



# (12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111032884 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201880054349.X

约翰·布罗泽克

(22)申请日 2018.08.27

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

(30)优先权数据

责任公司 11219

17306098.9 2017.08.25 EP

代理人 金海霞 刘慧

17200028.3 2017.11.03 EP

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/6883(2018.01)

2020.02.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/073050 2018.08.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/038456 EN 2019.02.28

(71)申请人 基恩菲特公司

地址 法国洛斯

(72)发明人 雷米·汉夫

权利要求书6页 说明书58页

热纳维耶夫·科多尼耶

序列表1页 附图13页

(54)发明名称

非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎  
和/或肝纤维化的非侵入性诊断

(57)摘要

本发明涉及一种用于诊断非酒精性脂肪性  
肝病、特别是非酒精性脂肪性肝炎和/或肝纤维  
化的新的非侵入性方法。

1. 一种用于诊断或监测非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和/或肝纤维化, 和/或用于确定NAFLD、NASH和/或肝纤维化的治疗的功效的方法, 所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中miR-193是hsa-miR-193, 特别是hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193b-3p。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 所述方法包括确定hsa-miR-193b-3p的水平。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述体液样品是血液、血浆或血清样品。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中将miR-193的水平与miR-193的参比水平进行比较。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中比在来自于没有肝脏脂肪变性的健康对象的样品中获得的参比水平更高的miR-193水平指示NAFLD的存在。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其中比在来自于非NASH对象的样品中获得的参比范围水平更高的miR-193水平指示NASH的存在, 所述NASH被定义为在脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分中至少1分。

8. 根据权利要求5所述的方法, 其中比在来自于没有活跃NASH的对象的样品中获得的参比范围水平更高的miR-193水平指示活跃NASH的存在。

9. 根据权利要求5所述的方法, 其中比在来自于没有或具有极少肝纤维化 ( $F=0$ 或 $1$ ) 的对象的样品中获得的参比水平更高的miR-193水平指示显著 ( $F=2$ )、中度 ( $F=3$ ) 或重度 ( $F=4$ ) 肝纤维化的存在。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法包括根据miR-193水平相对于在NTBT对象中测量到的miR-193参比水平的提高的检测, 将对象分类为NASH和/或肝纤维化治疗的潜在接受者 (TBT) 或非接受者 (NTBT)。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中TBT和NTBT对象具有下述肝组织活检来源的等级:

a) TBT1:

脂肪变性评分  $\geq 1$

肝细胞膨胀评分  $\geq 1$

小叶炎症评分  $\geq 1$

NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

纤维化分期  $\geq 1$  (例如纤维化分期等于1、2、3或4 3)

NTBT1:

与TBT1的差异在于在脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分、NAS或纤维化分期中的任一者中等级低至少1分;

或

b) TBT2:

脂肪变性评分  $\geq 1$

肝细胞膨胀评分  $\geq 1$

小叶炎症评分  $\geq 1$

NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

纤维化分期 $\geq 2$  (例如纤维化分期等于2、3或4,特别是2或3)

NTBT2:

与TBT的差异在于在脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分、NAS或纤维化分期中的任一者中等级低至少1分;

或

c) TBT7:

脂肪变性评分 $\geq 1$

肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

小叶炎症评分 $\geq 1$

NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

纤维化分期=1b、1c、2、3或4

NTBT2:

与TBT的差异在于在脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分、NAS或纤维化分期中的任一者中等级低至少1分。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括在从同一对象分两次或更多次收集的样品中miR-193水平的演变的基础上监测所述对象中NAFLD活性、NASH活性或肝纤维化的演变。

13. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,所述方法用于在从同一治疗对象分两次或更多次收集的样品中miR-193水平的演变的基础上评估NAFLD、NASH或肝纤维化治疗的效率。

14. 一种抗NAFLD、抗NASH或抗纤维化化合物,其分别用于治疗患有NAFLD、NASH或肝纤维化的对象的方法中,其中根据权利要求1至11中的任一项将所述对象诊断或分类为由于NAFLD、NASH或肝纤维化而待治疗的患者,并向所述诊断的对象施用所述化合物。

15. 一种miR-193抑制性化合物,其用于治疗患有NAFLD、NASH和/或肝纤维化的对象的方法中。

16. 根据权利要求15所述的供使用的miR-193抑制性化合物,其中所述对象根据权利要求1至11中的任一项被诊断或分类为待治疗的。

17. 一种用于在对象中诊断非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和/或用于确定NASH的活性、阶段或严重性,和/或用于将对象分类为NASH治疗的接受者或非接受者,和/或用于评估药物治疗的功效,和/或用于确定NASH患者中病理的进展或消退,和/或用于将患者分类为药物治疗的潜在响应者或非响应者,和/或用于为患者预测疾病结果,和/或用于鉴定临床相关结果的替代标志物的方法,所述方法包括测量血液、血清或血浆循环hsa-miR-193和肝损伤的至少一种其他血液、血清或血浆循环标志物的水平。

18. 根据权利要求17所述的方法,所述方法用于诊断NASH或用于将对象分类为NASH治疗的接受者或非接受者。

19. 根据权利要求17或18所述的方法,其中所述肝损伤的至少一种其他循环标志物选自TIMP-1、YKL-40、血小板计数、HbA1c和透明质酸。

20. 根据权利要求19所述的方法,所述方法还包括确定所述对象的代谢综合征评分。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的方法,所述方法包括下述步骤:

- 测量hsa-miR-193 (特别是hsa-miR-193b,更特别是hsa-miR-193b-3p) 和肝损伤的至少一种血液、血清或血浆循环标志物的水平,和
- 通过数学算法将所述结果组合以获得NASH评分。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中NASH评分根据下述逻辑函数来计算

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

其中:

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

其中:

S1是NASH评分;

A是以log10拷贝数.μL-1为单位的miR-193水平;

B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平;

C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;

D是以10<sup>9</sup>/L为单位的血小板计数;

F是代谢综合征水平类型;

k是所述逻辑函数的常数;

a是与miR-193 (特别是hsa-miR-193b-3p) 水平相关的系数;

b是与TIMP-1水平相关的系数;

c是与YKL-40水平相关的系数;

d是与血小板计数相关的系数;并且

f是与代谢综合征相关的系数;

所述方法源自于自举模型,其中:

k是-8.39至-2.67之间的数,特别是-5.53;

a是0.58至2.50之间的数,特别是1.54;

b是2.29E-03至1.87E-02之间的数,特别是1.05E-02;

c是2.14E-06至1.65E-05之间的数,特别是9.34E-06;

d是-1.56E-02至-1.05E-03之间的数,特别是-8.32E-03;

f是0.03至1.63之间的数,特别是0.83;

并且其中阈值在0.3050至0.6518之间,特别是0.3993。

其中高于在0.2017至0.4645之间、特别是等于0.2302的阈值的NASH评分指示重度NASH或者中或高NASH活性,并因此指示具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ 的患者。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中所述NASH评分根据下述逻辑函数来计算:

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

其中:

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

其中:

S2是NASH评分；

A是以 $\log_{10}$ 拷贝数 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 为单位的hsa-miR-193水平；

C是以pg/mL为单位的YKL-40水平；

B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平；

E是以百分数为单位的HbA1c水平；

G是以ng/mL为单位的透明质酸水平；

D是以 $10^9/\text{L}$ 为单位的血小板计数；

1是所述逻辑函数的常数；

a2是与miR-193 (特别是hsa-miR-193b-3p) 水平相关的系数；

c2是与YKL-40水平相关的系数；

b2是与TIMP-1水平相关的系数；

e是与HbA1c水平相关的系数；

g是与透明质酸水平相关的系数；

d2是与血小板计数相关的系数。

所述方法源自于自举模型,其中:

1是-10.92至-3.89之间的数,特别是-7.52；

a2是0.44至2.17之间的数,特别是1.29；

c2是0.0035至0.02之间的数,特别是0.01；

b2是0.0016至0.018之间的数,特别是0.0092；

e是-0.0053至0.0057之间的数,特别是-0.0024；

g是0.13至1.08之间的数,特别是0.59；

d2是-0.017至-0.0027之间的数,特别是-0.009；

并且其中阈值在0.2461至0.6252之间,特别是0.4216。

其中高于在0.2461至0.6252之间、特别是等于0.4216的阈值的NASH评分指示重度NASH或者中或高NASH活性,并因此指示具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ 的患者。

24. 根据权利要求20所述的方法,其中所述NASH评分根据下述逻辑函数来计算:

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

其中:

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

其中:

S3是根据本发明所述的NASH评分；

A' 是以Cq为单位的hsa-miR-193b-3p水平；

C是以pg/mL为单位的YKL-40水平；

B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平；

E是以百分数为单位的HbA1c水平；

G是以ng/mL为单位的透明质酸水平；

D以 $10^9/\text{L}$ 为单位的血小板计数；

m是所述逻辑函数的常数；

a3是与miR-193 (特别是hsa-miR-193b-3p) 水平相关的系数；

c3是与YKL-40水平相关的系数；

b3是与TIMP-1水平相关的系数；

e2是与HbA1c水平相关的系数；

g2是与透明质酸水平相关的系数；

d3是与血小板计数相关的系数。

所述方法源自于自举模型,其中:

m是-1.27至17.54之间的数,特别是8.08；

a3是-0.64至-0.09之间的数,特别是-0.38；

c3是0.005至0.019之间的数,特别是0.01；

b3是0.001至0.016之间的数,特别是0.01；

e2是-0.0054至0.0045之间的数,特别是0.0024；

g2是0.12至1.08之间的数,特别是0.57；

d3是-0.0164至-0.0016之间的数,特别是-0.0090；

并且其中阈值在0.2270至0.6364之间,特别是0.3741。

其中高于在0.2270至0.6364之间、特别是等于0.3741的阈值的NASH评分指示重度NASH或者中或高NASH活性,并因此指示具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ 的患者。

25. 一种试剂盒,其包含用于确定下述物质水平的工具:

(i) 选自hsa-miR-193 (特别是hsa-miR-193b、更特别是hsa-miR-193b-3p) 的至少一种标志物,和

(ii) 肝损伤的至少一种血液、血清或血浆循环标志物。

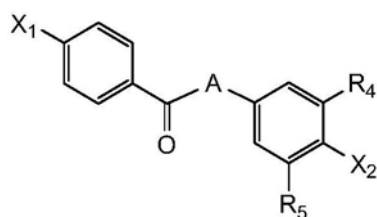
26. 根据权利要求25所述的试剂盒,其包含用于确定下述物质水平的工具:

(i) 选自hsa-miR-193 (特别是hsa-miR-193b、更特别是hsa-miR-193b-3p) 的至少一种标志物,和

(ii) 在根据权利要求1至25中任一项所述的方法中相应地使用的肝损伤的至少一种血液、血清或血浆循环标志物。

27. 一种用于NASH的治疗方法中的抗NASH分子,其中所述抗NASH分子被施用于需要的患者,所述患者根据权利要求1至11中任一项的方法被诊断为患有NASH或被分类,特别是被分类为NASH治疗的接受者。

28. 根据权利要求27所述的供使用的抗NASH分子,其中所述分子是式(I)的化合物或其可药用盐:



其中:

X1表示卤素、R1或G1-R1基团；

A表示CH=CH或CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>基团；

X2表示G2-R2基团；

G1和G2相同或不同，表示氧或硫原子；

R1表示氢原子，未取代的烷基，芳基或被一个或多个卤素原子、烷氧基或烷硫基取代的烷基，环烷基，环烷硫基或杂环基；

R2表示至少被-COOR<sub>3</sub>基团取代的烷基，其中R<sub>3</sub>表示氢原子，或被一个或多个卤素原子、环烷基或杂环基取代或未取代的烷基；

R4和R5相同或不同，表示被一个或多个卤素原子、环烷基或杂环基取代或未取代的烷基。

29. 根据权利要求27或28所述的供使用的抗NASH分子，其中所述化合物选自1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-异丙氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-三氟甲基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-三氟甲基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-三氟甲氧基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、1-[4-三氟甲氧基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮、2-[2,6-二甲基-4-[3-[4-(甲硫基)苯基]-3-氧代-丙基]苯氧基]-2-甲基丙酸和2-[2,6-二甲基-4-[3-[4-(甲硫基)苯基]-3-氧代-丙基]苯氧基]-2-甲基-丙酸异丙基酯或其可药用盐，特别是1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮或其可药用盐。

## 非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎和/或肝纤维化的 非侵入性诊断

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于诊断非酒精性脂肪性肝病,特别是非酒精性脂肪性肝炎和/或肝纤维化的新的非侵入性方法。

### 背景技术

[0002] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是一种无声疾病,其被定义为由过量饮酒之外的原因造成的肝脏中的脂肪积累 (脂肪变性)。NAFLD是转介给肝病学家患者中转氨酶升高的最常见原因。NAFLD的范围从良性的单纯脂肪变性到对某些患者而言的病态病症非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),其中坏死/炎性过程促使纤维化在肝脏中的逐渐累积,最终导致肝硬化、肝功能衰竭、肝细胞癌 (HCC)、肝移植和肝死亡。从流行病学和病理生理学两种观点来看,NAFLD和NASH与肥胖症、代谢综合征和2型糖尿病密切相关。因此,在过去的几十年中,在肥胖症和2型糖尿病流行的同时,NAFLD和NASH的盛行率急剧提高,并且NASH变成美国肝脏移植的首要原因。因此,NASH被认为是全球范围内日益严重的公共健康问题,因为已知目前尚无用于NASH的最佳诊断解决方案并且尚无批准的治疗方法。

[0003] 尽管可以通过使用超声技术检测肝脏中脂肪堆积的存在来诊断NAFLD,但NASH和与NASH相关的肝纤维化只能通过对肝组织活检的组织学检查来诊断。在对肝组织活检进行显微镜检查时,NASH被定义为脂肪酸积累 (脂类小滴) 并伴有肝细胞损伤 (肝细胞的膨胀或坏死) 和小叶炎症的迹象。尽管纤维化并不是诊断NASH的必需组织学特点,但肝纤维化的存在和分期对于评估疾病的严重性以及演变为肝硬化、HCC (肝细胞癌) 和肝死亡 (其是与肝脏相关的患者死亡) 的风险来说是至关重要的。

[0004] 已经开发了组织学评分/分期系统,用于评估NAFLD活性水平和纤维化分期并估算演变为临床肝结果的风险。已开发了NALFD活性评分 (NAS) 用于评估所述疾病的活性。所述NAS是对脂肪变性 (0到3)、小叶炎症 (0到3)、肝细胞膨胀 (0到2) 的未加权的组织活检样品的个体评分的总和。根据Kleiner等 (Hepatology, 2005; 41: 1313-21), NAS是从肝组织活检切片做出的三种组织学评分的总和:

[0005] -S: 脂肪变性评分: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66% 和 3: >66%

[0006] -LI: 小叶炎症评分 (每个20x视野的病灶): 0: 无; 1: <2; 2: 2-4 和 3: >4

[0007] HB: 膨胀变性评分: 0: 无; 1: 少量; 2: 许多细胞/显著膨胀。

[0008] 使用这种评分系统,NASH患者具有 $NAS \geq 3$ ,并在脂肪变性中具有至少1分,在小叶炎症中具有至少1分,且在肝细胞膨胀中具有至少1分。当 $NAS \geq 4$ ,并在脂肪变性中具有至少1分,在炎症中具有至少1分且在肝细胞膨胀中具有至少1分时,患者被认为具有活跃的NASH。

[0009] 组织学检查中纤维化的定位和程度标志着疾病的严重性 (进展), 并且NASH-CRN已开发了一种专用的纤维化分期系统 (Kleiner等, Hepatology, 2005; 41: 1313-21):

|        |                |    |
|--------|----------------|----|
|        | 窦周或门周纤维化       | 1  |
|        | 轻度窦周纤维化（第 3 区） | 1a |
|        | 中度窦周纤维化（第 3 区） | 1b |
| [0010] | 门/门周纤维化        | 1c |
|        | 窦周和门/门周纤维化     | 2  |
|        | 桥接纤维化          | 3  |
|        | 肝硬化            | 4  |

[0011] 使用这种纤维化分期系统,没有或具有极少纤维化 ( $F=0-1$ ) 的患者通常不被认为处于肝硬化、HCC或肝死亡的风险下。具有显著 ( $F=2$ ) 和中度纤维化 ( $F=3$ ) 的患者处于发生肝硬化、肝功能衰竭、HCC和肝死亡的提高的风险下。具有代偿性肝硬化的患者具有重度纤维化 ( $F=4$ ),并处于肝功能衰竭(失代偿性肝硬化)、HCC和与肝脏相关的死亡的高风险下。

[0012] 源自于这两种被广泛接受的评分和分期系统,最近对活性指数 (AI) 给予了特别关注,其可以被定义为小叶炎症评分和肝细胞膨胀评分的总和。此外,Munteanu等,Aliment Pharmacol Ther.,2016,44 (8) :877-89提出了SAF特征,以分开地报告脂肪变性、疾病活性和纤维化的评分。

[0013] 使用上述NAS、AI和肝纤维化的分期对NAFLD和NASH进行诊断以及对疾病活性进行评分需要肝组织活检,这具有阻碍它们的常规使用的许多明显缺点。事实上,肝组织活检是一种侵入性程序,对患者来说可能是繁琐、令人担忧和痛苦的,并且肝组织活检伴有出血甚至死亡的风险。因此,由于NASH和肝纤维化不断增长的流行性,并且由于组织活检不能被视为足够高效和安全的程序,因此对用于诊断NAFLD、NASH和/或肝纤维化的新的非侵入性方法,存在着迫切需求。

[0014] 已经开发了超声和成像技术(超声波扫描术、受控衰减参数、磁共振成像 (MRI) 和MRI估算的质子密度脂肪分数 (MRI-DPPF)) 来诊断NAFLD。然而,这些技术受到观察者间和观察者内可变性的限制,受成本限制,和/或是耗时的。此外,MRI-DPPF不是常规可用的,并且太复杂而不能在临床实践中使用。此外,纤维化分期以剂量依赖性方式伴有全病因死亡,在具有F2纤维化的患者中风险明显提高。基于超声的弹性成像例如Fibroscan和剪切波弹性成像在诊断晚期纤维化或肝硬化中具有中至高精确度。然而,F2纤维化不是晚期纤维化分期,因此无法用这些技术精确地检测。

[0015] 除了超声和成像技术外,还已付出了巨大努力来鉴定和验证新的循环生物标志物,以可靠、简单且经济高效地对NAFLD、NASH和/或肝纤维化进行非侵入性检测。下表列出了已报告在NAFLD/NASH和/或肝纤维化中受调节的各个生物标志物。

|        | 肝细胞功能 | 脂肪组织 | 代谢                        | 氧化胁迫/凋亡  | 纤维化      | 炎性                  |
|--------|-------|------|---------------------------|----------|----------|---------------------|
| [0016] | ALT   | 脂联素  | 禁食血浆葡萄糖                   | 丙二醛      | 纤粘连蛋白    | TNF $\alpha$        |
|        | AST   | 瘦蛋白  | 糖                         | TBARS    | 透明质酸     | IL1b, IL6,          |
|        | ALP   | 抵抗素  | 禁食胰岛素                     | Ox LDL   | IV 型胶原蛋白 | IL8, IFN $\gamma$ , |
|        | GGT   |      | HOMA 指数                   | CK18-M30 | 白        | TGF $\beta$         |
|        | 结合珠蛋白 |      | 甘油三酯                      | CK18-M65 | PIIINP   | hs-CRP              |
|        | 白蛋白   |      | HDL-胆固醇                   | 铁蛋白      | TIMP-1   | MCP1                |
|        | 胆红素   |      | VLCL-C                    | YKL-40   |          | sCD14               |
|        | 血小板计数 |      | 载脂蛋白 (ApoA1、ApoB、ApoCIII) | (CHI3L1) |          |                     |
|        |       |      |                           |          |          |                     |
|        |       |      |                           |          |          |                     |

[0017] 几项研究表明,这些血清生物标志物中的某些具有比肝功能障碍的常规血清标志物如转氨酶更好的诊断价值 (Naveau S.等,Clin Gastroenterol Hepatol.,2005;3 (2) : 167-74;Castera L.等,J.Hepatol.2000;32:412-8;Annoni G.等,Hepatology.1989;9: 693-7;Nojgaard C.等,J Hepatol.2003;39:179-86;Chossegros P.1995;22 (2Suppl) :96-9)。然而,这些研究都没有真正鉴定和验证到一种用于诊断NAFLD、NASH和/或肝纤维化的强有力的生物标志物。为了提高诊断性能,已经组合几种生物标志物和/或常规变量产生了多参数评分,但是它们用于鉴定NAFLD、NASH和/或肝纤维化患者的诊断性能仍可大大提高。

[0018] NASH伴有比NAFLD更快的纤维化进展,并且目前是药物治疗的主要目标。NASH患者更可能发生肝硬化并死于心血管和肝脏相关的病因,并且随着纤维化分期的进展预后也越来越差 (Ekstedt等,2015)。尽管已经提出了大量的血清生物标志物、组合小组和成像生物标志物,但仍需要鉴定用于诊断和监测NAFLD、NASH和肝纤维化的有效、侵入性较小且负担得起的方法,特别是由独立的临床验证小组确认的方法。

[0019] 鉴定具有发展为HCC、肝硬化并发症和肝相关死亡的风险的患者,是进行肝评估的最终原因。

## 发明内容

[0020] 本发明人对不同患者组群进行了几项非常精细且完整的分析,以提供非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和肝纤维化的新的、高度灵敏的非侵入性诊断和监测方法。本文提供的数据证实了miR-193是一种与NAFLD、NASH和/或肝纤维化相关的高效循环生物标志物。凭借三个独立的临床组群,这种生物标志物得到验证。因此,本发明的方法允许将对象诊断、监测和风险分类为患有NAFLD、NASH和/或肝纤维化。本发明人还提供了一种用于潜在患有NAFLD、NASH和/或肝纤维化的对象的诊断、监测和风险分类的方法。

本发明的方法也可以允许开发新的治疗方案。

[0021] 因此,本发明提供了一种用于在对象中诊断NAFLD、NASH或肝纤维化的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中的miR-193水平。

[0022] 这些方法是基于所述对象的体液中miR-193水平的确定。在本文中提出的所有方法和实施方式中,在本发明中应用的miR-193microRNA可以是hsa-miR-193microRNA,例如选自hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-5p和hsa-miR-193b-3p的hsa-miR-193。在特定实施方式中,确定hsa-miR-193b-3p的水平。在本文中提出的所有方法和实施方式中,所述体液样品可以是血液、血液来源的流体(例如血清和血浆,特别是无血小板血浆,例如无细胞、柠檬酸盐衍生的无血小板血浆样品)、唾液、脑脊液或尿液的样品。在特定实施方式中,所述体液是剥夺或未剥夺血小板的血浆或血清。

[0023] 在本发明的方法中,可以将所述对象中miR-193的体液水平与miR-193的参比水平进行比较。所述“参比水平”是指预定的标准或在来自于参比对象的相似处理的样品中实验确定的水平。取决于本发明的方法的目的,所述参比对象可以是健康对象、具有NAFLD但没有NASH的对象、具有NASH但没有活跃NASH的对象或没有或具有极少肝纤维化的对象。所述参比对象也可以是安慰剂治疗的患者。所述参比水平也可以是在过去从同一对象获得的相似处理的体液样品中确定的miR-193水平,允许确定所述对象中NAFLD、NASH或肝纤维化的演变,特别是允许根据应用的方法来确定疾病活性或纤维化的演变或所述疾病的治疗效率。

[0024] 因此,在特定实施方式中,对象中NAFLD的诊断和/或检测或潜在NAFLD的诊断和/或检测是基于相对于在没有肝脏脂肪变性的健康对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0025] 在特定实施方式中,对象中NASH的诊断和/或检测或潜在NASH的诊断和/或检测是基于相对于在非NASH对象例如健康对象、NAS<3的对象或至少一个NAS组分评分为0的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0026] 在另一个实施方式中,对象中活跃NASH的诊断和/或检测或潜在活跃NASH的诊断和/或检测是基于相对于在健康对象、NAS<4的对象或至少一个NAS组分评分为0的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。在特定实施方式中,对于活跃NASH或潜在活跃NASH的诊断和检测来说,所述参比水平是在NAS=3、脂肪变性为1分、小叶炎症为1分并且肝细胞膨胀评分为1分的对象中测量到的miR-193水平。

[0027] 在其他实施方式中,对象中肝纤维化( $F \geq 1$ )或潜在肝纤维化( $F \geq 1$ )的诊断和检测是基于相对于在没有肝纤维化( $F=0$ )的健康对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0028] 在另一个实施方式中,对象中显著( $F=2$ )、中度( $F=3$ )或重度( $F=4$ ;即肝硬化)肝纤维化或潜在显著肝纤维化、潜在中度肝纤维化或潜在重度肝纤维化的诊断和检测是基于相对于在没有( $F=0$ )或具有极少( $F=1$ )肝纤维化的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0029] 在另一个实施方式中,对象中显著( $F=2$ )、中度( $F=3$ )或重度( $F=4$ )肝纤维化或潜在显著肝纤维化、潜在中度肝纤维化或潜在重度肝纤维化的诊断和检测是基于相对于在具有极少肝纤维化( $F=1$ )的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193

水平的提高。在另一个特定实施方式中,所述参比水平在具有F=1a、1b或1c的对象中测量。

[0030] 在另一个实施方式中,对象中显著肝纤维化或潜在显著肝纤维化的诊断和检测是基于相对于在具有极少纤维化的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0031] 在另一个实施方式中,对象中中度肝纤维化或潜在中度肝纤维化的诊断和检测是基于相对于在具有显著纤维化的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0032] 在另一个实施方式中,对象中重度纤维化或潜在重度纤维化的诊断和检测是基于相对于在具有中度纤维化的对象中测量到的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0033] 根据另一个目的,本发明涉及一种将对象分类为NAFLD、NASH或肝纤维化治疗的潜在接受者(待治疗或TBT)或非接受者(非待治疗或NTBT)的方法,所述方法是基于相对于在如下所定义的NTBT患者中测量到的miR-193的参比水平,在所述体液样品中检测到miR-193水平的提高。

[0034] 在其他实施方式中,本发明还提供了一种在对象中确定NAFLD活性水平、NASH活性水平和/或肝纤维化阶段的方法,所述方法是基于对象体液样品中miR-193水平的确定。

[0035] 通过另一方面,本发明还允许在对象的体液样品中确定的miR-193水平的基础上进行纤维化的临床预后,其是NAFLD或NASH患者的肝纤维化演变成肝硬化和其他肝脏结果(例如HCC和肝相关的死亡)的风险的预后。

[0036] 本发明还提供了一种在对象中监测NAFLD活性水平、NASH活性水平和/或肝纤维化阶段的演变的方法,所述方法是基于相对于来自于过去在同一对象中收集的一个或多个体液样品的miR-193的参比水平,所述对象的体液样品中miR-193水平的演变。在这种方法中,miR-193水平的提高指示疾病活性和纤维化上升,而miR-193水平的降低指示疾病活性和纤维化下降。

[0037] 本发明还提供了一种确定NAFLD、NASH或肝纤维化在对象中的治疗效率的方法,所述方法是基于相对于来自于过去在同一对象中收集的一个或多个体液样品的miR-193的参比水平,所述对象的体液样品中miR-193水平的演变。在这种方法中,miR-193水平的提高或稳定的miR-193水平指示所述治疗不有效,而miR-193水平的降低指示所述治疗是有效的。在这种方法的另一个实施方式中,稳定的miR-193水平也可以指示所述治疗在稳定所述对象的NASH、NAFLD或肝纤维化状态中是有效的,从而降低了所述对象向重要结果例如肝硬化、HCC或肝相关的死亡演变的风险。

[0038] 本发明还提供了一种预测对象(响应对象)对特定治疗的响应(例如NAFLD、NASH活性和肝纤维化阶段的变化)的预测的方法,所述方法是基于所述体液样品中的miR-193水平相对于非响应对象中测量到的参比水平的差异的检测。

[0039] 另一方面,本发明提供了一种诊断NAFLD、NASH或肝纤维化或潜在NAFLD、NASH或肝纤维化的方法或鉴定处于从NAFLD、NASH或肝纤维化发展到临床结果(例如肝硬化、肝硬化并发症和/或肝相关的死亡)的风险下的对象的方法,所述方法包括确定miR-193和选自YKL-40 (CHI3L1)、金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1)、血小板计数、透明质酸(HYUA2)和糖化血红蛋白(HbA1c)的至少一种标志物的水平。在特定实施方式中,所述方法还包括确定所

述患者的代谢综合征 (ms) 状态。在特定实施方式中,所述方法包括确定miR-193和YKL-40的水平。在这一方面的其他特定实施方式中,所述方法包括:

[0040] (i) 确定来自于对象的体液样品中miR-193的水平,例如hsa-miR-193a-5p、hsa-miR193a-3p、hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193b-3p的量;

[0041] (ii) 测定:

[0042] -YKL-40 (CHI3L1)、金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1)、血小板计数、透明质酸 (HYUA2) 和糖化血红蛋白HbA1c的量;或

[0043] -测定来自于所述对象的体液样品中YKL-40 (CHI3L1)、金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1)、血小板计数的量,并确定所述对象是否具有代谢综合征 (ms);

[0044] (iii) 在步骤(i)和(ii)中获得的结果的基础上确定所述对象的评分;并且

[0045] (iv) 将所述评分与截止值进行比较,以便确定所述对象中NASH进展的风险。在说明性实施方式中,miR-193b-3p、YKL-40、TIMP-1和血小板计数中每一者的量和ms的确定都在所述方法中进行了测定。在另一个说明性实施方式中,miR-193b-3p、YKL-40、TIMP-1、HYUA2、HbA1c和血小板计数中每一者的量都在所述方法中进行了测定,并且截止值使用血液来源的样品的以Cq或log10拷贝数.μL<sup>-1</sup>为单位的miRNA水平来确定。

