



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.05

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

(21) Номер заявки
201892201

(22) Дата подачи заявки
2017.03.30

(54) НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА

(31) 16163048.8

(32) 2016.03.30

(33) EP

(43) 2019.03.29

(86) PCT/EP2017/057633

(87) WO 2017/167934 2017.10.05

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

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

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

(56) ARUN SANYAL ET AL.: "Bootstrap Algorithm Median Algorithm Clinical data from the GOLDEN-505 cohort A NEW METHOD INCLUDING THE QUANTIFICATION OF CIRCULATING MIRNAS ALLOWS THE EFFICIENT IDENTIFICATION OF NASH PATIENTS AT RISK WHO SHOULD BE TREATED", 24 March 2016 (2016-03-24), XP055376619, retrieved from the Internet: URL: <http://www.genfit.com/wp-content/uploads/2016/05/Poster-GENFIT-Biomarkers-EASLIL C16-SAT-431.pdf> [retrieved on 2017-05-29], the whole document

ANONYMOUS: "Elafibranor - Wikipedia", 29 May 2017 (2017-05-29), XP055376649, retrieved from the Internet: URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Elafibranor> [retrieved on 2017-05-29], the whole document

WO-A1-2017046181

EP-B1-1846862

M. ESTEP ET AL.: "Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease", ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 32, № 3, 1 August 2010 (2010-08-01), p. 487-497, XP055019336, ISSN: 0269-2813, DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04366.x, abstract, the whole document

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

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

(57) Изобретение относится к способу диагностики стадии или тяжести неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающему этапы измерения уровня циркулирующей hsa-miR-34 в крови, сыворотке или плазме; измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме; и комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH, где баллы NASH вычисляются посредством следующей логистической функции:

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

где $Y = k + a \times A + b \times B$, где S представляет собой баллы NASH; A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq; B представляет собой уровень YKL-40 в пг/мл; k является числом от -116,08 до 40,97, в частности 12,87; a является числом от -0,82 до 0, в частности -0,42; b является числом от 0 до 1,88E-05, в частности 8,160E-06, где баллы NASH выше порогового значения, составляющие от 0,1387 до 0,3481, свидетельствуют о тяжелом NASH или умеренной или высокой активности NASH и, таким образом, свидетельствуют о том, что пациент имеет баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 1 . Изобретение предоставляет способ с улучшенным

осуществлением диагностики NASH у субъекта или позволяет классифицировать индивидуума как будущего реципиента или нереципиента лечения NASH.

044836 B1

044836 B1

Область изобретения

Изобретение относится к новому способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) и классификации индивидуума как потенциального реципиента лечения NASH.

Предпосылки изобретения

Неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) является прогрессирующим заболеванием печени, охватывающим диапазон от простого стеатоза до неалкогольного стеатогепатита (NASH).

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) также является прогрессирующим заболеванием печени, гистологически отличающимся накоплением жирных кислот, повреждением гепатоцитов и воспалением, напоминающим алкогольный гепатит. NASH представляет собой критическую стадию процесса, который может приводить к циррозу, печеночной недостаточности и/или НСС (печеночно-клеточной карциноме). Для постановки этого диагноза необходимо тщательное документирование отсутствия значительного потребления алкоголя. NASH является одной из наиболее распространенных причин повышения аминотрансфераз у пациентов, рассматриваемых гепатологами при оценке. Ожирение и диабет 2 типа ассоциированы с NASH.

Вместе с распространением ожирения во всем мире, частота NASH также увеличилась за последние годы, и пациенты с развившимся NASH имеют повышенный показатель смертности, связанной с заболеваниями печени. Т.к. распространенность этих заболеваний повышается, ожидают, что распространенность NASH также будет повышаться, и, таким образом, это заболевание становится растущей общественной проблемой в США, а также других странах. Таким образом, растущая распространенность и повышенная смертность, ассоциированные с этими заболеваниями, подчеркивают необходимость

- i) большего механистического понимания прогрессирования заболевания; и
- ii) разработки более чувствительного и надежного способа неинвазивной диагностики NASH.

Т.к. эти заболевания потенциально можно реверсировать при достаточно ранней диагностике или, по меньшей мере, ограничить их последствия, представляется важным иметь возможность обеспечить медицинскую область новым инструментам, делающими возможной такую раннюю, быструю и точную диагностику.

Хотя предпринималось несколько попыток предложить неинвазивные способы диагностики и определения активности, стадии или тяжести NASH, в настоящее время гистологический анализ биоптатов печени остается оптимальным подходом для дифференцирования NASH и ранних стадий стеатоза. Стеатоз, лобулярное и портальное воспаление, повреждение гепатоцитов в формах баллонирования и апоптоза и фиброз являются признаками NASH, оцениваемыми при биопсии. Однако биопсия печени имеет ряд очевидных недостатков. Во-первых, материал, собранный при биопсии печени, представляет собой лишь очень небольшую часть печени индивидуума, подвергаемого диагностике, что, таким образом, увеличивает сомнения, касающиеся того, свидетельствует ли полученный образец об общем состоянии органа индивидуума. Кроме того, биопсия печени является очень инвазивным способом, который может являться трудоемким, причиняющим беспокойство и болезненным для пациента, что увеличивает опасения, касающиеся осложнений и смертности. И наконец, в свете приведенного выше, биопсию печени нельзя с достаточными основаниями предлагать в качестве рутинного способа определения того, страдает ли NASH индивидуум из общей совокупности или даже пациенты с риском NASH, и/или определения активности, стадии или тяжести NASH у указанного индивидуума.

Ультрасонографию также использовали для диагностики жирового гепатоза. Однако этот способ является субъективным, т.к. он основан на интенсивности отраженного сигнала (эхогенности) и конкретных паттернов отраженных сигналов (текстуры). В результате он не является достаточно чувствительным и зачастую неточен, особенно у пациентов с фиброзом на поздних стадиях.

В современных руководствах по диагностике NASH рекомендуют использование соотношения АСТ/АЛТ у нетяжелых пациентов (Angulo P.N., Engl. J. Med., 2002 Apr 18, 346(16):1221-31; Maher J.J., Semin Gastrointest Dis., 2002, 13:31-9) и биопсии печени у тяжелых пациентов с использованием дискриминантной функции Маддрея выше 32 (Levitsky J., Mailliar M.E., Semin Liver Dis., 2004, 24:233-47; Mathurin P. et al., Gastroenterology, 1996, 110:1847-53; Mathurin P. et al., J. Hepatol., 2002, 36:480-7).

Т.к. биопсия печени все еще является инвазивным и затратным способом с потенциальной ошибкой выборочного исследования, предпочтительным может являться наличие быстрого и простого способа для осуществления тестирования, обладающего хорошим прогностическим значением уровня NASH у пациента.

В нескольких исследованиях описано, что некоторые сывороточные биомаркеры фиброза имеют лучшие диагностические значения, чем стандартные сывороточные маркеры, такие трансаминазы или ActiTest (Naveau S. et al., Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2005, 3(2); Castera L. et al., J. Hepatol., 2000, 32:412-8; Annoni G. et al., Hepatology, 1989;9:693-7; Nojgaard C. et al., J. Hepatol., 2003, 39:179-86; Chossegros P., 1995, 22(2 Suppl):96-9), но ни в одном из этих исследований не идентифицирована точная комбинация маркеров NASH.

Кроме того, в последние годы в некоторых исследованиях изучали использование неинвазивных биомаркеров, которые приобрели важное значение в области диагностики печени. Например, в EP 1846862 В описывают неинвазивный способ *in vitro* для диагностики алкогольного или неалкогольного стеатогепатита.

тата в образце сыворотки или плазмы пациента, включающий стадии измерения концентрации 7 биохимических маркеров, а затем их комбинирования с помощью логистической функции для получения конечного значения.

В WO 2014/049131 описывают анализ крови для неинвазивной диагностики неалкогольного стеатогепатита на основе измерения по меньшей мере одного биомаркера, отражающего апоптоз, по меньшей мере одного биомаркера, отражающего антропометрические данные, по меньшей мере одного биомаркера, отражающего метаболическую активность и необязательно по меньшей мере одного биомаркера, отражающего состояние печени и комбинирования указанных биомаркеров с использованием математической функции.

Осуществлено несколько исследований, в которых сравнивали и комбинировали неинвазивные биомаркеры для оценки печеночного фиброза, а также сравнивали точность различных алгоритмов, включающих эти неинвазивные биомаркеры. Трудность заключается в выборе эффективных и надежных биомаркеров в конечном итоге для их комбинирования посредством алгоритма, анализе различных результатов и необязательно определении хорошо отвечающих пациентов.

Однако в настоящее время такой точный способ диагностики NASH недоступен.

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

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на очень точном и полном анализе большого количества переменных, определенных с использованием более 300 образцов высокого качества, полученных от пациентов с NASH при клиническом исследовании, осуществленном заявителем (исследование GFT505-212-7-NCT01694849), включающем гистологические данные, полученные с использованием биоптатов печени пациентов. Это исследование привело к открытию ключевых циркулирующих факторов (или биомаркеров), свидетельствующих о NASH и его тяжести, или стадии, или активности.

Настоящее изобретение относится к способу диагностики стадии или тяжести неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, и/или классификации индивидуума как реципиента или не-реципиента лечения NASH, и/или оценки эффективности лечения, и/или определения прогрессирования или регрессирования патологии у пациентов с NASH, и/или классификации пациента как потенциально отвечающего или не отвечающего на лечение, и/или прогнозирования исхода заболевания у пациента, и/или идентификации суррогатных маркеров клинических исходов, включающих этапы измерения уровня в крови, сыворотки или плазме циркулирующего hsa-miR-34 и измерения в крови, сыворотке или плазме уровня циркулирующей YKL-40.

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

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на количественном анализе и/или комбинировании конкретных циркулирующих микроРНК (мкРНК) и других циркулирующих биомаркеров, таких как биохимические биомаркеры, являющиеся циркулирующими маркерами повреждения печени.

В частности, заявитель определил, что среди мкРНК, описанных в этой области, есть потенциальные маркеры воспаления в условиях NASH/NAFLD (hsa-miR-21, hsa-miR-24, hsa-miR-33a, hsa-miR-34a, hsa-miR-122 и hsa-miR-155), hsa-miR-34a является ключевым биомаркером для диагностики NASH.

Таким образом, первый аспект изобретения относится к способу диагностики стадии или тяжести NASH у индивидуума, включающему измерение уровня циркулирующей hsa-miR-34a в крови, сыворотке или плазме и измерение уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и необязательно по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.

По изобретению, комбинации конкретных мкРНК и необязательно других конкретных биохимических маркеров могут приводить к очень точному, неинвазивному способу диагностики и определения стадии или тяжести NASH у индивидуума. Таким образом, настоящее изобретение относится к комбинации обоих типов маркеров таким образом, что способ является очень мощным и точным. Способ по настоящему изобретению обладает селективностью и специфичностью в отношении NASH у индивидуума.

Таким образом, настоящее изобретение обусловлено идентификацией определенного набора циркулирующих маркеров, которые при рассмотрении в совокупности свидетельствуют о NASH и/или активности, стадии или тяжести NASH у индивидуума, тестируемого на NASH или его тяжесть, или стадию, или активность. Изобретение, в частности, относится к способу диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) и/или определения стадии или тяжести NASH у индивидуума, в котором комбинируют идентификацию циркулирующих микроРНК (мкРНК) и других циркулирующих маркеров повреждения печени и количественный анализ их уровня.

