

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0167935
(43) 공개일자 2024년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7037409(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년01월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7026295
원출원일자(국제) 2017년01월30일
심사청구일자 2022년01월27일
(85) 번역문제출일자 2024년11월08일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2017/050231
(87) 국제공개번호 WO 2017/153710
국제공개일자 2017년09월14일
(30) 우선권주장
1603967.9 2016년03월08일 영국(GB)

(71) 출원인
더 유니버시티 오브 버밍햄
영국, 웨스트 미들랜드 비15 2티티, 버밍햄, 에지
배스턴
(72) 발명자
벨리 안토니오
영국, 이스트 웰로우 햄프셔 에스오51 6비엔, 위
단위슬 로드, 브락엔덴
디 피에트로 발렌티나
영국, 웨스트 미들랜드 비29 6큐제이, 웨스트 미
들랜드, 78 크리스토퍼 로드
(74) 대리인
특허법인한얼

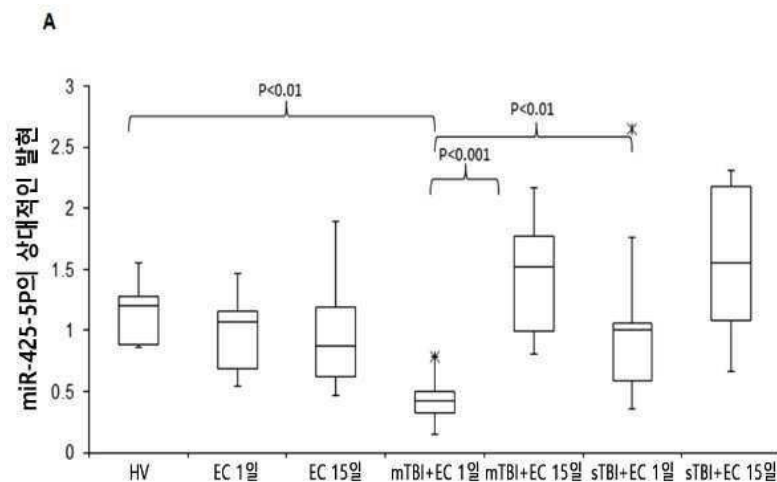
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 외상성 뇌 손상의 바이오마커

(57) 요약

대상체에서 외상성 뇌 손상(TBI)을 진단 및/또는 모니터링하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체로부터의 유체 샘플에서 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 것을 포함한다. miRNA는 miR-425-5p, miR-502, miR-21 및 miR-335로부터 선택될 수 있다. 상기 방법은 대상체가 경증-TBI 또는 중등도-내지-중증의 TBI를 앓고 있는지 여부를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 또한, TBI를 진단 및/또는 모니터링하기 위한 센서 요소, 검출 시스템, 조성물 및 키트가 제공되며, TBI가 의심되는 대상체에 대한 적절한 치료를 결정하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/178 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서의 외상성 뇌손상(traumatic brain injury (TBI))의 진단 또는 모니터링에 대한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 대상체로부터 분리된 유체 샘플(fluid sample) 내 miR-335의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은,

miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 방법은 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, 및 miR-671-3p, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 방법은 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, 및 miR-let-7g, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 방법은 let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, 및 miR-652-3p, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 방법은 miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 방법은 miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 TBI는 경증의 TBI (mTBI)이고 추가로 결정되는 miRNA는 miR-425-5p인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 소정의 임계치 이하이거나 기준치에 비하여 감소한 miR-425-5p의 수준은 대상체가 mTBI를 보유함을 나타내는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 TBI는 중증의 TBI (sTBI)이고 추가로 결정되는 miRNA는 miR-21인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 소정의 임계치를 초과하거나 기준치에 비하여 증가한 miR-21 및 miR-335의 수준은 대상체가 sTBI를 보유함을 나타내는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 방법은,

(i) miR-335; 및

(ii) miR-425-5p인 제2 miRNA의 수준을 결정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, (i) 소정의 임계치 이하이거나 기준치에 비하여 감소한 miR-425-5p의 수준, 및 (ii) 소정의 임계치를 초과하거나 기준치에 비하여 증가한 miR-335의 수준 모두는 대상체가 임의의 중증도의 TBI를 보유함을 나타내는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 방법은 TBI 진단에 정보를 제공하기 위한 것이고 상기 miRNA의 수준은 손상(injury) 이후 48시간 이내에 상기 대상체로부터 획득된 유체 샘플에서 결정되는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체 샘플은 타액(saliva), 혈액(blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum)을 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 유체 샘플은 타액인 방법.

청구항 17

TBI를 진단 또는 모니터링하는 검출 시스템용 센서 요소로서, miR-335에 특이적인 프로브(probe)로 기능화된 기관(substrate)을 포함하는 센서 요소.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 프로브는 핵산을 포함하는 센서 요소.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 핵산은 miR-335 서열과 상보적인 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 센서 요소.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 기관은 금속, 플라스틱, 유리, 실리카, 규소, 흑연(graphite) 또는 그래핀(graphene),

또는 이들의 임의의 조합으로부터 형성되는 센서 요소.

청구항 21

TBI를 진단 또는 모니터링하기 위한 검출 시스템으로서,

- 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따르는 센서 요소; 및
- 프로브에 대한 miR-335의 결합을 검출할 수 있는 검출 장치를 포함하는 검출 시스템.

청구항 22

대상체로부터의 유체 샘플에서 외상성 뇌 손상(TBI)을 진단 또는 모니터링하는 방법에서 사용하기 위한 키트(kit)로서, miR-335에 특이적인 적어도 하나의 프로브를 포함하는 키트.

