코호트 각각은 다수의 환자로 구성되며 환자 전체 집단 중에서 40%에서 60%를, 보다 구체적으로 40%에서 55%를, 보다 구체적으로 45%에서 55%를, 보다 구체적으로 45%에서 50%를 나타낸다(상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트의 환자의 전체는 100%이다). 예를 들어, 상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트를 구성하는 환자의 수는 총 300명 이상이며, 상기 첫 번째 코호트는 300명 이상의 전체 집단 중에서 40%에서 60%를 나타내는 환자의 수로 구성된다(따라서 상기 두 번째 코호트는 총 100%를 만들기 위해 상보적인 백분율을 나타내는 환자의 수로 구성된다).
- [0373] 따라서 본 발명의 방법은 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로만성 간염으로 고통 받는 (인간) 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부, 또는 이와는 반대로 이 단계를 초과하는 단계를 갖는지 여부를 결정하기 위한(보다 구체적으로 높은 확률로 결정하기 위한) (생체 외)방법이며, 상기 경 섬유증 단계는 격막이 없는 간문맥 섬유증(메타비르 섬유증 스코어 시스템에서, 격막이 없는 간문맥 섬유증은 F1 스코어이다)이고, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0374] i) 상기 (인간) 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에서, 상기 순환 분자 각각의 농도 값을 얻기 위하여 상기 샘플 내의 몇몇의 (인간의) 순환 분자의 양을 측정하는 단계이며, 상기 (인간) 순환 분자는 히알루론산(HA) 및 CXCL10 단백질을 포함하거나 구성된다(cf. 위의 “순환 분자”, “선택된 생물학적 마커”, 및 “바이오마커의 검출 및 정량화”);
- [0375] ii) 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 상기 순환 분자 각각에 대하여 획득한 농도 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 농도 값 또는 상기 농도 값의 분포와 비교하는 단계이며, 상기 참조 코호트는 다음과 같거나 포함한다:
- [0376] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트; 및
- [0377] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트;
- [0378] 상기 첫 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하지 않는 것을 나타내고;
- [0379] 상기 두 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하는 것을 나타낸다.
- [0380] 보다 구체적으로, 본 발명의 방법은 하나 이상의 간염 바이러스에 감염되거나 및/또는 간염, 구체적으로 만성 간염으로 고통 받는 (인간) 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하였는지 여부, 또는 이와는 반대로 이 단계를 초과하는 단계를 갖는지 여부를 결정하기 위한(보다 구체적으로 높은 확률로 결정하기 위한) (생체 외)방법이며, 상기 경 섬유증 단계는 격막이 없는 간문맥 섬유증(메타비르 섬유증 스코어 시스템에서, 격막이 없는 간문맥 섬유증은 F1 스코어이다)이고, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0381] i) 상이한 생물학적 마커(또는 변수)를 선택하는 단계이며,
- [0382] 상기 선택된 상이한 생물학적 마커(또는 변수)는 다음을 포함하거나 구성된다:
- [0383] a) 상이한 (인간의) 순환 분자, 상기 상이한 (인간의) 순환 분자는 히알루론산 및 CXCL10 을 포함하거나 구성된다(cf. 위의 “순환 분자”, “선택된 생물학적 마커”, 및 “바이오마커의 검출 및 정량화”); 및

- [0384] b) 나이, 체질량지수(BMI), 바이러스 수치(VL) 및 간 경직도(FS)를 포함하는 마커 목록에서 선택된 0, 1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커(cf. 위의 “선택적인 추가 마커”, “선택된 생물학적 마커”, 및 “바이오마커의 검출 및 정량화”);
- [0385] ii) 상기 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에 포함되어 있는 상기 i)a) 단계의 상기 (인간의) 순환 분자 각각의 농도를 생체 외에서 측정하고, 보다 구체적으로 상기 순환 분자 각각의 농도 값을 결정하기 위하여 상기 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에 포함되어 있는 상기 i)a) 단계의 상기 (인간의) 순환 분자 각각의 농도를 생체 외에서 측정하고[상기 샘플 내에서 및/또는 상기 환자 내에서]; 및
- [0386] 1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커가 상기 i) b)단계의 목록으로부터 선택되고, 상기 추가적인 마커(복수의 마커)가 나이, 체질량지수 및 간 경직도로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 마커이거나 이를 포함하는 경우에: 상기 환자에 대하여 미리 확인된 추가적인 마커 또는 복수의 마커들 각각에 대하여 정량화 값을 수집하거나,
- [0387] 1, 2, 3 또는 4개의 추가적인 마커가 상기 i) b)단계의 목록으로부터 선택되고, 상기 추가적인 마커(복수의 마커)가 바이러스 수치이거나 이를 포함하는 경우에: 상기 환자로부터 미리 획득한 생물학적 체액 샘플 내에 포함되어 있는 시험관내 바이러스 수치를 측정하거나, 상기 환자에 대하여 미리 확인된 바이러스 수치 값을 수집하여,
- [0388] 상기 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커(또는 변수)를 정량화하는 단계;
- [0389] iii) 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 상기 ii)단계에서 획득한 정량화 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 단계이며, 상기 참조 코호트는 다음과 같거나 포함한다:
- [0390] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하지 않는 첫 번째 참조 코호트; 및
- [0391] 상기 환자의 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하는 두 번째 참조 코호트;
- [0392] 상기 첫 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하지 않는 것을 나타내고;
- [0393] 상기 두 번째 코호트로의 분류는 상기 환자의 간 섬유증 단계가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하는 것을 나타낸다.
- [0394] 상기 i)b) 단계에서, 보다 구체적으로 상기 목록으로부터 나이, 체질량지수(BMI), 바이러스 수치(VL) 및 간 경직도(FS)로 구성된 마커 목록에서 0, 1, 2 또는 3개의 추가적인 마커가 선택된다(cf. 위의 “선택적인 추가 마커”).
- [0395] 예를 들어, 추가적인 마커가 선택되지 않거나, 추가적인 간 경직도 마커, 또는 추가적인 나이 및 체질량지수 마커, 또는 추가적인 나이, 체질량지수 및 바이러스 수치 마커가 선택된다
- [0396] 따라서, i)단계에서 선택된 상이한 생물학적인 마커는 예를 들어, 다음을 포함하거나 구성된다:
- [0397] - 히알루론산(HA) 및 CXCL10 단백질, 또는
- [0398] - 히알루론산(HA), CXCL10 단백질, 나이 및 체질량지수, 또는
- [0399] - 히알루론산(HA), CXCL10 단백질, 나이, 체질량지수 및 바이러스 수치(VL), 또는
- [0400] 히알루론산(HA), CXCL10 단백질, 나이, 체질량지수, 바이러스 수치(VL) 및 간 경직도(FS);
- [0401] (cf. 위의 “순환 분자”, “선택적인 추가 마커”, “선택된 생물학적 마커”, 및 “바이오마커의 검출 및 정량화”).
- [0402] 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 바이오마커의 정량화 값을 간 섬유증 단계(또는 정도)에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값, 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 상기 단계는 통상의 기술자가 적합하다고 고려하는 임의의 수단에 의해 실행될 수 있다.
- [0403] 특히, 상기 비교는 분류에 의해, 보다 구체적으로 상기 환자에 대하여 분류 모델 내에서, 보다 구체적으로 다변

수의 분류 모델 내에서 획득한 결정된(또는 측정된) 값을 결합하여 수행될 수 있다(조합된 방식으로).

- [0404] 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트(cohort) 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 이러한 분류 모델은 상기 환자에 대하여 획득한 결정된 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값, 또는 상기 정량화 값의 분포와 예를 들어, 상기 환자의 간 섬유증 스코어를 나타내는 출력값을 상기 정량화 값에 부여함으로써 비교한다.
- [0405] 이러한 분류 모델은 상기 참조 코호트에 대하여 획득한 결정된 값의 코호트, 또는 상기 결정된 값의 분포를 비교함으로써 생성될 수, 특히 미리 생성될 수 있다.
- [0406] 보다 구체적으로, 이러한 분류 모델은 간 섬유증 스코어에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 생물학적 마커의 정량화 값을 측정하거나 수집하고, 분류 모델을, 보다 구체적으로 상기 정량화 값으로부터 간 섬유증 스코어를 유도하거나 결정하는 다변수의 분류 모델을 생성하기 위한 통계적인 방법에 의해 상기 결정된 값, 또는 그 분포를 분석함으로써 생성될 수, 특히 미리 생성될 수 있다.
- [0407] 예를 들어, 분류 모델은 다음과 같이 (미리) 생성될 수 있다:
- [0408] - 간 섬유증의 단계(또는 정도 또는 스코어)에 따라 미리 생성된 적어도 두 개의 참조 코호트를 제작하는 단계;
- [0409] 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과하지 않은 환자로 구성된 첫 번째 참조 코호트, 및
- [0410] 간 섬유증 단계가 경 섬유증 단계를 초과한 환자로 구성된 두 번째 참조 코호트 (cf. 위의 “생물학적 마커의 정량화 값으로부터 간 섬유증 단계의 결정”);
- [0411] - 상기 첫 번째 코호트 및 상기 두 번째 코호트 내에서의 상기 선택된 상이한 생물학적 마커 각각에 대한 정량화 단계;
- [0412] - 상기 첫 번째 코호트 내에서 상기 마커에 의해 나타난 정량화 값과 상기 두 번째 코호트 내에서 (각각) 나타난 정량화 값의 (수학적인 및/또는 통계적인) 비교 단계.
- [0413] 보다 구체적으로, 상기 분류 모델은 다음과 같이 (미리) 생성될 수 있다:
- [0414] α) 상기 환자와 동일한 간염 바이러스(들)에 감염된, 상기 환자와 동일한 종의 환자 집단에 대하여 상기 집단의 환자 각각의 간 섬유증 단계(또는 정도 또는 스코어)를 결정하고,
- [0415] 상기 환자들을 환자들의 간 섬유증 단계(또는 정도 또는 스코어)에 따라서 하위 집단으로 분류하여, 상기 간 섬유증 단계(또는 정도 또는 스코어)에 따라서 생성된 참조 코호트를 제작하는 단계이며, 상기 참조 코호트는 다음과 같거나 다음을 포함한다:
- [0416] 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도 또는 스코어)가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하지 않는(즉, 메타비르 섬유증 F1 스코어를 초과하지 않는) 첫 번째 참조 코호트; 및
- [0417] 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도 또는 스코어)가 격막이 없는 간문맥 섬유증 단계를 초과하는(즉, 메타비르 섬유증 F1 스코어를 초과하는) 두 번째 참조 코호트;
- [0418] β) 상기 환자들 각각에 대하여, 청구항 1의 i)단계에서 선택된 상이한 생물학적 마커를 정량화하는 단계; 및
- [0419] γ) 상기 선택된 생물학적 마커의 정량화 값으로부터(보다 구체적으로, 상기 정량화 값의 조합으로부터) 상기 참조 코호트 중 하나로의 분류를 유도하는 분류 모델을 생성하기 위해 단계 β)에서 획득한 정량화 값의 코호트 또는 상기 정량화 값의 분포를 비교하는 단계.
- [0420] 상기 환자의 간 섬유증 단계(또는 정도)가 경 섬유증 단계를 초과하는지 여부를 나타내는 스코어 (Z)를 상기 환자에게 지정하기 위하여, 상기 비교 단계는 분류 모델, 보다 구체적으로 다변수의 분류 모델 내에서의 상기 환자에 대한 정량화 값을 분류하여 실행될 수 있다.
- [0421] 상기 분류 모델은 상기 생물학적 마커의 정량화 값의 조합으로부터, 상기 선택된 생물학적 마커의 정량화 값의 조합으로부터 스코어 값 (Z)를 유도하는 모델일 수 있다.
- [0422] 보다 구체적으로, 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여 (보다 구체적으로, 상기 첫 번째 코호트 또는 상기 두 번째 코호트로 상기 환자를 분류하기 위하여), 상기 비교 단계는 상기 환자에 대하여 획득한 정량화 값에 미리 결정된 판별 분류 규칙을 적용하여 실행될 수 있다.

- [0423] 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여(즉, 상기 첫 번째 코호트 또는 상기 두 번째 코호트로 상기 환자를 분류하기 위하여), 상기 판별 규칙은 선택된 생물학적 마커에 대하여 획득한 정량화 값을 분류에 의해 미리 결정된 하나 이상의 임계 값과 비교하는 규칙일 수 있다.
- [0424] 예를 들어, 모델은 수학 함수, 비파라미터(nonparametric) 기술, 휴리스틱(heuristic) 분류 절차, 또는 확률적 예측 기법에 의해 생성될 수 있다. 생물학적 마커의 정량화에 기초하여 분류하는 전형적인 예는 “건강한” 대 “아픈” 환자의 판별에 있다. 이 문제의 공식은 n 개의 무작위 변수로 기재된, m 개의 독립적 샘플이다. 각 환자 i ($i = 1, \dots, m$)는 n 개의 특성 값을 기술하는 x_i 벡터인 것이 특징이다: x_{ij} , $i = 1, \dots, m$, $j = 1, \dots, n$. 이러한 특징 값은 예를 들어 단백질 농도 및/또는 임상적인 및/또는 해부학적인 데이터 및/또는 바이러스학적인 데이터 값으로 나타날 수 있다. 각 샘플 x_i 는 환자 i 의 임상적인 상태를 나타내는 분리 값 y_i 와 연관되어 있다. 예를 들어, 환자 i 가 간 섬유증 F1 스코어라면 $y_i = 0$, 환자 i 가 간 섬유증 F2 스코어라면 $y_i = 1$ 이다. 모델은 관찰된 각 샘플 내에서 y_j 를 예측하기 위해 x_i 로부터 이용 가능한 판별 규칙을 제공한다(예를 들어, 수학 함수, 알고리즘 또는 절차). 목적은 이용 가능한 생물학적 및/또는 임상적인 값, 즉 x_p 로부터 환자 p 의 임상적인 상태, 즉 y_p 를 예측하기 위하여 이 모델을 사용하는 것이다.
- [0425] 다른 분류 모델은 통상의 기술자에게 알려져 있다(cf. Hastie, Tibishirani and Friedman, 2009; Falissard, 2005; Theodoridis and Koutroumbos 2009). 다변수의 분류 모델의 판별 규칙은, 예를 들어, f 는 선형 또는 비-선형 수학 함수(예를 들어, 로지스틱 회귀분석, mROC)인 $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ 유형의 수학 공식, 또는 상기 환자의 판별을 위해 가장 효율적인 것으로 확인된 일련의 제어 파라미터에 특성이 있는 인공 지능의 기계 학습의 알고리즘을 기반으로 할 수 있다(예를 들어, KNN, WKNN, SVM, RF). 통상의 기술자가 적합하다고 고려하는 각 분류 모델도 사용되거나 이용될 수 있다.
- [0426] 본 발명에 있어서, 상기 판별 분류 규칙은 예를 들어, 다음과 같을 수 있다:
- [0427] - 통계 분석 방법, 보다 구체적으로 다변수의 통계 분석, 예를 들어:
- [0428] ROC (receiver operating characteristics) 방법;
- [0429] 선형 또는 비-선형 수학 함수, 특히 mROC (multivariate ROC) 방법에 의해 생성되는 함수와 같은, 선형 수학 함수, 또는
- [0430] 로지스틱 회귀분석 보다 구체적으로 아핀 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석(LOGIT)과 같은, 보다 구체적으로 선형 또는 비-선형 회귀분석 방법;
- [0431] PLS-DA (부분 최소 제곱법- 판별 분석) 방법;
- [0432] LDA (선형 판별 분석) 방법;
- [0433] - 학습 또는 인공 지능, 예를 들어, 학습 또는 인공 지능 알고리즘, 비-파라미터 또는 휴리스틱 분류 방법 또는 확률적 예측 방법에 의하는 분류 방법, 다음과 같은:
- [0434] CART(분류 및 회귀분석 트리) 방법과 같은, 결정 트리; 또는
- [0435] 이진 분류법을 기반으로 하는 부스팅 유형의 방법(Adaboost로부터) 또는 부스팅에 관련된 방법(bagging); 또는
- [0436] k-nearest neighbors (또는 KNN) 방법, 또는 보다 일반적으로 weighted k-nearest neighbors (또는 WKNN) 방법; 또는
- [0437] 서포트 벡터 머신(support vector machines) (또는 SVM) 방법(예를 들어, 알고리즘); 또는
- [0438] 랜덤 포레스트(random forest) (또는 RF); 또는
- [0439] 베이저안 네트워크(Bayesian network); 또는
- [0440] 뉴럴 네트워크(neural network); 또는
- [0441] 갈루아 래티스(Galois lattice).
- [0442] 다변수의 ROC 방법(mROC)은 ROC(receiver operating characteristics) 방법의 일반화이다 (cf. Reiser and Faraggi 1997; Su and Liu 1993, Shapiro, 1999). mROC는 다변수의 정규 분포 가정 하에서 바이오마커의 및/또

는 바이오마커의 변형(정규화의 경우에)의 선형 조합에 관한 ROC curve 아래의 면적(AUC)을 계산한다. mROC 방법은 특히, Kramar et al. 1999 및 Kramar et al. 2001에 기재되어 있다. 예를 들어, 개발자 (A. Kramar, A. Fortune, D. Farragi 및 B. Reiser)로부터 상업적으로 상용화된, mROC 소프트웨어 버전 1.0은 mROC 모델을 생성하기 위해 사용될 수 있다. Andrew Kramar와 Antoine Fortune은 Unite de Biostatistique du Centre Regional de Lutte contre le Cancer (CRLC) Val d'Aurelle - Paul Lamarque (208, rue des Apothicaires; Parc Euromedecine; 34298 Montpellier Cedex 5; France)를 통해서 연락할 수 있다. David Faraggi와 Benjamin Reiser는 Haifa 대학의 통계학과 (Mount Carmel; Haifa 31905; Israel)를 통해서 연락할 수 있다. mROC 모델은 BMQ는 바이오마커, n은 바이오마커 BMQ의 수, BMQ_i 는 선택된 바이오마커 중 하나의 정량화 값(i는 1에서 n까지) 또는 상기 정량화 값의 Box-Cox 변환된 형태의 값[Box and Cox 1964: 바이오마커 BMQ에 대하여, BMQ의 정량화 값의 Box-Cox 변환 형태는 $(BMQ^{\lambda} - 1)/\lambda$ 와 같은, BMQ^{λ} 이다], 및 a, b, ... 및 w는 mROC 함수의 파라미터인 $Z = a(BMQ_1) + b(BMQ_2) + \dots + w(BMQ_n)$ 유형의 선형 함수 형태를 가질 수 있다.

[0443] 아핀 함수 또는 LOGIT 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석(LR)은 이항 회귀분석의 모델이다 (Berkson 1944; Berkson 1951). 로지스틱 회귀분석 모델은 BMQ는 바이오마커, n은 바이오마커 BMQ의 수, BMQ_i 는 선택된 바이오마커 중 하나의 정량화 값(i는 1에서 n까지) 및 인터셉트(Intercept), k, l, ... 및 z는 LOGIT 함수의 파라미터인, $LOGIT = \text{인터셉트} + k(BMQ_1) + l(BMQ_2) + \dots + w(BMQ_n)$ 유형의 아핀 함수 형태를 가질 수 있다.

[0444] 인공 지능 또는 기계 학습 방법의 계열은 명시적인 일반화로 진행되는 대신에, 새로운 문제의 예를 메모리에 저장된 학습 중에 고려된 예와 비교하는 알고리즘 계열이다. 이들 알고리즘은 학습된 예 자체로부터 가설을 직접적으로 생성한다.

[0445] 이 알고리즘 유형의 예는 “분류 및 회귀분석 트리” C(Breiman 1984)를 의미하는 약어인, CART 알고리즘이다. CART 모델은 결정 트리이다. 그에 대한 예가 도 12에 나와있다. 바이오마커 (BMQ_i) 각각의 정량화 값은 결정 트리(도 12에서: 스코어 < F2, 또는 스코어 $\geq F2$)에 따라 검사된 샘플을 분류 할 수 있는 일련의 임계 값(도 12에서 h, i 및 j 파라미터)과 비교된다.

[0446] 이러한 알고리즘 유형의 또 다른 예는 k-nearest neighbors (KNN) 알고리즘이며, 가능한 범위 중 하나는 weighted k-nearest neighbors (WKNN) 알고리즘의 이름으로 알려져 있다(Hechenbichler and Schliep, 2004). 새로운 관측값 x의 분류에서, 가장 간단한 기본 아이디어는 이 관측값 투표에서 가장 가까운 neighbor로 분류하는 것이다. 특정 KNN 함수의 라이브러리는 예를 들어, R 소프트웨어에서 이용 가능하다(<http://www.R-project.org/>). 소프트웨어 R은 최초로 John Chambers 및 Bell laboratories에 의해 개발되었다 (cf. Chambers 2008). 이 소프트웨어 제품군의 현재 버전은 2.11.1 버전이다. 소스 코드는 General Public License "Free Software Foundation's GNU" 규정에 따라 <http://www.Rproject.org/> 웹사이트에서 자유롭게 이용 가능하다. 이 소프트웨어는 WKNN 모델을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0447] 랜덤 포레스트(RF)는 예측 변수의 하위 세트를 나타내는 경우에 반응을 생성할 수 있는 간단한 예측 트리 세트 구성되어 있다 (Breiman 2001; Liaw and Wiener 2002). 계산은 소프트웨어 R로 실행된다. 이 소프트웨어는 랜덤 포레스트 모델은 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0448] 뉴럴 네트워크는 노드가 뉴런을 상징하는 방향성 가중 그래프로 구성되어 있다. 네트워크는 각 클래스의 예시(예를 들어, F2 대 F1) 구축되고 그리고 나서 새로운 요소가 속하는 클래스를 결정하는데 사용된다; cf. Intrator and Intrator 1993, Riedmiller and Braun 1993, Riedmiller 1994, Anastasiadis et. al. 2005; cf. <http://cran.r-project.org/web/packages/neuralnet/index.html>. <http://www.rproject.org/>에서 자유롭게 이용 가능한 R 소프트웨어(Marc Suling의 작업에 이어, Stefan Fritsch 및 Frauke Guenther에 의해 만들어진, 뉴럴 네트워크의 1.3 버전)는 예를 들어, 뉴런 네트워크를 구축하기 위해 사용될 수 있다.

[0449] 본 발명에 따라서, 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여 선택된 바이오마커의 정량화 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 것은 특히, 다음과 같은 방법을 따르거나 및/또는 다음과 같은 알고리즘 또는 소프트웨어를 사용하여 실행될 수 있다:

[0450] - 예를 들어, 다음과 같은 수학 함수를 기반으로 하거나

[0451] - 선형 함수 (예를 들어, mROC 함수), 또는

- [0452] - 예를 들어, 아핀 함수와 같은, 비-선형 함수 (예를 들어, LOGIT 로지스틱 회귀분석), 또는
- [0453] - 예를 들어, 방법, 소프트웨어 또는 인공 지능의 학습 알고리즘(예를 들어, CART 결정 트리)과 같은, 수학 함수를 기반으로 하지 않는다.
- [0454] 보다 구체적으로, 상기 비교는 특히, 다음과 같은 방법을 따르거나 및/또는 알고리즘 또는 소프트웨어를 사용하여 실행될 수 있다:
- [0455] - mROC
- [0456] - 로지스틱 회귀분석의 (보다 구체적으로 LOGIT 아핀 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석의);
- [0457] - KNN, WKNN (보다 구체적으로 WKNN),
- [0458] - RF, 또는
- [0459] - NN, 또는
- [0460] - CART,
- [0461] 보다 구체적으로 mROC, 로지스틱 회귀분석 (보다 구체적으로 LOGIT 아핀 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석) 또는 CART.
- [0462] 이러한 알고리즘, 소프트웨어 또는 방법 각각은 상기 참조 코호트 각각의 정량화 값으로부터 분류 모델을 구축할 수 있고, 그로부터 분류 또는 상기 환자의 간 섬유증 스코어를 유도하기 위하여 이 모델 내에서 상기 환자로부터 획득한 정량화 값을 조합할 수 있다.
- [0463] 본 발명자들은 CXCL10 및 히알루론산의 조합에서 관찰된 상승 효과가 mROC 함수가 환자의 분류에 이용된다는 사실에 의존하지 않음을 증명하였다; cf. 특히, 다음의 실시예:
- [0464] - 실시예 7, 보다 구체적으로 표 20, 21 및 23,
- [0465] - 실시예 8, 보다 구체적으로 표 24.
- [0466] 하나의 실시예에 따르면, 이용된 분류 모델은 mROC, 또는 로지스틱 회귀분석과(보다 구체적으로 LOGIT 아핀 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석) 같은, 수학 함수를 사용하는 다변수의 분류 모델이다.
- [0467] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 분류 모델은 CART와 같은, 기계 학습 또는 인공 지능 모델을 이용한다.
- [0468] 성능 (민감도, 음성예측도, 특이도, 음성예측도, 정확 분류 비율, AUC)
- [0469] 본 발명의 수단, 보다 구체적으로 본 발명의 생물학적 마커 선택은, 상기 환자의 분류에 있어 매우 좋은 성능을 얻을 수 있다.
- [0470] 따라서, 본 발명의 수단으로 인하여, 상기 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포에 대한 상기 환자의 정량화 값의 비교는 특히 높은 민감도(Se) 및/또는 음성예측도(NPV) 및/또는 특이도(Spe) 및/또는 양성예측도(PPV) 및/또는 ROC curve 아래의 면적(AUC) 및/또는 정확 분류 비율(CCR)을 통해 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하여 수행된다.
- [0471] 민감도(Se), 음성예측도(NPV), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), ROC curve 아래의 면적(AUC), 정확 분류 비율(CCR) 용어는 본 발명이 속하는 분야에서의 일반적인 의미를 갖는다. 공식적으로:
- [0472] $Se = TP / (TP + FN)$, TP = 진양성의 수 및 FN = 위음성의 수;
- [0473] $Sp = TN / (TN + FP)$, TN = 진음성의 수 및 FP = 위양성의 수이다.
- [0474] $PPV = TP / (TP + FP)$ TP = 진양성 및 FP = 위양성;
- [0475] $NPV = TN / (TN + FN)$, TN = 진음성 및 FN = 위음성;
- [0476] 양성 검사 = 상기 단계가 경 섬유증을 초과하였음
- [0477] 음성 검사 = 상기 단계가 경 섬유증을 초과하지 않았음.
- [0478] 따라서 양성예측도는 피실험자가 경 섬유증 단계(메타비르 섬유증 스코어에서 적어도 F2)를 초과할 확률을 나타

내고, 본 발명의 수단이 상기 피실험자가 경 섬유증 단계(메타비르 섬유증 스코어에서 적어도 F2)를 초과하였음을 나타내는 것으로 알고 있다[검사의 양성 결과].