[0046] 在另一个实施方式中,所述方法包括确定miR-193、YKL-40、TIMP-1、血小板计数、透明质酸 (HYUA2) 和糖化血红蛋白HbA1c的水平。在另一个实施方式中,所述方法包括确定miR-193、YKL-40、TIMP-1、血小板计数和透明质酸 (HYUA2) 的水平并确定所述患者的代谢综合征状态。在这一方面的任何实施方式中,优选的变化形式包括确定hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193b-3p,特别是hsa-miR-193b-3p的水平。

## 附图说明

[0047] 图1:入选时GOLDEN-DIAG的非待治疗 (NTBT) 和待治疗 (TBT) 患者(根据TBT患者的三种不同定义:TBT1、TBT2和TBT7) 中和健康对象 (n=100) 中hsa-miR-193b-3p的血清水平。结果被表示为平均值±SEM。统计显著性使用Kruskal Wallis ANOVA检验和随后的Dunn's多重比较检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。NTBT1 n=83, TBT1n=187; NTBT2 n=161, TBT2 n=109; NTBT7 n=119, TBT7 n=151

[0048] TBT1=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分≥1, NAS≥4, F≥1

[0049] TBT2=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分≥1, NAS≥4, F≥2

[0050] TBT7=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分≥1, NAS≥4, F=1b、1c、2、3或4

[0051] 图2:入选时GOLDEN-DIAG的NTBT和TBT患者(根据TBT患者的三种不同定义:TBT1、TBT2和TBT7) 中hsa-miR-193b-5p的血清水平。结果被表示为平均值±SEM。统计显著性使用Mann Whitney检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。

[0052] TBT1=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分各自≥1, NAS≥4, F≥1

[0053] TBT2=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分各自≥1, NAS≥4, F≥2

[0054] TBT7=脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分各自≥1, NAS≥4, F=1b、1c、2、3或4

[0055] 图3:入选时GOLDEN-DIAG的NTBT和TBT患者(根据TBT患者的三种不同定义:TBT1、TBT2和TBT7) 中hsa-miR-193a-5p的血清水平。结果被表示为平均值±SEM。统计显著性使用Mann Whitney检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。

[0056] 图4:入选时GOLDEN-DIAG(顶部)和OBESE组群(底部)的“健康”献血者中、NTBT2和TBT2患者中(左)、NAS<4和NAS $\geq$ 4的患者中(中)以及F<2和F $\geq$ 2的患者中(右)hsa-miR-193b-3p的血清水平。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用Kruskal Wallis ANOVA检验和随后的Dunn's多重比较检验(Golden Diag)和Mann Whitney检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。

[0057] 图5:入选时GOLDEN-DIAG(顶部)和OBESE组群(底部)的NTBT2和TBT2患者中(左)、NAS<4和NAS $\geq$ 4的患者中(中)以及F<2和F $\geq$ 2的患者中(右)hsa-miR-193a-5p的血清水平。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用Mann Whitney检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。

[0058] 图6:入选时GOLDEN-DIAG(顶部)和OBESE组群(底部)的NTBT2和TBT2患者中(左)、NAS<4和NAS $\geq$ 4的患者中(中)以及F<2和F $\geq$ 2的患者中(右)hsa-miR-193b-5p的血清水平。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用非Mann Whitney检验来计算:\*\*\*, p值<0.001。

[0059] 图7:RESOLVE-IT研究的NTBT2和TBT2患者中(左)、NAS<4和NAS $\geq$ 4的患者中(中)以及F<2和F $\geq$ 2的患者中(右)hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-193b-5p和hsa-miR-193a-5p的血清水平。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用非Mann Whitney检验来计算:\*\*, p值<0.005;\*\*\*, p值<0.001。

[0060] 图8:在GOLDEN-DIAG组群的患者中(底部),hsa-miR-193b-3p的血清水平与NAS、纤维化分期、活性指数、脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分之间的相关性。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用Kruskal Wallis ANOVA检验和随后的Dunn's多重比较检验来计算:\*, p值<0.05;\*\* , p值<0.005;\*\*\*, p值<0.001。

[0061] 图9:在GOLDEN-DIAG组群的患者中(底部),hsa-miR-193b-5p的血清水平与NAS、纤维化分期、活性指数、脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分之间的相关性。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用Kruskal Wallis ANOVA检验和随后的Dunn's多重比较检验来计算:\*, p值<0.05;\*\* , p值<0.005;\*\*\*, p值<0.001。

[0062] 图10:在GOLDEN-DIAG组群的患者中(底部),hsa-miR-193a-5p的血清水平与NAS、纤维化分期、活性指数、脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分、小叶炎症评分之间的相关性。结果被表示为平均值 $\pm$ SEM。统计显著性使用Kruskal Wallis ANOVA检验和随后的Dunn's多重比较检验来计算:\*, p值<0.05;\*\* , p值<0.005;\*\*\*, p值<0.001。

[0063] 图11:使用hsa-miR-193b-3p(log10拷贝数. $\mu$ L<sup>-1</sup>)、TIMP-1、YKL-40、血小板计数和代谢综合征的算法Y1的受试者工作特征(ROC)曲线分析。这种算法(NIS)与入选时GOLDEN-DIAG研究中的各个变量之间的曲线下面积(AUC)的比较。

[0064] 图12:使用hsa-miR-193b-3p(log10拷贝数. $\mu$ L<sup>-1</sup>)、YKL-40、TIMP-1、HbA1c、HYUA2和血小板计数的算法Y2的受试者工作特征(ROC)曲线分析。

[0065] 图13:使用hsa-miR-193b-3p(Cq)、YKL-40、TIMP-1、HbA1c、HYUA2和血小板计数的算法Y3的受试者工作特征(ROC)曲线分析。

[0066] 发明详述

[0067] 本发明人提供了一种用于对患有或潜在患有NAFLD、NASH和/或肝纤维化的对象进行诊断、监测和风险分类的新方法。

[0068] 本发明源于在临床试验期间对患者活检组织的非常精细的分析,以关联循环生物标志物的存在或水平并将患者分类为待治疗或非待治疗。特别地,本发明还提供了如下所

述的NAS评分。特别地,本发明非限制性地定义了三类待治疗的NASH患者。这些患者根据NASH特征的评分来分类。

[0069] 本文中提供的来自于两个大的独立患者组群的实验数据令人吃惊地将miR-193鉴定为NAFLD、NASH和/或肝纤维化的循环生物标志物,所述两个组群即GOLDEN-DIAG(入选时N=270;在第52周时N=223)和OBESE组群(N=253),并对肝活检组织和相应的血液、血浆和血清样品进行了评分。结果在第三个独立组群RESOLVE-IT(N=263)中进行了验证。

[0070] 现在将更详细地陈述本发明。

[0071] 定义

[0072] 根据本发明,术语“NAFLD”或“非酒精性脂肪性肝病”是指其中在不存在过量饮酒的情况下脂肪在肝脏中沉积(肝脏脂肪变性),并伴有或不伴有炎症和纤维化的迹象的病症。

[0073] 根据本发明,术语“NAFLD活性水平”是指NAFLD进展,并通过本文中所定义的脂肪变性评分的提高来定义。NAFLD活性水平也指NAFLD向NASH或纤维化的进展和NASH严重性。

[0074] 根据本发明,术语“脂肪变性”是指描述肝脏中的脂类异常滞留或脂肪积累的过程。

[0075] 根据本发明,术语“NASH”或“非酒精性脂肪性肝炎”是指在不存在过量饮酒的情况下并在排除其他肝脏疾病如病毒性肝炎(HCV、HBV)后,以在组织学检查时肝脏脂肪变性、肝细胞膨胀和肝脏炎症的同时存在(即NAS $\geq$ 3,其中脂肪变性至少1分、小叶炎症至少1分并且肝细胞膨胀评分至少1分)为特征的NAFLD病症。

[0076] 根据本发明,术语“NASH活性水平”是指NASH进展,并通过NAS评分相比于用于定义NASH的最低参数的提高来定义,所述最低参数是S=1、LI=1和HB=1。NASH活性水平也指NASH向不可逆NASH和/或纤维化的进展和NASH严重性。

[0077] 根据本发明,术语“活跃NASH”是指以NAS $\geq$ 4为特征的NASH,其中脂肪变性评分至少1分、小叶炎症评分至少1分并且肝细胞膨胀评分至少1分。

[0078] 根据本发明,术语“肝细胞膨胀”通常被定义为在光学显微镜水平上,在苏木精和曙红(H&E)染色的基础上,细胞增大为正常肝细胞直径的1.5-2倍,并且细胞质稀少。它更通常是指肝细胞死亡的过程。

[0079] 根据本发明,术语“小叶炎症”是指在肝活检组织的苏木精和曙红(H&E)染色的切片的显微镜检查时存在小叶炎性病灶(成团的炎性细胞)。

[0080] 根据本发明“NAFLD活性评分”或“NAS”是指如下所述的脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分的总和:

[0081] -S:脂肪变性评分:0:<5%;1:5-33%;2:34-66%和3:>66%;

[0082] -LI:小叶炎症评分(病灶/x20视野):0:无;1:<2;2:2-4和3:>4;

[0083] -HB:膨胀变性评分:0:无;1:少量;2:许多。

[0084] 根据本发明,“活性指数”是指肝细胞膨胀和小叶炎症评分的总和。

[0085] 根据本发明,术语“纤维化”或“肝纤维化”是指在肝活检组织的染色(H&E、三色或天狼猩红染色)切片的显微镜检查时存在纤维状结缔组织。

[0086] 在本发明的情形中,术语“纤维化分期”表示组织学检查时纤维化的位置和程度,如下所述:

|        |              |    |
|--------|--------------|----|
|        | 窦周或门周纤维化     | 1  |
|        | 轻度窦周纤维化（第3区） | 1a |
|        | 中度窦周纤维化（第3区） | 1b |
| [0087] | 门/门周纤维化      | 1c |
|        | 窦周和门/门周纤维化   | 2  |
|        | 桥接纤维化        | 3  |
|        | 肝硬化          | 4  |

[0088] 或者,在本发明的情形中,所述纤维化分期可以如下所指:

[0089] F=0:无纤维化

[0090] F=1:极少纤维化

[0091] F=2:显著纤维化

[0092] F=3:中度纤维化

[0093] F=4:重度纤维化(即肝硬化)。

[0094] 根据本发明,“待治疗对象”或“TBT对象”是其疾病活性评分(例如NAS或活性指数)和/或肝纤维化等级使其符合用于NAFLD、NASH和/或肝纤维化的治疗的条件的对象。相反,“非待治疗对象”或“NTBT对象”是其疾病活性评分(例如NAS或活性指数)和/或肝纤维化等级不够高以应该接受用于NAFLD、NASH和/或肝纤维化的治疗的对象。因此,TBT对象也被称为NAFLD、NASH和/或肝纤维化治疗的“接受者”或“潜在接受者”。在本发明中,优选的TBT对象是:

[0095] i) 具有NASH的对象,

[0096] ii) 具有活跃NASH的对象,

[0097] iii) 具有显著、中度或重度肝纤维化的对象,

[0098] iv) 具有NASH和纤维化的对象。

[0099] 所述定义涵盖了定义本发明的不同变化形式的各种不同的NASH活性评分和纤维化分期。

[0100] 本发明的优选变化形式如下详细描述。

[0101] 第一种TBT变化形式(TBT2):

[0102] TBT2对象被定义为表现出下述肝组织活检来源的等级的对象:

[0103]  $-S \geq 1$

[0104]  $-HB \geq 1$

[0105]  $-LI \geq 1$

[0106]  $-NAS$  (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

[0107]  $-$ 纤维化分期  $\geq 2$  (例如纤维化分期等于2、3或4,特别是2或3)。

[0108] 引申开来,NTBT2对象与TBT2对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。为清楚起见,NTBT2对象可以是例如具有NAS=4、 $S \geq 1$ 、 $LI \geq 1$ 、 $HB \geq 1$ 并且纤维化分期为1(例如纤维化分期1a、1b或1c)或NAS为3并且纤维化分期  $\geq 2$  (例如纤维化分期等于2、3或4)或如上所定义的评分的任何其他组合的NASH对

象。

[0109] 第二种TBT变化形式 (TBT1) :

[0110] TBT1对象被定义为表现出下述肝组织活检来源的等级的对象:

[0111] -脂肪变性评分 $\geq 1$

[0112] -肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

[0113] -小叶炎症评分 $\geq 1$

[0114] -NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

[0115] -纤维化分期 $\geq 1$  (例如纤维化分期等于1、2、3或4)。

[0116] 引申开来,NTBT1对象与TBT1对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。为清楚起见,NTBT1对象可以是例如具有NAS = 4、S $\geq 1$ 、LI $\geq 1$ 、HB $\geq 1$ 并且纤维化分期为0或NAS为3并且纤维化分期 $\geq 1$  (例如纤维化分期等于1a、1b或1c、2、3或4) 或如上所定义的评分的任何其他组合的NASH对象。

[0117] 第三种TBT变化形式 (TBT7) :

[0118] TBT7对象被定义为表现出下述肝组织活检来源的等级的对象:

[0119] -脂肪变性评分 $\geq 1$

[0120] -肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

[0121] -小叶炎症评分 $\geq 1$

[0122] -NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$

[0123] -纤维化分期 = 1b、1c、2、3或4。

[0124] 引申开来,NTBT7对象与TBT7对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。为清楚起见,NTBT7对象可以是例如具有NAS = 4、S $\geq 1$ 、LI $\geq 1$ 、HB $\geq 1$ 并且纤维化分期为0或1a或NAS为3并且纤维化分期等于1b、1c、2、3或4或如上所定义的评分的任何其他组合的NASH对象。

[0125] 在特定实施方式中,在本发明中应用的miR-193microRNA选自hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-5p和hsa-miR-193b-3p,它们的序列可以分别从miRBase数据库 (<http://mirbase.org>), 分别在miRBase登记号MIMAT0000459、MIMAT0004614、MIMAT004767和MIMAT0002819下获得。

[0126] 在另一个实施方式中,在本发明中应用的miR-193microRNA是miR-193茎环形式,例如选自hsa-miR-193a (也被称为HGNC:MIR193A) 和hsa-miR-193b (也被称为HGNC:MIR193B) 的miR-193microRNA,它们的序列可以分别从miRBase数据库 (<http://mirbase.org>), 分别在miRBase登记号MI0000487和MI0003137下获得。

[0127] 在特定实施方式中,在本发明中应用的miR-193microRNA是hsa-miR-193b-3p。

[0128] 样品和样品制备

[0129] 根据本发明,术语“体液样品”表示从对象获得的任何体液样品,例如血液和血液来源的流体 (例如血浆和血清)、淋巴液、脑脊液,滑液、尿液、唾液、黏液、痰和痰液。在特定实施方式中,所述体液选自血液和血液来源的流体 (例如血浆和血清)、唾液、脑脊液和尿液。在特定实施方式中,所述体液样品是血液或血液来源的流体 (例如血浆和血清)、唾液、脑脊液或尿液。在其他特定实施方式中,所述体液是血液、血浆或血清。体液样品可以通过任何适合的手段来收集。适合的体液可以是无细胞流体。这些无细胞体液通常通过例如用

离心或过滤处理含有细胞的体液以除去所述细胞来生产。通常,无细胞体液不含完整细胞,然而,某些可能含有细胞碎片或细胞残骸。所述体液样品可以立即使用,或者可以储存以备晚些时候使用。本领域中已知的任何适合的储存方法可用于储存所述体液样品:例如,可以将所述样品冷冻在约-20℃至约-80℃下。

#### [0130] miRNA分离和定量

[0131] 包括miRNA的总RNA可以通过各种不同的提取方法从样品纯化,所述方法包括下述任一者:苯酚:氯仿提取然后进行醇沉淀(TRIzol),苯酚:氯仿然后进行固相提取(基于柱的,例如miRVana和miRNeasy),使用/不使用亲和树脂(Norgen total and Isolate II)磁珠的固相分离,或直接裂解法。在本发明的实践中,miRNA用miRVana Paris提取试剂盒提取用于随后的RTqPCR分析,或用特异性探针捕获用于进一步的HTG Edge序列分析。

[0132] 接下来,使用本领域技术人员可用的任何技术例如基于测序、基于扩增或基于杂交的方法来检测临床样品中的miRNA。miRNA临床测试的常见方法包括小RNA测序(Hafner等,2012;Vigneault等,2012)、HTG Edge全转录组测定、基于下一代测序的miRNA剖析平台(Lizarraga等,2016;Satake等,2018)、定量miRNA实时反转录PCR(qRT-PCR)(Chen等,2005)、miRNA微阵列(Castoldi等,2007)、使用颜色编码探针对的多重miRNA检测(NanoString n Counter表达系统)(Geiss等,2008)、反转录后的微滴数字PCR(ddPCR)(Miotto等,2014)和miRNA原位杂交(Nelson等,2006)。miR-193的水平可以通过本领域中公知的常规方法来确定,例如免疫测定法(例如ELISA)或分子生物学测定法(定量RT-PCR或下一代测序)或生物化学测定法(比色测定法等)。在本发明的方法的特定实施方式中,miRNA通过HTG Edge全转录组测定法或HTG Edge测序和RT-qPCR来检测。

[0133] 在本发明的实践中,任何上述方法可以另外包括将来自于所述对象的体液样品中miR-193的水平归一化,并参照相对于健康患者来说其水平在NAFLD、NASH和/或肝纤维化对象中不变的microRNA的水平。为了减少技术性变差的潜在来源,在RNA提取之前可以向所述样品添加序列和量已知的掺入或外源合成micro-RNA,例如秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)miR-39。所述掺入或外源合成micro-RNA可以是在人类样品中不表达的miRNA,例如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)cel-miR-38或拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)ath-miR-159a。这些合成micro-RNA可以在RNA提取之前在血液来源的样品中添加裂解缓冲液之后添加,并提供过程对照用于技术归一化。因此,可以使用这些外源合成micro-RNA来监测RNA提取、互补DNA合成和PCR扩增的效率。

[0134] 在实验流程的所有步骤中,代表了受到与靶基因相同的变差来源影响的内源对照的用于qPCR数据归一化的micro-RNA归一化物或小的非编码RNA对照,可用于归一化靶miRNA即miR-193的水平。

[0135] 提供了通过定量RT-PCR来测量miR-193的标准流程。简单来说,从提取自体液样品例如血液、血浆或血清样品、特别是无细胞的柠檬酸盐衍生的无血小板血浆样品的总RNA进行测量。在RNA提取之前,可以向所述样品添加适合的内部对照(例如序列和量已知的micro-RNA,例如秀丽隐杆线虫miR-39)。使用定量RT-PCR确定Cq值。可以获得用于进行这些测定的商品化试剂盒。例如,Taqman miRNA RT-qPCR测定法:可以按照制造商的说明书使用Taqman MicroRNA反转录试剂盒、TaqMan MicroRNA Assay 20X和TaqMan Universal Master Mix II(Applied Biosystems)。反转录可以使用容易获得的PCR系统来进行,例如

GeneAmp®PCR System 9700热循环仪 (Applied Biosystems), 使用适合的循环参数例如 16°C 30分钟, 然后 42°C 30分钟和 85°C 5分钟, 最后保持在 4°C。所述反转录可以以多重格式实行。然后使用定量PCR系统例如CFX96TM实时系统 (C1000 TouchTM热循环仪, BioRad) 进行定量PCR。优选地, 定量PCR使用CFX96-Real-Time PCR检测系统-C1000-认证的In Vitro Diagnostic (IVD), Bio-Rad来进行。循环条件可以如下: 95°C 10分钟, 然后 95°C 15sec和 60°C 60sec共50个循环, 然后 30°C 30sec。Cq确定模式可以是例如定量PCR系统中的回归模式。在特定实施方式中, 按照本发明的方法确定的Cq值是可以使用上述特定参数和材料获得的Cq值。样品的Cq值如果高于每种miRNA的标准曲线的最大Cq, 可以从所述分析排除。所述标准曲线可用于评估PCR反应效率。可以从最浓的cDNA样品开始进行8个点的连续稀释, 以确保所述标准曲线覆盖在研究期间可能遇到的所有可能的模板浓度。所述标准曲线可以通过将模板的起始量的对数对获得的Cq值作图来构建。为了获得绝对定量数据, 可以将将稀释的例如3.125fmol/mL和5μL的合成miRNA (例如来自于Integrated DNA Technologies, 5' 磷酸酯, 3' OH, HPLC纯化) 与从血清样品提取的RNA同时用于反转录。然后可以将产物连续稀释, 并且可以对所有样品 (标准品和血清来源的RNA) 进行PCR。标准曲线可以单份、一式两份或一式三份进行, 并用于将Cq数据转变成拷贝数/μL流体。

[0136] 或者, 可以使用  $\Delta Ct$  (循环阈值) 或  $\Delta Cq$  (循环定量) 方法来估算miR-193水平。 $\Delta Ct$  或  $\Delta Cq$  对应于患者测试样品中所述靶的Ct或Cq与参比样品 (即健康对象、参照样品) 中所述靶的Ct或Cq之间的差。

[0137] 或者, miR-193水平可以通过使用茎环反转录 (RT) 反应与TaqMan qPCR的组合或poly (A) 加尾RT与SYBR Green检测和锁核酸 (LNA) 引物的组合的RT-qPCR来确定。

[0138] 本发明的方法

[0139] 在所有下述方面、实施方式和变化形式中, 优选的实施方式涉及确定血液、血清或血浆样品中hsa-miR-193的水平。这一方面的优选变化形式涉及确定hsa-miR-193b-3p的水平。

[0140] 本发明涉及一种在对象中诊断或检测NAFLD的方法, 所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。本发明涉及一种在对象中诊断或检测潜在NAFLD的方法, 所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。在特定实施方式中, NAFLD或潜在NAFLD基于相对于在来自于没有肝脏脂肪变性的对象的样品中测量到的参比水平, 来自于所述对象的体液样品中miR-193水平的提高来检测。在其他特定实施方式中, NAFLD或潜在NAFLD的诊断或检测是基于相对于在没有肝脏脂肪变性的健康对象中通常测量到的水平, 在体液样品中检测到miR-193水平的提高。在特定实施方式中, 所述方法还包括确认所述对象患有NAFLD的步骤。这种确认可以按照本领域技术人员已知的任何方法来实施, 例如通过进行肝组织活检或通过超声或成像技术 (例如超声波扫描术、通过瞬时弹性成像 (Fibroscan) 的受控衰减参数测量、磁共振成像 (MRI)、MRI估算质子密度脂肪分数 (MRI-DPFF) 和磁共振波谱密度脂肪分数 (MRS-DPFF))。可选地, 几种指数和评分可以评估肝脏脂肪变性, 包括但不限于:

[0141] -脂肪肝指数 (FLI), 其包含BMI、腰围以及甘油三酯和  $\gamma$ -谷氨酰转移酶 (GGT) 的血清水平,

[0142] -肝脏脂肪变性指数 (HIS), 其包括血清天冬氨酸转氨酶 (AST): 丙氨酸转氨酶

(ALT) 比率、BMI、性别和糖尿病的存在,

[0143] -NAFLD脂肪肝评分(代谢综合征、2型糖尿病、禁食血清胰岛素和AST、AST:ALT比率,

[0144] -脂肪测试( $\alpha$ 2巨球蛋白(A2M)、结合珠蛋白、载脂蛋白A1、总胆红素、GGT、禁食血液葡萄糖和年龄、性别、体重和身高的调整),和

[0145] -NAFLD脊评分(ALT、胆甾醇、甘油三酯、糖化血红蛋白A1c(HbA1c)和白细胞计数)和共病数据(高血压)。

[0146] 在特定实施方式中,遗传和基因组标志物可以评估NAFLD风险和严重性(单核苷酸多态性(SNP):rs738409(PNPLA3中的SNP),无细胞非编码RNA,miR-122,血清来源的组学数据的复合组)。

[0147] 本发明还涉及一种在对象中诊断或检测NASH的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。本发明还涉及一种在对象中诊断或检测潜在NASH的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。在特定实施方式中,NASH或潜在NASH的诊断或检测是基于相对于在健康对象、具有NAS<3的对象或NAS的至少一个组分的评分为0的对象中测量到的miR-193的参比水平,在来自于所述对象的体液中检测到miR-193水平的提高。在特定实施方式中,所述参比样品来自于NAS<3或NAS的至少一个组分的评分为0的对象,例如具有下述评分的对象:S=1,LI=1和HB=0;S=1,LI=0和HB=1;S=0,LI=1和HB=1。在特定实施方式中,NASH或潜在NASH的诊断或检测是基于相对于在非NASH对象包括健康对象、具有NAS<3的对象或NAS的至少一个组分的评分为0的对象中测量到的参比水平,在血液、血清或血浆中检测到hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p的表达水平的提高。在特定实施方式中,所述方法还包括确认所述对象患有NASH的步骤。这种确认可以按照本领域技术人员已知的任何方法来实行,例如通过进行肝组织活检或通过用成像技术例如基于MRI的技术测量的成像生物标志物、与MRI一起使用的钆塞酸、超顺磁氧化铁MRI、使用<sup>32</sup>P-MRS和MRE材料的细胞内ATP水平。可选地,几种指数和评分可以评估潜在NASH生物标志物,包括但不限于:

[0148] -凋亡标志物(CK18片段、总细胞角蛋白、凋亡介导表面抗原FAS的血清水平),

[0149] -炎性标志物(C-反应蛋白(CRP)、TNF、IL-8、CXC趋化因子配体10(CXCL10)),

[0150] -脂质氧化产物(11-羟基二十碳四烯酸(HETE)、9-羟基癸二烯酸(HODE)、13-HODE、13-氧代-十八碳二烯酸(ODE)、LA-13-HODE(oxNASH评分)、11,12-二羟基-二十碳三烯酸(diHETrE)),

[0151] -脂肪细胞因子和激素(脂联素、瘦蛋白、抵抗素、内脂素、视黄醇结合蛋白(RBP)4、脂肪酸结合蛋白(FABP)4、成纤维细胞生长因子(FGF21)),

[0152] -溶酶体酶(组织蛋白酶D),以及

[0153] -组合组(NASH测试、NASH诊断组)。

[0154] 本发明还涉及一种在对象中诊断或检测活跃NASH的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。本发明还涉及一种在对象中诊断或检测潜在活跃NASH的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。在特定实施方式中,活跃NASH或潜在活跃NASH的诊断或检测是基于相对于在健康对象、具有NAS<4的对象或NAS的至少一个组分的评分为0的对象中测量到的miR-193的参比水平,在来自于所述对象的体液

中检测到miR-193水平的提高。在特定实施方式中,所述参比样品来自于具有NAS=3并且S=1、LI=1和HB=1的对象。在特定实施方式中,活跃NASH或潜在活跃NASH的诊断或检测是基于相比于在健康对象、具有NAS<4的对象或NAS的至少一个组分的评分为0的对象中测量到的参比水平,在对象的血液、血清或血浆样品中检测到hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p的表达水平的提高。在特定实施方式中,所述方法还包括确认所述对象患有活跃NASH的步骤。这种确认可以按照本领域技术人员已知的任何方法来实行,例如通过进行肝组织活检或通过成像技术例如基于MRI的技术、超顺磁氧化铁MRI、多参数MRI、MRS和MRE。可选地,几种指数和评分可以评估潜在NASH生物标志物,包括但不限于:

[0155] -凋亡标志物(CK18片段、总细胞角蛋白、凋亡介导表面抗原FAS的血清水平),

[0156] -炎性标志物(C-反应蛋白(CRP)、TNF、IL-8、CXC趋化因子配体10(CXCL10))。

[0157] -脂质氧化产物(11-羟基二十碳四烯酸(HETE)、9-羟基癸二烯酸(HODE)、13-HODE、13-氧代-十八碳二烯酸(ODE)、LA-13-HODE(oxNASH评分)、11,12-二羟基-二十碳三烯酸(diHETrE)),

[0158] -脂肪细胞因子和激素(脂联素、瘦蛋白、抵抗素、内脂素、视黄醇结合蛋白(RBP)4、脂肪酸结合蛋白(FABP)4、成纤维细胞生长因子(FGF21)),

[0159] -溶酶体酶(组织蛋白酶D),以及

[0160] -组合组(NASH测试、NASH诊断组)。

[0161] 这种确认可以通过测量下述参数来实行:NAFLD风险(向NASH或纤维化发展)和严重性标志物如遗传和基因组标志物如SNP(PNPLA3中的rs738409),无细胞非编码RNA(miR-122、miR-1290、miR-192和miR-7b),血清来源的组学数据如rs738409和蛋白质组学数据包括ACY1、SHBG、CTS2、MET、GNS、LGALS3BP、CHL1和SERPINC1的复合组,多个基因座处的SNP(PNPLA3、SOD2、KLF6和LPIN1),miR-122,包括miR-122、miR-192、miR-21、ALT、CK18Asp396的复合组,无细胞DNA如循环甲基化PPARG。

[0162] 本发明还涉及一种在对象中表征肝脏小叶炎症的存在或等级的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。

[0163] 本发明还涉及一种在对象中表征肝细胞膨胀的存在或等级的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。

[0164] 本发明还涉及一种在对象中表征肝脏脂肪变性的存在或等级的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中hsa-miR-193的水平。

