

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 043299

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.10

(21) Номер заявки
202090569

(22) Дата подачи заявки
2018.08.27

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

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

(31) 17306098.9; 17200028.3

(32) 2017.08.25; 2017.11.03

(33) EP

(43) 2020.06.03

(86) PCT/EP2018/073050

(87) WO 2019/038456 2019.02.28

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

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

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

(56) TAN YOUWEN ET AL.: "Differential expression of serum microRNAs in cirrhosis that evolve into hepatocellular carcinoma related to hepatitis B virus.", ONCOLOGY REPORTS JUN 2015, vol. 33, no. 6, June 2015 (2015-06), pages 2863-2870, XP002774932, ISSN: 1791-2431, abstract; tables v, vi, page 2868, column 1 - column 2
WO-A1-2013071502
WO-A1-2012105826
WO-A1-2017046181

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

043299 B1

043299 B1

043299

B1

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 NAFLD (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 баллонизирующей дистрофии: 0: нет; 1: мало; 2: много клеток/выраженное баллонирование.

При использовании этой системы пациент с NASH имеет $NAS \geq 3$ 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 $NAS \geq 4$, 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 недостаточ-

ности (декомпенсированный цирроз), НСС 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 натошак Инсулин натошак ИндексНОМА 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 PIINP TIMP-1	TNFa IL1b, IL6, IL8, IFNg, TGFb hs-CRP MCP1 sCD14

Некоторые исследования показали, что некоторые из этих сывороточных биомаркеров имели луч-

шие 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 смерти, 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-193 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, 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Эти способы основаны на определении уровня miR-193 в биологической жидкости субъекта. Во всех представленных в настоящем описании способах и вариантах осуществления микроРНК miR-193, внедренная в настоящее изобретение, может представлять собой микроРНК hsa-miR-193, такую как hsa-miR-193, выбранную из группы, состоящей из hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p и hsa-miR-193b-3p. В конкретном варианте осуществления определяют уровень hsa-miR-193b-3p. 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-193 в биологической жидкости субъекта могут сравнивать с контрольным уровнем miR-193. "Контрольный уровень" обозначает заранее определенный стандарт или уровень, определенный экспериментально в образце, обработанном аналогичным образом, от контрольного субъекта. В зависимости от цели способа 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-193, определенный в аналогично обработанном образце биологической жидкости, полученном в прошлом от того же субъекта, что позволяет определять эволюцию NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, в частности, позволяет определять эволюцию активности заболевания или фиброза, или эффективность лечения заболевания, в зависимости от реализуемого способа.

Соответственно, в конкретном варианте осуществления диагностика и/или обнаружение NAFLD или диагностика и/или обнаружение потенциальной NAFLD у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у здоровых людей без стеатоза печени.

В конкретном варианте осуществления диагностика и/или обнаружение NASH, или диагностика

и/или обнаружение потенциального NASH у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 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-193 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-193, 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 ($F \geq 1$) или потенциального фиброза печени ($F \geq 1$) у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 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-193 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-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с минимальным фиброзом печени ($F=1$). 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-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с минимальным фиброзом.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление умеренного фиброза печени или потенциального умеренного фиброза печени у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта со значительным фиброзом.

В другом варианте осуществления диагностика и выявление тяжелого фиброза или потенциального тяжелого фиброза у субъекта основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта с умеренным фиброзом.

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-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня miR-193, 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-193 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 НСС и связанные с печенью смерти) пациента с NAFLD или NASH, на основании уровня miR-193, 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-193 в образце биологической жидкости субъекта относительно контрольного уровня miR-193 в одном или более образцов биологической жидкости, собранных у того же самого субъекта в прошлом. В этом способе повышение уровня miR-193 указывает на то, что активность заболевания и фиброз возрастают, тогда как снижение уровня miR-193 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-193 в образце биологической жидкости субъекта относительно контрольного уровня miR-193 в одном или более образцах биологической жидкости, собранных у того же самого субъекта в прошлом. В этом способе повышение уровня miR-193 или стабильный уровень miR-193 указывает на то, что лечение является неэффективным, тогда

как снижение уровня miR-193 указывает на то, что лечение является эффективным. В другом варианте осуществления этого способа стабильный уровень miR-193 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, НСС 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-193 в образце биологической жидкости относительно контрольного уровня, измеренного у субъекта, не отвечающего на лечение.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способ диагностики NAFLD, NASH или фиброза печени, или потенциального NAFLD, NASH или фиброза печени, или идентификации субъекта с риском прогрессирования до клинических исходов от NAFLD, NASH или фиброза печени (например, цирроз печени, цирротические осложнения и/или смерти, связанные с печенью), при этом способ включает в себя определение уровня miR-193 и, по меньшей мере, одного маркера, выбранного из группы, состоящей из YKL-40 (CHI3L1), тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1), количества тромбоцитов, гиалуроновой кислоты (HYUA2) и гликированного гемоглобина (HbA1c). В конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя определение статуса метаболического синдрома (ms) пациента. В конкретном варианте осуществления способ включает в себя определение уровня miR-193 и YKL-40. В дополнительном конкретном варианте осуществления этого аспекта способ включает в себя:

- (i) определение уровня miR-193, такого как количество hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193b-5p или hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости от субъекта;
- (ii) анализ:
 - количества YKL-40 (CHI3L1), тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1), количества тромбоцитов, гиалуроновой кислоты (HYUA2) и гликированного гемоглобина HbA1c; или
 - анализ количества YKL-40 (CHI3L1), тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1), количества тромбоцитов в образце биологической жидкости от субъекта и определение наличия у субъекта метаболического синдрома (ms);
- (iii) определение балла для субъекта на основании результатов, полученных на этапах (i) и (ii); и
- (iv) сравнение балла с пороговым значением для определения риска прогрессирования NASH у субъекта. В иллюстративном варианте осуществления количество каждого из miR-193b-3p, YKL-40, TIMP-1 и количества тромбоцитов, а также определение ms анализируют в способе. В другом иллюстративном варианте осуществления количество каждого из miR-193b-3p, YKL-40, TIMP-1, HYUA2, HbA1c и количества тромбоцитов анализируют в способе, и пороговые значения определяют с помощью уровней микроРНК по Cq или log10 копий.мкл-1 в образце крови.

В другом варианте осуществления способ включает в себя определение уровня miR-193, YKL-40, TIMP-1, количества тромбоцитов, гиалуроновой кислоты (HYUA2) и гликированного гемоглобина HbA1c. В другом варианте осуществления способ включает в себя определение уровня miR-193, YKL-40, TIMP-1, количества тромбоцитов и гиалуроновой кислоты (HYUA2) и определение статуса метаболического синдрома у пациента. В любом из вариантов осуществления этого аспекта предпочтительный вариант включает в себя определение уровня hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p или hsa-miR-193b-3p, в частности, hsa-miR-193b-3p.

Описание чертежей

Фиг. 1. Сывороточный уровень hsa-miR-193b-3p у пациентов, не подлежащих лечению (NTBT), и у пациентов, подлежащих лечению (TBT) GOLDEN-DIAG при включении в соответствии с тремя различными определениями пациентов TBT: TBT1, TBT2 и TBT7, и у здоровых субъектов (n=100). Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическая значимость была рассчитана с применением критерия ANOVA Крускала-Уоллиса с последующим применением критерия множественного сравнения Данна: ***, p-значение <0,001. NTBT1 n=83, TBT1 n=187; NTBT2 n=161, TBT2 n=109, NTBT7 n=119, TBT7 n=151

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.

Фиг. 2. Сывороточный уровень hsa-miR-193b-5p у пациентов NTBT и TBT GOLDEN-DIAG при включении в соответствии с тремя различными определениями пациентов TBT: TBT1, TBT2 и TBT7. Результаты выражены как Среднее±SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

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

TBT2=баллы для стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов ≥1 каждый,

NAS $\geq$ 4, F $\geq$ 2

TBT7= баллы для стеатоза, лобулярного воспаления и баллонирования гепатоцитов $\geq$ 1 каждый, NAS $\geq$ 4, F=1b, 1c, 2, 3 или 4.

Фиг. 3. Сывороточный уровень hsa-miR-19 3a-5p у пациентов NTBT и TBT GOLDEN-DIAG при включении в соответствии с тремя различными определениями пациентов TBT: TBT1, TBT2 и TBT7. Результаты выражены как Среднее $\pm$ SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фиг. 4. Сывороточный уровень hsa-miR-193b-3p у "здоровых" доноров крови, у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева), у пациентов с NAS<4 и NAS $\geq$ 4 (в середине) и у пациентов с F<2 и F $\geq$ 2 (справа) GOLDEN-DIAG при включении (вверху) и когорты OBESE (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Крускала-Уоллиса ANOVA и последующим применением критерия множественного сравнения Данна (Golden Diag) и критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

(Ожирение)

Фиг. 5. Сывороточный уровень hsa-miR-193a-5p у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева), у пациентов с NAS<4 и NAS $\geq$ 4 (в центре) и у пациентов с F<2 и F $\geq$ 2 (справа) в когортах GOLDEN-DIAG при включении (вверху) и OBESE (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ SEM. Статистическую значимость рассчитывали с применением критерия Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фиг. 6. Сывороточный уровень hsa-miR-193b-5p у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева), у пациентов с NAS<4 и NAS $\geq$ 4 (в центре) и у пациентов с F<2 и F $\geq$ 2 (справа) в когортах GOLDEN-DIAG при включении (вверху) и OBESE (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ SEM. Статистическая значимость была рассчитана с применением критерия не Манна-Уитни: ***, p-значение <0,001.

Фиг. 7. Сывороточные уровни hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-193b-5p и hsa-miR-193a-5p у пациентов NTBT2 и TBT2 (слева), у пациентов с NAS<4 и NAS $\geq$ 4 (в центре) и у пациентов с F<2 и F $\geq$ 2 (справа) исследования RESOLVE-IT. Результаты выражены как Среднее $\pm$ SEM. Статистическая значимость была рассчитана с применением критерия не Манна-Уитни: ** p-значение <0,005; ***, p-значение <0,001.

Фиг. 8. Корреляция между сывороточными уровнями hsa-miR-193b-3p с NAS, стадией фиброза, индексом активности, баллом стеатоза, баллом баллонирования гепатоцитов, баллом лобулярного воспаления у пациентов когорты GOLDEN-DIAG (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ 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.

Фиг. 9. Корреляция между уровнями hsa-miR-193b-5p в сыворотке крови с NAS, стадией фиброза, индексом активности, баллом стеатоза, баллом баллонирования гепатоцитов, баллом лобулярного воспаления у пациентов когорты GOLDEN-DIAG (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ 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.

Фиг. 10. Корреляция между уровнями hsa-miR-193a-5p в сыворотке крови с NAS, стадией фиброза, индексом активности, баллом стеатоза, баллом баллонирования гепатоцитов, баллом лобулярного воспаления у пациентов из группы GOLDEN-DIAG (внизу). Результаты выражены как Среднее $\pm$ 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.

Фиг. 11. Анализ кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов (ROC) алгоритма Y1 с hsa-miR-193b-3p (log10 копий.мкл-1), TIMP-1, YKL-40, количеством тромбоцитов и метаболическим синдромом. Сравнение площади под кривой (AUC) между этим алгоритмом (NIS) и отдельными переменными в исследовании GOLDEN-DIAG при включении.

Фиг. 12. Анализ кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов (ROC) алгоритма Y2 с hsa-miR-193b-3p (log10 копий.мкл-1), YKL-40, TIMP-1, HbA1c, HUYA2 и количеством тромбоцитов.

Фиг. 13. Анализ кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов (ROC) алгоритма Y3 с hsa-miR-193b-3p (Cq), YKL-40, TIMP-1, HbA1c, HUYA2 и количеством тромбоцитов.

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, изобретение также предоставляет оценку NAS, как описано ниже. В частности, настоящее изобретение неогра-

ничающим образом определяет три класса пациентов с NASH, подлежащих лечению. Этим пациентов классифицируют в отношении оценки характеристик NASH.

Представленные в настоящем описании экспериментальные данные, неожиданно, идентифицируют miR-193 в качестве циркулирующего биомаркера для NAFLD, 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.

Определения

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 термины "уровень активности NAFLD" относятся 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 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 $\geq$ 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 $\geq$ 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.

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, 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, NASH и/или фиброза печени. Следовательно, субъекта TBT также называют "получателем" или "потенциальным получателем" лечения NAFLD, NASH и/или фиброза печени. В настоящем изобретении предпочтительными субъектами TBT 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 TBT (TBT2).

Субъект TBT2 определяется как субъект, имеющий следующие оценки, полученные при биопсии печени:

$S \geq 1$,
 $HB \geq 1$,
 $LI \geq 1$,
 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 TBT2 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 $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 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 комбинацию баллов, как определено выше.

Второй вариант TBT (TBT1).

Субъект TBT1 определяется как субъект, имеющий следующие оценки, полученные при биопсии печени:

балл по стеатозу ≥ 1 ,
 балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 ,
 балл по лобулярному воспалению ≥ 1 ,
 NAS (балл активности NAFLD) ≥ 4 ,
 стадия фиброза ≥ 1 (например, стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4).

Аналогично, 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. Для ясности, субъектом NTBT1 может являться, например, субъект с NASH, имеющий $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 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 TBT (TBT7).

Субъект TBT7 определяется как субъект, демонстрирующий следующие оценки биопсии печени:

балл по стеатозу ≥ 1 ,
 балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 ,
 балл по лобулярному воспалению ≥ 1 ,
 NAS (балл активности NAFLD) ≥ 4 ,
 стадия фиброза=1b, 1c, 2, 3 или 4.

Таким образом, субъект NTBT7 отличается от субъекта TBT7 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 $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 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-193, используемую в настоящем изобретении, выбирают из группы, состоящей из hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p и hsa-miR-193b-3p, последовательности которых доступны в базе данных miRBase (<http://mirbase.org>), соответственно, под кодами доступа miRBase MIMAT0000459, MIMAT0004614, MIMAT004767 и MIMAT0002819, соответственно.

В другом варианте осуществления микроРНК miR-193, используемая в настоящем изобретении, представляет собой форму шпильки miR-193, такую как микроРНК miR-193, выбранная из группы, состоящей из hsa-miR-193a, также называемой HGNC:MIR193A, и hsa-miR-193b, последовательности которых доступны в базе данных miRBase (<http://mirbase.org>), соответственно, под кодами доступа miRBase miRBase=MI0000487 и MI0003137.

В конкретном варианте осуществления микроРНК miR-193, используемая в настоящем изобретении, представляет собой hsa-miR-193b-3p.

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 техники, 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 (Lizargaga 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-193 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-193 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-193*.