청구항 23

대상체에게 TBI 완화용 요법(therapy)을 시행하는 것이 적절한지 여부를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 대상체로부터 분리된 유체 샘플 내 miR-335의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

TBI를 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체의 적절한 치료를 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 대상체로부터 분리된 유체 샘플 내 miR-335의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

대상체에서 외상성 뇌 손상(TBI)를 진단 또는 모니터링하는 방법에서 사용하기 위한 조성물로서, miR-335에 특이적인 프로브를 포함하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 복수의 프로브를 포함하는 조성물.

청구항 27

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 센서 요소.

청구항 28

제21항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 이루어진 군으로부터

선택되는 것인 검출 시스템.

청구항 29

제22항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 30

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 방법은,

miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제25항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-21, miR-let-7g, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p, 및 miR-629, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 32

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 센서 요소.

청구항 33

제21항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 검출 시스템.

청구항 34

제22항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

청구항 35

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 방법은,

miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제25항에 있어서, 표적 miRNA에 특이적인 적어도 하나의 추가 프로브를 더 포함하고, 상기 miRNA는 miR-425-5p 및 miR-21, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 외상성 뇌 손상 (traumatic brain injury (TBI))을 진단 및/또는 모니터링하기 위한 조성물, 키트 (kit), 시스템 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 miRNA 바이오마커를 사용한 TBI의 진단 및 모니터링에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 외상성 뇌 손상 (TBI)은 서양 국가들에서 45세 미만의 사망 및 장애(disability)를 유발하는 원인이다. 의료비 부담 및 사회 비용은 지속적으로 증가할 것으로 예상되고, 2020년까지 세계보건기구(World Health Organization)는 TBI가 전 세계적으로 제 3의 주요 장애 원인이 될 것이라고 예측하고 있다.

[0003] 다수의 연구에도 불구하고, TBI의 중증도를 평가하고 회복을 예측하기 위한 신뢰할만한 바이오마커는 발견되지 않았다. 이는 특히 경증의 TBI (mTBI)의 경우에 사실이고, 현재 임상 실시에서 평가하기 어려운 상태로 남아있다. TBI 환자는 초기에 글래스고 코마 스코어 (Glasgow Coma Score (GCS)) 및 신경촬영법 기술(neuroimaging technique)에 의해 평가되지만, 이는 값비싼 장비를 필요로 하고, 현재의 진단 도구는 뇌 손상의 실제 중증도를 정확하게 정의하고 정량화할 수 있는 능력이 부족하므로, 대부분의 경우 (75~90%)를 대표하는, mTBI가 아닌 중증을 쉽게 감지하도록 유도한다.

[0004] mTBI의 정확한 진단은 특히 운동선수, 군인 및 어린이와 같은 환자에게 중요하고, 이들은 반복적인 mTBI의 위험이 크고 심각한 손상 및 심지어 사망의 결과를 야기하는 반복적인 TBI의 상승 효과가 있는 2차 충격 증후군(SIS)으로 알려진 뇌 손상의 치명적인 형태를 지닌다. 따라서 TBI의 조기 진단 및 중증도의 평가는 환자의 웰빙(wellbeing) 및 궁극적으로 생명을 구하는 데 결정적이다.

[0005] TBI 바이오마커에 대한 탐구는 미디어에서 스포츠 뇌진탕의 증가된 프로파일(profile)로 인하여 상당한 자극을 받고 있다. 지난 몇 년 동안 다수의 연구가 피치사이드(pitch-side) 또는 스포츠 클리닉을 만드는 임상의 의사 결정을 지원할 수 있는 바이오마커에 집중하였다. 그러나, 문헌에 보고된 단백질 바이오마커는 특이성 또는 민감성이 없거나, 또는 손상 후 얼마동안 검출할 수 없다. 이는 TBI의 하나의 형태인, 뇌진탕(concussion) 후 뇌로부터 유래한 화합물은 단지 극 소량으로만 방출되고 혈액-뇌 장벽은 대부분 폐쇄된 상태로 남아있는 사실에 기인할 수 있다.

[0006] 마이크로RNA(miRNA)는 표적 유전자의 3'UTR 내 부분적으로 상보적인 부위와 결합하여 mRNA의 분해, 번역 억제 또는 둘 다를 유도하는 약 22개의 뉴클레오타이드의 고도로 보존된 비-코딩 RNA 분자의 풍부한 부류이다. 인간 게놈은 2,000개 이상의 miRNA를 암호화하고 모든 유전자의 약 60%를 표적으로 할 수 있다. 그러나, miRNA가 풍부한 함에도 불구하고, 이들의 생체분자의 기능 및 병리학에 대한 개입은 아직 완전히 밝혀지지 않고 있다. 이들은 세포 주기, 세포 대사, 세포 사멸 및 번역 반응을 포함하는 다수의 생물학적 과정에서 중심적인 역할을 담당하고, 암 및 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)을 포함하는 다른 질환 상태의 검출(detection), 동정(identification) 및 분류(classification)를 위한 잠재적인 바이오마커로서 임상 연구에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0007] 본 발명은 상기 문제점을 염두에 두고 고안되었다.

