

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043166**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Номер заявки
201890724

(22) Дата подачи заявки
2016.09.14

(54) СПОСОБЫ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

(31) **15306412.6**

(32) **2015.09.14**

(33) **EP**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/EP2016/071727**

(87) **WO 2017/046181 2017.03.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:
**Дартей Рафаэль, Кордоннье
Женевьев, Брозек Джон, Прака
Эмили, Бен Судрик Фуад (FR)**

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

(56) **WO-A1-2013068348**

JOHN D. CLARKE ET AL.: "Circulating microRNA 122 in the methionine and choline-deficient mouse model of non-alcoholic steatohepatitis", JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY, vol. 34, № 6, 12 November 2013 (2013-11-12), p. 726-732, XP055246071, GB, ISSN: 0260-437X, DOI: 10.1002/jat.2960, the whole document

YAMADA HIROYA ET AL.: "Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver", CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 424, 30 May 2013 (2013-05-30), p. 99-103, XP028708555, ISSN: 0009-8981, DOI: 10.1016/J.CCA.2013.05.021, the whole document, abstract, table 1, p. 101, col. 1, first full para., fig. 2

WO-A1-2014049131

CN-A-104293908

KR-A-20140147920

VOLODYMYR P. TRYNDYAK ET AL.: "Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet", TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 262, № 1, 16 April 2012 (2012-04-16), p. 52-59, XP028517399, ISSN: 0041-008X, DOI: 10.1016/J.TAAP.2012.04.018 [retrieved on 2012-04-24], the whole document, fig. 4

(57) Изобретение относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH), определения активности, стадии или тяжести NASH или классификации индивидуума как потенциального реципиента или нереципиента лечения NASH. Оно также относится к набору для осуществления способа по изобретению и соединениям для применения в способе лечения NASH, где индивидуума, подлежащего лечению, идентифицируют, оценивают или классифицируют способом по изобретению.

B1**043166****043166 B1**

Область изобретения

Изобретение относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH), определения активности, стадии или тяжести NASH или классификации индивидуума как потенциального реципиента или нереципиента лечения NASH. Оно также относится к набору для осуществления способа по изобретению и соединениям для применения в способе лечения NASH, где индивидуума, подлежащего лечению, идентифицируют, оценивают или классифицируют способом по изобретению.

Предпосылки изобретения

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) является прогрессирующим заболеванием печени, гистологически характеризующимся накоплением жирных кислот, повреждением гепатоцитов и воспалением, напоминающим алкогольный гепатит. NASH является критической стадией процесса, прогрессирующего от жирового гепатоза до цирроза и печеночной недостаточности. Для постановки этого диагноза важна тщательная регистрация анамнеза с отсутствием значительного потребления алкоголя. NASH является одной из наиболее распространенных причин повышения аминотрансфераз у пациентов, направляемых на обследование к гепатологам. С NASH ассоциированы ожирение и диабет 2 типа. Так как распространенность этих заболеваний повышается, ожидают, что распространенность NASH также будет повышаться, и, таким образом, это заболевание становится новой проблемой общества в США, а также в других странах.

Хотя предпринято несколько попыток предложить неинвазивные способы диагностики и определения активности, стадии или тяжести NASH, в настоящее время гистологический анализ биоптатов печени остается оптимальным подходом для дифференциации NASH и ранних стадий стеатоза. Стеатоз, дольковое и портальное воспаление, повреждение гепатоцитов в форме баллонизирующей дегенерации и апоптоза и фиброз являются признаками NASH, оцениваемыми при биопсии. Однако биопсия печени имеет ряд очевидных недостатков.

Во-первых, материал, собираемый при биопсии печени, представляет собой лишь очень небольшую часть печени обследуемого индивидуума, что, таким образом, вызывает сомнения в том, характеризует ли полученный образец общее состояние органа индивидуума. Кроме того, биопсия печени является очень инвазивным способом, который может быть трудоемким, вызывающим беспокойство и болезненным для пациента и вызывающим озабоченность в отношении осложнений и смертности. И, наконец, в свете сказанного выше, биопсию печени нецелесообразно предлагать в качестве рутинной процедуры для определения того, имеет ли индивидуум из общей популяции, или даже пациенты, риск развития NASH, страдает ли NASH, и/или для определения активности, стадии или тяжести NASH у указанного индивидуума.

Таким образом, существует насущная потребность в точных неинвазивных способах диагностики и определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на очень тщательном и полном анализе большого количества перемешанных для более 300 образцов высокого качества, полученных из пациентов с NASH в ходе клинического испытания, проведенного заявителем (исследование GFT505-212-7 - NCT01694849), включающем гистологические данные, полученные при биопсии печени пациентов. Это исследование привело к открытию ключевых циркулирующих факторов (или биомаркеров), свидетельствующих о NASH и его тяжести, или стадии, или активности.

Таким образом, первый аспект изобретения относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) или определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, включающему измерение уровня по меньшей мере одного циркулирующего микроРНК-маркера NASH в крови, сыворотке или плазме и по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.

Предпочтительно этот первый аспект изобретения относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) или определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, включающему стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

- (i) альфа-2-макроглобулин;
- (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;
- (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
- (iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);
- (v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В конкретном варианте осуществления первого аспекта способ включает осуществление следующих измерений в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:

- (i) определение уровня альфа-2-макроглобулина;
- (ii) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;

- (iii) определение уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;
- (iv) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34, hsa-miR-122 и hsa-miR-192; и
- (v) определение уровня hsa-miR-200,

где повышение указанного уровня относительно контрольного образца свидетельствует о NASH и/или активности, стадии или тяжести NASH.

В дополнительном варианте осуществления первого аспекта изобретения измерение (ii) включает определение уровня, по меньшей мере, HbA1c; и/или измерение (iv) включает определение уровня, по меньшей мере, hsa-miR-34.

В другом аспекте способ по первому аспекту включает определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и где диагностируют NASH и/или определяют стадию, или активность, или тяжесть NASH с учетом указанных баллов NASH.

В другом варианте осуществления первого аспекта баллы NASH вычисляют с помощью следующей логистической функции:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

В конкретном варианте этого варианта осуществления

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0,001 до 1,02;

c является числом от 0,001 до 0,23;

d является числом от -0,77 до -0,001;

f является числом от -0,78 до -0,04.

В дополнительном варианте осуществления первого аспекта баллы NASH выше порогового значения от 0,102 до 0,6465 свидетельствует о тяжелом NASH или умеренной или высокой активности NASH.

В варианте этого варианта осуществления

k равно 25,13;

a равно 0,60;

b равно 0,48;

c равно 0,1;

d равно -0,43; и

f равно -0,45,

где пороговое значение составляет от 0,102 до 0,462 и более конкретно равно 0,23.

В альтернативном варианте этого варианта осуществления

k равно 21,35;

a равно 0,62;

b равно 0,55;

c равно 0,14;

d равно -0,38; и

f равно -0,39,

где пороговое значение составляет от 0,2319 до 0,6465 и более конкретно равно 0,4343

Второй аспект изобретения относится к способу классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающему измерение уровня по меньшей мере одного циркулирующего микроРНК-маркера NASH в крови, сыворотке или плазме и по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или

плазме.

Предпочтительно этот второй аспект изобретения относится к способу классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающему стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

- (i) альфа-2-макроглобулин;
- (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;
- (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
- (iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);
- (v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В конкретном варианте осуществления второго аспекта изобретения способ включает осуществление следующих измерений в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:

- (i) определение уровня альфа-2-макроглобулина;
- (ii) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;
- (iii) определение уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;
- (iv) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p); и
- (v) определение уровня hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p), где баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и где индивидуума классифицируют как реципиента или нереципиента лечения NASH на основе указанных баллов.

В дополнительном варианте осуществления второго аспекта

измерение (ii) включает определение уровня, по меньшей мере, HbA1c; и/или

измерение (iv) включает определение уровня, по меньшей мере, hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p).

В другом варианте осуществления второго аспекта способ включает определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В еще одном варианте осуществления второго аспекта баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

В варианте этого варианта осуществления

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0,001 до 1,02;

c является числом от 0,001 до 0,23;

d является числом от -0,77 до -0,001;

f является числом от -0,78 до -0,04.

В еще одном варианте осуществления второго аспекта индивидуума классифицируют как реципиента лечения, если S выше порогового значения от 0,102 до 0,6465.

В варианте этого варианта осуществления

k равно 25,13;

a равно 0,6;
b равно 0,48;
c равно 0,1;
d равно -0,43; и
f равно -0,45,

где пороговое значение составляет от 0,102 до 0,462 и более конкретно равно 0,23.