Предоставлен стандартный протокол для измерения *miR-193* 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 бесклеточной 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 CFX96™ (C1000 Touch™ 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'ОН, 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-193* 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-193* может быть определен с помощью количественной ОТ-ПЦР с использованием реакции обратной транскрипции (RT) шпилек вместе с TaqMan qPCR или с ОТ с поли(А)-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-193* в образце крови, сыворотки или плазмы. Предпочтительный вариант этого аспекта относится к определению уровня *hsa-miR-193b-3p*.

Настоящее изобретение относится к способу диагностики или обнаружения NAFLD у субъекта, включающему в себя определение уровня *miR-193* в образце биологической жидкости указанного субъекта. Настоящее изобретение относится к способу диагностики или обнаружения потенциальной NAFLD у субъекта, включающему в себя определение уровня *miR-193* в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления NAFLD или потенциальную NAFLD обнару-

живают на основании повышенного уровня miR-193 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-193 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 транзистентной 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 (HbA1c 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-193 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления диагностика или обнаружение NASH или потенциального NASH основаны на обнаружении повышенного уровня miR-193 в биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня miR-193, 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 экспрессии hsa-miR-193, в частности, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p 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 гадооксидной кислоты, MRI с суперпарамагнитным оксидом железа, внутриклеточный уровень АТФ с использованием ³²P-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 OхNASH), 11,12-дигидрокси-эйкозатриеновая кислота (diHETrE)),

адипоцитокнины 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-193 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-193 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-193 в биологической жидкости от субъекта по сравнению с контрольным уровнем miR-193, 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-193, в частности, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p 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 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)),

- адипоцитокينات 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-193 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-193 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-193 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-193 (такой как hsa-miR-193) 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-193 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-193 в биологической жидкости от субъекта относительно контрольного уровня miR-193, 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 или цирроз печени (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-193 в биологической жидкости от субъекта по сравнению с контрольным уровнем miR-193, 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, IMT, нарушение уровня глюкозы натощак и/или диабет, AST, ALT, количество тромбоцитов и альбумин),

ядро BARD (AST, ALT, IMT 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 miR-193 (такой как hsa-miR-193) в образце биологической жидкости указанного субъекта.

В конкретном варианте осуществления стадия F=4 может быть определена, если уровень miR-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза $F \leq 4$, 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза $F \leq 3$, 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза $F \leq 2$, 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце от субъекта со стадией фиброза $F \leq 1$, например, с F=0.

В конкретном варианте осуществления способ предназначен для диагностики и выявления значительного или тяжелого фиброза ($F \geq 2$) и прогрессирующего фиброза печени ($F \geq 3$) у субъекта с NAFLD или NASH на основе обнаружения повышенного уровня экспрессии hsa-miR-193, в частности, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p, 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-193 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 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 miR-193 (такой как hsa-miR-193) в образце биологической жидкости указанного субъекта.

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT2, если уровень miR-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце субъекта NTBT2. В конкретном варианте субъектом NTBT2 является субъект с $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ и $F=1$ (например, стадия фиброза 1a, 1b или 1c).

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT1, если уровень miR-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце субъекта NTBT1. В конкретном варианте субъектом NTBT1 является субъект с $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ и $F=0$.

В конкретном варианте осуществления субъекта классифицируют как субъекта TBT7, если уровень miR-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта выше, чем уровень miR-193 в контрольном образце субъекта NTBT7. В конкретном варианте субъектом NTBT7 является субъект с $NAS=4$, $S \geq 1$, $LI \geq 1$, $HB \geq 1$ 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-193, в частности, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p, в крови, сыворотке или плазме по сравнению с контрольными уровнями hsa-miR-193, 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 исследования, 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 miR-193 (такой как hsa-miR-193) в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу прогнозирования риска развития активности NAFLD или NASH у субъекта, включающему в себя определение уровня miR-193 (такой как hsa-miR-193) в образце биологической жидкости указанного субъекта. В конкретном варианте осуществления способ предназначен для прогнозирования риска развития активности NAFLD или NASH в отсутствие лечения.

Изобретение также относится к способу прогнозирования риска развития фиброза до цирроза печени и клинических исходов у пациента, включающему в себя определение уровня miR-193 (такой как hsa-miR-193) 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-193 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-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Изобретение также относится к способу прогнозирования реакции пациента на конкретное лечение NAFLD, NASH и/или фиброза печени, включающему в себя определение уровня hsa-miR-193 в образце биологической жидкости указанного субъекта.

Согласно другому варианту изобретение относится к способу определения стадии стеатоза у субъекта на основании определения уровня miR-193 в образце биологической жидкости субъекта.

Согласно другому варианту, изобретение относится к способу определения степени гепатоцеллюлярного баллонирования у субъекта на основании определения уровня miR-193 в образце биологической жидкости субъекта.

Согласно другому варианту, изобретение относится к способу определения степени лобулярного воспаления у субъекта на основании определения уровня miR-193 в образце биологической жидкости субъекта.

При практическом применении настоящего изобретения пороговые концентрации miR-193 могут быть рассчитаны для облегчения принятия решения лицом, реализующим способы по настоящему изобретению. Используемое в настоящем описании выражение "пороговая концентрация" относится к концентрации miR-193, 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 может быть определена посредством:

- i) измерения концентрации miR-193 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.

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

- i) измерения концентраций miR-193 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-193 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-193 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 ($F \geq 2$) или тяжелым фиброзом печени ($F \geq 3$) 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-193 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-193 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-193 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-193, 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-193 и повышением гистологических показателей, в частности, повышением индекса активности, NAS и стадии фиброза. Эти анализы поддерживают применение miR-193 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-193 в сыворотке в качестве суррогатов гистологических эволюции.

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-193 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-193 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-193 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 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 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 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 болезни NASH,

оценить эффективность медикаментозного лечения, основанного на введении 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.

Кроме того, способы согласно настоящему изобретению позволяют:

определить прогрессирование или регрессирования патологии у пациента с NAFLD 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 (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 (TBT) 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-193; при этом уровень, более высокий, чем контрольный уровень miR-193, указывает на наличие оцениваемого состояния, или диагноз субъекта, как имеющего NAFLD или NASH, или активный NASH или фиброз печени (такой как значительный фиброз), или лобулярное воспаление, или баллонирование гепатоцитов, или на то, что субъект является потенциальным получателем лекарственных препаратов (TBT) или респондером.

В конкретных вариантах осуществления субъект является субъектом с риском развития NAFLD, 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.

Согласно конкретному аспекту изобретения для каждого типа пациента, подлежащего лечению, может быть получен балл по шкале NASH.

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-193 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	Адипонектин	Глюкоза плазмы	Малоновый диальдегид	Фибронектин	TNF α
AST	Лептин	натошак	TBARS	Гиалуроновая кислота	IL1b, IL6, IL8, IFN γ ,
ALP	резистин	Инсулин	Ox LDL	Коллаген типа IV	TGF β
GGT		натошак	CK18-M30		hs-CRP
Гаптоглобин		Индекс НОМА	CK18-M65	PIINP	MCP1
Альбумин		Триглицериды	ферритин	TIMP-1	sCD14
Билирубин		Холестерин	YKL-40 (CHI3L1)		
Количество тромбоцитов		ЛПВП			
		VLCL-C			
		Аполипопротеины (ApoA1, ApoB, ApoCIII)			

Согласно другому варианту осуществления, способы по настоящему изобретению включают в себя определение уровня других биомаркеров в дополнение к miR-193.

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

В дополнительном конкретном варианте осуществления такие биомаркеры выбирают из группы, состоящей из TIMP-1, YKL-40, количества тромбоцитов, метаболического синдрома, гиалуроновой кислоты и HbA1c.

В другом дополнительном конкретном варианте осуществления такие биомаркеры выбирают из группы, состоящей из TIMP-1, YKL-40, количества тромбоцитов и метаболического синдрома.

В другом конкретном варианте осуществления такие биомаркеры выбирают из группы, состоящей из TIMP-1, YKL-40, количества тромбоцитов, гиалуроновой кислоты и HbA1c.

В более конкретном варианте осуществления таким биомаркером является YKL-40, TIMP-1, PIINP, HbA1c, количество тромбоцитов или A2M.

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 транзистентной 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 по-

лиморфизмов 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 CXCL10 (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)), адипоцитокينات 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 гадооксетовой 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-193. 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-193 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 NAFLD, NASH, активного NASH или фиброза печени у субъекта.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает в себя этапы:

- измерения уровня hsa-miR-193, в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, hsa-miR-193b-3p или hsa-miR-193b-5p, или hsa-miR-193a, более конкретно, hsa-miR-193a-5p или hsa-miR-193a-3p; и
- измерение уровня по меньшей мере одного другого маркера, предпочтительно, всех, выбранного из группы, состоящей из:

- тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1);
- YKL-40;
- количества тромбоцитов;
- метаболического синдрома (ms).

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает в себя этапы:

- измерения уровня hsa-miR-193, в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, hsa-miR-193b-3p или hsa-miR-193b-5p, или hsa-miR-193a, более конкретно, hsa-miR-193a-5p или hsa-miR-193a-3p; и
- измерения уровня по меньшей мере одного другого маркера, предпочтительно всего, выбранного из группы, состоящей из:

тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1);
 YKL-40;
 количества тромбоцитов;
 и определения, имеет ли субъект метаболический синдром.

Диагностика метаболического синдрома может быть выполнена в соответствии с критериями, изложенными в Kotronen и соавт., *Gastroenterology* 2009, 137: 865-872.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает в себя измерение уровня следующих маркеров:

уровень miR-193b (в частности, miR-193b-3p); и
 уровень TIMP-1; и
 уровень YKL-40; и
 количество тромбоцитов; и
 метаболический синдром.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению можно применять для вычисления балла, или балла NASH, по уровням биомаркеров, уровни которых были измерены.

В конкретном варианте осуществления балл S1 NASH определяют как логистическую функцию:

$$S1 \sim \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

где

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

при этом

S1 представляет собой балл NASH согласно настоящему изобретению;

A представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в $\log_{10}$ копий.мкл⁻¹;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

D представляет собой количество тромбоцитов: 10^9 /л;

F представляет собой метаболический синдром;

k представляет собой константу логистической функции;

a представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;

b представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;

c представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;

d представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов;

f представляет собой коэффициент, связанный с метаболическим синдромом.

В конкретном варианте осуществления метаболический синдром определяют как имеющий значение 1, если у субъекта имеется метаболический синдром, или 0, если у субъекта нет метаболического синдрома. В этом конкретном варианте осуществления коэффициент f применяется к значению 1, когда у пациента имеется метаболический синдром.

Таким образом, балл NASH представляет собой вероятность наличия активности NASH от умеренной до высокой, или тяжелого NASH.

Если S1 больше или равно пороговому значению, субъекта классифицируют как имеющего NASH, или как имеющего, или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH, или потенциально подлежащего лечению NASH, или классифицируют как подлежащего лечению NASH и/или как получателя рекомендаций по диете и/или образу жизни. Согласно конкретному варианту осуществления, если S1 ниже порогового значения, субъект может быть классифицирован как подлежащий лечению или не подлежащий лечению, в частности, не подлежащий лечению, и/или субъекта классифицируют как получателя или потенциального получателя рекомендаций по диете и/или по образу жизни для контроля его/ее NASH с низкой активностью или умеренного NASH.

В другом конкретном варианте осуществления, полученном из модели бутстреппинга, как описано в экспериментальной части настоящего изобретения:

k представляет собой число от -8,39 до -2,67,

a представляет собой число от 0,58 до 2,50

b представляет собой число от 2,29E-03 до 1,87E-02,

c представляет собой число в диапазоне от 2,14E-06 до 1,65E-05,

d представляет собой число в диапазоне от -1,56E-02 до -1,05E-03,

f представляет собой число в диапазоне от 0,03 до 1,63,

и при этом пороговое значение составляет от 0,3050 до 0,6518 и, более конкретно, равно $0,3993 \pm 10\%$, в частности, равно 0,3993.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH или как имеющего, или потенциально имеющего, балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифици-

руют как получателя или потенциального получателя лечения, если балл S1 для NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,3050 до 0,6518, и, в частности, равному $0,3993 \pm 10\%$, в частности, равному 0,3993.

В конкретном варианте осуществления, также выведенном из модели бутстреппинга:

k равно -5,53;

a равно 1,54;

b равно 0,0105;

c равно 0,00000934;

d равно -0,00832;

f равно 0,83; и

и при этом пороговое значение составляет от 0,3050 до 0,6518, и, более конкретно, равно $0,3993 \pm 10\%$, в частности, равно 0,3993.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH или имеющего, или потенциально имеющего, балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как получателя или потенциального получателя лечения, если показатель S1 NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,3050 до 0,6518, и, в частности, равному $0,3993 \pm 10\%$, в частности, равному 0,3993.

Согласно этому конкретному варианту AUC составляет, по меньшей мере, 0,80.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает в себя этапы:

измерения уровня hsa-miR-193, в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, hsa-miR-193b-3p или hsa-miR-193b-5p, или hsa-miR-193a, более конкретно, hsa-miR-193a-5p или hsa-miR-193a-3p; и

измерения уровня по меньшей мере одного другого маркера, предпочтительно, всех, выбранного из группы, состоящей из:

YKL-40;

тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP-1);

гиалуроновой кислоты (HYUA2);

HbA1c; и

количества тромбоцитов.

В конкретном варианте осуществления способ по изобретению включает в себя измерение уровня следующих маркеров:

уровень miR-193b (в частности, miR-193b-3p); и

уровень YKL-40; и

уровень TIMP-1; и

гиалуроновая кислота (HYUA2);

HbA1c; и

количество тромбоцитов.

В конкретном варианте осуществления балл S2 по шкале NASH определяют как логистическую функцию:

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

где

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

при этом

S2 представляет собой балл NASH согласно настоящему изобретению;

A представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в $\log_{10}$ копий.мкл⁻¹;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

E представляет собой уровень HbA1c в процентах;

G представляет собой уровень гиалуроновой кислоты в нг/мл;

D представляет собой количество тромбоцитов: $10^9/\text{л}$;

l представляет собой константу логистической функции;

a2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;

c2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;

b2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;

e представляет собой коэффициент, связанный с уровнем HbA1c;

g представляет собой коэффициент, связанный с уровнем гиалуроновой кислоты;

d2 представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов.

Таким образом, балл S2 NASH представляет собой вероятность наличия активности NASH от умеренной до высокой, или тяжелого NASH.

Если S2 больше или равен пороговому значению, субъекта классифицируют как имеющего NASH,

или имеющего или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH, или потенциально подлежащего лечению NASH, или классифицируют как подлежащего лечению NASH и/или получателя рекомендаций по диете и/или образу жизни. Согласно конкретному варианту осуществления, если S2 ниже порогового значения, субъект может быть классифицирован как подлежащий лечению или не подлежащий лечению, в частности, не подлежащий лечению, и/или субъекта классифицируют как получателя или потенциального получателя рекомендаций по диете и/или образу жизни для контроля его/ее NASH с низкой активностью или умеренного NASH.

