

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2020-0040848
(43) 공개일자 2020년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/106 (2013.01)
(21) 출원번호 **10-2020-7007853**
(22) 출원일자(국제) **2018년08월27일**
심사청구일자 **없음**
(85) 번역문제출일자 **2020년03월17일**
(86) 국제출원번호 **PCT/EP2018/073050**
(87) 국제공개번호 **WO 2019/038456**
국제공개일자 **2019년02월28일**
(30) 우선권주장
17306098.9 2017년08월25일
유럽특허청(EPO)(EP)
17200028.3 2017년11월03일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
장피트
프랑스공화국, 에프-59120 로스, 빠르끄
외라장페, 릴 메트로폴, 뤼 외젠느 아비네 885
(72) 발명자
앙쥬 레미
프랑스 59000 릴 뤼 프랭세스 13
조르도니에 주느비에브
프랑스 59175 땅뿔마르스 뤼 뒤 프레지당 퐁피두
13
브로쥬 존
프랑스 59230 생-따망-레-조 뤼 알베르 까뮈-까리
에르 드모리 855
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 비알콜성 지방 간 질환, 비알콜성 지방간염 및/또는 간 섬유화의 비침습성 진단**(57) 요약**

본 발명은 비알콜성 지방 간 질환, 특히 비알콜성 지방간염, 및/또는 간 섬유화의 진단을 위한 신규한 비침습성 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

비알콜성 지방 간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH) 및/또는 간 섬유화의 진단 또는 모니터링, 및/또는 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 치료 효능의 결정을 위한 방법으로서, 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, miR-193은 hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p 또는 hsa-miR-193b-3p인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, hsa-miR-193b-3p의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 체액 샘플은 혈액, 혈장 또는 혈청의 샘플인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, miR-193의 수준은 miR-193의 기준 수준과 비교되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 간 지방증 부재의 건강한 대상체 유래 샘플에서 수득된 기준 수준보다 높은 miR-193의 수준은 NAFLD의 존재를 의미하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 비-NASH 대상체 유래 샘플에서 수득된 기준 범위 수준보다 높은 miR-193의 수준은 지방증, 소엽 염증 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점으로서 정의되는 NASH의 존재를 의미하는 것인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 활성-NASH 부재의 대상체 유래 샘플에서 수득된 기준 범위 수준보다 높은 miR-193의 수준은 활성-NASH의 존재를 의미하는 것인 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 간 섬유화 부재 또는 최소의 간 섬유화 존재 (F=0 또는 1)의 대상체 유래 샘플에서 수득된 기준 수준보다 높은 miR-193의 수준은 유의미 (F=2), 중등증 (F=3) 또는 중증 (F=4) 간 섬유화의 존재를 의미하는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, NTBT 대상체에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로, NASH 및/또는 간 섬유화의 치료의 잠재적 수신자 (TBT) 또는 비수신자 (NTBT)로서 대상체의 분류 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, TBT 및 NTBT 대상체는 하기의 간 생검-유추 등급을 갖는 것인 방법:

a) TBT1:

지방증 점수 ≥ 1

간세포 풍선화 점수 ≥ 1

소엽 염증 점수 ≥ 1

NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4

섬유화 병기 ≥ 1 (예컨대 1, 2, 3 또는 4 3과 동등한 섬유화 병기)

NTBT1:

지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소엽 염증 점수, NAS 또는 섬유화 병기 중 어느 하나에서 적어도 1점 미만 등급이 TBT1과 상이;

또는

b) TBT2:

지방증 점수 ≥ 1

간세포 풍선화 점수 ≥ 1

소엽 염증 점수 ≥ 1

NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4

섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는 3과 동등한 섬유화 병기)

NTBT2:

지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소엽 염증 점수, NAS 또는 섬유화 병기 중 어느 하나에서 적어도 1점 미만 등급이 TBT와 상이;

또는

c) TBT7:

지방증 점수 ≥ 1

간세포 풍선화 점수 ≥ 1

소엽 염증 점수 ≥ 1

NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4

섬유화 병기 = 1b, 1c, 2, 3 또는 4

NTBT2:

지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소엽 염증 점수, NAS 또는 섬유화 병기 중 어느 하나에서 적어도 1점 미만 등급이 TBT와 상이.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 동일 대상체로부터 2회 이상 따로 수집된 샘플에서 miR-193 수준의 전개를 기반으로 대상체에서 NAFLD 활성, NASH 활성 또는 간 섬유화의 전개를 모니터링하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 동일 치료 대상체로부터 2회 이상 따로 수집된 샘플에서 miR-193 수준의 전개를 기반으로, NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 치료 효능을 평가하기 위한 것인 방법.

청구항 14

각각 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화를 갖는 대상체의 치료 방법에서 사용을 위한 항-NAFLD, 항-NASH 또는 항-섬유화 화합물로서, 대상체는 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따라서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화 때문에 치료

군 환자로서 진단 또는 분류되고, 상기 진단된 대상체에게 상기 화합물이 투여되는 것인 화합물.

청구항 15

NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화를 갖는 대상체의 치료 방법에서 사용을 위한 miR-193 억제성 화합물.

청구항 16

제15항에 있어서, 대상체는 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따라 치료군으로서 진단 또는 분류된 것인 miR-193 억제성 화합물.

청구항 17

비알콜성 지방간염 (NASH)의 진단 및/또는 대상체에서 NASH의 활성, 병기 또는 중증도의 결정, 및/또는 NASH에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 대상체의 분류, 및/또는 의학적 치료 효능의 평가, 및/또는 NASH 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정, 및/또는 의학적 치료에 대한 잠재적 반응자 또는 비반응자로서 환자의 분류, 및/또는 환자에 대한 질환 결과의 예측, 및/또는 임상 관련 결과의 대리 표지자의 식별을 위한 방법으로서, 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 hsa-miR-193 및 간 손상의 적어도 하나의 다른 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자의 수준의 측정 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, NASH의 진단 또는 NASH에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 대상체의 분류를 위한 것인 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 간 손상의 적어도 하나의 다른 순환 표지자는 TIMP-1, YKL-40, 혈소판 수치, HbA1c 및 히알루론산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 대상체의 대사 증후군 점수를 결정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

- hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 및 보다 특히 hsa-miR-193b-3p), 및 적어도 하나의 간 손상의 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자의 수준을 측정하는 단계, 및
 - 수학적 알고리즘을 통해 결과를 조합하여 NASH 점수를 획득하는 단계
- 를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, NASH 점수는 하기 로지스틱 함수:

$$S1 = \frac{e^{Y1}}{1 + e^{Y1}}$$

에 따라 계산되고,

상기 식에서,

$Y1 = k + a * A + b * B + c * C + d * D + f * F$ 이고,

여기서,

S1은 NASH 점수이고;

A는 log10 카피수. μ L-1로서 miR-193의 수준이고;

B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;

C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;

D는 10^9 /L로서 혈소판 수치이고;

F는 범주에서 대사 증후군의 수준이고;

k는 로지스틱 함수의 상수이고;

a는 miR-193 (특히 hsa-miR-193b-3p)의 수준과 연관된 계수이고;

b는 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;

c는 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;

d는 혈소판 수치와 연관된 계수이고;

f는 대사 증후군과 연관된 계수이며,

방법은 부트스트랩 모델로부터 유추되고, 여기서

k는 -8.39 내지 -2.67를 포함하는 수, 특히 -5.53이고,

a는 0.58 내지 2.50를 포함하는 수, 특히 1.54이고,

b는 $2.29E-03$ 내지 $1.87E-02$ 를 포함하는 수, 특히 $1.05E-02$ 이고,

c는 $2.14E-06$ 내지 $1.65E-05$ 를 포함하는 수, 특히 $9.34E-06$ 이고,

d는 $-1.56E-02$ 내지 $-1.05E-03$ 을 포함하는 수, 특히 $-8.32E-03$ 이고,

f는 0.03 내지 1.63을 포함하는 수, 특히 0.83이고,

한계치는 0.3050 내지 0.6518, 특히 0.3993을 포함하고,

0.2017 내지 0.4645를 포함하고, 특히 0.2302와 동등한 한계치보다 높은 NASH 점수는 중증 NASH, 또는 중등도 또는 고도의 NASH 활성을 의미하며, 따라서 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖는 환자를 의미하는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, NASH 점수는 하기 로지스틱 함수:

$$S2 \sim \frac{e^{Y2}}{1 + e^{Y2}}$$

에 따라 계산되고,

상기 식에서,

$Y2 = 1 + a2^*A + c2^*C + b2^*B + e^*E + g^*G + d2^*D$ 이고,

여기서,

S2는 NASH 점수이고;

A는 $\log_{10}$ 카피수. μL^{-1} 로서 hsa-miR-193의 수준이고,

C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;

B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;

E는 백분율로서 HbA1c의 수준이고;

G는 ng/mL로서 히알루론산의 수준이고;

D는 10^9 /L로서 혈소판 수치이고;

l은 로지스틱 함수의 상수이고;

a2는 miR-193의 수준 (특히 hsa-miR-193b-3p)과 연관된 계수이고;

c2는 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;

b2는 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;

e는 HbA1c의 수준과 연관된 계수이고;

g는 히알루론산의 수준과 연관된 계수이고;

d2는 혈소판 수치와 연관된 계수이며,

방법은 부트스트랩 모델로부터 유추되고, 여기서

l은 -10.92 내지 -3.89를 포함하는 수, 특히 -7.52이고,

a2는 0.44 내지 2.17을 포함하는 수, 특히 1.29이고,

c2는 0.0035 내지 0.02를 포함하는 수, 특히 0.01이고,

b2는 0.0016 내지 0.018을 포함하는 수, 특히 0.0092이고,

e는 -0.0053 내지 0.0057을 포함하는 수, 특히 -0.0024이고,

g는 0.13 내지 1.08을 포함하는 수, 특히 0.59이고,

d2는 -0.017 내지 -0.0027를 포함하는 수, 특히 -0.009이고,

한계치는 0.2461 내지 0.6252, 특히 0.4216를 포함하며,

0.2461 내지 0.6252를 포함하고, 특히 0.4216과 동등한 한계치보다 높은 NASH 점수는 중증 NASH, 또는 중등도 또는 고도의 NASH 활성을 의미하고; 따라서 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖는 환자를 의미하는 것인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, NASH 점수는 하기 로지스틱 함수:

$$S3 \sim \frac{e^{Y3}}{1 + e^{Y3}}$$

에 따라 계산되고,

상기 식에서,

$Y3 = m + a3 \cdot A' + c3 \cdot C + b3 \cdot B + e2 \cdot E + g2 \cdot G + d3 \cdot D$ 이고,

여기서

S3은 본 발명에 따른 NASH 점수이고;

A'은 Cq로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;

C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;

B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;

E는 백분율로서 HbA1c의 수준이고;

G는 ng/mL로서 히알루론산의 수준이고;

D는 10^9 /L로서 혈소판 수치이고;

m은 로지스틱 함수의 상수이고;

a3은 miR-193의 수준 (특히 hsa-miR-193b-3p)와 연관된 계수이고;

c3은 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;

b3은 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;

e2는 HbA1c의 수준과 연관된 계수이고;

g2는 히알루론산의 수준과 연관된 계수이고;

d3은 혈소판 수치와 연관된 계수이며,

방법은 부트스트랩 모델로부터 유추되고, 여기서

m은 -1.27 내지 17.54를 포함하는 수, 특히 8.08이고,

a3은 -0.64 내지 -0.09를 포함하는 수, 특히 -0.38이고,

c3은 0.005 내지 0.019를 포함하는 수, 특히 0.01이고,

b3은 0.001 내지 0.016을 포함하는 수, 특히 0.01이고,

e2는 -0.0054 내지 0.0045를 포함하는 수, 특히 0.0024이고,

g2는 0.12 내지 1.08을 포함하는 수, 특히 0.57이고,

d3은 -0.0164 내지 -0.0016을 포함하는 수, 특히 -0.0090이고,

한계치는 0.2270 내지 0.6364, 특히 0.3741을 포함하고,

0.2270 내지 0.6364를 포함하고, 특히 0.3741과 동등한 한계치보다 높은 NASH 점수는 중증 NASH, 또는 중등도 또는 고도의 NASH 활성을 의미하고; 따라서 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖는 환자를 의미하는 것인 방법.

청구항 25

(i) hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 및 보다 특히 hsa-miR-193b-3p)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 표지자, 및

(ii) 적어도 하나의 간 손상의 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자

의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트.

청구항 26

제25항에 있어서,

(i) hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 및 보다 특히 hsa-miR-193b-3p)으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 표지자; 및

(ii) 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 사용된 상응하는 적어도 하나의 간 손상의 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자

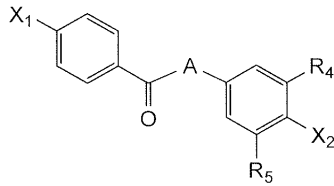
의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 것인 키트.

청구항 27

NASH의 치료 방법에서 사용을 위한 항-NASH 분자로서, 상기 항-NASH 분자는 NASH로 진단되거나 또는 제1항 내지 제11항 중 어느 하나에 따른 방법에 따라 분류되거나, 특히 NASH에 대한 치료의 수신자로서 분류된, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여되는 것인 항-NASH 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 분자는 하기 화학식 (I)의 분자 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 항-NASH 분자:



[상기 식에서,

X1은 할로젠, R1, 또는 G1-R1 기를 나타내고;

A는 CH=CH 또는 CH2-CH2 기를 나타내고;

X2는 G2-R2 기를 나타내고;

G1 및 G2는 동일하거나 또는 상이하게, 산소 또는 황의 원자를 나타내고;

R1은 수소 원자, 미치환된 알킬 기, 아릴 기, 또는 하나 이상의 할로젠 원자, 알콕시 또는 알킬티오 기, 시클로알킬 기, 시클로알킬티오 기 또는 복소환 기로 치환된 알킬 기를 나타내고;

R2는 적어도 -COOR3 기로 치환된 알킬 기를 나타내고, R3은 수소 원자, 또는 하나 이상의 할로젠 원자, 시클로알킬 기, 또는 복소환 기로 치환되거나 또는 미치환된 알킬 기를 나타내고.

R4 및 R5는 동일하거나 또는 상이하게, 하나 이상의 할로젠 원자, 시클로알킬 기, 복소환 기로 치환되거나 또는 미치환된 알킬 기를 나타냄].

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 화합물은 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시 페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-이소프로필옥시 카르보닐디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐디메틸메틸옥시페닐] 프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸페닐]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐 디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸페닐]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸 옥시페닐]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐디메틸메틸옥시 페닐] 프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸옥시페닐]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸 옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 2-[2,6-디메틸-4-[3-[4-(메틸티오)페닐]-3-옥소-프로필] 페녹시]-2-메틸프로판산, 및 2-[2,6-디메틸-4-[3-[4-(메틸티오) 페닐]-3-옥소-프로필]페녹시]-2-메틸-프로판산 이소프로필 에스테르; 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 특히 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시 페닐]프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 항-NASH 분자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비알콜성 지방 간 질환, 특히 비알콜성 지방간염, 및/또는 간 섬유화의 진단을 위한 신규한 비침습성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비알콜성 지방 간 질환 (NAFLD)은 과도한 알콜 소비 이외의 원인으로 인한 간 내 지방의 축적 (지방증)으로서 정의되는 침묵 질환이다. NAFLD는 간 전문의가 조사한 환자에서 상승된 아미노트랜스퍼라제가 가장 일반적인 원인이다. NAFLD는 양성 단순 지방증부터 일부 환자의 경우 병적 상태인 비알콜성 지방간염 (NASH)의 범위에 이르고, NASH는 괴사/염증 과정이 간에서 섬유화의 진행성 축적을 유발시켜, 궁극적으로 간경변증, 간부전, 간세포 암종 (HCC), 간 이식 및 간성 사망을 초래한다. 유행병학 및 병리생리학 둘 모두의 관점에서, NAFLD 및 NASH는 비만, 대사 증후군 및 2형 당뇨병과 밀접하게 연관된다. 그러므로, 비만 및 2형 당뇨병

병의 유행과 병행하여, NAFLD 및 NASH의 유병률은 지난 수십여년간 극적으로 증가되었으며 NASH는 미국에서 간 이식의 1차 원인이 되고 있다. 결론적으로, NASH는 진단을 위한 최적 해결법이 없고 아직도 NASH에 대해 승인된 치료가 없는 것으로 알려진 전세계적으로 증가되고 있는 공중 보건 문제로서 간주된다.

- [0003] NAFLD는 초음파 기술을 사용하여 간에서의 지방 축적 존재를 검출하여 진단할 수 있지만, NASH 및 NASH-연관 간 섬유화는 간 생검의 조직학적 검사를 통해서만 진단될 수 있다. 간 생검의 현미경 검사에서, NASH는 소엽 염증 징후 및 손상된 간세포 (간세포의 풍선화 또는 괴사)와 연관된 지방산 축적 (지방 소립)으로 정의된다. 섬유화가 NASH의 진단에 요구되는 조직학적 특성은 아니지만, 간 섬유화의 존재 및 병기 결정은 질환의 중증도, 및 간경변증, HCC (간세포 암종) 및 간-관련 환자 사망인 간성 사망으로의 발전 위험성을 평가하는데 핵심적이다.
- [0004] 조직학적 채점/병기결정 체계가 NAFLD 활성 수준 및 섬유화 병기를 평가하고 임상적 간 결과로의 발전 위험성을 추정하기 위해 개발되었다. NAFLD-활성-점수 (NAS)는 질환의 활성을 평가하기 위해 개발되었다. NAS는 지방증 (0 내지 3), 소엽 염증 (0 내지 3), 간세포 풍선화 (0 내지 2)에 대한 비가중 생검 개별 점수의 총합이다. Kleiner 등 (Hepatology, 2005; 41:1313-21)에 따르면, NAS는 간 생검 슬라이스로부터 만들어진 3가지 조직학적 점수의 총합이다:
- [0005] - S: 지방증 점수: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66% 및 3: >66%
- [0006] - LI: 소엽 염증 점수 (20x 시야 당 병소): 0: 없음; 1: <2; 2: 2-4 및 3: >4
- [0007] - HB: 풍선화 변성 점수: 0: 없음; 1: 약간; 2: 다수 세포/현저한 풍선화.
- [0008] 이러한 채점 체계를 사용하여 NASH가 있는 환자는 지방증에서 적어도 1점, 소엽 염증에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화에서 적어도 1점으로 $NAS \geq 3$ 을 갖는다. 환자는 지방증에서 적어도 1점, 염증에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화에서 적어도 1점으로 $NAS \geq 4$ 일 때 활성-NASH를 갖는 것으로 간주된다.
- [0009] 조직학적 검사에서 섬유화의 국제화 및 그 정도는 질환의 중증도 (진행도)를 나타내고 NASH-CRN은 전용 섬유화 병기결정 체계를 개발하였다 (Kleiner et al., Hepatology, 2005; 41:1313-21):
- [0010] 동주위 또는 문맥주변부 섬유화 1
- [0011] 경증 동주위 섬유화 (3구역) 1a
- [0012] 중등증 동주위 섬유화 (3구역) 1b
- [0013] 문맥/문맥주변부 섬유화 1c
- [0014] 동주위 및 문맥/문맥주변부 섬유화 2
- [0015] 가교 섬유화 3
- [0016] 간경변증 4
- [0017] 이러한 섬유화 병기결정 체계를 사용하여, 섬유화가 부재하거나 또는 최소의 섬유화 ($F=0-1$)가 존재하는 환자는 일반적으로 간경변증, HCC 또는 간성 사망의 위험성이 있다고 간주되지 않는다. 유의미 (significant) ($F=2$) 및 중등증 섬유화 ($F=3$)를 갖는 환자는 간경변증, 간부전, HCC 및 간성 사망이 발생할 위험성이 높다. 대상성 간경변증을 갖는 환자는 중증 섬유화 ($F=4$)를 가지며 간부전 (비대상성 간경변증), HCC 및 간-관련 사망의 위험성이 높다.
- [0018] 광범위하게 용인되는 이들 2가지 채점 및 병기결정 체계로부터 유추하여, 최근에는 소엽 염증 점수 및 간세포 풍선화 점수의 총합으로서 정의될 수 있는 활성 지수 (AI)에 특별히 주목하고 있다. 또한 [Munteanu et al., Aliment Pharmacol Ther., 2016, 44(8):877-89]는 지방증, 질환 활성 및 섬유화의 점수를 개별적으로 보고하도록 SAF 서명을 제안하였다.
- [0019] 상기에 언급된 NAS, AI 및 간 섬유화의 병기결정을 사용한 NAFLD 및 NASH의 진단, 및 질환 활성의 채점은 그의 임상적 사용을 불가능하게 하는 수많은 분명한 단점을 갖는 간 생검을 요구한다. 실제로, 간 생검은 환자에게 성가시고, 걱정스러우며 고통스러울 수 있는 침습성 시술이고 간 생검은 출혈과 심지어 사망의 위험성과 연관된다. 따라서, NASH 및 간 섬유화의 급속한 확산 증가 때문에 그리고 생검이 충분히 효율적이고 안전한 시술이라고 할 수 없기 때문에, NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 진단을 위해 새로운 비침습성 방법에 대한 시

급한 요구가 존재한다.

[0020] NAFLD를 진단하기 위해 초음파 및 영상 기법 (초음파검사, CAP (controlled attenuation parameter), 자기 공명 영상법 (MRI), 및 MRI-DPPF (MRI-estimated proton density fat fraction))이 개발되었다. 그러나, 이들 기법은 관찰자간 및 관찰자내 가변성과, 비용에 의해 제한적이고/이거나 시간 소모적이다. 또한, MRI-DPPF는 일상으로 이용가능하지 않으며 너무 복잡하여 임상 실습에서 사용할 수 없다. 게다가, 섬유화 병기는 F2 섬유화 환자에서 높은 위험성이 분명하여서, 용량 의존적 방식으로 전-원인 사망률과 연관된다. 초음파-기반 탄성영상법 예컨대 Fibroscan 및 진단과 탄성영상법은 진행성 섬유화 또는 간경변증의 진단에서 중등도 내지 고도의 정확도를 갖는다. 그러나, F2 섬유화는 진행성 섬유화 병기는 아니므로 이들 기술을 사용하여 정확하게 검출될 수 없다.

[0021] 초음파 및 영상 기법 이외에도, NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 신뢰할만하고, 단순하며 비용-효율적인 비침습성 검출을 위한 신규 순환성 생물표지자의 식별 및 검증에 엄청난 노력이 집중되어 왔다. 하기 표는 NAFLD/NASH 및/또는 간 섬유화에서 조절되는 것으로 보고된 개별 생물표지자를 열거한다.

간세포 기능	지방 조직	물질대사	산화 스트레스/아포토시스	섬유화	염증
ALT AST ALP GGT 합토글로빈 알부민 빌리루빈 혈소판 수치	아디포넥틴 렘틴 레시스틴	공복 혈장당 공복 인슐린 HOMA 지수 트리글리세리드 HDL-콜레스테롤 VLDL-C 아포리포단백질 (ApoA1, ApoB, ApoCIII)	말론디알데히드 TBARS Ox LDL CK18-M30 CK18-M65 페리틴 YKL-40 (CHI3L1)	피브로넥틴 히알루론산 제 IV 형 콜라겐 PIIINP TIMP-1	TNFA IL1b, IL6, IL8, IFNg, TGfb hs-CRP MCP1 sCD14

[0022]

[0023] 몇몇 연구들은 이들 혈청 생물표지자 중 일부가 트랜스아미나제와 같은 간 기능부전의 통상적인 혈청 표지자보다 더 양호한 진단적 가치를 갖는다고 제안하였다 (Naveau S. et al., Clin Gastroenterol Hepatol., 2005; 3(2): 167-74; Castera L. et al., J. Hepatol. 2000; 32:412-8; Annoni G. et al. Hepatology. 1989; 9:693-7; Nojgaard C. et al. J Hepatol. 2003;39: 179-86; Chossegros P. 1995; 22(2 Suppl):96-9). 그러나, 어떠한 이들 연구도 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 진단을 위한 강력한 생물표지자를 실제로 식별하고 검증하지 못하였다. 진단 성능을 개선시키고자 하는 시도로, 몇몇 생물표지자 및/또는 통상의 변수를 조합하여 다변량 점수를 생성시켰지만 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화가 존재하는 환자의 식별을 위한 그들 진단 성능은 대체로 여전히 개선의 여지가 남아있다.

[0024] NASH는 NAFLD에 비해 빠른 섬유화 진행도와 연관되며 현재는 약물 치료의 주요 표적이다. NASH 환자는 섬유화 병기가 진행됨에 따라 예후가 악화되어, 간경변증이 발생되고 심혈관계 및 간-관련 원인으로 사망할 가능성이 높다 (Ekstedt et al., 2015). 제안된 수많은 혈청 생물표지자, 조합 패널, 및 영상 생물표지자에도 불구하고, NAFLD, NASH 및 간 섬유화를 진단하고 모니터링하기 위한 효과적이고, 덜 침습적이며, 보다 적당한 방법, 특히 독립적인 임상 검증 패널로 확증된 방법의 발견이 여전히 필요하다.

[0025] HCC, 간경변성 합병증 및 간 관련 사망이 발생할 위험성이 있는 환자의 식별이 간 평가의 궁극적인 이유이다.

발명의 내용

[0026] 본 발명자는 환자의 상이한 코호트에 대해 개개의 매우 섬세하고 완벽한 분석을 수행하여 비알콜성 지방 간 질환 (NAFLD), 비알콜성 지방간염 (NASH) 및 간 섬유화에 대한 신규하고 고도로 민감한 비침습성 진단 및 모니터링 방법을 제공하였다. 본 명세서에 제공된 데이터는 miR-193가 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화와 연결된 강력한 순환 생물표지자라는 것을 입증한다. 이 생물표지자는 3개의 독립적인 임상 코호트 덕분에 검증되었다. 그러므로, 본 발명의 방법은 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화를 앓는 것으로 대상체의 진단, 모니터링 및 위험도 분류를 할 수 있게 한다. 본 발명자들은 또한 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화를 잠재적으로 앓는 대상체의 진단, 모니터링 및 위험군 분류를 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 또한 신규한 치료적 처치의 개발을 가능하게 할 것이다.

[0027] 따라서, 본 발명은 대상체에서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 진단을 위한 방법을 제공하고, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

- [0028] 이들 방법은 대상체의 체액에서 miR-193의 수준의 결정을 기반으로 한다. 본 명세서에 제시된 모든 방법 및 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 miR-193 마이크로RNA는 hsa-miR-193 마이크로RNA, 예컨대 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p 및 hsa-miR-193b-3p로 이루어진 군으로부터 선택되는 hsa-miR-193일 수 있다. 특정한 실시형태에서, hsa-miR-193b-3p의 수준이 결정된다. 본 명세서에서 제시되는 모든 방법 및 실시형태에서, 체액 샘플은 혈액, 혈액-유래 유체 (예컨대 혈청 및 혈장, 특히 무혈소판 혈장, 예를 들어 세포-무함유, 시트레이트-유래 무혈소판 혈장 샘플), 타액, 뇌척수액 또는 소변의 샘플일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 체액은 혈소판이 고갈되거나 또는 그렇지 않은 혈장 또는 혈청이다.
- [0029] 본 발명의 방법에서, 대상체에서 miR-193의 체액 수준은 miR-193의 기준 수준과 비교될 수 있다. "기준 수준"은 기준 대상체 유래의 유사하게 처리된 샘플에서 실험적으로 결정된 수준 또는 사전결정된 표준을 의미한다. 본 발명의 방법의 목적에 따라서, 기준 대상체는 건강한 대상체, NAFLD는 존재하지만 NASH는 부재하는 대상체, NASH는 존재하지만 활성 NASH는 부재하는 대상체, 또는 간 섬유화가 부재하거나 또는 최소로 존재하는 대상체일 수 있다. 기준 대상체는 또한 위약 처리된 환자일 수 있다. 기준 수준은 또한 대상체에서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 전개를 결정할 수 있게 하고, 특히 제공되는 방법에 따라서, 질환 활성 또는 섬유화의 전개, 또는 질환 치료의 효능을 결정할 수 있게 하는, 동일 대상체로부터 과거에 획득된 유사하게 처리된 체액 샘플에서 결정된 miR-193의 수준일 수 있다.
- [0030] 따라서, 특정한 실시형태에서, 대상체에서, NAFLD의 진단 및/또는 검출, 또는 잠재적 NAFLD의 진단 및/또는 검출은 간 지방증이 부재하는 건강한 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0031] 특정한 실시형태에서, 대상체에서, NASH의 진단 및/또는 검출, 또는 잠재적 NASH의 진단 및/또는 검출은 비-NASH 대상체 예컨대 건강한 대상체, NAS<3인 대상체 또는 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0032] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 활성-NASH의 진단 및/또는 검출, 또는 잠재적 활성-NASH의 진단 및/또는 검출은 건강한 대상체, NAS<4인 대상체 또는 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 활성-NASH, 또는 잠재적 활성-NASH의 진단 및 검출의 경우, 기준 수준은 지방증에서 1점, 소염 염증에서 1점 및 간세포 풍선화 점수에서 1점인 NAS=3인 대상체에서 측정된 miR-193의 수준이다.
- [0033] 추가 실시형태에서, 대상체에서, 간 섬유화 ($F \geq 1$), 또는 잠재적 간 섬유화 ($F \geq 1$)의 진단 및 검출은 간 섬유화가 부재 ($F=0$)하는 건강한 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0034] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 유의미 ($F=2$), 중등증 ($F=3$) 또는 중증 ($F=4$; 즉, 간경변증) 간 섬유화, 또는 잠재적 유의미 간 섬유화, 잠재적 중등증 간 섬유화, 또는 잠재적 중증 간 섬유화의 진단 및 검출은 간 섬유화가 부재 ($F=0$)하거나 또는 최소 ($F=1$) 간 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0035] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 유의미 ($F=2$), 중등증 ($F=3$) 또는 중증 ($F=4$) 간 섬유화, 또는 잠재적 유의미 간 섬유화, 잠재적 중등증 간 섬유화, 또는 잠재적 중증 간 섬유화의 진단 및 검출은 최소 간 섬유화 ($F=1$)가 존재하는 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 다른 특정한 실시형태에서, 기준 수준은 $F=1a$, $1b$ 또는 $1c$ 인 대상체에서 측정된다.
- [0036] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 유의미 간 섬유화, 또는 잠재적 유의미 간 섬유화의 진단 및 검출은 최소 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0037] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 중등증 간 섬유화, 또는 잠재적 중등증 간 섬유화의 진단 및 검출은 유의미 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0038] 다른 실시형태에서, 대상체에서, 중증 섬유화, 또는 잠재적 중증 섬유화의 진단 및 검출은 중등증 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다.
- [0039] 추가 목적에 따라서, 본 발명은 하기 정의된 바와 같은 NTBT 환자에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서 체

액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로, NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 잠재적 수신자 (치료군, 또는 TBT) 또는 비수신자 (비치료군, 또는 NTBT)로서 대상체의 분류를 위한 방법에 관한 것이다.