В альтернативном варианте этого варианта осуществления

k равно 21,35;
a равно 0,62;
b равно 0,55;
c равно 0,14;
d равно -0,38; и
f равно -0,39,

где пороговое значение составляет от 0,2319 до 0,6465 и более конкретно равно 0,4343.

Третий аспект изобретения относится к способу вычисления баллов NASH, свидетельствующих о неалкогольном стеатогепатите (NASH) или активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, где указанные баллы основаны на измерении по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и, по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

- (i) альфа-2-макроглобулин;
- (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;
- (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
- (iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);
- (v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В варианте осуществления третьего аспекта следующие показатели (i)-(v) определяют в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:

- (i) уровень альфа-2-макроглобулина;
- (ii) уровень по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;
- (iii) уровень N-концевого про-пептида коллагена типа III;
- (iv) уровень по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p); и
- (v) уровень of hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В конкретном варианте осуществления третьего аспекта способ включает определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p), где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

В конкретном варианте этого варианта осуществления

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0,001 до 1,02;

c является числом от 0,001 до 0,23;

d является числом от -0,77 до -0,001;

f является числом от -0,78 до -0,04.

В другом конкретном варианте этого варианта осуществления

k равно 25,13;

a равно 0,6;

b равно 0,48;

c равно 0,1;

d равно -0,43; и

f равно -0,45.

В другом конкретном варианте этого варианта осуществления

k равно 21,35;

a равно 0,62;

b равно 0,55;

c равно 0,14;

d равно -0,38; и

f равно -0,39.

В четвертом аспекте изобретение относится к набору, содержащему средства для определения уровня:

(i) альфа-2-макроглобулина;

(ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;

(iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p); и

(v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В варианте осуществления набор по четвертому аспекту содержит средства для определения уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В пятом аспекте изобретение относится к способу лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающему

(a) диагностику NASH или определение активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума описанным выше способом;

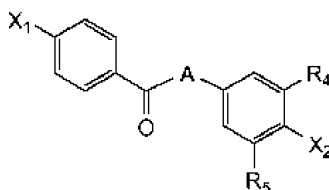
(b) введение лекарственного средства от NASH указанному индивидууму в соответствии со стадией (a).

В шестом аспекте изобретение относится к способу лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающему

(a) классификацию указанного индивидуума описанным выше способом;

(b) введение лекарственного средства от NASH индивидууму, если указанного индивидуума классифицируют как реципиента лечения в соответствии со стадией (a).

В варианте осуществления пятого и шестого аспектов лечение включает введение индивидууму соединения формулы (I)



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

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

X₂ представляет собой G₂-R₂-группу;

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

R₁ представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами галогенов, алкокси- или алкилтиогруппой, циклоалкильными группами, циклоалкилтиогруппами или гетероциклическими группами;

R₂ представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, -COOR₃-группой, где R₃ представляет собой атом водорода, или алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами;

R₄ и R₅, идентичные или разные, представляют собой алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом конкретном варианте осуществления пятого и шестого аспектов соединение выбрано из группы, состоящей из

1-[4- метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4- метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метилпропионовой кислоты и изопропилового сложного эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метил-пропионовой

кислоты или их фармацевтически приемлемой соли.

В другом конкретном варианте осуществления пятого и шестого аспектов соединение является 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-оном или его фармацевтически приемлемой солью.

В другом конкретном варианте осуществления пятого и шестого аспектов лечение включает введение индивидууму соединения из табл. 1, представленной ниже.

Другие аспекты и варианты осуществления будут очевидны из следующего подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. А-Г представлено сравнение подсчета баллов NASH способом по изобретению, полученным из бутстрэп-модели (фиг. А) с существующими баллами.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) или определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума. Оно также относится к способу классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH). Эта классификация также может являться основой для дальнейшего определения того, необходимо ли подвергать индивидуума дополнительному подтверждению NASH известными в этой области способами, такими как биопсия печени.

Изобретение основано на идентификации определенного набора вычисляемых маркеров, которые при совокупном учете свидетельствуют о NASH и/или активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, тестируемого на NASH или его тяжесть, или стадию, или активность. В частности, изобретение относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) или определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, в котором комбинируют определение уровня циркулирующих микроРНК (мкРНК) и других циркулирующих маркеров повреждения печени.

Кроме того, данные, собранные авторами настоящего изобретения, обрабатывали в соответствии с двумя биостатистическими подходами, что приводило к определению баллов, свидетельствующих о заболевании и/или его тяжести или стадии или активности, и, таким образом, получению мощного, точного инструмента с высокой прогностической способностью для врача для простого определения того, страдает ли индивидуум NASH, или определения стадии, или активности, или тяжести заболевания. Эти баллы, также обозначаемые в представленном ниже описании как "баллы NASH", представляют собой неоценимый инструмент для практикующего специалиста и нуждающихся в этом индивидуумов, так как они делают возможной диагностику или определение тяжести, или стадии, или активности NASH неинвазивным способом, т.е. не основываясь на биопсии печени.

Способы по изобретению включают измерение по меньшей мере одного маркера, являющегося микроРНК-маркером, и по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени. Более конкретно способы по изобретению включают измерение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из групп (i), (ii) и (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из групп (iv) и (v), представленных ниже.

В конкретном варианте осуществления способы по изобретению включают измерение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из групп (i), (ii) и (iii), и по меньшей мере одного маркера из каждой из групп (iv) и (v);

по меньшей мере одного маркера, выбранного из каждой из групп (i) и (ii), или (ii) и (iii), или (i) и (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из групп (iv) и (v);

по меньшей мере одного маркера, выбранного из каждой из групп (i), (ii) и (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из групп (iv) и (v);

по меньшей мере одного маркера в каждой группе маркеров (i), (ii), (iii), (iv) и (v), представленных ниже, т.е.

маркера, указанного в (i); и

по меньшей мере одного маркера, указанного в (ii); и

маркера, указанного в (iii); и

по меньшей мере одного маркера, указанного в (iv);

маркера, указанного в (v).

Группы маркеров определены следующим образом:

(i) альфа-2-макроглобулин;

(ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;

(iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;

(iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);

(v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В рамках настоящего изобретения термин "неалкогольный стеатогепатит" или "NASH" определяют как наличие жирового гепатоза, баллонизирующей дегенерации гепатоцитов и воспаления печени. Помимо этого основного определения заболевания, NASH может дополнительно включать фиброз печени.

В рамках настоящего изобретения индивидуум представляет собой млекопитающего, в частности человека. Изобретение, благодаря его неинвазивной природе, можно применять к любому индивидууму, такому как индивидуум без известной или предполагаемой предрасположенности к NASH. Однако в конкретном варианте осуществления индивидуум является индивидуумом с риском развития NASH в будущем, таким как индивидуум с ожирением, диабетом, страдающий метаболическим синдромом или имеющий повышенные ферменты печени, или у кого ранее диагностировали заболевание неалкогольного ожирения печени (или жирового гепатоза). Индивидуум также может являться индивидуумом с уже идентифицированным NASH, таким образом, способ по изобретению позволяет определять риски эволюции заболевания в гепатокарциному, или необходимости трансплантации печени, или развития сердечно-сосудистого заболевания.

Уровни маркеров, измеряемых в настоящем изобретении, определяют в физиологической жидкости индивидуума, которая, в частности, может являться кровью, более конкретно образцом сыворотки или плазмы.