В последнее время наблюдают высокий уровень активности в области, окружающей мкРНК как биомаркеров различных заболеваний, включая злокачественные новообразования, гепатит, повреждение печени и NAFLD (неалкогольную жировую болезнь печени) (Osman, Clin. Lab., 2012, 58:393-402; Cermelli et al., PloS.One, 2011, 6:e23937; Elfimova et al., Front. Physiol., 2012, 3:476).

мкРНК являются некодирующими, небольшими (от 19 до 25 нуклеотидов в длину), высококонсер-

вативными регуляторными РНК, регулирующими экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством частичной репрессии или деградации мРНК-мишени, в качестве эволюционно консервативного молекулярного механизма для модуляции синтеза белка.

В настоящее время существует более 2000 известных мкРНК, кодируемых различными межгенными, интронными или экзонными последовательностями в геноме человека, и считают, что мкРНК могут напрямую направленно воздействовать на до 60% всех генов человека. мкРНК участвуют в широком спектре биологических процессов, включая апоптоз, дифференцировку, развитие, пролиферацию и метаболизм клеток.

Циркулирующие мкРНК являются удивительно стабильными в среде, богатой рибонуклеазами, в крови, т.к. они могут встраиваться в рибонуклеопротеиновые комплексы или везикулы.

Конкретные профили экспрессии мкРНК ассоциированы с некоторыми заболеваниями, включая некоторые злокачественные новообразования, заболевания печени, сердца, почки и аутоиммунное заболевание. Если профили экспрессии циркулирующих мкРНК сильно коррелируют с конкретными условиями, то профиль циркулирующих мкРНК может служить в качестве биомаркера для диагностики и мониторинга заболеваний. мкРНК недавно стали рассматривать в качестве новых биомаркеров и потенциальных терапевтических мишеней при лечении NAFLD.

С момента их открытия, мкРНК исследуют на потенциальную взаимосвязь с заболеваниями человека. При многих заболеваниях наблюдают изменения их профилей экспрессии по сравнению с нормальными тканями и сывороткой. В частности, изменения экспрессии мкРНК при заболеваниях сердца, сепсисе, злокачественных новообразованиях и аутоиммунных заболеваниях позволяют найти новый путь исследования и мишени для лечения заболеваний человека.

Эта перспективная новая область позволила провести исследования и обнаружить возможность того, что стабильные мкРНК, детектируемые в сыворотке и плазме, могут служить в качестве биомаркеров ранних стадий заболевания или являться неинвазивным средством определения тяжести заболевания. Однако мкРНК являются достаточно мощным и значительным показателем NASH, и все еще необходимы способы реализации этого, т.к. современным золотым стандартом диагностики или определения стадии NASH все еще остается биопсия печени.

Среди мкРНК hsa-miR-122 предлагают в качестве биомаркера заболевания печени (Chang et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002).

В исследованиях по определению профиля экспрессии идентифицировали несколько дифференциально экспрессирующихся мкРНК, включая hsa-miR-21, hsa-miR-34a, hsa-miR-122 и hsa-miR-155 при NASH человека и мыши и определяли, что измененная экспрессия этих мкРНК позволяет предполагать их значительную роль в патогенезе NASH. Однако несмотря на некоторый недавний успех в исследовании и лечении NASH в этой области остаются значительные пробелы. Они включают ограниченное понимание биохимической этиологии, широкий спектр ее проявления и основной процесс прогрессирования заболевания от NAFLD до NASH.

В частности, до сих пор неизвестно, существует ли разная предрасположенность конкретных пациентов или тканей к прогрессированию до NASH и может ли эта предрасположенность быть ассоциированной с измененной экспрессией мкРНК.

В настоящее время не доступен ни один диагностический тест для более точной диагностики NASH с учетом измененной экспрессии мкРНК в отдельности или в комбинации.

Настоящее изобретение основано на очень точном анализе биоптатов пациентов в ходе клинического исследования для определения корреляции с наличием или уровнем циркулирующих биологических маркеров и определения различных типов пациентов, подлежащих лечению, в соответствии с балльной оценкой NAS, как описано ниже. В частности, по настоящему изобретению, в качестве неограничивающего примера, определяют три класса пациентов с NASH, подлежащих лечению. Этих пациентов классифицируют относительно балльной оценки характеристик NASH.

В конкретном варианте осуществления для каждого класса пациентов заявитель определяет список соответствующих биомаркеров для нескольких классов пациентов. Дополнительно описан способ, посредством которого комбинируют эти разные соответствующие биомаркеры.

Таким образом, различные способы напрямую связаны с пациентом, подлежащим лечению. Способы по изобретению могут позволить классифицировать пациентов как будущих реципиентов или не-реципиентов лечения NASH в зависимости от их признаков по оценке NASH. Пациент, подлежащий лечению, может зависеть от регуляторного органа или политики здравоохранения каждой страны. Настоящее изобретение относится к мощному инструменту, предоставляемому лечащему врачу для идентификации этих пациентов, подлежащих лечению, т.к. заявитель предлагает различные комбинации маркеров для идентификации нескольких классов пациентов. Осуществление способов по изобретению приводит к точной классификации индивидуумов, находящихся под мониторингом.

По изобретению, для каждого типа пациентов, подлежащих лечению, можно получать балльную оценку NASH.

Настоящее изобретение относится к способу классификации индивидуума как реципиента или не-реципиента, или как потенциального реципиента или потенциального не-реципиента лечения NASH. Эта

классификация также может служить основой для дальнейшего определения того, необходимо ли далее подвергать индивидуума дополнительному подтверждению NASH известными в этой области способами, такими как биопсия печени.

Способ по настоящему изобретению можно использовать для
 диагностики NASH у индивидуума;
 определения стадии NASH у индивидуума;
 определения тяжести NASH у индивидуума;
 классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения NASH;
 оценки эффективности лечения NASH, такой как эффективность лекарственного средства;
 определения прогрессирования или регрессирования патологии у пациента с NASH;
 определения прогрессирования или регрессирования патологии у пациента с NASH после проведения лечения;

прогнозирования того, будет ли пациент восприимчивым или нет, т.е. (потенциально) отвечающим или (потенциально) неответчающим на лечение NASH;

осуществления прогностической оценки, т.е. прогнозирования исхода заболевания.

Способы по изобретению делают возможной диагностику, а также мониторинг развития NASH у пациента. Эти способы предпочтительно можно осуществлять для определения начала лечения, например, или для оперативного вмешательства в случае пациентов в более критическом состоянии (такого как трансплантация печени).

Настоящее изобретение основано на точной комбинации разных идентифицированных биомаркеров благодаря математическим алгоритмам, примененным к результатам большого клинического исследования эффекта элафибранора, очень перспективного лекарственного средства для лечения NASH.

В конкретном варианте осуществления используют различные алгоритмы, каждый из которых ориентирован на конкретный класс пациентов.

При определении конкретного алгоритма в зависимости от состояния пациента дальнейшее использование результатов становится более точным и прогностическим.

Неожиданно среди всех мкРНК, как известно, каким-либо образом ассоциированных с NASH, авторы настоящего изобретения определяли hsa-miR-34 как наиболее мощный и показательный биомаркер NASH при комбинировании по меньшей мере с одним другим биомаркером.

По настоящему изобретению "неалкогольный стеатогепатит" или "NASH" определяют как наличие жирового гепатоза, баллонирования гепатоцитов и воспаления печени.

Помимо этого основного определения заболевания, NASH может дополнительно включать фиброз печени.

По настоящему изобретению термины "индивидуум" и "пациент" используют взаимозаменяемо и они означают млекопитающего, в частности человека или пациента-человека.

Настоящее изобретение благодаря своей неинвазивной природе можно осуществлять в отношении любого индивидуума, такого как индивидуум без известной предрасположенности к NASH или с предполагаемой предрасположенностью к NASH.

Однако в конкретном варианте осуществления индивидуум является индивидуумом с риском NASH или развития NASH в будущем, таким как индивидуум, имеющий ожирение, диабет, страдающий метаболическим синдромом или имеющий повышенный уровень циркулирующих ферментов печени (АЛТ и/или АСТ), или индивидуумом с диагнозом неалкогольной жировой болезни печени (или жирового гепатоза).

Индивидуум также может являться индивидуумом с уже идентифицированной NASH, таким образом, способ по изобретению делает возможным определение рисков развития заболевания в цирроз печени, фиброз, гепатокарциному, показание к трансплантации печени или сердечно-сосудистое заболевание.

Если индивидуум страдает NASH, способ по изобретению делает возможным определение эффективности лекарственного средства для лечения заболевания NASH, и также классификацию пациента как отвечающего/неотвечающего на лечение.

Настоящее изобретение можно осуществлять для идентификации пациентов, которые могут являться отвечающими или неответчающими на лечение NASH. В частности, настоящее изобретение делает возможной классификацию пациентов на различные классы.

В случае классификации каждого пациента настоящее изобретение относится к способу диагностики NASH, или определения стадии или тяжести NASH у индивидуума, или классификации индивидуума как реципиента или не-реципиента лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), или оценки эффективности лечения NASH, такого как посредством введения лекарственного средства, или определения прогрессирования или регрессирования патологии у пациентов с NASH, или определения прогрессирования или регрессирования NASH после проведения лечения, или прогнозирования того, будут ли пациенты восприимчивыми или нет к лечению, или прогностической оценки, т.е. прогнозирования исхода заболевания у пациента, и включающему измерение уровня циркулирующей hsa-miR-34 (например, hsa-miR-34a) в крови, сыворотке или плазме, и измерение в крови, сыворотке или плазме уровня циркулирующей YKL-40.

Классификацию пациентов осуществляют в соответствии с гистологическими признаками в биоптатах печени из образцов высокого качества от пациентов с NASH в ходе клинического исследования: печеночноклеточный стеатоз, баллонирование, лобулярное воспаление и, необязательно, фиброз.

Основываясь на предшествующем анализе, разрабатывали балльную оценку активности NAFLD (NAS), и ее можно определять следующим образом:

NAS основана на 3 признаках, каждый из которых оценивается в от 0 до 2 или 3 (см. таблицу ниже);

NAS представляет собой сумму балльной оценки стеатоза (S), лобулярного воспаления (L) и баллонирования гепатоцитов (B).

Таким образом, NAS может включать баллы от 0 до 8.

Затем необязательно пациентов NASH можно дополнительно охарактеризовывать по стадии фиброза, если он есть. Стадирование фиброза при NASH можно осуществлять в виде 4 стадий с тремя вероятностями для стадии 1, как показано ниже.

NAS=общие баллы: S+L+B (диапазон 0-8)					
Стеатоз	Баллы S	Лобулярное воспаление	Баллы L	Баллонирование гепатоцитов	Баллы B
<5%	0	Нет	0	Нет	0
5-33%	1	<2 фокусов/200х	1	Немного баллонированных клеток	1
34-66%	2	2-4 фокуса/200х	2		
>66%	3	>4 фокуса/200х	3	Много баллонированных клеток	2
Стадия фиброза					
Нет					0
Слабый, перисинусоидальный фиброз зоны 3					1a
Умеренный, перисинусоидальный фиброз зоны 3					1b
Только портальный/перипортальный фиброз					1c
Перисинусоидальный фиброз зоны 3 и портальный/перипортальный фиброз					2
Мостовидный фиброз					3
Цирроз					4

Источник: Kleiner et al., Hepatology, 2005, 41:1313-21.

Данные, собранные авторами настоящего изобретения, обрабатывали с использованием двух разных биостатистических подходов, что приводило к определению баллов, свидетельствующих о заболевании и/или его тяжести, или стадии, или активности, таким образом, получали мощный, точный и высокопрогностический инструмент для лечащего врача для легкого определения того, страдает ли индивидуум NASH, или для определения стадии, или активности, или тяжести заболевания.

