

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507740

(P2004-507740A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 78 頁)

(21) 出願番号	特願2002-521989 (P2002-521989)	(71) 出願人	500257447
(86) (22) 出願日	平成12年10月24日 (2000.10.24)		アシスタンス ピュブリック-オピト ド
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		パリ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2000/001559		ASSISTANCE PUBLIQUE
(87) 国際公開番号	W02002/016949		-HOPITAUX DE PARIS
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		フランス、エフ-75004 パリ、アベ
(31) 優先権主張番号	00402326.3		ニュ ビクトリア 3
(32) 優先日	平成12年8月21日 (2000.8.21)		3, avenue Victoria, F
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		-75004 Paris, FRANCE
(31) 優先権主張番号	09/687, 459	(74) 代理人	100075812
(32) 優先日	平成12年10月13日 (2000.10.13)		弁理士 吉武 賢次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学マーカーを用いる繊維性疾患の診断方法

## (57) 【要約】

本発明は、容易に検出可能な生物学的マーカーの血清濃度を用いることによる、患者、特にC型肝炎ウイルスに感染した患者における炎症性、繊維性または癌性の疾患の進展を検出するための新規な診断に関する。本発明は、この方法を実行するための診断キットにも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者の炎症性、繊維性または癌性の疾患の診断方法であって、

a) 患者の血清または血漿中の生化学マーカーの値を測定し、

b) 前記マーカーを含むロジスティック関数によって、前記値を組合わせて、

c) 前記ロジスティック関数の限界値を分析して、患者における肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在を測定する

段階を含んでなる、方法。

## 【請求項 2】

疾患が肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在である、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 3】

ロジスティック関数が、

i) 疾患の拡張にしたがって、様々な群の患者を分類し、

ii) 次元分析によってこれらの群の間で有意に異なる因子を同定し、

iii) ロジスティック回帰分析を行って、繊維症および/または肝壊死炎症性病変の診断の目的でマーカーの独立した特有の値を評価し、

iv) これらの同定した独立因子を組合せることによって、ロジスティック関数を構築する、

ことによって得られる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

少なくとも 4 種類の生化学マーカーを段階 a) において検討する、請求項 1 に記載の方法 20

## 【請求項 5】

前記マーカーが、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、AST、ALT、GGT、 $\alpha_1$ -グロブリン、総ビリルビン、アルブミン、 $\alpha_1$ -グロブリン、 $\alpha_2$ -グロブリン、ハプトグロビン、 $\alpha_2$ -グロブリン、アポ A1、IL10、TGF- $\beta_1$ 、アポ A2、アポ B からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

ロジスティック関数が更に患者の年齢および性別を考慮に入れる、請求項 1 に記載の方法 30

## 【請求項 7】

繊維症の診断に用いる測定した前記生化学マーカーが、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、GGT、 $\alpha_1$ -グロブリン、総ビリルビン、( $\alpha_2$ -グロブリンまたはハプトグロビン)、およびアポ A1 を包含する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

壊死炎症性病変の存在の診断に用いる測定した前記生化学マーカーが、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、GGT、 $\alpha_1$ -グロブリン、(ALT または AST)、およびアポ A1 を包含する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

ロジスティック関数が、下記 f1 ~ f5 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法 40

f1 =  $a_1 \times \text{Log} [\alpha_2\text{-マクログロブリン (g/l)}] - a_2 \times [\alpha_2\text{-グロブリン (g/l)}] + a_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + a_4 \times [\alpha_1\text{-グロブリン (g/l)}] + a_5 \times [\text{年齢 (才)}] + a_6 \times \text{Log} [\text{ビリルビン (umol/l)}] - a_7 \times [\text{アポ A1 (g/l)}] + a_8 \times [\text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)}] - a_9$

(式中、

$a_1$  は 6.5 ~ 6.9 であり、

$a_2$  は 0.450 ~ 0.485 であり、

$a_3$  は 1.100 ~ 1.300 であり、

$a_4$  は 0.0700 ~ 0.0750 であり、

$a_5$  は 0.0265 ~ 0.0300 であり、  
 $a_6$  は 1.400 ~ 1.700 であり、  
 $a_7$  は 0.900 ~ 1 であり、  
 $a_8$  は 0.300 ~ 0.450 であり、かつ  
 $a_9$  は 4.200 ~ 4.700 である) ;  
 $f_2 = b_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - b_2 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + b_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + b_4 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] + b_5 \times [ \text{年齢 (才)} ] + b_6 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - b_7 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + b_8 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] + b_9 [ \text{アルブミン (g/l)} ] + b_{10} [ \text{1 - グロブリン (g/l)} ] - b_{11} [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ]^2 - b_{12} \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - b_{13}$

(式中、

$b_1$  は 9.9 ~ 10.2 であり、  
 $b_2$  は 0.7 ~ 0.77 であり、  
 $b_3$  は 2 ~ 2.4 であり、  
 $b_4$  は 0.1 ~ 0.2 であり、  
 $b_5$  は 0.04 ~ 0.07 であり、  
 $b_6$  は 4 ~ 4.6 であり、  
 $b_7$  は 2 ~ 2.5 であり、  
 $b_8$  は 0.28 ~ 0.32 であり、  
 $b_9$  は 0.025 ~ 0.04 であり、  
 $b_{10}$  は 2 ~ 2.2 であり、  
 $b_{11}$  は 0.1 ~ 0.16 であり、  
 $b_{12}$  は 0.7 ~ 0.9 であり、かつ  
 $b_{13}$  は 12 ~ 14 である) ;

$f_3 = c_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - c_2 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + c_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + c_4 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] - c_5 \times [ \text{年齢 (才)} ] + c_6 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - c_7 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] - c_8 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] - c_9$

(式中、

$c_1$  は 3.45 ~ 3.65 であり、  
 $c_2$  は 0.3 ~ 0.4 であり、  
 $c_3$  は 0.8 ~ 1 であり、  
 $c_4$  は 0.075 ~ 0.09 であり、  
 $c_5$  は 0.0015 ~ 0.003 であり、  
 $c_6$  は 2.1 ~ 2.5 であり、  
 $c_7$  は 1.55 ~ 1.75 であり、  
 $c_8$  は 0.35 ~ 0.45 であり、かつ  
 $c_9$  は 4 ~ 4.6 である) ;

$f_4 = d_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - d_2 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + d_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + d_4 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] + d_5 \times [ \text{年齢 (才)} ] + d_6 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - d_7 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + d_8 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] + d_9 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - d_{10}$

(式中、

$d_1$  は 5.3 ~ 6.7 であり、  
 $d_2$  は 0.45 ~ 0.5 であり、  
 $d_3$  は 0.8 ~ 1.2 であり、  
 $d_4$  は 0.06 ~ 0.08 であり、  
 $d_5$  は 0.0015 ~ 0.0025 であり、

$d_6$  は 1 ~ 1.2 であり、  
 $d_7$  は 1 ~ 1.2 であり、  
 $d_8$  は 0.09 ~ 1.1 であり、  
 $d_9$  は 1.2 ~ 1.5 であり、かつ  
 $d_{10}$  は 4 ~ 5 である) ;

$f_5 = z_1 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - z_2 \times \text{Log} [ \text{ハプトグロブリン} (g/l) ] + z_3 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + z_4 \times [ \text{年齢} (才) ] + z_5 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - z_6 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + z_7 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - z_8$

(式中、

$z_1$  は 4 ~ 5 であり、  
 $z_2$  は 1.2 ~ 1.5 であり、  
 $z_3$  は 0.9 ~ 1.1 であり、  
 $z_4$  は 0.0026 ~ 0.03 であり、  
 $z_5$  は 1.6 ~ 1.9 であり、  
 $z_6$  は 1 ~ 1.3 であり、  
 $z_7$  は 0.25 ~ 0.35 であり、かつ  
 $z_8$  は 5 ~ 6 である)。

【請求項 10】

ロジスティック関数が、下記  $f_1 - a \sim f_5$  からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法： 20

$f_1 - a = 6.826 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.479 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 1.252 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0707 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0273 \times [ \text{年齢} (才) ] + 1.628 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 0.925 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.344 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 0) ] - 4.544 ;$

$f_1 - b = 6.552 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.458 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 1.113 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0740 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0295 \times [ \text{年齢} (才) ] + 1.473 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 0.979 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.414 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 4.305 ;$  30

$f_2 = 10.088 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.735 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 2.189 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.137 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0546 \times [ \text{年齢} (才) ] + 4.301 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 2.284 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.294 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] + 0.0312 \times [ \text{アルブミン} (g/l) ] + 2.109 \times [ 1 - \text{グロブリン} (g/l) ] - 0.136 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] - 0.813 \times \text{Log} [ \text{ALT} (IU/l) ] - 13.165 ;$

$f_3 = 3.513 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.354 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.889 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0827 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] - 0.0022 \times [ \text{年齢} (才) ] + 2.295 \times \text{Log} [ \text{ALT} (IU/l) ] - 1.670 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] - 0.415 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 4.311 ;$  40

$f_4 = 5.981 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.481 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.965 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0679 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0190 \times [ \text{年齢} (才) ] + 1.143 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 1.097 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.092 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] + 1.355 \times \text{Log} [ \text{ALT} (IU/l) ] - 4.498 ;$

$f_5 = 4.467 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 1.357 \times \text{Log}$  50

$[ \text{ハプトグロビン} ( \text{g} / \text{l} ) ] + 1.017 \times \text{Log} [ \text{GGT} ( \text{IU} / \text{l} ) ] + 0.0281 \times [ \text{年齢} ( \text{才} ) ] + 1.737 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} ( \text{umol} / \text{l} ) ] - 1.184 \times [ \text{アポA1} ( \text{g} / \text{l} ) ] + 0.301 \times [ \text{性} ( \text{女性} = 0, \text{男性} = 0 ) ] - 5.540$

【請求項 1 1】

ロジスティック関数の限界値を用いて肝硬変を診断する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 2】

ロジスティック関数の限界値を用いて疾患の発生を予測する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ロジスティック関数の限界値を用いて、患者に適切な治療を選択する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 1 4】

ロジスティック関数の限界値を患者の肝生験を行うことの決定に用いる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

患者が、場合によっては肝硬変に進展するような肝繊維症を伴う疾患に罹っている、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

疾患が、B および C 型肝炎、アルコール中毒、血色素症、代謝性疾患、糖尿病、肥満症、自己免疫肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、1 - アンチトリプシン欠損症、Wilson 病からなる群に包含される、請求項 1 5 に記載の方法。 20

【請求項 1 7】

疾患が C 型肝炎ウイルス感染症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

患者の炎症性、繊維性または癌性の疾患の診断キットであって、生化学マーカーを投薬した後、患者における炎症性、繊維性または癌性の疾患の存在を決定しうる使用説明書を含んでなる、キット。

【請求項 1 9】

患者の肝繊維症および / または肝壊死炎症性病変の診断キットであって、生化学マーカーを投薬した後、患者における肝繊維症および / または肝壊死炎症性病変の存在を決定しうる使用説明書を含んでなる、キット。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、容易に検出可能な生物学的マーカーの血清濃度を用いることによって患者、特に C 型肝炎ウイルスに感染した患者の炎症性、繊維性または癌性疾患、特に肝繊維症の拡張を検出するための新規な診断方法に関する。本発明は、この方法を実行するための診断キットにも関する。

【0002】

背景技術

肝生験は、C 型肝炎ウイルス ( HCV ) に感染した患者の管理のために、特に繊維症期 ( 1 - 4 ) には是非とも必要であると考えられている。患者と一般の開業医にとっては、これは積極的な処置と考えることができる ( 5 - 6 )。多数の研究により、肝硬変の診断のための幾つかのマーカーの重要な予測値が示されているが ( 6 - 15 )、HCV ウイルスだけに感染した大きな個体群で予想される僅かな隔壁 ( 架橋状繊維症の開始 ) のような初期段階の診断については、全く報告がなされていない。

【0003】

しかしながら、肝病理学の進展においてこれらの初期段階を検出できるようにすることは、患者の治療および疾病の継続管理を向上させる上で重要である。肝生験は未だに侵襲性 40 50

の処置であるので、患者の繊維症のレベルの良好な予測値が得られる迅速且つ容易に行われる検査があれば有利であろう。

【0004】

C型肝炎ウイルスに感染した後、この疾患の進展により繊維症を生じ、後に肝硬変となる可能性がある。肝生験は繊維症の段階の決定を考慮しているが、肝壊死炎症性病変の存在も考慮している。繊維症の程度を補完するこのような病巣の強度および活性は、この疾患の進展の診断および予知、および施療のタイプを決定する上で重要な要因として医師によって認知されている。

【0005】

従って、患者における繊維症および/または病変の存在(または非存在)の良好な予測値が得られ且つ肝生験の必要性を少なくするのに十分な信頼性のある診断法を開発することが求められている。

【0006】

【発明の概要】

本発明は、特に有意な繊維症(僅かな隔膜から肝硬変まで)および/または肝壊死炎症性病変の診断に極めて適した患者の肝臓における、炎症性、繊維性または癌性疾患の診断のための簡単な血清生化学マーカーの組合せの予測値を予想して評価する診断方法を提供する。高い正の予測値(有意な繊維症の予測)または負の予測値に到達することにより、生験指示の数は減少することになる。これは、患者と社会にとって生験特に肝生験の費用と危険性を減少する上で有用である(6)。

【0007】

【発明の具体的説明】

従って、本発明は、患者の炎症性、繊維性または癌性の疾患の診断方法であって、

- a) 患者の血清中の生化学マーカーの値を測定し、
  - b) 前記マーカーを含むロジスティック関数によって、前記値を組合わせて、
  - c) 前記ロジスティック関数の限界値を分析して、患者における肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在を測定する
- 段階を含んでなる方法に関する。

【0008】

生化学マーカーは患者の血漿で評価することもでき、この方法は、(患者の血清または血漿を採取する)任意の第一段階を用いないときには、イン・ビトロにおいてであると考えることができる。

【0009】

特に、本発明の方法は、患者における肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在の診断に完全に適している。これは、患者の肺または腎臓における炎症性および/または繊維性疾患の診断に用いることもできる。これは、例えば肺、胸部、膀胱、結腸における癌性病変の診断にも適している。

【0010】

ロジスティック関数は、下記の方法、すなわち

- i) 疾患の拡張にしたがって、様々な群の患者を分類し、
  - ii) 次元分析によってこれらの群の間で有意に異なる因子を同定し、
  - iii) ロジスティック回帰分析を行って、繊維症および/または肝壊死炎症性病変の診断の目的でマーカーの独立した特有の値を評価し、
  - iv) これらの同定した独立因子を組合せることによって、ロジスティック関数を構築する(指標を構築する)
- ことによって得られる。

【0011】

定義によれば、識別による最良の指標(「繊維症スコア」)は、独立した因子を合わせるロジスティック回帰関数であった。

【0012】

10

20

30

40

50

ロジスティック関数は、マーカーが繊維症の段階と負の相関を含むときは、ロジスティック回帰で個々に決定したそれぞれのパラメーターの相対重量を負の符号と組み合わせることによって得られる。値が極めて大きな範囲であるマーカーについては、対数を用いる。

【0013】

ロジスティック関数は、診断について所望される閾値によって得られるROC曲線によって分析される。ROC曲線を得る方法は、例に記載されている。本発明では、患者は少数の隔膜から出発する繊維症の存在によって分類されたが、多数の隔膜または肝硬変のみの患者を診断使用とするものである場合には、これは変更することができる。この結果、例に記載されているもう一つのROC曲線が得られる。

【0014】

患者の肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在の診断は、個体群における肝繊維症の予想有病率に関するデータによって更に正確にすることができる。

【0015】

好ましくは、本発明による方法の段階a)で投与される生化学マーカーは「単純な」生化学マーカーであり、これは、生化学マーカーが当該技術分野で既に知られている方法(クロマトグラフィー、電気泳動、ELISAドーシング(dosing)など)によって容易に投与されることを意味する。

【0016】

例えば、本発明の方法に完全に適するマーカーとしては、2-マクログロブリン、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)、 $\alpha$ -グロブリン、総ビリルビン、アルブミン、 $\alpha$ -1-グロブリン、 $\alpha$ -2-グロブリン、ハプトグロビン、 $\alpha$ - $\alpha$ -グロブリン、アポリポタンパク質A1(アポA1)、IL10、TGF- $\beta$ 1、アポA2、アポBが挙げられる。検討を行った疾患によっては、他のサイトカイン、または当業者に知られている特異的マーカーを用いることもできる。腎臓または膀胱疾患については、患者の尿試料について幾らかドーシングを行うのが好都合であることがある。

【0017】

本発明の方法の特定の態様では、少なくとも4、更に好ましくは5または6、7または10個の生化学マーカーを検討し、方法の段階a)で投与する。

【0018】

好ましくは、肝繊維症の診断を目的とするときには、これらのマーカーは、2-マクログロブリン、GGT、 $\alpha$ -グロブリン、総ビリルビン、( $\alpha$ -2-グロブリン、またはハプトグロビン)、およびアポA1である。 $\alpha$ -2-グロブリンは主としてハプトグロビンから構成されている2-マクログロブリンと2-ミクログロブリンとの和であるので、ハプトグロビンを2-グロブリンの代わりに用いることができる。従って、2-ミクログロブリンとハプトグロビンの相対重量は、ロジスティック関数で調整される。

【0019】

肝壊死炎症性病変の存在の診断を目的とするときには、投与されるマーカーが2-マクログロブリン、GGT、 $\alpha$ -グロブリン、(ALTまたはAST)およびアポA1を含むときが最良である。本発明の出願明細書に記載のデータはASTまたはALTが相関していることを示しているので、これらのマーカーは区別なく用いることができる。従って、一方のマーカーを他のものに代えても、相関因子を考慮したロジスティック関数の係数の平衡化が生じるだけである。

【0020】

ロジスティック関数は、患者の年齢および性別のような他のマーカーを用いることもできる。ロジスティック関数の異なるマーカーについて得た値に用いる異なる係数は、例に記載されている通りに、統計解析によって計算することができる。

【0021】

特に、本発明の方法の実行に用いることができる適当なロジスティック関数は、下記の通りである。

10

20

30

40

50

## 【0022】

6個のマーカ-を使用：

$$f_1 = a_1 \times \text{Log} [ \text{ }^2\text{-マクログロブリン} (g/l) ] - a_2 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + a_3 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + a_4 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + a_5 \times [ \text{年齢} (オ) ] + a_6 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (\mu\text{mol}/l) ] - a_7 [ \text{アポA1} (g/l) ] + a_8 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - a_9$$

(式中、

$a_1$  は 6.5 ~ 6.9 であり、

$a_2$  は 0.450 ~ 0.485 であり、

$a_3$  は 1.100 ~ 1.300 であり、

$a_4$  は 0.0700 ~ 0.0750 であり、

$a_5$  は 0.0265 ~ 0.0300 であり、

$a_6$  は 1.400 ~ 1.700 であり、

$a_7$  は 0.900 ~ 1 であり、

$a_8$  は 0.300 ~ 0.450 であり、かつ

$a_9$  は 4.200 ~ 4.700 である)。

## 【0023】

特異的に使用可能な関数は、具体的には下記の通りである。

$$f_1 - a = 6.826 \times \text{Log} [ \text{ }^2\text{-マクログロブリン} (g/l) ] - 0.479 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + 1.252 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0707 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + 0.0273 \times [ \text{年齢} (オ) ] + 1.628 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (\mu\text{mol}/l) ] - 0.925 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.344 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 4.544 ; \text{または}$$

$$f_1 - b = 6.552 \times \text{Log} [ \text{ }^2\text{-マクログロブリン} (g/l) ] - 0.458 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + 1.113 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0740 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + 0.0295 \times [ \text{年齢} (オ) ] + 1.473 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (\mu\text{mol}/l) ] - 0.979 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.414 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 4.305 ;$$

