



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0057765
(43) 공개일자 2021년05월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/5005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7010293
- (22) 출원일자(국제) 2019년09월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년04월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/050532
- (87) 국제공개번호 WO 2020/055954
국제공개일자 2020년03월19일
- (30) 우선권주장
62/729,787 2018년09월11일 미국(US)

- (71) 출원인
더 제너럴 হাসপিটাল কোর্পোরেশন
미국, 메사추세츠 02114, 보스톤 프룻트 스트리트 55
프래지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠프리지, 퀸시스트리트17
- (72) 발명자
팅, 데이비드 티.
미국 02030 메사추세츠주 도버 브라이언트 레인 1
반, 이룬
미국 02445 메사추세츠주 브록클린 폰드 애비뉴
77 아파트먼트 1005
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

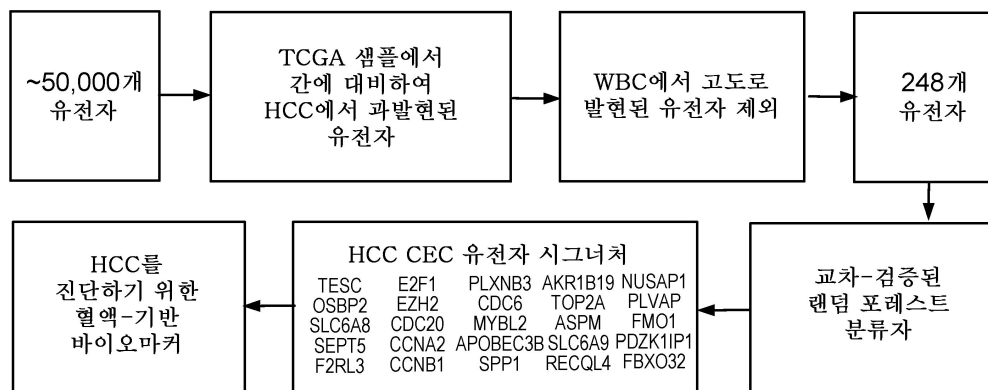
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 간 질환을 검출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 순환 상피 세포의 혈액 농도 및 그들의 유전자 발현에 기초하여 간 질환 및 병태를 진단, 결정, 또는 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/085 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

(72) 발명자

모세쑤, 켈리

미국 02130 메사추세츠주 보스톤 아버웨이 465 아
파트먼트 16

아리, 마틴

미국 02138 메사추세츠주 캠프릿지 콘코드 애비뉴
243 아파트먼트 4

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 순환 상피 세포 (CEC)에서 간세포 암종 (HCC) 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 여기서 HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법

청구항 2

제1항에 있어서, HCC 분류자 유전자가 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32 중 하나 이상으로 이루어지는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, HCC 분류자 유전자가 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32로 이루어지는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, HCC 분류자 유전자가 ACTG2, ADM2, AFP, AGR2, ALDH3A1, ALPK3, AMIGO3, ANKRD65, ANLN, AP1M2, ARHGAP11A, ARHGEF39, ASF1B, ASPHD1, AURKA, AXIN2, BAIAP2L2, BEX2, C15orf48, C1orf106, C1QTNF3, C6orf223, CA12, CA9, CAMK2N2, CAP2, CBX2, CCDC170, CCDC28B, CCDC64, CCNE2, CCNF, CD109, CD34, CDC25A, CDC7, CDCA5, CDCA8, CDH13, CDK1, CDKN2A, CDKN2C, CDT1, CELF6, CENPF, CENPH, CENPL, CENPU, CENPW, CKB, CNNM1, COL15A1, COL4A5, COL7A1, COL9A2, CRIP3, CSPG4, CTNND2, CXorf36, CYP17A1, DLK1, DMKN, DSCC1, DTL, DUOX2, ECT2, EEF1A2, EFNA3, EPHB2, EPPK1, ETV4, FABP4, FAM111B, FAM3B, FAM83D, FANCD2, FANCI, FBXL18, FERMT1, FGF19, FLNC, FLVCR1, FOXD2-AS1, FOXM1, FXYD2, GABRE, GAL3ST1, GCNT3, GINS1, GJC1, GMNN, GNAZ, GOLGA2P7, GPC3, GPR64, GPSM1, HRCT1, IGF2BP2, IGSF1, IGSF3, IQGAP3, ITGA2, ITPKA, KIAA0101, KIF11, KIFC1, KIFC2, KNTC1, KRT23, LAMA3, LEF1, LGR5, LINC00152, LINGO1, LPL, LRRC1, LYPD1, MAD2L1, MAGED4, MAGED4B, MAPK12, MAPK8IP2, MAPT, MCM2, MDGA1, MDK, MFAP2, MISP, MKI67, MMP11, MNS1, MPZ, MSC, MSH5, MTMR11, MUC13, MUC5B, MYH4, NAALADL1, NAV3, NCAPG, NDUFA4L2, NEB, NKD1, NMB, NOTCH3, NOTUM, NPM2, NQO1, NRCAM, NT5DC2, NTS, OBSCN, OLFML2A, OLFML2B, PAQR4, PEG10, PI3, PLCE1, PLCH2, PLK1, PLXDC1, PODXL2, POLE2, PPAP2C, PRC1, PTGES, PTGFR, PTHLH, PTK7, PTP4A3, PTTG1, PYCR1, RACGAP1, RBM24, RHBG, RNF157, ROBO1, RP4-800G7.2, RPS6KL1, RRM2, S100A1, SCGN, 5-Sep, SERPINA12, SEZ6L2, SFN, SGOL2, SLC22A11, SLC51B, SLC6A2, SNCG, SOAT2, SP5, SPARCL1, SPINK1, STIL, STK39, SULT1C2, TCF19, TDGF1, THY1, TK1, TMC5, TMEM132A, TMEM150B, TNFRSF19, TNFRSF25, TONSL, TPX2, TRIM16, TRIM16L, TRIM31, TRIM45, TTC39A, UBD, UBE2C, UBE2T, UGT2B11, USH1C, VSIG10L, WDR62, WDR76, 및 ZWINT로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 3개 또는 그 초과수의 추가 유전자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 5

(a) 대상체의 CEC에서 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 대상체의 CEC에서의 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교하여 HCC의 존재를 결정하는 단계

를 포함하는, 만성 간 질환 (CLD)을 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준이 HCC 스코어를 계산하는데 사용되고, 계산된 HCC 스코어가 참

조 스코어와 비교되며, 여기서 HCC의 존재는 참조 스코어보다 높은 HCC 스코어의 존재에 기초하여 결정되는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, HCC 스코어가 랜덤 포레스트 분석을 이용하여 계산되는 것인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준이 다변량 로지스틱 회귀 모델링 접근법을 이용하여 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교되는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 순환 상피 세포 (CEC)에서 HCC 분류자 유전자의 발현 수준이

- (a) 대상체로부터 혈액을 포함하는 샘플을 수득하고;
- (b) 크기-기반 배제를 통해 샘플로부터 적혈구, 혈소판 및 혈장을 제거하고;
- (c) 자기영동에 의해 샘플로부터 백혈구 (WBC)를 제거하고;
- (d) RNA-시퀀싱, qRT-PCT, RNA 제자리 하이브리드화, 단백질 마이크로어레이, 또는 질량 분광측정 및 단백질 프로파일링을 이용하여 CEC에서 유전자 세트의 발현을 측정함으로써 측정되는 것인 방법.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 검출되는 HCC가 초기 단계 HCC인 방법.

청구항 11

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 검출되는 HCC가 후기 단계 HCC인 방법.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 초음파 이미징, 역동적 CT, MRI 이미징, 바늘 생검, 및/또는 생검에 의해 환자에서 HCC의 존재를 확인하거나 확인한 단계; 및
- (b) 환자에서 HCC의 존재가 확인되는 경우, HCC 조직의 외과적 제거, HCC 조직의 고주파 절제, HCC 조직의 색전술; HCC 조직의 색전술, 화학요법, 및/또는 냉동요법에 의해 HCC에 대해 대상체를 치료하거나 치료한 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

- (a) 초기 시점에서 제6항 또는 제7항의 방법을 수행하는 단계, 및 HCC 스코어가 참조 스코어보다 낮은 경우,
- (b) 하나 이상의 후속 시점에서 제6항 또는 제7항의 방법을 수행하는 단계를 포함하는, HCC의 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 단계 (b)가 HCC의 존재가 결정될 때까지 하나 이상의 후속 시점에서 수행되는 것인 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 초기 및 각각의 후속 시점이 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격인 방법.

청구항 16

- (a) 대상체의 혈액 샘플에서 CEC의 농도를 검출하는 단계;
 - (b) 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도를 참조 값과 비교하는 단계;
 - (c) 대상체가 혈액 샘플에서 참조 값보다 낮은 CEC의 농도를 갖는 경우, 대상체를 초기 단계 섬유증으로 진단하는 단계; 및
 - d) 대상체가 혈액 샘플에서 참조 값보다 높은 CEC의 농도를 갖는 경우, 대상체를 후기 단계 섬유증으로 진단하는 단계
- 를 포함하는, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증과 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 대상체가 B형 간염을 갖는 것인 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, CEC의 농도가 면역형광에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, CEC의 농도가 글리피칸-3 (GPC3) 및/또는 시토케라틴 (CK)을 검출함으로써 측정되는 것인 방법.

청구항 20

- (a) 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법을 수행하는 단계; 및 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 낮은 경우,
 - (b) 하나 이상의 후속 시점에서 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법을 수행하는 단계
- 를 포함하는, 진행된 섬유증의 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 대상체가 후기 단계 섬유증으로 진단될 때까지 단계 (b)가 하나 이상의 후속 시점에서 수행되는 것인 방법.

청구항 22

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 초기 및 각각의 후속 시점이 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격인 방법.

청구항 23

- (a) 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법을 수행하고; 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 낮은 경우, 하나 이상의 후속 시점에서 제16항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법을 수행하는 단계; 및
 - (b) 초기 시점에서 제6항 또는 제7항의 방법을 수행하고, HCC 스코어의 발현 수준이 참조 스코어보다 낮은 경우, 하나 이상의 후속 시점에서 제6항 또는 제7항의 방법을 수행하는 단계
- 를 포함하는, 섬유증 또는 HCC의 진행을 방지하기 위해 치료 중인 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 대상체가 후기 단계 섬유증으로 진단될 때까지 단계 (a)가 하나 이상의 후속 시점에서 수행되고/되거나 HCC의 존재가 결정될 때까지 단계 (b)가 하나 이상의 후속 시점에서 수행되는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 제23항의 단계 (a) 또는 단계 (b)를 수행하기 위한 제1 초기 및 각각의 후속 시점이 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이고, 제2 초기 및 각각의 후속 시점이 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 중의 CEC가 미세유체 디바이스를 사용하여 정제되거나 농축되는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 미세유체 디바이스가 iChip 디바이스인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **연방 지원 연구 또는 개발**

[0002] 본 발명은 국립 보건원에서 부여한 과제 번호 DK007191, EB012493, CA172738 및 DK078772 하에 정부 지원으로 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 순환 상피 세포 (CEC)를 분리 및 분석하여 대상체에서 간 질환을 검출 및 특징구명하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 액체 생검은 고체 기관으로부터 유래하여 혈류로 들어간 세포 물질을 샘플링하는 것을 지칭한다. 순환 상피 세포 (CEC)는 국소암 (Stott SL, et al. *Sci Transl Med* 2010;2:25ra23; Lucci A, et al. *Lancet Oncol* 2012;13:688-95) 및 심지어 전암성 췌장 병변 (Rhim AD, et al. *Gastroenterology* 2014;146:647-51; Franses JW, et al. *Oncologist* 2017)의 환경에서 액체 생검에 의해 검출될 수 있으므로, 그들의 존재가 발암에만 국한되지 않음을 시사한다.

[0006] CEC를 분리하는 것은 혈류에서 그들의 희소성 및 세포 포획에 사용되는 항원의 가변적 발현으로 인해 기술적 난제이다. 예컨대, EpCAM-의존적 베리덱스 (Veridex) 플랫폼은 2개의 독립적인 연구에서 단지 35% 및 41%의 간세포 암종 (HCC) CEC 검출률을 산출하였다 (Kelley RK, et al. *BMC Cancer* 2015;15:206; Sun YF, et al. *Hepatology* 2013;57:1458-68). 이러한 한계를 극복하기 위해, 세포 생존력 및 고품질 RNA 내용물을 보존하면서 CEC를 분리하는 iChip로 불리는 항원-에그노스틱 (agnostic) 세포 분류 디바이스가 개발되었다. iChip 디바이스는 이전에 확립된 간-특이적 마커에 기초하여 RNA 시그니처와 조합되어 HCC에서 CEC의 농축 및 검출을 위한 검정을 생성하였다 (Kalinich M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:1123-1128).

[0007] HCC의 비-침습적 진단에 대한 다른 접근법은 높은 검출률을 달성하는데 성공하지 못하였다. 예컨대, 최근 연구에 따르면 무세포 DNA와 단백질 혈액-기반 바이오마커를 조합하여 HCC를 검출하면 HCC 예측 정확도가 44%에 불과한 것으로 나타났으며, 이는 일반적인 반복 돌연변이 및 HCC에 고유한 단백질 마커가 결여되기 때문일 수 있다 (문헌 (Cohen JD, et al. *Science* 2018) 참조).

[0008] 비-침습적 방법을 이용하여 특정 간 질환을 진단하는데 있어 또 다른 난제는 CEC가 2개의 상이한 질환에 존재할 수 있으므로 CEC의 정량 분석이 2개의 질환을 구별하는데 필요한 정보를 제공할 수 없다는 것이다.

[0009] 현재까지, 만성 간 질환 (CLD)을 갖는 대상체에서 HCC와 같은 간 질환을 정확하게 검출하거나 상이한 간 질환 또는 간 질환의 상이한 단계를 구분하는데 이용 가능한 비-침습적 혈액 기반 방법은 없다.

[0010] 따라서, 높은 정확도를 갖는 CLD 환자에서 HCC와 같은 간 질환의 존재를 검출하고 간 질환의 단계를 결정하기 위한 비-침습적 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 적어도 부분적으로 간 CEC (hCEC)가 발암에만 국한되는 것이 아니라 만성 간 질환 (CLD)과 같은 비-암 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 존재할 수 있다는 발견에 기초한다. 또한, 본 발명은 적어도 부분적으로 CLD를 갖는 대상체에서 hCEC를 정량적으로 또는 정성적으로 분석하여 간세포 암종 (HCC)과 같은 암의 존재를 정확하게 검출하고/하거나 간 섬유증과 같은 간 질환 또는 병태의 상이한 단계 (예컨대, 초기 또는 후기 단계)를

정확히 특징규명할 수 있다는 발견에 기초한다.