Уровень маркеров, идентифицированных авторами настоящего изобретения, можно определять общепринятыми способами, хорошо известными в этой области, такими как иммунологические анализы (например, ELISA), или молекулярные и биохимические анализы (количественная ПЦР, колориметрические анализы), или аналитическими способами (такими как масс-спектрометрия), в зависимости от типа биомаркера (такого как белок, микроРНК, уровень глюкозы). Если тестируемый маркер является микроРНК, его измерение можно осуществлять рядом способов, хорошо известных в этой области, таких как представленные в примерах ниже. В кратком изложении, измерения осуществляют с использованием тотальной РНК, выделенной из образца плазмы, в частности, бесклеточного, не содержащего тромбоциты образца плазмы. К образцу перед выделением РНК можно добавлять подходящий внутренний контроль (такой как микроРНК известной последовательности и количества, например, miR-39 C. elegans). Значения C_q определяют с использованием количественной ПЦР. Доступны коммерческие наборы для осуществления таких анализов. Например, qRT-ПЦР-анализ мкРНК Taqman: набор для обратной транскрипции микроРНК Taqman, 20-кратную смесь для анализа микроРНК TaqMan и универсальный мастер-микс TaqMan II (Applied Biosystems) можно использовать по инструкциям производителя. Обратную транскрипцию можно осуществлять с использованием доступных систем для ПЦР, таких как термоциклер GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), с подходящими параметрами циклов, такими как 16°C в течение 30 мин, затем 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин перед хранением при 4°C. Обратную транскрипцию можно осуществлять в мультиплексном формате. Затем количественную РСТ осуществляют с использованием системы для количественной ПЦР, такой как CFX96™ Real-Time System (термоциклер C1000 Touch™, BioRad). Условия проведения циклов могут быть следующими: 95°C в течение 10 мин, затем 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с всего в течение 50 циклов и 3°C в течение 30 с. Режимом определения C_q может являться "Регрессия" в системе для количественной ПЦР. В конкретном варианте осуществления значение C_q, определенное способом по изобретению, является значением C_q, получаемым с использованием указанных выше конкретных параметров и материала. Значения

Cq образцов можно исключать из анализа, если значения превышают максимум Cq стандартной кривой каждой мкРНК. Стандартную кривую можно использовать для оценки эффективности реакции. Серийное разведение можно осуществлять по восьми точкам, начиная с самого концентрированного образца кДНК, для обеспечения того, что стандартная кривая охватывает все потенциальные концентрации матрицы, обнаруживаемые при исследовании. Стандартную кривую можно получать, строя график log начального количества матрицы относительно полученных значений Cq.

В рамках настоящего изобретения индивидуума диагностируют как имеющего NASH, или диагностируют как потенциально имеющего NASH или вероятно имеющего NASH, если все уровни маркеров, выбранных и измеряемых в каждой из групп (i)-(v), повышенных при сравнении с референсными значениями, полученными с использованием контрольного (или референсного) образца. Референсный образец может соответствовать образцу физиологической жидкости, такому как образец крови, сыворотки или плазмы, полученный из одного или нескольких индивидуумов, например, двух или более, не имеющих NAFLD или NASH.

В рамках настоящего изобретения уровни биомаркеров, измеряемых, как описано выше, также можно использовать для определения баллов заболевания, также называемых баллами NASH. Баллы заболевания можно сравнивать с пороговым значением, позволяющим различать низкую, умеренную и высокую активность NASH или умеренный и тяжелый NASH. В рамках настоящего изобретения эту информацию преимущественно можно использовать для определения того, будут ли проводить индивидууму терапевтическое лечение NASH или нет. Лечение будут подвергать только индивидуумов с активностью NASH от средней до тяжелой или с тяжелым NASH. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающему определение уровня маркеров, как определено выше, вычисление баллов NASH и классификацию индивидуума как реципиента или нереципиента лечения с учетом указанных баллов NASH. Кроме того, классификацию индивидуума также можно использовать для определения низкой активности NASH или умеренного NASH у индивидуума и предоставления индивидууму, с учетом этой классификации рекомендаций по питанию и образу жизни для реверсирования NASH.

В рамках настоящего изобретения индивидуумов, классифицированных как имеющих активность NASH от умеренной до высокой или как пациентов с тяжелым NASH, рассматривают в качестве реципиентов, или потенциальных реципиентов, лечения NASH. В контексте настоящего изобретения пациент с активностью NASH от умеренной до высокой или тяжелым NASH определяют как или они эквивалентны пациенту со следующими степенями, определяемыми при биопсии печени:

степенью стеатоза ≥ 1 ;

степенью баллонизирующей дегенерации гепатоцитов ≥ 1 ;

степенью долькового воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллами активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму степени стеатоза, степени баллонизирующей дегенерации гепатоцитов и степени долькового воспаления);

стадий фиброза ≥ 2 (например, равной 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

В конкретном варианте осуществления баллы NASH по изобретению вычисляют с использованием следующих уровней маркеров, измеряемых, как описано выше:

уровня альфа-2-макроглобулина ^(LVBP_A2M_GL); и

уровня HbA1c ^(LBBC_HBA1C_PERC); и

уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III ^(LVB_P3NP); и

уровня hsa-miR-34 (в частности, miR-34a, более конкретно miR-34a-5p) ^(LVMK_HSA_MIR34A_MULTII_CQ); и

уровня hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p) ^(LVMK_HSA_MIR200A_MULTII_CQ).

В дополнительном конкретном варианте осуществления баллы определяют как логистическую функцию

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах (например, B равно 10, если измеренный процент HbA1c составляет 10%);

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p) в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;
 a является числом от 0,11 до 1,07;
 b является числом от 0 до 1,02;
 c является числом от 0 до 0,23;
 d является числом от -0,77 до 0;
 f является числом от -0,78 до 0.

В дополнительном конкретном варианте осуществления баллы вычисляют в соответствии с указанной выше логистической функцией, где

k является числом от 5,26 до 36,76;
 a является числом от 0,11 до 1,07;
 b является числом от 0,001 до 1,02;
 c является числом от 0,001 до 0,23;
 d является числом от -0,77 до -0,001;
 f является числом от -0,78 до -0,04.

Таким образом, баллы NASH представляют собой вероятность того, что индивидуум имеет активность NASH от умеренной до высокой или тяжелый NASH. Если S, определенное для индивидуума, выше или равно пороговому значению, индивидуума классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. Если S ниже порогового значения, индивидуума классифицируют как неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента рекомендаций по питанию и образу жизни для лечения его низкой активности NASH или умеренного NASH.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если S выше или равно пороговому значению от 0,102 до 0,6465.

В конкретном варианте осуществления из медианной модели, как описано в экспериментальной части настоящей заявки, получают, что

k равно 25,13;
 a равно 0,6;
 b равно 0,48;
 c равно 0,1;
 d равно -0,43; и
 f равно -0,45,

где пороговое значение составляет от 0,102 до 0,462 и более конкретно равно 0,23.

В конкретном варианте осуществления из бутстрэп-модели, как описано в экспериментальной части настоящей заявки, получают, что

k равно 21,35;
 a равно 0,62;
 b равно 0,55;
 c равно 0,14;
 d равно -0,38; и
 f равно -0,39,

где пороговое значение составляет от 0,2319 до 0,6465 и более конкретно равно 0,4343.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средства для определения уровня

- (i) альфа-2-макроглобулина;
- (ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;
- (iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;
- (iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p); и
- (v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный набор содержит средства для определения уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно miR-34a-5p) и hsa-miR-200a (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

Набор по изобретению, применимый для осуществления описанных выше способов, может необязательно дополнительно включать инструкции по осуществлению указанных способов. Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для осуществления измерений уровней маркеров, определенных выше. В частности, набор может содержать антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и/или праймеры, применимые для количественного анализа уровней микроРНК, как известно в этой области.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения NASH у индивидуума, включающему

(a) диагностику NASH или определение активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума представленными выше способами;

(b) введение лекарственного средства от NASH указанному индивидууму в соответствии со стадией (a).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения NASH у индивидуума, включающему

(a) классификацию указанного индивидуума способом классификации, как определено выше;

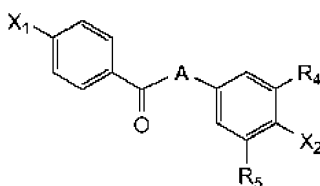
(b) введение лекарственного средства от NASH индивидууму, если указанного индивидуума классифицируют как реципиента лечения в соответствии со стадией (a).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у индивидуума, включающему

(a) классификацию указанного индивидуума способом классификации, как определено выше;

(b) предоставление рекомендаций по питанию и образу жизни индивидууму, если указанного индивидуума классифицируют как нереципиента лечения в соответствии со стадией (a).

Способ лечения NASH по настоящему изобретению включает введение одного или нескольких соединений нуждающемуся в этом, индивидууму таких как соединение формулы (I)



где X_1 представляет собой галоген, R_1 - или G_1 - R_1 -группу;

A представляет собой $CH=CH$ - или CH_2-CH_2 -группу;

X_2 представляет собой G_2 - R_2 -группу;

G_1 и G_2 , идентичные или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

R_1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами галогенов, алкокси- или алкилтиогруппой, циклоалкильными группами, циклоалкилтиогруппами или гетероциклическими группами;

R_2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, $-COOR_3$ -группой, где R_3 представляет собой атом водорода, или алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами;

R_4 и R_5 , идентичные или разные, представляют собой алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте осуществления этого способа лечения NASH соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из

1- [4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4- метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она,
 1-[4- трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил] проп-2-ен-1-она, 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио) фенил]-3-оксо-пропил] фенокси]-2-метилпропионовой кислоты и изопропилового сложного эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио) фенил]-3-оксо-пропил] фенокси]-2-метил-пропионовой кислоты

или их фармацевтически приемлемой соли.