[0165] 本发明还涉及一种在对象中诊断或检测肝纤维化的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193(例如hsa-miR-193)的水平。本发明还涉及一种在对象中诊断或检测潜在肝纤维化的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。在特定实施方式中,所述纤维化至少是显著纤维化(即 $F \geq 2$ )。在这个实施方式的变化形式中,肝纤维化或潜在肝纤维化的诊断或检测是基于相对于在没有或具有极少纤维化、特别是具有极少纤维化的对象中测量到的miR-193的参比水平,在来自于所述对象的体液中检测到miR-193水平的提高。在其他特定实施方式中,所述纤维化至少是中度肝纤维化或肝硬化(即 $F \geq 3$ )。在这个实施方式的变化形式中,肝纤维化或潜在肝纤维化的诊断或检测是基于相对于在具有纤维化、具有极少纤维化或具有重度纤维化、特别是具有重度纤维化的对象

中测量到的miR-193的参比水平,在来自于所述对象的体液中检测到miR-193水平的提高。在特定实施方式中,所述方法还包括确认所述对象患有肝纤维化或确定肝纤维化分期的方法。这种确认可以按照本领域技术人员已知的任何方法来实行,例如通过进行肝组织活检或通过成像,包括但不限于:

[0166] -FibroScan (瞬时弹性成像),

[0167] -点剪切波弹性成像pSWE,声辐射力脉冲 (ARFI)

[0168] -2D 3D剪切波弹性成像2D-3D SWE,

[0169] -磁共振弹性成像MRE,

[0170] -多参数MRI。

[0171] 可选地,肝纤维化和肝硬化的几种非侵入性测试包括:

[0172] -AST:ALT比率和AST:血小板比率指数 (APRI),

[0173] -纤维化-4指数 (FIB-4),其包含年龄、AST、ALT和血小板计数

[0174] -NAFLD纤维化评分 (年龄、BMI、禁食葡萄糖受损和/或糖尿病、AST、ALT、血小板计数和白蛋白),

[0175] -BARD评分 (AST、ALT、BMI和糖尿病)。

[0176] 在另一个实施方式中,特异性肝纤维化标志物和组可以评估肝纤维化:

[0177] -特异性纤维化标志物:透明质酸,III型胶原蛋白的N-端前肽 (PIIINP),用于PIIINP (Pro-C3) 的新表位特异性竞争性酶联免疫吸附测定法,组织抑制剂金属蛋白酶1 (TIMP-1),层粘连蛋白。

[0178] -特异性纤维化组:强化肝纤维化 (ELF),其包括PIIINP、透明质酸和TIMP-1; Fibrotest ( $\gamma$ -谷氨酰转移酶 (GGT)、总胆红素、 $\alpha$ 2巨球蛋白 (A2M)、载脂蛋白A1和结合珠蛋白);FibroMeter NAFLD (体重、凝血酶原指数、ALT、AST、铁蛋白和禁食葡萄糖)。

[0179] 本发明还涉及一种在对象中确定肝纤维化分期的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193 (例如hsa-miR-193) 的水平。

[0180] 在特定实施方式中,如果所述对象的体液样品中miR-193的水平高于来自于具有纤维化分期 $F \leq 4$ 、例如具有 $F=0$ 、 $F=1$ 、 $F=2$ 或 $F=3$ 的对象的参比样品中的miR-193水平,则可以确定 $F=4$ 期。在特定变化形式中,所述参比样品来自于具有 $F=3$ 的对象。

[0181] 在特定实施方式中,如果所述对象的体液样品中miR-193的水平高于来自于具有纤维化分期 $F \leq 3$ 、例如具有 $F=0$ 、 $F=1$ 或 $F=2$ 的对象的参比样品中的miR-193水平,则可以确定 $F=3$ 期。在特定变化形式中,所述参比样品来自于具有 $F=2$ 的对象。

[0182] 在特定实施方式中,如果所述对象的体液样品中miR-193的水平高于来自于具有纤维化分期 $F \leq 2$ 、例如具有 $F=0$ 或 $F=1$ 的对象的参比样品中的miR-193水平,则可以确定 $F=2$ 期。在特定变化形式中,所述参比样品来自于具有 $F=1$ 的对象。

[0183] 在特定实施方式中,如果所述对象的体液样品中miR-193的水平高于来自于具有纤维化分期 $F \leq 1$ 、例如具有 $F=0$ 的对象的参比样品中的miR-193水平,则可以确定 $F=1$ 期。

[0184] 在特定实施方式中,所述方法用于在具有NAFLD或NASH的对象中诊断和检测显著至重度纤维化 ( $F \geq 2$ ) 和晚期肝纤维化 ( $F \geq 3$ ),其基于相比于在没有和/或具有极少纤维化 ( $F=0-1$ ) 的患者中测量到的参比水平,在对象的血液、血清或血浆样品中检测到hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p的

表达水平的提高。

[0185] 在特定实施方式中,所述用于确定肝纤维化分期的方法还包括确认所述对象中的肝纤维化阶段的方法。这种确认可以按照本领域技术人员已知的任何方法来实行,例如通过进行肝组织活检或通过其他手段例如对上文列出的用于诊断纤维化的生物标志物进行成像。

[0186] 由于肝纤维化是大多数慢性肝病共同结果,因此本发明还涉及诊断和检测由其他纤维化肝病造成的显著或晚期肝纤维化,所述肝病例如:病毒性肝炎(HBV、HCV等),酒精性脂肪性肝炎,胆道疾病(原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、自体免疫性肝炎、威尔森氏病、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症)。

[0187] 本发明还涉及一种将对象分类为NAFLD、NASH和/或肝纤维化治疗的潜在接受者或非接受者的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193的水平。在特定实施方式中,所述方法用于将所述对象分类为NAFLD治疗的潜在接受者或非接受者。在另一个特定实施方式中,所述方法用于将所述对象分类为NASH治疗的潜在接受者或非接受者。在其他实施方式中,所述方法用于将所述对象分类为肝纤维化治疗的潜在接受者或非接受者。

[0188] 更具体来说,本发明涉及一种将对象分类为NASH和/或纤维化治疗的潜在接受者(TBT)或非接受者(NTBT)的方法,所述方法包括确定所述对象的体液样品中miR-193(例如hsa-miR-193)的水平。

[0189] 在特定实施方式中,如果来自于对象的体液样品中miR-193的水平高于NTBT2对象的参比样品中miR-193的水平,则将所述对象分类为TBT2对象。在特定变化形式中,所述NTBT2对象是具有 $NAS=4$ 、 $S \geq 1$ 、 $LI \geq 1$ 、 $HB \geq 1$ 和 $F=1$ (例如1a、1b或1c纤维化分期)的对象。

[0190] 在特定实施方式中,如果来自于对象的体液样品中miR-193的水平高于NTBT1对象的参比样品中miR-193的水平,则将所述对象分类为TBT1对象。在特定变化形式中,所述NTBT1对象是具有 $NAS=4$ 、 $S \geq 1$ 、 $LI \geq 1$ 、 $HB \geq 1$ 和 $F=0$ 的对象。

[0191] 在特定实施方式中,如果来自于对象的体液样品中miR-193的水平高于NTBT7对象的参比样品中miR-193的水平,则将所述对象分类为TBT7对象。在特定变化形式中,所述NTBT7对象是具有 $NAS=4$ 、 $S \geq 1$ 、 $LI \geq 1$ 、 $HB \geq 1$ 和 $F=1a$ 的对象。

[0192] 在特定实施方式中,本发明的方法用于将对象分类为TBT2对象。

[0193] 本发明的其他变化形式涉及一种将患者分类为NASH和/或纤维化治疗的潜在接受者(TBT)或非接受者(NTBT)的方法,其基于相比于在NTBT中测量到的hsa-miR-193的参比水平,在血液、血清或血浆中检测到hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p的表达水平的提高。

[0194] 这种分类也可以作为基础,用于确定对象是否应该在做出治疗决定之前经历其他肝脏调查、例如现有技术的肝脏调查,例如超声、弹性成像、成像技术包括MRI或肝组织活检。

[0195] TBT或接受者与NTBT或非接受者患者的定义可以随着药物功效或药物安全性而变,具有如上所提供的不同疾病活性值(NAS或活性指数)和不同的纤维化分期值。

[0196] 本发明还涉及一种在对象中确定NAFLD或NASH活性的方法,所述方法包括在所述对象的体液样品中确定miR-193(例如hsa-miR-193)的水平。

[0197] 本发明还涉及一种在对象中预后NAFLD或NASH活性演变的风险的方法,所述方法

包括在所述对象的体液样品中确定miR-193 (例如hsa-miR-193) 的水平。在特定实施方式中,所述方法用于预后在不存在治疗的情况下NAFLD或NASH活性演变的风险。

[0198] 本发明还涉及一种在对象中预后纤维化演变成肝硬化和肝脏临床结果的风险的方法,所述方法包括在所述对象的体液样品中确定miR-193 (例如hsa-miR-193) 的水平。在特定实施方式中,所述方法用于预后在不存在治疗的情况下纤维化演变成肝硬化和肝脏临床结果的风险。

[0199] 本发明还涉及一种在对象中监测NAFLD或NASH活性的演变(即进展或消退)的方法,所述方法包括在所述对象的体液样品中确定hsa-miR-193的水平。

[0200] 本发明还涉及一种在对象中监测肝纤维化的演变(即进展或消退)的方法,所述方法包括在所述对象的体液样品中确定hsa-miR-193的水平。

[0201] 本发明还涉及一种预测患者对NAFLD、NASH和/或肝纤维化的特定治疗的响应的方法,所述方法包括在所述对象的体液样品中确定hsa-miR-193的水平。

[0202] 根据另一种变化形式,本发明涉及一种在对象的体液样品中miR-193水平的检测的基础上确定对象中的脂肪变性分期的方法。

[0203] 根据另一种变化形式,本发明涉及一种在对象的体液样品中miR-193水平的检测的基础上确定对象中的肝细胞膨胀等级的方法。

[0204] 根据另一种变化形式,本发明涉及一种在对象的体液样品中miR-193水平的检测的基础上确定对象中的小叶炎症等级的方法。

[0205] 在本发明的实践中,可以计算miR-193的截止浓度以帮助实施本发明的方法的人做出决定。当在本文中使用时,表述“截止浓度”是指miR-193的浓度,在高于所述浓度时做出症状或疾病的统计学预测,并且在低于所述浓度时做出缺少疾病或症状的统计学预测。对于不同场景来说,这种截止浓度可以如下所述来确定。

[0206] 用于将对象分类为具有NAFLD (或潜在NAFLD) 的对象或没有NAFLD的健康对象的截止浓度可以如下确定:

[0207] i) 测量来自于参比对象组群的体液样品中的miR-193浓度,所述组群包括具有NAFLD的对象和不具有NAFLD的健康对象两者,

[0208] ii) 对所述参比数据集进行专门的统计分析,以确定最佳截止浓度。

[0209] 具体来说,可以使用现有技术的统计学方法ROC (受试者工作特征) 来计算用于辨别参比组群中的NAFLD和健康对象的最佳截止浓度。

[0210] 用于将对象分类为具有NASH (或潜在NASH) 的对象或没有NASH的对象的截止浓度可以如下确定:

[0211] i) 测量来自于参比对象组群的体液样品中的miR-193浓度,所述组群包括具有NASH的对象和不具有NASH的对象,

[0212] ii) 对所述参比数据集进行专门的统计分析,以确定最佳截止浓度。具体来说,可以使用现有技术的统计学方法ROC (受试者工作特征) 来计算用于辨别参比组群中的具有NASH (或潜在NASH) 的对象和不具有NASH的对象的最佳截止浓度。

[0213] 用于将对象分类为具有活跃NASH (或潜在活跃NASH) 的对象或没有活跃NASH的对象的截止浓度可以如下确定:

[0214] i) 测量来自于参比对象组群的体液样品中的miR-193浓度,所述组群包括具有活

跃NASH的对象和没有活跃NASH的对象两者，

[0215] ii) 对所述参比数据集进行专门的统计分析，以确定最佳截止浓度。具体来说，可以使用现有技术的统计学方法ROC (受试者工作特征) 来计算用于辨别参比组群中的具有活跃NASH (或潜在活跃NASH) 的对象和没有活跃NASH的对象的最佳截止浓度。

[0216] 用于将对象分类为具有显著肝纤维化 ( $F \geq 2$ ) (或潜在显著肝纤维化) 的对象或没有或具有极少纤维化的对象的截止浓度可以如下确定：

[0217] i) 测量来自于对象参比组群的体液样品中的miR-193浓度，所述对象包括具有显著至重度肝纤维化 ( $F \geq 2$ ) 或晚期肝纤维化 ( $F \geq 3$ ) 的对象和没有或具有极少纤维化 ( $F = 0-1$ ) 的对象两者，

[0218] ii) 对所述参比数据集进行专门的统计分析，以确定最佳截止浓度。具体来说，可以使用现有技术的统计学方法ROC (受试者工作特征) 来计算用于辨别参比组群中的具有显著肝纤维化 ( $F \geq 2$ ) 或晚期肝纤维化 ( $F \geq 3$ ) 的对象和没有或具有极少纤维化 ( $F = 0-1$ ) 的对象的最佳截止浓度。

[0219] 用于将对象分类为TBT对象或NTBT对象的截止浓度可以如下确定：

[0220] i) 测量来自于参比对象组群的体液样品中的miR-193浓度，所述组群包括TBT对象和NTBT对象两者，

[0221] ii) 对所述参比数据集进行专门的统计分析，以确定最佳截止浓度。具体来说，可以使用现有技术的统计学方法ROC (受试者工作特征) 来计算用于辨别参比组群中的TBT对象和NTBT对象的最佳截止浓度。

[0222] 本文中呈现的数据显示，miR-193是一种用于对象中组织学病灶 (脂肪变性、小叶炎症、肝细胞膨胀) 的非侵入性分级、NAFLD活性水平和NASH活性水平的评估以及肝纤维化严重性的评估的循环诊断生物标志物。

[0223] 根据本发明的另一个变化形式，提供了一种在对象的体液样品中的miR-193水平的基础上，在对象中预后在不存在治疗的情况下NAFLD或NASH活性演变的风险的方法。

[0224] 本发明的另一个变化形式涉及一种在对象的体液样品中测量到的miR-193水平的基础上，预后NAFLD或NASH患者的纤维化演变成肝硬化和肝脏结果的风险的方法。本发明还致力于在患有其他纤维化肝脏疾病的患者中预后纤维化演变的风险，所述纤维化肝脏疾病例如：病毒性肝炎 (HBV、HCV等)，酒精性脂肪性肝炎，胆道疾病 (原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、自体免疫性肝炎、威尔森氏病、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺乏症)。

[0225] 本发明人还已显示，在miR-193的循环水平的变化与组织学评分的演变、尤其是活性指数、NAS和纤维化分期的演变之间存在相关性。这些分析支持了将miR-193使用在监测对象中的组织学演变的方法中，不论所述对象是否用抗NAFLD、抗NASH药物或抗纤维化药物治疗。此外，假定miR-193的血清水平的变化作为组织学演变的替代物，本发明的方法可用于在干预性试验中评估药物的抗NAFLD、抗NASH和/或抗纤维化活性。

[0226] 因此，本发明的另一个变化形式涉及一种在从同一对象分两次或更多次收集的体液样品中miR-193的水平的演变的基础上，监测NAFLD或NASH活性的演变 (即发展或消退) 的方法。

[0227] 本发明的另一个变化形式涉及一种在从同一对象分两次或更多次收集的体液样品中miR-193的水平的演变的基础上，监测肝纤维化分期的演变 (即发展或消退) 的方法。

[0228] 本发明还致力于在患有其他纤维化肝脏疾病的患者中确定纤维化分期的演变,所述纤维化肝脏疾病例如:病毒性肝炎 (HBV、HCV等),酒精性脂肪性肝炎,胆道疾病(原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、自体免疫性肝炎、威尔森氏病、 $\alpha$ 1抗胰蛋白酶缺乏症)。

[0229] 本发明的另一个变化形式涉及一种预测对象对特定治疗的响应(预测NAFLD活性、NASH活性和肝纤维化分期的变化)(响应者对象)的方法,其基于相比于在非响应者对象中测量到的参比水平相比,在所述对象的体液样品中检测到miR-193的不同表达水平。

[0230] 因此,根据本发明,提供了用于下述目的的方法:

[0231] -表征所述对象中NAFLD的出现,

[0232] -表征所述对象中NASH的出现,

[0233] -表征所述对象中肝纤维化的出现,

[0234] -表征所述对象中肝细胞膨胀的出现,

[0235] -表征所述对象中小叶炎症的出现,

[0236] -表征所述对象中肝脏脂肪变性的出现。

[0237] 此外,根据本发明,提供了用于下述目的的方法:

[0238] -将所述对象诊断为具有NAFLD和/或更晚期的NAFLD,

[0239] -将所述对象诊断为具有NASH和/或更晚期的NASH,

[0240] -将所述对象诊断为具有肝纤维化和/或更晚期的肝纤维化分期,

[0241] -将所述对象诊断为具有肝细胞膨胀和/或更晚期的肝细胞膨胀评分,

[0242] -将所述对象诊断为具有小叶炎症和/或更晚期的小叶炎症评分,或

[0243] -将所述对象诊断为具有肝脏脂肪变性和/或更晚期的肝脏脂肪变性评分。

[0244] 此外,根据本发明的方法允许:

[0245] -确定对象中的NAFLD或NASH活性,

[0246] -确定对象中的纤维化分期,

[0247] -确定对象中NASH的严重性,或

[0248] -确定NASH患者中病情的进展或消退。

[0249] 此外,根据本发明的方法允许:

[0250] -将对象分类为NAFLD治疗的接受者或非接受者,

[0251] -将对象分类为NASH治疗的接受者或非接受者,

[0252] -将对象分类为肝纤维化治疗的接受者或非接受者,

[0253] -将对象分类为肝细胞膨胀治疗的接受者或非接受者,

[0254] -将对象分类为小叶炎症治疗的接受者或非接受者,或

[0255] -将对象分类为肝脏脂肪变性治疗的接受者或非接受者。

[0256] 此外,根据本发明的方法允许:

[0257] -评估基于药物施用的药物治疗方法治疗NAFLD疾病的功效,

[0258] -评估基于药物施用的药物治疗方法治疗NASH疾病的功效,

[0259] -评估基于药物施用的药物治疗方法治疗纤维化疾病的功效,

[0260] -评估基于药物施用的药物治疗方法治疗肝细胞膨胀疾病的功效,或

[0261] -评估基于药物施用的药物治疗方法治疗小叶炎症疾病的功效。

[0262] 此外,根据本发明的方法允许:

- [0263] -在药物治疗施用后确定NAFLD患者中病情的进展或消退，
- [0264] -在药物治疗施用后确定NASH患者中病情的进展或消退，
- [0265] -在药物治疗施用后确定患有纤维化的患者中病情的进展或消退，
- [0266] -在药物治疗施用后确定患有肝细胞膨胀疾病的患者中病情的进展或消退，或
- [0267] -在药物治疗施用后确定患有小叶炎症疾病的患者中病情的进展或消退。
- [0268] 此外，根据本发明的方法允许：
- [0269] -预测患者对治疗NAFLD的特定药物治疗是否响应，即是潜在响应者还是非响应者，
- [0270] -预测患者对治疗NASH疾病的药物治疗是否能接受，即是(潜在)响应者还是(潜在)非响应者，
- [0271] -预测患者对治疗肝纤维化的药物治疗是否能接受，即是(潜在)响应者还是(潜在)非响应者，
- [0272] -预测患者对治疗肝细胞疾病的药物治疗是否能接受，即是(潜在)响应者还是(潜在)非响应者，或
- [0273] -预测患者对治疗小叶炎症疾病的药物治疗是否能接受，即是(潜在)响应者还是(潜在)非响应者。
- [0274] 在某些实施方式中，所述用于确定对象是否患有NAFLD或NASH或活跃NASH或肝纤维化(例如显著肝纤维化)或小叶炎症或肝细胞膨胀或用于确定对象是否是特定药物的药物接受者(TBT)或潜在响应者的方法，包括从怀疑患有所评估的病症的对象收集体液样品，并检测miR-193的水平；其中比miR-193的参比水平更高的水平指示存在所述评估的病症，或将所述对象诊断为患有NAFLD或NASH或活跃NASH或肝纤维化(例如显著纤维化)或小叶炎症或肝细胞膨胀，或将所述对象诊断为潜在药物接受者(TBT)或响应者。
- [0275] 在特定实施方式中，所述对象是处于患有NAFLD、NASH、活跃NASH或肝纤维化的风险下的对象或处于在将来发生NAFLD、NASH、活跃NASH或肝纤维化的风险下的对象，例如具有肥胖症、糖尿病、患有代谢综合征和/或肝脏酶类升高和/或具有肝脏功能障碍的其他迹象的对象。所述对象也可以是患有以前鉴定的NAFLD、NASH或活跃NASH或肝纤维化的对象，因此本发明的方法允许确定疾病活性和纤维化分期并估算所述疾病向肝硬化、肝硬化并发症、肝癌、肝移植、心血管疾病或肝相关的死亡演变的风险。
- [0276] 在特定实施方式中，所述对象患有NASH，因此本发明的方法允许确定用于治疗NASH疾病的药物的功效，将所述对象分类为对用于NASH的治疗的响应者/非响应者，或监测所述对象的NASH状态的演变。
- [0277] 根据本发明的特定方面，可以为待治疗的每种类型的患者获得NASH评分。
- [0278] 在本发明的用于诊断NAFLD、NASH或肝纤维化，和/或用于在对象中确定疾病活性、纤维化分期，和/或用于评估药物治疗的功效，和/或用于在NAFLD、NASH或肝纤维化对象中确定病情的演变(进展或消退)，和/或用于将对象分类为对药物治疗的潜在响应者或非响应者，和/或用于预测对象的疾病结果的特定实施方式中，可以在数学模型(算法)中引入miR-193水平的测量值用于与其他变量组合，所述其他变量例如性别、年龄、体重指数、体重、医疗状况、动脉压或其他体液标志物例如血液、血清或血浆循环标志物，尤其是在下表中提到的那些。

|        | 肝细胞<br>功能                                                  | 脂肪组<br>织          | 代谢                                                                              | 氧化胁迫/凋<br>亡                                                                  | 纤维化                                                   | 炎性                                                                                          |
|--------|------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0279] | ALT<br>AST<br>ALP<br>GGT<br>结合珠<br>蛋白<br>白蛋白<br>胆红素<br>血小板 | 脂联素<br>瘦蛋白<br>抵抗素 | 禁食血浆葡<br>萄糖<br>禁食胰岛素<br>HOMA 指数<br>甘油三酯<br>HDL-胆固醇<br>VLCL-C<br>载脂蛋白<br>(ApoA1、 | 丙二醛<br>TBARS<br>Ox LDL<br>CK18 -M30<br>CK18-M65<br>铁蛋白<br>YKL-40<br>(CHI3L1) | 纤粘连蛋<br>白<br>透明质酸<br>IV 型胶<br>原蛋白<br>PIIINP<br>TIMP-1 | TNF $\alpha$<br>IL1b,<br>IL6,<br>IL8,<br>IFN $\gamma$ ,<br>TGFb<br>hs -CRP<br>MCP1<br>sCD14 |
| [0280] | 计数                                                         |                   | ApoB、<br>ApoCIII)                                                               |                                                                              |                                                       |                                                                                             |

[0281] 根据另一个实施方式,本发明的方法包括确定除了miR-193之外的其他生物标志物的水平。

[0282] 在特定实施方式中,这些生物标志物选自: $\alpha$ 2巨球蛋白(A2M),糖化血红蛋白(HbA1c),禁食葡萄糖水平或果糖胺水平,III型胶原蛋白的N-端前肽(PIIINP)和YKL-40。

[0283] 在其他特定实施方式中,这些生物标志物选自TIMP-1、YKL-40、血小板计数、代谢综合征、透明质酸和HbA1c。

[0284] 在另一个其他特定实施方式中,这些生物标志物选自TIMP-1、YKL-40、血小板计数和代谢综合征。

[0285] 在另一个特定实施方式中,这些生物标志物选自TIMP-1、YKL-40、血小板计数、透明质酸和HbA1c。

[0286] 在更特定实施方式中,这些生物标志物是YKL-40、TIMP-1、PIIINP、HbA1c、血小板计数或A2M。

[0287] 在另一个实施方式中,这些生物标志物是NAFLD、NASH或肝纤维化标志物,例如通过磁共振成像(MRI)、磁共振弹性成像(MRE)、磁共振波谱术(MRS)、受控衰减参数(CAP)估算的脂肪变性、坏死性炎症和纤维化的程度,和通过瞬时弹性成像(TE)、超声波扫描术(USG)、FibroScan、点剪切波弹性成像(pSWE)、2D剪切波弹性成像(2D-SWE)进行的肝脏硬度测量,单核苷酸多态性(SNP),无细胞DNA,无细胞非编码RNA和基因多态性(例如PNPLA3和TM6SF2)。

[0288] 在特定实施方式中,这些生物标志物是NAFLD标志物如脂肪肝指数相关标志物、肝脏脂肪变性指数相关标志物、NAFLD脂肪肝评分相关标志物、脂肪测试参数、NAFLD脊评分参数、循环甘油三酯、体重指数(BMI),成像生物标志物如光束被组织散射的程度(USG)、肝脂

肪的超声衰减程度 (CAP)、质子密度脂肪分数 (MRI-PDF)、肝脏甘油三酯含量、信号脂肪分数 (MRS)。

[0289] 在特定实施方式中,这些生物标志物是NASH生物活性血液标志物,如凋亡标志物 (CK18片段、总细胞角蛋白、凋亡介导表面抗原FAS的血清水平)、炎症标志物 (C-反应蛋白 (CRP)、TNF、IL-8、CXC趋化因子配体10 (CXCL10))、脂质氧化产物 (11-羟基二十碳四烯酸 (HETE)、9-羟基癸二烯酸 (HODE)、13-HODE、13-氧代-十八碳二烯酸 (ODE)、LA-13-HODE (oxNASH评分)、11,12-二羟基-二十碳三烯酸 (diHETrE))、脂肪细胞因子和激素 (脂联素、瘦蛋白、抵抗素、内脂素、视黄醇结合蛋白 (RBP) 4、脂肪酸结合蛋白 (FABP) 4、成纤维细胞生长因子 (FGF21))、溶酶体酶 (组织蛋白酶D) 和/或组合组 (NASH测试、NASH诊断组),成像生物标志物如枯否细胞摄取功能 (MRI)、使用钆塞酸的肝脏增强提高 (MRI)、肝细胞膜更新率和细胞内ATP (MRS)、肝脏硬度 (MRE)。

[0290] 在特定实施方式中,这些生物标志物是肝纤维化标志物:成像生物标志物如机械诱导的脉冲、剪切波速度的定量测量 (FibroScan-瞬时弹性成像、pSWE-ARFI、2D-3D-SWE)、死亡时超声诱导的聚焦辐射力脉冲 (pSWE-ARFI)、使用改良的相差方法对剪切波在肝实质中的传播进行成像 (MRE),生物活性血液标志物如AST:ALT比率、AST:血小板比率指数 (APRI)、FIB4指数参数、NAFLD纤维化评分参数、BARD评分参数,特异性纤维化标志物如HA、PIIINP、Pro-C3、TIMP-1、层粘连蛋白、ELF相关组、fibrotest参数、fibroMeter NAFLD参数。

[0291] 在另一个其他实施方式中,这些标志物是NAFLD风险和严重性标志物例如遗传和基因组标志物如SNP (PNPLA3中的rs738409),无细胞非编码RNA (miR-122、miR-1290、miR-192和miR-7b),血清来源的组学数据如rs738409和蛋白质组学数据包括ACY1、SHBG、CTS2、MET、GNS、LGALS3BP、CHL1和SERPINC1的复合组,多个基因座处的SNP (PNPLA3、SOD2、KLF6和LPIN1),miR-122,包括miR-122、miR-192、miR-21、ALT、CK18 Asp396的复合组,无细胞DNA如循环甲基化PPARG。

[0292] 根据其他实施方式,所述其他生物标志物是除了miR-193之外的其他循环microRNA。具体来说,可能在本发明的实践中有用的说明性的其他microRNA包括miR-34a、miR-122和miR-200。

[0293] 根据这些实施方式,所述方法可以包括下述步骤:

[0294] i) 测量miR-193和肝损伤的至少一种其他循环标志物 (例如肝损伤的血液、血清或血浆循环标志物) 的水平,并且

[0295] ii) 将这些测量值组合,用于通过生物信息学方法 (例如线性逻辑回归或随机森林) 产生数学模型 (算法),以获得具有高诊断/监测/预后/预测性能的NAFLD、NASH和/或肝纤维化评分,用于在对象中评估NALFD、NASH、活跃NASH或肝纤维化。

[0296] 在特定实施方式中,本发明的方法包括下述步骤:

[0297] -测量hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193b、更特别是hsa-miR-193b-3p或hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193a、更特别是hsa-miR-193a-5p或hsa-miR-193a-3p的水平;和

[0298] -测量选自下述的至少一种、优选地所有其他标志物的水平:

[0299] -金属蛋白酶的抑制因子1 (TIMP-1);

[0300] -YKL-40;

[0301] -血小板计数;