- [0012] 한 측면에서, 본 발명은 대상체의 순환 상피 세포 (CEC)에서 간세포 암종 (HCC) 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법에 관한 것으로서, 여기서 HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32 중 하나 이상을 포함한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32 중 하나 이상으로 이루어진다.
- [0014] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32로 이루어진다.
- [0015] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 또한 ACTG2, ADM2, AFP, AGR2, ALDH3A1, ALPK3, AMIGO3, ANKRD65, ANLN, AP1M2, ARHGAP11A, ARHGAP39, ASF1B, ASPHD1, AURKA, AXIN2, BAIAP2L2, BEX2, C15orf48, C1orf106, C1QTNF3, C6orf223, CA12, CA9, CAMK2N2, CAP2, CBX2, CCDC170, CCDC28B, CCDC64, CCNE2, CCNF, CD109, CD34, CDC25A, CDC7, CDCA5, CDCA8, CDH13, CDK1, CDKN2A, CDKN2C, CDT1, CELF6, CENPF, CENPH, CENPL, CENPU, CENPW, CKB, CNM1, COL15A1, COL4A5, COL7A1, COL9A2, CRIP3, CSPG4, CTNND2, CXorf36, CYP17A1, DLK1, DMKN, DSCC1, DTL, DUOX2, ECT2, EEF1A2, EFNA3, EPHB2, EPPK1, ETV4, FABP4, FAM111B, FAM3B, FAM83D, FANCD2, FANCI, FBXL18, FERMT1, FGF19, FLNC, FLVCR1, FOXD2-AS1, FOXM1, FXYD2, GABRE, GAL3ST1, GCNT3, GINS1, GJC1, GMNN, GNAZ, GOLGA2P7, GPC3, GPR64, GPSM1, HRCT1, IGF2BP2, IGSF1, IGSF3, IQGAP3, ITGA2, ITPKA, KIAA0101, KIF11, KIFC1, KIFC2, KNTC1, KRT23, LAMA3, LEF1, LGR5, LINC00152, LINGO1, LPL, LRRC1, LYPD1, MAD2L1, MAGED4, MAGED4B, MAPK12, MAPK8IP2, MAPT, MCM2, MDGA1, MDK, MFAP2, MISP, MKI67, MMP11, MNS1, MPZ, MSC, MSH5, MTMR11, MUC13, MUC5B, MYH4, NAALADL1, NAV3, NCAPG, NDUFA4L2, NEB, NKD1, NMB, NOTCH3, NOTUM, NPM2, NQO1, NRCAM, NT5DC2, NTS, OBSCN, OLFML2A, OLFML2B, PAQR4, PEG10, PI3, PLCE1, PLCH2, PLK1, PLXDC1, PODXL2, POLE2, PPAP2C, PRC1, PTGES, PTGFR, PTHLH, PTK7, PTP4A3, PTTG1, PYCR1, RACGAP1, RBM24, RHBG, RNF157, ROBO1, RP4-800G7.2, RPS6KL1, RRM2, S100A1, SCGN, 5-Sep, SERPINA12, SEZ6L2, SFN, SGOL2, SLC22A11, SLC51B, SLC6A2, SNCG, SOAT2, SP5, SPARCL1, SPINK1, STIL, STK39, SULT1C2, TCF19, TDGF1, THY1, TK1, TMC5, TMEM132A, TMEM150B, TNFRSF19, TNFRSF25, TONSL, TPX2, TRIM16, TRIM16L, TRIM31, TRIM45, TTC39A, UBD, UBE2C, UBE2T, UGT2B11, USH1C, VSIG10L, WDR62, WDR76, 및 ZWINT로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 3개 또는 그 초과수의 추가의 유전자를 포함한다.
- [0016] 한 측면에서, 본 발명은 만성 간 질환 (CLD)을 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법에 관한 것으로서, 방법은 (a) 대상체의 CEC에서 본원에 기재된 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 대상체의 CEC에서의 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교하여 HCC의 존재를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 HCC 스코어를 계산하는데 사용되고, 계산된 HCC 스코어는 참조 스코어와 비교되고, 여기서 HCC의 존재는 참조 스코어보다 높은 HCC 스코어의 존재에 기초하여 결정된다.
- [0018] 일부 실시양태에서, HCC 스코어는 랜덤 포레스트 분석을 이용하여 계산된다.
- [0019] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 다변량 로지스틱 회귀 모델링 접근법을 이용하여 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교된다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 순환 상피 세포 (CEC)에서 HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 (a) 대상체로부터 혈액을 포함하는 샘플을 획득하고; (b) 크기-기반 배제를 통해 샘플로부터 적혈구, 혈소판 및 혈장을 제거하고; (c) 자기영동에 의해 샘플로부터 백혈구 (WBC)를 제거하고; (d) RNA-시퀀싱, qRT-PCT, RNA 제자리 하이브리드화, 단백질 마이크로어레이, 또는 질량 분광측정 및 단백질 프로파일링을 이용하여 CEC에서 유전자 세트의 발현을 측정함으로써 측정된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 검출되는 HCC는 초기 단계 HCC 또는 후기 단계 HCC이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법은 또한 (a) 초음파 이미징, 역동적 CT, MRI 이미징, 바늘 생검, 및/또는 생검에 의해 환자에서 HCC의 존재를 확인하거나 확인한 단계; 및 (b) 환자에서

HCC의 존재가 확인되는 경우, HCC 조직의 외과적 제거, HCC 조직의 고주파 절제 (ablation), HCC 조직의 색전술; HCC 조직의 색전술, 화학요법, 및/또는 냉동요법에 의해 HCC에 대해 대상체를 치료하거나 치료한 단계를 포함한다.

- [0023] 한 측면에서, 본 발명은 HCC 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 방법은 (a) 초기 시점에서 본원에 기재된 바와 같이 CLD를 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 단계, 및 HCC 스코어가 참조 스코어보다 낮은 경우, (b) 하나 이상의 후속 시점에서 검출 단계를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출 단계는 HCC의 존재가 결정될 때까지 하나 이상의 후속 시점에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 초기 및 각각의 후속 시점은 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이다.
- [0024] 한 측면에서, 본 발명은 CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증의 존재와 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법에 관한 것으로서, 방법은 (a) 대상체의 혈액 샘플에서 CEC의 농도를 검출하는 단계; (b) 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도를 참조 값과 비교하는 단계; (c) 혈액 샘플에서 참조 값보다 낮은 CEC의 농도를 갖는 대상체를 초기 단계 섬유증으로 진단하는 단계; 및 d) 혈액 샘플에서 참조 값보다 높은 CEC의 농도를 갖는 대상체를 후기 단계 섬유증으로 진단하는 단계를 포함한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 대상체는 B형 간염을 갖는다. 일부 실시양태에서, CEC의 농도는 면역형광에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, CEC의 농도는 글리피칸-3 (GPC3) 및/또는 시토크라틴 (CK)을 검출함으로써 측정된다.
- [0026] 한 측면에서, 본 발명은 진행된 섬유증의 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 방법은 (a) 본원에 기재된, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법을 수행하는 단계; 및 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 낮은 경우, (b) 하나 이상의 후속 시점에서 CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법은 대상체가 후기 섬유증으로 진단될 때까지 하나 이상의 후속 시점에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 초기 및 각각의 후속 시점은 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이다.
- [0028] 한 측면에서, 본 발명은 섬유증 또는 HCC의 진행을 방지하기 위해 치료 중인 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 방법은 (a) 본원에 기재된, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법을 수행하고; 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 낮은 경우, 하나 이상의 후속 시점에서 CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법을 수행하는 단계; 및 (b) 본원에 기재된, CLD를 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법을 수행하고, HCC 스코어의 발현 수준이 참조 스코어보다 낮은 경우, 하나 이상의 후속 시점에서 검출 방법을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법은 대상체가 후기 단계 섬유증으로 진단될 때까지 하나 이상의 후속 시점에서 수행되고/되거나 CLD를 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법은 HCC의 존재가 결정될 때까지 하나 이상의 후속 시점에서 수행된다. 일부 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법 또는 CLD를 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법을 수행하기 위한 제1 초기 및 각각의 후속 시점은 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이며, 제2 초기 및 각각의 후속 시점은 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 대상체의 혈액 중의 CEC는 미세유체 디바이스를 사용하여 정제되거나 농축된다. 일부 실시양태에서, 미세유체 디바이스는 iChip 디바이스이다.
- [0031] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 재료가 본원에 기재되어 있다; 관련 기술분야에 공지된 다른 적절한 방법 및 재료가 또한 사용될 수 있다. 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 언급된 모든 공개문, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 엔트리 및 기타 참조문은 그 전체가 참조로 포함된다. 또한, 미국 특허 출원 US2016/0312298 A1은 그 전체가 참조로 본원에 구체적으로 포함되며, 일부 실시양태에서 본원에 기재된 방법은 그 출원에 기재된 방법과 함께 이용될 수 있다. 상충되는 경우 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다.

[0032] 본 발명의 다른 특색 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 도면 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)을 갖는 이 특허 또는 특허 출원 공개문의 사본은 요청 및 필요한 요금 납부 시 오피스에 의해 제공될 것이다.

도 1은 조혈 세포를 고갈시키는데 사용되는 iChip 항원-에그노스틱 세포 분류 디바이스 (iChip 디바이스)의 도식도이다. 샘플을 iChip 디바이스로 처리하여 샘플을 CEC에 대해 농축시켰으며, 이는 면역형광 또는 RNA-시퀀싱으로 분석될 수 있다.

도 2a는 CLD를 갖는 대상체의 말초 혈액으로부터의 면역형광 표지된 hCEC의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. HCC 또는 CLD를 갖는 환자로부터의 혈액 샘플을 iChip 디바이스를 사용하여 처리하여 CEC를 단리하고 DAPI, CD45, 글리피칸-3 (GPC3) 및 넓은-스펙트럼 시토케라틴 (CK-WS)에 대해 염색하였다. 비교를 위해 백혈구 (WBC)가 표시된다.

도 2b는 건강한 공여자 (HD) 또는 CLD, HCC를 갖는 환자, 또는 악성 질환의 증거가 없는 HCC 치료를 받았던 환자 (HCC NED)로부터의 iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플에서 면역형광 표지된 hCEC의 검출을 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 (Mann-Whitney) 시험으로 계산되었다.

도 2c는 초기 단계 간 섬유증을 갖는 CLD 환자 및 진행된 섬유증을 갖는 환자에서 hCEC의 검출을 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 3a는 대조군 혈액, 1-50개의 HepG2 세포로 스파이킹된 대조군 혈액에서 hCEC의 RNA-seq, 및 HepG2 단일 세포 RNA-seq로부터 수득된 HepG2 유전자 발현 시그니처의 히트맵이다.

도 3b는 CLD 환자, HCC 환자로부터의 hCEC 및 유동-분류된 WBC (B, B 세포; C, 세포독성 T 세포; H, 헬퍼 T 세포; M, 단핵구; N, NK 세포; G, 과립구)의 RNA-seq로부터 수득된 간-특이적 유전자 시그니처의 히트맵이다. 히트맵 단위는 \log_2 (백만개당 관독 +1)로 표시된다.

도 3c는 본원에 기재된 랜덤 포레스트 알고리즘의 도식도이다.

도 3d는 CLD, 초기 단계 HCC 및 후기 단계 HCC에서 HCC 스코어 (랜덤 포레스트 분류자로부터의 득표 비율)를 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 4a는 건강한 공여자 (HD) 또는 CLD를 갖는 환자 (CLD), HCC를 갖는 환자, 또는 이전에 HCC를 가졌으나 HCC 치료 후 악성 질환의 증거를 나타내지 않는 환자 (HCC NED)로부터의 iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플에서 글리피칸-3 양성 (GPC3) CEC의 검출을 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 4b는 건강한 공여자 (HD) 또는 CLD를 갖는 환자 (CLD), HCC를 갖는 환자 (HCC), 또는 이전에 HCC를 가졌으나 HCC 치료 후 악성 질환의 증거를 나타내지 않는 환자 (HCC NED)로부터의 iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플에서 넓은 스펙트럼 시토케라틴을 발현하는 CEC (CK+ 세포)의 검출을 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 4c는 섬유증 단계 (초기 단계는 F1 또는 F2로 정의되고 진행된 섬유증은 F3 또는 F4로 정의됨)에 의해 계층화된 HBV CLD 환자 (HCC 없음)에서 hCEC (CK+ 또는 GPC3+인 세포)의 검출을 나타내는 그래프이다. P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 4d는 간 질환의 병인에 의해 계층화된 CLD 환자에서 CEC 농도를 나타내는 그래프이다: 비-알콜성 지방간염 (NASH); B형 간염 바이러스 (HBV); C형 간염 바이러스 (HCV); 자가면역 간염 (AIH); 원발성 경화성 담관염 (PSC). P-값은 만-휘트니 시험으로 계산되었다.

도 5a는 CLD 환자, 치료를 받았지만 채혈 시점에 여전히 활성 질환을 가졌던 HCC 환자 (HCC On Tx), 및 치료 경험이 없는 활성 HCC를 갖는 환자 (HCC No Tx)에서 CEC의 HCC 스코어 (랜덤 포레스트 분류자로부터의 득표 비율)를 나타내는 그래프이다. 표시된 p-값은 만-휘트니 시험에 의해 계산되었다.

도 5b는 다변량 로지스틱 회귀 모델링에 의해 생성된 HCC 분류자에 대한 수신자 조작 특성 (ROC) 곡선을 나타내는 그래프이다.

도 5c는 HCC 랜덤 포레스트 분류자에 대한 ROC 곡선을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명은 적어도 부분적으로 hCEC가 발암에만 국한되는 것이 아니라 만성 간 질환 (CLD)과 같은 비-암 질환 또는 병태를 갖는 대상체에 존재할 수 있다는 발견에 기초한다. 또한, 본 발명은 적어도 부분적으로 CLD를 갖는 대상체에서 hCEC를 정량적으로 또는 정성적으로 분석하여 간세포 암종 (HCC)과 같은 암의 존재를 정확하게 검출하고/하거나 간 섬유증과 같은 간 질환 또는 간 병태의 단계 (예컨대, 초기 또는 후기 단계)를 정확히 특징규명할 수 있다는 발견에 기초한다.
- [0035] 본원에서 입증되는 바와 같이, 혈류에서 순환하는 병든 간으로부터의 세포 (즉, hCEC)는 HCC 및 CLD 진단에 사용하기 위해 정량적 (예컨대, 면역형광법에 의해) 및 정성적 (예컨대, HCC 분류자 유전자의 유전자 발현 프로파일 또는 발현 수준) 둘 다로 검출된다. 이 액체 생검의 중요한 적용은 HCC, CLD 병인 결정, 간 섬유증 병기분류, HCC 감시 또는 모니터링과 같은 간 질환 또는 병태의 검출 또는 진단을 포함한다. 본 발명은 CLD와 같은 간 병태를 갖는 환자의 진단 및 모니터링 모두에 적용될 수 있다.
- [0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, 질환 또는 병태와 관련하여 어구 "정확하게 진단한다" 및 "정확하게 검출한다"는 높은 민감도 (즉, 참 양성 비율 또는 질환 또는 병태가 존재할 때 질환 또는 병태를 검출) 또는 높은 특이도 (즉, 참 음성 비율 또는 질환 또는 병태가 존재하지 않을 때 질환 또는 병태를 검출하지 않음)로 질환 또는 병태의 존재를 예측하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 진단한다" 및 "정확하게 검출한다"는 또한 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 양성 비율로 질환 또는 병태의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 진단한다" 및 "정확하게 검출한다"는 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 음성 비율로 질환 또는 병태의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 질환 또는 병태와 관련하여 어구 "정확하게 구별한다"는, 제2 질환 또는 병태가 또한 존재하거나 부재하는 것과 관계 없이, 높은 민감도 (즉, 제1 질환 또는 병태가 존재할 때 제1 질환 또는 병태를 검출, 즉, 참 양성 비율) 또는 높은 특이도 (즉, 제1 질환 또는 병태가 존재하지 않을 때 제1 질환 또는 병태를 검출하지 않음, 즉, 참 음성 비율)로 제1 질환 또는 제1 병태의 존재를 검출하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 구별한다"는 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 양성 비율로 질환 또는 병태의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 구별한다"는 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 음성 비율로 질환 또는 병태의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, 질환 또는 병태의 상이한 단계와 관련하여 어구 "정확하게 구별한다"는 높은 민감도 (즉, 질환 또는 병태가 해당 단계에서 존재할 때 질환 또는 병태의 단계를 검출, 즉, 참 양성 비율) 또는 높은 특이도 (즉, 질환 또는 병태가 해당 단계에서 존재하지 않을 때 질환 또는 병태의 단계를 검출하지 않음, 즉, 참 음성 비율)로 질환 (예컨대, 간에서 진행된 섬유증)의 특정 단계의 존재를 검출하여 병태 또는 질환의 특정 단계가 예측될 수 있는 것을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 구별한다"는 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 양성 비율로 질환 또는 병태의 단계의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어구 "정확하게 진단한다"는 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 및 적어도 약 99.9%의 참 음성 비율로 질환 또는 병태의 존재를 검출할 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "순환 상피 세포 (CEC)"는 조직 (예컨대, 병든 조직, 종양 조직 또는 비-종양 조직)으로부터 떨어져 나와 혈액에 존재하는, 즉 순환하는 상피 기원의 세포를 지칭할 수 있다. 혈액의 다른 성분으로부터 CEC를 확인 및/또는 단리하는데 사용될 수 있는 세포 마커 (예컨대, 마커 유전자)는 본원에서

하기에 기재된다. 일부 실시양태에서, 간 질환 (예컨대, HCC 및/또는 CLD)을 갖는 대상체로부터의 CEC는, 예컨대 간세포에서 발견되는 유전자 (예컨대, GPC3 및 CK)로 CEC를 면역형광 염색함으로써 결정되는 바와 같이, 주로 간 CEC (hCEC)이다.

