(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090715 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.15

(22) Дата подачи заявки
2018.09.14

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6883* (2018.01)

(54) НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕАЛКОГОЛЬНЫХ ЖИРОВЫХ ДИСТРОФИЙ ПЕЧЕНИ, НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА И/ИЛИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

(31) **17306201.9**
(32) **2017.09.18**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/074975**
(87) **WO 2019/053233 2019.03.21**

(71) Заявитель:
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:
Анф Реми, Кордоннье Женевьев, Брозек Джон (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новому неинвазивному способу диагностики неалкогольной жировой дистрофии печени, в частности, неалкогольного стеатогепатита и/или фиброза печени.

202090715 A1

202090715 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561320EA/042

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕАЛКОГОЛЬНЫХ ЖИРОВЫХ ДИСТРОФИЙ ПЕЧЕНИ, НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА И/ИЛИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новому неинвазивному способу диагностики неалкогольной жировой дистрофии печени, в частности, неалкогольного стеатогепатита и/или фиброза печени.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Неалкогольная жировая дистрофия печени (NAFLD) представляет собой бессимптомное заболевание, определяемое как накопление жира в печени (стеатоз) по причинам, отличным от чрезмерного употребления алкоголя. NAFLD является наиболее частой причиной повышенного уровня аминотрансфераз у пациентов, обращающихся к гепатологам. NAFLD варьирует от доброкачественного простого стеатоза до патологического состояния у некоторых пациентов, неалкогольного стеатогепатита (NASH), когда некроз/ воспалительный процесс приводит к прогрессирующему накоплению фиброза в печени, что в конечном итоге приводит к циррозу, печеночной недостаточности, гепатоцеллюлярной карциноме (HCC), пересадке печени и отказу печени. Как с эпидемиологической, так и с патофизиологической точки зрения, NAFLD и NASH тесно связаны с ожирением, метаболическим синдромом и диабетом 2 типа. Таким образом, параллельно с эпидемиями ожирения и диабета 2 типа, распространенность NAFLD и NASH в последние десятилетия резко возросла, и NASH становится основной причиной трансплантации печени в США. Следовательно, NASH считается растущей общемировой проблемой общественного здравоохранения с учетом того, что не существует оптимального решения для диагностики и отсутствует утвержденное лечение для NASH.

Если NAFLD может быть диагностирована путем обнаружения накопления жира в печени с помощью ультразвуковых методик, то NASH и NASH-ассоциированный фиброз печени могут быть диагностированы только путем гистологического исследования биопсии печени. При микроскопическом исследовании биопсии печени NASH определяют по накоплению жирных кислот (липидных капель), ассоциированному с поврежденными гепатоцитами (баллонирование или некроз гепатоцитов) и признакам лобулярного воспаления. Хотя фиброз не является обязательным гистологическим признаком для диагностики NASH, наличие и стадия фиброза печени имеют решающее значение для оценки тяжести заболевания и риска развития цирроза, HCC (гепатоцеллюлярной карциномы) и отказа печени, который представляет собой связанную с печенью смерть пациента.

Для оценки уровня активности NAFLD и стадии фиброза и оценки риска развития клинических исходов для печени были разработаны гистологические системы

оценки/определения стадии. Шкала оценки активности NALFD (NAS) была разработана для оценки активности заболевания. NAS представляет собой сумму индивидуальных невзвешенных показателей биопсии по стеатозу (от 0 до 3), лобулярному воспалению (от 0 до 3), гепатоцеллюлярному баллонированию (от 0 до 2). Согласно Kleiner и соавт. (Hepatology, 2005; 41:1313-21), NAS представляет собой сумму трех гистологических показателей, полученных для срезов биопсии печени:

- S: балл по стеатозу: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66% и 3: >66%
- LI: балл по лобулярному воспалению (фокус на поле 20x): 0: нет; 1: <2; 2: 2-4 и 3: >4
- HB: балл баллонирующей дистрофии: 0: нет; 1: мало; 2: много клеток/выраженное баллонирование.

При использовании этой системы пациент с NASH имеет NAS≥3 и, по меньшей мере, 1 балл по стеатозу, по меньшей мере, 1 балл лобулярного воспаления и, по меньшей мере, 1 балл по баллонированию гепатоцитов. Пациент считается имеющим активный NASH, когда NAS≥4, и он имеет, по меньшей мере, 1 балл стеатозу, по меньшей мере, 1 балл воспаления и, по меньшей мере, 1 балл по баллонированию гепатоцитов.

Локализация и степень фиброза при гистологическом исследовании указывает на тяжесть (прогресс) заболевания, и NASH-CRN разработала специальную систему стадирования фиброза (Kleiner и соавт., Hepatology, 2005; 41:1313-21):

Перисинусоидальный или перипортальный фиброз	1
Легкий перисинусоидальный фиброз (зона 3)	1a
Умеренный перисинусоидальный фиброз (зона 3)	1b
Портальный/перипортальный фиброз	1c
Перисинусоидальный и портальный/перипортальный фиброз	2
Мостовидный фиброз	3
Цирроз	4

При использовании этой системы стадирования фиброза, пациенты с отсутствующим или минимальным фиброзом (F=0-1), как правило, не считаются имеющими риск развития цирроза, HCC или отказа печени. Пациенты со значительным (F=2) и умеренным фиброзом (F=3) имеют повышенный риск развития цирроза, печеночной недостаточности, HCC и отказа печени. Пациенты с компенсированным циррозом печени имеют тяжелый фиброз (F=4) и подвержены высокому риску печеночной недостаточности (декомпенсированный цирроз), HCC и связанной с печенью смерти.

В последнее время особое внимание уделяется индексу активности (AI), полученному на основе этих двух широко используемых систем оценки и стадирования, который может быть определен как сумма баллов лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов. Кроме того, Munteanu и соавт., Aliment Pharmacol Ther.,

2016, 44(8):877-89 предложили признак SAF, чтобы отдельно выдавать баллы стеатоза, активности болезни и фиброза.

Диагностика NAFLD и NASH, а также оценка активности заболевания с использованием вышеупомянутых NAS, AI и стадирования фиброза печени требуют биопсии печени, которая имеет ряд очевидных недостатков, исключающих ее рутинное применение. Действительно, биопсия печени является инвазивной процедурой, которая может быть обременительной, беспокоящей и болезненной для пациента, и биопсия печени связана с риском кровоизлияний и даже смерти. Соответственно, вследствие нарастающей эпидемии NASH и фиброза печени, а также вследствие того, что биопсия не может рассматриваться как достаточно эффективная и безопасная процедура, существует острая необходимость в новых неинвазивных способах диагностики NAFLD, NASH и/или фиброза печени.

Для диагностики NAFLD были разработаны методики ультразвукового исследования и визуализации (ультразвуковая эхография, контролируемый параметр затухания, магнитно-резонансная визуализация (MRI) и измерение доли жира, взвешенной по протонной плотности, с помощью магнитно-резонансной визуализации (MRI-DPFF)). Однако эти методики ограничены вариабельностью как между наблюдателями, так и для одного и того же наблюдателя, стоимостью и/или занимают много времени. Кроме того, MRI-DPFF обычно является недоступным и слишком сложным для применения в клинической практике. Кроме того, стадия фиброза ассоциирована со смертностью по любой причине в зависимости от дозы, при этом повышенный риск проявляется у пациентов с фиброзом F2. Ультразвуковая эластография, такая как Фиброскан и эластография на сдвиговых волнах, имеет умеренную или высокую точность в диагностике прогрессирующего фиброза или цирроза. Однако фиброз F2 не является прогрессирующей стадией фиброза и, следовательно, не может быть точно обнаружен с помощью этих методик.

Помимо ультразвуковых и визуализационных методик, были предприняты интенсивные усилия для идентификации и проверки новых циркулирующих биомаркеров для надежного, простого и экономически эффективного неинвазивного выявления NAFLD, NASH и/или фиброза печени. В следующей таблице перечислены отдельные биомаркеры, которые были описаны как модулированные при NAFLD/NASH и/или фиброзе печени.

Функция гепатоцитов	Жировая ткань	Метаболизм	Окислительный стресс/апоптоз	Фиброз	Воспаление

ALT AST ALP GGT Гаптоглобин Альбумин Билирубин Количество тромбоцитов	Адипонектин Лептин Резистин	Глюкоза плазмы натощак Инсулин натощак Индекс HOMA Триглицериды Холестерин ЛПВП VLCL-C Аполипопротеины (ApoA1, ApoB, ApoCIII)	Малоновый диальдегид TBARS Ox LDL CK18-M30 CK18-M65 Ферритин YKL-40 (CHI3L1)	Фибронектин Гиалуроновая кислота Коллаген типа IV PIIINP TIMP-1	TNFa IL1b, IL6, IL8, IFNg, TGFb hs-CRP MCP1 sCD14

Некоторые исследования показали, что некоторые из этих сывороточных биомаркеров имели лучшие диагностические значения, чем обычные сывороточные маркеры дисфункции печени, такие как трансаминазы (Naveau S. и соавт., Clin Gastroenterol Hepatol., 2005; 3 (2): 167-74; Castera L и соавт., J. Hepatol. 2000; 32: 412-8; Annoni G. и соавт. Hepatology. 1989; 9: 693-7; Nojgaard C. и соавт. J Hepatol. 2003; 39: 179-86; Chossegros P. 1995; 22 (2 Suppl): 96-9). Однако ни одно из этих исследований не позволило выявить и валидировать эффективный биомаркер для диагностики NAFLD, NASH и/или фиброза печени. В попытках улучшить диагностические характеристики, были получены многопараметрические оценки, объединяющие несколько биомаркеров и/или обычных переменных, но их диагностические характеристики для идентификации пациентов с NAFLD, NASH и/или фиброзом печени остаются в значительной степени ненадежными.

NASH ассоциируется с более быстрым прогрессированием фиброза, чем NAFLD, и в настоящее время является основной целью фармакологического лечения. У пациентов с NASH чаще развивается цирроз печени, и они умирают от сердечно-сосудистых и связанных с печенью причин, причем прогноз ухудшается по мере прогрессирования стадии фиброза (Ekstedt et al, 2015). Несмотря на большое количество сывороточных биомаркеров, комбинированных панелей и биомаркеров визуализации, которые были предложены, по-прежнему существует потребность в идентификации эффективных, менее инвазивных и более доступных способов диагностики и мониторинга NAFLD, NASH и

фиброза печени, в частности, способов, подтвержденных независимой панелью клинической проверки.

Выявление пациентов с риском развития HCC, цирротических осложнений и смертей, связанных с печенью, является основной причиной оценки состояния печени.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения провели несколько очень точных и полных анализов различных групп пациентов в целях предоставления новых и высокочувствительных неинвазивных способов диагностики и мониторинга неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH) и фиброза печени. Представленные в настоящем описании данные демонстрируют, что miR-452 является эффективным циркулирующим биомаркером, связанным с NAFLD, NASH и/или фиброзом печени. Этот биомаркер был валидирован в трех независимых клинических когортах. Таким образом, способы по настоящему изобретению позволяют диагностировать, контролировать и классифицировать риск для субъекта, страдающего NAFLD, NAFL, NASH и/или фиброзом печени. Авторы настоящего изобретения также предоставляют способ диагностики, мониторинга и классификации риска субъектов, потенциально страдающих NAFLD, NASH и/или фиброзом печени. Способы по настоящему изобретению могут также способствовать разработке новых терапевтических способов лечения.

Соответственно, изобретение предоставляет способ диагностики NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, включающий в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Эти способы основаны на определении уровня miR-452 в биологической жидкости субъекта. Во всех представленных в настоящем описании способах и вариантах осуществления микроРНК miR-452, внедренная в настоящем изобретении, может представлять собой микроРНК hsa-miR-452, такую как hsa-miR-452, выбранную из группы, состоящей из hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p. В конкретном варианте осуществления определяют уровень hsa-miR-452-5p. Во всех представленных в настоящем описании способах и вариантах осуществления образец биологической жидкости может представлять собой образец крови, жидкости, полученной из крови (такой как сыворотка и плазма, в частности плазма, не содержащая тромбоцитов, например, образец бесклеточной плазмы, не содержащей тромбоцитов, полученной с использованием цитрата), образец слюны, спинномозговой жидкости или мочи. В конкретном варианте осуществления биологическая жидкость представляет собой плазму или сыворотку без тромбоцитов или с тромбоцитами.

В способах по настоящему изобретению уровень miR-452 в биологической жидкости субъекта могут сравнивать с контрольным уровнем miR-452. «Контрольный уровень» обозначает заранее определенный стандарт или уровень, определенный экспериментально в образце, обработанном аналогичным образом, от контрольного субъекта. В зависимости от цели способов по настоящему изобретению контрольный

субъект может являться здоровым субъектом, субъектом, имеющим NAFLD, но не имеющим NASH, субъектом, имеющим NASH, но не имеющим активного NASH, или субъектом, у которого фиброз печени отсутствует или минимален. Контрольным субъектом также может являться пациент, получавший плацебо. Контрольным уровнем также может являться уровень miR-452, определенный в аналогично обработанном образце биологической жидкости, полученном в прошлом от того же субъекта, что позволяет определять эволюцию NAFLD, NAFL, NASH или фиброза печени у субъекта, в частности, позволяет определить эволюцию активности заболевания или фиброза, или эффективность лечения заболевания, в зависимости от реализуемого способа.

В конкретном варианте осуществления диагностика и/или обнаружение NAFLD или диагностика и/или обнаружение потенциальной NAFLD у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у здоровых людей без стеатоза печени.

В конкретном варианте осуществления диагностика и/или обнаружение NAFL, или диагностика и/или обнаружение потенциальной NAFL, у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта без стеатоза печени, без лобулярного воспаления и без баллонирования гепатоцитов.

В другом конкретном варианте осуществления диагностика и/или обнаружение NASH, или диагностика и/или обнаружение потенциального NASH у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта без NASH, такого как здоровый субъект, субъект с NAS<3 или субъект по меньшей мере с одним компонентом NAS, имеющим оценку 0.

В другом варианте осуществления диагностика и/или обнаружение активного NASH, или диагностика и/или обнаружение потенциально активного NASH у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у здорового субъекта, субъекта с NAS<4 или субъекта по меньшей мере с одним компонентом NAS, имеющим оценку 0. В конкретном варианте осуществления для диагностики и обнаружения активного NASH или потенциально активного NASH контрольный уровень представляет собой уровень miR-452, измеренный у субъекта с NAS=3, 1 баллом по стеатозу, 1 баллом по лобулярному воспалению и 1 баллом по баллонированию гепатоцитов.

В дополнительном варианте осуществления диагностика и выявление фиброза печени (F≥1) или потенциального фиброза печени (F≥1) у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у здорового субъекта без фиброза печени (F=0).

В другом варианте осуществления диагностика и выявление значительного (F=2), умеренного (F=3) или тяжелого (F=4; то есть, цирроза) фиброза печени или

потенциального значительного фиброза печени, потенциального умеренного фиброза печени или потенциального тяжелого фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта без (F=0) или с минимальным (F=1) фиброзом печени.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление значительного (F=2), умеренного (F=3) или тяжелого (F=4) фиброза печени, или потенциального значительного фиброза печени, потенциального умеренного фиброза печени или потенциального тяжелого фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с минимальным фиброзом (F=1). В другом конкретном варианте осуществления контрольный уровень измеряют у субъекта с F=1a, 1b или 1c.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление значительного фиброза печени или потенциального значительного фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с минимальным фиброзом печени.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление умеренного фиброза печени или потенциального умеренного фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта со значительным фиброзом печени.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление тяжелого фиброза печени или потенциального тяжелого фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с умеренным фиброзом печени.

Согласно еще одной цели, изобретение относится к способу классификации субъекта как потенциально получающего (подлежащего лечению, или TBT) или не получающего (не подлежащего лечению, или NTBT) лечение NAFLD, NASH или фиброза печени, на основании обнаружения повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня miR-452, измеренного у пациентов NTBT, как определено ниже.

В дополнительном варианте осуществления изобретение также предоставляет способ определения уровня активности NAFLD, уровня активности NASH и/или стадии фиброза печени у субъекта на основании определения уровня miR-452 в образце биологической жидкости субъекта.

В другом аспекте изобретение также позволяет клинически прогнозировать фиброз, а именно, прогнозировать фактор риска развития фиброза печени в цирроз и другие исходы для печени (такие как HCC и связанные с печенью смерти) пациента с

NAFLD или NASH, на основании уровня miR-452, определенного в образце биологической жидкости субъекта.

Изобретение также предоставляет способ для мониторинга эволюции уровня активности NAFLD, уровня активности NASH и/или стадии фиброза печени у субъекта на основе эволюции уровня MIR-452 в образце биологической жидкости субъекта относительно контрольного уровня miR-452 в одном или более образцов биологической жидкости, собранных у того же самого субъекта в прошлом. В этом способе повышение уровня miR-452 указывает на то, что активность заболевания и фиброз возрастают, тогда как снижение уровня miR452 указывает на то, что активность заболевания и фиброз снижаются.

Изобретение, кроме того, предоставляет способ определения эффективности лечения NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта на основе эволюции уровня miR-452 в образце биологической жидкости субъекта относительно контрольного уровня miR-452 в одном или более образцах биологической жидкости, собранных у того же самого субъекта в прошлом. В этом способе повышение уровня miR-452 или стабильный уровень miR-452 указывает на то, что лечение является неэффективным, тогда как снижение уровня miR-452 указывает на то, что лечение является эффективным. В другом варианте осуществления этого способа стабильный уровень miR-452 может также указывать на то, что лечение является эффективным в отношении стабилизации состояния NASH, NAFLD или фиброза печени у субъекта, посредством чего снижается риск развития у субъекта таких критических исходов, как цирроз печени, HCC или связанная с печенью смерть.

Изобретение, кроме того, предоставляет способ прогнозирования ответа субъекта (например, прогнозирования изменений NAFLD, активности NASH и стадии фиброза печени) на конкретное лечение (субъект-респондер) на основе обнаружения дифференциального уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта, не отвечающего на лечение.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Сывороточный уровень hsa-miR-452-5p у пациентов, не подлежащих лечению (NTBT), и у пациентов, подлежащих лечению (TBT) GOLDEN-DIAG в соответствии с тремя различными определениями пациентов TBT: TBT1, TBT2 и TBT7. NTBT1 n=83, TBT1 n=187; NTBT2 n=161, TBT2 n=109, NTBT7 n=119, TBT7 n=151. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическая значимость была рассчитана с применением критерия Манаа-Уитни***, p-значение <0,001.

TBT1=балл для стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов ≥1, NAS≥4, F≥1

TBT2=балл для стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов ≥1, NAS≥4, F≥2

TBT7=балл для стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов ≥1, NAS≥4, F=1b, 1c, 2, 3 или 4

Фигура 2: Сывороточный уровень hsa-miR-452-5p у пациентов NTBT2 и TBT2

(слева) у пациентов с NAS<4 (n=56) и NAS≥4 (n=214) (в середине) и у пациентов с F<2(n=145) и F≥2 (n=125) (справа) когорты GOLDEN-DIAG. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фигура 3: Сывороточный уровень hsa-miR-452-5p у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева) у пациентов с NAS<4 (n=121) и NAS≥4 (n=129) (в середине) и у пациентов с F<2(n=190) и F≥2 (n=59) (справа) когорты OBESE. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фигура 4: Сывороточный уровень hsa-miR-452-5p у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева) у пациентов с NAS<4 (n=50) и NAS≥4 (n=212) (в середине) и у пациентов с F<2(n=108) и F≥2 (n=154) (справа) когорты RESOLVE-IT. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фигура 5: Корреляция между сывороточными уровнями hsa-miR-452-5p с NAS, стадией фиброза, индексом активности, баллом стеатоза, баллом баллонирования гепатоцитов, баллом лобулярного воспаления у пациентов когорты GOLDEN-DIAG при включении. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия ANOVA Крускала-Уоллиса с последующим применением критерия множественного сравнения Данна: *, p-значение <0,05; ** p-значение <0,005; ***, p-значение <0,001

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения предоставляют новый способ диагностики, мониторинга и классификации риска субъектов, страдающих или потенциально страдающих NAFLD, NASH и/или фиброзом печени.

Настоящее изобретение основано на очень точном анализе биопсий пациентов во время клинического испытания в целях сопоставления наличия или уровня циркулирующих биологических маркеров и классификации пациентов как подлежащих лечению или не подлежащих лечению. В частности, настоящее изобретение неограничивающим образом определяет три класса пациентов с NASH, подлежащих лечению. Этих пациентов классифицируют в отношении оценки характеристик NASH.

Представленные в настоящем описании экспериментальные данные, неожиданно, идентифицируют miR-452 в качестве циркулирующего биомаркера для NAFLD, NAFL, NASH и/или фиброза печени в двух больших независимых когортах пациентов, а именно, GOLDEN-DIAG (N=270 при включении; N=223 на 52 неделе) и когорте OBESE (N=253) с оцененными биопсиями печени и соответствующими образцами крови, плазмы и сыворотки. Результаты были подтверждены в третьей независимой когорте RESOLVE-IT (N=263).

Изобретение теперь будет представлено более подробно.

<u>Определения</u>

Согласно настоящему изобретению термины «NAFLD» или «неалкогольная жировая дистрофия печени» относятся к состоянию, при котором жир откладывается в печени (стеатоз печени), с признаками воспаления и фиброза или без них, в отсутствие чрезмерного потребления алкоголя.