Два биостатистических подхода, медианную модель и бутстреп-модель использовали для точного определения комбинации маркеров, коррелирующей с пациентами с NASH, как описано ниже.

Уровни маркеров, измеряемые в настоящем изобретении, определяли в физиологических жидкостях индивидуума, которые представляют собой кровь, более конкретно, образец сыворотки или плазмы.

В конкретном варианте осуществления уровень маркеров и особенно мкРНК, измеряемых в настоящем изобретении, определяют в образце плазмы и предпочтительно образце плазмы, не содержащем тромбоциты.

Уровень маркеров, идентифицированных авторами настоящего изобретения, можно определять общепринятыми способами, хорошо известными в этой области, такими как иммунологические анализы (например, ELISA), или молекулярные и биохимические анализы (количественная RT-ПЦР, колориметрические анализы), или аналитические способы (такие как масс-спектрометрия), в зависимости от типа биомаркера (такого как уровень белка, микроРНК, глюкоза).

Если тестируемым маркером является микроРНК, более конкретно hsa-miR-34a, его измерение можно осуществлять рядом способов, хорошо известных в этой области, таких как представленные в примерах ниже.

В кратком изложении, измерения осуществляют с использованием тотальной РНК, выделенной из образца крови, плазмы или сыворотки, в частности бесклеточного, цитратного образца плазмы, не содержащего тромбоциты. Перед выделением РНК к образцу можно добавлять подходящий внутренний контроль (такой как микроРНК с известной последовательностью и количеством, например, miR-39

C. elegans). Значения C_q определяют с использованием количественной РТ-ПЦР. Доступны коммерческие наборы для осуществления таких анализов. Например, анализ qRT-ПЦР мкРНК Taqman: набор для обратной транскрипции микроРНК Taqman, 20-кратные реагенты для анализа микроРНК TaqMan и универсальный мастер-микс TaqMan II (Applied Biosystems) можно использовать по инструкциям производителя. Обратную транскрипцию можно осуществлять с использованием доступных систем для ПЦР, таких как термоциклер GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), с подходящими параметрами циклов, таких как 16°C в течение 30 мин, затем 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин перед хранением при 4°C. Обратную транскрипцию можно осуществлять в мультиплексном формате. Затем осуществляют количественную ПЦР с использованием системы для количественной ПЦР, такой как CFX96™ Real-Time System (термоциклер C1000 Touch™, BioRad). Условия циклов могут быть следующими: 95°C в течение 10 мин, затем 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с в течение всего 50 циклов, в затем 30°C в течение 30 с. Режимом определения C_q может являться регрессионный режим в системе для количественной ПЦР. В конкретном варианте осуществления значение C_q , определяемое способом по изобретению, является значением C_q , получаемым с использованием указанных выше конкретных параметров и материалов. Значения C_q образцов можно исключать из анализа, если значения превышают максимум C_q стандартной кривой для каждой мкРНК. Стандартную кривую можно использовать для оценки эффективности реакции.

Серийное разведение можно осуществлять по восьми точкам, начиная с наиболее концентрированного образца кДНК, для обеспечения того, чтобы стандартная кривая охватывала все потенциальные концентрации матрицы, которые могут встречаться в ходе исследования. Стандартную кривую можно получать посредством построения графика \log исходного количества матрицы относительно полученных значений C_q . Для получения абсолютных количественных данных синтетическую hsa-мкРНК (например, от Integrated DNA Technologies) можно разводить до 3,125 фмоль/мл и использовать 5 мкл для обратной транскрипции одновременно с РНК, выделенной из образцов сыворотки. Затем продукт можно серийно разводить и можно осуществлять ПЦР с использованием всех образцов (стандартов и РНК, полученной из сыворотки). Построение стандартной кривой можно осуществлять в двух параллелях и использовать для преобразования данных о C_q в копии/мкл. Режим определения C_q представлял собой регрессию. Данные, используемые в построении алгоритма, выражали в формате $\text{Log}_{10}(\text{копий/мкл сыворотки})$.

По настоящему изобретению индивидуума определяют как имеющего NASH, или потенциально имеющего NASH, или вероятно имеющего NASH, если уровень hsa-miR-34a и уровни по меньшей мере одного другого маркера повышены, в частности, по сравнению с референсными значениями, полученными с использованием контрольного (или референсного) образца. Референсный образец может соответствовать образцу физиологической жидкости, такому как образец крови, сыворотки или плазмы, полученному из одного или нескольких индивидуумов, например двух или более, не имеющих NAFLD или NASH.

В настоящем изобретении уровни биомаркеров, т.е. уровень hsa-miR-34 (например, hs-miR-34a) и циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме, измеряли как описано выше, также можно использовать для определения балльной оценки заболевания, также названной "балльной оценкой NASH". Эта балльная оценка, представленная в настоящем описании, является бесценным и мощным инструментом для практического специалиста и нуждающихся в этом индивидуумов, т.к. она делает возможной диагностику NASH, или определение тяжести, или стадии, или активности NASH, а также всех параметров, указанных ниже, с использованием неинвазивного способа, т.е. без использования биопсии печени. Балльную оценку NASH можно сравнивать с пороговыми значениями, позволяющими отличать низкую, умеренную или высокую активность NASH или умеренный и тяжелый NASH.

Кроме того, с помощью балльной оценки NASH также можно прогнозировать эффективность лечения, такого как лечение на основе усвоения лекарственного средства.

По настоящему изобретению эту информацию предпочтительно можно использовать для определения того, будет ли индивидуум реципиентом терапевтического лечения NASH или нет. В конкретном варианте осуществления индивидуума, определенного как пациента с NASH (с низкой, умеренной или высокой активностью NASH или тяжелым NASH), будут лечить с помощью подходящего лечения NASH. В дополнительном конкретном варианте осуществления будут лечить индивидуумов с активностью NASH от умеренной до высокой или тяжелым NASH.

Кроме того, вычисление баллов NASH также позволяет прогнозировать то, будет ли пациент восприимчивым к лечению или нет, т.е. отвечающим или неотвечающим на лечение.

Аналогично балльная оценка NASH позволяет следить за прогрессированием или регрессированием патологии у пациентов с NASH. Кроме того, она делает возможным определение прогрессирования или регрессирования NASH после проведения лечения.

Балльная оценка NASH также делает возможной прогностическую оценку, т.е. прогнозирование исхода заболевания у пациента, например риск развития цирроза.

Фактически высокие баллы NASH свидетельствуют о том, что пациент имеет риск и у него может развиться отрицательное явление, т.е. цирроз или даже смерть.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу классификации индивидуума как ре-

ципиента или не-реципиента или потенциального реципиента или потенциального не-реципиента лечения NASH, включающему определение уровней маркеров, как определено выше, вычисление баллов NASH, как представлено в настоящем описании, и классификацию индивидуума как (потенциального) реципиента или (потенциального) не-реципиента лечения с учетом указанных баллов NASH. Эта классификация также может служить основой для дальнейшего определения того, необходимо ли далее подвергать индивидуума дополнительному подтверждению NASH известными в этой области способами, такими как биопсия печени.

Кроме того, классификацию индивидуума также можно использовать для определения низкой активности NASH или умеренного NASH у индивидуума и предоставления индивидууму рекомендаций по питанию и/или образу жизни для реверсирования NASH с учетом этой классификации.

Пациент, подлежащий лечению, может иметь низкую, умеренную или высокую активность NASH или тяжелый NASH. Однако в предпочтительном варианте осуществления заявитель начал с предположения о том, что пациента, подлежащего лечению, определяют как пациента с риском.

Таким образом, пациента, рассматриваемого в настоящем изобретении, предпочтительно классифицируют как пациента с NASH от умеренного до тяжелого.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения индивидуумов, классифицируемых как имеющих активность NASH от умеренной до высокой или как пациентов с тяжелым NASH, рассматривают в качестве реципиентов или потенциальных реципиентов лечения NASH.

В контексте по настоящему изобретению, как правило, пациента с NASH определяют как имеющего следующие оценки при биопсии печени:

баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 3 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления).

Способы по изобретению включают измерение hsa-miR-34 (например, hsa-miR-34a) и циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме.

В конкретном варианте осуществления измерения уровней мкПНК осуществляют с использованием образцов плазмы и особенно образцов плазмы, не содержащих тромбоциты.

В соответствии со статистическим анализом биомаркеры также тестировали с использованием проверки на коллинеарность, как описано ниже.

Если у двух или более переменных наблюдают корреляцию выше 0,7, осуществляют одномерный анализ различия среднего относительно переменной ответа, определяющей пациентов. Это означает, что коллинеарные переменные также включены, если они существуют. Среди коллинеарных переменных выбирали переменную с наилучшим результатом в одномерном анализе. Эти выбранные переменные, а также другие неколлинеарные переменные включали в моделирование.

В настоящем изобретении уровни биомаркеров, измеренных, как описано выше, также можно использовать для определения балльной оценки заболевания, также называемой "балльной оценкой NASH".

Таким образом, в настоящем описании также описывают способ, где баллы NASH вычисляют из измеренных уровней циркулирующих hsa-miR-34 или YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и где диагностируют NASH и/или определяют стадию, или активность, или тяжесть NASH, и/или классифицируют индивидуума как реципиента или не-реципиента лечения NASH, и/или определяют эффективность лечения на основе введения лекарственного средства, и/или измеряют прогрессирование или регрессирование патологии у пациентов с NASH, и/или измеряют прогрессирование или регрессирование NASH после проведения лечения, и/или определяют пациента как восприимчивого к лечению или нет, и/или осуществляют прогностическую оценку, т.е. прогнозирование исхода заболевания у пациента.

Согласно изобретению, способ включает стадии

измерения уровня циркулирующей hsa-miR-34 в крови, сыворотке или плазме;

измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и необязательно по меньшей мере одного циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме; и

комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения балльной оценки NASH.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один другой циркулирующий маркер повреждения печени выбирают из группы, состоящей из альфа-2-макроглобулина, гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина, инсулина, С-пептида, оценки гомеостатической модели (НОМА), N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-200, СК18-М30, СК18-М65, АЛТ, АСТ, удельного веса мочи), креатинина мочи, базофилов, высокочувствительного С-реактивного белка (HSCRP), β -NAG мочи, лейкоцитов, нейтрофилов и фибриногена. Эти измерения можно дополнять другими параметрами, такими как измерение роста индивидуума, как будет описано ниже. В конкретном варианте осуществления в способе по изобретению комбинируют измерение уровня

miR34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и измерение уровня YKL-40. В дополнительном конкретном варианте осуществления в способе по изобретению комбинируют измерение уровня miR34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и измерение уровня YKL-40 и альфа-2-макроглобулина. В другом конкретном варианте осуществления в способе по изобретению комбинируют измерение уровня miR34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p) и измерение уровня YKL-40, альфа-2-макроглобулина и гликированного гемоглобина (HbA1c).

По настоящему изобретению в способах, представленных в настоящем описании, изменение уровней маркеров, анализируемых относительно уровней в контрольном образце, является показателем NASH, и/или стадии или тяжести NASH, и/или классификации индивидуума как реципиента или не-реципиента лечения NASH, и/или эффективности лечения на основе введения лекарственного средства, и/или прогрессирования или регрессирования патологии у пациентов с NASH, и/или прогрессирования или регрессирования NASH после проведения лечения, и/или определения пациента как восприимчивого или невосприимчивого к лечению, и/или прогностической оценки, т.е. прогнозирования исхода заболевания пациента.

Термин "балльная оценка NASH", также обозначаемый как "S", в конкретном варианте осуществления может относиться к вероятности того, что пациент имеет активность NASH от умеренной до высокой или тяжелой NASH.

Первый подкласс пациентов.