- [0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "만성 간 질환 (CLD)"은 간 실질의 점진적 파괴 및 재생을 수반하는 간의 질환 과정을 지칭한다. 일부 실시양태에서, CLD는 섬유증 경변증을 이룰 수 있다. 일부 다른 실시양태에서, CLD는 문맥 고혈압 (예컨대, 복수, 하이퍼플레니즘 (hyperplenism) 및 하부 식도 정맥류 및 직장 정맥류), 간폐 증후군, 간신 증후군, 뇌병증 또는 HCC와 같은 합병증을 초래할 수 있다. CLD는 또한 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 5년 초과에 걸쳐 지속되는 간 질환을 지칭할 수 있다. CLD는 B형 간염, C형 간염, 시토크롬 P450 1B1 결핍, 알코올성 간 질환, 및/또는 메토트렉세이트, 아미오다론, 니트로푸란토인 또는 아세타미노펜으로 인한 약물 유발된 간 질환으로 인해 유발될 수 있다. 다른 실시양태에서, CLD는 비-알코올성 지방간 질환, 혈색소 침착증, 윌슨 질환, 또는 원발성 담즙성 담관염 또는 원발성 경화성 담관염과 같은자가면역 반응에 의해 유발될 수 있다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "모니터링" 또는 "감시"는 질환 또는 병태의 존재에 대해 대상체 또는 환자 (예컨대, 병태가 발병할 위험이 있는 대상체)를 주기적으로 평가하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 주기적 평가는 약 매일, 약 격일, 약 주 1회, 약 격주 1회, 약 1개월마다, 약 2개월마다, 약 3개월마다, 약 4개월마다, 약 5개월마다, 약 6개월마다, 약 7개월마다, 약 8개월마다, 약 9개월마다, 약 매년, 약 18개월마다, 약 2년마다, 약 3년마다, 약 4년마다, 약 5년마다, 약 6년마다, 약 7년마다, 약 8년마다, 약 9년마다 또는 약 10년마다 발생할 수 있다. 질환 또는 병태의 존재에 대한 대상체 또는 환자의 이러한 반복적 평가는 (1) 질환 또는 병태가 대상체 또는 환자에서 검출되거나; (2) 환자가 더 이상 질환 또는 병태를 발병시킬 위험이 없거나; (3) 모니터링을 받는 대상체 또는 모니터링을 관리하는 사람의 재량에 따라; 또는 (4) 다른 이유로 인해 반복적 평가를 중단해야 할 때까지 계속할 수 있다. 대상체가 질환 또는 병태의 존재에 대해 평가되는 간격은 모니터링 과정에서 조정될 수 있다.
- [0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양상불 학습 방법"은 훈련된 후 예측을 위해 사용될 수 있는 랜덤 포레스트와 같은 통제된 학습 알고리즘을 지칭한다.
- [0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "간세포 암종 (HCC)"은 CLD를 갖는 대상체에서 만연한 원발성 간암 유형을 지칭한다. HCC는 HBV 감염에 대해 음성 마커를 갖고 간세포 계통에 통합된 HBV DNA를 갖는 환자를 포함하여 다양한 병인의 기저 경변성 간 질환을 갖는 환자에서 발병할 수 있다. HCC의 역학, 병인 및 발암은 본원에 참조로 포함된 문헌 (Ghoury YA, et al., *J Carcinog* 2017; 16:1)에 기재되어 있다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "초기 단계 HCC"는 밀란 (Milan) 기준 내에 있는 HCC를 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "후기 단계 HCC"는 밀란 기준을 벗어난 HCC를 지칭할 수 있다. 밀란 기준은 HCC를 갖는 대상체가 하기 기준을 충족하도록 요구한다: 5 cm보다 작은 하나의 병변 또는 각각 3 cm보다 작은 최대 3개의 병변인 HCC; 간의 발현 없음; 및 심한 혈관 침식의 증거가 없음. 다시 말해서, "초기 단계 HCC"는 모든 밀란 기준을 충족하고 "후기 단계 HCC"는 모든 밀란 기준을 충족하지 않는다.
- [0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "초기 단계 간 섬유증" 및 "후기 단계 간 섬유증"은 METAVIR 분류에 의해 정의되는 바와 같이 각각 F1 또는 F2 단계, 및 F3 또는 F4 단계를 지칭한다.
- [0046] 본원에 기재된 방법은 랜덤 포레스트 분류자와 같은 양상불 학습 방법에 기초한 분류자를 사용하여 환자의 CEC에서 유전자 세트의 발현을 검출하고 분석함으로써 비-암 질환 상태, 예컨대 CLD를 갖는 환자에서 암, 예컨대 HCC의 존재를 정확하게 진단하거나 예측하는데 이용될 수 있다.
- [0047] 일부 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체 (예컨대, B형 간염을 갖는 대상체 또는 B형 간염 바이러스로 감염된 대상체)로부터의 hCEC를 (예컨대, 정성적으로) 분석하여 HCC를 갖는 대상체와 갖지 않는 대상체를 정확하게 구별할 수 있다. 다른 실시양태에서, CLD를 갖는 대상체로부터의 hCEC를 정량적으로 측정하여 초기 단계 간 섬유증을 갖는 대상체와 후기 단계 간 섬유증을 갖는 대상체를 정확하게 구별할 수 있다.
- [0048] 본원에서 입증되는 바와 같이, 암, 예컨대 HCC의 존재 및 비-암 질환 또는 병태, 예컨대 CLD의 존재는 CEC의 증가된 존재와 관련된다. CEC의 증가된 존재는 (예컨대, 치료적 치료를 받았고 질환에 대한 임상적 증거를 갖지 않는 HCC 환자에서) 치료되어 질환의 임상적 증거가 없는 암 (예컨대, HCC)의 이전 존재와 관련된다.
- [0049] 따라서, 방법은 암, 예컨대 HCC의 존재를 검출하기 위해 다양한 통계적 및 계산적 예측 방법 (예컨대, 랜덤 포레스트 분류자와 같은 양상불 학습 방법 또는 다변량 로지스틱 회귀와 같은 통계적 방법)을 이용하는 유전자 세

트 (예컨대, HCC 분류자 유전자)의 검출 및 분석을 포함할 수 있다.

- [0050] 일부 실시양태에서, 방법은 초기 단계의 암의 존재를 검출할 수 있으며, 이는 그렇지 않으면 초음파 이미징, 역동적 CT, MRI 이미징, 바늘 생검, 또는 생검과 같은 현재 공지된 방법을 이용하여 검출하기 어려울 수 있다.
- [0051] 일부 실시양태에서, 미세유체 (예컨대, "랩-온-어-칩 (lab-on-a-chip)" 또는 iChip 디바이스)가 CEC를 분리, 정제, 농축 또는 제조하기 위해 본 방법에서 사용될 수 있다. 이러한 디바이스는 미세유체 유동 세포측정, 연속 크기-기반 분리, 크로마토그래피 또는 자기영동 분리에 성공적으로 사용되었다. 예컨대, 미국 특허 출원 US2016/0312298 A1 (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 iChip 디바이스 및 이러한 디바이스의 다양한 다른 실시양태가 세포 혼합물로부터 hCEC를 분리하거나 hCEC의 농축 집단을 제조하는데 사용될 수 있다. 특히, 이러한 디바이스는 전혈과 같은 복잡한 혼합물로부터 hCEC를 단리하는데 사용될 수 있다.
- [0052] 일부 실시양태에서, 디바이스는 초기 샘플 혼합물과 비교하여 원하는 세포의 적어도 75%, 예컨대 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 보유하는 동시에 원하는 세포 집단을 하나 이상의 원하지 않는 세포 유형에 비해 적어도 100배, 예컨대 1000, 10,000, 100,000, 또는 심지어 1,000,000배 농축시킨다. 한 예에서, 검출 모듈은 분리 또는 농축 디바이스와 유체 연통할 수 있다. 검출 모듈은 본원에 개시된 임의의 검출 방법 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법을 이용하여 작동할 수 있다. 예컨대, 검출 모듈은 현미경, 세포 계수기, 자석, 바이오캐버티 (biocavity) 레이저 (예컨대, 문헌 (Gourley et al., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36: R228-R239 (2003)) 참조), 질량 분광측정기, PCR 디바이스, RT-PCR 디바이스, 마이크로어레이, RNA 제자리 하이브리드화를 수행하기 위한 디바이스, 또는 초분광 이미징 시스템 (예컨대, 문헌 (Vo-Dinh et al., *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 23:40-49 (2004)) 참조)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 컴퓨터 단말기가 검출 모듈에 연결될 수 있다. 예컨대, 검출 모듈은 관심 세포, 단백질 또는 핵산, 예컨대 HCC 분류자 유전자의 전사체 또는 코딩된 단백질에 선택적으로 결합하는 표지를 검출할 수 있다.
- [0053] 일부 실시양태에서, 미세유체 시스템은 (i) CEC (예컨대, hCEC)의 분리 또는 농축을 위한 디바이스; (ii) 농축된 CEC의 용해를 위한 디바이스; 및 (iii) 유전자 전사체 (예컨대, HCC 분류자 유전자의 전사체) 또는 코딩된 단백질의 검출을 위한 디바이스를 포함한다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 미세유체 디바이스를 사용하여 제조된 CEC 집단은, 예컨대 상기 및 문헌 (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd edition (Jan. 15, 2001)); and *Short Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (*Current Protocols*; 52 edition (Nov. 5, 2002)))에 기재되는 바와 같이, 공지된 분자 생물학적 기술을 이용하여 유전자 전사체 또는 단백질의 발현을 분석하는데 사용된다.
- [0055] 일반적으로, 농축된 CEC (예컨대, CTC) 집단에서 암 진단에 유용한 분류자 유전자의 발현 또는 코딩된 단백질을 검출 및/또는 정량화하기 위한 디바이스가 본원에 기재되어 있으며, 암, 예컨대 상피 기원의 종양의 조기 검출, 예컨대 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 전립선암, 신장암, 난소암 또는 결장암의 조기 검출에 사용될 수 있다.
- [0056] 본원에서 기재되는 바와 같이, 어구 "차등 발현 분석"은 샘플 (예컨대, 세포, 예컨대, CEC, 예컨대, hCEC)에서 개별 유전자 (예컨대, 개별 HCC 분류자 유전자)의 발현 수준 및/또는 다중 유전자 (예컨대, 다중 HCC 분류자 유전자)의 발현 패턴에 대한 계산적 또는 통계적 분석을 수행하는 것을 지칭할 수 있다. 용어 "차등 발현"은 과발현 (참조 값보다 높은 수준으로 유전자 발현) 또는 저발현 (참조 값보다 낮은 수준으로 유전자 발현)을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 차등 발현 분석은 샘플의 발현 수준 또는 패턴을 참조 값 (예컨대, 병들지 않은 대응 세포 또는 조직으로부터의 샘플에서 하나 이상의 유전자의 발현 수준 또는 패턴)과 비교할 수 있다. 다른 실시양태에서, 발현 수준 또는 패턴은 하나 이상의 대조군 유전자의 발현 수준에 대해 정규화될 수 있거나, 비-상대적 방식으로 정량화될 수 있다 (예컨대, 부피당 전사체 카피 또는 절대 카피 수). 유전자 발현 수준은 RNA-시퀀싱, qRT-PCT, RNA 제자리 하이브리드화, 단백질 마이크로어레이, 및/또는 질량 분광측정 및 단백질 프로파일링과 같은 임의의 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 다른 공지된 생화학적 또는 분자 생물학적 기술을 이용하여 유전자의 발현을 검출할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA-시퀀싱 및 qRT-PCT는 유전자 발현 수준을 측정하기 위한 바람직한 방법이다.
- [0057] 차등 발현 분석은 공지된 통계적 또는 계산적 방법 중 어느 하나, 예컨대 랜덤 포레스트 분류자와 같은 앙상블 학습 방법 또는 다변량 로지스틱 회귀와 같은 통계적 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0058] 한 측면에서, 본 발명은 대상체의 순환 상피 세포 (CEC)에서 간세포 암종 (HCC) 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 대상체의 CEC에 의한 HCC 분류자 유전자의 과발현은 대상체에서 HCC

의 존재를 고도로 예측하는 것으로 결정되었다 (예컨대, 실시예 1-4 참조). 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1, 및 FBXO32 중 1, 2, 3개, 또는 그 초과 (예컨대 전부)를 포함한다. 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 TESC, OSBP2, SLC6A8, SEPT5, F2RL3, E2F1, EZH2, CDC20, CCNA2, CCNB1, PLXNB3, CDC6, MYBL2, APOBEC3B, SPP1, AKR1B10, TOP2A, ASPM, SLC6A9, RECQL4, NUSAP1, PLVAP, FMO1, PDZK1IP1을 모두 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, HCC 분류자 유전자는 또한 HCC에서 과발현되는 하나 이상의 다른 유전자, 예컨대 ACTG2, ADM2, AFP, AGR2, ALDH3A1, ALPK3, AMIGO3, ANKRD65, ANLN, AP1M2, ARHGAP11A, ARHGAP39, ASF1B, ASPHD1, AURKA, AXIN2, BAIAP2L2, BEX2, C15orf48, C1orf106, C1QTNF3, C6orf223, CA12, CA9, CAMK2N2, CAP2, CBX2, CCDC170, CCDC28B, CCDC64, CCNE2, CCNF, CD109, CD34, CDC25A, CDC7, CDCA5, CDCA8, CDH13, CDK1, CDKN2A, CDKN2C, CDT1, CELF6, CENPF, CENPH, CENPL, CENPU, CENPW, CKB, CNM1, COL15A1, COL4A5, COL7A1, COL9A2, CRIP3, CSPG4, CTNND2, CXorf36, CYP17A1, DLK1, DMKN, DSCC1, DTL, DUOX2, ECT2, EEF1A2, EFNA3, EPHB2, EPPK1, ETV4, FABP4, FAM111B, FAM3B, FAM83D, FANCD2, FANCI, FBXL18, FERMT1, FGF19, FLNC, FLVCR1, FOXD2-AS1, FOXM1, FXD2, GABRE, GAL3ST1, GCNT3, GINS1, GJC1, GMNN, GNAZ, GOLGA2P7, GPC3, GPR64, GPSM1, HRCT1, IGF2BP2, IGSF1, IGSF3, IQGAP3, ITGA2, ITPKA, KIAA0101, KIF11, KIFC1, KIFC2, KNTC1, KRT23, LAMA3, LEF1, LGR5, LINC00152, LINGO1, LPL, LRRC1, LYPD1, MAD2L1, MAGED4, MAGED4B, MAPK12, MAPK8IP2, MAPT, MCM2, MDGA1, MDK, MFAP2, MISPL, MKI67, MMP11, MNS1, MPZ, MSC, MSH5, MTMR11, MUC13, MUC5B, MYH4, NAALADL1, NAV3, NCAPG, NDUFA4L2, NEB, NKD1, NMB, NOTCH3, NOTUM, NPM2, NQO1, NRCAM, NT5DC2, NTS, OBSCN, OLFML2A, OLFML2B, PAQR4, PEG10, PI3, PLCE1, PLCH2, PLK1, PLXDC1, PODXL2, POLE2, PPAP2C, PRC1, PTGES, PTGFR, PTHLH, PTK7, PTP4A3, PTTG1, PYCR1, RACGAP1, RBM24, RHBG, RNF157, ROBO1, RP4-800G7.2, RPS6KL1, RRM2, S100A1, SCGN, 5-Sep, SERPINA12, SEZ6L2, SFN, SGOL2, SLC22A11, SLC51B, SLC6A2, SNCG, SOAT2, SP5, SPARCL1, SPINK1, STIL, STK39, SULT1C2, TCF19, TDGF1, THY1, TK1, TMC5, TMEM132A, TMEM150B, TNFRSF19, TNFRSF25, TONSL, TPX2, TRIM16, TRIM16L, TRIM31, TRIM45, TTC39A, UBD, UBE2C, UBE2T, UGT2B11, USH1C, VSIG10L, WDR62, WDR76, 및 ZWINT 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0059] 또 다른 측면에서, 본 발명은 만성 간 질환 (CLD)을 갖는 대상체에서 HCC의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 방법은 (a) 대상체의 CEC에서 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 대상체의 CEC에서의 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교하여 HCC의 존재를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HCC 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 (a) 대상체의 CEC에서 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 측정하고, 대상체의 CEC에서의 HCC 분류자 유전자의 발현 수준을 초기 시점에서 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교하는 단계; 및 HCC 분류자 유전자의 발현 수준이 참조 수준보다 낮은 경우, (b) 후속 시점에서, 및 임의적으로 추가의 시점에서, 예컨대 HCC 분류자 유전자의 발현 수준이 참조 수준보다 높을 때까지 단계를 다시 수행하는 단계를 포함한다. 이 평가는 먼저 HCC 스코어 (예컨대, RF 분류자로부터의 득표 비율) 또는 대상체의 CEC에서 HCC 분류자 유전자의 차등 발현 정도를 나타내는 다른 매트릭스를 참조 스코어 또는 다른 참조 매트릭스 값과 비교하여 계산함으로써 형성될 수 있다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CLD를 갖는 대상체에서 초기 단계 간 섬유증 및 후기 단계 간 섬유증의 존재를 구별하는 방법을 제공한다. 방법은 (a) 대상체의 혈액 샘플에서 CEC의 농도를 검출하는 단계; (b) 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도를 참조 값과 비교하는 단계; (c) 대상체의 혈중 CEC 농도가 참조 값보다 낮은 경우, 대상체를 초기 단계 섬유증으로 진단하는 단계; 및 (d) 대상체의 혈중 CEC 농도가 참조 값보다 높은 경우, 대상체를 후기 단계 섬유증으로 진단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진행된 섬유증의 발병에 대해 CLD를 갖는 대상체를 모니터링하는 방법을 제공한다. 방법은 (a) 대상체의 혈액 샘플에서 CEC의 농도를 검출하고 혈액 CEC 농도를 참조 값과 비교하는 단계; 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 낮은 경우, (b) 하나 이상의 후속 시점에서, 예컨대 대상체의 혈액 샘플에서의 CEC의 농도가 참조 값보다 높을 때까지 동일한 검출 및 비교 단계를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0063] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 바람직하게는 랜덤 포레스트 분석을 이용하여 HCC 스코어를 계산하는데 사용되며, 방법은 HCC 스코어를 참조 스코어와 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 HCC의 존재는 참조 스코어보다 높은 HCC 스코어의 존재에 기초하여 결정된다.