Согласно изобретению, термин «уровень активности NAFLD» относится к прогрессированию NAFLD и определяются по повышению балла стеатоза, как определено в настоящем описании. Уровень активности NAFLD также относится к прогрессированию NAFLD в направлении NASH или фиброза и тяжести NASH.

Согласно настоящему изобретению, термин «NAFL», или «неалкогольная ожиревшая печень», относится к состоянию, при котором жир откладывается в печени (стеатоз печени) без признаков воспаления или фиброза, в отсутствие чрезмерного потребления алкоголя.

Согласно изобретению, термин «стеатоз» относится к процессу, описывающему аномальное удержание липидов или накопление жира в печени.

Согласно изобретению, термин «NASH» или «неалкогольный стеатогепатит» относится к состоянию NAFLD, характеризующемуся сопутствующим наличием стеатоза печени, баллонирования гепатоцитов и воспаления печени при гистологическом исследовании (то есть, NAS≥3, по меньшей мере, с 1 баллом по стеатозу, по меньшей мере, 1 баллом по лобулярному воспалению и, по меньшей мере, 1 баллом по баллонированию гепатоцитов) при отсутствии чрезмерного употребления алкоголя и после исключения других заболеваний печени, таких как вирусный гепатит (HCV, HBV).

Согласно изобретению, термины «уровень активности NASH» относятся к прогрессированию NASH и определяются по повышению балла NAS выше минимальных параметров для определения NASH, которые представляют собой S=1, LI=1 и HB=1. Уровень активности NASH также относится к прогрессированию NASH в направлении необратимого NASH и/или фиброза и тяжести NASH.

Согласно изобретению, термин «активный NASH» относится к NASH, характеризующемуся NAS≥4, по меньшей мере, 1 баллом по стеатозу, по меньшей мере, 1 баллом по лобулярному воспалению, и, по меньшей мере, 1 баллом по баллонированию гепатоцитов.

В соответствии с настоящим изобретением термин «гепатоцеллюлярное баллонирование» обычно определяют на уровне светового микроскопа на основе окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) как увеличение клеток в 1,5-2 раза от нормального диаметра гепатоцитов, с разреженной цитоплазмой. В более общем смысле термин относится к процессу гибели клеток гепатоцитов.

Согласно настоящему изобретению термин «лобулярное воспаление» относится к наличию очагов лобулярного воспаления (сгруппированных воспалительных клеток) при микроскопическом исследовании окрашенного гематоксилином и эозином (H&E) среза биопсии печени.

В соответствии с настоящим изобретением «балл активности NAFLD» или «NAS»

относится к сумме баллов стеатоза, гепатоцеллюлярного баллонирования, лобулярного воспаления следующим образом:

- S: балл по стеатозу: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66% и 3:>66%;

- LI: балл по лобулярному воспалению (очаги/поле x20): 0: нет; 1: <2; 2: 2-4 и 3:>4;

- HB: балл дегенерации вследствие баллонирования: 0: нет; 1: мало; 2: много клеток/заметное баллонирование.

Согласно настоящему изобретению «индекс активности» относится к сумме баллов гепатоцеллюлярного баллонирования и лобулярного воспаления.

Согласно настоящему изобретению термин «фиброз» или «фиброз печени» относится к наличию фиброзной соединительной ткани при микроскопическом исследовании окрашенной (H&E, окрашивание трихромом или пикросириусом красным) биопсии печени.

В контексте настоящего изобретения термин «стадия фиброза» обозначает локализацию и степень фиброза при гистологическом исследовании следующим образом:
Перисинусоидальный или перипортальный фиброз

Легкий перисинусоидальный фиброз (зона 3)

Умеренный перисинусоидальный фиброз (зона 3)

Портальный/перипортальный фиброз

Перисинусоидальный и портальный/перипортальный фиброз

Мостовидный фиброз

Цирроз

Альтернативно, стадия фиброза может быть определена следующим образом в контексте настоящего изобретения:

F=0: нет фиброза

F=1: минимальный фиброз

F=2: значительный фиброз

F=3: умеренный фиброз

F=4: тяжелый фиброз (то есть, цирроз).

Согласно настоящему изобретению «подлежащий лечению субъект» или «субъект TBT» представляет собой субъекта, у которого оценка активности заболевания (например, NAS или индекс активности) и/или стадия фиброза печени делают субъекта пригодным для лечения NAFLD, NAFL, NASH и/или фиброза печени (то есть, для NAFLD, NASH и/или фиброза печени). В противоположность этому «не подлежащий лечению субъект», или «субъект NTBT», является субъектом, у которого показатель активности заболевания (например, NAS или индекс активности) и/или стадия фиброза печени являются недостаточно высокими для того, чтобы сделать его пригодным для лечения NAFLD, NAFL, NASH и/или фиброза печени (то есть, для лечения NAFLD, NASH и/или фиброза печени). Следовательно, субъекта TBT также называют «получателем» или

«потенциальным получателем» лечения NAFLD, NAFL, NASH и/или фиброза печени (то есть, для лечения NAFLD, NASH и/или фиброза печени). В настоящем изобретении предпочтительными субъектами ТВТ являются:

i) субъекты с NASH,

ii) субъекты с активным NASH,

iii) субъекты со значительным, умеренным или тяжелым фиброзом печени,

iv) субъекты с NASH и фиброзом.

Определение охватывает различные баллы активности NASH и стадии фиброза, определяющие различные варианты изобретения.

Предпочтительные варианты изобретения детализируются следующим образом.

Первый вариант ТВТ (ТВТ2):

Субъект ТВТ2 определяется как субъект, имеющий следующие оценки, полученные при биопсии печени:

- S ≥ 1
- HB ≥ 1
- LI ≥ 1
- NAS (балл активности NAFLD) ≥ 4
- стадия фиброза ≥2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).

Таким образом, субъект с NTBT2 отличается от субъекта с ТВТ2 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза. Для ясности, субъектом NTBT2 может являться, например, субъект с NASH, имеющий NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и стадию фиброза 1 (такую как стадия фиброза 1a, 1b или 1c) или NAS, равный 3, и стадию фиброза ≥2 (например, стадия фиброза, равная 2, 3 или 4), или любую другую комбинация баллов, как определено выше.

Второй вариант ТВТ (ТВТ1):

Субъект ТВТ1 определяется как субъект, имеющий следующие оценки, полученные при биопсии печени:

- S ≥ 1
- HB ≥ 1
- LI ≥ 1
- NAS (балл активности NAFLD) ≥ 4
- стадия фиброза ≥1 (например, стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4).

Аналогично, субъект NTBT1 отличается от субъекта ТВТ1 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза. Для ясности, субъектом NTBT1 может являться, например, субъект с NASH, имеющий NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и стадию фиброза 0, или NAS, равный 3, и стадию фиброза ≥ 1 (например, стадия фиброза, равная 1a, 1b или 1c, 2, 3 или 4), или любую другую комбинацию баллов, как определено выше.

Третий вариант ТВТ (ТВТ7):

Субъект ТВТ7 определяется как субъект, демонстрирующий следующие оценки биопсии печени:

- S ≥ 1
- HB ≥ 1
- LI ≥ 1
- NAS (балл активности NAFLD) ≥ 4
- стадия фиброза=1b, 1c, 2, 3 или 4.

Таким образом, субъект NTBT7 отличается от субъекта ТВТ7 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза. Для ясности, субъектом NTBT7 может являться, например, субъект с NASH, имеющий NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и стадию фиброза, равную 0 или 1a, или NAS, равный 3, и стадию фиброза, равную 1b, 1c, 2, 3 или 4, или любую другую комбинацию баллов, как определено выше.

В конкретном варианте осуществления микроРНК miR-452, используемую в настоящем изобретении, выбирают из группы, состоящей из hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p, последовательности которых доступны в базе данных miRBase (http://mirbase.org) под кодами доступа miRBase MIMAT0001635 (идентификатор последовательности N1) и MIMAT0001636 (идентификатор последовательности N2), соответственно.

В другом варианте осуществления микроРНК miR-452, используемая в настоящем изобретении, представляет собой форму шпильки miR-452, также называемую HGNC:MIR452, последовательность которой доступна в базе данных miRBase (http://mirbase.org) под кодом доступа miRBase miRBase=MI0001733 (идентификатор последовательности N3).

идентификатор последовательности N 1:

AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA

идентификатор последовательности N 2:

CUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUG

идентификатор последовательности N 3:

GCUAAGCACUUACAACUGUUUGCAGAGGAAACUGAGACUUUGUAACUAUG UCUCAGUCUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUGCUUUGC

В конкретном варианте осуществления микроРНК miR-452, используемая в настоящем изобретении, представляет собой hsa-miR-452-5p.

Образцы и подготовка образцов

Согласно настоящему изобретению, термин «образец биологической жидкости» обозначает любой образец биологической жидкости, полученный от субъекта, такой как кровь и жидкости, полученные из крови (такие как плазма и сыворотка), лимфатическая жидкость, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча, слюна, слизистые, слизь и мокрота. В конкретном варианте осуществления биологическую жидкость выбирают из крови и жидкостей, полученных из крови (таких как плазма и сыворотка),

слюны, спинномозговой жидкости и мочи. В конкретном варианте осуществления образец биологической жидкости представляет собой кровь или полученную из крови жидкость (такую как плазма и сыворотка), слюну, спинномозговую жидкость или мочу. В еще одном конкретном варианте осуществления биологическая жидкость представляет собой кровь, плазму или сыворотку. Образец биологической жидкости может быть взят любым подходящим способом. Подходящими биологическими жидкостями могут являться бесклеточные жидкости. Такие бесклеточные биологические жидкости обычно получают путем обработки содержащей клетки биологической жидкости посредством, например, центрифугирования или фильтрации для удаления клеток. Как правило, бесклеточная биологическая жидкость не содержит интактных клеток, однако, некоторые жидкости могут содержать клеточные фрагменты или клеточный дебрис. Образец биологической жидкости может использоваться немедленно или может храниться для последующего использования. Любой подходящий способ хранения, известный в данной области техники, можно использовать для хранения образца биологической жидкости: например, образец может быть заморожен при температуре от -20 до -80°C.

Выделение и количественное определение микроРНК

Тотальная РНК, включая микроРНК, может быть выделена из образца различными методами экстракции, которые включают: фенол:хлороформную экстракцию с последующим осаждением спиртом (TRIzol), фенол:хлороформную экстракцию с последующей твердофазной экстракцией (на колонках; например, miRVana и miRNeasy) и твердофазное разделение с/без магнитными частицами аффинной смолы (Norgen total и Isolate II) или методы прямого лизиса. При применении на практике настоящего изобретения микроРНК экстрагировали с помощью набора для экстракции miRVana Paris для последующего анализа количественной ОТ-ПЦР(RTqPCR) или захватывали с помощью специальных зондов для дальнейшего анализа HTG Edge Sequence.

Затем микроРНК детектируют в клинических образцах с применением любой методики, доступной специалистам в данной области технкии, такой как методы на основе секвенирования, на основе амплификации или на основе гибридизации. Общие подходы к клиническому тестированию микроРНК включают секвенирование коротких РНК (Hafner et al, 2012; Vigneault et al, 2012), HTG Edge Whole Transcriptome, платформа профилирования микроРНК на основе секвенирования следующего поколения (Lizarraga et al, 2016; Satake и соавт., 2018), количественная ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией микроРНК (qRT-PCR) (Chen и соавт., 2005), микрочип микроРНК (Castoldi и соавт., 2007), мультиплексное обнаружение микроРНК с помощью пар зондов с цветовой кодировкой (экспрессионная система NanoString n Counter) (Geiss и соавт., 2008), капельная цифровая ПЦР (ddPCR) после обратной транскрипции (Miotto и соавт., 2014) и in situ гибридизация микроРНК (Nelson и соавт., 2006). Уровень miR-452 может быть определен с помощью общепринятых методологий, хорошо известных в данной области техники, таких как иммунные анализы (например, ELISA) или молекулярно-биологические анализы (количественная ОТ-ПЦР или секвенирование следующего

поколения) или биохимические анализы (колориметрические или другие анализы). В конкретном варианте осуществления способа по настоящему изобретению микроРНК детектируют с помощью анализов полных транскриптомов HTG Edge или секвенирования HTG Edge и количественной ОТ-ПЦР.

При практическом применении настоящего изобретения любой из вышеописанных способов может дополнительно включать в себя нормализацию уровня miR-452 в образце биологической жидкости от субъекта по уровню или микроРНК, уровень которой не изменяется у субъектов с NAFLD, NASH и/или фиброзом печени относительно здоровых пациентов. В целях сокращения потенциального источника технической изменчивости, перед экстракцией РНК в образец можно добавить добавочную или экзогенную синтетическую микроРНК с известной последовательностью и количеством, такую как miR-39 C. elegans. Добавочная или экзогенная синтетическая микроРНК может представлять собой микроРНК, которая не экспрессируется в образцах человека, например, cel-miR-38 Caenorhabditis elegans или ath-miR-159a Arabidopsis thaliana. Эти синтетические микроРНК могут быть добавлены после добавления лизирующего буфера в образцы крови перед экстракцией РНК и обеспечивают контроль процесса в отношении технической нормализации. Таким образом, эффективность экстракции РНК, синтеза комплементарной ДНК и ПЦР-амплификации можно контролировать с использованием этих экзогенных синтетических микроРНК.

Нормализатор микроРНК или малые некодирующие РНК-контроли для нормализации данных количественной ПЦР, представляющие собой эндогенные контроли, на которые воздействуют те же источники изменчивости, что и на гены-мишени, на всех этапах процесса эксперимента, могут использоваться для нормализации уровня целевой микроРНК, miR-452.

Предоставлен стандартный протокол для измерения miR-452 с помощью количественной ОТ-ПЦР. Кратко, измерения проводят для тотальной РНК, выделенной из образца биологической жидкости, такого как образец крови, плазмы или сыворотки, в частности, образца бесклеточный плазмы, не содержащий тромбоцитов, полученной с использованием цитрата. Соответствующий внутренний контроль (такой как микроРНК с известной последовательностью и количеством, например, miR-39 C. elegans) может быть добавлен к образцу перед экстракцией РНК. Значения Cq определяют с использованием количественной ОТ-ПЦР. Коммерческие наборы доступны для проведения таких анализов. Например, анализ Taqman miRNA RT-qPCR: набор для обратной транскрипции Taqman MicroRNA, анализ TaqMan MicroRNA 20X и TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) могут использоваться в соответствии с инструкциями производителя. Обратная транскрипция может быть выполнена с использованием легкодоступных систем ПЦР, таких как термоциклер GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), с соответствующими параметрами циклирования, такими как 16°C в течение 30 минут, затем 42°C в течение 30 минут и 85°C в течение 5 минут и последующей выдержкой при 4°C. Обратная транскрипция может быть реализована в мультиплексированном формате.

Затем проводят количественную ПЦР с применением системы количественной ПЦР, такой как система в реальном времени CFX96TM (C1000 TouchTM Thermal Cycler, BioRad). Предпочтительно, количественную ПЦР проводят с применением системы ПЦР-детекции в реальном времени CFX96 - C1000 - сертифицированной диагностики in vitro (IVD), Bio-Rad. Условия циклирования могут быть следующими: 95°C в течение 10 минут, затем 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с в общей сложности 50 циклов, а затем 30°C в течение 30 с. Режимом определения Cq может быть, например, режим регрессии в системе количественной ПЦР. В конкретном варианте осуществления значение Cq, определенное в соответствии со способом изобретения, представляет собой значение Cq, которое можно получить с использованием вышеуказанных конкретных параметров и материала. Значения Cq образцов могут быть исключены из анализа, если значения превышают максимальный Cq стандартной кривой каждой микроРНК. Стандартная кривая может быть использована для оценки эффективности реакции ПЦР. Последовательные разведения могут быть выполнены в восьми точках, начиная с наиболее концентрированного образца кДНК, чтобы гарантировать, что стандартная кривая охватывает все потенциальные концентрации матрицы, которые могут встретиться во время исследования. Стандартная кривая может быть построена путем построения логарифма начального количества матрицы относительно полученных значений Cq. Для получения абсолютных количественных данных синтетические микроРНК (например, производства Integrated DNA Technologies, 5'-фосфат, 3'OH, очищенная ВЭЖХ), разведенные, например, в 3,125 фмоль/мл и 5 мкл, могут быть использованы для обратной транскрипции одновременно с РНК, экстрагированной из образцов сыворотки. Затем продукт можно последовательно разводить и проводить ПЦР для всех образцов (стандартов и РНК, полученных из сыворотки). Стандартная кривая может быть построена однократно, двукратно или трехкратно и использована для преобразования данных Cq в копии/мкл жидкости.

Альтернативно, для оценки уровня miR-452 можно использовать метод дельта Ct (порог цикла) или дельта Cq (количественное определение цикла). Дельта Ct или дельта Cq соответствует разности между Ct или Cq мишени в тестируемом образце пациента и Ct или Cq мишени в контрольном образце (то есть, здоровые субъекты, контрольный образец).

Альтернативно, уровень miR-452 может быть определен с помощью количественной ОТ-ПЦР с использованием реакции обратной транскрипции (RT) шпилек вместе с TaqMan qPCR или с ОТ с поли(A)-хвостом вместе с детектированием SYBR Green и праймеров закрытой нуклеиновой кислоты (LNA).

Способы по изобретению

Во всех приведенных ниже аспектах, вариантах осуществления и вариантах предпочтительный вариант осуществления относится к определению уровня hsa-miR-452 в образце крови, сыворотки или плазмы. Предпочтительный вариант этого аспекта относится к определению уровня hsa-miR-452-5p.

Настоящее изобретение относится к способу диагностики или обнаружения NAFLD у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения потенциальной NAFLD у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления NAFLD или потенциальную NAFLD обнаруживают на основании повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня, измеренного в образце от субъекта без стеатоза печени. В дополнительном конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение NAFLD или потенциальной NAFLD основана на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости по сравнению с уровнями, обычно измеряемыми у здоровых людей без стеатоза печени. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап подтверждения того, что субъект страдает NAFLD. Такое подтверждение может быть осуществлено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, таким как взятие биопсии печени или методики ультразвукового исследования или визуализации (такие как ультразвуковое исследование, измерение параметра контролируемого затухания с помощью транзиентной эластографии (Fibroscan), магнитно-резонансная визуализация (MRI), измерение доли жира, взвешенной по протонной плотности, с помощью магнитно-резонансной визуализации (MRI-DPFF), и измерение доли жира, взвешенной по протонной плотности, с помощью магнитно-резонансной спектроскопии (MRS-DPFF)). Альтернативно, стеатоз печени могут оценивать по нескольким показателям и баллам, включая, без ограничения:

- жировой индекс печени (FLI), который включает ИМТ, окружность талии и уровни триглицеридов и гамма-глутарилтрансферазы (GGT) в сыворотке,

- индекс стеатоза печени (HIS), который включает отношение аспартатаминотрансферазы (AST) к аланинаминотрансферазе (ALT) в сыворотке, ИМТ, пол и наличие сахарного диабета,

- балл жировой ткани NAFLD (метаболический синдром, диабет 2 типа, сывороточный инсулин натощак и AST, соотношение AST:ALT),

- стеатотест (альфа 2 макроглобулин (A2M), гаптоглобин, аполипопротеин A1, общий билирубин, GGT, уровень глюкозы в крови натощак и поправка на возраст, пол, вес и рост), и

- балл по шкале NAFLD (ALT, холестерин, триглицериды, гликированный гемоглобин A1c (HbA1 и количество лейкоцитов) и данные о сопутствующей патологии (гипертония)).

В конкретном варианте осуществления по генетическим и геномным маркерам могут оценивать риск и тяжесть NAFLD (однонуклеотидные полиморфизмы (SNP):rs738409 (SNP в PNPLA3), бесклеточные некодирующие РНК, miR-122, составная панель полученных из сыворотки омиксных данных).

Настоящее изобретение относится к способу диагностики или обнаружения NAFL у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения потенциального NAFL у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости организма указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления NAFL или потенциальную NAFL обнаруживают на основании повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня, измеренного в образце от субъекта без стеатоза печени. В дополнительном конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение NAFL или потенциального NAFL основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно уровней, обычно измеряемых у здоровых субъектов без стеатоза печени. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап подтверждения того, что субъект страдает NAFL. Такое подтверждение может быть осуществлено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, таким как взятие биопсии печени или методики ультразвукового исследования или визуализации (такие как ультразвуковое исследование, измерение параметра контролируемого затухания с помощью транзиентной эластографии (Fibroscan), магнитно-резонансная визуализация (MRI), измерение доли жира, взвешенной по протонной плотности, с помощью магнитно-резонансной визуализации (MRI-DPFF), и измерение доли жира, взвешенной по протонной плотности, с помощью магнитно-резонансной спектроскопии (MRS-DPFF)). Альтернативно, стеатоз печени могут оценивать по нескольким показателям и баллам, включая, без ограничения:

- жировой индекс печени (FLI), который включает ИМТ, окружность талии и уровни триглицеридов и гамма-глутарилтрансферазы (GGT) в сыворотке,

- индекс стеатоза печени (HIS), который включает отношение аспартатаминотрансферазы (AST) к аланинаминотрансферазе (ALT) в сыворотке, ИМТ, пол и наличие сахарного диабета,

- балл жировой ткани NAFLD (метаболический синдром, диабет 2 типа, сывороточный инсулин натощак и AST, соотношение AST:ALT),

- стеатотест (альфа 2 макроглобулин (A2M), гаптоглобин, аполипопротеин A1, общий билирубин, GGT, уровень глюкозы в крови натощак и поправка на возраст, пол, вес и рост), и

- балл по шкале NAFLD (ALT, холестерин, триглицериды, гликированный гемоглобин A1c (HbA1 и количество лейкоцитов) и данные о сопутствующей патологии (гипертония)).