## 【0024】

10個のマーカ-を使用：

$$f_2 = b_1 \times \text{Log} [ \text{ }^2\text{-マクログロブリン} (g/l) ] - b_2 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + b_3 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + b_4 \times [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ] + b_5 \times [ \text{年齢} (オ) ] + b_6 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (\mu\text{mol}/l) ] - b_7 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + b_8 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] + b_9 [ \text{アルブミン} (g/l) ] + b_{10} [ \text{ }^1\text{-グロブリン} (g/l) ] - b_{11} [ \text{ }^2\text{-グロブリン} (g/l) ]^2 - b_{12} \times \text{Log} [ \text{ALT} (IU/l) ] - b_{13}$$

(式中、

$b_1$  は 9.9 ~ 10.2 であり、

$b_2$  は 0.7 ~ 0.77 であり、

$b_3$  は 2 ~ 2.4 であり、

$b_4$  は 0.1 ~ 0.2 であり、

$b_5$  は 0.04 ~ 0.07 であり、

$b_6$  は 4 ~ 4.6 であり、

$b_7$  は 2 ~ 2.5 であり、

$b_8$  は 0.28 ~ 0.32 であり、

$b_9$  は 0.025 ~ 0.04 であり、

$b_{10}$  は 2 ~ 2.2 であり、

$b_{11}$  は 0.1 ~ 0.16 であり、

$b_{12}$  は 0.7 ~ 0.9 であり、かつ

$b_{13}$  は 12 ~ 14 である)。

## 【0025】

特異的に使用可能な関数は、下記の通りである。

$$f_2 = 10.088 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - 0.735 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + 2.189 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + 0.137 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] + 0.0546 \times [ \text{年齢 (才)} ] + 4.301 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - 2.284 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + 0.294 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] + 0.0312 [ \text{アルブミン (g/l)} ] + 2.109 [ \text{1 - グロブリン (g/l)} ] - 0.136 [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] - 0.813 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - 13.165.$$

## 【0026】

有意な活性を測定するために6個のマーカーを使用：

$$f_3 = c_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - c_2 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + c_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + c_4 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] - c_5 \times [ \text{年齢 (才)} ] + c_6 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - c_7 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] - c_8 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] - c_9$$

(式中、

$c_1$  は 3.45 ~ 3.65 であり、

$c_2$  は 0.3 ~ 0.4 であり、

$c_3$  は 0.8 ~ 1 であり、

$c_4$  は 0.075 ~ 0.09 であり、

$c_5$  は 0.0015 ~ 0.003 であり、

$c_6$  は 2.1 ~ 2.5 であり、

$c_7$  は 1.55 ~ 1.75 であり、

$c_8$  は 0.35 ~ 0.45 であり、かつ

$c_9$  は 4 ~ 4.6 である)。

## 【0027】

特異的な使用可能な関数は、特に下記の通りである：

$$f_3 = 3.513 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - 0.354 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + 0.889 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + 0.0827 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] - 0.0022 \times [ \text{年齢 (才)} ] + 2.295 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - 1.670 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] - 0.415 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] - 4.311.$$

## 【0028】

有意な繊維症または有意な活性の診断のために7個のマーカーを使用：

$$f_4 = d_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - d_2 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + d_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + d_4 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] + d_5 \times [ \text{年齢 (才)} ] + d_6 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - d_7 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + d_8 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] + d_9 \times \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - d_{10}$$

(式中、

$d_1$  は 5.3 ~ 6.7 であり、

$d_2$  は 0.45 ~ 0.5 であり、

$d_3$  は 0.8 ~ 1.2 であり、

$d_4$  は 0.06 ~ 0.08 であり、

$d_5$  は 0.0015 ~ 0.0025 であり、

$d_6$  は 1 ~ 1.2 であり、

$d_7$  は 1 ~ 1.2 であり、

$d_8$  は 0.09 ~ 1.1 であり、

$d_9$  は 1.2 ~ 1.5 であり、かつ

$d_{10}$  は 4 ~ 5 である)。

## 【0029】

特異的な使用可能な関数は、下記の通りである：

$$f_4 = 5.981 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - 0.481 \times [ \text{2 - グロブリン (g/l)} ] + 0.965 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + 0.0679 \times [ \text{- グロブリン (g/l)} ] + 0.0190 \times [ \text{年齢 (才)} ] + 1.143 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - 1.097 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + 0.092 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] + 1.355 \text{Log} [ \text{ALT (IU/l)} ] - 4.498$$

## 【0030】

有意な繊維症の診断のため、5個のマーカ―を使用：

$$f_5 = z_1 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - z_2 \times \text{Log} [ \text{ハプトグロビン (g/l)} ] + z_3 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + z_4 \times [ \text{年齢 (才)} ] + z_5 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - z_6 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + z_7 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)} ] - z_8$$

(式中、

$z_1$  は 4 ~ 5 であり、

$z_2$  は 1.2 ~ 1.5 であり、

$z_3$  は 0.9 ~ 1.1 であり、

$z_4$  は 0.0026 ~ 0.03 であり、

$z_5$  は 1.6 ~ 1.9 であり、

$z_6$  は 1 ~ 1.3 であり、

$z_7$  は 0.25 ~ 0.35 であり、かつ

$z_8$  は 5 ~ 6 である)。

## 【0031】

特異的な使用可能な関数は、下記の通りである：

$$f_5 = 4.467 \times \text{Log} [ \text{2 - マクログロブリン (g/l)} ] - 1.357 \times \text{Log} [ \text{ハプトグロビン (g/l)} ] + 1.017 \times \text{Log} [ \text{GGT (IU/l)} ] + 0.0281 \times [ \text{年齢 (才)} ] + 1.737 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン (umol/l)} ] - 1.184 \times [ \text{アポA1 (g/l)} ] + 0.301 \times [ \text{性 (女性 = 0, 男性 = 0)} ] - 5.540$$

## 【0032】

実際に、様々な関数の係数に対する多数の定義は、検討を行う患者の数および特徴によって若干変動することができる(約10~15%)。従って、異なるマーカ―の係数について与えられる値は、本発明の範囲を減少することなく若干異なるものであることができる。と解釈されなければならない。

## 【0033】

生物学的マーカ―について測定した値のロジスティック関数を用いて解析することによって得た限界値によっては、患者について肝繊維症の存在を結論づけることができる。ROC曲線の図面における閾値として肝硬変を見なすことによって肝硬変の存在を結論づけることもできる。

## 【0034】

本発明の方法は、疾患の発生の予測手段として用いることもできる。特に、患者がC型肝炎ウイルスに感染しているときには、感染(通常は輸血による)日を確定できることが多い。従って、診断日による疾患の発生率を測定する目的で本発明の方法を用い、疾患の将来における進展を予測することもできる。

## 【0035】

本発明による診断法によって得られたデータは、疾患の病期に準じて患者の適切な治療法を選択する上で医師にとって極めて重要である可能性もある。

## 【0036】

医者にかかっている患者の個体群における肝繊維症の有病率によっては、本発明の方法に

10

20

30

40

50

よって得たデータを用いて、患者の肝生験を行う必要性を決定することができる。本発明の方法により、肝生験の必要性が約50%まで減少することが予想される。

【0037】

本発明の方法は、肝硬変にまで進展する可能性がある肝繊維症などの任意の疾患に罹っている患者に用いようとするものである。特に、本発明の方法は、BおよびC型肝炎、アルコール中毒、血色素症、代謝性疾患、糖尿病、肥満症、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、1-アンチトリプシン欠損症、Wilson病からなる群に包含される疾患に罹っている患者で肝繊維症を検出する目的で有利に行われる。

【0038】

本発明の方法は、肝炎ウイルス、特にC型肝炎ウイルスに感染した患者で最も良好に行われる。 10

【0039】

本発明はまた、患者の炎症性、繊維性または癌性の疾患の診断キットであって、生化学マーカーを投薬した後、患者における炎症性、繊維性または癌性の疾患の存在を決定しうる使用説明書を含んでなる、キットに関する。

【0040】

本発明はまた、患者の肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の診断キットであって、生化学マーカーを投薬した後、患者における肝繊維症および/または肝壊死炎症性病変の存在を決定しうる使用説明書を含んでなる、キットに関する。

【0041】

使用説明書は、生化学マーカーの投薬量を決定した後に用いなければならないロジスティック関数を含んでなることがある。これは、印刷されたサポートとしても、ソフトウェアのようなコンピューターで使用可能なサポートとして出版される可能性がある。この使用説明書は、ロジスティック関数から得られる限界値を分析するための検討を行う閾値によってはROC曲線を含んでなることもある。それらは、患者個体群における繊維症の予想有病率によっては、予測値を得る様々な表を含んでなることもある。 20

【0042】

本発明による診断キットは、目的とする生物学的マーカーを投薬できる要素を含むこともある。 30

【0043】

本発明の方法は、容易に自動化し、マーカーの投薬を自動的にを行い、データをコンピューターまたはロジスティック関数の値を計算してROC曲線を用いてこれを解析し、最終的に患者個体群における肝繊維症の有病率を解析する計算機に送ることができる。従って、医師によって得られるデータは一層容易に解釈可能となり、生験の必要性または処方すべき適正な治療法を決定する過程が改良される。 40

【0044】

下記の例は、発明の態様を説明し、本発明の方法を反復するための方法を得ることを意味するが、発明を制限するものではない。

【0045】

【実施例】

例1：患者および方法

1.1. 患者

検討に含まれる患者は、単一センターのコホートに属した(DOSVIRC)。このコホートは、1993年以前および以後のPitie-Salpetriere Hospital、パリ、フランス国の肝および消化器ユニットで追跡した総てのC型肝炎患者を包含した(16)。社会人口統計学的管理データ、危険因子、および来診時毎の臨床的、生物学的、ウイルス学および治療項目など129項目、および肝生験を行ったときの組織学的データを含む特定の質問票を、患者毎に記入した。HCV感染の期間を輸血または非経口的供給源に最初に暴露した日から推定したが、散発性感染患者や感染源が不明な患者については算出することができなかった。除外基準は、HBsAgまたはHIV陽性抗体 50

の存在であった。1997年8月から2000年3月まで、PCRにより検出可能なHCVを有する肝生験を行う総ての情報を知らされた患者が予め包含され、血液試料を生験の当日に採取した。除外基準は、HIV、HBV、他の肝疾患への同時感染、および解釈不能な肝生験であった。

#### 【0046】

解析は第一期について行い（初年のトレーニング期、患者数206）、第二期で確認した（確認期、患者数156）（表1）。

もう一つの解析は、トレーニング期の1名の患者と確認期の22名の患者を除外した後にいった（表4）。

#### 【0047】

10

##### 1.2. 血清マーカー

下記の11項目の試験を、2つの期間について評価した：2 - マクログロブリン、AST、ALT、GGT、総ビリルビン、アルブミン、1 -、2 -、 - および - グロブリン、アポA1。2グロブリン（主として2 - マクログロブリンおよびハプトグロビンからなる）の独立した診断値を説明するため、ハプトグロビンの遡及評価を2期間について行った。

#### 【0048】

IL10、TGF-1、アポA2、およびアポBは、第二期のみについて評価した。AST、ALT、GGT、総ビリルビンは、Roche Diagnostics 試薬（Mannheim、ドイツ国）を用いてHitachi 917自動分析装置によって評価した。

20

#### 【0049】

アルブミンは、自動分析装置Hydrasys and Hyrys（Sebia、Issy-les-Moulineaux、フランス国）で行った血清タンパク質電気泳動（1 -、2 -、 - および - グロブリン画分）とは別に、プロモクレゾールグリーン法（17）によって評価した。

アポリポタンパク質 - A1、 - A2、 - B、および2マクログロブリンは、血清試料（分析まで - 80 で保存）で自動比濁計BNII（Dade Behring Marburg、ドイツ国）を用いて測定した。

血漿TGF-1濃度は、QuantikineヒトTGF-1イムノアッセイ（R and D Systems, Inc.、ミネアポリス、ミネソタ、米国）を用いて測定した。潜在性のTGF-1を免疫反応性形態に活性化するため、試料を酸によって活性化した後、中和した。

30

血漿インターロイキン10は、イムノアッセイキット（Beckman Coulter Company Immunotech、マルセイユ、フランス国）を用いて測定した。

血漿試料は、分析を行うまで - 80 で保存した（1年未満）。

#### 【0050】

##### 1.3. 組織学的な段階および等級の決定

肝標本の組織学的特徴を、METAVIRスコアリングシステムによって分析した（18, 19）。長さが10mmを上回る肝生験を固定して、パラフィン包埋し、コラーゲンについて少なくともヘマトキシリンエオシンサフランおよびMasson三原色またはピクロシリウスレッドで染色した。

40

#### 【0051】

それぞれの肝生験について、繊維症の段階および活性の等級を下記の基準に準じて確定した。肝生験は、0~4の尺度で段階設定した：0 = 繊維症なし、1 = 隔膜なしの肝門部繊維症、2 = 少数の隔膜、3 = 肝硬変のない多数の隔膜、および4 = 肝硬変。この特徴は、病理学者間で極めて再現性が高いことが示されている。

#### 【0052】

壊死炎症性病変の強度を評価する活性の等級付けは、下記のように示した：A0 = 組織学的活性なし、A1 = 穏やかな活性、A2 = 中程度の活性、およびA3 = 強い活性。MET

50

A V I Rスコアリングシステムは、患者の特徴を知らない単一の病理学者（F C）によって評価された。

【0053】

#### 例2：統計分析

統計分析には、ロジスティック回帰およびROC曲線を用いた（20）。分析は第一期（最初の年のトレーニング期）に行い、第二期（確認期）で確認した。患者のコホートは表1および4の通り。

【0054】

次に、最終分析を、2つの期間を合わせて全個体群について行った（表2および5参照）。

M E T A V I Rスコアリングシステムに準じて、患者を数群に分けた。

主要な限界値は、有意な繊維症を有する患者（F 2、F 3またはF 4）対有意な繊維症を持たない患者（F 0またはF 1）の同定であった。

【0055】

第二の分析では、患者を活性等級によって分類した：有意な活性を持たない患者（A 0またはA 1）および組織学的活性を有する患者（A 2またはA 3）。

有意でない組織学的特徴を有する群（A < 2およびF < 2）と有意な病変の群（A > 2および/またはF > 2）を定義した。

最後に、広汎な繊維症または肝硬変を有する群（F 3またはF 4）も定義した。

【0056】

第一段階は、カイ二乗、Student t検定、またはMann-Whitney検定を用いる次元分析によってこれらの群で有意差を示す因子を同定することからなっていた。

第二段階は、繊維症の診断のためのマーカーの独立した識別値を評価するためのロジスティック回帰分析からなっていた。

第三段階は、これらの同定した独立因子を合わせる指標を構築することであった。定義によれば、識別に関する最良の指標（「繊維症スコア」）は、独立因子を合わせるロジスティック回帰関数であった。

【0057】

これらの指標および単離した因子の診断値を、感受性、特異性、正および負の予測値、およびレシーバー操作特性によって評価した。これらの予測値を有意な繊維症の実測有病率（この検討では40%）に対して評価したが、これより低い（10%）またはこれより高い有病率（90%）に対しても評価した。

【0058】

それぞれの総合診断値を、レシーバー操作特性（Receiver Operating Characteristic）曲線の下面積によって比較した。ROC曲線は、異なる閾値（0～1）についてのロジスティック関数に対して得られた値に準じて患者を分類した後、感受性対（1 - 特異性）をプロットすることによって描かれる。通常は、ROC曲線の下面積が0.7より大きな値を有する曲線は、診断に良好な予測曲線であると認められている。ROC曲線は、診断法の品質を予測する曲線として認められなければならない。

【0059】

これらの統計分析は、上記で定義した異なる群について別々に行った。

因子の数を減少させるため、6個の極めて有意なマーカーのみを合わせる分析を行った（f1 - aまたはf1 - b）。

分析の際に、2マクログロブリンを考慮するときには2グロブリンが独立した診断値を有することが見られたので、2グロブリンの第二の主成分であるハプトグロビンの診断値を遡及的に評価した。

【0060】

タンパク質電気泳動成分を除く5個のマーカーを有する指標を、最終的にハプトグロビン

10

20

30

40

50

と4個の他の同定されたマーカーを合わせて構築した(ロジスティック関数 f 5)。

【0061】

### 例3:ロジスティック関数の決定

総数が422名の慢性C型肝炎の患者を、予め包含した。

繊維症ステージングが他では不可能であったこと、または11個のマーカーから少なくとも1個を投薬することが不可能であったことにより除外された数によっては(HIV同時感染、HBV同時感染および移植)、それぞれ表1および4に示されるように、総数362(最初の検討)または339(二番目の検討)名の慢性C型肝炎患者が検討に包含された。

第一および第二の試料の間には、患者の特徴と生化学マーカーとの間に差はなかった(表1および4)。有意な繊維症の総有病率は、組織学によって測定されたように、40%(F0 17~18%、F1 42~43%、F2 19~20%、F3 8%、F4 12~13%)であった。

【0062】

### 3.1.有意な繊維症の診断

11個の生化学マーカーのそれぞれの診断値(ROC曲線の下面積)、並びに繊維症とのそれらの独立結合(ロジスティック回帰)を、表2および5に示す。

10または6個の極めて有益なマーカー(2-マクログロブリン、2-ミクログロブリン、総ビリルビン、-グロブリン、アポA1、およびGGT)または5個のマーカー(2-ミクログロブリン、-グロブリンを除外し、ハプトグロビンを包含後)、および年齢および性別を合わせる繊維症スコアは、トレーニング試料並びに確認試料について、および総個体群において高い診断値を有した(表2および5)。

トランスアミナーゼALTおよびASTは高度に相関していたので(相関係数=0.88)、このマーカーが必要なときにはALTのみを用いた。

【0063】

6個のマーカー、および年齢および性別のロジスティック関数は、下記のようにして決定した:

$$f1 - a = 6.826 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.479 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 1.252 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0707 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0273 \times [ \text{年齢} (オ) ] + 1.628 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 0.925 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.344 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 4.544, \text{ または}$$

$$f1 - b = 6.552 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.458 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 1.113 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0740 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0295 \times [ \text{年齢} (オ) ] + 1.473 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 0.979 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.414 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 0) ] - 4.305.$$

【0064】

6個のマーカー、および年齢および性別のロジスティック関数は、下記のようにして決定した:

$$f5 = 4.467 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 1.357 \times \text{Log} [ \text{ハプトグロビン} (g/l) ] + 1.017 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.0281 \times [ \text{年齢} (オ) ] + 1.737 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 1.184 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.301 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] - 5.540.$$

【0065】

これらの関数は、ロジスティック回帰において個々に決定されたそれぞれのパラメーターの相対重量を、マーカーが繊維症の段階と負の相関を含むときには負の符号と合わせることで得られた。極めて広範囲の値を有するマーカーについては、対数を用いた。

【0066】

10

20

30

40

50

繊維症の決定のためのロジスティック関数の計算に10個のマーカーを用いるときには、関数は下記の通りである：

$$f_2 = 10.088 \times \text{Log} [ 2 - \text{マクログロブリン} (g/l) ] - 0.735 \times [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] + 2.189 \times \text{Log} [ \text{GGT} (IU/l) ] + 0.137 \times [ - \text{グロブリン} (g/l) ] + 0.0546 \times [ \text{年齢} (才) ] + 4.301 \times \text{Log} [ \text{ビリルビン} (umol/l) ] - 2.284 \times [ \text{アポA1} (g/l) ] + 0.294 \times [ \text{性} (女性 = 0, 男性 = 1) ] + 0.0312 [ \text{アルブミン} (g/l) ] + 2.109 [ 1 - \text{グロブリン} (g/l) ] - 0.136 [ 2 - \text{グロブリン} (g/l) ] - 0.813 \times \text{Log} [ \text{ALT} (IU/l) ] - 13.165.$$

【0067】

10または6個の極めて有益なマーカー（図1）または10、6または5個の極めて有益なマーカー（図3）を用いる繊維症スコアについてのROC曲線は、同一であった。曲線の下面積は、差がなかった。