- [0040] 추가 실시형태에서, 본 발명은 또한 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 수준의 결정을 기반으로, 대상체에서 NAFLD 활성 수준, NASH 활성 수준 및/또는 간 섬유화 병기의 결정을 위한 방법을 제공한다.
- [0041] 다른 양상을 통해서, 본 발명은 또한 대상체의 체액 샘플에서 결정된 miR-193의 수준을 기반으로 NAFLD 또는 NASH 환자의 간경변증 및 다른 간 결과 (예컨대 HCC 및 간-관련 사망)로 간 섬유화의 전개 위험성 예후인, 섬유화의 임상 예후를 가능하게 한다.
- [0042] 본 발명은 또한 과거 동일 대상체에서 수집된 하나 이상의 체액 샘플(들) 유래 miR-193의 기준 수준에 비해서 대상체의 체액 샘플 중 miR-193 수준의 전개를 기반으로, 대상체에서 NAFLD 활성 수준, NASH 활성 수준 및/또는 간 섬유화 병기의 전개를 모니터링하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법에서, miR-193의 수준의 증가는 질환 활성 및 섬유화가 진행되는 것을 의미하는 반면 miR193 수준의 감소는 질환 활성 및 섬유화 감소를 의미한다.
- [0043] 본 발명은 또한 과거에 동일 대상체에서 수집된 하나 이상의 체액 샘플(들) 유래 miR-193의 기준 수준에 비해서 대상체의 체액 샘플 중 miR-193 수준의 전개를 기반으로 대상체에서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 치료 효율을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법에서, miR-193의 수준의 증가 또는 안정한 miR-193의 수준은 치료가 효율적이지 않음을 의미하는 반면 miR-193의 수준의 감소는 치료가 효율적임을 의미한다. 이 방법의 다른 실시형태에서, 안정한 miR-193의 수준은 또한 대상체의 NASH, NAFLD 또는 간 섬유화 상태를 안정화시키는데 효율적이고, 그리하여 대상체가 결정적 결과 예컨대 간경변증, HCC 또는 간-관련 사망으로 전개될 위험성을 감소시킨다는 것을 의미할 수 있다.
- [0044] 본 발명은 또한 비반응자 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서 체액 샘플 중 miR-193의 차등적 수준의 검출을 기반으로 특이적 치료 (반응자 대상체)에 대한 대상체의 반응을 예측 (NAFLD, NASH 활성 및 간 섬유화 병기에서 변화의 예측)하기 위한 방법을 제공한다.
- [0045] 다른 양상에서, 본 발명은 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화, 또는 잠재적 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화를 진단하거나, 또는 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화로부터 임상 결과 (예를 들어, 간경변증, 간경변성 합병증 및/또는 간-관련 사망)로의 전개 위험성이 있는 대상체를 식별하는 방법을 제공하고, 이 방법은 YKL-40 (CHI3L1), 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1) (TIMP-1), 혈소판 수치, 히알루론산 (HYUA2), 및 당화 헤모글로빈 (HbA1c)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 표지자 및 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 환자의 대사 증후군 (ms) 상태를 결정하는 단계를 더 포함한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 miR-193 및 YKL-40의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 이러한 양상의 추가의 특정한 실시형태에서, 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0046] (i) 대상체 유래 체액 샘플에서 miR-193의 수준, 예컨대 hsa-miR-193a-5p, hsa-miR193a-3p, hsa-miR-193b-5p, 또는 hsa-miR-193b-3p의 수준을 결정하는 단계;
- [0047] (ii) - YKL-40 (CHI3L1), 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 혈소판 수치, 히알루론산 (HYUA2), 및 당화 헤모글로빈 HbA1c의 양을 어세이하는 단계; 또는
- [0048] - 대상체 유래 체액 샘플에서, YKL-40 (CHI3L1), 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 혈소판 수치의 양을 어세이하고, 대상체가 대사 증후군 (ms)을 갖는지 여부를 결정하는 단계;
- [0049] (iii) 단계 (i) 및 (ii)에서 수득된 결과를 기반으로 대상체에 대한 점수를 결정하는 단계; 및
- [0050] (iv) 대상체에서 NASH 진행 위험성을 결정하기 위해서 점수를 컷오프 값과 비교하는 단계. 예시적인 실시형태에서, miR-193b-3p, YKL-40, TIMP-1, 및 혈소판 수치의 각각의 값 및 ms의 결정은 모두 이 방법으로 어세이된다. 다른 예시적인 실시형태에서, miR-193b-3p, YKL-40, TIMP-1, HYUA2, HbA1c, 및 혈소판 수치의 각각의 값은 모두 이 방법으로 어세이되고 컷-오프 값은 Cq 또는 log10 카피수. μL^{-1} 로서 혈액-유래 샘플의 miRNA 수준으로 결정된다.
- [0051] 다른 실시형태에서, 방법은 miR-193, YKL-40, TIMP-1, 혈소판 수치, 히알루론산 (HYUA2), 및 당화 헤모글로빈 HbA1c의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 방법은 miR-193, YKL-40, TIMP-1, 혈소판 수치 및 히알루론산 (HYUA2)의 수준을 결정하는 단계, 및 환자의 대사 증후군 상태를 결정하는 단계를 포함한다. 이러한 양상의 임의의 실시형태에서, 바람직한 이형은 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-

miR-193b-5p 또는 hsa-miR-193b-3p의 수준, 특히 hsa-miR-193b-3p의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0052]

도 1: TBT 환자의 3가지 상이한 정의: TBT1, TBT2 및 TBT7에 따른 포함시 GOLDEN-DIAG의 비치료군 (Not-To-Be Treated) (NTBT) 및 치료군 (To-Be-Treated) (TBT) 환자, 및 건강한 대상체 (n=100)에서 hsa-miR-193b-3p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계적 유의성은 크루스칼 월리스 (Kruskal Wallis) ANOVA 검정 이후 던 (Dunn)의 다중 비교 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001. NTBT1 n=83, TBT1 n=187; NTBT2 n=161, TBT2 n=109, NTBT7 n=119, TBT7 n=151

TBT1 = 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F ≥ 1

TBT2= 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F ≥ 2

TBT7= 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F = 1b, 1c, 2, 3 또는 4

도 2: TBT 환자의 3가지 상이한 정의: TBT1, TBT2 및 TBT7에 따른 포함시 GOLDEN-DIAG의 NTBT 및 TBT 환자에서 hsa-miR-193b-5p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001.

TBT1 = 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 각각 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F ≥ 1

TBT2= 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 각각 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F ≥ 2

TBT7= 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수 각각 ≥ 1 , NAS ≥ 4 , F = 1b, 1c, 2, 3 또는 4

도 3: TBT 환자의 3가지 상이한 정의: TBT1, TBT2 및 TBT7에 따른 포함시 GOLDEN-DIAG의 NTBT 및 TBT 환자에서 hsa-miR-193a-5p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계적 유의성은 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001.

도 4: 포함시 GOLDEN-DIAG (위) 및 OBESE 코호트 (아래)의 "건강인" 혈액 공여자, NTBT2 및 TBT2 환자 (좌), NAS<4 및 NAS ≥ 4 의 환자 (중간) 및 F<2 및 F ≥ 2 의 환자 (우)에서 hsa-miR-193b-3p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계적 유의성은 크루스칼 월리스 ANOVA 검정과 이후 던의 다중 비교 검정 (Golden Diag) 및 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001.

(비만 (obese))

도 5: 포함시 GOLDEN-DIAG (위) 및 OBESE 코호트 (아래)의 NTBT2 및 TBT2 환자 (좌), NAS<4 및 NAS ≥ 4 의 환자 (중간) 및 F<2 및 F ≥ 2 의 환자 (우)에서 hsa-miR-193a-5p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 통계적 유의성은 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001.

도 6: 포함시 GOLDEN-DIAG (위) 및 OBESE 코호트 (아래)의 NTBT2 및 TBT2 환자 (좌), NAS<4 및 NAS ≥ 4 의 환자 (중간) 및 F<2 및 F ≥ 2 의 환자 (우)에서 hsa-miR-193b-5p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 비(非) 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ***, p 값 < 0.001.

도 7: RESOLVE-IT 연구의 NTBT2 및 TBT2 환자 (좌), NAS<4 및 NAS ≥ 4 의 환자 (중간) 및 F<2 및 F ≥ 2 의 환자 (우)에서 hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-193b-5p, 및 hsa-miR-193a-5p의 혈청 수준. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 비 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다: ** p 값 < 0.005; ***, p 값 < 0.001.

도 8: GOLDEN-DIAG 코호트의 환자 (아래)에서 hsa-miR-193b-3p의 혈청 수준과 NAS, 섬유화 병기, 활성 지수, 지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소염 염증 점수 간 상관도. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 크루스칼 월리스 ANOVA 검정과 이후 던의 다중 비교 검정을 사용해 계산하였다: *, p 값 < 0.05; ** p 값 < 0.005; ***, p 값 < 0.001

도 9: GOLDEN-DIAG 코호트의 환자 (아래)에서 hsa-miR-193b-5p의 혈청 수준과 NAS, 섬유화 병기, 활성 지수, 지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소염 염증 점수 간 상관도. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 크루스칼 월리스 ANOVA 검정과 이후 던의 다중 비교 검정을 사용해 계산하였다: *, p 값 < 0.05; ** p 값 < 0.005; ***, p 값 < 0.001

도 10: GOLDEN-DIAG 코호트의 환자 (아래)에서 hsa-miR-193a-5p의 혈청 수준과 NAS, 섬유화 병기, 활성 지수,

지방증 점수, 간세포 풍선화 점수, 소엽 염증 점수 간 상관도. 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다. 통계적 유의성은 크루스칼-왈리스 ANOVA 검정과 이후 Dunn의 다중 비교 검정을 사용해 계산하였다: *, $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; ***, $p < 0.001$.

도 11: hsa-miR-193b-3p ($\log_{10}$ 카피수 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$), TIMP-1, YKL-40, 혈소판 수치, 및 대사 증후군을 사용한 알고리즘 Y1의 수신자 조작 특성 (ROC) 그래프 분석. 이 알고리즘 (NIS) 및 포함시 GOLDEN-DIAG 연구의 개별 변수 간 곡선하 면적 (AUC)의 비교.

도 12: hsa-miR-193b-3p ($\log_{10}$ 카피수 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$), YKL-40, TIMP-1, HbA1c, HYUA2, 및 혈소판 수치를 사용한 알고리즘 Y2의 수신자 조작 특성 (ROC)의 그래프 분석.

도 13: hsa-miR-193b-3p (Cq), YKL-40, TIMP-1, HbA1c, HYUA2, 및 혈소판 수치를 사용한 알고리즘 Y3의 수신자 조작 특성 (ROC) 그래프 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] 본 발명자는 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화를 앓거나 또는 잠재적으로 앓는 대상체의 진단, 모니터링 및 위험도 분류를 위한 신규한 방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명은 순환 생물학적 표지자의 존재 또는 수준을 상호관련짓고 환자를 치료군 또는 비치료군으로서 분류하기 위해서, 임상 시험 동안 환자 생검의 매우 섬세한 분석으로부터 비롯된다. 특히, 본 발명은 또한 하기에 기술된 바와 같은 NAS 채점법을 제공한다. 특히 본 발명은 비제한적으로 3개 부류의 NASH 환자를 치료군으로 정의한다. 이들 환자는 NASH 특징의 채점에 따라서 분류된다.
- [0055] 본 명세서에서 제공하는 실험 데이터는 놀랍게도 채점된 간 생검 및 상응하는 혈액, 혈장 및 혈청 샘플을 사용하여 환자의 2개의 거대 독립 코호트, 즉 즉 GOLDEN-DIAG (포함시 $N=270$; 52주시 $N=223$) 및 OBESE 코호트 ($N=253$)로부터 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화에 대한 순환 생물표지자로서 miR-193을 찾아낸다. 그 결과는 제3의 독립 코호트 RESOLVE-IT ($N=263$)에서 검증하였다.
- [0056] 이제 본 발명을 더욱 상세하게 제공할 것이다.
- [0057] 정의
- [0058] 본 발명에 따라서, 용어 "NAFLD" 또는 "비알콜성 지방 간 질환"은 과도한 알콜 소비 부재 하에서, 염증 및 섬유화의 징후가 있거나 또는 없이, 지방이 간에 침착되는 병태 (간 지방증)를 의미한다.
- [0059] 본 발명에 따라서, 용어 "NAFLD 활성 수준"은 NAFLD 진행을 의미하고 본 명세서에 정의된 바와 같은, 지방증 점수에 의해 정의된다. NAFLD 활성 수준은 또한 NASH 또는 섬유화로 NAFLD 진행도 및 NASH 중증도를 의미한다.
- [0060] 본 발명에 따라서, 용어 "지방증"은 간 내에 비정상적인 지질 체류 또는 지방 축적을 설명하는 과정을 의미한다.
- [0061] 본 발명에 따라서, 용어 "NASH" 또는 "비알콜성 지방간염"은 과도한 알콜 소비의 부재 하에서 바이러스 간염 (HCV, HBV)과 같은 다른 간 질환을 배제한 후에 조직학적 검사시에 간 지방증, 간세포 풍선화 및 간 염증의 부수적인 존재 (즉, 지방증에서 적어도 1점, 소엽 염증에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점으로, $NAS \geq 3$)를 특징으로 하는 NAFLD를 의미한다.
- [0062] 본 발명에 따라서, 용어 "NASH 활성 수준"은 NASH 진행도를 의미하고 $S=1$, $LI=1$ 및 $HB=1$ 인, NASH를 정의하기 위한 최소 매개변수 이상으로 NAS 점수의 증가에 의해 정의된다. NASH 활성 수준은 또한 비가역적 NASH 및/또는 섬유화로 NASH 진행도 및 NASH 중증도를 의미한다.
- [0063] 본 발명에 따라서, 용어 "활성-NASH"는 지방증 점수에서 적어도 1점, 소엽 염증 점수에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점으로, $NAS \geq 4$ 를 특징으로 하는 NASH를 의미한다.
- [0064] 본 발명에 따라서, 용어 "간세포 풍선화"는 일반적으로 광학 현미경 수준에서, 헤모톡실린 및 에오신 (H&E) 염색을 기반으로, 희박한 세포질을 갖는, 정상 간세포 직경보다 1.5-2배의 세포 확장으로서 정의된다. 더 일반적으로는 간세포 세포 사멸 과정이라고 한다.
- [0065] 본 발명에 따라서, 용어 "소엽 염증"은 헤모톡실린 및 에오신 (H&E) 염색된 간 생검 조각의 현미경 검사에서 소

염 염증 병소 (군집된 염증 세포)의 존재를 의미한다.

[0066] 본 발명에 따라서, "NAFLD-활성 점수" 또는 "NAS"는 다음과 같은, 지방증, 간세포 풍선화, 소염 염증 점수의 총합을 의미한다:

[0067] - S: 지방증 점수: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66% 및 3: >66%;

[0068] - LI: 소염 염증 점수 (병소/x20 시야): 0: 없음; 1: <2; 2: 2-4 및 3: >4;

[0069] - HB: 풍선 변성 점수: 0: 없음; 1: 소수; 2: 다수.

[0070] 본 발명에 따라서, "활성 지수"는 간세포 풍선화 및 소염 염증 점수의 총합을 의미한다.

[0071] 본 발명에 따라서, 용어 "섬유화" 또는 "간 섬유화"는 염색 (H&E, 트리크롬 또는 피크로시리우스 레드 염색)된 간 생검 조각의 현미경 검사에서 섬유성 결합 조직의 존재를 의미한다.

[0072] 본 발명의 상황에서, 용어 "섬유화 병기"는 다음과 같이, 조직학적 검사에서 섬유화의 국제화 및 그 정도를 의미한다:

[0073] 동주위 또는 문맥주변부 섬유화 1

[0074] 경증 동주위 섬유화 (3구역) 1a

[0075] 중등증 동주위 섬유화 (3구역) 1b

[0076] 문맥/문맥주변부 섬유화 1c

[0077] 동주위 및 문맥/문맥주변부 섬유화 2

[0078] 가교 섬유화 3

[0079] 간경변증 4

[0080] 대안적으로, 섬유화 병기는 본 발명의 상황에서 다음과 같이 언급될 수 있다:

[0081] F=0: 섬유화 부재

[0082] F=1: 최소 섬유화

[0083] F=2: 유의미 섬유화

[0084] F=3: 중등증 섬유화

[0085] F=4: 중증 섬유화 (즉, 간경변증).

[0086] 본 발명에 따라서, "치료군 대상체" 또는 "TBT 대상체"는 그의 질환 활성 점수 (예를 들어, NAS 또는 활성 지수) 및/또는 간 섬유화 병기가 대상체를 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화에 대한 치료에 적격하게 만드는 대상체이다. 반대로 "비치료군 대상체" 또는 "NTBT 대상체"는 그의 질환 활성 점수 (예를 들어, NAS 또는 활성 지수) 및/또는 간 섬유화 병기가 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화에 대한 치료를 받을만큼 충분히 높지 않은 대상체이다. 그러므로, TBT 대상체는 또한 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화 치료에 대한 "수신자" 또는 "잠재적 수신자"라고도 한다. 본 발명에서 우선되는 TBT 대상체는 다음과 같다:

[0087] i) NASH가 존재하는 대상체,

[0088] ii) 활성-NASH가 존재하는 대상체,

[0089] iii) 유의미, 중등증 또는 중증 간 섬유화가 존재하는 대상체,

[0090] iv) NASH 및 섬유화가 존재하는 대상체.

[0091] 이 정의는 본 발명의 상이한 이형을 정의하는 다양한 NASH 활성 점수 및 섬유화 병기를 포괄한다.

[0092] 본 발명의 우선적인 이형은 다음과 같이 상술된다.

[0093] 제1 TBT 이형 (TBT2):

[0094] TBT2 대상체는 하기의 간 생검-유추 등급을 나타내는 대상체로서 정의된다:

- [0095] - $S \geq 1$
- [0096] - $HB \geq 1$
- [0097] - $LI \geq 1$
- [0098] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4
- [0099] - 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는 3의 섬유화 병기).
- [0100] 더 나아가서 NTBT2 대상체는 지방증, 간세포 풍선화, 소엽 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만의 등급이 TBT2 대상체와 상이하다. 명확함을 위해, NTBT2 대상체는 NAS=4, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 1의 섬유화 병기 (예컨대 섬유화 병기 1a, 1b 또는 1c), 또는 3의 NAS 및 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4의 섬유화 병기), 또는 상기 정의된 점수의 임의의 다른 조합을 갖는 NASH 대상체일 수 있다.
- [0101] 제2 TBT 이형 (TBT1):
- [0102] TBT1 대상체는 하기의 간 생검-유추 등급을 나타내는 대상체로서 정의된다:
- [0103] - 지방증 점수 ≥ 1
- [0104] - 간세포 풍선화 점수 ≥ 1
- [0105] - 소엽 염증 점수 ≥ 1
- [0106] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4
- [0107] - 섬유화 병기 ≥ 1 (예컨대 1, 2, 3 또는 4의 섬유화 병기).
- [0108] 더 나아가서 NTBT1 대상체는 지방증, 간세포 풍선화, 소엽 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만의 등급이 TBT1 대상체와 상이하다. 명확함을 위해, NTBT1 대상체는 예를 들어, NAS=4, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 0의 섬유화 병기, 또는 3의 NAS 및 섬유화 병기 ≥ 1 (예컨대 1a, 1b 또는 1c, 2, 3 또는 4의 섬유화 병기), 또는 상기 정의된 바와 같은 점수의 임의의 다른 조합을 갖는 NASH 대상체일 수 있다.
- [0109] 제3 TBT 이형 (TBT7):
- [0110] TBT7 대상체는 하기의 간 생검-유추 등급을 나타내는 대상체로서 정의된다:
- [0111] - 지방증 점수 ≥ 1
- [0112] - 간세포 풍선화 점수 ≥ 1
- [0113] - 소엽 염증 점수 ≥ 1
- [0114] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4
- [0115] - 섬유화 병기 = 1b, 1c, 2, 3 또는 4.
- [0116] 더 나아가서 NTBT7 대상체는 지방증, 간세포 풍선화, 소엽 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만의 등급이 TBT7 대상체와 상이하다. 명확함을 위해서, NTBT7 대상체는 NAS=4, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 0 또는 1a의 섬유화 병기, 또는 3의 NAS 및 1b, 1c, 2, 3 또는 4의 섬유화 병기, 또는 상기 정의된 바와 같은 점수의 임의의 다른 조합을 갖는 NASH 대상체일 수 있다.
- [0117] 특정한 실시형태에서, 본 발명에서 제공하는 miR-193 마이크로RNA는 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p 및 hsa-miR-193b-3p로 이루어진 군으로부터 선택되고, 그의 서열은 각각 MIMAT0000459, MIMAT0004614, MIMAT004767 및 MIMAT0002819의 miRBase 수탁 번호 하에 각각 miRBase 데이터베이스 (<http://mirbase.org>)로부터 입수가 가능하다.
- [0118] 다른 실시형태에서, 본 발명에서 제공하는 miR-193 마이크로RNA는 miR-193 스템-루프 형태, 예컨대 HGNC:MIR193A라고도 하는 hsa-miR-193a, 및 HGNC:MIR193B라고도 하는 hsa-miR-193b로 이루어진 군으로부터 선택되는 miR-193 마이크로RNA이고, 그의 서열은 miRBase 수탁 번호 = MI0000487 및 MI0003137 하에 각각 miRBase 데이터베이스 (<http://mirbase.org>)로부터 입수가 가능하다.
- [0119] 특정한 실시형태에서, 본 발명에서 제공되는 miR-193 마이크로RNA는 hsa-miR-193b-3p이다.

[0120] 샘플들 및 샘플 제조

[0121] 본 발명에 따라서, 용어 "체액 샘플"은 대상체로부터 획득되는 임의의 체액 샘플 예컨대 혈액 및 혈액-유래 체액 (예컨대 혈장 및 혈청), 림프액, 뇌척수액, 운혈액, 소변, 타액, 점액, 가래 및 객담을 의미한다. 특정한 실시형태에서, 체액은 혈액 및 혈액-유래 체액 (예컨대 혈장 및 혈청), 타액, 뇌척수액 및 소변으로부터 선택된다. 특정한 실시형태에서, 체액 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 체액 (예컨대 혈장 및 혈청), 타액, 뇌척수액 또는 소변이다. 추가의 특정한 실시형태에서, 체액은 혈액, 혈장 또는 혈청이다. 체액 샘플은 임의의 적합한 수단으로 수집될 수 있다. 적합한 체액은 세포-무함유 유체일 수 있다. 이러한 세포-무함유 체액은 일반적으로 세포를 제거하기 위해서, 예를 들어 원심분리 또는 여과를 통해 세포-함유 체액을 처리하여 생산된다. 전형적으로, 세포-무함유 체액은 온전한 세포를 함유하지 않지만, 일부는 세포 단편 또는 세포 찌꺼기를 함유할 수 있다. 체액 샘플은 즉시 사용할 수 있거나 또는 이후 사용을 위해 저장될 수 있다. 당분야에 공지된 임의의 적합한 저장 방법을 사용하여 체액 샘플을 저장할 수 있고, 예를 들어, 샘플은 약 -20°C 내지 약 -80°C에서 냉동될 수 있다.

[0122] miRNA 단리 및 정량

[0123] miRNA를 포함하는 전체 RNA는 페놀:클로로포름 추출 후 알콜 침전 (TRIzol), 페놀:클로로포름 후 고체상 추출 (겔럼-기반; 예를 들어, miRVana 및 miRNeasy) 및 친화성 수지 (Norgen total and Isolate II) 자성 입자 존재/부재의 고체상 분리, 또는 직접 용해 방법을 포함하는 다양한 추출 방법을 통해서 샘플로부터 정제할 수 있다. 본 발명의 실시에서, miRNA는 후속 RTqPCR을 위해 miRVana Paris 추출 키트를 사용해 추출하였거나 또는 추가의 HTG Edge 서열 분석을 위해 특이적 프로브를 사용해 포획하였다.

[0124] 다음으로, miRNA는 당업자가 이용가능한 임의 기법, 예컨대 시퀀싱-기반, 증폭-기반, 또는 하이브리드화-기반 방법을 사용해 임상 샘플에서 검출한다. miRNA 임상 검사에 대한 일반적인 접근법은 소형 RNA 시퀀싱 (Hafner et al, 2012; Vigneault et al, 2012), HTG Edge 전체 전사체 어레이, 차세대 시퀀싱-기반 miRNA 프로파일링 플랫폼 (Lizarraga et al, 2016; Satake et al, 2018), 정량적 miRNA 실시간 역전사 PCR (qRT-PCR) (Chen et al, 2005), miRNA 마이크로어레이 (Castoldi et al, 2007), 색상-코딩된 프로브쌍을 사용한 복합 miRNA 검출 (NanoString n Counter expression system) (Geiss et al, 2008), 역전사 후 디지털 액적 PCR (ddPCR) (Miotto et al, 2014), 및 miRNA 인시츄 하이브리드화 (Nelson et al, 2006)를 포함한다. miR-193의 수준은 당분야에 충분히 공지된 통상의 방법론, 예컨대 면역어레이 (예를 들어, ELISA), 또는 분자 생물학 어레이 (정량적 RT-PCR 또는 차세대-시퀀싱) 또는 생화학적 어레이 (비색 어레이 등)에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 방법의 특정한 실시형태에서, miRNA는 HTG Edge 전체 전사체 어레이 또는 HTG Edge 시퀀싱, 및 RT-qPCR을 통해 검출된다.

[0125] 본 발명의 실시에서, 임의의 상기 기술된 방법은 그 수준이 건강한 환자에 비해서 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화 대상체에서 가변적이지 않은 마이크로RNA 또는 기준 수준에 대해 대상체 유래 체액 샘플 중 miR-193의 수준을 정규화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 기술적 가변성의 잠재적 근원을 감소시키기 위해서, 기지 서열 및 분량의 스파이크-인 (spike-in) 또는 외생성 합성 마이크로-RNA, 예컨대 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*) miR-39를 RNA 추출 이전에 샘플에 첨가할 수도 있다. 스파이크-인 또는 외생성 합성 마이크로-RNA는 인간 샘플에서 발현되지 않는 miRNA, 예컨대 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*) cel-miR-38 또는 아라비도시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) ath-miR-159a일 수 있다. 이들 합성 마이크로-RNA는 RNA 추출 이전 혈액 유래 샘플에 용해 완충액의 첨가 후에 첨가될 수 있고 기술적 정규화를 위한 공정 관리를 제공할 수 있다. 그러므로 RNA 추출, 상보성 DNA 합성 및 PCR 증폭의 효율은 이들 외생성 합성 마이크로-RNA를 사용하여 모니터링할 수 있다.

[0126] 실험 파이프라인의 모든 단계 동안, 표적 유전자와 동일한 가변성 근원에 의해 영향받는 내생성 대조군을 대표하는, qPCR 데이터의 정규화를 위한 마이크로-RNA 정규화군 또는 소형 넌코딩 RNA 대조군이 표적 miRNA, miR-193의 수준을 정규화하는데 사용될 수 있다.

[0127] 정량적 RT-PCR을 통해 miR-193을 측정하기 위한 표준 프로토콜이 제공된다. 간략하게, 측정은 체액 샘플 예컨대 혈액, 혈장 또는 혈청 샘플, 특히 세포-무함유, 시트레이트-유래 무혈소판 혈장 샘플로부터 추출된 전체 RNA에서 수행된다. 적절한 내부 대조군 (예컨대 기지 서열 및 분량의 마이크로-RNA, 예를 들어 예쁜꼬마선충 miR-39)은 RNA 추출 이전에 샘플에 첨가될 수 있다. Cq 값은 정량적 RT-PCR을 사용하여 결정된다. 이러한 어레이를 수행하기 위한 시판 키트가 이용가능하다. 예를 들어, Taqman miRNA RT-qPCR 어레이: Taqman 마이크로RNA 역전사 키트, TaqMan 마이크로RNA 어레이 20X, 및 TaqMan 유니버설 마스터 믹스 II

(Applied Biosystems)가 제조사의 지시에 따라 사용될 수 있다. 역전사는 쉽게 입수가 가능한 PCR 시스템, 예컨대 GeneAmp® PCR System 9700 열순환기 (Applied Biosystems)를 사용하여, 30분간 16℃ 이후에 30분 동안 42℃ 및 5분 동안 85℃에 이어서 4℃ 유지와 같은 적절한 사이클링 매개변수에 의해 수행될 수 있다. 역전사는 복합 형식으로 제공될 수 있다. 그 다음으로, 정량적 PCR은 정량적 PCR 시스템 예컨대 CFX96™ 실시간 시스템 (C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad)을 사용하여 수행된다. 우선적으로, 정량적 PCR은 CFX96-실시간 PCR 검출 시스템 - C1000 - (In Vitro Diagnostic (IVD) certified, Bio-Rad)을 사용하여 수행된다. 사이클링 조건은 다음과 같을 수 있다: 95℃에서 10분 이후 95℃에서 15초 및 60℃에서 60초로 총 50사이클 및 그 다음으로 30℃에서 30초. Cq 결정 방식은 예를 들어 정량적 PCR 시스템에서 회귀 방식일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법에 따라 결정된 Cq 값은 상기의 특정한 매개변수 및 재료를 사용해 수득가능한 Cq 값이다. 샘플의 Cq 값은 그 값이 각각의 miRNA의 표준 그래프의 최대 Cq 이상이면 분석에서 배제될 수 있다. 표준 그래프는 PCR 반응 효율을 평가하는데 사용될 수 있다. 표준 그래프가 연구 동안 마주칠 수 있는 모든 잠재적 주형 농도를 포괄하는 것을 보장하도록, 가장 농축된 cDNA 샘플로부터 시작하여 8개 지점으로 연속 희석을 수행할 수 있다. 표준 그래프는 수득된 Cq 값에 대해 주형의 시작 분량의 log를 그래프화하여 작성될 수 있다. 절대 정량 데이터를 수득하기 위해서 합성 miRNA (예를 들어, Integrated DNA Technologies 판매, 5'포스페이트, 3'OH, HPLC 정제)는 예를 들어, 3.125 fmol/mL로 희석된 5 µL가 혈청 샘플로부터 추출된 RNA와 함께 역전사에 사용될 수 있다. 그 이후에 생성물은 연속적으로 희석될 수 있고 PCR이 모든 샘플 (표준물 및 혈청-유래 RNA)에 대해 수행될 수 있다. 표준 그래프는 단일, 이중 또는 삼중으로 수행될 수 있고 카피수/유체 µL로서의 Cq 데이터로 전환시키는데 사용될 수 있다.

[0128] 대안적으로, 델타 Ct (Cycle threshold) 또는 델타 Cq (Cycle quantification) 방법이 miR-193의 수준을 추정하는데 사용될 수 있다. 델타 Ct 또는 델타 Cq는 환자 검사 샘플 중 표적의 Ct 또는 Cq 및 기준 샘플 (즉, 건강한 대상체, 참조 샘플) 중 표적의 Ct 또는 Cq 간 편차에 해당된다.