В конкретном варианте осуществления по генетическим и геномным маркерам могут оценивать риск и тяжесть NAFLD (однонуклеотидные полиморфизмы (SNP):rs738409 (SNP в PNPLA3), бесклеточные некодирующие РНК, miR-122, составная

панель полученных из сыворотки омиксных данных).

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения потенциального NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение NASH или потенциального NASH основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня miR-452, измеренного у здорового субъекта, у субъекта с NAS<3 или у субъекта по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0. В конкретном варианте осуществления контрольный образец берут у субъекта с NAS<3, по меньшей мере, с одним компонентом NAS, оцененным как 0, такого как субъект со следующими баллами: S=1, LI=1 и HB=0; S=1, LI=0 и HB=1; S=0, LI=1 и HB=1. В конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение NASH или потенциального NASH основаны на обнаружении повышенного уровня hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p в крови, сыворотке или плазме крови относительно контрольных уровней, измеренных у субъектов без NASH, включая здоровых субъектов, субъектов с NAS<3 или субъектов по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап подтверждения того, что субъект страдает NASH. Такое подтверждение может быть выполнено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, таким как проведение биопсии печени или визуализация биомаркеров, измеренных посредством методик визуализации, таких как методики на основе MRI, MRI с использованием гадоксетической кислоты, MRI с суперпарамагнитным оксидом железа, P-MRS и MRE. Альтернативно, несколько индексов и баллов внутриклеточный уровень АТФ с использованием ^{32}P-MRS и MRE. Альтернативно, несколько индексов и баллов могут оценивать потенциальные биомаркеры NASH, включая, без ограничений:

- маркеры апоптоза (фрагмент CK18, общий цитокератин, сывороточный уровень апоптоз-опосредующего поверхностного антигена FAS),

- маркеры воспаления (С-реактивный белок (CRP), TNF, IL-8, хемокиновый лиганд CXC 10 (CXCL10)),

- продукты окисления липидов (11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (HETE), 9-гидроксидекадиеновая кислота (HODE), 13-HODE, 13-оксооктадекадиеновая кислота (ODE), LA-13-HODE (балл OxNASH), 11,12-дигидрокси)-эйкозатриеновая кислота (diHETrE)),

- адипоцитокины и гормоны (адипонектин, лептин, резистин, висфатин, связывающий ретинол белок (RBP) 4, связывающий жирные кислоты (FABP) белок 4, фактор роста фибробластов (FGF21)),

- лизосомальные ферменты (катепсин D) и

- комбинированные панели (тест NASH, диагностическая панель NASH).

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения активного NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или обнаружения потенциального активного NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение активного NASH или потенциального активного NASH основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в биологической жидкости от субъекта по сравнению с контрольным уровнем miR-452, измеренным у здорового субъекта, у субъекта с NAS<4 или у субъекта по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0. В конкретном варианте осуществления контрольный образец берут от субъекта с NAS=3, с S=1, LI=1 и HB=1. В конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение активного NASH или потенциального активного NASH основаны на обнаружении повышенного уровня экспрессии hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p в образцах крови, сыворотки или плазмы субъекта по сравнению с контрольными уровнями, измеренными у здоровых субъектов, субъектов с NAS<4 или субъектов по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап подтверждения того, что субъект страдает активным NASH. Такое подтверждение может быть выполнено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, таким как взятие биопсии печени или методики визуализации, такие как методики на основе MRI, MRI с суперпарамагнитным оксидом железа, мультипараметрическая MRI, MRS и MRE. Альтернативно, несколько индексов и баллов могут оценивать потенциальные биомаркеры NASH, включая, без ограничений:

- маркеры апоптоза (фрагмент CK18, общий цитокератин, сывороточный уровень апоптоз-опосредующего поверхностного антигена FAS),

- маркеры воспаления (С-реактивный белок (CRP), TNF, IL-8, хемокиновый лиганд CXC 10 (CXCL10)),

- продукты окисления липидов (11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (HETE), 9-гидроксидекадиеновая кислота (HODE), 13-HODE, 13-оксооктадекадиеновая кислота (ODE), LA-13-HODE (балл OxNASH), 11,12-дигидрокси)-эйкозатриеновая кислота (diHETrE)),

- адипоцитокины и гормоны (адипонектин, лептин, резистин, висфатин, связывающий белок ретинол (RBP) 4, связывающий жирные кислоты белок (FABP) 4, фактор роста фибробластов (FGF21)),

- лизосомальные ферменты (катепсин D) и

- комбинированные панели (тест NASH, диагностическая панель NASH).

Такое подтверждение может быть выполнено путем измерения риска NAFLD (прогрессирование к NASH или фиброзу) и маркеров тяжести, таких как генетические и

геномные маркеры, такие как SNP (rs738409 в PNPLA3), бесклеточные некодирующие РНК (miR-122, miR-1290, miR-192 и miR-7b), составная панель полученных из сыворотки омиксных данных, таких как rs738409, и протеомных данных, включая ACY1, SHBG, CTSZ, MET, GNS, LGALS3BP, CHL1 и SERPINC1, SNP в нескольких локусах (PNPLA3, SOD2, KLF6 и LPIN1), miR-122, составная панель, включающая miR-122, miR-192, miR-21, ALT, CK18 Asp396, бесклеточную ДНК, такую как циркулирующий метилированный PPARG.

Настоящее изобретение также относится к способу характеристики возникновения или степени лобулярного воспаления печени у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу характеристики возникновения или степени баллонирования гепатоцитов у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу характеристики возникновения или степени стеатоза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или выявления фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу диагностики или выявления потенциального фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления фиброз является, по меньшей мере, значительным фиброзом (то есть $F \geq 2$). В варианте этого варианта осуществления диагностика или обнаружение фиброза печени или потенциального фиброза печени основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня miR-452, измеренного у субъекта с отсутствием фиброза или минимальным фиброзом, в частности, с минимальным фиброзом. В следующем конкретном варианте осуществления фиброз представляет собой, по меньшей мере, умеренный фиброз печени или цирроз (то есть, $F \geq 3$). В варианте этого варианта осуществления диагностика или обнаружение фиброза печени или потенциального фиброза печени основаны на обнаружении повышенного уровня miR-452 в биологической жидкости от субъекта по сравнению с контрольным уровнем miR-452, измеренным у субъекта без фиброза, с минимальным фиброзом или с тяжелым фиброзом, в частности, с тяжелым фиброзом. В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя этап подтверждения того, что субъект страдает фиброзом печени, или подтверждения стадии фиброза печени. Такое подтверждение может быть выполнено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, например, путем взятия биопсии печени или посредством биомаркеров визуализации, включая, без ограничения:

- FibroScan (транзиентная эластография),

- точечная поперечно-волновая эластография pSWE, импульс силы акустического излучения (ARFI)

- 2D 3D сдвиговолновая эластография 2D-3D SWE,

- магнитно-резонансная эластография MRE,

- многопараметрическая MRI.

Альтернативно, несколько неинвазивных тестов фиброза и цирроза печени:

- соотношение AST:ALT и индекс отношения AST:тромбоциты (APRI),

- индекс фиброза-4 (FIB-4), который включает возраст, AST, ALT и количество тромбоцитов

- балл фиброза NAFLD (возраст, ИМТ, нарушение уровня глюкозы натощак и/или диабет, AST, ALT, количество тромбоцитов и альбумин),

- ядро BARD (AST, ALT, ИМТ и диабет).

В другом варианте осуществления конкретные маркеры фиброза печени и панель могут оценивать фиброз печени:

- специфичные маркеры фиброза: гиалуроновая кислота, N-концевой пропептид коллагена типа III (PIIINP), специфичный конкурентный иммуноферментный анализ нео-эпитопов для PIIINP (Pro-C3), тканевый ингибитор металлопротеиназ (TIMP-1), ламинин.

- Специфичные для фиброза панели: улучшенная панель для фиброза печени (ELF), которая включает PIIINP, гиалуроновую кислоту и TIMP-1; Fibrotest (гамма-глутамилтрансфераза (GGT), общий билирубин, альфа-2-макроглобулин (A2M), аполипопротеин A1 и гаптоглобин; FibroMeter NAFLD (масса тела, индекс протромбина, ALT, AST, ферритин и глюкоза натощак).

Настоящее изобретение также относится к способу определения стадии фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

В конкретном варианте осуществления стадия F=4 может быть определена, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза F≤4, например, при F=0, F=1, F=2 или F=3. В конкретном варианте контрольный образец берут от субъекта с F=3.

В конкретном варианте осуществления стадия F=3 может быть определена, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза F≤3, например, с F=0, F=1 или F=2. В конкретном варианте контрольный образец берут от субъекта с F=2.

В конкретном варианте осуществления стадия F=2 может быть определена, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза F≤2, например, с F=0 или F=1. В конкретном варианте контрольный образец берут от субъекта с F=1.

В конкретном варианте осуществления стадия F=1 может быть определена, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем

уровень miR-452 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза F≤1, например, с F=0.

В конкретном варианте осуществления способ предназначен для диагностики и выявления значительного или тяжелого фиброза (F≥2) и прогрессирующего фиброза печени (F≥3) у субъекта с NAFLD или NASH на основе обнаружения повышенного уровня экспрессии hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p, в образцах крови, сыворотки или плазмы крови субъекта по сравнению с контрольными уровнями, измеренными у пациентов без фиброза и/или с минимальным фиброзом (F=0-1).

В конкретном варианте осуществления способ определения стадии фиброза печени дополнительно включает в себя этап подтверждения стадии фиброза печени у субъекта. Такое подтверждение может быть осуществлено в соответствии с любым способом, известным специалистам в данной области техники, например, путем взятия биопсии печени или с помощью других средств, таких как биомаркеры для визуализации, перечисленные выше для диагностики фиброза.

Поскольку фиброз печени является распространенным следствием большинства хронических заболеваний печени, настоящее изобретение также относится к диагностике и выявлению значительного или прогрессирующего фиброза печени, вызванного другими фиброзными заболеваниями печени, такими как вирусный гепатит (HBV, HCV, …), алкогольный стеатогепатит, заболевания желчевыводящих путей (первичный желчный холангит, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, альфа-1-антитрипсиновый дефицит).

Настоящее изобретение также относится к способу классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NAFLD, NASH и/или фиброза печени, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NAFLD. В другом конкретном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NASH. В дополнительном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциального потенциально получающего или не получающего лечение фиброза печени.

Настоящее изобретение также относится к способу классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NAFL, включающему в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NAFL. В другом конкретном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциально получающего или не получающего лечение NAFL. В дополнительном варианте осуществления способ предназначен для классификации субъекта в качестве потенциального потенциально получающего или не получающего

лечение фиброза печени.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу классификации субъекта в качестве потенциально получающего (TBT) или не получающего (NTBT) лечение NASH и/или фиброза, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT2, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце субъекта NTBT2. В конкретном варианте субъектом NTBT2 является субъект с NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и F=1 (например, стадия фиброза 1a, 1b или 1c).

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT1, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце субъекта NTBT1. В конкретном варианте субъектом NTBT1 является субъект с NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и F=0.

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT7, если уровень miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-452 в контрольном образце субъекта NTBT7. В конкретном варианте субъектом NTBT7 является субъект с NAS=4, S≥1, LI≥1, HB≥1 и F=1a.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению предназначен для классификации субъекта как субъекта TBT2.

Другие варианты изобретения относятся к способу классификации пациентов как потенциально получающих (TBT) или не получающих (NTBT) лечение NASH и/или фиброза на основании обнаружения повышенного уровня экспрессии hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p, в крови, сыворотке или плазме по сравнению с контрольными уровнями hsa-miR-452, измеренными у пациентов NTBT.

Такая классификация может также служить основой для определения того, должен ли субъект пройти, прежде чем будет принято решение о лечении, дальнейшие исследования печени, такие как современные исследования печени, такие как ультразвуковые исследование, эластография, методики визуализации, включая MRI, или биопсию печени.

Определение TBT, или получающего лечение пациента, в отличие от NTBT, или не получающего лечение пациента, может варьироваться в зависимости от соотношения эффективности лекарственного препарата и безопасности лекарственного препарата при различных значениях активности заболевания (NAS или индекс активности) и различных значениях стадии фиброза, как указано выше.

Настоящее изобретение также относится к способу определения активности NAFLD или NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу прогнозирования риска развития активности NAFLD или NASH у субъекта при отсутствии лечения, включающему в себя

определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу определения стадии фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу прогнозирования риска развития фиброза до цирроза печени и клинических исходов у пациента при отсутствии лечения, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного пациента. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для прогнозирования риска развития фиброза до цирроза и клинических исходов для печени при отсутствии лечения.

Изобретение также относится к способу мониторинга развития (то есть, прогрессирования или регрессирования) активности NAFLD или NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу мониторинга развития (то есть, прогрессирования или регрессирования) фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу предсказания ответа пациента на конкретное лечение NAFLD, NASH и/или фиброза печени у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу предсказания ответа пациента на конкретное лечение NAFL у субъекта, включающему в себя определение уровня hsa-miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Таким образом, изобретение относится к способу диагностики и выявления NAFLD у субъекта, основанному на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно уровней, обычно измеряемых у здоровых субъектов без стеатоза печени.

Таким образом, изобретение относится к способу диагностики и выявления NAFL у субъекта, основанному на обнаружении повышенного уровня miR-452 в образце биологической жидкости относительно уровней, обычно измеряемых у здоровых субъектов без стеатоза печени, без баллонирования печени и без лобулярного воспаления.

Согласно первому варианту, изобретение относится к способу диагностики и обнаружения NASH у субъекта, основанному на обнаружении повышенного уровня экспрессии hsa-miR-452, в частности hsa-miR-452-5p и hsa -miR-452-3p, в крови, сыворотке или плазме крови относительно контрольных уровней, измеренных у субъектов без NASH, включая здоровых субъектов, субъектов с NAS<3 или субъектов по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0.

Согласно второму варианту изобретение относится к способу диагностики и обнаружения активного NASH у субъекта, основанному на обнаружении повышенного

уровня экспрессии hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p, в образцах крови, сыворотки или плазмы субъекта по сравнению с контрольными уровнями, измеренными у здоровых субъектов, субъектов с NAS<4 или субъектов по меньшей мере с одним компонентом NAS, оцененным как 0.

Согласно еще одному варианту, предложен способ для характеристики наличия и степени стеатоза у субъекта, основанный на обнаружении уровня hsa-miR-452 и, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p, в образце крови, сыворотки или плазмы субъекта.

Согласно еще одному варианту предложен способ определения наличия и степени гепатоцеллюлярного баллонирования у субъекта, основанный на обнаружении уровня hsa-miR-452 и, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p в образце крови, сыворотки или плазмы субъекта.

Согласно еще одному варианту изобретение относится к способу характеристики возникновения и степени лобулярного воспаления у субъекта, основанному на определении уровня hsa-miR-452 и, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p в образце крови, сыворотки или плазмы субъекта.

При практическом применении настоящего изобретения пороговые концентрации miR-452 могут быть рассчитаны для облегчения принятия решения лицом, реализующим способы по настоящему изобретению. Используемое в настоящем описании выражение «пороговая концентрация» относится к концентрации miR-452, выше которой делается статистическое предсказание симптома или заболевания и ниже которого делается статистическое предсказание отсутствия заболевания или симптома. Такие пороговые концентрации могут быть определены следующим образом для различных сценариев.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта с NAFLD (или потенциальной NAFLD) или как здорового субъекта без NAFLD, S=0, может быть определена посредством:

i) измерения концентрации miR-452 в образцах биологической жидкости из контрольных когорт субъектов, включая субъектов с NAFLD и здоровых субъектов без NAFLD,

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации.

В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения NAFLD и здоровых субъектов в контрольных когортах.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта с NAFL (или потенциальной NAFL) или как субъекта без NAFL, S=0, может быть определена посредством:

i) измерения концентраций miR-452 в образцах биологической жидкости контрольных когорт субъектов, включающих как субъектов с NAFL, так и субъектов без NAFL,

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации.

В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения субъектов с NAFL (или потенциальной NAFL) и субъектов здоровых субъектов в контрольных когортах.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта с NASH (или потенциальным NASH) или как субъекта без NASH может быть определена посредством:

i) измерения концентраций miR-452 в образцах биологической жидкости контрольных когорт субъектов, включающих как субъектов с NASH, так и субъектов без NASH,

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации.

В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения субъектов с NASH (или потенциальным NASH) и субъектов без NASH в контрольных когортах.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта с активным NASH (или потенциальным активным NASH) или как субъекта без активного NASH может быть определена посредством:

i) измерения концентраций miR-452 в образцах биологической жидкости контрольных когорт субъектов, включая субъектов с активным NASH и субъектов без активного NASH,

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации.

В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения пациентов с активным NASH (или потенциальным активным NASH) и субъектов без активного NASH в контрольных когортах.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта со значительным фиброзом печени ($F \geq 2$) (или потенциальным значительным фиброзом печени) или как субъекта без фиброза или с минимальным фиброзом может быть определена посредством:

i) измерения концентраций miR-452 в образцах биологической жидкости контрольных когорт пациентов, включающих как пациентов со значительным или тяжелым фиброзом печени ($F \geq 2$) или прогрессирующим фиброзом печени ($F \geq 3$), так и субъектов без фиброза или с минимальным фиброзом ($F=0-1$),

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации. В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного

обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения субъектов со значительным фиброзом печени (F≥2) или тяжелым фиброзом печени (F≥3) и субъектов с отсутствием фиброза или минимальным фиброзом (F=0-1) в контрольных когортах.

Пороговая концентрация для классификации субъекта как субъекта TBT или субъекта NTBT может быть определена посредством:

i) измерения концентраций miR-452 в образцах биологической жидкости контрольных когорт субъектов, включающих как субъектов TBT, так и субъектов NTBT,

ii) применения специального статистического анализа к контрольному множеству данных с целью определения оптимальной пороговой концентрации. В частности, современный статистический метод ROC (соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов) можно применять для расчета оптимальной пороговой концентрации для различения субъектов TBT и NTBT в контрольных когортах.

Представленные в настоящем описании данные показывают, что miR-452 является циркулирующим диагностическим биомаркером для неинвазивной классификации гистологических очагов (стеатоз, лобулярное воспаление, баллонирование гепатоцитов), оценки уровня активности NAFLD, уровня активности NASH и оценки тяжести фиброза печени у субъекта.

Согласно другому варианту настоящего изобретения, предложен способ прогнозирования риска развития активности NAFLD или NASH у субъекта в отсутствие лечения на основе уровня miR-452 в образце биологической жидкости субъекта.

Другой вариант изобретения относится к способу прогнозирования риска развития фиброза до цирроза и исходов для печени у пациента с NAFLD или NASH на основе уровня miR-452, измеренного в образце биологической жидкости субъекта. Настоящее изобретение также предназначено для прогнозирования риска развития фиброза у пациентов, страдающих другими фиброзными заболеваниями печени, такими как: вирусный гепатит (HBV, HCV, …), алкогольный стеатогепатит, заболевания желчевыводящих путей (первичный желчный холангит, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, альфа-1-антитрипсиновый дефицит).

Авторы настоящего изобретения также показали наличие корреляции между изменениями уровней циркулирующего miR-452 и повышением гистологических показателей, в частности, повышением индекса активности, NAS и стадии фиброза. Эти анализы поддерживают применение miR-452 в способе мониторинга гистологического развития у субъекта, независимо от того, подвергается ли он или нет лечению лекарственным препаратом против NAFLD, лекарственным препаратом против NASH или противофиброзным лекарственным препаратом. Кроме того, способ по изобретению может быть применен для оценки активности лекарственного препарата против NAFLD, против NASH и/или против фиброза в интервенционных испытаниях, предполагающих изменения уровня miR-452 в сыворотке в качестве суррогатов гистологических эволюций.

Таким образом, другой вариант осуществления настоящего изобретения относится

к способу для мониторинга эволюции (то есть, прогрессирования или регрессирования) активности NAFLD или NASH на основе эволюции уровня MIR-452 в образцах биологической жидкости, собранных в два или более различных моментов времени от одного и того же субъекта.

Таким образом, другой вариант изобретения относится к способу мониторинга эволюции (то есть прогрессирования или регрессирования) стадии фиброза печени, основанному на эволюции уровня miR-452 в образцах биологической жидкости, взятых два или более раз отдельно от одного и того же субъекта.

Настоящее изобретение также относится к определению стадии развития фиброза при других фиброзных заболеваниях печени, таких как: вирусный гепатит (HBV, HCV, …), алкогольный стеатогепатит, заболевания желчевыводящих путей (первичный желчный холангит, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, альфа-1-антитрипсиновый дефицит).