- [0479] 따라서 음성예측도는 피실험자가 실제로 경 섬유증 단계(메타비르 섬유증 스코어에서 기껏해야 F1)를 초과하지 않았을 확률을 나타내고, 본 발명의 수단이 상기 피실험자가 경 섬유증 단계(메타비르 섬유증 스코어에서 기껏해야 F1)를 초과하였음을 나타내는 것으로 알고 있다[검사의 음성 결과].
- [0480] 정확 분류 확률은 정확하게 분류된 환자의 백분율이다.
- [0481] ROC curve 아래의 면적(AUC)은 다변수의 정규 분포 가정하에서 바이오마커 및/또는 바이오마커 변형(정규화의 경우)의 선형 조합에 관한 ROC curve 아래의 면적(AUC)이다.
- [0482] 상기 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포에 대한 상기 환자의 정량화 값의 비교는 위에 기재된 바와 같은 분류 모델에 따라서 수행될 수 있다.
- [0483] 보다 구체적으로, 상기 비교는 아래에 기재된 바와 같은, mROC 함수, LOGIT 함수 또는 CART 트리, 특히 Z_1 에서 Z_{13} 의 mROC 함수, LOGIT₁에서 LOGIT₄의 함수, CART₁에서 CART₄의 트리에 따라서 수행될 수 있다.
- [0484] 본 발명에 있어서, 상기 비교는 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82% 또는 적어도 83%의 민감도(Se)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0485] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82% 또는 적어도 83%의 민감도(Se)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석 또는 CART 트리에 의해).
- [0486] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82% 또는 적어도 83%의 음성예측도(NPV)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0487] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82% 또는 적어도 83%의 음성예측도(NPV)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석 또는 CART 트리에 의해).
- [0488] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 59%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 89% 적어도 90% 또는 적어도 91%의 특이도로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0489] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 89% 적어도 90% 또는 적어도 91%의 특이도로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0490] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 54%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 90% 또는 적어도 91%의 양성예측도(PPV)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0491] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 90% 또는 적어도 91%의 양성예측도(PPV)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0492] 민감도 및/또는 음성예측도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도 최소 값의 모든 조합은 본 발명의 기재에 명시적으로 포함된다.
- [0493] 따라서, 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 76%의 민감도(Se)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 75%의 음성예측도(NPV)(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0494] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 76%의 민감도(Se)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 59%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0495] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 76%의 민감도(Se)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 85%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지

스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).

- [0496] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 76%의 민감도(Se)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 54%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0497] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 76%의 민감도(Se)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 85%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0498] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 54%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 54%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0499] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 54%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 85%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0500] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 85%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 54%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0501] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 85%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 85%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0502] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 54%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 75%의 음성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0503] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 85%의 특이도(Spe)(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 75%의 음성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0504] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 75%의 음성예측도(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 54%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0505] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 75%의 음성예측도(위에 기재된 바와 같이) 및/또는 적어도 85%의 양성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0506] 따라서, 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 다음 뿐만 아니라 적어도 76%의 민감도(Se) (위에 기재된 바와 같이) 및 적어도 75%의 음성예측도(위에 기재된 바와 같이)로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0507] - 적어도 85%의 특이도(Spe), 및/또는
- [0508] - 적어도 85%의 양성예측도.
- [0509] 본 발명의 수단으로 인하여, 상기 비교는 적어도 0.700, 적어도 0.704, 적어도 0.720, 적어도 0.729, 적어도 0.730, 적어도 0.731, 적어도 0.840, 적어도 0.844, 적어도 0.860, 적어도 0.865, 적어도 0.868, 적어도 0.880, 적어도 0.882, 적어도 0.890, 적어도 0.895, 적어도 0.898, 적어도 0.899, 적어도 0.0900, 적어도 0.910, 적어도 0.920, 적어도 0.921, 적어도 0.930, 적어도 0.931, 또는 적어도 0.933의 ROC curve 아래의 면적(AUC)로 상기 환자를 분류하여 수행될 수 있다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0510] 실제로, 히알루론산 및 CXCL10 두 마커의 조합만으로 적어도 0.700, 보다 구체적으로 0.704, 보다 구체적으로 0.865의 AUC를 얻기에 충분하다(cf. 아래의 실시예).
- [0511] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 0.800, 보다 구체적으로 적어도 0.865, 적어도 0.868, 적어도 0.880, 적

어도 0.882, 적어도 0.890, 적어도 0.895 또는 적어도 0.898의 AUC로 예를 들어, mROC, 로지스틱 회귀분석에 의해 상기 환자를 분류하여 수행될 수 있다.

- [0512] 본 발명의 수단으로 인하여, 상기 비교는 적어도 60%, 적어도 66%, 적어도 70%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 75%, 적어도 77%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88% 또는 적어도 89%의 정확 분류 비율(CCR)로 상기 환자를 분류하여 수행될 수 있다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0513] 보다 구체적으로, 상기 비교는 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 88% 또는 적어도 89%의 정확 분류 비율(CCR)로 상기 환자를 분류하여 수행될 수 있다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0514] 민감도 및/또는 음성예측도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도 최소 값의 모든 조합은 본 발명의 기재에 명시적으로 포함된다.
- [0515] 따라서, 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0516] 대안적인 또는 보완적인 실시예에 따르면, 상기 비교는 적어도 70%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.800의 AUC, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.800의 AUC 로 상기 환자를 분류하여 수행된다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해).
- [0517] - 민감도 및 특이도, 또는
- [0518] - 민감도 및 양성예측도, 또는
- [0519] - 민감도 및 음성예측도, 또는
- [0520] - 민감도 및 AUC, 또는
- [0521] - 민감도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0522] - 특이도 및 양성예측도, 또는
- [0523] - 특이도 및 음성예측도, 또는
- [0524] - 특이도 및 AUC, 또는
- [0525] - 특이도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0526] - 양성예측도 및 음성예측도, 또는
- [0527] - 양성예측도 및 AUC, 또는
- [0528] - 양성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0529] - 음성예측도 및 AUC, 또는
- [0530] - 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0531] - AUC 및 정확 분류 비율, 또는
- [0532] - 민감도, 특이도 및 양성예측도, 또는
- [0533] - 민감도, 특이도 및 음성예측도, 또는
- [0534] - 민감도, 특이도 및 AUC, 또는
- [0535] - 민감도, 특이도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0536] - 민감도, 양성예측도 및 음성예측도, 또는
- [0537] - 민감도, 양성예측도 및 AUC, 또는
- [0538] - 민감도, 양성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0539] - 민감도, 음성예측도 및 AUC, 또는

- [0540] - 민감도, 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0541] - 민감도, AUC 및 정확 분류 비율, 또는
- [0542] - 민감도, 특이도, 양성예측도 및 음성예측도, 또는
- [0543] - 민감도, 특이도, 양성예측도 및 AUC, 또는
- [0544] - 민감도, 특이도, 양성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0545] - 민감도, 특이도, 음성예측도 및 AUC, 또는
- [0546] - 민감도, 특이도, 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0547] - 민감도, 양성예측도, 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0548] - 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 AUC, 또는
- [0549] - 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0550] - 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 AUC, 또는
- [0551] - 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 정확 분류 비율, 또는
- [0552] - 특이도, 양성예측도, 음성예측도, AUC 및 정확 분류 비율, 또는
- [0553] - 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도, AUC 및 정확 분류 비율의 최소 값의 모든 조합은 본 발명의 기재에 명시적으로 포함된다.
- [0554] 예를 들어, 상기 비교는 아래와 같은 1/ 및 2/ 두 개의 성능 중에서 적어도 하나로 수행될 수 있다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해):
- [0555] 1/ 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도,
- [0556] 2/ 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 상기 ROC 곡선 아래의 면적.
- [0557] 보다 구체적으로, 상기 비교는 아래와 같은 1/ 및 2/ 두 개의 성능 중에서 적어도 하나로 수행될 수 있다(예를 들어 mROC, 로지스틱 회귀분석, CART 트리에 의해):
- [0558] 1/ 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도,
- [0559] 2/ 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.800의 상기 ROC 곡선 아래의 면적.
- [0560] 본 발명의 판별 규칙 (mROC, CART, LR 또는 다른 것 중 어느 하나, cf. 아래), 보다 구체적으로 Z_{10} , Z_{11} , Z_{12} 또는 Z_{13} 함수에 상응하는 mROC 함수는 분류되지 않은 환자의 비율이 0%이다.
- [0561] 게다가, 본 발명의 판별 규칙 (mROC, CART, LR 또는 다른 것 중 어느 하나), 보다 구체적으로 Z_{10} , Z_{11} , Z_{12} 또는 Z_{13} 함수에 상응하는 mROC 함수는 다음보다 우수한 AUC 성능, 정확 분류 비율, 민감도, 음성예측도, 특이도 및 양성예측도 중에서 적어도 하나를 갖는다:
- [0562] - 히알루론산 마커가 없는 동일한 조건하에서 획득한 것,
- [0563] - CXCL10 마커가 없는 동일한 조건하에서 획득한 것.
- [0564] 본 발명자들은 CXCL10 마커와 히알루론산 마커의 조합은 상승 효과, 즉, 그들 각각의 개별적인 성능의 단순한 병렬을 뛰어 넘는 성능에 이른다는 사실을 증명하였다(AUC 성능 및/또는 정확 분류 비율 및/또는 민감도 및/또는 음성예측도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도). 특히, 실험적인 증명은 아래의 실시예에 기재되어 있다:
- [0565] - 실시예 1(cf. 표 3),
- [0566] - 실시예 3(cf. 표 8 및 10), 및
- [0567] - 실시예 7(cf. 표 20 및 21).
- [0568] 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여 상기 환자의 생물학적 마커의 정량화 값을 간 섬유증 단계(또는 정도)에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값

또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 단계를 실행하기 위하여, mROC (선형 함수), 로지스틱 회귀분석(아핀 함수) 또는 결정 트리(예를 들어, CART 트리)와 같은 상이한 분류 수단이 이용될 수 있다(cf. 위).

[0569] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 CXCL10 및 히알루론산의 조합에서 관찰된 상승 효과가 mROC 함수가 환자의 분류에 이용된다는 사실에 의존하지 않음을 증명하였다; cf. 특허, 아래의 실시예:

[0570] - 실시예 7, 보다 구체적으로 표 20, 21 및 23,

[0571] - 실시예 8, 보다 구체적으로 표 24.

[0572] 수학 함수 (예를 들어, mROC, 로지스틱 회귀분석)

[0573] 수학 함수는 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여 상기 환자의 생물학적 마커의 정량화 값을 간 섬유증 단계(또는 정도)에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하는 단계를 수행하기 위하여 이용될 수 있다. 그리고 나서 상기 비교는 상기 수학 함수 내에서 선택된 생물학적 마커 각각의 정량화 값을 조합하여 수행된다. 이 수학 함수는 상기 환자에 대하여 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여(보다 구체적으로, 상기 첫 번째 코호트 또는 두 번째 코호트로 상기 환자를 분류하기 위하여), 다변수의 분류에 의해 미리 결정된 임계 값(δ 또는 컷-오프)과 비교되는 스코어 (Z)를 지정할 수 있다.

[0574] 상기 수학 함수는 예를 들어, mROC 함수와 같은, 선형 함수, 또는 비-선형 함수, 예를 들어, LOGIT 아핀 함수를 사용하는 로지스틱 회귀분석의 함수와 같은 아핀 함수 일 수 있다.

[0575] 본 발명의 mROC 함수는 다음의 식을 가질 수 있다:

$$[0576] \quad Z = a(BMQ_1^t) + b(BMQ_2^t) + c(BMQ_3^t) + d(BMQ_4^t) + e(BMQ_5^t)$$

[0577] BMQ_1 , BMQ_2 , BMQ_3 , BMQ_4 및 BMQ_5 는 다섯 개의 상이한 바이오마커(예를 들어, CXCL10, 히알루론산, 체질량지수, 나이 및 바이러스 수치), a, b, c, d 및 e는 mROC 함수의 상수의 수치 값, 및 지수 t는 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 정량화 값의 Box-Cox 변환된 형태 (Box and Cox 1964)라는 것을 나타낸다:

$$[0578] \quad BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda.$$

[0579] 본 발명에 따르면, mROC 함수는 다음과 같이 공식화 될 수 있다:

$$[0580] \quad Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t) + f(FS^t)$$

[0581] [함수 Z_{13}]

[0582] a 및 b는 각각 독립적으로 0.1에서 0.6까지의 양의 실수이며;

[0583] c, d, e 및 f는 각각 독립적으로 -10.0에서 +10.0까지의 실수이며;

[0584] λ_{CXCL10} , λ_{HA} , λ_{BMI} , λ_{age} , λ_{VL} 및 λ_{FS} 는 각각 독립적으로, 0을 제외하고, -6.0에서 1.2까지의 실수이다: cf. 실시예 8.

[0585] 위의 Z_{13} 함수에서, 본 명세서에서 언급된 모든 mROC 함수와 마찬가지로, 지수 t는 본 발명이 속하는 분야의 사용에 따라서, 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 정량화 값의 Box-Cox 변환된 형태 (Box and Cox 1964)라는 것을 나타낸다:

$$[0586] \quad BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda.$$

[0587] 본 발명의 mROC 함수는, 아래에 기재되어 있는 Z_{12} 에서 Z_1 함수 뿐만 아니라 위의 Z_{13} 함수와 마찬가지로, 위에 기재된 성능을 나타낸다(AUC 성능 및/또는 정확 분류 비율 및/또는 민감도 및/또는 음성예측도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도).

[0588] 본 발명자들은 mROC 함수의 파라미터는 표시된 값의 범위 내에서 선택되기 때문에, CXCL10과 히알루론산의 조합의 성능이 특히 뛰어나다는 것을 입증했다(AUC 성능 및/또는 정확 분류 비율 및/또는 민감도 및/또는 음성예측

도 및/또는 특이도 및/또는 양성예측도): cf. 아래의 실시예 9.

[0589] Z_{13} 함수의 예는 다음과 같다:

$$Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t) + f(FS^t)$$

[0591] [함수 Z_{12}]

[0592] a 및 b는 각각 독립적으로 +0.1에서 +0.6까지의, 보다 구체적으로 +0.3에서 +5.5까지의 양의 실수이며;

[0593] c는 -10.0에서 +4.0까지의 실수이며;

[0594] d는 -0.8에서 +0.2까지의 실수이며;

[0595] e는 -0.003에서 +0.002까지의 실수이며;

[0596] f는 +0.0에서 +10.0까지의 실수이며;

[0597] λ_{CXCL10} , λ_{HA} , λ_{BMI} , λ_{age} , λ_{VL} 및 λ_{FS} 는 각각 독립적으로, 0을 제외하고, -6.0에서 1.2까지의 실수이다: cf. 아래의 실시예 8.

[0598] 본 발명의 mROC 함수 각각의 임계 값, 보다 구체적으로 Z_{13} 및 Z_{12} 은 예를 들어 -7에서 25까지의, 보다 구체적으로 3에서 25까지의, 보다 구체적으로 10에서 25까지 일 수 있다.

[0599] 본 발명의 mROC 함수 각각의, 보다 구체적으로 Z_{13} 및 Z_{12} 의 임계 값은 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.898의 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 값을 가질 수 있다.

[0600] 본 발명의 mROC 함수, 보다 구체적으로 Z_{13} 및 Z_{12} 은 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도를 가질 수 있다.

[0601] 본 발명의 mROC 함수, 보다 구체적으로 Z_{13} 및 Z_{12} 은 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도를 가질 수 있다.

[0602] Z_{12} 함수의 예이며, 또한 Z_{13} 함수의 예는 다음과 같다:

$$Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t)$$

[0604] [함수 Z_{10}]

$$0.812 \leq a \leq 5.089$$

$$2.033 \leq b \leq 4.462$$

$$-0.262 \leq \lambda_{CXCL10} \leq 0.030$$

$$-0.382 \leq \lambda_{HA} \leq -0.219 \text{이며,}$$

[0609] a, b, λ_{CXCL10} 및 λ_{HA} 는 0이 아니다.

[0610] Z_{10} 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 3에서 25, 보다 구체적으로 10에서 25, 보다 구체적으로 11.68에서 23.71까지 일 수 있다.

[0611] Z_{10} 의 실례가 아래의 실시예 3, 5 및 8에 나와 있다(함수 Z_{10} 및 Z_4).

- [0612] Z_{10} 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.898의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 83%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 3, 5 및 8).
- [0613] Z_{10} 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 78%의 민감도 및/또는 적어도 77%의 음성예측도를 가질 수 있다.
- [0614] Z_{10} 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 90%의 특이도 및/또는 적어도 90%의 양성예측도를 가질 수 있다.
- [0615] Z_{10} 함수의 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0616]
$$Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.852) \times HA^t$$
- [0617] [함수 Z_4]
- [0618] $\lambda_{CXCL10} = -0.116$ 및 $\lambda_{HA} = -0.288$ 이다.
- [0619] Z_4 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 3에서 25, 보다 구체적으로 10에서 25, 보다 구체적으로 15.170 일 수 있다.
- [0620] Z_4 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.882의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 83%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 3, 5 및 8).
- [0621] Z_4 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 78%의 민감도 및/또는 적어도 77%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 3 및 5).
- [0622] Z_4 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 90%의 특이도 및/또는 적어도 90%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 3 및 5).
- [0623] Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0624]
$$Z = 0.386 \times CXCL10^t + 0.3064 \times HA^t$$
- [0625] [함수 Z_1]
- [0626] $\lambda_{CXCL10} = -0.013$ 및 $\lambda_{HA} = 0.099$ 이다.
- [0627] Z_1 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 3에서 25, 보다 구체적으로 3에서 5, 보다 구체적으로 3.382 일 수 있다.
- [0628] Z_1 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).

- [0629] Z_1 함수는 예를 들어 적어도 78%의 민감도 및/또는 적어도 81%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).
- [0630] Z_1 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).
- [0631] Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0632] $Z = (1.849) \times CXCL10^t + (2.368) \times HA^t$
- [0633] [함수 Z_7]
- [0634] $\lambda_{CXCL10} = -0.116$ 및 $\lambda_{HA} = -0.27$ 이다.
- [0635] Z_7 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 3에서 25, 보다 구체적으로 10에서 25, 보다 구체적으로 13.5 일 수 있다.
- [0636] Z_7 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 82%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 6).
- [0637] Z_7 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 78%의 민감도 및/또는 적어도 77%의 음성예측도를 가질 수 있다.
- [0638] Z_7 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 90%의 특이도 및/또는 적어도 90%의 양성예측도를 가질 수 있다.
- [0639] Z_{12} 함수의 예이며, 또한 Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같다:
- [0640] $Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t)$
- [0641] [함수 Z_{11}]
- [0642] $0.748 \leq a \leq 5.357$
- [0643] $2.075 \leq b \leq 4.690$
- [0644] $0.848 \leq c \leq 3.697$
- [0645] $0.746 \leq d \leq 0.147$
- [0646] $0.003 \leq e \leq 0.002$
- [0647] $0.262 \leq \lambda_{CXCL10} \leq 0.047$
- [0648] $0.882 \leq \lambda_{HA} \leq 0.219$
- [0649] $5.545 \leq \lambda_{BMI} \leq 0.485$
- [0650] $0.116 \leq \lambda_{age} \leq 0.828$
- [0651] $0.236 \leq \lambda_{VL} \leq 0.305$
- [0652] $a, b, c, d, e, \lambda_{CXCL10}, \lambda_{HA}, \lambda_{BMI}, \lambda_{age}, \lambda_{VL}$ 는 0이 아니다.

- [0653] Z_{11} 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17 일 수 있다.
- [0654] Z_{11} 의 실행이 아래의 실시예 1, 3, 6, 7 및 8에 나와 있다(함수 Z_3 , Z_5 및 Z_8).
- [0655] Z_{11} 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.882의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 83%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.899의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3, 6, 7 및 8).
- [0656] Z_{11} 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 80%의 민감도 및/또는 적어도 78%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3, 6, 및 7).
- [0657] Z_{11} 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 87%의 특이도 및/또는 적어도 88%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3, 6, 및 7).
- [0658] Z_{11} 함수의 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0659]
$$Z = (0.2914) \times CXCL10^t + (0.2569) \times HA^t + (-9.3855) \times BMI^t + (0.01419) \times age^t + (0.0140) \times VL^t$$
- [0660] [함수 Z_3]
- [0661] $\lambda_{CXCL10} = -0.013$
- [0662] $\lambda_{HA} = 0.099$
- [0663] $\lambda_{age} = 1.086$
- [0664] $\lambda_{BMI} = -0.923$
- [0665] $\lambda_{VL} = 0.159$ 이다.
- [0666] Z_3 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 -5.730 일 수 있다.
- [0667] Z_3 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 73%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.731의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1 및 8).
- [0668] Z_3 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 83%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).
- [0669] Z_3 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 71%의 특이도 및/또는 적어도 62%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).
- [0670] Z_{11} 함수의 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0671]
$$Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.958) \times HA^t + (0.616) \times BMI^t + (-0.053) \times age^t + (-0.00024) \times VL^t$$

- [0672] [함수 Z_5]
- [0673] $\lambda_{CXCL10} = -0.116$
- [0674] $\lambda_{HA} = -0.288$
- [0675] $\lambda_{age} = 0.433$
- [0676] $\lambda_{BMI} = -0.039$
- [0677] $\lambda_{VL} = 0.279$ 이다.
- [0678] Z_5 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 16.543 일 수 있다.
- [0679] Z_5 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.856의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.882의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 83%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.899의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3, 7 및 8).
- [0680] Z_5 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 80%의 민감도 및/또는 적어도 78%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3 및 7).
- [0681] Z_5 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 87%의 특이도 및/또는 적어도 88%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1, 3 및 7).
- [0682] Z_{11} 함수의 예는 다음과 같은 함수이다:
- [0683] $Z = (1.853) \times CXCL10^t + (2.511) \times HA^t + (0.4246) \times BMI^t + (-0.0343) \times age^t + (-0.00027) \times VL^t$
- [0684] [함수 Z_8]
- [0685] $\lambda_{CXCL10} = -0.116$
- [0686] $\lambda_{HA} = -0.27$
- [0687] $\lambda_{age} = 0.536$
- [0688] $\lambda_{BMI} = -0.0056$
- [0689] $\lambda_{VL} = 0.288$ 이다.
- [0690] Z_8 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 14.7 일 수 있다.
- [0691] Z_8 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 82%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 6 및 8).
- [0692] Z_8 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측

도, 보다 구체적으로 적어도 80%의 민감도 및/또는 적어도 78%의 음성예측도를 가질 수 있다.

[0693] Z_8 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 87%의 특이도 및/또는 적어도 88%의 양성예측도를 가질 수 있다.

[0694] Z_{12} 함수의 예이며, 또한 Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같다:

$$Z = (0.3313) \times CXCL10^t + (0.25154) \times HA^t + (-9.8818) \times BMI^t + (0.0143) \times age^t$$

[0696] [함수 Z_2]

$$\lambda_{CXCL10} = -0.013$$

$$\lambda_{HA} = 0.099$$

$$\lambda_{age} = 1.086$$

$$\lambda_{BMI} = -0.923 \text{ 이다.}$$

[0701] Z_2 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 14.7 일 수 있다.

[0702] Z_2 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).

[0703] Z_2 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 82%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).

[0704] Z_2 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 1).

[0705] Z_{12} 함수의 예이며, 또한 Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같다:

$$Z = (1.686) \times CXCL10^t + (2.216) \times HA^t + (6.947) \times FS$$

[0707] [함수 Z_6]

[0708] FS는 예를 들어, kDa 단위의 간 경직도의 정량화 값이고,

$$\lambda_{CXCL10} = -0.016$$

$$\lambda_{HA} = 0.2888$$

$$\lambda_{FS} = -0.888 \text{ 이다.}$$

[0712] Z_6 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 14.7 일 수 있다.

[0713] Z_6 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 86%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.931의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 5).

[0714] Z_6 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측

도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 82%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 83%의 민감도 및/또는 적어도 81%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 5).

[0715] Z_6 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 89%의 특이도 및/또는 적어도 90%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 5).

[0716] Z_{12} 함수의 예이며, 또한 Z_{13} 함수의 또 다른 예는 다음과 같다:

[0717]
$$Z_7 = (1.585) \times CXCL10^T + (2.181) \times HA^T + (2.910) \times FS$$

[0718] [함수 Z_9]

[0719] FS는 예를 들어, kDa 단위의 간 경직도의 정량화 값이고,

[0720] $\lambda_{CXCL10} = -0.016$

[0721] $\lambda_{HA} = 0.27$

[0722] $\lambda_{FS} = -0.27$ 이다.

[0723] Z_9 의 임계 값은 예를 들어, -7에서 25, 보다 구체적으로 -7에서 17, 보다 구체적으로 14.7 일 수 있다.

[0724] Z_9 함수는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 85%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.868의 AUC의 값을 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 6).

[0725] Z_9 함수는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 6).

[0726] Z_9 함수는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도를 가질 수 있다(cf. 아래의 실시예 6).

[0727] 로지스틱 회귀분석 함수는 다음 형식을 가질 수 있다:

[0728]
$$\text{LOGIT} = \text{인터셉트} + k(\text{BMQ}_1) + l(\text{BMQ}_2),$$

[0729] BMQ_1 및 BMQ_2 는 두 개의 상이한 바이오마커이며(예를 들어, CXCL10 및 히알루론산), 인터셉트, k 및 l은 로지스틱 회귀분석 함수의 상수의 수치 값이다.