В дополнительном конкретном варианте осуществления изобретения соединение формулы (I) является 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-оном или его фармацевтически приемлемой солью.

Другие соединения, которые можно использовать в способе лечения NASH по настоящему изобретению, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, соединение, выбранное из следующих классов и конкретных соединений из табл. 1.

Таблица 1

Класс	Соединение
Стимулятор аланинтрансаминазы	HU-002
Ингибитор 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназы (HSD)	RO5093151
Антагонист альдостерона, антиоксидант	Спиринолактон/витамин Е
Аминокислота	SAMe (S-аденозил-L-метионин)
Аналог лептина человека	Метрелептин
Антиапоптотический ингибитор каспазы	Эмрикасан (IDN-6556)
Антибиотик	Рифаксимин
Антиоксидант	MitoQ Витамин Е
Антиоксидант PPAR γ	Витамин Е, пиоглитазон
Антиоксидант	Цистеамин (цистагон ЕС) Силифос
Антиоксидант-бигуанид	Витамин Е, метформин
Колострум коров	IMM 124-E
Ингибитор каспазы	GS-9450
Ингибиторы SCD1	Арамхол
Ингибиторы DGAT1	LCQ908
Добавки на основе рыбьего жира	Omega 3 PUFA Opti-EPA
Флавоноид	MEDOX (антоцианин), силимарин
Агонист FXR	OCA (обетихолевая кислота)
Ингибитор галектина	GR-MD-02
Агонист GLP-1	Эксенатид
Миметик GLP1	Лираглутид
Иммуномодулятор	Пероральное средство против а-CD3 EGS21
Желчные кислоты	UDCA
Хелатор железа	Деферасирокс ICL 670 Exjade®
Средство для снижения липидов	Эзетимиб
Миотропный вазодилататор	Пентоксифиллин
Omega 3	Lovaza EPA-E (MND-21)

Примеры

Получение и анализ образцов.

Клиническое исследование.

Клиническое исследование (исследование фазы 2 GOLDEN-505 NASH (GFT505-212-7 - NCT01694849)) является многоцентровым, рандомизированным, двойным слепым, плацебо-контролируемым исследованием для оценки эффективности и безопасности введения элафибранора (1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилокси фенил]проп-2-ен-1-она) один раз в сутки в отношении стеатогепатита у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом (NASH).

Осуществляли биопсию печени для подтверждения диагноза NASH после соответствующего исключения заболевания печени другой этиологии. NASH диагностировали как стеатогепатит, оцениваемый посредством биопсии печени в течение 6 месяцев перед рандомизацией. Подтверждение стеатогепатита

тата основано на централизованном исследовании биоптатов печени. Определяли пациентов с NASH с NAS ≥ 3 , включая степень стеатоза ≥ 1 , степень баллонизирующей дегенерации гепатоцитов ≥ 1 и степень долькового воспаления ≥ 1 .

Исследование одобрено соответствующими регуляторными органами в каждом участвующем центре, и все пациенты дали согласие на участие в медицинском исследовании.

Забор крови и лабораторное тестирование.

Образцы крови получали в соответствии с Центральным лабораторным протоколом и Manual-Genfit-GFT505-212-7.

В соответствии с протоколом исследования осуществляли следующие анализы.

Анализ крови включает гемоглобин, гематокрит, эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарную формулу (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы - абсолютное значение и значение в %), тромбоциты и ретикулоциты.

Биохимический анализ I включает глюкозу плазмы, триглицериды (TG), креатинин, клиренс креатинина, гамма-глутамилтрансферазу (GGT), аспартатаминотрансферазу (AST), аланинаминотрансферазу (ALT), креатинфосфокиназу (CPK), щелочную фосфатазу, тиреотропный гормон (TSH) и HbA1c.

Биохимический анализ II включает глюкозу плазмы, креатинин, клиренс креатинина, общий белок, альбумин, натрий, калий, хлорид, кальций, мочевую кислоту, мочевины, выраженную в виде азота 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.

Анализ мочи включает

анализ с использованием тест-полоски (удельный вес, pH, эритроциты, лейкоциты, глюкоза, белок, кетоны, билирубин, уробилиноген и нитрит);

микроскопический анализ, включающий эритроциты, лейкоциты, цилиндры, кристаллы, бактерии, эпителиальные клетки и дрожжи;

химический анализ (альбумин и креатинин).

Серологический анализ включает антитела против ВИЧ I/II, антитела против HCV, РНК HCV (тестировали только после получения образцов при посещении "РНК HCV" и в случае "реактивного" или "неопределенного" результата на антитела против HCV) и HbsAg.

Анализ липидов включает триглицериды (TG), общий холестерин, не-HDL-C (вычисление), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), липопротеины низкой плотности (LDL-C) (вычисление), вычисленный холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C) (вычисление), апо-липопротеин A1 (ApoA1) и аполипопротеин B (ApoB).

Химический анализ мочи включает альфа-1-микроглобулин, бета-N-ацетилглюкозаминидазу (бета-NAG) и нейтрофил-желатиназа-ассоциированный липокалин (N-Gal).

Маркеры безопасности включают гомоцистеин, NT-ProBNP, тропонин T, цистатин C и бета-2-микроглобулин.

Гликемические и другие липидные параметры включают лептин, инсулин, оценку гомеостатической модели (HOMA-IR), глюкозу сыворотки (для вычисления HOMA-IR), фруктозамин, С-пептид и свободные жирные кислоты (FFA).

Маркеры воспаления включают гаптоглобин, фибриноген, фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин 6 (ИЛ-6) и ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), Ag (цитрат).

Маркеры печени включают цитокератин-18 (CK18) (M65&M30), адипонектин, ферритин, альфа-2-макроглобулин, FGF19&FGF21, гиалуроновую кислоту (ADVIA Centaur, реагенты, поставляемые Siemens Belgium и переданные Genfit), N-концевой про-пептид коллагена типа III (PIIINP) (ADVIA Centaur, реагенты, поставляемые Siemens Belgium) и тканевый ингибитор матричной металлопротеазы-1 (TIMP-1) (ADVIA Centaur, реагенты, поставляемые Siemens).

Сбор и хранение образцов.

Образцы крови, используемые в этом исследовании биомаркеров, получали из пациентов из исследования 505.212.7 до периода лечения. От каждого пациента получали письменное информированное согласие на сбор, хранение и использование дополнительных образцов.

Кровь, собранную в пробирки, содержащие цитрат, емкостью 2,7 мл обрабатывали посредством отделения бесклеточной плазмы от клеток крови в течение 15 мин сбора посредством центрифугирования при 1500×g в течение 15 мин. Супернатант плазмы переносили в новую пробирку. Пробирки хранили при -70°C.

Затем для подготовки к выделению РНК пробирки с плазмой центрифугировали при 13000×g в течение 2 мин для осаждения и удаления тромбоцитов. Супернатант плазмы, не содержащий тромбоциты, переносили в новую пробирку, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Выделение тотальной РНК и количественный анализ мкРНК.

Тотальную РНК с сохраненной мкРНК выделяли из 400 мкл плазмы, не содержащей тромбоциты с помощью набора для выделения miRNeasy (набор для выделения из сыворотки/плазмы miRNeasy

(кат. № 217184)) и при соотношении плазма/QIAzol 1:5 по инструкциям производителя. Синтетическую miR-39 C. elegans с известной концентрацией добавляли к образцам [3,125 фмоль] перед выделением РНК в качестве внутреннего контроля. Элюцию осуществляли в 18 мкл элюирующего буфера.

Экспрессию зрелой мкРНК определяли по инструкциям производителя с использованием qRT-ПЦР-анализа мкРНК Taqman: набор для обратной транскрипции микроРНК TaqMan (кат. № 4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 20-кратная смесь для анализа микроРНК TaqMan (кат. № 4440887, Applied Biosystems) и универсальный мастер-микс TaqMan II (кат. № 4440040, Applied Biosystems).

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием термоциклера GeneAmp® PCR System 9700 (кат. № 200005, Applied Biosystems) с условиями циклов 16°C в течение 30 мин, затем 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин перед хранением при 4°C. Обратную транскрипцию мультиплексировали с использованием 4 мкРНК-специфичных обратных праймеров для сохранения образца РНК.

Количественную ПЦР осуществляли с использованием CFX96™ Real-Time System (термоциклер C1000 Touch™, BioRad) с условиями циклов 95°C в течение 10 мин, затем 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с всего в течение 50 циклов и 30°C в течение 30 с.