Другой вариант изобретения относится к способу предсказания реакции субъекта (прогноз изменения активности NAFLD, активности NASH и стадии фиброза печени) на конкретное лечение (субъект-респондер) на основе обнаружения уровня дифференциальной экспрессии miR-452 в образце биологической жидкости субъекта по сравнению с контрольными уровнями, измеренными у субъектов, не отвечающих на терапию.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предоставлены способы для:

- характеризации наличия NAFLD у субъекта,
- характеризации наличия NAFL у субъекта,
- характеризации наличия NASH у субъекта,
- характеризации наличия фиброза печени у субъекта,
- характеризации наличия гепатоцеллюлярного баллонирования у субъекта,
- характеризации наличия лобулярного воспаления у субъекта, или
- характеризации наличия стеатоза печени у субъекта.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением предоставлены способы для:

- диагностирования у субъекта NAFLD и/или более тяжелой NAFLD,
- диагностирования у субъекта NAFL и/или более тяжелой NAFL,
- диагностирования у субъекта NASH и/или более тяжелого NASH,
- диагностирования у субъекта наличия фиброза печени и/или более поздней стадии фиброза печени,
- диагностирования у субъекта гепатоцеллюлярного баллонирования и/или более высокого балла по гепатоцеллюлярному баллонированию,
- диагностирования у субъекта лобулярного воспаления и/или более высокого балла по лобулярному воспалению, или
- диагностирования у субъекта наличия стеатоза печени и/или более высокого балла по стеатозу печени.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

- определить активность NAFLD или NASH у субъекта,

- определить стадию NAFL у субъекта,

- определить стадию фиброза у субъекта,

- определить степень тяжести NASH у субъекта, или

- определить прогрессирование или регрессирование патологии у пациента с NASH.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение NAFLD,

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение для NASH,

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение фиброза печени,

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение гепатоцеллюлярного баллонирования,

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение лобулярного воспаления, или

- классифицировать субъекта как получающего или не получающего лечение стеатоза печени.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного препарата для лечения заболевания NAFLD,

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного препарата для лечения NAFL,

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного препарата для лечения заболевания NASH,

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введения лекарственного препарата для лечения заболевания фиброза,

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного средства для лечения заболевания гепатоцеллюлярного баллонирования, или

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного средства для лечения заболевания лобулярного воспаления,

- оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении лекарственного средства для лечения стеатоза печени.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

- определить прогрессирование или регрессирования патологии у пациента с NAFLD после введения медикаментозного лечения,

- определить прогрессирование или регрессирования патологии у пациента с NAFL

после введения медикаментозного лечения,

- определить прогрессирование или регрессирование патологии у пациента с NASH после введения медикаментозного лечения,

- определить прогрессирование или регрессирование патологии у пациента, страдающего фиброзом, после введения медикаментозного лечения,

- определить прогрессирование или регрессирование патологии у пациента, страдающего заболеванием гепатоцеллюлярного баллонирования, после введения медикаментозного лечения, или

- определить прогрессирование или регрессирование патологии у пациента, страдающего заболеванием лобулярного воспаления, после введения медикаментозного лечения.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он потенциально респондером или не является респондером на конкретное медикаментозное лечение для лечения NAFLD,

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он потенциально респондером или не является респондером на конкретное медикаментозное лечение для лечения NAFL,

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он (потенциально) респондером или (потенциально) не является респондером на медикаментозное лечение для лечения заболевания NASH,

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он (потенциально) респондером или (потенциально) не является респондером на медикаментозное лечение для лечения фиброза печени,

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он (потенциально) респондером или (потенциально) не является респондером на медикаментозное лечение для лечения гепатоцеллюлярного заболевания, или

- предсказать, будет ли пациент отвечать или нет, то есть, является ли он (потенциально) респондером или (потенциально) не является респондером на медикаментозное лечение заболевания лобулярного воспаления.

В некоторых вариантах осуществления способы определения того, имеет ли субъект NAFLD или NASH, или активный NASH, или фиброз печени (такой как значительный фиброз печени), или лобулярное воспаление, или баллонирование гепатоцитов, или определения, является ли субъект получателем лекарственных препаратов (ТВТ) или потенциальным респондером на конкретный лекарственный препарат, включает в себя забор образца биологической жидкости от субъекта, у которого подозревают наличие оцениваемого состояния, и определение уровня miR-452; при этом уровень, более высокий, чем контрольный уровень miR-452, указывает на наличие оцениваемого состояния, или диагноз субъекта, как имеющего NAFLD или NASH, или активный NASH или фиброз печени (такой как значительный фиброз печени), или

лобулярное воспаление, или баллонирование гепатоцитов, или на то, что субъект является потенциальным получателем лекарственных препаратов (ТВТ) или респондером.

В конкретных вариантах осуществления субъект является субъектом с риском развития NALFD, NASH, активного NASH или фиброза печени, или субъектом с риском развития NAFLD, NASH, активного NASH или фиброза печени в будущем, таким как субъект, имеющий ожирение, диабет, страдающий метаболическим синдромом и/или имеющий повышенные уровни ферментов печени и/или имеющий другие признаки дисфункции печени. Субъект также может являться субъектом с ранее идентифицированными NAFLD, NASH или активным NASH или фиброзом печени, при этом способ по изобретению позволяет определить активность заболевания и стадию фиброза и оценить риски развития заболевания в направлении цирроза, цирротических осложнений, гепатокарциномы, трансплантации печени, сердечно-сосудистых заболеваний или смерти, связанной с печенью.

В конкретных вариантах осуществления субъект страдает NASH, при этом способ по изобретению позволяет определить эффективность лекарственного препарата для лечения заболевания NASH, классифицировать субъекта как респондера/не-респондера на лечение NASH, или позволяет осуществлять мониторинг эволюции состояния NASH у субъекта.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения для диагностики NAFLD, NASH или фиброза печени и/или для определения активности заболевания, стадии фиброза у субъекта и/или для оценки эффективности медикаментозного лечения, и/или для определения эволюции (прогрессирования или регрессирования) патологии у субъекта с NAFLD, с NASH или фиброзом печени и/или для классификации субъекта в качестве потенциального респондера не-респондера на медикаментозное лечение, и/или для предсказания исхода заболевания для субъекта измерение уровня miR-452 может быть введено в математические модели (алгоритмы) для комбинирования с другими переменными, такими как пол, возраст, индекс массы тела, вес, состояние здоровья, артериальное давление или другие маркеры биологических жидкостей, такие как циркулирующие маркеры крови, сыворотки или плазмы, в частности те, которые указаны в приведенной ниже таблице.

Функция гепатоцитов	Жировая ткань	Метаболизм	Окислительный стресс/апоптоз	Фиброз	Воспаление

ALT AST ALP GGT Гаптоглобин Альбумин Билирубин Количество тромбоцитов	Адипонектин Лептин резистин	Глюкоза плазмы натощак Инсулин натощак Индекс HOMA Триглицериды Холестерин ЛПВП VLCL-C Аполипопротеины (ApoA1, ApoB, ApoCIII)	Малоновый диальдегид TBARS Ox LDL CK18-M30 CK18-M65 ферритин YKL-40 (CHI3L1)	Фибронектин Гиалуроновая кислота Коллаген типа IV PIIINP TIMP-1	TNFa IL1b, IL6, IL8, IFNg, TGFb hs-CRP MCP1 sCD14

Согласно другому варианту осуществления, способы по настоящему изобретению включают в себя определение уровня других биомаркеров в дополнение к miR-452.

В конкретном варианте осуществления такие биомаркеры выбирают из группы, состоящей из альфа-2-макроглобулина (A2M), гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак или уровня фруктозамина, N-концевого пропептида коллагена типа III (PIIINP) и YKL-40.

В более конкретном варианте осуществления таким биомаркером является YKL-40.

В другом варианте осуществления такие биомаркеры представляют собой маркеры NAFLD, NASH или фиброза печени, такие как степень стеатоза, некровоспаления и фиброза, оцененные с помощью магнитно-резонансной визуализации (MRI), магнитно-резонансной эластографии (MRE), магнитно-резонансной спектроскопии (MRS), измерения контролируемого параметра затухания (CAP) и жесткости печени методом транзиентной эластографии (TE), ультразвукового исследования (USG), FibroScan, точечной поперечно-волновой эластографии (pSWE), 2D эластографии со сдвиговыми волнами (2D-SWE), однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), бесклеточных ДНК, бесклеточной некодирующей РНК и полиморфизмов генов (такие как PNPLA3 и TM6SF2).

В конкретном варианте осуществления такие биомаркеры представляют собой маркеры NAFLD, такие как маркеры, связанные с индексом жира в печени, маркеры, связанные с индексом стеатоза печени, маркеры, связанные с баллом жира в печени

NAFLD, параметры SteatoTest, параметры балла по шкале NAFLD, циркулирующие триглицериды, индекс массы тела (BMI); биомаркеры визуализации, такие как степень рассеяния луча на ткани (USG), степень ослабления ультразвука печеночным жиром (CAP), доля жира, взвешенная по протонной плотности (MRI-PDFF), содержание триглицеридов в печени, доля жира, оцененная по сигналу (MRS).

В конкретном варианте осуществления такие биомаркеры представляют собой биохимические маркеры крови NASH, такие как маркеры апоптоза (фрагмент CK18, общий цитокератин, сывороточный уровень апоптоз-опосредующего поверхностного антигена FAS), маркеры воспаления (С-реактивный белок (CRP), TNF, IL-8, хемокиновый лиганд CXC 10 (CXCL10)), продукты окисления липидов (11-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (HETE), 9-гидроксидекадиеновая кислота (HODE), 13-HODE, 13-оксооктадекадиеновая кислота (ODE), LA-13-HODE (балл oxNASH), 11,12-дигидрокси-эйкозатриеновая кислота (diHETrE)), адипоцитокины и гормоны (адипонектин, лептин, резистин, висфатин, связывающий ретинол белок (RBP) 4, связывающий жирные кислоты белок (FABP) 4, фактор роста фибробластов (FGF21), лизосомальные ферменты (катепсин D) и/или комбинированные панели (тест NASH, диагностическая панель NASH); биомаркеры визуализации, такие как функция поглощения клеток Купфера (MRI), усиление функции печени при использовании гадоксетовой кислоты (MRI), метаболизм мембран гепатоцитов и внутриклеточная АТФ (MRS), жесткость печени (MRE).

В конкретном варианте осуществления такие биомаркеры представляют собой маркеры фиброза печени: биомаркеры визуализации, такие как механически индуцированный импульс, количественное измерение скорости поперечной волны (FibroScan-транзиентная эластография, pSWE-ARFI, 2D-3D-SWE), метод ультразвуковой лучевой импульсной визуализации при смерти (pSWE-ARFI), применение модифицированного фазово-контрастного метода для визуализации распространения поперечной волны в паренхиме печени (MRE); биохимические маркеры крови, такие как соотношение AST:ALT, индекс соотношения AST:тромбоциты (APRI), параметры индекса FIB4, параметры оценки фиброза NAFLD, параметры оценки BARD, специфичные маркеры фиброза, такие как HA, PIIINP, Pro-C3, TIMP-1, ламинин, ELF-связанные панели, параметры фибротеста, параметры фиброметра NAFLD.

В другом дополнительном варианте осуществления такими маркерами являются маркеры риска и тяжести NAFLD, такие как генетические и геномные маркеры, такие как SNP (rs738409 в PNPLA3), бесклеточные некодирующие РНК (miR-122, miR-1290, miR-192 и miR-7b), составная панель полученных из сыворотки омиксных данных, таких как rs738409, и протеомных данных, включая ACY1, SHBG, CTSZ, MET, GNS, LGALS3BP, CHL1 и SERPINC1, SNP в нескольких локусах (PNPLA3, SOD2, KLF6 и LPIN1), miR-122, составная панель, включающая miR-122, miR-192, miR-21, ALT, CK18 Asp396, бесклеточная ДНК, такая как циркулирующая метилированная PPARG.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления другие биомаркеры представляют собой другие циркулирующие микроРНК, в дополнение к miR-452. В

частности, иллюстративные дополнительные микроРНК, которые могут быть полезными при практическом применении настоящего изобретения, включают: miR-34a, miR-122 и miR-200.

Согласно этим вариантам осуществления способы могут включать в себя этапы:

i) измерения уровня miR-452 и, по меньшей мере, одного другого циркулирующего маркера повреждения печени (такого как циркулирующий в крови, сыворотке или плазме маркер повреждения печени), и

ii) объединения этих измерений для генерации математических моделей (алгоритмов) с помощью биоинформатических подходов (например, линейная логистическая регрессия или случайный лес) с целью получения показателя NAFLD, NASH и/или фиброза печени с высокими диагностическими/мониторинговыми/прогностическими/ предсказательными показателями для оценки NALFD, NASH, активного NASH или фиброза печени у субъекта.

В другом варианте осуществления диагностику, обнаружение, мониторинг, оценку риска или оценку эффективности лечения NAFLD, NASH или фиброза печени проводят путем определения уровня miR-452 в образце биологической жидкости субъекта и направления субъекта на диагностику посредством физических неинвазивных методик, таких как ультразвук, эластография или методики визуализации, такие как MRI.

В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут быть объединены со способом, раскрытым в WO2017046181, принадлежащем тому же заявителю.

В некоторых вариантах осуществления, благодаря способам по изобретению, может быть принято решение дать пациенту рекомендации по образу жизни (например, режиму питания или рекомендации по физической активности), предоставить субъекту медицинскую помощь (например, посредством планирования регулярных посещений врача или регулярных осмотров, например, для регулярного мониторинга маркеров повреждения печени) или ввести субъекту по меньшей мере одну терапию NAFLD, NASH или фиброза печени. В конкретном варианте осуществления может быть принято решение о выдаче рекомендаций по образу жизни пациенту или о введении по меньшей мере одной терапии NAFLD, NASH или фиброза печени. Такая классификация субъекта как получателя, или TBT, основана на повышенном уровне miR-452 по сравнению с контрольными уровнями miR-452, измеренными у пациентов, не являющихся получателями (NTBT), как указано выше.

Таким образом, изобретение, кроме того, относится к соединению против NAFLD, против NASH или против фиброза для применения в способе лечения NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был идентифицирован посредством способа согласно изобретению. Изобретение также относится к соединению против NAFL для применения в способе лечения NAFL у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был идентифицирован посредством

способа согласно изобретению.

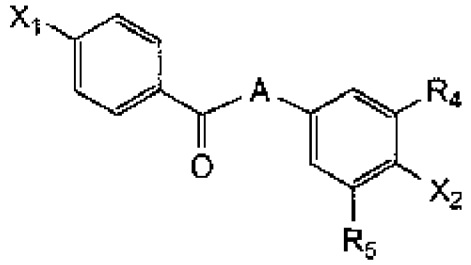
В частности, изобретение относится к соединению против NAFLD для применения в способе лечения NAFLD у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был классифицирован как получатель указанного лечения посредством способа согласно изобретению.

В частности, изобретение относится к соединению против NASH для применения в способе лечения NASH у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был классифицирован как получатель указанного лечения посредством способа согласно изобретению.

В частности, изобретение относится к соединению против фиброза для применения в способе лечения фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был классифицирован как получатель указанного лечения посредством способа согласно изобретению.

Иллюстративные соединения против NAFLD, против NASH и против фиброза перечислены ниже:

- соединение формулы (I):



в которой:

X1 представляет собой галоген, группу R1 или G1-R1;

A представляет собой CH=CH или группу CH2-CH2;

X2 представляет группу G2-R2;

G1 и G2, одинаковые или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

R1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, алкокси или алкилтиогруппу, циклоалкильные группы, циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

R2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, группой -COOR3, где R3 представляет собой атом водорода или алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами.

R4 и R5, одинаковые или разные, представляют собой алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемая соль;

- ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы, такие как GS-0976, ND-654, AC-8632,

PF05175157, CP640186, Gemcabene, MK-4074 и PF05175157.

- агонисты рецептора аденозина A3, такие как 2-(1-гексинил)-N-метиладенозин, пиклиденозон CF-101 (IB-MECA), намоденозон CF-102, 2-Cl-IB-MECA, CP-532,903, инозин, LUF-6000 и MRS-3558.

- антагонисты альдостерона и антагонисты минералокортикоидных рецепторов, такие как апараренон (MT 3995), амилорид, спиронолактон, эплеренон, канренон и канреноат калия, прогестерон, дроспиренон, гестоден и бенидипин.

- AMP-активированные протеинкиназные стимуляторы, такие как PXL-770, MB-11055 Debio-0930B метформин, CNX-012, O-304, кальциевая соль мангиферина, элтромбопаг, каротуксимаб и имеглимин.

- агонисты рецептора амилина и агонисты рецептора кальцитонина включают KBP-042 и KBP-089, но не ограничиваются ими.

- антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на трансформирующий фактор роста бета 2, включает ASPH-0047, IMC-TR1 и ISTH-0047, но не ограничивается ими.

- ингибиторы ангиопоэтин-родственного белка-3, такие как ARO-ANG3, IONIS-ANGGPTL3-LRx или AKCEA-ANGPTL3LRx, эвинакумаб и ALN-ANG.

- антитела против LPS, такие как IMM-124-E

- ингибиторы апикального натрий-созависимого транспортера желчной кислоты, такие как A-4250, воликсибат, мараликсибат, ранее называвшийся SHP-625, GSK-2330672, элобиксибат и CJ-14199.

- бетаин безводный или PM-003;

- Желчные кислоты, такие как обетихоловая кислота (OCA) и UDCA, норурсодезоксихолевая кислота и урсодиол.

- биоактивные липиды, такие как 5-гидроксиэйкозапентаеновая кислота (15-HEPE, DS-102), ненасыщенные жирные кислоты, такие как 25-арахидоновая кислота, икосапентетиловый эфир, эйкозапентановая кислота и докозагексаеновая кислота.

- антагонисты каннабиноидного рецептора CB1, такие как 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, отенабант, ибипинабант, суринабант; римонабант, дринабант, SLV-326, V-24343 и O-2093.

- миметики каннабиноидного рецептора CB2, такие как анабазум (резунаб, JKT-101).

- двойной каннабиноидный рецептор CB1/ингибитор iNOS

- ингибиторы каспазы, такие как эмрикасан, белнаказан, нивоказан, IDN-7314, F-573, VX-166, YJP-60107, MX-1122, IDN-6734, TLC-144, SB-234470, IDN-1965, VX-799, SDZ-220-976 и L-709049.

- ингибиторы катепсина, такие как VBY-376, VBY-825, VBY-036, VBY-129, VBY-285, Org-219517, LY3000328, RG-7236 и BF/PC-18.

- антагонисты CCR, такие как ценикривирок (антагонист CCR2/5), PG-092, RAP-310, INCB-10820, RAP-103, PF-04634817 и CCX-872.

- модуляторы хемокинов CCR3 и ингибиторы лиганда эотаксина 2

- ингибиторы диацилглицерол-О-ацилтрансферазы (DGAT), такие как IONIS-DGAT2Rx ранее называвшийся ISIS-DGAT2Rx, LY-3202328, BH-03004, KR-69530, OT-13540, AZD-7687 и ABT-046.

- ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DPP4), такие как эвоглиптин, вилдаглиптин, фотаглиптин, алоглиптин, сахаглиптин, тилоглиптин, анаглиптин, ситаглиптин, ретаглиптин, мелоглиптин, госоглиптин, трелаглиптин, тенелиглиптин, утоглиптин, линаглиптин, гемиглиптин, йоглиптин, бетаглиптин, имиглиптин, омариглиптин, вилдаглиптин и денаглиптин.

- агонисты инсулинового лиганда и рецептора инсулина;

- менсибилизатор инсулина и антагонист рецептора MCH-1

- ингибиторы Dual NOX (NADPH-оксидазы) 1 и 4, такие как GKT-831 (2-(2-хлорфенил)-4-[3- (диметиламино)фенил]-5-метил-1H-пиразоло[4,3-c]пиридин-3,6(2H,5H)-дион), ранее называвшийся GKT137831 и GKT-901

- модуляторы белка внеклеточного матрикса, такие как CNX-024, CNX-025 и SB-030.

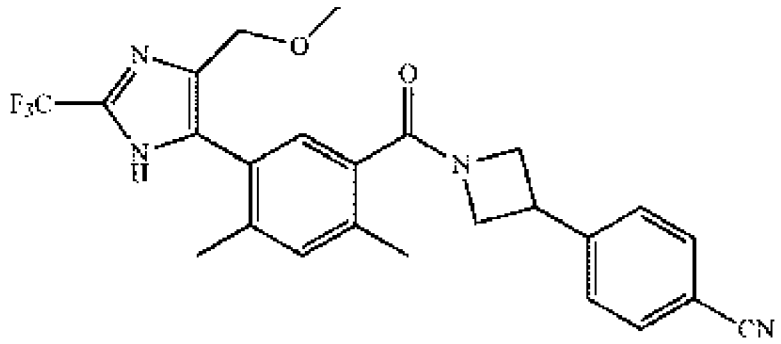
- конъюгаты стеароил-КоА-десатуразы-1/жирной кислоты и желчных кислот (FABAC);

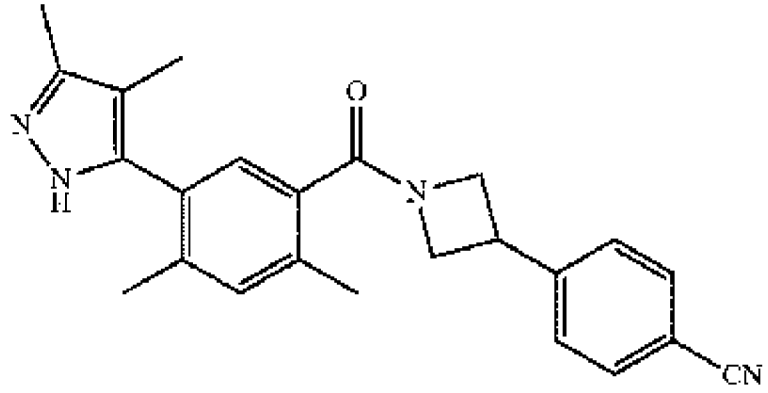
- агонисты фарнезоидного X-рецептора (FXR); обетихоловая кислота, (OCA), GS-9674, LJN-452, EDP-305; AKN-083, INT-767, GNF-5120, LY2562175, INV-33, NTX-023-1, EP-024297, Px-103, SR-45023.