В контексте по настоящему изобретению и в первом варианте изобретения первый подкласс пациентов определяют как пациента, у которого присутствуют следующие показатели при биопсии печени, или он эквивалентен ему:

баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления);

стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

Следующие способы можно осуществлять для диагностики NASH у индивидуума или для классификации индивидуума как потенциально имеющего указанные выше показатели при биопсии печени, или для характеристики пациента как реципиента или не-реципиента лечения NASH.

В первом варианте способа идентификации (или диагностики) первого подкласса пациентов, измеряют уровень hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, и уровень YKL-40.

В предпочтительном варианте осуществления первого варианта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p; и

измерения уровня YKL-40;

измерения уровня по меньшей мере одного другого маркера, предпочтительно всех, выбранных в группе, состоящей из

альфа-2-макроглобулина,

гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак или уровня фруктозамина,

N-концевого про-пептида коллагена типа III (PIIINP),

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

В конкретном варианте осуществления первого варианта изобретения баллы NASH по изобретению вычисляют с использованием следующих уровней маркеров, измеренных, как указано выше:

уровня miR-34a (более конкретно miR-34a-5p);

уровня альфа-2-макроглобулина;

уровня HbA1c;

уровня N-концевого про-пептида коллагена типа III;

уровня hsa-miR-200a (в частности, hsa-miR-200a-3p); и

уровня YKL-40.

В дополнительном конкретном варианте осуществления первого варианта баллы определяют в виде логистической функции

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

где

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

где S представляет собой баллы NASH по настоящему изобретению;

A представляет собой уровень альфа-2-макроглобулина в г/л;

B представляет собой уровень HbA1c в процентах (например, B равно 10, если процентная доля измеренного HbA1c составляет 10%);

C представляет собой уровень N-концевого про-пептида коллагена типа III в нг/мл;

D представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

F представляет собой уровень hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p) в Cq;

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

k представляет собой константу логистической функции;

a представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем альфа-2-макроглобулина;

b представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем HbA1c;

c представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем N-концевого про-пептида коллагена типа III;

d представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p);

f представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем hsa-miR-200 (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p);

g представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем YKL-40;

Таким образом, баллы NASH представляют собой вероятность того, что пациент имеет активность NASH от умеренной до высокой или тяжелый NASH.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента рекомендаций по питанию и/или образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, полученном с использованием медианной модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от 5,94 до 50,74;

a является числом от 0 до 1,07;

b является числом от 0 до 1,20;

c является числом от 0 до 0,24;

d является числом от -0,97 до 0;

f является числом от -0,87 до 0,

g является числом от 0 до $1,74E-05$;

и где пороговое значение составляет от 0,2017 до 0,4645 и более конкретно равно 0,2302.

В конкретном варианте осуществления, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2017 до 0,4645.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, полученном из медианной модели,

k равно 25,13;

a равно 0,52;

b равно 0,57;

c равно 0,12;

d равно -0,43;

f равно -0,47; и

g равно $9,54E-06$,

и где пороговое значение составляет от 0,2017 до 0,4645 и более конкретно равно 0,2302.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2017 до 0,4645.

В конкретном варианте осуществления площадь под кривой (AUC) зависимости чувствительности от частоты ложноположительных результатов (ROC) по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82, более предпочтительно 0,84. AUC является хорошо известным критерием, используемым во многих областях для измерения качества алгоритма. Чем больше ее значение близко 1, тем лучше алгоритм.

В другом конкретном варианте осуществления, полученном из бутстреп-модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от 8,24 до 35,44;

a является числом от 0,06 до 0,88;

b является числом от 0,14 до 1,04;

c является числом от 0,03 до 0,23;

d является числом от -0,75 до -0,05;

f является числом от -0,73 до -0,07,

g является числом от 3,59E-06 до 1,78E-05,

и где пороговое значение составляет от 0,2718 до 0,6391 и более конкретно равно 0,3502.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2718 до 0,6391.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, также полученном из бутстреп-модели,

k равно 21,84;

a равно 0,47;

b равно 0,59;

c равно 0,13;

d равно -0,40;

f равно -0,40; и

g равно 1,07E-05,

и где пороговое значение составляет от 0,2718 до 0,6391 и более конкретно равно 0,3502.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадии фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2718 до 0,6391.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82, более предпочтительно 0,84.

В конкретном варианте осуществления указанные выше способы, описанные для первого варианта, осуществляют с использованием образца плазмы.

В случае бутстреп-модели и медианной модели AUC являлась очень хорошей.

Это означает, что обе модели в настоящем изобретении можно использовать взаимозаменяемо.

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

(i) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно miR-34a-5p) и YKL-40; и по меньшей мере одного другого маркера, в частности всех маркеров, выбранных из группы, состоящей из

(ii) альфа-2-макроглобулина;

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

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

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

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный набор содержит средства для определения уровня

(i) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно miR-34a-5p);

(ii) альфа-2-макроглобулина;

(iii) HbA1c;

(iv) N-концевого про-пептида коллагена типа III; и

(v) hsa-miR-200a (в частности, hsa-miR-200a, более конкретно hsa-miR-200a-3p) и YKL-40.

Набор по изобретению применим для осуществления способов, описанных выше, и может дополнительно необязательно включать инструкции для осуществления указанных способов. Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для осуществления измерений уровней маркеров, указанных выше. Набор содержит антитела, специфические для белка, подлежащего количественному анализу, и/или праймеры, применимые для количественного анализа уровней микроРНК, как хорошо известно в этой области.

В этом первом варианте настоящего изобретения заявитель углубился в исследования и решил сфокусироваться на циркулирующих мкРНК в сыворотке.

Как правило, различные циркулирующие маркеры, особенно мкРНК, оценивают с использованием плазмы различных пациентов с риском, подлежащих лечению.

В новом подходе заявитель оценивал различные циркулирующие маркеры с использованием сывороток. Сыворотку можно определять как прозрачную желтоватую жидкость, полученную после разделения цельной крови на твердые и жидкие компоненты после того, как ей позволили свернуться.

мкРНК, анализируемые с использованием сывороток, выражают в Log_{10} (копий/мкл сыворотки), и подробности способа определения этого значения представлены ниже.

В другой модели мкРНК, анализируемые с использованием сывороток, выражают в S_q .

В предпочтительном варианте осуществления, в котором мкРНК анализируют с использованием сывороток и выражают в S_q по первому варианту по изобретению, способ включает стадии измерения уровня hsa-miR-34 в сыворотке, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, и измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и необязательно по меньшей мере одного циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме; и комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34 в сыворотке, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p; измерения уровня альфа-2-макроглобулина;

измерения уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак или уровня фруктозамина;

измерения уровня YKL-40.

В конкретном варианте осуществления первого аспекта изобретения баллы NASH по изобретению вычисляют из следующих уровней маркеров, измеренных, как указано выше:

уровня miR-34a (более конкретно miR-34a-5p), измеренного в сыворотке;

уровня альфа-2-макроглобулина в сыворотке;

уровня YKL-40 в сыворотке; и

уровня HbA1c.

В конкретном варианте осуществления баллы определяют в виде логистической функции с использованием уровня hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в сыворотке, выраженного в единицах S_q ,

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

где

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

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в сыворотке в S_q ;

B представляет собой сыворотка уровень альфа-2-макроглобулина в г/л;

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

D представляет собой уровень HbA1c в процентах (например, D равно 10, если измеренная процентная доля HbA1c составляет 10%);

k представляет собой константу логистической функции;

a представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем hsa-miR-34a (в частности hsa-miR-34a-5p) в сыворотке;

b представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем альфа-2-макроглобулина в сыворотке;

c представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем YKL-40 в сыворотке;

d представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем HbA1c.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента рекомендаций по питанию и образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, полученном из бутстреп-модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от 9,51 до 34,37;

a является числом от -1,17 до -0,47;

b является числом от 0,02 до 0,84;

c является числом от $6,10E-06$ до $2,09E-05$;

d является числом от 0,07 до 0,89,

и где пороговое значение составляет от 0,2013 до 0,5965 и более конкретно равно 0,4661.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2013 до 0,5965.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, также полученном из бутстреп-модели,

k равно 21,94;
 a равно -0,82;
 b равно 0,43;
 c равно 1,35E-05;
 d равно 0,48,

и где пороговое значение составляет от 0,2013 до 0,5965 и более конкретно равно 0,4661.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2013 до 0,5965.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, полученном из медианной модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от 6,02 до 56,69;
 a является числом от -1,26 до 0,00;
 b является числом от 0,00 до 0,88,
 c является числом от 0,00 до 2,00E-05;
 d является числом от 0,00 до 0,96,

и где пороговое значение составляет от 0,9773 до 0,9955 и более конкретно равно 0,9936.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего стеатоз ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,9773 до 0,9955.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, также полученном из медианной модели,

k равно 28,17;
 a равно -0,84;
 b равно 0,36;
 c равно 1,23E-05;
 d равно 0,41,

и где пороговое значение составляет от 0,9773 до 0,9955 и более конкретно равно 0,9936.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,9773 до 0,9955.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82.

В случае бутстреп-модели и медианной модели AUC являлась очень хорошей.

Это означает, что обе модели в настоящем изобретении можно использовать взаимозаменяемо.

В конкретном варианте осуществления первого варианта изобретения, в котором мкРНК анализируют с использованием сывороток и выражают в копиях/мкл (\log_{10}), способ включает стадии измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, и измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и необязательно по меньшей мере одного циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме; и комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого первого варианта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности, hsa-miR-34a, и более конкретно - hsa-miR-34a-5p;

измерения уровня альфа-2-макроблибулина;

измерения уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак или уровня фруктозамина;

измерения уровня YKL-40.

В этом конкретном варианте осуществления баллы определяют в виде логистической функции с использованием уровня has-miR-34a в сыворотке (в частности, hsa-miR-34a-5p), выраженного в копиях/мкл (\log_{10}).

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

где

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

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в сыворотке в копиях/мкл (log10);

B представляет собой уровень альфа-2-макроглобулина в сыворотке в г/л;

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

D представляет собой уровень HbA1c в процентах (например, D равно 10, если измеренная процентная доля HbA1c составляет 10%);

k представляет собой константу логистической функции;

a представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем hsa-miR-34a (в частности hsa-miR-34a-5p) в сыворотке;

b представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем альфа-2-макроглобулина в сыворотке;

c представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем YKL-40 в сыворотке;

d представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем HbA1c.

Таким образом, баллы NASH представляют собой вероятность того, что пациент имеет активность NASH от умеренной до высокой или тяжелый NASH.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента, рекомендаций по питанию и/или образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, полученном из бутстреп-модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от -14,50 до -7,40;

a является числом от 1,38 до 3,58;

b является числом от 0,02 до 0,84;

c является числом от 5,98E-06 до 2,08E-05;

d является числом от 0,07 до 0,89,

и где пороговое значение составляет от 0,1895 до 0,6089 и более конкретно равно 0,4255.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1895 до 0,6089.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, также полученном из бутстреп-модели,

k равно -10,95;

a равно 2,48;

b равно 0,43;

c равно 1,34E-05;

d равно 0,48,

и где пороговое значение составляет от 0,1895 до 0,6089 и более конкретно равно 0,4255.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1895 до 0,6089.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, полученном из медианной модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от -27,16 до -0,78;

a является числом от 0 до 3,97;

b является числом от 0 до 0,89,

c является числом от 0 до 1,98E-05;

d является числом от 0 до 0,97,

и где пороговое значение составляет от 0,1421 до 0,4556 и более конкретно равно 0,3201.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или

потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1421 до 0,4556.