Последовательности специфических праймеров мкРНК, представляющих потенциальный интерес, выбирали в соответствии со следующей табл. 2.

Таблица 2

Последовательности тестируемой мкРНК

Зрелая мкРНК	ID анализа (Life Technologies)	Последовательность зрелой мкРНК	Номер в mirBase	Поставщик
cel-miR-39-3p	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO: 1)	MIMAT0000010	Life technologies
hsa-miR-122-5p	002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (SEQ ID NO: 2)	MIMAT0000421	Life technologies
hsa-miR-34a-5p	000426	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU (SEQ ID NO: 3)	MIMAT0000255	Life technologies
hsa-miR-200a-3p	000502	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU (SEQ ID NO: 4)	MIMAT0000318	Life technologies
hsa-miR-29b-3p	000413	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO: 5)	MIMAT0000100	Life technologies
hsa-miR-192-5p	000491	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC (SEQ ID NO: 6)	MIMAT0000222	Life technologies
hsa-miR-221-3p	000524	AGCUACAUGUCUGCGGGUUUC (SEQ ID NO: 7)	MIMAT0000278	Life technologies
hsa-miR-103a-3p	000439	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA (SEQ ID NO: 8)	MIMAT0000101	Life technologies
hsa-miR-155-5p	002623	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU (SEQ ID NO: 9)	MIMAT0000646	Life technologies
hsa-miR-199a-5p	000498	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC (SEQ ID NO: 10)	MIMAT0000231	Life technologies

Данные, использованные при создании алгоритма, представлены в формате в Cq. Режимом определения Cq являлась "Регрессия".

Статистический анализ.

Цель и определение.

Целью этих анализов являлось определение биомаркеров, которые можно отнести к идентификации пациентов с NASH, подлежащих лечению. Пациентов, подлежащих лечению (ТБТ), определяли следующим образом:

стадия фиброза ≥ 2 ; и

NAS ≥ 4 ; и

степень долькового воспаления ≥ 1 ; и

степень стеатоза ≥ 1 ; и

степень баллонизирующей дегенерации ≥ 1 .

Других пациентов указывали как неподлежащих лечению (NTBT). Для анализа пациентов ТВТ классифицировали как 1, а пациентов NTBT как 0 в качестве зависимой переменной. Как показано выше, объясняющие переменные включали широкий диапазон биомаркеров, измеряемых в образцах крови (анализ крови, биохимический анализ, анализ свертывания, маркеров печени, циркулирующих мкРНК) или мочи (анализ с использованием тест-полоски, анализ осадка), при условии наличия демографических (возраст, пол, раса), региональных (исследовательский центр, страна, континент) или медицинских (диабет) записей.

Учет данных.

Массив данных, используемых в этом исследовании, получали из исследования Golden-505, и исходно он состоял из 274 пациентов и 121 переменных. Учет данных включал следующие стадии:

1. Исключение 28 пациентов без измерения мкРНК.
2. Исключение 9 переменных более чем с 10 отсутствующими значениями.
3. Исключение 7 пациентов с крайними значениями и 28 с отсутствующими значениями.

В результате получали массив данных из 211 пациентов и 112 переменных, который использовали для проверки коллинеарности между объясняющими переменными.

Проверка коллинеарности.

Коэффициент корреляции Пирсона вычисляли попарно между количественными переменными. Если две переменные имели коэффициент корреляции выше 0,7, определяли одномерный критерий различия их средних в отношении зависимой переменной, определяя пациентов ТВТ. Выбранной переменной являлась более значимая. Коллинеарные и выбранные переменные представлены в табл. 2.

Исключали тридцать пять уникальных коллинеарных переменных, и конечный массив данных, используемый в анализе, включал 77 переменных (ID пациента, зависимая переменная, 5 гистологических степеней и 70 объясняющих переменных) и 211 пациентов (95 ТВТ и 116 NTBT).

Таблица 3

Выбранные и отклоненные переменные при проверке коллинеарности

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Отклоненные переменные среди коллинеарных переменных				
GLP_HOMA_IR	GLP_INS_PMOLL	GLP_CPEPTID_NMOLL			
INMK_CK18_M65_UL	LVBP_CK18_M30_PMOLL	LBBC_AST_UIL	LBBC_ALT_UIL		
INMK_FGF_21_PGML	SFMK_HOMOCYS_UMOLL				
LBBC_HBA1C_PERC	LBBC_GLU_FAST_MMOLL	GLP_GLU_FAST_MMOLL	GLP_FRUCTO_UMOLL		
LBHA_BASO_10_9_L	LBHA_BASO_PERC				
LBHA_ЭОЗИНО_10_9_L	LBHA_ЭОЗИНО_PERC				
LBHA_HEMATO_VV	LBHA_HEMO_GL	LBHA_RBC_COUNT_10_12_L			
LBHA_LEUKO_10_9_L	LBHA_NEUTRO_10_9_L				
LBHA_LYMPHO_PERC	LBHA_NEUTRO_PERC				
LBHA_PROTHR_TIME_SEC	LBHA_INR	LBHA_PROTHR_TIME_PERC			
LBHA_RETICULO_10_9_L	LBHA_RETICULO_RBC				
LBLP_LIPOPRINT_HDL_MGDL	LBLP_HDL_MMOLL	LBLP_APOA1_MGDL			
LBLP_LIPOPRINT_IDLA_MGDL	LBLP_LIPOPRINT_LDL1_MGD				
	L				
LBLP_LIPOPRINT_IDLB_MGDL	LBLP_NHDL_MMOLL				
LBLP_LIPOPRINT_IDLC_MGDL	LBLP_TC_MMOLL	LBLP_LDL_MMOLL	LBLP_APOB_MGDL	LBLP_NHDL_MMOL	
				L	
LBLP_LIPOPRINT_LDL2_MGDL	LBLP_APOB_MGDL	LBLP_NHDL_MMOLL			
LBLP_TG_MMOLL	LBLP_VLDL_MMOLL	LBLP_LIPOPRINT_VLDL_MGDL			
LVMK_HSA_MIR103_MULT11_CQ	LVMK_HSA_MIR155_MULT11_CQ	LVMK_HSA_MIR199A_MULT11_CQ	LVMK_HSA_MIR221_MULT11_CQ		
LVMK_HSA_MIR34A_MULT11_CQ	LVMK_HSA_MIR122_MULT11_CQ	LVMK_HSA_MIR192_MULT11_CQ			
	CQ	Q			
URI_SPECGRAV	URI_CREAT_GL				
WAIST	BMI	WEIGHT			

Переменные	Параметр
GLP_HOMA_IR	Оценка гомеостатической модели (HOMA-IR)
INMK_CK18_M65_UL	Цитокератин-18 (CK18) (M65)
INMK_FGF_21_PGML	FGF21
LBBC_HbA1c_PERC	HbA1c
LBHA_BASO_10_9_L	Базофилы (абс.)
LBHA_ЭОЗИНО_10_9_L	Эозинофилы (абс.)
LBHA_HEMATO_VV	Гематокрит
LBHA_LEUKO_10_9_L	Лейкоциты
LBHA_LYMPHO_PERC	Лимфоциты (%)
LBHA_PROTHR_TIME_SEC	Протромбиновое время (сек)
LBHA_RETICULO_10_9_L	Ретикулоциты (абс.)
LBLP_LIPOPRINT_HDL_MGDL	Липопротеины высокой плотности (HDL)
LBLP_LIPOPRINT_IDLA_MGDL	Липопротеины промежуточной плотности
LBLP_LIPOPRINT_IDLB_MGDL	Липопротеины промежуточной плотности
LBLP_LIPOPRINT_IDLC_MGDL	Липопротеины промежуточной плотности
LBLP_LIPOPRINT_LDL2_MGDL	Липопротеины низкой плотности (LDL)
LBLP_TG_MMOLL	Триглицериды
lvmk_hsa_mir103_multil_cq	miRNA103
lvmk_hsa_mir34a_multil_cq	miRNA34a
URI_SPECGRAV	Удельный вес
GLP_INS_PMOLL	Инсулин
LVBP_CK18_M30_PMOLL	Цитокератин-18 (CK18) (M30)
SFMK_HOMOCYS_UMOLL	Гомоцистеин
LBBC_GLU_FAST_MMOLL	Глюкоза
LBHA_BASO_PERC	Базофилы (%)
LBHA_ЭОЗИНО_PERC	Эозинофилы (%)
LBHA_HEMO_GL	Гемоглобин
LBHA_NEUTRO_10_9_L	Нейтрофилы (абс.)
LBHA_NEUTRO_PERC	Нейтрофилы (%)
LBHA_INR	INR
LBHA_RETICULO_RBC	Ретикулоциты (% эритроцитов)
LBLP_HDL_MMOLL	Холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C)
LBLP_LIPOPRINT_LDL1_MGDL	Липопротеин низкой плотности (LDL)
LBLP_NHDL_MMOLL	Не-HDL-C
LBLP_TC_MMOLL	Общий холестерин
LBLP_APOB_MGDL	Аполипопротеин В (Apo B)
LBLP_VLDL_MMOLL	Вычисленный холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C)
lvmk_hsa_mir155_multil_cq	miR155