[0129] 대안적으로, miR-193의 수준은 TaqMan qPCR과 조합된 스텝-루프 역전사 (RT) 반응, 또는 SYBR Green 검출 및 LNA (Lock Nucleic Acid) 프라이머와 조합된 폴리(A)-첨부 RT를 사용하는 RT-qPCR을 통해서 결정될 수 있다.

[0130] 본 발명의 방법

[0131] 모든 하기의 양상, 실시형태 및 이형에서, 바람직한 실시형태는 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플 중 hsa-miR-193의 수준의 결정에 관한 것이다. 이러한 양상의 바람직한 이형은 hsa-miR-193b-3p의 수준의 결정에 관한 것이다.

[0132] 본 발명은 대상체에서 NAFLD의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서, miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명은 대상체에서 잠재적 NAFLD의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서, miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, NAFLD 또는 잠재적 NAFLD는 간 지방증이 부재하는 대상체 유래 샘플에서 측정된 기준 수준에 비해서, 대상체 유래 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준을 기반으로 검출된다. 추가의 특정한 실시형태에서, NAFLD 또는 잠재적 NAFLD의 진단 또는 검출은 간 지방증이 부재하는 건강한 대상체에서 일반적으로 측정되는 수준에 비해서 체액 샘플에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 대상체가 NAFLD를 앓는다는 것을 확인하는 단계를 더 포함한다. 이러한 확인은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 따라서, 예컨대 간 생검을 수행하거나 또는 초음파 또는 영상화 기법 (예컨대 초음파검사법, 순간 탄성영상법 (Fibroscan)에 의한 제어 감쇠 매개변수 측정법, 자기 공명 영상법 (MRI), MRI-DPFF (MRI-estimated proton density fat fraction), 및 MRS-DPFF (Magnetic Resonance Spectrometry density fat fraction))을 통해서 제공될 수 있다. 대안적으로, 제한없이 하기를 포함하는, 몇몇 지수 및 점수가 간 지방증을 평가할 수 있다:

[0133] - BMI, 허리 둘레, 및 트리글리세리드 및 감마 글루타릴 트랜스퍼라제 (GGT)의 혈청 수준을 포함한 지방간 지수 (FLI),

[0134] - 혈청 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST): 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT) 비율, BMI, 성별 및 진성 당뇨병의 존재를 포함하는 간 지방증 지수 (HIS),

[0135] - NAFLD 간 지방 점수 (대사 증후군, 2형 당뇨병, 공복 혈청 인슐린 및 AST, AST:ALT 비율,

[0136] - 간 지방증 검사 (steatotest) (알파 2 마크로글로불린 (A2M), 합토크로빈, 아포지질단백질 A1, 총 빌리루빈, GGT, 공복 혈액 글루코스 및 연령, 성별, 체중 및 신장에 대해 조정), 및

- [0137] - NAFLD 릿지 점수 (ALT, 콜레스테롤, 트리글리세리드, 당화 헤모글로빈 A1c (HbA1c) 및 백혈구 수치) 및 동반 이환 데이터 (고혈압).
- [0138] 특정한 실시형태에서, 유전자 및 게놈 표지자는 NAFLD 위험도 및 중증도를 평가할 수 있다 (SNP (Single Nucleotide Polymorphisms):rs738409 (PNPLA3의 SNP), 세포-무함유 넌코딩 RNA, miR-122, 혈청 유래 오믹스 데이터의 복합 패널).
- [0139] 본 발명은 또한 대상체에서 NASH의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 대상체에서 잠재적 NASH의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서, miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, NASH 또는 잠재적 NASH의 진단 또는 검출은 건강한 대상체, NAS<3인 대상체 또는 0으로 채점된 NAS의 적어도 하나의 성분을 갖는 대상체에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서, 대상체 유래 체액에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 기준 샘플은 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 NAS<3인 대상체, 예컨대 하기 점수: S=1, LI=1 및 HB=0; S=1, LI=0 및 HB=1; S=0, LI=1 및 HB=1인 대상체에서 유래된다. 특정한 실시형태에서, NASH 또는 잠재적 NASH의 진단 또는 검출은 건강한 대상체, NAS<3인 대상체 또는 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 대상체를 포함하는 비-NASH 대상체에서 측정된 기준 수준에 비해서, 혈액, 혈청 또는 혈장에서 hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 증가된 발현 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 대상체가 NASH를 앓는다는 것을 확인하는 단계를 더 포함한다. 이러한 확인은 당업자에게 공지된 임의 방법에 따라서, 예컨대 간 생검을 수행하거나 또는 영상화 기법 예컨대 MRI 기반 기법, 가독세트산 사용 MRI, 초상자성 철 산화물 MRI, ³²P-MRS를 사용한 세포내 ATP 수준 및 MRE에 의해 측정된 생물 표지자를 영상화시켜 제공될 수 있다. 대안적으로, 제한없이, 하기를 포함하는 몇몇 지수 및 점수는 잠재적 NASH 생물표지자를 평가할 수 있다:
- [0140] - 아폽토시스 표지자 (CK18 단편, 총 사이토케라틴, 아폽토시스-매개 표면 항원 FAS의 혈청 수준),
- [0141] - 염증 표지자 (C-반응성 단백질 (CRP), TNF, IL-8, CXC 케모카인 리간드 10 (CXCL10)),
- [0142] - 지질 산화 생성물 (11-히드록시아이코사테트라엔산 (HETE), 9-히드록시데카디엔산 (HODE), 13-HODE, 13-옥소-옥타데카디엔산 (ODE), LA-13-HODE (oxNASH 점수), 11,12-디히드록시-아이코사트리엔산 (diHETrE)),
- [0143] - 아디포사이트카인 및 호르몬 (아디포넥틴, 렙틴, 레시스틴, 비스파틴, 레티놀 결합 단백질 (RBP)4, 지방산 결합 단백질 (FABP)4, 섬유아세포 성장 인자 (FGF21)),
- [0144] - 리소솜 효소 (카텝신 D), 및
- [0145] - 조합 패널 (NASH 검사, NASH 진단 패널).
- [0146] 본 발명은 또한 대상체에서 활성-NASH의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 대상체에서 잠재적 활성-NASH의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 활성-NASH 또는 잠재적 활성-NASH의 진단 또는 검출은 건강한 대상체, NAS<4인 대상체 또는 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 대상체에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서, 대상체 유래 체액에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 기준 샘플은 S=1, LI=1 및 HB=1로 NAS=3인 대상체로부터 유래된다. 특정한 실시형태에서, 활성-NASH 또는 잠재적 활성-NASH의 진단 또는 검출은 건강한 대상체, NAS<4인 대상체 또는 NAS의 적어도 하나의 성분이 0으로 채점된 대상체에서 측정된 기준 수준과 비교하여, 대상체의 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플에서, hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 상승된 발현 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 대상체가 활성-NASH를 앓는다는 것을 확인하는 단계를 더 포함한다. 이러한 확인은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 따라서, 예컨대 간 생검을 수행하거나 또는 영상화 기법 예컨대 MIR 기반 기법, 초상자성 철 산화물 MRI, 다변수 MRI, MRS 및 MRE를 통해서 제공될 수 있다. 대안적으로, 제한없이, 하기를 포함하는 몇몇 지수 및 점수는 잠재적 NASH 생물표지자를 평가할 수 있다:
- [0147] - 아폽토시스 표지자 (CK18 단편, 총 사이토케라틴, 아폽토시스-매개 표면 항원 FAS의 혈청 수준),
- [0148] - 염증 표지자 (C-반응성 단백질 (CRP), TNF, IL-8, CXC 케모카인 리간드 10 (CXCL10)),

- [0149] - 지질 산화 생성물 (11-히드록시아이코사테트라엔산 (HETE), 9-히드록시데카디엔산 (HODE), 13-HODE, 13-옥소-옥타데카디엔산 (ODE), LA-13-HODE (oxNASH 점수), 11,12-디히드록시-아이코사트리엔산 (diHETrE)),
- [0150] - 아디포사이트카인 및 호르몬 (아디포넥틴, 렙틴, 레시스틴, 비스파틴, 레티놀 결합 단백질 (RBP)4, 지방산 결합 단백질 (FABP)4, 섬유아세포 성장 인자 (FGF21)),
- [0151] - 리소솜 효소 (카텝신 D), 및
- [0152] - 조합 패널 (NASH 검사, NASH 진단 패널).
- [0153] 이러한 확진은 NAFLD 위험도 (NASH 또는 섬유화로의 진행도) 및 중증도 표지자 예컨대 SNP (PNPLA3의 rs738409)와 같은 유전자 및 게놈 표지자, 세포-무함유 넢코딩 RNA (miR-122, miR-1290, miR-192 및 miR-7b), 혈청 유래 오믹스 데이터 예컨대 rs738409 및 ACY1, SHBG, CTSZ, MET, GNS, LGALS3BP, CHL1 및 SERPINC1을 포함하는 단백질체학 데이터의 복합 패널, 다수 유전자좌의 SNP (PNPLA3, SOD2, KLF6 및 LPIN1), miR-122, miR-122, miR-192, miR-21, ALT, CK18 Asp396, 세포 무함유 DNA 예컨대 순환 메틸화 PPARG를 포함하는 복합 패널을 측정하여 제공될 수 있다.
- [0154] 본 발명은 또한 대상체에서 간 소염 염증의 발생 또는 등급을 특징규명하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0155] 본 발명은 또한 대상체에서 간세포 풍선화의 발생 또는 등급을 특징규명하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0156] 본 발명은 또한 대상체에서 간 지방증의 발생 또는 등급을 특징규명하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 hsa-miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0157] 본 발명은 또한 대상체에서 간 섬유화의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 대상체에서 잠재적 간 섬유화의 진단 또는 검출을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 섬유화는 최소의 유의미 섬유화이다 (즉, $F \geq 2$). 이러한 실시형태의 이형에서, 간 섬유화 또는 잠재적 간 섬유화의 진단 또는 검출은 섬유화 부재 또는 최소 섬유화, 특히 최소 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서, 대상체 유래 체액에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 추가의 특정한 실시형태에서, 섬유화는 최소의 중등증 간 섬유화 또는 간경변증이다 (즉, $F \geq 3$). 이러한 실시형태의 이형에서, 간 섬유화 또는 잠재적 간 섬유화의 진단 또는 검출은 섬유화 부재, 최소 섬유화, 또는 중증 섬유화, 특히 중증 섬유화가 존재하는 대상체에서 측정된 miR-193의 기준 수준에 비해서, 대상체 유래 체액에서 miR-193의 증가된 수준의 검출을 기반으로 한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 대상체가 간 섬유화를 앓는다는 것을 확인하는 단계, 또는 간 섬유화의 병기를 확인하는 단계를 더 포함한다. 이러한 확진은 당업자에게 공지된 임의 방법에 따라서, 예컨대 간 생검을 수행하거나 또는 제한없이, 하기를 포함하는 생물표지자를 영상화하여 제공될 수 있다:
- [0158] - FibroScan (순간 탄성영상법),
- [0159] - 포인트 전단파 탄성영상법 pSWE, 음향 복사력 임펄스 (acoustic radiation force impulse) (ARFI)
- [0160] - 2D 3D 전단파 탄성영상법 2D-3D SWE,
- [0161] - 자기 공명 탄성도 검사 MRE,
- [0162] - 다변량 MRI.
- [0163] 대안적으로, 간 섬유화 및 간경변증의 몇몇 비침습성 검사:
- [0164] - AST:ALT 비율 및 AST:혈소판 비율 지수 (APRI),
- [0165] - 연령, AST, ALT, 및 혈소판 수치를 포함하는 섬유화-4 지수 (FIB-4)
- [0166] - NAFLD 섬유화 점수 (연령, BMI, 공복 혈당 장애 및/또는 당뇨병, AST, ALT, 혈소판 수치, 및 알부민),
- [0167] - BARD 코어 (AST, ALT, BMI, 및 당뇨병).
- [0168] 다른 실시형태에서 특이적 간 섬유화 표지자 및 패널이 간 섬유화를 평가할 수 있다:

- [0169] - 특이적 섬유화 표지자: 히알루론산, III형 콜라겐의 N-말단 프로-펩티드 (PIIINP), PIIINP에 대한 네오 에피토프 특이적 경쟁적 효소 연결 면역흡착 어세이 (Pro-C3), 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 라미닌.
- [0170] - 특이적 섬유화 패널: PIIINP, 히알루론산 및 TIMP-1을 포함하는 ELF (Enhanced Liver Fibrosis); Fibrotest (감마 글루타밀 트랜스퍼라제 (GGT), 총 빌리루빈, 알파 2 마크로글로불린 (A2M), 아포지질단백질 A1 및 합도글로빈; FibroMeter NAFLD (체중, 프로트롬빈 지수, ALT, AST, 페리틴 및 공복 혈당).
- [0171] 본 발명은 또한 대상체에서 간 섬유화 병기의 결정을 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0172] 특정한 실시형태에서, F=4 병기는 상기 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 수준이 $F \leq 4$, 예컨대 F=0, F=1, F=2 또는 F=3의 섬유화 병기를 갖는 대상체 유래 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높다면 결정될 수 있다. 특정한 이형에서, 기준 샘플은 F=3인 대상체 유래이다.
- [0173] 특정한 실시형태에서, F=3 병기는 상기 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 수준이 $F \leq 3$, 예컨대 F=0, F=1 또는 F=2의 섬유화 병기를 갖는 대상체 유래 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높으면 결정될 수 있다. 특정한 이형에서, 기준 샘플은 F=2인 대상체 유래이다.
- [0174] 특정한 실시형태에서, F=2 병기는 상기 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 수준이 $F \leq 2$, 예컨대 F=0 또는 F=1의 섬유화 병기를 갖는 대상체 유래 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높으면 결정될 수 있다. 특정한 이형에서, 기준 샘플은 F=1인 대상체 유래이다.
- [0175] 특정한 실시형태에서, F=1 병기는 상기 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 수준이 섬유화 병기 $F \leq 1$, 예컨대 F=0의 섬유화 병기를 갖는 대상체 유래 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높으면 결정될 수 있다.
- [0176] 특정한 실시형태에서, 방법은 섬유화 부재 및/또는 최소 섬유화 ($F=0-1$)의 환자에서 측정된 기준 수준에 비해서 대상체의 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플에서, hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 상승된 발현 수준의 검출을 기반으로 NAFLD 또는 NASH를 갖는 대상체에서 유의미 내지 중증 섬유화 ($F \geq 2$) 및 진행성 간 섬유화 ($F \geq 3$)의 진단 및 검출을 위한 것이다.
- [0177] 특정한 실시형태에서, 간 섬유화의 병기를 결정하기 위한 방법은 대상체에서 간 섬유화의 병기를 확인하는 단계를 더 포함한다. 이러한 확인은 당업자에게 공지된 임의 방법에 따라서, 예컨대 간 생검을 수행하거나 또는 섬유화의 진단에 대해 상기 열거된 생물표지자의 영상화와 같은 다른 수단에 의해 제공될 수 있다.
- [0178] 간 섬유화는 대부분의 만성 간 질환의 공통 결과이므로, 본 발명은 또한 다른 섬유성 간 질환 예컨대: 바이러스 간염 (HBV, HCV, ...), 알콜성 지방간염, 담즙 질환 (원발성 담즙성 담관염, 원발성 경화성 담관염, 자가면역성 간염, 윌슨병, 알파1 항트립신 결핍증)으로 인한 유의미 또는 진행성 간 섬유화의 진단 및 검출에 관한 것이다.
- [0179] 본 발명은 또한 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화에 대한 치료의 잠재적 수신자 또는 비수신자로서 대상체를 분류하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 NAFLD에 대한 치료의 잠재적 수신자 또는 비수신자로서 대상체를 분류하기 위한 것이다. 다른 특정한 실시형태에서, 방법은 NASH에 대한 치료의 잠재적 수신자 또는 비수신자로서 대상체를 분류하기 위한 것이다. 추가 실시형태에서, 방법은 간 섬유화에 대한 치료의 잠재적 수신자 또는 비수신자로서 대상체를 분류하기 위한 것이다.
- [0180] 본 발명은 보다 특히 NASH 및/또는 섬유화에 대한 치료의 잠재적 수신자 (TBT) 또는 비수신자 (NTBT)로서 대상체를 분류하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0181] 특정한 실시형태에서, 대상체는 상기 대상체 유래 체액 샘플 중 miR-193의 수준은 NTBT2 대상체의 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높다면 TBT2 대상체로서 분류된다. 특별한 이형에서, NTBT2 대상체는 $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 $F=1$ (예를 들어, 1a, 1b 또는 1c 섬유화 병기)인 대상체이다.
- [0182] 특정한 실시형태에서, 대상체는 상기 대상체 유래 체액 샘플 중 miR-193의 수준이 NTBT1 대상체의 기준 샘플 중 miR-193의 수준보다 높으면 TBT1 대상체로서 분류된다. 특별한 이형에서, NTBT1 대상체는 $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 $F=0$ 인 대상체이다.
- [0183] 특정한 실시형태에서, 대상체는 상기 대상체 유래 체액 샘플 중 miR-193의 수준은 NTBT7 대상체의 기준 샘플 중

miR-193의 수준보다 높으면 TBT7 대상체로서 분류된다. 특별한 이형에서, NTBT7 대상체는 $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 및 $F=1a$ 인 대상체이다.

- [0184] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 TBT2 대상체로서 대상체를 분류하기 위한 것이다.
- [0185] 본 발명의 다른 이형은 NTBT 환자에서 측정된 hsa-miR-193의 기준 수준과 비교하여 혈액, 혈청 또는 혈장에서, hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 상승된 발현 수준의 검출을 기반으로, NASH 및/또는 섬유화에 대한 치료의 잠재적 수신자 (TBT) 또는 비수신자 (NTBT)로서 환자를 분류하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0186] 이러한 분류는 또한 대상체가 치료 결정 전에 추가 간 검사, 예컨대 최신 간 검사, 예컨대 초음파, 탄성영상법, MRI를 포함한 영상 기법, 또는 간 생검을 받아야하는지 여부의 결정을 기반으로 할 수 있다.
- [0187] TBT 또는 수신자 대 NTBT 또는 비수신자 환자의 정의는 상기 제공되는 바와 같은 다양한 섬유화 병기값 및 다양한 질환 활성 값 (NAS 또는 활성 지수)을 갖는 약물 안전성에 대한 약물 효능에 따라 다양할 수 있다.
- [0188] 본 발명은 또한 대상체에서 NAFLD 또는 NASH 활성의 결정을 위한 방법으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0189] 본 발명은 또한 대상체에서 NAFLD 또는 NASH 활성 전개의 위험성의 예후에 대한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 치료 부재 하에서 NAFLD 또는 NASH 활성 전개의 위험성의 예후를 위한 것이다.
- [0190] 본 발명은 또한 대상체에서 간경변증으로 섬유화 전개의 위험성 및 간 임상 결과의 예후에 대한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 miR-193 (예컨대 hsa-miR-193)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 방법은 치료의 부재 하에서 간경변증으로 섬유화 전개의 위험성 및 간 임상 결과의 예후를 위한 것이다.
- [0191] 본 발명은 또한 대상체에서 NAFLD 또는 NASH 활성의 전개 (즉, 진행 또는 퇴행)를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 hsa-miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0192] 본 발명은 또한 대상체에서 간 섬유화의 전개 (즉, 진행 또는 퇴행)를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 hsa-miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0193] 본 발명은 또한 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 특이적 치료에 대한 환자의 반응을 예측하기 위한 방법에 관한 것으로서, 방법은 상기 대상체의 체액 샘플에서 hsa-miR-193의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0194] 다른 이형에 따라서, 본 발명은 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준의 검출을 기반으로, 대상체에서 지방증 병기의 결정을 위한 방법에 관한 것이다.
- [0195] 다른 이형에 따라서, 본 발명은 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준의 검출을 기반으로 대상체에서 간세포 종선화 등급의 결정을 위한 방법에 관한 것이다.
- [0196] 다른 이형에 따라서, 본 발명은 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준의 검출을 기반으로 대상체에서 소엽 염증 등급의 결정을 위한 방법에 관한 것이다.
- [0197] 본 발명의 실시에서, miR-193의 컷-오프 농도는 본 발명의 방법을 실행하는 사람에 의한 의사 결정에 도움을 주기 위해 계산될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 표현 "컷-오프 농도"는 증상 또는 질환의 통계적 예측으로 만든 것 이상, 및 질환 또는 증상의 결여의 통계적 예측으로 만든 것 이하의 miR-193의 농도에 관한 것이다. 이러한 컷-오프 농도는 상이한 시나리오에 따라서 다음과 같이 결정될 수 있다.
- [0198] NAFLD (또는 잠재적 NAFLD)가 존재하는 대상체로서 또는 NAFLD가 부재하는 건강한 대상체로서 대상체를 분류하기 위한 컷-오프 농도는
- [0199] i) NAFLD가 존재하는 대상체 및 NAFLD가 부재하는 건강한 대상체 둘 모두를 포함하는 대상체의 기준 코호트 유래 체액 샘플에서 miR-193 농도를 측정하는 단계,
- [0200] ii) 전용 통계 분석을 기준 데이터 세트에 적용하여 최적 컷-오프 농도를 결정하는 단계에 의해 결정될 수 있다.
- [0201] 특히, 최신 통계 방법 ROC (수신자 조작 특성)는 기준 코호트에서 NAFLD 및 건강한 대상체를 구별하기 위한 최

적 컷-오프 농도를 계산하기 위해 사용될 수 있다.

- [0202] NASH (또는 잠재적 NASH)가 존재하는 대상체 또는 NASH가 부재하는 대상체로서 대상체를 분류하기 위한 컷-오프 농도는
- [0203] i) NASH가 존재하는 대상체 및 NASH가 부재하는 대상체 둘 모두를 포함하는 대상체의 기준 코호트의 체액 샘플에서 miR-193 농도를 측정하는 단계,
- [0204] ii) 전용 통계 분석을 기준 데이터 세트에 적용하여 최적 컷-오프 농도를 결정하는 단계에 의해 결정될 수 있다. 특히, 최신 통계 방법 ROC (수신자 조작 특성)는 기준 코호트에서 NASH (또는 잠재적 NASH)가 존재하는 대상체 및 NASH가 부재하는 대상체를 구별하기 위한 최적 컷-오프 농도를 계산하는데 사용될 수 있다.
- [0205] 활성-NASH (또는 잠재적 활성-NASH)가 존재하는 대상체 또는 활성-NASH가 부재하는 대상체로서 대상체를 분류하기 위한 컷-오프 농도는
- [0206] i) 활성-NASH가 존재하는 대상체 및 활성-NASH가 부재하는 대상체 둘 모두를 포함하는 대상체의 기준 코호트의 체액 샘플에서 miR-193 농도를 측정하는 단계,
- [0207] ii) 전용 통계 분석을 기준 데이터 세트에 적용하여 최적 컷-오프 농도를 결정하는 단계에 의해 결정될 수 있다. 특히, 최신 통계 방법 ROC (수신자 조작 특성)는 기준 코호트에서 활성-NASH (또는 잠재적 활성-NASH)가 존재하는 환자 및 활성-NASH가 부재하는 환자를 구별하기 위한 최적 컷-오프 농도를 계산하는데 사용될 수 있다.
- [0208] 유의미 간 섬유화 ($F \geq 2$) (또는 잠재적 유의미 간 섬유화)가 존재하는 대상체 또는 섬유화 부재 또는 최소 섬유화가 존재하는 대상체로서 대상체를 분류하기 위한 컷-오프 농도는
- [0209] i) 유의미 내지 중증 간 섬유화 ($F \geq 2$) 또는 진행성 간 섬유화 ($F \geq 3$)가 존재하는 대상체 또는 섬유화 부재 또는 최소 섬유화 ($F=0-1$)가 존재하는 대상체 둘 모두를 포함하는 대상체의 기준 코호트의 체액 샘플에서 miR-193 농도를 측정하는 단계,
- [0210] ii) 전용 통계 분석을 기준 데이터 세트에 적용하여 최적 컷-오프 농도를 결정하는 단계에 의해 결정될 수 있다. 특히, 최신 통계 방법 ROC (수신자 조작 특성)는 기준 코호트에서 유의미 간 섬유화 ($F \geq 2$) 또는 진행성 간 섬유화 ($F \geq 3$)가 존재하는 대상체 및 섬유화 부재 또는 최소 섬유화 ($F=0-1$)가 존재하는 대상체를 구별하기 위한 최적 컷-오프 농도를 계산하는데 사용될 수 있다.
- [0211] 대상체를 TBT 대상체 또는 NTBT 대상체로서 분류하기 위한 컷-오프 농도는
- [0212] i) TBT 대상체 및 NTBT 대상체 둘 모두를 포함하는 대상체의 기준 코호트의 체액 샘플에서 miR-193 농도를 측정하는 단계,
- [0213] ii) 전용 통계 분석을 기준 데이터 세트에 적용하여 최적 컷-오프 농도를 결정하는 단계를 통해 결정될 수 있다. 특히, 최신 통계 방법, ROC (수신자 조작 특성)는 기준 코호트에서 TBT 대상체 및 NTBT를 구별하기 위한 최적 컷-오프 농도를 계산하는데 사용될 수 있다.
- [0214] 본 명세서에서 제시하는 데이터는 miR-193이 대상체에서 조직학적 병변 (지방증, 소엽 염증, 간세포 풍선화)의 비침습적 등급화, NAFLD 활성 수준, NASH 활성 수준의 평가 및 간 섬유화 중증도의 평가를 위한 순환성 진단 생물표지자라는 것을 보여준다.
- [0215] 본 발명의 다른 이형에 따라서, 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 기반으로, 치료 부재 하의 대상체에서 NAFLD 또는 NASH 활성 전개의 위험성의 예후를 위한 방법을 제공한다.
- [0216] 본 발명의 다른 이형은 대상체의 체액 샘플에서 측정된 miR-193의 수준을 기반으로 섬유화의 간경변증으로의 전개 위험성 및 NAFLD 또는 NASH 환자의 간 결과의 예후에 대한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 다른 섬유성 간 질환 예컨대: 바이러스 간염 (HBV, HCV, ...), 알콜성 지방간염, 담즙 질환 (원발성 담즙성 담관염, 원발성 경화성 담관염, 자가면역성 간염, 윌슨병, 알파1 항트립신 결핍증)을 앓는 환자에서 섬유화 전개의 위험성 예후에 대한 것이다.
- [0217] 발명자는 또한 miR-193의 순환 수준의 변화 및 조직학적 점수의 전개, 특히 활성 지수, NAS 및 섬유화 병기의 전개 간 상관성이 존재한다는 것을 확인하였다. 이들 분석은 대상체가 항-NAFLD, 항-NASH 약물 또는 항섬유화 약물로 치료되거나 또는 치료되지 않는지 대상체에서 조직학적 전개를 모니터링하기 위한 방법에서 miR-

193의 용도를 뒷받침한다. 뿐만 아니라, 본 발명의 방법은 조직학적 전개의 대리자로서 혈청 수준 miR-193의 변화를 추정하는 중재 실험에서 약물의 항-NAFLD, 항-NASH 및/또는 항섬유화 활성을 평가하는데 사용될 수 있다.