繊維症段階による6個のマーカーの繊維症スコア分散プロットを、図2に示す。

繊維症段階による5または6個のマーカー繊維症スコア（0.00～1.00）のボックスプロットを、図4に示す。

【0068】

6個のマーカー繊維症スコアを用いたときには、0～0.20の範囲のスコア（125名の患者（第一の検討）、または119名の患者（第二の検討））については、高い負の予測値（>90% F2 F3 F4の非存在）が得られ、これは患者の約35%であり、34～59才の13名が偽陰性であった（4 F2 A0, 6 F2 A1, 3 F2 A2）。0.80～1（53名の患者（第一の検討）、または50名の患者（第二の検討））については、高い正の予測値（>90% F2 F3 F4の存在）が得られ、これは患者の15%であり、47～68才の4または5名が偽陽性であった（1または2, F1 A1, 3 F1 A2）（表3および6）。

【0069】

これらの値は、試験個体群では繊維症（F>1）の有病率について40%と計算された。試験個体群における繊維症の有病率が90%または10%であるときに考慮される予測についての値も、表3および6に示す。

【0070】

神経結合法でも同様な結果が得られ、正確に分類した患者の比率は、トレーニング、確認および試験試料について、それぞれ77%、74%および79%であった（図示せず）。第二の試料では、IL10、TGFB1、アポA2およびアポBの添加により、面積曲線が0.889±0.030に若干増加したが、6個のマーカーの繊維症スコアとは差はなかった。

【0071】

### 3.2. 低ALT患者での有意な繊維症の診断（第二の検討）

総数が43名の患者が35IU/lより低いALTを有し、10名の患者は有意な繊維症を有していた。6マーカー繊維症関数の診断値は高いままであり、ROC曲線の下面積は0.758±0.090であった。スコアが0.80より大きな2名の患者は、肝硬変を有していた。スコアが0.20より低い29名の患者中、25名は有意な繊維症を示さなかった。

【0072】

### 3.3. 肝硬変または拡張性繊維症の診断（第一の検討）

肝硬変または拡張性繊維症の診断については、同じ6マーカー（ $R^2 = 0.345$ 、 $P < 0.001$ ）を用いる繊維症スコアは極めて高いROC曲線の下面積0.929±0.020に達した。

この関数を用いて、高い負の予測値（>90% F3 F4の非存在）が0～0.80の範囲のスコアに対して得た（309名の患者、これは患者の85%であり、27～74才の32名が偽陰性であった：13肝硬変および19F3）。>0.80のスコアについては

10

20

30

40

50

、極めて高い正の予測値 (> 85% F3 F4の存在) が53名の患者で見られ、これは患者の15%であり、47~68才の8名が偽陽性であった: 4 F2および2 F1。

【0073】

### 3.4. 肝硬変または拡張性繊維症の診断(第二の検討)

肝硬変または拡張性繊維症の診断については、6マーカー ( $R^2 = 0.347$ 、 $p < 0.001$ ) を用いる同じ繊維症スコアは極めて高いROC曲線の下面積  $0.923 \pm 0.020$  に達した。

この関数を用いて、高い負の予測値 (> 90% F3 F4の非存在) が0~0.80の範囲のスコアに対して得た。患者総数の85%である289名の患者の中、30名が偽陰性であった: 11肝硬変および19 F3。> 0.80のスコアについては、極めて高い正の予測値 (> 85% F3 F4の存在) が見られた。患者総数の15%であるこれら50名の患者の中、10名が偽陽性であった: 5 F2および5 F1。

10

【0074】

### 3.5. 有意な活性あるいは繊維症または活性の診断(第一および第二の検討)

有意な活性 (A2 A3) の診断については、最良の最終的ロジスティック回帰により、ALT、2-マクログロブリン、 $\gamma$ -グロブリン、 $\alpha$ -グロブリン、アポA1、およびGGT ( $R = 0.243$ 、 $P < 0.001$ ) を合わせた。

【0075】

用いたロジスティック関数は、下記の通りであった:

$$f_3 = 3.513 \times \log [2\text{-マクログロブリン (g/l)}] - 0.354 \times [2\text{-グロブリン (g/l)}] + 0.889 \times \log [GGT (IU/l)] + 0.0827 \times [\gamma\text{-グロブリン (g/l)}] - 0.0022 \times [\text{年齢 (才)}] + 2.295 \times \log [ALT (IU/l)] - 1.670 \times [\text{アポA1 (g/l)}] - 0.415 \times [\text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)}] - 4.311.$$

20

【0076】

有意な繊維症 (F2 F3 F4) または有意な活性 (A2 A3) の診断については、最良の最終的ロジスティック回帰により、有意な繊維症のみとALT ( $R^2 = 0.290$ 、 $P < 0.001$ ) についてと同じ6個のマーカーを合わせた。

【0077】

この診断に用いるロジスティック関数は、下記の通りであった:

$$f_4 = 5.981 \times \log [2\text{-マクログロブリン (g/l)}] - 0.481 \times [2\text{-グロブリン (g/l)}] + 0.965 \times \log [GGT (IU/l)] + 0.0679 \times [\gamma\text{-グロブリン (g/l)}] + 0.0190 \times [\text{年齢 (才)}] + 1.143 \times \log [\text{ビリルビン (umol/l)}] - 1.097 \times [\text{アポA1 (g/l)}] + 0.092 \times [\text{性 (女性 = 0, 男性 = 1)}] + 1.355 \log [ALT (IU/l)] - 4.498.$$

30

【0078】

### 3.6. サイトカインと生化学マーカーの結合(第二の検討)

TGF- $\beta$ 1はプラス方向にハプトグロビン ( $R = 0.39$ 、 $p < 0.001$ ) と結合し、マイナス方向に2マクログロブリン ( $R = -0.20$ 、 $p = 0.02$ )、ビリルビン ( $R = -0.32$ 、 $p < 0.001$ ) およびGGT ( $R = -0.20$ 、 $p = 0.01$ ) と結合した。HGFは2マクログロブリン ( $R = 0.45$ 、 $p = 0.006$ ) およびGGT ( $R = 0.54$ 、 $p < 0.001$ ) と結合した。IL10は、 $\gamma$ -グロブリン ( $R = 0.20$ 、 $p = 0.01$ ) のみと結合した。

40

【0079】

### 例4: データの解析

得られた結果は、繊維形成には直接は関係しない5または6個の単純な生化学マーカーの組合せにより、隔膜が僅かである初期段階においても有意な繊維症の診断のための高い正または負の予測値を得ることができることを示している。

【0080】

50

検討を行った試料が偏向していたりまたは最も一般的な患者の第非用例でないときには、診断法の結論は通常は弱いものである。この検討で予想される個体群の臨床的、組織学的および生化学的特徴は検討の33ヶ月間安定であり、最近の大規模な無作為試験に含まれる個体群と同様であった(22)。明白な代償不全肝硬変の患者は、含まれなかった。重症肝疾患の患者を包含することによって、ロジスティック関数の予測値は人工的に向上した。一方、組織学的特徴の極めて少ない患者も有意な数であり(13~18% 繊維症なし)、患者の9%はALTが30IU/mlを下回り、13%はALTが35IU/mlを下回り、これらは通常は無作為試験に含まれないものであった。

#### 【0081】

繊維症スコアの診断値は、2つの期間で再現性があった(表2および5)。これらの結果を解析することにより、生験数を慢性C型肝炎の管理では50%減少させることができると結論される。

#### 【0082】

実際には、患者は、繊維症段階および等級によって治療される(1~4)。生験なしで治療せずの決定が繊維症スコア<0.20によって採用されたときには、125または119名の患者の13名だけが偽陰性であった。これらの中で、肝硬変または拡張性繊維症(F3~F4)の患者はなく、2名だけが中程度の活性を示した。生験なしでの治療の決定が繊維症スコア>0.80によって採用されたときには、53名中4名または50名中5名の患者だけが偽陽性であった。それらの中、3名の患者は中程度の活性であり、同意書によれば肝門部繊維症のみであるが、治療を正当化した。

#### 【0083】

これら3名の患者の2名は経静脈肝生験を行い、それぞれ19および13mmHgの肝門-大静脈グラディエントの増加を示した。従って、これらの患者は実際に有意な繊維症を有する可能性が高い。

この場合には、1または2名の患者のみ(4%)を過剰に治療した。従って、このスコアは、中程度および重度の組織学的活性を有するが有意な繊維症のないほとんどの患者を検出することもできる。最後に、繊維症スコアを用いて、生験なしで肝硬変の治療を行うこともできた。

#### 【0084】

本発明の方法は、多数の患者の過度の治療をおこないまたは治療の必要のある患者を除外することにはならない点に留意することが極めて重要である。本出願明細書に示されているデータは、本発明による診断法の信頼性を高めている。

繊維症スコアを用いて、生験なしの肝硬変の治療を行うこともできる。従って、静脈瘤および肝細胞癌のスクリーニングを、繊維症スコアが>0.80の患者では推奨することができる。

#### 【0085】

最も有益なマーカーは、下記の低下順位のものであった： 2マクログロブリン、 2-グロブリン、GGT、 -グロブリン、総ビリルビン、およびアポA1。

#### 【0086】

2-グロブリン(正常範囲4~6g/l)は 2-マクログロブリン(1.4~4.0g/l)、および 2-ミクログロブリン：ハプトグロビン(0.4~2g/l)、セルレオプラスミン(0.2~0.4)、アンチトロンピンIII(0.2~0.3)、およびレチノール結合タンパク質(0.03~0.07)によって構成されている(23)。2-グロブリンの診断値は一変量分析では見られなかったが、これは、繊維症 2-マクログロブリンの増加および 2-ミクログロブリンの減少と関連していたからである(図5)。

#### 【0087】

これらのデータは、 2-ミクログロブリンの主成分であるハプトグロビンは、繊維症が増加し且つ予測因子であるときには、減少することを示している。実際に、 2-グロブリンと、主としてハプトグロビンによって構成されている 2-マクログロブリンとの差

は、繊維症と強力に且つマイナス方向に結合していた ( $R = -0.33$ ,  $p < 0.001$ )。2 - ミクログロブリンの他の成分 (セルレオプラスミン、アンチトロンビン III、およびレチノール結合タンパク質) の血清濃度はずっと低く、それらの個々の診断値は評価しなかった。

【0088】

繊維症と 2 - マクログロブリン (正の相関  $R = 0.46$ ,  $p < 0.001$ ) 対 2 - ミクログロブリン (ハプトグロビンに富む, 負の相関  $R = -0.40$ ) との間には、逆の相関が見られた。

【0089】

この仮説は、5 個のマーカーを有するロジスティック関数によって強化される。

10

【0090】

繊維症のステージングのためのぞうかした 2 - マクログロブリンの有意な診断値は、アルコール性肝疾患の患者で既に見られている。2 - マクログロブリンは急性期タンパク質に属し、肝細胞、星状細胞、および肉芽腫細胞によって炎症および肝繊維症の部位で局所的に産生される。更に、2 - マクログロブリンは、星状細胞活性化の特徴として繊維症に特異的に関係している。2 - マクログロブリンはプロテイナーゼ阻害薬でもあり、その合成の増加により、マトリックスタンパク質の異化作用を阻害し且つ肝臓における繊維性過程を増進することができる。

【0091】

繊維症が増加すると、ハプトグロビンが減少するので、2 - マクログロブリンと合わせたときの 2 - グロブリンの予測値が説明される。ハプトグロビンは、既に観察したように、繊維症と強力且つマイナス方向に結合していた。この結合は、溶血、脾臓機能亢進症または肝機能不全とは関係していない。同様に、未抱合ビリルビンとの有意な結合は、この検討では見られなかった (データは示さず)。

20

【0092】

繊維症と 2 マクログロブリン (正) およびハプトグロビン (負) との逆相関は、繊維形成および急性期応答の際の HGF と TGF - 1 の役割が異なっていることによって説明することができた。2 - マクログロブリンについては、HGF との強力なプラス方向の結合および TGF - 1 血清濃度との負の相関が見られた。

【0093】

対照的に、ハプトグロビンについては、TGF - 1 で強力且つ正の相関が見られた。実験的繊維症では、HGF 遺伝子による形質導入は TGF - 1 の増加を抑制し、HGF は 2 - マクログロブリンの合成を刺激し、ハプトグロビンの合成を減少することが観察されている。従って、これら 2 種類のタンパク質は極めて有益であり、2 種類の主要な繊維形成サイトカインの典型的なものであり、すなわち、2 - マクログロブリンは HGF の典型的なものであり、ハプトグロビンは TGF - 1 の典型的なものである。

30

【0094】

繊維症と結合し且つプロトロンビンおよびアポリポタンパク質 A1PGA インデックスと共に用いられる GGT が、数回観察されている (7 - 8, 13 - 14, 34)。この検討では、GGT の診断値は他の因子、特にトランスアミナーゼおよびビリルビンから独立している。非肝硬変患者での総血清ビリルビンの独立した診断値については、現在のところは説明がなされていない。GGT およびビリルビンは、いずれも HGF と結合した。初期胆汁鬱滞の他に、表皮増殖因子の増加を GGT 増加の一つの説明として挙げる事ができる。

40

【0095】

- グロブリン血清濃度は、以前から肝硬変および門脈体静脈シャントと関連づけられている (36)。この検討では、- グロブリン濃度は、肝硬変患者よりは低い、F1 または F0 の患者と比較して非肝硬変性繊維症患者では既に増加していることが示された。

【0096】

繊維症と結合し且つプロトロンビンおよび GGT : PGA インデックスと共に用いられる

50

アポ A 1 血清濃度が、数回観察されている（上記参照）。アポ A 1 単独と比較して、アポ - A I I またはアポ B の有意な追加診断値は、この検討では見られなかった。

【 0 0 9 7 】

繊維症段階による血清 T G F - 1 の予想外の減少がこの検討で見られたが、6 マーカーの組合せに有意な診断値を加えなかった。最も強力な相関は、T G F - 1 と 2 - ミクログロブリンとの間で見られ（ $R = 0.42$ 、 $p < 0.001$ ）、ハプトグロビンが慢性 C 型肝炎での T G F - 1 活性化の単純なマーカーとなり得ることを示唆している。

【 0 0 9 8 】

最後に、血清サイトカインの評価は、測定が一層容易で且つ一層廉価な生化学マーカーに有意な診断値を加えなかった。電気泳動化合物（ 2 - グロブリンおよび - グロブリン）の測定は、旧式の半定量評価法として考察することができる。5 マーカー関数でそれらをハプトグロビンに代えたところ、同様な予測値が得られた。

10

【 0 0 9 9 】

結論として、本発明は、肝繊維症および/または炎症性病変の存在の検出に用いられる 5、または 6 個以上の生化学マーカーの組合せを提供する。本発明で用いられるマーカーを、このような方法で患者の年齢および性別と組み合わせて、R O C 曲線の下面積によって示される良好な予測値を得たことはなかった。

【 0 1 0 0 】

本発明の診断法は、マーカーの値を自動的に測定した後に自動的に解析することができ、慢性 C 型肝炎患者に有利に適用して、肝生験の指示を減少させることができる。

20

【 0 1 0 1 】

【 表 1 】

表1：関数f1-a、f2、f3、f4の決定のための患者に含まれる特徴

特徴	トレーニング期間	確認期間	総数
患者数	206	156	362
生験時の年齢(才) 平均95% CI	47 (45-49)	48 (46-50)	47 (46-49)
男性(%)	108 (52%)	103 (66%)	211 (58%)
女性(%)	99 (48%)	53 (34%)	152 (42%)
纖維症なし(F0)	36 (17%)	28 (18%)	64 (18%)
肝門部纖維症(F1)	91 (44%)	61 (39%)	152 (42%)
少数の隔膜(F2)	41 (20%)	29 (19%)	70 (19%)
多数の隔膜(F3)	18 (9%)	11 (7%)	29 (8%)
肝硬変(F4)	21 (10%)	27 (17%)	48 (13%)
なし(A0)	52 (25%)	27 (17%)	79 (22%)
軽度(A1)	87 (42%)	87 (56%)	174 (48%)
中度(A2)	63 (30%)	38 (24%)	101 (28%)
重度(A3)	5 (2%)	4 (3%)	9 (2%)
鉄スコア	1.2 (0.8-1.6)	1.4 (0.9-1.7)	1.3 (1.0-1.6)
脂肪症(%)	12% (9-26%)	15% (10-19%)	13% (10-16%)
マーカー (正常範囲)			
A S T U/L (17-27 女性) (20-32 男性)	71 (63-80)	79 (65-92)	74 (67-82)
A L T U/L (11-26 女性) (16-35 男性)	108 (95-121)	113 (92-133)	110 (99-122)
総ビリルビンumoles/L (2-17)	11 (10-12)	13 (9-18)	12 (10-14)
アルブミンg/L (35-44)	44 (43-44)	44 (43-45)	44(43-44)
G G T U/L (7-32 女性) (11-49 男性)	81 (64-98)	99 (72-126)	89 (74-104)
α 2-マクログロブリンg/L (女性1.6-4.0 男性1.4-3.3)	2.6 (2.5-2.7)	2.5 (2.3-2.6)	2.6 (2.5-2.7)
α 1-グロブリンg/L (1-3)	1.9 (1.9-2.0)	1.8 (1.8-1.9)	1.9 (1.9-1.9)
α 2-グロブリンg/L (4-9)	7.6 (7.4-7.8)	6.8 (6.6-7.1)	7.3 (7.1-7.4)
β-グロブリンg/L (4-10)	6.8 (6.7-7.0)	7.0 (6.8-7.2)	6.9 (6.8-7.0)
γ-グロブリンg/L (5-12)	14.9 (14.3-15.6)	14.5 (13.8-15.5)	14.8 (14.3-15.3)
アポA1 g/L (1.2-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
アポB g/L (0.5-1.4)	ND	0.9 (0.8-0.9)	ND
アポA2 g/L (0.3-0.5)	ND	0.3 (0.3-0.3)	ND
IL 10 pg/ml (<16)	ND	73 (41-105)	ND
TGF B1 ng/l (35-64)	ND	32 (29-33)	ND

ND: 測定せず。

【 0 1 0 2 】  
【 併 2 】

表2：表1の患者についてのf1-a、f2に対する有意な繊維症(少数F2, 多数の隔膜F3, 肝硬変F4)についての生化学マーカーの診断値(ROC曲線下の面積±s.d.)