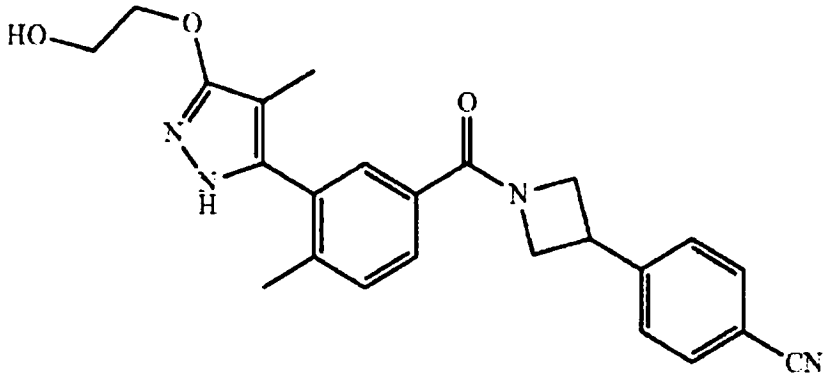
- жирные кислоты, такие как омега-3 жирные кислоты, омакор или MF4637, рыбий жир, полиненасыщенные жирные кислоты (эфамакс, optiEPA).

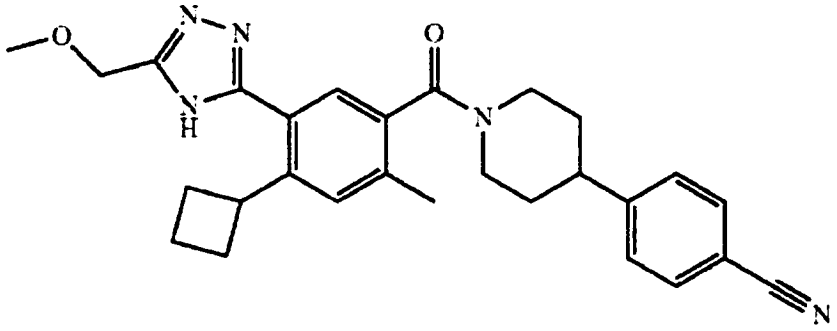
- ингибиторы синтеза жирных кислот (FAS), такие как TVB-2640; TVB-3199, TVB-3693BZL-101, 2-октадециновая кислота, MDX-2, Fasnall, MT-061, G28UCM, MG-28, HS-160, GSK-2194069, KD-023 и цилостазол.

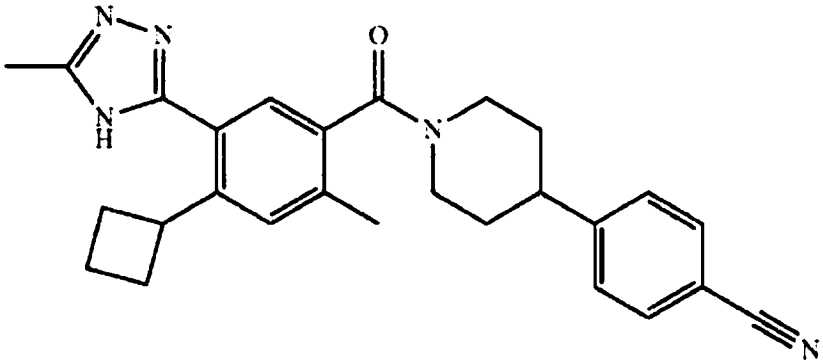
В конкретном варианте осуществления ингибитор FAS представляет собой соединение, выбранное из следующего списка соединений:

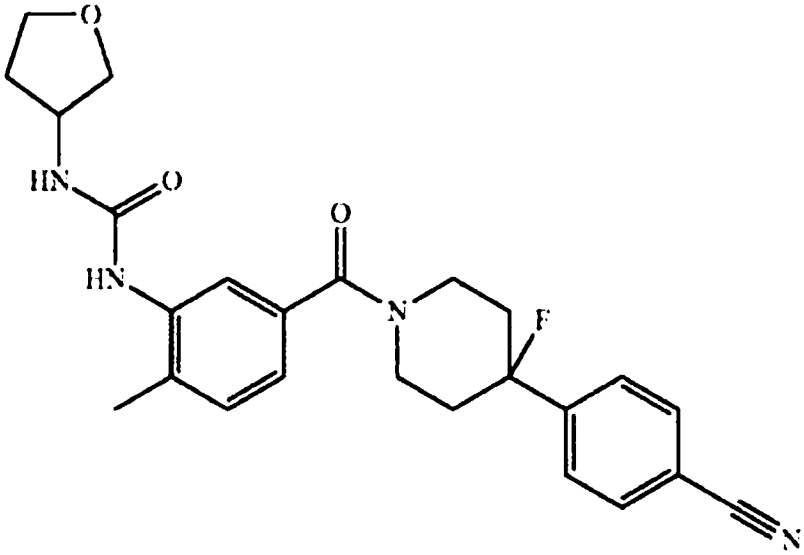


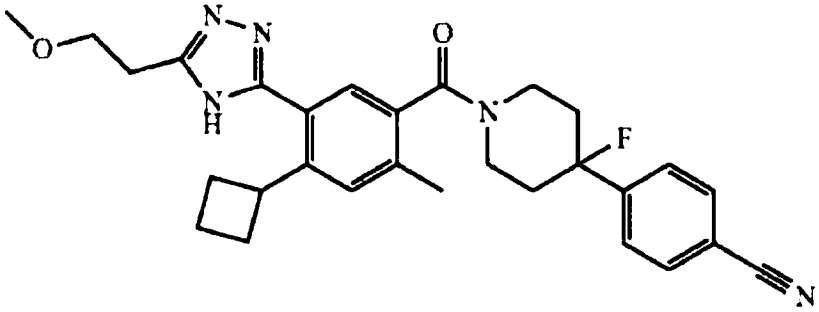


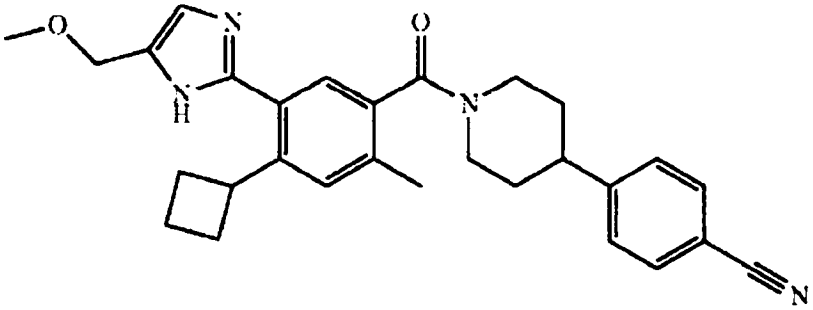


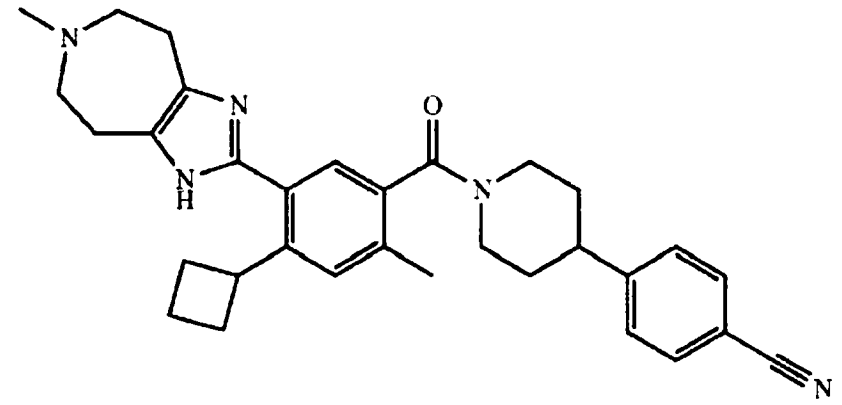


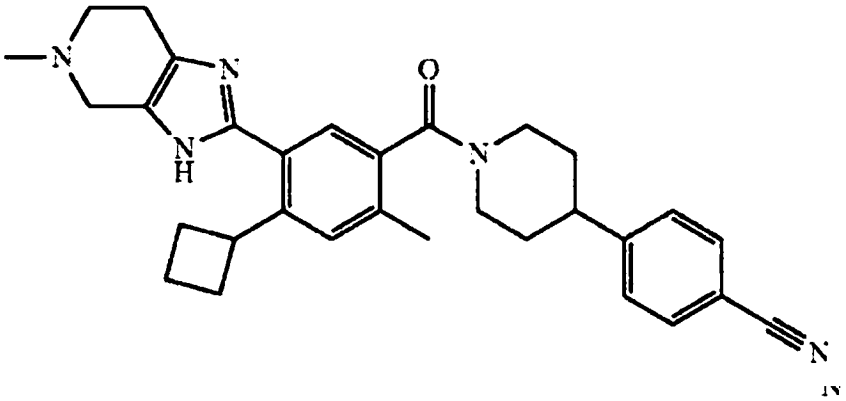


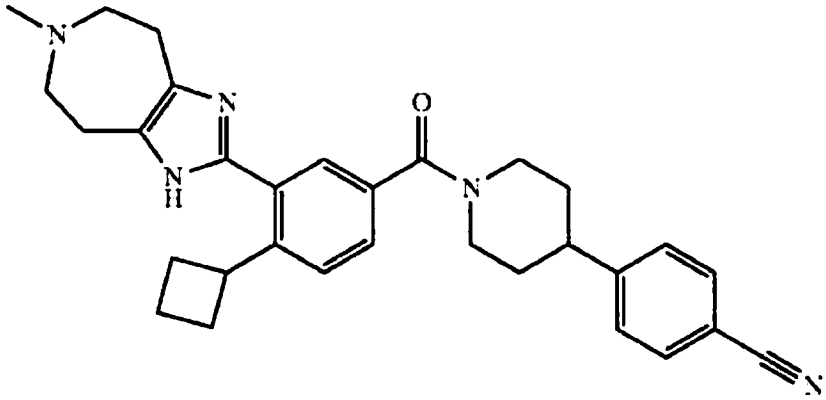






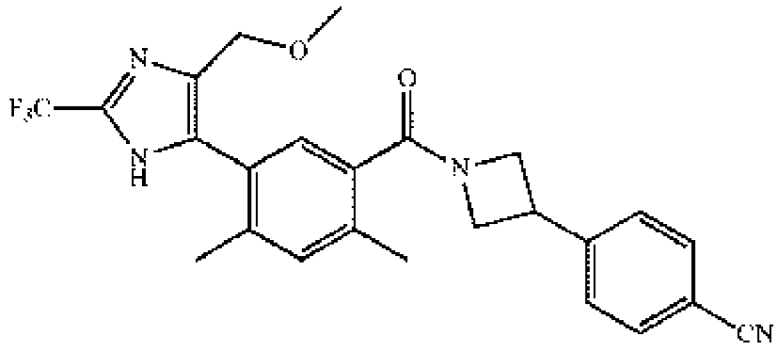


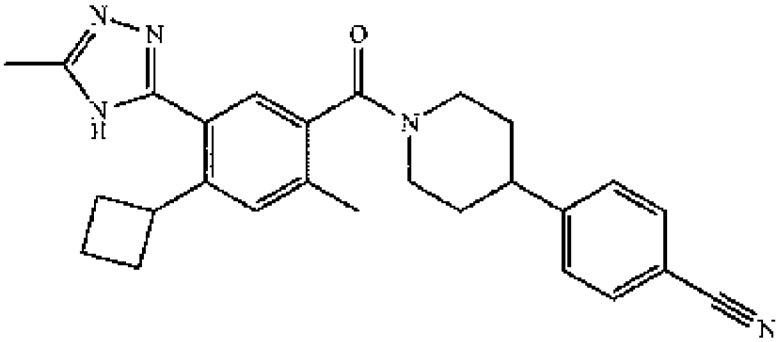




и TVB-2640.

В другом конкретном варианте осуществления ингибитор FAS выбирают из:





и TVB-2640.

В конкретном варианте осуществления ингибитор FAS представляет собой TVB-2640.

- лиганд рецептора фактора роста фибробластов 19 (FGF-19) или функционально сконструированный вариант FGF-19

- рекомбинантные варианты фактора роста фибробластов 19 (FGF-19), такие как NGM-282.

- агонисты фактора роста фибробластов 21 (FGF-21), такие как PEG-FGF21, ранее называвшийся BMS-986036, YH-25348, BMS-986171, YH-25723, LY-3025876 и NNC-0194-0499.

- ингибиторы галектина 3, такие как GR-MD-02, TD-139, ANG-4021, галектин-3C, LJPC-201, TFD-100, GR-MD-03, GR-MD-04, GM-MD-01, GM-CT-01, GM-CT-02, Gal-100 и Gal-200.

- аналоги глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), такие как семаглутид, лираглутид, эксенатид, альбиглютид, дулаглутид, ликсисенатид, локсенатид, эфпегленатид, таспоглютид, MKC-253, DLP-205 и ORMD-0901.

- агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), такие как LY-3305677 и оксинтомодулин длительного действия.

- модуляторы рецептора, связанного с G-белком (GPCR), CNX-023.

- антагонист рецептора 84, связанного с G-белком (антагонист GPR84), ингибитор лиганда фактора роста соединительной ткани и агонист рецептора 1 свободной жирной кислоты (агонист FFAR1), такой как PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283 и PBI-4299.

- гормон роста

- ингибиторы клеточного сигнального пути Hedgehog, такие как висмодегиб, TAK-441, IPI-926, саридегиб, сонидегиб/эрисмодегиб, BMS-833923/XL139, PF-04449913,

таладегиб/LY2940680, ETS-2400, SHR-1514 и CUR-1514, CUR-1514, CUR-1514, CUR-1514, и CUR-1514, CUR-1514,

- ингибиторы натрий-зависимого котранспортера желчной кислоты подвздошной кишки, такие как A-4250, GSK-2330672, volixibat, CJ-14199 и элобиксибат.

- иммуномодуляторы, такие как PBI-4050, PBI-4265, PBI-4283, PBI-4299 и AIC-649.

- сенсибилизатор инсулина и антагонист рецептора MCH, такой как MSDC-0602k, MSDC-0602, CSTI-100 и AMRI.

- ингибиторы интегрина; ингибиторы интегрина Pliant Therapeutics, ингибиторы интегрина Indalo Therapeutics, ингибиторы интегрина университета Сент-Луиса, ProAgio и GSK-3008348.

- ингибиторы кетогексокиназы, такие как JNJ-28165722; JNJ-42065426; JNJ-42152981; JNJ-42740815; JNJ-42740828 и PF-06835919.

- ингибиторы лейкотриена (LT)/фосфодиэстеразы (PDE)/липоксигеназы (LO), такие как типелукаст (ранее называвшийся MN-001), томелукаст, сулукаст, масилукаст, зафирлукаст, пранлукаст, монтелукаст, гемилукаст, верлукаст, аклукаст, побиликаст, циналукаст и иралукаст.

- ингибиторы гомолога 2 лизилоксидазы, такие как Раппапорт, InterMune, Pharmaxis, AB-0023, симтузумаб, PXS-5382A и PXS-5338.

- макролиды: лисолитромицин, азитромицин и эритромицин.

- модуляторы рецепторов маннозы макрофагов, такие как AB-0023, MT-1001, [18F] FB18mHSA, Xemys, технеций Tc 99m тилманоцепт и CDX-1307.

- модулятор метил-CpG-связывающего белка 2 и ингибиторы трансглутаминазы включают, но не ограничиваются указанным, цистеамин, EC цистеамин, энтеросолюбильный битартрат цистеамина, битартрат цистеамина (с энтеросолюбильным покрытием), Bennu, битартрат цистеамина (с энтеросолюбильным покрытием), Raptor, битартрат цистеамина, DR цистеамин, битартрат цистеамина с замедленным высвобождением и энтеросолюбильным покрытием, меркаптамин, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), Bennu, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), Raptor, RP-103, RP-104, PROCYSBI и меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием).

- антагонисты микроРНК, такие как RG-125, ранее называвшийся AZD4076, RGLS-5040, RG-101, MGN-5804 и MRG-201.

- стимулятор металлопротеиназы-9 (MMP9), такой как стимулятор MMP9 Elastomic Ab.

- ингибитор семейства митохондриальных носителей и ингибитор митохондриального фосфатного белка-носителя включают, но не ограничиваются указанным, TRO-19622, Trophos, олесоксим, RG-6083 или RO-7090919.

- ингибиторы миелопероксидазы включают, но не ограничиваются указанным, PF-06667272

- моноклональные антитела: бертилимумам, NGM-313, нацеленные на IL-20

моноколональные антитела, фрезолимумаб (антиTGFβ), ранее называвшийся GC1008, тимолумаб, ранее называвшийся BTT-1023, намацизумаб, омализумаб, ранибизумаб, бевацизумаб, лебрикизумаб, эпратузумаб, фелвизумаб, матузумаб, монализумаб, реслизумаб и инебилизумаб.

- моноклональные антитела, такие как анти-IL20 моноклональных антитела, анти-TGFβ антитела, анти-CD3 антитела, анти-LOXL2 антитела и анти-TNF антитела.

- модуляторы mTOR, такие как MSDC-0602, и генная терапия AAV, вводимая совместно с SVP-сиролимусом.

- NAD-зависимый деацетилазный стимулятор сиртуина; ингибитор PDE 5, такой как NS-0200.

- ингибиторы NF-каппа B, такие как LC-280126.

- никотиновая кислота, такая как ниацин или витамин B3

- агонисты никотиновой кислоты (GPR109), такие как ARI-3037MO, MMF, LUF 6283, ацифран, IBC 293, MK-1903, GSK256073, MK-6892, MK-0354, SLx-4090, ломитапид, лексибулин, апабеталон, ацифран, ларопипрант, дапоринад, анацетрапиб, INCB-19602, ST-07-02, ломефлоксацин, ниацин и ларопипрант с контролируемым высвобождением.

- нитазоксанид (NTZ), его активный метаболит тизоксанид (TZ) и другие пролекарства TZ, такие как RM-5061,

- нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) включают, но не ограничиваются указанным, F-351, салицилаты (аспирин), ацетаминофен, производные пропионовой кислоты (ибупрофен, напроксен), производные уксусной кислоты (индометацин, диклофенак), производные эноловой кислоты (пироксикам, фенилбутазон), производные антраниловой кислоты (меклофеналминовая кислота, флуфенамовая кислота), селективные ингибиторы COX-2 (целекоксиб, парекоксиб) и сульфонанилиды (нимесулид).

- лиганды ядерного рецептора, такие как DUR-928, ранее называвшийся DV 928.

- агонисты белка P2Y13, такие как CER-209

- модуляторы PDGFR, такие как BOT-501 и BOT-191.

- стимуляторы фенилаланин-гидроксилазы, такие как пегвалиаза, сапроптерин, AAV-PAH, CDX-6114, сепиаптерин, RMN-168, ALTU-236, ETX-101, HepaStem, ролипрам и альпростадил.

- антагонисты активируемого протеазой рецептора (PAR)-2, такие как PZ-235 и NP-003.

- модуляторы протеинкиназы, такие как CNX-014, MB-11055, ALF-1, мангиферин, амлексанокс, GS-444217, REG-101 и валин.

- агонисты PPAR-альфа, такие как фенофибрат, ципрофибрат, пемафибрат, гемфиброзил, клофибрат, бинифибрат, клинофибрат, клофибриновая кислота, никофибрат, пирифибрат, плафибрид, ронифибрат, теофибрат, токофибрат и SR10171;

- агонисты PPAR-гамма, такие как пиоглитазон, дейтерированный пиоглитазон, росиглитазон, эфатутазон, ATx08-001, OMS-405, CHS-131, THR-0921, SER-150-DN, KDT-

501, GED-0507-34-Levo, CLC-3001 и ALL-4.

- агонисты PPAR-дельта, такие как GW501516 (эндурабол или ({4-[({4-метил-2-[4-(трифторметил) фенил]-1,3-тиазол-5-ил} метил) сульфанил] -2-метилфенокси} уксусная кислота)), или MBX8025 (селаделпар или {2-метил-4- [5-метил-2- (4-трифторметилфенил) -2H- [1,2,3] триазол-4-илметилсилфанил] фенокси}-уксусная кислота), GW0742 ([4-[[[2-[3-фтор-4-(трифторметил)фенил]-4-метил-5-тиазолил]метил]тио]-2-метилфенокси] уксусная кислота), или L165041, или HPP-593, или NCP-1046.

- агонисты PPAR-альфа/гамма (также называемые глитазарами), такие как сароглитазар, алеглитазар, мураглитазар, тесаглитазар, DSP-8658.

- агонисты PPAR-альфа/дельта, такие как элафибранор и T913659.

- PPAR гамма/дельта-подобная конъюгированная линолевая кислота (CLA), T3D-959.

- агонисты PPAR-альфа/гамма/дельта или панагонисты PPAR: IVA337 или TTA (тетрадецилтиоуксусная кислота), или бавахинин, или GW4148, или GW9135, или безафибрат, или лобеглитазон, или CS038.

- пребиотические волокна, пробиотики

- рецепторы прегнана X, такие как рифампицин.

- ингибиторы Rho-ассоциированной протеинкиназы 2 (ROCK2), такие как KD-025, TRX-101, BA-1049, LYC-53976, INS-117548 и RKI-1447.