[0730] 예를 들어 다음과 같다:

[0731]
$$\text{LOGIT} = \text{인터셉트} + k(\text{CXCL10}) + l(\text{AH}),$$

[0732] [LOGIT₁ 함수]

[0733] $-5 \leq \text{인터셉트} \leq -1$

[0734] $0.001 \leq k \leq 0.010$

[0735] $0.010 \leq l \leq 0.050.$

[0736] 보다 구체적으로, 로지스틱 회귀분석 함수는 다음과 같다:

[0737]
$$\text{LOGIT} = \text{인터셉트} + k(\text{CXCL10}) + l(\text{AH}),$$

- [0738] [LOGIT₂ 함수]
- [0739] $-4.481 \leq \text{인터셉트} \leq -2.398$
- [0740] $0.003 \leq k \leq 0.008$
- [0741] $0.013 \leq l \leq 0.045$;
- [0742] (cf. 실시예 8, 표 24).
- [0743] 로지스틱 회귀분석 LOGIT₁ 및 LOGIT₂ 함수의 실례는 아래의 실시예 7에 나와 있다, 주로 다음과 같다:
- [0744] $\text{LOGIT}_3 = \text{인터셉트} + k(\text{CXCL10}) + l(\text{AH})$,
- [0745] [LOGIT₃ 함수]
- [0746] $-3.57 \leq \text{인터셉트} \leq -2.67$
- [0747] $0.003 \leq k \leq 0.007$; 및
- [0748] $0.02 \leq l \leq 0.04$; (cf. 실시예 7, 표 19);
- [0749] $\text{LOGIT} = \text{인터셉트} + k(\text{CXCL10}) + l(\text{AH})$,
- [0750] [LOGIT₄ 함수]
- [0751] $\text{인터셉트} = -3.164$
- [0752] $k = 0.005$; 및
- [0753] $l = 0.024$; (cf. 실시예 7, 표 22);
- [0754] 본 발명의 LOGIT 함수, 보다 구체적으로 LOGIT₁, LOGIT₂, LOGIT₃, LOGIT₄의 각각의 임계값은 예를 들어 0.5 일 수 있다.
- [0755] 본 발명의 로지스틱 회귀분석 함수(LOGIT 아핀 함수를 사용하는), 보다 구체적으로 LOGIT₁, LOGIT₂, LOGIT₃ 및 LOGIT₄는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.704의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 72%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.729의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.865의 AUC의 값, 보다 구체적으로 적어도 80%의 정확 분류 비율 및/또는 적어도 0.882의 AUC의 값을 가질 수 있다.
- [0756] 본 발명의 로지스틱 회귀분석 함수, 보다 구체적으로 LOGIT₁, LOGIT₂, LOGIT₃ 및 LOGIT₄는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도를 가질 수 있다.
- [0757] 본 발명의 로지스틱 회귀분석 함수, 보다 구체적으로 LOGIT₁, LOGIT₂, LOGIT₃ 및 LOGIT₄는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도를 가질 수 있다.
- [0758] 기계 학습 (예를 들어, CART)
- [0759] 대안적으로 또는 보완적으로, 기계 학습은 상기 환자가 속할 가능성이 가장 높은 참조 코호트 중 하나로 상기 환자를 분류하기 위하여, 바이오마커의 정량화 값을 간 섬유증 단계에 따라 미리 정의된 참조 코호트 내에서의 상기 정량화 값 또는 상기 정량화 값의 분포와 비교하기 위해 이용될 수 있다. 상기 기계 학습은 결정 트리, 보다 구체적으로 CART 결정 트리에 의해 학습될 수 있다.
- [0760] 예를 들어, 상기 환자로부터 획득한 정량화 값은 결정 트리, 보다 구체적으로 CART 결정 트리에 따라서, 상기 마커의 정량화 값이 속하는 임계값 또는 그 특성과 각각 비교된다. 상기 결정 트리(보다 구체적으로 상기 CART 결정 트리), 보다 구체적으로 이 트리의 임계 값은 상기 참조 코호트, 보다 구체적으로 상기 첫 번째 또는 두 번째 코호트의 정량화 값, 또는 정량화 값의 분포로부터 기계 학습, 보다 구체적으로 결정 트리의 확립(보다 구

체적으로 CART 트리의 확립)에 의해 [미리] 결정될 수 있다. 따라서 결정 트리, 보다 구체적으로 CART 결정 트리는 결정 트리에 따라서 정렬된 일련의 임계 값에 의해서 정의될 수 있다.

- [0761] 예를 들어, 히알루론산 및 CXCL10 마커를 사용한 결정 트리는 다음과 같은 세 개의 임계 값에 의해서 정의될 수 있다:
- [0762] - 두 개의 바이오마커 중 하나의 정량화 값(예를 들어, 히알루론산의 정량화 값)에 지정되고 상기 정량화 값이 임계 값보다 낮거나 높은지 여부에 따라서 두 개의 가지(branch)를 갖는 분기점(branching point)을 생성하는 첫 번째 임계 값(예를 들어, h), 그리고 나서
- [0763] - 두 개의 바이오마커 중 다른 하나의 정량화 값(예를 들어, CXCL10의 정량화 값)에 각각 지정된 두 개 이상의 임계 값(예를 들어, i 및 j), 두 개의 가지 중 하나에 지정된 이러한 두 개 이상의 임계 값 중 하나, 및 두 개의 가지 중에서 또 다른 하나에 지정된 이러한 두 개 이상의 임계 값 중 또 다른 하나.
- [0764] 이러한 CART 트리는 도 12에 나와 있다.
- [0765] 도 12에 따르면, 상기 기계 학습은 히알루론산 마커에 대한 결정 임계 값 h 및 CXCL10에 대한 결정 임계 값 i 및 j 을 포함하는 CART 결정 트리 일 수 있으며, 상기 임계 값 h , i 및 j 는 다음과 같다:
- [0766] 상기 환자의 히알루론산 정량화 값이 h 보다 낮은 경우, CXCL10 마커의 임계 값은 j 이고:
- [0767] CXCL10의 정량화 값이 j 보다 낮으면 상기 환자는 상기 첫 번째 코호트 (메타비르 섬유증 스코어 < F2)로 분류되고;
- [0768] CXCL10의 정량화 값이 j 보다 높거나 같으면 상기 환자는 상기 두 번째 코호트 (메타비르 섬유증 스코어 $\geq$ F2)로 분류된다; 그리고
- [0769] 상기 환자의 히알루론산 정량화 값이 h 보다 높거나 같은 경우, CXCL10 마커의 임계 값은 i 이고:
- [0770] CXCL10의 정량화 값이 i 보다 낮으면 상기 환자는 상기 첫 번째 코호트 (메타비르 섬유증 스코어 < F2)로 분류되고;
- [0771] CXCL10의 정량화 값이 i 보다 높거나 같으면 상기 환자는 상기 두 번째 코호트 (메타비르 섬유증 스코어 $\geq$ F2)로 분류된다.
- [0772] 예를 들어, CART 트리는 다음을 포함하는 도 12와 같다:
- [0773] $40 \leq h \leq 80$
- [0774] $150 \leq i \leq 300$
- [0775] $400 \leq j \leq 620$
- [0776] [CART₁ 트리].
- [0777] 예를 들어, CART 트리는 다음을 포함하는 도 12와 같다:
- [0778] $41.96 \leq h \leq 77.43$
- [0779] $159.09 \leq i \leq 266.7$
- [0780] $410.75 \leq j \leq 613.49$
- [0781] [CART₂ 트리]; cf. 실시예 8.
- [0782] 예를 들어, CART 트리는 다음을 포함하는 도 12와 같다:
- [0783] $42.18 \leq h \leq 77.4$
- [0784] $209.3 \leq i \leq 266.7$
- [0785] $454.7 \leq j \leq 553.1$
- [0786] [CART₃ 트리]; cf. 실시예 7 및 8.

- [0787] 예를 들어, CART 트리는 다음을 포함하는 도 12와 같다:
- [0788] $h = 47.29$
- [0789] $i = 209.3$
- [0790] $j = 503.4$
- [0791] [CART₄ 트리]; cf. 실시예 7 및 8.
- [0792] 본 발명의 CART 트리, 보다 구체적으로 CART₁, CART₂, CART₃ 및 CART₄는 예를 들어 적어도 66%의 정확 분류 비율, 보다 구체적으로 적어도 72%, 보다 구체적으로 적어도 80%, 보다 구체적으로 적어도 83%, 보다 구체적으로 적어도 84%, 보다 구체적으로 적어도 85%의 정확 분류 비율을 가질 수 있다.
- [0793] 본 발명의 CART 트리, 보다 구체적으로 CART₁, CART₂, CART₃ 및 CART₄는 예를 들어 적어도 70%의 민감도 및/또는 적어도 70%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 75%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 76%의 민감도 및/또는 적어도 75%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 77%의 민감도 및/또는 적어도 77%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 78%의 민감도 및/또는 적어도 78%의 음성예측도, 보다 구체적으로 적어도 82%의 민감도 및/또는 적어도 80%의 음성예측도를 가질 수 있다.
- [0794] 본 발명의 CART 트리, 보다 구체적으로 CART₁, CART₂, CART₃ 및 CART₄는 예를 들어 적어도 59%의 특이도 및/또는 적어도 54%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 70%의 특이도 및/또는 적어도 61%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 85%의 특이도 및/또는 적어도 85%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 86%의 특이도 및/또는 적어도 86%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 89%의 특이도 및/또는 적어도 90%의 양성예측도, 보다 구체적으로 적어도 91%의 특이도 및/또는 적어도 91%의 양성예측도를 가질 수 있다.
- [0795] 기계 학습 및 수학 함수의 조합
- [0796] 대안적으로 또는 보완적으로, 상기 비교는 기계 학습 및 수학 함수의 조합, 예를 들어 결정 트리 및 선형 또는 비-선형 함수의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [0797] 예를 들어, 상기 비교는 다음에 의해 수행될 수 있다:
- [0798] - 바이러스 수치, 나이, 체질량지수 및 간 경직도로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 적어도 하나의 마커, 보다 구체적으로 (적어도) 간 경직도 대한 마커에 대한 결정 트리, 보다 구체적으로 CART 트리, 그리로 나서
- [0799] - 위에 기재된 바와 같이 선택된 마커, 보다 구체적으로 적어도 CXCL10 및 히알루론산마커에 대한 선형 또는 아핀 함수, 보다 구체적으로 mROC 또는 로지스틱 회귀분석.
- [0800] 실례가 아래의 실시예 6 및 도 9, 10, 11에 나와 있다: CXCL10 및 히알루론산 마커에 대한(도 9), 또는 CXCL10, 히알루론산, 나이, 체질량지수 및 바이러스 수치(도 10)에 대한, 또는 CXCL10, 히알루론산 및 간 경직도(도 11)에 대한 선형 함수에 의한 비교에 이어서, 상기 값 중 하나에 대한 임계 값과의 비교.
- [0801] 따라서, 하나의 실시예에 따르면, 상기 방법은 예를 들어, FIBROSCAN™을 사용하여, 상기 환자의 간 경직도의 측정하는 단계로 시작한다. 이 단계는 예를 들어, 상기 환자의 간이 간 경화(메타비르 단계 F4)에 영향을 받는 지 여부를 결정할 수 있다. 간 경화에 영향을 받지 않았다면, 즉, 상기 환자의 간 섬유증 단계가 메타비르 스코어 F4보다 낮은 경우, 간 섬유증 단계(메타비르 스코어 F0 또는 F1이거나 메타비르 스코어 F2 또는 F3)를 추가로 결정하기 위하여, 생물학적 체액 샘플은 위에 기재된 바와 같이 선택된 생물학적 마커, 보다 구체적으로 적어도 CXCL10 및 히알루론산을 정량화하여 분석될 수 있다. 상기 환자의 간이 간 경화에 영향을 받았다면(간 경직도의 측정에 의해 검출된), 생물학적 체액 샘플의 분석 성능은 불필요하게 보이므로, 따라서 필수적이지 않다.
- [0802] 본 발명의 다른 목적
- [0803] 보완적인 측면에 따르면, 본 발명은 선택된 바이오마커의 검출 및/또는 정량화를 위한 제품, 시약 또는 리간드, 보다 구체적으로 위에 기재된 바와 같이 바이오마커로서 선택된 순환 분자에 특이적으로 결합하는 시약 또는 리간드 뿐만 아니라, 본 발명의 방법 또는 본 발명의 제품에 특히 적합한 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트, 튜브, 이러한 시약 또는 리간드를 포함하는 고체 지지체 뿐만 아니라 컴퓨팅 시스템(특히 컴퓨터 프로그램 및 컴퓨팅 장치 제품)에 관한 것이다.

- [0804] 특히, 본 발명은 위에 기재된 바와 같이 순환 분자인 바이오마커에 특이적으로 결합하는 리간드, 예를 들어, 히알루론산에 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 CXCL10(보다 구체적으로 인간의 CXCL10 단백질)에 특이적으로 결합하는 리간드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이 리간드는 이 분자의 순환 형태에 특이적으로 결합하거나, 몇몇의 순환 형태가 있는 경우에, 적어도 하나에, 여러 개에, 또는 모든 순환 형태에 결합한다.
- [0805] 바람직하게는, 이 리간드는 선택된 바이오마커를 특이적으로 검출할 뿐만 아니라, 그것을 정량화 할 수 있다.
- [0806] 특히, 이 리간드는 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 예를 들어 항체(단일클론성의 또는 다중클론성의), 항체 절편, 재조합 단백질, 앵타머(aptamer), 다당류, 지질, 또는 이런 물질들의 조합, 보다 구체적으로 단백질, 항체(단일클론성의 또는 다중클론성의), 항체 절편 또는 재조합 단백질 일 수 있다.
- [0807] 예를 들어, 항체는 상기 선택된 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 의한 비-인간 포유동물(토끼와 같은)의 면역에 의해서, 또는 선택적으로 면역 보조제(Freund's 보조제 또는 KLH = keyhole limpet hemocyanin과 같은)에 결합되거나 연결된 단백질의 항원 단편에 의해서, 예를 들어, 복강 내의 또는 피하 주사에 의해서, 및 상기 포유 동물의 혈청 내에서 획득한 항체를 수집하여 생산될 수 있다.
- [0808] 단일클론성의 항체는 Kohler and Milstein 1975 (cf. 또한 US 4,376,110) 의 방법, 인간 B세포 하이브리도마 방법 (Kosbor et al. 1983; Cole et al. 1983), 또는 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus) = EBV (Cole et al. 1985)에 의한 림프구 면역 방법과 같은, 림프구 잡종 방법(하이브리도마)에 의해서 생산될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어, IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, 또는 이들 면역글로빈의 어떠한 다른 subclass일 수 있다. 유전 공학에 의해 변형된 항체는 재조합과 같은, 키메라 항체 또는 하나 이상의 CDR = 상보성 결정 부위의 이식에 의해 인간화된 항체에 의해 생산될 수 있다.
- [0809] 본 발명에서 이용된 항체는 절편 또는 유도체가 상기 특이적 결합 특성을 나타내기 때문에, 항체 절편 또는 이러한 절편의 인공적인 유도체 일 수 있다. 이러한 절편은 예를 들어, Fab, F(ab')₂, Fv, Fab/c, scFv(single chain Fragment variable) 일 수 있다.
- [0810] 리간드의 예는 다음과 같이 CXCL10에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다:
- [0811] - R&D SYSTEMS, Inc. (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 시판 중인 마우스 단일클론성의 항-인간 CXCL10 항체, 카탈로그 참조 MAB266 (clone 33036, class IgG1);
- [0812] - R&D SYSTEMS, Inc. (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 이용 가능한 거위 다중클론성의 항-인간 CXCL10 항체, 비오틴에 결합되지 않은 형태에 대하여 카탈로그 참조 AF-266-NA;
- [0813] - R&D SYSTEMS, Inc. (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA; 카탈로그 참조 MAB266)에서 시판 중인 마우스 단일클론성의 항-인간 CXCL10 항체.
- [0814] "샌드위치 (sandwich)" 형태를 사용하는 경우에, 이들 항체 각각은 포획 리간드 및/또는 검출 리간드로서 이용될 수 있다.
- [0815] 리간드의 예는 R&D SYSTEMS, Inc. 회사 (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA) 에서 시판 중인, 카탈로그 참조 1220-PG-025의 재조합 인간 단백질 아그레간 G1-IGD-G2와 같은, 또는 UNITED STATES BIOLOGICAL (4 Technology Way, Salem, MA 01970, USA)에서 시판 중인, 카탈로그 참조 H7980-30의 HABP (히알루론산 결합 단백질; 소의 연골로부터 추출한 단백질)단백질과 같은 히알루론산에 특이적으로 결합하는 단백질을 포함한다.
- [0816] "샌드위치 (sandwich)" 형태를 사용하는 경우에, 이 재조합 단백질은 포획 리간드 및/또는 검출 리간드로서 이용될 수 있다.
- [0817] 상기 리간드 각각은 추가로 검출을 위한 적어도 하나의 마커, 보다 구체적으로 리간드의 구조 내에 본래 존재하지 않는 검출을 위한 적어도 하나의 마커, 예를 들어 형광단(예를 들어 ATTO™ 550, ATTO™ 663; ATTO-TEC GmbH, Siegen, Germany), 발색단, 효소(예를 들어, 홀스래디쉬 과산화 효소, 알칼리성 인산가수분해효소), 방사성 원소, 화학 원소의 동위 원소로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 부분을 포함한다.
- [0818] 본 발명은 또한 주로 선택된 순환 분자 중에서 하나에 특이적으로 결합하는 첫 번째 리간드, 및 선택된 순환 분자 중에서 또 다른 하나에 특이적으로 결합하는 두 번째 리간드인 적어도 두 개의 리간드 세트 또는 조합, 예를 들어 히알루론산에 특이적인 리간드 및 CXCL10에 특이적인 리간드의 세트 또는 조합에 관한 것이다.

- [0819] 상기 첫 번째 및 두 번째 리간드 각각은 그것의 검출을 위한 마커를 가지거나 갖지 않을 수도 있다. 상기 첫 번째 및 두 번째 리간드는 각각 그것의 검출을 위한 마커를 갖는다. 그들은 각각 동일한 마커를 갖거나, 또는 상이한 마커를 가질 수 있다.
- [0820] 상기 리간드는 예를 들어, 동시 사용을 위해, 개별적으로 또는 상이한 시간에 조합된 조제 내에서, 혼합물, 또는 별개의 형태 또는 물리적으로 서로 분리된 형태 일 수 있다.
- [0821] 하나의 실시예에 따르면, 세트 또는 조합은 위에 기재된 바와 같은 바이오마커로서 선택된 순환 분자를 포함하지 않는 순환 단백질에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다. 보다 구체적으로, 이 실시예에 따르면, 세트 또는 조합은 히알루론산 및 CXCL10 이외의 순환 단백질에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다. 보다 구체적으로, 이 실시예에 따르면, 세트 또는 조합은 A2M, GMCSF, IL-12, IL-2, MMP13, ALT, GGT, ICAM1, IL-4, CXCL9, VCAM1, RBP4, TIMP1, VIM, SPP1, AST, ApoA1, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 또는 MMP1에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다.
- [0822] 상기 세트 또는 조합은 간염 바이러스(예를 들어, C형 간염 바이러스 및/또는 B형간염 바이러스 및/또는 D형 간염 바이러스)에서 바이러스 수치의 검출 및/또는 측정을 위한 수단을 추가로 포함한다.
- [0823] 본 발명은 또한 각각 본 발명의 적어도 하나의 리간드 또는 적어도 하나의 리간드 세트 또는 조합을 포함하는 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트에 관한 것이다.
- [0824] 보다 구체적으로, 본 발명은 순환 분자, 즉, 예를 들어 CXCL10 및 히알루론산과 같은 생물학적 체액 (샘플) 내에 무세포 형태로 함유된 분자의 다중 검출에 각각 적합한 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트에 관한 것이다 (cf. 위의 “순환 분자”).
- [0825] 보다 구체적으로, 본 발명은 각각 다음을 포함하는 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트에 관한 것이다:
- [0826] - 선택된 순환 분자 중에서 하나에 특이적으로 결합하는 첫 번째 리간드(예를 들어, 첫 번째 단백질), 예를 들어, CXCL10에 특이적으로 결합하는 첫 번째 리간드(보다 구체적으로 첫 번째 단백질, 보다 구체적으로 항체); 및
- [0827] - 선택된 순환 분자 중에서 또 다른 하나에 특이적으로 결합하는 두 번째 리간드(예를 들어, 두 번째 단백질), 예를 들어, 히알루론산에 특이적으로 결합하는 두 번째 리간드(보다 구체적으로 두 번째 단백질).
- [0828] 보다 구체적으로, 본 발명은 특히 동시에, 분리된 또는 일시적으로 구분된 사용, 보다 구체적으로 제시간에 동시 사용을 위한 조합 제품(또는 조합된 형태 내에서, 또는 조합된 조제로서)으로서, 각각 첫 번째 및 두 번째 리간드를 포함하는 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트에 관한 것이다.
- [0829] 하나의 실시예에 따르면, 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트는 위에 기재된 바와 같이 바이오마커로서 선택된 순환 분자를 포함하지 않는 순환 단백질에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다. 보다 구체적으로, 이 실시예에 따르면, 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트는 히알루론산 및 CXCL10 이외의 순환 단백질에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다. 보다 구체적으로, 이 실시예에 따르면, 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 키트는 A2M, GMCSF, IL-12, IL-2, MMP13, ALT, GGT, ICAM1, IL-4, CXCL9, VCAM1, RBP4, TIMP1, VIM, SPP1, AST, ApoA1, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 또는 MMP1에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다.
- [0830] 따라서, 본 발명은 생물학적 체액 (샘플) 내에 무세포 형태로 함유되어 있는 분자의 다중 검출에 적합하고, 상기 분자의 리간드가 부착된 고체 지지체를 포함하는 제조 물품에 관한 것이다.
- [0831] 상기 제조 물품은 예를 들어 다음과 같을 수 있다:
- [0832] - 하나 이상의 튜브;
- [0833] - 키트, 특히 하나 이상의 튜브를 포함하는 키트;
- [0834] - 예를 들어, 플라스틱, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 유리, 실리콘, 니트로셀룰로오스, poly(vinylidene fluoride)[PVDF] 또는 중합체로 만들어지거나, 또는 산화 철과 같은 금속 물질을 포함하는 고체 또는 반-고체 지지체, 예를 들어 다음과 같다:
- [0835] ○ 예를 들어, 폴리프로필렌 및/또는 폴리스티렌으로 만들어진 웰(well)이 있는 플레이트(plate) 또는 마이크로 플레이트(microplate), 보다 구체적으로 적정 및/또는 고 처리량 스크리닝에 적합한 웰이 있는 플레이트 또는

마이크로플레이트(고 처리량 스크리닝 마이크로 플레이트);

- [0836] ○ 도성 또는 반도체 물질로 만들어진 칩(chip) 또는 마이크로어레이(microarray)(집적 회로를 가진), 보다 구체적으로 실리콘 와퍼 칩(또는 마이크로어레이), 보다 구체적으로 실리콘으로 만들어진 칩(또는 마이크로어레이);
- [0837] ○ 모세관, 보다 구체적으로 유리관;
- [0838] ○ 마이크로미터보다 작은 평균 지름을 가진 마그네틱 비드(magnetic bead);
- [0839] ○ 유리 슬라이드;
- [0840] ○ 막 (예를 들어, 니트로셀룰로오스 또는 PVDF로 만들어진 막).
- [0841] 보다 구체적으로, 고 처리량 스크리닝을 위한 마이크로플레이트가 사용될 수 있다(cf. 실시예 10). 이들 마이크로플레이트의 웰은 생체 분자, 보다 구체적으로 단백질을 흡수하는 능력을 갖고 있다. 그들은 일반적으로 우수한 열적 및 화학적 안정성 뿐만 아니라 우수한 광학 특성을 갖고 있다. 그들은 일반적으로 폴리스티렌 및/또는 폴리프로필렌으로 만들어졌다. 각 마이크로플레이트는 많은 웰, 일반적으로 96개의 웰을 함유한다. 이들 마이크로플레이트는 부피가 액적(droplet) 마다 100 nL 보다 낮은 상기 첫 번째 및 두 번째 리간드 액적의 열(row)을 수용하도록 고안되어 있다.
- [0842] 상기 첫 번째 및 두 번째 리간드는 제조 물품 위에 부착되고, 고정되고 또는 접합되거나 또는 제조 물품에 공유 결합될 수 있다.
- [0843] 제조 물품은 예를 들어, 500 μ L 보다 작거나 같은(보다 구체적으로 400 μ L 보다 작거나 같은, 보다 구체적으로 100 μ L 보다 작거나 같은) 부피를 갖는 생물학적 체액 (샘플) 내에 무세포 형태로 함유된 분자의 다중 검출에 적합한 제조 물품의 형태 일 수 있으며, 상기 고체 지지체는 많은 액체 샘플 수용 영역을 포함하며, 상기 영역은 유동적으로 서로 독립적이며, 각각은 영역 마다 단일 액체 샘플의 수용에 적합한 것을 특징으로 하며, 각 영역이 수용할 수 있는 액체 샘플의 최대 부피는 500 μ L(보다 구체적으로 400 μ L 보다 작거나 같은, 보다 구체적으로 100 μ L 보다 작거나 같은)를 초과하지 않는 것을 특징으로 하고, 및 상기 액체 샘플 수용 영역의 적어도 하나는 상기 첫 번째 리간드 및 상기 두 번째 리간드(보다 구체적으로, 상기 첫 번째 단백질 및 상기 두 번째 단백질) 모두를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 액체 샘플 수용 영역은 예를 들어, 적정 및/또는 고 처리량 스크리닝을 위한 플레이트 또는 마이크로플레이트의 웰, 실리콘 칩에서 스팟(spot)의 수용 웰, 유리관의 원통형 부분, 막, 유리 슬라이드, 튜브일 수 있다.
- [0844] 제조 물품에서, 상기 첫 번째 리간드 및 상기 두 번째 리간드(보다 구체적으로, 상기 첫 번째 단백질 및 상기 두 번째 단백질)는 500 μ L 보다 작거나 같은(보다 구체적으로 400 μ L 보다 작거나 같은, 보다 구체적으로 100 μ L 보다 작거나 같은) 부피를 갖는 하나의 액체 샘플만 상기 첫 번째 단백질 및 상기 두 번째 단백질 모두와 접촉할 수 있는 형태로 상기 고체 지지체에 부착(또는 고정 또는 접합 또는 공유 결합)될 수 있다.
- [0845] 제조 물품에서, 상기 첫 번째 리간드(보다 구체적으로, 상기 첫 번째 단백질)는 첫 번째 결합 지점에서 상기 고체 지지체에 부착(또는 고정 또는 접합 또는 공유 결합)될 수 있고, 상기 두 번째 리간드(보다 구체적으로, 상기 두 번째 단백질)는 두 번째 부착 지점에서 상기 고체 지지체에 부착(또는 고정 또는 접합 또는 공유 결합)될 수 있으며, 상기 첫 번째 부착 지점은 상기 두 번째 부착 지점과 유동적 통로 안에 있는 것을 특징으로 한다.
- [0846] 첫 번째 및 두 번째 리간드 각각은 포획 리간드로서 사용될 수 있다(예를 들어, 샌드위치 형태에서 검출의 경우에 추가적으로 사용하는 적어도 하나의 검출 마커를 갖는 검출 리간드; cf. 아래의 조성물, cf. 실시예 10).
- [0847] 하나의 실시예에 따르면, 제조 물품에 함유되어 있는 순환 분자의 리간드는 A2M, GMCSF, IL-12, IL-2, MMP13, ALT, GGT, ICAM1, IL-4, CXCL9, VCAM1, RBP4, TIMP1, VIM, SPP1, AST, ApoA1, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 또는 MMP1에 결합하는 리간드를 포함하지 않는다.
- [0848] 하나의 실시예에 따르면, 제조 물품에 함유되어 있는 순환 분자의 리간드는 다음과 같이 구성된다:
- [0849] - 히알루론산에 특이적으로 결합하는 첫 번째 리간드(예를 들어, 첫 번째 단백질);
- [0850] - CXCL10에 특이적으로 결합하는 두 번째 리간드(예를 들어, 두 번째 단백질).
- [0851] 선택적으로, 제조 물품은 추가로 리간드가 특이적으로 결합하는 분자를 정량화하기 위한, 예를 들어 CXCL10 및

히알루론산을 정량화하기 위한 명령(예를 들어, 명령서), 보다 구체적으로 이들 분자를 정량화하고 획득한 정량화 값으로부터 간 섬유증 단계 또는 스코어를 결정하기 위한 명령을 포함한다.