В другом конкретном варианте осуществления, полученном из модели бутстреппинга, как описано в экспериментальной части настоящего изобретения:

l представляет собой число в диапазоне от -10,92 до -3,89,

a2 представляет собой число в диапазоне от 0,44 до 2,17,

c2 представляет собой число в диапазоне от 0,0035 до 0,02,

b2 представляет собой число в диапазоне от 0,0016 до 0,018,

e представляет собой число в диапазоне от -0,0053 до 0,0057,

g представляет собой число в диапазоне от 0,13 до 1,08,

d2 представляет собой число в диапазоне от -0,017 до -0,0027,

и при этом пороговое значение составляет от 0,2461 до 0,6252 и, в частности, равно $0,4216 \pm 10\%$, в частности равно 0,4216.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH, или имеющего или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как получателя или потенциального получателя лечения, если балл S2 NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,2461 до 0,6252, и, в частности, равному $0,4216 \pm 10\%$, в частности равному 0,4216.

В конкретном варианте осуществления, также выведенном из модели бутстреппинга:

l равно -7,52;

a2 равно 1,29;

c2 равно 0,01;

b2 равно 0,0092;

e равно -0,0024;

g равно 0,59;

d2 равно -0,009; и

и при этом пороговое значение составляет от 0,2461 до 0,6252 и, в частности, равно $0,4216 \pm 10\%$, в частности, равно 0,4216.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH, или имеющего или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как получателя или потенциального получателя лечения, если балл S2 NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,2461 до 0,6252, и, в частности, равен $0,4216 \pm 10\%$, в частности, равен 0,4216.

Согласно этому конкретному варианту AUC составляет, по меньшей мере, 0,80.

В конкретном варианте осуществления балл S3 NASH определяют как логистическую функцию:

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

где

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

при этом

S3 представляет собой балл NASH согласно настоящему изобретению;

A' представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в Cq;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

E представляет собой уровень HbA1c в процентах;

G представляет собой уровень гиалуроновой кислоты в нг/мл;

D представляет собой количество тромбоцитов: $10^9/\text{л}$;

m представляет собой константу логистической функции;

a3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;

c3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;

b3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;

e2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем HbA1c;

g2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем гиалуроновой кислоты;

d3 представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов.

Таким образом, балл S3 NASH представляет собой вероятность наличия умеренной или высокой активности NASH, или тяжелого NASH.

Если S3 больше или равно пороговому значению, субъекта классифицируют как имеющего NASH, или имеющего или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH, или потенциально подлежащего лечению NASH, или классифицируют как подлежащего лечению NASH и/или получателя рекомендаций по диете и/или образу жизни. Согласно конкретному варианту осуществления, если S3 ниже порогового значения, субъект может быть классифицирован как подлежащий лечению или не подлежащий лечению, в частности, не подлежащий лечению, и/или субъекта классифицируют как получателя или потенциального получателя рекомендаций по диете и/или образу жизни для контроля его/ее NASH с низкой активностью или умеренного NASH.

В другом конкретном варианте осуществления, выведенном из модели бутстреппинга, как описано в экспериментальной части настоящего изобретения:

m представляет собой число в диапазоне от -1,27 до 17,54,

a3 представляет собой число в диапазоне от -0,64 до -0,09,

c3 представляет собой число в диапазоне от 0,005 до 0,019,

b3 представляет собой число в диапазоне от 0,001 до 0,016,

e2 представляет собой число в диапазоне от -0,0054 до 0,0045,

g2 представляет собой число в диапазоне от 0,12 до 1,08,

d3 представляет собой число в диапазоне от -0,0164 до -0,0016,

и при этом пороговое значение составляет от 0,2270 до 0,6364 и, в частности, равно $0,3741 \pm 10\%$, в частности равно 0,3741.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH, или имеющего или потенциально имеющего балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как получателя или потенциального получателя лечения, если балл S3 NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,2270 до 0,6364, и, в частности, равному $0,3741 \pm 10\%$, в частности равному 0,3741.

В конкретном варианте осуществления, также выведенном из модели бутстреппинга:

m равно 8,08;

a3 равно -0,38;

c3 равно 0,01;

b3 равно 0,01;

e2 равно -0,0024;

g2 равно 0,57;

d3 равно -0,0090; и

и при этом пороговое значение составляет от 0,2270 до 0,6364 и, в частности, равно $0,3741 \pm 10\%$, в частности, равно 0,3741.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъекта классифицируют как имеющего NASH или имеющего, или потенциально имеющего, балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 , и/или классифицируют как получателя или потенциального получателя лечения, если балл S3 NASH выше или равен пороговому значению, составляющему от 0,2270 до 0,6364, и, в частности, равному $0,3741 \pm 10\%$, в частности равному 0,3741.

Согласно этому конкретному варианту AUC составляет, по меньшей мере, 0,80.

В дополнительном конкретном варианте осуществления приведенные выше способы, описанные для вычисления балла NASH, реализованы для образца крови, сыворотки или плазмы, в частности, образца плазмы.

В другом варианте осуществления диагностику, обнаружение, мониторинг, оценку риска или оценку эффективности лечения NAFLD, NASH или фиброза печени проводят путем определения уровня miR-193 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 WO 2017046181, 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. Такая классификация субъекта как получателя, или TBT, основана на повышенном уровне miR-193 по сравнению с контрольными уровнями miR-193, измеренными у пациентов, не являющихся получателями (NTBT), как указано выше.

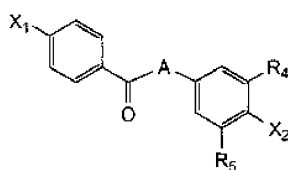
Таким образом, изобретение, кроме того, относится к соединению против NAFLD, против NASH или против фиброза для применения в способе лечения NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, при этом субъект был идентифицирован посредством способа согласно изобретению.

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-МЕСА), намоденозон CF-102, 2-CI-IB-МЕСА, 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;

АМР-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;

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;

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

ингибиторы апикального натрий-созависимого транспортера желчной кислоты, такие как A-4250, воликсibat, мараликсibat, ранее называвшийся SHP-625, GSK-2330672, элоксиксibat и CJ-14199;

бетаин безводный или PM-003.

Желчные кислоты включают в себя обетихоловую кислоту (OCA) и UDCA, норурсодезоксиколовую кислоту и урсодиол.

Биоактивные липиды, такие как 5-гидроксиэйкозапентаеновая кислота (15-HEPE, DS-102), ненасыщенные жирные кислоты, такие как 25-арахидоновая кислота, икосапентетиловый эфир, эйкозапентаеновая 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, ISIS 703802, LY-3202328, BH-03004, KR-69530, OT-13540, AZD-7687, PF-039064646 и ABT-046.

Ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DPP4), 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.

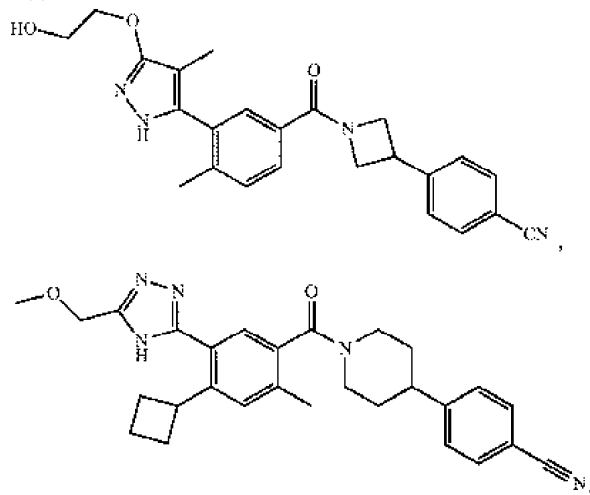
Менсибилизатор инсулина и антагонист рецептора MCH-1.

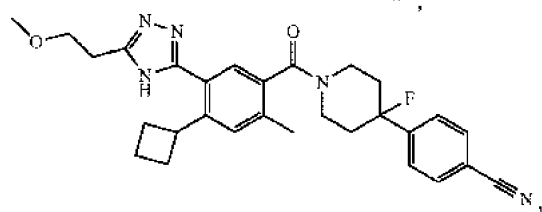
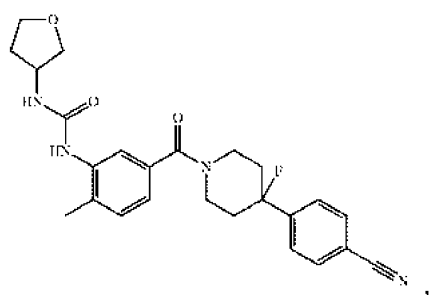
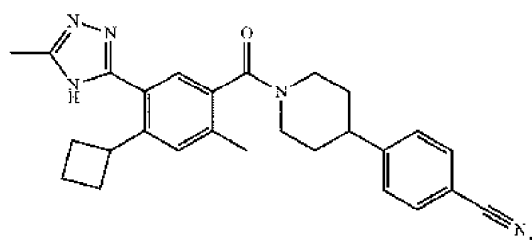
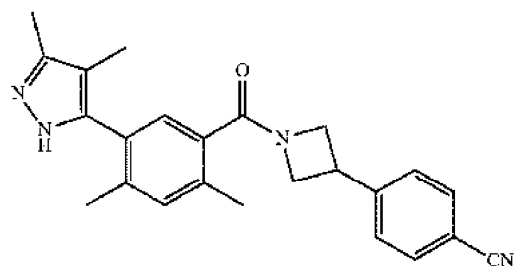
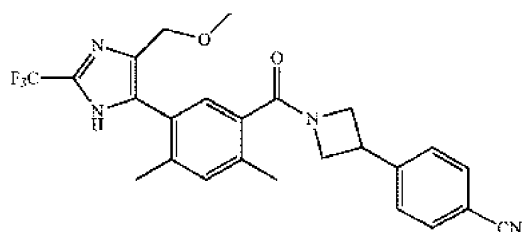
Ингибиторы NOX (NADPH-оксидазы), такие как ингибиторы Dual NOX (NADPH-оксидазы) 1 и 4; GKT-831 (2-(2-хлорфенил)-4-[3-(диметиламино)фенил]-5-метил-1H-пиразоло[4,3-с]пиридин-3,6(2H,5H)-дион), ранее называвшийся GKT137831 и GKT-901.

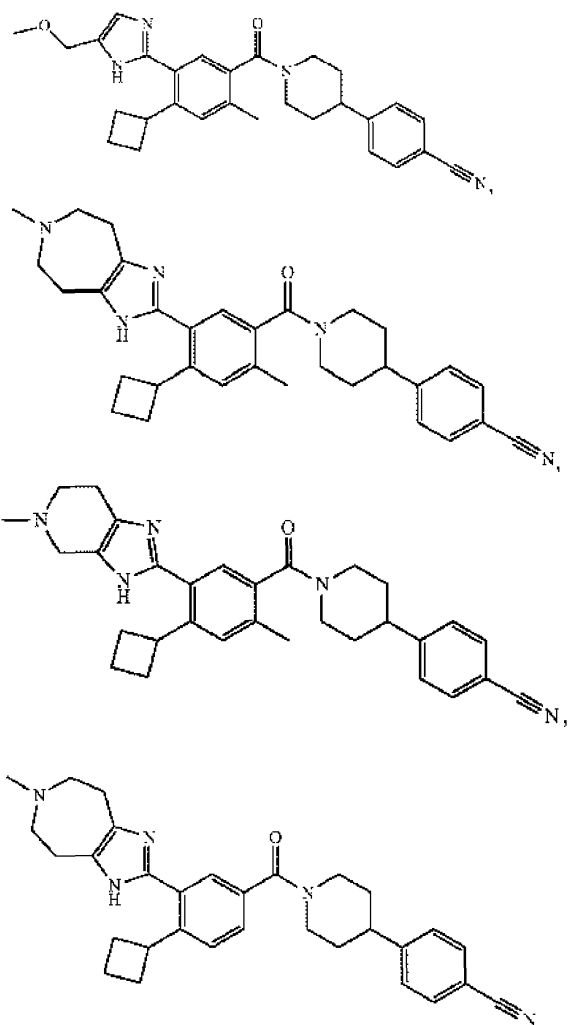
Модуляторы белка внеклеточного матрикса, такие как CNX-024, CNX-025 и SB-030.

Ингибиторы синтеза жирных кислот (FAS), такие как TVB-2640; TVB-3664; TVB-3166, TVB-3150, TVB-3199, TVB-3693BZL-101, 2-октадециновая кислота, MDX-2, Fasnall, MT-061, G28UCM, MG-28, HS-160, GSK-2194069, KD-023 и цилостазол.

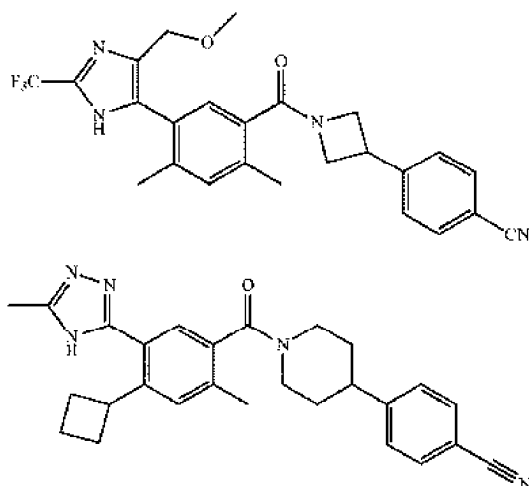
В конкретном варианте осуществления ингибитор FAS представляет собой соединение, выбранное из следующего списка соединений:







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.