В дополнительном конкретном варианте осуществления

k равно -11,03;

a равно 2,59;

b равно 0,38;

c равно 1,21E-05;

d равно 0,40,

и где пороговое значение составляет от 0,1421 до 0,4556 и более конкретно равно 0,3201.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1421 до 0,4556.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82.

В последнем варианте осуществления этого первого варианта, касающегося мкРНК, анализируемой с использованием сывороток и выражаемой в копиях/мкл (\log_{10}), заявитель также решил преобразовать измеренные значения некоторых из других биомаркеров в значения \log_{10} . Это означает, что измеренные значения некоторых маркеров, определенных выше, выражают в \log_{10} .

Таким образом, в этом последнем варианте осуществления первого аспекта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, или hsa-miR-122, в частности hsa-miR-122-5p, и измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме и необязательно по меньшей мере одного циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме; и

комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого варианта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, в сыворотке;

измерения уровня \log_{10} (НОМА) (оценки гомеостатической модели), или уровня глюкозы натощак в плазме, или уровня глюкозы натощак в сыворотке, или \log_{10} (фруктозамина), или HbA1C, или инсулина, или С-пептида;

измерения уровня \log_{10} (YKL-40).

В этом конкретном варианте осуществления баллы определяют в виде логистической функции с использованием уровня в сыворотке has-miR-34a (в частности hsa-miR-34a-5p), выраженного в копиях/мкл (\log_{10}).

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

где

$$Y = k + a \times A + b \times B + c \times C,$$

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в сыворотке в копиях/мкл (\log_{10});

B представляет собой уровень \log_{10} (НОМА) в сыворотке;

C представляет собой уровень \log_{10} (YKL-40) в сыворотке,

k представляет собой константу логистической функции;

a представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем hsa-miR-34a (в частности hsa-miR-34a-5p) в сыворотке;

b представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем \log_{10} (НОМА) в сыворотке;

c представляет собой коэффициент, ассоциированный с уровнем \log_{10} (YKL-40) в сыворотке.

Таким образом, баллы NASH представляют собой вероятность того, что пациент имеет активность NASH от умеренной до высокой или тяжелый NASH.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента рекомендаций по питанию и/или образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, полученном из бутстреп-модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k является числом от -25,68 до -13,34;

a является числом от 1,62 до 3,78;

b является числом от 0,40 до 2,52;

c является числом от 1,37 до 3,61.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2392 до 0,5907.

В дополнительном конкретном варианте осуществления, также полученном из бутстреп-модели,

k равно -19,51;

a равно 2,70;

b равно 1,46;

c равно 2,49,

и где пороговое значение составляет от 0,2392 до 0,5907 и более конкретно равно 0,5313.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 2 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,2392 до 0,5907.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,80, предпочтительно 0,82.

Второй подкласс пациентов.

В контексте по настоящему изобретению и во втором варианте изобретения второй подкласс пациентов определяют как (или он эквивалентен) пациента, у которого присутствуют следующие показатели при биопсии печени:

баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления);

стадия фиброза ≥ 1 (такая как стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4).

Способы по изобретению включают измерение hsa-miR-34 и YKL-40 и необязательно по меньшей мере одного другого циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.

В соответствии со статистическим анализом, биомаркеры также тестировали посредством проверки на коллинеарность, как описано ниже.

В первом варианте способа идентификации (или диагностики) второго подкласса пациентов измеряют уровень hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p, и уровень YKL-40.

В предпочтительном варианте осуществления второго варианта изобретения способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p;

измерения уровня YKL-40; и необязательно

измерения уровня удельного веса мочи или креатинина мочи;

измерения уровня базофилов; и

измерения уровня HSCRP (высокочувствительного С-реактивного белка).

В более предпочтительном варианте осуществления этого второго варианта изобретения, полученного из медианной модели, способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p;

измерение уровня YKL-40.

В конкретном варианте осуществления второго варианта изобретения баллы NASH по изобретению вычисляют из следующих уровней маркеров, измеренных, как указано выше:

уровня miR-34a (более конкретно - miR-34a-5p); и

уровня YKL-40.

В дополнительном конкретном варианте осуществления второго варианта изобретения баллы определяют в виде логистической функции

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

где

$$Y = k + a \times A + b \times B,$$

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

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

k является числом от -116,08 до 40,97;

a является числом от -0,82 до 0;

b является числом от 0 до 1,88E-05,

и где пороговое значение составляет от 0,1387 до 0,3481 и более конкретно равно 0,2187.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1387 до 0,3481, более конкретно равны 0,2187.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента, рекомендаций по питанию и/или образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, также полученном из медианной модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k равно 12,87;

a равно -0,42;

b равно 8,160E-06,

и где пороговое значение составляет от 0,1387 до 0,3481 и более конкретно равно 0,2187.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,1387 до 0,3481, более конкретно равны 0,2187.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,68, предпочтительно 0,70.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого второго варианта изобретения, полученного из бутстреп-модели, способ включает стадии

измерения уровня hsa-miR-34, в частности hsa-miR-34a, более конкретно hsa-miR-34a-5p;

измерения уровня YKL-40;

измерения уровня удельного веса мочи;

измерения уровня базофилов;

измерения уровня HSCRP.

В конкретном варианте осуществления второго варианта изобретения баллы NASH по изобретению вычисляют из следующих уровней маркеров, как указано выше:

уровня miR-34a (более конкретно, miR-34a-5p);

уровня YKL-40;

уровня удельного веса мочи;

уровня базофилов; и

уровня HSCRP.

В дополнительном конкретном варианте осуществления второго варианта изобретения баллы определяют в виде логистической функции

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

где

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

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

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

C представляет собой уровень удельного веса мочи (без единиц);

D представляет собой уровень базофилов в $10^9/\text{л}$;

F представляет собой уровень HSCRP в мг/дл;

k является числом от -124,81 и 1,13;

a является числом от -0,91 до -0,25;

b является числом от 4,77e-06 до 2,39e-05;

c является числом от 17,21 до 141,51;

d является числом от 2,80 до 60,74;

f является числом от 0,01 до 0,23,

и где пороговое значение составляет от 0,5791 до 0,8269 и более конкретно равно 0,7758.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,5791 до 0,8269.

Если S выше или равны пороговому значению, индивидуума классифицируют как имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как подлежащего лечению NASH или потенциально подлежащего лечению NASH. В конкретном варианте осуществления, если S ниже порогового значения, индивидуума можно классифицировать как подлежащего лечению или неподлежащего лечению, в частности неподлежащего лечению, и/или индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента, рекомендаций по питанию и/или образу жизни для лечения низкой активности NASH или умеренного NASH у него.

В конкретном варианте осуществления, полученном из бутстреп-модели, как описано в экспериментальной части заявки,

k равно -61,84;

a равно -0,58;

b равно 1,44E-05;

c равно 79,36;

d равно 31,77;

f равно 0,12,

и где пороговое значение составляет от 0,5791 до 0,8269 и более конкретно равно 0,7758.

В конкретном варианте осуществления индивидуума классифицируют как имеющего NASH или имеющего или потенциально имеющего баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , $NAS \geq 4$ и стадию фиброза ≥ 1 и/или классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения, если баллы NASH S выше или равны пороговому значению от 0,5791 до 0,8269.

В конкретном варианте осуществления AUC по меньшей мере равна 0,75, предпочтительно 0,77.

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

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

(ii) YKL-40; и необязательно

(iii) удельного веса мочи или креатинина мочи; базофилов и HSCRP (высококчувствительного C-реактивного белка).

В конкретном варианте осуществления изобретения указанный набор содержит средства для определения уровня

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

(ii) YKL-40.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанный набор содержит средства для определения уровня

(i) hsa-miR-34 (в частности, hsa-miR-34a, более конкретно miR-34a-5p);

(ii) YKL-40;

(iii) удельного веса мочи;

(iv) базофилов; и

(v) HSCRP.

Набор по изобретению применим для осуществления способов, описанных выше, и может дополнительно необязательно включать инструкции по осуществлению указанных способов. Набор может содержать реагенты и буферы, подходящие для осуществления измерений уровней маркеров, указанных выше. Набор содержит антитела, специфические для белка, подлежащего количественному анализу, и/или праймеры, применимые для количественного анализа уровней микроРНК, как хорошо известно в этой области.

По другому аспекту настоящее изобретение также относится к различным способам классификации пациентов.

Настоящее изобретение также относится к другим заболеваниям печени и более конкретно фиброзным заболеваниям печени, таким как вирусный гепатит (HBV, HCV), алкогольный стеатогепатит, заболевания желчных путей (первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, недостаточность альфа-1-антитрипсина).

Примеры

Материалы и способы.

Сбор и анализы образцов.

Клиническое исследование.

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

Биопсию печени осуществляли для подтверждения диагноза NASH после соответствующего исключения заболевания печени другой этиологии. NASH диагностировали как стеатогепатит, оцениваемый посредством биопсии печени в пределах 6 месяцев до рандомизации. Подтверждение стеатогепатита было основано на централизованном анализе биоптатов печени. Пациентов NASH определяли как имеющих $NAS \geq 3$, включая баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 и баллы лобулярного воспаления ≥ 1 .

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

Образцы плазмы из исследования фазы 2 GOLDEN-505 NASH использовали для идентификации наиболее мощных и значимых маркеров NASH.

Биопсию печени осуществляли для подтверждения диагноза NASH после соответствующего исключения заболевания печени другой этиологии.

NASH диагностировали как стеатогепатит, оцениваемый посредством биопсии печени в пределах 6 месяцев до рандомизации. Подтверждение стеатогепатита было основано на централизованном анализе биоптатов печени.

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

Забор крови и лабораторное тестирование.

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

В соответствии с протоколом исследования осуществляли следующие анализы.

"Гематология" включает гемоглобин, гематокрит, количество эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы - абсолютные значения и % значения), тромбоциты и ретикулоциты.

"Биохимическая панель I" включает глюкозу плазмы, триглицериды (TG), креатинин, клиренс креатинина, гамма-глутамилтрансферазу (GGT), аспартатаминотрансферазу (АСТ), аланинаминотрансферазу (АЛТ), креатинфосфокиназу (СРК), щелочную фосфатазу, тиреотропный гормон (TSH) и HbA1c.

"Биохимическая панель II" включает глюкозу плазмы, креатинин, клиренс креатинина, общий белок, альбумин, натрий, калий, хлорид, кальций, мочевую кислоту, мочевины, выраженную как азот мочевины крови (BUN), аспартатаминотрансферазу (АСТ), аланинаминотрансферазу (АЛТ), гамма-глутамилтрансферазу (GGT), щелочную фосфатазу, креатинфосфокиназу (СРК), общий билирубин, конъюгированный билирубин, С-реактивный белок (hsCRP), соотношение АСТ/АЛТ и HbA1c.

"Анализ мочи" включает

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

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

химический анализ (альбумин и креатинин).

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

"Липидная панель" включает триглицериды (TG), общий холестерин, не-HDL-C (вычисление), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), липопротеины низкой плотности (LDL-C) (вычисление), вычисленный холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C) (вычисление), апо-липопротеин AI (ApoAI) и аполипопротеин B (ApoB).

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

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

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

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

"Маркеры печени" включают цитокератин-18 (СК18) (М65 и М30), адипонектин, ферритин, альфа-2-макроглобулин, FGF19 и FGF21, гиалуроновую кислоту (Advia centaur, реагент, производимый Siemens Belgium и переданный Genfit), N-концевой про-пептид коллагена типа III (PIINP) (Advia centaur, реагент, производимый Siemens Belgium) и тканевый ингибитор матричной металлопротеазы-1 (TIMP-1) (Advia centaur, реагент, производимый Siemens).