- [0852] 상기 제조 물품은 다음의 요소 중에서 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다:
- [0853] - 특히, 상기 샘플을 수집하기 위한 명령
- [0854] ○ 바늘 및/또는 주사기, 보다 구체적으로 혈액과 같은 신체 내부의 체액을 수집하기 위한 바늘 및/또는 주사기; 및/또는
- [0855] ○ 간세포의 파괴에 적합한 바늘, 예를 들어, 18에서 22G의 지름을 갖는 바늘; 및/또는
- [0856] ○ PBH에 적합한 바늘 및/또는 카테터(catheter) 및/또는 생검용 총(biopsy gun);
- [0857] - 컴퓨터 프로그램 또는 소프트웨어 제품, 특히 통계 분석을 위한 컴퓨터 프로그램 또는 소프트웨어 제품, 예를 들어 아래에 기재된 바와 같은 발명의 컴퓨터 프로그램 제품.
- [0858] 본 발명은 또한 분자의 다중 검출에, 보다 구체적으로 체액 내에 무세포 형태로 함유된 분자(CXCL10 및 히알루론산 분자와 같은)의 다중 검출에 적합하고, 혼합물 내에서 다음을 포함하는 조성물에 관한 것이다:
- [0859] - 첫 번째 검출 마커를 갖는 첫 번째 리간드, 및
- [0860] - 두 번째 검출 마커를 갖는 두 번째 리간드.
- [0861] 상기 첫 번째 검출 마커는 상기 두 번째 검출 마커와 같거나 상이할 수 있다.
- [0862] 첫 번째 리간드 및 두 번째 리간드 각각은 상이한 순환 분자(위에 기재된 바와 같이 바이오마커로서 선택된 순환 분자)에 대해 특이적이다.
- [0863] 보다 구체적으로, 상기 첫 번째 리간드는 히알루론산에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질)이고, 상기 두 번째 리간드는 (인간의) CXCL10에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질, 보다 구체적으로 항체), 보다 구체적으로 하나, 적어도 하나, 몇몇의 또는 모든 (인간의) CXCL10 단백질 순환 형태에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질, 보다 구체적으로 항체)이다.
- [0864] 첫 번째 및 두 번째 리간드는 예를 들어, 검출 리간드로서 사용될 수 있다(예를 들어, 포획 리간드를 갖는 샌드위치 형태에서 검출의 경우에; cf. 위의 제조 물품; cf. 실시예 10).
- [0865] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:
- [0866] - 하나 이상의 간염 바이러스에 특이적으로 결합하는 핵산, 및 추가로 다음을 포함한다
- [0867] - 생물학적 체액 내에서 무세포 형태로 함유된 분자에 결합하는 리간드, 상기 리간드는 제시간에 분리, 구분 또는 동시 사용을 위하여, 보다 구체적으로 혼합물 내에서 사용을 위하여 조합된 조제 내에서 키트 내에 함유된다.
- [0868] 생물학적 체액 내에 무세포 형태로 함유된 분자에 결합하는 상기 리간드는 다음과 같이 구성된다:
- [0869] - 첫 번째 검출 마커를 갖는 첫 번째 리간드, 및
- [0870] - 두 번째 검출 마커를 갖는 두 번째 리간드.
- [0871] 상기 첫 번째 검출 마커는 상기 두 번째 검출 마커와 같거나 상이할 수 있다.
- [0872] 첫 번째 리간드 및 두 번째 리간드 각각은 상이한 순환 분자(위에 기재된 바와 같이 바이오마커로서 선택된 순환 분자)에 대해 특이적이다.
- [0873] 보다 구체적으로, 상기 첫 번째 리간드는 히알루론산에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질)이고, 상기 두 번째 리간드는 (인간의) CXCL10에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질, 보다 구체적으로 항체), 보다 구체적으로 하나, 적어도 하나, 몇몇의 또는 모든 (인간의) CXCL10 단백질 순환 형태에 특이적으로 결합하는 리간드(예를 들어, 단백질, 보다 구체적으로 항체)이다.
- [0874] 첫 번째 및 두 번째 리간드는 예를 들어, 검출 리간드로서 사용될 수 있다(예를 들어, 포획 리간드를 갖는 샌드위치 형태에서 검출의 경우에; cf. 위의 제조 물품; cf. 실시예 10).

- [0875] 키트는 위에 기재된 바와 같은 제조 물품을 추가로 포함한다.
- [0876] 본 발명은 또한 상기 리간드, 리간드의 세트 또는 조합, 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 간 조직 병변을 포함하는 간 질환을 검출 또는 진단하기 위한, 보다 구체적으로 간 섬유증, 보다 구체적으로 환자의 간 섬유증 스코어를 결정하기 위한, 보다 구체적으로 간 섬유증, 보다 구체적으로 환자의 간 섬유증 스코어가 경 섬유증 스코어를 초과하였는지 여부를 결정하기 위한, 보다 구체적으로 환자의 간 섬유증이 기껏해야 메타비르 스코어 F1, 또는 적어도 F2를 갖는지 여부를 결정하기 위한 방법에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0877] 본 발명은 또한 상기 리간드, 리간드의 세트 또는 조합, 제조 물품, 조성물, 약학 조성물, 간 조직 병변을 포함하는 간 질환, 보다 구체적으로 간 섬유증을 치료하기 위한 방법에 사용되기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0878] 특히, 그러한 사용은 다음을 포함할 수 있다:
- [0879] - 환자의 간 섬유증 스코어가 경 섬유증 스코어를 초과하였는지 여부를 결정하기 위한, 보다 구체적으로 환자의 간 섬유증이 기껏해야 메타비르 스코어 F1, 또는 적어도 F2를 갖는지 여부를 결정하기 위한 본 발명의 방법에서의 상기 리간드의 사용; 및
- [0880] - 환자가 경 섬유증 단계의 스코어(메타비르 스코어에서 적어도 F2)를 초과하는 간 섬유증 스코어를 갖는 경우에, 간 섬유증 진행을 막는 것을 목표로 하는 치료(단일요법 또는 리바비린(ribavirin)을 포함하는 다중요법에서 표준의 또는 pegylated 인터페론을 포함하는 치료와 같은)를 시행하는 단계.
- [0881] 본 방법은 스코어가 경 섬유증 스코어를 초과하지 않는 한, 치료가 시행되지 않는다는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0882] 이 치료는 예를 들어 다음과 같다:
- [0883] - 약 1.5 g/kg/week의 투여량의 pegylated 인터페론 alpha-2b (PEG-INTRON[®]과 같은, Schering Plough Corporation, Kenilworth, NJ) 및 800에서 1200 mg/kg/day의 투여량(간 질환이 유전자형 2 또는 3의 C형 간염 바이러스를 의미하는 경우에, 약 800 mg/kg/day의 투여량이 일반적으로 권장된다)의 리바비린 (REBETOL[®]; Schering Plough Corporation, Kenilworth, NJ), 또는
- [0884] - 180g/kg/week 농도의 pegylated 인터페론 alpha-2a (PEGASYS[®]와 같은; Roche Corp.; F.Hoffmann-La Roche Ltd.; Basel, Switzerland) 및 1000에서 1200 mg/kg/day 투여량의 리바비린 (COPEGUS[®], Roche Corp.; F. Hoffmann-La Roche Ltd.; Basel, Switzerland).
- [0885] 치료 기간은 예를 들어, 적어도 24주, 예를 들어, 유전자형 2 또는 3의 C형 간염 바이러스 간 질환의 경우 24주, 또는 유전자형 1, 4 또는 5의 C형 간염 바이러스 간 질환의 경우 또는 24주 말까지 치료에 반응하지 않은 환자의 경우 48주 일 수 있다.
- [0886] 본 발명은 또한 본 발명의 치료 방법에 사용하기 위한, 간 조직의 손상, 보다 구체적으로 간 섬유증을 포함하는 간 질환의 치료를 위한 의약품 또는 의약품 조합(단일요법 또는 하나 이상의 다른 활성 성분 특히, 리바비린을 포함하는 다중요법에서 표준의 인터페론 또는 pegylated 인터페론과 같은)과 관련이 있다.
- [0887] 본 명세서에서, “간 질환” 용어는 일반적인 의미, 즉, 손상된 간, 보다 구체적으로 간 조직의 손상, 보다 구체적으로 간 병변, 특히 간 섬유증을 의미한다.
- [0888] 본 발명은 보다 구체적으로 만성 간 질환과 관련이 있다(6개월 이상의 간의 만성 질환).
- [0889] 다른 질병이 간 섬유증과 같은 간 병변을 유발시키거나 및/또는 이로 인해 유발된다. 특히, 다음과 같은 질병이 언급된다:
- [0890] - 바이러스성 만성 간염(특히 만성 B형 간염, 만성 C형 간염, 만성 D형 간염);
- [0891] - 지방증 및 지방간염 (대사 증후군, 비만, 당뇨와 관련됨);
- [0892] - 알코올성 간염;
- [0893] - 유전적 혈색소증 및 두 번째의 철분 과다;
- [0894] - 자가 면역 질환;

- [0895] - 쓸개 질환 (원발 쓸개관 간경화 및 원발 경화 쓸개관염);
- [0896] - 의약품이나 독성 물질에 의한 중독;
- [0897] - 대사 질환;
- [0898] - 비-알콜성 지방간염(NASH).
- [0899] 본 발명은 보다 구체적으로 바이러스성 간염, 특히 C형 간염 바이러스(HCV) 및/또는 B형 간염 바이러스(HBV) 및/또는 D형 간염 바이러스(HDV), 특히 적어도 C형 간염 바이러스의 바이러스성 간염(및 선택적으로 B형 간염 바이러스 및 D형 간염 바이러스)에 적합하다.
- [0900] 본 발명은 또한 처리 장치의 메모리, 또는 상기 처리 장치의 판독기와 협력하도록 의도된 고정식 데이터 캐리어 (data carrier) 상에 저장되도록 의도된 컴퓨터 프로그램 제품에 관한 것이다. 컴퓨터 프로그램 제품은 방법을 수행하거나 또는 본 발명의 제품을 사용하기 위한, 특히 본 발명의 방법을 수행하는 데에 적합한 통계 분석을 수행하기 위한[특히 선택된 바이오마커의 (다변수의) 통계 분석에 적합한], 및/또는 방법을 수행하거나 또는 본 발명의 제품을 사용하는 데에 적합한 (다변수의) 분류 모델 구축을 위한 명령을 포함한다.
- [0901] 본 발명은 또한 메모리에 다음과 같이 저장 또는 등록된 처리 장치를 포함하는, 컴퓨터 설치, 컴퓨터 장치, 컴퓨터에 관한 것이다:
- [0902] - 본 발명의 컴퓨터 프로그램 제품, 및 선택적으로
- [0903] - 선택된 바이오마커의 정량화 값.
- [0904] “내포하는” 또는 “함유하는” 과 교체할 수 있는, “포함하는” 용어는 명시적으로 언급되지 않은 하나 이상의 추가적인 요소, 성분 또는 진행 단계의 존재를 배제하지 않는 열린 용어이며, 반면에 “구성하는” 또는 “이루는” 용어는 명시적으로 기재되지 않은 어떠한 다른 추가적인 요소, 단계 또는 성분의 존재를 배제하는 폐쇄된 용어이다. “본질적으로 구성하는” 또는 “본질적으로 이루는” 용어는 추가적인 요소, 성분 또는 단계가 본 발명의 본질적인 특성에 필수적으로 영향을 주지 않는 한, 하나 이상의 추가적인 요소, 성분 또는 단계의 존재를 배제하지 않는 부분적으로 열린 용어이다.
- [0905] 결론적으로, “포함하는” (또는 “포함하다”) 용어는 “본질적으로 구성하는” 및 “본질적으로 이루는” 용어 뿐만 아니라 “구성하는”, “이루는” 용어를 내포한다.
- [0906] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위하여, 기재는 다양한 문단, 단락 및 실시예로 분리되어 있다. 이러한 분리가 문단, 단락 또는 실시예의 내용과 또 다른 문단, 단락 또는 실시예의 내용과 분리한다는 것으로 이해되어서는 안된다. 반대로, 기재는 그것이 함유하는 상이한 문단, 단락, 문장 및 실시예의 모든 가능한 조합을 포함한다.
- [0907] 본 명세서에서 인용된 서지 참조의 내용은 본 명세서의 내용에 참조로서 명확하게 포함된다.
- [0908] 다음의 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제시된 것이다. 그들은 어떤 수단으로도 본 발명을 제한하지 않는다.

실시예 1

- [0909] :간 조직 생검(PBH)에 의해 섬유증 정도가 결정되는 환자 집단에 대한 히알루론산 + CXCL10의 결정 및 적용
- [0910] 환자 집단은 Beaujon 병원(100, boulevard du General Leclerc; 92110 Clichy; France)의 C형 간염 바이러스 유전자형의 전부 또는 대부분을 포함하는, C형 간염 바이러스(HCV) 감염에 의한 만성 간염을 나타내는 환자들로 구성되어 있다.
- [0911] 상기 환자의 간 섬유증 스코어는 간 조직 생검(PBH)에 의해 결정된다. 이 집단은 118명의 환자로 구성되고, 그 중에서 73명은 F1 섬유증 스코어를 나타내고, 45명은 F2 섬유증 스코어를 나타낸다(메타비르 F 스코어 시스템에 따라서 PBH에 의해 결정된 스코어, 승인된 병리학자에 의한 두 개의 독립적인 측정). 수행된 연구는 헬싱키 (Helsinki) 선언에 따라서 지역 윤리 위원회의 승인을 받았다. 모든 환자는 서면 동의서를 제출했다.
- [0912] 이들 118명의 환자의 특성은 아래의 표 1에 나와 있다.

표 1

변수	전체 집단	F1 환자	F2 환자
n	118	73	45

성별 [남자 (%)/여자 (%)]	54 (46) / 64 (54)	27 (37) / 46 (63)	27 (60) / 18 (40)
샘플링 날짜에서의 나이 [mean ± SD (min-max)]	49.1 ± 11.2 (21-71)	46.7 ± 11.0 (21-71)	53.1 ± 10.4 (32-71)
알라닌 아미노기전달효소 (ALT) IU/L [mean ± SD (min-max)]	95 ± 83 (22-647)	77 ± 54 (22-308)	122 ± 111 (36-647)
HCV 유전자형 [n (%)]			
1	61 (52)	34 (47)	27 (60)
2	15 (13)	11 (15)	4 (9)
3	12 (10)	7 (10)	5 (11)
4	23 (19)	16 (22)	7 (16)
5	4 (3)	3 (4)	1 (2)
6	2 (2)	1 (1)	1 (2)
unknown	1 (1)	1 (1)	0 (0)
샘플링 날짜에서의 바이러스 수치 (VL): copies/mL [mean (min-max)]	5.6×10^6 ($1.4 \times 10^4 - 5.9 \times 10^7$)	4.8×10^6 ($3.7 \times 10^4 - 2.7 \times 10^7$)	7.0×10^6 ($1.4 \times 10^4 - 5.9 \times 10^7$)

[0914] SD = 표준편차; IU = 국제 단위

[0915] CXCL10 단백질 및 히알루론산(HA)의 혈청 농도는 시판 중인 ELISA 키트를 사용하여 상기 환자의 혈청 내에서 측정된다(고체 상에서 샌드위치).

[0916] 인간 CXCL10의 혈청 농도에 대하여, 이용된 키트는 R&D Systems, Inc.(614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA)에서 시판 중인, 카탈로그 참조 DIP100의 QUANTIKINE[®] HUMAN CXCL10/IP-10 ELISA 키트이다.

[0917] 히알루론산(HA)의 혈청 농도에 대하여, 이용된 키트는 R&D Systems, Inc.(614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA)에서 시판 중인, 카탈로그 참조 DHYALO의 HYALURONAN QUANTIKINE[®] ELISA 키트이다.

[0918] 간 섬유증 스코어에 따른 CXCL10 및 히알루론산 분자의 농도 분포는 각각 도 1 및 도 2에 나와 있다.

[0919] CXCL10 및 히알루론산 혈청 농도 값은 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq$ F2)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $<$ F2)을 나타내는 환자로부터 판별하는 판별 규칙을 구축하기 위하여, mROC 방법에 의해 합쳐진다.

[0920] CXCL10 및 히알루론산 혈청 농도 값은 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq$ F2)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $<$ F2)을 나타내는 환자로부터 판별하는 판별 규칙을 구축하기 위하여, 샘플링 날짜에서의 체질량지수(BMI), 샘플링 날짜에서의 나이(Age), 샘플링 날짜에서의 환자의 바이러스 수치(VL)와 같은, 임상적인 파라미터를 가진 mROC 방법에 의해 합쳐진다.

[0921] mROC 방법은 특히, Kramar et al. 1999 및 Kramar et al. 2001에서 기재된 바와 같이 다변수의 수신기 작동 특성 방법이다.

[0922] mROC 방법은 상이한 바이오마커(BMQ)를 합치는 선형 함수 [$Z = a(BMQ_1) + b(BMQ_2) + \dots$] 뿐만 아니라, 이 선형 함수에 대하여 최상의 성능을 부여하는 참조 값(Youden index를 최대화하는 임계 값, δ)를 생성한다.

[0923] 각각 지정된 이와 같이 생성된 선형 함수 및 참조 값은 아래의 표 2에 나열되어 있다.

[0924] 이 실시예에 있어서, 다른 실시예 및 본 명세서의 다른 어느 내용과 매우 유사한, 지수 t는 선형 함수에 적용된 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 값의 Box-Cox 변환된 형태(Box and Cox 1964)라는 것을 나타낸다:

[0925] $BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda$. 파라미터 λ 의 값은 아래의 표 2에 나타냈다.

표 2

바이오마커	판별 규칙		임계 값의 예 (Youden index를 최대화하는 임계 값 (δ))
	선형 함수 (mROC에 의해 생성된)	Box-Cox 표준화 파라미터(λ)	
CXCL10	$Z = CXCL10^t$	CXCL10: -0.013	5.611
HA	$Z = HA^t$	HA: 0.099	4.683
HA + CXCL10	$Z = (0.3686) \times CXCL10^t + (0.3064) \times HA^t$ [function Z1]	CXCL10: -0.013 HA: 0.099	3.382
HA + CXCL10 + BMI + Age	$Z = (0.3313) \times CXCL10^t + (0.25154) \times HA^t + (0.0143) \times Age^t + (-9.8818) \times BMI^t$ [function Z2]	CXCL10: -0.013 HA: 0.099 Age: 1.086 B MI: -0.923	-6.263
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	$Z = (0.2914) \times CXCL10^t + (0.2569) \times HA^t + (0.01419) \times age^t + (-9.3855) \times BMI^t + (0.0140) \times VL^t$ [function Z3]	CXCL10: -0.013 HA: 0.099 Age: 1.086 BMI: -0.923 VL: 0.159	-5.730

위의 표 2에서:

HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도

CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도

Age = 샘플링 날짜에서의 환자 나이

BMI = 샘플링 날짜에서의 환자의 체질량 지수 (질량/신장²)

VL = 10³ copies/mL로 표시된, 샘플링 날짜에서의 환자의 바이러스 수치

함수 Z가 주어진 환자에 적용된다면, 다음과 같다:

- 상기 환자는 상기 환자에 대한 함수 Z의 값이 함수 Z와 관련된 Youden index를 최대화하는 임계 값(δ)보다 크거나 같다면, 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 크거나 같은 클래스에 지정된다;

- 역으로, 상기 환자는 상기 환자에 대한 함수 Z의 값이 임계 값 δ 보다 낮다면, 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 낮은 클래스에 지정된다.

예를 들어, 다른 마커와 조합하지 않고 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커를 조합하는 선형 함수에 대하여 다음과 같다[주로 함수 $Z = (0.3686) \times CXCL10^t + (0.3064) \times HA^t$]:

- 주어진 환자에 대한 상기 함수 Z의 값이 임계 값 3.382 보다 크거나 같다면, 이 환자는 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 크거나 같은 클래스에 지정된다;

- 역으로, 주어진 환자에 대한 상기 함수 Z의 값이 임계 값 3.382 보다 낮다면, 이 환자는 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 낮은 클래스에 지정된다.

예를 들어, 체질량 지수 및 나이 바이오마커 뿐만 아니라 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커를 조합하는 선형 함수에 대하여 다음과 같다[주로 함수 $Z = (0.3313) \times CXCL10^t + (0.25154) \times HA^t + (0.0143) \times age^t - (9.8818) \times BMI^t$]:

- 주어진 환자에 대한 상기 함수 Z의 값이 임계 값 -6.263 보다 크거나 같다면, 이 환자는 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 크거나 같은 클래스에 지정된다;

[0941] - 역으로, 주어진 환자에 대한 상기 함수 Z의 값이 임계 값 -6.263 보다 낮다면, 이 환자는 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2보다 낮은 클래스에 지정된다.

[0942] 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq$ F2)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $<$ F2)을 나타내는 환자로부터 판별하기 위한 118명의 환자에 대한 분류 모델의 적용은 아래의 표 3에 나열된 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과를 나타낸다.

표 3

[0943]	바이오마커	분류되지 않은 환자 비율	Se	Spe	PPV	NPV	correct classification rate	AUC
	CXCL10	0%	73%	55%	50%	77%	62%	0.583
	HA	0%	62%	73%	58%	76%	69%	0.681
	HA + CXCL10	0%	78%	59%	54%	81%	66%	0.704
	HA + CXCL10 + BMI + Age	0%	76%	70%	61%	82%	72%	0.729
	HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	0%	76%	71%	62%	83%	73%	0.731

[0944] 특정 성능은 개별적으로 사용되는 동일한 바이오마커 보다 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 조합에 의해 개선되는 것으로 밝혀졌다.

[0945] 특히, AUC 값의 경우에, 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 조합에 대하여 0.7 보다 크지만, 반면에 개별적으로 사용되는 바이오마커 각각에 대하여는 0.7 보다 낮다:

[0946] 다른 마커 없이 히알루론산 + CXCL10 바이오마커의 조합에 대한 0.704의 AUC [히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이에 대한 0.729의 AUC, 및 히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 + 바이러스수치에 대한 0.731의 AUC], 대

[0947] 개별적으로 사용된 CXCL10에 대한 0.583 및 개별적으로 사용된 히알루론산에 대한 0.681의 AUC.

[0948] 이는 민감도의 성능에 대한 경우에도 다음과 같다:

[0949] 다른 마커 없이 히알루론산 + CXCL10 바이오마커의 조합에 대한 78%의 음성예측도[히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 또는 히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 + 바이러스수치 조합에 대한 76%의 민감도], 대

[0950] 개별적으로 사용된 CXCL10에 대한 73% 및 개별적으로 사용된 히알루론산에 대한 62%의 민감도.

[0951] 이는 음성예측도의 성능에 대한 경우에도 다음과 같다:

[0952] 다른 마커 없이 히알루론산 + CXCL10 바이오마커의 조합에 대한 81%의 민감도[히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 또는 히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 + 바이러스수치에 대한 82% 또는 83%의 민감도], 대

[0953] 개별적으로 사용된 CXCL10에 대한 77% 및 개별적으로 사용된 히알루론산에 대한 76%의 음성예측도.

[0954] 따라서, 두 개의 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 조합은 이러한 바이오마커의 개별적인 성능을 단순히 더하는 것을 뛰어 넘는 상승 효과를 생성한다는 점을 알 수 있다.

[0955] 히알루론산의 농도 및 CXCL10 발현은 동일한 방향으로 이동하기 때문에, 이 상승 효과는 예상되지 않았다. 실제로, 히알루론산은 CXCL10의 발현을 유도한다. 따라서, 히알루론산의 농도가 증가하면, CXCL10 발현도 증가한다. 그러나, 동일한 방향으로 함께 이동하는 두 개의 바이오마커의 조합이 각각 개별적으로 제공되는 것과 비교하여 추가적인 정보를 제공할 것으로 예상되지 않았다.

[0956] 히알루론산 및 CXCL10의 조합은, 선택적으로 간 섬유증 단계 결정에서 우수한 성능을 나타내는 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커와 결합한다.