- ингибиторы регулирующей сигнал киназы 1 (ASK1); GS-4997

- ингибиторы натрий-глюкозного транспорта (SGLT) 2, такие как ремоглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин, эртуглифлозин, сотаглифлозин, ипраглифлозин, тианаглифлозин, канаглифлозин, тофоглифлозин, джанаглифлозин, бексаглифлозлифлозин, бексаглифлозлифлозин, HEC-44616, AST-4525 и PLD-101.

- конъюгаты стеароил-CoA-десатуразы-1/жирной кислоты: арамхол, GRC-9332, стеамхол, TSN-2998, GSK-1940029 и XEN-801.

- агонисты рецептора щитовидной железы β (THR β): VK-2809, MGL-3196, MGL-3745, SKL-14763, собетиром, BCT-304, ZYT-1, MB-07811 и эпротиром.

- антагонисты Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4), такие как налтрексон, JKB-121, M-62812, резаторвид, дендрофилин, CS-4771, AyuV-1, AyuV-25, NI-0101, EDA-HPVE7 и эриторан.

- модуляторы рецептора тирозинкиназы (RTK); CNX-025, KBP-7018.

- ингибиторы уратного анионита 1 и ингибиторы ксантиноксидазы, такие как лесинурад, RLBN-1001, веринурад, KUX-1151 и лесинурад+аллопуринол.

- ингибиторы белка васкулярной адгезии-1 (VAP-1), такие как PXS-4728A, CP-664511, PRX-167700, ASP-8232, RTU-1096, RTU-007 и BTT-1023.

- агонисты рецептора витамина D (VDR), такие как кальциферол, альфакальцидол, 1,25-дигидроксивитамин D3, витамин D2, витамин D3, кальцитриол, витамин D4, витамин D5, дигидротахистерол, кальципотриол, такальцитол, 1,24-дигидроксивитамин D3 и парикальцитол.

- витамин Е и изоформы, витамин Е в сочетании с витамином С и аторвастатином.

Другие анти-NASH агенты включают KB-GE-001, и NGM-386, и NGM-395, и NC-10, и TCM-606F. Другие анти-NASH агенты включают икосабутат, NC-101, NAIA-101, колесевелам и PRC-4016. Другие антифиброзные агенты включают HEC-585, INV-240, терапевтическую РНКi (Silence Therapeutics) и программу SAMiRNA (Bioneer Corp).

Другие иллюстративные антифиброзные агенты включают ингибиторы пирфенидона или рецепторной тирозинкиназы (RTKI), такие как нинтеданиб, сорафениб и другие RTKI, или блокаторы рецепторов ангиотензина II (AT1), или ингибитор CTGF, или любое антифибротическое соединение, чувствительное к интерференции с TGFβ- и BMP-активированными путями, включая активаторы латентного комплекса TGFβ, такие как MMP2, MMP9, THBS1 или интегрины клеточной поверхности, рецепторы TGFβ типа I (TGFBRI) или типа II (TGFBRII) и их лиганды, такие как TGFβ, активин, ингибин, Nodal, анти-гормон Мюллера, GDF или BMP, вспомогательные корецепторы (также известные как рецепторы типа III) или компоненты SMAD-зависимого канонического пути, включая регуляторные или ингибирующие белки SMAD, или члены SMAD-1-независимых или неканонических путей, включая различные ветви передачи сигналов MAPK, TAK1, Rho-подобные GTPase сигнальные пути, пути фосфатидилинозитол-3 киназы/AKT, TGFβ-индуцированный процесс EMT или канонические и неканонические пути передачи сигналов Hedgehog, в том числе лиганды Hh или гены-мишени, или любые члены WNT, или пути Notch, которые чувствительны к влиянию TGFβ.

В конкретном варианте осуществления лечение NASH или фиброза печени включает в себя введение соединения формулы (I), выбранного из группы, состоящей из следующего: 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонил диметилметилоксифенил] проп-2-ен -1-он, 1- [4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилоксифенил] -3- [3, 5-Диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилоксифенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксиоксифенил] проп-2-ен-1-он 2- [2,6-диметил-4- [3- [4- (метилтио) фенил] -3-оксопропил] фенокси] -2-метилпропановая кислота и 2- [2,6-диметил-4- [3- [4- (метилтио) фенил]-3-оксопропил] фенокси]-2-метилпропановой кислоты изопропиловый эфир; или их фармацевтически приемлемая соль. В дополнительном конкретном варианте осуществления изобретения соединение формулы (I) представляет собой 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, или его фармацевтически приемлемую соль.

В частности, изобретение относится к комбинированному продукту, содержащему, по меньшей мере, анти-NAFLD и/или анти-NASH, и/или анти-фиброзный агент для

применения в способе лечения NAFLD, NASH, активного NASH и/или фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был классифицирован как получатель указанного лечения посредством способа согласно изобретению.

В более конкретном варианте осуществления изобретение относится к лечению NAFLD, NASH, активного NASH и/или фиброза печени комбинированным продуктом, включающим по меньшей мере один агент, выбранный из группы соединений против NAFLD, против NASH и/или против фиброза, или их фармацевтически приемлемые соли.

В более конкретном варианте осуществления изобретение относится к лечению NAFLD, NASH, активного NASH и/или фиброза печени с помощью элафибранора.

В следующем варианте осуществления лечение NASH или фиброза печени включает в себя введение NTZ, TZ, витамина E или пиоглитазона, обетихоловой кислоты, элафибранора, селонсертиба, сароглитазара и/или ценикривока.

В дополнительном варианте осуществления лечение NASH или фиброза печени включает введение NTZ или TZ, в частности, NTZ.

В еще одном конкретном варианте осуществления проводится комбинированное лечение. В другом конкретном варианте осуществления лечение NAFLD, NAFL, NASH, активного NASH или фиброза печени включает введение элафибранора в сочетании с одним или более другими соединениями против NAFLD, против NAFL, против NASH или против фиброза печени. В еще одном варианте лечение NAFLD, NAFL, NASH, активного NASH или фиброза печени включает введение элафибранора в сочетании по меньшей мере с одним соединением, выбранным из группы, состоящей из NTZ, TZ, витамина E или пиоглитазона, обетихолевой кислоты, элафибранора, селонсертиба, сароглитазар и ценикривока. В еще одном варианте осуществления лечение NAFLD, NAFL, NASH, активного NASH или фиброза печени включает введение элафибранора в сочетании с NTZ.

Учитывая роль микро-РНК в модуляции экспрессии генов, результаты, полученные авторами изобретения, также подтверждают патофизиологическую роль miR-452 в развитии и эволюции NAFLD, NASH и/или фиброза печени.

Учитывая роль микро-РНК в модуляции экспрессии генов, результаты, полученные авторами изобретения, также подтверждают патофизиологическую роль miR-452 в развитии и эволюции NAFL.

Таким образом, способы по изобретению могут быть применены для идентификации специфичных субпопуляций субъектов с NAFLD, NASH и/или фиброзом печени на основе уровней циркулирующей miR-452. Эти субпопуляции могут иметь зависимое от miR-452 заболевание, которое заставляет этих пациентов реагировать на специфичные лекарственные препараты, действующие непосредственно (миметики или мимики miR-452, дерегулятор микроРНК, такой как кольцевая РНК (circРНК), или анти-miR-452) или косвенно на зависимые пути miR-452.

Таким образом, способы по изобретению могут быть применены для идентификации специфичных субпопуляций субъектов с NAFL на основе уровней

циркулирующей miR-452. Эти субпопуляции могут иметь зависимое от miR-452 заболевание, которое заставляет этих пациентов реагировать на специфичные лекарственные препараты, действующие непосредственно (миметики или miR-452, дерегулятор микроРНК, такой как кольцевая РНК (circРНК), или анти-miR-452) или косвенно на зависимые пути miR-452.

Кроме того, на основании этого наблюдения, в дополнительном аспекте изобретение относится к соединению-ингибитору miR-452 для применения при лечении NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом.

Кроме того, на основании этого наблюдения, в дополнительном аспекте изобретение относится к соединению-ингибитору miR-452 для применения при лечении NAFL у субъекта, нуждающегося в этом.

Используемый в настоящем описании термин «соединение-ингибитор miR-452» и его склонения относятся к любому соединению, такому как соединение нуклеиновой кислоты, способному предотвращать действие miR-452 и, в частности, hsa-miR-452-5p и hsa-miR-452-3p. В конкретном варианте осуществления соединение-ингибитор miR-452 по настоящему изобретению представляет собой соединение, которое ингибирует или снижает активность miR-452, например, посредством связывания с miR-452, или которое ингибирует экспрессию miR-452. Термин «ингибирование экспрессии miR-452» означает, что продуцирование miR-452 в печени или гепатоцитах после обработки указанным ингибирующим соединением меньше, чем количество, продуцируемое до лечения. Специалист в данной области техники с может легко определить, была ли ингибирована экспрессия miR-452 в печени или гепатоцитах, используя, например, методики определения уровня транскриптов микроРНК.

Подходящие соединения-ингибиторы miR-452 включают в себя двух- или одноцепочечную РНК (такую как короткую или малую интерферирующую РНК или «миРНК»), антагомиры, антисмысловые нуклеиновые кислоты, кольцевую РНК, искусственные микроРНК-губки и ферментативные молекулы для РНК, такие как рибозимы. Каждое из этих соединений может быть нацелено на заданную микроРНК и может разрушать или индуцировать разрушение целевой микроРНК. Например, экспрессия заданной микроРНК может быть ингибирована посредством индуцирования РНК-интерференции микроРНК с изолированной молекулой двухцепочечной РНК («дцРНК»), которая имеет по меньшей мере 90%, например, 95%, 98%, 99% или 100%, гомологию последовательности, по меньшей мере, с частью или, предпочтительно, со всей микроРНК. В предпочтительном варианте осуществления молекула дцРНК представляет собой миРНК. миРНК, подходящие для представленных способов, включают короткую двухцепочечную РНК длиной от около 17 нуклеотидов до около 29 нуклеотидов, предпочтительно, от около 19 до около 25 нуклеотидов. миРНК содержит цепочку смысловой РНК и цепочку комплементарной антисмысловой РНК, отожженных вместе с помощью стандартных взаимодействий спаривания оснований Уотсона-Крика (далее «спаренные по основаниям»). Смысловая цепь содержит последовательность

нуклеиновой кислоты, которая по существу идентична последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в миРНК-мишени.

Наборы

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средство для определения уровня:

(i) miR-452 в образце биологической жидкости и, необязательно,

(ii) по меньшей мере, одного другого циркулирующего маркера повреждения печени.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средство для определения уровня:

(i) miR-452 в образце биологической жидкости и, необязательно,

(ii) по меньшей мере, одного другого маркера NAFLD, NASH или фиброза печени.

Набор по изобретению является полезным для реализации способов, описанных выше. Кроме того, он может дополнительно содержать инструкции для реализации указанных способов. Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для проведения измерений уровней miR-452 и любого другого циркулирующего маркера повреждения печени, как указано выше.

В частности, набор может содержать антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и/или праймеры, полезные для количественной оценки уровней микроРНК, как хорошо известно в данной области техники.

Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для проведения измерений уровней miR-452 и любого другого маркера NAFLD и/или NASH.

В предпочтительном варианте осуществления набор содержит средство для определения уровня miR-452-5p.

Следует понимать, что приведенное выше описание, а также приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема изобретения будут очевидны для специалистов в области техники, к которой относится изобретение.

ПРИМЕРЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

А. Клинические образцы

Образцы крови, использованные в этом исследовании биомаркеров, были взяты у пациентов из исследования GOLDEN-DIAG, когорты OBESE и исследования RESOLVE-It.

Клиническое испытание фазы 2 GOLDEN-505 (NCT01694849) представляло собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование для оценки эффективности и безопасности элафибранора (1- [4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он) один раз в день при стеатогепатите у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом (NASH). Биопсия печени была взята для подтверждения диагноза NASH после

соответствующего исключения заболевания печени другой этиологии. NASH был диагностирован как стеатогепатит, оцененный посредством биопсии печени в течение 6 месяцев до рандомизации. Подтверждение стеатогепатита было основано на централизованном прочтении биопсий печени. Пациенты с NASH были определены как имеющие NAS≥3, включая балл по стеатозу ≥1, и по баллонированию гепатоцитов ≥ 1, и по лобулярному воспалению ≥ 1. Исследование было одобрено соответствующими регулирующими органами в каждом участвующем центре, и все пациенты дали согласие на участие в медицинском исследовании.

При включении биопсия печени была использована для изучения и оценки гистологических очагов. Образцы крови отбирались при скрининге и в конце 1-летнего периода лечения для анализов гематологии и клинического биохимического анализа, включая полный список параметров, связанных с NAFLD/NASH. У пациентов, которые подписали специальное информированное согласие, были взяты дополнительные образцы крови для исследования новых диагностических биомаркеров NASH.

Образцы крови, использованные в этом исследовании биомаркеров, были взяты у пациентов исследования GOLDEN-DIAG при включении (270 образцов) и через год (223 образца).

Авторы настоящего изобретения также имели доступ к образцам крови человека от субъектов с биопсией печени и связанными с ними клиническим и биологическим данным из биобанка UZA, когорты OBESE. Эта когорта, состоящая из пациентов с патологическим ожирением, также включает пациентов с NAFLD/не-NASH, пациентов с NASH, пациентов с циррозом и здоровых людей. Сыворотка 253 пациентов была обработана для проверки кандидатной циркулирующей микроРНК, идентифицированной в исследовании GOLDEN-DIAG, с использованием технологии секвенирования следующего поколения (NGS) (HTGEdgeSeq) и количественной ОТ-ПЦР, соответственно. Письменное информированное согласие на сбор, хранение и использование дополнительных образцов было получено от каждого пациента.

Авторы настоящего изобретения также имели доступ к образцам крови человека от субъектов с биопсией печени и связанным с ними клиническим и биологическим данным из исследования RESOLVE-IT. RESOLVE-IT представляет собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование III фазы (NCT02704403) для оценки эффективности и безопасности элафибранора у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом (NASH) и фиброзом. Исследование было одобрено соответствующими регулирующими органами, все пациенты дали информированное согласие на участие. Биопсия печени при включении в исследование была использована для изучения и оценки гистологических повреждений. Образцы крови были отобраны при скрининге. У пациентов, которые подписали специальное информированное согласие, были взяты дополнительные образцы крови для исследования новых диагностических биомаркеров NASH.

Сыворотка крови 370 пациентов в исследовании RESOLVE-IT при скрининге с 263

соответствующими биопсиями печени была обработана для проверки кандидатной циркулирующей микроРНК, идентифицированной в исследовании GOLDEN-DIAG, с помощью анализа последовательности HTG Edge и количественной ОТ-ПЦР.

Сыворотка 100 субъектов из EFS (Etablissement Français u Sang) была обработана для оценки уровней идентифицированных кандидатных циркулирующих микроРНК у здоровых субъектов из исследования GOLDEN-DIAG с помощью анализа последовательности HTG Edge. Образы сыворотки использовали для анализа последовательности HTG Edge.

Образцы сыворотки трех когорт (GOLDEN-DIAG, OBESE and RESOLVE-IT) были использованы для анализа последовательности HTG Edge и количественной ОТ-ПЦР.

Забор крови и лабораторные исследования

Образцы крови были собраны в соответствии с центральным лабораторным протоколом и руководством Genfit - GFT505-212-7.

Согласно протоколу исследования, были проведены следующие анализы.

ГЕМАТОЛОГИЯ включает в себя гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов, лейкоциты, дифференциальное количество лейкоцитов (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы - значения и%), количество тромбоцитов и ретикулоциты.

БИОХИМИЯ Панель I включает глюкозу в плазме крови, триглицериды (TG), креатинин, клиренс креатинина, гамма-глутамилтрансферазу (GGT), аспартатаминотрансферазу (AST), аланинаминотрансферазу (ALT), креатинфосфокиназу (CPK), щелочную фосфатазу, тиреотропный гормон (TSH) и HbA1c.

БИОХИМИЯ Панель II включает глюкозу в плазме, креатинин, клиренс креатинина, общий белок, альбумин, натрий, калий, хлорид, кальций, мочевую кислоту, мочевину, выраженную как азот мочевины крови (BUN), аспартатаминотрансферазу (AST), аланинаминотрансферазу (ALT), гамма-глутамилтрансферазу (GGT), щелочную фосфатазу, креатинфосфокиназу (CPK), общий билирубин, конъюгированный билирубин, С-реактивный белок (hsCRP), соотношение AST/ALT и HbA1c.

УРИНАЛИЗ включает в себя:

- анализ индикаторной полоски (удельный вес, pH, RBC, лейкоциты, глюкоза, белок, кетоны, билирубин, уробилиноген и нитрит)

- Микроскопический анализ включает RBC, WBC, цилиндры, кристаллы, бактерии, эпителиальные клетки и дрожжи.

- Химический анализ (альбумин и креатинин)

СЕРОЛОГИЯ включает антитела к ВИЧ I/II, антитела к HCV, РНК HCV (тестируется только после получения образцов РНК HCV при посещении и в случае «реактивного» или «неопределенного» результата для антител HCV) и HbsAg.

Липидная панель включает триглицериды (TG), общий холестерин, не-HDL-C (расчет), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), липопротеин низкой плотности (LDL-C) (расчет), рассчитанный холестерин липопротеинов очень низкой

плотности (VLDL-C) (расчет), аполипопротеин AI (ApoAI) и аполипопротеин B (ApoB).

ХИМИЯ МОЧИ включает альфа-1-микроглобулин, бета-N-ацетилглюкозаминидазу (бета-NAG) и липокалин, связанный с нейтрофил-желатиназой (N-Gal)

МАРКЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ включают гомоцистеин, NT-ProBNP, тропонин T, цистатин C и бета2-микроглобулин.

ГЛИКЕМИЧЕСКИЕ И ДРУГИЕ ЛИПИДИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ включают лептин, инсулин, оценку гомеостатической модели (HOMA-IR), сывороточную глюкозу (для расчета HOMA-IR), фруктозамин, C-пептид и свободные жирные кислоты (FFA).

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ включают в себя гаптоглобин, фибриноген, фактор некроза опухоли альфа (TNF-α), интерлейкин 6 (IL-6) и ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1) Ag (цитрат).

МАРКЕРЫ ПЕЧЕНИ включают цитокератин-18 (CK18) (M65 и M30), адиопектин, ферритин, альфа2 макроглобулин, FGF19 и FGF21, гиалуроновую кислоту (Advia centaur, реагенты, закупаемые Siemens Belgium и оплачиваемые Genfit при переносе затрат), N-концевой пропептид коллагена типа III (PIIINP) (Advia centaur, реагенты, закупаемые Siemens Belgium) и тканевый ингибитор матричной металлопротеазы-1 (TIMP-1) (Advia centaur, реагенты, закупаемые Siemens).

Список методов, инструментов и производителей для каждого биохимического анализа представлен в данной таблице:

параметр	метод	инструмент	производитель
лептин	ELISA	вручную	R&D Systems
инсулин	CLIA	Immulite 2000	Siemens
HOMA-IR	Расчет с глюкозой и инсулином		
фруктозамин	колориметрический	Modular P800	Roche Diagnostics
C-пептид	CLIA	Иммулит 2000	Siemens
гаптоглобин	иммунотурбидиметрия	Modular P800	Roche Diagnostics
фибриноген	Метод Клаусса	STAR-evolution	Stago
TNF альфа	флюорокиновое мульти профилирование анализируемого вещества	Luminex	Millipore
IL-6	флюорокиновое мульти профилирование анализируемого вещества	Luminex	Millipore
PAI-1 Ag	ELISA	вручную	Stago
FFA	ACS-ACOD	Modular P800	Roche Diagnostics

CK18 M30	ELISA	вручную	Peviva
CK18 M65	ELISA	вручную	Peviva
адипонектин	ELISA	вручную	Millipore
ферритин	ECLIA	Modular E170	Roche Diagnostics
альфа2 макроглобулин	нефелометрия	БН II	Siemens
гиалуроновая кислота	иммунологический анализ	Advia centaur	Siemens
PIIINP	иммунологический анализ	Advia centaur	Siemens
TIMP-1	иммунологический анализ	Advia centaur	Siemens
FGF-19	ELISA	вручную	R&D Systems
FGF-21	ELISA	вручную	R&D Systems
висфатин	ELISA	вручную	Alpco immunoassays
резистин	ELISA	вручную	R&D Systems

YKL-40, CHI3L1	Иммунологический анализ на человеческий хитиназа-3-подобный белок 1 Quantikine® ELISA Номер по каталогу DC3L10 Для количественного определения концентраций человеческого хитиназа-3-подобного белка 1 (CHI3L1) в супернатантах клеточной культуры, сыворотке, плазме и моче.

Сбор и хранение образцов

Образцы крови, использованные в этом исследовании биомаркеров, были взяты у пациентов из исследования 505.212.7 до начала лечения. Письменное информированное согласие на сбор, хранение и использование дополнительных образцов было получено от каждого пациента.

Кровь, собранную в пробирки, содержащие цитрат объемом 2,7 мл, обрабатывали путем отделения бесклеточной плазмы от клеток крови в течение 15 минут после сбора путем центрифугирования на 1500 об/мин в течение 15 минут. Супернатантную плазму переносили в новую пробирку. Пробирки хранили при -70°C.

Для того, чтобы приступить к экстракции РНК, пробирки с плазмой затем центрифугировали на 13000 об/мин в течение 2 минут для осаждения и удаления тромбоцитов. Супернатантную плазму без тромбоцитов переносили в новую пробирку, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Кровь, собранную в пробирку для отделения сыворотки (SST), объемом 8,5 мл, обрабатывали через один час после взятия образца путем отделения бесклеточной сыворотки от клеток крови путем центрифугирования в диапазоне от 1300 до 2000 об/мин в течение 10 минут. Затем сыворотку переносили в новую пробирку. Пробирки хранили при -70°С. Экстракцию РНК проводили без дополнительного центрифугирования.