Список способов, инструментов и производителей для каждого биохимического анализа приведен в этой таблице.

Параметр	Способ	Инструмент	Производитель
Лептин	ELISA	вручную	R&D systems
Инсулин	CLIA	Immulite 2000	Siemens
НОМА-IR	Вычисление с использованием глюкозы и инсулина		
Фруктозамин	Колориметрический способ	Modular P800	Roche Diagnostics
C-пептид	CLIA	Immulite 2000	Siemens
Гаптоглобин	Иммунотурбидиметрия	Modular P800	Roche Diagnostics
Фибриноген	Способ Клаусса	STAR- evolution	Stago
ФНО	Мультианалитное профилирование использование флуорокина	Luminex	Millipore
ИЛ-6	Мультианалитное профилирование использование флуорокина	Luminex	Millipore
PAI-1 Ag	ELISA	вручную	Stago
FFA	ACS-ACOD	Modular P800	Roche Diagnostics
СК18 М30	ELISA	вручную	Peviva
СК18 М65	ELISA	вручную	Peviva
Адипонектин	ELISA	вручную	Millipore
Ферритин	ECLIA	Modular E170	Roche Diagnostics
Альфа-2- макроглобулин	Нефелометрия	BN II	Siemens
Гиалуроновая кислота	Иммунологический анализ	Advia centaur	Siemens
PIINP	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
YKL40, CHI3L1	Иммунологический анализ хитиназа-3-подобного белка 1 человека Quantikine® ELISA Кат. № DC3L10 Для количественного определения концентрации хитиназа-3-подобного белка 1 человека (CHI3L1) в супернатантах культур клеток, сыворотке, плазме и моче.		

Получение и хранение образцов.

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

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

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

Выделение тотальной РНК и количественный анализ мкРНК в цитратной плазме.

Тотальную РНК с сохраненной мкРНК выделяли из 400 мкл не содержащей тромбоциты плазмы с помощью набора для выделения miRNeasy (miRNeasy Serum/Plasma Kit (кат. № 217184)) с использованием соотношения плазма/QIAzol 1:5 по инструкциям производителя. В образцы [3,125 фмоль] добавляли синтетическую добавочную miR-39 C. elegans до выделения РНК в качестве внутреннего контроля при выделении РНК. Элюцию осуществляли в 18 мкл элюирующего буфера.

Экспрессию зрелой мкРНК определяли по инструкциям производителя с использованием анализа qRT-ПЦР мкРНК Taqman: набор для обратной транскрипции микроРНК TaqMan (Ref: 4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 20-кратная смесь для анализа микроРНК TaqMan (Ref: 4440887, Applied Biosystems) и универсальный мастер-микс TaqMan II (Ref: 4440040, Applied Biosystems).

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием термоциклера GeneAmp® PCR System 9700 (Ref: 200005, Applied Biosystems) с условиями циклов 16°C в течение 30 мин, затем 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин перед хранением при 4°C. Обратную транскрипцию осуществляли в мультиплексном формате с использованием 4 мкРНК-специфических обратных праймеров для сохранения образца РНК.

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

Последовательности специфических праймеров для мкРНК, потенциально представляющих интерес, выбирали в соответствии с представленным в следующей табл. 1.

Таблица 1

Последовательности тестируемой мкРНК

Зрелая мкРНК	ID анализа (Life Technologies)	Последовательность зрелой мкРНК	Номер в mirBase	Поставщик
cel-miR-39-3p	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO:1)	MIMAT0000010	Life technologies
hsa-miR-122-5p	002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (SEQ ID NO:2)	MIMAT0000421	Life technologies

hsa-miR-34a-5p	000426	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU (SEQ ID NO:3)	MIMAT0000255	Life technologies
hsa-miR-200a-3p	000502	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU (SEQ ID NO:4)	MIMAT0000318	Life technologies
hsa-miR-29b-3p	000413	UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO:5)	MIMAT0000100	Life technologies
hsa-miR-192-5p	000491	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC (SEQ ID NO:6)	MIMAT0000222	Life technologies
hsa-miR-221-3p	000524	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC (SEQ ID NO:7)	MIMAT0000278	Life technologies
hsa-miR-103a-3p	000439	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA (SEQ ID NO:8)	MIMAT0000101	Life technologies
hsa-miR-155-5p	002623	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU (SEQ ID NO:9)	MIMAT0000646	Life technologies
hsa-miR-199a-5p	000498	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC (SEQ ID NO:10)	MIMAT0000231	Life technologies

Данные, используемые при конструировании алгоритма, находились в формате S_q. Режим определения S_q представлял собой регрессию.

Выделение тотальной РНК и количественный анализ мкРНК в сыворотке.

Тотальную РНК в сыворотке с сохраненной мкРНК выделяли из 100 мкл сыворотки с помощью набора для выделения miRVanaParis (AM1556, Ambion) по инструкциям производителя. К образцам [3,125 фмоль] добавляли синтетическую добавочную miR-39 C. elegans (MSY0000010, Qiagen) до выделения РНК в качестве внутреннего контроля при выделении РНК. Элюцию осуществляли в 100 мкл элюирующего буфера.

Экспрессию зрелой мкРНК определяли по инструкциям производителя с использованием анализа qRT-ПЦР мкРНК Taqman: набор для обратной транскрипции микроРНК TaqMan (Ref: 4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), 20-кратная смесь для анализа микроРНК TaqMan (Ref: 4440887, Applied Biosystems) и универсальный мастер-микс TaqMan II (Ref: 4440040, Applied Biosystems).

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием термоциклера GeneAmp® PCR System 9700 (Ref: 200005, Applied Biosystems) с условиями циклов 16°C в течение 30 мин, затем 42°C в течение 30 мин и 85°C в течение 5 мин перед хранением при 4°C. Обратную транскрипцию осуществляли в мультиплексном формате с использованием 4 мкРНК-специфических обратных праймеров для сохранения образца РНК.

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

Последовательности специфических праймеров для интересующих мкРНК выбирали в соответствии с представленным в следующей таблице.

Зрелая мкРНК	ID анализа	Последовательность зрелой мкРНК	Номер в mirBase	Поставщик
cel-miR-39-3p	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	MIMAT0000010	Life technologies
hsa-miR-122-5p	002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	MIMAT0000421	Life technologies
hsa-miR-34a-5p	000426	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	MIMAT0000255	Life technologies
hsa-miR-200a-3p	000502	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	MIMAT0000318	Life technologies
hsa-miR-29b-3p	000413	UAGCACCAUUGAAAUCAGUGU U	MIMAT0000100	Life technologies
hsa-miR-192-5p	000491	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	MIMAT0000222	Life technologies

hsa-miR-221-3p	000524	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUU C	MIMAT000027 8	Life technologies
hsa-miR-103a-3p	000439	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUG A	MIMAT000010 1	Life technologies
hsa-miR-155-5p	002623	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG U	MIMAT000064 6	Life technologies
hsa-miR-199a-5p	000498	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUU C	MIMAT000023 1	Life technologies

Синтетическую hsa-мкРНК (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 осуществляли ПЦР с использованием всех образцов (стандарты и РНК из сыворотки). Построение стандартных кривых осуществляли в двух параллелях и использовали для преобразования данных Cq в копии/мкл. Режимом определения Cq являлась регрессия. Данные, используемые для построения алгоритма, находились в формате Log10(копии/мкл сыворотки).

Ref. ID	Олигорибонуклеотид	Последовательность одноцепочечной РНК	MW	Tm (°C)	Содержание GC (%)	Поставщик
69861876	cel-miR-39-3p	5' Phos- UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG- 3'	7098,2	53,2	50,0	IDT
69861877	hsa-miR-122-5p	5' Phos- UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG- 3'	7196,2	50,7	45,5	IDT
69861878	hsa-miR-29b-3p	5' Phos- UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU- 3'	7373,4	44,9	34,8	IDT
69861879	hsa-miR-34a-5p	5' Phos- UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU- 3'	7109,1	53,0	50,0	IDT
69861880	hsa-miR-192-5p	5' Phos- CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3'	6376,0	53,4	47,6	IDT
69861881	hsa-miR-221-3p	5' Phos- AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC- 3'	7358,3	51,8	47,8	IDT
69861882	hsa-miR-103a-3p	5' Phos- AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA- 3'	7490,5	59,4	47,8	IDT
69861883	hsa-miR-155-5p	5' Phos- UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU- 3'	7469,4	50,7	39,1	IDT
69861884	hsa-miR-199a-5p	5' Phos- CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUUC- 3'	7300,3	51,9	52,2	IDT
69861885	hsa-miR-200a-3p	5' Phos- UAACACUGUCUGGUAACGAUGU- 3'	7083,2	51,3	40,9	IDT

Статистический анализ.

Цель и определение.

Целью этих анализов являлось обнаружение биомаркеров, которые могут быть связаны с идентификацией пациентов с NASH, подлежащих лечению. Пациентов, подлежащих лечению (TBT), определяют по-разному в зависимости от различных частей исследования.

В первом аспекте изобретения ТВТ определяют как баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления);

стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

Во втором аспекте изобретения ТВТ определяют как

баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления);

стадия фиброза ≥ 1 (такая как стадия фиброза, равная 1, 2, 3 или 4).

В третьем аспекте изобретения ТВТ определяют как

баллы стеатоза ≥ 1 ;

баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 ;

баллы лобулярного воспаления ≥ 1 ;

NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 (NAS определяют как сумму баллов стеатоза, баллов баллонирования гепатоцитов и баллов лобулярного воспаления);

стадия фиброза=1b, 1c, 2, 3 или 4.

Других пациентов определяли как неподлежащих лечению (NTBT). Для анализа пациентов ТВТ классифицировали как 1 и NTBT как 0 в переменной ответа. Как указано выше, объясняющие переменные включали широкий диапазон биомаркеров, измеренных в образцах крови (гематология, биохимия, свертывание, маркеры печени, циркулирующие мкРНК) или моче (тест-полоски, седиментация) при условии наличия демографических (возраст, пол, раса), географических (исследовательский центр, страна, континент) или медицинских (диабет) данных.

Обработка набора данных.

Набор данных, используемый в настоящем исследовании, получали из исследования Golden-505, и исходно он состоял из 274 пациентов и 121 переменных. Обработка набора данных включала следующие стадии:

1) удаление пациентов без измерения мкРНК;

2) удаление переменных с более чем 10 отсутствующими значениями;

3) удаление пациентов с крайними значениями и 28 с оставшимися отсутствующими значениями.

Это приводило к получению набора данных для 216 пациентов для всех способов по настоящему изобретению за исключением способов, касающихся сыворотки, которые осуществляли на 212 пациентах, и 112 переменных, используемых для проверки на коллинеарность между объясняющими переменными.

Проверка на коллинеарность.

Коэффициент корреляции.

Пирсона вычисляли попарно с использованием количественных переменных. Когда у двух переменных наблюдают коэффициент корреляции выше 0,7 в случае анализа с использованием мкРНК плазмы или 0,6 в случае анализа с использованием мкРНК сыворотки, осуществляли одномерный анализ различия среднего относительно переменной ответа, определяющей пациентов ТВТ. Выбранная переменная была более значимой.

Коллинеарные и выбранные переменные представлены в табл. 2-7.

Эти переменные зависят от определения пациента и, таким образом, склонны варьироваться в зависимости от категории пациентов.

Медианная модель.