- [0218] 따라서, 본 발명의 다른 이형은 동일 대상체로부터 2회 이상 따로 수집된 체액 샘플에서 miR-193의 수준의 전개를 기반으로 NAFLD 또는 NASH 활성의 전개 (즉, 진행 또는 퇴행)를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0219] 본 발명의 다른 이형은 동일한 대상체로부터 2회 이상 따로 수집된 체액 샘플에서 miR-193의 수준의 전개를 기반으로 간 섬유화 병기의 전개 (즉, 진행 또는 퇴행)를 모니터링하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0220] 본 발명은 또한 다른 섬유성 간 질환 예컨대: 바이러스 간염 (HBV, HCV,...), 알콜성 지방간염, 담즙 질환 (원발성 담즙성 담관염, 원발성 경화성 담관염, 자가면역성 간염, 윌슨병, 알파1 항트립신 결핍증)에서 섬유화 병기 전개의 결정에 관한 것이다.
- [0221] 본 발명의 다른 이형은 비반응자 대상체에서 측정된 기준 수준과 비교한 대상체의 체액 샘플 중 miR-193의 차등 발현 수준의 검출을 기반으로 특이적 치료에 대한 대상체 (반응자 대상체)의 반응을 예측 (NAFLD 활성, NASH 활성 및 간 섬유화 병기 변화의 예측)하는 방법에 관한 것이다.
- [0222] 따라서, 본 발명에 따라서, 방법은
- [0223] - 대상체에서 NAFLD의 발생의 특징규명,
- [0224] - 대상체에서 NASH의 발생의 특징규명,
- [0225] - 대상체에서 간 섬유화의 발생의 특징규명,
- [0226] - 대상체에서 간세포 풍선화의 발생의 특징규명,
- [0227] - 대상체에서 소엽 염증의 발생의 특징규명, 또는
- [0228] - 대상체에서 간 지방증의 발생의 특징규명을 위해 제공된다.
- [0229] 뿐만 아니라, 본 발명에 따라서, 방법은
- [0230] - 대상체를 NAFLD 및/또는 더 진행된 NAFLD를 갖는 것으로 진단,
- [0231] - 대상체를 NASH 및/또는 더 진행된 NASH를 갖는 것으로 진단,
- [0232] - 대상체를 간 섬유화 및/또는 더 진행된 간 섬유화 병기를 갖는 것으로 진단,
- [0233] - 대상체를 간세포 풍선화 및/또는 더 진행된 간세포 풍선화 점수를 갖는 것으로 진단,
- [0234] - 대상체를 소엽 염증 및/또는 더 진행된 소엽 염증 점수를 갖는 것으로 진단, 또는
- [0235] - 대상체를 간 지방증 및/또는 더 진행된 간 지방증 점수를 갖는 것으로 진단하기 위해 제공된다.
- [0236] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 방법은
- [0237] - 대상체에서 NAFLD 또는 NASH의 활성 결정,
- [0238] - 대상체에서 섬유화 병기의 결정,
- [0239] - 대상체에서 NASH의 중증도의 결정, 또는
- [0240] - NASH 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정을 가능하게 한다.
- [0241] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 방법은
- [0242] - 대상체를 NAFLD에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류,
- [0243] - 대상체를 NASH에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류,
- [0244] - 대상체를 간 섬유화에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류,
- [0245] - 대상체를 간세포 풍선화에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류,
- [0246] - 대상체를 소엽 염증에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류, 또는

- [0247] - 대상체를 간 지방증에 대한 치료의 수신자 또는 비수신자로서 분류를 가능하게 한다.
- [0248] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 방법은
- [0249] - NAFLD 질환을 치료하기 위한 약물 투여 기반의 의학적 치료의 효능 평가,
- [0250] - NASH 질환을 치료하기 위한 약물 투여 기반의 의학적 치료의 효능 평가,
- [0251] - 섬유화 질환을 치료하기 위한 약물 투여 기반의 의학적 치료의 효능 평가,
- [0252] - 간세포 풍선화 질환을 치료하기 위한 약물 투여 기반의 의학적 치료의 효능 평가, 또는
- [0253] - 소염 염증 질환을 치료하기 위한 약물 투여 기반의 의학적 치료의 효능 평가를 가능하게 한다.
- [0254] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 방법은
- [0255] - 의학적 치료의 투여 이후 NAFLD 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정,
- [0256] - 의학적 치료의 투여 이후 NASH 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정,
- [0257] - 의학적 치료의 투여 이후 섬유화를 앓는 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정,
- [0258] - 의학적 치료의 투여 이후 간세포 풍선화 질환을 앓는 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정, 또는
- [0259] - 의학적 치료의 투여 이후 소염 염증 질환을 앓는 환자에서 병리의 진행 또는 퇴행의 결정을 가능하게 한다.
- [0260] 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 방법은
- [0261] - 환자가 NAFLD를 치료하기 위한 특정 의학적 치료에 반응할 것인지 또는 그렇지 않을지, 즉, 잠재적 반응자일지 또는 비반응자일지의 예측,
- [0262] - 환자가 NASH 질환을 치료하기 위한 의학적 치료에 대해 수용적일지 또는 그렇지 않을지, 즉, (잠재적으로) 반응자 또는 (잠재적으로) 비반응자일지의 예측,
- [0263] - 환자가 간 섬유화를 치료하기 위한 의학적 치료에 수용적일지 또는 그렇지 않을지, 즉, (잠재적으로) 반응자일지 또는 (잠재적으로) 비반응자일지의 예측,
- [0264] - 환자가 간세포 질환을 치료하기 위한 의학적 치료에 수용적일지 또는 그렇지 않을지, 즉, (잠재적으로) 반응자일지 또는 (잠재적으로) 비반응자일지의 예측, 또는
- [0265] - 환자가 소염 염증 질환을 치료하기 위한 의학적 치료에 수용적일지 또는 그렇지 않을지, 즉, (잠재적으로) 반응자일지 또는 (잠재적으로) 비반응자일지의 예측을 가능하게 한다.
- [0266] 일부 실시형태에서, 대상체가 NAFLD 또는 NASH, 또는 활성-NASH 또는 간 섬유화 (예컨대 유의미 간 섬유화), 또는 소염 염증, 또는 간세포 풍선화를 갖는지 여부를 결정하거나 또는 대상체가 특이적 약물에 대한 약물 수신자 (TBT) 또는 잠재적 반응자인지를 결정하기 위한 방법은 평가된 병태를 갖는 것이 의심되는 대상체로부터 혈액의 샘플을 수집하는 단계, 및 miR-193의 수준을 검출하는 단계를 포함하고, 여기서 수준 miR-193의 기준 수준보다 높은 수준은 평가된 병태의 존재, 또는 NAFLD 또는 NASH, 또는 활성-NASH 또는 간 섬유화 (예컨대 유의미 섬유화), 또는 소염 염증, 또는 간세포 풍선화를 갖는 것으로 대상체의 진단 또는 잠재적 약물 수신자 (TBT) 또는 반응자로서 대상체를 의미한다.
- [0267] 특정한 실시형태에서, 대상체는 NAFLD, NASH, 활성-NASH 또는 간 섬유화를 가질 위험성이 있는 대상체이거나 또는 향후에 NAFLD, NASH, 활성-NASH 또는 간 섬유화가 발생할 위험성이 있는 대상체, 예컨대 비만, 당뇨병을 갖고/갖거나, 대사 증후군을 앓고/앓거나, 상승된 간 효소를 갖고/갖거나 간 기능 이상의 다른 징후를 갖는 대상체이다. 대상체는 또한 이전에 확인된 NAFLD, NASH 또는 활성-NASH 또는 간 섬유화가 존재하는 대상체일 수 있고, 그리하여 본 발명의 방법은 질환 활성 및 섬유화 병기의 결정, 및 간경변증, 간경변성 합병증, 간암증, 간 이식, 심혈관 질환 또는 간-관련 사망으로 질환의 전개 위험성의 추정을 가능하게 한다.
- [0268] 특정한 실시형태에서, 대상체는 NASH를 앓고, 그리하여 본 발명의 방법은 NASH 질환의 치료를 위한 약물의 효능 결정, NASH의 치료에 대한 반응자/비반응자로서 대상체의 분류, 또는 대상체의 NASH 상태의 전개의 모니터링을 가능하게 한다.
- [0269] 본 발명의 특정한 양상에 따라서, 치료하려는 환자의 각 유형에 대해 NASH 점수를 획득할 수 있다.

[0270] NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 진단 및/또는 대상체에서 질환 활성, 섬유화 병기의 결정, 및/또는 의학적 치료 효능의 평가, 및/또는 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화 대상체에서 병리의 전개 (진행 또는 퇴행)의 결정, 및/또는 의학적 치료에 대한 잠재적 반응자 또는 비반응자로서 대상체의 분류, 및/또는 대상체에 대한 질환 결과의 예측에 대한 본 발명의 특정한 실시형태에서, miR-193 수준의 측정은 다른 변수 예컨대 성별, 연령, 체질량 지수, 체중, 의학적 상태, 동맥압 또는 다른 체액 표지자 예컨대 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자, 특히 하기 표에 언급된 것들과 조합을 위해 수학 모델 (알고리즘)에 도입될 수 있다.

간세포 기능	지방 조직	물질대사	산화 스트레스/아픔토시스	섬유화	염증
ALT AST ALP GGT 합토글로빈 알부민 빌리루빈 혈소판 수치	아디포넥틴 렙틴 레시스틴	공복 혈장당 공복 인슐린 HOMA 지수 트리글리세리드 HDL-콜레스테롤 VLDL-C 아포리포단백질 (ApoA1, ApoB, ApoCIII)	말론디알데히드 TBARS Ox LDL CK18-M30 CK18-M65 페리틴 YKL-40 (CHI3L1)	피브로넥틴 히알루론산 제 IV 형 콜라겐 PIIINP TIMP-1	TNFα IL1b, IL6, IL8, IFNg, TGFβ hs-CRP MCP1 sCD14

[0271]

[0272] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 miR-193 이외에도 다른 생물표지자의 수준의 결정 단계를 포함한다.

[0273] 특정한 실시형태에서 이러한 생물표지자는 알파 2 마크로글로불린 (A2M), 당화 헤모글로빈 (HbA1c), 공복 혈당 수준 또는 프록토사민 수준, III형 콜라겐의 N-말단 프로-펩티드 (PIIINP) 및 YKL-40으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0274] 추가의 특정한 실시형태에서 이러한 생물표지자는 TIMP-1, YKL-40, 혈소판 수치, 대사 증후군, 히알루론산 및 HbA1c로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0275] 다른 추가의 특정한 실시형태에서 이러한 생물표지자는 TIMP-1, YKL-40, 혈소판 수치, 및 대사 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0276] 다른 특정한 실시형태에서 이러한 생물표지자는 TIMP-1, YKL-40, 혈소판 수치, 히알루론산, 및 HbA1c로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0277] 보다 특정한 실시형태에서 이러한 생물표지자는 YKL-40, TIMP-1, PIIINP, HbA1c, 혈소판 수치 또는 A2M이다.

[0278] 다른 실시형태에서, 이러한 생물표지자는 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화 표지자, 예컨대 자기공명 영상법 (MRI), 자기 공명 탄성도 검사 (MRE), 자기 공명 분광법 (MRS), 순간 탄성영상법 (TE)에 의한 제어 감쇠 매개변수 (CAP) 및 간 경직도 측정, 초음파검사 (USG), FibroScan, 포인트 진단과 탄성영상법 (pSWE), 2D 진단과 탄성영상법 (2D-SWE), 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP), 세포 무함유 DNA, 세포 무함유 넌코딩 RNA, 및 유전자 다형성 (예컨대 PNPLA3 및 TM6SF2)에 의해 추정되는, 지방증, 피사염증 및 섬유화의 정도가 있다.

[0279] 특정한 실시형태에서, 이러한 생물표지자는 NAFLD 표지자 예컨대 지방간 지수 관련 표지자, 간 지방증 지수 관련 표지자, NAFLD 간 지방 점수 관련 표지자, SteatoTest 매개변수, NAFLD 릿지 점수 매개변수, 순환 트리글리세리드, 체질량 지수 (BMI); 영상화 생물표지자 예컨대 조직에 의한 빔 산란도 (USG), 간 지방에 의한 초음파 감쇠도 (CAP), 양자 밀도 지방 분획 (MRI-PDFF), 간 트리글리세리드 함량, 신호 지방 분획 (MRS)이다.

[0280] 특정한 실시형태에서, 이러한 생물표지자는 NASH 생화학적 혈액 표지자 예컨대 아픔토시스 표지자 (CK18 단편, 총 사이토케라틴, 아픔토시스-매개 표면 항원 FAS의 혈청 수준), 염증 표지자 (C-반응성 단백질 (CRP), TNF, IL-8, CXC 케모카인 리간드 10 (CXCL10)), 지질 산화 생성물 (11-히드록시아이코사테트라엔산 (HETE), 9-히드록시데카디엔산 (HODE), 13-HODE, 13-옥소-옥타데카디엔산 (ODE), LA-13-HODE (oxNASH 점수), 11,12-디히드록시아이코사트리엔산 (diHETrE)), 아디포사이토카인 및 호르몬 (아디포넥틴, 렙틴, 레시스틴, 비스파틴, 레티놀 결합 단백질 (RBP)4, 지방산 결합 단백질 (FABP)4, 섬유아세포 성장 인자 (FGF21)), 리소솜 효소 (카텝신 D), 및/또는 조합 패널 (NASH 검사, NASH 진단 패널); 영상화 생물표지자 예컨대 쿠퍼 세포 흡수 기능 (MRI), 가독세트 산 사용에 의해 증가된 간 증강 (MRI), 간세포막 턴오버 및 세포내 ATP (MRS), 간 경직도 (MRE)이다.

[0281] 특정한 실시형태에서, 이러한 생물표지자는 간 섬유화 표지자: 영상화 생물표지자 예컨대 기계적으로 유도된 임펄스, 진단과 속도의 정량적 측정 (FibroScan-순간 탄성영상법, pSWE-ARFI, 2D-3D-SWE), 사망시 초음파 유도 집중 방사력 임펄스 (pSWE-ARFI), 간 실질 내 진단과 전파의 영상화를 위한 변형된 위상차 방법의 사용 (MRE);

생화학적 혈액표지자 예컨대 AST:ALT 비율, AST:혈소판 비율 지수 (APRI), FIB4 지수 매개변수, NAFLD 섬유화 점수 매개변수, BARD 점수 매개변수, 특이적 섬유화 표지자 예컨대 HA, PIIINP, Pro-C3, TIMP-1, 라미닌, ELF 관련 패널, fibrotest 매개변수, fibroMeter NAFLD 매개변수이다.

- [0282] 다른 추가 실시형태에서 이러한 표지자는 NAFLD 위험도 및 중증도 표지자 예컨대 유전자 및 게놈 표지자 예컨대 SNP (PNPLA3의 rs738409), 세포 무함유 네크코딩 RNA (miR-122, miR-1290, miR-192 및 miR-7b), 혈청 유래 오믹스 데이터의 복합 패널 예컨대 rs738409 및 ACY1, SHBG, CTSZ, MET, GNS, LGALS3BP, CHL1 및 SERPINC1을 포함하는 단백질체 데이터, 다수 유전자좌의 SNP (PNPLA3, SOD2, KLF6 및 LPIN1), miR-122, miR-122, miR-192, miR-21, ALT, CK18 Asp396을 포함하는 복합 패널, 세포 무함유 DNA 예컨대 순환 메틸화 PPARG이다.
- [0283] 추가의 실시형태에 따라서, 다른 생물표지자는 miR-193 이외에도, 다른 순환 마이크로RNA가 있다. 특히, 본 발명의 실시에서 유용할 수 있는 예시적인 추가의 마이크로RNA는 miR-34a, miR-122 및 miR-200을 포함한다.
- [0284] 이들 실시형태에 따라서, 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:
- [0285] i) miR-193의 수준 및 적어도 하나의 다른 간 손상의 순환 표지자 (예컨대 간 손상의 혈액, 혈청 또는 혈장 순환 표지자)를 측정하는 단계, 및
- [0286] ii) NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화 점수를 획득하기 위해 생물정보학 접근법 (예를 들어, 선형 로지스틱 회귀 또는 랜덤 포레스트)을 통해 수학 모델 (알고리즘)의 생성을 위한 이들 측정치를 대상체에서 NAFLD, NASH, 활성-NASH 또는 간 섬유화의 측정을 위한 높은 진단/모니터링/예후/예측 성능과 조합시키는 단계.
- [0287] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:
- [0288] - hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 hsa-miR-193b-3p 또는 hsa-miR-193b-5p, 또는 hsa-miR-193a, 보다 특히 hsa-miR-193a-5p 또는 hsa-miR-193a-3p의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0289] - 하기로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 다른 표지자, 바람직하게는 전부의 수준을 측정하는 단계:
- [0290] - 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1);
- [0291] - YKL-40;
- [0292] - 혈소판 수치;
- [0293] - 대사 증후군 (ms).
- [0294] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0295] - hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 hsa-miR-193b-3p 또는 hsa-miR-193b-5p, 또는 hsa-miR-193a, 보다 특히 hsa-miR-193a-5p 또는 hsa-miR-193a-3p의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0296] - 하기로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 다른 표지자, 바람직하게는 전부의 수준을 측정하는 단계:
- [0297] - 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1);
- [0298] - YKL-40;
- [0299] - 혈소판 수치;
- [0300] 및 대상체가 대사 증후군을 갖는지 여부를 결정하는 단계.
- [0301] 대사 증후군의 진단은 [Kotronen et al., Gastroenterology 2009, 137: 865-872]에 교시된 기준에 따라 수행될 수 있다.
- [0302] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 하기 표지자의 수준을 측정하는 단계를 포함한다:
- [0303] - miR-193b (보다 특히 miR-193b-3p)의 수준; 및
- [0304] - TIMP-1의 수준; 및
- [0305] - YKL-40; 및
- [0306] - 혈소판 수치; 및
- [0307] - 대사 증후군.

- [0308] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 그 수준이 측정된 생물표지자의 수준으로부터, 점수, 또는 NASH-점수를 계산하는데 사용될 수 있다.
- [0309] 특정한 실시형태에서, NASH 점수 S1은 하기 로지스틱 함수로서 정의된다:
- $$S1 \sim \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$
- [0310]
- [0311] 상기 식에서,
- [0312] $Y = k + a \cdot A + b \cdot B + c \cdot C + d \cdot D + f \cdot F$ 이고,
- [0313] 여기서,
- [0314] S1은 본 발명에 따른 NASH 점수이고;
- [0315] A는 $\log_{10}$ 카피수. μL^{-1} 로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;
- [0316] B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;
- [0317] C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;
- [0318] D는 $10^9/L$ 로서 혈소판 수치이고;
- [0319] F는 대사 증후군이고;
- [0320] k는 로지스틱 함수의 상수이고;
- [0321] a는 hsa-miR-193b-3p의 수준과 연관된 계수이고;
- [0322] b는 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;
- [0323] c는 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;
- [0324] d는 혈소판 수치와 연관된 계수이고;
- [0325] f는 대사 증후군과 연관된 계수이다.
- [0326] 특정한 실시형태에서, 대사 증후군은 대상체가 대사 증후군을 가지면 1의 값을 갖는 것으로 정의되거나, 또는 대상체가 대사 증후군을 갖지 않으면 0의 값을 갖는 것으로 정의된다. 이러한 특정 실시형태에서, 계수 f는 환자가 대사 증후군을 가질 때 1의 값에 적용된다.
- [0327] 따라서 NASH 점수는 중등도 내지 고도의 NASH 활성 또는 중증 NASH를 가질 확률이다.
- [0328] S1이 한계치 이상이면, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소염 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나, 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH에 대한 치료군, 또는 NASH에 대한 잠재적 치료군으로 분류되거나, 또는 NASH에 대한 치료군 및/또는 식이 및/또는 생활방식 조언의 수신자로서 분류된다. 특정한 실시형태에 따라서, S1이 한계치 미만이면, 대상체는 치료군으로서 또는 미치료군으로서, 특히 미치료군으로서 분류될 수 있고/있거나, 대상체는 그/그녀의 낮은 NASH 활성 또는 중등증 NASH를 관리하기 위해 식이 및/또는 생활방식 조언의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.
- [0329] 다른 특정한 실시형태에서, 본 출원의 실험 부분에 기술된 바와 같이 부트스트랩 모델로부터 다음이 유추된다:
- [0330] k는 -8.39 내지 -2.67을 포함하는 수이고,
- [0331] a는 0.58 내지 2.50을 포함하는 수이고,
- [0332] b는 $2.29E-03$ 내지 $1.87E-02$ 를 포함하는 수이고,
- [0333] c는 $2.14E-06$ 내지 $1.65E-05$ 를 포함하는 수이고,
- [0334] d는 $-1.56E-02$ 내지 $-1.05E-03$ 을 포함하는 수이고,
- [0335] f는 0.03 내지 1.63을 포함하는 수이고,

- [0336] 여기서 한계치는 0.3050 내지 0.6518을 포함하고, 보다 특히 0.3993 $\pm$ 10%이고, 특히 0.3993이다.
- [0337] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S1이 0.3050 내지 0.6518을 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 0.3993 $\pm$ 10%, 특히 0.3993이면 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.
- [0338] 특정한 실시형태에서, 하기가 부트스트랩 모델로부터 유추된다:
- [0339] k는 -5.53이고;
- [0340] a는 1.54이고;
- [0341] b는 0.0105이고;
- [0342] c는 0.00000934이고;
- [0343] d는 -0.00832이고;
- [0344] f는 0.83이고;
- [0345] 여기서 한계치는 0.3050 내지 0.6518을 포함하고, 보다 특히 0.3993 $\pm$ 10%이고, 특히 0.3993이다.
- [0346] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S1이 0.3050 내지 0.6518을 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 0.3993 $\pm$ 10%이면, 특히 0.3993이면 치료의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.
- [0347] 이러한 특정한 실시형태에 따라서, AUC는 적어도 0.80이다.
- [0348] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0349] - hsa-miR-193, 특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 hsa-miR-193b-3p 또는 hsa-miR-193b-5p, 또는 hsa-miR-193a, 보다 특히 hsa-miR-193a-5p 또는 hsa-miR-193a-3p의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0350] - 하기로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 다른 표지자, 바람직하게는 전부의 수준을 측정하는 단계:
- [0351] - YKL-40;
- [0352] - 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1);
- [0353] - 히알루론산 (HYUA2)
- [0354] - HbA1c; 및
- [0355] - 혈소판 수치.
- [0356] 특정한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 하기 표지자의 수준을 측정하는 단계를 포함한다:
- [0357] - miR-193b (보다 특히 miR-193b-3p)의 수준; 및
- [0358] - YKL-40의 수준; 및
- [0359] - TIMP-1의 수준; 및
- [0360] - 히알루론산 (HYUA2)
- [0361] - HbA1c; 및
- [0362] - 혈소판 수치.
- [0363] 특정한 실시형태에서, NASH 점수 S2는 하기 로지스틱 함수로서 정의된다:
- [0364]
$$S2 \sim \frac{e^{Y2}}{1 + e^{Y2}}$$
- [0365] 상기 식에서,

- [0366] $Y2=1+a2 \cdot A+c2 \cdot C+b2 \cdot B+e \cdot E+g \cdot G+d2 \cdot D$ 이고,
- [0367] 여기서,
- [0368] S2는 본 발명에 따른 NASH 점수이고;
- [0369] A는 $\log_{10}$ 카피수 $\cdot \mu L^{-1}$ 로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;
- [0370] C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;
- [0371] B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;
- [0372] E는 백분율로서 HbA1c의 수준이고;
- [0373] G는 ng/mL로서 히알루론산의 수준이고;
- [0374] D는 $10^9/L$ 로서 혈소판 수치이고;
- [0375] 1은 로지스틱 함수의 상수이고;
- [0376] a2는 hsa-miR-193b-3p의 수준과 연관된 계수이고;
- [0377] c2는 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;
- [0378] b2는 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;
- [0379] e는 HbA1c의 수준과 연관된 계수이고;
- [0380] g는 히알루론산의 수준과 연관된 계수이고;
- [0381] d2는 혈소판 수치와 연관된 계수이다.
- [0382] 따라서 NASH 점수 S2는 중등도 내지 고도의 NASH 활성 또는 중증 NASH를 가질 확률이다.
- [0383] S2가 한계치 이상이면, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH에 대한 치료군, 또는 NASH에 대한 잠재적 치료군으로서 분류되거나, 또는 NASH에 대한 치료군 및/또는 식이 및/또는 생활 방식 조건의 수신자로서 분류된다. 특정한 실시형태에 따라서, S2가 한계치 미만이면, 대상체는 치료군 또는 미치료군, 특히 미치료군으로서 분류될 수 있고/있거나, 대상체는 그/그녀의 낮은 NASH 활성 또는 중등증 NASH를 관리하기 위해 식이 및/또는 생활방식 조건의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.
- [0384] 다른 특정한 실시형태에서, 하기는 본 출원의 실험 부분에서 기술된 바와 같이 부트스트랩 모델로부터 유추된다:
- [0385] 1은 -10.92 내지 -3.89를 포함하는 수이고,
- [0386] a2는 0.44 내지 2.17을 포함하는 수이고,
- [0387] c2는 0.0035 내지 0.02를 포함하는 수이고,
- [0388] b2는 0.0016 내지 0.018을 포함하는 수이고,
- [0389] e는 -0.0053 내지 0.0057을 포함하는 수이고,
- [0390] g는 0.13 내지 1.08을 포함하는 수이고,
- [0391] d2는 -0.017 내지 -0.0027을 포함하는 수이고,
- [0392] 여기서 한계치는 0.2461 내지 0.6252를 포함하고, 보다 특히 0.4216 $\pm$ 10%이고, 특히 0.4216이다.
- [0393] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S2가 0.2461 내지 0.6252를 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 0.4216 $\pm$ 10%이면, 특히 0.4216이면 치료의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.

- [0394] 특정한 실시형태에서, 또한 하기가 부트스트랩 모델로부터 유추된다:
- [0395] l 은 -7.52 이고;
- [0396] a_2 는 1.29 이고;
- [0397] c_2 는 0.01 이고;
- [0398] b_2 는 0.0092 이고;
- [0399] e 는 -0.0024 이고;
- [0400] g 는 0.59 이고;
- [0401] d_2 는 -0.009 이고;
- [0402] 여기서 한계치는 0.2461 내지 0.6252 를 포함하고, 보다 특히 $0.4216 \pm 10\%$ 이고, 특히 0.4216 이다.
- [0403] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S2가 0.2461 내지 0.6252 를 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 $0.4216 \pm 10\%$ 이면, 특히 0.4216 이면 치료의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.
- [0404] 이러한 특정한 실시형태에 따라서, AUC는 적어도 0.80 이다.
- [0405] 특정한 실시형태에서, NASH 점수 S3은 다음의 로지스틱 함수로서 정의된다:
- [0406]
$$S3 \sim \frac{e^{Y3}}{1 + e^{Y3}}$$
- [0407] 상기 식에서,
- [0408] $Y3 = m + a_3 A' + c_3 C + b_3 B + e_2 E + g_2 G + d_3 D$ 이고,
- [0409] 여기서,
- [0410] S3은 본 발명에 따른 NASH 점수이고;
- [0411] A' 은 Cq로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;
- [0412] C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;
- [0413] B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;
- [0414] E는 백분율로서 HbA1c의 수준이고;
- [0415] G는 ng/mL로서 히알루론산의 수준이고;
- [0416] D는 $10^9/L$ 로서 혈소판 수치이고;
- [0417] m 은 로지스틱 함수의 상수이고;
- [0418] a_3 은 hsa-miR-193b-3p의 수준과 연관된 계수이고;
- [0419] c_3 은 YKL-40의 수준과 연관된 계수이고;
- [0420] b_3 은 TIMP-1의 수준과 연관된 계수이고;
- [0421] e_2 는 HbA1c의 수준과 연관된 계수이고;
- [0422] g_2 는 히알루론산의 수준과 연관된 계수이고;
- [0423] d_3 은 혈소판 수치와 연관된 계수이다.
- [0424] 따라서 NASH 점수 S3은 중등도 내지 고도의 NASH 활성 또는 중증 NASH를 가질 확률이다.
- [0425] S3이 한계치 이상이면, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH에 대한 치

료군 또는 잠재적 치료군으로서 분류되거나, 또는 NASH에 대한 치료군 및/또는 식이 및/또는 생활방식 조건의 수신자로서 분류된다. 특정한 실시형태에 따라서, S3이 한계치 미만이면, 대상체는 치료군 또는 미치료군, 특히 미치료군으로서 분류될 수 있고/있거나, 대상체는 그/그녀의 낮은 NASH 활성 또는 중등증 NASH를 관리하기 위해 식이 및/또는 생활방식 조건의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.

[0426] 다른 특정한 실시형태에서, 하기는 본 출원의 실험 부분에 기술된 바와 같은 부트스트랩 모델로부터 유추된다:

[0427] m 은 -1.27 내지 17.54를 포함하는 수이고,

[0428] a_3 은 -0.64 내지 -0.09를 포함하는 수이고,

[0429] c_3 은 0.005 내지 0.019를 포함하는 수이고,

[0430] b_3 은 0.001 내지 0.016을 포함하는 수이고,

[0431] e_2 는 -0.0054 내지 0.0045를 포함하는 수이고,

[0432] g_2 는 0.12 내지 1.08을 포함하는 수이고,

[0433] d_3 은 -0.0164 내지 -0.0016을 포함하는 수이고,

[0434] 여기서 한계치는 0.2270 내지 0.6364를 포함하고, 보다 특히 $0.3741 \pm 10\%$ 이고, 특히 0.3741이다.

[0435] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S3이 0.2270 내지 0.6364를 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 $0.3741 \pm 10\%$ 이면, 특히 0.3741이면 치료의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.

[0436] 특정한 실시형태에서, 또한 하기는 부트스트랩 모델로부터 유추된다:

[0437] m 은 8.08이고;

[0438] a_3 은 -0.38이고;

[0439] c_3 은 0.01이고;

[0440] b_3 은 0.01이고;

[0441] e_2 는 -0.0024이고;

[0442] g_2 는 0.57이고;

[0443] d_3 은 -0.0090이고;

[0444] 여기서 한계치는 0.2270 내지 0.6364를 포함하고, 보다 특히 $0.3741 \pm 10\%$ 이고, 특히 0.3741이다.

[0445] 특정한 실시형태에 따라서, 대상체는 NASH를 갖거나, 또는 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 를 갖거나 또는 잠재적으로 갖는 것으로 분류되고/되거나, NASH 점수 S3이 0.2270 내지 0.6364를 포함하는 한계치 이상이면, 보다 특히 $0.3741 \pm 10\%$ 이면, 특히 0.3741이면 치료의 수신자 또는 잠재적 수신자로서 분류된다.

[0446] 이러한 특정한 실시형태에 따라서, AUC는 적어도 0.80이다.

[0447] 추가의 특정한 실시형태에서, NASH 점수를 계산하기 위해 기술된 상기 방법은 혈액, 혈청 또는 혈장 샘플, 특히 혈장 샘플로부터 제공된다.

[0448] 다른 실시형태에서, NAFLD, NASH 또는 간 섬유화에 대한 위험성의 진단, 검출, 모니터링, 평가 또는 치료 효능의 평가는 대상체의 체액 샘플에서 miR-193의 수준을 결정하는 단계, 및 대상체에게 물리적, 비침습성 기법, 예컨대 초음파, 탄성영상법 또는 영상 기법 예컨대 MRI를 수행하는 단계에 의해 수행된다.

[0449] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 동일 출원인이 소유하는 W02017046181에 개시된 방법과 조합될 수 있다.

[0450] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법 덕분에, 대상체에게 생활방식 권고를 제공 (예컨대, 식이 요법 또는 신체 활동 권고 제공)하거나, (예를 들어, 규칙적으로 간 손상의 표지자를 모니터링하기 위한 규칙적인 조사 또는 의사에게 규칙적인 방문을 설정하여) 대상체를 의학적으로 돌보거나, 또는 적어도 하나의 NAFLD, NASH 또는 간 섬유

유화 요법을 대상체에게 투여하도록 판단할 수 있다. 수신자 또는 TBT 환자로서 대상체의 이러한 분류는 상기에 제공된 바와 같이, 비수신자 환자 (NTBT)에서 측정된 기준 miR-193 수준과 비교하여 miR-193의 상승된 수준을 기반으로 한다.

[0451] 따라서 본 발명은 또한 치료를 필요로 하는 대상체에서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 치료를 위한 방법에서 사용을 위한 항-NAFLD, 항-NASH 또는 항섬유화 화합물에 관한 것으로서, 여기서 대상체는 본 발명에 따른 방법 덕분에 식별되었다.

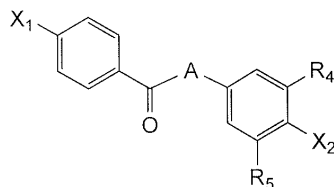
[0452] 특히, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 NAFLD를 치료하기 위한 방법에서 사용을 위한 항-NAFLD 화합물에 관한 것으로서, 여기서 대상체는 본 발명에 따른 방법 덕분에 상기 치료의 수신자로서 분류되었다.

[0453] 특히, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 NASH를 치료하기 위한 방법에서 사용을 위한 항-NASH 화합물에 관한 것으로서, 여기서 대상체는 본 발명에 따른 방법 덕분에 상기 치료의 수신자로서 분류되었다.

[0454] 특히, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 간 섬유화를 치료하기 위한 방법에서 사용을 위한 항섬유화 화합물에 관한 것으로서, 여기서 대상체는 본 발명에 따른 방법 덕분에 상기 치료의 수신자로서 분류되었다.

[0455] 예시적인 항-NAFLD, 항-NASH 및 항섬유화 화합물은 하기에 열거한다:

[0456] - 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:



[0457]

[상기 식에서,

[0458]

X1은 할로젠, R1, 또는 G1-R1 기를 나타내고;

[0459]

A는 CH=CH 또는 CH2-CH2 기를 나타내고;

[0460]

X2는 G2-R2 기를 나타내고;

[0461]

G1 및 G2는 동일하거나 또는 상이하게, 산소 또는 황의 원자를 나타내고;

[0462]

R1은 수소 원자, 미치환된 알킬 기, 아릴 기 또는 하나 이상의 할로젠 원자, 알콕시 또는 알킬티오 기, 시클로알킬 기, 시클로알킬티오 기 또는 복소환 기로 치환된 알킬 기를 나타내고;

[0463]

R2는 적어도 -COOR3 기로 치환된 알킬 기를 나타내고, 여기서 R3은 수소 원자, 또는 하나 이상의 할로젠 원자, 시클로알킬 기, 또는 복소환 기로 치환 또는 미치환된 알킬 기를 나타내고.