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

конъюгаты стеарил-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;

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, альбиглутид, дулаглутид, ликсисенатид, локсенатид, эфпегленатид, таспоглутид, MKC-253, DLP-205 и 0RM;

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

модуляторы рецептора, связанного с G-белком (GPCR), такие как 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 элобиксibat;

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

сенситизатор инсулина и антагонист рецептора MCH, такой как MSDC-0602k, MSDC-0602, CSTI-100 и AMRI;

ингибиторы интегрин; ингибиторы интегрин Pliant Therapeutics, ингибиторы интегрин Indalo Therapeutics, ингибиторы интегрин университета Сент-Луиса, ProAgiо 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, подобные лисолитромицину, азитромицину и эритромицину;

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

модулятор метил-СрG-связывающего белка 2 и ингибиторы трансклутаминазы включают, но не ограничиваются указанным, цистеамин, ЕС цистеамин, энтеросолюбильный битартрат цистеамина, битартрат цистеамина (с энтеросолюбильным покрытием), Венпи, битартрат цистеамина (с энтеросолюбильным покрытием), Raptor, битартрат цистеамина, DR цистеамин, битартрат цистеамина с замедленным высвобождением и энтеросолюбильным покрытием, меркаптамин, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), Венпи, меркаптамин (с энтеросолюбильным покрытием), Raptor, RP-103, RP-104, PRO-CYSBI 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, такие как бертилимумам, NGM-313, нацеленные на IL-20 моноклональные антитела, фрезолимумаб (анти-TGFβ), ранее называвшийся GC1008, тимолумаб, ранее называвшийся BTT-1023, намацизумаб, омализумаб, ранибизумаб, бевацизумаб, лебрикизумаб, эспратузумаб, фелвизумаб, матузумаб, монализумаб, реслизумаб, форалумаб (NI-0401, анти-CD3), симбезумаб (GS-6624), моноклональное антитело против LOXL2, устекинумаб, антитело против TNF, и инебилизумаб;

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

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

ингибиторы NF-каппа В, такие как LC-280126;

никотиновая кислота, такая как ниацин или витамин В3;

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

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 антраиловой кислоты (меклофеналминовая кислота, флуфенамовая кислота), селективные ингибиторы COX-2 (целекоксиб, парекоксиб) и сульфонанилиды (нимесулид);

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

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, НераStem, 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, эфату-тазон, 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)), 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), L165041, HPP-593 и 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, такие как IVA337 (ланифибранор), ТТА (тетрадецилтиоуксусная кислота), бавахинин, GW4148, GW9135, безафибрат, лобеглитазон и 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), такие как GS-4997;

ингибиторы натрий-глюкозного транспорта (SGLT) 1, такие как LX-4212/LX-4211/сотаглифлозин, SAR-439954, LIK-066 (ликоглифлозин), LX-2761, GSK-161235, LP-925219, KGA-2727, SAR- 7226, SAR-474832, SY-008 и AVX-3030;

ингибиторы натрий-глюкозного транспорта (SGLT) 2, такие как ремоглифлозин, дапаглифлозин, эмпаглифлозин, эртуглифлозин, сотаглифлозин, ипраглифлозин, тианаглифлозин, канаглифлозин, тофоглифлозин, джанаглифлозин, бексаглифлозлизифлозин, бексаглифлозлизифлозин, HEC-44616, AST-1935 и PLD-101;

статины, такие как аторвастатин или симвастатин;

конъюгаты стеариол-КоА-десатуразы-1/жирной кислоты, такие как арамхол, GRC-9332, стеамхол, TSN-2998, GSK-1940029 и XEN-801;

агонисты рецептора щитовидной железы β (THR β), такие как VK-2809, MGL-3196, MGL-3745, SKL-14763, собегиром, BCT-304, ZYT-1, MB-07811 и эпротиром;

антагонисты Toll-подобного рецептора 2 и 4 (TLR-2), такие как CI-201, также известный как VB-201;

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;

ингибиторы естественных клеток-киллеров типа I, такие как GRI-0621;

модуляторы рецептора тирозинкиназы (RTK), такие как CNX-025, KBP-7018, нинтеданиб и сорафениб;

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), также называемые содержащие аминоксидазу меди 2 (AOC3), такие как BI-1467335, ранее называвшийся 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, дигидротаксистерол, кальцитриол, таккальцитол, 1,24-дигидроксивитамин D3 и парикальцитол;

витамин E и изоформы, витамин E в сочетании с витамином C 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 PINKi (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 (ATI), 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 интегрин 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 лечения 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-бутилоксикарбонилдиметилметилоксифенил]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 лечения NASH или фиброза печени включает в себя введение витамина E или пиоглитазона, обетихоловой кислоты, элафибранора, селонсертиба, сароглитазара и/или ценикривока.

Учитывая роль микро-РНК в модуляции экспрессии генов, результаты, полученные авторами изобретения, также подтверждают патофизиологическую роль miR-193 в развитии и эволюции NAFLD, NASH и/или фиброза печени.

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-193. Эти субпопуляции могут иметь зависимое от miR-193 заболевание, которое заставляет этих пациентов реагировать на специфичные лекарственные препараты, действующие непосредственно (мишени miR-193 или анти-miR-193) или косвенно на зависимые пути miR-193.

Кроме того, на основании этого наблюдения, в дополнительном аспекте изобретение относится к соединению-ингибитору miR-193 для применения при лечении NAFLD, NASH или фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом.

Используемый в настоящем описании термин "соединение-ингибитор miR-193" и его склонения от-

носятся к любому соединению, такому как соединение нуклеиновой кислоты, способному предотвращать действие miR-193 и, в частности, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p или hsa-miR-193b-5p. В конкретном варианте осуществления соединение-ингибитор miR-193 по настоящему изобретению представляет собой соединение, которое ингибирует или снижает активность miR-193, например, посредством связывания с miR-193, или которое ингибирует экспрессию miR-193. Термин "ингибирование экспрессии miR-193" означает, что продуцирование miR-193 в печени или гепатоцитах после обработки указанным ингибирующим соединением меньше, чем количество, продуцируемое до лечения. Специалист в данной области техники может легко определить, была ли ингибирована экспрессия miR-193 в печени или гепатоцитах, используя, например, методики определения уровня транскриптов микроРНК.

Подходящие соединения-ингибиторы miR-193 включают в себя двухцепочечную РНК (такую как короткую или малую интерферирующую РНК или "миРНК"), антагомиры, антисмысловые нуклеиновые кислоты 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, отождествленных 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 относится к набору, содержащему средство для определения уровня:

- (i) miR-193 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-193 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-193 и любого другого циркулирующего маркера повреждения печени, как указано выше. В частности, набор может содержать антитела, специфичные для белка, подлежащего количественной оценке, и/или необходимые праймеры. В более конкретном варианте осуществления набор может содержать праймеры и/или зонды для количественного определения уровней микроРНК, как хорошо известно в данной области техники.

Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для проведения измерений уровней miR-193 и любого другого маркера NAFLD и/или NASH.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средства для определения уровня: по меньшей мере, одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-193 (в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, miR-193b-3p); и по меньшей мере одного другого, в частности всех, маркеров, выбранных из группы, выбранной из:

TIMP-1;
YKL-40;
количества тромбоцитов; и
балла метаболического синдрома.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средства для определения уровня: по меньшей мере, одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-193 (в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, miR-193b-3p); и, по меньшей мере, одного другого, в частности всех, маркеров, выбранных из группы, выбранной из:

YKL-40;
TIMP-1;
HbA1c;
гиалуриновой кислоты и
количества тромбоцитов.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему средства для определения уровня: по меньшей мере, одного маркера, выбранного из группы, состоящей из hsa-miR-193 (в частности, hsa-miR-193b, более конкретно, miR-193b-3p); и, по меньшей мере, одного другого, в частности всех,

маркеров, выбранных из группы, выбранной из:

YKL-40;

TIMP-1;

HbA1c;

гиалуроновой кислоты и

количества тромбоцитов.

В предпочтительном варианте осуществления набор содержит средства для определения уровня miR-193b-3p.

Набор по изобретению является полезным для реализации способов, описанных выше, и может дополнительно содержать инструкции по реализации указанных способов. Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для проведения измерений уровней маркеров, указанных 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.

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.

Клиническое испытание (фаза 2 GOLDEN-505 в NASH (GFT505-212-7 -NCT01694849) представляет 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 $\geq$ 3, включая балл по стеатозу $\geq$ 1, и по баллонированию гепатоцитов $\geq$ 1, и по лобулярному воспалению $\geq$ 1.

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

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) и количественной ОТ-ПЦР, соответственно.

Для обеих когорт GOLDEN и OBESE 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 370 пациентов в исследовании RESOLVE-IT при скрининге с 263 соответствующими биопсиями печени была обработана для идентификации циркулирующей микроРНК с помощью анализа последовательности HTG Edge.

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 кандидатных циркулирующих микроРНК у здоровых с помощью анализа последовательности HTG Edge и количественной ОТ-ПЦР.

Образцы сыворотки были использованы для анализа посредством NGS и количественной 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, мочевины, 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-желатиной (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, С-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), адипектин, 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
С-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
РПНР	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°C . Экстракцию РНК проводили без дополнительного центрифугирования.

В. Секвенирование следующего поколения.

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

Использовали набор для полного транскриптома микроРНК (WTA) HTG. Подготовка библиотеки и секвенирование выполнялись в соответствии с рекомендациями производителя. Для каждого образца было получено в среднем 931000 прочтений на образец. Данные были нормализованы по рекомендации производителя в целях обеспечения возможности прямого сравнения между различными образцами путем корректировки количества прочтений.

Limma, пакет программного обеспечения R/Bioconductor, включал дифференциальный анализ для секвенирования HTG Edge.

С. Количественная ОТ-ПЦР микроРНК в сыворотке.

Тотальную РНК сыворотки с сохраненными микроРНК экстрагировали из 100 мкл сыворотки с помощью набора для экстракции miRVanaParis (AMI556, Ambion) в соответствии с инструкциями производителя. Синтетическая добавленная miR-39 C. Elegans была добавлена к образцам [3125 ммоль] (MSY0000010, Qiagen) 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: 4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), анализа TaqMan MicroRNA 20X (Ref: 4440887, 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). Обратная транскрипция была мультиплексирована с 4 специфичными для обратной РНК праймерами.

Количественные ПЦР проводили с использованием системы реального времени CFX96™ (C 1000 Touch™ Thermal Cycler, BioRad).

Последовательности микроРНК, представляющей интерес, и идентификаторы анализов Taq Man представлены в следующей таблице.

ID микроРНК	Последовательность	номер miRbase	ID теста
hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAAGUCCAGU (ID последовательности: 1)	MIMAT0000459	002250
hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA (ID последовательности: 2)	MIMAT0004614	002281
hsa-miR-193b-5p	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA (ID последовательности: 3)	MIMAT004767	002366
hsa-miR-193b-3p	AACUGGCCCCUACAAAGUCCGCU (ID последовательности: 4)	MIMAT0002819	002367

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 всех синтетических hsa-микроРНК поставщиком являлся IDT.

D. Статистический анализ.

Цель и определение.

Целью данных анализов было выявление биомаркеров, которые могут быть связаны с идентификацией пациентов с NASH, подлежащих лечению. Пациентов, подлежащих лечению (ТБТ), определяют по-разному в зависимости от различных частей исследования.

Согласно первой классификации, ТБТ определяют как:

балл по стеатозу ≥ 1 ,
 балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 ,
 балл по лобулярному воспалению ≥ 1 ,
 NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяется как сумма балла по стеатозу, балла по баллонированию гепатоцитов и балла по лобулярному воспалению),
 стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).
 Согласно второй классификации, TBT определяют как:
 балл по стеатозу ≥ 1 ,
 балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 ,
 балл по лобулярному воспалению ≥ 1 ,
 NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяется как сумма балла по стеатозу, балла по баллонированию гепатоцитов и балла по лобулярному воспалению),
 стадия фиброза ≥ 1 (например, стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4).
 Согласно третьей классификации, TBT определяют как:
 балл по стеатозу ≥ 1 ,
 балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 ,
 балл по лобулярному воспалению ≥ 1 ,
 NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяется как сумма балла по стеатозу, балла по баллонированию гепатоцитов и балла по лобулярному воспалению),
 стадия фиброза = 1b, 1c, 2, 3 или 4.

Другие пациенты были установлены как не подлежащие лечению (NTBT). Для анализа пациенты TBT были классифицированы как 1 и NTBT как 0 в зависимой переменной. Как показано выше, объясняющие переменные охватывают широкий спектр биомаркеров, измеряемых в образцах крови (гематология, биохимия, коагуляция, маркеры печени, циркулирующая микроРНК) или мочи (индикаторная полоска, осадок), до демографических (возраст, пол, раса), регион (исследовательский центр, страна, континент) или медицинских карт (диабет).

Бутстрэп-модель.

В бутстрэп-моделировании логистическая обобщенная линейная модель зависимой переменной (определяющей пациентов TBT/NTBT) в отношении объясняющих переменных (биомаркеров) рассчитывается для всех пациентов из общего набора данных. Выполняется обратный выбор переменных, и оптимальный алгоритм выбирается с помощью AIC. Значимость переменных коэффициентов из этого оптимального алгоритма затем проверяется путем запуска алгоритма с использованием 1000 бутстрэп-образцов. Коэффициенты, которые показывают 95% доверительный интервал, исключая ноль, считаются значимыми. Затем алгоритм проверяется путем расчета ROC, AUC, оптимального порога, общей точности, чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности и отрицательной прогностической ценности.

Результаты

Во-первых, циркулирующие уровни 2083 видов микроРНК были одновременно измерены в 517 образцах сыворотки из GOLDEN-DIAG и OBESE с помощью секвенирования следующего поколения на 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, НСС, печеночная недостаточность, пересадка печени и отказ печени.

Из этого анализа авторы изобретения идентифицировали miR193, которая обычно имела повышенную экспрессию в образцах сыворотки пациентов TBT2 по сравнению с пациентами NTBT2 в когорте GOLDEN-DIAG и OBESE при включении.

Как показано в табл. 1, и является значимым и неожиданным, в когортах GOLDEN-DIAG и OBESE число прочтений на миллион для hsa-miR193a-5p, hsa-miR193a-3p и hsa-miR193b-3p было значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2.

Например, 778, 592 и 632 RPM (прочтений на миллион) было получено у пациентов TBT2 по сравнению с 516, 439 и 392 RPM для пациентов NTBT2 для hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p и hsa-miR-193b-3p, соответственно.

Авторы изобретения также использовали биопсию печени и образцы сыворотки, собранные в конце годовичного периода лечения в испытании GOLDEN, в качестве третьего независимого набора данных и еще раз подтвердили, что число прочтений на миллион для hsa-miR193a-5p и hsa-miR193b-3p были значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2. Уровень hsa-miR-193b-5p также был значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2.

Эти результаты были подтверждены в независимой когорте OBESE между пациентами TBT2 и

NTBT2.

Кроме того, биопсия и образцы сыворотки, собранные в независимой клинической когорте RE-SOLVE-IT, были также обработаны посредством анализа HTG Edge Sequencing. Повышенная регуляция hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-5p и hsa-miR-193b-3p была подтверждена в этом дополнительном наборе данных и клинической когорте.

Все протестированные кандидаты hsa-miR-193, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193b-5p и hsa-miR-193b-3p имели повышенную регуляцию у пациентов с NAFLD с минимальными гистологическими очагами (NTBT2) по сравнению с сывороткой от здоровых субъектов (табл. 1).