- [0064] 일부 실시양태에서, HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 다변량 로지스틱 회귀 모델링 접근법을 이용하여 HCC 분류자 유전자의 참조 발현 수준과 비교된다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 순환 상피 세포 (CEC)에서 HCC 분류자 유전자의 발현 수준은 (a) 대상체로부터 혈액을 포함하는 샘플을 수득하고; (b) 크기-기반 배제를 통해 샘플로부터 적혈구, 혈소판 및 혈장을 제거하고; (c) 자기 영동에 의해 샘플로부터 백혈구 (WBC)를 제거하고; (d) RNA-시퀀싱, qRT-PCT, RNA 제자리 하이브리드화, 단백질 마이크로어레이, 또는 질량 분광측정 및 단백질 프로파일링을 이용하여 CEC에서 유전자 세트의 발현을 측정함으로써 측정된다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 검출되는 HCC는 초기 단계 HCC 또는 후기 단계 HCC이다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 방법은 또한 (a) 초음파 이미징, 역동적 CT, MIR 이미징, 바늘 생검, 및/또는 생검에 의해 환자에서 HCC의 존재를 확인하거나 확인한 단계; 및 (b) 환자에서 HCC의 존재가 확인되는 경우, HCC 조직의 외과적 제거, HCC 조직의 고주파 절제, HCC 조직의 색전술; HCC 조직의 색전술, 화학요법, 및/또는 냉동요법에 의해 HCC에 대해 대상체를 치료하거나 치료한 단계를 포함한다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 혈액 CEC 농도를 측정 및 비교하거나 HCC 분류자 유전자를 측정 및 비교하기 위한 초기 및 각각의 후속 시점은 약 3개월, 6개월, 또는 1년 간격이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 B형 간염을 갖거나 B형 간염을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, CEC의 농도는 면역형광에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, CEC의 농도는 글리코판-3 (GPC3) 및/또는 시토크라틴 (CK)을 검출함으로써 측정된다.
- [0069] **간 질환의 진단 및 치료**
- [0070] CLD 또는 HCC와 같은 간 질환이 대상체에서 검출되면 CLD 또는 HCC와 같은 질환의 존재를 다른 방법을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0071] **HCC의 진단 또는 검출**
- [0072] HCC는 완전한 혈액 카운트 (CBC), 전해질, 간 기능 시험 (LFT), 응고 연구 (예컨대, 국제 정규화 비율 (INR) 및 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT)) 및 알파-태아단백질 (AFP) 결정을 포함한 기존의 방법을 이용하여 혈액 샘플을 분석함으로써 추가로 확인되거나 진단될 수 있다.
- [0073] 다양한 이미징 기술을 이용하여 HCC를 진단할 수 있다. 예컨대, 초음파촬영은 자기 공명 이미징 (MRI)의 비용 또는 컴퓨터 단층촬영 (CT)에 필요한 방사선 및 잠재적으로 신독성인 조영제에 대한 노출 없이 비교적 저렴한 스크리닝 방법을 제공한다. 스크리닝 방법으로서의 초음파촬영은 경변 집단에서 민감도가 60%, 특이도가 97%인 것으로 보고되었으며, 비용-효과적인 것으로 입증되었다. 이러한 낮은 민감도로 인해 초음파 검사 결과는 추가의 이미징 연구 및 잠재적인 생검을 통해 확인되어야 한다.
- [0074] HCC는 CT 이미징을 이용하여, 바람직하게는 동맥 상에서 조기 향상과 3상 컨트라스트 스캔의 문맥 정맥 상에서 컨트라스트의 빠른 세척을 통해 검출될 수 있다. HCC는 또한 MRI를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0075] HCC는 생검에 의해, 특히 낮은 수준의 알파-태아단백질과 함께 2 cm보다 큰 HCC를 갖거나 절제 치료 또는 이식이 금기되는 대상체에 대해 검출될 수 있다.
- [0076] 상승된 AFP 및 일관된 이미징 특징을 갖는 환자에서, 환자는 생검 없이 HCC에 대해 추정적으로 치료될 수 있다. 바람직하게는, 환자는 또한 단면 이미징으로 간외 질환 (주로 폐 전이)에 대한 평가를 받을 수 있으며; 이는 치료적 국소영역 요법을 방해할 것이다.
- [0077] **HCC의 치료**
- [0078] HCC는 간 이식을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 다수의 방법을 이용하여 치료될 수 있지만-공여자 기관의 제한된 공급은 많은 대상체에 대한 옵션으로서의 이식의 이용 가능성을 제한한다. HCC는 또한 적출, 고주파 절제 (RFA)를 이용하여 치료될 수 있다. 소라페닙으로의 (또는 소라페닙이 실패하는 경우, 레고라페닙, 니볼루맙 또는 렌바티닙으로의) 전신 요법을 이용하여 환자를 이식으로 브릿징하거나 HCC의 재발을 지연시킬 수 있다. 적출 또는 이식 후 재발을 경험하는 환자의 경우, 적극적인 외과적 치료가 최상의 가능한 결과와 관련되는 것으로 보인다.
- [0079] HCC는 공급 동맥을 종양으로 선택적으로 캐놀라화하고 독소루비신, 시스플라틴 또는 미토마이신 C를 포함한 높은 국소 용량의 화학요법을 전달하는 트랜스카테터 동맥 화학색전술로 치료될 수 있다. 전신 독성을 방지하기

위해, 공급 동맥을 젤 포움 또는 코일로 막아 유동을 방지한다.

[0080] HCC는 화학요법으로 치료될 수 있지만-HCC는 전신 화학요법에 최소로 반응한다. 예컨대, 가장 큰 효능을 갖는 것으로 보이는 독소루비신-기반 요법은 20-30%의 반응률 및 생존에 대해 최소한의 영향을 갖는다.

[0081] 소아 C급 경변증 및 이식 금기 환자의 경우, HCC는 통증 제어, 복수, 부종 및 문맥전신신 뇌병증 관리에 중점을 두어 관리될 수 있다.

[0082] HCC는 수술로 치료될 수 있다. 현재, 효과적인 화학요법의 부재 및 HCC의 방사선요법에 대한 무감응을 고려할 때, 완전한 종양 제거는 장기 치료를 위한 유일한 옵션이다. 부분 간절제술에 의한 종양 적출은 기저 경변증의 정도에 기인하여 제한된 수의 환자 (일반적으로 <15-30%)에서 수행될 수 있다.

[0083] **간 경변증의 진단 및 치료**

[0084] 만성 간 질환은 섬유증 및 정상적인 간 구조가 구조적으로 비정상적인 결절로 전환되는 것을 특징으로 하는 간 경변증을 포함할 수 있다. 간 손상의 경변증으로의 진행은 몇 주 내지 몇 년에 걸쳐 발생할 수 있다. 섬유증에 추가하여, 경변증의 합병증은 문맥 고혈압, 복수, 간신 증후군 및 간성 뇌병증을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0085] 간 경변증은 C형 간염 알콜성 간 질환, NASH; 및 B형 간염에서 발생할 수 있다. 간 섬유증은 세포외 기질 생산의 정상적으로 균형 잡힌 과정의 변화 및 간의 분해로 인해 발생할 수 있다. 간 경변증에서, 정상 세포는 다양한 주변분비 인자에 의해 콜라겐-형성 세포로 활성화될 수 있다. 이러한 인자는 간 손상 후 간세포, 쿠퍼 세포 및 동양 (sinusoidal) 내피에 의해 방출될 수 있다. 예컨대, 만성 C형 간염을 갖는 환자 및 경변증을 갖는 환자에서 시토키인 전환 성장 인자 베타1 (TGF-beta1)의 증가된 수준이 관찰된다. TGF-beta1은 결국 활성화된 정상 세포를 자극하여 I형 콜라겐을 생성한다.

[0086] **간 경변증의 진단**

[0087] 간 경변증의 중증도는 일반적으로, 임상 변수인 뇌병증, 복수의 존재 및/또는 중증도, 혈액에서 빌리루빈 수준 및 알부민 수준, 및 프로트롬빈 시간을 고려하여 경변증의 중증도를 평가하는 스코어링 시스템인 소아-트루코트-푸그 (Child-Turcotte-Pugh: CTP) 시스템을 사용하여 평가된다.

[0088] 간 경변증의 중증도는 또한 투석이 필요한 횟수, 크레아티닌의 혈중 수준, 빌리루빈 수준, 나트륨 및 프로트롬빈 시간의 임상 변수를 고려하여 말기 간 질환에 대한 모델 (Model for End-Stage Liver Disease: MELD) 스코어링 시스템을 사용하여 평가될 수 있다.

[0089] **간 경변증의 치료**

[0090] 중증 CLD (예컨대, 보상부전 경변증)를 갖는 대상체는 간 이식을 이용하여 치료될 수 있다. 간 이식은 85-90%의 1년 생존율 및 70% 보다 높은 5년 생존율을 갖는다. 간 이식 후 삶의 질은 대부분의 경우 좋거나 우수하다. 그러나, 공여자 기관의 제한된 공급은 많은 대상체에 대한 옵션으로의 이식의 이용 가능성을 제한한다.

[0091] CLD를 갖는 대상체에서 경변증의 발병을 방지하거나 지연시키기 위해 다수의 요법이 이용 가능하다: 자가면역 간염 치료를 위한 프레드니손 및 아자티오프린, B형 및 C형 간염 치료를 위한 인터페론 및 다른 항바이러스제, 혈액소침착증에 대한 정맥절개, 원발성 담즙성 경변증에 대한 우르소데옥시콜산, 및 월슨 질환에 대한 트리엔틴 및 아연. NASH는 알로스테릭 아세틸-CoA 카르복실라제 (ACC) 억제제 (예컨대, NDI-010976/GS-0976), 오베티콜산, 티아졸리딘디온 (예컨대, 피오글리타존, 로시글리타존, 로베글리타존, 시글리타존, 다르글리타존, 엔글리타존, 네토글리타존, 리보글리타존, 트로글리타존, 발라글리타존), 엘라피브라노르 (GFT505), 오베티콜산 (OCA), 아포토시스 신호-조절 키나제 1 (ASK1) 억제제 (셀론세르티프), 이중 CCR2/CCR5 억제제 세니크리비록 (CVC, 또한 TBR-652 또는 TAK-652), 및 비타민 E를 사용하는 치료에 대해 평가되고 있는 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD)의 진행된 형태이다.

[0092] 이들 요법은 만성 간 질환이 경변증으로 발전하는 경우 덜 효과적이다. 경변증이 발병하면 치료는 경변증으로 인해 발생하는 합병증의 관리를 목표로 한다. 예컨대, 경변증-관련된 아연 결핍은 이상미각을 개선하고 식욕을 자극하기 위해 황산아연 220 mg을 매일 2회 경구로 치료될 수 있다. 또한, 아연은 근육 경련 치료에 효과적이며 간성 뇌병증에 대한 보조 요법이다. CLD (예컨대, 담즙정체성 간 질환 또는 C형 간염)를 갖는 대상체의 가려움증은 콜레스티라민, 항히스타민 (예컨대, 디펜히드라민, 히드록시진) 및 암모늄 락테이트 12% 스킨 크림 (락-히드린 (Lac-Hydrin))으로 치료될 수 있으며, 우르소데옥시콜산, 독세핀 및 리팜핀을 포함한다. 날트렉손

은 효과적일 수 있지만 종종 내약성이 떨어진다. 가바펜틴은 신뢰할 수 없는 요법이다. 중증 가려움증을 갖는 환자는 자외선 요법 또는 혈장분리반출술을 받아야 할 수 있다. CLD를 가는 남성 대상체에서 생식선기능저하증은 국소 테스토스테론 제제로 치료될 수 있다. CLD (특히 만성 담즙정체 또는 원발성 담즙성 경변증)를 갖는 대상체에서 골다공증은 칼슘 및 비타민 D 보충제로 치료될 수 있다. 또한, CLD를 갖는 환자는 A형 간염에 대해 백신접종을 받을 수 있다.

[0093] **실시예**

[0094] 본 발명은 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는 하기 실시예에서 추가로 설명된다.

[0095] **방법**

[0096] 하기 재료 및 방법이 하기에 제시된 실시예에서 사용되었다.

[0097] **임상 프로토콜**

[0098] 환자의 의료 데이터는 환자의 허가를 받아 환자 전자 의료 기록으로부터 수집되었으며, 임의의 주어진 채혈 시 2개의 10-mL EDTA 튜브에 환자로부터 최대 20 mL의 혈액을 수득하였으며, 환자당 약 8-15 mL의 혈액을 처리하였다.