[0464]

R4 및 R5는 동일하거나 또는 상이하게, 하나 이상의 할로젠 원자, 시클로알킬 기, 복소환 기로 치환 또는 미치환된 알킬 기를 나타냄];

[0465]

- 아세틸-CoA 카르복실라제 억제제 예컨대 GS-0976, ND-654, AC-8632, PF05175157, CP640186, 켄카벤, MK-4074, 및 PF05175157.

[0466]

- 아데노신 A3 수용체 효현제 예컨대 2-(1-헥실닐)-N-메틸아데노신, 피클리데노손 CF-101 (IB-MECA), 나모데노손 CF-102, 2-CI-IB-MECA, CP-532,903, 이노신, LUF-6000, 및 MRS-3558.

[0467]

- 알도스테론 길항제 및 미네랄코르티코이드 수용체 길항제 예컨대 아파라레논 (MT 3995), 아밀로리드, 스피로노락톤, 에플레레논, 칸레논 및 포타슘 칸레노에이트, 프로게스테론, 드로스피레논, 게스토텐, 및 베니디핀.

[0468]

- AMP 활성화된 단백질 키나제 자극제 예컨대 PXL-770, MB-11055 Debio-0930B 메트포르민, CNX-012, O-304, 만지페린 칼슘 염, 엘트롬보판, 카로톡시맙, 및 이메글리민.

[0469]

- 아밀린 수용체 효현제 및 칼시토닌 수용체 효현제는 제한없이 KBP-042 및 KBP-089를 포함한다.

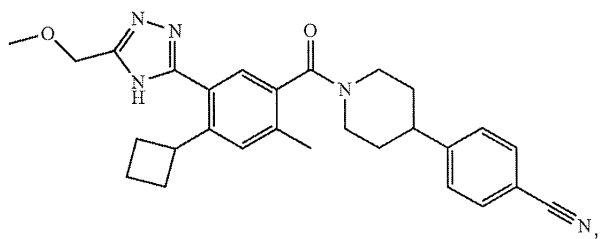
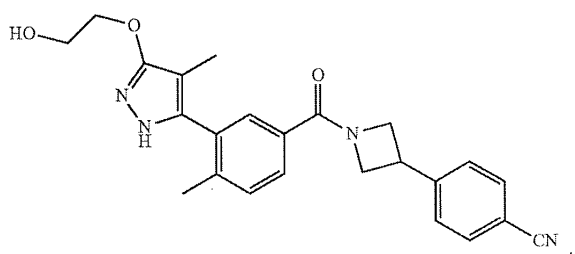
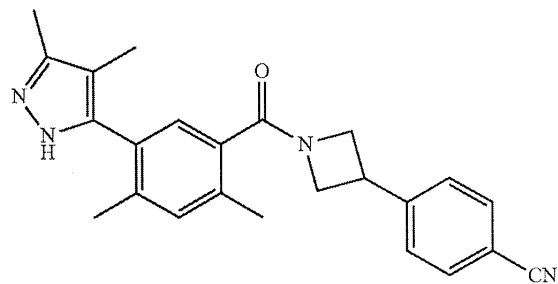
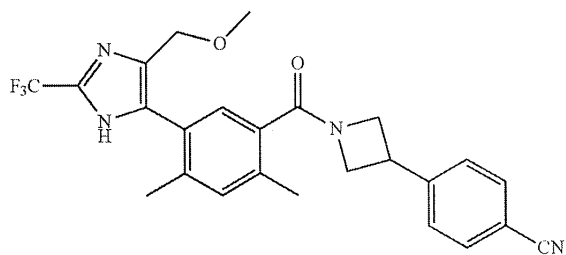
[0470]

- 안지오프이어틴-관련 단백질-3 억제제 예컨대 ARO-ANG3, IONIS-ANGPTL3-LRx 또는 AKCEA-ANGPTL3LRx, 에비나쿠맙, 및 ALN-ANG.

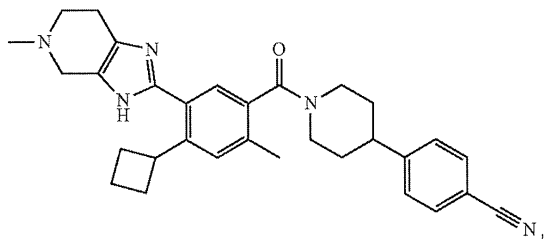
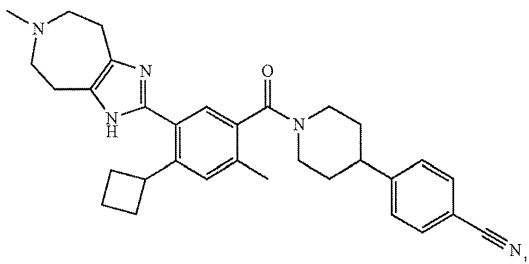
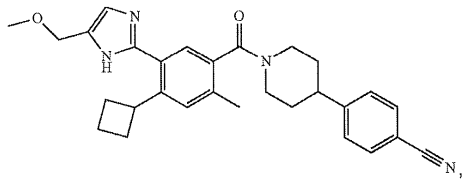
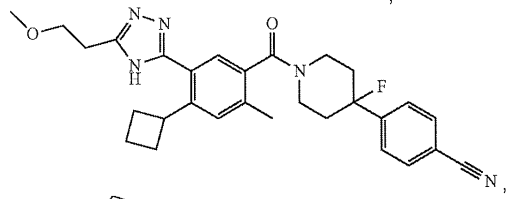
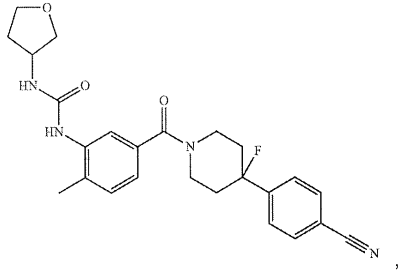
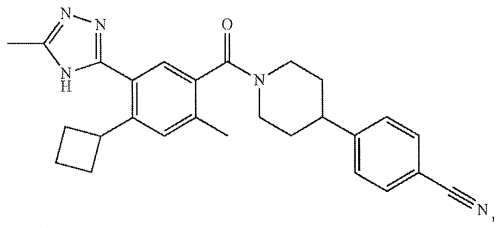
[0471]

- [0472] - 항-LPS 항체 예컨대 IMM-124-E.
- [0473] - 형질전환 성장 인자 베타 2를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 제한없이, ASPH-0047, IMC-TR1 및 ISTH-0047을 포함한다.
- [0474] - 정점 소듬-동시의존적 담즙산 수송체 억제제 예컨대 A-4250, 볼릭시바트, 마랄릭시바트 (이전명칭 SHP-625), GSK-2330672, 엘로빅시바트, 및 CJ-14199.
- [0475] - 무수 베타인 또는 RM-003.
- [0476] - 담즙산은 예컨대 오베티콜산 (OCA) 및 UDCA, 노르우르소데옥시콜산, 및 우르소디올을 포함한다.
- [0477] - 생활성 지질 예컨대 5-히드록시아이코사펜타에노산 (15-HEPE, DS-102), 불포화 지방산 예컨대 25 아라키돈산, 아이코사펜테틸 에스테르, 아이코사펜타네오산, 및 도코사헥사에노산.
- [0478] - 칸나비노이드 CB1 수용체 길항제 예컨대 GRC-10801, MRI-1569, MRI-1867, DBPR-211, AM-6527, AM-6545, NESS-11-SM, CXB-029, GCC-2680, TM-38837, Org-50189, PF-514273, BMS-812204, ZYO-1, AZD-2207, AZD-1175, 오테나반트, 이비피나반트, 수리나반트; 리모나반트, 트리나반트, SLV-326, V-24343, 및 O-2093.
- [0479] - 칸나비노이드 CB2 수용체 모방제 예컨대 아나바숨 (레수납, JKT-101).
- [0480] - 이중 칸나비노이드 CB1 수용체/iNOS 억제제.
- [0481] - 캐스파제 억제제 예컨대 엠리카산, 벨나카산, 니보카산, IDN-7314, F-573, VX-166, YJP-60107, MX-1122, IDN-6734, TLC-144, SB-234470, IDN-1965, VX-799, SDZ-220-976, 및 L-709049.
- [0482] - 카텝신 억제제 예컨대 VBY-376, VBY-825, VBY-036, VBY-129, VBY-285, Org-219517, LY3000328, RG-7236, 및 BF/PC-18.
- [0483] - CCR 길항제 예컨대 세니크리비록 (CCR2/5 길항제), PG-092, RAP-310, INCB-10820, RAP-103, PF-04634817, 및 CCX-872.
- [0484] - CCR3 케모카인 조절인자 및 에오타신 2 리간드 억제제.
- [0485] - 디아실글리세롤-O-아실트랜스퍼라제 (DGAT) 억제제, 예컨대 IONIS-DGAT2Rx (이전명칭 ISIS-DGAT2Rx), ISIS 703802, LY-3202328, BH-03004, KR-69530, OT-13540, AZD-7687, PF-06865571, PF-06424439, 및 ABT-046.
- [0486] - 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP4) 억제제, 예보글립틴, 비다글립틴, 포타글립틴, 알로글립틴, 삭사글립틴, 티로글립틴, 아나글립틴, 시타글립틴, 레타글립틴, 멜로글립틴, 가소글립틴, 트렐라글립틴, 테넬리글립틴, 두토글립틴, 리나글립틴, 제미글립틴, 요글립틴, 베타글립틴, 이미글립틴, 오마리글립틴, 비다글립틴, 및 데나글립틴.
- [0487] - 인슐린 리간드 및 인슐린 수용체 효현제.
- [0488] - 인슐린 감작제 및 MCH 수용체-1 길항제.
- [0489] - NOX (NADPH 옥시다제) 억제제, 예컨대 이중 NOX (NADPH 옥시다제) 1&4 억제제; GKT-831 (2-(2-클로로페닐)-4-[3-(디메틸아미노)페닐]-5-메틸-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-3,6(2H,5H)-디온) (이전명칭 GKT137831), 및 GKT-901.
- [0490] - 세포외 매트릭스 단백질 조절인자 예컨대 CNX-024, CNX-025, 및 SB-030.
- [0491] - 지방산 신타제 (FAS) 억제제 예컨대 TVB-2640; TVB-3664; TVB-3166, TVB-3150, TVB-3199, TVB-3693BZL-101, 2-옥타데시노산, MDX-2, 파스날, MT-061, G28UCM, MG-28, HS-160, GSK-2194069, KD-023, 및 실로스타졸.

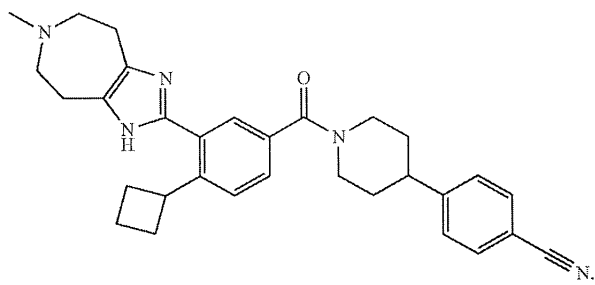
[0492] 특정한 실시형태에서, FAS 억제제는 하기의 화합물 목록에서 선택되는 화합물이다:



[0493]

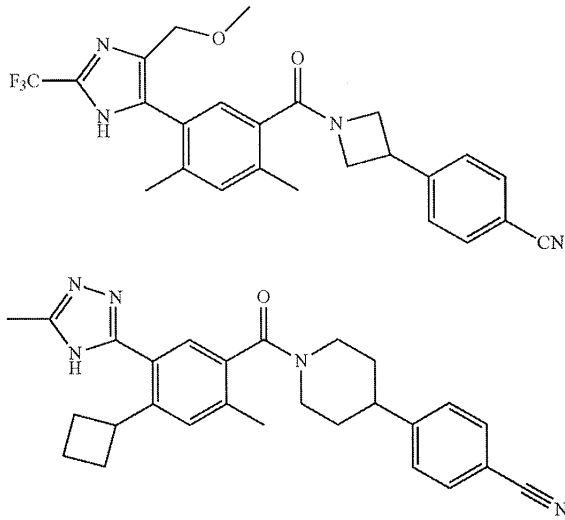


[0494]



[0495] 및 TVB-2640.

[0496] 다른 특정한 실시형태에서, FAS 억제제는 하기로부터 선택된다:



[0497] 및 TVB-2640.

[0498] 특정한 실시형태에서, FAS 억제제는 TVB-2640이다.

[0499] - 지방산 예컨대 오메가-3 지방산, 오마코 또는 MF4637, 어유, 다가 불포화 지방산 (efamax, optiEPA).

[0500] - 스테아로일 CoA 디사투라제-1 억제제/지방산 담즙산 접합체 (FABAC).

[0501] - 파르네소이드 X 수용체 (FXR) 효현제; 오벤티콜산,(OCA), GS-9674, LJN-452, EDP-305; AKN-083, INT-767, GNF-5120, LY2562175, INV-33, NTX-023-1, EP-024297, Px-103, SR-45023.

[0502] - 섬유아세포 성장 인자 19 (FGF-19) 수용체 리간드 또는 FGF-19의 기능적 조작 변이체.

[0503] - 섬유아세포 성장 인자 19 (FGF-19) 재조합체 예컨대 NGM-282.

[0504] - 섬유아세포 성장 인자 21 (FGF-21) 효현제 예컨대 PEG-FGF21 (이전명칭 BMS-986036), YH-25348, BMS-986171, YH-25723, LY-3025876, 및 NNC-0194-0499.

[0505] - 갈락틴 3 억제제 예컨대 GR-MD-02, TD-139, ANG-4021, 갈락틴-3C, LJPC-201, TFD-100, GR-MD-03, GR-MD-04, GM-MD-01, GM-CT-01, GM-CT-02, Gal-100, 및 Gal-200.

[0506] - 글루카곤-유사 펩티드-1 (GLP-1) 유사체 예컨대 세마글루티드, 리라글루티드, 엑세나티드, 알비글루티드, 둘라글루티드, 리시세나티드, 록세나티드, 에프페글레나티드, 타스포글루티드, MKC-253, DLP-205, 및 ORMD-0901.

[0507] - 글루카곤-유사 펩티드-1 (GLP-1) 수용체 효현제 예컨대 LY-3305677, 및 장기 지속형 옥신토모둘린.

[0508] - G-단백질 커플링된 수용체 (GPCR) 조절인자 예컨대 CNX-023.

[0509] - G-단백질 커플링된 수용체 84 길항제 (GPR84 길항제), 결합 조직 성장 인자 리간드 억제제 및 유리 지방산 수용체 1 효현제 (FFAR1 효현제) 예컨대 PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283, 및 PBI-4299.

[0510] - 성장 호르몬.

[0511] - 헤지호그 세포-신호전달 경로 억제제 예컨대 비스모테집, TAK-441, IPI-926, 사리테집, 소니테집/에리스모테집, BMS-833923/XL139, PF-04449913, 탈라테집/LY2940680, ETS-2400, SHR-1539, 및 CUR61414.

[0512] - 회장 소듬 담즙산 공동수송체 억제제 예컨대 A-4250, GSK-2330672, 볼릭시바트, CJ-14199, 및 엘로빅시바트.

[0513] - 면역조절인자 예컨대 PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283, PBI-4299 및 AIC-649.

[0514] - 인슐린 감작제 및 MCH 수용체-1 길항제 예컨대 MSDC-0602k, MSDC-0602, CSTI-100 및 AMRI.

[0515] - 인테그린 억제제; Pliant Therapeutic의 인테그린 억제제, Indalo Therapeutics의 인테그린 억제제, St Louis University의 인테그린 억제제, ProAgio, 및 GSK-3008348.

[0516] - 케토헥소키나제 억제제 예컨대 JNJ-28165722; JNJ-42065426; JNJ-42152981; JNJ-42740815; JNJ-42740828, 및 PF-06835919.

[0517] - 류코트리엔 (LT)/포스포디에스테라제 (PDE)/리포옥시게나제 (LO) 억제제 예컨대 티페루카스트 (이전명칭 MN-

001), 토메루카스트, 수루카스트, 마실루카스트, 자필루카스트, 프란루카스트, 몬테루카스트, 제미루카스트, 벨루카스트, 아크루카스트, 포빌리카스트, 시나루카스트, 및 이라루카스트.

- [0518] - 리실 옥시다제 상동체 2 억제제 예컨대 Rappaport, InterMune, Pharmaxis, AB-0023, 심투주맙, PXS-5382A, 및 PXS-5338.
- [0519] - 마크롤리드 예컨대 솔리트로마이신, 아지트로마이신, 및 에리쓰로마이신.
- [0520] - 마크로파지 만노스 수용체 조절인자 예컨대 AB-0023, MT-1001, [18F]FB18mHSA, 제미스, 테크네튬 Tc 99m 킬마노셉트, 및 CDX-1307.
- [0521] - 메틸 CpG 결합 단백질 2 조절인자 및 트랜스글루타미나제 억제제는 제한없이 시스테아민, EC 시스테아민, 장용 제피 시스테아민 바이타르트레이트, 시스테아민 바이타르트레이트 (장용 제피), 베누, 시스테아민 바이타르트레이트 (장용 제피), 랩터, 시스테아민 바이타르트레이트, DR 시스테아민, 자연 방출형 장용 제피시스테아민 바이타르트레이트, 머캅타민, 머캅타민 (장용 제피), 베누, 머캅타민 (장용 제피), 랩터, RP-103, RP-104, PROCYSBI, 및 머캅타민 (장용 제피)을 포함한다.
- [0522] - miRNA 길항제 예컨대 RG-125 (이전명칭 AZD4076), RGLS-5040, RG-101, MGN-5804, 및 MRG-201.
- [0523] - 메탈로프로테이나제-9 (MMP9) 자극인자 예컨대 Elastomic Ab의 MMP9 자극인자.
- [0524] - 미토콘드리아 캐리어 패밀리 억제제 및 미토콘드리아 포스페이트 캐리어 단백질 억제제는 제한없이 TRO-19622, 트로포스, 올레속심, RG-6083, 또는 RO-7090919를 포함한다.
- [0525] - 미엘로퍼옥시다제 억제제는 제한없이 PF-06667272를 포함한다.
- [0526] - 단일클론 항체 예컨대 벨틸리주맙, NGM-313, IL-20 표적화 mAb, 프레솔리주맙 (항 TGF β) (이전명칭 GC1008), 티몰루맙 (이전명칭 BTT-1023), 나마시주맙, 오말리주맙, 라니비주맙, 베바시주맙, 레브리키주맙, 에프라투주맙, 펠비주맙, 마투주맙, 모날리주맙, 레슬리주맙, 포탈루맙 (NI-0401, 항-CD3), 심티주맙 (GS-6624) LOXL2에 대한 mAb, 우스테키누맙 항-TNF 항체, 및 이네빌리주맙.
- [0527] - 단일클론 항체 예컨대 항-IL20 mAb, 항-TGF β 항체, 항-CD3 항체, 항-LOXL2 항체 및 항-TNF 항체.
- [0528] - NAD-의존적 디아세틸라제 시르투인 자극인자; PDE 5 억제제 예컨대 NS-0200.
- [0529] - NF- κ B 억제제 예컨대 LC-280126.
- [0530] - 니코틴산 예컨대 니아신 또는 비타민 B3.
- [0531] - 니코틴산 수용체 (GPR109) 효현제 예컨대 ARI-3037MO, MMF, LUF 6283, 아시프란, IBC 293, MK-1903, GSK256073, MK-6892, MK-0354, SLx-4090, 로미타피드, 렉시볼린, 아파베탈론, 아시프란, 라로피프란트, 다포리나드, 아나세트라핌, INCB-19602, ST-07-02, 로메플록사신, 니아신, 및 제어 방출형/라로피프란트.
- [0532] - 비스테로이드 항염증 약물 (NSAID)은 제한없이 F-351, 살리실레이트 (아스피린), 아세트아미노펜, 프로피온산 유도체 (이부프로펜, 나프록센), 아세트산 유도체 (인도메타신, 디클로페낙), 에놀산 유도체 (피록시캄, 페닐부타존), 안트라닐산 유도체 (메클로페남산, 플루페남산), 선택적 COX-2 억제제 (셀레콕싹, 파레콕싹), 및 숄폰아닐리드 (니메술리드)를 포함한다.
- [0533] - mTOR 조절인자 예컨대 MSDC-0602, 및 SVP-시롤리무스와 동시 투여되는 AAV 유전자 요법.
- [0534] - 핵 수용체 리간드 예컨대 DUR-928 (이전명칭 DV 928).
- [0535] - P2Y13 단백질 효현제 예컨대 CER-209.
- [0536] - PDGFR 조절인자 예컨대 BOT-501 및 BOT-191.
- [0537] - 페닐알라닌 히드록실라제 자극인자 예컨대 페그발리아제, 사프롭테린, AAV-PAH, CDX-6114, 세피암테린, RMN-168, ALTU-236, ETX-101, HepaStem, 롤리프렘, 및 알프로스타딜.
- [0538] - 프로테아제-활성화된 수용체 (PAR)-2 길항제 예컨대 PZ-235, 및 NP-003.
- [0539] - 단백질 키나제 조절인자 예컨대 CNX-014, MB-11055, ALF-1, 만지페린, 암렉사녹스, GS-444217, REG-101, 및 발린.

- [0540] - PPAR 알파 효현제 예컨대 페노피브레이트, 시프로피브레이트, 페마피브레이트, 젠포브로질, 클로피브레이트, 비니피브레이트, 클리노피브레이트, 클로피브르산, 니코피브레이트, 피리피브레이트, 플라피브리드, 노니피브레이트, 테오피브레이트, 토코피브레이트, 및 SR10171.
- [0541] - PPAR 감마 효현제 예컨대 피오글리타존, 중수소화 피오글리타존, 로시글리타존, 에파투타존, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001, 및 ALL-4.
- [0542] - PPAR 델타 효현제 예컨대 GW501516 (엔두라볼 또는 ({4-[(4-메틸-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-1,3-티아졸-5-일)메틸]술폰아닐}-2-메틸페녹시)아세트산)), MBX8025 (셀라델과 또는 {2-메틸-4-[5-메틸-2-(4-트리플루오로메틸-페닐)-2H-[1,2,3]트리아졸-4-일메틸술폰아닐]-페녹시}-아세트산), GW0742 ([4-[[[2-[3-플루오로-4-(트리플루오로메틸)페닐]-4-메틸-5-티아졸릴]메틸]티오]-2-메틸 페녹시]아세트산), L165041, HPP-593, 및 NCP-1046.
- [0543] - PPAR알파/감마 효현제 (글리타자르라고도 함), 예컨대 사로글리타자르, 알레글리타자르, 무라글리타자르, 테사글리타자르, DSP-8658.
- [0544] - PPAR알파/델타 효현제 예컨대 엘라피브라노, 및 T913659.
- [0545] - PPAR 감마/델타 예컨대 접합된 리놀레산 (CLA), T3D-959.
- [0546] - PPAR 알파/감마/델타 효현제 또는 PPAR 범 효현제 예컨대 IVA337 (라니피브라노), TTA (테트라데실티오아세트산), 바바키닌, GW4148, GW9135, 베자피브레이트, 로베글리타존, 및 CS038.
- [0547] - 프리바이오틱 섬유, 프로바이오틱스.
- [0548] - 프로그래닌 X 수용체 예컨대 리팜피신.
- [0549] - Rho-연관 단백질 키나제 2 (ROCK2) 억제제 예컨대 KD-025, TRX-101, BA-1049, LYC-53976, INS-117548, 및 RKI-1447.
- [0550] - 신호-조절 키나제 1 (ASK1) 억제제 예컨대 GS-4997.
- [0551] - 소듐-포도당 수송체 (SGLT) 1 억제제 예컨대 LX-4212/LX-4211/소타글리플로진, SAR -439954, LIK-066 (리코글리포진), LX-2761, GSK-161235, LP-925219, KGA-2727, SAR-7226, SAR-474832, SY-008, 및 AVX-3030.
- [0552] - 소듐-포도당 수송체 (SGLT) 2 억제제 예컨대 레모글리플로진, 다파글리플로진, 엠파글리플로진, 엘투글리플로진, 소타글리플로진, 이프라글리플로진, 티아나글리플로진, 카나글리플로진, 토포글리플로진, 자나글리플로진, 벡사글리플로진, 루세오글리플로진, 셀글리플로진, HEC-44616, AST-1935, 및 PLD-101.
- [0553] - 스타틴 예컨대 아토르바스타틴 또는 심바스타틴.
- [0554] - 스테아로일 CoA 디아투라제-1 억제제/지방산 담즙산 접합체 예컨대 아람콜, GRC-9332, 스테암콜, TSN-2998, GSK-1940029, 및 XEN-801.
- [0555] - 갑상선 수용체 β (THR β) 효현제 예컨대 VK-2809, MGL-3196, MGL-3745, SKL-14763, 소베티륨, BCT-304, ZYT-1, MB-07811, 및 에프로티륨.
- [0556] - Toll 유사 수용체 2 및 4 (TLR-2) 길항제 예컨대 VB-201로도 공지된 CI-201.
- [0557] - Toll 유사 수용체 4 (TLR-4) 길항제 예컨대 날트렉손, JKB-121, M-62812, 레사톨비드, 텐드로필린, CS-4771, AyuV-1, AyuV-25, NI-0101, EDA-HPVE7, 및 에리토란.
- [0558] - I형 자연 살해 T 세포 억제제 예컨대 GRI-0621
- [0559] - 티로신 키나제 수용체 (RTK) 조절인자 예컨대 CNX-025, KBP-7018, 닌테다닙, 및 소라페닙.
- [0560] - 우레이트 음이온 교환체 1 억제제 및 잔틴 옥시다제 억제제 예컨대 레시누라드, RLBN-1001, 베리누라드, KUX-1151, 및 레시누라드 + 알로푸리놀.
- [0561] - 아민 옥시다제 구리 함유 2 (AOC3)라고도 하는 혈관 부착 단백질-1 (VAP-1) 억제제, 예컨대 BI-1467335 (이전 명칭 PXS-4728A), CP-664511, PRX-167700, ASP-8232, RTU-1096, RTU-007, 및 BTT-1023.
- [0562] - 비타민 D 수용체 (VDR) 효현제 예컨대 칼시페롤, 알파칼시돌, 1,25-디히드록시비타민 D3, 비타민 D2, 비타민 D3, 칼시트리올, 비타민 D4, 비타민 D5, 디히드로타키스테롤, 칼시포트리올, 타칼시톨 1,24- 디히드록시비타민

D3, 및 파리칼시톨.

- [0563] - 비타민 E 및 이소플, 비타민 C와 조합된 비타민 E 및 아토르바스타틴.
- [0564] 다른 항-NASH제는 KB-GE-001 및 NGM-386 및 NGM-395 및 NC-10 및 TCM-606F를 포함한다. 추가의 항-NASH제는 이코사부테이트, NC-101, NAIA-101 콜레세베람, 및 PRC-4016을 포함한다. 다른 항섬유화제는 HEC-585, INV-240, RNAi 치료제 (Silence Therapeutics) 및 SAMiRNA 프로그램 (Bioneer Corp)을 포함한다.
- [0565] 다른 예시적인 항섬유화제는 필페니돈 또는 수용체 티로신 키나제 억제제 (RTKI) 예컨대 닌테다닙, 소라페닙 및 다른 RTKI, 또는 안지오텐신 II (AT1) 수용체 차단제, 또는 CTGF 억제제, 또는 잠복기 TGF β 복합체의 활성인자 예컨대 MMP2, MMP9, THBS1 또는 세포-표면 인테그린, I형 TGF β 수용체 (TGFBR1) 또는 II형 TGF β 수용체 (TGFBR2) 및 그들의 리간드 예컨대 TGF β , 액티빈, 인히빈, Nodal, 항플러관 호르몬, GDF 또는 BMP, 보조 공수용체 (III형 수용체라고도 알려짐), 또는 조절 또는 억제 SMAD 단백질을 포함하는 SMAD-의존적 정규 경로의 성분, 또는 다양한 분지의 MAPK 신호전달, TAK1, Rho-유사 GTPase 신호전달 경로, 포스포티로시노스-3 키나제/AKT 경로, TGF β -유도된 EMT 과정, 또는 Hh 리간드 또는 표적 유전자를 포함하는 정규 및 비정규 헤지호그 신호전달 경로를 포함한 SMAD-독립적 또는 비정규 경로의 구성원, 또는 TGF β 에 영향을 미치는데 민감한 WNT, 또는 Notch 경로의 임의 구성원을 포함하는, TGF β 및 BMP-활성화 경로의 방해에 민감한 임의의 항섬유화 화합물을 포함한다.
- [0566] NASH 또는 간 섬유화 치료의 특정한 실시형태에서는 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-이소프로필옥시 카르보닐디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐디메틸메틸옥시페닐] 프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸페닐]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐 디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸페닐]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸 옥시페닐]-3-[3,5-디메틸-4-터트부틸옥시카르보닐디메틸메틸옥시 페닐] 프로프-2-엔-1-온, 1-[4-트리플루오로메틸옥시페닐]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸 옥시페닐]프로프-2-엔-1-온, 2-[2,6-디메틸-4-[3-[4-(메틸티오)페닐]-3-옥소-프로필] 페녹시]-2-메틸프로판산, 및 2-[2,6-디메틸-4-[3-[4-(메틸티오)페닐]-3-옥소-프로필]페녹시]-2-메틸-프로판산 이소프로필 에스테르; 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 화학식 (I)의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 추가의 특정한 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 1-[4-메틸티오펜일]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시 페닐]프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.
- [0567] 특히, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 NAFLD, NASH, 활성 NASH, 및/또는 간 섬유화의 치료를 위한 방법에서 사용을 위한, 적어도 항-NAFLD제, 및/또는 항-NASH제, 및/또는 항섬유화제를 포함하는 조합 생성물에 관한 것으로서, 여기서 대상체는 본 발명에 따른 방법 덕분에 상기 치료의 수신자로서 분류되었다.
- [0568] 보다 특정한 실시형태에서, 본 발명은 항-NAFLD, 항-NASH 및/또는 항섬유화제 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 작용제를 포함하는 조합 생성물에 의한 NAFLD, NASH, 활성 NASH, 및/또는 간 섬유화의 치료에 관한 것이다.
- [0569] 보다 특정한 실시형태에서, 본 발명은 엘라피브라노에 의한 NAFLD, NASH, 활성 NASH, 및/또는 간 섬유화의 치료에 관한 것이다.
- [0570] NASH 또는 간 섬유화 치료의 추가 실시형태는 비타민 E 또는 피오글리타존, 오메티콜산, 엘라피브라노, 셀론세르티프, 사로글리타자르 및/또는 세니크리복을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0571] 유전자 발현의 조절에서 마이크로-RNA의 역할을 고려하면, 본 발명자가 수득한 결과는 또한 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화의 발생 및 전개에서 miR-193의 병리생리학적 역할을 뒷받침한다.
- [0572] 따라서 본 발명의 방법은 miR-193의 순환 수준을 기반으로 NAFLD, NASH 및/또는 간 섬유화가 존재하는 대상체의 특별한 부분 집단을 확인하는데 사용될 수 있다. 이들 부분 집단은 이들 환자를 miR-193 의존적 경로에 직접적으로 (miR-193 모방체 또는 항-miR-193) 또는 간접적으로 작용하는 특이적 약물에 반응성있게 만드는 miR-193 의존적 질환을 가질 것이다.
- [0573] 또한, 이러한 관찰로부터, 추가 양상에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 NAFLD, NASH 또는 간 섬유화의 치료에서 사용을 위한 miR-193 억제제 화합물에 관한 것이다.
- [0574] 본 명세서에서 사용되는 용어 "miR-193 억제제 화합물" 및 이의 유의어는 miR-193 및 특히 hsa-miR-193a-5p,

hsa-miR-193b-3p 또는 hsa-miR-193b-5p의 작용을 방지할 수 있는 임의의 화합물, 예컨대 핵산 화합물을 의미한다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 miR-193 억제제 화합물은 miR-193, 예를 들어 miR-193에 결합하여 miR-193의 활성을 억제 또는 감소시키거나, 또는 miR-193 발현을 억제하는 화합물이다. 용어 "miR-193 발현 억제"는 상기 억제 화합물에 의한 치료 후 간 또는 간세포 중 miR-193의 생산이 치료 전에 생산된 양 미만인 것을 의미한다. 당업자는 예를 들어 miRNA 전사물 수준을 결정하기 위한 기법을 사용하여, 간 또는 간세포에서 miR-193 발현이 억제되었는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.