- [0302] -代谢综合征 (ms)。
- [0303] 在特定实施方式中,本发明的方法包括下述步骤:
- [0304] -测量hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193b、更特别是hsa-miR-193b-3p或hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193a、更特别是hsa-miR-193a-5p或hsa-miR-193a-3p的水平;和
- [0305] -测量选自下述的至少一种、优选地所有其他标志物的水平:
- [0306] -金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1);
- [0307] -YKL-40;
- [0308] -血小板计数;
- [0309] 并确定所述对象是否具有代谢综合征。
- [0310] 代谢综合征的诊断可以遵照Kotronen等,Gastroenterology 2009,137:865-872中教授的标准来进行。
- [0311] 在特定实施方式中,本发明的方法包括测量下述标志物的水平:
- [0312] -miR-193b (更特别是miR-193b-3p) 的水平;和
- [0313] -TIMP-1水平;和
- [0314] -YKL-40水平;和
- [0315] -血小板计数;和
- [0316] -代谢综合征。
- [0317] 在特定实施方式中,本发明的方法可用于从水平已被测量的生物标志物的水平来计算评分或NASH评分。
- [0318] 在特定实施方式中,NASH评分S1被定义为下述逻辑函数:
- [0319] 
$$S1 \sim \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$
- [0320] 其中:
- [0321]  $Y = k + a * A + b * B + c * C + d * D + f * F$
- [0322] 其中:
- [0323] S1是根据本发明所述的NASH评分;
- [0324] A是以log10拷贝数.μL-1为单位的hsa-miR-193b-3p水平;
- [0325] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平;
- [0326] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;
- [0327] D是以10<sup>9</sup>/L为单位的血小板计数;
- [0328] F是代谢综合征;
- [0329] k是所述逻辑函数的常数;
- [0330] a是与hsa-miR-193b-3p水平相关的系数;
- [0331] b是与TIMP-1水平相关的系数;
- [0332] c是与YKL-40水平相关的系数;
- [0333] d是与血小板计数相关的系数;
- [0334] f是与代谢综合征相关的系数。
- [0335] 在特定实施方式中,如果所述对象具有代谢综合征,则代谢综合征被定义为具有1的值,或者如果所述对象不具有代谢综合征,则被定义为具有0的值。在这个特定实施方式

中,当所述患者具有代谢综合征时,将系数f应用到所述1的值。

[0336] 因此,所述NASH评分是具有中至高NASH活性或重度NASH的概率。

[0337] 如果S1大于或等于阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为待进行NASH治疗或潜在地待进行NASH治疗,或被分类为待进行NASH治疗和/或饮食和/或生活方式建议的接受者。根据特定实施方式,如果S1低于阈值,则所述对象可以被分类为待治疗或非待治疗,特别是非待治疗,和/或所述对象被分类为饮食和/或生活方式建议的接受者或潜在接受者,用于管控他/她的低NASH活性或中度NASH。

[0338] 在另一个特定实施方式中,源自于本申请的实验部分中所描述的自举(bootstrap)模型:

[0339] k是-8.39至-2.67之间的数,

[0340] a是0.58至2.50之间的数,

[0341] b是 $2.29\text{E}-03$ 至 $1.87\text{E}-02$ 之间的数,

[0342] c是 $2.14\text{E}-06$ 至 $1.65\text{E}-05$ 之间的数,

[0343] d是 $-1.56\text{E}-02$ 至 $-1.05\text{E}-03$ 之间的数,

[0344] f是0.03至1.63之间的数,

[0345] 并且其中所述阈值在0.3050至0.6518之间,更特别是等于 $0.3993 \pm 10\%$ ,特别是等于0.3993。

[0346] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S1高于或等于0.3050至0.6518之间、更特别是等于 $0.3993 \pm 10\%$ 、特别是等于0.3993的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。

[0347] 在特定实施方式中,也源自于所述自举模型:

[0348] k等于-5.53;

[0349] a等于1.54;

[0350] b等于0.0105;

[0351] c等于0.00000934;

[0352] d等于-0.00832;

[0353] f等于0.83;并且

[0354] 其中所述阈值在0.3050至0.6518之间,更特别是等于 $0.3993 \pm 10\%$ ,特别是等于0.3993。

[0355] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S1高于或等于0.3050至0.6518之间、更特别是等于 $0.3993 \pm 10\%$ 、特别是等于0.3993的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。

[0356] 根据这个特定实施方式,AUC至少等于0.80。

[0357] 在特定实施方式中,本发明的方法包括下述步骤:

[0358] -测量hsa-miR-193、特别是hsa-miR-193b、更特别是hsa-miR-193b-3p或hsa-miR-193b-5p或hsa-miR-193a、更特别是hsa-miR-193a-5p或hsa-miR-193a-3p的水平;并且

[0359] -测量选自下述的至少一种、优选地所有其他标志物的水平：

[0360] -YKL-40；

[0361] -金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1)；

[0362] -透明质酸 (HYUA2)

[0363] -HbA1c；和

[0364] -血小板计数。

[0365] 在特定实施方式中，本发明的方法包括测量下述标志物的水平：

[0366] -miR-193b (更特别是miR-193b-3p) 的水平；和

[0367] -YKL-40水平；和

[0368] -TIMP-1水平；和

[0369] -透明质酸 (HYUA2)；

[0370] -HbA1c；和

[0371] -血小板计数。

[0372] 在特定实施方式中，所述NASH评分S2被定义为下述逻辑函数：

[0373] 
$$S2 \sim \frac{e^{Y2}}{1 + e^{Y2}}$$

[0374] 其中：

[0375]  $Y2 = 1 + a2 * A + c2 * C + b2 * B + e * E + g * G + d2 * D$

[0376] 其中：

[0377] S2是根据本发明所述的NASH评分；

[0378] A是以log10拷贝数· $\mu\text{L}^{-1}$ 为单位的hsa-miR-193b-3p水平；

[0379] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平；

[0380] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平；

[0381] E是以百分数为单位的HbA1c水平；

[0382] G是以ng/mL为单位的透明质酸水平；

[0383] D是以 $10^9/\text{L}$ 为单位的血小板计数；

[0384] 1是所述逻辑函数的常数；

[0385] a2是与hsa-miR-193b-3p水平相关的系数；

[0386] c2是与YKL-40水平相关的系数；

[0387] b2是与TIMP-1水平相关的系数；

[0388] e是与HbA1c水平相关的系数；

[0389] g是与透明质酸水平相关的系数；

[0390] d2是与血小板计数相关的系数。

[0391] 因此，所述NASH评分S2是具有中至高NASH活性或重度NASH的概率。

[0392] 如果S2大于或等于阈值，则所述对象被分类为具有NASH，或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ，和/或被分类为待进行NASH治疗或潜在地待进行NASH治疗，或被分类为待进行NASH治疗和/或饮食和/或生活方式建议的接受者。根据特定实施方式，如果S2低于阈值，则所述对象可以被分类为待治疗或非待治疗，特别是非待治疗，和/或所述对象被分类为饮食和/或生活

方式建议的接受者或潜在接受者,用于管控他/她的低NASH活性或中度NASH。

[0393] 在另一个特定实施方式中,源自于在本申请的实验部分中所描述的自举模型:

[0394] 1是-10.92至-3.89之间的数,

[0395] a2是0.44至2.17之间的数,

[0396] c2是0.0035至0.02之间的数,

[0397] b2是0.0016至0.018之间的数,

[0398] e是-0.0053至0.0057之间的数,

[0399] g是0.13至1.08之间的数,

[0400] d2是-0.017至-0.0027之间的数,

[0401] 并且其中所述阈值在0.2461至0.6252之间,更特别是等于 $0.4216 \pm 10\%$ ,特别是等于0.4216。

[0402] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S2高于或等于0.2461至0.6252之间、更特别是等于 $0.4216 \pm 10\%$ 、特别是等于0.4216的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。

[0403] 在特定实施方式中,也源自于所述自举模型:

[0404] 1等于-7.52;

[0405] a2等于1.29;

[0406] c2等于0.01;

[0407] b2等于0.0092;

[0408] e等于-0.0024;

[0409] g等于0.59;

[0410] d2等于-0.009;并且

[0411] 其中所述阈值在0.2461至0.6252之间,更特别是等于 $0.4216 \pm 10\%$ ,特别是等于0.4216。

[0412] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S2高于或等于0.2461至0.6252之间、更特别是等于 $0.4216 \pm 10\%$ 、特别是等于0.4216的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。

[0413] 根据这个特定实施方式,AUC至少等于0.80。

[0414] 在特定实施方式中,所述NASH评分S3被定义为下述逻辑函数:

$$[0415] \quad S3 \sim \frac{e^{Y3}}{1 + e^{Y3}}$$

[0416] 其中:

[0417]  $Y3 = m + a3 * A' + c3 * C + b3 * B + e2 * E + g2 * G + d3 * D$

[0418] 其中:

[0419] S3是根据本发明所述的NASH评分;

[0420] A' 是以Cq为单位的hsa-miR-193b-3p水平;

[0421] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;

- [0422] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平；
- [0423] E是以百分数为单位的HbA1c水平；
- [0424] G是以ng/mL为单位的透明质酸水平；
- [0425] D是以 $10^9$ /L为单位的血小板计数；
- [0426] m是所述逻辑函数的常数；
- [0427] a3是与hsa-miR-193b-3p水平相关的系数；
- [0428] c3是与YKL-40水平相关的系数；
- [0429] b3是与TIMP-1水平相关的系数；
- [0430] e2是与HbA1c水平相关的系数；
- [0431] g2是与透明质酸水平相关的系数；
- [0432] d3是与血小板计数相关的系数。
- [0433] 因此,所述NASH评分S3是具有中至高NASH活性或重度NASH的概率。
- [0434] 如果S3大于或等于阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为待进行NASH治疗或潜在地待进行NASH治疗,或被分类为待进行NASH治疗和/或饮食和/或生活方式建议的接受者。根据特定实施方式,如果S3低于阈值,则所述对象可以被分类为待治疗或非待治疗,特别是非待治疗,和/或所述对象被分类为饮食和/或生活方式建议的接受者或潜在接受者,用于管控他/她的低NASH活性或中度NASH。
- [0435] 在另一个特定实施方式中,源自于本申请的实验部分中所描述的自举模型:
- [0436] m是-1.27至17.54之间的数,
- [0437] a3是-0.64至-0.09之间的数,
- [0438] c3是0.005至0.019之间的数,
- [0439] b3是0.001至0.016之间的数,
- [0440] e2是-0.0054至0.0045之间的数,
- [0441] g2是0.12至1.08之间的数,
- [0442] d3是-0.0164至-0.0016之间的数,
- [0443] 并且其中所述阈值在0.2270至0.6364之间,更特别是等于 $0.3741 \pm 10\%$ ,特别是等于0.3741。
- [0444] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S3高于或等于0.2270至0.6364之间、更特别是等于 $0.3741 \pm 10\%$ 、特别是等于0.3741的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。
- [0445] 在特定实施方式中,也源自于所述自举模型:
- [0446] m等于8.08;
- [0447] a3等于-0.38;
- [0448] c3等于0.01;
- [0449] b3等于0.01;
- [0450] e2等于-0.0024;
- [0451] g2等于0.57;

[0452] d3等于-0.0090;并且

[0453] 其中所述阈值在0.2270至0.6364之间,更特别是等于 $0.3741 \pm 10\%$ ,特别是等于0.3741。

[0454] 根据特定实施方式,如果所述NASH评分S3高于或等于0.2270至0.6364之间、更特别是等于 $0.3741 \pm 10\%$ 、特别是等于0.3741的阈值,则所述对象被分类为具有NASH,或被分类为具有或潜在具有脂肪变性评分 $\geq 1$ 、肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ 、小叶炎症评分 $\geq 1$ 、NAS $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ ,和/或被分类为治疗的接受者或潜在接受者。

[0455] 根据这个特定实施方式,AUC至少等于0.80。

[0456] 在其他特定实施方式中,上文为计算NASH评分所描述的方法从血液、血清或血浆样品、特别是血浆样品实施。

[0457] 在另一个实施方式中,NAFLD、NASH或肝纤维化的诊断、检测、监测、风险评估或治疗功效评估如下所述来进行:确定所述对象的体液样品中miR-193的水平,并使所述对象经历物理非侵入性技术例如超声、弹性成像或成像技术例如MRI。

[0458] 在其他实施方式中,本发明的方法可以与本申请人拥有的W02017046181中公开的方法相组合。

[0459] 在某些实施方式中,由于本发明的方法,可以做出决定以为对象提供生活方式建议(例如食物方案或提供体育锻炼建议),为对象提供医疗护理(例如通过定期访问医生或定期检查,例如定期监测肝损伤的标志物),或向对象提供至少一种NAFLD、NASH或肝纤维化疗法。如上所述,这种将对象分为接受者或TBT患者的分类是基于与在非接受者患者(NTBT)中测量到的参比miR-193水平相比miR-193水平的升高。

[0460] 因此,本发明还涉及一种抗NAFLD、抗NASH或抗纤维化化合物,其用于在需要的对象中治疗NAFLD、NASH或肝纤维化的方法中,其中所述对象由于根据本发明的方法而被鉴定。

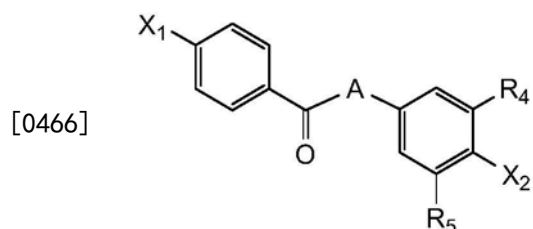
[0461] 具体来说,本发明涉及一种抗NAFLD化合物,其用于在需要的对象中治疗NAFLD的方法中,其中所述对象由于根据本发明的方法而被分类为所述治疗的接受者。

[0462] 具体来说,本发明涉及一种抗NASH化合物,其用于在需要的对象中治疗NASH的方法中,其中所述对象由于根据本发明的方法而被分类为所述治疗的接受者。

[0463] 具体来说,本发明涉及一种抗纤维化化合物,其用于在需要的对象中治疗肝纤维化的方法中,其中所述对象由于根据本发明的方法而被分类为所述治疗的接受者。

[0464] 说明性的抗NAFLD、抗NASH和抗纤维化化合物如下列出:

[0465] -式(I)的化合物或其可药用盐



[0467] 其中:

[0468] X<sub>1</sub>表示卤素、R<sub>1</sub>或G<sub>1</sub>-R<sub>1</sub>基团;

[0469] A表示CH=CH或CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>基团;

- [0470] X2表示G2-R2基团；
- [0471] G1和G2相同或不同，表示氧或硫原子；
- [0472] R1表示氢原子，未取代的烷基，芳基或被一个或多个卤素原子、烷氧基或烷硫基取代的烷基，环烷基，环烷硫基或杂环基；
- [0473] R2表示至少被-COOR3基团取代的烷基，其中R3表示氢原子，或被一个或多个卤素原子、环烷基或杂环基取代或未取代的烷基；
- [0474] R4和R5相同或不同，表示被一个或多个卤素原子、环烷基或杂环基取代或未取代的烷基；
- [0475] -乙酰辅酶A羧化酶抑制剂如GS-0976、ND-654、AC-8632、PF05175157、CP640186、Gemcabene、MK-4074和PF05175157；
- [0476] -腺苷A3受体激动剂如2-(1-己炔基)-N-甲基腺苷、Piclidenoson CF-101 (IB-MECA)、Namodenoson CF-102、2-Cl-IB-MECA、CP-532,903、肌苷、LUF-6000和MRS-3558；
- [0477] -醛固酮拮抗剂和盐皮质激素受体拮抗剂如Apararenone (MT3995)、阿米洛利、螺内酯、依普利酮、坎利酮和坎利酸钾、孕酮、屈螺酮、孕二烯酮和贝尼地平；
- [0478] -AMP活化蛋白激酶刺激剂如PXL-770、MB-11055、Debio-0930B、甲福明、CNX-012、O-304、芒果苷钙盐、艾曲波帕、carotuximab和Imeglimin；
- [0479] -胰淀素受体激动剂和降钙素受体激动剂包括但不限于KBP-042和KBP-089；
- [0480] -血管生成素相关蛋白-3抑制剂如ARO-ANG3、IONIS-ANGGPTL3-LRx或AKCEA-ANGPTL3LRx、evinacumab和ALN-ANG；
- [0481] -抗LPS抗体如IMM-124-E；
- [0482] -靶向转化生长因子 $\beta$ 2的反义寡核苷酸包括但不限于ASPH-0047、IMC-TR1和ISTH-0047；
- [0483] -顶端钠相互依赖性胆汁酸转运蛋白抑制剂如A-4250、volixibat、以前被称为SHP-625的maralixibat、GSK-2330672、elobixibat和CJ-14199；
- [0484] -无水甜菜碱或RM-003；
- [0485] -胆汁酸类包括奥贝胆酸 (OCA) 和UDCA、正熊去氧胆酸和熊二醇；
- [0486] -生物活性脂类如5-羟基二十碳五烯酸 (15-HEPE、DS-102)、不饱和脂肪酸例如25花生四烯酸、二十碳五乙酯、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸；
- [0487] -大麻素CB1受体拮抗剂如GRC-10801、MRI-1569、MRI-1867、DBPR-211、AM-6527、AM-6545、NESS-11-SM、CXB-029、GCC-2680、TM-38837、Org-50189、PF-514273、BMS-812204、ZYO-1、AZD-2207、AZD-1175、奥替那班、伊必那班、溴乙那班、利莫那班、屈那班、SLV-326、V-24343和O-2093；
- [0488] -大麻素CB2受体模拟物如anabasum (Resunab、JKT-101)；
- [0489] -双重大麻素CB1受体/iNOS抑制剂；
- [0490] -半胱天冬酶抑制剂如恩利卡生、belnacasan、nivocasan、IDN-7314、F-573、VX-166、YJP-60107、MX-1122、IDN-6734、TLC-144、SB-234470、IDN-1965、VX-799、SDZ-220-976和L-709049；
- [0491] -组织蛋白酶抑制剂如VBY-376、VBY-825、VBY-036、VBY-129、VBY-285、Org-219517、LY3000328、RG-7236和BF/PC-18；

[0492] -CCR拮抗剂如cenicriviroc (CCR2/5拮抗剂)、PG-092、RAP-310、INCB-10820、RAP-103、PF-04634817和CCX-872;

[0493] -CCR3趋化因子调节物和嗜酸性粒细胞趋化因子2配体抑制剂;

[0494] -二酰基甘油-0-酰基转移酶 (DGAT) 抑制剂如以前被称为ISIS-DGAT2Rx的IONIS-DGAT2Rx、ISIS 703802、LY-3202328、BH-03004、KR-69530、OT-13540、AZD-7687、PF-06865571、PF-06424439和ABT-046;

[0495] -二肽基肽酶IV (DPP4) 抑制剂依格列汀、维格列汀、福格列汀、阿格列汀、沙格列汀、tilogliptin、阿拉格列汀、西他列汀、瑞格列汀、美格列汀、戈格列汀、曲格列汀、替格列汀、杜格列汀、利格列汀、吉格列汀、yogliptin、betagliptin、imigliptin、奥格列汀、维达列汀和地格列汀;

[0496] -胰岛素配体和胰岛素受体激动剂;

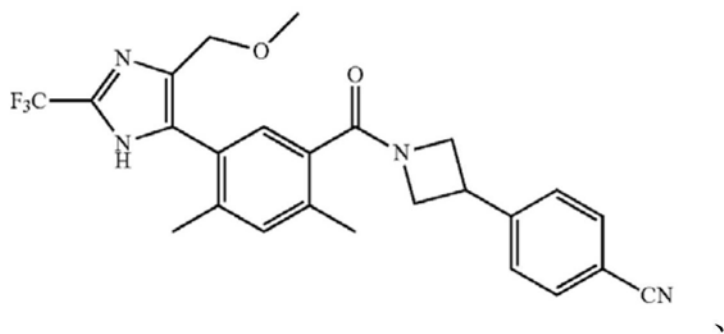
[0497] -胰岛素敏化剂和MCH受体-1拮抗剂;

[0498] -NOX (NADPH氧化酶) 抑制剂如双重NOX (NADPH氧化酶) 1&4抑制剂、以前被称为GKT137831的GKT-831 (2-(2-氯苯基)-4-[3-(二甲基氨基) 苯基]-5-甲基-1H-吡啶并[4,3-c]吡啶-3,6 (2H,5H)-二酮) 和GKT-901;

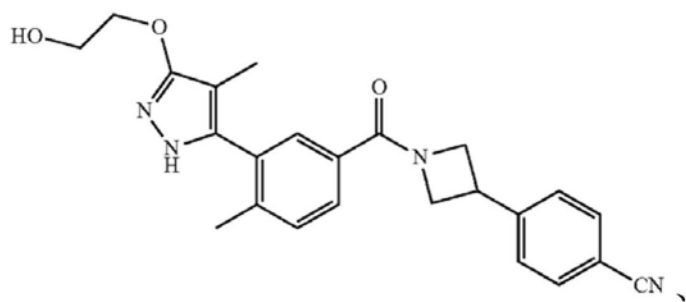
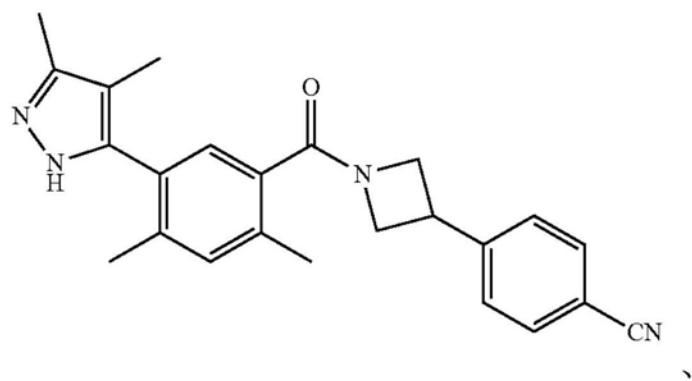
[0499] -细胞外基质蛋白调节剂如CNX-024、CNX-025和SB-030;

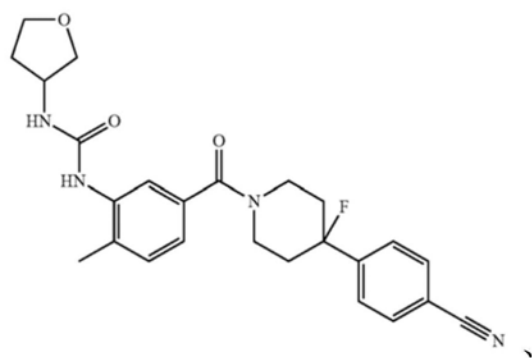
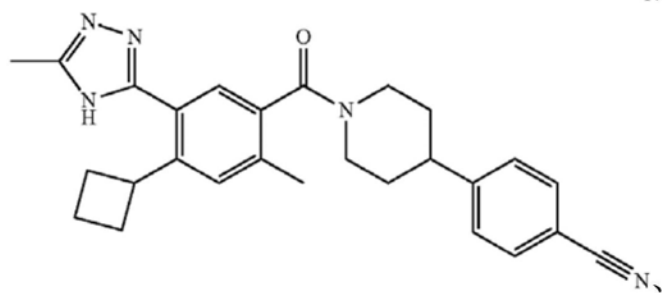
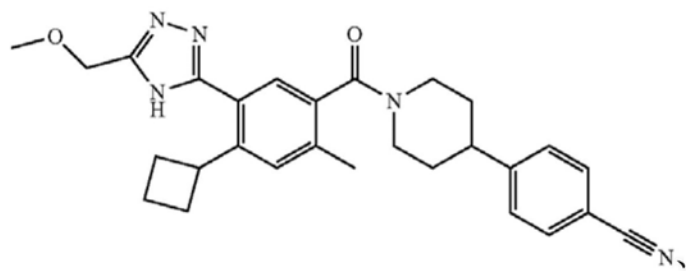
[0500] -脂肪酸合酶 (FAS) 抑制剂如TVB-2640、TVB-3664、TVB-3166、TVB-3150、TVB-3199、TVB-3693、BZL-101、2-十八碳炔酸、MDX-2、Fasnall、MT-061、G28UCM、MG-28、HS-160、GSK-2194069、KD-023和西洛他唑。

[0501] 在特定实施方式中,所述FAS抑制剂是选自下面的化合物列表的化合物:

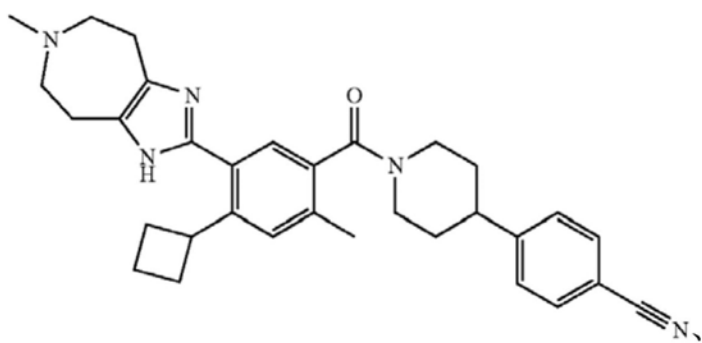
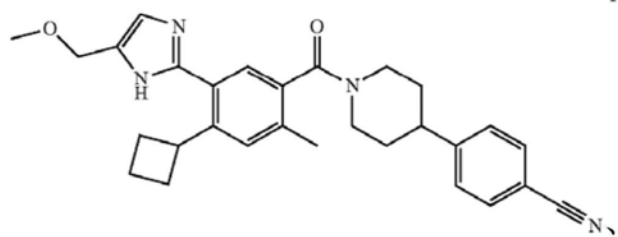
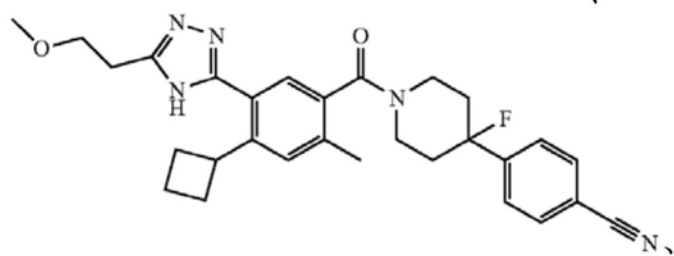


[0502]

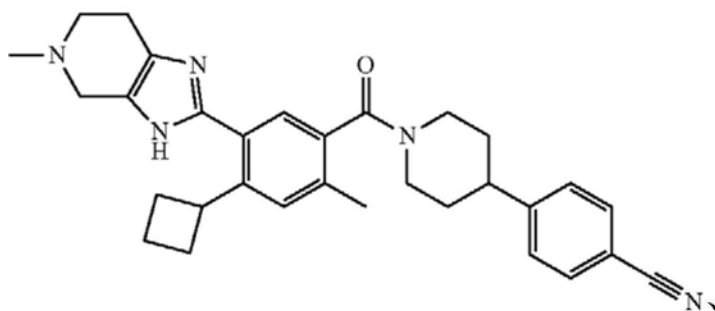




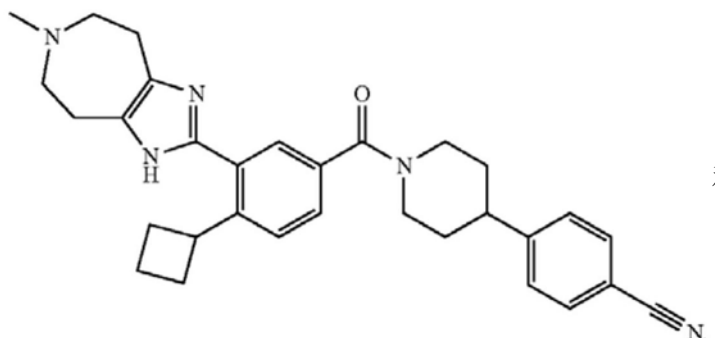
[0503]



[0504]



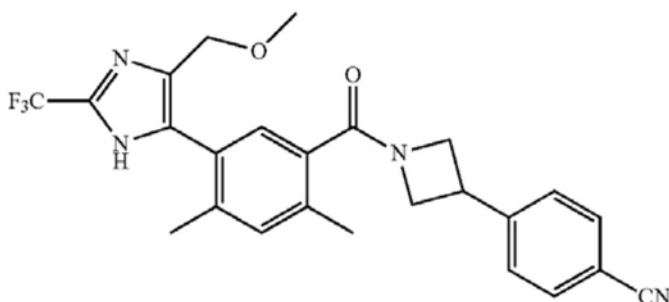
[0505]



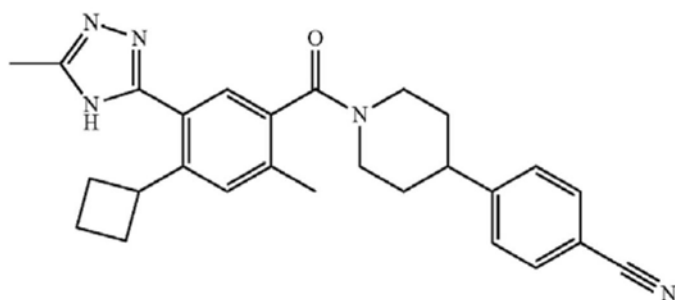
和TVB-2640。

[0506] 在另一个特定实施方式中,所述FAS抑制剂选自:

[0507]



[0508]



和TVB-2640。

[0509] 在特定实施方式中,所述FAS抑制剂是TVB-2640。

[0510] -脂肪酸如 $\omega$ -3脂肪酸、Omacor或MF4637、鱼油、多不饱和脂肪酸(efamax、optiEPA)；

[0511] -硬脂酰CoA去饱和酶-1抑制剂/脂肪酸胆汁酸偶联物(FABAC)；

[0512] -法尼醇X受体(FXR)激动剂、奥贝胆酸(OCA)、GS-9674、LJN-452、EDP-305、AKN-083、INT-767、GNF-5120、LY2562175、INV-33、NTX-023-1、EP-024297、Px-103、SR-45023；