マーカー	トレニング期間		確認期間		両期間	
	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰
A S T	0.774±0.04	0.13	0.706±0.04	0.35	0.743±0.03	0.35
α2-マクログロブリン	0.753±0.04	<0.001	0.750±0.04	<0.001	0.751±0.03	<0.001
A L T	0.724±0.04	0.09	0.583±0.05	0.11	0.662±0.03	0.41
G G T	0.680±0.04	0.03	0.722±0.04	0.01	0.700±0.03	0.003
γ-グロブリン	0.680±0.04	0.16	0.680±0.04	0.59	0.676±0.03	0.04
総ビリルビン	0.611±0.04	0.69	0.751±0.04	0.008	0.673±0.03	0.06
アルブミン	0.485±0.05	0.12	0.326±0.04	0.53	0.415±0.03	0.68
α1-グロブリン	0.512±0.04	0.30	0.571±0.05	0.80	0.534±0.03	0.26
α2-グロブリン	0.488±0.04	0.007	0.482±0.05	0.03	0.480±0.03	<0.001
β-グロブリン	0.477±0.04	0.75	0.578±0.05	0.45	0.522±0.03	0.97
アポA1	0.449±0.04	0.14	0.372±0.04	0.12	0.413±0.03	0.05
10マーカー、および年齢および性別のロジスティック関数	0.856±0.03	<0.001	0.885±0.03	<0.001	0.853±0.02	<0.001
6マーカー、および年齢および性別のロジスティック関数*	0.839±0.03	R <sup>2</sup> =0.314	0.868±0.03	R <sup>2</sup> =0.363	0.851±0.02	R <sup>2</sup> =0.310
ロジスティック関数*		R <sup>2</sup> =0.288		R <sup>2</sup> =0.347		R <sup>2</sup> =0.298

\*6マーカー、および年齢および性別のロジスティック関数： $6.826 \times \text{Log} \alpha 2 \text{マクログロブリン}(\text{g/l}) - 0.479 \times \alpha 2 \text{グロブリン}(\text{g/l}) + 1.252 \times \text{Log} \text{G G T}(\text{IU/l}) + 0.0707 \times \gamma(\text{g/l}) + 0.0273 \times \text{年齢}(\text{才}) + 1.628 \times \text{Log} \text{ビリルビン}(\text{umol/l}) - .925 \times \text{アポA1}(\text{g/l}) + 0.344 \times \text{性別}(\text{女性}=0, \text{男性}=1) - 4.544。$

ND：測定せず。R<sup>2</sup>=Rの二乗。

【 0 1 0 3 】  
【 表 3 】

表3：6マーカー繊維症関数f1-aの感受性、特異性および予測値

繊維症関数の カットオフ	感受性	特異性	公算比	有病率=0.40		有病率=0.10		有病率=0.90	
				PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
0.10	0.99	0.30	1.41	0.49	0.97	0.14	0.995	0.93	0.71
0.20	0.91	0.52	1.89	0.56	0.90	0.17	0.98	0.94	0.39
0.30	0.83	0.65	2.35	0.61	0.85	0.21	0.97	0.96	0.30
0.40	0.74	0.74	2.85	0.66	0.81	0.24	0.96	0.96	0.24
0.50	0.67	0.81	3.62	0.71	0.79	0.29	0.96	0.97	0.22
0.60	0.59	0.93	8.48	0.85	0.77	0.49	0.95	0.99	0.20
0.70	0.51	0.96	12.16	0.89	0.76	0.57	0.95	0.99	0.18
0.80	0.32	0.98	13.90	0.90	0.68	0.61	0.93	0.99	0.14
0.90	0.16	0.995	35.50	0.96	0.64	0.80	0.91	0.997	0.12

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

【 表 4 】

表4：ロジスティック関数 f1-bおよびf5の測定のために包含された患者の特徴

特徴	トレーニング期間	確認期間	総数
患者数	205	134	339
生誕時の年齢(才)平均95% CI	47 (45-49)	48 (46-50)	47 (46-49)
男性 (%)	108 (53%)	88 (66%)	196 (58%)
女性 (%)	97 (47%)	46 (34%)	143 (42%)
繊維症なし(F0)	36 (17%)	20 (15%)	56 (17%)
肝門部繊維症(F1)	91 (44%)	54 (40%)	145 (43%)
少数の隔膜(F2)	40 (20%)	28 (21%)	68 (20%)
多数の隔膜(F3)	18 (9%)	10 (7%)	28 (8%)
肝硬変(F4)	20 (10%)	22 (17%)	42 (12%)
なし(A0)	52 (25%)	17 (12%)	69 (20%)
軽度(A1)	85 (41%)	80 (60%)	165 (49%)
中程度(A2)	63 (31%)	33 (25%)	96 (28%)
重度(A3)	5 (2%)	4 (3%)	9 (3%)
鉄スコア	1.2 (0.8-1.6)	1.4 (0.9-1.7)	1.3 (1.0-1.6)
脂肪症(%)	12% (9-26%)	15% (10-19%)	13% (10-16%)
マーカー (正常範囲)			
A S T U/L (17-27 女性) (20-32 男性)	71 (63-80)	79 (65-92)	77 (67-82)
A L T U/L (11-26 女性) (16-35 男性)	108 (95-121)	113 (92-133)	114 (99-122)
総ビリルビン umoles/L (2-17)	11 (10-12)	13 (9-18)	12 (10-14)
アルブミンg/L (35-44)	44 (43-44)	44 (43-45)	44 (43-44)
G G T U/L (7-32 女性) (11-49 男性)	81 (64-98)	99 (72-126)	89 (74-104)
α 2 -マクログロブリン g/L (女性 1.6-4.0 男性 1.4-3.3)	2.6 (2.5-2.7)	2.5 (2.3-2.6)	2.6 (2.5-2.7)
α 1 -グロブリン g/L (1-3)	1.9 (1.9-2.0)	1.8 (1.8-1.9)	1.9 (1.9-1.9)
α 2 -グロブリン g/L (4-9)	7.6 (7.4-7.8)	6.8 (6.6-7.1)	7.3 (7.1-7.4)
β -グロブリン g/L (4-10)	6.8 (6.7-7.0)	7.0 (6.8-7.2)	6.9 (6.8-7.0)
γ -グロブリン g/L (5-12)	14.9 (14.3-15.6)	14.5 (13.8-15.5)	14.8 (14.3-15.3)
アポA1 g/L (1.2-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
アポB g/L (0.5-1.4)	ND	0.9 (0.8-0.9)	ND
アポA2 g/L (0.3-0.5)	ND	0.3 (0.3-0.3)	ND
IL 10 pg/ml (<16)	ND	78 (41-105)	ND
TGF B1 ng/l (35-64)	ND	32 (29-33)	ND
ハプトグロビン g/l (0.35-2.00)*	0.97 (0.89-1.05)	0.89 (0.80-0.99)	0.94 (0.88-1.00)
HgF ng/l (-)	ND	1181 (76-1386)	ND

ND：測定せず。  
 \* ハプトグロビンについては、投薬量が第一の期間では8名の患者について、また第二の期間では1名の患者について紛失している。

【 0 1 0 5 】  
 【 表 5 】

表5: 表4の患者についてのf1-b, f2, f5に対する有意な繊維症(少数F2, 多数の隔膜F3, 肝硬変F4)についての生化学マーカーの診断値(ROC曲線の下の面積±s.d)

マーカー	トレーニング期間		確認期間		両期間	
	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰	ROC曲線下の面積	有意性 ロジスティック回帰
AST	0.773±0.04	0.13	0.679±0.05	0.35	0.739±0.03	0.35
α2マクログロブリン	0.749±0.04	<0.001	0.740±0.04	<0.001	0.746±0.03	<0.001
ALT	0.725±0.04	0.09	0.564±0.05	0.11	0.664±0.03	0.41
ハプトグロビン(減少)S	0.704±0.04	0.02	0.654±0.05	0.006	0.685±0.03	0.02
γグロブリン	0.680±0.04	0.16	0.670±0.04	0.59	0.672±0.03	0.04
GGT	0.672±0.04	0.03	0.705±0.04	0.01	0.697±0.03	0.003
総ビリルビン	0.611±0.04	0.69	0.726±0.04	0.008	0.669±0.03	0.06
アポA1(減少)	0.554±0.04	0.14	0.647±0.05	0.12	0.597±0.03	0.05
アルブミン(減少)	0.514±0.04	0.12	0.662±0.04	0.53	0.574±0.03	0.68
α1グロブリン	0.518±0.04	0.30	0.577±0.05	0.80	0.538±0.03	0.26
α2グロブリン(減少)	0.508±0.04	0.007	0.518±0.05	0.03	0.518±0.03	<0.001
βグロブリン	0.475±0.04	0.75	0.601±0.05	0.45	0.527±0.03	0.97
10マーカー、年齢および性別のロジスティック関数	0.856±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.314	0.885±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.363	0.851±0.02	<0.001 R <sup>2</sup> =0.305
6マーカー、年齢および性別のロジスティック関数*	0.836±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.284	0.870±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.338	0.847±0.02	<0.001 R <sup>2</sup> =0.297
5マーカー、年齢および性別のロジスティック関数**	0.827±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.265	0.851±0.03	<0.001 R <sup>2</sup> =0.323	0.837±0.02	<0.001 R <sup>2</sup> =0.279

Sハプトグロビンを適及的に評価した。投薬量が第一期の間では8名の患者について、また第二期の間では1名の患者について紛失している。ハプトグロビンをα2グロブリンに代えたときのロジスティック回帰における有意性。

\* 6マーカー、および年齢および性別のロジスティック関数: 6.552xLogα2マクログロブリン(g/l)-0.458xα2 グロブリン(g/l)+1.113xLog GGT(IU/l)+0.074xγグロブリン(g/l)+0.0295x年齢(才)+1.473xLogビリルビン(μmol/l)-.979xアポA1(g/l)+0.414x性(女性=0, 男性=1)-4.305。

\*\* 5マーカー、および年齢および性別のロジスティック関数: 4.467xLogα2マクログロブリン(g/l)-1.357xLogハプトグロブリン(g/l)+1.017xLog GGT(IU/l)+0.0281x年齢(才)+1.737xLogビリルビン(μmol/l)-1.184xアポA1(g/l)+0.301x性(女性=0, 男性=1)-5.540。  
ND: 測定せず。 R<sup>2</sup>=Rの二乗。

【 0 1 0 6 】  
【 規 6 】

表6：6マーカー繊維症関数  $f_{1-b}$  の感受性、特異性および予測値

繊維症関数の カットオフ	繊維症関数の		公算比	模擬有病率=0.10		模擬有病率=0.90	
	感受性	特異性		PPV	NPV	PPV	NPV
0.10	0.98	0.33	1.46	0.96	0.14	0.99	0.63
0.20	0.91	0.53	1.94	0.90	0.18	0.98	0.39
0.30	0.81	0.65	2.33	0.83	0.21	0.97	0.28
0.40	0.73	0.74	2.78	0.80	0.24	0.96	0.23
0.50	0.68	0.85	4.42	0.79	0.33	0.96	0.23
0.60	0.60	0.93	8.64	0.85	0.49	0.95	0.21
0.70	0.50	0.95	10.05	0.87	0.53	0.94	0.17
0.80	0.33	0.98	13.11	0.90	0.59	0.93	0.12
0.90	0.17	0.99	17.48	0.92	0.66	0.92	0.12

10

20

30

40

【0107】

参考文献

【化1】

1. Perrillo RP. *Hepatology* 1997;26:57S-61S.
2. Consensus Statement. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 30: 956-961.
3. Friedman SL. *Am J Med.* 1999;107:27S-30S.
4. Poynard T, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000;20:47-55.
5. Poynard T, Lebrech D. The inconvenience of investigations used in hepatology: patients' and hepatologists' opinions. *Liver* 1982;2:369-75. 10
6. Poynard T, et al. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000;14:543-548.
7. Teare JP, et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet.* 1993;342:895-8.
8. Naveau S, et al. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Dig Dis Sci.* 1994;39:2426-32.
9. Guechot J, et al. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem.* 1996 ;42:558-63. 20
10. Gabrielli GB, et al. Serum laminin and type III procollagen in chronic hepatitis C. Diagnostic value in the assessment of disease activity and fibrosis. *Clin Chim Acta.* 1997;265:21-31.
11. Kasahara A, et al. *J Hepatol.* 1997;26:574-83.
12. Poynard T, Bedossa P. Age and platelet count: a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. METAVIR and CLINIVIR Cooperative Study Groups. *J Viral Hepat* 1997;4:199-208. 30
13. Oberti F, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology.* 1997;113:1609-16.
14. Pilette C, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol.* 1998 ;28:439-46.
15. Wong VS, et al. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 1998;5:187-92.

16. Poynard T, et al. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32.
17. Doumas BT, et al. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta* 1971, 31, 87-96.
18. The METAVIR cooperative group. Inter- and intra-observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20;1:15-20.
19. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24(2):289-93. 10
20. Hintze JL. NCSS 97 User Guide. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville. Utah 1997.
21. Neural Connection 1.0 User's guide. SPSS. Chicago. Illinois 1995.
22. Poynard T, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-32. 20
23. Boulanger P, et al. Les protéines du plasma sanguin In: Polonovski M, *Biochimie Médicale*, fascicule III. Masson et compagnie, 1971, Paris, pages 47-154.
24. Tiggelman AM, et al. Localization of alpha 2-macroglobulin protein and messenger RNA in rat liver fibrosis: evidence for the synthesis of alpha 2-macroglobulin within *Schistosoma mansoni* egg granulomas. *Hepatology* 1996;23:1260-7
25. Tiggelman AM, et al. Transforming growth factor-beta-induced collagen synthesis by human liver myofibroblasts is inhibited by alpha2-macroglobulin. *J Hepatol.* 1997;26:1220-8 30
26. Meisse D, et al. Cell swelling increased the alpha2-macroglobulin gene expression in cultured rat hepatocytes. *FEBS Letter.* 1998;422:346-8.
27. Kawser CA, et al. Rat hepatic stellate cell expression of alpha2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. *Clin Sci.* 1998;95:179-86. 40

28. Van Goor H, et al. Alpha macroglobulins and the low-density-lipoprotein-related protein/alpha-2-macroglobulin receptor in experimental renal fibrosis. *Exp Nephrol*. 1999 Jan-Feb;7(1):35-43.
29. Bacq Y, et al. Decrease of haptoglobin serum level in patients with chronic viral hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 1993;17:364-9.
30. Louagie HK, et al. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996 ;25:10-4. 10
31. Guillen MI, et al. The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes: divergent effect on interleukin-6-stimulated genes. *Hepatology*. 1996;23:1345-52.
32. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997;181:257-66.
33. Shiota G, et al. Hepatocyte growth factor and acute phase proteins in patients with chronic liver diseases. *J Med* 1995;26:295-308.
34. Poynard T, et al. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991;100:1397-402. 20
35. Edwards AM, et al. Modulation of gamma-glutamyltranspeptidase in normal rat hepatocytes in culture by cell density, epidermal growth factor and agents which alter cell differentiation. *Carcinogenesis*. 1987;8:1837-42.
36. Sakumoto I, et al. Studies on the relationship between the histological changes and liver cell function or plasma proteins in hepatic diseases. *Gastroenterol Jpn*. 1976;11:224-36.
37. Paradis V, et al. Role of liver extracellular matrix in transcriptional and post-transcriptional regulation of apolipoprotein A-I by hepatocytes. *Cell Mol Biol*. 1996;42:525-34 30
38. Sabile A, et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology*. 1999;30:1064-76.
39. Murawaki Y, et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13:680-4.
40. Tsai JF, et al. Urinary transforming growth factor beta1 levels in hepatitis C virus-related chronic liver disease: correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology*. 1997;25:1141-6. 40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

6 ( 2 - マクログロブリン、 2 - ミクログロブリン、総ビリルビン、 - グロブリン、アポ A 1、および G G T ) または 1 0 個の生化学因子 ( 上記の因子にアルブミン、 1 - ミクログロブリン、 - グロブリンおよび A L T を加えたもの ) および年齢と性別を合わせた繊維症マーカー関数の R O C 曲線を示す。曲線の下面積には、差がない : それぞ 50

れ  $0.853 \pm 0.02$  および  $0.851 \pm 0.02$ 。

【図 2】

繊維症段階による 6 マーカー繊維症スコア (  $0.00 \sim 1.00$  ) の分散プロットである。

【図 3】

5 ( 2 - マクログロブリン、ハプトグロビン、総ビリルビン、アポ A 1、および GGT )、6 ( 2 - マクログロブリン、2 - ミクログロブリン、総ビリルビン、 $\alpha_2$ -グロブリン、アポ A 1、および GGT )、または 10 個の生化学因子 ( 上記の因子にアルブミン、 $\alpha_1$ -ミクログロブリン、 $\alpha_2$ -グロブリンおよび ALT を加えたもの )、および年齢および性別を合わせた繊維症マーカー関数の ROC 曲線を示す。曲線の下面積には、有意差がない：それぞれ、 $0.837 \pm 0.02$ 、 $0.847 \pm 0.02$  および  $0.851 \pm 0.02$ 。

10

【図 4 a】

繊維症段階による繊維症スコアを示す。

ボックスの上端および下端は 25 および 75 百分位数点である。従って、ボックスの長さは四分位数間領域である。すなわち、ボックスはデータの中央の 50% を表している。線分が、メジアンにおけるボックスの中央を通過して惹かれている ( 50 百分位数 )。上方の隣接値は、75 百分位数 +  $1.5 \times$  四分位数間領域以下の最大観察値である。下方の隣接値は、25 百分位数 +  $1.5 \times$  四分位数間領域以上の最小観察値である。分散分析は、総ての段階間に有意差があることを示している ( ( Bonferroni all - pairwise Multiple Comparison Test ) ;  $p < 0.001$  )。6 マーカー関数 F0 n = 56 メジアン = 0.10 ; F1 n = 145 メジアン = 0.22 ; F2 n = 68 メジアン = 0.41 ; F3 n = 28 メジアン = 0.66 ; F4 n = 42 メジアン = 0.89。

20

【図 4 b】

繊維症段階による繊維症スコアを示す。

ボックスの上端および下端は 25 および 75 百分位数点である。従って、ボックスの長さは四分位数間領域である。すなわち、ボックスはデータの中央の 50% を表している。線分が、メジアンにおけるボックスの中央を通過して惹かれている ( 50 百分位数 )。上方の隣接値は、75 百分位数 +  $1.5 \times$  四分位数間領域以下の最大観察値である。下方の隣接値は、25 百分位数 +  $1.5 \times$  四分位数間領域以上の最小観察値である。分散分析は、総ての段階間に有意差があることを示している ( ( Bonferroni all - pairwise Multiple Comparison Test ) ;  $p < 0.001$  )。5 マーカー関数 F0 n = 55 メジアン = 0.14 ; F1 n = 139 メジアン = 0.21 ; F2 n = 64 メジアン = 0.43 ; F3 n = 26 メジアン = 0.73 ; F4 n = 41 メジアン = 0.85。

30

【図 5 a】

図 5 は、繊維症段階による  $\alpha_2$ -グロブリン、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよびハプトグロビンを示す。

$\alpha_2$ -グロブリンについては、有意差は段階 4 と段階 1 および段階 3 の間だけであった ( Bonferroni の総てペアの多群比較試験 ;  $p = 0.01$  )。

40

【図 5 b】

$\alpha_2$ -マクログロブリンについては、段階 2、3 および 4 より低い段階 0 と 1 の値の間で有意差が見られた ( Bonferroni の総てペアの多群比較試験 ;  $p < 0.001$  )。段階 2 の値は、段階 3 および 4 の値より低かった ( Bonferroni の総てペアの多群比較試験 ;  $p < 0.001$  )。段階 0 と 1 の間、および段階 3 と 4 の間には有意差はなかった。

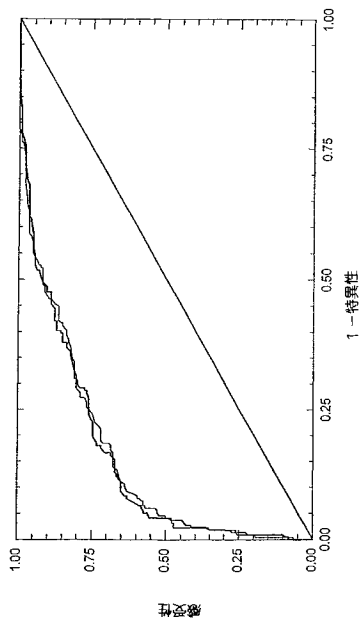
【図 5 c】

ハプトグロビンについては、段階 2、3 および 4 より大きい段階 1 の値の間で有意差が見られた。段階 4 の値は、段階 0、1 および 2 の値より低かった ( Bonferroni の

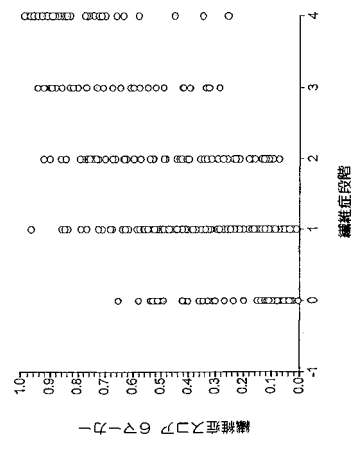
50

総てペアの多群比較試験； $p < 0.001$ ）。段階0と1の間、および段階3と4の間には有意差はなかった。

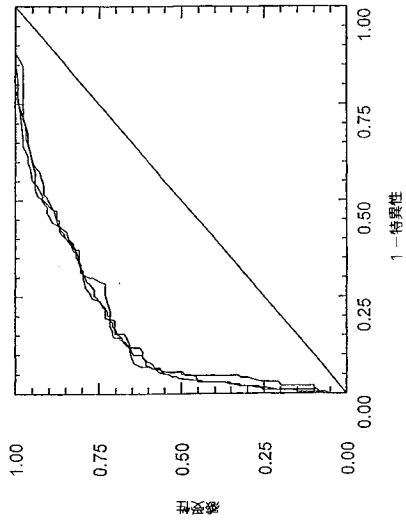
【図1】



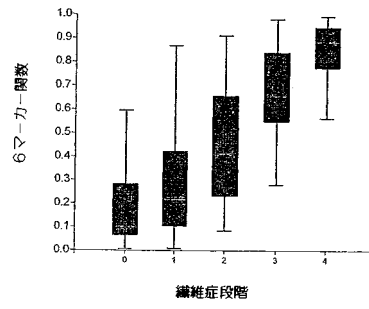
【図2】



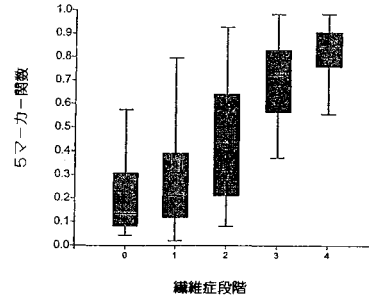
【図 3】



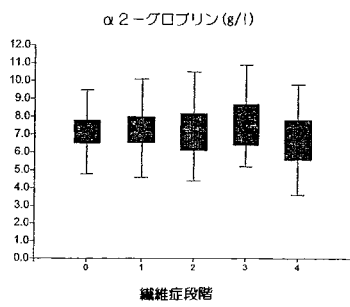
【図 4 a】



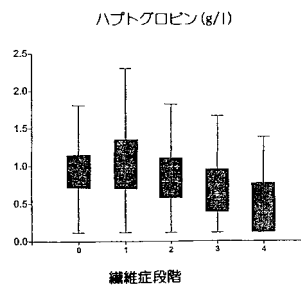
【図 4 b】



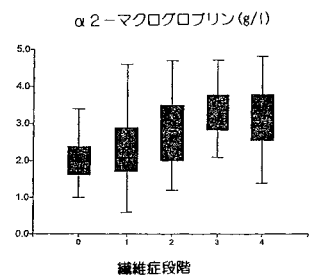
【図 5 a】



【図 5 c】



【図 5 b】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/16949 A1**

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/68** (74) Agents: MARTIN, Jean-Jacques et al., Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris (FR).
- (21) International Application Number: PCT/IB00/01559
- (22) International Filing Date: 24 October 2000 (24.10.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
06402326.3 21 August 2000 (21.08.2000) EP  
09/687,459 13 October 2000 (13.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): EPIGENE [FR/FR]; 65, boulevard Masséna, F-75013 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

— with international search report

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): POYNARD, Thierry [FR/FR], Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris (FR).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/16949 A1

(54) Title: DIAGNOSIS METHOD OF FIBROTIC DISEASE USING BIOCHEMICAL MARKERS

(57) Abstract: The present invention is drawn to a new diagnosis for detecting the extend of a inflammatory, fibrotic or cancerous disease in a patient, in particular liver fibrosis, in particular in a patient infected with hepatitis C virus, by using the serum concentration of easily detectable biological markers. The invention is also dream to diagnosis kits for the implementation of the method.