[0575] 적합한 miR-193 억제제 화합물은 이중 가닥 RNA (예컨대 단형- 또는 소형-간섭 RNA 또는 "siRNA"), 안타고미어, 안티센스 핵산, 및 효소적 RNA 분자 예컨대 리보자임을 포함한다. 이들 화합물 각각은 소정 miRNA에 대해 표적화될 수 있고 표적 miRNA를 파괴하거나 또는 파괴를 유도할 수 있다. 예를 들어, 소정 miRNA의 발현은 miRNA의 적어도 일부분, 또는 바람직하게는 전체와 적어도 90%, 예를 들어 95%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 상동성을 갖는 단리된 이중 가닥 RNA ("dsRNA")를 사용한 miRNA의 RNA 간섭을 유도시켜 억제될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, dsRNA 분자는 siRNA이다. 본 발명의 방법에서 유용한 siRNA는 약 17개 뉴클레오티드 내지 약 29개 뉴클레오티드 길이, 바람직하게 약 19개 내지 약 25개 뉴클레오티드 길이의 짧은 이중-가닥 RNA를 포함한다. siRNA는 표준 왓슨-크릭 염기쌍 형성 상호작용 (이하, "염기 쌍형성")을 통해 함께 어닐링된 센스 RNA 가닥 및 상보성 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. 센스 가닥은 표적 miRNA 내에 함유된 핵산 서열과 실질적으로 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0576] 키트

[0577] 추가 양상에 따라서, 본 발명은

[0578] (i) 체액 샘플 중 miR-193, 및 임의로는

[0579] (ii) 적어도 하나의 다른 간 손상의 순환 표지자의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0580] 다른 양상에 따라서, 본 발명은 또한

[0581] (i) 체액 샘플 중 miR-193, 및 임의로는

[0582] (ii) NAFLD, NASH, 또는 간 섬유화의 적어도 하나의 다른 표지자의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0583] 본 발명의 키트는 상기 기술된 방법을 실행하는데 유용하다. 임의로는 상기 방법을 실행하기 위한 지시서를 더 포함할 수 있다. 키트는 miR-193 및 상기 제공된 바와 같은 임의의 다른 간 손상의 순환 표지자의 수준 측정을 수행하기에 적합한 시약 및 완충제를 포함할 수 있다. 특히, 키트는 정량하려는 단백질에 특이적인 항체, 및/또는 유용한 프라이머를 포함할 수 있다. 보다 특정한 실시형태에서, 키트는 당분야에서 충분히 공지된 바와 같이, 마이크로-RNA 수준의 정량을 위한 프라이머 및/또는 프로브를 포함할 수 있다.

[0584] 키트는 miR-193 및 NAFLD 및/또는 NASH의 임의의 다른 표지자의 수준 측정을 수행하기에 적합한 시약 및 완충제를 포함할 수 있다.

[0585] 본 발명은 또한

[0586] - hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 miR-193b-3p)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 표지자; 및 하기로부터 선택된 군에서 선택된 적어도 하나의 다른, 특히 모든 표지자의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다:

[0587] - TIMP-1;

[0588] - YKL-40;

[0589] - 혈소판 수치; 및

[0590] - 대사 증후군 점수.

[0591] 본 발명은 또한

[0592] - hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 miR-193b-3p)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 표지자; 및 하기로부터 선택된 군에서 선택된 적어도 하나의 다른, 특히 모든 표지자의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다:

- [0593] - YKL-40;
- [0594] - TIMP-1;
- [0595] - HbA1c
- [0596] - 히알루론산, 및
- [0597] - 혈소판 수치.
- [0598] 본 발명은 또한
- [0599] - hsa-miR-193 (특히 hsa-miR-193b, 보다 특히 miR-193b-3p)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 표지자; 및 하기로부터 선택된 군에서 선택된 적어도 하나의 다른, 특히 모든 표지자의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다:
- [0600] - YKL-40;
- [0601] - TIMP-1;
- [0602] - HbA1c
- [0603] - 히알루론산; 및
- [0604] - 혈소판 수치.
- [0605] 바람직한 실시형태에서, 키트는 miR-193b-3p의 수준을 결정하기 위한 수단을 포함한다.
- [0606] 본 발명의 키트는 상기 기술된 방법의 실행에 유용하고 임의로는 상기 방법의 실행을 위한 지시서를 더 포함할 수 있다. 키트는 상기에서 확인된 표지자의 수준 측정을 수행하는데 적절한 시약 및 완충제를 포함할 수 있다. 특히, 키트는 당분야에 충분히 공지된 바와 같이, 정량하려는 단백질에 특이적인 항체, 및/또는 마이크로-RNA 수준의 정량에 유용한 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0607] 상기 설명을 비롯하여 하기의 실시예는 예시하고자 하는 것이며 본 발명의 범주를 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내의 다른 양상, 장점 및 변형은 본 발명이 속하는 당업자에게 자명할 것이다.
- [0608] 실시예
- [0609] 재료 및 방법
- [0610] A. 임상 샘플
- [0611] 임상 시험 (NASH의 2상 GOLDEN-505 시험 (GFT505-212-7 - NCT01694849)은 비알콜성 지방간염 (NASH)이 있는 환자에서 지방간염에 대한 1일 1회 엘라피브라노 (1-[4-메틸티오페닐]-3-[3,5-디메틸-4-카르복시디메틸메틸옥시페닐]프로프-2-엔-1-온)의 효능 및 안전성을 평가하기 위한 다센터, 임의추출, 이중 맹검, 위약-대조 연구이다. 간 생검은 다른 병인론의 간 질환의 적절한 배제 이후 NASH의 진단을 확인하기 위해 수행되었다. NASH는 임의추출 이전 6개월 내에 간 생검으로 평가된 지방간염으로서 진단되었다. 지방간염 확진은 간 생검의 중심 판독치를 기반으로 하였다. NASH 환자는 지방증 점수 ≥ 1 및 간세포 풍선화 ≥ 1 및 소엽 염증 ≥ 1 을 포함하는 NAS ≥ 3 으로 정의되었다.
- [0612] 이 연구는 각 참여 센터의 적절한 규제 기관에 의해 승인받았고 모든 환자는 의학 연구 참여에 대한 동의를 제공하였다.
- [0613] 이러한 생물표지자 연구에서 사용된 혈액 샘플은 포함시 (270개 샘플) 및 1년 후 (223개 샘플)에 GOLDEN-DIAG 연구의 환자로부터 채취되었다.
- [0614] 발명자들은 또한 간 생검에 의한 대상체 유래 인간 혈액 샘플 및 UZA Biobank, OBESE (비만) 코호트로부터의 얻은 임상 및 생물학적 데이터를 사용하였다. 병적 비만 환자로 구성된 이러한 코호트는 또한 NAFLD/비-NASH 환자, NASH 환자, 간경변 환자 및 건강한 대조군을 포함한다. 253명 환자의 혈청은 각각 차세대 시퀀싱 (NGS) 기법 및 RT-qPCR을 사용한 GOLDEN-DIAG 연구에서 확인된 후보 순환 miRNA의 검증을 위해 처리하였다.
- [0615] GOLDEN 및 OBESE 코호트 둘 모두의 경우에, 추가 샘플의 수집, 저장 및 사용에 관한 서면 정보 동의서를 모든 환자로부터 얻었다.

- [0616] 발명자는 또한 간 생검에 의한 대상체 유래 인간 혈액 샘플 및 RESOLVE-IT 연구로부터의 연관된 임상 및 생물학적 데이터를 사용하였다. RESOLVE-IT는 비알콜성 지방간염 (NASH) 및 섬유화가 존재하는 환자에서 엘라피브라노의 효능 및 안전성을 평가하기 위한 다센터, 임의추출, 이중 맹검, 위약-대조 III상 연구 (NCT02704403)이다. 이 연구는 적절한 규제 기관에 의해 승인받았고 모든 환자는 참여에 대한 정보 동의서를 제공받았다. 포함 간 생검은 조직학적 병변의 검사 및 채점에 사용되었다. 혈액 샘플은 스크리닝 시에 채혈되었다. 전용 정보 동의서에 서명한 환자에서, 추가의 혈액 샘플이 NASH의 신규 진단 생물표지자의 연구를 위해 수집되었다.
- [0617] 263회의 상응하는 간 생검으로 스크리닝 시 RESOLVE-IT 연구의 370명 환자의 혈청은 HTG Edge 서열 분석에 의한 순환 miRNA의 확인을 위해 처리되었다.
- [0618] 263회의 상응하는 간 생검으로 스크리닝 시 RESOLVE-IT 연구의 370명 환자의 혈청은 HTG Edge 서열 분석 및 RTqPCR 분석에 의한 GOLDEN-DIAG 연구로 확인된 후보 순환 miRNA의 검증을 위해 처리되었다.
- [0619] EFS (Etablissement Francais du Sang)로부터의 100명 대상체의 혈청은 HTG Edge 서열 분석 및 RT-qPCR 분석에 의한 건강인에서의 후보 순환 miRNA 수준의 평가를 위해 처리되었다.
- [0620] 혈청 샘플은 NGS 및 qPCR 분석에 사용되었다.
- [0621] **혈액 샘플채취 및 실험실 검사**
- [0622] 혈액 샘플은 중앙 실험실 프로토콜 및 매뉴얼 - Genfit - GFT505-212-7에 따라 수집하였다.
- [0623] 연구 프로토콜에 따라서, 하기 분석을 수행하였다.
- [0624] 혈액학은 헤모글로빈, 헤마토크리트, RBC 수치, 백혈구, 감별 백혈구 수치 (호중구, 림프구, 호산구, 단핵구, 호염기구 -abs. 및% 값), 혈소판 수치 및 망상적혈구를 포함한다.
- [0625] 생화학 패널 I은 혈장 포도당, 트리글리세리드 (TG), 크레아티닌, 크레아티닌 청소율, 감마-글루타밀트랜스퍼라제 (GGT), 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 크레아틴 포스포키나제 (CPK), 알칼리 포스파타제, 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 HbA1c를 포함한다.
- [0626] 생화학 패널 II는 혈장 포도당, 크레아티닌, 크레아티닌 청소율, 총 단백질, 알부민, 소듐, 포타슘, 클로라이드, 칼슘, 요산, 혈액 우레아 질소 (BUN)으로 표시되는 우레아, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 감마-글루타밀트랜스퍼라제 (GGT), 알칼리 포스파타제, 크레아틴 포스포키나제 (CPK), 총 빌리루빈, 결합 빌리루빈, C-반응성 단백질 (hsCRP), AST/ALT 비율 및 HbA1c를 포함한다.
- [0627] 소변검사는 다음을 포함한다:
- [0628] - 덤스틱 분석 (비중, pH, RBC, 백혈구, 포도당, 단백질, 케톤, 빌리루빈, 우로빌리노겐 및 나이트라이트)
- [0629] - 현미경 분석은 RBC, WBC, 캐스트, 결정, 박테리아, 상피 세포 및 효모를 포함한다.
- [0630] - 화학 분석 (알부민 및 크레아티닌)
- [0631] 혈청학은 HIV ab I/ II, HCV ab, HCV RNA (오직 HCV RNA 방문 샘플 수령 시 및 HCV Ab에 대한 '반응성' 또는 '불확정' 결과 경우에 검사) 및 HbsAg를 포함한다.
- [0632] 지질 패널은 트리글리세리드 (TG), 총 콜레스테롤, 비 HDL-C (계산), 고밀도 지단백질 콜레스테롤 (HDL-C), 초저밀도 지단백질 콜레스테롤 (VLDL-C) (계산)로 계산되는 저밀도 지단백질 (LDL-C) (계산), 아포지질단백질 AI (ApoAI) 및 아포지질단백질 B (ApoB)를 포함한다.
- [0633] 소변 화학은 알파-1-마이크로글로불린, 베타-N-아세틸글루코사미니다제(베타-NAG) 및 호중구-젤라티나제 회합 리포칼린(N-Gal)을 포함한다.
- [0634] 안전성 표지자는 호모시스테인, NT-ProBNP, 트로포닌 T, 시스타틴 C, 및 베타2-마이크로글로불린을 포함한다.
- [0635] 혈당 및 다른 지질 매개변수는 랩틴, 인슐린, 항상성 모델 평가 (HOMA-IR), 혈청 포도당 (HOMA-IR 계산 경우), 프록토사민, C-펩티드 및 유리 지방산 (FFA)을 포함한다.
- [0636] 염증 표지자는 합토크로빈, 피브리노겐, 중앙 괴사 인자 알파 (TNF- α), 인터류킨 6 (IL-6) 및 플라즈미노겐 활성인자 억제제 1 (PAI-1) Ag (시트레이트)를 포함한다.

[0637] 간 표지자는 사이토케라틴-18 (CK18)(M65 & M30), 아디노펙틴, 페리틴, 알파2 마크로글로불린, FGF19 & FGF21, 히알루론산 (Advia centaur, Siemens Belgium 조달 및 Genfit의 패스-쓰루 담당 시약), III형 콜라겐의 N-말단 프로-펩티드 (PIIINP) (Advia centaur, Siemens Belgium 조달 시약) 및 매트릭스메탈로프로테아제의 조직억제제-1 (TIMP-1) (Advia centaur, Siemens 조달 시약)을 포함한다.

[0638] 각각의 생화학적 어세이에 관한 방법, 장비 및 제조사의 목록은 하기 표로 보고된다:

매개변수	방법	장비	제조사
렙틴	ELISA	수동	R&D systems
인슐린	CLIA	Immolute 2000	Siemens
HOMA-IR	포도당 및 인슐린으로 계산		
프록토사민	비색법	Modular P800	Roche Diagnostics
c-펩티드	CLIA	Immolute 2000	Siemens
합토글로빈	면역비탁법	Modular P800	Roche Diagnostics
피브리노겐	클라우스 (Clauss) 방법	STAR-evolution	Stago
TNF 알파	fluorokine® Multianalyte profiling	Luminex	Millipore
IL-6	fluorokine® Multianalyte profiling	Luminex	Millipore
PAI-1 Ag	ELISA	수동	Stago
FFA	ACS-ACOD	Modular P800	Roche Diagnostics
CK18 M30	ELISA	수동	Peviva
CK18 M65	ELISA	수동	Peviva
아디포넥틴	ELISA	수동	Millipore
페리틴	ECLIA	Modular E170	Roche Diagnostics
알파2 마크로글로불린	비탁법	BN II	Siemens
히알루론산	면역어세이	Advia centaur	Siemens
PIIINP	면역어세이	Advia centaur	Siemens
TIMP-1	면역어세이	Advia centaur	Siemens
FGF-19	ELISA	수동	R&D systems
FGF-21	ELISA	수동	R&D systems
비스파틴	ELISA	수동	Alpco immunoassays
레스스틴	ELISA	수동	R&D systems

YKL-40, CHI3L1	인간 키티나제 3-유사 1 면역어세이 Quantikine® ELISA 카탈로그 번호 DC3L10 세포 배양 상청액, 혈청, 혈장 및 소변 중 인간 키티나제 3-유사 1 (CHI3L1) 농도의 정량적 결정을 위한.
----------------	---

[0639]

[0640] 샘플 수집 및 저장

[0641] 본 생물표지자 연구에서 사용된 혈액 샘플은 치료 기간 이전에 505.212.7 연구의 환자로 부터 채혈되었다. 추가 샘플의 수집, 저장 및 사용에 관한 서명 정보 동의서를 모든 환자로 부터 받았다.

[0642] 시트레이트 함유 2.7 mL 튜브에 수집된 혈액은 1,500xg에서 15분 동안 원심분리를 통해서 수집 15분 이내에 혈액 세포로부터 세포 무함유 혈장을 분리시켜 처리하였다. 혈장 상청액은 새로운 튜브로 옮겼다. 튜브는 -70°C에 유지시켰다.

[0643] RNA 추출을 진행하기 위해서, 혈장 튜브를 13,000xg에서 2분 동안 원심분리하여 펠렛화시키고 혈소판을 제거하였다. 무혈소판 혈장 상청액을 새로운 튜브로 옮겼고 액체 질소에 냉동시키고 -80°C에 저장하였다.

[0644] 8.5 mL의 혈청 분리 튜브 (SST)에 수집된 혈액은 1,300xg 내지 2,000xg에서 10분 동안 원심분리를 통해 혈액 세포로부터 세포 무함유 혈청을 분리시켜서 샘플채취 후 1시간 내에 처리하였다. 그 다음으로 혈청은 새로운 튜브로 옮겼다. 튜브는 -70°C에 유지시켰다. RNA 추출은 추가의 원심분리없이 수행하였다.

[0645] B. 차세대 시퀀싱

[0646] HTG Edge 시퀀싱 시스템이 혈청 샘플에 함유된 miRNA를 시퀀싱하는데 사용되었다.

[0647] HTG 전체 전사체 miRNA (WTA) 키트를 사용하였다. 라이브러리 제조 및 시퀀싱은 제조사의 추천에 따라 수행하였다. 각 샘플의 경우에, 샘플 당 931.000회 판독치의 평균을 생성시켰다. 데이터는 판독 횟수의 조

정을 통해서 상이한 샘플간 직접 비교를 허용하도록 제조사 추천에 따라 정규화시켰다.

[0648] Limma, R/Bioconductor 소프트웨어 패키지는 HTG Edge 시퀀싱 분석을 위한 감별 분석을 작동시켰다.

[0649] C. 혈청 중 miRNA의 정량적 RTqPCR

[0650] 보존된 miRNA가 존재하는 혈청 총 RNA는 제조사의 지시에 따라서, miRvanaParis 추출 키트 (AM1556, Ambion)를 통해 100 μ l의 혈청으로부터 추출하였다. 합성 스파이크-인 예쁜꼬마선충 miR-39는 RNA 추출 과정의 내부 대조군으로서 RNA 추출 전에 샘플 [3,125 fmoles] (MSY0000010, Qiagen)에 첨가되었다. 100 μ l의 용리 완충액에서 용리를 수행하였다.

[0651] 성숙한 miRNA의 발현은 Taqman miRNA qRT-PCR 어세이: TaqMan 마이크로RNA 역전사 키트 (Ref: 4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), TaqMan 마이크로RNA 어세이 20X (Ref: 4440887, Applied Biosystems) 및 TaqMan 유니버설 마스터 믹스 II (Ref: 4440040, Applied Biosystems)를 사용하여 제조사 지시에 따라 검출하였다.

[0652] 역전사는 GeneAmp® PCR System 9700 열순환기 (Ref: 200005, Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다. 역전사는 4종의 miRNA 특이적-역 프라이머를 사용하여 다중화시켰다.

[0653] 정량적 PCR은 CFX96™ 실시간 시스템 (C1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad)을 사용하여 수행하였다.

[0654] 관심 miRNA의 서열 및 Taq Man 어세이 ID는 하기 표에 보고한다:

miRNA ID	서열	miRbase 번호	어세이 ID
hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU (SEQ ID NO: 1)	MIMAT0000459	002250
hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA (SEQ ID NO: 2)	MIMAT0004614	002281
hsa-miR-193b-5p	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA (SEQ ID NO: 3)	MIMAT004767	002366
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCUCAAAGUCCCAGCU (SEQ ID NO: 4)	MIMAT0002819	002367

[0655] 합성 hsa-miRNA (Integrated DNA Technologies)는 3.125 fmol/mL로 희석하였고 5 μ l를 혈청 샘플로부터 추출한 RNA와 동시에 역전사에 사용하였다. 생성물을 연속 희석하였고 PCR을 모든 샘플 (표준물 및 혈청-유래 RNA)에 대해 수행하였다. 표준 곡선을 수행하였고 카피수/ μ l로서 Cq 데이터를 전환시키는데 사용하였다. Cq 결정 방식은 회귀였다. 정량은 카피수/혈청 구성 μ l로서 표시된다.

[0657] 모든 합성 hsa-miRNA의 공급처는 IDT이다.

[0658] D. 통계 분석

[0659] 목적 및 정의

[0660] 이들 분석의 목적은 치료하려는 NASH 환자의 식별과 관련될 수 있는 생물표지자를 발굴하는 것이었다. 치료군 환자 (TBT)는 상이한 연구 부분에 따라서 다르게 정의된다.

[0661] 제1 분류에 따라서, TBT는 다음과 같이 정의된다:

[0662] - 지방증 점수 ≥ 1

[0663] - 간세포 풍선화 점수 ≥ 1

[0664] - 소엽 염증 점수 ≥ 1

[0665] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 (NAS는 지방증 점수, 간세포 풍선화 점수 및 소엽 염증 점수의 총합으로서 정의됨)

[0666] - 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는 3의 섬유화 병기).

[0667] 제2 분류에 따라서, TBT는 다음과 같이 정의된다:

[0668] - 지방증 점수 ≥ 1

[0669] - 간세포 풍선화 점수 ≥ 1

- [0670] - 소염 염증 점수 ≥ 1
- [0671] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 (NAS는 지방증 점수, 간세포 풍선화 점수 및 소염 염증 점수의 총합으로서 정의됨)
- [0672] - 섬유화 병기 ≥ 1 (예컨대 1, 2, 3 또는 4의 섬유화 병기).
- [0673] 제3 분류에 따라서, TBT는 다음과 같이 정의된다:
- [0674] - 지방증 점수 ≥ 1
- [0675] - 간세포 풍선화 점수 ≥ 1
- [0676] - 소염 염증 점수 ≥ 1
- [0677] - NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 (NAS는 지방증 점수, 간세포 풍선화 점수 및 소염 염증 점수의 총합으로서 정의됨)
- [0678] - 섬유화 병기 = 1b, 1c, 2, 3 또는 4.
- [0679] 다른 환자는 비치료군 (NTBT)으로서 명시되었다. 분석의 경우, TBT 환자는 반응 변수에서 0으로서 NTBT 및 1로서 분류되었다. 상기에 표시된 바와 같이, 설명 변수는 인구학 (연령, 성별, 인종), 지역 (연구 센터, 국가, 대륙) 또는 의학 (당뇨병) 기록인 한, 혈액 (혈액학, 생화학, 응집, 간 표지자, 순환 miRNA) 또는 소변 (딥스틱, 침강) 샘플에서 측정된 광범위한 생물표지자를 포괄하였다.
- [0680] **부트스트랩 모델**
- [0681] 부트스트랩 모델링 과정에서, 설명 변수 (생물표지자)와 관련된 반응 변수 (TBT/NTBT 환자 정의)의 로지스틱 일반화 선형 모델은 전체 데이터셋으로부터의 모든 환자에 대해 산출된다. 후진 변수 선별을 수행하고 최적 알고리즘은 AIC를 사용해 선택한다. 이러한 최적 알고리즘으로부터의 가변 계수의 유의성은 1000개 부트스트랩 샘플을 사용하여 알고리즘을 운영하여 시험된다. 0을 제외하고 95% 신뢰 구간을 보이는 계수는 유의미로 간주된다. 그 다음으로 알고리즘은 ROC, AUC, 최적 한계치, 총 정확도, 감도, 특이도, 양성 예측값 및 음성 예측값을 계산하여 검증된다.
- [0682] **결과**
- [0683] 첫번째로, 2083 miRNA 종의 순환 수준은 그 순환 수준이 TBT2 환자 (TBT2 정의 = NAS ≥ 4 및 F ≥ 2 , 및 지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점) 및 NTBT2 대상체 (NTBT2 대상체는 TBT2 대상체와 지방증, 간세포 풍선화, 소염 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만 등급이 상이함)를 구별할 수 있는 miRNA의 불변성 선별을 위한 Edge 시퀀싱 차세대 시퀀싱을 통해서 GOLDEN-DIAG 및 OBESE로부터의 517개 혈청 샘플에서 동시에 측정하였다. TBT2 환자는 간경변증, HCC, 간부전, 간 이식 및 간성 사망과 같은 중증 간 결과로의 전개의 증가된 그들 위험성에 대해 처치되어야 한다.
- [0684] 이 분석으로부터, 발명자는 포함시 GOLDEN-DIAG 및 OBESE 코호트의 NTBT2 환자와 비교하여 TBT2 환자의 혈청 샘플에서 일반적으로 과발현된 mir193을 확인하였다.
- [0685] 표 1에 표시된 바와 같이, 특히 놀랍게도, GOLDEN-DIAG 및 OBESE 코호트 둘 모두에서, hsa-miR193a-5p, hsa-miR193a-3p 및 hsa-miR193b-3p에 대한 백만 당 관독수는 NTBT2 환자에 비해서 TBT2 환자에서 유의하게 더 높았다.
- [0686] 예를 들어, 각각 hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p 및 hsa-miR-193b-3p에 대해서 NTBT2 환자의 경우 516, 439 및 392 RPM (Reads per million) 대비 TBT2 환자에서 778, 592 및 632 RPM이 획득되었다.
- [0687] 본 발명자는 또한 제3의 독립 데이터 세트로서 GOLDEN 시험의 1년 치료 기간 종료 시에 수집된 혈청 샘플 및 간 생검을 사용하였고, 다시 한번 hsa-miR193a-5p, 및 hsa-miR193b-3p에 대한 백만 당 관독수가 NTBT2 환자에 비해서 TBT2 환자에서 유의하게 더 높았다는 것을 확증하였다. hsa-miR-193b-5p는 또한 NTBT2 환자보다 TBT2 환자에서 유의하게 더 높았다.
- [0688] 이들 결과는 TBT2 및 NTBT2 환자 간 독립 코호트 OBESE에서 확증되었다.
- [0689] 또한, 독립 임상 코호트, RESOLVE-IT에서 수집된 생검 및 혈청 샘플은 또한 HTG Edge 시퀀싱 분석으로 처리하였다. hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p 및 hsa-miR-193b-3p의 상향 조절은 이러한 추가의 데이터 세트 및

임상 코호트에서 검증하였다.

[0690]

시험된 모든 hsa-miR-193 후보, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193b-5p, 및 hsa-miR-193b-3p는 건강한 대상체 유래 혈청에 비해서 최소의 조직학적 병변을 갖는 NAFLD 환자 (NTBT2)에서 상향 조절되었다 (표 1).

Golden Diag – 포함시				
hsa_miRNA	NTBT2 의 RPM	TBT2 의 RPM	배수 변화	p 값
hsa-miR-193a-3p	516	778	1,33	3,33E-04
hsa-miR-193a-5p	439	592	1,38	4,16E-06
hsa-miR-193b-3p	392	632	1,76	8,08E-09
hsa-miR-193b-5p	18	31	1,72	4,22E-06
Golden Diag –52 주 시				
hsa_miRNA	NTBT2 의 RPM	TBT2 의 RPM	배수 변화	p 값
hsa-miR-193a-3p	512	598	1,11	3,08E-01
hsa-miR-193a-5p	382	636	1,61	1,14E-06
hsa-miR-193b-3p	354	720	1,83	1,71E-06
hsa-miR-193b-5p	16	35	1,91	6,41E-06
Obese - 포함시				
hsa_miRNA	NTBT2 의 RPM	TBT2 의 RPM	배수 변화	p 값
hsa-miR-193a-3p	811	1075	1,19	1,12E-01
hsa-miR-193a-5p	300	465	1,45	6,99E-06
hsa-miR-193b-3p	95	244	1,96	1,21E-11
hsa-miR-193b-5p	4	13	1,78	1,03E-03
RESOLVE-IT – 포함시				
hsa_miRNA	NTBT2 의 RPM	TBT2 의 RPM	배수 변화	p 값
hsa-miR-193a-3p	658	796	1,15	1,16E-01
hsa-miR-193a-5p	442	653	1,44	2,38E-06
hsa-miR-193b-3p	387	607	1,69	8,22E-08
hsa-miR-193b-5p	17	27	1,81	4,82E-06
EFS 대상체				
hsa_miRNA	건강인의 RPM			
hsa-miR-193a-3p	198,05			
hsa-miR-193a-5p	212,04			
hsa-miR-193b-3p	69,93			
hsa-miR-193b-5p	3,44			

[0691]

[0692]

표 1: 치료군 (TBT2) 대 비치료군 (NTBT2) 환자에서 hsa-miR-193a-3p, 및 hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p, 및 hsa-miR-193b-5p에 대한 HGT-Edge-차세대 시퀀싱 실험 및 수득된 백만 당 관독수 (Reads per million) (RPM). RPM은 각각 NTBT2 및 TBT2 환자 그룹 (Golden Diag 연구 - 포함시 (109 TBT2 및 161 NTBT2 환자) 및 Golden Diag - 1년 후 (76 TBT2 및 147 NTBT2); Obese (50 TBT2 및 202 NTBT2 환자, RESOLVE-IT (137 TBT2 및 117 NTBT2))의 평균으로서 표시되고; TBT2는 지방증, 간세포 풍선화 및 소염 염증 점수에서 적어도 1점으로 NAS ≥ 4 및 간 생검의 조직학적 검사에서 섬유화 병기 ≥ 2 인 환자를 의미한다. NTBT2 대상체는 TBT2 대상체와 지방증, 간세포 풍선화, 소염 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만의 등급이 상이하다. EFS (Etablissement Francais du Sang) 대상체는 약물없는 건강한 대상체이다.

[0693]

그 이후에 확증을 위해서, hsa-mir193a-5p, hsa-miR193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 수준은 특이적 Taq Man miRNA 어세이를 사용하는, 체액 중 올리고뉴클레오타이드의 정량을 위한 금 표준 방법, RT-qPCR을 사용해 측정하였다. 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다:

[0694]

표 2 및 도 2에 표시된 바와 같이, 포함시 양쪽 코호트 및 52주 시 GOLDEN-DIAG에서, hsa-mir193a-5p, hsa-miR193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p 혈청 농도는 NTBT2 환자보다 TBT2 환자에서 유의하게 더 높았다. GOLDEN-DIAG에서, hsa-miR193b-3p 혈청 농도는 건강한 대상체 유래 혈청보다 최소의 조직학적 병변이 존재하는 NAFLD 환자 (NTBT2)에서 유의하게 더 높았다 (도 1 및 도 4).