[0099] **iChip 디바이스를 사용하여 전혈로부터 CEC의 미세유체 정제**

[0100] 항-인간 CD45 항체 (클론 2D1, R&D 시스템스 (R&D Systems), BAM1430) 및 항-인간 CD66b 항체 (Abd 세로텍 (Abd Serotec), 80H3)에 대한 비오틴화된 1차 항체를 각각 100 fg/WBC 및 37.5 fg/WBC로 전혈 (5-10 mL 총 부피)에 스파이킹하고, 실온에서 20분 동안 흔들면서 인큐베이션하였다. 이어서, 디나비즈 마이원 스트렙타비딘 T1 (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) (라이프 테크놀로지스 (Life Technologies), 65602) 자기 비드를 첨가하고, 추가의 20분 동안 실온에서 흔들면서 인큐베이션하였다. 이어서, 총 혈액 부피 (5-10 mL)를 이전에 기재된 바와 같이 iChip 디바이스 상에서 실행하였다.⁸

[0101] **CEC의 면역형광 염색**

[0102] iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플 분취물의 세포를 2% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시킨 다음, 산돈 EZ 메가핀넬 (Shandon EZ Megafunnel) (썬모피셔 (ThermoFisher) A78710001)을 사용하여 5분 동안 2000 rpm에서 시토스핀을 통해 유리 슬라이드에 적용하였다. 슬라이드를 PBS로 세척하고, 실온 (RT)에서 1시간 동안 PBS 중의 5% 당나귀 혈청 + 0.3% 트리톤-X로 차단하였다. 이어서, 넓은 스펙트럼 시토크라틴 (WS CK, 애브캄 (Abcam) ab9377), 글리피칸-3 (애브캄 ab81263) 및 CD45 (백톤 디켄슨 (Becton Dickenson) 555480)에 대한 1차 항체 (각각 PBS, 0.1% BSA, 0.3% 트리톤-X에 1:50 희석)를 첨가하고, RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 각각의 1차 항체에 대해 지시된 2차 항체 (각각 PBS, 0.1% BSA, 0.3% 트리톤-X에 1:200 희석)를 형광 표지화에 사용하고, 빛으로부터 보호된 RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다: 1) 시토크라틴 - 당나귀 항-토끼 알렉사 (Alexa)-647 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch) 711-605-152); 2) 글리피칸-3 - 당나귀 항-양 Cy3 (잭슨 이뮤노리서치 713-165-003); 3) CD45 - 당나귀 항-마우스 알렉사-488 (잭슨 이뮤노리서치 715-545-150). 세포핵을 DAPI (PBS 중 5 µg/mL, 라이프 테크놀로지스)로 대조염색하였다. 프로롱 골드 안티페이드 시약 (ProLong Gold Antifade Reagent, 라이프 테크놀로지스)을 사용하여 슬라이드를 장착하였다. 염색된 세포를 이미지 획득을 위한 적절한 필터 큐브 및 자동화된 이미지 분석을 위한 바이오뷰 (BioView) 플랫폼을 사용하여 형광 현미경 (TiE 또는 이클립스 (Eclipse) 90i, 니콘 (Nikon))으로 이미지화하였다. 검출된 모든 후보 CEC를 무손상 형태, DAPI 핵 대조염색을 사용한 CEC 마커의 국소화 (WS CK 알렉사-647 및/또는 GPC3 Cy3), 및 백혈구 마커의 부재 (CD45 알렉사-488)에 기초하여 검토 및 스코어링하였다.

[0103] **HepG2 세포 스파이크-인 (Spike-in)**

[0104] HepG2 세포를 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection)-권장된 배양 조건에 따라 배양하였다. 개별 세포를 에펜도르프 트랜스퍼만 (Eppendorf TransferMan) NK2 미세조작기를 사용하여 미세피펫팅하고, iChip 디바이스를 통해 처리하기 전에 건강한 공여자로부터의 혈액 4 mL에 도입하였다.

[0105] **CEC의 RNA-시퀀싱**

[0106] iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플 분취물을 펠릿화하고 -80°C에서 RNA레이터 (RNAlater) (썬모-피셔 사이언티픽 (Thermo-Fisher Scientific))에서 급속 냉동하였다. RNA를 추출하고 (RN이지 마이크로 (RNEasy Micro), 퀴아젠 (Qiagen)), RNA-seq를 위해 하기와 같이 처리하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 시퀀싱을 위한 SMARTer

초저 입력 RNA 키트 (SMARTer Ultra Low Input RNA Kit) (v3 또는 v4) (클론텍 라보라토리즈 (Clontech Laboratories))를 사용하여 각각의 샘플로부터의 RNA로부터 증폭된 cDNA를 생성하였다. 간단히, ERCC RNA 스카이크-인 혼합물 (라이프 테크놀로지스)의 1:50,000 희석액 1 μ l를 각각의 샘플에 첨가하였다. RNA 분자의 제 1-가닥 합성을 폴리-dT-기반 3'-SMART CDS 프라이머 II A에 이어 역전사효소에 의한 확장 및 템플릿 스위칭을 이용하여 수행하였다. 제2 가닥 합성 및 증폭 PCR을 18주기 동안 실행하고, 증폭된 cDNA를 1x 아젠코트 AM퓨어 XP 비드 클린업 (Agencourt AMPure XP bead cleanup) (베크만 코울터 (Beckman Coulter))으로 정제하였다. 넥스테라(Nextera)® XT DNA 라이브러리 제조 키트 (일루미나 (Illumina))를 제조업체의 프로토콜에 따라 샘플 바코딩 및 단편화에 사용하였다. 1 ng의 증폭된 cDNA를 효소 태그부착에 이어 개별 라이브러리의 12주기의 증폭 및 고유한 이중-인덱스 바코딩에 사용하였다. PCR 생성물을 1.8x 아젠코트 AM퓨어 XP 비드 클린업으로 정제하였다. 용출된 cDNA 라이브러리는 넥스테라 XT 프로토콜에서 비드-기반 라이브러리 정규화 단계를 거치지 않았다. 라이브러리 검증 및 정량화를 카파 시브르(KAPA SYBR)® 신속 범용 qPCR 키트 (FAST Universal qPCR Kit) (카파 바이오시스템스 (Kapa Biosystems))를 사용하여 정량적 PCR로 수행하였다. 개별 라이브러리를 동일한 농도로 풀링하였으며, 풀 농도를 카파 시브르® 신속 범용 qPCR 키트를 사용하여 결정하였다. 이후, 라이브러리의 풀을 2 x 100 염기쌍 키트 및 이중 유동 셀을 사용하여 빠른 실행 모드 (Rapid Run Mode)의 HiSeq 2500에서 3번의 복제로 시퀀싱하였다. 3번의 시퀀싱 실행으로부터의 페어드-엔드 (paired-end) 판독을 조합하고, 디폴트 설정을 갖는 STAR v2.4.0h 정렬기를 사용하여 <http://genome.ucsc.edu>로부터의 hg38 게놈에 정렬하였다. 매핑되지 않았거나 다수 위치에 매핑된 판독은 제거되었다. 중복 판독은 피카드-툴스-1.8.4 (picard-tools-1.8.4)의 마크듀플리케이션즈 (MarkDuplicates) 도구를 사용하여 표시되고 제거되었다. 고유하게 정렬된 판독은 공개적으로 이용 가능한 Homo_sapiens.GRCh38.79.gtf 주석 테이블에 대해 교차-엄격 모드 (intersection-strict mode)로 htseq-카운트 (htseq-count)를 사용하여 계산되었다. 이어서, 분석을 위해 데이터를 R 통계 프로그래밍 언어로 불러왔다. 모든 RNA-seq 원시 데이터는 NCBI GEO: 수탁 GSE117623에 제출되었다.

[0107] **백혈구의 유동 분류**

[0108] HCC 환자의 서브세트에 대해, iChip 디바이스-처리된 혈액 샘플을 2개의 동일한 분취물로 나누었다: 하나의 분취물은 펠릿화하고 상기와 같이 급속 냉동하고; 제2 분취물은 오염 백혈구의 아유형 (단핵구, 과립구, NK 세포, 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포 및 B 세포)을 단리하기 위해 유동 분류되었다. 세포를 시토픽스 (Cytofix) (BD 바이오사이언시즈 (BD Biosciences) 554655)로 고정하였다. 하기 항체를 사용하였다: CD45 (베크만 코울터 IM0782U), CD56 (베크만 코울터 IM2073U), CD16 (바이올레전드 (Biolegend) 360712), CD14 (바이올레전드 301808), CD3 (바이올레전드 317330), CD19 (바이올레전드 302216), CD4 (바이올레전드 300556), CD8 (바이올레전드 301016), CD66b (바이올레전드 305112). 상술된 바와 같이, 유동 분류된 세포를 펠릿화하고, RNA레이터에서 급속 냉동하고, RNA-seq를 실시하였다.

[0109] **실시예 1: 랜덤 포레스트 분류자를 사용한 CLD 환자 분류의 개요**

[0110] RNA-seq 원시 데이터는 64개의 CLD 및 52개의 HCC 샘플에 대한 59,074개의 전사체에 대한 판독 카운트로 이루어졌다. 이들 중 250k 초과와 총 판독을 갖는 샘플만 유지되어, 44개의 CLD 및 39개의 HCC 샘플을 남겨두었다. 데이터 세트의 피쳐 목록을 HCC 상태 예측과 관련된 더 높은 가능성을 갖는 것으로 좁히기 위해, RNA-seq 발현 데이터를 정상 간 및 HCC 조직 둘 다에 대한 발현 카운트를 함유하는 더 캔서 게놈 아틀라스 (The Cancer Genome Atlas: TCGA) 간암 프로젝트 (LIHC)에서 얻었다. R의 다중 가설 시험에 대한 벤자미니-호크버그 (Benjamini-Hochberg) 보정과 함께 DESeq2 패키지 (버전 1.16.1)를 사용하여 HCC 대 정상 간 조직에서 과발현되는 전사체를 확인하기 위해 이 데이터 세트에 대해 차등 발현 분석을 수행하였다. 유동 분류를 통해 획득된 벌크 백혈구 (WBC) 서브세트에 대한 RNA-seq 데이터와 조합된 이 분석을 이용하여, 조정된 p-값 < 0.05, log2 배 변화 (fold change) > 2, 합산된 WBC 서브세트에서 WBC < 50 rpm 및 건강한 간 조직에서의 평균 발현 > 0.5 rpm을 갖는 전사체 목록을 구축하였다. 이 목록을 원시 데이터 세트의 59,074개 피쳐를 HCC를 예측할 가능성이 더 높은 248개의 전사체 세트에 좁히는데 사용하였다. 248개 전사체의 세트는 ACTG2, ADM2, AFP, AGR2, AKR1B10, ALDH3A1, ALPK3, AMIGO3, ANKRD65, ANLN, AP1M2, APOBEC3B, ARHGAP11A, ARHGEF39, ASF1B, ASPHD1, ASPM, AURKA, AXIN2, BAIAP2L2, BEX2, C15orf48, C1orf106, C1QTNF3, C6orf223, CA12, CA9, CAMK2N2, CAP2, CBX2, CCDC170, CCDC28B, CCDC64, CCNA2, CCNB1, CCNE2, CCNF, CD109, CD34, CDC20, CDC25A, CDC6, CDC7, CDCA5, CDCA8, CDH13, CDK1, CDKN2A, CDKN2C, CDT1, CELF6, CENPF, CENPH, CENPL, CENPU, CENPW, CKB, CNM1, COL15A1, COL4A5, COL7A1, COL9A2, CRIP3, CSPG4, CTNND2, CXorf36, CYP17A1, DLK1, DMKN, DSCC1, DTL, DUOX2, E2F1, ECT2, EEF1A2, EFNA3, EPHB2, EPPK1, ETV4, EZH2, F2RL3, FABP4, FAM111B, FAM3B, FAM83D, FANCD2, FANCI, FBXL18, FBXO32, FERMT1, FGF19, FLNC, FLVCR1, FMO1, FOXD2-AS1, FOXM1, FXD2, GABRE,

GAL3ST1, GCNT3, GINS1, GJC1, GMNN, GNAZ, GOLGA2P7, GPC3, GPR64, GPSM1, HRCT1, IGF2BP2, IGSF1, IGSF3, IQGAP3, ITGA2, ITPKA, KIAA0101, KIF11, KIFC1, KIFC2, KNTC1, KRT23, LAMA3, LEF1, LGR5, LINC00152, LINGO1, LPL, LRRC1, LYPD1, MAD2L1, MAGED4, MAGED4B, MAPK12, MAPK8IP2, MAPT, MCM2, MDGA1, MDK, MFAP2, MISP, MKI67, MMP11, MNS1, MPZ, MSC, MSH5, MTMR11, MUC13, MUC5B, MYBL2, MYH4, NAALADL1, NAV3, NCAPG, NDUFA4L2, NEB, NKD1, NMB, NOTCH3, NOTUM, NPM2, NQO1, NRCAM, NT5DC2, NTS, NUSAP1, OBSCN, OLFML2A, OLFML2B, OSBP2, PAQR4, PDZK1IP1, PEG10, PI3, PLCE1, PLCH2, PLK1, PLVAP, PLXDC1, PLXNB3, PODXL2, POLE2, PPAP2C, PRC1, PTGES, PTGFR, PTHLH, PTK7, PTP4A3, PTTG1, PYCR1, RACGAP1, RBM24, RECQL4, RHBG, RNF157, ROBO1, RP4-800G7.2, RPS6KL1, RRM2, S100A1, SCGN, 5-Sep, SERPINA12, SEZ6L2, SFN, SGOL2, SLC22A11, SLC51B, SLC6A2, SLC6A8, SLC6A9, SNCG, SOAT2, SP5, SPARCL1, SPINK1, SPP1, STIL, STK39, SULT1C2, TCF19, TDGF1, TESC, THY1, TK1, TMC5, TMEM132A, TMEM150B, TNFRSF19, TNFRSF25, TONSL, TOP2A, TPX2, TRIM16, TRIM16L, TRIM31, TRIM45, TTC39A, UBD, UBE2C, UBE2T, UGT2B11, USH1C, VSIG10L, WDR62, WDR76, ZWINT이었다.

[0111] 모든 분석에 사용된 최종 데이터 세트는 상술된 바와 같이 확인된 248개 전사체 및 83개 샘플에 대한 $\log_2(1+RPM)$ 로 이루어졌다. 분류 알고리즘의 성능을 평가하기 위해 10배 교차-검증의 10회 반복을 구현하였으며, 하기에 단계별로 기재된다:

[0112] 1. **피처 선택.** R 통계 (*stats*) 패키지 (버전 3.4.2)를 사용하여 TCGA 차등 발현 분석에 의해 확인된 248개의 전사체 각각에 대한 훈련 세트에 대해 대안적 가설 $H_A: \mu_{CLD} < \mu_{HCC}$ 로 일측 t-시험을 수행하였다. p-값이 0.05 미만인 것만 유지되었다.

[0113] 2. **랜덤 포레스트 분류자.** 피처 선택 단계에서 유지된 모든 전사체가 R의 **랜덤포레스트** 패키지 (버전 4.6-12)를 사용하여 구축된 랜덤 포레스트를 훈련하는데 사용되었다. 파라미터 m_{try} 는 \sqrt{p} 의 디폴트 값으로 남겨졌으며 (여기서, p 는 데이터 세트 내의 피처의 수임), $n_{tree}=500$ 트리가 구축되었다. 샘플링은 질환 상태에 따라 계층화되었다. 비교기 분류자로서, 피처 선택 단계에서 p-값으로 10개의 가장 중요한 유전자를 사용하여 다변량 로지스틱 회귀 모델을 생성하였다.

[0114] 3. **예측.** 시험 세트의 각각의 샘플에 대한 암 분류에 투표한 랜덤 포레스트의 트리 비율은 랜덤 포레스트 출력으로부터 수득되었으며, *pROC* 패키지 (버전 1.10.0)로 ROC 곡선을 구축하는데 사용되었다.