## DIAGNOSIS METHOD OF FIBROTIC DISEASE USING BIOCHEMICAL MARKERS

## FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention is drawn to a new diagnosis method for detecting the extend of a inflammatory, fibrotic or cancerous disease in a patient, in particular liver fibrosis, in particular in a patient infected with hepatitis C virus, by using the serum concentration of easily detectable biological markers. The invention is also drawn to diagnosis kits for the implementation of the method.

10

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Liver biopsy is considered as mandatory for the management of patients infected by the hepatitis C virus (HCV), particularly for the staging of fibrosis (1-4). For patients and general practitioner it can be considered as an aggressive procedure  
15 (5-6). Numerous studies have shown significant predictive values of several markers for the diagnosis of cirrhosis (6-15) but none for the diagnosis of earlier stage as few septa (beginning of bridging fibrosis), prospectively in a large population infected only by HCV virus.

It is nevertheless important to be able to detect these early stages in the  
20 development of liver pathology, in order to improve the patient treatment, and the follow-up of the disease. As liver biopsy is still an invasive procedure, it could be advantageous to have a fast and easy to perform test that would give a good predictive value of the level of fibrosis in the patient.

After infection by the hepatitis C virus, the evolution of the disease can lead  
25 to fibrosis, and later to cirrhosis. The liver biopsy allows for the determination of the stage of the fibrosis, but also the presence of liver necroinflammatory lesions. The intensity and activity of such lesions, in complement to the degree of fibrosis, are acknowledged by physicians as an important factor for diagnosis and prognosis of the evolution of the disease, and in order to determine the type of treatment to  
30 administrate.

There is therefore a need to develop a diagnosis method that would give a good predictive value of the presence (or the absence) of fibrosis and/or lesions in a patient, and that would be reliable enough to reduce the need of liver biopsy.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of diagnosis that assesses prospectively the predictive value of a combination of simple serum biochemical markers for the diagnosis of an inflammatory, fibrotic or cancerous disease, in particular in the liver of a patient where it is well suited for diagnosis of significant fibrosis (from few septa to cirrhosis) and/or liver necroinflammatory lesions. With the reach of high positive predictive values (prediction of significant fibrosis) or negative predictive values, the number of biopsy indications could be reduced. This could be useful for patients and society in order to reduce the cost and the risk of biopsies especially liver biopsies (6).

## DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 : ROC curves of the fibrosis markers function combining six (alpha2-macroglobulin, alpha2-microglobulin, total bilirubin, gamma globulin, apo A1, and GGT,) or ten biochemical factors (same plus albumin, alpha1-microglobulin, beta globulin and ALT,) and the age and gender . The area under the curve were not different :  $0.853 \pm 0.02$  and  $0.851 \pm 0.02$  respectively.

Figure 2 : scatter plot of the six markers fibrosis score (ranging from 0.00 to 1.00), according to fibrosis stage.

Figure 3: ROC curves of the fibrosis markers function combining five (Alpha2-Macroglobulin, Haptoglobin, total Bilirubin, Apo A1, and GGT), six (alpha2-macroglobulin, alpha2-microglobulin, total bilirubin, gamma globulin, apo A1, and GGT) or ten biochemical factors (same plus albumin, alpha1-microglobulin, beta globulin and ALT,) and the age and gender . The area under the curve were not significantly different :  $0.837 \pm 0.02$ ,  $0.847 \pm 0.02$  and  $0.851 \pm 0.02$  respectively.

Figure 4 : Fibrosis Score according to fibrosis stage

Figure 4a: 6 markers function F0 n=56 median= 0.10; F1 n=145 median= 0.22; F2 n=68 median= 0.41 ; F3 n=28 median= 0.66 ; F4 n=42 median= 0.89.

Figure 4b: 5 markers function F0 n=55 median= 0.14; F1 n=139 median= 0.21; F2 n=64 median= 0.43 ; F3 n=26 median= 0.73 ; F4 n=41 median= 0.85.

The top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles. The length of the box is thus the interquartile range. That is, the box represents the middle 50% of the data. A line is drawn through the middle of the box at the median (the 50th

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

3

percentile). The upper adjacent value is the largest observation that is less than or equal to the 75th percentile plus 1.5 times interquartile range. The lower adjacent value is the smallest observation that is greater than or equal to the 25th percentile minus 1.5 times interquartile range. Analysis of variance shows significant differences between all stages.(Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p<0.001).

Figure 5 : Alpha 2 Globulins, Alpha 2 Macroglobulin and Haptoglobin according to fibrosis stage.

Figure 5a: For Alpha 2 Globulins values, the only significant differences were between stage 4 versus stage 1 and stage 3.(Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p=0.01).

Figure 5b: For Alpha 2 Macroglobulin, there was a significant difference between stage 0 and 1 values lower than stages 2,3 and 4. (Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p<0.001). Values of stage 2 were lower than values of stage 3 and 4.(Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p<0.001). There was no significant difference between stage 0 and 1 and between stage 3 and 4.

Figure 5c: For Haptoglobin there was a significant difference between stage 1 values higher than stages 2,3 and 4. (Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p<0.001). Values of stage 4 were lower than values of stage 0,1 and 2.(Bonferroni all-pairwise Multiple Comparison Test ; p<0.001). There was no significant difference between stage 0 and 1 and between stage 3 and 4.

#### DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention is therefore drawn to a method for diagnosis of an inflammatory, a fibrotic or a cancerous disease in a patient comprising the steps of:

- a) measuring the values of biochemical markers in the serum of said patient,
- b) combining said values through a logistic function including said markers and,
- c) analyzing the end value of said logistic function in order to determine the presence of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in said patient.

The biochemical markers can also be assessed in the plasma of the patients, and the method can be considered as *in vitro*, when an optional first step (harvesting serum or plasma of patients) is not used.

In particular, the method of the invention is perfectly suited for diagnosis of  
5 liver fibrosis and/or presence of liver necroinflammatory lesions in said patient. It can also be performed for diagnosis of inflammatory and/or fibrotic disease in the lungs or kidneys of patients. It is also suited for the diagnosis of cancerous lesions, for example in lungs, breasts, bladder, colon.

The logistic function may be obtained through the following method:

- 10 i) classification of the patients in different groups according to the extend of their disease;
- ii) identification of factors which differ significantly between these groups by unidimensional analysis;
- 15 iii) logistic regression analysis to assess the independent discriminative value of markers for the diagnosis of fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions
- iv) construction of the logistic function by combination of these identified independent factors (construction of an index).

By definition the best index ("fibrosis score") in term of discrimination was  
20 the logistic regression function combining the independent factors.

The logistic function is obtained by combining the relative weight of each parameter, as individually determined in the logistic regression, with a negative sign when the markers harbor a negative correlation with the stage of fibrosis. Logarithms are used for markers whose values have a very large range.

25 The quality of the logistic function is analyzed with the aid of a ROC curve, that is obtained depending of the threshold desired for the diagnosis. The way of obtaining the ROC curve is described in the examples. In the present invention, the classification of the patients was the presence of fibrosis, starting at few septa, but it could be changed if diagnosis of patient only with a large number of septa or with  
30 cirrhosis was intended. This leads to another ROC curve, as discussed in the examples.

The diagnosis of the presence of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in the patient can be further refined by the data concerning the to the expected prevalence of liver fibrosis in the population.

Preferably, the biochemical markers that are dosed in step a) of the method according to the present invention are "simple" biochemical markers, which means that they are easily dosed with methods already known in the art (chromatography, electrophoresis, ELISA dosing...).

Thus, markers that are perfectly suitable for the method of the invention include  $\alpha$ 2-macroglobulin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gammaglutamyl transpeptidase (GGT),  $\gamma$ -globulin, total bilirubin, albumin,  $\alpha$ 1-globulin,  $\alpha$ 2-globulin, haptoglobin,  $\beta$ -globulin, apolipoproteinA1 (apoA1), IL10, TGF- $\beta$ 1, apoA2, apoB. Depending of the studied disease, one could also use other cytokines, or specific markers known by the person skilled in the art. For the analysis of kidney or bladder disease, it may be convenient to perform some dosing on urine samples of the patient.

In a particular embodiment of the method of the invention, at least 4, more preferably 5 or 6, 7 or 10 biochemical markers are studied and dosed in step a) of the method.

Preferably, these markers are  $\alpha$ 2-macroglobulin, GGT,  $\gamma$ -globulin, total bilirubin, ( $\alpha$ 2-globulin or haptoglobin) and apoA1, when diagnosis of liver fibrosis is intended. Haptoglobin can be used in place of  $\alpha$ 2-globulin, as  $\alpha$ 2-globulin is the sum of  $\alpha$ 2-macroglobulin and  $\alpha$ 2-microglobulins, which are mainly composed of haptoglobin. The relative weight of  $\alpha$ 2-microglobulin and haptoglobin would therefore be adjusted in the logistic function.

When diagnosis of the presence of liver necroinflammatory lesions is intended, it is best when the markers that are dosed include  $\alpha$ 2-macroglobulin, GGT,  $\gamma$ -globulin, (ALT or AST) and apoA1. AST or ALT can indifferently be used as the data reported in the present application shows that these markers are correlated. Therefore, replacement of one marker by the other only results in the balancing of the coefficient in the logistic function, taking the correlation factor into account.

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

6

The logistic function can also use other markers such as the age and gender of the patient. The different coefficients used for the values obtained for the different markers in the logistic function can be calculated through statistical analysis, as described in the examples.

5 In particular, suitable logistic functions that can be used for the implementation of the method of the invention are as follow:

Using six markers:

$f1 = a_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - a_2 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + a_3$   
 $\times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + a_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + a_5 \times [\text{Age (years)}] + a_6 \times \text{Log}$   
 10  $[\text{Bilirubin (umol/l)}] - a_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + a_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] -$   
 $a_9$ , with

- $a_1$  comprised between 6.5 and 6.9,
- $a_2$  comprised between 0.450 and 0.485,
- $a_3$  comprised between 1.100 and 1.300,
- 15 -  $a_4$  comprised between 0.0700 and 0.0750,
- $a_5$  comprised between 0.0265 and 0.0300,
- $a_6$  comprised between 1.400 and 1.700,
- $a_7$  comprised between 0.900 and 1,
- $a_8$  comprised between 0.300 and 0.450, and
- 20 -  $a_9$  comprised between 4.200 and 4.700.

Specific usable functions are in particular:

$f1\text{-a} = 6.826 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.479 \times [\alpha 2\text{-globulin}$   
 $(g/l)] + 1.252 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0707 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0273 \times$   
 25  $[\text{Age (years)}] + 1.628 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 0.925 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] +$   
 $0.344 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.544 ;$

or

$f1\text{-b} = 6.552 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.458 \times [\alpha 2\text{-globulin}$   
 $(g/l)] + 1.113 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0740 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0295 \times$   
 30  $[\text{Age (years)}] + 1.473 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 0.979 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] +$   
 $0.414 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.305 ;$

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

7

Using 10 markers:

$$f2 = b_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - b_2 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + b_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + b_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + b_5 \times [\text{Age (years)}] + b_6 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - b_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + b_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + b_9 \times [\text{Albumin (g/l)}] + b_{10} \times [\alpha 1\text{-globulin (g/l)}] - b_{11} \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] + 2.189 - b_{12} \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - b_{13}, \text{ with}$$

- $b_1$  comprised between 9.9 and 10.2,
- $b_2$  comprised between 0.7 and 0.77,
- $b_3$  comprised between 2 and 2.4,
- $b_4$  comprised between 0.1 and 0.2,
- $b_5$  comprised between 0.04 and 0.07,
- $b_6$  comprised between 4 and 4.6,
- $b_7$  comprised between 2 and 2.5,
- $b_8$  comprised between 0.28 and 0.32
- $b_9$  comprised between 0.025 and 0.04
- $b_{10}$  comprised between 2 and 2.2
- $b_{11}$  comprised between 0.1 and 0.16
- $b_{12}$  comprised between 0.7 and 0.9, and
- $b_{13}$  comprised between 12 and 14.

20 A specific usable function is in particular:

$$f2 = 10.088 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.735 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 2.189 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.137 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0546 \times [\text{Age (years)}] + 4.301 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 2.284 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.294 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 0.0312 \times [\text{Albumin (g/l)}] + 2.109 \times [\alpha 1\text{-globulin (g/l)}] - 0.136 \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] - 0.813 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 13.165.$$

Using six markers to determine significant activity:

$$f3 = c_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - c_2 \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] + c_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + c_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] - c_5 \times [\text{Age (years)}] + c_6 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - c_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] - c_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - c_9, \text{ with}$$

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

8

- $c_1$  comprised between 3.45 and 3.65,
- $c_2$  comprised between 0.3 and 0.4,
- $c_3$  comprised between 0.8 and 1,
- $c_4$  comprised between 0.075 and 0.09,
- 5 -  $c_5$  comprised between 0.0015 and 0.003,
- $c_6$  comprised between 2.1 and 2.5,
- $c_7$  comprised between 1.55 and 1.75,
- $c_8$  comprised between 0.35 and 0.45, and
- $c_9$  comprised between 4 and 4.6.

10 A specific usable function is notably:

$$f3 = 3.513 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.354 \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] + 0.889 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0827 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] - 0.0022 \times [\text{Age (years)}] + 2.295 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 1.670 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] - 0.415 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.311.$$

15 Using seven markers, for the diagnostic of significant fibrosis or significant activity:

$$f4 = d_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - d_2 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + d_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + d_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + d_5 \times [\text{Age (years)}] + d_6 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - d_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + d_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + d_9 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - d_{10}, \text{ with}$$

- 20 -  $d_1$  comprised between 5.3 and 6.7,
- $d_2$  comprised between 0.45 and 0.5,
- $d_3$  comprised between 0.8 and 1.2,
- $d_4$  comprised between 0.06 and 0.08,
- 25 -  $d_5$  comprised between 0.0015 and 0.0025,
- $d_6$  comprised between 1 and 1.2,
- $d_7$  comprised between 1 and 1.2,
- $d_8$  comprised between 0.09 and 1.1,
- $d_9$  comprised between 1.2 and 1.5, and
- 30 -  $d_{10}$  comprised between 4 and 5.

A specific usable function is:

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

9

$$f4 = 5.981 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.481 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 0.965 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0679 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0190 \times [\text{Age (years)}] + 1.143 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.097 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.092 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 1.355 \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 4.498.$$

5

Using five markers, for the diagnosis of significant fibrosis:

$$f5 = z_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - z_2 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin (g/l)}] + z_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + z_4 \times [\text{Age (in years)}] + z_5 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - z_6 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + z_7 \times \text{Sex (female=0, male=1)} - z_8, \text{ with}$$

10

- $z_1$  comprised between 4 and 5,
- $z_2$  comprised between 1.2 and 1.5,
- $z_3$  comprised between 0.9 and 1.1,
- $z_4$  comprised between 0.0026 and 0.03,
- $z_5$  comprised between 1.6 and 1.9,
- $z_6$  comprised between 1 and 1.3,
- $z_7$  comprised between 0.25 and 0.35, and
- $z_8$  comprised between 5 and 6.

15

A specific usable function is:

$$f5 = 4.467 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 1.357 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin (g/l)}] + 1.017 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0281 \times [\text{Age (in years)}] + 1.737 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.184 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.301 \times \text{Sex (female=0, male=1)} - 5.540.$$

20

In fact, the numerical definitions for the coefficients in the different functions can slightly vary (about 10-15 %) depending of the number and characteristics of patients studied. Therefore, the value given for the coefficients of the different markers have to be interpreted as capable to being slightly different, without reducing the scope of the invention.

Depending of the end value obtained by the analysis with the logistic function of the value measured for the biological markers, it is possible to draw conclusions about the presence of liver fibrosis for the patient. It is also possible to conclude about the presence of cirrhosis, by taking cirrhosis as the threshold in the drawing of the ROC curve.

30

The method of the invention is also usable as a predictive mean for the evolution of the disease. In particular, when the patient is infected with the hepatitis C virus, it is often possible to determine the date of the infection (usually through transfusion). Therefore, the use of the method of the invention to determine the degree of evolution of the disease through the date of the diagnosis can also allow  
5 for the prognosis of the future development of the disease.

The data obtained by the diagnosis method according to the invention can also be very valuable for the physician to chose a suitable treatment for the patient, according to the stage of the disease.

10 Depending of the prevalence of liver fibrosis in the population of patients that are consulting, the data obtained with the method of the invention can be used to determine the need to perform a liver biopsy on the patient. It is expected that the method of the invention will reduce the need of liver biopsy by around 50 %.

The method of the invention is intended to be used for patient suffering of  
15 any disease involving liver fibrosis, that could develop to cirrhosis. In particular, the method of the invention is advantageously performed for detecting liver fibrosis in patient suffering from a disease included in the group consisting of hepatitis B and C, alcoholism, hemochromatosis, metabolic disease, diabetes, obesity, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis,  $\alpha$ 1-antitrypsin deficit, Wilson disease.

20 The method of the invention is best performed on patients infected with a hepatitis virus, in particular the hepatitis C virus.

The invention is also drawn to a kit of diagnosis of an inflammatory, a fibrotic or a cancerous disease in a patient, comprising instructions allowing to determine the presence of said inflammatory, fibrotic or cancerous disease in said  
25 patient, after the dosage of biochemical markers.

The invention is also drawn to a kit of diagnosis of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in a patient, comprising instructions allowing to determine the presence of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in said patient, after dosage of biochemical markers.

30 The instructions may comprise the logistic function that has to be use after determination of the dosage of the biochemical markers. It can appear as a printed support as well as a computer usable support, such as a software. The instructions may also comprise the ROC curve depending of the threshold that is looked for, to

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

11

allow the analysis of the end data obtained from the logistic function. They may also comprise different tables that allow to obtain the predictive values, depending of the expected prevalence of fibrosis in the patient population.