lvmk_hsa_mir122_multil_cq	miR122
URI_CREAT_GL	Креатинин
bmi	Индекс массы тела
GLP_CPEPTID_NMOLL	С-пептид
LBBC_AST_UIL	Аспаратаминотрансфераза (AST)
GLP_GLU_FAST_MMOLL	Глюкоза
LBHA_RBC_COUNT_10_12_L	Эритроциты
LBHA_PROTHR_TIME_PERC	Протромбиновое время
LBLP_APOA1_MGDL	Аполипопротеин A1 (Апо A1)
LBLP_LDL_MMOLL	Липопротеины низкой плотности (LDL-C)
LBLP_LIPOPRINT_VLDL_MGDL	Холестерин липопротеинов очень низкой плотности
lvmk_hsa_mir199a_multil_cq	miR199a
lvmk_hsa_mir192_multil_cq	miR192
LBBC_ALT_UIL	Аланинаминотрансфераза (ALT)
GLP_FRUCTO_UMOLL	Фруктозамин
lvmk_hsa_mir221_multil_cq	miR221

Медианная модель.

Массив данных разбивали один миллион раз на 2/3 обучающее множество и 1/3 верификационное множество, стратифицировали по распределению на пациентов ТБТ и NTBT. Из этих различных возможных разбиов в 27477 отсутствовало значимое различие между обучающим и верификационным множествами для всех объясняющих переменных и гистологических степеней, и их использовали для анализа.

Определяли логистическую регрессию между зависимой переменной и 70 объясняющими переменными с последующим выбором переменных с использованием информационного критерия Акаике (AIC) в 27477 обучающих множествах. В результате получали 27477 различных коэффициентов для 70 переменных. Создавали медианную модель, комбинируя переменные с медианным коэффициентом, отличающимся от нуля (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для медианной модели			
Переменные, включенные в медианную модель	Коэффициенты	1 ^{ая} -3 ^я квартили	
Константа	25,13	18,39; 32,66	
LVBP_A2M_GL	0,60	0,43; 0,77	
LBBC_HbA1C_PERC ^{cor}	0,48	0,001; 0,69	
LVB_P3NP	0,10	0,001; 0,14	
lvmk_hsa_mir34a_multil_cq ^{cor}	-0,43	-0,60; -0,001	
lvmk_hsa_mir200a_multil_cq	-0,45	-0,58; -0,31	

^{cor}: коллинеарная переменная;

LVBP_A2M_GL: альфа-2-макроглобулин;

LBBC_HbA1C_PERC: HbA1c;

LVB_P3NP: N-концевой про-пептид коллагена типа III;

lvmk_hsa_mir34a_multil_cq: miR-34a;

lvmk_hsa_mir200a_multil_cq: miR-200a.

Затем модель верифицировали посредством вычисления площади под кривой ROC (AUC) для каждого из 27477 множеств. AUC составляла 0,82 (95% CI: 0,72-0,91). Используя медиану AUC 3, определяли пороговые значения для прогнозирования отнесения пациентов к ТБТ или NTBT.

1. Пороговое значение, наиболее близкое к точке с 1-специфичностью=0% и чувствительностью=100%, было равно 0,23. Соответствующая таблица сопряженности представлена в табл. 5а, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 80,28%;

чувствительность: 81,25%;

специфичность: 79,49%;

PPV (Положительное прогностическое значение): 76,47%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 83,78%.

2. Пороговое значение, приводящее к чувствительности выше 90%, было равно 0,102. Соответствующая таблица сопряженности представлена в табл. 5b, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 63,38%;

чувствительность: 90,63%;

специфичность: 41,03%;

PPV (Положительное прогностическое значение): 55,77%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 84,21%.

3. Пороговое значение, приводящее к чувствительности выше 90%, было равно 0,462. Соответствующая таблица сопряженности представлена в таблице 5с, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 70,42%;

чувствительность: 43,75%;

специфичность: 92,31%;

PPV (Положительное прогностическое значение): 82,35%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 66,67%.

Таблица 5a

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием медианной модели и порогового значения 0,23

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	31	8
	TBT (1)	6	26

Таблица 5b

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием медианной модели и порогового значения 0,102

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	16	23
	TBT (1)	3	29

Таблица 5с

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием медианной модели и порогового значения 0,462

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	36	3
	TBT (1)	18	14

Бутстрэп-модель.

Используя всех 211 пациентов, вычисляли логистическую регрессию в виде полной модели с использованием всех 70 объясняющих переменных и получали оптимальную модель, выбирая переменные с AIC (табл. 6). Затем значимость переменных коэффициентов тестировали с использованием 1000 бутстрэп-выборок (табл. 6).

Таблица 6

Результаты для бутстрэп-модели			
Переменные, включенные	в	Коэффициенты	95% CI
медианную модель			
Константа		21,35	5,26; 36,76
LVB_P_A2M_GL		0,62	0,11; 1,07
LVB_P_HBA1C_PERC ^{cor}		0,55	0,13; 1,02
LVB_P3NP		0,14	0,03; 0,23
lvmk_hsa_mir34a_multil_cq ^{cor}		-0,38	-0,77; -0,001
lvmk_hsa_mir200a_multil_cq		-0,39	-0,78; -0,04

^{cor}: коллинеарная переменная.

Крайне важно отметить, что переменные, идентифицированные с помощью бутстрэп-модели, яв-

ляются теми же переменными, которые идентифицировали с использованием медианной модели, описанной выше. Эти результаты подтверждают статистическую значимость и достоверность этих переменных в качестве прогностических показателей для NASH и его стадии или тяжести.

Оптимальную модель верифицировали посредством вычисления AUC в 1000 бутстрэп-выборках. AUC составляла 0,82 (95% CI: 0,76-0,87). Используя AUC оптимальной модели, определяли 3 пороговых значения для прогнозирования отнесения пациентов к TBT или NTBT.

1. Пороговое значение, наиболее близкое к точке с 1-специфичностью=0% и чувствительностью=100%, было равно 0,4343. Соответствующая таблица сопряженности представлена в табл. 7a, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 75,36%;

чувствительность: 74,74%;

специфичность: 75,86%;

PPV: 71,72%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 78,57%.

2. Пороговое значение, приводящее к чувствительности выше 90%, было равно 0,2319. Соответствующая таблица сопряженности представлена в табл. 7b, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 65,88%;

чувствительность: 90,53%;

специфичность: 45,69%;

PPV (Положительное прогностическое значение): 57,72%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 85,48%.

3. Пороговое значение, приводящее к чувствительности выше 90%, было равно 0,6465. Соответствующая таблица сопряженности представлена в табл. 7c, и из нее получали следующие показатели:

общая точность: 73,46%;

чувствительность: 52,63%;

специфичность: 90,52%;

PPV (Положительное прогностическое значение): 81,97%;

NPV (Отрицательное прогностическое значение): 70,00%.

Таблица 7a

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием бутстрэп-модели и порогового значения 0,4343

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	88	28
	TBT (1)	24	71

Таблица 7b

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием бутстрэп-модели и порогового значения 0,2319

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	53	63
	TBT (1)	9	86

Таблица 7c

Таблица сопряженности пациентов TBT/NTBT, наблюдаемых и прогнозируемых с использованием бутстрэп-модели и порогового значения 0,6465

		Прогнозируемое	
		NTBT (0)	TBT (1)
Наблюдаемое	NTBT (0)	105	11
	TBT (1)	45	50

Сравнение с другими способами подсчета баллов NASH.

Способы определения баллов NASH ранее описаны в следующей литературе:

Индекс Ангуло (Angulo et al., 2007);

ELF (Guha et al., 2008) (см. также лист спецификаций ELF

[http://www.healthcare.Siemens.com/clinical-specialities/liver-disease/el f-test-now-avail](http://www.healthcare.Siemens.com/clinical-specialities/liver-disease/el-f-test-now-avail));

Fibrotest (Ratziu et al., 2006);

Fibrometer (Cales et al., 2009);

FLI (Bedogni et al., 2006);

Степень стеатоза или SteatoTest (Poynard et al., 2005).