Golden Diag - 포함시	NTBT2 의 카피수/μL			TBT2 의 카피수/μL			TBT2/NTBT2		
환자	(N=161)			(N=109)					
카피수, μL-1 혈청	평균	SD	SEM	평균	SD	SEM	비율	p 값	AUC
hsa-miR-193a-5p	400	285	22	609	412	39	1,52	< 0,0001	0,68
hsa-miR-193b-3p	161	196	15	290	350	34	1,80	< 0,0001	0,68
hsa-miR-193b-5p	20	37	3	40	49	5	1,98	< 0,0001	0,67

Golden Diag - 1 년 후 - 52 주 시	NTBT2 의 카피수/μL			TBT2 의 카피수/μL			TBT2/NTBT2		
환자	(N=147)			(N=76)					
카피수, μL-1 혈청	평균	SD	SEM	평균	SD	SEM	비율	p 값	AUC
hsa-miR-193a-5p	412	260	21	613	401	33	1,49	< 0,0001	0,65
hsa-miR-193b-3p	155	179	15	286	281	23	1,84	< 0,0001	0,69
hsa-miR-193b-5p	22	40	3	50	69	8	2,32	< 0,0001	0,69

Obese - 포함시	NTBT2 의 카피수/μL			TBT2 의 카피수/μL			TBT2/NTBT2		
환자 (N=202)				(N=50)					
카피수, μL-1 혈청	평균	SD	SEM	평균	SD	SEM	비율	p 값	AUC
hsa-miR-193a-5p	452	269	19	637	412	58	1,41	< 0,0001	0,65
hsa-miR-193b-3p	67	53	4	190	218	31	2,85	< 0,0001	0,74
hsa-miR-193b-5p	27	20	1	48	39	6	1,78	< 0,0001	0,69

RESOLVE-IT - 포함시	NTBT2 의 카피수/μL			TBT2 의 카피수/μL			TBT2/NTBT2		
환자	(N=112)			(N=136)					
카피수, μL-1 혈청	평균	SD	SEM	평균	SD	SEM	비율	p 값	AUC
hsa-miR-193a-5p	334	254	27	503	332	33	1,51	< 0,0001	0,70
hsa-miR-193b-3p	56	73	8	105	112	11	1,88	< 0,0001	0,73
hsa-miR-193b-5p	11	18	2	19	24	2	1,71	0,0010	0,65

표 2: 3개 코호트 (GOLDE, OBESE 및 RESOLVE-IT)의 치료군 (TBT2) 환자 대 비치료군 (NTBT2) 환자에서 hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p 및 hsa-miR-193b-5p의 과발현의 확증/검증을 위한 RT-qPCR 실험. TBT2 vs NTBT2의 통계적 유의성은 비모수적 만 휘트니 검정을 사용해 계산하였다. TBT2는 지방증, 간세포 풍선화 및 소염 염증 점수 ≥ 1 로 NAS ≥ 4 이고 간 생검의 조직학적 검사시 섬유화 병기 ≥ 2 인 환자를 의미한다. AUROC = 수신자 조작 특성의 곡선 하 면적 (Area under the curve of Receiver Operating Characteristic) 은 TBT2 vs NTBT2의 식별을 위해 수득하였다.

- 도 1, 2 및 3에 도시된 바와 같이, 포함시 2개 코호트에서 TBT 환자 및 NTBT 환자의 제2 정의 (TBT1 vs. NTBT1))를 적용했을 때, 분석은 hsa-miR193b-3p (도 1), hsa-miR193b-5p (도 2) 및 hsa-miR193a-5p (도 3) 혈청 농도가 NTBT1 환자에 비해서 TBT1 환자에서 유의하게 더 높았다는 것을 보여주었다. GOLDEN-DIAG에서, hsa-miR193b-3p 혈청 농도는 건강한 대상체 유래 혈청에 비해서 최소의 조직학적 병변이 존재하는 NAFLD 환자 (NTBT1)에서 유의하게 더 높았다 (도 1). 이들 분석에서, TBT1은 지방증, 간세포 풍선화 및 소염 염증 점수에서 적어도 1점으로 NAS ≥ 4 및 간 생검의 조직학적 검사시 섬유화 병기 ≥ 1 인 환자를 의미한다. NTBT1 대상체는 TBT1 대상체와 지방증, 간세포 풍선화, 소염 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만 등급이 상이하다.

- 도 1, 2 및 3에서, 포함시 2개 코호트에서 TBT 환자 및 NTBT 환자의 제3 정의 (TBT7 vs. NTBT7)를 적용한 경우에, 분석은 hsa-miR193b-3p (도 1), hsa-miR193b-5p (도 2) 및 hsa-miR193a-5p (도 3) 혈청 농도가 NTBT7 환자에 비해 TBT7 환자에서 유의하게 더 높았다는 것을 확인하였다. GOLDEN-DIAG에서, hsa-miR193b-3p 혈청 농도는 건강한 대상체 유래 혈청에 비해서 최소의 조직학적 병변이 존재하는 환자 (NTBT7)에서 유의하게 더 높았다 (도 1). 이들 분석에서, TBT7은 지방증, 간세포 풍선화 및 소염 염증 점수에서 적어도 1점으로 NAS ≥ 4 및 간 생검의 조직학적 검사시 섬유화 병기 ≥ 1 인 환자를 의미한다. NTBT1 대상체는 TBT1 대상체와 지방증, 간세포 풍선화, 소염 염증 점수, NAS 및/또는 섬유화 병기에서 적어도 1점 미만 등급이 상이하다.

- 도 4, 5 및 6에 도시된 바와 같이, 2개 코호트에서, hsa-miR193b-3p (도 4), hsa-miR193a-5p (도 5) 및 hsa-miR-193b-5p (도 6) 혈청 농도는 비-NASH 및 경증 NASH 환자 (NAS<4)에 비해서 활성-NASH (지방증, 소염 염증 및 간세포 풍선화에서 적어도 1점으로 NAS ≥ 4)가 존재하는 환자에서 유의하게 더 높았다. GOLDEN-DIAG에서, hsa-miR-193b-3p 혈청 농도는 건강한 대상체 유래 혈청에 비해서 최소의 질환 활성 (NAS<4)이 존재하는 환자에서 유의하게 더 높았다.

- [0700] - 도 4, 5 및 6에 도시된 바와 같이, 2개 코호트에서, hsa-miR-193b-3p (도 4), hsa-miR-193a-5p (도 5) 및 hsa-miR-193b-5p (도 6) 혈청 농도는 섬유화 부재 또는 최소 섬유화 존재 ($F < 2$) 환자에 비해서 유의미 섬유화 또는 높은 섬유화 병기 ($F \geq 2$)의 환자에서 유의하게 더 높았다. GOLDEN-DIAG에서 hsa-miR-193b-3p 혈청 농도는 건강한 대상체에 비해서 섬유화 부재 또는 최소 섬유화 존재 ($F < 2$)의 NAFLD 환자에서 유의하게 더 높았다.
- [0701] - 이들 결과는 RESOLVE-IT 연구에서 hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-193a-5p, 및 hsa-miR-193b-5p에 대해 확증되었다 (도 7).
- [0702] - miR-193 종의 순환 수준 및 조직학적 점수 및 섬유화 병기 사이에 강력한 상관성을 보이는 포함시 GOLDEN-DIAG 유래 혈청 샘플에 대해 수행된 RT-qPCR 실험의 추가 분석이 제공된다 (유사한 결과가 OBESE 및 RESOLVE-IT 샘플을 사용해서 수득됨).
- [0703] - 도 8에 도시된 바와 같이, hsa-miR193b-3p의 순환 수준은 지방증 점수, 소염 염증 점수, 간세포 풍선화 점수와 양성적으로 상관성이 있었다. 결론적으로, miR193b-3p의 순환 수준은 NAS 및 활성 지수와 유의하게 양성적으로 상관성이 있었다. 마지막으로, 포함시 GOLDEN DIAG에서 193b-5p의 순환 수준 및 섬유화 병기 사이에 강력한 상관성이 존재하였다.
- [0704] - 도 9에 도시된 바와 같이, hsa-miR193b-5p의 순환 수준은 지방증 점수, 소염 염증 점수, 간세포 풍선화 점수와 양성적으로 상관성이 있었다. 결론적으로, miR193b-3p의 순환 수준은 NAS 및 활성 지수와 유의하게 양성적으로 상관성이 있었다. 마지막으로, 포함시 GOLDEN DIAG에서 miR193b-5p의 순환 수준 및 섬유화 병기 사이에 강력한 상관성이 존재하였다.
- [0705] - 도 10에 도시된 바와 같이, miR193a-5p의 순환 수준은 지방증 점수, 소염 염증 점수, 및 간세포 풍선화 점수와 양성적으로 상관성이 있었다. 결론적으로, miR193b-3p의 순환 수준은 NAS 및 활성 지수와 유의하게 양성적으로 상관성이 있었다. 마지막으로, 포함시 GOLDEN DIAG에서 miR193a-5p의 순환 수준 및 섬유화 병기 사이에 강력한 상관성이 존재하였다.
- [0706] 하기 표 3에 제시된 결과는 GOLDEN 환자에서 52주 이후에 NAFLD 및 NASH 활성의 전개 및 hsa-miR-193a-5p의 순환 수준 변화 사이에 유의한 상관성을 예시한다. 유사하게, 하기 표 3에 제시된 결과는 GOLDEN 환자에서 52주 이후에 NAFLD 및 NASH 활성의 전개 및 hsa-miR-193b-3p의 순환 수준 변화 사이에 유의한 상관성을 예시한다.

GOLDEN-DIAG (52 주-포함) miR 혈청 농도의 변화 (Δ miR) vs 활성 지수의 전개 (Δ AI)				
	개선 (Δ AI<0)	안정 (Δ AI=0)	악화 (Δ AI>0)	P 값 (크루스칼-왈리스 검정)
Δ miR-193a-5p (카피수/ μ L)	-72 $\pm$ 33	-7 $\pm$ 41	+202 $\pm$ 91	0.02
Δ miR-193b-3p (카피수/ μ L)	-41 $\pm$ 26	-7 $\pm$ 29	+49 $\pm$ 36	0.17
GOLDEN-DIAG (52 주-포함) miR 혈청 농도의 변화 (Δ miR) vs NAS의 전개 (Δ NAS)				
	개선 (Δ NAS<0)	안정 (Δ NAS=0)	악화 (Δ NAS>0)	P 값 (크루스칼-왈리스 검정)
Δ miR-193a-5p (카피수/ μ L)	-87 $\pm$ 33	+23 $\pm$ 50	+107 $\pm$ 62	0.02
Δ miR-193b-3p (카피수/ μ L)	-62 $\pm$ 26	+8 $\pm$ 38	+48 $\pm$ 22	0.008

- [0707]
- [0708] 표 3: 1년 GOLDEN 시험 동안 활성 지수 (AI) 및 NAS의 전개 및 hsa-miR193a-5p 및 hsa-miR193b-3p의 혈청 수준 변화의 상관성.
- [0709] 부트스트랩 접근법을 사용한 모델링은 TBT2 환자를 NTBT2 환자와 구별하기 위해 miR-193b-3p에 의해 4개의 유의한 변수들을 선별하였다 (표 4). 이 모델은 치료군 NASH 환자 또는 위험성이 있는 NASH 환자를 진단하기 위해서 miR-193b-3p, 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 키티나제 3 유사 단백질 1 (CHI3L1)이라고도 하는 YKL-40, 혈소판 수치 및 대사 증후군 (MS)을 조합한다.
- [0710] 하기 간 생검-유추 등급에 해당하는 치료군으로의 위험성이 있는 환자: 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소염 염증 점수 ≥ 1 , NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는

3의 섬유화 병기)

	계수	SE	95% CI	
상수	-5,53	1,46	-8,39	-2,67
miR-193b-3p (Log10 카피수.μL-1)	1,54	0,49	0,58	2,50
메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1)	1,05E-02	4,17E-03	2,29E-03	1,87E-02
YKL-40 또는 CHI3L1	9,34E-06	3,67E-06	2,14E-06	1,65E-05
혈소판 수치	-8,32E-03	3,71E-03	-1,56E-02	-1,05E-03
대사 증후군	0,83	0,41	0,03	1,63

표 4: Golden에서 TBT2 환자를 확인하기 위한 최적 부트스트랩 모델에서 선별된 변수. 신뢰 구간 = CI, SE: 표준 오차

점수는 다음의 로지스틱 함수로서 정의된다:

$$S \sim \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

상기 식에서,

$Y = k + a \cdot A + b \cdot B + c \cdot C + d \cdot D + f \cdot F$ 이고,

여기서,

S는 NASH 점수이고;

A는 log10 카피수. μL-1로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;

B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;

C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;

D는 10^9 /L로서 혈소판 수치이고;

F는 대사 증후군 점수이고;

k는 -8.39 내지 -2.67을 포함하는 수이다.

몇몇 변수들을 조합하고 이전에 기술된 바와 같이 위험성이 있는 환자에 해당하는 부트스트랩 모델에 대한 AUC 점수는 개별 변수에 대해 수득된 AUC 점수보다 양호하다. 따라서, 본 발명에 따른 로지스틱 함수를 통한 몇몇 변수들의 조합은 단독 변수의 연구에 비해 더 양호하고 더 정확하다 (표 5 및 도 11).

	AUC	최적 한계치	정확도	감도	특이도	PPV	NPV
Genfit NIS	0,80	0,3993	72,62%	81,25%	64,77%	67,71%	79,17%
hsa-miR-193b-3p	0,68	2,1829	67,26%	65,00%	69,32%	65,82%	68,54%
TIMP-1	0,68	248,50	64,88%	65,00%	64,77%	62,65%	67,06%
CHI3L1	0,68	56512,88	65,48%	65,00%	65,91%	63,42%	67,44%
혈소판 수치	0,62	212,50	61,91%	65,00%	59,09%	59,09%	65,00%

표 5: GOLDEN-DIAG에서 개별 변수 대비 본 발명의 부트스트랩 모델의 점수간 비교. 진단 성능 비교. 비침습성 서명 (Non Invasive Signature) = NIS=miR-193b-3p 사용 알고리즘.

최적 모델은 1000개 부트스트랩 샘플에서 AUC를 계산하여 검증된다. AUC는 0.80이었다 (95% CI: 0.73-0.86). 최적 모델의 AUC를 사용하여, TBT 또는 NTBT로서 환자를 예측하기 위한 3가지 한계치를 정의하였다:

1. 0.3993과 동일한, 1-특이도=0% 및 감도=100%인 지점에 가장 가까운 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

- [0730] · 총 정확도: 72.62%
- [0731] · 감도: 81.25%
- [0732] · 특이도: 64.77%
- [0733] · PPV: 67.71%
- [0734] · NPV (음성 예측값): 79.17%
- [0735] 2. 0.3050과 동일한 90%에서 감도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:
- [0736] · 총 정확도: 70.24%
- [0737] · 감도: 90.00%
- [0738] · 특이도: 52.27%
- [0739] · PPV (양성 예측값): 63.16%
- [0740] · NPV (음성 예측값): 85.19%
- [0741] 3. 0.6518과 동등한 90%보다 우세한 특이도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:
- [0742] · 총 정확도: 70.24%
- [0743] · 감도: 47.50%
- [0744] · 특이도: 90.91%
- [0745] · PPV (양성 예측값): 82.61%
- [0746] · NPV (음성 예측값): 65.57%
- [0747] log10 (카피수. μL^{-1})로서 miRNA 수준 및 생화학적 데이터에 의한 부트스트랩 접근법을 사용한 제2 모델링은 TBT2 환자를 NTBT2 환자와 구별하기 위해 miR-193b-3p에 의해 6개의 유의한 변수를 선별하였다 (표 6). 이 모델은 치료군 NASH 환자 또는 위험성있는 NASH 환자를 진단하기 위해서 miR-193b-3p, 키티나제 3 유사 단백질 1 (CHI3L1)이라고도 하는 YKL-40, 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 당화 헤모글로빈 (HbA1c), 히알루론산 (HYUA2), 및 혈소판 수치를 조합하였다.
- [0748] 하기 간 생검-유추 등급에 해당하는 치료군으로의 위험성이 있는 환자: 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는 3의 섬유화 병기).

	계수	P-값	95% CI	
상수 I	-7.52	3.72E-06	-10.92	-3.89
miR193b-3p (log10 cpul)	1.29	0.0028	0.44	2.17
YKL-40 또는 CHI3L1	0.01	0.0028	0.0035	0.020
TIMP-1	0.0092	0.0097	0.0016	0.0018
HYUA2	-0.0024	0.0131	-0.0053	0.0057
HBA1C	0.59	0.0042	0.13	1.08
혈소판 수치	-0.009	0.0043	-0.017	-0.0027

[0749]

- [0750] 표 6: Golden에서 TBT2 환자를 확인하기 위한 최적 부트스트랩 모델에서 선별된 변수. 신뢰 구간 = CI, 카피수. μL^{-1} =cpul.

[0751] 점수는 다음의 로지스틱 함수로서 정의된다:

$$S2 \sim \frac{e^{Y2}}{1 + e^{Y2}}$$

[0753] 상기 식에서,

[0754] $Y2 = 1 + a2 \cdot A + c2 \cdot C + b2 \cdot B + e \cdot E + g \cdot G + d2 \cdot D$ 이고,

[0755] 여기서

[0756] S2는 NASH 점수이고;

[0757] A는 log10 카피수. μL^{-1} 로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;

[0758] C는 pg/mL로서 YKL-40의 수준이고;

[0759] B는 ng/mL로서 TIMP-1의 수준이고;

[0760] E는 ng/mL로서 HYUA2의 수준이고;

[0761] G는 %로서 HbA1c의 수준이고;

[0762] D는 혈소판 수치이고;

[0763] 1은 -10.92 내지 -3.89를 포함하는 수이다.

[0764] 최적 모델은 1000개 부트스트랩 샘플에서 AUC를 계산하여 검증된다. AUC는 0.80 (95% CI: 0.74-0.86)이었다. 최적 모델의 AUC를 사용하여, TBT 또는 NTBT로서 환자를 예측하기 위한 최적 한계치를 정의하였다:

[0765] 1. 0.4216과 동등한, 1-특이도=0% 및 감도=100%의 지점에 가장 가까운 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

[0766] · 총 정확도: 74.31%

[0767] · 감도: 73.68%

[0768] · 특이도: 74.80%

[0769] · PPV: 69.31%

[0770] · NPV: 78.63%

[0771] 2. 0.2461과 동등한 90%보다 우세한 감도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

[0772] · 총 정확도: 66.51%

[0773] · 감도: 90.53%

[0774] · 특이도: 45.97%

[0775] · PPV: 57.33%

[0776] · NPV: 86.76%

[0777] 3. 0.6252와 동등한 90%보다 우세한 특이도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

[0778] · 총 정확도: 72.02%

[0779] · 감도: 48.42%

[0780] · 특이도: 90.24%

[0781] · PPV: 79.31%

[0782] · NPV: 69.38%

[0783] Cq로서 miRNA 수준 및 생화학적 데이터에 의한 부트스트랩 접근법을 사용한 제3 모델링은 TBT2 환자를 NTBT2 환

자와 구별하기 위해 miR-193b-3p에 의해 동일한 6개의 유의미한 변수를 선별하였다 (표 6). 이 모델은 치료군 NASH 환자 또는 위험성있는 NASH 환자를 진단하기 위해서 miR-193b-3p, 키티나제 3 유사 단백질 1 (CHI3L1)이라고도 하는 YKL-40, 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 1 (TIMP-1), 당화 헤모글로빈 (HbA1c), 히알루론산 (HYUA2), 및 혈소판 수치를 조합한다.

하기 간 생검-유추 등급에 해당하는 치료군으로서의 위험성이 있는 환자: 지방증 점수 ≥ 1 , 간세포 풍선화 점수 ≥ 1 , 소엽 염증 점수 ≥ 1 , NAS (NAFLD 활성 점수) ≥ 4 및 섬유화 병기 ≥ 2 (예컨대 2, 3 또는 4, 특히 2 또는 3의 섬유화 병기)

	계수	P- 값	95% CI	
상수 m	8.08	0.0828	-1.27	17.54
miR193b-3p (Cq)	-0.38	0.0030	-0.64	-0.09
YKL-40 또는 CHI3L1	0.01	0.0031	0.005	0.019
TIMP-1	0.01	0.0095	0.001	0.016
HYUA2	-0.0024	0.0138	-0.0054	0.0045
HBA1C	0.57	0.00460	0.12	1.08
혈소판 수치	-0.009	0.0042	-0.0164	-0.0016

표 6: Golden의 TBT2 환자를 확인하기 위한 최적 부트스트랩 모델에서 선택된 변수. 신뢰 구간 = CI, 카피수. $\mu\text{L}^{-1} = \text{cpul}$.

점수는 다음의 로지스틱 함수로서 정의된다:

$$S3 \sim \frac{e^{Y3}}{1 + e^{Y3}}$$

상기 식에서,

$Y3 = m + a3^*A + c3^*C + b3^*B + e2^*E + g2^*G + d3^*D$ 이고,

여기서,

S3은 NASH 점수이고;

A는 $\log_{10}$ 카피수. μL^{-1} 로서 hsa-miR-193b-3p의 수준이고;

C는 pg/mL 로서 YKL-40의 수준이고;

B는 ng/mL 로서 TIMP-1의 수준이고;

E는 ng/mL 로서 HYUA2의 수준이고;

G는 %로서 HbA1c의 수준이고;

D는 혈소판 수치이고;

m은 -1.27 내지 17.54를 포함하는 수이다.

최적 모델은 1000개 부트스트랩 샘플에서 AUC를 계산하여 검증된다. AUC는 0.80 (95% CI: 0.74-0.86)이었다. 최적 모델의 AUC를 사용하여, TBT 또는 NTBT로서 환자를 예측하기 위한 최적 한계치를 정의하였다:

1. 0.3741과 동등한, 1-특이도=0% 및 감도=100%인 지점에 가장 가까운 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

· 총 정확도: 73.39%

· 감도: 78.95%

- [0804] · 특이도: 69.11%
- [0805] · PPV: 66.37%
- [0806] · NPV: 80.95%

[0807] 2. 0.2270과 동등한 90%보다 우세한 감도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

- [0808] · 총 정확도: 63.76%
- [0809] · 감도: 90.53%
- [0810] · 특이도: 43.09%
- [0811] · PPV: 55.13%
- [0812] · NPV: 85.48%

[0813] 3. 0.6364와 동등한 90%보다 우세한 특이도를 제공하는 한계치. 해당 분할표는 하기 지수를 생성시켰다:

- [0814] · 총 정확도: 71.56%
- [0815] · 감도: 47.37%
- [0816] · 특이도: 90.24%
- [0817] · PPV: 78.95%
- [0818] · NPV: 68.94%

[0819] 도 12 및 13에 도시된 바와 같이, 독립 코호트, RESOLVE-IT에서 알고리즘 Y2 (hsa-miR-193b-3p (log10 cpul), YKL-40 또는 CHI3L1, TIMP-1, 히알루론산, HbA1c 및 혈소판 수치) 및 Y3 (hsa-miR-193b-3p (Cq), YKL-40 또는 CHI3L1, TIMP-1, 히알루론산, HbA1c 및 혈소판 수치)의 검증은 그 결과 비슷하고, 심지어 0.81의 더 큰 AUC를 생성시켰다.

[0820] 표 7에서, 위험성이 있는 환자의 식별은 양성 예측값으로 표시된 바와 같이, 독립 코호트에서 훨씬 개선된다.

성능	총 정확도	감도	특이도	PPV (%)	NPV (%)
Y2 GOLDEN DIAG	74.31%	73.68	74.80	69.31	78.63
Y2 RESOLVE-IT	70.61%	55.73	87.72	83.91	63.29
Y3 GOLDEN DIAG	73.58%	72.34	74.58	69.39	77.19
Y3 RESOLVE-IT	74.79%	77.69	71.43	75.94	73.39

[0821]

[0822] 표 7: GOLDEN-DIAG 및 RESOLVE-IT에서 모델 Y2 및 Y3의 진단 성능. PPV = 양성 예측값, NPV = 음성 예측값.

[0823] 결론:

[0824] i) 2개의 상이한 방법론 (HTG Edge-Seq NGS 및 RTqPCR)을 사용한 혈청 및 혈장 샘플에서 miRNA의 수준 측정을 기반으로 하는, 이들 결과는 NAFLD (NAS $\geq$ 1), NASH (지방증에서 적어도 1점, 소염 염증에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점으로 NAS $\geq$ 3), 활성-NASH (지방증에서 적어도 1점, 소염 염증에서 적어도 1점 및 간세포 풍선화 점수에서 적어도 1점으로 NAS $\geq$ 4), 유의미 섬유화 (F $\geq$ 2), 및/또는 활성-NASH 및 섬유화 (TBT1, TBT2, TBT7)가 존재하는 환자의 식별을 위한 순환 진단 생물표지자로서 hsa-mir193a-5p, hsa-miR193b-3p 및 hsa-193b-5p, 및 보다 일반적으로 hsa-miR193 관련 올리고뉴클레오타이드의 용도를 뒷받침한다.

[0825] ii) 혈청 및 혈장 샘플에서 miRNA의 수준의 측정을 기반으로 하는, 이들 결과는 대상체에서 조직학적 병변 (지방증, 소염 염증, 간세포 풍선화)의 비침습성 등급화, NASH 활성 (NAS 또는 활성 지수)의 평가 및 질환 중증도 (섬유화 병기)의 평가를 위한 순환 진단 생물표지자로서 hsa-miR193 종의 용도를 뒷받침한다.

[0826] iii) 혈청 및 혈장 샘플에서 miRNA의 수준 측정을 기반으로 하는, 이들 결과는 대상체에서 조직학적 병변 (지방증, 소염 염증, 간세포 풍선화)의 비침습성 등급화, NASH 활성 (NAS 또는 활성 지수)의 평가 및 질환 중증도 (섬유화 병기)의 평가를 위한 순환 진단 생물 표지자로서 hsa-miR193 종의 용도를 뒷받침한다.

- [0827] iv) 혈청 및 혈장 샘플에서 miRNA의 수준 측정을 기반으로 하는, 이들 결과는 그 환자가 항-NAFLD 약물, 항-NASH 약물 또는 항섬유화 약물로 치료되거나 또는 치료되지 않는, 동일 환자에서 NAFLD 활성, NASH 활성 또는 섬유화 병기의 전개를 모니터링하기 위한 순환성 생물표지자로서 hsa-miR193 종의 용도를 뒷받침한다.
- [0828] v) 마지막으로, NASH 활성의 수준을 섬유화 전개의 위험성과 연결시키고 섬유화 병기를 장기간 간 결과 (간경변증, 간 이식, HCC 또는 간성 사망)의 위험성과 연결시키는 최신 기술은, 간경변증으로 섬유화 전개의 위험성을 평가하고 장기간 중증 합병증의 위험성을 추정하기 위한 예후 생물표지자로서 miR193 종을 뒷받침한다.
- [0829] vi) 몇몇 변수를 조합하고 이전에 기술된 바와 같이 위험성이 있는 환자에 해당하는 부트스트랩 모델에 대한 AUC 점수는 개별 변수에 대해 수득된 AUC 점수에 비해 통계적으로 더 양호하다. 따라서, 본 발명에 따른 로지스틱 함수를 통한 몇몇 변수의 조합은 단독 변수의 연구에 비해 더 양호하고 보다 정확하다.
- [0830] vii) Cq로서 hsa-miR-193b-3p에 의한 모델링 및 log10 카피수. μ L-1로서 hsa-miR-193b-3p에 의한 모델링은 동일한 변수 선별을 일으켰다: YKL-40 또는 CHI3L1, TIMP-1, 히알루론산, HbA1c 및 혈소판 수치.
- [0831] viii) GOLDEN-DIAG 및 RESOLVE -IT 간 AUC의 유사성 및 독립 코호트에서 알고리즘 Y2 및 Y3의 진단값의 검증은 이들 복합 생물표지자 패널의 능력을 교차 검증한다.
- [0832] 참조문헌
- Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU (2007) miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods* **43**: 146-152
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **33**: e179
- Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, Sebastiani G, Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Stal P, Wong VW, Kechagias S, Hultcrantz R, Loomba R (2017) Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* **65**: 1557-1565
- Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, Hultcrantz R (2015) Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* **61**: 1547-1554
- Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Mitton JD, Oliveri P, Osborn JL, Peng T, Ratcliffe AL, Webster PJ, Davidson EH, Hood L, Dimitrov K (2008) Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* **26**: 317-325
- Hafner M, Renwick N, Farazi TA, Mihailovic A, Pena JT, Tuschl T (2012) Barcoded cDNA library preparation for small RNA profiling by next-generation sequencing. *Methods* **58**: 164-170
- Lizarraga D, Huen K, Combs M, Escudero-Fung M, Eskenazi B, Holland N (2016) miRNAs differentially expressed by next-generation sequencing in cord blood buffy coat samples of boys and girls. *Epigenomics* **8**: 1619-1635

Miotto E, Saccenti E, Lupini L, Callegari E, Negrini M, Ferracin M (2014) Quantification of circulating miRNAs by droplet digital PCR: comparison of EvaGreen- and TaqMan-based chemistries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**: 2638-2642

Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, Kauppinen S, Plasterk RH, Mourelatos Z (2006) RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA* **12**: 187-191

Satake E, Pezzolesi MG, Md Dom ZI, Smiles AM, Niewczas MA, Krolewski AS (2018) Circulating miRNA Profiles Associated With Hyperglycemia in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* **67**: 1013-1023

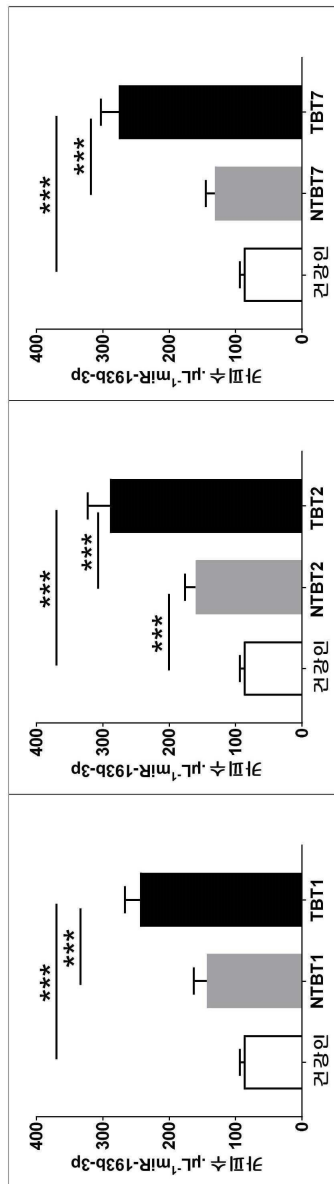
Vigneault F, Ter-Ovanesyan D, Alon S, Eminaga S, D CC, Seidman JG, Eisenberg E, G MC (2012) High-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 11**: Unit 11 12 11-10