발명의 내용**발명의 요약**

- [0008] **발명의 요약**
- [0009] 본 발명은 대상체에서 외상성 뇌 손상 (TBI)을 진단 또는 모니터링하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 제1의 실시양태에 따르면, 대상체에서 외상성 뇌 손상(TBI)를 진단 및/또는 모니터링하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 대상체로부터의 샘플 내 적어도 하나의 miRNA의 존재를 검출 및/또는 이의 수준을 결정하는 것을 포함한다.
- [0011] 적어도 하나의 miRNA(본원에서 "miR"이라고도 지칭됨)는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p; miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p 및 miR-629로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 miRNA는 목적 miRNA 또는 표적 miRNA로 본원에서 지칭될 수 있다.
- [0012] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, 및 miR-671-3p로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 상기 마이크로 RNA는 모든 TBI 환자(경증 또는 중증)에서 발현되는 바이오마커로 밝혀졌다.
- [0013] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0014] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA는 let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, and miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA는 miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p 및 miR-629로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 의심의 여지를 피하기 위해, 본원에서 사용된, "적어도 하나의 miRNA는 miRNA들의 군으로부터 선택된다"는 진단적, 예후적, 또는 치료적 목적으로 수행되는 것은 나열된 miRNA 중 임의의 하나 또는 나열된 miRNA 중 임의의 다수(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 나열된 miRNA)와 함께 수행될 수 있는 지 여부의, 질문에 대한 방법을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 나열된 miRNA 중 임의의 하나 또는 그 이상이 명시적으로 제외될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 miR-335를 제외한 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, 및 miR-let-7g의 어떠한 조합물의 수준을 검출 및/또는 평가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 하나의 실시양태에 따르면, 대상체에서 외상성 뇌 손상(TBI)을 진단 및/또는 모니터링하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 대상체로부터의 샘플 내 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 상기 miRNA는 miR-425-5p; miR-502; miR-21; 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 외상성 뇌 손상은 외력(external force)이 외상으로 뇌를 손상시킬 때 발생한다. 예를 들어, 중증도(severity), 손상의 유형 및 예후(prognosis)에 기초하여 TBI를 분류하기 위한 상이한 시스템이 있다. TBI를 분류하기 위해 사용되는 가장 일반적인 시스템은 글래스고우 코마 스케일(Glasgow Coma Scale (GCS))이고, 이는 자극에 대한 구두(verbal), 운동(motor), 및 눈을 뜨는 반응(eye-opening reaction)에 기초하여 3-15의 척도로 사람의 의식 수준을 평가한다. 일반적으로, 13 또는 그 이상의 GCS 점수를 갖는 TBI는 경증으로, 9-12는 중등도로, 8 또는

그 이하는 중증으로 정의된다. 또 다른 시스템, 마요 분류 체계(Mayo Classification System)는, 명확한 중등도-중증의 TBI, 개연성 있는 경증의 TBI, 및 가능한 TBI를 포함하는 3가지 주요 분류를 가진다. 다수의 기준이 의식 상실(loss of consciousness), 외상 후 기억 상실(post-traumatic amnesia), 두개골 골절(skull fracture), 및 경막하부혈종(subdural haematoma), 대뇌 타박상(cerebral contusion), 및 출혈성 타박상(hemorrhagic contusion)을 포함하는 신경방사선학적 이상의 증거를 포함하는 각각의 진단에 사용된다. GCS 또는 Mayo 시스템을 사용하는 TBI의 분류는 당해 기술분야에서 통상의 기술자에게 공지될 것이다.

[0019] 본원에서 사용된, "경증의", "중등도" 및 "중증의" TBI에 대한 언급은 GCS에 따라 이루어진다. 본원에서 "중등도-내지-중증의" TBI에 대한 언급은 GCS에 따라 중등도 및 중증의 TBI를 모두 포함한다.

[0020] 본 발명의 바이오마커를 이용한 TBI의 진단 및/또는 모니터링하는 것은 하기의 상황: 환자가 신경외과 전문의가 있는 시설, 주요 외상 센터 또는 지역 외상 유닛으로 이송되어야만 하는지 여부를 결정하기 위해 구급대원에 의한 초기 평가의 일부분으로서; CT 뇌 스캔의 필요성을 포함한, 적절한 치료를 결정하기 위해 병원의 응급실에서; 피치-사이드(pitch-side), 경기로부터 운동선수를 제거하고 병원으로 운동선수를 이송할 필요성을 평가하기 위한 결정을 지원하기 위한, 피치-사이드; 뇌진탕 사건을 확인하고 경기 복귀와 관련된 의사 결정을 가능하게 하기 위한, 스포츠 클리닉; 구조팀을 파견하고 희생자를 대피시키기 위한 필요성을 결정하기 위한, 전투 상황을 포함하는, 다양한 상황에서 임상적 의사 결정 및 치료 요법을 지원할 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명이 특히 이익을 제공하는 대상체는 사고 희생자, 스포츠 선수 및 군인을 포함한다.

[0021] 임의의 경우에, 특히 대상체가 TBI에 대한 위험이 더 큰 경우(예를 들어, 대상체가 전문적인 운동선수이거나 또는 군대에 입대한 경우), 샘플은 임의의 알려진 또는 최근의 외상 전(예를 들어, 스포츠 경력의 시작 또는 군대 배치 이전)에 대상체로부터 취득될 수 있고, 임의의 목적 miRNA는 대상체가 가능한 TBI를 경험한, 그 시점 또는 그 후에 평가될 수 있다. 따라서 이러한 샘플은 내부 기준 표준(internal reference standard)을 제공할 수 있다.

[0022] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0023] TBI는 경증의 TBI(mTBI), 중등도 TBI(moderate TBI) 또는 중증의 TBI(sTBI)일 수 있다. 일부 구현예에서, TBI는 중등도-내지-중증의 TBI(m-sTBI)이다.