Таким образом, авторы настоящего изобретения оценивали баллы NASH по изобретению рядом этих ранее известных способов. На фиг. А-Г представлено сравнение подсчета баллов NASH способом по изобретению, полученным из бутстрэп-модели (фиг. А) с использованием существующих баллов.

Данные, представленные в настоящем описании, свидетельствуют о значительном улучшении точности идентификации пациентов с NASH или потенциальных пациентов с NASH, определения активности, стадии или тяжести NASH. Эти результаты представляют особую важность и будут неоценимым инструментом для улучшения эффективности лечения пациентов.

Дополнительные объекты, представленные в настоящем описании

Настоящее изобретение, в частности, относится к следующим объектам.

1. Способ диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) или определения активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, включающий измерение уровня по меньшей мере одного циркулирующего микроРНК-маркера NASH в крови, сыворотке или плазме и по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.

2. Способ по п.1, включающий стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

(i) альфа-2-макроглобулин;

(ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;

(iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;

(iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);

(v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

3. Способ по п.1 или 2, включающий осуществление следующих измерений в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:

(i) определение уровня альфа-2-макроглобулина;

(ii) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;

(iii) определение уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34, hsa-miR-122 и hsa-miR-192; и

(v) определение уровня hsa-miR-200,

где повышение указанных уровней относительно уровней в контрольном образце свидетельствует о NASH и/или активности, стадии или тяжести NASH.

4. Способ по пп.2 и 3, где

измерение (ii) включает определение уровня, по меньшей мере, HbA1c; и/или

измерение (iv) включает определение уровня, по меньшей мере, hsa-miR-34.

5. Способ по любому из пп.1 или 4, включающий определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.

6. Способ по любому из пп.2-5, где баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и где диагностируют NASH и/или определяют стадию, или активность, или тяжесть NASH с учетом указанных баллов NASH.

7. Способ по п.6, где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

- f является числом от -0,78 до 0.
8. Способ по п.7, где
- k является числом от 5,26 до 36,76;
 - a является числом от 0,11 до 1,07;
 - b является числом от 0,001 до 1,02;
 - c является числом от 0,001 до 0,23;
 - d является числом от -0,77 до -0,001;
 - f является числом от -0,78 до -0,04.
9. Способ по п.7 или 8, где баллы NASH выше порогового значения от 0,102 до 0,6465 свидетельствуют о тяжелом NASH или умеренной или высокой активности NASH.
10. Способ по п.9, где
- k равно 25,13;
 - a равно 0,60;
 - b равно 0,48;
 - c равно 0,1;
 - d равно -0,43; и
 - f равно -0,45, и
- где пороговое значение составляет от 0,102 до 0,462 и более конкретно равно 0,23.
11. Способ по п.9, где
- k. равно 21,35;
 - a равно 0,62;
 - b равно 0,55;
 - c равно 0,14;
 - d равно -0,38; и
 - f равно -0,39, и
- где пороговое значение составляет от 0,2319 до 0,6465 и более конкретно равно 0,4343
12. Способ классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий измерение уровня по меньшей мере одного циркулирующего микроРНК-маркера NASH в крови, сыворотке или плазме и по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.
13. Способ по п.12, включающий стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:
- (i) альфа-2-макроглобулин;
 - (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;
 - (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
 - (iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);
 - (v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).
14. Способ по п.12 или 13, включающий осуществление следующих измерений в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:
- (i) определение уровня альфа-2-макроглобулина;
 - (ii) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;
 - (iii) определение уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;
 - (iv) определение уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34, hsa-miR-122 и hsa-miR-192; и
 - (v) определение уровня hsa-miR-200,
- где баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и где индивидуума классифицируют как реципиента или нереципиента лечения NASH на основе указанных баллов.
15. Способ по п.13 или 14, где
- измерение (ii) включает определение уровня, по меньшей мере, HbA1c; и/или
 - измерение (iv) включает определение уровня, по меньшей мере, hsa-miR-34.
16. Способ по любому из пп.13-15, включающий определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.
17. Способ по п.16, где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

18. Способ по п.17, где

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0,001 до 1,02;

c является числом от 0,001 до 0,23;

d является числом от -0,77 до -0,001;

f является числом от -0,78 до -0,04.

19. Способ по любому из п.17 или 18, где индивидуума классифицируют как реципиента лечения, если S выше порогового значения от 0,102 до 0,6465.

20. Способ по п.19, где

k равно 25,13;

a равно 0,6;

b равно 0,48;

c равно 0,1;

d равно -0,43; и

f равно -0,45, и

где пороговое значение составляет от 0,102 до 0,462 и более конкретно равно 0,23.

21. Способ по п.19, где

k равно 21,35;

a равно 0,62;

b равно 0,55;

c равно 0,14;

d равно -0,38; и

f равно -0,39, и

где пороговое значение составляет от 0,2319 до 0,6465 и более конкретно равно 0,4343.

22. Способ вычисления баллов NASH, свидетельствующих о неалкогольном стеатогепатите (NASH) или активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, где указанные баллы основаны на измерении по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

(i) альфа-2-макроглобулин;

(ii) гликированный гемоглобин (HbA1c), уровень глюкозы натощак, уровень фруктозамина;

(iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;

(iv) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-122 (в частности, hsa-miR-122-5p) и hsa-miR-192 (в частности, hsa-miR-192-5p);

(v) hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p).

23. Способ по п.22, где в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума осуществляют следующие измерения:

(i) уровень альфа-2-макроглобулина;

(ii) уровень по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;

(iii) уровень N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) уровень по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34, hsa-miR-122 и hsa-miR-192; и

(v) уровень hsa-miR-200.

24. Способ по п.23, включающий определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.

25. Способ по п.24, где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

26. Способ по п.25, где

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0,001 до 1,02;

c является числом от 0,001 до 0,23;

d является числом от -0,77 до -0,001;

f является числом от -0,78 до -0,04

27. Способ по п.25, где

k равно 25,13;

a равно 0,6;

b равно 0,48;

c равно 0,1;

d равно -0,43; и

f равно -0,45.

28. Способ по п.25, где

k равно 21,35;

a равно 0,62;

b равно 0,55;

c равно 0,14;

d равно -0,38; и

f равно -0,39.

29. Набор, содержащий средства для определения уровня:

(i) альфа-2-макроглобулина;

(ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c, уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина;

(iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34, hsa-miR-122 и hsa-miR-192; и

(v) hsa-miR-200.

30. Набор по п.29, содержащий средства для определения уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.

31. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающий

(a) диагностику NASH или определение активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума способом по любому из пп.1-11;

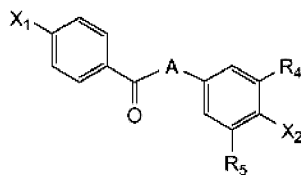
(b) введение лекарственного средства от NASH указанному индивидууму в соответствии со стадией (a).

32. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающий

(a) классификацию указанного индивидуума способом по любому из пп.12-21;

(b) введение лекарственного средства от NASH индивидууму, если указанного индивидуума классифицируют как реципиента лечения в соответствии со стадией (a).

33. Способ по п.31 или 32, где лечение включает введение индивидууму соединения формулы (I)



где X_1 представляет собой галоген, R_1 - или G_1 - R_1 -группу;

A представляет собой $CH=CH$ - или CH_2-CH_2 -группу;

X_2 представляет собой G_2 - R_2 -группу;

G_1 и G_2 , идентичные или разные, представляют собой атом кислорода или серы;

R_1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами галогенов, алкокси- или алкилтиогруппой, циклоалкильными группами, циклоалкилтиогруппами или гетероциклическими группами;

R_2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, $-COOR_3$ -группой, где R_3 представляет собой атом водорода, или алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами.

R_4 и R_5 , идентичные или разные, представляют собой алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемой соли.

34. Способ по п.33, где соединение выбрано из группы, состоящей из

1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-изопропилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-трифторметилфенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-трет-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она,
 1-[4-трифторметилоксифенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-она, 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метилпропионовой кислоты и изопропилового сложного эфира 2-[2,6-диметил-4-[3-[4-(метилтио)фенил]-3-оксо-пропил]фенокси]-2-метилпропионовой кислоты

или их фармацевтически приемлемой соли.

35. Способ по п.33 или 34, где соединение является 1-[4-метилтиофенил]-3-[3,5-диметил-4-карбоксидиметилметилоксифенил]проп-2-ен-1-оном или его фармацевтически приемлемой солью.

36. Способ по п.31 или 32, где лечение включает введение индивидууму соединения из табл. 1.