[0115] **실시예 2: 면역형광에 의한 CEC의 검출**

[0116] CEC는 면역형광 (IF)에 의해 처음 검출되었다. 혈액 샘플을 10명의 건강한 혈액 공여자, 통상적인 임상 감시는 받지만 HCC의 증거를 갖지 않는 39명의 CLD 환자, HCC를 갖는 54명의 환자, 치료적 치료를 받았고 질환의 임상적 증거를 갖지 않는 (NED) 10명의 HCC 환자로부터 수득하였다 (표 1-4 참조). iChip 디바이스로 적혈구, 혈소판 및 혈장의 크기-기반 배제를 수행한 다음 표지된 백혈구 (WBC)의 자기영동을 수행하였다 (문헌 (Ozkumur E, et al. *Sci Transl Med* 2013;5:179ra47)에 기재된 바와 같음) (도 1 참조). 이어서, CEC는 HCC뿐만 아니라 CLD 간 조직에서 발현되는 종양태아 단백질인 글리피칸-3 (문헌 (Wang HL, et al. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1723-8)에 기재된 바와 같음), 또는 상피 마커인 시토크라틴에 대한 IF 염색에 의해 열거되었다 (도 2a 참조). 전혈 10 mL당 5개 세포의 임계값을 사용하여, CEC는 CLD 환자 (79%), HCC 환자 (81%) 및 NED 환자 (90%)에 대해 유사한 비율로 확인되었지만 건강한 공여자에서는 20%에서만 확인되었다 (도 2b 및 도 4a-b 참조; $p < 0.01$, 각각의 군 대 건강한 공여자). 면역형광 정량화와 조합된 iChip 디바이스를 사용한 정제는 HCC 및 CLD 환자에서 유사한 농도로 CEC 검출에 대한 높은 민감도를 나타내었다. CLD 환자 중, 진행된 섬유증을 갖는 환자 (METAVIR F3 또는 F4)는 진행된 섬유증이 없는 환자 (0.7개 세포/mL, $p < 0.01$, 도 2c 참조)에 비해 더 높은 농도의 CEC (중앙값 5.1개 세포/mL)를 가졌다. CLD 연구 집단은 HCC 위험이 충분히 높아 감시를 받을 환자로만 이루어졌기 때문에, 진행된 섬유증이 없는 아군의 각각의 환자에 대한 CLD의 병인은 B형 간염 감염이었다. 섬유증 단계와 관련된 CEC 농도의 차이는 CLD 병인에 기인하는 것으로 보이지 않았으며, 이는 분석이 B형 간염-유발된 CLD를 갖는 환자로만 제한되었을 때 추세가 지속되었기 때문이다 (진행된 섬유증을 갖는 경우 중앙값 5.0개 세포/mL, 진행된 섬유증이 없는 경우 0.7개 세포/mL, $p=0.06$, 도 4c 참조). 달리, CLD 병인에 의한 CEC 농도의 차이가 없었다 (도 4d 참조).

[0117] **실시예 3: RNA-시퀀싱에 의한 CEC의 검출**

[0118] RNA-시퀀싱 (RNA-seq)은 CEC를 검출하기 위해 수행되었다. 이 접근법의 민감도를 결정하기 위해, 0, 1, 3, 5,

10 또는 50개의 HepG2 HCC 세포를 4 mL의 건강한 공여자 혈액에 스파이킹하고, RNA-seq를 위해 iChip 디바이스를 통해 처리하였다. HepG2 특이적 유전자 발현은 전혈에서 단일 세포로부터 검출 가능하였다 (도 3a 참조). CEC는 64명의 CLD 및 52명의 HCC 환자로부터의 임상 혈액 샘플에서 확인되었다. 먼저, 유전자형 조직 발현 (GTEx) 발현 데이터에 기초하여 17개의 간-특이적 유전자 시그니처가 생성되었다. 간-특이적 유전자는 두 환자군 모두로부터의 샘플에서 확인되었지만 iChip 디바이스-처리된 혈액으로부터 유동-분류된 WBC 아유형에는 없었다 (도 3b 참조). 따라서, 간-특이적 시그니처는 오염 WBC에서 이들 유전자의 이상 발현보다는 희귀 CEC를 확인하였다.

[0119] 실시예 4: HCC를 검출하기 위한 분류자의 생성

[0120] CEC가 기저 질환 상태에 따라 표현형적으로 상이할 수 있음을 나타내기 위해, CLD 대 HCC 설정에서 CEC 간의 정량적 차이보다는 정성적 차이를 확인하기 위해 유전자 발현 프로파일링을 수행하였다 (도 3c 참조). 더 캔서 게놈 아틀라스 (TCGA) 데이터베이스를 사용하여, 간 조직에 비해 HCC에서 과발현되고 WBC에서 발현된 유전자를 제외한 248개의 유전자가 확인되었다. 랜덤 포레스트 (RF) 기계 학습 접근법을 이용하여 CLD와 HCC CEC를 구별하기 위해 이들 유전자에 기초하여 분류자를 생성하였다. 보다 구체적으로, 랜덤 포레스트에서 각각의 결정 트리는 샘플을 CLD 또는 HCC로 분류하는 "투표"를 캐스팅하였다. 최종 분류자는 표 5에 열거된 25개의 유전자를 사용하였다. 특히, 분류자에서 가장 유용한 유전자 중 3개 (*TESC*, *SLC6A8*, *SPP1*)는 암 전이에 연루되었으며, 또 다른 유전자 (*E2F1*)는 확립된 세포 증식 마커이다 (문헌 (Kang J, et al. *Tumour Biol* 2016;37:13843-13853; Loo JM, et al. *Cell* 2015;160:393-406; 및 Sangaletti S, et al. *Cancer Res* 2014;74:4706-19) 참조).

[0121] 교차-검증된 분류자는 95%의 특이도 (즉, 참 음성 비율)에서 85%의 민감도 (즉, 참 양성 비율) 및 초기 및 후기 단계 HCC 모두의 확인 (밀란 기준에 의함)과 함께 CLD와 HCC 샘플 간의 탁월한 분리를 제공하였다 (도 3d 및 도 5a-c 참조). 이 실시예에서 달성된 정확도 (민감도 및 특이도) 수준은, HCC 예측에 대한 정확도가 단지 44%에 불과한 (일반적인 반복 돌연변이 및 HCC에 고유한 특정 단백질 마커의 결여에 기인할 수 있음), 무세포 DNA와 단백질 혈액-기반 바이오마커를 조합한 최근 연구 (Cohen JD, et al. *Science* 2018)에 비해 더 높다.

[0122] <표 1>

HCC에 대해 감시를 받는 CLD 환자에 대한 인구 통계 및 결과. CEC는 면역형광에 의해 CK 또는 GPC3를 발현하는 세포로 정의된다. HCC 스코어는 RF 분류자로부터의 득표 분율이다. HBV, B형 간염 바이러스; HCV, C형 간염 바이러스; PSC, 원발성 경화성 담관염; NASH, 비-알콜성 지방간염; AIH (자가면역 간염).

샘플	나이	성별	진단	진행된 섬유증	AFP (ng/mL)	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)	HCC 스코어
CLD.001	61	F	HCV	있음	2.7	0.0	10.1	10.1	0.39
CLD.002	64	M	HBV	없음	-	0.0	4.8	4.8	0.08
CLD.003	31	F	HBV	없음	3.3	0.0	14.5	14.5	0.21
CLD.004	63	M	알콜	있음	6.6	0.0	3.4	3.4	0.38
CLD.005	81	F	HBV	있음	1.9	0.0	5.0	5.0	0.40
CLD.006	53	M	HBV	있음	2.9	0.0	5.1	5.1	0.19
CLD.007	36	F	HBV	없음	2	0.9	5.3	5.3	-
CLD.008	64	M	HBV	없음	1.9	0.9	0.9	0.9	0.37
CLD.009	59	F	HBV	없음	3	0.8	3.2	3.2	-
CLD.010	46	F	알콜	있음	1.7	5.3	6.2	6.2	0.32
CLD.011	77	M	HBV	없음	1.7	0.0	0.0	0.0	-
CLD.012	85	F	알콜	있음	1.4	0.0	8.9	8.9	-
CLD.013	87	F	HCV	있음	8.1	0.9	2.6	2.6	0.14
CLD.015_2	59	M	HBV	없음	2.2	-	-	-	0.11
CLD.017	66	M	HCV	있음	4.4	0.0	1.6	1.6	-
CLD.019	67	M	알콜	있음	1.9	5.8	5.8	5.8	-
CLD.020	40	M	HBV	없음	2.5	0.5	0.5	0.5	-
CLD.022	42	M	PSC	있음	3.3	5.3	0.0	5.3	0.27
CLD.023	72	M	HCV	있음	1.7	0.8	1.6	1.6	-
CLD.024	77	M	HBV	있음	2.1	0.0	12.3	12.3	0.46
CLD.025	54	M	알콜/ NASH	있음	10.4	10.7	15.4	15.4	0.54
CLD.026	55	F	알콜	있음	4	0.0	5.3	5.3	-
CLD.027	50	M	HBV	없음	4.6	0.0	3.7	3.7	-
CLD.028	70	M	HBV	없음	3.2	0.0	0.0	0.0	-

[0123]

샘플	나이	성별	진단	진행된 섬유증	AFP (ng/ mL)	CK+ (세포/ mL)	GPC3+ (세포 /mL)	CEC (세포/ mL)	HCC 스코어
CLD.029	38	M	PSC	있음	1.2	5.1	6.3	6.3	-
CLD.030	59	F	원인 불명	있음	5.5	0.9	16.0	16.0	-
CLD.031	28	M	HBV	없음	2.3	0.0	0.0	0.0	-
CLD.032	70	M	HCV	있음	3.2	0.0	0.6	0.6	0.33
CLD.033	54	M	HCV	있음	2.8	-	-	-	0.26
CLD.034	73	F	HBV	있음	2.8	1.8	3.6	3.6	0.46
CLD.037	60	F	HBV	없음	3.3	0.0	0.0	0.0	-
CLD.038	60	F	HBV	없음	2.1	3.7	3.1	6.2	-
CLD.039	54	F	HBV	없음	3.5	0.0	0.0	0.0	0.80
CLD.040	39	M	HBV	없음	4	0.0	0.0	0.0	0.22
CLD.041	51	M	HBV	없음	4.8	0.0	0.0	0.0	-
CLD.042	54	M	HBV	없음	3.2	1.6	2.4	2.4	-
CLD.043	65	F	NASH	있음	3.1	0.8	0.8	0.8	-
CLD.044	57	M	NASH	있음	4	0.6	5.5	5.5	-
CLD.045	68	M	HCV/ NASH	있음	12.2	0.0	4.9	4.9	-
CLD.046_2	60	M	HBV	있음	3.2	-	-	-	0.35
CLD.048	66	F	HCV	있음	3.1	2.3	5.1	5.1	-
CLD.050	50	F	AIH	있음	5	1.2	4.1	4.1	-
CLD.055	37	F	HBV	없음	1.4	-	-	-	0.30
CLD.056	47	M	HBV	없음	4.4	-	-	-	0.25
CLD.057	44	F	HBV	없음	1.6	-	-	-	0.09
CLD.058	31	M	HBV	없음	1.7	-	-	-	0.18
CLD.060	61	F	AIH	있음	10.5	-	-	-	0.08
CLD.061	69	F	HCV	있음	3.2	-	-	-	0.04
CLD.062	42	F	HBV	없음	4.8	-	-	-	0.05
CLD.065	54	M	HCV	있음	2.4	-	-	-	0.07
CLD.070	45	F	HBV	없음	4.8	-	-	-	0.25
CLD.071	66	M	HBV	없음	4.8	-	-	-	0.32
CLD.072	48	F	HBV	없음	1.3	-	-	-	0.18
CLD.073	69	F	HCV	있음	4.6	-	-	-	0.20
CLD.077	44	M	HBV	있음	5.1	-	-	-	0.10
CLD.078	40	M	HCV	없음	1.3	-	-	-	0.16
CLD.079	54	M	HBV	없음	1.6	-	-	-	0.28
CLD.081	74	M	HBV	없음	2	-	-	-	0.29
CLD.082	74	M	NASH	있음	1.9	-	-	-	0.47
CLD.083	60	F	HBV	없음	4.4	-	-	-	0.25
CLD.084	69	M	HBV	있음	3.2	-	-	-	0.11
CLD.085	64	M	HBV	있음	2.6	-	-	-	0.20

[0124]

샘플	나이	성별	진단	진행된 섬유증	AFP (ng/ mL)	CK+ (세포/ mL)	GPC3+ (세포 /mL)	CEC (세포/ mL)	HCC 스코어
CLD.087	64	M	HBV	있음	2.6	-	-	-	0.08
CLD.088	69	M	HCV	있음	4.4	-	-	-	0.09
CLD.089	43	M	HBV	없음	6.6	-	-	-	0.13
CLD.090	69	M	HCV	있음	4.4	-	-	-	0.20
CLD.091	43	M	HBV	없음	6.6	-	-	-	0.03

[0125]

[0126]

<표 2>

활성 질환을 갖는 HCC 환자에 대한 인구 통계 및 결과 (채혈 전 치료를 받거나 받지 않음). CEC는 면역형광에 의해 CK 또는 GPC3를 발현하는 세포로 정의된다. HCC 스코어는 RF 분류자로부터의 득표 분율이다. NASH, 비-알콜성 지방간염; PSC, 원발성 경화성 담관염; HBV, B형 간염 바이러스; HCV, C형 간염 바이러스; A1AT 알파-1-항트립신 결핍; RT, 방사선요법 (외부); TACE, 경동맥 화학색전술; SIRT, 선택적 내부 방사선 요법.

샘플	나이	성별	위험 인자	경변증	AFP (ng/mL)	치료	밀란 기준	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)	HCC 스코어
HCC.008	43	M	혈색소침착증	없음	9534	RT, 소라페닙, 화학요법, 체크포인트 억제제, 격출	없음	57	103.5	103.5	-
HCC.011	74	M	NA	없음	939.2	절제, 격출	없음	2.4	18.4	18.4	0.32
HCC.0130	63	F	버드 키아리	있음	6.1	없음	있음	31.1	90.4	90.4	-
HCC.013	63	F	버드 키아리	있음	3.4	절제, RT	있음	-	-	-	0.87
HCC.014	69	F	NASH	있음	218	TACE	있음	0.7	0.7	0.7	0.24
HCC.015	70	F	PSC	있음	3.8	없음	있음	3	0	3	0.78
HCC.016	70	M	HBV	없음	101.5	티말파신	있음	0	0	0	-
HCC.018	82	M	NASH	없음	132367	없음	있음	40.6	61.8	61.8	0.86
HCC.019	64	M	알콜	있음	10.4	없음	없음	44	45.1	55.4	-
HCC.0192	64	M	알콜	있음	21	RT, 소라페닙	없음	-	-	-	0.85
HCC.021	68	M	NASH, 알콜	있음	4891	절제	없음	0	4.2	4.2	-
HCC.025	68	M	알콜	있음	4.3	없음	있음	0.9	1.7	2.6	-
HCC.026	85	M	원인 불명	있음	1.3	없음	있음	0	15.4	15.4	-
HCC.027	55	M	HBV	없음	731.8	없음	없음	5.4	6.6	11.4	0.83
HCC.029	70	M	NASH	있음	4800	절제	없음	15.2	23.6	34.2	0.80
HCC.0300	78	M	HBV	있음	151.6	없음	없음	3	9	9	-
HCC.030	78	M	HBV	있음	26.9	TACE	있음	-	-	-	0.42
HCC.0310	63	M	HCV	있음	64.9	절제, TACE, 이식	NED	15	34.5	35.3	-
HCC.034	71	F	NA	없음	3.8	없음	없음	0.6	3.6	3.6	-
HCC.035	82	F	NA	없음	2043.5	SIRT, RT, 소라페닙	없음	1.1	9.1	9.1	-
HCC.037	54	M	알콜	있음	5947	절제, SIRT, 소라페닙	없음	0	3.3	3.3	-
HCC.0400	70	M	NA	없음	2.2	격출	없음	1.3	14.5	15.8	-

[0127]