[0024] 샘플 내 miRNA 또는 각각의 miRNA의 수준은 정량적 또는 반-정량적으로 결정될 수 있다. "정량적으로"는, 샘플 내 miRNA 또는 각각의 miRNA의 절대량 또는 농도가 결정된다는 것으로 이해될 것이다. 이에 따라 샘플 내 miRNA 또는 각각의 miRNA의 절대량은 소정의 임계치(예를 들어, 예상된 정상 수준에 대한 공지된 문헌값), 건강한 대상체로부터 취득된 대조군 샘플 내 기준 miRNA의 수준, 또는 대상체로부터 취득된 샘플 내 기준 miRNA의 양과 비교될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 miRNA의 수준이 소정의 임계치 이하이거나, 또는 기준 또는 대조군 샘플에 비해 감소된 경우, TBI를 갖는 것으로 진단된다. 다른 구현예에서, 대상체는 miRNA의 수준이 소정의 임계치와 비교하여 증가된 경우 TBI를 갖는 것으로 진단된다.

[0025] "반-정량적으로"는, miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준은 기준과 관련하여 측정된다는 것으로 이해될 것이다.

[0026] 상기 기준은 불변 miRNA, 즉 건강한 대상체와 TBI를 갖는 대상체 사이에서 실질적으로 변하지 않는 발현 수준을 갖는 miRNA일 수 있다. 대상체는 miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준이 불변 miRNA의 수준에 비해 증가되거나 또는 감소되는 경우, TBI를 앓는 것으로 진단될 수 있다. 적합한 불변 miRNA는 miR-331, miR-223*, miR-23a-3p 및 miR148b-3p를 포함한다. miR-23a-3p 및 miR148b-3p는 타액(saliva)에서만 변하지 않는다.

[0027] 일부 구현예에서, 대상체로부터 취득된 샘플 내 miRNA 또는 각각의 miRNA의 수준은 대조군 샘플 내 수준, 기준 수준 또는 공지된 값보다 약 0.01배 내지 약 100배, 약 0.05배 내지 약 50배, 약 0.1배 내지 약 10배, 약 0.5배 내지 5배, 약 1.0 내지 3배, 또는 약 1.5배 내지 약 2.0배 더 낮거나 높을 수 있다.

[0028] 장치 또는 방법이 값을 창출하기 위해 사용된 경우, 본 발명자들은 명시된 값 및 사용된 장치 또는 방법에 내재하는 값의 임의의 변동을 포착하기 위해 용어 "약"으로 값을 인정할 수 있다. 값 또는 값의 범위가 구체적으로 공개되는 경우, "약"은 명시된 값 또는 범위의 플러스-또는-마이너스 10%를 의미할 수 있다. 예를 들어, 약 10분은 9-11분을 의미할 수 있다.

[0029] miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준을 결정하는 것은 miRNA를 증폭시키는 단계를 포

함한다. 일부 구현예에서, 전체 miRNA는 표준 기술, 예를 들어 miRNeasy 미니 키트(Qiagen)를 사용하여, 샘플로부터 먼저 분리될 수 있다. 이에 따라 목적 miRNA의 양은 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플 내 miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준은 PCR(중합효소 연쇄 반응)을 사용하여 결정된다. 예를 들어, 정량적 PCR은 miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준의 정량적 측정에 사용될 수 있다. PCR은 또한 샘플 내 miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준을 기준(예를 들어, 불변 miRNA)의 수준과 비교함으로써, 반-정량적 결정을 위해 사용될 수 있다.

[0030] 당해 기술분야에 통상의 기술자에게 공지될 것인, miRNA 검출 및/또는 정량화에 적합한 기술은, qPCR, miRNA 분석, 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing (NGS)), 및 다중화 miRNA 프로파일링 분석(multiplex miRNA profiling assay)을 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, miRNA 또는 각각의 목적 miRNA의 수준은 동일 계내 혼성화(*in-situ* hybridization), 예를 들어 miRNA에 특이적인 프로브(예를 들어, 표지된 프로브)를 사용하여 결정된다.

[0032] miRNA의 수준은 손상 직후(즉, 손상 후 1시간 미만)의 대상체로부터 수득된 샘플, 및/또는 손상 후 수시간 또는 수일 후에 하나 이상의 시점에서 수득된 샘플에서 측정될 수 있다. 따라서, miRNA 수준 내 변화는 TBI의 모니터링을 가능하게 하는 시간에 따라 검출될 수 있다. miRNA의 수준이 시간의 경과에 따라 변하는 경우, TBI를 모니터링하기 위해 본원에서 기술된 방법은 대상체의 치료 요법을 적절하게 유지 또는 조절하는 것을 포함하도록 확대될 수 있다.

[0033] 특정 miRNA 및 TBI의 유형에 따라서, 대상체 내 miRNA의 수준은 시간이 지남에 따라 유의하게 변할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 정확한 진단을 가능하게 하기 위해 손상 직후에 miRNA를 측정하는 것이 상대적으로 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA의 수준은 손상 후 72시간 이하, 48시간 이하, 36시간 이하, 24시간 이하, 12시간 이하, 6시간 이하, 4시간 이하, 2시간 이하 또는 1시간 이하의 대상체로부터 수득된 샘플에서 결정된다.