실시예 2

- [0957] : 공중이 사용 가능한 비-침습적인 검사와의 비교(실시에 1과 동일한 환자 집단)
- [0958] 실시예 1의 118명의 환자들을 공중이 추가적으로 사용 가능한 간 섬유증 단계의 측정 검사(시판 중이거나 과학 논문에 기재된 검사)와 비교를 위해 검사하였다.
- [0959] 다음과 같은 다섯 개의 검사가 수행되었다: HEPAScore™ 검사, FIBROTEST™ 검사, APRI 검사, Forns 검사 및 SHASTA 검사.
- [0960] HEPAScore™ 검사는 QUEST DIAGNOSTICS (3 Giralda Farms, Madison, NJ 07940, USA)에 의해 상용화되고, Adams et al. 2005에 기재되어 있다.
- [0961] FIBROTEST™ 검사는 BIOPREDICTIVE (40, rue du Bac, 75007 Paris, France)에 의해 상용화되고, Imbert-Bismut et al. 2001에 기재되어 있다.
- [0962] APRI 검사는 Wai et al. 2003에 기재되어 있다.
- [0963] Forns 검사는 Forns et al. 2002 에 기재되어 있다.
- [0964] SHASTA 검사는 Kelleher et al. 2005에 기재되어 있다.
- [0965] 이들 검사 중에서 현재 가장 자주 사용되는 것은 FIBROTEST™ 검사이다.
- [0966] 이들 검사 각각은 제조업자의 지시에 따라서, 또는 적용 가능한 경우, 과학 논문의 저자의 지시에 따라서 수행되었다.
- [0967] 이들 다섯 개 검사의 파라미터는 아래의 표 4에 기재되어 있다.
- [0968] A2M = alpha 2 macroglobulin의 농도
- [0969] GGT = 감마 글루타밀 전달효소의 농도
- [0970] APOA1 = apolipoprotein A1의 농도
- [0971] Hapto = 합토클로빈(haptoglobin)의 농도
- [0972] Bilirubin = 총 빌리루빈의 농도
- [0973] ASAT = 아스파르트산 아미노기전달효소의 농도
- [0974] 혈소판 = 혈소판의 농도
- [0975] 콜레스테롤 = 총 콜레스테롤의 농도
- [0976] 알부민 = 알부민의 농도
- [0977] AST = 아스파르트산 아미노기전달효소의 농도
- [0978] 히알루론산 = 히알루론산의 농도
- [0979] 나이 = 샘플링 날짜에서의 나이
- [0980] 성별 = 환자의 성별 (여성 또는 남성)

표 4

[0981] 검사 이름	FIBROTEST™	HEPAScore™	APRI	Forns	SHASTA
검사에 포함된 바이오마커의 수	결정에 요구되는 5개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 7개	결정에 요구되는 4개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 6개	2	결정에 요구되는 3개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 4개	3
생화학적 바이오마커	A2M GGT APOA1 Hapto Bilirubin	A2M GGT Bilirubin HA	ASAT Platelets	GGT Platelets Cholesterol	Albumin AST HA

임상적인 바이오마커	Age Sex	Age Sex	-	Age	-	
검사에서 권유되는 참조 임계 값	0.48: $\geq$ F2 0.28: $<$ F2 0.28 에서 0.47 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	≥ 0.5 : $\geq$ F2 < 0.5 : $<$ F2	> 1.5 : $\geq$ F2 ≥ 0.5 : $<$ F2 0.5 에서 1.5 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	> 6.9 : $\geq$ F2 < 4.21 : $<$ F2 4.21 에서 6.9 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	Threshold 1 ≥ 0.8 : $\geq$ F2 < 0.8 : $<$ F2	Threshold 2 ≥ 0.3 : $\geq$ F2 < 0.3 : $<$ F2

[0982] 이들 다섯 개의 비-침습적인 검사는 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq$ F2)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $<$ F2)을 나타내는 환자로부터 판별하기 위하여 실시예 1의 118명의 환자 집단에 적용되었다.

[0983] 획득한 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과는 아래의 표 5에 나열되어 있다.

[0984] 아래의 표 5는 추가로 동일한 환자 집단에 대한 히알루론산 + CXCL10 조합으로 획득한 결과(위의 실시예 2에서의 히알루론산 + CXCL10 조합)와 이들 결과의 비교를 보여준다.

표 5

	분류되지 않은 환자의 비율	Se	Spe	PPV	NPV	Rate of correct classification (*)	Global rate of correct classification (\$)
HEPASCORE™	0%	67%	75%	63	79	72%	72%
SHASTA [threshold 1]	0%	51%	15%	27	33	29%	29%
SHASTA [threshold 2]	0%	67%	14%	32	40	34%	34%
FIBROTEST™	22%	74%	68%	59	81	71%	55%
APRI	42%	26%	96%	71	77	76%	44%
FORNS	50%	35%	93%	67	78	76%	38%
이전에 보았던 바와 같이, 히알루론산 + CXCL10 조합의 결과 (본 발명에 따른 실시예 1의 조합, cf. 위의 표 3)는 다음과 같다:							
HA + CXCL10	0%	78%	59%	54%	81%	66%	66%
HA + CXCL10 + BMI + Age	0%	76%	70%	61%	82%	72%	72%
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	0%	76%	71%	62%	83%	73%	73%

[0986] (*): 분류될 수 있는 환자에 대해 계산된 비율

[0987] (\$): 총 집단(n = 118)에 대하여 계산된 비율

[0988] 히알루론산과 CXCL10 조합은 현재 공중이 사용 가능한 검사, 특히 전체적인 정확 분류 비율, 정확 분류 비율, 민감도 및 음성예측도의 측면에서 적어도 비교해도 나쁘지 않은, 진단 성능을 달성할 수 있다.

[0989] 특히, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)에 의해 달성된 성능은 명백하게 SHASTA, APRI 및 FORNS 검사보다 우수하다는 점이 관찰되었다.

[0990] FIBROTEST™ 검사와 비교에 있어서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 특히, 다음과 같은 특성을 갖는다:

[0991] - FIBROTEST™ 검사를 받은 환자의 22%는 섬유증 스코어를 받지 못하는 반면에 모든 환자를 분류할 수 있다는 장점, 및 추가로

- [0992] - FIBROTEST™ 검사에 있어서, 다섯 개의 바이오마커(A2M, GGT, APOA1, Hapto 및 Bilirubin)가 확인되어야 하는 반면에 단지 두 개의 바이오마커(히알루론산 및 CXCL10)의 확인이 요구되는 장점.
- [0993] HEPAScore™ 검사와 비교에 있어서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 특히, HEPAScore™ 검사에 있어서, 네 개의 바이오마커(A2M, GGT, Bilirubin 및 히알루론산)가 확인되어야 하는 반면에 단지 두 개의 바이오마커(히알루론산 및 CXCL10)의 확인이 요구되는 장점을 갖고 있다. 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 HEPAScore™ 검사보다 개선된 민감도 성능을 나타내는 것이 또한 관찰되었다.
- [0994] 따라서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 적어도 가장 자주 사용되는 두 개의 검사 즉, HEPAScore™ 및 FIBROTEST™의 진단 성능 보다 만족할만한 진단 성능을 나타내며, 반면에 훨씬 더 수행하기 쉽다(그리고 빠르고, 더 저렴하고 및 안전하다).

실시예 3

- [0995] : 실시예 1의 환자 집단과 독립적인 환자 집단에 대한 히알루론산 + CXCL10의 결정 및 적용
- [0996] 실시예 1의 환자 집단과 독립적인 환자 집단이 생성되었다. 이 독립적인 집단은 Haut-Leveque (1, avenue Magellan; 33600 Pessac; France) 병원의 C형 간염 바이러스 유전자형의 전부 또는 대부분을 포함하는, C형 간염 바이러스(HCV) 감염에 의한 만성 간염을 나타내는 310명의 환자로 구성되어 있다.
- [0997] 수행된 연구는 헬싱키 선언에 따라서 지역 윤리 위원회의 승인을 받았다. 모든 환자는 서면 동의서를 제출했다.
- [0998] 간 조직 생검(PBH)은 현재 거의 더 이상 사용되지 않기 때문에, 섬유증 단계는 과학계에서 권장하는, 상이한 원리(혈액 검사 및 영상 검사)를 기반으로 하는 비-침습적인 검사의 조합을 사용하여 결정된다(cf. Castera 2012).
- [0999] 이 목적을 위하여, Castera et al.의 다변수의 분류의 알고리즘 변형이 수행되었다.
- [1000] Castera et al.의 다변수의 분류의 알고리즘은 Castera et al. 2010 및 Castera et al. 2014에 기재되어 있는 알고리즘이다. 그것은 FIBROTEST™ (혈액 검사), 및 FIBROSCAN™ (영상 검사)의 결과 사이의 일치치를 기반으로 한다.
- [1001] 이 알고리즘은 비-침습적인 검사 (FIBROTEST™ 및 FIBROSCAN™)가 일치하는 경우에, 환자들을 두 클래스(심각한 섬유증의 부재 또는 존재)로 분류할 수 있다.
- [1002] FIBROTEST™ 및 FIBROSCAN™ 검사의 결과가 일치하지 않는 경우에, Castera et al.의 알고리즘이 BPH이 수행되는 것을 권장한다.
- [1003] PBH를 갖거나 수행하지 않고 섬유증 단계를 결정하기 위하여, Castera et al.의 알고리즘은 두 번째 분석 레벨을 더하여 변형된다. 이 두 번째 분석 레벨은 FIBROTEST™ 및 FIBROSCAN™ 검사의 일치하지 않는 결과를 제공하는 샘플을 목표로 한다. 이 두 번째 분석 레벨은 FIBROTEST™ (FT), FIBROSCAN™ (FS), HEPAScore™ (HS), APRI 및 FORNS와 같은 몇몇의 비-침습적인 검사를 수행한다.
- [1004] FIBROTEST™, HEPAScore™, APRI 및 FORNS 검사는 위의 실시예 2에 기재되어 있다.
- [1005] FIBROSCAN™ 검사는 간 경직도(섬유증의 당량으로 kPa 표시된)를 결정할 수 있는 간 섬유증 스캔을 사용하는 영상 방법이다; cf. Castera et al. 2005. FIBROSCAN™ 장치는 ECHOSENS 회사(30 place d'Italie, 75013 Paris, France)에 의해 상용화되었다.
- [1006] 두 번째 분석 레벨 동안에, 이들 검사 중에서 적어도 세 개(FIBROTEST™ (FT), FIBROSCAN™ (FS), HEPAScore™ (HS), APRI 및 FORNS 중에서 적어도 세 개)는 첫 번째 분석 레벨과 일치하지 않는 결과를 제공한 샘플에 적용된다. 따라서 이들 검사 각각을 통하여 획득한 섬유증 단계가 결정되었다. 이 검사의 대부분에 의해 확인된 단계는 분석된 샘플에 지정되었다. 다수가 없다면, 변형된 알고리즘은 샘플에 대해 “결정되지 않은 섬유증 단계” 라벨의 지정을 예상한다.
- [1007] 이렇게 변형된 분류 알고리즘(또는 모델)은 도 3에 나와 있다. 그것은 상기 환자의 섬유증 단계에 따라서 상기 환자를 두 개의 클래스로 분류할 수 있다: PBH를 되풀이하지 않고, 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어

$\geq F2$) 및 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$).

[1008] 생성된 310명의 환자 집단에 대한 변형된 알고리즘의 적용은 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$)을 나타내는 141명의 환자 및 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq F2$)을 나타내는 169명의 환자를 확인할 수 있다.

[1009] 310명 환자의 특성은 아래의 표 6에 나열되어 있다.

표 6

변수	총 집단	메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$ 인 환자	메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq F2$ 인 환자
n	310	141	169
성별 [남성 (%) / 여성 (%)]	140 (45) / 170 (55)	55 (39) / 86 (61)	85 (50) / 84 (50)
샘플링 날짜에서의 나이 [mean $\pm$ SD (min-max)]	57.9 $\pm$ 11.0 (27 - 88)	55.2 $\pm$ 10.0 (27 - 88)	60.2 $\pm$ 11.2 (35 - 88)
알라닌 아미노기전달효소 (ALT) IU/L [mean $\pm$ SD (min-max)]	87 $\pm$ 83 (16 - 795)	54 $\pm$ 34 (16 - 271)	113 $\pm$ 101 (21 - 795)
HCV 유전자형 [n (%)]			
1	213 (69)	95 (67)	118 (70)
2	32 (10)	19 (13)	13 (8)
3	26 (8)	10 (7)	16 (9)
4	33 (11)	13 (9)	20 (12)
5	3 (1)	2 (1)	1 (1)
7	1 (0)	1 (0)	0 (0)
unknown	2 (1)	1 (0)	1 (1)
샘플링 날짜에서의 바이러스 수치 (VL): IU/mL [mean (min-max)]	1.5 x 10 ⁶ (14 - 1.1 x 10 ⁷)	1.5 x 10 ⁶ (14 - 8.9 x 10 ⁷)	1.5 x 10 ⁶ (39 - 1.1 x 10 ⁷)

[1011] SD = 표준편차; IU = 국제 단위

[1012] 집단 310명의 환자 각각에 대하여, 히알루론산 및 CXCL10의 혈청 농도는 위의 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정되었다. 간 섬유증 정도 (Metavir 스코어 $< F2$ 또는 $\geq F2$)에 따른 이들 농도의 분포는 도 4(CXCL10) 및 도 5(히알루론산)에 나와 있다.

[1013] CXCL10 및 히알루론산 혈청 농도 값은 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq F2$)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$)을 나타내는 환자로부터 판별하는 판별 규칙을 구축하기 위하여, mROC 방법에 의해 합쳐진다.

[1014] CXCL10 및 히알루론산 혈청 농도 값은 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq F2$)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$)을 나타내는 환자로부터 판별하는 판별 규칙을 구축하기 위하여, 샘플링 날짜에서의 체질량지수(BMI), 샘플링 날짜에서의 바이러스 수치(VL)와 같은, 임상적인 파라미터를 가진 mROC 방법에 의해 합쳐진다.

[1015] mROC 방법의 기재에 대하여, 특히 cf. 위의 실시예 1.

[1016] mROC 방법에 의해 생성된 선형 함수 뿐만 아니라 이 선형 함수에 대하여 최상의 성능을 부여하는 참조 값 (Youden index를 최대화하는 임계 값, δ)은 아래의 표 7에 나와 있다. Box-Cox 변환된 형태 $[BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda]$ 의 파라미터 λ 의 값은 아래의 표 7에 나와 있다.

표 7

바이오마커	판별 규칙		임계 값의 예 (Youden index를 최대화하는 임계 값 (δ))
	선형 함수 (mROC에 의해 생성된)	Box-Cox 표준화 파라미터 (λ)	
HA	$Z = HA^t$	HA: -0.288	2.330

CXCL10	$Z = CXCL10^t$	CXCL10: -0.116	4.242
HA + CXCL10	$Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.852) \times HA^t$ [function Z4]	CXCL10: -0.116 HA: -0.288	15.170
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	$Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.958) \times HA^t + (0.616) \times BMI^t + (-0.053) \times Age^t - (0.00024) \times VL^t$ [function Z5]	CXCL10: -0.116 HA: -0.288 Age: 0.433 BMI: -0.039 VL: 0.279	16.543

[1018] 위의 표 7에서:

[1019] HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도

[1020] CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도

[1021] Age = 샘플링 날짜에서의 환자 나이

[1022] BMI = 샘플링 날짜에서의 환자의 체질량 지수 (질량/신장²)

[1023] VL = IU/ mL의, 샘플링 날짜에서의 환자의 바이러스 수치

[1024] 함수 “Z =”의 내용에 표시된 지수 t는 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 값의 Box-Cox 변환된 형태 (Box and Cox 1964) 라는 것을 나타낸다:
 $BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda$.

[1025] 주어진 환자에 대하여 함수 Z를 적용하고 이와 같이 획득한 Z값과 Youden index를 최대화하는 임계 값의 비교를 위하여, cf. 위의 실시예 1.

[1026] 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq F2$)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $< F2$)을 나타내는 환자로부터 관별하기 위한 310명의 환자에 대한 분류 모델의 적용은 아래의 표 8에 나열된 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과를 나타낸다.

표 8

바이오마커	분류되지 않은 환자 비율	Se	Spe	PPV	NPV	correct classification rate	AUC
HA	0%	76%	79%	82%	74%	78%	0.840
CXCL10	0%	72%	76%	78%	69%	74%	0.810
HA + CXCL10	0%	78%	90%	90%	77%	83%	0.898
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	0%	80%	87%	88%	78%	83%	0.899

[1028] 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 단지 두 개의 바이오마커를 통하여 및 PBH 없이, 분류(분류되지 않은 환자의 비율, 민감도, 특이도, 양성예측도 및 음성예측도)의 우수한 결과를 획득할 수 있다.

[1029] 보다 구체적으로, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)의 민감도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도, 정확 분류 비율 및 AUC 성능은 히알루론산 마커 단독의 성능 뿐만 아니라 CXCL10 마커 단독의 성능 보다 우수한 것으로 관찰되었다.

[1030] 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 따라서 조합된 두 개의 마커 각각의 개별적인 성능의 단순한 병렬을 뛰어

넘는다.

[1031] 따라서, 두 개의 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 개별적인 성능을 단순히 더하는 것을 뛰어 넘는 예상하지 않았던 상승 효과를 생성한다는 점을 알 수 있다(310명의 환자 집단에 대하여 입증된 상승 효과).

[1032] 히알루론산과 CXCL10 조합의 성능이 각각의 성능을 단순히 더하는 것으로부터 예상할 수 있는 것을 뛰어 넘는다 는 것을 추가로 입증하기 위하여, 히알루론산 및 CXCL10를 조합하지 않고 이들을 병렬하는 검사가 실시예의 310명 환자 집단에 대하여 수행되었다.

[1033] 이 병렬 검사는 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커 각각의 성능의 단순히 더하는 것이 CXCL10에 의해 제공된 정보에 히알루론산에 의해 제공된 정보를 추가하는 것과 일치한다는 사실에 기초한다: 이 병렬 검사에 따라서, 두 개의 바이오마커 중 적어도 하나가 검사는 양성(섬유증 스코어가 F2 보다 크거나 같다)이라는 것을 나타내는 경우에 검사는 양성이다(섬유증 스코어가 F2 보다 크거나 같다).

[1034] 병렬 검사로 획득한 분류는 다음과 같다:

표 9

히알루론산 검사만으로 주어진 섬유증 스코어 (cf. 실시예 3)	CXCL10 검사만으로 주어진 섬유증 스코어 (cf. 실시예 3)	히알루론산과 CXCL10의 병렬 검사로 주어진 섬유증 스코어
≥ F2	≥ F2	≥ F2
≥ F2	< F2	≥ F2
< F2	≥ F2	≥ F2
< F2	< F2	< F2

[1036] 실시예 3의 310명의 환자에게 적용된 이 병렬 검사의 성능은 다음과 같다: 분류되지 않은 환자의 비율 = 0%; 민감도 (Se) = 90%; 특이도 (Spe) = 57%; 양성예측도 (PPV) = 72%; 음성예측도 (NPV) = 83%; 정확 분류 비율 = 75%.

[1037] 두 개의 마커 각각에 대하여 독립적으로 획득한 결과와 두 마커의 조합으로 획득한 결과를 비교하여 제시된 결과가 아래에 주어져 있다.

표 10

바이오마커	분류되지 않은 환자 비율	Se	Spe	PPV	NPV	correct classification rate	AUC
HA 단독 (cf. 위의 표 8)	0%	76%	79%	82%	74%	78%	0.840
CXCL10 단독 (cf. 위의 표 8)	0%	72%	76%	78%	69%	74%	0.810
HA/CXCL10 HA와 CXCL10의 병렬 검사	0%	90%	57%	72%	83%	75%	NA
HA + CXCL10 HA와 CXCL10 조합 검사 (cf. 위의 표 8)	0%	78%	90%	90%	77%	83%	0.898

[1039] NA = 해당사항 없음

[1040] 개별적으로 수행한 각각의 마커와 비교하면 다음과 같다:

[1041] - 히알루론산 및 CXCL10의 개별적으로 수행한 각각의 마커와 비교하면 병렬은 민감도 및 음성예측도를 강하게

증가시킨다;

- [1042] - 대조적으로, 특이도 및 양성예측도는 감소하고, 75%의 정확 분류 비율로 이어졌다(히알루론산 단독에 대하여 얻은 비율과 CXCL10 단독에 대하여 얻은 비율의 중간).
- [1043] 결과적으로, 히알루론산이 CXCL10과 결합하는 경우에, 특이도 및 양성예측도의 감소 보다는, 매우 강한 증가를 획득한다(특이도에 대하여 90% 대 57% 및 양성예측도에 대하여 90% 대 72%).
- [1044] 이 상승 효과는 두 개의 마커의 병렬에서 획득한 특이도 및 양성예측도의 성능 측면에서 또는 개별적으로 수행된 두 개의 바이오마커의 각각으로 획득된 결과를 고려할 때 예상될 수 없다.
- [1045] 게다가, 일반적으로 바이오마커의 성능을 평가할 수 있는, 정확 분류 비율은 두 개의 바이오마커의 병렬(75%)과 비교하면 두 개의 바이오마커의 조합(83%)은 훨씬 우수하다.
- [1046] 게다가, 상승 효과는 또한 위의 실시예 1에서 관찰되었다(118명의 환자 집단).
- [1047] 따라서, 이 상승 효과는 이용된 판별 규칙에 의존하지 않고, 보다 일반적으로 히알루론산 + CXCL10 조합에 의존한다.
- [1048] 히알루론산 단독 또는 CXCL10 단독과 비교하여 히알루론산 + CXCL10 조합의 상승 효과를 입증하기 위하여, Bootstrap (cf. Efron 1979) 이름으로 알려진 리샘플링 방법이 히알루론산 + CXCL10 조합으로 제공된 결과를 평가하기 위해 수행된다.
- [1049] 310명의 환자 집단에서 진행하여, 동일한 크기의 1000개의 하위 집단을 무작위로 뽑아냈다(동일한 하위 집단 내에서 동일한 환자가 여러 번 나타나도록 대체물로 뽑아냈다).
- [1050] AUC 값 및 정확 분류 비율은 이들 1000개의 하위 집단 각각에 대하여 다음과 같이 측정되었다:
- [1051] - 한편, 적용된 mROC 판별 규칙이 310명의 환자 집단에 대해 초기에 결정된 계수("고정 계수" 또는 "계수 고정")를 가지는 경우에; 및
- [1052] - 다른 한편으로는, 적용된 mROC 판별 규칙이 1000개의 하위 집단 각각에 대하여 결정된 계수("최적화된 계수" 또는 "계수 최적화")를 가지는 경우.
- [1053] AUC 값은 ROC curve 아래의 면적 값이다.
- [1054] 정확 분류 비율 값은 정확하게 분류된 환자의 백분율 값이다.
- [1055] 결과는 도 13A, 13B, 14A 및 14B에 나와 있다.
- [1056] 도 13A 및 13B는 한편으로, "고정 계수" (또는 "계수 고정")을 가지는 mROC 판별 규칙과 다른 한편으로는, "최적화된 계수" (또는 "계수 최적화")을 가지는 mROC 판별 규칙에서 측정된 AUC와 정밀도의 차이 값을 히스토그램의 형태로 나타낸다.
- [1057] 도 13A 및 13B에서, mROC 판별 규칙은 히알루론산 + CXCL10 조합을 이용하였다.
- [1058] 도 13A는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대하여 고정 또는 최적화된 계수를 가지는 AUC 차이의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.000; 0.005; 0.010].
- [1059] 도 13B는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대하여 고정 또는 최적화된 계수를 가지는 분류 정확 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 차이의 히스토그램을 나타낸다.
- [1060] 도 13A 및 13B에서 보여준 대로, 다음과 같다.
- [1061] - AUC 측면에서, 차이의 평균은 0.001 (95%의 신뢰 구간 [-0.002; 0.008]에서)이다; 및
- [1062] - 정확 분류 비율 측면에서, 차이의 평균은 1.04 (95%의 신뢰 구간 [-0.33; 3.55]에서)이다.
- [1063] 도 13A 및 13B는 연구된 집단에 대하여 최적화된 계수의 고정 계수가 적용되는 경우에 성능간에 약간의 차이가 있음을 나타낸다.
- [1064] 따라서, 도 13A 및 13B는 성능이 계수로 인한 것이 아니라 마커 그 자체에 기인한 것으로, 이용된 계수(최적화된 계수 또는 고정 계수)에 관계없이, 획득한 성능은 비교 가능하다.
- [1065] 도 14A 및 14B는 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합 및, 다른 한편으로는, 히알루론산 마커 단독의 mROC 판별

규칙에 대하여 측정된 AUC와 정확 분류 비율의 차이 값을 히스토그램의 형태로 나타낸다.

- [1066] 도 14A는 “고정 계수(또는 “계수 고정”)을 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합과 다른 한편으로는, 히알루론산 마커 단독의 AUC 차이의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10; 0.12].
- [1067] 도 14B는 “고정 계수(또는 “계수 고정”)을 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 한편으로, 히알루론산 + CXCL10 조합과 다른 한편으로는, 히알루론산 마커 단독의 정확 분류 비율 차이의 히스토그램을 나타낸다.
- [1068] 도 14A 및 14B에서 보여준 대로, 다음과 같다.
- [1069] - AUC 측면에서, 히알루론산 마커 단독과 비교하여 히알루론산 + CXCL10 조합의 이득은 항상 0보다 크고, 차이의 평균은 0.06 (95%의 신뢰 구간 [0.027; 0.092]에서)이다; 및
- [1070] - 정확 분류 비율 측면에서, 히알루론산 마커 단독과 비교하여 히알루론산 + CXCL10 조합의 이득은 99%의 경우에 0보다 크고, 차이의 평균은 5.5% (95%의 신뢰 구간 1.29; 10]에서)이다.
- [1071] 이러한 이득은 히알루론산 + CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 임상적인, 해부학적인, 바이러스학적인 마커와 결합된)은 히알루론산 및 CXCL10 바이오마커의 개별적인 성능의 단순히 더하는 것을 뛰어 넘는, 예상하지 못한 상승 효과를 생성하고, 이 상승 효과는 이용된 분류 모델과 독립적이라는 것을 확인한다.