The diagnosis kit according to the present invention may also contain  
5 elements allowing the dosage of the biological markers of interest.

The method of the invention can easily be automated, the dosage of the markers being performed automatically, the data being sent to a computer or a calculator that will calculate the value of the logistic function and analyze it with the aid of the ROC curve, and eventually the prevalence of liver fibrosis in the  
10 patient population. The data obtained by the physician is therefore more easily interpretable, and will allow for an improvement in the process for deciding the need of a biopsy or the adequate treatment to prescribe.

The following examples are meant to describe an aspect of invention, and give the methodology in order to repeat the method of the invention, but shall not be  
15 limiting the invention.

#### EXAMPLES

##### Example 1: Patients and methods

###### 1.1. Patients

20 Patients included in the study belonged to a single center cohort (DOSVIRC). This cohort included all the patients with hepatitis C (defined as a positive serology by at least a second generation ELISA test) followed in the liver and gastrointestinal unit of Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France, retrospectively before 1993 and prospectively afterwards (16). A specific questionnaire was filled  
25 out for each patient which contained 129 items including social-demographic-administrative data, risk factors, and at each visit clinical, biologic, virologic and treatment items, and histologic data when liver biopsy was performed. The duration of HCV infection was estimated from the date of transfusion or initial exposure to other parenteral sources, and it could not be calculated for patients with sporadic  
30 infection or those in whom the source of infection was unknown. Exclusion criteria were the presence of HBsAg or HIV positive antibodies. From August 1997 to March 2000 all informed patients with detectable HCV by PCR undergoing a liver biopsy were pre-included and a blood sample taken the day of biopsy. Exclusion

criteria were coinfection with HIV, HBV other liver disease, and non interpretable liver biopsy.

The analysis was performed on a first period (first year training period 206 patients) and validated on the second period (validation period 156 patients) (Table 5 1)

Another analysis was performed after exclusion of one patient in the training period, and 22 patients in the validation period (Table 4).

#### 1.2. Serum markers

10 The 11 following tests were assessed for the 2 periods: alpha2-macroglobulin, AST, ALT, GGT, total bilirubin, albumin, alpha1 alpha2 beta and gamma globulins, apo A1. To explain the independent diagnostic value of alpha2 globulins (mainly made up of alpha2-macroglobulin and haptoglobin), a retrospective assessment of haptoglobin was performed on the 2 periods.

15 IL10, TGF-β1, apoA2 and apoB were assessed for the second period only.

AST, ALT, GGT, total bilirubin, were assessed by Hitachi 917 automate using Roche Diagnostics reagents (Mannheim Germany).

Albumin was assessed by bromocresol green method (17) independently of serum proteins electrophoresis, (alpha1, alpha2, beta and gamma globulins 20 fractions) which were conducted in an automatic system Hydrasys and Hyrys (Sebia, Issy-Les-Moulineaux, France).

Apolipoproteins A1,-A2, -B and alpha2macroglobulin were determined in serum samples (preserved at -80°C until assay) by using an automatic nephelometer BNII (Dade Behring Marburg, Germany).

25 Plasma TGFβ1 concentration was measured using Quantikine human TGFβ1 immunoassay (R and D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). To activate latent TGFβ1 to the immunoreactive form, the samples were activated by acid and neutralized thereafter.

30 Plasma Interleukin 10 were measured using an immunoassay kit (Beckman Coulter Company Immunotech, Marseille, France).

Plasmas samples were preserved at -80°C until assay (less than one year).

#### 1.3. Histological staging and grading

Histological features of liver specimens were analyzed according to the METAVIR scoring system (18,19). Liver biopsies, more than 10 mm in length, were fixed, paraffin-embedded and stained with at least hematoxylin eosin safran and Masson's trichrome or picrosirius red for collagen.

5 For each liver biopsy, a stage of fibrosis and a grade of activity was established according to the following criteria. Liver biopsy was staged on a scale of 0 to 4 : 0 = no fibrosis, 1 = portal fibrosis without septa, 2 = few septa, 3 = numerous septa without cirrhosis, and 4 = cirrhosis. This feature has been shown to be highly reproducible between pathologists.

10 The grading of activity that evaluates the intensity of necroinflammatory lesions was indicated as follows: A0 = no histological activity, A1 = mild activity, A2 = moderate activity, and A3 = severe activity. The METAVIR scoring system was assessed by a single pathologist (FC) unaware of patients characteristics.

15 **Example 2: Statistical analysis**

Statistical analysis used logistic regression and ROC curves (20). The analysis was performed on a first period (first year training period) and validated on the second period (validation period), cohort of patients as in Tables 1 and 4.

20 Then a final analysis was performed on the overall population combining the two periods (see tables 2 and 5).

According to the METAVIR scoring system, patients were divided into several groups.

The major endpoint was the identification of patients with significant fibrosis (F2, F3 or F4) versus patients without significant fibrosis (F0 or F1).

25 In secondary analyses patients were also divided according to activity grades: patients without significant activity (A0 or A1) and patients with histological activity (A2, or A3).

A group with non-significant histological features ( $A < 2$  and  $F < 2$ ) and a group of significant lesions ( $A \geq 2$  and/or  $F \geq 2$ ) were defined.

30 Finally a group with extensive fibrosis or cirrhosis (F3 or F4) was also defined.

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

14

The first stage consisted of identifying factors which differed significantly between these groups by unidimensional analysis using the chi-square, Student t test or Mann-Whitney test.

The second stage consisted of logistic regression analysis to assess the independent discriminative value of markers for the diagnosis of fibrosis.

The third step was to construct an index combining these identified independent factors. By definition the best index ("fibrosis score") in term of discrimination was the logistic regression function combining the independent factors.

The diagnostic values of these indexes and of the isolated factors were assessed by sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and receiver operating characteristics. The predictive values were assessed for the observed prevalence of significant fibrosis (40 % in this study), but also for lower (10%) or higher prevalence (90%).

The respective overall diagnostic values were compared by the area under the Receiver Operating Characteristic curves. The ROC curve is drawn by plotting the sensitivity versus (1 - specificity), after classification of the patients, according to the value obtained for the logistic function, for different thresholds (from 0 to 1). It is usually acknowledged that a ROC curve the area under which has a value superior to 0.7 is a good predictive curve for diagnosis. The ROC curve has to be acknowledged as a curve allowing to predict the quality of a diagnosis method.

These statistical analyses were performed separately for the different groups, as previously defined.

In order to reduce the number of factors, an analysis combining only the 6 most significant markers was performed (f1-a, or f1-b).

Since it was observed, during the analyses, that alpha 2 globulins had an independent diagnostic value when alpha 2 macroglobulin was taken into account, the diagnostic value of haptoglobin, the second main component of alpha 2 globulins, was retrospectively assessed.

An index with five markers, excluding protein electrophoresis components, was finally constructed combining haptoglobin and the four other identified markers (logistic function f5).

**Example 3: determination of the logistic function**

A total of 422 patients with chronic hepatitis C were pre-included.

Depending of the number excluded for the following reasons (HIV coinfection, HBV coinfection and transplantation), of the impossibility of fibrosis staging was impossible in others, or the impossibility of dosage of at least one out of the 11 markers, total of 362 (1<sup>st</sup> study) or 339 (2<sup>nd</sup> study) patients with chronic hepatitis C were included in the study, as indicated in Tables 1 and 4, respectively.

There was no difference between the patients characteristics and biochemical markers between first and second sample (Tables 1 and 4). The overall prevalence of significant fibrosis was 40% (F0 17-18%, F1 42-43%, F2 19-20%, F3 8%, F4 12-13%), as determined by histology.

**3.1. Diagnosis of significant fibrosis**

The diagnostic values (area under the ROC curves) of each of the eleven biochemical markers are given in tables 2 and 5 as well as their independent association with fibrosis (logistic regression).

The fibrosis score combining the ten or the six most informative markers (alpha2-macroglobulin, alpha2-microglobulin, total bilirubin, gamma globulin, apo A1, and GGT) or five markers (after excluding alpha2-microglobulin, gamma globulin and including haptoglobin), and age and gender had high diagnostic values, on the training sample as well as on the validation sample and in the overall population (Table 2 and 5).

Because transaminases ALT and AST were highly correlated (correlation coefficient=0.88) only ALT was used, when this marker was needed.

The logistic function of 6 markers and age and sex was determined to be as follow:

$$f1-a = 6.826 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.479 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 1.252 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0707 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0273 \times [\text{Age (years)}] + 1.628 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 0.925 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.344 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.544.$$

or

$$f1-b = 6.552 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.458 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 1.113 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0740 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0295 \times$$

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

16

[Age (years)] + 1.473 x Log [Bilirubin (umol/l)] - 0.979 x [ApoA1 (g/l)] + 0.414 x [Sex (female=0, male=1)] - 4.305 ;

The logistic function of 6 markers and age and sex was determined to be as  
5 follow:

$$F5 = 4.467 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 1.357 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin (g/l)}] + 1.017 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0281 \times [\text{Age (in years)}] + 1.737 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.184 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.301 \times \text{Sex (female=0, male=1)} - 5.540.$$

10

These functions were obtained by combining the relative weight of each parameter, as individually determined in the logistic regression, with a negative sign when the markers harbors a negative correlation with the stage of fibrosis. Logarithms were used for markers whose values have a very large range.

15 When 10 markers were used for the calculation of the logistic function for the determination of fibrosis, the function was as follow:

$$F2 = 10.088 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.735 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 2.189 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.137 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0546 \times [\text{Age (years)}] + 4.301 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 2.284 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.294 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 0.0312 [\text{Albumin (g/l)}] + 2.109 [\alpha 1\text{-globulin (g/l)}] - 0.136 [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] - 0.813 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 13.165.$$

25 The ROC curves for the fibrosis score using the ten or the six most informative markers (Figure 1), or the ten, six or five most informative markers (Figure 3) were identical. The area under the curve were not different.

The scatter plot of the six markers fibrosis score (which ranges from 0.00 to 1.00), according to fibrosis stage is given in figure 2.

30 The box plots of the five or six markers fibrosis score (which ranges from 0.00 to 1.00), according to fibrosis stage, are given in Figure 4.

Using the six markers fibrosis score, high negative predictive value (>90% absence of F2 F3 F4) was obtained for score ranging from 0 to 0.20 (125 patients

(1<sup>st</sup> study), or 119 patients (2<sup>nd</sup> study)), that is about 35 % of patients, with 13 false negative aged from 34 to 59 years: 4 F2A0, 6 F2A1, 3F2A2). High positive predictive value (>90% presence of F2 F3 F4) was obtained for score from 0.80 to 1 (53 patients (1<sup>st</sup> study), resp. 50 patients (2<sup>nd</sup> study), that is 15% of patients, with 4, 5 resp. 5, false positive aged from 47 to 68 years: 1, reps.2, F1A1, 3 F1A2) (Tables 3 and 6).

These value were calculated for a prevalence of fibrosis (F>1) of 40% in the test population. The values for prediction that are to be considered if the prevalence of fibrosis in the test population is 90 % or 10 % are also indicated in Tables 3 and 6.

Neural connection methods gave similar results : the percentage of patients correctly classified was 77%, 74 % and 79% for the training, validation and test samples, respectively (not shown).

In the second sample the addition of IL10, TGFB1, apoA2 and apoB permitted to slightly increase the area curve to  $0.889\pm 0.030$ , not different from the 6 markers fibrosis score.

### 3.2. Diagnosis of significant fibrosis among patients with low ALT (2<sup>nd</sup> study)

A total of 43 patients had ALT lower than 35 IU/l, with 10 patients having significant fibrosis. The diagnostic value of the 6 markers fibrosis function was still high with the area under the ROC curve  $0.758\pm 0.090$ . The two patients with a score greater than 0.80 had a cirrhosis. Among 29 patients with scores lower than 0.20, 25 had no significant fibrosis.

### 3.3. Diagnosis of cirrhosis or extensive fibrosis (1<sup>st</sup> study)

For the diagnosis of cirrhosis or extensive fibrosis, a fibrosis score using the same 6 markers ( $R^2 = 0.345$   $P < 0.001$ ) reached a very high area under the ROC curve :  $0.929\pm 0.020$ .

Using this function, high negative predictive value (>90% absence of F3 F4) was obtained for score ranging from 0 to 0.80 (309 patients, that is 85 % of patients, with 32 false negative aged from 27 to 74 years: 13 cirrhosis and 19 F3). For score >0.80 there was a high positive predictive value (>85% presence of F3

F4) 53 patients, that is 15 % of patients, with 8 false positive aged from 47 to 68 years: 4 F2 and 2 F1.

#### 3.4. Diagnosis of cirrhosis or extensive fibrosis (2<sup>nd</sup> study)

5 For the diagnosis of cirrhosis or extensive fibrosis, the same fibrosis score using 6 markers ( $R^2 = 0.347$ ;  $p < 0.001$ ) reached a very high area under the ROC curve:  $0.923 \pm 0.020$ .

10 Using this function, a high negative predictive value (>90% absence of F3 F4) was obtained for scores ranging from 0 to 0.80. Out of these 289 patients, being 85 % of the total, there were 30 false negatives : 11 cirrhosis and 19 F3. For scores >0.80, there was a high positive predictive value (>85% presence of F3 F4). Out of these 50 patients, that is 15 % of the total, there were 10 false positives : 5 F2 and 5 F1.

15 3.5. Diagnosis of significant activity or either fibrosis or activity (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> study)

For the diagnostic of significant activity (A2A3) the best final logistic regression combined ALT, alpha2-macroglobulin, beta-globulin, gamma globulin, apo A1, and GGT ( $R^2 = 0.243$   $P < 0.001$ ).

20 The logistic function that was used was:

$$f3 = 3.513 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.354 \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] + 0.889 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0827 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] - 0.0022 \times [\text{Age (years)}] + 2.295 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 1.670 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] - 0.415 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.311.$$

25 For the diagnostic of significant fibrosis (F2F3F4) or significant activity (A2A3) the best final logistic regression combined the same six markers as for significant fibrosis alone plus ALT ( $R^2 = 0.290$   $P < 0.001$ ).

The logistic function that one should use for this diagnostic reads:

30

$$f4 = 5.981 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.481 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 0.965 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0679 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0190 \times [\text{Age (years)}] + 1.143 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.097 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.092 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 1.355 \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 4.498.$$

### 3.6. Associations between cytokines and biochemical markers (2<sup>nd</sup> study)

TGF-beta1 was positively associated with haptoglobin ( $R=0.39$ ;  $p<0.001$ ) and negatively with alpha2 macroglobulin ( $R=-0.20$ ;  $p=0.02$ ), bilirubin ( $R=-0.32$ ;  $p<0.001$ ) and GGT ( $R=-0.20$ ;  $p=0.01$ ). HGF was associated with alpha2 macroglobulin ( $R=0.45$ ;  $p=0.006$ ) and GGT ( $R=0.54$ ;  $p<0.001$ ). IL10 was only associated with gamma-globulins ( $R=0.20$ ;  $p=0.01$ ).

#### Example 4: Analysis of the data

10 The results obtained show that a combination of five or six simple biochemical markers, not directly related to fibrogenesis, can reach high positive or negative predictive values for the diagnosis of significant fibrosis even at the early stage of few septa.

15 Conclusions for diagnosis methods are usually weak if the studied sample is biased and not representative of the most common patients. The clinical, histological and biochemical characteristics of the prospective population in this study was stable during the 33 months of the study, and similar to populations included in recent large randomized trials (22). Patients with obvious decompensated cirrhosis were not included. Inclusion of patients with severe liver  
20 disease would have improved artificially the predictive values of the logistic function. On the other hand, there was also a significant number of patients with minimal histologic features (13-18 % without fibrosis), and 9% of patients with ALT lower than 30 IU/ml, and 13% with ALT lower than 35 IU/ml, who are usually not included in randomized trials.

25 The diagnostic value of the fibrosis score was reproducible between the two periods (Tables 2 and 5). Analysis of these results allows the conclusion that the number of biopsy could be reduced by 50% in the management of chronic hepatitis C.

30 In practice, patients are treated according to fibrosis stage and grade (1-4). If a non-treatment decision without biopsy would have been taken according to a fibrosis score  $<0.20$ , only 13 out 125 or 119 patients were false negative. Among them none had cirrhosis or extensive fibrosis (F3-F4) and only two had moderate activity. If a treatment decision without biopsy would have been taken according to

a fibrosis score  $>0.80$ , only 4 patients out of 53 or 5 out of 50, were false positive. Among them 3 patients had moderate activity which justified treatment despite only portal fibrosis according to consensus statement (2).

Two of these 3 patients underwent a transvenous liver biopsy showing  
5 elevated porto-caval gradient, 19 and 13 mmHg respectively. It is therefore highly possible that these patients had, in fact, a significant fibrosis.

In this instance, only one or two patients (4 %) would have been treated in excess. Therefore, this score can also detect most patients with moderate and severe histological activity but without significant fibrosis. Finally, the fibrosis score could  
10 also be used for cirrhosis management without biopsy.

It is very important to notice that the method of the invention does not lead to a large number of undue treatment of patients or to the exclusion of patients in need of a treatment. The data presented in this application does strengthen the reliability of the method of diagnosis according to the present invention.

The fibrosis score could also be used for cirrhosis management without  
15 biopsy. Thus, screening for varices and for hepato-cellular carcinoma could be recommended in patients with fibrosis score  $>0.80$ .

The most informative markers were in decreasing rank : alpha2-macroglobulin, alpha2-globulin, GGT, gamma globulin, total bilirubin and apoA1.

20 Alpha2-globulin (normal range 4-6 g/l) is constituted by alpha2-macroglobulin (1.4-4.0 g/l), and alpha2-microglobulins : haptoglobin (0.4-2 g/l), caeruleoplasmin (0.2-0.4), antithrombin III (0.2-0.3) and retinol binding protein (0.03-0.07) (23). The diagnostic value of alpha2-globulin was not observed in univariate analysis because fibrosis was associated with an increase of alpha2-  
25 macroglobulin and a decrease of alpha2-microglobulins (Figure 5).

The data reported suggests that haptoglobin, the main component of alpha2-microglobulins, decreased when fibrosis increased and is the predictive factor. Indeed, the difference between alpha2-globulin and alpha2-macroglobulin, mainly constituted by haptoglobin, was strongly and negatively associated with fibrosis  
30 ( $R=-0.33$ ,  $p<0.001$ ). The other components of alpha2-microglobulin (caeruleoplasmin, antithrombin III, and retinol binding protein) are in much lower serum concentration and their individual diagnostic value have not been assessed.

An opposite correlation could be observed between fibrosis and alpha2 macroglobulin (positively correlated  $R=0.46$   $p<0.001$ ) versus alpha2 microglobulins (rich in haptoglobin, negatively correlated  $R=-0.40$ ).

The logistic function with 5 markers strengthens this hypothesis.

5 A significant diagnostic value of increased alpha2-macroglobulin for fibrosis staging had already been observed in patients with alcoholic liver disease. Alpha2-macroglobulin belongs to the acute phase proteins and is produced locally by hepatocytes, stellate cells and granuloma cells at sites of inflammation and liver fibrosis. Moreover, alpha2-macroglobulin is specifically related to fibrosis as a  
10 feature of stellate cell activation. Alpha2-macroglobulin is also a proteinase inhibitor and an increased synthesis of it can inhibit the catabolism of matrix proteins and enhance fibrotic processes in the liver.

Haptoglobin decreases when fibrosis increases and thus explains the predictive value of alpha2-globulins when combined with alpha2-macroglobulins.  
15 Haptoglobin was strongly and negatively associated with fibrosis, as already observed. This association was not related to hemolysis, hypersplenism, or hepatic insufficiency. Similarly, no significant association with unconjugated bilirubin was found in this study (data not shown).

The opposite correlations with fibrosis between alpha2 macroglobulin  
20 (positive) and haptoglobin (negative) could be explained by the different roles of HGF and TGF-beta1 during fibrogenesis and the acute phase response. For alpha2 macroglobulin a strong positive association with HGF and a negative correlation with TGF-beta1 serum concentrations were observed.