[0034] 일부 miRNA의 수준은 시간이 지남에 따라 실질적으로 안정하고, 이에 따라 손상 후 몇 시간, 며칠 또는 심지어 몇 주 후에 진단을 내리도록 허용하고 있다. 일부 구현예에서, miRNA의 수준은 손상으로부터 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5 또는 2일까지 대상체로부터 수득된 샘플에서 결정된다.

[0035] 일부 구현예에서, miRNA의 수준은 손상 직후(예를 들어, T=0시간에서), 손상 후 4-12시간, 손상 후 48-72 시간, 또는 손상 후 15일에 대상체로부터 수득된 샘플에서 결정된다.

[0036] 일부 구현예에서, TBI는 경증의 TBI (mTBI) 또는 중등도-내지-중증의 TBI (m-sTBI)이고 적어도 하나의 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, 및 miR-671-3p로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0037] 일부 구현예에서, TBI는 경증 TBI (mTBI)이고 miRNA는 miR-425-5p 및 miR-502로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대상체는 miR-425-5p 및/또는 miR-502의 수준이 소정의 임계치보다 낮은 것으로 결정되거나, 또는 기준에 비해 감소된 경우 mTBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, 소정의 임계치 이하이거나, 또는 기준에 비해 감소된 miR-425-5p 및/또는 miR-502의 수준은, 상기 수준이 손상 후 48시간 이내에 수득된 샘플에서 결정된 경우 진단상의 mTBI이다.

[0039] 일부 구현예에서, TBI는 중등도-내지-중증의 TBI (m-sTBI)이고 miRNA는 miR-21 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대상체는 miR-21 및/또는 miR-335의 수준이 소정의 임계치 이상으로 결정되거나, 또는 기준에 비해 증가된 경우 중등도-내지-중증의 TBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, 소정의 임계치 이상이거나, 또는 기준에 비해 증가된 miR-21 및/또는 miR-335의 수준은, 상기 수준이 손상 후 15일까지 수득된 샘플에서 결정된 경우 진단상의 중등도-내지-중증의 TBI이다.

[0041] 일부 구현예에서, TBI는 중등도-내지-중증의 TBI (m-s TBI)이고 적어도 하나의 miRNA는 miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p 및 miR-629로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 대상체는 miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642 및/또는 miR-99a의 수

준이 소정의 임계치 이상으로 결정되거나, 또는 기준에 비해 증가된 경우 m-sTBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0043] 대상체는 miR-192, miR-429, miR-520D-3p 및/또는 miR-629의 수준이 소정의 임계치보다 낮은 것으로 결정되거나, 또는 기준에 비해 감소된 경우 m-sTBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0044] miRNA는 TBI를 진단하기 위해 개별적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 스포츠 뇌진탕(concussion)에서, miR-502 또는 miR-425-5p는 외상성 뇌 손상이 발생했음을 확인하는 데 사용될 수 있었다.

[0045] 따라서, 본 발명의 추가의 실시양태는 TBI의 중증도를 결정하는 방법이고, 상기 방법의 단계는 대상체를 시간에 따라 모니터링하기 위해 반복될 수 있다. 단일 miRNA에 대한 양성 결과 (예를 들어, 단일 miRNA의 수준이 소정의 임계치 이상/이하로 결정되거나, 또는 기준에 비해 증가/감소됨)가 TBI의 중증도를 결정하기 위해 충분하다는 것을 알게 될 것이다. 예를 들어, miR-425-5p의 수준이 소정의 임계치보다 낮거나, 또는 기준에 비해 감소된 경우, TBI의 중증도는 경미한 것(mTBI)으로 결정된다. 그러나, TBI의 중증도의 평가를 용이하게 하기 위해 상이한 miRNA(예를 들어, 테스트 패널에서)를 조합하는 것이 편리할 수 있다.

[0046] 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플 내 복수의 (예를 들어, 2개 또는 그 이상의) miRNA의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서 2개 또는 그 이상의 miRNA는 miR-425-5p; miR-502; miR-21; 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0047] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기의 수준을 결정하는 단계를 포함한다:

[0048] (i) miR-425-5p 및 miR-502로부터 선택된 제 1의 miRNA; 및

[0049] (ii) miR-21 및 miR-335로부터 선택된 제2의 miRNA.

[0050] 대상체는 miR-425-5p 또는 miR-502의 수준이 소정의 임계치보다 낮게 결정되거나, 또는 기준에 비해 감소된 경우, 또는 miR-425-5p 또는 miR-502의 수준이 소정의 임계치 이상으로 결정되거나, 또는 기준에 비해 증가된 경우, TBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다.

[0051] 일부 구현예에서, TBI는 경증의 TBI (mTBI) 이고 적어도 하나의 miRNA는 let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miRmmiR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-424-5p, miR-30a-5p, miR-107, miR-135b-5p, miR-199b-5p, miR-324-5p, 및 miR-652-3p, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대상체는 기준과 비교하여 miRNA의 수준에서 적어도 0.5, 적어도 1.0, 적어도 1.5, 적어도 2.0, 적어도 2.5, 적어도 3.0, 적어도 3.5 또는 적어도 4.0의 배수 차이가 있는 경우 mTBI를 갖는 것으로 진단될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 마이크로RNA(들)의 수준(들)이 기준과 비교하여 증가되는 경우 대상체는 mTBI를 갖는 것으로 진단된다.