Получение медианной модели начинали с наблюдения набора данных в обучающей выборке, соответствующей 2/3 пациентов ТВТ/NTBT, и валидационной выборке, соответствующей остальной 1/3 пациентов ТВТ/NTBT. Это наблюдение осуществляют случайным образом миллион раз и для анализа сохраняют образцы, у которых наблюдают однородность между обучающей и валидационной выборками (не наблюдали значимого различия во всех объясняющих переменных между двумя выборками). В каждой обучающей выборке вычисляли генерализованную логистическую линейную модель переменной ответа (определяющей пациентов ТВТ/NTBT) относительно объясняющих переменных (биомаркеров). Для каждой модели обучающей выборки осуществляли пошаговое исключение переменных и находили оптимальную модель с помощью наименьшего информационного критерия Акаике (AIC). Таким образом, все объясняющие переменные имели коэффициент модели для каждой обучающей выборки. Медианный алгоритм строили с использованием переменных, у которых наблюдали медианный коэффициент, отличающийся от нуля, и соответствующие ему коэффициенты. Этот алгоритм валидировали (вычисле-

ние ROC, AUC, оптимального порогового значения, общей точности, чувствительности, специфичности, положительного прогностического значения и отрицательного прогностического значения) в каждой валидационной выборке и получали оптимальное пороговое значение медианы. По сравнению с бутстреп-моделью медианная модель также применима к общему набору данных для валидации.

Бутстреп-модель.

При построении бутстреп-модели генерализованную логистическую линейную модель переменной ответа (определяющей пациентов TBT/NTBT) относительно объясняющих переменных (биомаркеров) вычисляли с использованием всех пациентов из общего набора данных. Осуществляли пошаговое исключение переменных и выбирали оптимальный алгоритм с использованием AIC. Затем тестировали значимость коэффициентов переменных из этого оптимального алгоритма, запуская алгоритм с использованием 1000 бутстреп-образцов. Коэффициенты с 95%-ным доверительным интервалом, исключаящим нуль, считали значимыми. Затем алгоритм валидировали посредством вычисления ROC, AUC, оптимального порогового значения, общей точности, чувствительности, специфичности, положительного прогностического значения и отрицательного прогностического значения.

Сравнение с другими способами балльной оценки NASH.

Способы осуществления балльной оценки NASH уже описаны в литературе:

балльная оценка фиброза при NAFLD (индекс Ангуло) (Angulo et al., 2007);

ELF (Guha et al., 2008) (см. также лист спецификаций ELF <http://www.healthcare.Siemens.com/clinical-specialities/liver-disease/elf-test-now-avail>);

Fibrotest (Ratziu et al., 2006);

Fibrometer (Cales et al., 2009);

FLI (Bedogni et al., 2006);

балльная оценка стеатоза или SteatoTest (Poynard et al., 2005).

Таким образом, авторы настоящего изобретения оценивали балльную оценку NASH по изобретению с использованием ряда этих уже известных способов.

Сравнение балльной оценки по различным моделям по настоящему изобретению и других балльных оценок и сравнение балльных оценок по различным моделям по настоящему изобретению относительно индивидуальных переменных представлены в табл. 8-12.

Данные, представленные в настоящем описании, свидетельствуют о существенном улучшении точности идентификации пациентов с NASH или потенциальных пациентов с NASH, определения активности, стадии или тяжести NASH. Этот вывод имеет исключительно важное значение и будет бесценным инструментом для улучшения эффективности лечения пациентов.

Таблица 2

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных		
Индекс массы тела	Обхват талии	Масса	
НОМА	Инсулин	С-пептид	
СК18-М65	СК18-М30	АСТ	АЛТ
НВА1С	Уровень глюкозы натощак в плазме	Фруктозамин	Уровень глюкозы натощак в сыворотке
Базофилы (абс.)	Базофилы (%)		
Эозинофилы (абс.)	Эозинофилы (%)		
Гематокрит	Гемоглобин	Количество эритроцитов	
Лейкоциты	Нейтрофилы (абс.)		
Нейтрофилы (%)	Лимфоциты (%)		
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)	
Ретикулоциты (абс.)	Ретикулоциты (%RBC)		
Липопротеины высокой плотности (HDL)	холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C)	Аполипопротеин AI (Apo AI)	
Липопротеины промежуточной плотности С	Общий холестерин	Аполипопротеин В (Apo В)	Не-HDL-C
Липопротеины низкой плотности (LDL) 1	Липопротеины промежуточной плотности А		
Липопротеины низкой плотности (LDL) 2	Аполипопротеин В (Apo В)	Не-HDL-C	
Холестерин липопротеинов очень низкой плотности	Триглицериды		
miRNA103	miRNA155	miRNA199a	miRNA221
miRNA34a	miRNA122	miRNA192	
Удельный вес мочи	Креатинин мочи		

Выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеа-

тоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3) при измерении в плазме.

Таблица 3

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных			
Индекс массы тела	Обхват талии	Масса		
НОМА	Инсулин	С-Пептид		
СК18-М65	СК18-М30	АСТ	АЛТ	
FGF-21	Гомоцистеин			
Конъюгированный билирубин	Общий билирубин			
С1	Na			
HBA1C	Уровень глюкозы натощак в плазме	Фруктозамин	Уровень глюкозы натощак в сыворотке	
Базофилы (абс.)	Базофилы (%)			
Эозинофилы (абс.)	Эозинофилы (%)			
Гематокрит	Гемоглобин	Количество эритроцитов		
Лейкоциты	Нейтрофилы (абс.)	Нейтрофилы (%)		
Лимфоциты (%)	Нейтрофилы (%)			
Моноциты (абс.)	Моноциты (%)			
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)		
Ретикулоциты (% of RBC)	Ретикулоциты (абс.)			
Лipoproteины высокой плотности (HDL)	Холестерин липoproteинов высокой плотности (HDL-C)	Аpolipoprotein AI (Apo AI)		
Лipoproteины промежуточной плотности A	Лipoproteины низкой плотности (LDL) 1 Не-HDL-C	Общий холестерин	Аpolipoprotein B (Apo B)	Лipoproteины промежуточной плотности B
Лipoproteины промежуточной плотности C	Лipoproteины промежуточной плотности B	Общий холестерин	Не-HDL-C	Аpolipoprotein B (Apo B)
Лipoproteины низкой плотности (LDL) 2	Общий холестерин	Не-HDL-C	Аpolipoprotein B (Apo B)	
Холестерин липoproteинов очень низкой плотности	Триглицериды	Не-HDL-C		
miRNA34a	СК18-М30	АСТ	miRNA122	
β -NAG в моче	ALM в моче			

Выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3) при измерении в сыворотках (мкРНК в копиях/мкл log 10).

Таблица 4

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных			
Индекс массы тела	Обхват талии	Масса		
НОМА	Инсулин	С-Пептид		
FGF-21	Гомоцистеин			
Конъюгированный билирубин	Общий билирубин			
С1	Na			
HBA1C	Уровень глюкозы натощак в плазме	Фруктозамин	Уровень глюкозы натощак в сыворотке	
Базофилы (абс.)	Базофилы (%)			
Эозинофилы (абс.)	Эозинофилы (%)			
Гематокрит	Гемоглобин	Количество эритроцитов		
Лейкоциты	Нейтрофилы (абс.)	Нейтрофилы (%)		
Лимфоциты (%)	Нейтрофилы (%)			
Моноциты (абс.)	Моноциты (%)			
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)		

Ретикулоциты (%RBC)	Ретикулоциты (абс.)			
Лipoproteины высокой плотности (HDL)	Холестерин липoproteинов высокой плотности (HDL-C)	Аpolipoprotein AI (Apo AI)		
Лipoproteины промежуточной плотности A	Лipoproteины низкой плотности (LDL) 1	Общий холестерин	Аpolipoprotein B (Apo B)	Лipoproteины промежуточной плотности B
	Не-HDL-C			
Лipoproteины промежуточной плотности C	Лipoproteины промежуточной плотности B	Общий холестерин	Не-HDL-C	Аpolipoprotein B (Apo B)
Лipoproteины низкой плотности (LDL) 2	Общий холестерин	Не-HDL-C	Аpolipoprotein B (Apo B)	
Холестерин липoproteинов очень низкой плотности	Триглицериды	Не-HDL-C		
miRNA34a	CK18-M30	ACT	АЛТ	miRNA122
	CK18-M65			
β -NAG в моче	А1М в моче			

Выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3) при измерении в сыворотках (мкРНК в Cq).

Таблица 5

Значимые выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных			
log10 (HOMA)	Инсулин	C-пептид		
	HbA1c	Уровень глюкозы натощак в плазме	log10 (фруктозамин)	Уровень глюкозы натощак в сыворотке
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)		
CK18-M65	log10 (CK18-M30)	log10 (ACT)		
log10 (miRNA34a)	log10 (miRNA122)	log10 (АЛТ)	log10 (ACT)	log10 (CK18-M30)

Значимые выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3) при измерении в сыворотках (мкРНК в копиях/мкл и log10-трансформация).

Таблица 6

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных			
Индекс массы тела	Обхват талии	Масса		
НОМА	Инсулин	C-Пептид		
CK18-M65	CK18-M30	ACT	АЛТ	
HbA1c	Уровень глюкозы натощак в плазме	Фруктозамин	Уровень глюкозы натощак сыворотка	
Базофилы (абс.)	Базофилы (%)			
Эозинофилы (абс.)	Эозинофилы (%)			
Лимфоциты (%)	Нейтрофилы (%)			
Нейтрофилы (абс.)	Лейкоциты			
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)		
Количество эритроцитов	Гемоглобин	Гематокрит		
Ретикулоциты (абс.)	Ретикулоциты (% of RBC)			
холестерин липoproteинов высокой плотности (HDL-C)	Лipoproteины высокой плотности (HDL)	Аpolipoprotein AI (Apo AI)		

Лipoppoтeины нeзкoй плотности (LDL) 1	Лipoppoтeины пpoмeжyтoчнoй плотности A				
Лipoppoтeины нeзкoй плотности (LDL) 2	He-HDL-C	Лipoppoтeины пpoмeжyтoчнoй плотности C	Апoлипoпpoтeин B (Apo B)	Общeй холестерин	Хoлeстeрин липoпpoтeинов oчeнь нeзкoй плотности
miRNA221	miRNA155	miRNA199a	miRNA103		
miRNA34a	miRNA122	miRNA192			
Удeльный вeс мoчи	Кpeaтинин мoчи				

Выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 1 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3) при измерении в плазме.

Таблица 7

Выбранные переменные среди коллинеарных переменных	Исключенные переменные среди коллинеарных переменных				
Индекс массы тела	Обхват талии	Масса			
НОМА	Инсулин	C-пептид			
СК18-M65	СК18-M30	АСТ	АЛТ		
HBA1C	Уровень глюкозы натощак в плазме	Фруктозамин	Уровень глюкозы натощак в сыворотке		
Базофилы (абс.)	Базофилы (%)				
Эозинофилы (абс.)	Эозинофилы (%)				
Гемоглобин	Гематокрит	Количество эритроцитов			
Лейкоциты	Нейтрофилы (абс.)				
Лимфоциты (%)	Нейтрофилы (%)				
Протромбиновое время (секунды)	INR	Протромбиновое время (%)			
Ретикулоциты (% of RBC)	Ретикулоциты (абс.)				
Холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C)	Лipoppoтeины вoыcoкoй плотности (HDL)	Апoлипoпpoтeин AI (Apo AI)			
Лipoppoтeины пpoмeжyтoчнoй плотности C	Общeй холестерин	He-HDL-C	Апoлипoпpoтeин B (Apo B)		
Лipoppoтeины нeзкoй плотности (LDL) 1	Лipoppoтeины пpoмeжyтoчнoй плотности A				
Лipoppoтeины нeзкoй плотности (LDL) 2	He-HDL-C	Апoлипoпpoтeин B (Apo B)			
Триглицериды	Хoлeстeрин липoпpoтeинов oчeнь нeзкoй плотности				
miRNA103	miRNA155	miRNA199a	miRNA221		
miRNA34a	miRNA122	miRNA192			
Удeльный вeс мoчи	Кpeaтинин мoчи				

Выбранные и исключенные переменные при проверке на коллинеарность в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 1 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности, 2 или 3) при измерении в плазме.