В. Секвенирование следующего поколения

Система секвенирования HTG Edge была использована для секвенирования микроРНК, содержащихся в образцах сыворотки.

Уровни сыворотки 2083 микроРНК (miRBase) измеряли с использованием технологии HTG-EdgeSeq-NGS. Использовали набор для полного транскриптома микроРНКы (WTA) HTG. Образцы готовили с использованием 15 мкл буфера для лизиса плазмы и 15 мкл образца плазмы, и 3 мкл протеиназы К смешивали и инкубировали при 50°С в течение 60 минут при орбитальном встряхивании. 25 мкл смеси переносили на планшет для образцов HTG и загружали в процессор HTG для проведения анализа нуклеазной защиты и подготовки стехиометрической NPP.

Подготовка библиотеки и секвенирование

Баркодирование выполняли с использованием фермента Hemo KlenTaq. Для каждого образца смешивали 2,4 мкл Hemo KlenTaq, 0,6 мкл dNTP (10 нМ), 6 мкл буфера OneTaq PCR GC 5X, 3 мкл прямого и обратного праймеров, 3 мкл подготовленного образца и 12 мкл Н20. В целях удаления избытка праймера из библиотеки использовали шарики Agentcour AMPure XP. Концентрацию библиотеки для каждого образца выполняли с использованием набора KPA Biosystems qPCR. Каждый образец пулировали для создания объединенной библиотеки и секвенировали на Illumina NextSeq500. Для каждого образца генерировалось не менее 250000 прочтений. Восстановление и анализ данных выполнялись с использованием файлов FASTQ и обрабатывали программным обеспечением HTG Parser.

Уровни микроРНК (количество прочтений) в образцах сыворотки пациентов с NASH, подверженных риску прогрессирования фиброза (подлежащие лечению; TBT=NAS≥4, F≥2 при гистологическом исследовании, n=109), сравнивали с уровнями, полученными в сыворотке пациентов, не подлежащих лечению (NTBT), n=161. Рассчитывали кратность изменения (TBT против NTBT) и статистическую значимость.

Биоинформатический анализ

Целью анализа является выявление биомаркеров, которые могут быть связаны с идентификацией пациентов с NASH, подлежащих лечению. Пациенты, подлежащие лечению (TBT) определяются по-разному в зависимости от различных частей исследования.

TBT2 определяется как:

- балл по стеатозу ≥ 1
- балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1
- балл по лобулярному воспалению ≥ 1

- NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяется как сумма баллов по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и степени лобулярного воспаления)

- стадия фиброза ≥2 (такая как фиброз, равный 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).

Целью проверки контроля качества (FastQC) является предоставление простого способа выполнения некоторых проверок контроля качества необработанных данных последовательностей, поступающих из высокопроизводительных конвейеров секвенирования.

Он предоставляет модульный набор анализов, который можно использовать, чтобы быстро понять, имеются ли с данными какие-либо проблемы, о которых следует узнать перед дальнейшим анализом.

Использовали набор для полного транскриптома микроРНК (WTA) HTG. Подготовка библиотеки и секвенирование были выполнены в соответствии с рекомендациями производителя. Для каждого образца было получено в среднем 931000 прочтений на образец. Данные были нормализованы по рекомендации производителя, чтобы обеспечить возможность прямого сравнения между различными образцами, путем корректировки количества прочтений. Limma, пакет программного обеспечения R/Bioconductor, был использован для дифференциальных анализов для анализа HTG Edge Sequencing.

D. Количественная ОТ-ПЦР микроРНК в сыворотке

Тотальную РНК сыворотки с сохраненными микроРНК экстрагировали из 100 мкл сыворотки с помощью набора для экстракции miRVanaParis (AM1556, Ambion) в соответствии с инструкциями производителя. Синтетическая добавленная miR-39-3p C. elegans была добавлена к образцам [3,125 фмоль] (cel-miR-39-3p, код доступа miRBase MIMAT=0000010, 5'Phos-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3' (идентификатор последовательности №4), очистка ВЭЖХ Integrated DNA Technologies), перед экстракцией РНК в качестве внутреннего контроля процесса экстракции РНК. Элюирование проводили в 100 мкл элюирующего буфера.

Экспрессию зрелых микроРНК определяли в соответствии с инструкциями производителя с применением ОТ-ПЦР анализа Taqman MicroRNA: Набор для обратной транскрипции TaqMan MicroRNA (Ref: 4366597, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), анализа TaqMan MicroRNA 20X (Ref: 4440888, Applied Biosystems) и TaqMan Universal Master Mix II (Ref: 4440040, Applied Biosystems).

Обратную транскрипцию выполняли с использованием термоциклера GeneAmp® PCR System 9700 (Ref: 200005, Applied Biosystems).

Количественные ПЦР проводили с использованием системы детекции в реальном времени CFX96 Touch™ - C1000, сертицифирован IVD (188-5095 IVD, BioRad).

Последовательность микроРНК, представляющая интерес, и идентификатор анализов Taq Man представлены в следующей таблице:

ID микроРНК	**Последовательность**	**номер miRbase**	**ID теста**
hsa-miR-452-5p	AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA	MIMAT0001635	001032

	(идентификатор последовательности №1)		

Синтетические hsa-микроРНК (Integrated DNA Technologies) разводили до 3,125 фмоль/мл и 5 мкл использовали для обратной транскрипции одновременно с РНК, выделенной из образцов сыворотки. Продукт серийно разводили и проводили ПЦР для всех образцов (стандартов и РНК, полученных из сыворотки). Стандартную кривую строили и использовали для преобразования данных Cq в копии/мкл. Режим определения Cq - регрессия. Количественная оценка выражена в копиях/мкл сывороточного формата.

Для синтетических hsa-микроРНК поставщиком являлся IDT.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Во-первых, циркулирующие уровни 2083 видов микроРНК были одновременно измерены в 1216 образцах сыворотки из GOLDEN-DIAG (270 при включении, 223 - через год), OBESE (253 образца при включении), RESOLVE-IT (370 образцов при посещении для скрининга) и HEALTHY (100 субъектов EFS) с помощью секвенирования следующего поколения на HTG Edge Sequencing для беспристрастного отбора микроРНК, циркулирующие уровни которых могли бы различать пациентов TBT2 (определение TBT2=NAS ≥4 и F≥ 2, и, по меньшей мере, один балл по стеатозу, лобулярному воспалению и баллонированию гепатоцитов) и субъектов NTBT2 (субъект NTBT2 отличается от субъекта TBT2, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза). Пациентов TBT2 следует лечить в связи с повышенным риском развития таких серьезных заболеваний печени, как цирроз печени, HCC, печеночная недостаточность, пересадка печени и отказ печени.

Из этого анализа авторы изобретения идентифицировали mir-452, которая обычно имела повышенную экспрессию в образцах сыворотки пациентов TBT2 по сравнению с пациентами NTBT2 в когортах GOLDEN-DIAG, OBESE и RESOLVE-IT при включении.

Как показано в таблице 1, и является значимым и неожиданным, в когортах GOLDEN-DIAG, OBESE и RESOLVE-IT число прочтений на миллион для hsa-miR452-5p было значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2.

Например, 36 RPM (прочтений на миллион) было получено у пациентов TBT2 по сравнению с 21 RPM для пациентов NTBT2 для hsa-miR452-5p в GOLDEN-DIAG при включении.

Авторы изобретения также использовали биопсию печени и образцы сыворотки, собранные в конце годичного периода лечения в испытании GOLDEN, в качестве третьего независимого набора данных и еще раз подтвердили, что число прочтений на миллион для hsa-miR-452-5p было значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2.

Эти результаты были подтверждены в независимых когортах OBESE и RESOLVE-IT между пациентами TBT2 и NTBT2.

В когортах GOLDEN-DIAG, OBESE и RESOLVE-IT сывороточные концентрации miR-452-5p были значимо выше у NTBT2 (пациенты с NAFLD с минимальными

гистологическими очагами), чем в сыворотки у субъектов когорты HEALTHY (таблица 1).

GOLDEN-DIAG - при включении				
hsa_микроРНК	**Прочтений на миллион у NTBT2**	**Прочтений на миллион у TBT2**	**Кратность изменения**	**p-значение**
hsa-miR-452-5p	21	36	1,61	1,24E-05
GOLDEN-DIAG - через год				
hsa_микроРНК	**Прочтений на миллион у NTBT2**	**Прочтений на миллион у TBT2**	**Кратность изменения**	**p-значение**
hsa-miR-452-5p	21	40	1,97	1,83E-08
OBESE				
hsa_микроРНК	**Прочтений на миллион у NTBT2**	**Прочтений на миллион у TBT2**	**Кратность изменения**	**p-значение**
hsa-miR-452-5p	10	17	1,60	5,50E-04
RESOLVE-IT At inclusion				
hsa_микроРНК	**Прочтений на миллион у NTBT2**	**Прочтений на миллион у TBT2**	**Кратность изменения**	**p-значение**
hsa-miR-452-5p	23	32	1,53	1,14E-04
HEALTHY				
hsa-микроРНК	**RPM**			
hsa-miR-452-5p	6			

Таблица 1: Эксперименты по секвенированию HGT-Edge и количеству прочтений на миллион (RPM), полученных для hsa-miR-452-5p у пациентов, подлежащих лечению (TBT2), по сравнению с пациентами, не подлежащими лечению (NTBT2). Прочтения на миллион (RPM) выражены как среднее значение для групп пациентов с NTBT2 и TBT2 (исследование GOLDEN-DIAG - при включении (109 пациентов TBT2 и 161 NTBT2) и GOLDEN-DIAG - через год (76 TBT2 и 147 NTBT2); OBESE (50 TBT2 и 202 NTBT2 пациентов); RESOLVE-IT (87 TBT2 и 90 NTBT2), соответственно; TBT2 относится к пациентам с NAS $\geq$ 4, по меньшей мере, с 1 баллом по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению и стадией фиброза $\geq$ 2 при гистологическом исследовании биопсии печени. Субъект NTBT2 отличается от субъекта TBT2 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза. Субъектами когорты

HEALTHY (здоровыми) являются 100 субъектов EFS, не принимающих лекарства, RPM выражены как средние значения 100 субъектов. Субъекты EFS (Etablissement Français du Sang) являются здоровыми субъектами, не принимающими лекарства.

В целях подтверждения уровни hsa-mir-452-5p затем измеряли, используя метод золотого стандарта для количественного определения олигонуклеотидов в биологических жидкостях, количественную ОТ-ПЦР, с использованием специфических анализов miRNA TaqMan. Результат можно подвести следующим образом:

- Как показано в таблице 2 и на фигурах 1-2-3-4, в трех группах при включении и в GOLDEN-DIAG на 52 неделе концентрация hsa-mir-452-5p в сыворотке была значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2.

GOLDEN-DIAG - при включении									
Количественная ОТ-ПЦР	**Копий.мкл-1 у NTBT2**			**Копий.мкл-1 у TBT2**			**TBT2/NTBT2**		
Копий.мкл-1 в сыворотке	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Кратность изменения**	**p-значение**	**AUC**
hsa-miR-452-5p	12	11	1	23	17	2	1,84	< 0,0001	0,72
GOLDEN-DIAG - через год									
Количественная ОТ-ПЦР	**Копий.мкл-1 у NTBT2**			**Копий.мкл-1 у TBT2**			**TBT2/NTBT2**		
Копий.мкл-1 в сыворотке	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Кратность изменения**	**p-значение**	**AUC**
hsa-miR-452-5p	13	10	1	23	18	2	1,77	< 0,0001	0,71

OBESE									
Количественная ОТ-ПЦР	**Копий.мкл-1 у NTBT2**			**Копий.мкл-1 у TBT2**			**TBT2/NTBT2**		
Копий.мкл-1 в сыворотке	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Кратность изменения**	**p-значение**	**AUC**

hsa-miR-452-5p	13	8	1	24	19	3	1,83	< 0,0001	0,72

RESOLVE-IT									
Количественная ОТ-ПЦР	**Копий.мкл-1 у NTBT2**			**Копий.мкл-1 у TBT2**			**TBT2/NTBT2**		
Копий.мкл-1 в сыворотке	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Средние уровни**	**SD**	**SEM**	**Кратность изменения**	**p-значение**	**AUC**
hsa-miR-452-5p	14	12	1	27	25	2	1,93	<0,0001	0,73

Таблица 2: эксперименты количественной ОТ-ПЦР для подтверждения/валидации сверхэкспрессии hsa-miR-452-5p у пациентов, подлежащих лечению (TBT2), по сравнению с пациентами, не подлежащих лечению (NTBT2). Статистическая значимость TBT2 против NTBT2 рассчитывалась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. TBT2 относится к пациентам с NAS ≥ 4 со баллами по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению ≥ 1 и стадией фиброза ≥ 2 при гистологическом исследовании биопсии печени. AUC=Площадь под кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов была получена для идентификации TBT2 по сравнению с NTBT2.

- Как показано на фигуре 1, при применении второго определения пациентов TBT и пациентов с NTBT (TBT1 против NTBT1) в когорте GOLDEN-DIAG при включении, анализы показали, что концентрация hsa-miR-452-5p в сыворотке была значимо выше у пациентов TBT1, чем у пациентов с NTBT1. В этих анализах TBT1 относится к пациентам с NAS ≥ 4, по меньшей мере с 1 баллом по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению и стадией фиброза ≥ 1 при гистологическом исследовании биопсии печени. Субъект NTBT1 отличается от субъекта TBT1 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза.

- Как показано на фигуре 1, при применении третьего определения пациентов TBT и пациентов с NTBT (TBT7 против NTBT7) в когорте GOLDEN-DIAG при включении, анализы показали, что концентрация hsa-miR-452-5p в сыворотке была значимо выше у пациентов с TBT7 чем у пациентов NTBT7. В этих анализах TBT7 относится к пациентам с NAS ≥ 4, по меньшей мере с 1 баллом по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению и стадией фиброза ≥ 1при гистологическом исследовании биопсии печени. Субъект NTBT1 отличается от субъекта TBT1 более низкой оценкой, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов,

лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза.

- Как показано на фигурах 2, 3 и 4, в трех когортах концентрации hsa-miR-452-5p в сыворотке были значимо выше у пациентов с активным NASH (NAS ≥ 4, по меньшей мере с 1 баллом по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению), чем у пациентов без NASH и с умеренным NASH (NAS <4).

- Как показано на фигурах 2, 3 и 4, в трех когортах концентрации hsa-mir-452-5p в сыворотке были значимо выше у пациентов со значительным фиброзом или более высокой стадией фиброза (F ≥ 2), чем у пациентов с отсутствующим или минимальным фиброзом (F<2). Дальнейший анализ экспериментов количественной ОТ-ПЦР, выполненных на образцах сыворотки из GOLDEN-DIAG при включении, показал сильную корреляцию между уровнями циркулирующих видов miR-452 и гистологическими баллами и стадией фиброза (аналогичные результаты были получены с использованием образцов OBESE и RESOLVE-IT):

- Как показано на фигуре 5, уровень hsa-miR-452-5p в крови положительно коррелирует с баллом по стеатозу, баллом по лобулярному воспалению и баллом по баллонированию гепатоцитов. Следовательно, уровень циркулирующей miR-452-5p достоверно и положительно коррелирует с NAS и индексом активности. Наконец, присутствовала сильная корреляция между уровнем циркулирующей miR-452-5p и стадией фиброза.

Результаты, представленные в следующей таблице 3, иллюстрируют значимые корреляции между изменениями уровней циркулирующей hsa-miR-452-5p и эволюцией NAS, индекса активности NASH и фиброза через 52 недели у пациентов когорты GOLDEN.

GOLDEN-DIAG *(Неделя 52-Включение)* *Изменение концентрации* m*iR в сыворотке (Δ*m*iR) в сравнении с эволюцией индекса активности (ΔAI)*				
	Улучшение (Δ AI <0)	стабильный (Δ AI=0)	Обострение (Δ AI> 0)	P-значение (Тест Крускала-Уоллиса)
ΔmiR—□□□—□p□ □копий.мкл$^{-1}$)	-1,81 ± 1,54	1,237 ± 1,61	0,56 ± 2,26	0,2124
GOLDEN-DIAG *(Неделя 52-Включение)* *Изменение концентрации* m*iR в сыворотке (Δ*m*iR) в сравнении с эволюцией* NAS (*ΔNAS*)				
	Улучшение (ΔNAS<0)	стабильный (ΔNAS=0)	Обострение (ΔNAS>0)	P-значение (Тест Крускала-

				Уоллиса)
ΔmiR—□□□—□р□□копий.мкл$^{-1}$)	-2,39 ± 1,60	2,069 ± 1,64	0,8237 ± 1,95	0,055
GOLDEN-DIAG *(Неделя 52-Включение)* *Изменение концентрации* m*iR в сыворотке (Δ*m*iR) в сравнении с эволюцией фиброза (ΔF)*				
	Улучшение (ΔF <0)	стабильный (ΔF=0)	Обострение (ΔF>0)	P-значение (Тест Крускала-Уоллиса)
ΔmiR—□□□—□р□□копий.мкл$^{-1}$□	-1,491 ± 1,45	-0,23 ± 1,32	1,01 ± 3,15	0,7550

Таблица 3: Корреляция изменений в сывороточных уровнях hsa-miR-452-5p и эволюции индекса активности (AI), NAS и фиброза в течение годичного исследования GOLDEN.

В заключение:

i) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах сыворотки и плазмы с использованием двух разных методологий (HTG Edge-Seq и количественная ОТ-ПЦР), подтверждают использование относящихся к hsa-mir452-5, и, в более общем виде, hsa-miR452, олигонуклеотидов в качестве циркулирующих диагностических биомаркеров для идентификации пациентов с NAFLD (NAS ≥1), NASH (NAS≥3, по меньшей мере 1 балл по стеатозу, по меньшей мере 1 балл по лобулярному воспалению и по меньшей мере 1 балл по баллонированию гепатоцитов), активным NASH (NAS≥4, по меньшей мере 1 балл по стеатозу, по меньшей мере 1 балл по лобулярному воспалению и по меньшей мере 1 балл по баллонированию гепатоцитов), значительным фиброзом (F≥2) и/или активным NASH и фиброзом (TBT1, TBT2, TBT7).

ii) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах сыворотки, подтверждают использование видов hsa-miR452 в качестве циркулирующих диагностических биомаркеров для неинвазивной классификации гистологических очагов (стеатоз, лобулярное воспаление, баллонирование гепатоцитов), оценки активности NASH (NAS или индекс активности) и оценки тяжести заболевания (стадия фиброза) у субъекта.

iii) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах сыворотки и плазмы, подтверждают использование видов hsa-miR452 в качестве циркулирующих диагностических биомаркеров для неинвазивной классификации гистологических очагов (стеатоз, лобулярное воспаление, баллонирование гепатоцитов), оценки активности NASH (NAS или индекс активности) и оценки тяжести заболевания (стадия фиброза) у субъекта.

iv) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах

сыворотки и плазмы, подтверждают использование видов hsa-miR452 в качестве циркулирующих биомаркеров для мониторинга эволюции активности NAFLD, активности NASH или стадии фиброза у одного и того же пациента, подвергающегося или не подвергающегося лечению лекарственным препаратом против NAFLD, лекарственным препаратом против NASH или противофиброзным лекарственным препаратом.

v) наконец, уровень техники, связывающий уровень активности NASH с риском развития фиброза и связывающий стадию фиброза с риском отдаленных исходов печени (цирроз печени, трансплантация печени, HCC или отказ печени), поддерживает виды miR452 в качестве прогностических биомаркеров для оценки риска развития фиброза до цирроза и оценки риска долгосрочных серьезных осложнений.

Список литературы

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики или мониторинга неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или фиброза печени, и/или для определения эффективности лечения NAFLD, NASH и/или фиброза печени, включающий в себя определение уровня miR-452 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

2. Способ по п. 1, в котором miR-452 представляет собой hsa-miR-452, в частности, hsa-miR-452-5p, hsa-miR-452-3p.

3. Способ по п. 1 или 2, включающий в себя определение уровня hsa-miR-452-5p.

4. Способ по любому из п. 1 или 3, в котором образец биологической жидкости представляет собой образец крови, плазмы или сыворотки.

5. Способ по любому из п. 1-4, в котором уровень miR-452 сравнивают с контрольными уровнями miR-452.

6. Способ по п. 5, в котором уровень miR-452, который выше контрольных уровней, полученных в образцах от здоровых субъектов без стеатоза печени, указывает на наличие NAFLD.

7. Способ по п. 2, в котором уровень указанной по меньшей мере одной микроРНК, который выше, чем контрольный уровень, полученный в образцах от здоровых субъектов без стеатоза печени, указывает наличие NAFL.

8. Способ по п. 5, в котором уровень miR-452, который выше, чем уровни контрольного диапазона, полученные в образцах от субъекта без NASH, указывает на наличие NASH, определенного как по меньшей мере один балл при стеатозу, лобулярному воспалению и баллонированию гепатоцитов.

9. Способ по п. 5, в котором уровень miR-452, который выше, чем уровень контрольного диапазона, полученный в образцах от субъектов без активного NASH, указывает на наличие активного NASH, определенного как NAS≥4, по меньшей мере с одним баллом при стеатозу, лобулярному воспалению и баллонированию гепатоцитов.