[0052] 본원에서 기술된 miRNA에 대한 서열 및 등록 번호는 표 1에 제공되어 있다:

표 1

[0053]

miRNA	서열	miRBase 등록번호
hsa-miR-21	uagcuuaucaugacugauguuga (서열번호 1)	MIMAT0000076
hsa-miR-425-5p	aaugacacgaucacuccguuga (서열번호 2)	MIMAT0003393
hsa-miR-502-5p (hsa-miR-502로도 공지됨)	auccuugcuauccugggugcua (서열번호 3)	MIMAT0002873
hsa-miR-335-5p (hsa-miR-335로도 공지됨)	ucaagagcaauaacgaaaaugu (서열번호 4)	MIMAT0000765
hsa-miR-301b-3p (hsa-miR-301b로도 공지됨)	cagugcaugauauugucaaaagc (서열번호 5)	MIMAT0004958
hsa-miR-184	uggacgggagaacugauaaggu (서열번호 6)	MIMAT0000454
hsa-miR-505-3p (hsa-miR-505로도 공지됨)	cgucaacacuugcugguuuccu(서열번호 7)	MIMAT0002876
hsa-miR-203a-3p (hsa-miR-203a, hsa-miR-203로도 공지됨)	gugaaauguuuaggaccacuag (서열번호 8)	MIMAT0000264
hsa-miR-654-3p	uaugucugcugaccauacccuu (서열번호 9)	MIMAT0004814
hsa-miR-655-3p (hsa-miR-655로도 공지됨)	auaaauacaugguuaaccucuuu (서열번호 10)	MIMAT0003331
hsa-miR-331-3p (hsa-miR-331로도 공지됨)	gccccugggccuauccuagaa (서열번호 11)	MIMAT0000760

hsa-miR-223-5p (hsa-miR-223*로도 공지됨)	cguguauuuugacaagcugaguu (서열번호 12)	MIMAT0004570
hsa-miR-let-7g	ugagguaguaguuguacaguu (서열번호 13)	MIMAT0000414
hsa-miR-126* (hsa-miR-126-5p로도 공지됨)	cauuauuacuuuugguacgcg (서열번호 14)	MIMAT0000444
hsa-miR-193a-5p	ugggucuuuugcggcgagauga (서열번호 15)	MIMAT0004614
hsa-miR-144* (hsa-miR-144-5p로도 공지됨)	ggauaucaucauauacuguaag (서열번호 16)	MIMAT0004600
hsa-miR-190 (hsa-miR-190a 또는 hsa-miR-190a-3p로도 공지됨)	cuauauaucaaacauauuccu (서열번호 17)	MIMAT0026482
hsa-miR-194 (hsa-miR-194-5p로도 공지됨)	uguaacagcaacuccaugugga (서열번호 18)	MIMAT0000460
hsa-miR-365 (hsa-miR-365a-3p로도 공지됨)	uaaugcccccuaaaaauccuuau (서열번호 19)	MIMAT0000710
hsa-miR-590-3p(hsa-miR-590로도 공지됨)	uaauuuuauaguauaagcuagu (서열번호 20)	MIMAT0004801
hsa-miR-624	uaguaccaguaccuuguguuca (서열번호 21)	MI0003638
hsa-miR-625* (hsa-miR-625-3p로도 공지됨)	gacuauagaacuuccccuca (서열번호 22)	MIMAT0004808
hsa-miR-671-3p	uccgguucucagggcuccacc (서열번호 23)	MIMAT0004819
hsa-let-7c-5p	ugagguaguagguuguauugguu (서열번호 24)	MIMAT0000064
hsa-let-7i-5p (hsa-let-7i로도 공지됨)	ugagguaguaguuuugucuguu (서열번호 25)	MIMAT0000415
hsa-miR-142-3p	uguaguguuuuccuacuuuugga (서열번호26)	MIMAT0000434
hsa-miR-148a-3p (hsa-miR-148a로도 공지됨)	ucagugcacuacagaacuuugu (서열번호 27)	MIMAT0000243
hsa-miR-15b-5p (hsa-miR-15b로도 공지됨)	uagcagcacaucaugguuuaca (서열번호 28)	MIMAT0000417
hsa-miR-16-5p (hsa-miR-16로도 공지됨)	uagcagcacguaaaauuuggcg (서열번호 29)	MIMAT0000069
hsa-miR-181a-5p (hsa-miR-181a로도 공지됨)	aacauucaacgcugucggugagu (서열번호30)	MIMAT0000256
hsa-miR-20a-5p (또한 공지된 hsa-miR-20;hsa-miR-20a로도 공지됨)	uaaagugcuauauagucagguag (서열번호31)	MIMAT0000075
hsa-miR-20b-5p (hsa-miR-20b로도 공지됨)	caaagugcucauagucagguag (서열번호32)	MIMAT0001413
hsa-miR-221-3p (hsa-miR-221로도 공지됨)	agcuacauugucugcuggguuuc (서열번호33)	MIMAT0000278
hsa-miR-24-3p (hsa-miR-24로도 공지됨)	uggcucaguucagcaggaacag (서열번호34)	MIMAT0000080
hsa-miR-27b-3p (hsa-miR-27b로도 공지됨)	uucacaguggcuaguucugc (서열번호35)	MIMAT0000419
hsa-miR-29a-3p (hsa-miR-29a로도 공지됨)	uagcaccaucugaaucgguua (서열번호36)	MIMAT0000086
hsa-miR-29c-3p (hsa-miR-29c로도 공지됨)	uagcaccauuugaaaucgguua (서열번호37)	MIMAT0000681
hsa-miR-30a-5p (hsa-miR-30a로도 공지됨)	uguaaaacauccugacuggaag (서열번호38)	MIMAT0000087
hsa-miR-107 (hsa-miR-107-10으로도 공지됨)	agcagcauuguacagggcuauca (서열번호39)	MI0000114
hsa-miR-135b-5p (hsa-miR-135b로도 공지됨)	uauggcuuuuauuccuauuguga (서열번호40)	MIMAT0000758
hsa-miR-199b-5p(hsa-miR-199b로도 공지됨)	cccaguguuuagacuaucuguuc (서열번호41)	MIMAT0000263
hsa-miR-324-5p	cgcauccccuagggcauuggugu (서열번호42)	MIMAT0000761
hsa-miR-652-3p (hsa-miR-652로도 공지됨)	aauggcgccacuagguugug (서열번호43)	MIMAT0003322