Таблица 8

Сравнение балльных оценок в моделях по настоящему изобретению и других известных моделей

	AUC	Пороговое значение	Точность	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
Бутстреп	0,82	0,4255	75,94	73,12	78,15	72,34	78,81
Полученная медианная	0,82	0,3201	75,94	72,04	78,99	72,83	78,33

модель							
Балльная оценка фиброза NAFLD	0,69	0,676	34,12	66,67	8,47	36,47	24,39
ELF	0,70	7,7	45,28	97,28	4,20	44,39	71,43
FibroTest	0,68	0,48	66,51	40,86	86,55	70,37	65,19
BARD	0,64	2	59,91	60,22	59,66	53,85	65,74
APRI	0,72	1	66,51	26,88	97,48	89,29	63,04
Неинвазивная система балльной оценки	0,68	0,361	62,26	67,74	57,98	55,75	69,70
FIB-4	0,72	3,25	58,96	6,45	100,00	100,00	57,77
Диагностическая панель NAFLD - NASH	0,71	0,3641	71,70	63,44	78,15	69,41	73,23

Модели (мкРНК, измеряемой в сыворотке в копиях/мкл \log_{10}) в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3). Обе модели, полученные из бутстреп-модели и медианной модели по настоящему изобретению, имели лучшую AUC, чем другие известные модели. Различия четко свидетельствуют о важности настоящего изобретения.

Таблица 9

Сравнение балльной оценки с использованием бутстреп-модели по настоящему изобретению и других балльных оценок

Балльная оценка	AUC	Балльная оценка	AUC	Значение P
Бутстреп-модель	0,82	Полученная медианная модель	0,82	0,7968
Бутстреп-модель	0,82	Балльная оценка фиброза NAFLD	0,69	0,006184
Бутстреп-модель	0,82	ELF	0,70	0,01356
Бутстреп-модель	0,82	FibroTest	0,68	0,007507
Бутстреп-модель	0,82	BARD	0,64	5,16E-05
Бутстреп-модель	0,82	APRI	0,72	0,03062
Бутстреп-модель	0,82	Неинвазивная система балльной оценки (NISS)	0,68	0,002862
Бутстреп-модель	0,82	FIB4	0,72	0,04898
Бутстреп-модель	0,82	Диагностическая панель NAFLD - NASH	0,71	0,02169

Модели (мкРНК, измеренная в сыворотке в копиях/мкл \log_{10}) в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

В случае всех бутстреп-моделей, представленных в настоящем описании и соответствующих пациенту с риском, как описано выше, значения AUC были статистически лучше, чем значения AUC, полученные с использованием других моделей.

Значения, полученные с использованием полученной медианной модели, схожи со значениями, полученными с использованием бутстреп-модели, что означает, что обе модели обоснованы.

Продемонстрирована важность настоящего изобретения.

Таблица 10

Сравнение балльной оценки с использованием полученных медианных моделей по настоящему изобретению с другими балльными оценками

Балльная оценка	AUC	Балльная оценка	AUC	Значение P
Полученная медианная модель	0,82	Бутстреп-модель	0,82	0,7968
Полученная медианная модель	0,82	Балльная оценка фиброза при NAFLD	0,69	0,006828
Полученная медианная модель	0,82	ELF	0,70	0,01561
Полученная медианная модель	0,82	FibroTest	0,68	0,006284
Полученная медианная модель	0,82	BARD	0,64	0,000129
Полученная медианная модель	0,82	APRI	0,72	0,03337
Полученная медианная модель	0,82	Неинвазивная система балльной оценки (NISS)	0,68	0,003578
Полученная медианная модель	0,82	FIB4	0,72	0,04829
Полученная медианная модель	0,82	Диагностическая панель NAFLD - NASH	0,71	0,0223

Модели (мкРНК, измеренная в сыворотке в копиях/мкл \log_{10}) в случае пациента в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

В случае всех полученных медианных моделей, представленных в настоящем описании и соответствующих пациенту с риском, как описано выше, значения AUC были статистически лучше, чем значения AUC, полученные с использованием других моделей.

Значения, полученные с использованием бутстреп-модели, схожи со значениями, полученными с использованием полученной медианной модели, что означает, что обе модели обоснованы.

Продемонстрирована важность настоящего изобретения.

Таблица 11

Сравнение балльных оценок с использованием бутстреп-модели по настоящему изобретению с отдельными переменными

Балльная оценка	AUC	Показатель	AUC	Значение P
Бутстреп-модель	0,82	мкРНК 34a	0,74	0,002699
Бутстреп-модель	0,82	YKL40	0,71	0,00143
Бутстреп-модель	0,82	HBA1C	0,67	1,343e-05
Бутстреп-модель	0,82	A2M	0,71	0,001744

Модели (мкРНК, измеренная в сыворотке в копиях/мкл \log_{10}) в случае пациента в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS (баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

Значение AUC в случае бутстреп-модели, соответствующей пациенту с риском, как описано ранее, в которой комбинируют несколько переменных, было статистически лучше, чем значение AUC, полученное в случае отдельных переменных.

Таким образом, комбинация нескольких переменных посредством логистической функции по настоящему изобретению лучше и точнее исследование переменных по отдельности.

Продемонстрирована важность настоящего изобретения.

Таблица 12

Сравнение балльных оценок с использованием полученной медианной модели по настоящему изобретению с отдельными переменными

Балльная оценка	AUC	Показатель	AUC	Значение P
Полученная медианная модель	0,82	мкРНК 34a	0,74	0,001128
Полученная медианная модель	0,82	YKL40	0,71	0,004108
Полученная медианная модель	0,82	HBA1C	0,67	1,199e-05
Полученная медианная модель	0,82	A2M	0,71	0,003032

Модели (мкРНК, измеренная в сыворотке в копиях/мкл \log_{10}) в случае пациента в случае пациента с риском, подлежащего лечению, соответствующего следующим показателям при биопсии печени: баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS

(баллы активности NAFLD) ≥ 4 и стадия фиброза ≥ 2 (такая как стадия фиброза, равная 2, 3 или 4, в частности 2 или 3).

Значение AUC в случае полученной медианной модели, соответствующей пациенту с риском, как описано ранее, в которой комбинируют несколько переменных, было статистически лучше, чем значение AUC, полученное в случае отдельных переменных.

Таким образом, комбинация нескольких переменных посредством логистической функции по настоящему изобретению лучше и точнее исследование переменных по отдельности.

Продемонстрирована важность настоящего изобретения.

Ссылки

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики стадии или тяжести неалкогольного стеатогепатита (NASH) у индивидуума, включающий этапы

измерения уровня циркулирующей hsa-miR-34 в крови, сыворотке или плазме;

измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме; и

комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH, где баллы NASH вычисляются посредством следующей логистической функции:

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

где

$$Y = k + a \times A + b \times B,$$

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

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

k является числом от -116,08 до 40,97, в частности 12,87;

a является числом от -0,82 до 0, в частности -0,42;

b является числом от 0 до 1,88E-05, в частности 8,160E-06,

где баллы NASH выше порогового значения, составляющие от 0,1387 до 0,3481, в частности равные 0,2187, свидетельствуют о тяжелом NASH или умеренной или высокой активности NASH и, таким образом, свидетельствуют о том, что пациент имеет баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 1 .

2. Способ классификации индивидуума как реципиента или нереципиента лечения NASH, включающий этапы

измерения уровня циркулирующей hsa-miR-34 в крови, сыворотке или плазме;

измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме; и

комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH, где баллы NASH вычисляются посредством следующей логистической функции:

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

где

$$Y = k + a \times A + b \times B,$$

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

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

k является числом от -116,08 до 40,97, в частности 12,87;

a является числом от -0,82 до 0, в частности -0,42;

b является числом от 0 до 1,88E-05, в частности 8,160E-06,

где, когда баллы NASH выше порогового значения и составляют от 0,1387 до 0,3481, в частности равны 0,2187, индивидуума классифицируют как реципиента или потенциального реципиента лечения NASH.

3. Способ оценки эффективности медицинского лечения, и/или определения прогрессирования или регрессирования патологии у пациентов с NASH, и/или прогнозирования исхода заболевания у пациента, включающий этапы

измерения уровня циркулирующей hsa-miR-34 в крови, сыворотке или плазме;

измерения уровня циркулирующей YKL-40 в крови, сыворотке или плазме; и

комбинирования результатов посредством математического алгоритма для получения баллов NASH, где баллы NASH вычисляются посредством следующей логистической функции:

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

где

$$Y = k + a \times A + b \times B,$$

где S представляет собой баллы NASH;

A представляет собой уровень hsa-miR-34a (в частности, hsa-miR-34a-5p) в Cq;

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

k является числом от -116,08 до 40,97, в частности 12,87;

a является числом от -0,82 до 0, в частности -0,42;

b является числом от 0 до 1,88E-05, в частности 8,160E-06,

где баллы NASH выше порогового значения, составляющие от 0,1387 до 0,3481, в частности равные 0,2187, свидетельствуют о тяжелом NASH или умеренной или высокой активности NASH и, таким образом, свидетельствуют о том, что пациент имеет баллы стеатоза ≥ 1 , баллы баллонирования гепатоцитов ≥ 1 , баллы лобулярного воспаления ≥ 1 , NAS ≥ 4 и стадию фиброза ≥ 1 , и

где указанный балл NASH сравнивается с контрольным баллом, где увеличение балла NASH указывает на неэффективность медицинского лечения и/или прогрессирование патологии у пациентов с NASH, а уменьшение балла NASH указывает на эффективность медицинского лечения и/или регрессирование патологии у пациентов с NASH.

4. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий измерение уровня по меньшей мере одного другого циркулирующего в крови, сыворотке или плазме маркера повреждения печени, выбранного из группы, состоящей из альфа-2-макроглобулина, гликированного гемоглобина (HbA1c), уровня глюкозы натощак, уровня фруктозамина, инсулина, С-пептида, оценки гомеостатической модели (НО-МА), N-концевого про-пептида коллагена типа III, hsa-miR-200, СК18-М30, СК18-М65, АЛТ, АСТ, удельного веса мочи, креатинина мочи, базофилов, высокочувствительного С-реактивного белка (HSCRP), β -NAG в моче, лейкоцитов, нейтрофилов и фибриногена.

5. Способ по любому из пп.1-4, где способ дополнительно включает измерение по меньшей мере одного другого параметра, такого как рост индивидуума.

6. Способ по п.5, где способ включает изменение уровня hsa-miR-34a-5p, YKL-40, альфа-2-

макроглобулина и HbA1c.

7. Набор для определения уровней hsa-miR-34 и YKL40, при этом в качестве средств набор содержит антитела, специфические для белка, подлежащего количественному анализу, и/или праймеры, применимые для количественного анализа уровней микроРНК.

8. Набор по п.7, дополнительно содержащий средства для определения уровня по меньшей мере одного циркулирующего маркера повреждения печени в крови, сыворотке или плазме.

9. Набор по п.8, содержащий средства для определения уровня

(i) hsa-miR-34;

(ii) YKL-40,

и по меньшей мере одного другого маркера, выбранного из группы, состоящей из

(iii) альфа-2-макроглобулина;

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

(v) N-концевого про-пептида коллагена типа III; и

(vi) hsa-miR-200.