In contrast, for haptoglobin, a strong and positive correlation was observed  
25 with TGF-beta1. In experimental fibrosis, it has been observed that transduction with the HGF gene suppressed the increase of TGF-beta1 and that HGF stimulates synthesis of alpha2-macroglobulin and decreases synthesis of haptoglobin. Therefore, it seems that these two proteins are very informative, being representative of the two main fibrogenesis cytokines : alpha2-macroglobulin is  
30 representative of HGF and haptoglobin is representative of TGF-beta1.

GGT has been several times observed associated with fibrosis and used in association with prothrombin and apolipoprotein A1 PGA index (7-8,13-14,34). In this study the diagnostic value of GGT was independent of other factors,

particularly transaminases and bilirubin. No explanation can currently be given for the independent diagnostic value of total serum bilirubin in non cirrhotic patients. Both GGT and bilirubin were associated with HGF. Besides early cholestasis, an increase of epidermal growth factor could be one explanation for the GGT increase.

5       Gamma globulin serum concentration has been associated with cirrhosis and porto-systemic shunts for years (36). In this study, it was shown that, although lower than in patients with cirrhosis, gamma-globulin concentration was already increased in patients with non cirrhotic fibrosis in comparison to patients with F1 or F0.

10       ApoA1 serum concentration has been several times observed associated with fibrosis and used in association with prothrombin and GGT : PGA index (cf. *supra*). No significant additive diagnostic value of apo-AII or apoB in comparison to apoA1 alone was found in this study.

15       An unexpected decrease in serum TGF-beta1 according to fibrosis stage was observed in this study, although it did not add significant diagnostic value to the combination of the 6 markers. The strongest correlation was observed between TGF-beta1 and alpha2-microglobulin ( $R=0.42$   $p<0.001$ ), which suggests that haptoglobin could be a simple marker of TGF- $\beta$ 1 activation in chronic hepatitis C.

20       Finally, assessments of serum cytokines did not add significant diagnostic values to the biochemical markers which are easier and cheaper to measure. Measurements of electrophoresis compounds (alpha2-globulins and gamma-globulins) can be viewed as old fashioned semi-quantitative assessments. Their replacement by haptoglobin in a five markers function gave similar predictive values.

25       In conclusion, the present invention presents a combination of five, six or more biochemical markers to be used for the detection of liver fibrosis and/or presence of inflammatory lesions. The markers used in the present invention had never been combined in such a way, with the age and gender of the patients to give such a good predictive value, as illustrated by the area under the ROC curve.

30       The diagnosis method of the invention can be analyzed automatically, after an automatic measurement of the values of the markers, and can advantageously be applied for patients with chronic hepatitis C to reduce the indication of liver biopsy.

Table 1 : Characteristics of included patients for determination of functions f1-a, f2, f3, f4

Characteristics	Training period	Validation period	Total
Number of patients	206	156	362
Age at biopsy (years) mean 95% CI	47 (46-49)	48 (46-50)	47 (46-49)
Male (%)	108 (52%)	103 (66%)	211 (58%)
Female (%)	99 (48%)	53 (34%)	152 (42%)
No fibrosis (F0)	36 (17%)	28 (18%)	64 (18%)
Portal fibrosis (F1)	91 (44%)	61 (39%)	152 (42%)
Few septa (F2)	41 (20%)	29 (19%)	70 (19%)
Many septa (F3)	18 (9%)	11 (7%)	29 (8%)
Cirrhosis (F4)	21 (10%)	27 (17%)	48 (13%)
None (A0)	52 (25%)	27 (17%)	79 (22%)
Mild (A1)	87 (42%)	87 (56%)	174 (48%)
Moderate (A2)	63 (30%)	38 (24%)	101 (28%)
Severe (A3)	5 (2%)	4 (3%)	9 (2%)
Iron score	1.2 (0.8-1.6)	1.4 (0.9-1.7)	1.3 (1.0-1.6)
Steatosis (%)	12% (9-26%)	15% (10-19%)	13% (10-16%)
<b>Markers (normal range)</b>			
AST U/L (17-27 female) (20-32 male)	71 (63-80)	79 (65-92)	74 (67-82)
ALT U/L (11-26 female) (16-35 male)	108 (95-121)	113 (92-133)	110 (99-122)
Total Bilirubin umoles/L (2-17)	11 (10-12)	13 (9-18)	12 (10-14)
Albumin g/L (35-44)	44 (43-44)	44 (43-45)	44 (43-44)
GGT U/L (7-32 female) (11-49 male)	81 (64-98)	99 (72-126)	89 (74-104)
Alpha2 macroglobulin g/L (female 1.6-4.0 male 1.4-3.3)	2.6 (2.5-2.7)	2.5 (2.3-2.6)	2.6 (2.5-2.7)
Alpha1 globulin g/L (1-3)	1.9 (1.9-2.0)	1.8 (1.8-1.9)	1.9 (1.9-1.9)
Alpha2 globulin g/L (4-9)	7.6 (7.4-7.8)	6.8 (6.6-7.1)	7.3 (7.1-7.4)
Beta globulin g/L (4-10)	6.8 (6.7-7.0)	7.0 (6.8-7.2)	6.9 (6.8-7.0)
Gamma globulin g/L (5-12)	14.9 (14.3-15.6)	14.6 (13.8-15.5)	14.8 (14.3-15.3)
ApoA1 g/L (1.2-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
ApoB g/L (0.5-1.4)	ND	0.9 (0.8-0.9)	ND
ApoA2 g/L (0.3-0.5)	ND	0.3 (0.3-0.3)	ND
IL 10 pg/ml (<16)	ND	73 (41-105)	ND
TGF B1 ng/L (35-64)	ND	32 (29-33)	ND

ND : Not determined

Table 2 : Diagnostic value (area under the ROC curves  $\pm$  sd) of biochemical markers for significant fibrosis (Few F2, Many septa F3, Cirrhosis F4), for f1-f2, for the patients of Table 1.

Markers	Training period		Validation period		Both periods	
	Area under ROC curve	Significance Logistic regression	Area under ROC curve	Significance Logistic regression	Area under ROC curve	Significance Logistic regression
AST	0.774 $\pm$ 0.04	0.13	0.706 $\pm$ 0.04	0.35	0.743 $\pm$ 0.03	0.35
Alphaz2 macroglobulin	0.753 $\pm$ 0.04	<0.001	0.750 $\pm$ 0.04	<0.001	0.751 $\pm$ 0.03	<0.001
ALT	0.724 $\pm$ 0.04	0.09	0.583 $\pm$ 0.05	0.11	0.662 $\pm$ 0.03	0.41
GGT	0.680 $\pm$ 0.04	0.03	0.722 $\pm$ 0.04	0.01	0.700 $\pm$ 0.03	0.003
Gamma globulin	0.680 $\pm$ 0.04	0.16	0.680 $\pm$ 0.04	0.59	0.676 $\pm$ 0.03	0.04
Total Bilirubin	0.611 $\pm$ 0.04	0.69	0.751 $\pm$ 0.04	0.008	0.673 $\pm$ 0.03	0.06
Albumin	0.485 $\pm$ 0.04	0.12	0.326 $\pm$ 0.04	0.53	0.415 $\pm$ 0.03	0.68
Alphaz1 globulin	0.512 $\pm$ 0.04	0.30	0.571 $\pm$ 0.05	0.80	0.534 $\pm$ 0.03	0.26
Alphaz2 globulin	0.488 $\pm$ 0.04	0.007	0.482 $\pm$ 0.05	0.03	0.480 $\pm$ 0.03	<0.001
Beta globulin	0.477 $\pm$ 0.04	0.75	0.578 $\pm$ 0.05	0.45	0.522 $\pm$ 0.03	0.97
ApoA1	0.449 $\pm$ 0.04	0.14	0.372 $\pm$ 0.04	0.12	0.413 $\pm$ 0.03	0.05
Logistic function of 10 markers and age and sex	0.856 $\pm$ 0.03	<0.001	0.885 $\pm$ 0.03	<0.001	0.853 $\pm$ 0.02	<0.001
		R <sup>2</sup> = 0.314		R <sup>2</sup> = 0.363		R <sup>2</sup> = 0.310
Logistic function of 6 markers and age and sex*	0.839 $\pm$ 0.03	<0.001	0.868 $\pm$ 0.03	<0.001	0.851 $\pm$ 0.02	<0.001
		R <sup>2</sup> = 0.288		R <sup>2</sup> = 0.347		R <sup>2</sup> = 0.298

\* Logistic function of 6 markers and age and sex: 6.826xLogAlphaz2Macroglobulin (g/l) - 0.479xAlphaz2Globulin (g/l) + 1.252xLogGGT (IU/l) + 0.0707xGamma (g/l) + 0.0273xAge (in years) + 1.628xLogBilirubin (umol/l) - .925xApoA1 (g/l) + 0.344xSex (female=0, male=1) - 4.544.

ND : Not determined R<sup>2</sup> = R squared

Table 3 : Sensitivity, Specificity and predictive value of the six markers fibrosis function FI-a

Cutoff of fibrosis function	Sensitivity	Specificity	Likelihood Ratio	Prev =0.40		Prev =0.10		Prev =0.90	
				PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
0.10	0.99	0.30	1.41	0.49	0.97	0.14	0.995	0.93	0.71
0.20	0.91	0.52	1.89	0.56	0.90	0.17	0.98	0.94	0.59
0.30	0.83	0.65	2.35	0.61	0.85	0.21	0.97	0.96	0.30
0.40	0.74	0.74	2.85	0.66	0.81	0.24	0.96	0.96	0.24
0.50	0.67	0.81	3.62	0.71	0.79	0.29	0.96	0.97	0.22
0.60	0.59	0.93	8.48	0.85	0.77	0.49	0.95	0.99	0.20
0.70	0.51	0.96	12.16	0.89	0.74	0.57	0.95	0.99	0.18
0.80	0.32	0.98	13.90	0.90	0.68	0.61	0.93	0.99	0.14
0.90	0.16	0.995	35.50	0.96	0.64	0.80	0.91	0.997	0.12

Table 4: Characteristics of included patients for determination of logistic functions f1-b and f5.

Characteristics	Training period	Validation period	Total
Number of patients	205	134	339
Age at biopsy (years) mean 95% CI	47 (45-49)	48 (46-50)	47 (46-49)
Male (%)	108 (53%)	88 (66%)	196 (58%)
Female (%)	97 (47%)	46 (34%)	143 (42%)
No fibrosis (F0)	36 (17%)	20 (15%)	56 (17%)
Portal fibrosis (F1)	91 (44%)	54 (40%)	145 (43%)
Few septa (F2)	40 (20%)	28 (21%)	68 (20%)
Many septa (F3)	18 (9%)	10 (7%)	28 (8%)
Chirrosis (F4)	20 (10%)	22 (17%)	42 (12%)
None (A0)	52 (25%)	17 (12%)	69 (20%)
Mild (A1)	85 (41%)	80 (60%)	165 (49%)
Moderate (A2)	63 (31%)	33 (25%)	96 (28%)
Severe (A3)	5 (2%)	4 (3%)	9 (3%)
Iron score	1.2 (0.8-1.6)	1.4 (0.9-1.7)	1.3 (1.0-1.6)
Steatosis (%)	12% (9-26%)	15% (10-19%)	13% (10-16%)
<b>Markers (normal range)</b>			
AST U/L (17-27 female) (20-32 male)	71 (63-80)	79 (65-92)	77 (67-82)
ALT U/L (11-26 female) (16-35 male)	108 (95-121)	113 (92-133)	114 (99-122)
Total Bilirubin umoles/L (2-17)	11 (10-12)	13 (9-18)	12 (10-14)
Albumin g/L (35-44)	44 (43-44)	44 (43-45)	44 (43-44)
GGT U/L (7-32 female) (11-49 male)	81 (64-98)	99 (72-126)	88 (74-104)
Alpha2 macroglobulin g/L (female 1.4-3.3)	2.6 (2.5-2.7)	2.5 (2.3-2.6)	2.6 (2.5-2.7)
Alpha 1 globulin g/L (1-3)	1.9 (1.9-2.0)	1.8 (1.8-1.9)	1.9 (1.9-1.9)
Alpha2 globulin g/L (4-9)	7.6 (7.4-7.8)	6.8 (6.6-7.1)	7.3 (7.1-7.4)
Beta globulin g/L (4-10)	6.8 (6.7-7.0)	7.0 (6.8-7.2)	6.9 (6.8-7.0)
Gamma globulin g/L (5-12)	14.9 (14.3-15.6)	14.6 (13.8-15.5)	14.8 (14.3-15.3)
ApoA1 g/L (1.2-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.4-1.5)	1.5 (1.4-1.5)
ApoB g/L (0.5-1.4)	ND	0.9 (0.8-0.9)	ND
ApoA2 g/L (0.3-0.5)	ND	0.3 (0.3-0.3)	ND
IL 10 pg/ml (<16)	ND	78 (41-105)	ND
TGF B1 ng/ml (35-64)	ND	31 (29-33)	ND
Haploglobin g/L (0.35-2.00)*	0.97 (0.89-1.05)	0.89 (0.80-0.99)	0.94 (0.88-1.00)
HGF ng/L (c)	ND	1181 (976-1386)	ND

ND: Not determined \* For Haploglobin, dosage was missing for 8 patients in the first period and one patient in the second period.

Table 5 : Diagnostic value (area under the ROC curves  $\pm$  sd) of biochemical markers for significant fibrosis (Few F2, Many septa F3, Cirrhosis F4), for fl-b, F2, F5, for the patients of Table 4.

Markers	Training period		Validation period		Both periods	
	Area under ROC curve	Significance Logistic regression	Area under ROC curve	Significance Logistic regression	Area under ROC curve	Significance Logistic regression
AST	0.773 $\pm$ 0.04	0.13	0.679 $\pm$ 0.05	0.35	0.739 $\pm$ 0.03	0.35
Alpha2 Macroglobulin	0.749 $\pm$ 0.04	<0.001	0.740 $\pm$ 0.04	<0.001	0.746 $\pm$ 0.03	<0.001
ALT	0.725 $\pm$ 0.04	0.09	0.564 $\pm$ 0.05	0.11	0.654 $\pm$ 0.03	0.41
Haptoglobin (decrease)§	0.704 $\pm$ 0.04	0.02	0.654 $\pm$ 0.05	0.006	0.685 $\pm$ 0.03	0.02
Gamma Globulin	0.680 $\pm$ 0.04	0.16	0.670 $\pm$ 0.04	0.59	0.672 $\pm$ 0.03	0.04
GGT	0.672 $\pm$ 0.04	0.03	0.705 $\pm$ 0.04	0.01	0.697 $\pm$ 0.03	0.003
Total Bilirubin	0.611 $\pm$ 0.04	0.69	0.726 $\pm$ 0.04	0.008	0.699 $\pm$ 0.03	0.06
ApoA1 (decrease)	0.554 $\pm$ 0.04	0.14	0.697 $\pm$ 0.05	0.52	0.297 $\pm$ 0.03	0.05
Albumin (decrease)	0.514 $\pm$ 0.04	0.17	0.662 $\pm$ 0.05	0.33	0.297 $\pm$ 0.03	0.68
Alpha1 Globulin	0.518 $\pm$ 0.04	0.30	0.677 $\pm$ 0.05	0.30	0.238 $\pm$ 0.03	0.26
Alpha2 Globulin (decrease)	0.508 $\pm$ 0.04	0.007	0.218 $\pm$ 0.05	0.42	0.238 $\pm$ 0.03	<0.001
Beta2 Globulin	0.475 $\pm$ 0.04	0.25	0.601 $\pm$ 0.03	0.42	0.327 $\pm$ 0.03	0.97
10 markers, age and sex	Logistic 0.856 $\pm$ 0.03	<0.001	0.883 $\pm$ 0.03	<0.001	0.851 $\pm$ 0.02	<0.001
function	$R^2=0.314$		$R^2=0.363$		$R^2=0.305$	
6 markers, age and sex	Logistic 0.856 $\pm$ 0.03	<0.001	0.870 $\pm$ 0.03	<0.001	0.847 $\pm$ 0.02	<0.001
function	$R^2=0.284$		$R^2=0.338$		$R^2=0.297$	
5 markers, age and sex	Logistic 0.827 $\pm$ 0.03	<0.001	0.851 $\pm$ 0.03	<0.001	0.837 $\pm$ 0.02	<0.001
function **	$R^2=0.265$		$R^2=0.323$		$R^2=0.279$	

§ Haptoglobin was retrospectively assessed. Dosage was missing for 8 patients in the first period and one patient in the second period. Significance in logistic regression when haptoglobin replaced alpha2 globulin  
 \* Logistic function of 6 markers and age and sex: 6.552xLogAlpha2Macroglobulin (g/l) - 0.458xAlpha2 Globulin (g/l) + 1.113xLogGGT (IU/l) + 0.0740xGamma Globulin (g/l) + 0.0295xAge (in years) + 1.473xLogBilirubin (umol/l) - 0.979xApoA1 (g/l) + 0.414xSex (female=0, male=1) - 4.305.  
 \*\* Logistic function of 5 markers and age and sex: 4.467xLogAlpha2Macroglobulin (g/l) - 1.357xLogHaptoglobin (g/l) + 1.017xLogGGT (IU/l) + 0.0281xAge (in years) + 1.737xLogBilirubin (umol/l) - 1.184xApoA1 (g/l) + 0.301xSex (female=0, male=1) - 5.540.  
 ND : Not determined  $R^2 = R$  squared

Table 6 : Sensitivity, Specificity and predictive value of the six markers fibrosis function fl-b

Cut off of fibrosis functio	Sensitivity	Specificity	Likelihood Ratio	Prevalence Observed = 0.2				Prevalence Simulated = 0.10				Prevalence Simulated = 0.90									
				PPV		NPV		PPV		NPV		PPV		NPV							
				0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
0.10	0.98	0.33	1.46	0.50	0.96	0.14	0.99	0.93	0.63	0.50	0.96	0.14	0.99	0.93	0.63	0.50	0.96	0.14	0.99	0.93	0.63
0.20	0.91	0.53	1.94	0.57	0.90	0.18	0.98	0.95	0.39	0.57	0.90	0.18	0.98	0.95	0.39	0.57	0.90	0.18	0.98	0.95	0.39
0.30	0.81	0.65	2.33	0.62	0.83	0.21	0.97	0.95	0.28	0.62	0.83	0.21	0.97	0.95	0.28	0.62	0.83	0.21	0.97	0.95	0.28
0.40	0.73	0.74	2.78	0.66	0.80	0.24	0.96	0.96	0.23	0.66	0.80	0.24	0.96	0.96	0.23	0.66	0.80	0.24	0.96	0.96	0.23
0.50	0.68	0.85	4.42	0.75	0.79	0.33	0.96	0.98	0.23	0.75	0.79	0.33	0.96	0.98	0.23	0.75	0.79	0.33	0.96	0.98	0.23
0.60	0.60	0.93	8.64	0.86	0.77	0.49	0.95	0.99	0.21	0.86	0.77	0.49	0.95	0.99	0.21	0.86	0.77	0.49	0.95	0.99	0.21
0.70	0.50	0.95	10.05	0.87	0.73	0.53	0.94	0.99	0.17	0.87	0.73	0.53	0.94	0.99	0.17	0.87	0.73	0.53	0.94	0.99	0.17
0.80	0.33	0.98	13.11	0.90	0.68	0.59	0.93	0.99	0.12	0.90	0.68	0.59	0.93	0.99	0.12	0.90	0.68	0.59	0.93	0.99	0.12
0.90	0.17	0.99	17.48	0.92	0.64	0.66	0.92	0.997	0.12	0.92	0.64	0.66	0.92	0.997	0.12	0.92	0.64	0.66	0.92	0.997	0.12

## REFERENCES

1. Perrillo RP. *Hepatology* 1997;26:578-61S.
2. Consensus Statement. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 30: 956-961.
- 5 3. Friedman SL. *Am J Med.* 1999;107:27S-30S.
4. Poynard T, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis* 2000;20:47-55.
5. Poynard T, Lebec D. The inconvenience of investigations used in hepatology: patients' and hepatologists' opinions. *Liver* 1982;2:369-75.
- 10 6. Poynard T, et al. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000;14:543-548.
7. Teare JP, et al. Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis. *Lancet.* 1993;342:895-8.
8. Naveau S, et al. Alpha-2-macroglobulin and hepatic fibrosis. Diagnostic interest. *Dig Dis Sci.* 1994;39:2426-32.
- 15 9. Guechot J, et al. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem.* 1996 ;42:558-63.
- 10 10. Gabrielli GB, et al. Serum laminin and type III procollagen in chronic hepatitis C. Diagnostic value in the assessment of disease activity and fibrosis. *Clin Chim Acta.* 1997;265:21-31.
11. Kasahara A, et al. *J Hepatol.* 1997;26:574-83.
12. Poynard T, Bedossa P. Age and platelet count: a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. METAVIR and CLINIVIR Cooperative Study Groups. *J Viral Hepat* 1997;4:199-208.
- 25 13. Oberti F, et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology.* 1997;113:1609-16.
14. Pilette C, et al. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *J Hepatol.* 1998 ;28:439-46.
- 30 15. Wong VS, et al. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 1998;5:187-92.