Wong VW, Adams LA, de Ledinghen V, Wong GL, Sookoian S (2018) Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*

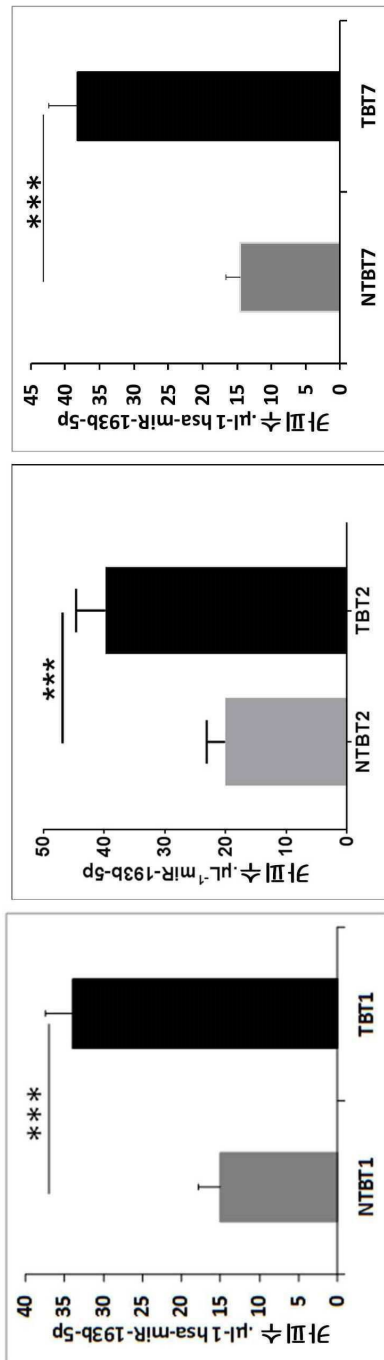
[0834]

도면

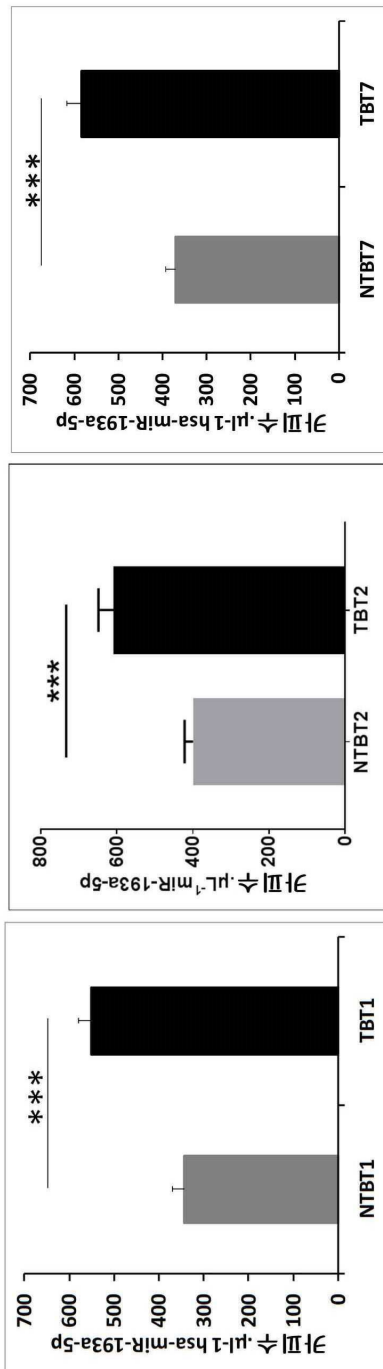
도면1



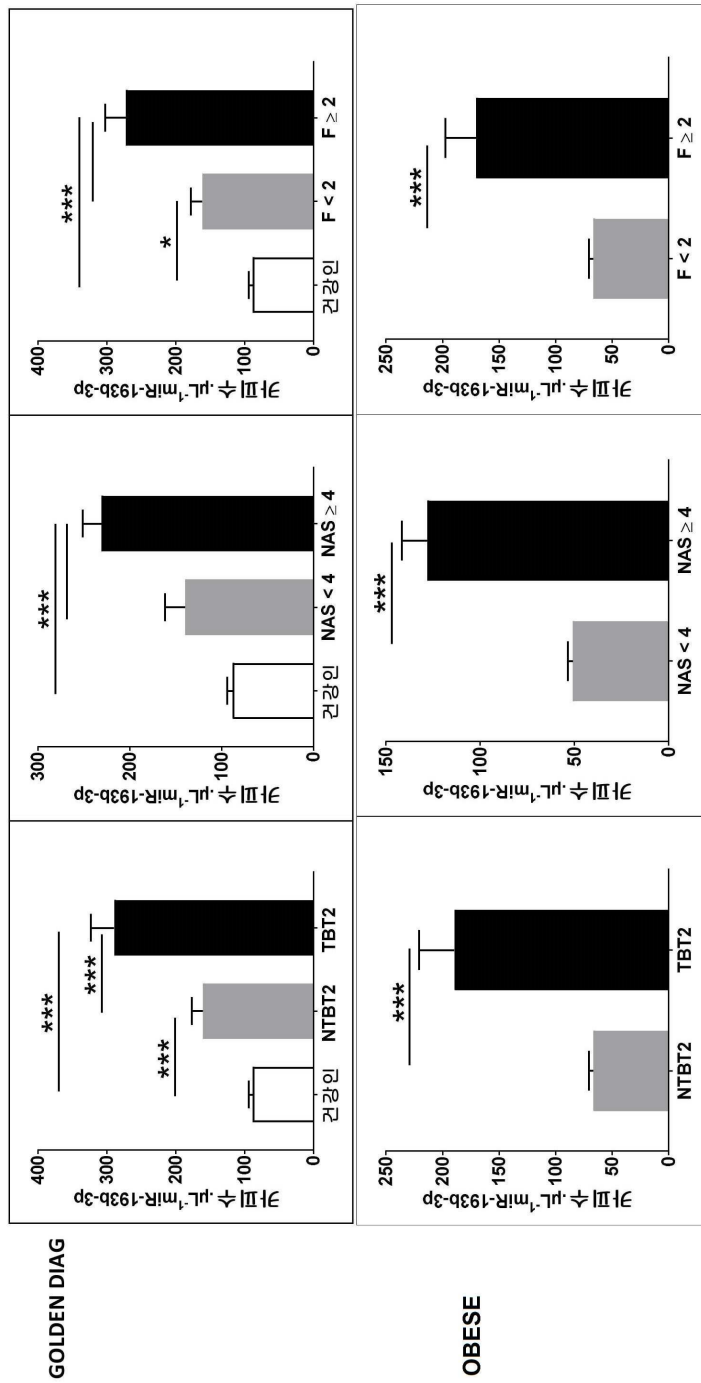
도면2



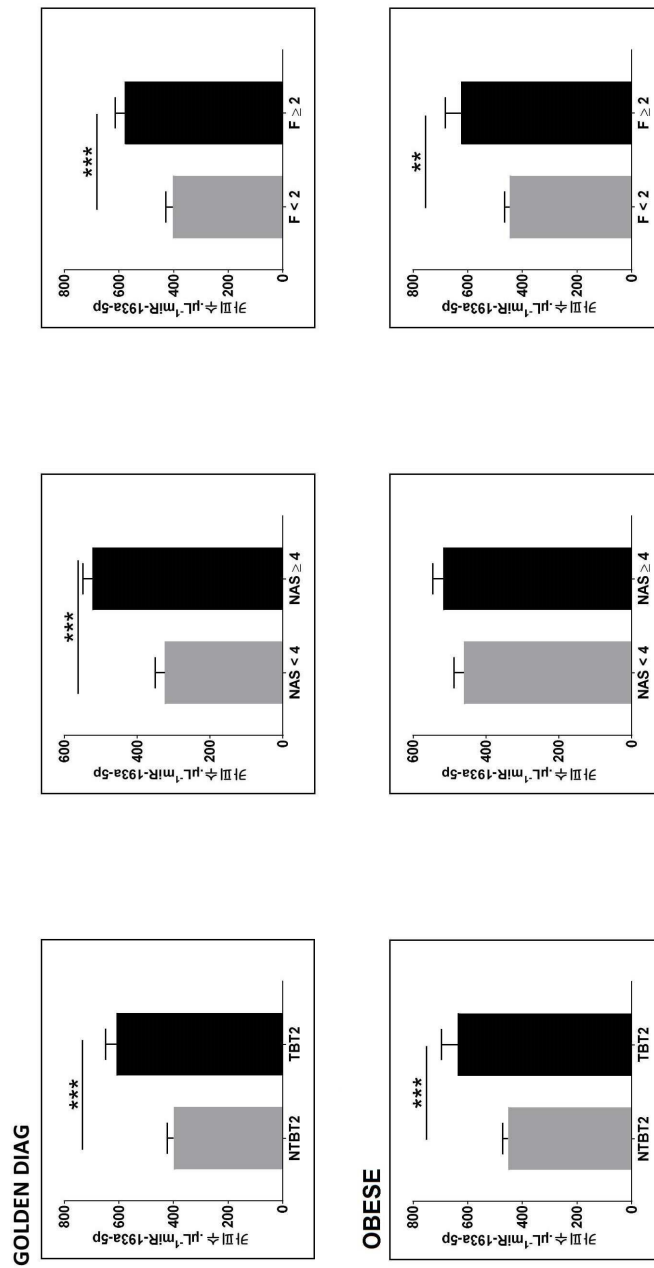
도면3



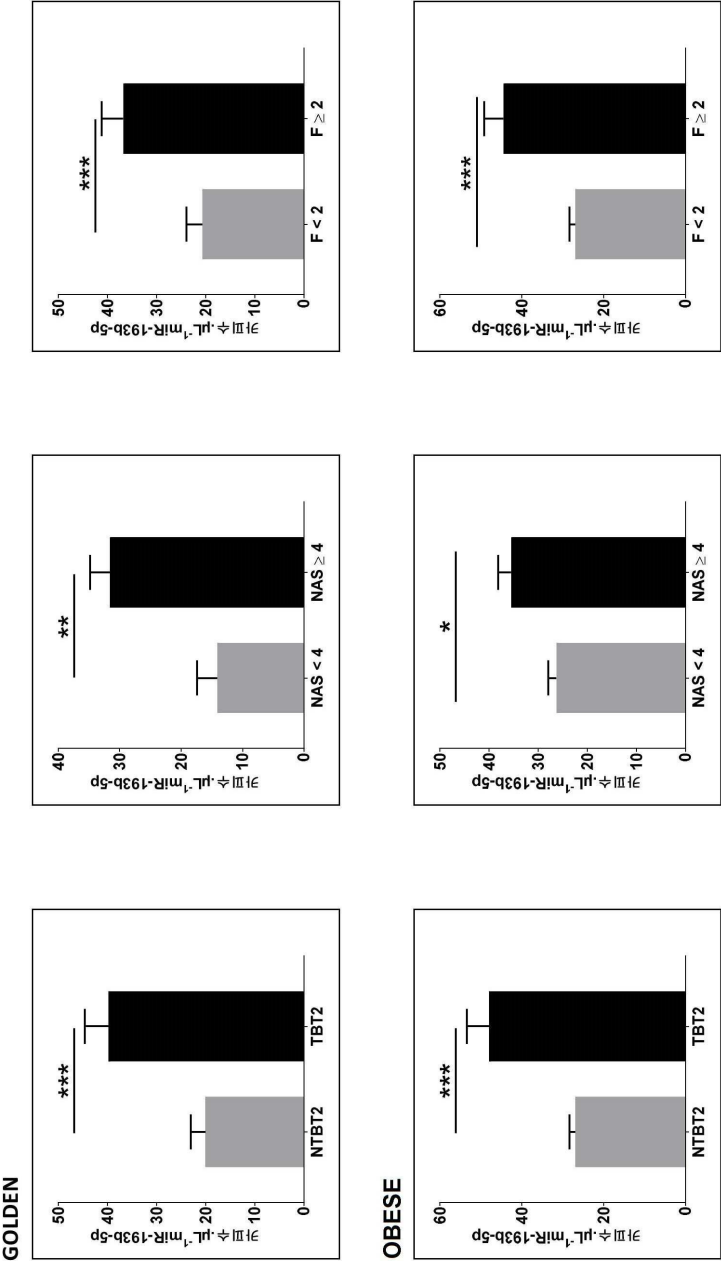
도면4



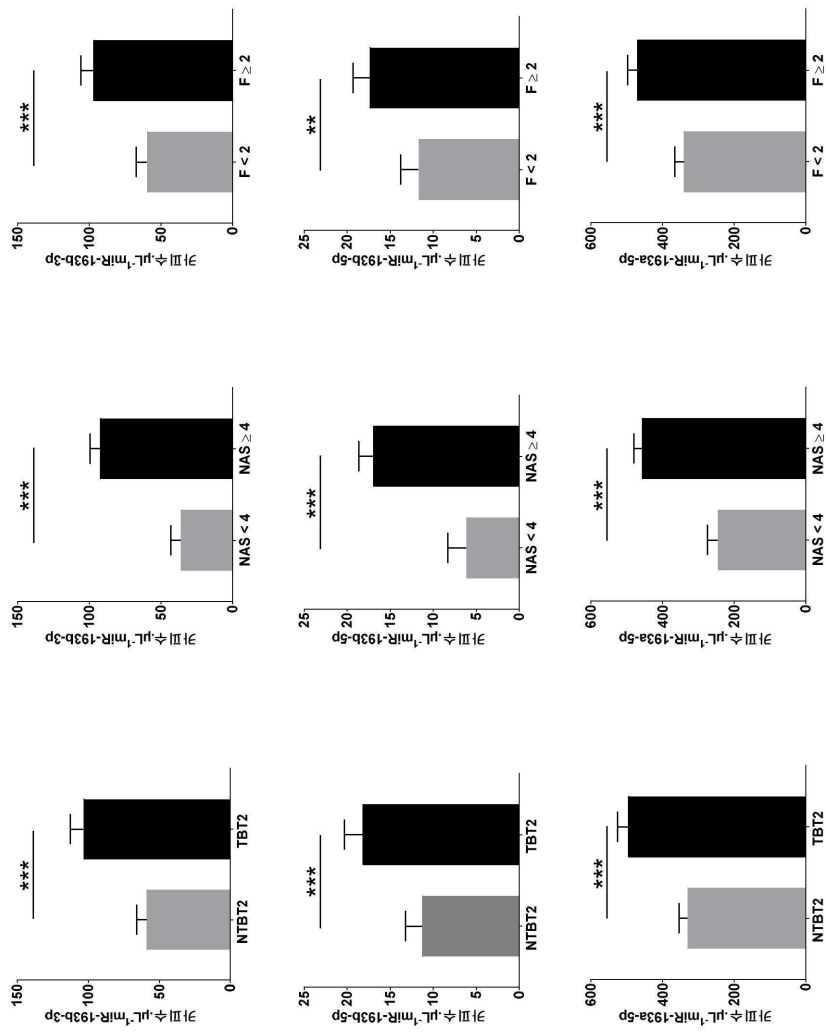
도면5



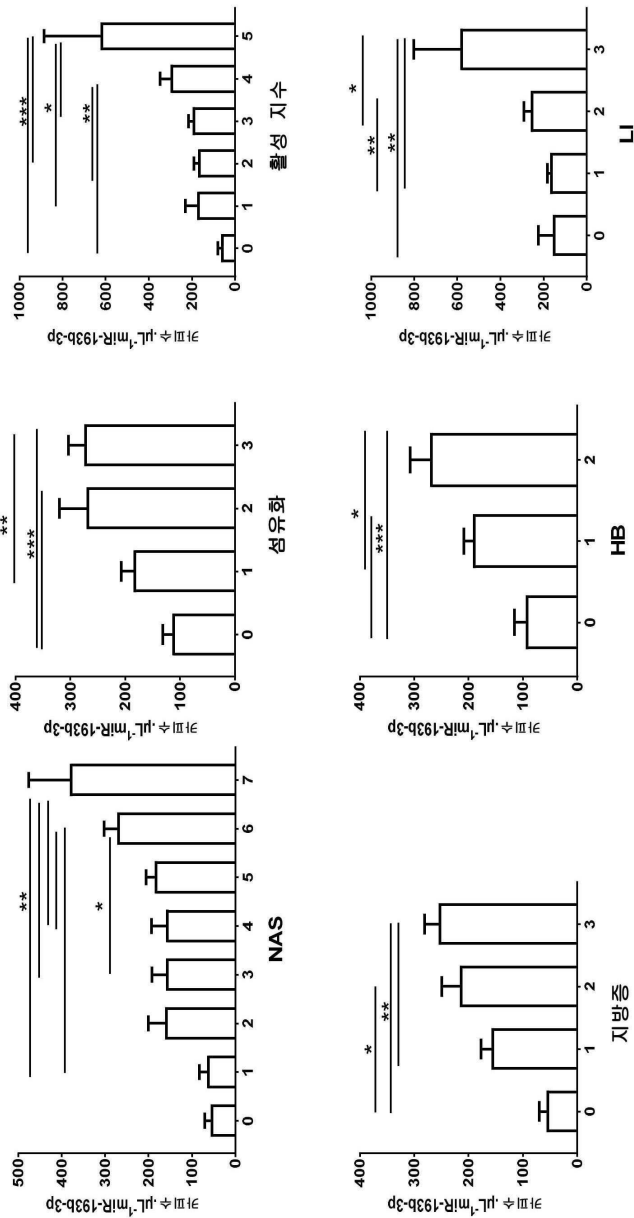
도면6



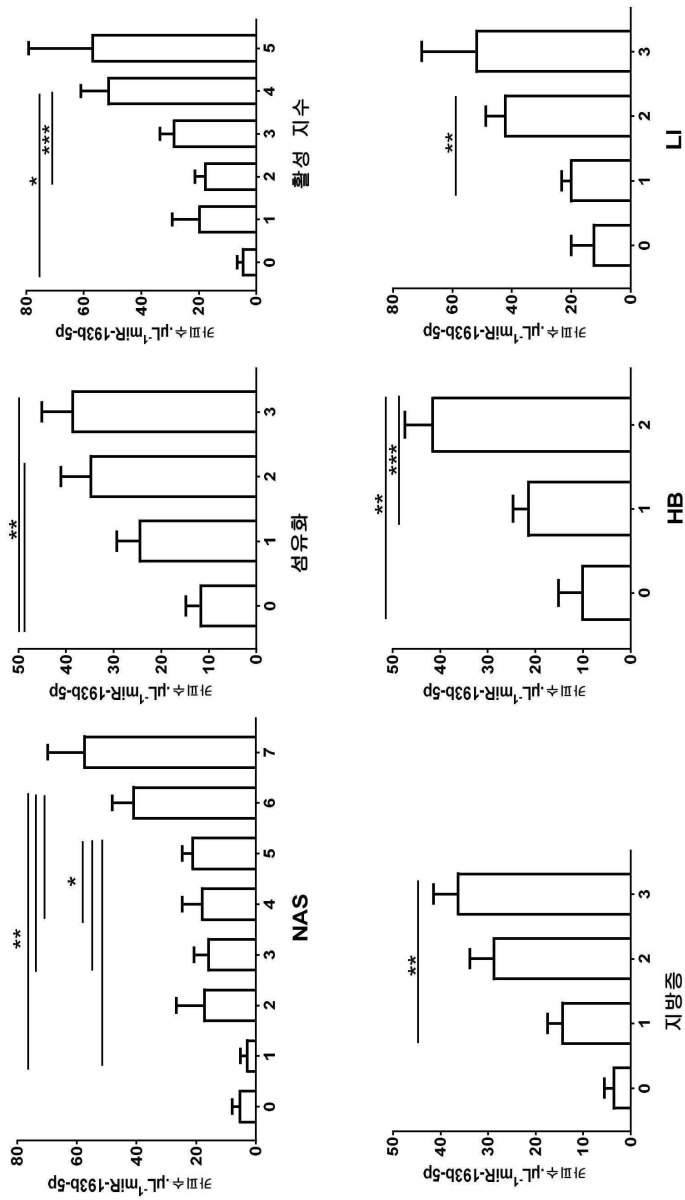
도면7



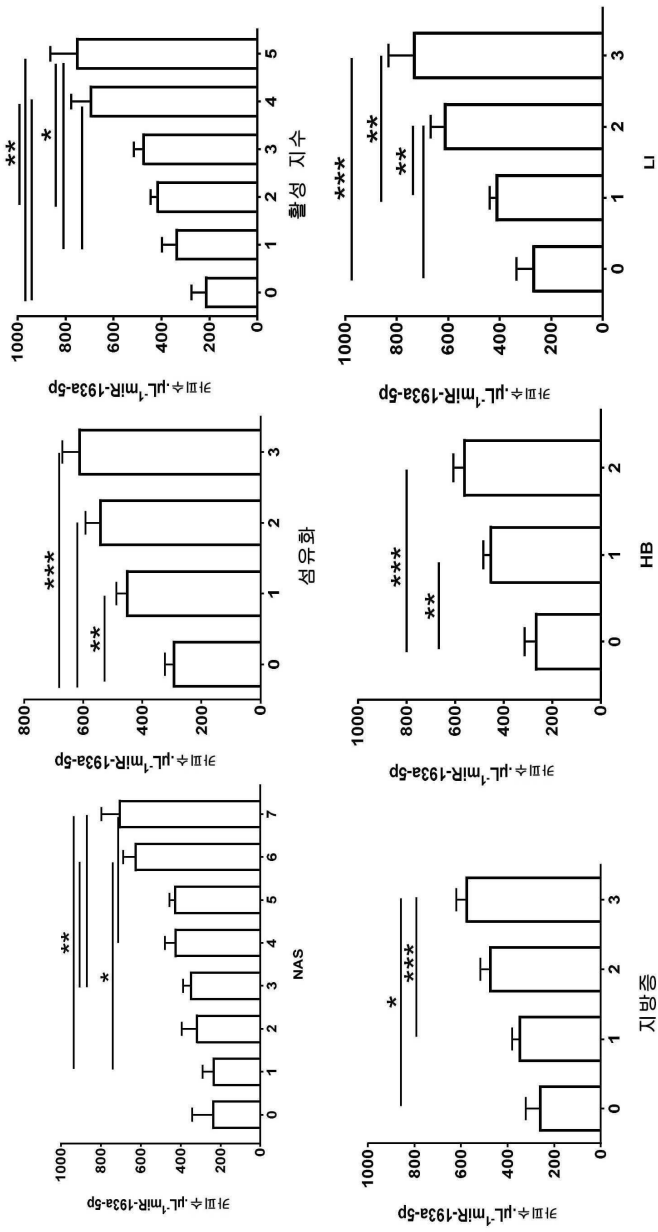
도면8



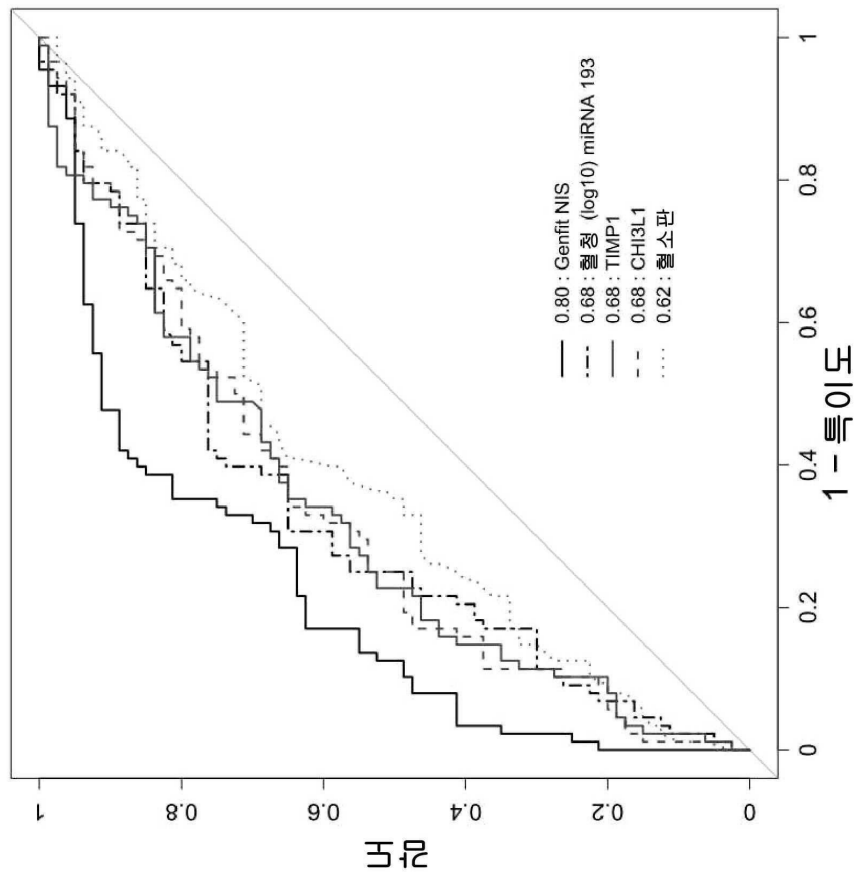
도면9



도면10

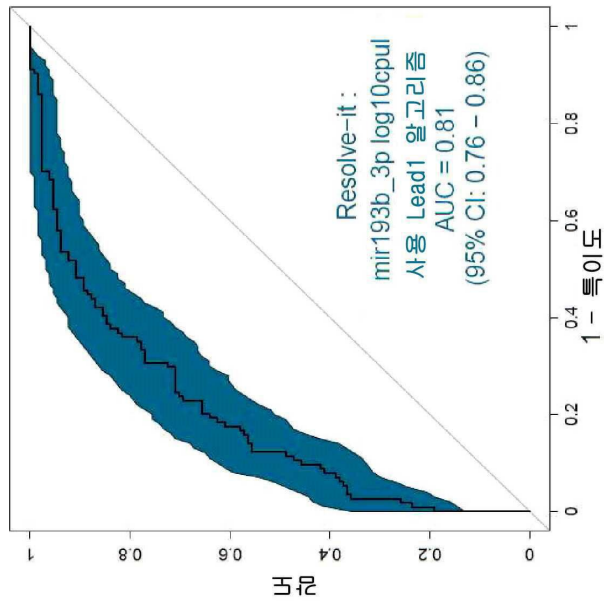


도면11

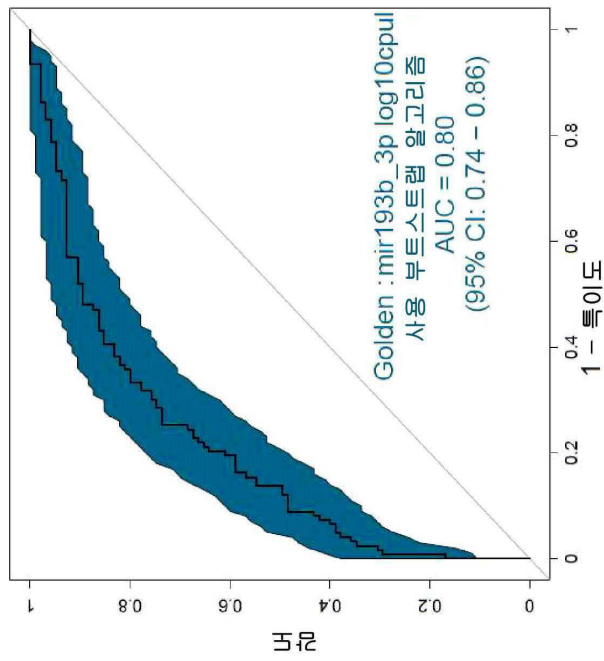


도면12

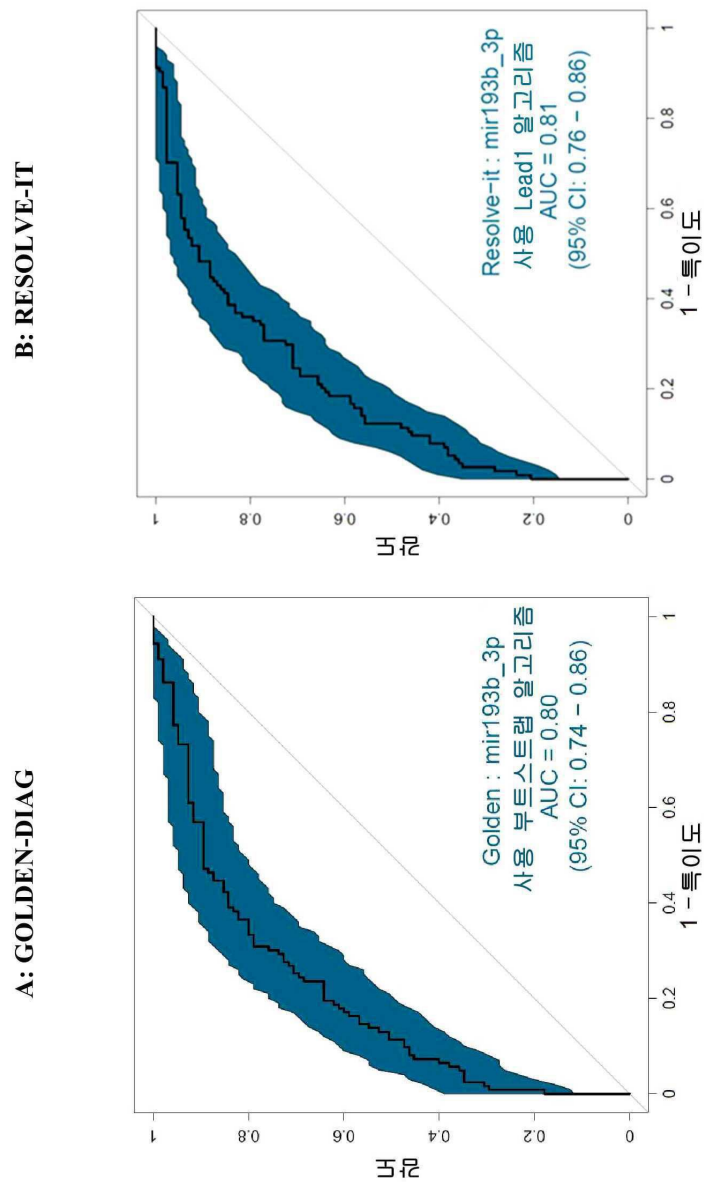
B: RESOLVE-IT



A: GOLDEN-DIAG



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENFIT
- <120> NON-INVASIVE DIAGNOSTIC OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASES,
NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS AND/OR LIVER FIBROSIS
- <130> B2567EP00
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 22

<212> RNA
 <213> homo sapiens
 <400> 1
 aacuggccua caaaguccca gu 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> homo sapiens
 <400> 2
 ugggucuuug cgggcgagau ga 22

 <210> 3
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> homo sapiens
 <400> 3
 cgggguuuug agggcgagau ga 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> homo sapiens
 <400> 4
 aacuggcccu caaagucccg cu 22