실시예 4

- [1072] : 공중이 사용 가능한 비-침습적인 검사와의 비교(실시에 3과 동일한 환자 집단)
- [1073] 실시예 3의 310명의 환자들을 공중이 추가적으로 사용 가능한 간 섬유증 단계의 측정 검사(시판 중이거나 과학 논문에 기재된 검사)와 비교를 위해 검사하였다.
- [1074] 다음과 같은 다섯 개의 검사가 수행되었다: HEPAScore™ 검사, FIBROTEST™ 검사, APRI 검사, Forns 검사 및 FIBROSCAN™ 검사.
- [1075] HEPAScore™ 검사는 QUEST DIAGNOSTICS (3 Giralda Farms, Madison, NJ 07940, USA)에 의해 상용화되고, Adams et al. 2005에 기재되어 있다.
- [1076] FIBROTEST™ 검사는 BIOPREDICTIVE (40, rue du Bac, 75007 Paris, France)에 의해 상용화되고, Imbert-Bismut et al. 2001에 기재되어 있다.
- [1077] APRI 검사는 Wai et al. 2003에 기재되어 있다.
- [1078] Forns 검사는 Forns et al. 2002 에 기재되어 있다.
- [1079] FIBROSCAN™ 검사는 간 경직도(섬유증의 당량으로 kPa 표시된)를 결정할 수 있는 간 섬유증 스캔을 사용하는 영상 방법이다; cf. Castera et al. 2005. FIBROSCAN™ 장치는 ECHOSENS 회사(30 place d'Italie, 75013 Paris, France)에 의해 상용화되었다.
- [1080] 이들 검사 각각은 제조업자의 지시에 따라서, 또는 적용 가능한 경우, 과학 논문의 저자의 지시에 따라서 수행되었다.
- [1081] 이들 다섯 개 검사의 파라미터는 아래의 표 11에 기재되어 있다.
- [1082] A2M = alpha 2 macroglobulin의 농도
- [1083] GGT = 감마 글루타밀 전달효소의 농도
- [1084] APOA1 = apolipoprotein A1의 농도
- [1085] Hapto = 합토클로빈(haptoglobin)의 농도
- [1086] Bilirubin = 총 빌리루빈의 농도
- [1087] ASAT = 아스파르트산 아미노기전달효소의 농도
- [1088] 혈소판 = 혈소판의 농도

- [1089] 콜레스테롤 = 총 콜레스테롤의 농도
- [1090] 히알루론산 = 히알루론산의 농도
- [1091] 나이 = 샘플링 날짜에서의 나이
- [1092] 성별 = 환자의 성별 (여성 또는 남성)

표 11

검사 이름	FIBROTEST™	HEPAScore™	APRI	Forns	FibroScan™
검사에 포함된 바이오마커의 수	결정에 요구되는 5개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 7개	결정에 요구되는 4개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 6개	2	결정에 요구되는 3개의 생화학적 바이오마커를 포함하는 4개	0 (measurement of elastometry in kPa)
생화학적 바이오마커	A2M GGT APOA1 Hapto Bilirubin	A2M GGT Bilirubin HA	ASAT Platelets	GGT Platelets Cholesterol	-
임상적인 바이오마커	Age Sex	Age Sex	-	Age	-
검사에서 권유되는 참조 임계 값	0.48: $\geq$ F2 0.28: < F2 0.28 에서 0.47 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	≥ 0.5 : $\geq$ F2 < 0.5: < F2	> 1.5: $\geq$ F2 ≥ 0.5 : < F2 0.5 에서 1.5 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	> 6.9: $\geq$ F2 < 4.21: < F2 4.21 에서 6.9 까지: 분류될 수 없는 결정되지 않은 환자	< 7.1: < F2 ≥ 7.1 : $\geq$ F2 ≥ 9.5 : $\geq$ F3 ≥ 12.5 : F4

- [1094] 이들 다섯 개의 비-침습적인 검사는 심각한 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 $\geq$ F2)을 나타내는 환자를 심각하지 않은 섬유증(메타비르 간 섬유증 스코어 < F2)을 나타내는 환자로부터 판별하기 위하여 실시예 3의 310명의 환자 집단에 적용되었다.
- [1095] 획득한 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과는 아래의 표 12에 나열되어 있다.
- [1096] 아래의 표 12는 추가로 동일한 환자 집단에 대한 히알루론산 + CXCL10 조합으로 획득한 결과(위의 실시예 3에서의 히알루론산 + CXCL10 조합)와 이들 결과의 비교를 보여준다.

표 12

제조사 또는 저자의 명령에 따라서 수행되고 처리된 측정	분류되지 않은 환자 비율	Se	Spe	PPV	NPV	Rate of correct classification (*)	Global rate of correct classification (\$)
HEPAScore™	0%	95%	90%	94%	90%	93%	93%
FibroScan™	0%	62%	94%	95%	58%	74%	74%
FibroTest™	15%	100%	58%	81%	100%	85%	72%
Forns	54%	49%	44%	100%	100%	47%	45%
APRI	45%	36%	64%	98%	81%	46%	50%
이전에 보았던 바와 같이, 히알루론산 + CXCL10 조합의 결과 (본 발명에 따른 실시예 3의 조합, cf. 위의 표 8)는 다음과 같다:							
HA + CXCL10	0%	78%	90%	90%	77%	83%	83%
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	0%	80%	87%	88%	78%	83%	83%

- [1098] (*) : 분류될 수 있는 환자에 대해 계산된 비율
- [1099] (\$) : 총 집단(n = 310)에 대하여 계산된 비율
- [1100] 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)에 의해 달성된 성능은 APRI 및 FORNS 검사보다 훨씬 우수하다는 점이 관찰되었다.
- [1101] FIBROTEST™ 검사와 비교에 있어서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 특히, 다음과 같은 특성을 갖는다:
- [1102] - FIBROTEST™ 검사를 받은 환자의 15%는 섬유증 스코어를 받지 못하는 반면에 모든 환자를 분류할 수 있다는 장점,
- [1103] - 더 나은 특이도 및 양성예측도의 성능을 나타내는 장점 (추가로 더 나은 정확 분류 비율); 및 추가로
- [1104] - FIBROTEST™ 검사에 있어서, 다섯 개의 바이오마커(A2M, GGT, APOA1, Hapto 및 Bilirubin)가 확인되어야 하는 반면에 단지 두 개의 바이오마커(히알루론산 및 CXCL10)의 확인이 요구되는 장점.
- [1105] HEPAScore™ 검사와 비교에 있어서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 특히, HEPAScore™ 검사에 있어서, 네 개의 바이오마커(A2M, GGT, Bilirubin 및 히알루론산)가 확인되어야 하는 반면에 단지 두 개의 바이오마커(히알루론산 및 CXCL10)의 확인이 요구되는 장점을 갖고 있다.
- [1106] 이들 검사가 환자의 섬유증 단계를 결정하기 위해 사용된 참조의 일부인 경우(cf. 위의 실시예 3; cf. 도 3), HEPAScore™ 검사, FIBROTEST™ 검사, APRI 검사, FORNS 검사 및 FIBROSCAN™ 검사 를 통하여 측정된(실시예 4) 상이한 비-침습적인 검사의 성능이 선호될 것이라는 점을 알 수 있다. 이는 위의 실시예 2의 비교 측정에 대한 경우는 아니다(PBH에 의해 결정되는 섬유증 단계).
- [1107] 따라서, 히알루론산과 CXCL10 조합(선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들)와 결합된)은 현재 이용 가능한 비-침습적인 검사와 비교해 보면, 적어도 가장 자주 사용되는 두 개의 검사 즉, HEPAScore™ 및 FIBROTEST™의 진단 성능 보다 만족할만한 진단 성능을 나타내며, 반면에 훨씬 더 수행하기 쉽다(그리고 빠르고, 더 저렴하고 및 안전하다).

실시예 5

- [1108] :바이오마커 히알루론산 및 CXCL10과 FIBROSCAN™의 조합
- [1109] 실시예 4의 310명의 환자에 대한 FIBROSCAN™ 검사의 결과는 단독으로 또는 동일한 환자에 대한 히알루론산 + CXCL10 검사의 결과와 조합하여, mROC 방법에 의해 처리되고 분석되었다.
- [1110] mROC 방법의 기재에 대하여, 특히 cf. 위의 실시예 1.
- [1111] mROC 방법에 의해 생성된 선형 함수 뿐만 아니라 이 선형 함수에 대하여 최상의 성능을 부여하는 참조 값 (Youden index를 최대화하는 임계 값, δ)은 아래의 표 13에 나와 있다. Box-Cox 변환된 형태 $[BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda]$ 의 파라미터 λ 의 값은 아래의 표 13에 나와 있다.

표 13

바이오마커	판별 규칙		임계 값의 예 (Youden index를 최대화하는 임계 값 (δ))
	선형 함수 (mROC에 의해 생성된)	Box-Cox 표준화 파라미터 (λ)	
FS	$Z = FS^t$	HA: -0.888	0.893
HA + CXCL10	$Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.852) \times HA^t$ [function Z4]	CXCL10: -0.116 HA: -0.288	15.170

HA + CXCL10 + FS	$Z = (1.686) \times CXCL10^t + (2.216) \times HA^t + (6.947) \times FS^t$ [function Z6]	CXCL10: -0.116 HA: -0.288 FS: -0.888	18.375
------------------	--	--	--------

- [1113] 위의 표 13에서:
- [1114] HA = ng/ml로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도
- [1115] CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도
- [1116] FS = 섬유증 당량으로 kPa 표시된 간 경직도의 측정
- [1117] 주어진 환자에 대하여 함수 Z를 적용하고 이와 같이 획득한 Z값과 Youden index를 최대화하는 임계 값의 비교를 위하여, cf. 위의 실시예 1.
- [1118] 310명 환자 집단에 대한 위의 함수 적용은 그들을 섬유증의 단계 < F2 및 ≥ F2 (메타비르 스코어)로 분류할 수 있다. 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과는 아래의 표 14에 나열되어 있다.

표 14

	Se	Spe	PPV	NPV	correct classification rate	AUC
FS	76%	82%	83%	74%	78%	0.858
HA + CXCL10	78%	90%	90%	77%	83%	0.898
HA + CXCL10 + FS	83%	89%	90%	81%	86%	0.931
As seen before:						
HA (cf. 위의 실시예 3, 표 8)	76%	79%	82%	74%	78%	0.840
CXCL10 (cf. 위의 실시예 3, 표 8)	72%	76%	78%	69%	74%	0.810

[1120] 히알루론산과 CXCL10의 조합은 FIBROSCAN™ 검사 단독과 비교하여 더 나은 진단 성능을 제공한다.

[1121] 히알루론산과 CXCL10 및 추가로 간 경직도의 조합은 더 나은 성능을 제공한다.

실시예 6

[1122] : 섬유증 단계(F0-F1/F2-F3/F4)의 미세한 분류를 위한 히알루론산 + CXCL10의 조합의 결정 및 적용 (실시예 3과 동일한 환자 집단)

[1123] 실시예 3의 집단의 310명 환자 각각에 대하여, 간 섬유증 단계의 미세한 결정이 다변수의 분류 알고리즘에 의하여 수행되었다.

[1124] 이 알고리즘은 Boursier et al. 2012의 알고리즘은 변형에 의해 개발되었다(cf. Boursier et al. 2012의 도 2C).

[1125] Boursier et al. 2012의 알고리즘은 섬유증 단계(F0-F1/F2-F3/F4)의 미세한 분류를 할 수 있으며, FIBROSCAN™ 과 FIBROTEST™에서 일치하지 않는 결과를 나타내는 환자를 PBH를 되풀이 할 필요 없이 분류할 수 있도록 변형되었다.

[1126] 이와 같이 변형된 알고리즘은 도 6에 나와 있다.

[1127] 변형된 알고리즘은 FIBROSCAN™ (FS), HEPAScore™ (HS), APRI 및 Forns와 같은, 몇몇의 비-침습적인 검사의 조합을 사용하는 두 번째 분석 레벨(cf. 도 6)을 포함한다.

[1128] FIBROSCAN™ 검사는 위의 실시예 3에 기재되어 있다.

[1129] HEPASCORE™, APRI 및 FORNS 검사는 위의 실시예 2에 기재되어 있다.

[1130] 두 번째 분석 레벨 동안에, 이들 검사 중에서 적어도 세 개는 첫 번째 분석 레벨과 일치하지 않는 결과를 제공한 샘플에 적용된다. 따라서 이들 검사 각각을 통하여 획득한 섬유증 단계가 결정되었다. 이 검사의 대부분에 의해 확인된 단계는 분석된 샘플에 지정되었다. 다수가 없다면, 변형된 알고리즘은 샘플에 대해 “결정되지 않은 섬유증 단계” 라벨의 지정을 예상한다.

[1131] 310명 환자의 특성은 아래의 표 15에 나열되어 있다.

표 15

변수	전체 집단	F0-F1 환자	F2-F3 환자	F4 환자
n	310	141	128	41
성별 [남성(%)/ 여성 (%)]	140 (45) / 170 (55)	55 (39) / 86 (61)	57 (45) / 71 (55)	28 (68) / 13 (32)
샘플링 날짜에서의 나이 [mean ± SD (min-max)]	57.9 ± 11.0 (27 - 88)	55.2 ± 10.0 (27 - 88)	60.7 ± 11.3 (35 - 88)	58.9 ± 11.0 (41 - 85)
알라닌 아미노기전달효소 (ALT) IU/L [mean ± SD (min-max)]	87 ± 83 (16 - 795)	54 ± 34 (16 - 271)	103 ± 91 (21 - 795)	149 ± 121 (23 - 741)
HCV 유전자형 [n (%)]				
1	213 (69)	95 (67)	90 (70)	28 (68)
2	32 (10)	19 (13)	9 (7)	4 (10)
3	26 (8)	10 (7)	12 (9)	4 (10)
4	33 (11)	13 (9)	15 (12)	5 (12)
5	3 (1)	2 (1)	1 (0)	0 (0)
7	1 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)
unknown	2 (1)	1 (0)	1 (0)	0 (0)
샘플링 날짜에서의 바이러스 수치 (VL): IU/mL [mean (min-max)]	1.5×10^6 (14 - 1.1×10^7)	1.5×10^6 (14 - 8.9×10^7)	1.7×10^6 (39 - 1.1×10^7)	1.0×10^6 (1.3×10^3 - 4.2×10^6)

[1133] SD = 표준편차; IU = 국제 단위

[1134] 집단의 310명 환자 각각에 대하여, 히알루론산 및 CXCL10의 혈청 농도는 위의 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정되었다. 간 섬유증 정도(메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3 또는 F4)에 따른 이들 농도의 분포는 도 7(CXCL10) 및 도 8(히알루론산)에 나와 있다. FIBROSCAN™의 측정(섬유증 당량으로 kPa표시된 간 경직도)은 메타비르 스코어 F4, 즉 12.5 kPa의 임계 값에 대한 간 섬유증의 단계를 분류하기 위하여 이 검사에서 권장된 임계 값과 비교되었다. 제조업자의 지시에 있어서 다음과 같다:

[1135] - FIBROSCAN™(FS)에 의한 측정 값이 12.5 kPa 보다 낮은 환자는 “F4보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어” 클래스로 지정된다; 및

[1136] - FIBROSCAN™(FS)에 의한 측정 값이 12.5 kPa 보다 높은 환자는 “메타비르 간 섬유증 스코어 = F4” 클래스로 지정된다.

[1137] 메타비르 간 섬유증 스코어가 F4 보다 낮게 결정된 환자는 이전에 히알루론산 + CXCL10 마커의 조합에 의해서 분류되었다(두 번째 분석 레벨). 이 목적에 대하여, CXCL10 및 히알루론산의 혈청 농도 값은 섬유증 단계 (메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3)를 결정할 수 있는 판별 규칙을 구축하기 위하여 mROC 방법에 의해서 조합되었다. CXCL10 및 히알루론산의 혈청 농도 값은 또한 다음과 같이 조합되었다:

[1138] - 체질량지수(BMI), 나이 및 환자의 바이러스 수치(VL)과 같은 임상적인 파라미터로;

[1139] - FIBROSCAN™에 의해 측정된 값으로;

[1140] 섬유증 단계 (메타비르 스코어 F0-F1 또는 F2-F3)를 결정할 수 있는 판별 규칙을 구축하기 위하여 mROC 방법에

따라서.

[1141] mROC 방법의 기재에 대하여, 특히 cf. 위의 실시예 1. mROC 방법에 의해 생성된 선형 함수 뿐만 아니라 이 선형 함수에 대하여 최상의 성능을 부여하는 참조 값(Youden index를 최대화하는 임계 값, δ)은 아래의 표 16에 나와 있다. Box-Cox 변환된 형태[$BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda$]의 파라미터 λ 의 값은 아래의 표 16에 나와 있다. 도 9, 10 및 11은 이와 같이 개발되고 적용된 다변수의 분류 알고리즘의 실례를 보여준다.

표 16

바이오마커	판별 규칙		임계 값의 예 (Youden index를 최대화하는 임계 값 (δ))
	선형 함수 (mROC에 의해 생성된)	Box-Cox 표준화 파라미터 (λ)	
HA + CXCL10	$Z = (1.849) \times CXCL10^t + (2.368) \times HA^t$ [function Z_7]	HA: -0.27 CXCL10: -0.116	13.5
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	$Z = (1.853) \times CXCL10^t + (2.511) \times HA^t + (-0.00027) \times VL^t + (-0.0343) \times age^t + (0.4246) \times BMI^t$ [function Z_8]	HA: -0.27 CXCL10: -0.116 VL: 0.288 Age: 0.536 BMI: 0.056	14.7
HA + CXCL10 + FS	$Z = (1.585) \times CXCL10^t + (2.181) \times HA^t + (2.910) \times FS^t$ [function Z_9]	HA: -0.27 CXCL10: -0.116 FS: -0.27	15.7

[1143] FS = 섬유증 당량으로 kPa 표시된 간 경직도의 측정(FIBROSCAN™)

[1144] 위의 표 16에서:

[1145] HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도

[1146] CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도

[1147] FS = FIBROSCAN™ = 섬유증 당량으로 kPa 표시된 간 경직도의 측정

[1148] Age = 샘플링 날짜에서의 환자 나이

[1149] BMI = 샘플링 날짜에서의 환자의 체질량 지수 (질량/신장²)

[1150] VL = IU/mL로 표시된, 샘플링 날짜에서의 환자의 바이러스 수치

[1151] 함수 “Z =”의 내용에 표시된 지수 t는 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 값의 Box-Cox 변환된 형태 (Box and Cox 1964) 라는 것을 나타낸다:
 $BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda$.

[1152] 주어진 환자에 대하여 함수 Z를 적용하고 이와 같이 획득한 Z값과 Youden index를 최대화하는 임계 값의 비교를 위하여, cf. 위의 실시예 1.

[1153] 위의 표 16에서 보여준 함수 Z 각각은 메타비르 간 섬유증 스코어가 F4 보다 낮은 환자에 대하여 직접 지정될 수 있다.

[1154] 환자의 간 섬유증 스코어를 알고 있다면, 그리고 이 스코어가 메타비르 스코어 F4보다 낮다면, 사전에 FIBROSCAN™(또는 어떠한 다른 검사)에 의한 검사는 필수적이지 않다: 표 16의 Z식은 이 환자의 데이터에 직접 적용될 수 있다.

[1155] 대조적으로, 환자의 간 섬유증 스코어를 알 수 없다면, 이 스코어가 F4 보다 낮은지 여부를 결정하기 위하여 예를 들어, FIBROSCAN™에 의한 검사가 수행되어야 하고, 그리고 나서 선택된 Z식에 따라서 도 9, 10 또는 11에서 보여준 바와 같이 진행된다.

[1156] 집단의 310명 환자에 대한 분류의 적용은 아래의 표 17에서 나와 있는 바와 같은 정확분류 비율로 환자들을 세

개의 섬유증 단계(메타비르 간 섬유증 스코어 F0-F1 또는 F2-F3 또는 F4)로 분류할 수 있다.

표 17

(정확 분류 비율)

메타비르 간 섬유증 스코어가 F4 보다 낮은 환자에 적용된 조합	Correct classification rate			전체 집단
	메타비르 간 섬유증 스코어 F0-F1	F2-F3	F4 (FIBROSCAN™에 의해 알려지거나 결정된 스코어)	
Combination HA + CXCL10	89%	69%	100%	82%
Combination HA + CXCL10 + VL + Age + BMI	84%	73%	100%	82%
Combination HA + CXCL10 + FS	82%	84%	100%	85%

선택적으로 하나 이상의 추가적인 마커(임상적인 또는 해부학적인 마커(들) 및/또는 바이러스학적인 마커(들))와 결합된, 히알루론산과 CXCL10의 조합은 메타비르 간 섬유증 스코어가 F4 보다 낮은 환자들의 집단에서 우수한 정확 분류 비율을 달성할 수 있다.

실시예 7

- 선형 함수를 기반으로 하지 않는 방법이 사용될 수 있다; 및

- 일반적인 mROC 공식의 실험적인 증명

mROC 방법은 선형 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법이다. mROC 방법의 기재에 대하여, 특히 cf. 위의 실시예 1. mROC 선형 함수의 예에 대하여, cf. 위의 실시예 1에서 6.

선형 함수를 기반으로 하는, mROC 방법과 같은, 다변수의 분류 방법은 CXCL10 및 히알루론산 바이오마커의 조합을 사용하는 환자의 분류 모델을 구축하기 위하여 수행될 수 있는 유일한 방법이 아니다.

실제로, 선형 함수를 기반으로 하지 않은 다변수의 분류 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 방법이 사용될 수 있다:

- 선형 함수가 아닌 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법, 예를 들어, 로지스틱 회귀분석(LR) 방법과 같은, 아핀 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법; 또는

- 결정 트리에 기초하는 방법과 같은, (수학) 함수를 기반으로 하지 않은 다변수의 분류 방법, 예를 들어, CART (분류 및 회귀분석 트리) 방법.

로지스틱 회귀분석 모델은 Berkson 1944에 기재되어 있다.

CART 모델은 Breiman et al. 1984에 기재되어 있다.

환자 집단은 위의 실시예 3과 동일하다. 이 집단은 도 3에서 보여준 분류 알고리즘에 따라서 결정된 섬유증 단계를 갖고 있는 310명의 환자로 구성되어 있다. 이들 환자의 특성은 아래의 표 6에 나와 있다.

학습 그룹과 확인 그룹은 310명의 환자 중에서 10개의 대체물과 무작위로 뽑아 냈다.

학습 그룹은 환자 집단의 2/3, 즉, 207명의 환자로 구성되어 있고, 확인 그룹은 환자 집단의 1/3, 즉, 103명의 환자로 구성되어 있다.

다음과 같은 세 가지의 방법이 비교되었다:

- mROC 방법 (선형 함수로);

- 로지스틱 회귀분석 방법 (아핀 함수로);

- CART 방법 (수학 함수 없이, 결정 트리에 의한 분류).

[1175] 이용된 mROC 함수는 위의 실시예 3의 mROC 함수이다 (cf. 위의 표 7). 기록은 다음과 같다:

표 18

메타비르 간 섬유증 스코어가 F4 보다 낮은 환자에 적용된 조합	Correct classification rate			전체 집단
	메타비르 간 섬유증 스코어			
	F0-F1	F2-F3	F4 (FIBROSCAN™에 의해 알려지거나 결정된 스코어)	
Combination HA + CXCL10	89%	69%	100%	82%
Combination HA + CXCL10 + VL + Age + BMI	84%	73%	100%	82%
Combination HA + CXCL10 + FS	82%	84%	100%	85%

[1177] 함수 “Z =” 의 내용에 표시된 지수 t는 선형 함수에 적용될 값은 다음의 식에 따라서 측정된 값을 표준화하기 위하여 바이오마커(BMQ)에 대하여 측정된 값의 Box-Cox 변환된 형태 (Box and Cox 1964) 라는 것을 나타낸다:

$$BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1)/\lambda .$$

[1178] CART 및 로지스틱 회귀분석 분류 모델은 학습 그룹에 구축되었다(cf. 아래의 표 19).

표 19

방법	마커(들)	판별 규칙		임계 값의 예
		함수 또는 결정 트리	파라미터	
CART	HA+CXCL10	cf. 도 12	NA	h ∈ [42.18;77.4] i ∈ [209.3;266.7] j ∈ [454.7;553.1] [CART ₃ tree]
	HA	if HA < threshold, the score is < F2 if HA ≥ threshold, the score is ≥ F2	NA	threshold ∈ [42.18;77.4]
	CXCL10	if CXCL10 < threshold, the score is < F2 if CXCL10 ≥ threshold, the score is ≥ F2	NA	threshold ∈ [220.8;440.3]
LR	HA+CXCL10	LOGIT = Intercept + k(CXCL10) + l(HA) [function LOGIT ₃]	Intercept ∈ [-3.57;-2.67] k ∈ [0.003; 0.007] l ∈ [0.02; 0.04]	Logit = 0.5
	HA	LOGIT = Intercept + l(HA)	Intercept ∈ [-2.13;-1.36] l ∈ [0.02; 0.04]	
	CXCL10	LOGIT = Intercept + k(CXCL10)	Intercept ∈ [-2.41;-1.55] k ∈ [0.005; 0.007]	

[1180] 위의 표 19에서 보여준 파라미터 값(로지스틱 회귀분석 방법)은 10개의 무작위로 뽑아낸 집단의 파라미터 값의 하한 및 상한에 해당한다.

[1181] 성능은 확인 그룹(메타비르 간 섬유증 스코어가 F2 보다 낮거나, 메타비르 간 섬유증 스코어가 F2 보다 높거나 같은)에서 검증되었다.

[1182] 학습 그룹과 확인 그룹에 대한 10개의 반복 세트를 통하여 획득한 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과의 평균 값은 아래의 표 20 및 표 21에 각각 나와 있다.

표 20

[1183]

학습 그룹 n = 207							
조합	방법	Se	Spe	PPV	NPV	Correct classification rate	AUC
HA + CXCL10	mROC	76	92	92	76	83	0.898
HA	mROC	78	79	82	75	78	0.845
CXCL10	mROC	72	75	78	70	74	0.802
HA + CXCL10	CART	77	91	91	77	83	NA
HA	CART	78	79	82	75	78	NA
CXCL10	CART	72	75	78	70	74	NA
HA + CXCL10	LR	76	86	86	75	80	0.878
HA	LR	68	84	84	68	75	0.845
CXCL10	LR	72	73	76	68	72	0.802

표 21

[1184]

확인 group n = 103							
마커	방법	Se	Spe	PPV	NPV	Correct classification rate	AUC
HA + CXCL10	mROC	76	88	88	76	81	0.898
HA	mROC	76	73	78	73	75	0.831
CXCL10	mROC	73	71	77	70	72	0.832
HA + CXCL10	CART	78	91	91	78	84	NA
HA	CART	76	73	78	73	75	NA
CXCL10	CART	73	71	77	70	72	NA
HA + CXCL10	LR	78	86	87	77	82	0.888
HA	LR	68	83	83	68	75	0.831
CXCL10	LR	77	72	77	72	75	0.832

[1185]

HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도

[1186]

CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도

[1187]

NA = 해당사항 없음

[1188]

따라서, 히알루론산 + CXCL10의 성능은 히알루론산 단독 또는 CXCL10 단독의 성능보다 우수하다는 것을 확인할 수 있다. 특히, 이는 특이도, 양성예측도, 음성예측도, 정확 분류 비율 및 AUC에 적용된다.