[0513] -成纤维细胞生长因子19(FGF-19)受体配体或FGF-19的有功能的工程化变体；

[0514] -成纤维细胞生长因子19(FGF-19)重组体如NGM-282；

[0515] -成纤维细胞生长因子21(FGF-21)激动剂如以前被称为BMS-986036的PEG-FGF21、YH-25348、BMS-986171、YH-25723、LY-3025876和NNC-0194-0499；

- [0516] -半乳凝素3抑制剂如GR-MD-02、TD-139、ANG-4021、Galectin-3C、LJPC-201、TFD-100、GR-MD-03、GR-MD-04、GM-MD-01、GM-CT-01、GM-CT-02、Gal-100和Gal-200；
- [0517] -胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物如索马鲁肽、利拉鲁肽、艾塞那肽、阿必鲁肽、度拉糖肽、利西拉肽、洛塞那肽、efpeglenatide、taspoglutide、MKC-253、DLP-205和ORMD-0901；
- [0518] -胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂如LY-3305677和长效胃泌酸调节素；
- [0519] -G-蛋白偶联受体 (GPCR) 调节剂如CNX-023；
- [0520] -G-蛋白偶联受体84拮抗剂 (GPR84拮抗剂)、结缔组织生长因子配体抑制剂和游离脂肪酸受体1激动剂 (FFAR1激动剂) 如PBI-4050、PBI-4265、PBI-4283和PBI-4299；
- [0521] -生长激素；
- [0522] -刺猬细胞信号传导途径抑制剂如Vismodegib、TAK-441、IPI-926、Saridegib、索尼德吉/Erismodegib、BMS-833923/XL139、PF-04449913、Taladegib/LY2940680、ETS-2400、SHR-1539和CUR61414；
- [0523] -回肠胆汁酸钠共转运蛋白抑制剂如A-4250、GSK-2330672、volixibat、CJ-14199和elobixibat；
- [0524] -免疫调节剂如PBI-4050、PBI-4265、PBI-4283、PBI-4299和AIC-649；
- [0525] -胰岛素敏化剂和MCH受体-1拮抗剂如MSDC-0602k、MSDC-0602、CSTI-100和AMRI；
- [0526] -整合蛋白抑制剂：Pliant Therapeutic的整合蛋白抑制剂，IndaloTherapeutics的整合蛋白抑制剂，St Louis University的整合蛋白抑制剂，ProAgio和GSK-3008348；
- [0527] -己酮糖激酶抑制剂如JNJ-28165722、JNJ-42065426、JNJ-42152981、JNJ-42740815、JNJ-42740828和PF-06835919；
- [0528] -白三烯 (LT) /磷酸二酯酶 (PDE) /脂氧合酶 (LO) 抑制剂如tipelukast (以前被称为MN-001)、托鲁司特、硫鲁司特、masilukast、扎鲁司特、普鲁司特、孟鲁司特、gemilukast、维鲁司特、aklukast、pobilikast、西那司特和伊拉司特；
- [0529] -赖氨酰氧化酶同源物2抑制剂如Rappaport、InterMune、Pharmaxis、AB-0023、Simtuzumab、PXS-5382A和PXS-5338；
- [0530] -大环内酯类如索利霉素、阿奇霉素和红霉素；
- [0531] -巨噬细胞甘露糖受体调节剂如AB-0023、MT-1001、[18F]FB18mHSA、Xemys、锝Tc 99m tilmanocept和CDX-1307；
- [0532] -甲基CpG结合蛋白2调节剂和转谷氨酰胺酶抑制剂，包括但不限于半胱胺、EC半胱胺、肠溶包衣重酒石酸半胱胺、Bennu的重酒石酸半胱胺 (肠溶包衣)、Raptor的重酒石酸半胱胺 (肠溶包衣)、重酒石酸半胱胺、DR半胱胺、延迟释放的肠溶包衣重酒石酸半胱胺、巯基乙胺、Bennu的巯基乙胺 (肠溶包衣)、Raptor的巯基乙胺 (肠溶包衣)、RP-103、RP-104、PROCYSBI和巯基乙胺 (肠溶包衣)；
- [0533] -miRNA拮抗剂如以前被称为AZD4076的RG-125、RGLS-5040、RG-101、MGN-5804和MRG-201；
- [0534] -金属蛋白酶-9 (MMP9) 刺激剂如Elastomic Ab的MMP9刺激剂；
- [0535] -线粒体载体蛋白家族抑制剂和线粒体磷酸载体蛋白抑制剂包括但不限于TRO-19622、Trophos、奥利索西、RG-6083或RO-7090919；

- [0536] -髓过氧化物酶抑制剂包括但不限于PF-06667272;
- [0537] -单克隆抗体如柏替木单抗、NGM-313、靶向IL-20的mAb、以前被称为GC1008的fresolimumab(抗TGFβ抗体)、以前被称为BTT-1023的timolumab、namacizumab、奥马珠单抗、雷珠单抗、贝伐单抗、lebrikizumab、依帕珠单抗、felvizumab、马妥珠单抗、monalizumab、瑞利珠单抗、foralumab(NI-0401、抗CD3抗体)、sintizumab(GS-6624)、针对LOXL2的mAb、优特克单抗、抗TNF抗体和inebilizumab;
- [0538] -单克隆抗体如抗IL20 mAb、抗TGFβ抗体、抗CD3抗体、抗LOXL2抗体和抗TNF抗体;
- [0539] -NAD依赖性脱乙酰酶sirtuin刺激剂,PDE 5抑制剂如NS-0200;
- [0540] -NF-κB抑制剂如LC-280126;
- [0541] -烟酸如尼克酸或维生素B3;
- [0542] -烟酸受体(GPR109)激动剂如ARI-3037MO、MMF、LUF 6283、阿昔吠喃、IBC 293、MK-1903、GSK256073、MK-6892、MK-0354、SLx-4090、洛美他派、lexibulin、apabetalone、阿昔吠喃、拉罗皮兰、达珀利奈、安塞曲匹、INCB-19602、ST-07-02、洛美沙星、尼克酸和受控释放/拉罗皮兰;
- [0543] -非甾类消炎药(NSAID)包括但不限于F-351、水杨酸酯(阿司匹林)、对乙酰氨基酚、丙酸衍生物(布洛芬、萘普生)、乙酸衍生物(吲哚美辛、双氯芬酸)、烯醇酸衍生物(吡罗昔康、保泰松)、邻氨基苯甲酸衍生物(甲氯芬酸、氟芬那酸)、选择性COX-2抑制剂(塞来昔布、帕瑞昔布)和磺酰苯胺类(尼美舒利);
- [0544] -mTOR调节剂如MSDC-0602和与SVP-西罗莫司共同施用的AAV基因疗法;
- [0545] -核受体配体如以前被称为DV 928的DUR-928;
- [0546] -P2Y13蛋白激动剂如CER-209;
- [0547] -PDGFR调节剂如BOT-501和BOT-191;
- [0548] -苯丙氨酸羟化酶刺激剂如Pegvaliase、沙丙蝶呤、AAV-PAH、CDX-6114、墨蝶呤、RMN-168、ALTU-236、ETX-101、HepaStem、咯利普兰和前列地尔;
- [0549] -蛋白酶活化受体(PAR)-2拮抗剂如PZ-235和NP-003;
- [0550] -蛋白激酶调节剂如CNX-014、MB-11055、ALF-1、芒果苷、氨来咕诺、GS-444217、REG-101和缬氨酸;
- [0551] -PPARα激动剂如非诺贝特、环丙贝特、pemafibrate、吉非罗齐、氯贝丁酯、比尼贝特、克利贝特、氯贝酸、尼可贝特、吡贝特、普拉贝脉、罗尼贝特、theofibrate、托考贝特和SR10171;
- [0552] -PPARγ激动剂如吡格列酮、氘化吡格列酮、罗格列酮、efatutazone、ATx08-001、OMS-405、CHS-131、THR-0921、SER-150-DN、KDT-501、GED-0507-34-Levo、CLC-3001和ALL-4;
- [0553] -PPARδ激动剂如GW501516(Endurabol或({4-[(4-甲基-2-[4-(三氟甲基)苯基]-1,3-噻唑-5-基]甲基)硫烷基]-2-甲基苯氧基}乙酸))、MBX8025(Seladelpar或{2-甲基-4-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-2H-[1,2,3]三唑-4-基甲基硫烷基]-苯氧基}-乙酸)、GW0742([4-[[[2-[3-氟-4-(三氟甲基)苯基]-4-甲基-5-噻唑基]甲基]硫基]-2-甲基苯氧基]乙酸)、L165041、HPP-593和NCP-1046;
- [0554] -PPARα/γ激动剂(也被称为格列扎类)如Saroglitazar、阿格列扎、莫格列扎、Tesaglitazar、DSP-8658;

- [0555] -PPAR $\alpha$ / $\delta$ 激动剂如Elafibranor和T913659;
- [0556] -PPAR  $\gamma$  / $\delta$ 激动剂如共轭亚油酸 (CLA)、T3D-959;
- [0557] -PPAR $\alpha$ /  $\gamma$  / $\delta$ 激动剂或PPAR泛激动剂如IVA337 (Lanifibranor)、TTA (十四烷基硫代乙酸)、补骨脂二氢黄酮甲醚、GW4148、GW9135、苯扎贝特、Lobeglitazone和CS038;
- [0558] -益生元纤维、益生菌;
- [0559] -孕烷X受体如利福平;
- [0560] -Rho相关蛋白激酶2 (ROCK2) 抑制剂如KD-025、TRX-101、BA-1049、LYC-53976、INS-117548和RKI-1447;
- [0561] -信号调控激酶1 (ASK1) 抑制剂如GS-4997;
- [0562] -钠-葡萄糖转运 (SGLT) 1抑制剂如LX-4212/LX-4211/sotagliflozin、SAR-439954、LIK-066 (Licogliflozin)、LX-2761、GSK-161235、LP-925219、KGA-2727、SAR-7226、SAR-474832、SY-008和AVX-3030;
- [0563] -钠-葡萄糖转运 (SGLT) 2抑制剂如remogliflozin、达格列净、恩格列净、埃格列净、sotagliflozin、伊格列净、tianagliflozin、坎格列净、托格列净、janagliflozin、bexagliflozin、鲁格列净、舍格列净、HEC-44616、AST-1935和PLD-101;
- [0564] -他汀类药物如阿托伐他汀或辛伐他汀;
- [0565] -硬脂酰CoA去饱和酶-1抑制剂/脂肪酸胆汁酸偶联物如aramchol、GRC-9332、steamchol、TSN-2998、GSK-1940029和XEN-801;
- [0566] -甲状腺受体 $\beta$  (THR $\beta$ ) 激动剂如VK-2809、MGL-3196、MGL-3745、SKL-14763、sobetirome、BCT-304、ZYT-1、MB-07811和伊罗替罗;
- [0567] -Toll样受体2和4 (TLR-2) 拮抗剂如也被称为VB-201的CI-201;
- [0568] -Toll样受体4 (TLR-4) 拮抗剂如纳曲酮、JKB-121、M-62812、瑞沙托维、dendrophilin、CS-4771、AyuV-1、AyuV-25、NI-0101、EDA-HPVE7和eritoran;
- [0569] -I型自然杀伤T细胞抑制剂如GRI-0621;
- [0570] -酪氨酸激酶受体 (RTK) 调节剂如CNX-025、KBP-7018、尼达尼布和索拉非尼;
- [0571] -尿酸盐阴离子交换剂1抑制剂和黄嘌呤氧化酶抑制剂如雷西奈德、RLBN-1001、verinurad、KUX-1151和雷西奈德+别嘌呤醇。
- [0572] -血管黏附蛋白-1 (VAP-1) 抑制剂也被称为含铜胺氧化酶2 (AOC3) 如以前被称为PXS-4728A的BI-1467335、CP-664511、PRX-167700、ASP-8232、RTU-1096、RTU-007和BTT-1023;
- [0573] -维生素D受体 (VDR) 激动剂如钙化醇、阿法骨化醇、1,25-二羟基维生素D3、维生素D2、维生素D3、骨化三醇、维生素D4、维生素D5、双氢速甾醇、钙泊三醇、他卡西醇、1,24-二羟基维生素D3和帕立骨化醇;
- [0574] -维生素E和异构体、维生素E与维生素C结合和阿托伐他汀。
- [0575] 其他抗NASH药剂包括KB-GE-001和NGM-386和NGM-395和NC-10以及TCM-606F,其他抗NASH药剂包括icosabutate、NC-101、NAIA-101考来维仑和PRC-4016。其他抗纤维化药剂包括HEC-585、INV-240、RNAi治疗剂 (Silence Therapeutics) 和SAMiRNA程序 (Bioneer Corp)。
- [0576] 其他说明性抗纤维化药剂包括吡非尼酮或受体酪氨酸激酶抑制剂 (RTKI) 例如尼

达尼布、索拉非尼和其他RTKI,或血管紧张素II (AT1) 受体阻断剂,或CTGF抑制剂,或容易干扰TGFβ和BMP激活的途径的任何抗纤维化化合物,包括潜在TGFβ复合体的激活剂例如MMP2、MMP9、THBS1或细胞表面整合蛋白,TGFβ受体I型 (TGFβRI) 或II型 (TGFβRII) 和它们的配体例如TGFβ、激活素、抑制素、Nodal、抗苗勒管激素、GDF或BMP,辅助受体(也被称为III型受体),或SMAD依赖性经典途径的组分包括调节性或抑制性SMAD蛋白,或SMAD不依赖性或非经典途径包括MAPK信号传导的各种不同分支、TAK1、Rho样GTP酶信号传导途径、磷脂酰肌醇-3激酶/AKT途径、TGFβ诱导的EMT过程或经典和非经典刺猬信号传导途径的成员包括Hh配体或靶基因,或WNT或容易影响TGFβ的Notch途径的任何成员。

[0577] 在特定实施方式中,NASH或肝纤维化的治疗包括施用选自下述的式(I)的化合物: 1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-异丙氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-三氟甲基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-三氟甲基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-三氟甲氧基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-叔丁氧基羰基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,1-[4-三氟甲氧基苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮,2-[2,6-二甲基-4-[3-[4-(甲硫基)苯基]-3-氧代-丙基]苯氧基]-2-甲基丙酸和2-[2,6-二甲基-4-[3-[4-(甲硫基)苯基]-3-氧代-丙基]苯氧基]-2-甲基-丙酸异丙酯,或其可药用盐。在本发明的其他特定实施方式中,所述式(I)的化合物是1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮或其可药用盐。

[0578] 具体来说,本发明涉及一种组合产品,其至少包含抗NAFLD和/或抗NASH和/或抗纤维化药剂,用于在需要的对象中治疗NAFLD、NASH、活跃NASH和/或肝纤维化的方法中,其中所述对象由于根据本发明的方法而被分类为所述治疗的接受者。

[0579] 在更特定实施方式中,本发明涉及NAFLD、NASH、活跃NASH和/或肝纤维化的治疗,所述治疗使用包含选自抗NAFLD、抗NASH和/或抗纤维化化合物或其可药用盐的至少一种药剂的组合产品。

[0580] 在更特定实施方式中,本发明涉及使用Elafibranor治疗NAFLD、NASH、活跃NASH和/或肝纤维化。

[0581] 在其他实施方式中,NASH或肝纤维化的治疗包括施用维生素E或吡格列酮、奥贝胆酸、elafibranor、selonsertib、saroglitazar和/或cenicrivoc。

[0582] 考虑到micro-RNA在基因表达的调节中的作用,由本发明人获得的结果也支持miR-193在NAFLD、NASH和/或肝纤维化的发生和演变中的病理生理作用。

[0583] 因此,本发明的方法可用于在miR-193的循环水平的基础上鉴定具有NAFLD、NASH和/或肝纤维化的对象的特定子群体。这些子群体可能具有miR-193依赖性疾病,使得这些患者对直接(miR-193模拟物或抗miR-193抗体)或间接作用于miR-193依赖性途径的特定药物具有响应性。

[0584] 此外,在另一方面,从这一观察,本发明涉及一种miR-193抑制剂化合物,其用于在需要的对象中治疗NAFLD、NASH或肝纤维化。

[0585] 当在本文中使用时,术语“miR-193抑制剂化合物”及其类似语是指能够阻止miR-

193、特别是hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p或hsa-miR-193b-5p的作用的任何化合物，例如核酸化合物。在特定实施方式中，本发明的miR-193抑制剂化合物是例如通过结合到miR-193而抑制或降低miR-193的活性或抑制miR-193表达的化合物。术语“抑制miR-193表达”意味着在用所述抑制性化合物治疗后肝脏或肝细胞中miR-193的生产小于在治疗之前产生的量。本领域技术人员可以使用例如用于确定miRNA转录本水平的技术，容易地确定肝脏或肝细胞中miR-193表达是否已被抑制。

[0586] 适合的miR-193抑制剂化合物包括双链RNA（例如短或小干扰RNA或“siRNA”）、antagomir、反义核酸和酶RNA分子例如核酶。每种这些化合物可以被靶向到给定miRNA，并破坏靶miRNA或诱导靶miRNA的破坏。例如，给定miRNA的表达，可以通过用与所述miRNA的至少一部分、优选地整个所述miRNA具有至少90%、例如95%、98%、99%或100%序列同源性的分离的双链RNA（“dsRNA”）分子诱导所述miRNA的RNA干扰来抑制。在优选实施方式中，所述dsRNA分子是siRNA。可用于本方法的siRNA包含长度为约17个核苷酸至约29个核苷酸、优选地长度为约19至约25个核苷酸的短的双链RNA。所述siRNA包含通过标准的Watson-Crick碱基配对相互作用退火在一起的（在后文中被称为“碱基配对的”）正义RNA链和互补的反义RNA链。所述正义链包含与靶miRNA内含有的核酸序列基本上一致的核酸序列。

#### [0587] 试剂盒

[0588] 根据其他方面，本发明涉及一种试剂盒，其包含用于确定下述物质的水平的工具：

[0589] (i) 体液样品中的miR-193，和任选地

[0590] (ii) 肝损伤的至少一种其他循环标志物。

[0591] 根据另一方面，本发明还涉及一种试剂盒，其包含用于确定下述物质的水平的工具：

[0592] (i) 体液样品中的miR-193，和任选地

[0593] (ii) NAFLD、NASH或肝纤维化的至少一种其他标志物。

[0594] 本发明的试剂盒可用于实行上文描述的方法。它还可以任选地包括用于实行所述方法的说明书。所述试剂盒可以包含适用于进行miR-193和如上所提供的肝损伤的任何其他循环标志物的水平的测量的试剂和缓冲液。具体来说，所述试剂盒可以包含对待定量的蛋白质特异的抗体和/或有用的引物。在更特定实施方式中，所述试剂盒可以包含本领域中公知的用于定量micro-RNA水平的引物和/或探针。

[0595] 所述试剂盒可以包含适合于进行miR-193和NAFLD和/或NASH的任何其他标志物的水平的测量的试剂和缓冲液。

[0596] 本发明还涉及一种试剂盒，其包含用于确定下述物质的水平的工具：

[0597] -选自hsa-miR-193（特别是hsa-miR-193b、更特别是miR-193b-3p）的至少一种标志物，和选自下述的至少一种其他、优选地所有标志物：

[0598] -TIMP-1；

[0599] -YKL-40；

[0600] -血小板计数；和

[0601] -代谢综合征评分。

[0602] 本发明还涉及一种试剂盒，其包含用于确定下述物质的水平的工具：

[0603] -选自hsa-miR-193（特别是hsa-miR-193b、更特别是miR-193b-3p）的至少一种标

志物,和选自下述的至少一种其他、优选地所有标志物:

[0604] -YKL-40;

[0605] -TIMP-1;

[0606] -HbA1c;

[0607] -透明质酸;和

[0608] -血小板计数。

[0609] 本发明还涉及一种试剂盒,其包含用于确定下述物质的水平的工具:

[0610] -选自hsa-miR-193 (特别是hsa-miR-193b、更特别是miR-193b-3p) 的至少一种标志物,和选自下述的至少一种其他、优选地所有标志物:

[0611] -YKL-40;

[0612] -TIMP-1;

[0613] -HbA1c;

[0614] -透明质酸;和

[0615] -血小板计数。

[0616] 在优选实施方式中,所述试剂盒包含用于确定miR-193b-3p的水平工具。

[0617] 本发明的试剂盒可用于实行上述方法,并且还可以任选地包括用于实行所述方法的说明书。所述试剂盒可以包含适用于进行上文鉴定的标志物的水平的测量的试剂和缓冲液。具体来说,正如本领域中公知的,所述试剂盒可以包含对待定量的蛋白质特异的抗体和/或可用于定量micro-RNA水平的引物。

[0618] 应该理解,上面的描述以及后文的实施例打算说明而不是限制本发明的范围。对于本发明所属领域的技术人员来说,在本发明的范围之内的其他方面、优点和修改将是显而易见的。

## 实施例

[0619] 材料和方法

[0620] A. 临床样品

[0621] 所述临床试验(NASH中的2期GOLDEN-505试验(GFT505-212-7-NCT01694849))是一项多中心随机双盲安慰剂对照研究,用于在患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的患者中评估每日一次Elafibranor(1-[4-甲基硫苯基]-3-[3,5-二甲基-4-羧基二甲基甲氧基苯基]丙-2-烯-1-酮)对脂肪性肝炎的功效和安全性。进行肝组织活检以在适当排除其他病因的肝脏疾病后确认NASH的诊断。NASH被诊断为在随机分组之前6个月内通过肝组织活检评估的脂肪性肝炎。脂肪性肝炎的确认是基于肝活检组织的集中解读。NASH患者被定义为具有NAS $\geq$ 3,包括脂肪变性评分 $\geq$ 1,肝细胞膨胀 $\geq$ 1和小叶炎症 $\geq$ 1。

[0622] 所述研究在每个参与中心得到适合的管理机构批准,并且所有患者提供参与医学研究的同意书。

[0623] 在这个生物标志物研究中使用的血液样品从GOLDEN-DIAG研究的患者在入选时(270个样品)和一年后(223个样品)抽取。

[0624] 本发明人也有权使用来自于UZA Biobank的OBESE组群的对象的人类血液样品以及肝活检组织和相关的临床和生物学数据。该组群由病态肥胖症患者构成,也包含NAFLD/

非NASH患者、NASH患者、肝硬化患者和健康对照。对253位患者的血清进行处理,用于分别使用下一代测序(NGS)技术和RT-qPCR验证在GOLDEN-DIAG研究中鉴定到的候选循环miRNA。

[0625] 对于GOLDEN和OBESE两个组群来说,从每位患者获得另外样品的收集、储存和使用的书面同意书。

[0626] 本发明人也有权使用来自于RESOLVE-IT研究的对象的人类血液样品以及肝活检组织和相关的临床和生物学数据。RESOLVE-IT是一项多中心随机双盲安慰剂对照的III期研究(NCT02704403),用于在患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和纤维化的患者中评估Elafibranor的功效和安全性。所述研究得到适合的管理结构批准,所有患者提供了参与的书面同意书。入选时的肝组织活检用于组织学病损的检查和评分。血液样品在筛查时抽取。在签署了专门书面同意书的患者中收集了另外的血液样品,用于研究NASH的新的诊断生物标志物。

[0627] 对RESOLVE-IT研究的370位患者在筛查时的血清和263份相应的肝活检组织进行处理,用于使用HTG Edge序列分析鉴定循环miRNA。

[0628] 对RESOLVE-IT研究的370位患者在筛查时的血清和263份相应的肝活检组织进行处理,用于使用HTG Edge序列分析和RTqPCR分析验证在GOLDEN-DIAG研究中鉴定到的候选循环miRNA。

[0629] 对来自于EFS(Etablissement **Français** du Sang)的100位对象的血清进行处理,用于使用HTG Edge序列分析和RT-qPCR分析评估健康人中的候选循环miRNA水平。

[0630] 将血清样品用于NGS和qPCR分析。

[0631] 血液取样和实验室测试

[0632] 血液样品按照中心实验室流程(Central Laboratory Protocol)和Genfit手册-GFT505-212-7来收集。

[0633] 根据研究方案,进行了下述分析。

[0634] 血液学包括血红蛋白、血细胞比容、RBC计数、白细胞、差异白细胞计数(嗜中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞,绝对值和百分数值)、血小板计数和网织红细胞。

[0635] I组生物化学包括血浆葡萄糖、甘油三酯(TG)、肌酐、肌酐清除率、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶(GGT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、肌酸磷酸激酶(CPK)、碱性磷酸酶、促甲状腺激素(TSH)和HbA1c。

[0636] II组生物化学包括血浆葡萄糖、肌酐、肌酐清除率、总蛋白、白蛋白、钠、钾、氯、钙、尿酸、表示为血液尿素氮(BUN)的尿素、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶(GGT)、碱性磷酸酶、肌酸磷酸激酶(CPK)、总胆红素、偶联的胆红素、C-反应蛋白(hsCRP)、AST/ALT比率和HbA1c。

[0637] 尿液分析包括:

[0638] -试纸条分析(比重、pH、RBC、白细胞、葡萄糖、蛋白质、酮类、胆红素、尿胆素原和硝酸盐);

[0639] -显微术分析包括RBC、WBC、脱落物、晶体、细菌、上皮细胞和酵母;

[0640] -化学分析(白蛋白和肌酐)。

[0641] 血清学包括HIV ab I/II、HCV ab、HCV RNA(仅在收到HCV RNA访视样品后和在HCV

Ab结果为“反应性”或“不确定”的情况下测试)和HbsAg。

[0642] 脂类组包括甘油三酯(TG)、总胆固醇、非HDL-C(计算)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)(计算)、计算的极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)(计算)、载脂蛋白AI(ApoAI)和载脂蛋白B(ApoB)。

[0643] 尿液化学包括 $\alpha$ -1-微球蛋白、 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶( $\beta$ -NAG)和嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(N-Gal)。

[0644] 安全性标志物包括高半胱氨酸、NT-ProBNP、肌钙蛋白T、胰抑素C和 $\beta$ 2-微球蛋白。

[0645] 血糖和其他脂类参数包括瘦蛋白、胰岛素、内稳态模型评估(HOMA-IR)、血清葡萄糖(用于计算HOMA-IR)、果糖胺、C-肽和游离脂肪酸(FFA)。

[0646] 炎性标志物包括结合珠蛋白、血纤蛋白原、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素6(IL-6)和纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)Ag(柠檬酸盐)。

[0647] 肝脏标志物包括细胞角蛋白-18(CK18)(M65&M30)、adinopectin、铁蛋白、 $\alpha$ 2巨球蛋白、FGF19&FGF21、透明质酸(Advia centaur,由Siemens Belgium生产并由Genfit分装销售的试剂)、III型胶原蛋白的N-端前肽(PIIINP)(Advia centaur,由Siemens Belgium生产的试剂)和基质金属蛋白酶-1的组织抑制剂(TIMP-1)(Advia centaur,由Siemens生产的试剂)。

[0648] 用于每种生物化学测定法的方法、仪器和制造商的名单报告在下表中：

[0649]

| 参数           | 方法                | 仪器             | 制造商               |
|--------------|-------------------|----------------|-------------------|
| 瘦蛋白          | ELISA             | 手动             | R&D systems       |
| 胰岛素          | CLIA              | Immulite 2000  | Siemens           |
| HOMA-IR      | 使用葡萄糖和胰岛素计算       |                |                   |
| 果糖胺          | 比色法               | Modular P800   | Roche Diagnostics |
| c-Peptide    | CLIA              | Immulite 2000  | Siemens           |
| 结合珠蛋白        | 免疫比浊法             | Modular P800   | Roche Diagnostics |
| 血纤蛋白原        | Clauss 方法         | STAR-evolution | Stago             |
| TNF $\alpha$ | fluorokine 多分析物剖析 | Luminex        | Millipore         |

[0650]

|                 |                       |               |                       |
|-----------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| IL-6            | fluorokine 多分析物<br>剖析 | Luminex       | Millipore             |
| PAI-1 Ag        | ELISA                 | 手动            | Stago                 |
| FFA             | ACS-ACOD              | Modular P800  | Roche<br>Diagnostics  |
| CK18 M30        | ELISA                 | 手动            | Peviva                |
| CK18 M65        | ELISA                 | 手动            | Peviva                |
| 脂联素             | ELISA                 | 手动            | Millipore             |
| 铁蛋白             | ECLIA                 | Modular E170  | Roche<br>Diagnostics  |
| $\alpha 2$ 巨球蛋白 | 浊度测定法                 | BN II         | Siemens               |
| 透明质酸            | 免疫测定法                 | Advia centaur | Siemens               |
| PIIINP          | 免疫测定法                 | Advia centaur | Siemens               |
| TIMP-1          | 免疫测定法                 | Advia centaur | Siemens               |
| FGF-19          | ELISA                 | 手动            | R&D systems           |
| FGF-21          | ELISA                 | 手动            | R&D systems           |
| 内脂素             | ELISA                 | 手动            | Alpco<br>immunoassays |
| 抵抗素             | ELISA                 | 手动            | R&D systems           |

|                    |                                                                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| YKL-40 、<br>CHI3L1 | 人几丁质酶 3-样 1 免疫测定法<br>Quantikine® ELISA<br>目录号 DC3L10<br>用于定量确定细胞培养上清液、血清、血浆和尿液中人<br>几丁质酶 3-样 1 (CHI3L1) 的浓度。 |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0651] 样品收集和储存

[0652] 在这项生物标志物研究中使用的血液样品在研究期之前从505.212.7研究的患者抽取。从每位患者获得用于另外样品的收集、储存和使用的书面正式同意书。

[0653] 对收集在含有柠檬酸盐的2.7mL试管中的血液进行处理,在收集后15分钟内通过以1,500xg离心15分钟将无细胞血浆与血细胞分离开。将上清液血浆转移到新的试管。将试管保持在-70℃。