샘플	나이	성별	위험 인자	경변증	AFP (ng/mL)	치료	밀란 기준	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)	HCC 스코어
HCC.040	70	M	NA	없음	5.6	RT, 체크포인트 억제제, 적출	없음	NA	NA	NA	0.77
HCC.041	72	M	알콜	있음	338	RT	없음	0	1.2	1.2	-
HCC.041 ₃	72	M	알콜	있음	1092	RT, 소라페닙	없음	-	-	-	0.52
HCC.042	58	M	HCV, 알콜	있음	5.4	없음	없음	0.5	0.5	0.5	0.43
HCC.044	79	F	NA	없음	19598	없음	없음	0.5	0	0.5	-
HCC.046	66	M	HBV	있음	5.5	절제	있음	1.4	10.3	10.3	0.05
HCC.047	62	M	알콜	있음	12.7	절제	있음	0	0	0	-
HCC.050	76	M	알콜	있음	5.4	절제, TACE, RT	있음	0	2.3	2.3	-
HCC.052	23	M	담도 췌체증	있음	1.5	RT	없음	0	2.5	2.5	-
HCC.059	66	M	HCV, 알콜	있음	4847	절제	없음	43.6	48.7	49.5	0.91
HCC.060	63	F	NASH	있음	13629	없음	없음	0	3.2	3.2	0.77
HCC.061	67	F	NA	없음	60.6	적출	없음	0	1.3	1.3	-
HCC.062	63	M	NASH	있음	185.2	TACE	있음	0	3.7	3.7	0.71
HCC.064	53	M	HCV	있음	1.6	없음	있음	0	0.8	0.8	0.85
HCC.065	59	M	HBV	없음	63.3	없음	있음	0	0	0	0.80
HCC.067	74	F	NA	없음	2.5	소라페닙	없음	0.7	1.3	1.3	0.89
HCC.068	83	M	HBV	있음	4.7	RT	없음	NA	NA	NA	0.79
HCC.069	62	M	NASH	있음	20.8	TACE	있음	NA	NA	NA	0.88
HCC.074 ₀	64	M	NASH, 알콜	있음	167580	없음	없음	0	0	0	-
HCC.075	81	M	HBV	있음	7.7	절제, 소라페닙, 화학요법, 체크포인트 억제제, 적출	없음	0	1	1	0.76
HCC.076	79	M	HBV	있음	13322	없음	없음	0	1.5	1.5	-
HCC.078	60	M	HBV	없음	4.7	절제, 적출	없음	2.2	2.2	2.2	0.83
HCC.079	71	M	NA	없음	5.2	없음	없음	-	-	-	0.73
HCC.082	62	M	HCV, 알콜	있음	5.9	없음	있음	6.7	7.3	7.3	0.80
HCC.083	59	M	HCV, 알콜	있음	8.5	TACE, SIRT, RT, 소라페닙	없음	2.1	2.1	2.1	0.89
HCC.084	81	M	NA	없음	16.8	소라페닙	없음	0	0	0	-
HCC.087	57	M	알콜	있음	16.7	절제, TACE	있음	0	1.2	1.2	0.80
HCC.090	69	M	알콜	있음	19960	없음	없음	4.7	5.3	5.3	0.92
HCC.091	72	M	HBV	없음	3.2	없음	있음	0	0	0	0.91
HCC.093	77	M	NA	없음	3.2	RT, 적출	없음	0	0	0	0.80
HCC.094	70	M	NA	없음	156.4	SIRT, RT	없음	4	6	6	-
HCC.095	64	M	HCV, 알콜	있음	7.6	TACE	있음	1.3	2.7	2.7	0.66

[0128]

샘플	나이	성별	위험 인자	경변증	AFP (ng/mL)	치료	밀란 기준	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)	HCC 스코어
HCC.097	52	F	NA	없음	1.3	절제, 화학요법, 이식, 적출, 에베롤리부스/ 듀프롤리드, 시트라바티닙	없음	0	6.4	6.4	0.66
HCC.098	66	M	알콜	있음	356	없음	없음	0	0	0	0.65
HCC.099	58	M	알콜	있음	254.9	TACE	있음	1.5	1.5	1.5	0.51
HCC.101	78	M	NASH	있음	NA	없음	있음	1.2	2.5	2.5	0.54
HCC.102	61	M	알콜, 혈액소침착증	있음	9.6	없음	있음	0	5.6	5.6	0.87
HCC.103	68	M	A1AT	있음	286.8	절제	있음	0	2.7	2.7	0.59
HCC.104	74	M	NA	없음	15.4	없음	없음	3.2	6.4	6.4	0.49
HCC.105	56	M	HCV	있음	3.7	없음	없음	1.6	1.6	1.6	0.89

[0129]

[0130] <표 3>

치료 후 질환의 증거가 없는 HCC 환자에 대한 인구 통계 및 결과. CEC는 면역형광에 의해 CK 또는 GPC3를 발현하는 세포로 정의된다. NASH, 비-알콜성 지방간염; HBV, B형 간염 바이러스; HCV, C형 간염 바이러스.

샘플	나이	성별	위험 인자	간경변 증	AFP (ng/mL)	치료	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)
HCC.033_0	85	M	혈색소침착증	없음	1.3	TACE	2.0	3.3	3.3
HCC.051	68	M	NASH	있음	2.5	절제, TACE, 이식	0.9	10.4	10.4
HCC.053	63	M	HCV, 알콜	있음	2.3	적출	0.0	6.4	6.4
HCC.055	51	M	알콜	있음	2.6	절제, 이식	2.4	5.6	8.0
HCC.058_2	54	M	HBV	있음	3.6	적출	0.0	0.0	0.0
HCC.063	68	M	HBV	있음	22.3	TACE	8.0	9.8	9.8
HCC.077	77	M	버드 키아리	없음	16.7	절제	8.0	9.8	9.8
HCC.085	71	M	NASH	있음	7.4	TACE	1.2	4.9	4.9
HCC.086	75	M	HBV	있음	2.9	절제	0.5	1.1	1.1
HCC.088	81	M	HCV	없음	1.6	절제	1.5	5.1	5.1

[0131]

[0132] <표 4>

건강한 혈액 공여자 인구 통계.

샘플	성별	나이	CK+ (세포/mL)	GPC3+ (세포/mL)	CEC (세포/mL)
HD.01	F	28	0	0.4	0.4
HD.02	M	34	0	0.4	0.4
HD.03	M	40	0	0.4	0.4
HD.04	M	29	0	2.4	2.4
HD.05	M	23	0	0	0
HD.06	M	38	0	0	0
HD.07	F	24	0	0.4	0.4
HD.08	F	26	0	0.4	0.4
HD.09	F	35	1.2	0	1.2
HD.10	F	27	0	0	0

[0133]

[0134] <표 5>

HCC를 진단하기 위한 혈액-기반 바이오마커에 대한 유전자 시그니처. 유전자 가중치는 분류자에 대한 유전자 기여도의 측정 기준으로서 기니 (Gini)의 평균 감소이다.

유전자	가중치	유전자 기능	암 관련성	공개문
TESC	5.170	형질막-유형 Na ⁺ /H ⁺ 교환 활성을 제어하여 세포 pH 조절에 필수 보조인자로 기능.	결장직장암의 전이	Kang J, et al. Tumour Biol 2016
OSBP2	4.203	지질 결합 단백질	ERK 경로를 통한 발암	Du X, et al. Semin Cell Dev Biol 2018
SLC6A8	3.937	근육 및 뇌에서 크레아틴의 흡수에 필요.	전이의 생존 증가	Loo JM, et al. Cell 2015
SEPT5	2.504	세포질분열 및 소포 트래픽킹	발암	Russell S, et al. Br J 암 2005
F2RL3	1.502	막횡단 신호전달에 관여하는 프로테아제-활성화된 수용체	폐암 위험 및 사망과 관련된 메틸화 상태	Zhang Y, et al. Int J Cancer 2015
E2F1	1.378	세포 주기 제어	증식	Zhan L, et al. Cell Signal 2014
EZH2	1.079	전사 억제 조절	변경된 전사 프로그래밍	Kim K, et al. Nat Med 2016
CDC20	0.924	세포 주기 제어	증식	Kidokoro T, et al. Oncogene 2008
CCNA2	0.894	세포 주기 제어	증식	Gao T, et al. PLOS One 2014
CCNB1	0.876	세포 주기 제어	증식, 간암중형성	Patil M, et al. Cancer Res 2009
PLXNB3	0.766	세포 이동	불명	
CDC6	0.754	세포 주기 제어	발암	Yao Z, et al. Cancer Biol Ther 2009

[0135]

유전자	가중치	유전자 기능	암 관련성	공개문
MYBL2	0.689	세포 주기 제어	증식, 생존	Musa J, et al. Cell Death Dis 2017
APOBEC3B	0.653	시타딘 테아미나제	돌연변이유발	Kuong K, et al. Nat Genet 2014
SPP1	0.648	조직 리모델링에 중요한 ECM 단백질. 또한 시토카인으로 작용.	전이와 관련	Sangaletti S, et al. Cancer Research 2014
AKR1B10	0.639	알도-케토 리덕타제	간암 세포 증식 매개	Jin J, et al. Scientific Reports 2016
TOP2A	0.606	토포이소머라제	발암	Wong N, et al. Int J Cancer 2009
ASPM	0.600	유사분열 방추체 조절	HCC에서 침습성 마커	Lin SY, et al. Clin Cancer Res 2008
SLC6A9	0.579	글리신의 나트륨-의존적 재흡수	불명	
RECQL4	0.554	게놈 불안정성에 관여하는 인간 DNA 헬리카제	HCC에서 불량한 예후 상향조절	Li J, et al. Oncology Letters 2017
NUSAP1	0.554	방추체 미세관 조직	침습 및 전이와 관련	Gordon C, et al. Oncotarget 2017
PLVAP	0.540	카베올라의 스토마탈 (stomatal) 및 페네스트랄 (fenestral) 격막 형성에 관여	강화된 전이 및 혈관형성을 갖는 암의 내피에서 유도	Carson-Walter EB, et al. Clin Cancer Research 2005
FMO1	0.523	미생체성분의 산화적 대사	불명	
PDZK1IP1	0.520	세포내 단백질 트래픽킹	면역 미세환경의 조절	Garcia-Heredia JM, et al. Oncotarget 2017
FBXO32	0.510	유비퀴틴화를 위한 기질 인식	불명	

[0136]

[0137]

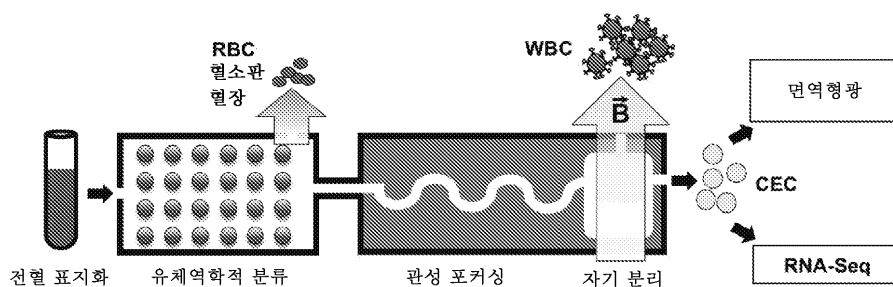
[0138]

다른 실시양태

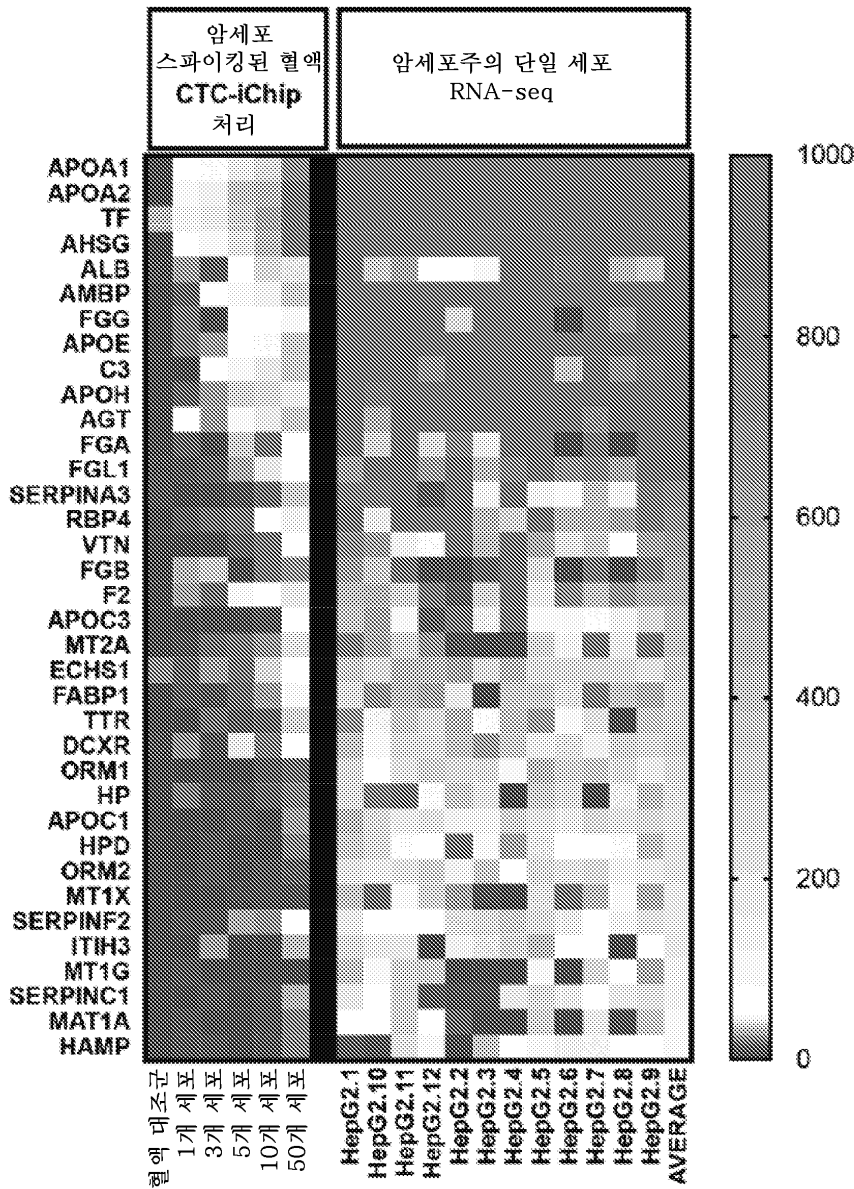
본 발명이 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 전술된 설명은 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기의 청구범위 내에 있다.