Таблица 1

Эксперименты по секвенированию следующего поколения HGT-Edge и число прочтений на миллион (RPM), полученных для hsa-miR-193a-3p, и hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p у пациентов, подлежащих лечению (TBT2), по сравнению с пациентами, не подлежащими лечению (NTBT2)

Golden Diag - при включении				
hsa_микроРНК	RPM у в	RPM у TBT2	Кратность	р-значение
	NTBT2		изменения	
hsa-miR-193a-3p	516	778	1,33	3,33E-04
hsa-miR-193a-5p	439	592	1,38	4,16E-06
hsa-miR-193b-3p	392	632	1,76	8,08E-09
hsa-miR-193b-5p	18	31	1,72	4,22E-06
Golden Diag - на 52 неделе				
hsa_микроРНК	RPM у NTBT2	RPM у TBT2	Кратность	р-значение
			изменения	
hsa-miR-193a-3p	512	598	1,11	3,08E-01
hsa-miR-193a-5p	382	636	1,61	1,14E-06
hsa-miR-193b-3p	354	720	1,83	1,71E-06
hsa-miR-193b-5p	16	35	1,91	6,41E-06
OBESE - при включении				
hsa_микроРНК	RPM у NTBT2	RPM у TBT2	Кратность	р-значение
			изменения	
hsa-miR-193a-3p	811	1075	1,19	1,12E-01
hsa-miR-193a-5p	300	465	1,45	6,99E-06
hsa-miR-193b-3p	95	244	1,96	1,21E-11
hsa-miR-193b-5p	4	13	1,78	1,03E-03
RESOLVE-IT - при включении				
hsa_микроРНК	RPM у NTBT2	RPM у TBT2	Кратность	р-значение
			изменения	
hsa-miR-193a-3p	658	796	1,15	1,16E-01
hsa-miR-193a-5p	442	653	1,44	2,38E-06
hsa-miR-193b-3p	387	607	1,69	8,22E-08
hsa-miR-193b-5p	17	27	1,81	4,82E-06
Субъекты EFS				
hsa_микроРНК	RPM у здоровых			
hsa-miR-193a-3p	198,05			
hsa-miR-193a-5p	212,04			
hsa-miR-193b-3p	69,93			
hsa-miR-193b-5p	3,44			

Прочтения на миллион (RPM) выражены как среднее для групп пациентов TBT2 и NTBT2 (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 (137 TBT2 и 117 NTBT2)), соответственно; TBT2 относится к пациентам с NAS ≥ 4 , по меньшей мере, с 1 баллом по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению и стадией фиброза ≥ 2 при гистологическом исследовании биопсии печени. Субъект NTBT2 отличается от субъекта TBT2, по меньшей мере по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза. Субъекты EFS (Etablissement Francais du Sang) являются здоровыми субъектами, не принимающими лекарства.

В целях подтверждения уровни hsa-miR193a-5p, hsa-miR193b-3p и hsa-miR-193b-5p были затем измерены с использованием метода золотого стандарта для количественного определения олигонуклеотидов в жидкостях организма, количественной ОТ-ПЦР, с использованием специальных анализов микроПНК TaqMan. Результаты можно подвести следующим образом:

Как показано в табл. 2 и на фиг. 2, в обеих когортах при включении и в GOLDEN-DIAG на неделе 52, концентрации hsa-miR193a-5p, hsa-miR193b-3p и hsa-miR-193b-5p в сыворотке были значимо выше у пациентов TBT2, чем у пациентов NTBT2. В GOLDEN-DIAG концентрации hsa-miR193b-3p в сыворотке были значимо выше у пациентов с NAFLD с минимальными гистологическими изменениями (NTBT2), чем в сыворотке от здоровых субъектов (фиг. 1 и фиг. 4).

Таблица 2

Эксперименты количественной ОТ-ПЦР для подтверждения/валидации сверхэкспрессии hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b-3p и hsa-miR-193b-5p у подлежащих лечению пациентов (TBT2) по сравнению с не подлежащими лечению пациентами (NTBT2) в трех когортах (GOLDE, OBESE и RESOLVE-IT)

Golden Diag - При включении	Копий/мкл у NTBT2			Копий/мкл у TBT2			TBT2/NTBT2		
Пациенты	(N=161)			(N=109)					
Копий.мкл-1 в сыворотке	Среднее	SD	SEM	Среднее	SD	SEM	соотношение	значение p	AUC
hsa-miR-193a-5p	400	285	22	609	412	39	1,52	<0,0001	0,68

hsa-miR-193b-3p	161	196	15	290	350	34	1,80	<0,0001	0,68
hsa-miR-193b-5p	20	37	3	40	49	5	1,98	<0,0001	0,67
Golden Diag - Один год спустя - на неделе 52	Копий/мкл у NTBT2			Копий/мкл у TBT2			TBT2/NTBT2		
Пациенты	(N=147)			(N=76)					
Копий.мкл-1 в сыворотке	Среднее	SD	SE М	Среднее	SD	SE М	отношение	р значение	- AU C
hsa-miR-193a-5p	412	260	21	613	401	33	1,49	<0,0001	0,65
hsa-miR-193b-3p	155	179	15	286	281	23	1,84	<0,0001	0,69
hsa-miR-193b-5p	22	40	3	50	69	8	2,32	<0,0001	0,69
Ожирение - при включении	Копий/мкл у NTBT2			Копий/мкл у TBT2			TBT2/NTBT2		
Пациенты (N=202)	(N=50)								
Копий.мкл-1 в сыворотке	Среднее	SD	SE М	Среднее	SD	SE М	отношение	р значение	- AU C
hsa-miR-193a-5p	452	269	19	637	412	58	1,41	<0,0001	0,65

hsa-miR-193b-3p	67	53	4	190	218	31	2,85	<0,0001	0,74
hsa-miR-193b-5p	27	20	1	48	39	6	1,78	<0,0001	0,69
RESOLV E-IT - при включении и Пациенты	Копий/мкл NTBT2			у Копий/мкл у TBT2			TBT2/NTBT2		
	(N=112)			(N=136)					
Копий.мкл-1 в сыворотке	Среднее	SD	SEM	Среднее	SD	SEM	отношение	p - значение	AUC
hsa-miR-193a-5p	334	254	27	503	332	33	1,51	<0,0001	0,70
hsa-miR-193b-3p	56	73	8	105	112	11	1,88	<0,0001	0,73
hsa-miR-193b-5p	11	18	2	19	24	2	1,71	0,0010	0,65

Статистическая значимость TBT2 по сравнению с NTBT2 была рассчитана с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. TBT2 относится к пациентам с NAS ≥ 4 , баллами по стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению ≥ 1 и стадией фиброза ≥ 2 при гистологическом исследовании биопсии печени. AUROC=Площадь под кривой соотношений правильного и ложного обнаружения сигналов была получена для идентификации TBT2 по сравнению с NTBT2.

Как показано на фиг. 1, 2 и 3, при применении второго определения пациентов TBT и пациентов NTBT (TBT1 против NTBT1) в двух когортах при включении анализы показали, что для hsa-miR193b-3p (фиг. 1), hsa-miR193b-5p (фиг. 2) и hsa-miR193a-5p (фиг. 3), сывороточные концентрации были значительно выше у пациентов TBT1, чем у пациентов NTBT1. В GOLDEN-DIAG концентрации hsa-miR193b-3p в сыворотке были значимо выше у пациентов с NAFLD с минимальными гистологическими очагами (NTBT1), чем в сыворотке от здоровых субъектов (фиг. 1). 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, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза.

Как показано на фиг. 1, 2 и 3, при применении третьего определения пациентов TBT и пациентов NTBT (TBT7 против NTBT7) в двух группах при включении анализы показали, что сывороточные концентрации hsa-miR193b-3p (фиг. 1), hsa-miR193b-5p (фиг. 2) и hsa-miR193a-5p (фиг. 3) были значимо выше у пациентов TBT7, чем у пациентов NTBT7. При GOLDEN-DIAG концентрации hsa-miR193b-3p в сыворотке были значительно выше у пациентов с минимальными гистологическими очагами (NTBT7), чем в сыворотке от здоровых субъектов (фиг. 1). 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 ≥ 1 при гистологическом исследовании биопсии печени. Субъект NTBT1 отличается от субъекта TBT1, по меньшей мере на один пункт, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS и/или стадии фиброза.

Как показано на фиг. 4, 5 и 6, в двух группах, hsa-miR193b-3p (фиг. 4), hsa-miR193a-5p (фиг. 5) и hsa-miR-193b-5p (фиг. 6), сывороточные концентрации 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 легким NASH (NAS <4). В GOLDEN-DIAG концентрации hsa-miR-193b-3p в сыворотке были значимо выше у пациентов с минимальной активностью заболевания (NAS <4), чем в сыворотке от здоровых субъектов.

Как показано на фиг. 4, 5 и 6, в двух группах: hsa-miR-193b-3p (фиг. 4), hsa-miR-193a-5p (фиг. 5) и hsa-miR-193b-5p (фиг. 6), концентрации в сыворотке были значимо выше у пациентов со значительным

фиброзом или более высокой стадией фиброза ($F \geq 2$), чем у пациентов без фиброза или с минимальным фиброзом ($F < 2$). В GOLDEN-DIAG сывороточные концентрации hsa-miR-193b-3p были значимо выше у пациентов с NAFLD без фиброза или с минимальным фиброзом ($F < 2$), чем у здоровых людей.

Эти результаты были подтверждены в исследовании RESOLVE-IT для hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-193a-5p и hsa-miR-193b-5p (фиг. 7).

Дальнейший анализ экспериментов количественной ОТ-ПЦР, выполненных на образцах сыворотки из GOLDEN-DIAG при включении, показывает сильную корреляцию между уровнями циркулирующих видов miR-193 и гистологическими баллами и стадией фиброза (аналогичные результаты были получены с использованием образцов OBESE и RESOLVE-IT).

Как показано на фиг. 8, циркулирующий уровень hsa-miR193b-3p положительно коррелирует с баллом по стеатозу, баллом по лобулярному воспалению и баллом по баллонированию гепатоцитов. Следовательно, уровень циркулирующей miR193b-3p значимо и положительно коррелирует с NAS и индексом активности. Наконец, имелась сильная корреляция между уровнем циркулирующей 193b-5p и стадией фиброза в GOLDEN DIAG при включении.

Как показано на фиг. 9, уровень циркулирующей hsa-miR193b-5p положительно коррелирует с баллом по стеатозу, баллом по лобулярному воспалению и баллом по баллонированию гепатоцитов. Следовательно, уровень циркулирующей miR193b-3p значимо и положительно коррелирует с NAS и индексом активности. Наконец, имелась сильная корреляция между уровнем циркулирующей miR193b-5p и стадией фиброза в GOLDEN DIAG при включении.

Как показано на фиг. 10, уровень циркулирующей miR193a-5p положительно коррелирует с баллом по стеатозу, баллом по лобулярному воспалению и баллом по баллонированию гепатоцитов. Следовательно, уровень циркулирующей miR193b-3p значимо и положительно коррелирует с NAS и индексом активности. Наконец, имелась сильная корреляция между уровнем циркулирующей miR193a-5p и стадией фиброза в GOLDEN DIAG при включении.

Результаты, представленные в следующей табл. 3, иллюстрируют значимые корреляции между изменениями уровней циркулирующей hsa-miR-193a-5p и эволюцией активности NAFLD и NASH через 52 недели у пациентов GOLDEN. Аналогичным образом, результаты, представленные в следующей табл. 3, иллюстрируют значимые корреляции между изменениями уровней циркулирующей hsa-miR-193b-3p и эволюцией активности NAFLD и NASH через 52 недели у пациентов GOLDEN.

Таблица 3

Соотношение изменений уровней в сыворотке hsa-miR193a-5p и hsa-miR193b-3p и эволюции индекса активности (AI) и NAS в течение однолетнего исследования GOLDEN

GOLDEN-DIAG (Неделя 52-Включение)				
<i>Изменение концентрации miR в сыворотке (ΔmiR) в сравнении с индексом эволюции активности (ΔAI)</i>				
	Улучшение (Δ AI <0)	стабильный (Δ AI=0)	Обострение (Δ AI> 0)	P-значение (Тест Крускала-Уоллиса)
ΔmiR-193a-5p (копий/мкл)	-72 $\pm$ 33	-7 $\pm$ 41	+202 $\pm$ 91	0,02
ΔmiR-193b-3p (копий/мкл)	-41 $\pm$ 26	-7 $\pm$ 29	+49 $\pm$ 36	0,17
GOLDEN-DIAG (Неделя 52-Включение)				
<i>Изменение концентрации miR в сыворотке (ΔmiR) в сравнении с эволюцией NAS (Δ NAS)</i>				
	Улучшение (Δ	стабильный	Ухудшение (Δ	P-значение

	NAS <0)	(Δ NAS=0)	NAS> 0)	(Тест Крускала-Уоллиса)
ΔmiR-193a-5p (копий/мкл)	-87±33	+23±50	+107±62	0,02
ΔmiR-193b-3p (копий/мкл)	-62±26	+8±38	+48±22	0,008

Моделирование с использованием подхода бутстрэп позволило отобрать четыре значимые переменные с miR-193b-3p для дифференциации пациентов TBT2 и пациентов NTBT2 (табл. 4). Эта модель сочетает miR-193b-3p, тканевый ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1), YKL-40, также называемый хитиназа-3-подобный белок 1 (CHI3L1), количество тромбоцитов и метаболический синдром (MS) для диагностики подлежащих лечению пациентов с NASH или пациентов с риском развития NASH.

Пациенты из группы риска, подлежащие лечению, соответствуют следующим классам, полученным по биопсии печени: балл по стеатозу ≥1, балл по баллонированию гепатоцитов ≥1, балл по лобулярному воспалению ≥1, NAS (показатель активности NAFLD) ≥4 и стадия фиброза ≥2 (например, стадия фиброза равна 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).

Таблица 4

Выбранные переменные в оптимальной модели бутстрэп для идентификации пациентов TBT2 в Golden. Доверительный интервал=CI, SE: стандартная ошибка

	Коэффициент	SE	95% CI	
Постоянная	-5,53	1,46	-8,39	-2,67
miR-193b-3p (Log10 копий.мкл-1)	1,54	0,49	0,58	2,50
Тканевый ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1)	1,05E-02	4,17E-03	2,29E-03	1,87E-02
YKL-40 или CHI3L1	9,34E-06	3,67E-06	2,14E-06	1,65E-05
Количество тромбоцитов	-8,32E-03	3,71E-03	-1,56E-02	-1,05E-03
Метаболический синдром	0,83	0,41	0,03	1,63

Балл определяется как логистическая функция:

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

где

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

где

S представляет собой балл NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в log10 копий.мкл-1;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

D представляет собой количество тромбоцитов в 10^9 /л;

F представляет собой балл метаболического синдрома;

k представляет собой число в диапазоне от -8,39 до -2,67.

Оценка AUC для модели бутстреппинга, соответствующей пациенту с риском, как описано ранее, и объединение нескольких переменных лучше, чем оценка AUC, полученная для отдельных переменных. Таким образом, комбинация нескольких переменных с помощью логистической функции в соответствии с настоящим изобретением лучше и точнее, чем изучение одной переменной (табл. 5 и фиг. 11).