hsa-miR-424-5p(hsa-miR-424로도 공지됨)	cagcagcaauucauguuuugaa (서열번호44)	MIMAT0001341
hsa-miR-10a (hsa-miR-10-5p로도 공지됨)	uaccuguagauccgaauugug (서열번호45)	MIMAT0000253
hsa-miR-132 (hsa-miR-132-3p로도 공지됨)	uaacagucuacagccauggucg (서열번호46)	MIMAT0000426
hsa-miR-223 (hsa-miR-223-3p로도 공지됨)	ugucaguuuugcaaaauaccca (서열번호47)	<u>MIMAT0000280</u>
hsa-miR-143 (hsa-miR-143-3p로도 공지됨)	ugagaugaagcacuguagcuc (서열번호48)	MIMAT0000435
hsa-miR-148b (hsa-miR-148b-3p로도 공지됨)	ucagugcaucacagaacuuugu (서열번호49)	MIMAT0000759
hsa-miR-18a (hsa-miR-18;hsa-miR-18a-5p로도 공지됨)	uaaggugcaucagucagauag (서열번호50)	MIMAT0000072
hsa-miR-192 (hsa-miR-192-5p로도 공지됨)	cugaccuaugaauugacagcc (서열번호51)	MIMAT0000222
hsa-miR-429	uaauacugucugguaaaaccgu (서열번호52)	MIMAT0001536
hsa-miR-618	aaacucuacuuguccuucugagu (서열번호53)	MIMAT0003287
hsa-miR-95 (hsa-miR-95-5p로도 공지됨)	ucaauaaaugucuguuauuu (서열번호54)	MIMAT0026473
hsa-miR-130a (hsa-miR-130a-3p로도 공지됨)	cagugcaauguuaaaagggcau (서열번호55)	MIMAT0000425
hsa-miR-152 (hsa-miR-152-5p로도 공지됨)	agguucugugauacacuccgacu (서열번호56)	MIMAT0026479
hsa-miR-27b (hsa-miR-27b-3p로도 공지됨)	uucacaguggcuaaguucugc (서열번호57)	MIMAT0000419
hsa-miR-301 (hsa-miR-301a-3p 또는 hsa-miR-301a로도 공지됨)	cagugcaauaguauugucaagc (서열번호58)	MIMAT0000688
hsa-miR-326	ccucugggccccuucccag (서열번호59)	MIMAT0000756
hsa-miR-345 (hsa-miR-345-5p로도 공지됨)	gcugacuccuaguccagggcuc (서열번호60)	MIMAT0000772
hsa-miR-361 (hsa-miR-361-5p로도 공지됨)	uuaucaagaauccagggguac (서열번호61)	MIMAT0000703
hsa-miR-422a	acuggacuuagggucaagc (서열번호62)	MIMAT0001339
hsa-miR-579 (hsa-miR-579-3p로도 공지됨)	uucauuugguauaaaccgcgauu (서열번호63)	MIMAT0003244
hsa-miR-642 (hsa-miR-642a-5p; hsa-miR-642로도 공지됨)	guccucuccaaaugugucuug (서열번호64)	MIMAT0003312
hsa-miR-99a (hsa-miR-99a-5p로도 공지됨)	aaccguagaucggaucuuug (서열번호65)	MIMAT0000097
hsa-miR-520D-3p (hsa-miR-520D로도 공지됨)	aaagugcuucucuuggugggu (서열번호66)	MIMAT0002856
hsa-miR-629 (hsa-miR-629-5p로도 공지됨)	uggguuuacguugggagaacu (서열번호67)	MIMAT0004810
hsa-miR-23a-3p (hsa-miR-23a로도 공지됨)	aucacauugccagggauuucc (서열번호68)	MIMAT0000078
hsa-miR-148b-3p (hsa-miR-148b로도 공지됨)	ucagugcaucacagaacuuugu (서열번호69)	MIMAT0000759

[0054] 편리하게도, 샘플은 대상체로부터 획득된 임의의 적절한 유체 또는 조직 샘플일 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 소변(urine), 타액(saliva), 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 정액

(semen), 배설물(faeces), 비강 면봉 샘플(nasal swab), 눈물(tears), 질 면봉 샘플(vaginal swab), 직장 면봉 샘플(rectal swab), 자궁 경관 도말(cervical smear), 조직 생검(tissue biopsy), 및 요도 면봉 샘플(urethral swab)으로 이루어진 군 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 유체 샘플이다. 적합하게는, 샘플은 소변, 타액, 혈액 및 가래(sputum)와 같이, 개인으로부터 용이하게 획득될 수 있는 것이다. 일부 구현예에서, 샘플은 타액, 혈액, 혈장 또는 혈청을 포함한다. 일부 구현예에서 샘플을 획득하는 공정은 본원에 기술된 본 발명의 일부를 형성하지 않는다는 것은 이해될 것이다.