[0654] 为了进行RNA提取,然后将血浆管以13,000xg离心2min以沉积并移除血细胞。将上清液无血小板血浆转移到新的试管,在液氮中冷冻并储存在-80℃。

[0655] 在取样后1小时对收集在8.5mL血清分离管(SST)中的血液进行处理,通过在1,300xg至2,000xg之间离心10分钟将无细胞血清与血细胞分离开。然后将血清转移到新的试管。将试管保持在-70℃。不需另外离心即可进行RNA提取。

#### [0656] B. 下一代测序

[0657] 将HTG Edge测序系统用于血清样品中包含的miRNA的测序。

[0658] 使用HTG全转录组miRNA (WTA) 试剂盒。文库制备和测序按照制造商的推荐来进行。对于每个样品,产生每个样品平均931,000个读出数据。将数据按照制造商的推荐归一化,以通过调整读出数据数目在不同样品之间进行直接比较。

[0659] 一种R/Bioconductor软件包Limma可用于HTG Edge测序分析的差异分析。

#### [0660] C. 血清中miRNA的定量RTqPCR

[0661] 保留有miRNA的血清总RNA通过miRvanaParis提取试剂盒 (AM1556, Ambion), 按照制造商的说明书从100μl血清提取。在RNA提取之前向样品添加合成的掺入秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) miR-39[3,125fmoles] (MSY0000010, Qiagen), 作为RNA提取过程的内部对照。洗脱在100μl洗脱缓冲液中进行。

[0662] 成熟miRNA的表达使用Taqman miRNA qRT-PCR测定法,按照制造商的说明书来检测:TaqMan MicroRNA反转录试剂盒 (Ref:4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, CA), TaqMan MicroRNA测定体系20X (Ref:4440887, Applied Biosystems) 和TaqMan Universal Master Mix II (Ref:4440040, Applied Biosystems)。

[0663] 反转录使用 **GeneAmp®** PCR System 9700热循环仪 (Ref:200005, Applied Biosystems) 来进行。所述反转录使用4种miRNA特异性反向引物多路进行。

[0664] 定量PCR使用CFX96™实时系统 (C1000 Touch™热循环仪, BioRad) 来进行。

[0665] 感兴趣的miRNA的序列和Taq Man测定体系ID报告在下表中:

| miRNA ID        | 序列                                       | miRbase 编号   | 测定系统 ID |
|-----------------|------------------------------------------|--------------|---------|
| hsa-miR-193a-3p | AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU<br>(SEQ ID NO: 1) | MIMAT0000459 | 002250  |
| hsa-miR-193a-5p | UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA<br>(SEQ ID NO: 2) | MIMAT0004614 | 002281  |
| hsa-miR-193b-5p | CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA<br>(SEQ ID NO: 3) | MIMAT004767  | 002366  |
| hsa-miR-193b-3p | AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU<br>(SEQ ID NO: 4) | MIMAT0002819 | 002367  |

[0667] 将合成的hsa-miRNA (Integrated DNA Technologies) 稀释到3.125fmol/mL, 并将5μL与从血清样品提取的RNA共同用于反转录。将产物连续稀释并对所有样品进行PCR (标准

品和血清来源的RNA)。制作标准曲线并将其用于将Cq数据转变成以拷贝数/ $\mu\text{L}$ 为单位。Cq确定方式是回归。数量以拷贝数/ $\mu\text{L}$ 血清的格式表示。

[0668] 所有合成的hsa-miRNA的供应商是IDT。

[0669] D. 统计分析

[0670] 目的和定义

[0671] 这些分析的目的是发现可以与待治疗的NASH患者的鉴定相关的生物标志物。待治疗的患者(TBT)根据研究的不同部分不同地定义。

[0672] 根据第一种分类,TBT被定义为:

[0673] -脂肪变性评分 $\geq 1$

[0674] -肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

[0675] -小叶炎症评分 $\geq 1$

[0676] -NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$  (NAS被定义为脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分和小叶炎症评分的总和)

[0677] -纤维化分期 $\geq 2$  (例如纤维化分期等于2、3或4,特别是2或3)。

[0678] 根据第二种分类,TBT被定义为:

[0679] -脂肪变性评分 $\geq 1$

[0680] -肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

[0681] -小叶炎症评分 $\geq 1$

[0682] -NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$  (NAS被定义为脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分和小叶炎症评分的总和)

[0683] -纤维化分期 $\geq 1$  (例如纤维化分期等于1、2、3或4)。

[0684] 根据第三种分类,TBT被定义为:

[0685] -脂肪变性评分 $\geq 1$

[0686] -肝细胞膨胀评分 $\geq 1$

[0687] -小叶炎症评分 $\geq 1$

[0688] -NAS (NAFLD活性评分)  $\geq 4$  (NAS被定义为脂肪变性评分、肝细胞膨胀评分和小叶炎症评分的总和)

[0689] -纤维化分期=1b、1c、2、3或4。

[0690] 其他患者被陈述为非待治疗 (NTBT)。对于所述分析来说,在响应变量上TBT患者被分类为1,NTBT被分类为0。如上所述,解释性变量涵盖了大量在血液(血液学、生物化学、凝血、肝脏标志物、循环miRNA)或尿液(试纸条、沉积物)样品中测量的生物标志物,以及人口统计(年龄、性别、种族)、地区(研究中心、国家、洲)或医学(糖尿病)记录。

[0691] 自举模型

[0692] 在自举模型建模过程中,从整体数据集对所有患者计算响应变量(定义TBT/NTBT患者)与解释变量(生物标志物)相关联的逻辑广义线性模型。进行向后变量选择,并使用AIC选择最佳算法。然后,通过使用1000个自举样品运行所述算法来检验来自于该最佳算法的可变系数的显著性。显示出95%置信区间的系数(不包括零)被认为是显著的。然后通过计算ROC、AUC、最佳阈值、总准确度、灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值来验证所述算法。

### [0693] 结果

[0694] 首先,通过Edge Sequencing下一代测序在来自于GOLDEN-DIAG和OBESE的571个血清样品中同时测量2083种miRNA物质的循环水平,用于其循环水平可以辨别TBT2患者 (TBT2定义= $NAS \geq 4$ 和 $F \geq 2$ ,并且在脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀评分中至少1分) 和NTBT2对象 (NTBT2对象与TBT2对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分) 的miRNA的无偏选择。TBT2患者应该针对他们演变成严重肝脏结果如肝硬化、HCC、肝功能衰竭、肝移植和肝死亡的提高的风险进行治疗。

[0695] 从这项分析,本发明人在入选时的GOLDEN-DIAG和OBESE组群中鉴定到mir193,其通常相比于NTBT2患者在TBT2患者的血清样品中过表达。

[0696] 如表1中所示,显著并且令人吃惊的是,在GOLDEN-DIAG和OBESE两个组群中,对于hsa-miR193a-5p、hsa-miR193a-3p和hsa-miR193b-3p来说每百万的读出数据数目在TBT2患者中显著高于在NTBT2患者中。

[0697] 例如,分别对于hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p和hsa-miR-193b-3p来说,在TBT2患者中获得778、592和632RPM(每百万的读出数据),相比而言在NTBT2患者中为516、439和392RPM。

[0698] 本发明人还使用在GOLDEN试验的1年治疗期结束时收集的肝活检组织和血清样品作为第三个数据集,并再一次确认了对于hsa-miR193a-5p和hsa-miR193b-3p来说,每百万的读出数据数目在TBT2患者中明显比在NTBT2患者中更高。hsa-miR-193b-5p在TBT2患者中也明显比在NTBT2患者中更高。

[0699] 这些结果在独立组群OBESE中,在TBT2与NTBT2患者之间得到确认。

[0700] 此外,对在独立的临床组群RESOLVE-IT中收集的活检组织和血清样品也通过HTG Edge测序分析进行了处理。在这个另外的数据集和临床组群中验证了hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-5p和hsa-miR-193b-3p的上调。

[0701] 与来自于健康对象的血清相比,在具有极少组织学病灶的NAFLD患者 (NTBT2) 中所有测试的hsa-miR-193候选物hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193b-5p和hsa-miR-193b-3p上调(表1)。

[0702]

| <b>Golden Diag – 入选时</b>     |                     |                    |             |            |
|------------------------------|---------------------|--------------------|-------------|------------|
| <b>hsa_miRNA</b>             | <b>NTBT2 中的 RPM</b> | <b>TBT2 中的 RPM</b> | <b>变化倍数</b> | <b>p 值</b> |
| hsa-miR-193a-3p              | 516                 | 778                | 1,33        | 3,33E-04   |
| hsa-miR-193a-5p              | 439                 | 592                | 1,38        | 4,16E-06   |
| hsa-miR-193b-3p              | 392                 | 632                | 1,76        | 8,08E-09   |
| hsa-miR-193b-5p              | 18                  | 31                 | 1,72        | 4,22E-06   |
| <b>Golden Diag – 第 52 周时</b> |                     |                    |             |            |
| <b>hsa_miRNA</b>             | <b>NTBT2 中的 RPM</b> | <b>TBT2 中的 RPM</b> | <b>变化倍数</b> | <b>p 值</b> |
| hsa-miR-193a-3p              | 512                 | 598                | 1,11        | 3,08E-01   |
| hsa-miR-193a-5p              | 382                 | 636                | 1,61        | 1,14E-06   |
| hsa-miR-193b-3p              | 354                 | 720                | 1,83        | 1,71E-06   |
| hsa-miR-193b-5p              | 16                  | 35                 | 1,91        | 6,41E-06   |
| <b>Obese- 入选时</b>            |                     |                    |             |            |
| <b>hsa_miRNA</b>             | <b>NTBT2 中的 RPM</b> | <b>TBT2 中的 RPM</b> | <b>变化倍数</b> | <b>p 值</b> |
| hsa-miR-193a-3p              | 811                 | 1075               | 1,19        | 1,12E-01   |
| hsa-miR-193a-5p              | 300                 | 465                | 1,45        | 6,99E-06   |
| hsa-miR-193b-3p              | 95                  | 244                | 1,96        | 1,21E-11   |
| hsa-miR-193b-5p              | 4                   | 13                 | 1,78        | 1,03E-03   |
| <b>RESOLVE-IT - 入选时</b>      |                     |                    |             |            |
| <b>hsa_miRNA</b>             | <b>NTBT2 中的 RPM</b> | <b>TBT2 中的 RPM</b> | <b>变化倍数</b> | <b>p 值</b> |
| hsa-miR-193a-3p              | 658                 | 796                | 1,15        | 1,16E-01   |
| hsa-miR-193a-5p              | 442                 | 653                | 1,44        | 2,38E-06   |
| hsa-miR-193b-3p              | 387                 | 607                | 1,69        | 8,22E-08   |
| hsa-miR-193b-5p              | 17                  | 27                 | 1,81        | 4,82E-06   |
| <b>EFS 对象</b>                |                     |                    |             |            |

|        |                  |                      |
|--------|------------------|----------------------|
| [0703] | <b>hsa_miRNA</b> | <b>健康者中的<br/>RPM</b> |
|        | hsa-miR-193a-3p  | 198,05               |
|        | hsa-miR-193a-5p  | 212,04               |
|        | hsa-miR-193b-3p  | 69,93                |
|        | hsa-miR-193b-5p  | 3,44                 |

[0704] 表1:HGT-Edge下一代测序实验和在待治疗(TBT2)相比于非待治疗(NTBT2)患者中为hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p获得的每百万的读出数据数目(RPM)。每百万的读出数据(RPM)分别被表示为NTBT2和TBT2患者组(Golden Diag研究-入选时(109TBT2和161NTBT2患者)和Golden Diag-一年后(76TBT2和147NTBT2);Obese(50TBT2和202NTBT2患者),RESOLVE-IT(137TBT2和117NTBT2))的平均值;TBT2是指在肝活检组织的组织学检查时具有NAS $\geq 4$ 并且在脂肪变性、肝细胞膨胀和小叶炎症评分中至少1分和纤维化分期 $\geq 2$ 的患者。NTBT2对象与TBT2对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。EFS(Etablissement Français du Sang)对象是没有用药的健康对象。

[0705] 为了确认,然后使用定量体液中的寡核苷酸的黄金标准方法RT-qPCR,使用特异性Taq Man miRNA测定法测量hsa-miR193a-5p、hsa-miR193b-3p和hsa-miR-193b-5p的水平。结果可以概述如下:

[0706] 正如在表2和图2中所示,在入选时的两个组群以及在第52周时的GOLDEN-DIAG中,hsa-miR193a-5p、hsa-miR193b-3p和hsa-miR-193b-5p的血清浓度在TBT2患者中明显高于NTBT2患者中。在GOLDEN-DIAG中,hsa-miR193b-3p的血清浓度在具有极少组织学病灶的NAFLD患者(NTBT2)中明显高于来自于健康对象的血清中(图1和图4)。

[0707]

|                 |             |  |  |            |  |  |            |  |  |
|-----------------|-------------|--|--|------------|--|--|------------|--|--|
| Golden Diag – 入 | NTBT2 中的拷贝数 |  |  | TBT2 中的拷贝数 |  |  | TBT2/NTBT2 |  |  |
|-----------------|-------------|--|--|------------|--|--|------------|--|--|

[0708]

|                 |         |     |     |         |     |     |      |          |      |
|-----------------|---------|-----|-----|---------|-----|-----|------|----------|------|
| 选时              | /μL     |     |     | /μL     |     |     |      |          |      |
| 患者              | (N=161) |     |     | (N=109) |     |     |      |          |      |
| 拷贝数.μL-1 血清     | 平均值     | SD  | SEM | 平均值     | SD  | SEM | 比率   | p 值      | AUC  |
| hsa-miR-193a-5p | 400     | 285 | 22  | 609     | 412 | 39  | 1,52 | < 0,0001 | 0,68 |
| hsa-miR-193b-3p | 161     | 196 | 15  | 290     | 350 | 34  | 1,80 | < 0,0001 | 0,68 |
| hsa-miR-193b-5p | 20      | 37  | 3   | 40      | 49  | 5   | 1,98 | < 0,0001 | 0,67 |

|        |                           |                    |     |     |                   |     |     |            |          |      |
|--------|---------------------------|--------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|------------|----------|------|
| [0709] | Golden Diag – 一年后在第 52 周时 | NTBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2/NTBT2 |          |      |
|        | 患者                        | (N=147)            |     |     | (N=76)            |     |     |            |          |      |
|        | 拷贝数,μL-1 血清               | 平均值                | SD  | SEM | 平均值               | SD  | SEM | 比率         | p 值      | AUC  |
|        | hsa-miR-193a-5p           | 412                | 260 | 21  | 613               | 401 | 33  | 1,49       | < 0,0001 | 0,65 |
|        | hsa-miR-193b-3p           | 155                | 179 | 15  | 286               | 281 | 23  | 1,84       | < 0,0001 | 0,69 |
|        | hsa-miR-193b-5p           | 22                 | 40  | 3   | 50                | 69  | 8   | 2,32       | <0,0001  | 0,69 |
| [0710] | Obese - 入选时               | NTBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2/NTBT2 |          |      |
|        | 患者                        | (N=202)            |     |     | (N=50)            |     |     |            |          |      |
|        | 拷贝数,μL-1 血清               | 平均值                | SD  | SEM | 平均值               | SD  | SEM | 比率         | p 值      | AUC  |
|        | hsa-miR-193a-5p           | 452                | 269 | 19  | 637               | 412 | 58  | 1,41       | < 0,0001 | 0,65 |
|        | hsa-miR-193b-3p           | 67                 | 53  | 4   | 190               | 218 | 31  | 2,85       | < 0,0001 | 0,74 |
|        | hsa-miR-193b-5p           | 27                 | 20  | 1   | 48                | 39  | 6   | 1,78       | < 0,0001 | 0,69 |
| [0711] | RESOLVE-IT - 入选时          | NTBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2 中的拷贝数<br>/μL |     |     | TBT2/NTBT2 |          |      |
|        | 患者                        | (N=112)            |     |     | (N=136)           |     |     |            |          |      |
|        | 拷贝数,μL-1 血清               | 平均值                | SD  | SEM | 平均值               | SD  | SEM | 比率         | p 值      | AUC  |
|        | hsa-miR-193a-5p           | 334                | 254 | 27  | 503               | 332 | 33  | 1,51       | < 0,0001 | 0,70 |
|        | hsa-miR-193b-3p           | 56                 | 73  | 8   | 105               | 112 | 11  | 1,88       | < 0,0001 | 0,73 |
|        | hsa-miR-193b-5p           | 11                 | 18  | 2   | 19                | 24  | 2   | 1,71       | 0,0010   | 0,65 |

[0712] 表2:用于在三个组群 (GOLDE、OBESE和RESOLVE-IT) 中确认/验证hsa-miR-193a-5p、hsa-miR-193b-3p和hsa-miR-193b-5p在待治疗 (TBT2) 患者中相比于非待治疗 (NTBT2) 患者中的过表达的RT-qPCR实验。TBT2相比于NTBT2的统计显著性使用非参数Mann Whitney 检验来计算。TBT2是指在肝活检组织的组织学检查时具有NAS≥4并且脂肪变性、肝细胞膨胀和小叶炎症评分≥1且纤维化分期≥2的患者。获得AUROC=受试者工作特征的曲线下面积用于鉴定TBT2与NTBT2。

[0713] 如图1、2和3中所示,当在入选时的两个组群中使用TBT患者和NTBT患者的第二个定义 (TBT1与NTBT1) 时,分析显示hsa-miR193b-3p (图1)、hsa-miR193b-5p (图2) 和hsa-mir193a-5p (图3) 的血清浓度在TBT1患者中明显比在NTBT1患者中更高。在GOLDEN-DIAG中,hsa-miR193b-3p的血清浓度在具有极少组织学病灶的NAFLD患者 (NTBT1) 中明显比在来自于健康对象的血清中更高 (图1)。在这些分析中,TBT1是指在肝活检组织的组织学检查时具

有NAS $\geq 4$ 并在在脂肪变性、肝细胞膨胀和小叶炎症评分中至少1分且纤维化分期 $\geq 1$ 的患者。NTBT1对象与TBT1对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。

[0714] 如图1、2和3中所示,当在入选时的两个组群中使用TBT患者和NTBT患者的第三个定义(TBT7与NTBT7)时,分析显示hsa-miR193b-3p(图1)、hsa-miR193b-5p(图2)和hsa-miR193a-5p(图3)的血清浓度在TBT7患者中明显比在NTBT7患者中更高。在GOLDEN-DIAG中,hsa-miR193b-3p的血清浓度在具有极少组织学病灶的患者(NTBT7)中明显比在来自于健康对象的血清中更高(图1)。在这些分析中,TBT7是指在肝活检组织的组织学检查时具有NAS $\geq 4$ 并在在脂肪变性、肝细胞膨胀和小叶炎症评分中至少1分且纤维化分期 $\geq 1$ 的患者。NTBT1对象与TBT1对象的差异在于在脂肪变性、肝细胞膨胀、小叶炎症评分、NAS和/或纤维化分期中等级低至少1分。

[0715] 如图4、5和6中所示,在两个组群中,hsa-miR193b-3p(图4)、hsa-miR193a-5p(图5)和hsa-miR-193b-5p(图6)的血清浓度在具有活跃NASH(NAS $\geq 4$ 并且在脂肪变性、小叶炎症和肝细胞膨胀中至少1分)的患者中明显比在非NASH和轻度NASH患者(NAS $< 4$ )中更高。在GOLDEN-DIAG中,hsa-miR-193b-3p的血清浓度在具有极少疾病活性(NAS $< 4$ )的患者中明显比在来自于健康对象的血清中更高。

[0716] 如图4、5和6中所示,在两个组群中,hsa-miR-193b-3p(图4)、hsa-miR-193a-5p(图5)和hsa-miR-193b-5p(图6)的血清浓度在具有显著纤维化或更高纤维化分期(F $\geq 2$ )的患者中明显比在没有或具有极少纤维化(F $< 2$ )的患者中更高。在GOLDEN-DIAG中,hsa-miR-193b-3p的血清浓度在没有或具有极少纤维化(F $< 2$ )的NAFLD患者中明显比在健康对象中更高。

[0717] 对于hsa-miR-193b-3p、hsa-miR-193a-5p和hsa-miR-193b-5p来说,这些结果在RESOLVE-IT中得到确认(图7)。

[0718] 提供了对来自于GOLDEN-DIAG在入选时的血清样品进行的RT-qPCR实验的进一步分析,显示出在miR-193物质的循环水平与组织学评分和纤维化分期之间存在强烈相关性(使用OBES和RESOLVE-IT样品获得了类似结果)。

[0719] 如图8中所示,hsa-miR193b-3p的循环水平与脂肪变性评分、小叶炎症评分、肝细胞膨胀评分正相关。因此,miR193b-3p的循环水平与NAS和活性指数显著并且正相关。最后,在入选时的GOLDEN DIAG中,在193b-5p的循环水平与纤维化分期之间存在强烈相关性。

[0720] 如图9中所示,hsa-miR193b-5p的循环水平与脂肪变性评分、小叶炎症评分、肝细胞膨胀评分正相关。因此,miR193b-3p的循环水平与NAS和活性指数显著并且正相关。最后,在入选时的GOLDEN DIAG中,在miR193b-5p的循环水平与纤维化分期之间存在强烈相关性。

[0721] 如图10中所示,miR193a-5p的循环水平与脂肪变性评分、小叶炎症评分、肝细胞膨胀评分正相关。因此,miR193b-3p的循环水平与NAS和活性指数显著并且正相关。最后,在入选时的GOLDEN DIAG中,在miR193a-5p的循环水平与纤维化分期之间存在强烈相关性。

[0722] 在下面的表3中呈现的结果说明了在GOLDEN患者中,在52周后hsa-miR-193a-5p的循环水平的变化与NAFLD和NASH活性的演变之间的显著相关性。同样地,在下面的表3中呈现的结果说明了在GOLDEN患者中,在52周后hsa-miR-193b-3p的循环水平的变化与NAFLD和NASH活性的演变之间的显著相关性。

|                                                                                  |                         |                         |                         |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| <b>GOLDEN-DIAG (第 52 周-入选)</b>                                                   |                         |                         |                         |                               |
| <b>miR 血清浓度的变化 (<math>\Delta</math>miR) 相比于活性指数的演变 (<math>\Delta</math>AI)</b>   |                         |                         |                         |                               |
|                                                                                  | 改善<br>( $\Delta$ AI<0)  | 稳定<br>( $\Delta$ AI=0)  | 恶化<br>( $\Delta$ AI>0)  | P 值<br>(Kruskal<br>Wallis 检验) |
| <b><math>\Delta</math>miR-193a-5p</b><br>(拷贝数/ $\mu$ L)                          | -72 $\pm$ 33            | -7 $\pm$ 41             | +202 $\pm$ 91           | 0.02                          |
| <b><math>\Delta</math>miR-193b-3p</b><br>(拷贝数/ $\mu$ L)                          | -41 $\pm$ 26            | -7 $\pm$ 29             | +49 $\pm$ 36            | 0.17                          |
|                                                                                  |                         |                         |                         |                               |
| <b>GOLDEN-DIAG (第 52 周-入选)</b>                                                   |                         |                         |                         |                               |
| <b>miR 血清浓度的变化 (<math>\Delta</math>miR) 相比于 NAS 的演变 (<math>\Delta</math>NAS)</b> |                         |                         |                         |                               |
|                                                                                  | 改善<br>( $\Delta$ NAS<0) | 稳定<br>( $\Delta$ NAS=0) | 恶化<br>( $\Delta$ NAS>0) | P 值<br>(Kruskal<br>Wallis 检验) |
| <b><math>\Delta</math>miR-193a-5p</b><br>(拷贝数/ $\mu$ L)                          | -87 $\pm$ 33            | +23 $\pm$ 50            | +107 $\pm$ 62           | 0.02                          |
| <b><math>\Delta</math>miR-193b-3p</b><br>(拷贝数/ $\mu$ L)                          | -62 $\pm$ 26            | +8 $\pm$ 38             | +48 $\pm$ 22            | 0.008                         |

[0725] 表3:在一年的GOLDEN试验期间,hsa-miR193a-5p和hsa-miR193b-3p的血清水平的变化与活性指数(AI)和NAS的演变的相关性。

[0726] 使用自举方法的建模选择了4个显著变量与miR-193b-3p一起将TBT2患者与NTBT2患者区分开(表4)。这个模型组合了miR-193b-3p、金属蛋白酶的组织抑制剂1(TIMP-1)、也被称为几丁质酶3样蛋白1(CHI3L1)的YKL-40、血小板计数和代谢综合征(MS)来诊断待治疗的NASH患者或有风险的NASH患者。

[0727] 待治疗的有风险患者对应于下述肝组织活检来源的等级:脂肪变性评分 $\geq 1$ ,肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ ,小叶炎症评分 $\geq 1$ ,NAS(NAFLD活性评分) $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ (例如纤维化分期等于2、3或4,特别是2或3)

|                              | 系数        | SE       | 95% CI    |           |
|------------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
|                              |           |          |           |           |
| 常数                           | -5,53     | 1,46     | -8,39     | -2,67     |
| miR-193b-3p (Log10 拷贝数.μL-1) | 1,54      | 0,49     | 0,58      | 2,50      |
| [0728] 金属蛋白酶的抑制剂 1 (TIMP-1)  | 1,05E-02  | 4,17E-03 | 2,29E-03  | 1,87E-02  |
| YKL-40 或 CHI3L1              | 9,34E-06  | 3,67E-06 | 2,14E-06  | 1,65E-05  |
| 血小板计数                        | -8,32E-03 | 3,71E-03 | -1,56E-02 | -1,05E-03 |
| 代谢综合征                        | 0,83      | 0,41     | 0,03      | 1,63      |

[0729] 表4:在Golden中鉴定TBT2患者的最佳自举模型中的所选变量。置信区间=CI,SE:标准误差

[0730] 所述评分被定义为逻辑函数:

$$[0731] \quad S \sim \frac{e^Y}{1 + e^Y}$$

[0732] 其中:

$$[0733] \quad Y = k + a*A + b*B + c*C + d*D + f*F$$

[0734] 其中:

[0735] S是NASH评分;

[0736] A是以log10拷贝数.μL-1为单位的hsa-miR-193b-3p水平;

[0737] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平;

[0738] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;

[0739] D以10<sup>9</sup>/L为单位的血小板计数;

[0740] F是代谢综合征评分;

[0741] k是-8.39与-2.67之间的数。

[0742] 对应于如前所述的有风险患者并组合了几种变量的自举模型的AUC评分好于为各个变量获得的AUC评分。因此,几个变量通过本发明的逻辑函数的组合比单独变量的研究更好并且更精确(表5和图11)。

|                   | AUC  | 最佳阈值     | 准确度    | 灵敏度    | 特异性    | PPV    | NPV    |
|-------------------|------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| [0743] Genfit NIS | 0,80 | 0,3993   | 72,62% | 81,25% | 64,77% | 67,71% | 79,17% |
| hsa-miR-193b-3p   | 0,68 | 2,1829   | 67,26% | 65,00% | 69,32% | 65,82% | 68,54% |
| TIMP-1            | 0,68 | 248,50   | 64,88% | 65,00% | 64,77% | 62,65% | 67,06% |
| CHI3L1            | 0,68 | 56512,88 | 65,48% | 65,00% | 65,91% | 63,42% | 67,44% |
| 血小板计数             | 0,62 | 212,50   | 61,91% | 65,00% | 59,09% | 59,09% | 65,00% |

[0744] 表5:在GOLDEN-DIAG中本发明的自举模型与各个变量的评分之间的比较。诊断性能比较。非侵入性特征=NIS=使用miR-193b-3p的算法

[0745] 所述最佳模型通过在1000个自举模型中计算AUC来验证。所述AUC为0.80 (95%CI: 0.73-0.86)。使用所述最佳模型的AUC,定义了用于将患者预测为TBT或NTBT的3个阈值:

[0746] 1.最接近于具有1-特异性=0%和灵敏度=100%的点的阈值,等于0.3993。相应的列联表产生了下述指数:

[0747] • 总准确度:72.62%

[0748] • 灵敏度:81.25%

[0749] • 特异性:64.77%

[0750] • PPV:67.71%

[0751] • NPV (阴性预测值):79.17%

[0752] 2.给出等于90%的灵敏度的阈值,等于0.3050。相应的列联表产生了下述指数:

[0753] • 总准确度:70.24%

[0754] • 灵敏度:90.00%

[0755] • 特异性:52.27%

[0756] • PPV (阳性预测值):63.16%

[0757] • NPV (阴性预测值):85.19%

[0758] 3.给出高于90%的特异性的阈值,等于0.6518。相应的列联表产生了下述指数:

[0759] • 总准确度:70.24%

[0760] • 灵敏度:47.50%

[0761] • 特异性:90.91%

[0762] • PPV (阳性预测值):82.61%

[0763] • NPV (阴性预测值):65.57%

[0764] 使用自举方法,使用以log10(拷贝数.μL-1)为单位的miRNA水平和生物化学数据的第二种建模选择了6个显著变量与miR-193b-3p一起将TBT2患者与NTBT2患者区分开(表6)。这个模型组合了miR-193b-3p、也被称为几丁质酶3样蛋白1(CHI3L1)的YKL-40、金属蛋白酶的抑制剂1(TIMP-1)、糖化血红蛋白(HbA1c)、透明质酸(HYUA2)和血小板计数来诊断待治疗的NASH患者或有风险的NASH患者。