[1189]

히알루론산 + CXCL10의 조합이 히알루론산 단독 또는 CXCL10 단독의 성능보다 더 나은 성능에 도달한다는 사실은 히알루론산 + CXCL10의 조합이 두 개의 마커의 단순한 병렬을 뛰어 넘는 상승 효과를 가진다는 것을 나타낸다. (상승 효과의 주제에 관하여, cf. 또한 위의 실시예 1 및 3).

[1190]

이용된 다변수의 분류 방법에 관계 없이 성능이 유사하다는 점을 알 수 있다.

[1191]

히알루론산 + CXCL10의 조합의 성능, 보다 구체적으로 상승 효과는 이용된 다변수의 분류 방법의 성질에 의존하지 않는다.

[1192]

이는 mROC 이외에 다변수의 분류 방법을 사용할 수 있다는 것을 증명한다.

[1193]

보다 구체적으로, mROC와 같은, 선형 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법에 대안적으로, 다음과 같은 방법이 이용될 수 있다:

[1194]

- 선형 함수가 아닌 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법, 예를 들어, 로지스틱 회귀분석과 같은, 아핀 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법;

[1195]

- (수학) 함수를 기반으로 하지 않는 분류 방법 뿐만 아니라, 예를 들어, 로지스틱 회귀분석과 같은, 아핀 함수를 기반으로 하는 다변수의 분류 방법.

[1196]

mROC, CART 및 로지스틱 회귀분석 방법은 또한 실시예 3의 310명의 환자 집단 전체에 적용된다. CART 및 로지

스틱 회귀분석 방법으로 310명의 환자 집단에 대하여 획득한 판별 규칙의 예는 아래의 표 22에 나와 있다(F2 보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어, 또는 F2보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어). 이용된 mROC 함수는 실시예 3의 mROC 함수이다(cf. 위의 표 7).

표 22

방법	판별 규칙		임계 값의 예
	함수 또는 결정 트리	파라미터	
mROC	$Z = a \times (CXCL10^t) + b \times (HA^t)$ [function Z_4]	$a = 1.999$ $b = 2.852$ $\mu_{CXCL10} = -0.116$ $\mu_{\underline{z}} = -0.288$	$\delta_1 = 15.170$
mROC	$Z = a \times (CXCL10^t) + b \times (HA^t) + c \times (BMI^t) + d \times (age^t) + e \times (VL^t)$ [function Z_5]	$a = 1.999$ $b = 2.958$ $c = 0.616$ $d = -0.053$ $e = -0.00024$ $\mu_{CXCL10} = -0.116$ $\mu_{\underline{z}} = -0.288$ $\mu_{BMI} = -0.039$ $\mu_{\geq_{ge}} = 0.433$ $\mu_{VL} = 0.279$	$\delta_2 = 16.543$
CART	cf. 도 12	NA	$h = 47.29$ $i = 209.3$ $j = 503.4$ [CART ₄ tree]
LR	LOGIT = Intercept + $k(CXCL10) + l(HA)$, [function LOGIT ₄]	Intercept = -3.164 $k = 0.005$ $l = 0.024$	Logit = 0.5

- [1198] HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도
- [1199] CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도
- [1200] mROC 방법에 따라서, 주어진 환자에 대한 Z_4 의 값이 15.170 보다 크거나 같다면(히알루론산 + CXCL10의 조합), 이 환자는 F2보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다. 대조적으로, 주어진 환자에 대한 Z_4 의 값이 15.170 보다 낮다면, 이 환자는 F2보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다.
- [1201] 유사하게, 주어진 환자에 대한 Z_5 의 값이 16.543 보다 크거나 같다면(히알루론산 + CXCL10 + 체질량지수 + 나이 + 바이러스 수치의 조합), 이 환자는 F2보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다. 대조적으로, 주어진 환자에 대한 Z_5 의 값이 16.543 보다 낮다면, 이 환자는 F2보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다.
- [1202] CART 방법에 따라서(cf. 도 12), 환자의 ng/mL의 히알루론산의 혈청 농도(HA)가 파라미터 h의 값(47.29) 보다 낮다면, 그들은 다음과 같이 지정된다:
- [1203] - pg/mL의 CXCL10 단백질의 혈청 농도(HA)가 파라미터 j의 값(503.4) 보다 낮다면 F2 보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어; 및
- [1204] - pg/mL의 CXCL10 단백질의 혈청 농도(HA)가 파라미터 j의 값(503.4) 보다 크거나 같다면 F2 보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어.
- [1205] 유사하게, CART 방법에 따라서(cf. 도 12), 환자의 ng/mL의 히알루론산의 혈청 농도(HA)가 파라미터 h의 값(47.29) 보다 높다면, 그들은 다음과 같이 지정된다:
- [1206] - pg/mL의 CXCL10 단백질의 혈청 농도(HA)가 파라미터 i의 값(209.3) 보다 낮다면 F2 보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어; 및

유증 스코어; 및

[1207] - pg/mL의 CXCL10 단백질의 혈청 농도(HA)가 파라미터 i의 값(209.3) 보다 크거나 같다면 F2 보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어.

[1208] 로지스틱 회귀분석 방법에 따라서, 주어진 환자에 대한 LOGIT 함수의 값이 LOGIT 임계 값(0.5) 보다 크거나 같다면, 이 환자는 F2보다 크거나 같은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다. 대조적으로, 주어진 환자에 대한 LOGIT 함수의 값이 LOGIT 임계 값(0.5) 보다 낮다면, 이 환자는 F2보다 낮은 메타비르 간 섬유증 스코어가 지정된다.

[1209] 310명 환자의 집단에 대하여 이들 판별 규칙을 통하여 획득한 민감도(SE), 특이도(Spe), 양성예측도(PPV), 음성예측도(NPV), 정확 분류 비율(정확하게 분류된 환자의 백분율) 및 ROC curve 아래의 면적(AUC)의 결과는 아래의 표 23에 나열되어 있다.

표 23

[1210]

전체 집단 n = 310							
조합	방법	Se	Spe	PPV	NPV	Correct classification rate	AUC
HA + CXCL10	mROC	78	90	90	77	83	0.898
HA + CXCL10 + BMI + Age + VL	mROC	80	87	88	78	83	0.899
HA + CXCL10	CART	82	89	90	80	85	NA
HA + CXCL10	LR	77	87	87	76	81	0.882

[1211] HA = ng/mL로 표시된, 히알루론산의 혈청 농도

[1212] CXCL10 = pg/mL로 표시된, CXCL10의 혈청 농도

[1213] Age = 샘플링 날짜에서의 환자 나이

[1214] BMI = 샘플링 날짜에서의 환자의 체질량 지수 (질량/신장²)

[1215] VL = IU/ mL의, 샘플링 날짜에서의 환자의 바이러스 수치

[1216] NA = 해당사항 없음

[1217] 따라서, 히알루론산과 CXCL10의 조합의 성능은 이용된 다변수의 분류 방법의 성질과 전체적으로 독립적이라는 것을 확인할 수 있다.

실시예 8

[1218] : 일반적인 공식

[1219] 분류 모델에 이용된 파라미터 및 임계 값의 범위는 Bootstrap (cf. Efron 1979) 방법을 사용하여 계산될 수 있다. 이 방법에 따라서, 310명 환자의 무작위 집단은 1000번 연속으로 무작위로 뽑아 냈다.

[1220] mROC, CART, 로지스틱 회귀분석 방법에 대한 이들 계산의 결과는 아래의 표 24에 나와 있다.

표 24

[1221]

다변수의 분류 방법 판별 규칙	파라미터	임계 값의 예	성능
mROC $Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t)$ [function Z_{10}]	$0.812 \leq a \leq 5.089$ $2.033 \leq b \leq 4.462$ $-0.262 \leq \mu_{CXCL10} \leq 0.030$ $-0.382 \leq \mu_{\text{HA}} \leq -0.219$	$11.68 \geq \delta \geq 23.71$	$AUC \geq 0.865$ [$0.865 \geq AUC \geq 0.931$] $CCR \geq 80\%$ [$80\% \geq CCR \geq 88\%$]

mROC $Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t)$ [function Z_{11}]		$0.748 \leq a \leq 5.357$ $2.075 \leq b \leq 4.690$ $-0.848 \leq c \leq 3.697$ $-0.746 \leq d \leq 0.147$ $-0.003 \leq e \leq 0.002$ $-0.262 \leq \mu_{CXCL10} \leq 0.047$ $-0.882 \leq \mu_{\underline{x}} \leq -0.219$ $-5.545 \leq \mu_{BMI} \leq 0.485$ $-0.116 \leq \mu_{age} \leq 0.828$ $0.236 \leq \mu_{VL} \leq 0.305$	$11 \geq \delta \geq 25.87$	$AUC \geq 0.868$ $[0.868 \geq AUC \geq 0.933]$ $CCR \geq 80\%$ $[80\% \geq CCR \geq 88\%]$
선형 함수에 기반하지 않 은 다변수의 분류 방법	CART (Classification And Regression Tree) cf. 도 12 (markers HA and CXCL10)	NA	$41.96 \leq h \leq 77.43$ $159.0 \leq i \leq 266.7$ $410.7 < j < 613.5$ [CART ₂ tree]	$CCR \geq 81\%$ $[81\% \geq CCR \geq 89\%]$
	LR (logistic regression) LOGIT = Intercept + $k(CXCL10) + l(HA)$ [function LOGIT ₂]	$-4.481 \leq \text{Intercept} \leq -2.398$ $0.003 \leq k \leq 0.008$ $0.013 \leq l \leq 0.045$	Logit = 0.5, for example	$AUC \geq 0.844$ $[0.844 \geq AUC \geq 0.921]$ $CCR \geq 77\%$ $[77\% \geq CCR \geq 86\%]$

- [1222] CCR =정확 분류 비율; NA = 해당사항 없음
- [1223] 표 24에서, a, b, c, d, e, λ_{CXCL10} , λ_{HA} , λ_{BMI} , λ_{VL} , 인터셉트, k 및 l는 각각 0이 아니다.
- [1224] 상이한 mROC 함수의 세트는 다음과 같은 식에 따라서 공식화 될 수 있다:
- [1225] $Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t) + f(FS^t)$
- [1226] [함수 Z_{12}]
- [1227] a 및 b는 각각 독립적으로 +0.1에서 +0.6까지의, 보다 구체적으로 +0.3에서 +5.5까지의 양의 실수이며;
- [1228] c는 -10.0에서 +4.0까지의 실수이며;
- [1229] d는 -0.8에서 +0.2까지의 실수이며;
- [1230] e는 -0.003에서 +0.002까지의 실수이며;
- [1231] f는 +0.0에서 +10.0까지의 실수이며;
- [1232] λ_{CXCL10} , λ_{HA} , λ_{BMI} , λ_{age} , λ_{VL} 및 λ_{FS} 는 각각 독립적으로, 0을 제외하고, -6.0에서 1.2까지의 실수이다.
- [1233] 상이한 CART 함수의 세트는 다음과 같은 식에 따라서 공식화 될 수 있다:
- [1234] $Z = a(CXCL10^t) + b(HA^t) + c(BMI^t) + d(age^t) + e(VL^t) + f(FS^t)$
- [1235] [함수 Z_{13}]
- [1236] a 및 b는 각각 독립적으로 0.1에서 0.6까지의 양의 실수이며;
- [1237] c, d, e 및 f는 각각 독립적으로 -10.0에서 +10.0까지의 실수이며;

- [1238] λ_{CXCL10} , λ_{HA} , λ_{BMI} , λ_{age} , λ_{VL} 및 λ_{FS} 는 각각 독립적으로, 0을 제외하고, -6.0에서 1.2까지의 실수이다.
- [1239] LOGIT 함수의 세트는 다음과 같은 식에 따라서 공식화 될 수 있다:
- [1240] $LOGIT = \text{인터셉트} + k(CXCL10) + l(AH)$,
- [1241] [LOGIT₁ 함수]
- [1242] $-5 \leq \text{인터셉트} \leq -1$
- [1243] $0.001 \leq k \leq 0.010$
- [1244] $0.010 \leq l \leq 0.050$.
- [1245] LOGIT 함수의 세트는 다음과 같은 식에 따라서 공식화 될 수 있다:
- [1246] 다음을 포함하는 도 12와 같다:
- [1247] $40 \leq h \leq 80$
- [1248] $150 \leq i \leq 300$
- [1249] $400 \leq j \leq 620$
- [1250] [CART₁ 트리].
- [1251] mROC 함수, 로지스틱 회귀분석 함수 또는 CART 트리 각각에 대하여, 파라미터 값은 표시된 값의 범위에 따라서 선택될 수 있다.
- [1252] 일단 파라미터 각각의 값이 선택되면, 이로부터 생성된 mROC 함수 또는 로지스틱 회귀분석 함수 또는 CART 트리는 참조 집단, 예를 들어, 실시예 3에 기재된 바와 같은 310명의 환자 집단에 대하여 검사할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 선택된 파라미터로, mROC 함수 또는 로지스틱 회귀분석 함수 또는 CART 트리가 실제로 예상된 또는 원하는 성능, 특히 예상된 또는 원하던 AUC 값 및/또는 정확 분류 비율 값에 이르는지를 시험 할 수 있다.
- [1253] 성능은 실시예 1의 118명의 환자 집단 또는 실시예 3의 310명의 환자 집단과 같은, 적어도 F1에서 F3(메타비브 스코어) 단계를 포함하는 간 섬유증 단계를 갖는 C형 간염 바이러스-양성 환자 집단에 대하여 측정될 수 있다.
- [1254] 연관된 임계 값은 예를 들어, -7에서 25까지의 실수 값인, Youden index를 최대화하는 임계 값, δ 일 수 있다.

실시예 9

- [1255] :히알루론산 + CXCL10 조합의 뛰어난
- [1256] 히알루론산 + CXCL10 조합의 뛰어난을 입증하기 위하여, Bootstrap (cf. Efron 1979) 이름으로 알려진 리샘플링 방법이 위의 실시예 3의 310명 환자 집단에 대하여 수행된다.
- [1257] 이 310명의 환자 집단으로부터, 동일한 크기의 1000개의 하위 집단을 무작위로 뽑아 냈다(동일한 환자가 동일한 하위 집단 내에서 여러 번 나타나도록 대체물로 뽑아 냈다).
- [1258] AUC 및 정확 분류 비율 값은 이들 1000개의 하위 집단 각각에 대하여 다음과 같이 측정되었다:
- [1259] - 한편으로, 적용된 mROC 판별 규칙이 310명의 환자 집단에 대해 초기에 결정된 계수 및 임계 값("고정 계수" 또는 "계수 고정")을 가지는 경우에; 및
- [1260] - 다른 한편으로는, 적용된 mROC 판별 규칙이 1000개의 하위 집단 각각에 대하여 결정된 계수 및 임계 값("최적화된 계수" 또는 "계수 최적화")를 가지는 경우;
- [1261] cf. 위의 실시예 3.
- [1262] 정확 분류 비율 값은 정확하게 분류된 환자들의 백분율 값이다.
- [1263] AUC 값은 ROC curve 아래의 면적 값이다.
- [1264] "고정 계수"("계수 고정")의 mROC 규칙으로 획득한 AUC 및 "최적화된 계수"("계수 최적화")의 mROC 규칙으로 획득한 AUC 사이의 가변성이 결정되었다(도 15).

- [1265] 도 15는 “고정 계수(또는 “계수 고정”)을 가지는 Bootstrap(B=1000)에서 히알루론산 + CXCL10 조합에 대한 AUC의 히스토그램을 나타낸다[가로 좌표: 0.84; 0.86; 0.88; 0.90; 0.92; 0.94; 0.96]. 도 17은 1000개의 상이한 집단에 대하여, 히알루론산 + CXCL10 조합의 성능이 뛰어나다는 것을 증명하였다(높은 성능인, 0.84에서 0.96 내에서 AUC 값).
- [1266] 게다가, AUC 측면에서의 성능은 “고정 계수(또는 “계수 고정”)[310명 환자의 최초 집단으로부터 고정되고 Bootstrap 하위 집단 각각에 대하여 적용된 계수]을 갖는 mROC 규칙이 사용되는지 또는 “최적화된 계수”(“계수 최적화”)[1000개의 Bootstrap 하위 집단 각각에 대하여 최적화된 mROC 규칙의 계수]를 갖는 mROC 규칙이 사용되는지 여부에 관계 없이 유사하다는 점을 알 수 있다.
- [1267] 실시예 1의 118명의 환자 집단에 둘 다 적용되는 경우에 118명의 환자 집단에서 획득한 mROC 함수의 성능(히알루론산 + CXCL10 마커; 함수 Z_1 ; cf. 위의 표 2)은 실시예 3의 310명의 환자 집단에서 획득한 mROC 함수의 성능(히알루론산 + CXCL10 마커; 함수 Z_4 ; cf. 위의 표 7)과 비교된다.
- [1268] 이 비교의 결과는 도 16A 및 16B에 나와 있다.
- [1269] 도 16A: 세로 좌표, 실시예 1의 함수 Z_1 [$\lambda_{CXCL10} = 0.013$ 및 $\lambda_{HA} = 0.099$ 인, $Z = (0.3686) \times CXCL10^t + (0.3064) \times HA^t$]; 가로 좌표, 실시예 3의 함수 Z_4 [$\lambda_{CXCL10} = 0.116$ 및 $\lambda_{HA} = -0.288$ 인, $Z = (1.999) \times CXCL10^t + (2.852) \times HA^t$].
- [1270] 도 16B. 세로 좌표, 민감도; 가로 좌표, 특이도; Z_1 및 Z_4 의 커브.
- [1271] 310명의 환자 집단에서 획득한 규칙(함수 Z_4)의 118명의 환자 집단으로의 이전은 이 집단에 최적화된 계수로 획득한 것(함수 Z_1)과 유사한 AUC를 획득할 수 있다. 따라서, 계수의 큰 차이에도 불구하고, 두 개의 스코어가 매우 연관되어 있고, ROC curve가 서로 매우 가깝다는 것을 알 수 있다. 민감도 및 특이도의 차이는 310명의 환자 집단으로부터 시작된 임계 값에 의해서 근본적으로 설명된다. 유사한 성능을 획득할 수 있는 임계 값을 결정하는 것이 완벽하게 가능하다.
- 실시예 10**
- [1272] :다중 모드에서 히알루론산과 CXCL10의 조합
- [1273] 고 처리량 스크리닝 마이크로플레이트가 사용되었다. 이들은 GREINER BIOONE GmbH; Maybachstrasse 2; DE 72636 Frickenhausen; Germany (카탈로그 참조 655 097)에서 시판 중인, 폴리스티렌 LUMITRAC™ 600(F 바닥, "강한 결합", chimney 웰, 웰의 최대 이론적 부피 = 392 μ L)의 96-웰 마이크로플레이트이다.
- [1274] Spotter 로봇에 의해서, 각 웰의 바닥에 스팟 줄이 놓여진다(스팟 = 약 50 nl의 액적). 각 스팟은 포획 리간드, 주로 항-인간 CXCL10 포획 리간드 또는 항-인간 히알루론산 포획 리간드를 함유한다. 포획 리간드는 웰의 표면에 결합한다.
- [1275] 항-인간 CXCL10 포획 리간드는 R&D SYSTEMS, Inc. (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 시판 중인 마우스 단일클론성의 항-인간 CXCL10 항체, 카탈로그 참조 MAB266 (clone 33036, class IgG1)이다.
- [1276] 항-인간 히알루론산 포획 리간드는 R&D SYSTEMS, Inc. 회사 (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA)에서 시판 중인, 카탈로그 참조 1220-PG-025의 재조합 인간 단백질 아그레칸 G1-IGD-G2이다.
- [1277] 환자의 혈청 또는 혈장의 샘플은 C형 간염 바이러스에 의해 감염된다. 그들은 Haut-Leveque (1, avenue Magellan; 33600 Pessac; France) 병원 또는 Beaujon (100, boulevard du General Leclerc; 92110 Clichy; France) 병원으로부터 기원되었다. 환자는 예를 들어, 실시예 3 또는 실시예 1의 환자를 포함한다.
- [1278] CXCL10의 표준 범위는 재조합 단백질 CXCL10 (PEPROTECH; Princeton Business Park; 5 Crescent Avenue; P.O. Box 275; Rocky Hill, NJ 08553; USA; reference catalogue 300-12)을 5%의 소의 혈청 알부민, 20%의 글리세롤 및 0.1%의 보존제(PROCLIN® 300; SIGMA-ALDRICH CHIMIE에서 시판 중인 SUPELCO 제품; 38297 Saint-Quentin-Fallavier CEDEX; France)를 함유하는 pH 7.4의 PBS 완충 용액에서 희석하여 준비된다.
- [1279] 히알루론산의 표준 범위는 재조합 인간 히알루론산 (R&D SYSTEMS; Minneapolis; USA)을 5%의 소의 혈청 알부민,

20%의 글리세롤 및 0.1%의 보존제 PROCLIN[®] 300를 함유하는 pH 7.4의 PBS 완충 용액에서 희석하여 준비된다.

- [1280] 마이크로플레이트의 각 웰에는, 다음과 같이 (각 스팟에) 연속적으로 분포된다: 5%의 소의 혈청 알부민, 20%의 글리세롤 및 0.1%의 보존제 PROCLIN[®] 300를 함유하는 pH 7.4의 PBS 완충 용액; 및
- [1281] 분석될 샘플의 40 μ L, 또는 표준 범위의 CXCL10 용액, 또는 표준 범위의 히알루론산 용액.
- [1282] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 40분 동안 저어 가며 배양한다.
- [1283] 각각 적어도 세척액(218 mM NaCl, 0.1%의 TWEEN[®] 20 (SIGMA-ALDRICH CHIMIE; 38297 Saint-Quentin-Fallavier CEDEX; France; 카탈로그 참조 2287) 400 μ L 및 0.002%의 보존제 PROCLIN[®] 300를 함유하는 pH 7.4의 10 mM의 완충 용액 TRIS)을 가지고 3회 연속적인 세척이 수행된다.
- [1284] 각 반응 웰에, 150 mM NaCl, 10%의 글리세롤, 50 g/L의 마우스 IgG, 0.1%의 보존제 PROCLIN[®] 300 뿐만 아니라, 0.2 μ g/mL 농도의 인간 단백질 CXCL10 포획을 위한 리간드, 및 0.2에서 0.5 μ g/mL 농도의 인간 히알루론산 리간드를 함유하는 pH 7.4의 10 mM PBS 완충 용액 50 μ L가 연속적으로 분포된다(각 스팟에).
- [1285] CXCL10 검출을 위한 리간드는 R&D SYSTEMS, Inc. (614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA; 카탈로그 참조 BAF266)에서 시판 중인 비오틴-결합 거위 다중클론성의 항-인간 CXCL10 항체이다.
- [1286] 인간 히알루론산 검출을 위한 리간드는 R&D SYSTEMS, Inc.(614 McKinley Place NE; Minneapolis, MN 55413; USA; 카탈로그 참조 1220-PG-025)에서 시판 중인 비오틴-결합 재조합 단백질 아그레칸 G1-IGD-G2이다.
- [1287] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 저어 가며 배양한다.
- [1288] 각각 적어도 세척액(218 mM NaCl, 0.1%의 TWEEN[®] 20 (SIGMA-ALDRICH CHIMIE; 38297 Saint-Quentin-Fallavier CEDEX; France; 카탈로그 참조 2287) 400 μ L 및 0.002%의 보존제 PROCLIN[®] 300를 함유하는 pH 7.4의 10 mM의 완충 용액 TRIS)을 가지고 3회 연속적인 세척이 수행된다.
- [1289] 각 반응 웰에, 리포터, 즉 150 mM NaCl, 5.6 mM EDTA, TRITON[®] 2%, 양의 혈청 10%, 마우스 IgG 500 μ g/mL, 보존제 PROCLIN[®] 300 0.5%, 소의 우유(100% 탈지된) 15%, 글리세롤 10%, NaN₃ 0.095% 및 추가로 3 μ g/mL의 홀스 래디쉬 과산화 효소가 결합된 스트렙타아비딘 (streptavidin-POD, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH에서 시판 중인; Roche Applied Science; 68298 Mannheim; Germany; 카탈로그 참조 11089153001) (cf. Nakane and Kawaoi 1974)를 함유하는 pH 6.7, 50 mM 시트르산염 완충 용액의 50 μ L가 연속적으로 분포된다(각 스팟에).
- [1290] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 저어 가며 배양한다.
- [1291] 각 반응 웰에, 화학 발광 반응의 전개를 위한 기질, 즉 인핸서(enhancer) 용액 25 μ L/ 루미놀(luminol) XLSE024L 및 과산화물 용액 XLSE024P 25 μ L[ELISTAR ETA C Ultra ELISA의 용액 (A) 25 μ L 및 용액 (B) 25 M l, CYANAGEN에서 시판 중인; Via degli Stradelli Guelfi 40/C; 40138 Bologna; Italy; 카탈로그 참조 XLSE024.0020]가 연속적으로 분포된다.
- [1292] 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 저어 가며 배양한다.
- [1293] 발광 신호의 획득은 180초 동안 실행된다.
- [1294] 판독 결과는 영상 분석 시스템에 의해 직접 처리되고 상대적인 발광 단위 또는 상대적인 조명 단위(RLU)로 등록된다.
- [1295] 결과의 해석을 위해, CXCL10 및 히알루론산의 농도는 pg/mL 단위의 CXCL10에 대한 재조합 CXCL10 표준 범위 및 ng/mL 단위의 히알루론산에 대한 재조합 히알루론산 표준 범위에 의해서 각 샘플에 대하여 재계산된다.
- [1296] 대안적으로, 인간 CXCL10의 검출을 위한 리간드 및 인간 히알루론산의 검출을 위한 리간드는 각각 다른 스팟에 놓여질 수 없고, 대조적으로 둘 다 동일한 스팟에 놓인다. 이 경우에, 검출은 결합된 CXCL10 분자를 결합된 히알루론산 분자, 예를 들어 화학 발광이 아닌 형광으로 구별하여 수행된다(두 개의 상이한 형광에 의해서, 하나는 CXCL10 검출 리간드에 의해, 다른 하나는 히알루론산 검출 리간드에 의해 결합된다).