도면

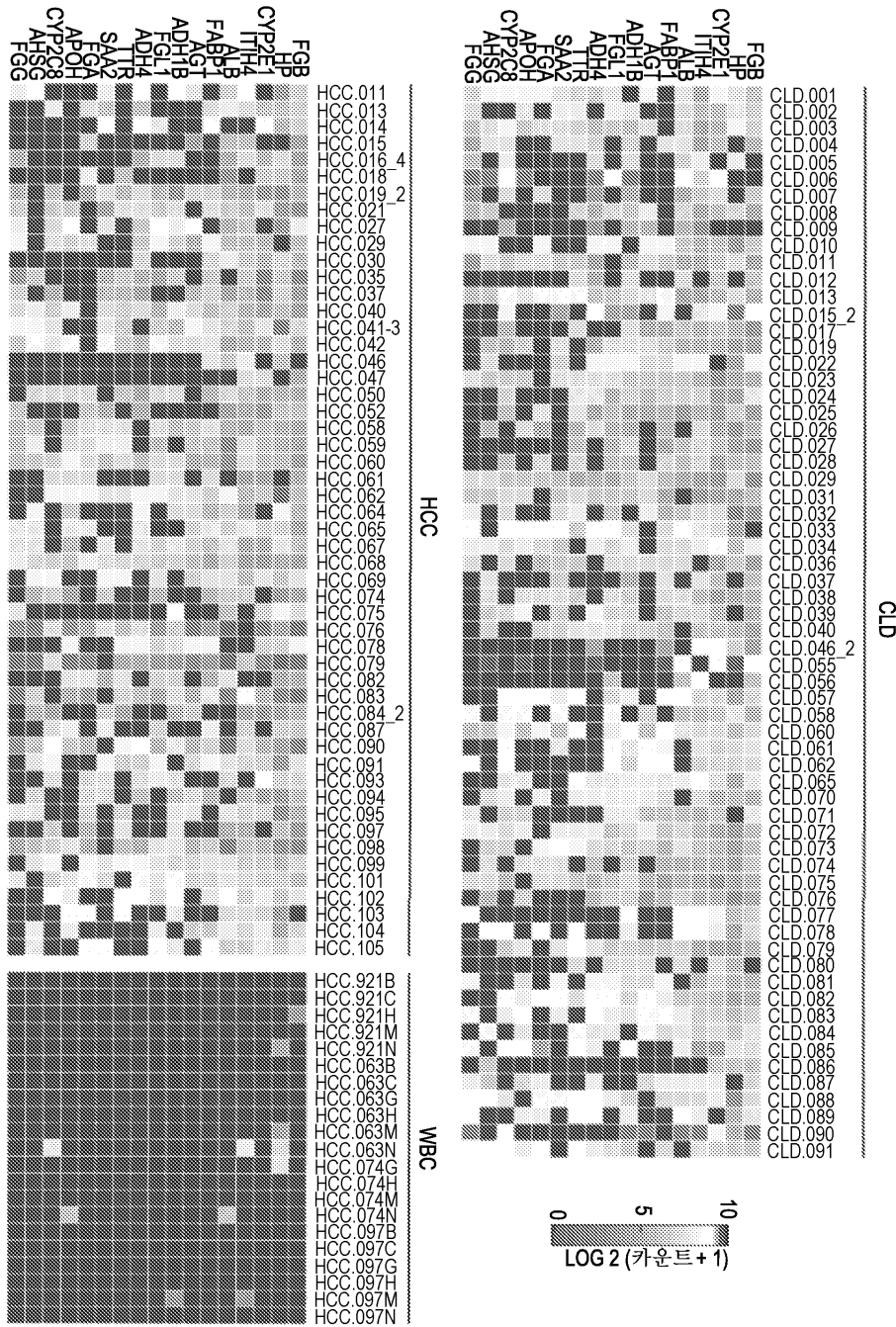
도면1



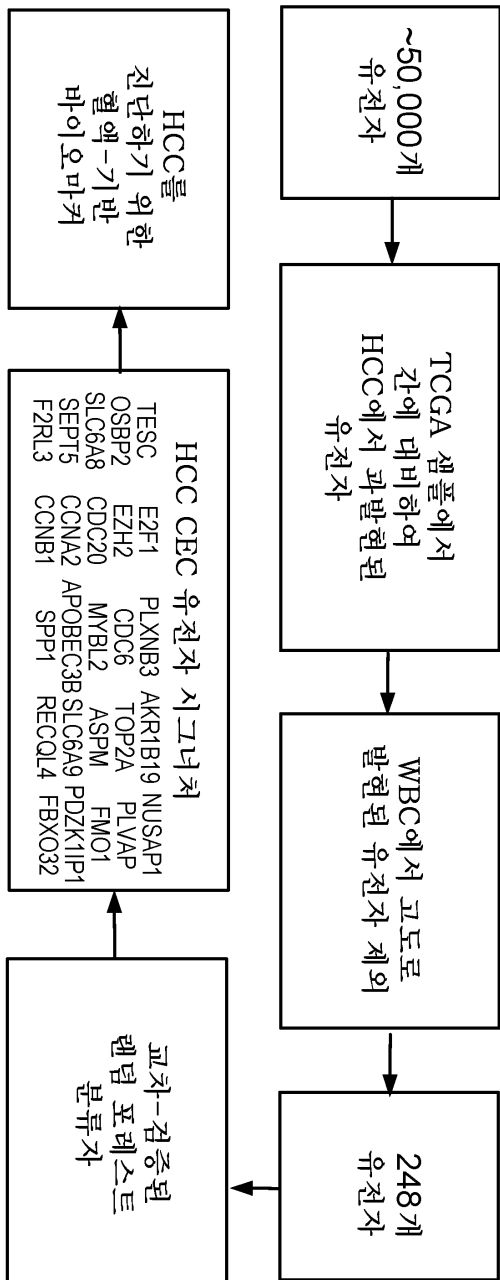
도면3a



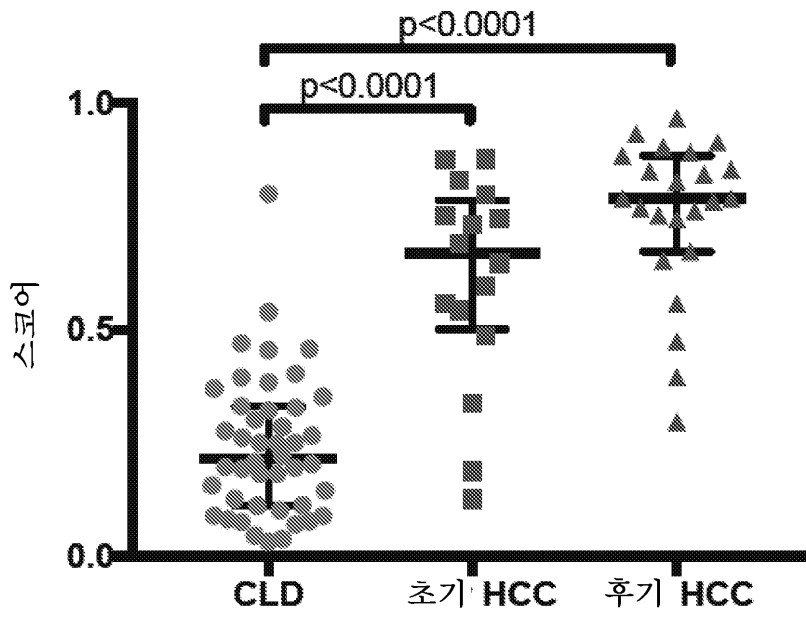
도면3b



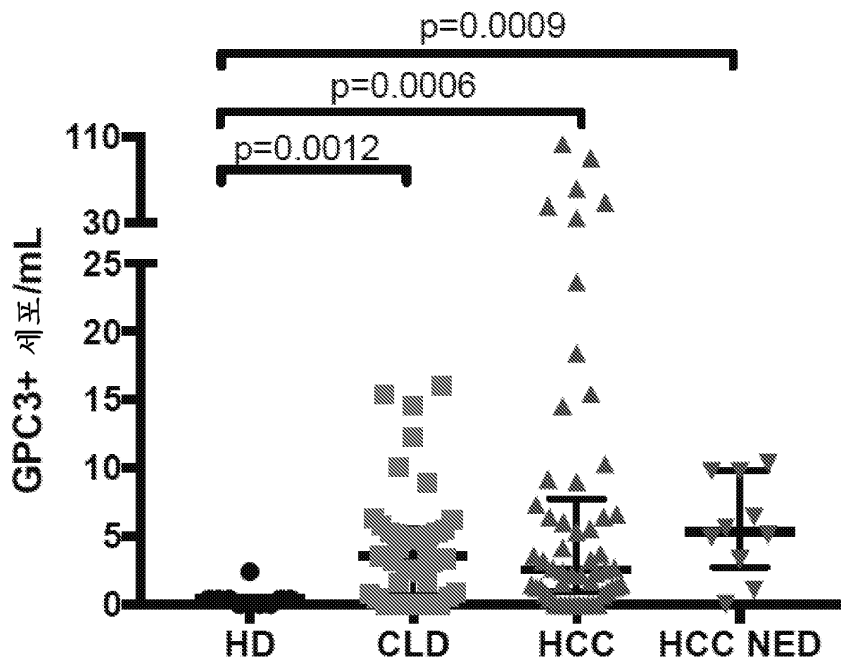
도면3c



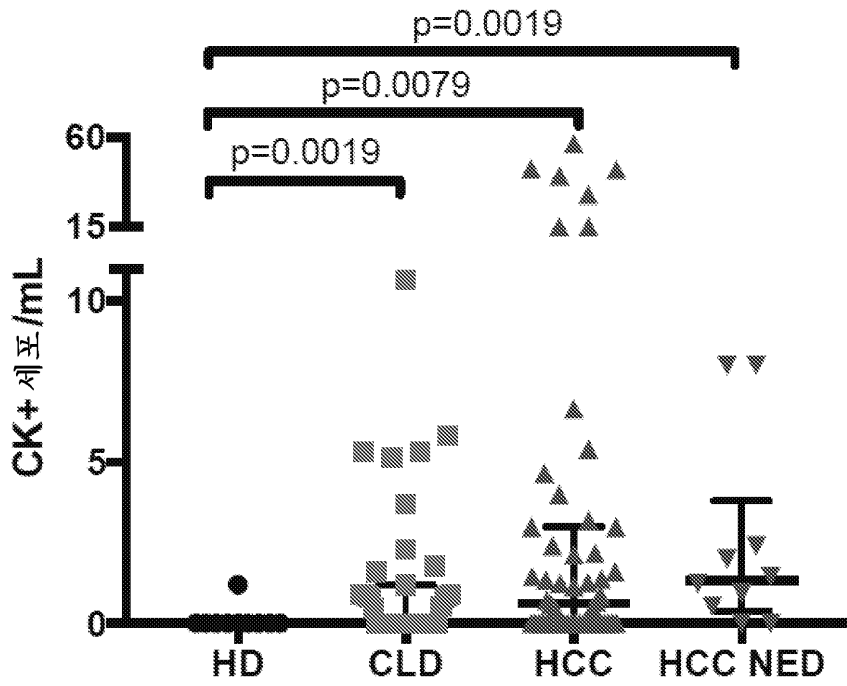
도면3d



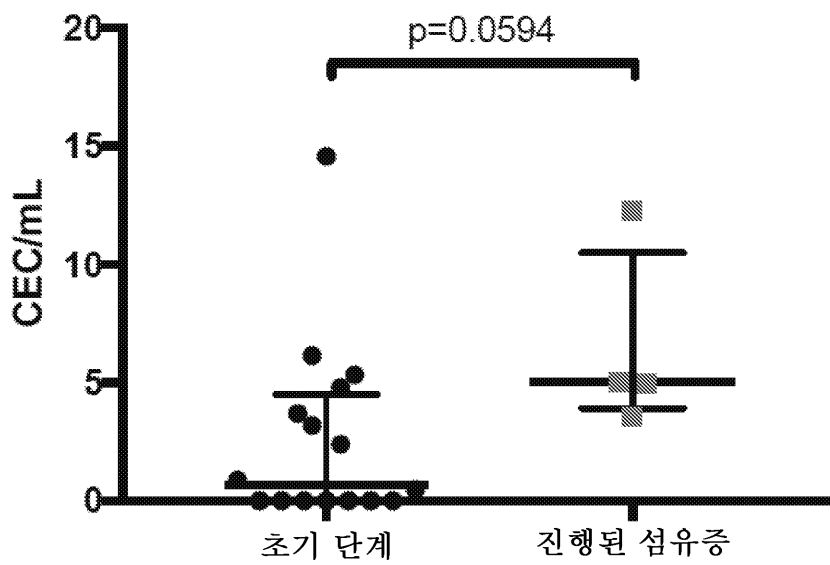
도면4a



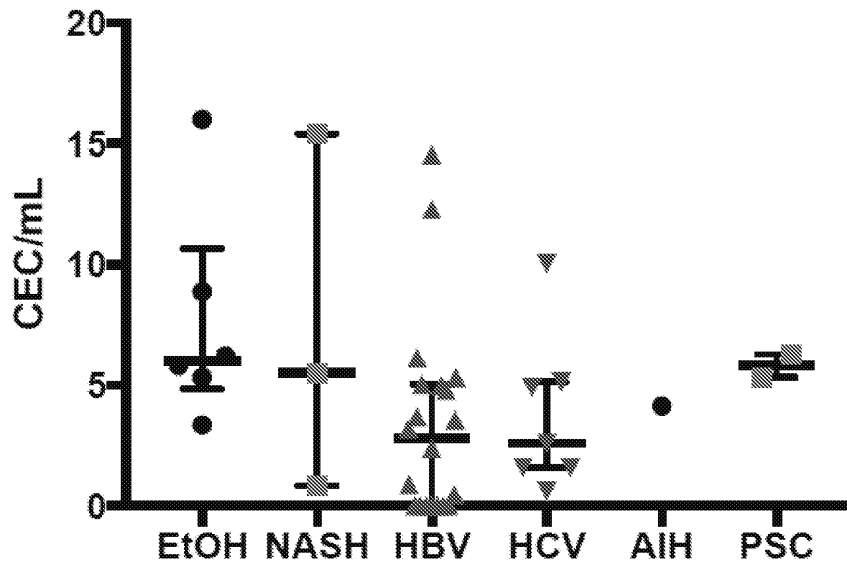
도면4b



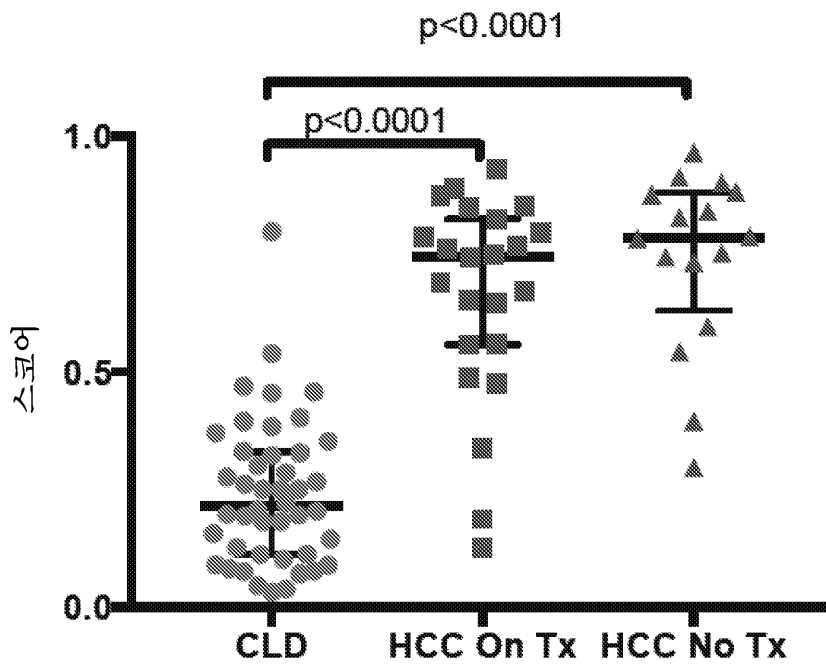
도면4c



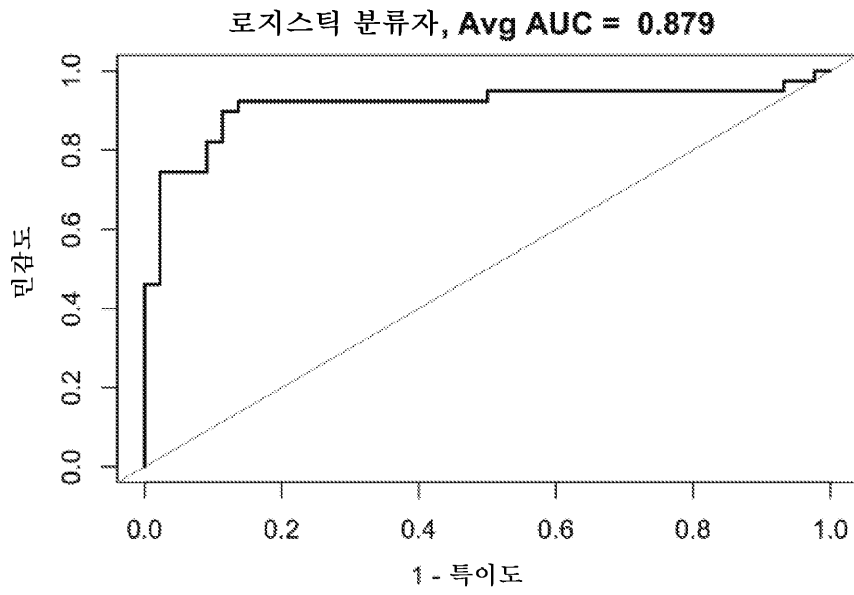
도면4d



도면5a



도면5b



도면5c