Таблица 5

Сравнение оценок модели бутстреппинга по настоящему изобретению с индивидуальными переменными в GOLDEN-DIAG. Сравнение диагностических характеристик.

Неинвазивный профиль=NIS=алгоритм с miR-193b-3p

	AUC	Оптимальный порог	Точность	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
Genfit NIS	0,80	0,3993	72,62%	81,25%	64,77%	67,71%	79,17%
hsa-miR-193b-3p	0,68	2,1829	67,26%	65,00%	69,32%	65,82%	68,54%
TIP-1	0,68	248,50	64,88%	65,00%	64,77%	62,65%	67,06%
CHI3L1	0,68	56512,88	65,48%	65,00%	65,91%	63,42%	67,44%
Количество тромбоцитов	0,62	212,50	61,91%	65,00%	59,09%	59,09%	65,00%

Оптимальная модель проверяется путем расчета AUC в 1000 бутстрэп-выборках. AUC составляла 0,80 (95% CI: 0,73-0,86). С использованием AUC оптимальной модели были определены 3 порога для предсказания пациентов как TBT или NTBT.

1. Порог, ближайший к точке с 1-специфичность=0% и чувствительностью=100%, равнялся 0,3993. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 72,62%.

Чувствительность: 81,25%.

Специфичность: 64,77%.

PPV: 67,71%.

NPV (отрицательная прогностическая ценность): 79,17%.

2. Порог, дающий чувствительность на уровне 90%, равнялся 0,3050. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 70,24%.

Чувствительность: 90,00%.

Специфичность: 52,27%.

PPV (положительная прогностическая ценность): 63,16%.

NPV (отрицательная прогностическая ценность): 85,19%.

3. Порог, дающий специфичность, превышающую 90%, составил 0,6518. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 70,24%.

Чувствительность: 47,50%.

Специфичность: 90,91%.

PPV (положительная прогностическая ценность): 82,61%.

NPV (отрицательная прогностическая ценность): 65,57%.

Второе моделирование с использованием подхода бутстрэп с уровнями микроРНК в log10 (копий.мкл-1) и биохимическими данными позволило отобрать шесть значимых переменных с miR-193b-3p для дифференциации пациентов TBT2 и пациентов NTBT2 (табл. 6). Эта модель сочетает в себе miR-193b-3p, YKL-40, также называемым хитиназа-3 подобный белок 1 (CHI3L1), тканевый ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1), гликированный гемоглобин (HbA1c), гиалуроновую кислоту (HYUA2) и количество тромбоцитов для диагностирования подлежащих лечению пациентов с NASH или пациентов, имеющих риск развития NASH.

Пациенты из группы риска, подлежащие лечению, соответствуют следующим классам, полученным по биопсии печени: балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (например, стадия фиброза равна 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).

Таблица 6

Выбранные переменные в оптимальной бутстрэп-модели
для идентификации пациентов TBT2 в Golden

	Коэффициент	P-значение	95% CI	
Постоянная I	-7,52	3,72E-06	-10,92	-3,89
miR-193b-3p (log10 копий.мкл-1)	1,29	0,0028	0,44	2,17
YKL-40 или CHI3L1	0,01	0,0028	0,0035	0,020
TIMP-1	0,0092	0,0097	0,0016	0,0018
HYUA2	-0,0024	0,0131	-0,0053	0,0057
HbA1c	0,59	0,0042	0,13	1,08
Количество тромбоцитов	-0,009	0,0043	-0,017	-0,0027

Доверительный интервал=CI.

Балл определяется как логистическая функция:

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

где

$Y2 = I + a2 \cdot A + c2 \cdot C + b2 \cdot B + e \cdot E + g \cdot G + d2 \cdot D$,

где

S2 представляет собой балл NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в log10 копии.мкл-1;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

E представляет собой уровень HYUA2 в нг/мл;

G представляет собой уровень HbA1c в %;

D представляет собой количество тромбоцитов;

I представляет собой число в диапазоне от -10,92 до -3,89.

Оптимальная модель проверяется путем расчета AUC в 1000 бутстрэп-выборках. AUC составляла 0,80 (95% CI: 0,74-0,86). С использованием AUC оптимальной модели был определен оптимальный порог для предсказания пациентов как TBT или NTBT.

1. Порог, ближайший к точке с 1-специфичность=0% и чувствительностью=100%, составил 0,4216. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 74,31%.

Чувствительность: 73,68%.

Специфичность: 74,80% PPV: 69,31%.

NPV: 78,63%.

2. Порог, дающий чувствительность выше 90%, составил 0,2461. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 66,51%.

Чувствительность: 90,53%.

Специфичность: 45,97%.

PPV: 57,33%.

NPV: 86,76%.

3. Порог, дающий специфичность, превышающую 90%, составил 0,6252. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 72,02%.

Чувствительность: 48,42%.

Специфичность: 90,24%.

PPV: 79,31%.

NPV: 69,38%.

Третье моделирование с использованием подхода бутстрэп с уровнями микроРНК в Cq и биохимическими данными позволило отобрать те же шесть значимых переменных с miR-193b-3p для дифференциации пациентов TBT2 и пациентов NTBT2 (табл. 6). Эта модель сочетает в себе miR-193b-3p, YKL-40, хитиназа-3 подобный белок 1 (CHI3L1), тканевый ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1), гликированный гемоглобин (HbA1c), гиалуроновую кислоту (HYUA2) и количество тромбоцитов для диагности-

рования подлежащих лечению пациентов с NASH или пациентов, имеющих риск развития NASH.

Пациенты из группы риска, подлежащие лечению, соответствуют следующим классам, полученным при биопсии печени: балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS (показатель активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (например, стадия фиброза равна 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3).

Таблица 6
Выбранные переменные в оптимальной модели бутстрэп для идентификации пациентов TBT2 в Golden

	Коэффициент	P-значение	95% CI	
Постоянная m	8,08	0,0828	-1,27	17,54
miR193b-3p (Cq)	-0,38	0,0030	-0,64	-0,09
YKL-40 или CHI3L1	0,01	0,0031	0,005	0,019
TIMP-1	0,01	0,0095	0,001	0,016
HYUA2	-0,0024	0,0138	-0,0054	0,0045
HbA1c	0,57	0,00460	0,12	1,08
Количество тромбоцитов	-0,009	0,0042	-0,0164	-0,0016

Доверительный интервал=CI.

Балл определяется как логистическая функция:

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

где

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

где

S3 представляет собой балл NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в log10 копии.мкл-1;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

E представляет собой уровень HYUA2 в нг/мл;

G представляет собой уровень HbA1c в %;

D представляет собой количество тромбоцитов;

m представляет собой число в диапазоне от -1,27 до 17,54.

Оптимальная модель проверяется путем расчета AUC в 1000 бутстрэп-выборках. AUC составляла 0,80 (95% CI: 0,74-0,86). С использованием AUC оптимальной модели был определен оптимальный порог для предсказания пациентов как TBT или NTBT.

1. Порог, ближайший к точке с 1-специфичность=0% и чувствительностью=100%, составил 0,3741. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 73,39%.

Чувствительность: 78,95%.

Специфичность: 69,11%.

PPV: 66,37% NPV: 80,95%.

2. Порог, дающий чувствительность выше 90%, составил 0,2270. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 63,76%.

Чувствительность: 90,53%.

Специфичность: 43,09%.

PPV: 55,13%.

NPV: 85,48%.

3. Порог, дающий специфичность, превышающую 90%, составил 0,6364. Соответствующая факторная таблица дала следующие показатели.

Общая точность: 71,56%.

Чувствительность: 47,37%.

Специфичность: 90,24%.

PPV: 78,95%.

NPV: 68,94%.

Как показано на фиг. 12 и 13, валидация алгоритмов Y2 (hsa-miR-193b-3p (log10 копий.мкл-1), YKL-40 или CHI3L1, TIMP-1, гиалуроновая кислота, HbA1c и количество тромбоцитов) и Y3 (hsa-miR-193b-3p (Cq), YKL-40 или CHI3L1, TIMP-1, гиалуроновая кислота, HbA1c и количество тромбоцитов) в независимой когорте RESOLVE-IT привела к сопоставимой и даже большей AUC, составившей 0,81.

Как показано в табл. 7, выявление пациентов с повышенным риском даже улучшилось в независимой когорте, о чем свидетельствует положительная прогностическая ценность.

Таблица 7

Диагностические характеристики моделей Y2 и Y3 в GOLDEN-DIAG и RESOLVE-IT

Производительность	Общая точность	Чувствительность	специфичность	PPV (%)	NPV (%)
Y2 GOLDEN DIAG	74,31%	73,68	74,80	69,31	78,63
Y2 RESOLVE-IT	70,61%	55,73	87,72	83,91	63,29
Y3 GOLDEN DIAG	73,58%	72,34	74,58	69,39	77,19
Y3 RESOLVE-IT	74,79%	77,69	71,43	75,94	73,39

PPV=положительная прогностическая ценность, NPV=отрицательная прогностическая ценность.

В заключение:

i) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах сыворотки и плазмы с использованием двух разных методологий (HTG Edge-Seq NGS и количественная ОТ-ПЦР), подтверждают использование относящихся к hsa-miR193a-5p, hsa-miR193b-3p и hsa-193b-5p и, в более общем виде, hsa-miR193, олигонуклеотидов в качестве циркулирующих диагностических биомаркеров для идентификации пациентов с NAFLD (NAS $\geq$ 1), NASH (NAS $\geq$ 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 $\geq$ 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 $\geq$ 2) и/или активным NASH и фиброзом (TBT1, TBT2, TBT7);

ii) данные результаты, основанные на измерении уровней микроРНК в образцах сыворотки и плазмы, подтверждают использование видов hsa-miR193 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-miR193 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-miR193 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 противфиброзным 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, НСС или отказ печени), поддерживает виды miR193 в качестве прогностических биомаркеров для оценки риска развития фиброза до цирроза и оценки риска долгосрочных серьезных осложнений.

vi) Оценка AUC для модели бутстреппинга, соответствующей пациенту с риском, как описано ранее, и объединение нескольких переменных статистически лучше, чем оценка AUC, полученная для отдельных переменных. Таким образом, комбинация нескольких переменных с помощью логистической функции согласно настоящему изобретению лучше и точнее, чем изучение одной переменной.

vii) Моделирование с помощью hsa-miR-193b-3p в Cq и моделирование с помощью hsa-miR-193b-3p в log10 копий.мкл-1 приводит к одинаковому выбору переменных: YKL-40 или CHI3L1, TIMP-1, гиалуроновая кислота, HbA1c и количество тромбоцитов.

viii) Сходство AUC между GOLDEN-DIAG и RESOLVE-IT и проверка диагностической ценности алгоритмов Y2 и Y3 в независимой когорте перекрестно проверяет мощность этих составных панелей биомаркеров.

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 неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), включающий в себя определение уровня hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости субъекта, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольными уровнями hsa-miR-193b-3p, где уровень hsa-miR-193b-3p, который более высокий, чем контрольные уровни, полученные из образцов от здоровых субъектов без жирового гепатоза, указывает на присутствие NAFLD.

2. Способ диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий в себя определение уровня hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости субъекта, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольными уровнями hsa-miR-193b-3p,

где уровень hsa-miR-193b-3p, который более высокий, чем уровни контрольных диапазонов, полученные из образцов от субъекта, не страдающего NASH, указывает на присутствие NASH, определенное как 1 балл по стеатозу, лобулярному воспалению и баллонированию гепатоцитов;

где уровень hsa-miR-193b-3p, который более высокий, чем уровень контрольного диапазона, полу-

ченный из образцов от субъектов, не имеющих активную форму NASH, указывает на присутствие активной формы NASH.

3. Способ диагностики фиброза печени, включающий определение уровня hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольными уровнями hsa-miR-193b-3p, где уровень hsa-miR-193b-3p, который более высокий, чем контрольные уровни, полученные из образцов с отсутствующим или минимальным фиброзом печени (F=0 или 1), указывает на присутствие значительного (F=2), умеренного (F=3) или тяжелого (F=4) фиброза печени.

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

5. 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 hsa-miR-193b-3p относительно контрольного уровня hsa-miR-193b-3p, измеренного у субъектов NTBT.

6. Способ по п.5, в котором субъекты, подлежащие лечению (TBT) и не подлежащего лечению (NTBT), имеют следующие оценки, полученные при биопсии печени:

а) TBT1:

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 меньше, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS или стадии фиброза;

или

б) 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 меньше, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS или стадии фиброза;

или

в) 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 меньше, по баллам стеатоза, баллонирования гепатоцитов, лобулярного воспаления, NAS или стадии фиброза.

7. Способ мониторинга NAFLD, NASH и/или фиброза печени, включающий определение уровня hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости субъекта, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольными уровнями hsa-miR-193b-3p из одного или более образцов биологической жидкости, полученных от того же субъекта в прошлом.

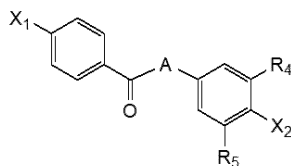
8. Способ по п.7, включающий в себя мониторинг эволюции активности NAFLD, активности NASH или фиброза печени у субъекта на основе эволюции уровня hsa-miR-193b-3p в образцах, собранных в два или более разных моментов времени у одного и того же субъекта.

9. Способ определения эффективности лечения NAFLD, NASH и/или фиброза, включающий определение уровня hsa-miR-193b-3p в образце биологической жидкости субъекта, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольными уровнями hsa-miR-193b-3p из одного или более образцов биологической жидкости, полученных от того же субъекта в прошлом.

10. Способ по п.9 для оценки эффективности лечения NAFLD, NASH или фиброза печени, основанный на эволюции уровня hsa-miR-193b-3p в образцах, собранных в два или более разных моментов времени у одного и того же субъекта, прошедшего лечение.

11. Применение соединения против NAFLD в способе лечения субъекта, имеющего NAFLD, при этом субъект диагностирован или классифицирован как подлежащий лечению пациент вследствие NAFLD по любому из пп.1, 4-6, и введение указанного соединения указанному диагностированному

субъекту, где указанная молекула представлена формулой (I)



где

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

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

X2 представляет собой группу G2-R2;

G1 представляет собой атом кислорода;

G2 представляет собой атом кислорода или серы;

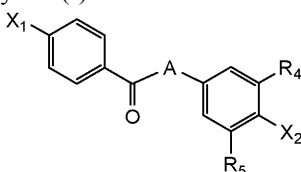
R1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, алкокси или алкилтиогруппу, циклоалкильные группы, циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

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.