[0765] 待治疗的有风险患者对应于下述肝组织活检来源的等级:脂肪变性评分 $\geq 1$ ,肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ ,小叶炎症评分 $\geq 1$ ,NAS (NAFLD活性评分) $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ (例如纤维化

分期等于2、3或4,特别是2或3)。

| [0766] |                         | 系数      | P-值      | 95% CI  |         |
|--------|-------------------------|---------|----------|---------|---------|
|        | 常数 1                    | -7.52   | 3.72E-06 | -10.92  | -3.89   |
|        | miR193b-3p (log10 cpul) | 1.29    | 0.0028   | 0.44    | 2.17    |
|        | YKL-40 或 CHI3L1         | 0.01    | 0.0028   | 0.0035  | 0.020   |
|        | TIMP-1                  | 0.0092  | 0.0097   | 0.0016  | 0.0018  |
|        | HYUA2                   | -0.0024 | 0.0131   | -0.0053 | 0.0057  |
|        | HBA1C                   | 0.59    | 0.0042   | 0.13    | 1.08    |
|        | 血小板计数                   | -0.009  | 0.0043   | -0.017  | -0.0027 |

[0767] 表6:在Golden中鉴定TBT2患者的最佳自举模型中的所选变量。置信区间=CI,拷贝数.μL-1=cpul。

[0768] 所述评分被定义为逻辑函数:

$$[0769] \quad S2 \sim \frac{e^{Y2}}{1 + e^{Y2}}$$

[0770] 其中:

[0771]  $Y2 = 1 + a2 * A + c2 * C + b2 * B + e * E + g * G + d2 * D$

[0772] 其中:

[0773] S2是NASH评分;

[0774] A是以log10拷贝数.μL-1为单位的hsa-miR-193b-3p水平;

[0775] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;

[0776] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平;

[0777] E是以ng/mL为单位的HYUA2水平;

[0778] G是以%为单位的HbA1c水平;

[0779] D是血小板计数;

[0780] 1是-10.92与-3.89之间的数。

[0781] 所述最佳模型通过在1000个自举模型中计算AUC来验证。所述AUC为0.80 (95%CI: 0.74-0.86)。使用所述最佳模型的AUC,定义了用于将患者预测为TBT或NTBT的最佳阈值:

[0782] 1.最接近于具有1-特异性=0%和灵敏度=100%的点的阈值,等于0.4216。相应的列联表产生了下述指数:

[0783] • 总准确度:74.31%

[0784] • 灵敏度:73.68%

[0785] • 特异性:74.80%

[0786] • PPV:69.31%

- [0787] • NPV:78.63%
- [0788] 2. 给出超过90%的灵敏度的阈值,等于0.2461。相应的列联表产生了下述指数:
- [0789] • 总准确度:66.51%
- [0790] • 灵敏度:90.53%
- [0791] • 特异性:45.97%
- [0792] • PPV:57.33%
- [0793] • NPV:86.76%
- [0794] 3. 给出超过90%的特异性的阈值,等于0.625。相应的列联表产生了下述指数:
- [0795] • 总准确度:72.02%
- [0796] • 灵敏度:48.42%
- [0797] • 特异性:90.24%
- [0798] • PPV:79.31%
- [0799] • NPV:69.38%
- [0800] 使用自举方法,使用以C<sub>q</sub>为单位的miRNA水平和生物化学数据的第三种建模选择了同样的6个显著变量与miR-193b-3p一起将TBT2患者与NTBT2患者区分开(表6)。这个模型组合了miR-193b-3p、也被称为几丁质酶3样蛋白1 (CHI3L1) 的YKL-40、金属蛋白酶的组织抑制剂1 (TIMP-1)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、透明质酸 (HYUA2) 和血小板计数来诊断待治疗的NASH患者或有风险的NASH患者。
- [0801] 待治疗的有风险患者对应于下述肝组织活检来源的等级:脂肪变性评分 $\geq 1$ ,肝细胞膨胀评分 $\geq 1$ ,小叶炎症评分 $\geq 1$ ,NAS (NAFLD活性评分) $\geq 4$ 和纤维化分期 $\geq 2$ (例如纤维化分期等于2、3或4,特别是2或3)。

|        |                              | 系数      | P-值     | 95% CI  |         |
|--------|------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| [0802] | 常数 m                         | 8.08    | 0.0828  | -1.27   | 17.54   |
|        | miR193b-3p (C <sub>q</sub> ) | -0.38   | 0.0030  | -0.64   | -0.09   |
|        | YKL-40 或 CHI3L1              | 0.01    | 0.0031  | 0.005   | 0.019   |
|        | TIMP-1                       | 0.01    | 0.0095  | 0.001   | 0.016   |
|        | HYUA2                        | -0.0024 | 0.0138  | -0.0054 | 0.0045  |
|        | HBA1C                        | 0.57    | 0.00460 | 0.12    | 1.08    |
|        | 血小板计数                        | -0.009  | 0.0042  | -0.0164 | -0.0016 |

[0803] 表6:在Golden中鉴定TBT2患者的最佳自举模型中选择的变量。置信区间=CI,拷贝数. $\mu\text{L}^{-1} = \text{cpul}$ 。

[0804] 所述评分被定义为逻辑函数:

$$[0805] \quad S3 \sim \frac{e^{Y3}}{1 + e^{Y3}}$$

[0806] 其中:

[0807]  $Y3 = m + a3 * A + c3 * C + b3 * B + e2 * E + g2 * G + d3 * D$

[0808] 其中:

[0809] S3是NASH评分;

[0810] A是以log10拷贝数.μL<sup>-1</sup>为单位的hsa-miR-193b-3p水平;

[0811] C是以pg/mL为单位的YKL-40水平;

[0812] B是以ng/mL为单位的TIMP-1水平;

[0813] E是以ng/mL为单位的HYUA2水平;

[0814] G是以%为单位的HbA1c水平;

[0815] D是血小板计数;

[0816] m是-1.27至17.54之间的数。

[0817] 所述最佳模型通过在1000个自举模型中计算AUC来验证。所述AUC为0.80 (95%CI: 0.74-0.86)。使用所述最佳模型的AUC,定义了用于将患者预测为TBT或NTBT的最佳阈值:

[0818] 1.最接近于具有1-特异性=0%和灵敏度=100%的点的阈值,等于0.3741。相应的列联表产生了下述指数:

[0819] • 总准确度:73.39%

[0820] • 灵敏度:78.95%

[0821] • 特异性:69.11%

[0822] • PPV:66.37%

[0823] • NPV:80.95%

[0824] 2.给出超过90%的灵敏度的阈值,等于0.2270。相应的列联表产生了下述指数:

[0825] • 总准确度:63.76%

[0826] • 灵敏度:90.53%

[0827] • 特异性:43.09%

[0828] • PPV:55.13%

[0829] • NPV:85.48%

[0830] 3.给出超过90%的特异性的阈值,等于0.6364。相应的列联表产生了下述指数:

[0831] • 总准确度:71.56%

[0832] • 灵敏度:47.37%

[0833] • 特异性:90.24%

[0834] • PPV:78.95%

[0835] • NPV:68.94%

[0836] 如图12和13中所示,算法Y2(hsa-miR-193b-3p(log10 cpul)、YKL-40或CHI3L1、TIMP-1、透明质酸、HbA1c和血小板计数)和Y3(hsa-miR-193b-3p(Cq)、YKL-40或CHI3L1、TIMP-1、透明质酸、HbA1c和血小板计数)在独立的组群RESOLVE-IT中的验证,产生了等于0.81的可比并且甚至更高的AUC。

[0837] 如表7中所示,在独立组群中有风险患者的鉴定甚至得到改善,正如阳性预测值所

示。

| [0838] | 性能             | 总准确度   | 灵敏度   | 特异性   | PPV<br>(%) | NPV<br>(%) |
|--------|----------------|--------|-------|-------|------------|------------|
|        | Y2 GOLDEN DIAG | 74.31% | 73.68 | 74.80 | 69.31      | 78.63      |
|        | Y2 RESOLVE-IT  | 70.61% | 55.73 | 87.72 | 83.91      | 63.29      |
|        | Y3 GOLDEN DIAG | 73.58% | 72.34 | 74.58 | 69.39      | 77.19      |
|        | Y3 RESOLVE-IT  | 74.79% | 77.69 | 71.43 | 75.94      | 73.39      |

[0839] 表7:在GOLDEN-DIAG和RESOLVE-IT中模型Y2和Y3的诊断性能。PPV=阳性预测值, NPV=阴性预测值。

[0840] 结论:

[0841] i) 在使用两种不同方法 (HTG Edge-Seq NGS和RTqPCR) 对血清和血浆样品中的miRNA水平进行测量的基础上,这些结果支持了使用hsa-miR193a-5p、hsa-miR193b-3p和hsa-193b-5p和更广义来说hsa-miR193相关的寡核苷酸作为循环诊断生物标志物,用于鉴定具有NAFLD ( $NAS \geq 1$ )、NASH ( $NAS \geq 3$ ,并且在脂肪变性中至少1分、在小叶炎症中至少1分和在肝细胞膨胀评分中至少1分)、活跃NASH ( $NAS \geq 4$ ,并且在脂肪变性中至少1分、在小叶炎症中至少1分和在肝细胞膨胀评分中至少1分)、显著纤维化 ( $F \geq 2$ ) 和/或活跃NASH和纤维化的患者 (TBT1、TBT2、TBT7) 的用途。

[0842] ii) 在对血清和血浆样品中的miRNA水平进行测量的基础上,这些结果支持了使用hsa-miR193物质作为循环诊断生物标志物,用于在对象中进行组织学病变(脂肪变性、小叶炎症、肝细胞膨胀)的非侵入性分级、NASH活性 (NAS或活性指数) 的评估和疾病严重性(纤维化分期)的评估。

[0843] iii) 在对血清和血浆样品中的miRNA水平进行测量的基础上,这些结果支持了使用hsa-miR193物质作为循环诊断生物标志物,用于在对象中进行组织学病变(脂肪变性、小叶炎症、肝细胞膨胀)的非侵入性分级、NASH活性 (NAS或活性指数) 的评估和疾病严重性(纤维化分期)的评估。

[0844] iv) 在对血清和血浆样品中的miRNA水平进行测量的基础上,这些结果支持了使用hsa-miR193物质作为循环诊断生物标志物,用于监测同一患者中NAFLD活性、NASH活性或纤维化分期的演变,所述患者用或未用抗NAFLD药物、抗NASH药物或抗纤维化药物治疗。

[0845] v) 最后,将NASH活水平动与纤维化演变的风险相关联和将纤维化分期与长期肝脏结果(肝硬化、肝移植、HCC或肝死亡)的风险相关联的技术现状,支持了miR193物质作为预后生物标志物,用于评估纤维化演变成肝硬化的风险并用于估算长期严重并发症的风险。

[0846] vi) 对应于如前所述的有风险患者并组合了几种变量的自举模型的AUC评分在统计上好于为各个变量获得的AUC评分。因此,几个变量通过本发明的逻辑函数的组合比单独变量的研究更好并且更精确。

[0847] vii) 使用以Cq为单位的hsa-miR-193b-3p的建模和使用以log10拷贝数.  $\mu\text{L}^{-1}$ 为单位的hsa-miR-193b-3p的建模产生相同的变量选择:YKL-40或CHI3L1, TIMP-1, 透明质酸,

HbA1c和血小板计数。

[0848] viii) The similarity of the AUC between GOLDEN-DIAG与RESOLVE-IT之间的AUC的相似性和算法Y2和Y3在独立组群中的诊断价值的确认,交叉确认了这些复合生物标志物组的性能。

[0849] 参考文献

[0850] Castoldi M, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU (2007) miChip: 一种基于锁核酸 (LNA) 寡核苷酸捕获探针的用于microRNA的表达情况分析的微阵列平台 (miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes), *Methods* 43:146-152

[0851] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) 通过茎环RT-PCR进行microRNA的实时定量 (Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR), *Nucleic Acids Res* 33:e179

[0852] Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, Sebastiani G, Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Stal P, Wong VW, Kechagias S, Hultcrantz R, Loomba R (2017) 在非酒精性脂肪性肝病中纤维化分期提高死亡风险: 系统性评论和元分析 (Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis), *Hepatology* 65:1557-1565

[0853] Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, Hultcrantz R (2015) 在长达33年的随访后纤维化分期是NAFLD中疾病特异性死亡的最强预测物 (Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up), *Hepatology* 61:1547-1554

[0854] Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Mitton JD, Oliveri P, Osborn JL, Peng T, Ratcliffe AL, Webster PJ, Davidson EH, Hood L, Dimitrov K (2008) 基因表达的使用颜色编码的探针对的直接多路测量 (Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs), *Nat Biotechnol* 26:317-325

[0855] Hafner M, Renwick N, Farazi TA, Mihailovic A, Pena JT, Tuschl T (2012) 用于通过下一代测序进行小RNA情况分析的带条形码的cDNA文库制备 (Barcoded cDNA library preparation for small RNA profiling by next-generation sequencing), *Methods* 58:164-170

[0856] Lizarraga D, Huen K, Combs M, Escudero-Fung M, Eskenazi B, Holland N (2016) 在男孩和女孩的脐带血血沉棕黄层样品中通过下一代测序调查差异表达的miRNA (miRNAs differentially expressed by next-generation sequencing in cord blood buffy coat samples of boys and girls), *Epigenomics* 8:1619-1635

[0857] Miotto E, Saccenti E, Lupini L, Callegari E, Negrini M, Ferracin M (2014) 通过微滴数字PCR进行循环miRNA的定量: 基于EvaGreen和TaqMan的科学的比较 (Quantification of circulating miRNAs by droplet digital PCR: comparison of EvaGreen-and TaqMan-based chemistries), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:

2638-2642

[0858] Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, Kauppinen S, Plasterk RH, Mourelatos Z (2006) RAKE和LNA-ISH揭示出存档的人脑中microRNA的表达和定位 (RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain), RNA 12:187-191

[0859] Satake E, Pezzolesi MG, Md Dom ZI, Smiles AM, Niewczas MA, Krolewski AS (2018) 在患有1型糖尿病的患者中循环miRNA概貌与高血糖相关 (Circulating miRNA Profiles Associated With Hyperglycemia in Patients With Type 1 Diabetes), Diabetes 67:1013-1023

[0860] Vigneault F, Ter-Ovanesyan D, Alon S, Eminaga S, D CC, Seidman JG, Eisenberg E, G MC (2012) 《miRNA的高通量多路测序》 (High-throughput multiplex sequencing of miRNA), Curr Protoc Hum Genet Chapter 11:Unit 11 12 11-10

[0861] Wong VW, Adams LA, de Ledingham V, Wong GL, Sookoian S (2018) NAFLD和NASH中的非侵入性生物标志物——目前的进展和未来的希望 (Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH-current progress and future promise), Nat Rev Gastroenterol Hepatol

## 序列表

<110> 基恩菲特公司 (GENFIT)