10. Способ по п. 5, в котором уровень miR-452, который выше контрольных уровней, полученных в образцах от субъектов с отсутствующим или минимальным фиброзом печени (F=0 или 1), указывает на наличие значимого (F=2), умеренного (F=3) или тяжелого (F=4) фиброза печени.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий в себя классификацию субъекта как потенциального получающего (TBT) или не получающего (NTBT) лечение NASH и/или фиброза печени, на основании обнаружения повышенного уровня miR-452 относительно контрольного уровня miR-452, измеренного у субъектов NTBT.

12. Способ по п. 11, в котором субъекты TBT и NTBT имеют следующие оценки, полученные при биопсии печени:

а) <u>TBT1:</u>

балл по стеатозу ≥ 1

балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1

балл по лобулярному воспалению ≥ 1

NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4

стадия фиброза ≥ 1 (например, стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4)

NTBT1:

отличается от TBT1 по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза;

или

b) TBT2:

балл по стеатозу ≥ 1

балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1

балл по лобулярному воспалению ≥ 1

NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4

стадия фиброза ≥2 (например, стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3)

NTBT2:

отличается от TBT по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза;

или

c) TBT7:

балл по стеатозу ≥ 1

балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1

балл по лобулярному воспалению ≥ 1

NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4

стадия фиброза=1b, 1c, 2, 3 или 4

NTBT7:

отличается от TBT по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий в себя мониторинг эволюции активности, активности NAFLD, активности NASH или фиброза печени у субъекта на основе эволюции уровня miR-452 в образцах, собранных в два или более разных моментов времени у одного и того же субъекта.

14. Способ по любому из п. 1-13 для оценки эффективности лечения NAFLD, NASH или фиброза печени, основанный на эволюции уровня miR-452 в образцах, собранных в два или более разных моментов времени у одного и того же субъекта.

15. Соединение против NAFLD, против NASH или против фиброза для применения в способе лечения субъекта, имеющего NAFLD, NASH или фиброз печени, соответственно, при этом субъект диагностирован или классифицирован как подлежащий лечению пациент вследствие NAFLD, NASH или фиброза печени по любому из п. 1-11, и введение указанного соединения указанному диагностированному субъекту.

16. Ингибирующее miR-452 соединение для применения в способе лечения субъекта, имеющего NAFLD, NASH и/или фиброз печени.

17. Ингибирующее miR-452 соединение для применения по п. 16, при этом субъект был диагностирован или классифицирован для лечения по любому из п. 1-11.

18. Способ диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или определения активности, стадии или тяжести NASH у субъекта и/или для классификации субъекта как получающего или не получающего лечение NASH и/или для оценки эффективности медикаментозного лечения, и/или для определения прогрессирования или репрессирования патологии у пациентов с NASH, и/или для классификации пациента в качестве потенциального респондера или не-респондера на медикаментозное лечение и/или для предсказания исхода заболевания у пациента, и/или для определения суррогатных маркеров клинически значимых результатов, включающий в себя измерение уровня циркулирующей hsa-miR-452 в крови, сыворотке или плазме крови и, по меньшей мере, одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени.

19. Способ по п. 18 для диагностики NASH или для классификации субъекта в качестве получающего или не получающего лечение NASH.

20. Набор, содержащий средство для определения уровня:

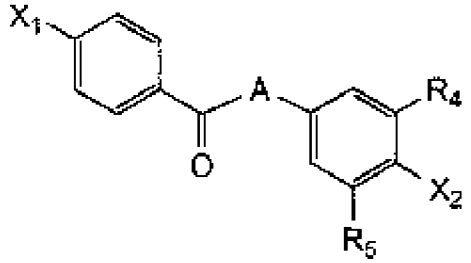
(i) hsa-miR-452 (в частности, hsa-miR-452-5p) и

(ii) по меньшей мере, одного маркера повреждения печени, циркулирующего в сыворотке или плазме крови.

21. Набор по п. 20 для применения в способе по любому из п. 1-19.

22. Молекула против NASH для применения в способе лечения NASH, при этом указанную молекулу против NASH вводят пациенту, нуждающемуся в этом, диагностированному как имеющему NASH или классифицированному по способу по любому из п. 1-19.

23. Молекула против NASH для применения по п. 22, при этом указанная молекула имеет формулу (I):



в которой:

X1 представляет собой галоген, группу R1 или G1-R1;

A представляет собой CH=CH или группу CH2-CH2;

X2 представляет группу G2-R2;

G1 и G2, одинаковые или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

R1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу,

арильную группу или алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, алкокси или алкилтиогруппу, циклоалкильные группы, циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

R2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, группой -COOR3, где R3 представляет собой атом водорода или алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами.

R4 и R5, одинаковые или разные, представляют собой алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

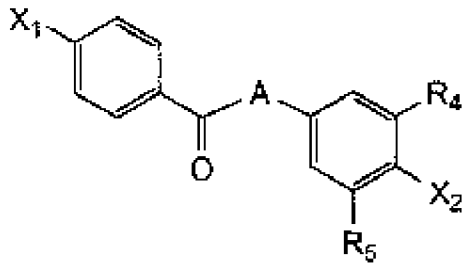
или его фармацевтически приемлемая соль.

24. Молекула против NASH для применения по п. 22 или 23, при этом соединение выбрано из группы, состоящей из 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1-[4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонил диметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1-[4-трифторметилоксифенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилоксифенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксиоксифенил] проп-2-ен-1-он, 2 - [2,6-диметил-4- [3- [4- (метилтио) фенил] -3-оксопропил] фенокси] -2-метилпропановая кислота и 2- [2,6-диметил-4- [3 - [4- (метилтио) фенил] -3-оксопропил] фенокси] -2-метилпропановой кислоты изопропилового эфира; или его фармацевтически приемлемой соли, в частности 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он или его фармацевтически приемлемой соли.

25. Способ по любому из п. 22-24, в котором молекула против NASH представляет собой элафибранор, необязательно объединенный с другой молекулой против NASH, такой как нитазоксанид, витамин Е или пиоглитазон, обетихоловая кислота, элафибранор, селонсертиб, сароглитазар и ценикривок.

26. Молекула против фиброза для применения в способе лечения фиброза печени, при этом указанную молекулу против фиброза вводят пациенту, нуждающемуся в этом, который был диагностирован как имеющий фиброз печени, или классифицирован как подлежащий лечению пациент, или классифицированный как получатель лечения фиброза печени по любому из п. 1-19.

27. Молекула против фиброза для применения по п. 26, при этом указанная молекула имеет формулу (I):



в которой:

X1 представляет собой галоген, группу R1 или G1-R1;

A представляет собой CH=CH или группу CH2-CH2;

X2 представляет группу G2-R2;

G1 и G2, одинаковые или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

R1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, алкокси или алкилтиогруппу, циклоалкильные группы, циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

R2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, группой -COOR3, где R3 представляет собой атом водорода или алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами.

R4 и R5, одинаковые или разные, представляют собой алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемая соль.

28. Молекула против фиброза для применения по п. 25 или 26, при этом соединение выбрано из группы, состоящей из 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонил диметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилфенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1-[4-трифторметилоксифенил] -3- [3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он, 1- [4-трифторметилоксифенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксиоксифенил] проп-2-ен-1-он, 2 - [2,6-диметил-4- [3- [4- (метилтио) фенил] -3-оксопропил] фенокси] -2-метилпропановая кислота и 2- [2,6-диметил-4- [3 - [4- (метилтио) фенил] -3-оксопропил] фенокси] -2-метилпропановой кислоты изопропилового эфира; или его фармацевтически приемлемой соли, в частности 1- [4-метилтиофенил] -3- [3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-он или его фармацевтически приемлемой соли.

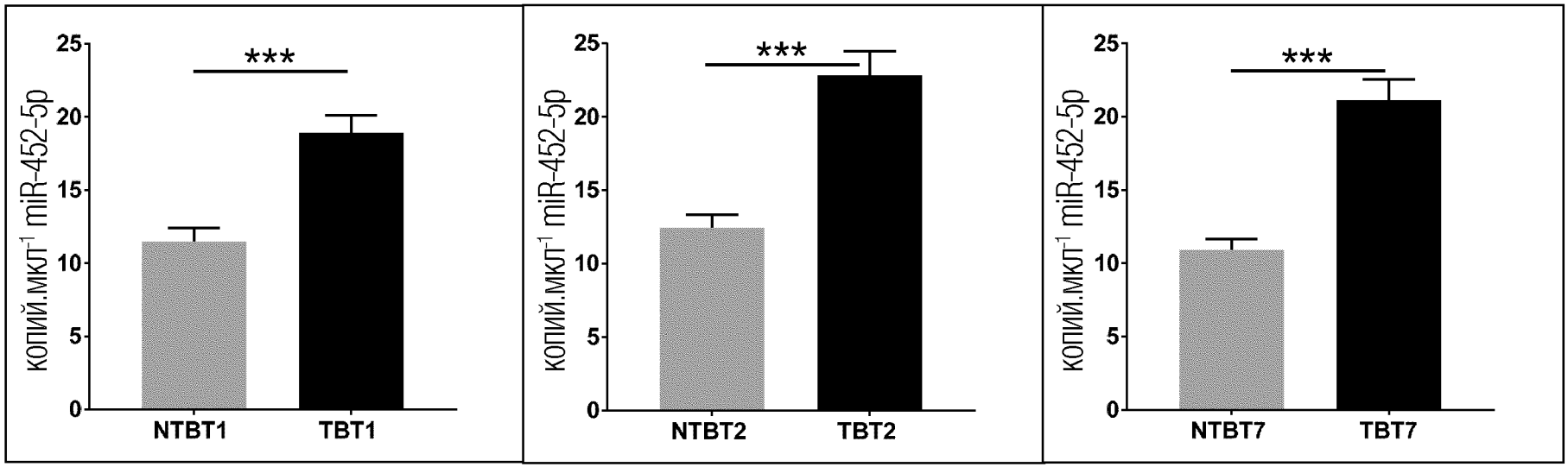
29. Способ по любому из п. 25-27, в котором молекула против фиброза

представляет собой элафибранор, необязательно объединенный с другой молекулой против фиброза, такой как нитазоксанид, витамин Е или пиоглитазон, обетихоловая кислота, элафибранор, селонсертиб, сароглитазар и ценикривок.

30. Способ по любому из п. 25-27, в котором молекула против фиброза представляет собой нитазоксанид, необязательно объединенный с другой молекулой против фиброза, такой как витамин Е или пиоглитазон, обетихоловая кислота, элафибранор, селонсертиб, сароглитазар и ценикривок.

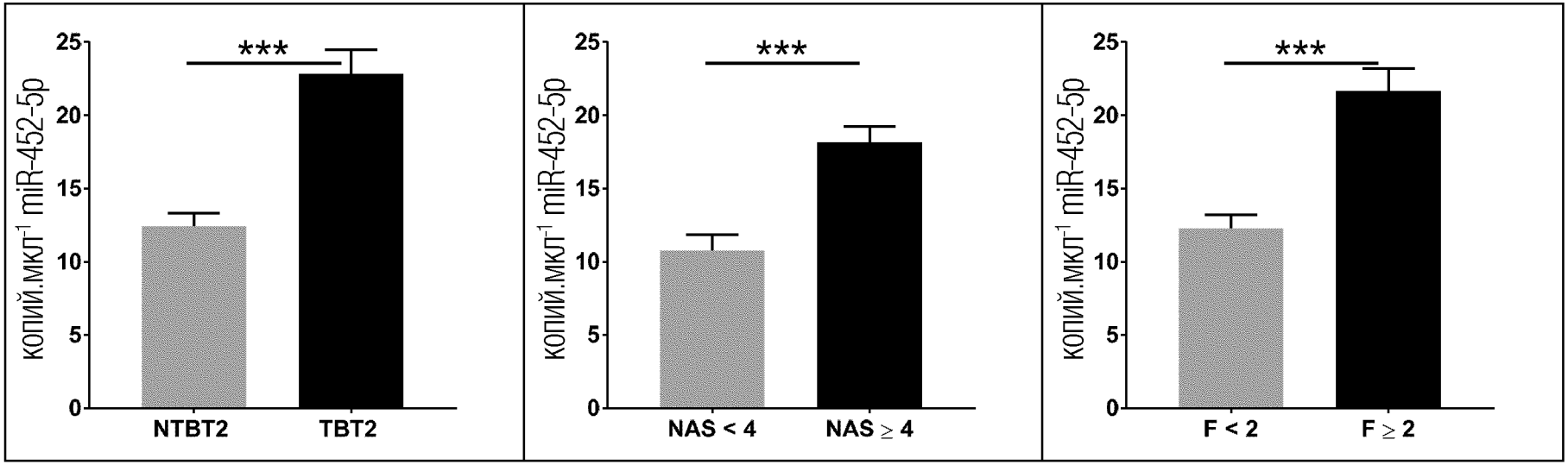
По доверенности

GOLDEN-Diag



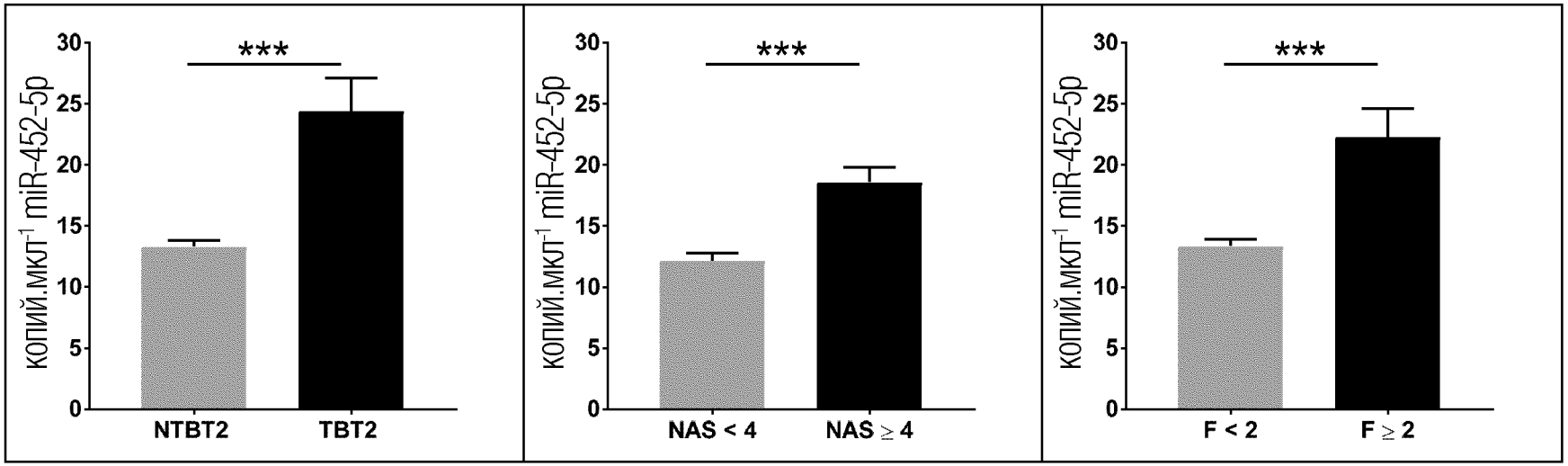
ФИГ. 1

GOLDEN-Diag



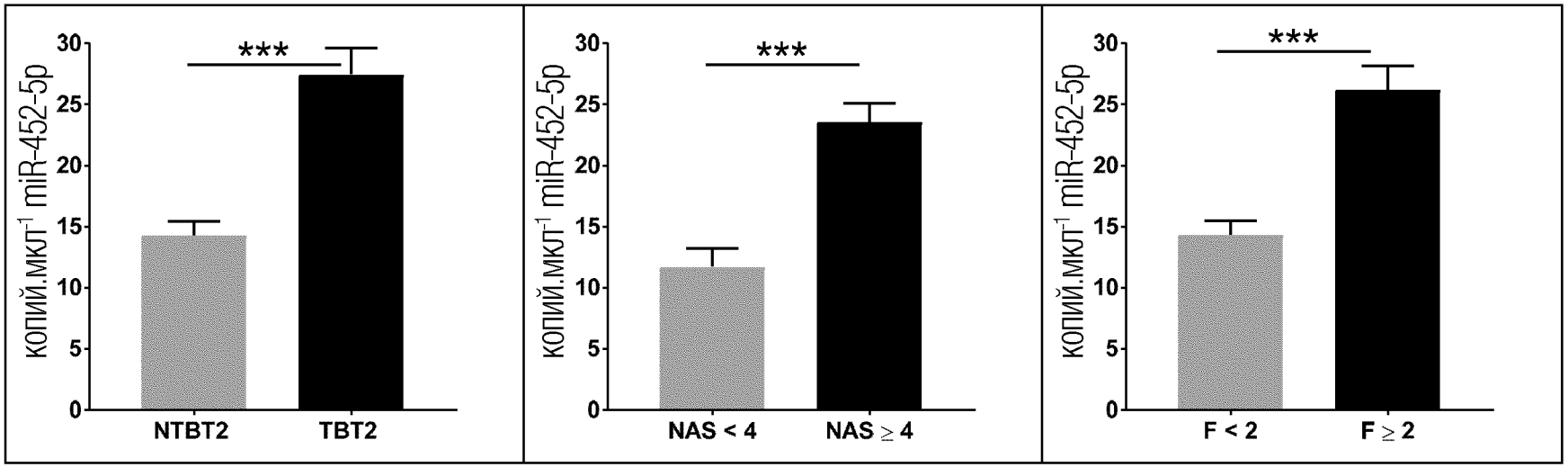
ФИГ. 2

OBESE


копий.мкл-1 miR-452-5p
30
25
20
15
10
5
0
***
NTBT2
TBT2
NAS < 4
NAS ≥ 4
F < 2
F ≥ 2

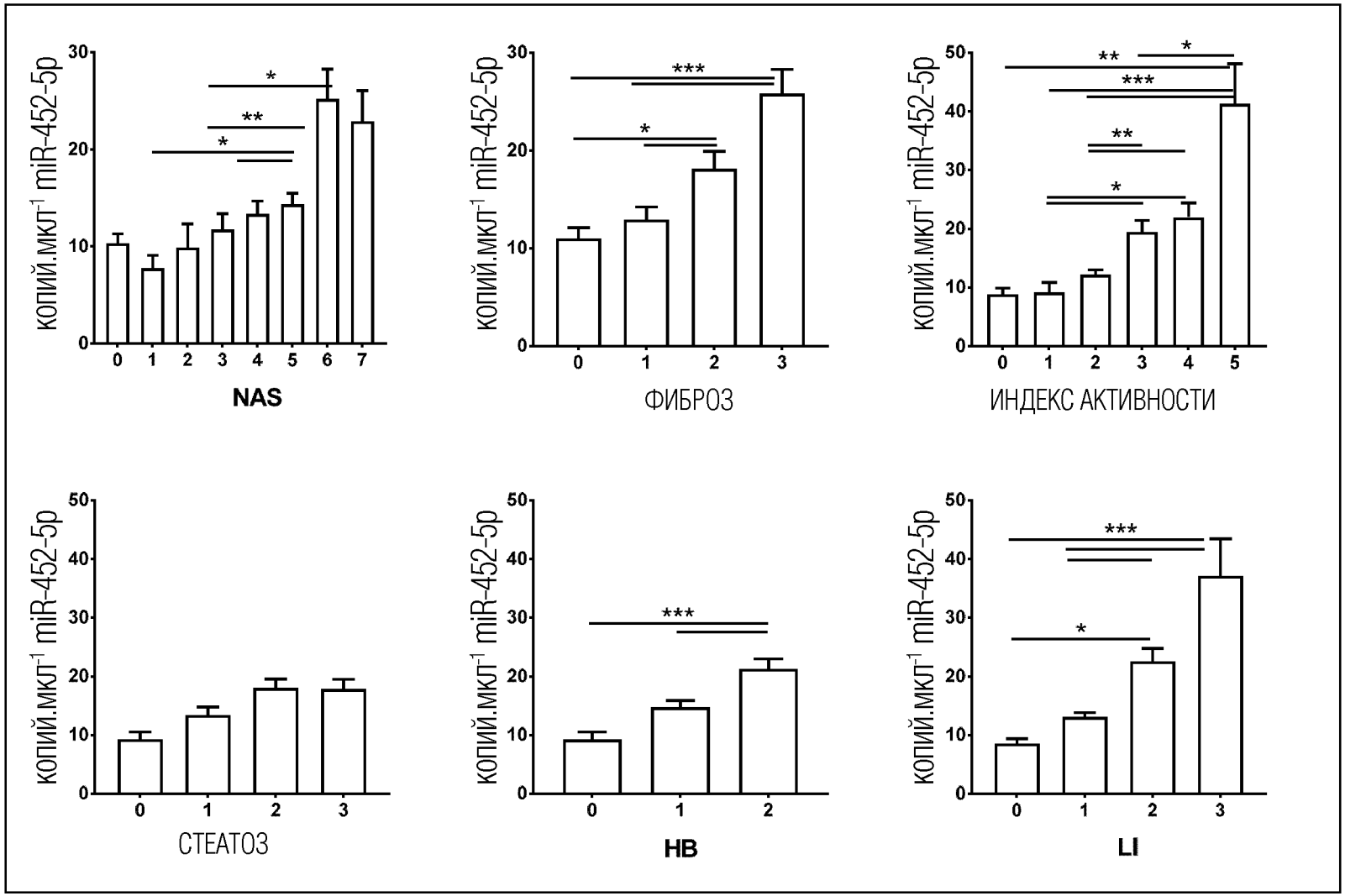
ФИГ. 3

RESOLVE-IT



ФИГ. 4

GOLDEN DIAG



ФИГ. 5