12. Применение соединения против NASH в способе лечения субъекта, имеющего NASH, при этом субъект диагностирован или классифицирован как подлежащий лечению пациент вследствие NASH по любому из пп.2, 4-6, и введение указанного соединения указанному диагностированному субъекту, где указанная молекула представлена формулой (I)



где

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

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

X2 представляет собой группу G2-R2;

G1 представляет собой атом кислорода;

G2 представляет собой атом кислорода или серы;

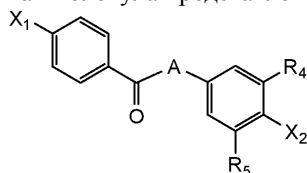
R1 представляет собой атом водорода, незамещенную алкильную группу, арильную группу или алкильную группу, которая замещена одним или несколькими атомами галогена, алкокси или алкилтиогруппу, циклоалкильные группы, циклоалкилтиогруппы или гетероциклические группы;

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.

13. Применение соединения против фиброза в способе лечения субъекта, имеющего фиброз печени, соответственно, при этом субъект диагностирован или классифицирован как подлежащий лечению пациент вследствие фиброза печени по любому из пп.3-6, и введение указанного соединения указанному диагностированному субъекту, где указанная молекула представлена формулой (I)



где

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

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

X2 представляет собой группу G2-R2;

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, 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.

14. Применение ингибирующего hsa-miR-193b-3p соединения в способе лечения субъекта, имеющего NAFLD, где ингибирующее hsa-miR-193b-3p соединение выбирают из двухцепочечных РНК, антагомиров, антисмысловых нуклеиновых кислот и ферментативных молекул для РНК.

15. Применение ингибирующего hsa-miR-193b-3p соединения в способе лечения субъекта, имеющего NASH, где ингибирующее hsa-miR-193b-3p соединение выбирают из двухцепочечных РНК, антагомиров, антисмысловых нуклеиновых кислот и ферментативных молекул для РНК.

16. Применение ингибирующего hsa-miR-193b-3p соединения в способе лечения субъекта, имеющего фиброз печени, где ингибирующее hsa-miR-193b-3p соединение выбирают из двухцепочечных РНК, антагомиров, антисмысловых нуклеиновых кислот и ферментативных молекул для РНК.

17. Применение ингибирующего hsa-miR-193b-3p соединения по любому из пп.14-16, при этом субъект был диагностирован или классифицирован для лечения по любому из пп.1-6.

18. Способ диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или определения активности, стадии или тяжести NASH у субъекта, включающий в себя измерение уровня циркулирующей hsa-miR-193b-3p в крови, сыворотке или плазме крови и по меньшей мере одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольным уровнем hsa-miR-193b-3p.

19. Способ классификации субъекта как получающего или не получающего лечение NASH и/или для классификации пациента в качестве потенциального респондера или нереспондера на медикаментозное лечение, включающий в себя измерение уровня циркулирующей hsa-miR-193b-3p в крови, сыворотке или плазме крови и по меньшей мере одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольным уровнем hsa-miR-193b-3p.

20. Способ определения прогрессирования или репрессирования патологии у пациентов с NASH и/или для предсказания исхода заболевания у пациента, включающий в себя измерение уровня циркулирующей hsa-miR-193b-3p в крови, сыворотке или плазме крови и по меньшей мере одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольным уровнем hsa-miR-193b-3p.

21. Способ определения суррогатных маркеров клинически значимых результатов, включающий в себя измерение уровня циркулирующей hsa-miR-193b-3p в крови, сыворотке или плазме крови и по меньшей мере одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени, где уровень hsa-miR-193b-3p сравнивают с контрольным уровнем hsa-miR-193b-3p.

22. Способ по любому из пп.18 или 21, в котором указанный по меньшей мере один другой циркулирующий маркер повреждения печени выбирают из группы, состоящей из TIMP-1, YKL-40, количества тромбоцитов, HbA1c и гиалуроновой кислоты.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий в себя определение балла метаболического синдрома у субъекта.

24. Способ по любому из пп.18-23, включающий в себя этапы:

измерение уровня hsa-miR-193b-3p и по меньшей мере одного маркера повреждения печени, циркулирующего в крови, сыворотке или плазме, и

объединение результатов с помощью математического алгоритма для получения балла NASH.

25. Способ по п.23, в котором балл NASH рассчитывают в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

при этом

S1 представляет собой балл NASH;

А представляет собой уровень miR-193b-3p в $\log_{10}$ копий.мкл⁻¹;
 В представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;
 С представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;
 D представляет собой количество тромбоцитов: $10^9/\text{л}$;
 F представляет собой метаболический синдром в категории;
 k представляет собой константу логистической функции;
 a представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;
 b представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;
 c представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;
 d представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов; и
 f представляет собой коэффициент, связанный с метаболическим синдромом,
 при этом способ получен из модели бутстреппинга, в которой
 k представляет собой число в диапазоне от -8,39 до -2,67, в частности -5,53,
 a представляет собой число в диапазоне от 0,58 до 2,50, в частности 1,54,
 b представляет собой число в диапазоне от $2,29\text{E-}03$ до $1,87\text{E-}02$, в частности $1,05\text{E-}02$,
 c представляет собой число в диапазоне от $2,14\text{E-}06$ до $1,65\text{E-}05$, в частности $9,34\text{E-}06$,
 d представляет собой число в диапазоне от $-1,56\text{E-}02$ до $-1,05\text{E-}03$, в частности $-8,32\text{E-}03$,
 f представляет собой число в диапазоне от 0,03 до 1,63, в частности 0,83,
 и при этом пороговое значение составляет от 0,3050 до 0,6518, в частности 0,3993,
 при этом балл NASH, превышающий пороговое значение, составляющее от 0,2017 до 0,4645, в частности, равное 0,2302, указывает на тяжелый NASH или на умеренную или высокую активность NASH;
 и, следовательно, является показателем того, что пациент имеет балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $\text{NAS} \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 .

26. Способ по п.23, в котором балл NASH рассчитывают в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где
 $Y2 = 1 + a2 \cdot A + c2 \cdot C + b2 \cdot B + e \cdot E + g \cdot G + d2 \cdot D$,
 при этом
 S2 представляет собой балл NASH;
 А представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в $\log_{10}$ копий.мкл⁻¹;
 С представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;
 В представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;
 Е представляет собой уровень HbA1c в процентах;
 G представляет собой уровень гиалуроновой кислоты в нг/мл;
 D представляет собой количество тромбоцитов: $10^9/\text{л}$;
 l представляет собой константу логистической функции;
 a2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;
 c2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;
 b2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;
 e представляет собой коэффициент, связанный с уровнем HbA1c;
 g представляет собой коэффициент, связанный с уровнем гиалуроновой кислоты;
 d2 представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов,
 при этом способ получен из модели бутстреппинга, в которой
 l представляет собой число в диапазоне от -10,92 до -3,89, в частности -7,52,
 a2 представляет собой число в диапазоне от 0,44 до 2,17, в частности 1,29,
 c2 представляет собой число в диапазоне от 0,0035 до 0,02, в частности 0,01,
 b2 представляет собой число в диапазоне от 0,0016 до 0,018, в частности 0,0092,
 e представляет собой число в диапазоне от -0,0053 до 0,0057, в частности -0,0024,
 g представляет собой число в диапазоне от 0,13 до 1,08, в частности 0,59,
 d2 представляет собой число в диапазоне от -0,017 до -0,0027, в частности -0,009,
 и при этом пороговое значение составляет от 0,2461 до 0,6252, в частности 0,4216,
 при этом балл NASH, превышающий пороговое значение, составляющее от 0,2461 до 0,6252, в частности, равное 0,4216, указывает на тяжелый NASH или умеренную или высокую активность NASH; и, следовательно, является показателем того, что пациент имеет балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , $\text{NAS} \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 .

27. Способ по п.23, в котором показатель NASH рассчитывают в соответствии со следующей логистической функцией:

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

где

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

при этом

S3 представляет собой балл NASH согласно настоящему изобретению;

A' представляет собой уровень hsa-miR-193b-3p в Cq;

C представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл;

B представляет собой уровень TIMP-1 в нг/мл;

E представляет собой уровень HbA1c в процентах;

G представляет собой уровень гиалуроновой кислоты в нг/мл;

D представляет собой количество тромбоцитов: $10^9/\text{л}$;

m представляет собой константу логистической функции;

a3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем hsa-miR-193b-3p;

c3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем YKL-40;

b3 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем TIMP-1;

e2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем HbA1c;

g2 представляет собой коэффициент, связанный с уровнем гиалуроновой кислоты;

d3 представляет собой коэффициент, связанный с количеством тромбоцитов,

при этом способ получен из модели бутстреппинга, в которой

m представляет собой число в диапазоне от -1,27 до 17,54, в частности 8,08,

a3 представляет собой число в диапазоне от -0,64 до -0,09, в частности -0,38,

c3 представляет собой число в диапазоне от 0,005 до 0,019, в частности 0,01,

b3 представляет собой число в диапазоне от 0,001 до 0,016, в частности 0,01,

e2 представляет собой число в диапазоне от -0,0054 до 0,0045, в частности 0,0024,

g2 представляет собой число в диапазоне от 0,12 до 1,08, в частности 0,57,

d3 представляет собой число в диапазоне от -0,0164 до -0,0016, в частности -0,0090,

и при этом пороговое значение составляет от 0,2270 до 0,6364, в частности 0,3741,

при этом балл NASH выше порогового значения, составляющего от 0,2270 до 0,6364, в частности, равного 0,3741, указывает на тяжелый NASH или умеренную или высокую активность NASH; и, следовательно, является показателем того, что пациент имеет балл по стеатозу ≥ 1 , балл по баллонированию гепатоцитов ≥ 1 , балл по лобулярному воспалению ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 2 .

28. Набор для определения уровня

(i) hsa-miR-193b-3p,

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

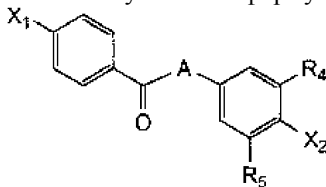
где набор содержит средства для определения уровней hsa-miR-193b-3p и циркулирующий (циркулирующие) маркер(ы) повреждения печени.

29. Набор по п.28, содержащий средство для определения уровня

(i) hsa-miR-193b-3p;

(ii) по меньшей мере одного маркера повреждения печени, циркулирующего в крови, плазме или сыворотке, соответствующего применяемому в способе по любому из пп.1-27.

30. Применение молекулы против NASH 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 пп.2, 4-6, в частности классифицированному как получатель лечения NASH, 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 представляет собой атом кислорода;

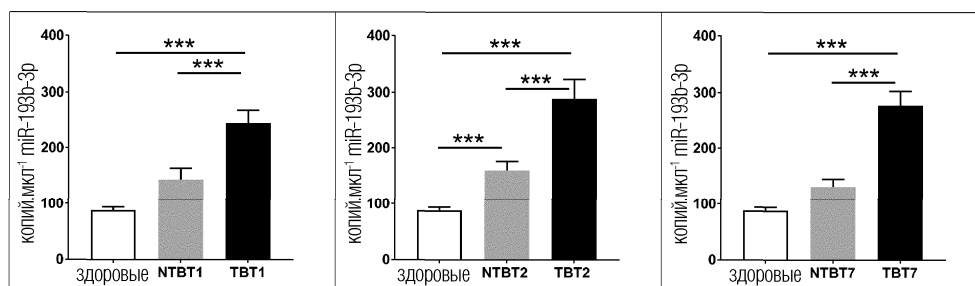
G2 представляет собой атом кислорода или серы;

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

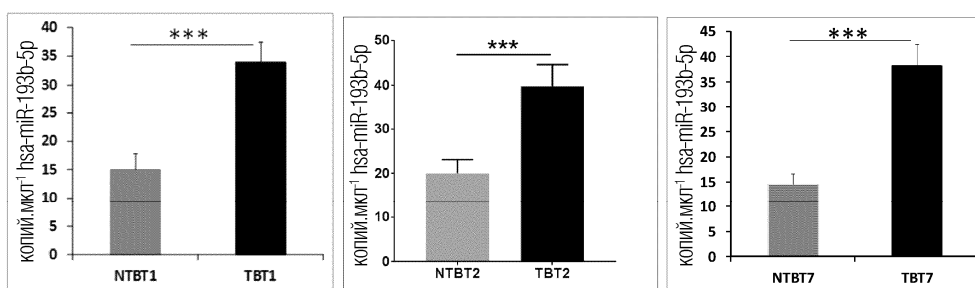
R2 представляет собой алкильную группу, замещенную, по меньшей мере, группой -COOR3, где R3 представляет собой атом водорода или алкильную группу, которая замещена или не замещена одним или несколькими атомами галогена, циклоалкильными группами или гетероциклическими группами,

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

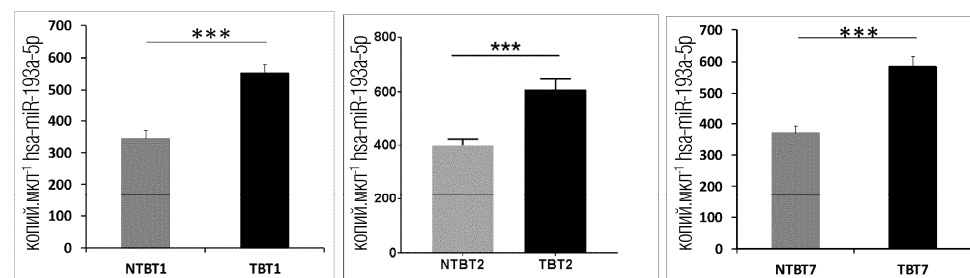
или его фармацевтически приемлемая соль.