16. Poynard T, et al. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32.
17. Doumas BT, et al. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta* 1971, 31, 87-96.
18. The METAVIR cooperative group. Inter- and intra-observer variation in the assessment of liver biopsy of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20;1:15-20.
19. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24(2):289-93.
20. Hintze JL. NCSS 97 User Guide. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville. Utah 1997.
21. Neural Connection 1.0 User's guide. SPSS. Chicago. Illinois 1995.
22. Poynard T, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-32.
23. Boulanger P, et al. Les protéines du plasma sanguin In: Polonovski M, *Biochimie Médicale, fascicule III*. Masson et compagnie, 1971, Paris, pages 47-154.
24. Tiggelman AM, et al. Localization of alpha 2-macroglobulin protein and messenger RNA in rat liver fibrosis: evidence for the synthesis of alpha 2-macroglobulin within *Schistosoma mansoni* egg granulomas. *Hepatology* 1996;23:1260-7
25. Tiggelman AM, et al. Transforming growth factor-beta-induced collagen synthesis by human liver myofibroblasts is inhibited by alpha2-macroglobulin. *J Hepatol.* 1997;26:1220-8
26. Meisse D, et al. Cell swelling increased the alpha2-macroglobulin gene expression in cultured rat hepatocytes. *FEBS Letter.* 1998;422:346-8.
27. Kawser CA, et al. Rat hepatic stellate cell expression of alpha2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. *Clin Sci.* 1998;95:179-86.

28. Van Goor H, et al. Alpha macroglobulins and the low-density-lipoprotein-related protein/alpha-2-macroglobulin receptor in experimental renal fibrosis. *Exp Nephrol.* 1999 Jan-Feb;7(1):35-43.
29. Bacq Y, et al. Decrease of haptoglobin serum level in patients with chronic viral hepatitis C. *Gastroenterol Clin Biol* 1993;17:364-9.
- 5 30. Louagie HK, et al. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996 ;25:10-4.
31. Guillen MI, et al. The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes: divergent effect on interleukin-6-stimulated genes. *Hepatology.* 1996;23:1345-52.
- 10 32. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997;181:257-66.
33. Shiota G, et al. Hepatocyte growth factor and acute phase proteins in patients with chronic liver diseases. *J Med* 1995;26:295-308.
- 15 34. Poynard T, et al. A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers. *Gastroenterology* 1991;100:1397-402.
35. Edwards AM, et al. Modulation of gamma-glutamyltranspeptidase in normal rat hepatocytes in culture by cell density, epidermal growth factor and agents which alter cell differentiation. *Carcinogenesis.* 1987;8:1837-42.
- 20 36. Sakumoto I, et al. Studies on the relationship between the histological changes and liver cell function or plasma proteins in hepatic diseases. *Gastroenterol Jpn.* 1976;11:224-36.
37. Paradis V, et al. Role of liver extracellular matrix in transcriptional and post-transcriptional regulation of apolipoprotein A-I by hepatocytes. *Cell Mol Biol.* 25 1996;42:525-34.
38. Sabile A, et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology.* 1999;30:1064-76.
39. Murawaki Y, et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13:680-4.
- 30 40. Tsai JF, et al. Urinary transforming growth factor beta1 levels in hepatitis C virus-related chronic liver disease: correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology.* 1997;25:1141-6.

CLAIMS

1. A method for diagnosis of an inflammatory, a fibrotic or a cancerous disease in a patient comprising the steps of:
- 5 a) measuring the values of biochemical markers in the serum or plasma of said patient,
- b) combining said values through a logistic function including said markers and,
- 10 c) analyzing the end value of said logistic function in order to determine the presence of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in said patient.
2. The method of claim 1, wherein said disease is liver fibrosis and/or presence of liver necroinflammatory lesions.
3. The method of claim 1, wherein the logistic function is obtained through the following method:
- 15 i) classification of the patients in different groups according to the extend of their disease;
- ii) identification of factors which differ significantly between these groups by unidimensional analysis;
- 20 iii) logistic regression analysis to assess the independent discriminative value of markers for the diagnosis of fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions
- iv) construction of the logistic function by combination of these identified independent factors.
- 25 4. The method of claim 1, wherein at least 4 biochemical markers are studied in step a).
5. The method of claim 1, wherein said markers are chosen in the group consisting of  $\alpha$ 2-macroglobulin, AST, ALT, GGT,  $\gamma$ -globulin, total bilirubin, albumin,  $\alpha$ 1-globulin,  $\alpha$ 2-globulin, haptoglobin,  $\beta$ -globulin, apoA1, IL10, TGF- $\beta$ 1, apoA2, apoB.
- 30 6. The method of claim 1, wherein the logistic function further takes the age and gender of the patient into account.

7. The method of claim 2, wherein said measured biochemical markers used for diagnosis of fibrosis include  $\alpha$ 2-macroglobulin, GGT,  $\gamma$ -globulin, total bilirubin, ( $\alpha$ 2-globulin or haptoglobin) and apoA1.
8. The method of claim 2, wherein said measured biochemical markers used for diagnosis of presence of necroinflammatory lesions include  $\alpha$ 2-macroglobulin, GGT,  $\gamma$ -globulin, (ALT or AST) and apoA1.
9. The method of claim 2, wherein the logistic function is chosen in the group consisting of:
- $f1 = a_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - a_2 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + a_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + a_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + a_5 \times [\text{Age (years)}] + a_6 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - a_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + a_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - a_9$ , with
- $a_1$  comprised between 6.5 and 6.9,
  - $a_2$  comprised between 0.450 and 0.485,
  - $a_3$  comprised between 1.100 and 1.300,
  - $a_4$  comprised between 0.0700 and 0.0750,
  - $a_5$  comprised between 0.0265 and 0.0300,
  - $a_6$  comprised between 1.400 and 1.700,
  - $a_7$  comprised between 0.900 and 1,
  - $a_8$  comprised between 0.300 and 0.450, and
  - $a_9$  comprised between 4.200 and 4.700.
- $f2 = b_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - b_2 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + b_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + b_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + b_5 \times [\text{Age (years)}] + b_6 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - b_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + b_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + b_9 [\text{Albumin (g/l)}] + b_{10} [\alpha 1\text{-globulin (g/l)}] - b_{11} [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] 2.189 - b_{12} \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - b_{13}$ , with
- $b_1$  comprised between 9.9 and 10.2,
  - $b_2$  comprised between 0.7 and 0.77,
  - $b_3$  comprised between 2 and 2.4,
  - $b_4$  comprised between 0.1 and 0.2,
  - $b_5$  comprised between 0.04 and 0.07,
  - $b_6$  comprised between 4 and 4.6,

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

34

- $b_7$  comprised between 2 and 2.5,
  - $b_8$  comprised between 0.28 and 0.32
  - $b_9$  comprised between 0.025 and 0.04
  - $b_{10}$  comprised between 2 and 2.2
  - 5 -  $b_{11}$  comprised between 0.1 and 0.16
  - $b_{12}$  comprised between 0.7 and 0.9, and
  - $b_{13}$  comprised between 12 and 14.
- $f_3 = c_1 \times \text{Log} [\alpha_2\text{-macroglobulin (g/l)}] - c_2 \times [\beta_2\text{-globulin (g/l)}] +$   
 $c_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + c_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] - c_5 \times [\text{Age (years)}] + c_6 \times$   
 10  $\text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - c_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] - c_8 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] -$   
 $c_9$ , with
- $c_1$  comprised between 3.45 and 3.65,
  - $c_2$  comprised between 0.3 and 0.4,
  - $c_3$  comprised between 0.8 and 1,
  - 15 -  $c_4$  comprised between 0.075 and 0.09,
  - $c_5$  comprised between 0.0015 and 0.003,
  - $c_6$  comprised between 2.1 and 2.5,
  - $c_7$  comprised between 1.55 and 1.75,
  - $c_8$  comprised between 0.35 and 0.45, and
  - 20 -  $c_9$  comprised between 4 and 4.6.
- $f_4 = d_1 \times \text{Log} [\alpha_2\text{-macroglobulin (g/l)}] - d_2 \times [\alpha_2\text{-globulin (g/l)}] +$   
 $d_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + d_4 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + d_5 \times [\text{Age (years)}] + d_6 \times$   
 25  $\text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - d_7 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + d_8 \times [\text{Sex (female=0,$   
 $\text{male=1)}] + d_9 \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - d_{10}$ , with
- $d_1$  comprised between 5.3 and 6.7,
  - $d_2$  comprised between 0.45 and 0.5,
  - $d_3$  comprised between 0.8 and 1.2,
  - $d_4$  comprised between 0.06 and 0.08,
  - $d_5$  comprised between 0.0015 and 0.0025,
  - 30 -  $d_6$  comprised between 1 and 1.2,
  - $d_7$  comprised between 1 and 1.2,
  - $d_8$  comprised between 0.09 and 1.1,
  - $d_9$  comprised between 1.2 and 1.5, and

WO 02/16949

PCT/IB00/01559

35

-  $d_{10}$  comprised between 4 and 5.

-  $f5 = z_1 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - z_2 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin (g/l)}] + z_3 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + z_4 \times [\text{Age (in years)}] + z_5 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - z_6 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + z_7 \times \text{Sex (female=0, male=1)} - z_8$ , with

- 5
- $z_1$  comprised between 4 and 5,
  - $z_2$  comprised between 1.2 and 1.5,
  - $z_3$  comprised between 0.9 and 1.1,
  - $z_4$  comprised between 0.0026 and 0.03,
  - $z_5$  comprised between 1.6 and 1.9,
  - 10 -  $z_6$  comprised between 1 and 1.3,
  - $z_7$  comprised between 0.25 and 0.35, and
  - $z_8$  comprised between 5 and 6.

10. The method of claim 9, wherein the logistic function is chosen in the group consisting of:

- 15
- $f1\text{-a} = 6.826 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.479 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 1.252 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0707 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0273 \times [\text{Age (years)}] + 1.628 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 0.925 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.344 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.544$  ;
  - $f1\text{-b} = 6.552 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.458 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 1.113 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0740 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0295 \times [\text{Age (years)}] + 1.473 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 0.979 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.414 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.305$
  - 20
  - $f2 = 10.088 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.735 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}] + 2.189 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.137 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0546 \times [\text{Age (years)}] + 4.301 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 2.284 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.294 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 0.0312 [\text{Albumin (g/l)}] + 2.109 [\alpha 1\text{-globulin (g/l)}] - 0.136 [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] - 0.813 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 13.165$ .
  - 25
  - $f3 = 3.513 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.354 \times [\beta 2\text{-globulin (g/l)}] + 0.889 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0827 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] - 0.0022 \times [\text{Age (years)}] + 2.295 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 1.670 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] - 0.415 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] - 4.311$ .
  - 30

- $f_4 = 5.981 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 0.481 \times [\alpha 2\text{-globulin (g/l)}]$   
 $+ 0.965 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0679 \times [\gamma\text{-globulin (g/l)}] + 0.0190 \times$   
 $[\text{Age (years)}] + 1.143 \times \text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.097 \times [\text{ApoA1 (g/l)}]$   
 $+ 0.092 \times [\text{Sex (female=0, male=1)}] + 1.355 \times \text{Log} [\text{ALT (IU/l)}] - 4.498.$
- 5 -  $f_5 = 4.467 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-macroglobulin (g/l)}] - 1.357 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin}$   
 $(\text{g/l})] + 1.017 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0.0281 \times [\text{Age (in years)}] + 1.737 \times$   
 $\text{Log} [\text{Bilirubin (umol/l)}] - 1.184 \times [\text{ApoA1 (g/l)}] + 0.301 \times \text{Sex}$   
 $(\text{female=0, male=1}) - 5.540.$
11. The method of claim 2, wherein the end value of the logistic function is used for  
 10 the diagnosis of cirrhosis.
12. The method of claim 1, wherein the end value of the logistic function is used to  
 predict the evolution of the disease.
13. The method of claim 1, wherein the end value of the logistic function is used for  
 the choice of a suitable treatment for the patient.
- 15 14. The method of claim 1, wherein the end value of the logistic function is used in  
 the decision of performing a liver biopsy on said patient.
15. The method of claim 2, wherein said patient suffers from a disease involving  
 liver fibrosis, optionally developing to cirrhosis.
16. The method of claim 15, wherein said disease is included in the group  
 20 consisting of hepatitis B and C, alcoholism, hemochromatosis, metabolic  
 disease, diabetes, obesity, autoimmune liver disease, primary biliary cirrhosis,  
 $\alpha 1$ -antitrypsin deficit, Wilson disease.
17. The method of claim 15, wherein said disease is hepatitis C virus infection.
18. A kit of diagnosis of an inflammatory, a fibrotic or a cancerous disease in a  
 25 patient, comprising instructions allowing to determine the presence of said  
 inflammatory, fibrotic or cancerous disease in said patient, after the dosage of  
 biochemical markers.
19. A kit of diagnosis of liver fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in a  
 30 patient, comprising instructions allowing to determine the presence of liver  
 fibrosis and/or liver necroinflammatory lesions in said patient, after the dosage  
 of biochemical markers.

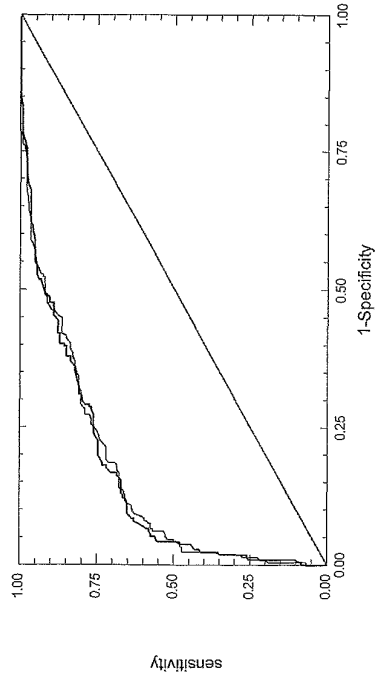


Fig. 1

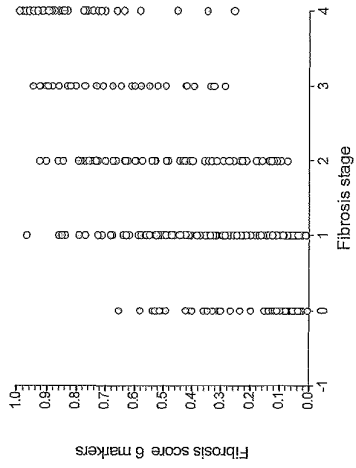


Fig. 2

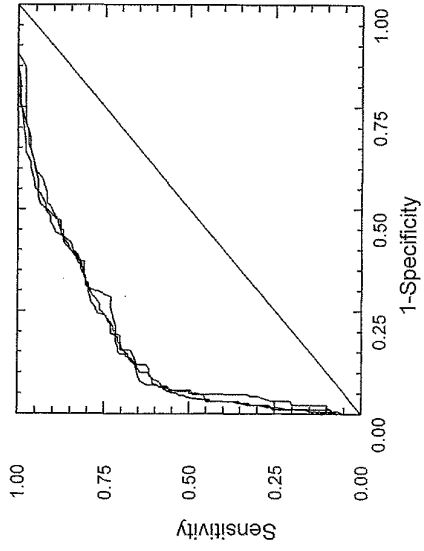


Fig. 3

4/6

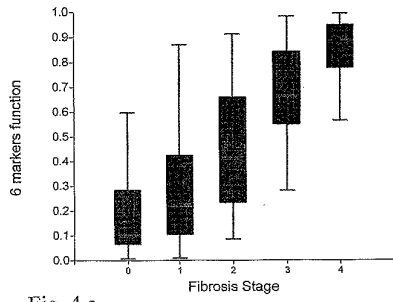


Fig. 4.a

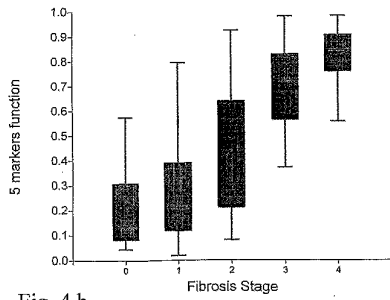


Fig. 4.b

Fig. 4

5 / 6

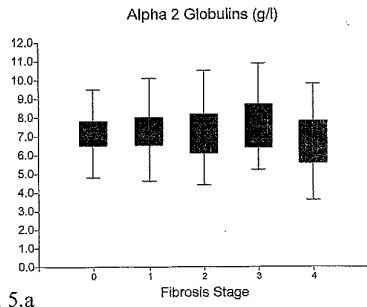


Fig. 5.a

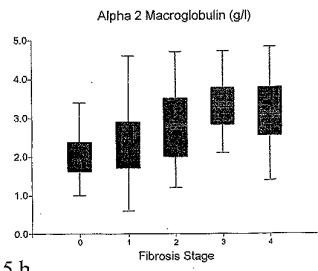


Fig. 5.b

Fig. 5

6/6

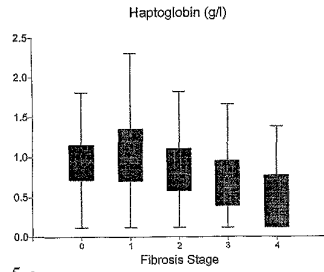


Fig. 5.c

Fig. 5 continued

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. l. Application No. PCT/IB 00/01559
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 130, no. 7, 15 February 1999 (1999-02-15) Columbus, Ohio, US; abstract no. 78389, C. PILETTE ET AL.: "Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs. semi-quantitative scores: comparison with serum markers." page 332; XP002149460 abstract & J. HEPATOL., vol. 28, no. 3, 1998, pages 439-446, cited in the application --- -/-	1-19
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2001		Date of mailing of the international search report 13/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 540-3340, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 540-3016		Authorized officer Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 00/01559
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. P. TEARE ET AL.: "Comparison of serum procollagen III peptide concentrations and PGA index for assessment of hepatic fibrosis." LANCET THE., vol. 342, 9 October 1993 (1993-10-09), pages 895-898, XP002149457 LANCET LIMITED, LONDON., GB ISSN: 0140-6736 cited in the application the whole document	1-19
X	J. KROFF ET AL.: "Efficacy of serum laminin measurement for diagnosis of fibrotic liver diseases" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 34, no. 10, October 1988 (1988-10), pages 2026-2030, XP002149458 WINSTON US the whole document	1-19
X	J. GUÉCHOT ET AL.: "Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 42, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 558-563, XP002149459 WINSTON US cited in the application the whole document	1-19
X	EP 0 911 343 A (TOSOH CORPORATION) 28 April 1999 (1999-04-28) the whole document	1
A	T. POYNARD ET AL.: "Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C." LANCET THE., vol. 349, 22 March 1997 (1997-03-22), pages 825-832, XP002158763 LANCET LIMITED, LONDON., GB ISSN: 0140-6736 cited in the application the whole document	1-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

In International Application No  
PCT/IB 00/01559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 911343 A	28-04-1999	JP 11171898 A US 6060255 A	29-06-1999 09-05-2000

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 ティエリー、ポイナール

フランス国パリ、ブルバール、ド、ロピタル、47、グループ、オスピタリエ、ピティエ サル  
ペトリエール