<120> 非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎和/或肝纤维化的非侵入性诊断

<130> B2567EP00

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 1

aacuggccua caaaguccca gu 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 2

ugggucuuug cgggcgagau ga 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 3

cgggguuuug agggcgagau ga 22

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 4

aacuggcccu caaagucccg cu 22

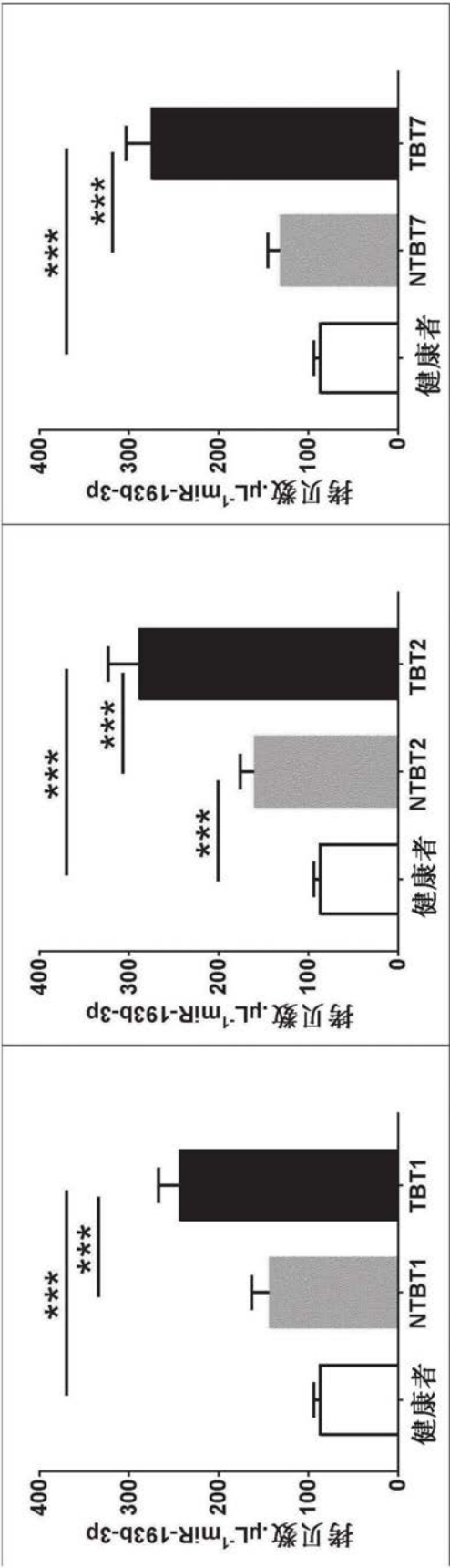


图1

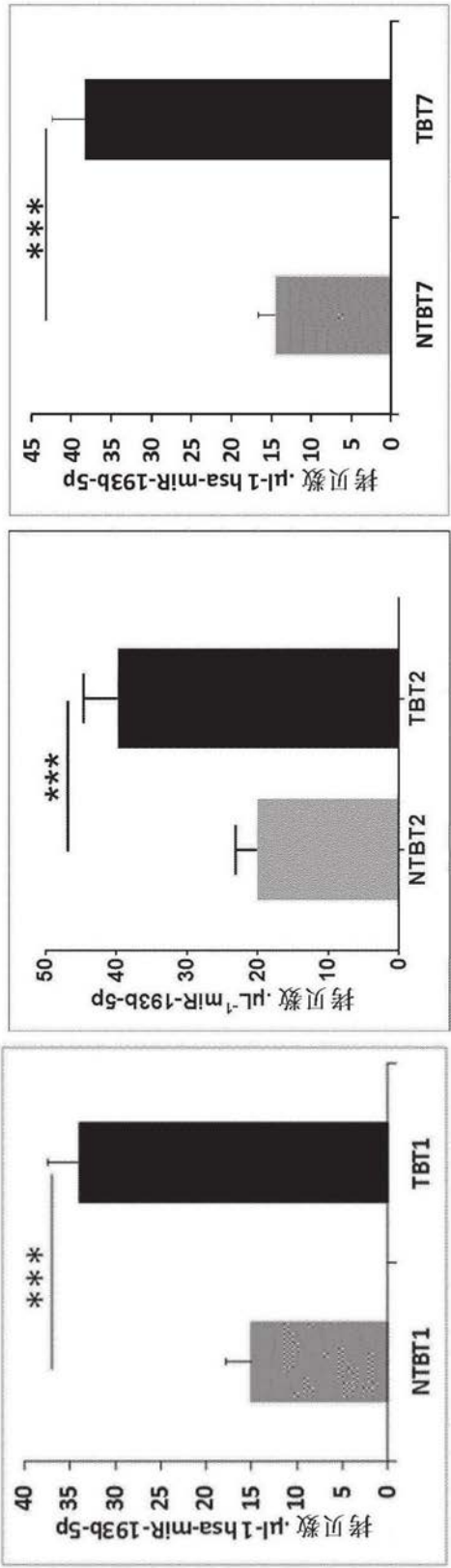


图2

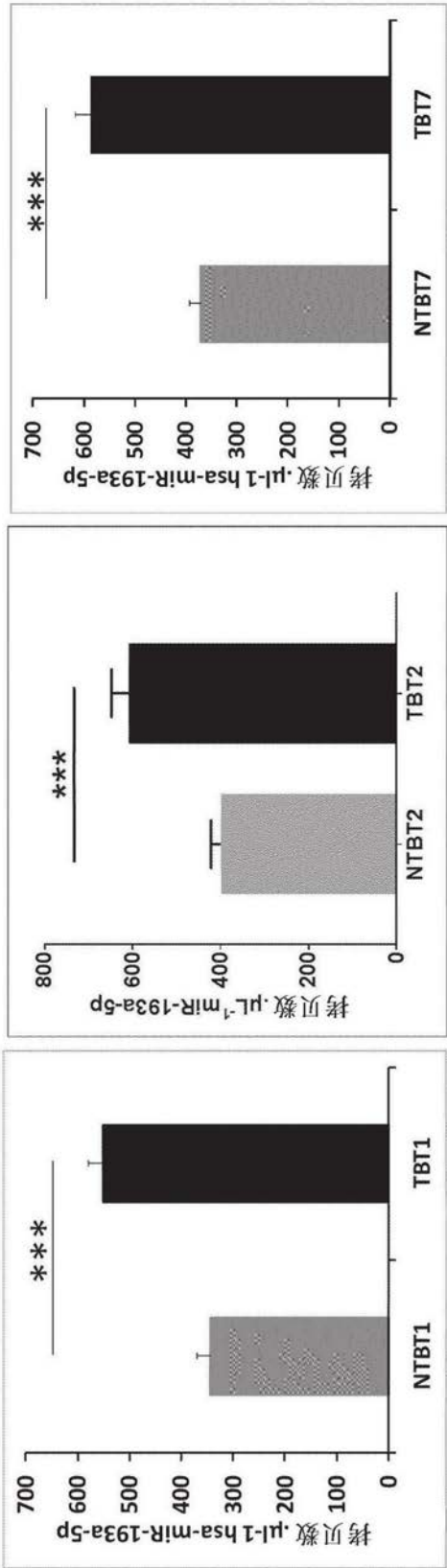


图3

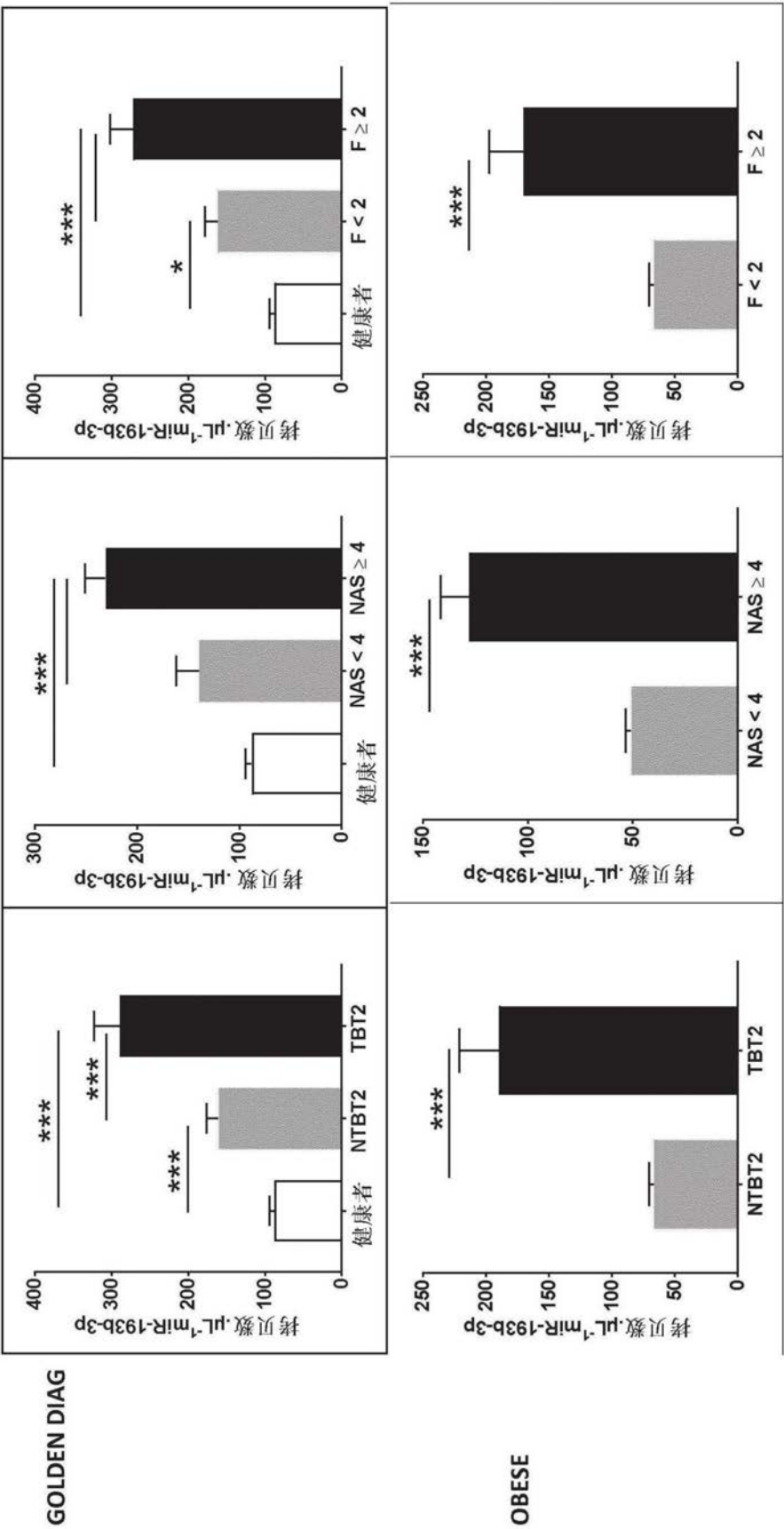


图4

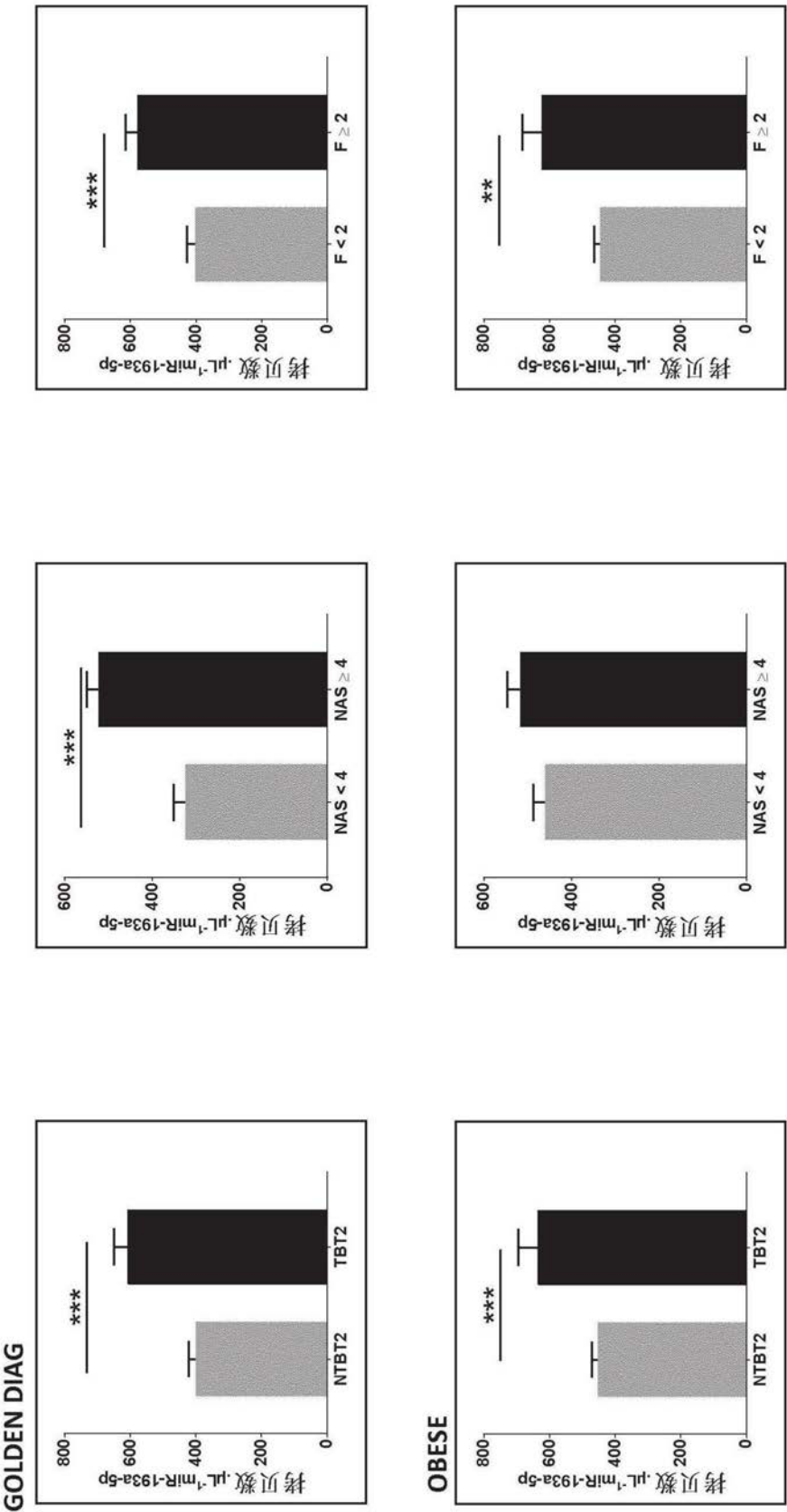


图5

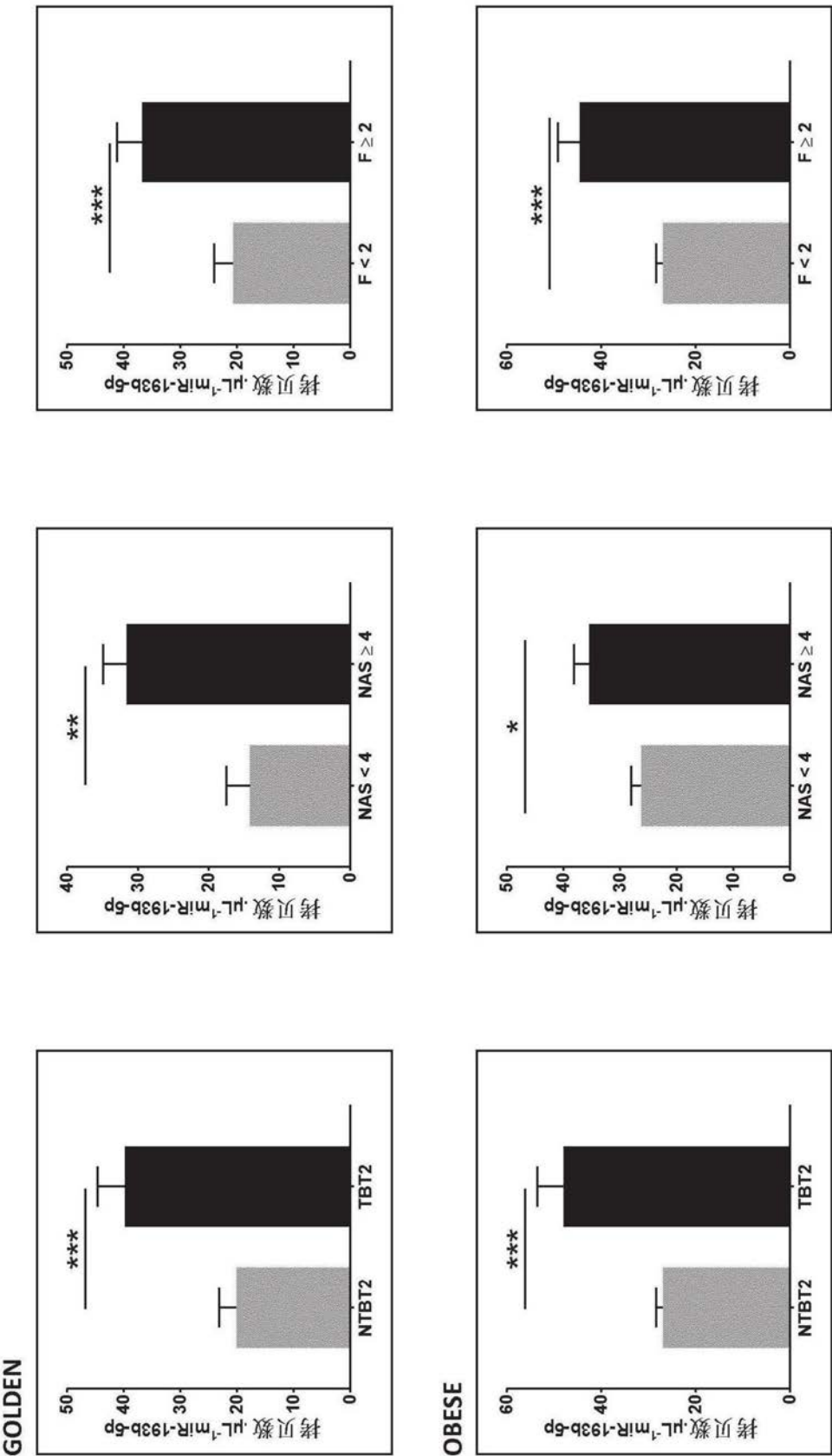


图6

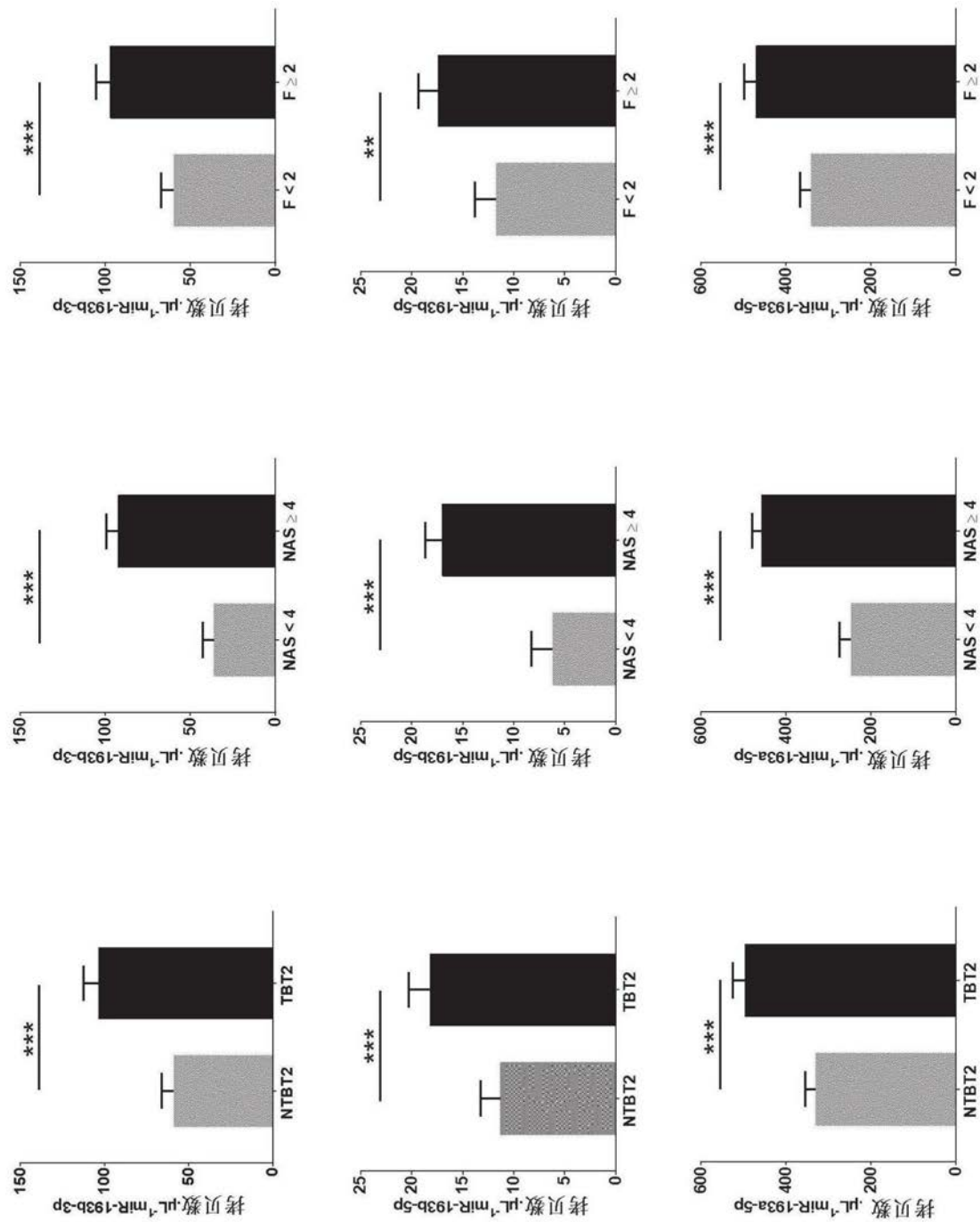


图7

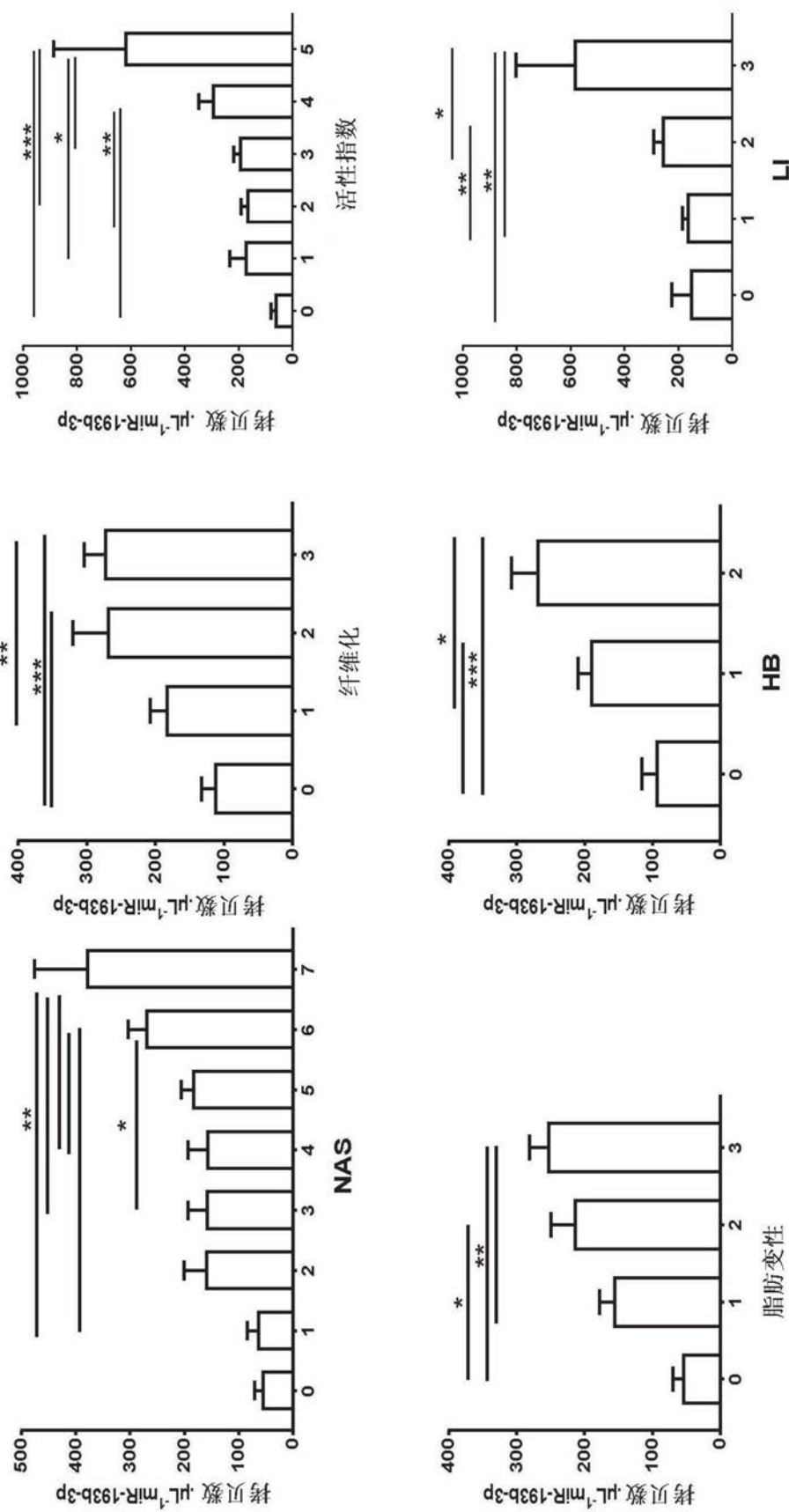


图8

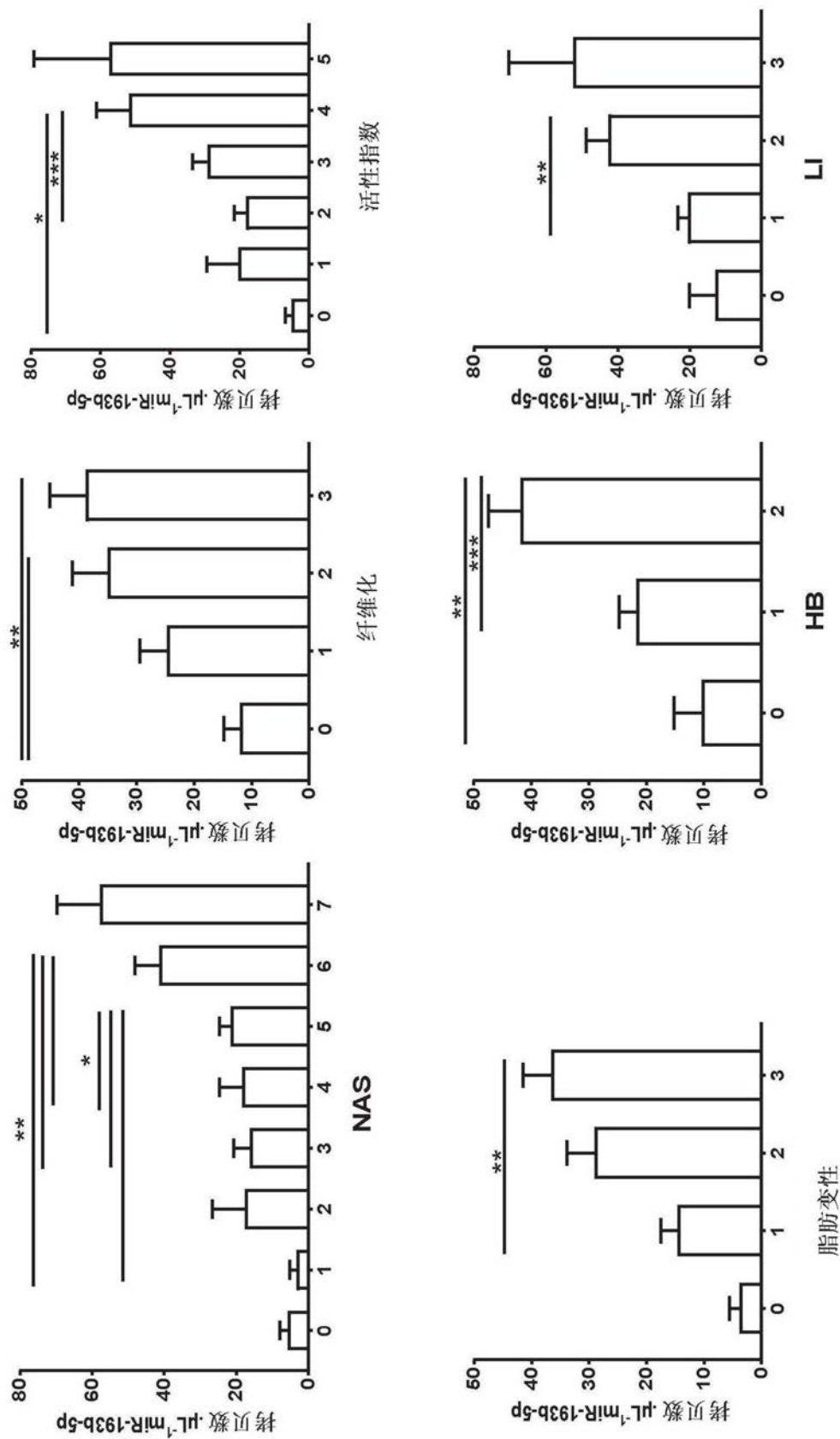


图9

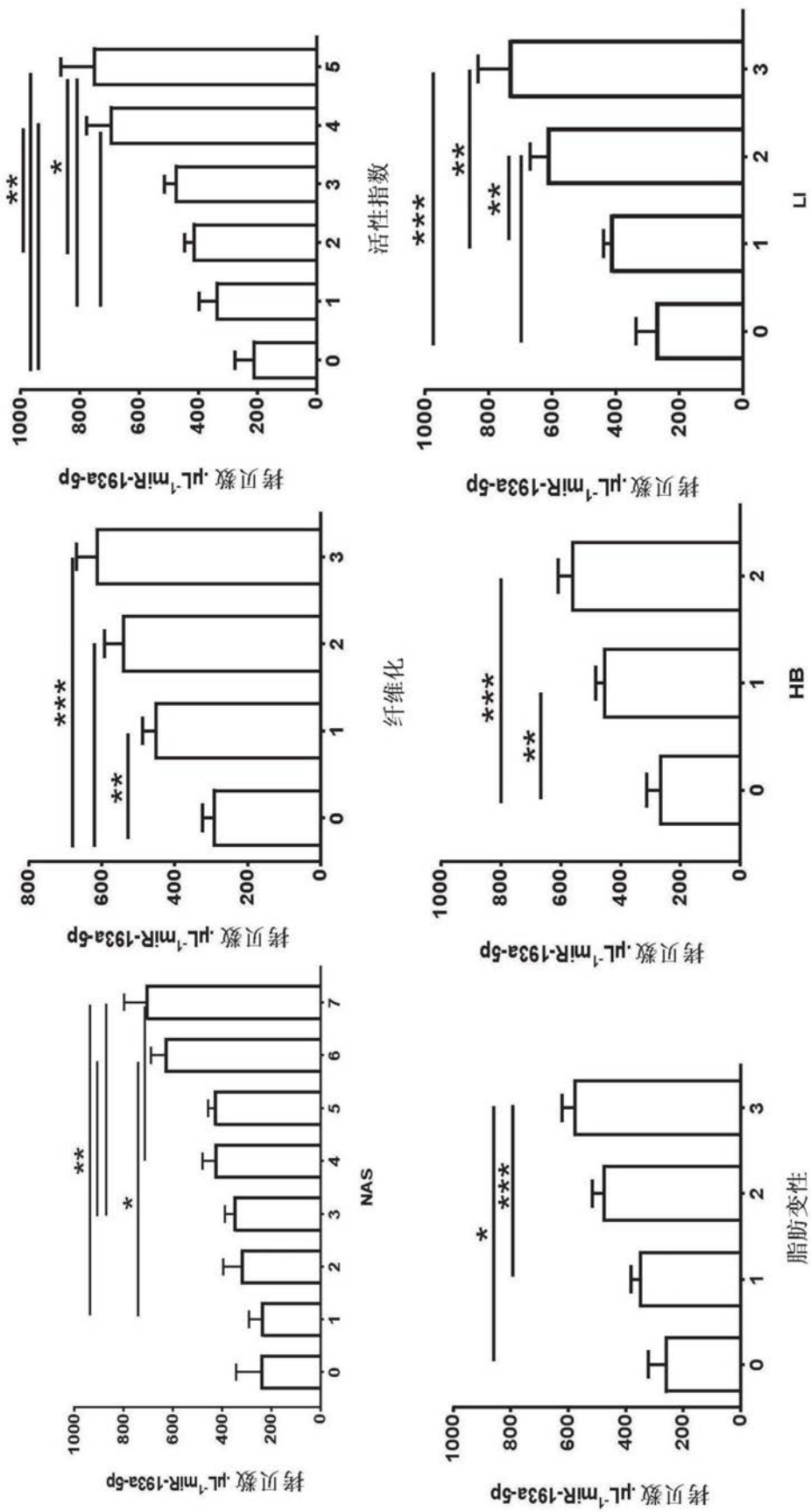


图10

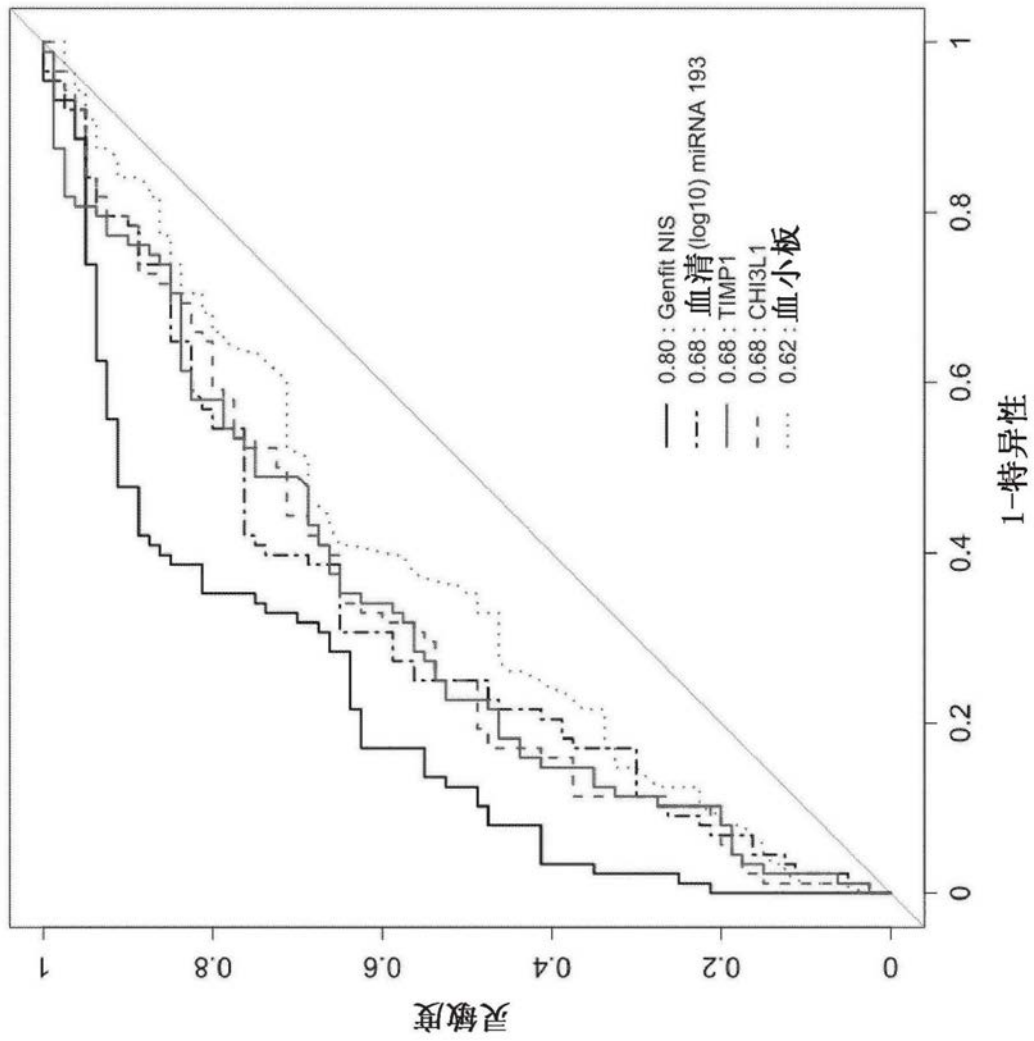
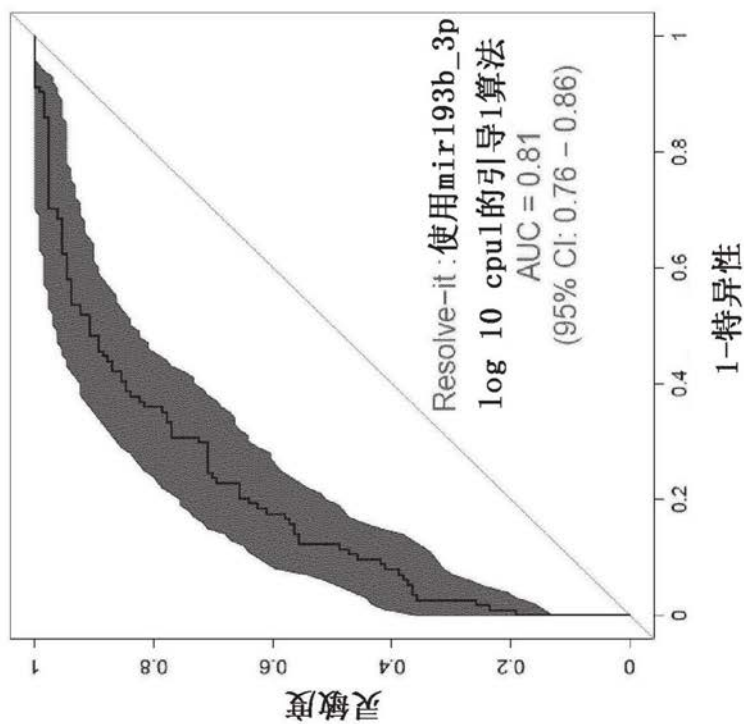


图11

B: RESOLVE-IT



A: GOLDEN-DIAG

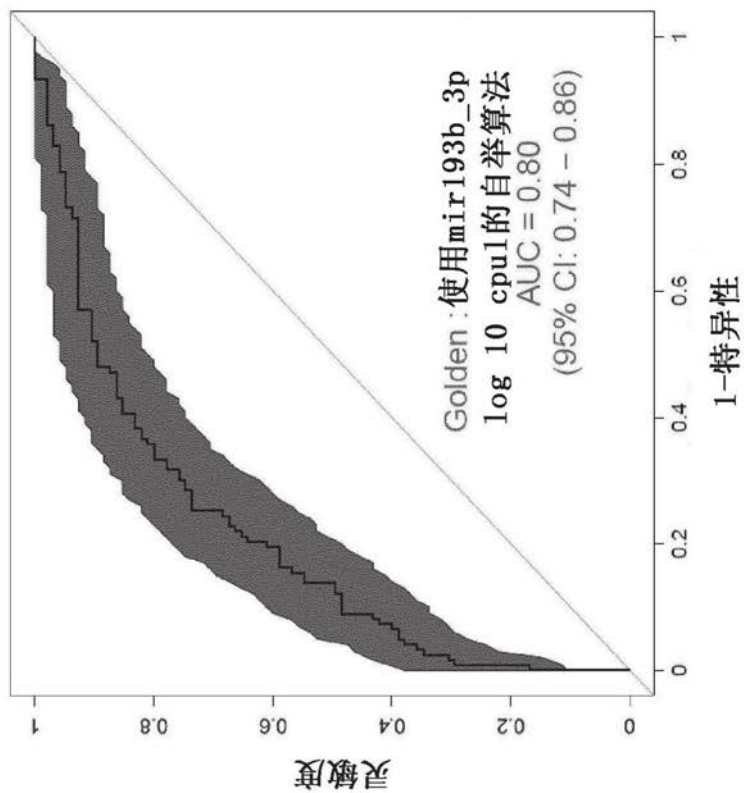


图12

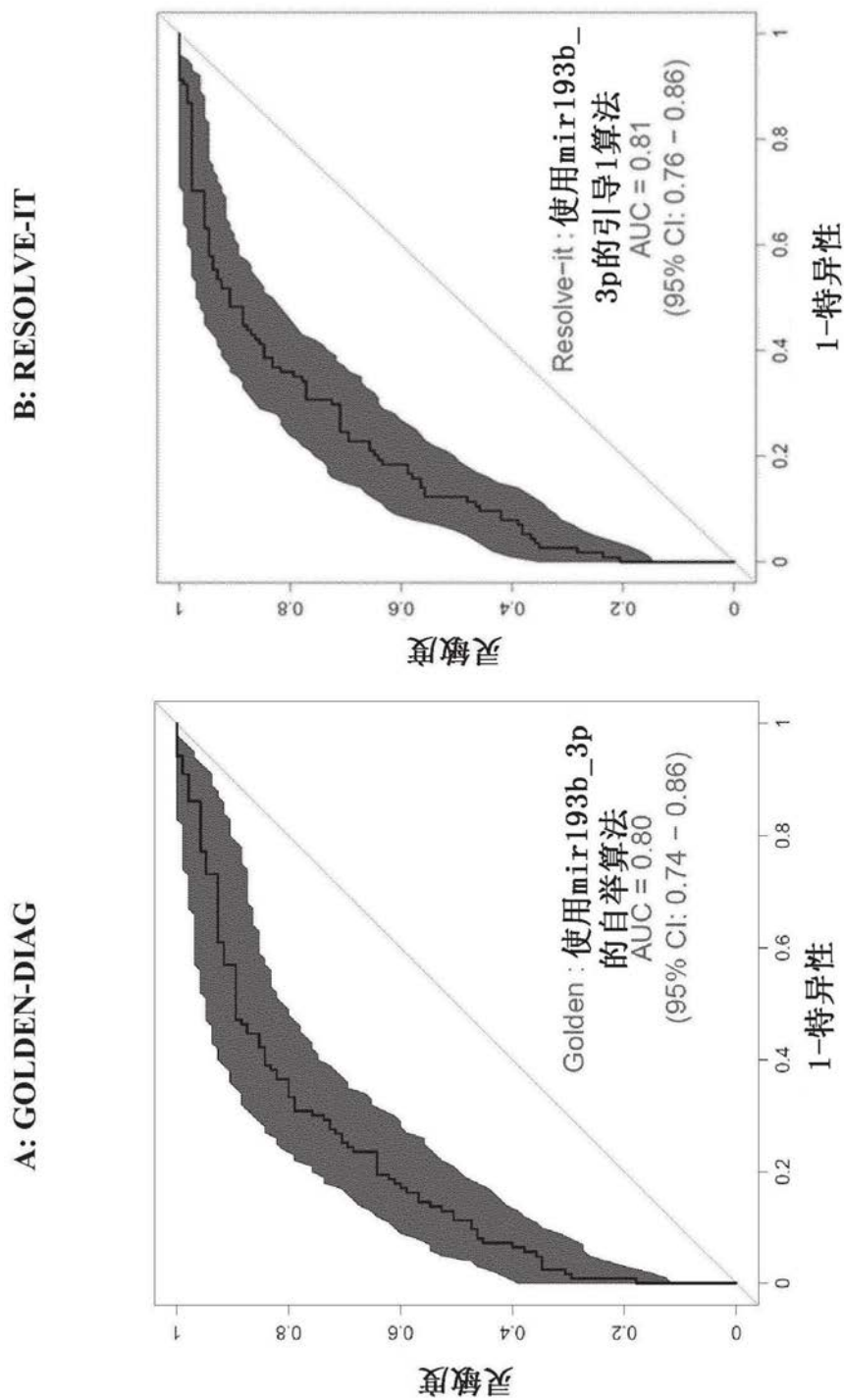


图13