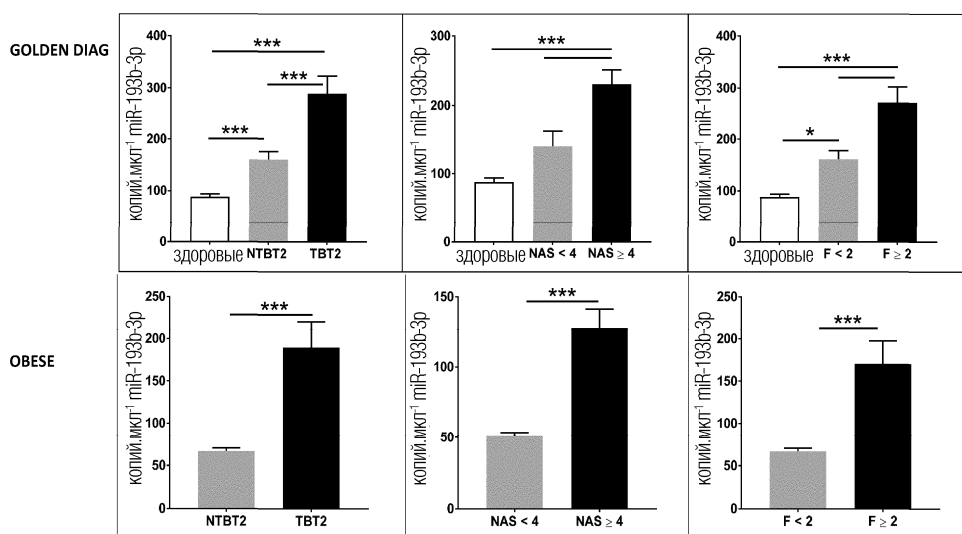
Фиг. 1



Фиг. 2

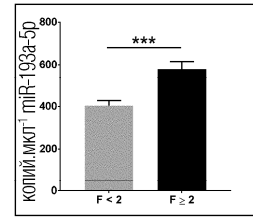
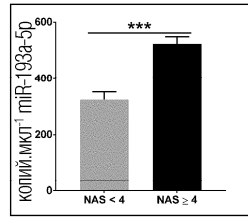
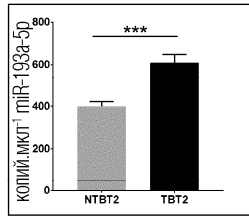


Фиг. 3

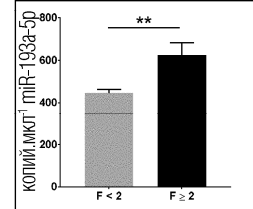
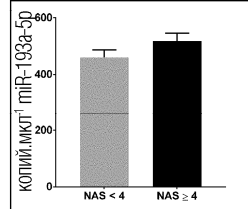
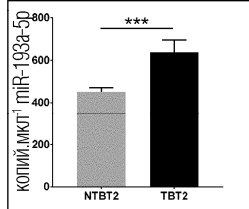


Фиг. 4

GOLDEN DIAG

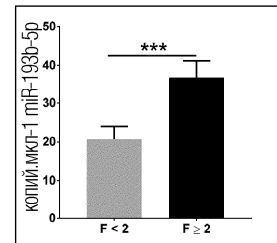
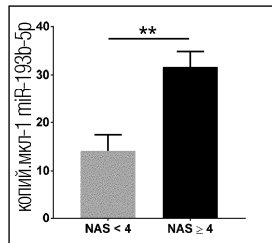
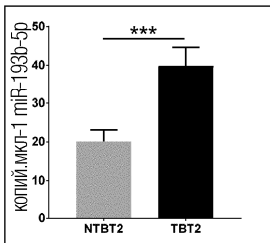


OBESE

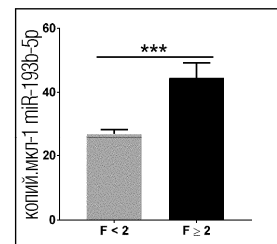
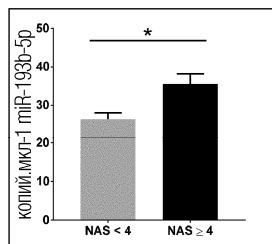
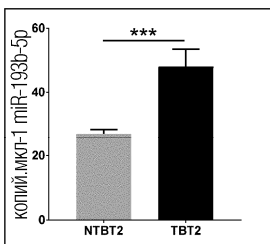


Фиг. 5

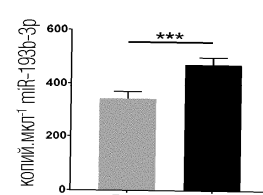
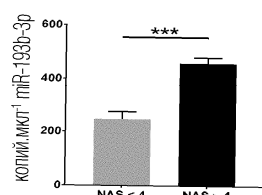
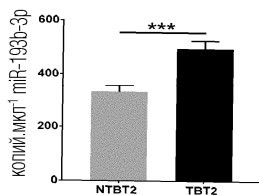
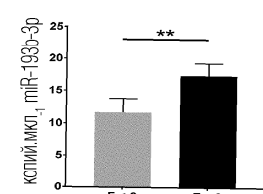
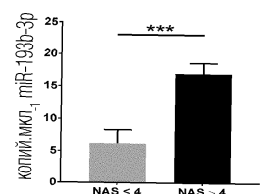
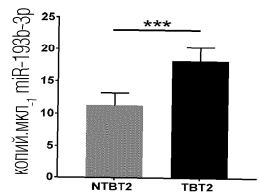
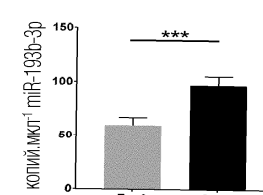
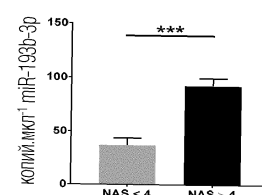
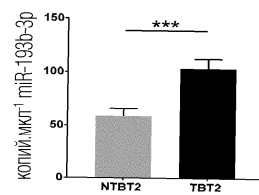
GOLDEN



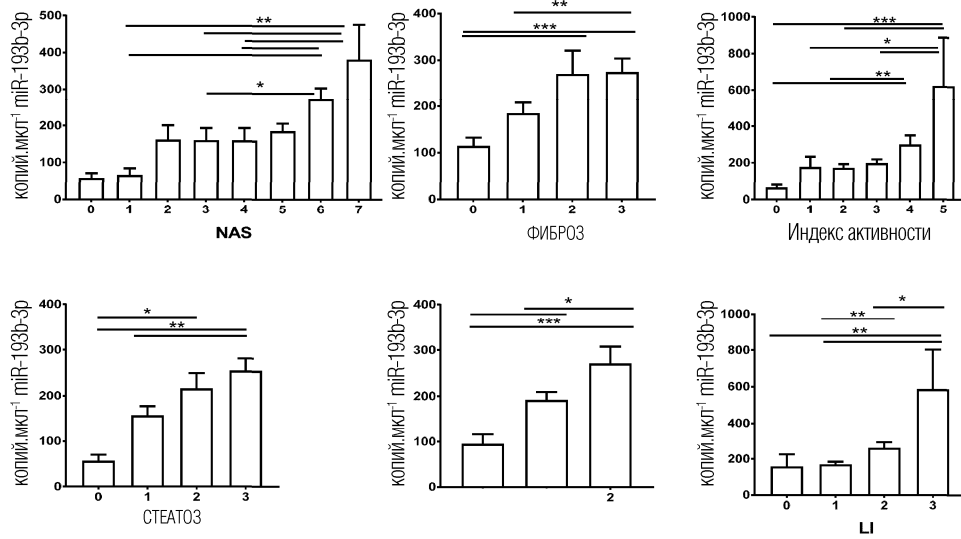
OBESE



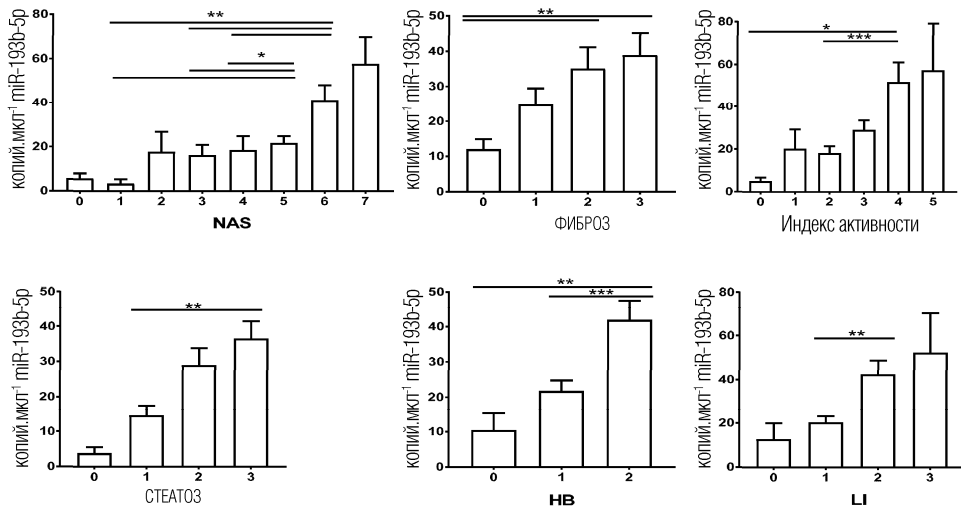
Фиг. 6



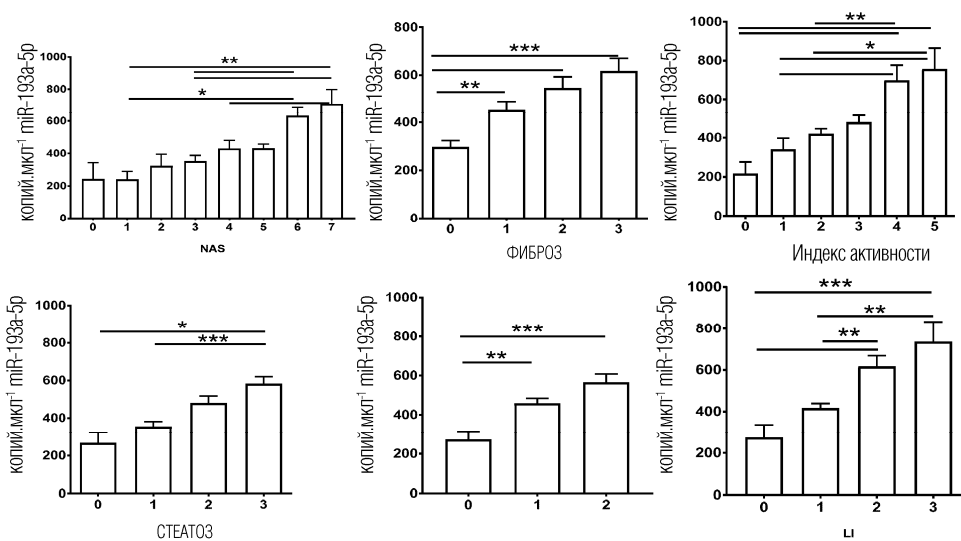
Фиг. 7



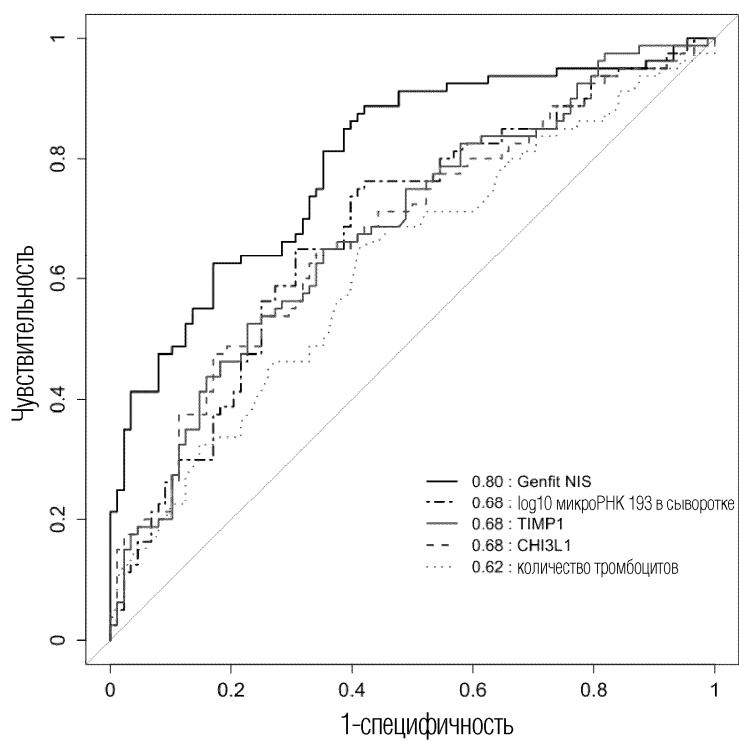
Фиг. 8



Фиг. 9

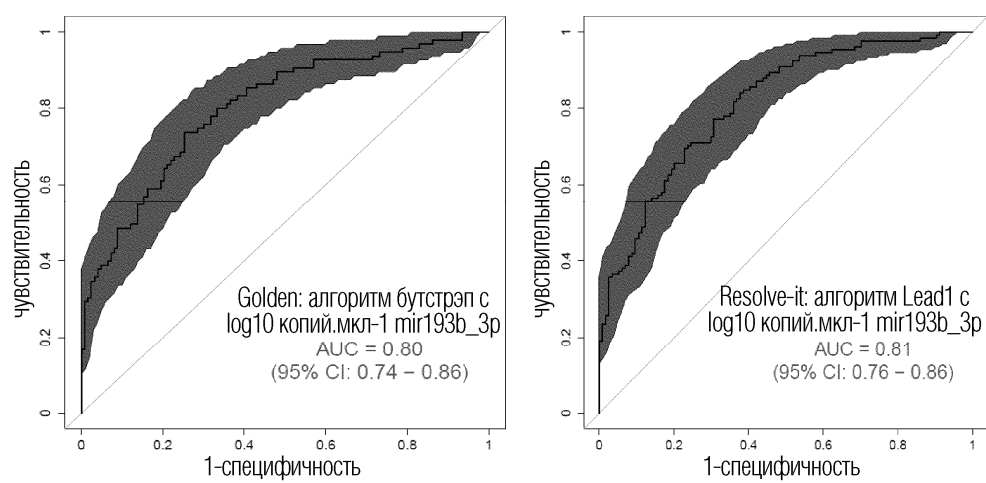


Фиг. 10

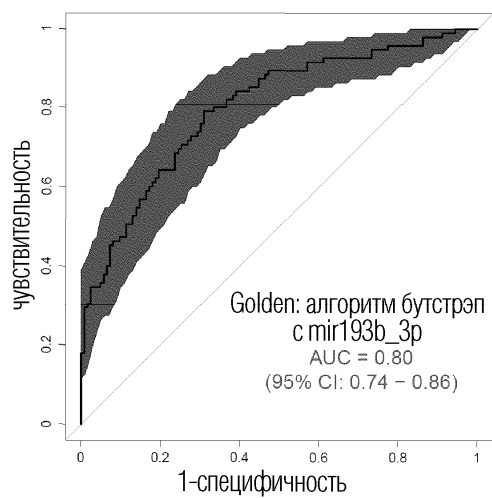


A: GOLDEN-DIAG

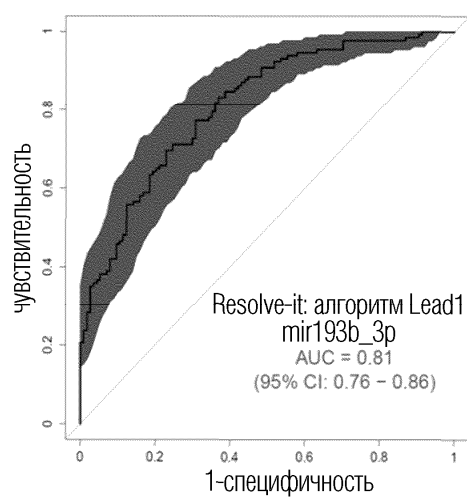
B: RESOLVE-IT



A: GOLDEN-DIAG



B: RESOLVE-IT



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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