Ссылки

Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, Enders F, Saksena S, Burt AD, Bida JP, Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP (2007) The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*45: 846-854

Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C (2006) The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*6: 33

Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F (2009) Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol*50: 165-173

Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, Kaye P, Burt AD, Ryder SD, Aithal GP, Day CP, Rosenberg WM (2008) Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*47: 455-460

Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, Capron D, Abella A, Massard J, Ngo Y, Munteanu M, Mercadier A, Manns M, Albrecht J (2005) The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol*4: 10

Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranet JF, Le Bail B, de Ledinghen V, Poynard T (2006) Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*6: 6

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

- (i) альфа-2-макроглобулин;
- (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c);
- (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
- (iv) hsa-miR-34;
- (v) hsa-miR-200,

где повышение указанных уровней относительно уровня референсного значения, полученного в референсном образце, свидетельствует о NASH, и

где референсный образец соответствует образцу крови, сыворотки или плазмы, полученному из одного или более индивидуумов, не имеющих NAFLD или NASH.

2. Способ определения тяжести NASH у индивидуума, включающий стадию измерения уровня по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (i), (ii) или (iii), и по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы (iv) или (v), определенных следующим образом:

- (i) альфа-2-макроглобулин;
- (ii) гликированный гемоглобин (HbA1c);
- (iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;
- (iv) hsa-miR-34;
- (v) hsa-miR-200,

где повышение указанных уровней относительно уровня референсного значения, полученного в референсном образце, свидетельствует о тяжести NASH, и

где референсный образец соответствует образцу крови, сыворотки или плазмы, полученному из од-

ного или более индивидуумов, не имеющих NAFLD или NASH.

3. Способ по п.1 или 2, включающий осуществление следующих измерений в образце крови, сыворотки или плазмы указанного индивидуума:

- (i) определение уровня альфа-2-макроглобулина;
- (ii) определение уровня HbA1c;
- (iii) определение уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;
- (iv) определение уровня hsa-miR-34; и
- (v) определение уровня hsa-miR-200;

где повышение указанных уровней относительно уровня референсного значения, полученного в референсном образце, свидетельствует о NASH и/или тяжести NASH.

4. Способ по любому из пп.1-3, включающий определение уровня альфа-2-макроглобулина, HbA1c, N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-34 и hsa-miR-200.

5. Способ по любому из пп.1-4, где маркер hsa-miR-34 из группы (iv) представляет собой hsa-miR-34a.

6. Способ по любому из пп.1-5, где маркер hsa-miR-34 из группы (iv) представляет собой hsa-miR-34a-5p.

7. Способ по любому из пп.1-6, где маркер hsa-miR-200 из группы (v) представляет собой hsa-miR-200a.

8. Способ по любому из пп.1-7, где маркер hsa-miR-200 из группы (v) представляет собой hsa-miR-200a-5p.

9. Способ по любому из пп.1-8,

где баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и

где диагностируют NASH и/или определяют тяжесть NASH с учетом указанных баллов NASH, где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

10. Способ по п.9, где баллы NASH выше порогового значения от 0,102 до 0,6465 свидетельствуют о тяжелом NASH.

11. Способ классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий стадию измерения уровня одного маркера, выбранного из группы (i), (ii), (iii), (iv) и (v), определенных следующим образом:

(i) альфа-2-макроглобулин;

(ii) гликированный гемоглобин (HbA1c);

(iii) N-концевой про-пептид коллагена типа III;

(iv) hsa-miR-34;

(v) hsa-miR-200,

где баллы NASH вычисляют на основе уровней, определяемых при измерениях (i)-(v), и

где индивидуума классифицируют как реципиента или нереципиента лечения NASH на основе указанных баллов NASH, где баллы NASH вычисляют в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

где S является баллами NASH;

A является уровнем альфа-2-макроглобулина в г/л;

B является уровнем HbA1c в процентах;

C является уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D является уровнем hsa-miR-34 в Cq;

F является уровнем hsa-miR-200 в Cq;

k является числом от 5,26 до 36,76;

a является числом от 0,11 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,02;

c является числом от 0 до 0,23;

d является числом от -0,77 до 0;

f является числом от -0,78 до 0.

12. Способ по п.11, где маркер hsa-miR-34 из группы (iv) представляет собой hsa-miR-34a.

13. Способ по п.11 или 12, где маркер hsa-miR-34 из группы (iv) представляет собой hsa-miR-34a-5p.

14. Способ по любому из пп.11-13, где hsa-miR-200 из группы (v) представляет собой hsa-miR-200a.

15. Способ по любому из пп.11-14, где маркер hsa-miR-200 из группы (v) представляет собой hsa-miR-200a-5p.

16. Способ по п.11, где индивидуума классифицируют как реципиента лечения, если S выше порогового значения от 0,102 до 0,6465.

17. Набор для осуществления способа диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) по любому из пп.1, 3-10, содержащий средства для определения уровня

(i) альфа-2-макроглобулина;

(ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c;

(iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34; и

(v) hsa-miR-200,

где набор содержит в качестве средств антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и праймеры, применимые для количественного определения уровней микроРНК.

18. Набор для осуществления способа классификации индивидуума как потенциального реципиента или нереципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) по любому из пп.11-16, содержащий средства для определения уровня

(i) альфа-2-макроглобулина;

(ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c;

(iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34; и

(v) hsa-miR-200,

где набор содержит в качестве средств антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и праймеры, применимые для количественного определения уровней микроРНК.

19. Набор для осуществления способа определения тяжести NASH по любому из пп.2-10, содержащий средства для определения уровня

(i) альфа-2-макроглобулина;

(ii) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из HbA1c;

(iii) N-концевого про-пептида коллагена типа III;

(iv) по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-34; и

(v) hsa-miR-200,

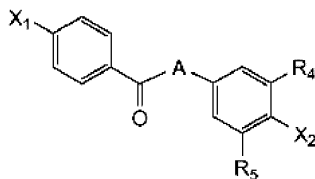
где набор содержит в качестве средств антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и праймеры, применимые для количественного определения уровней микроРНК.

20. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающий

(a) диагностику NASH или тяжести NASH у индивидуума способом по любому из пп.1-10 или классификацию указанного индивидуума способом по любому из пп.11-16;

(b) введение лекарственного средства от NASH указанному индивидууму в соответствии со стадией (a),

где лечение включает введение индивидууму соединения формулы (I)



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

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

X₂ представляет собой G₂-R₂-группу;

G₁ представляет собой атом кислорода;

G₂ представляет собой атом кислорода или серы;

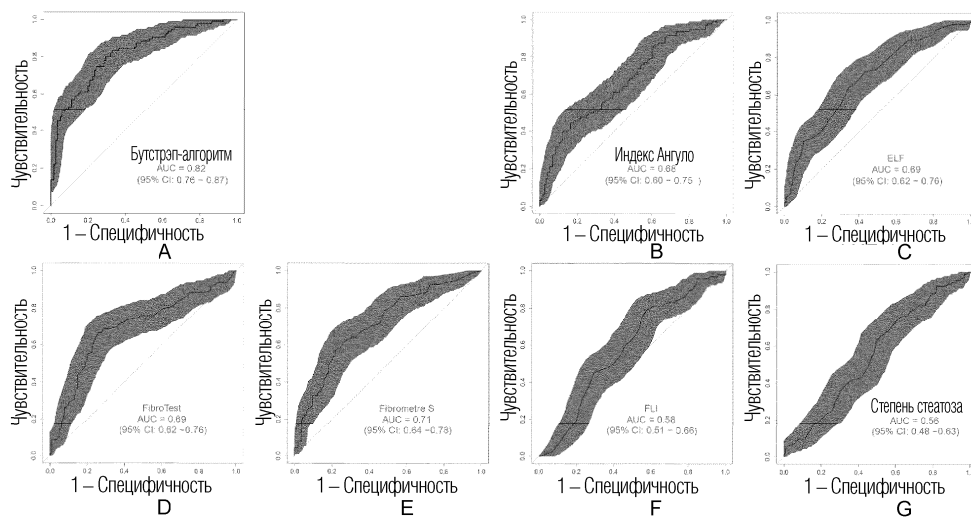
R₁ представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами галогенов, алкокси- или алкилтиогруппой,

циклоалкильными группами, циклоалкилтиогруппами или гетероциклическими группами;

R_2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, $-\text{COOR}_3$ -группой, где R_3 представляет собой атом водорода, или алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами;

R_4 и R_5 , идентичные или разные, представляют собой алкильную группу, замещенную или незамещенную одним или несколькими атомами галогенов, циклоалкильными группами, гетероциклическими группами;

или его фармацевтически приемлемой соли.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2