도면

도면1

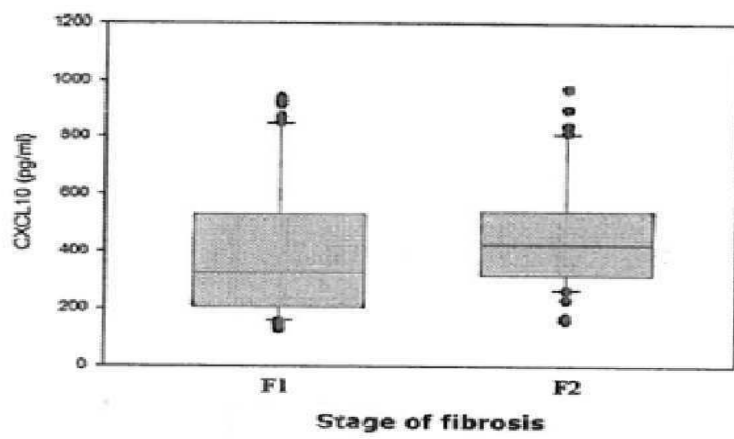


FIGURE 1

도면2

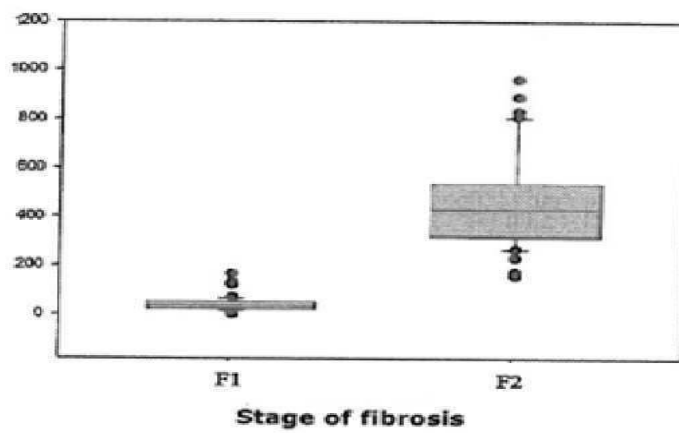


FIGURE 2

도면3

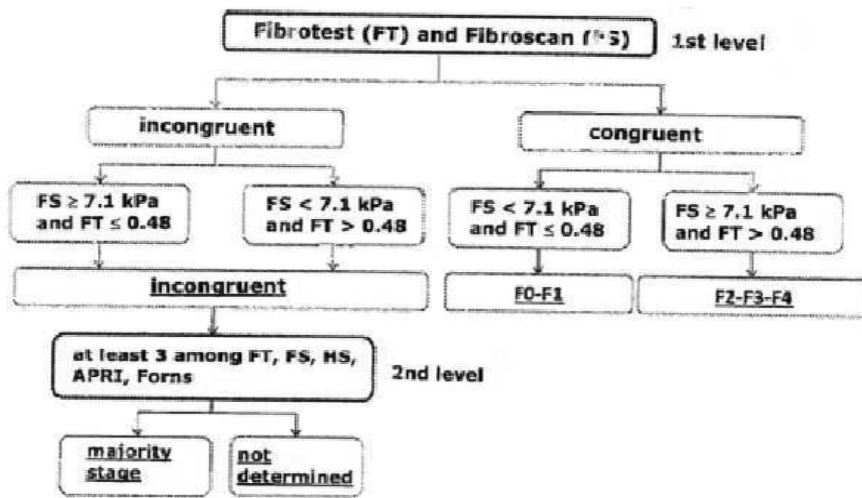


FIGURE 3

도면4

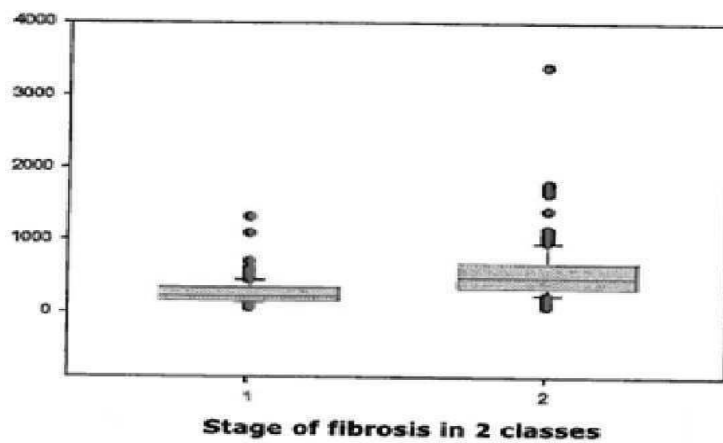


FIGURE 4

도면5

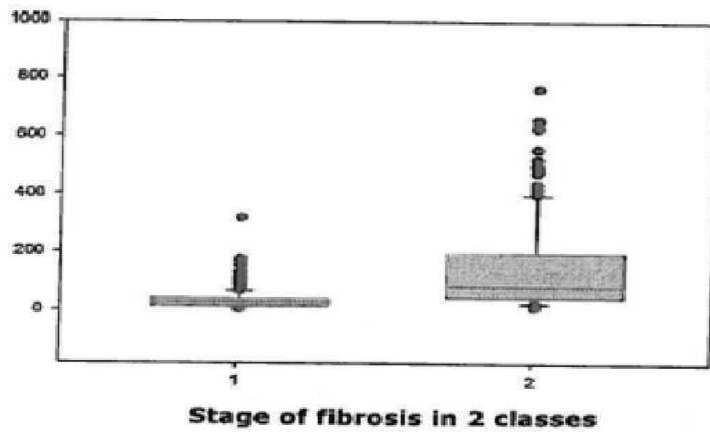


FIGURE 5

도면6

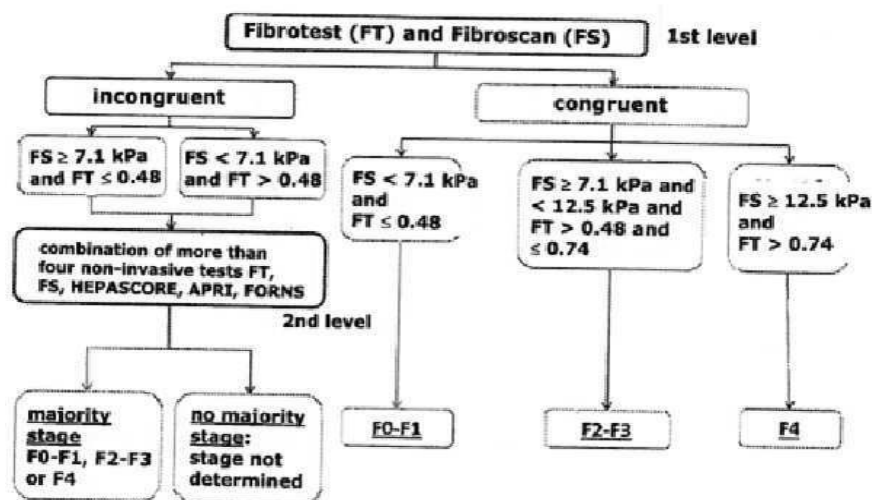


FIGURE 6

도면7

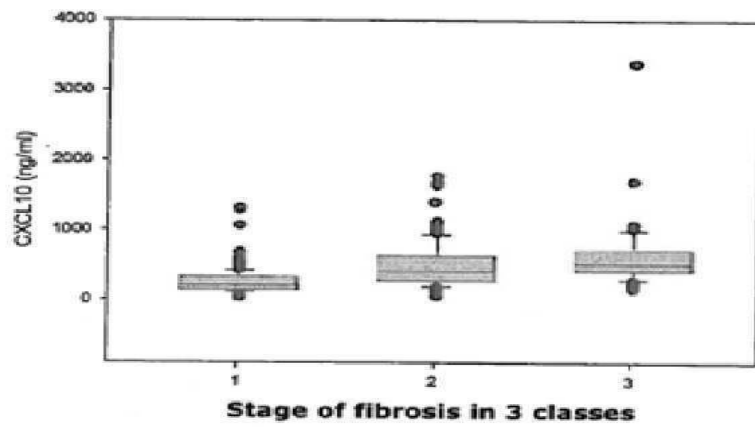


FIGURE 7

도면8

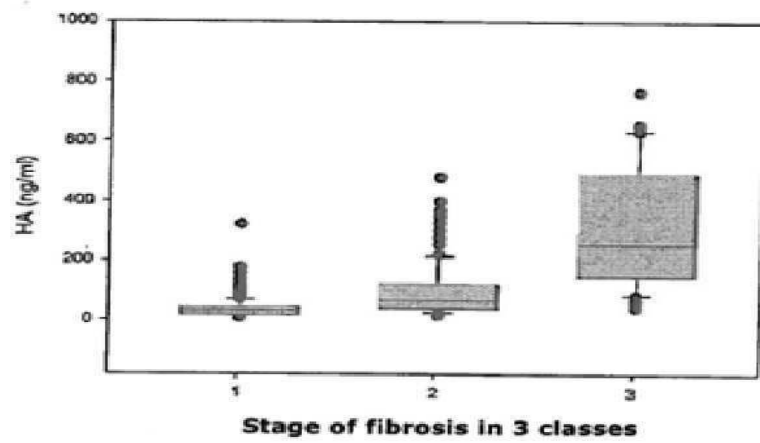


FIGURE 8

도면9

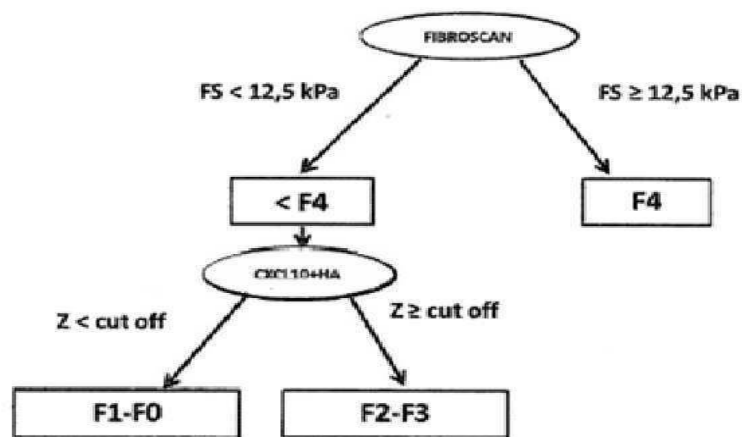


FIGURE 9

도면10

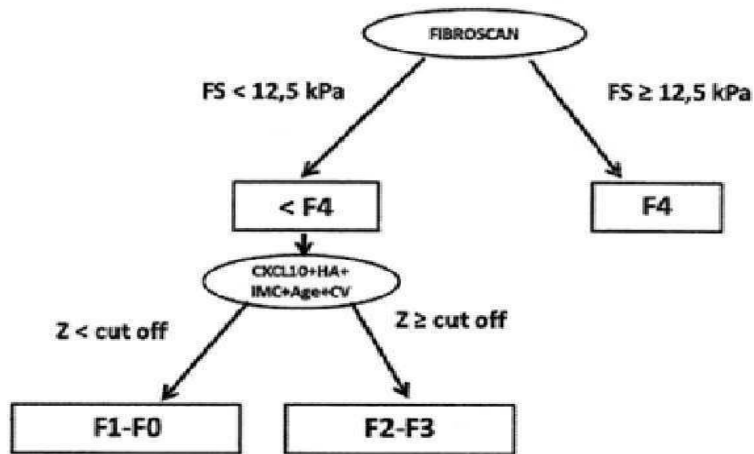


FIGURE 10

도면11

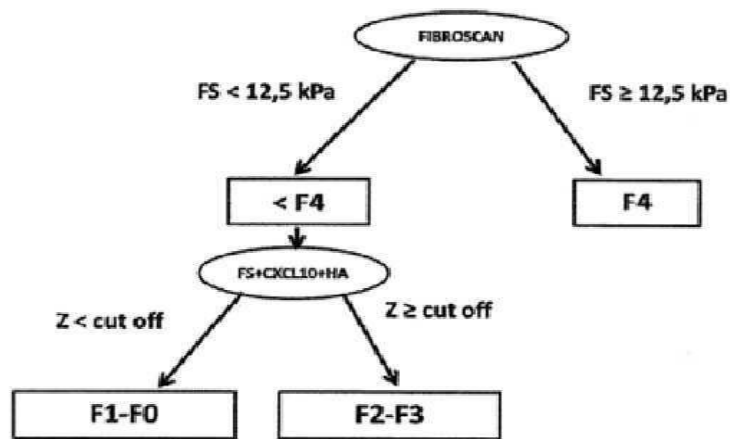


FIGURE 11

도면12

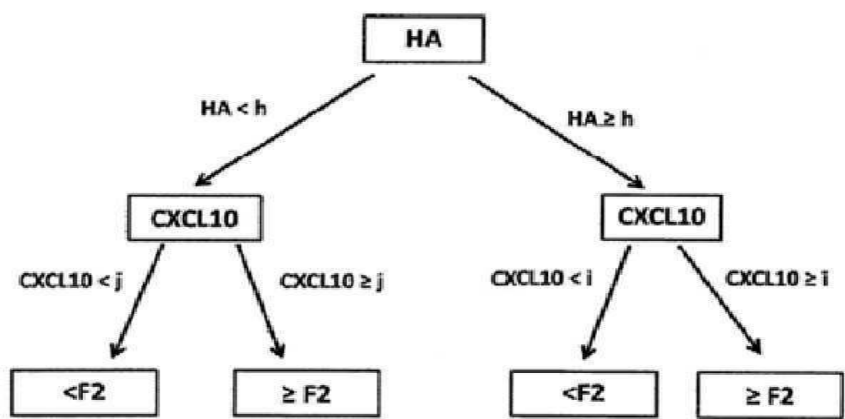


FIGURE 12

도면13a

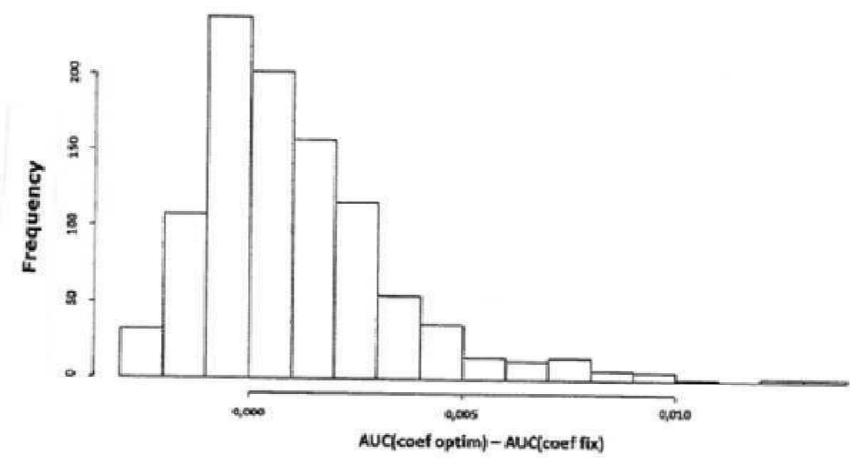


FIGURE 13A

도면13b

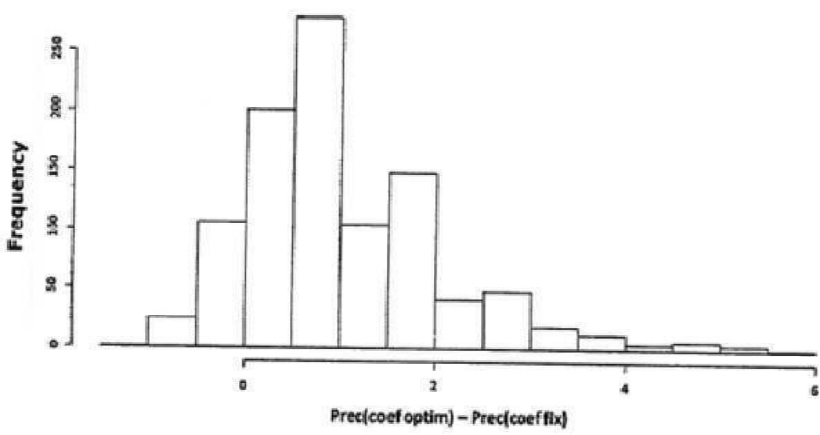


FIGURE 13B

도면14a

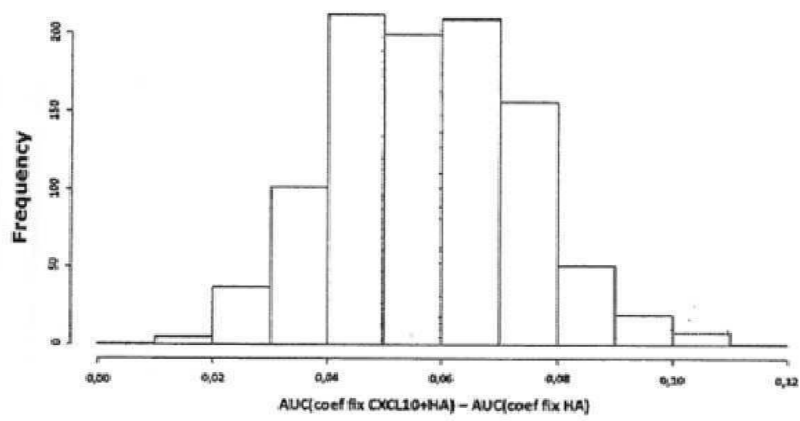


FIGURE 14A

도면14b

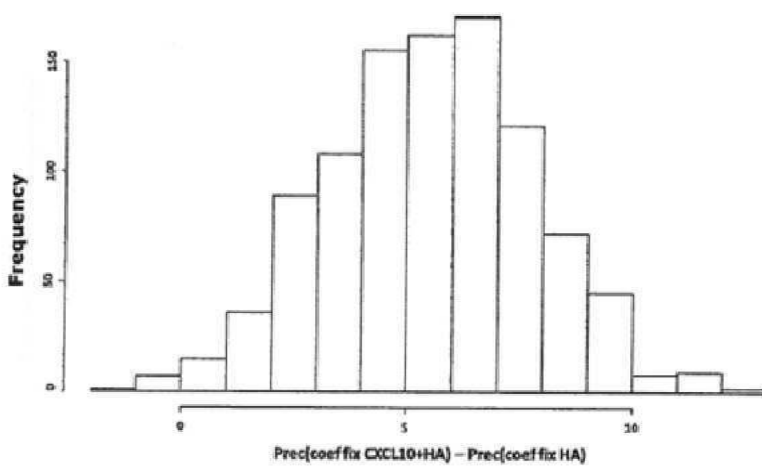


FIGURE 14B

도면15

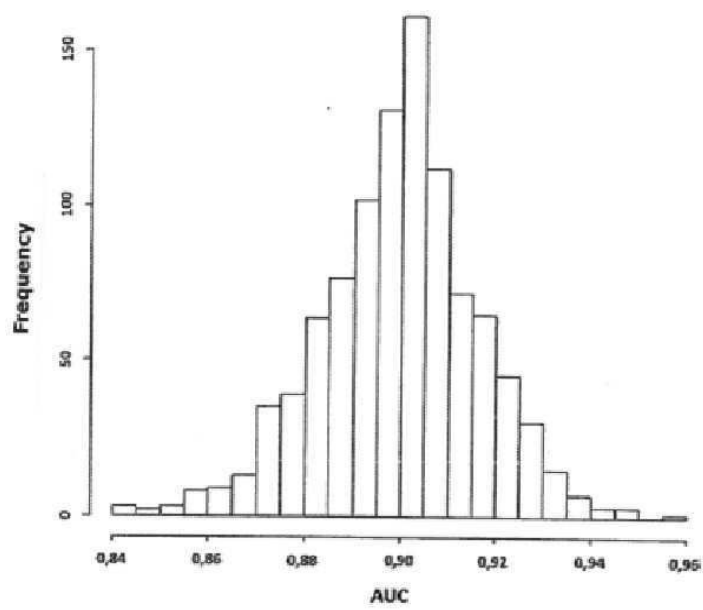


FIGURE 15

도면16a

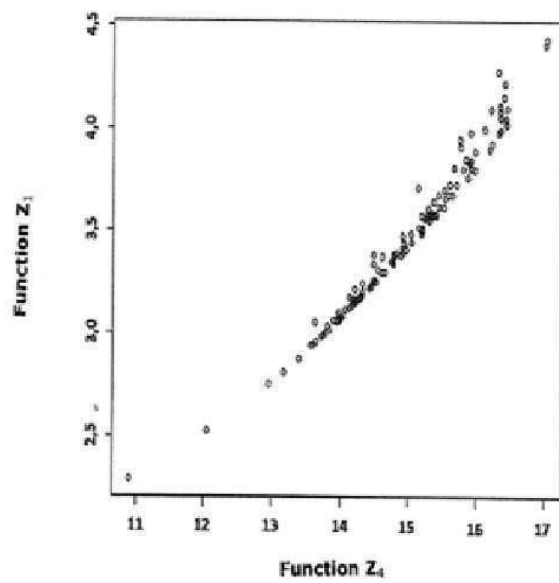


FIGURE 16A

도면16b

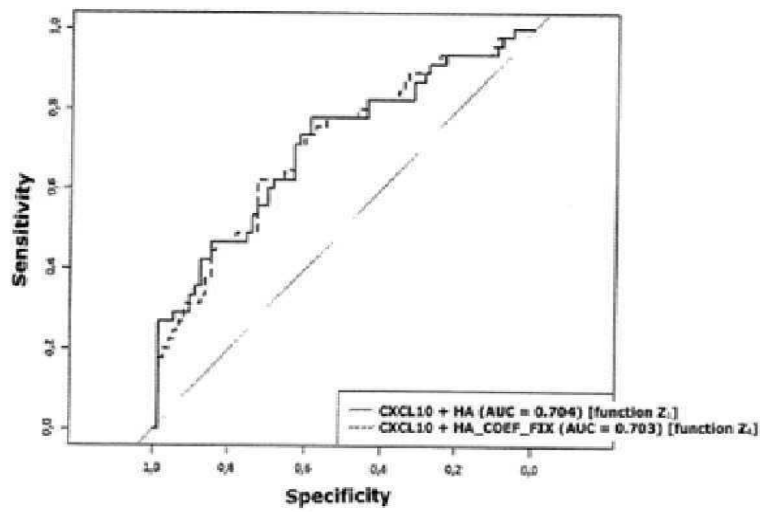


FIGURE 16b

서열 목록

- <110> BIO-RAD INNOVATIONS
ASSISTANCE PUBLIQUE - H^ÔITAUX DE PARIS
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
- <120> Synergistic combination of biomarkers for detecting and assessing
hepatic fibrosis
- <130> PI16-B344
- <150> PCT/FR
- <151> 2014-06-27
- <160> 9
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 294
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Glu Thr Ala Ser Asn Gly Leu Asn Thr His Arg Ala Leu Ala Ile

1 5 10 15

Leu Glu Leu Glu Ala Ile Leu Glu Cys Tyr Ser Cys Tyr Ser Leu Glu

20 25 30

Ala Ile Leu Glu Pro His Glu Leu Glu Ala Thr His Arg Leu Glu Ala

35 40 45
 Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ile Leu Glu Gly Leu Asn Gly Leu Tyr Val
 50 55 60
 Ala Leu Pro Arg Ala Leu Glu Ala Ser Glu Arg Ala Arg Gly Thr His
 65 70 75 80

 Arg Val Ala Leu Ala Arg Gly Cys Tyr Ser Thr His Arg Cys Tyr Ser
 85 90 95
 Ile Leu Glu Ser Glu Arg Ile Leu Glu Ser Glu Arg Ala Ser Asn Gly
 100 105 110
 Leu Asn Pro Arg Ala Val Ala Leu Ala Ser Asn Pro Arg Ala Ala Arg
 115 120 125
 Gly Ser Glu Arg Leu Glu Ala Gly Leu Ala Leu Tyr Ser Leu Glu Ala
 130 135 140
 Gly Leu Ala Ile Leu Glu Ile Leu Glu Pro Arg Ala Ala Leu Ala Ser

 145 150 155 160
 Glu Arg Gly Leu Asn Pro His Glu Cys Tyr Ser Pro Arg Ala Ala Arg
 165 170 175
 Gly Val Ala Leu Gly Leu Ala Ile Leu Glu Ile Leu Glu Ala Leu Ala
 180 185 190
 Thr His Arg Met Glu Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly
 195 200 205
 Leu Tyr Gly Leu Ala Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Cys Tyr Ser Leu Glu
 210 215 220

 Ala Ala Ser Asn Pro Arg Ala Gly Leu Ala Ser Glu Arg Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Ala Leu Ala Ile Leu Glu Leu Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Ala Leu
 245 250 255
 Glu Ala Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Leu Tyr
 260 265 270
 Ser Gly Leu Ala Ala Arg Gly Ser Glu Arg Leu Tyr Ser Ala Arg Gly
 275 280 285

Ser Glu Arg Pro Arg Ala

290

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu

1 5 10 15

Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys

20 25 30

Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu

35 40 45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala

50

55

60

Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys

65 70 75 80

Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Met Ser Lys Arg

85 90 95

Ser Pro

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu

1 5 10 15

Ser Gly Ile Gln Gly

20

<210> 4

<211> 77

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
 20 25 30
 Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
 35 40 45
 Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu

50 55 60
 Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro
 65 70 75

<210> 5
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
 20 25 30
 Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys

35 40 45
 Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Met Ser Lys Arg Ser Pro
 65 70 75

<210> 6
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro
1 5 10 15

Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln

20 25 30
Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu

35 40 45

Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys

50 55 60

Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro

65 70 75

<210> 7

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro

1 5 10 15
Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln

20 25 30

Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu

35 40 45

Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys

50 55 60

Ala Val Ser Lys Glu Met Ser Lys Arg Ser Pro

65 70 75

<210> 8

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn

1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45

Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser
65 70

<210> 9

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45

Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Met Ser
65 70