- [0055] 일부 구현예에서, 샘플은 혈청을 포함하거나 또는 혈청으로 구성된다. 혈청은 실제적인 이점이 있을 뿐만 아니라, PCR 반응의 잠재적인 억제제인, 헤파린(heparin)과 같은 항응고제(anticoagulant) 또한 없다. 혈청은 또한 혈장과 비교하여, 용혈(haenolysis)에 의해 영향을 덜 받을 수 있다.
- [0056] 일부 구현예에서, 샘플은 타액이다. 타액은 전문적인 훈련 또는 의료 장비 없이, 환자(예를 들어, 피치-축, 또는 현장에서)로부터 용이하게 획득될 수 있다.
- [0057] 타액에서 mTBI를 나타내는 것으로 밝혀진 miRNA는: hsa-let-7ca-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-1421-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-340-5p, hsa-miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b is selected from the group consisting of -5p; miR-324-5p; 및 miR-652-3p를 포함한다.
- [0058] miRNA의 수준은 손상으로부터 대상체의 회복을 추적하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 초기 진단의 대안으로서 또는 추가적으로, TBI로부터 대상체의 회복을 모니터링하는 것을 포함한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 방법은 TBI를 모니터링하는 것을 포함하고 적어도 하나의 miRNA의 수준은 손상 후 적어도 2, 적어도 3, 적어도 5, 적어도 7, 적어도 10 또는 적어도 14일에 대상체로부터 획득된 샘플에서 결정된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA의 수준은 손상 후 15일에 대상체로부터 획득된 샘플에서 결정된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 miRNA의 수준은 손상 후 상이한 시간 간격에서 획득된 2개의 샘플에서 결정되며, 이에 따라 회복을 모니터링할 수 있도록 허용한다. 예를 들어, miRNA 수준은 손상 후 7일 및 14일, 또는 손상 후 5, 10 및 15일에 결정될 수 있었다. 정상으로의 miRNA 수준의 복귀는 TBI로부터의 대상체의 회복을 나타낼 수 있다.
- [0060] 일부 구현예에서, 대상체는 miR-425-5p 및/또는 miR-502의 수준이 더 이상 소정의 임계치 이하이거나 또는 더 이상 기준에 비해 감소되지 않은 경우 mTBI로부터 회복된 것으로 결정된다.
- [0061] 일부 구현예에서, 대상체는 miR-21 및/또는 miR-335의 수준이 소정의 임계치를 더 이상 초과하지 않거나 또는 기준에 비해 증가되지 않은 경우 중등도-내지-중증의 TBI로부터 회복된 것으로 결정된다.
- [0062] TBI를 앓고 있는 대상체의 진단, 및 특히 경증의 TBI 또는 중등도-내지-중증의 TBI의 진단은 적절한 치료의 결정을 용이하게 할 수 있다. 따라서 본 발명은 의료 종사자, 예를 들어 의사, 임상사, 의료보조원, 및 심지어 비-의료 인력(예를 들어, 교사, 스포츠 코치, 군인)은 TBI를 갖는 것으로 의심이 되는 대상체에 대한 적절한 조치를 결정할 수 있는 테스트를 제공한다. 따라서 TBI를 갖는 것으로 결정된 대상체는 판정된 진단 결과로 가장 적절한 치료를 받을 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 추가로 TBI로 진단된 대상체에게 적절한 치료를 지시하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0063] TBI로 진단된 대상체는 추가로 예를 들어, CT 스캐닝(scanning)으로 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 병원에 입원된다. 일부 구현예에서, 중등도-내지-중증의 TBI는 배제될 수 있는 경우, 대상체는 평가를 위해 병원에 입원될 필요가 없을 수 있다. 중등도-내지-중증의 TBI를 갖는 것으로 진단된 대상체는 병원, 또는 신경 외상 전문의가 있는 전문 센터에 입원될 수 있다.
- [0064] 병원 환경 외부, 예를 들어 전투 중 또는 경기 중의 스포츠 경기에서, TBI(특히 mTBI)로 진단된 대상체는 즉시 경기 또는 전투로부터 제거될 수 있다. 대상체는 수여된 복귀에 따라 경기 또는 전투를 시작할 수 있다.
- [0065] 추가의 실시양태에서, TBI를 완화시키기 위한 요법을 대상체에게 시행하는 것이 적절한지 여부를 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은:
- [0066] 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계; 및
- [0067] 적어도 하나의 miRNA의 수준에 기초하여, TBI를 경감시키는 치료법을 시행하는 것이 적절한지의 여부를 결정하

는 단계를 포함한다.

- [0068] 명확하게 언급되지 않는 한, 대상체에게 치료법을 시행하는 단계는 청구된 방법의 일부를 형성하지 않는다는 것을 이해할 것이다.
- [0069] 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에게 적절한 치료를 시행하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 치료는 TBI를 경감시키기 위한 치료법을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 대상체에서 TBI를 진단 및 치료하는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 (a) 대상체로부터 샘플(예를 들어, 혈액, 혈장, 소변, 또는 타액의 샘플)을 수득하는 단계; (b) 하나 이상의 miRNA (본원에서 기술된 것들로부터 선택된 것)을 검출하는 단계; miRNA(들)의 수준(들)이 기준 표준(본원에서 기술된)과 상이한 경우 TBI를 갖는 것으로 환자를 진단하는 단계; 및 TBI를 위한 치료를 시행하는 단계를 포함한다.
- [0070] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 TBI를 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체에게 적절한 치료를 결정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체가 상기 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정함으로써 TBI를 갖는 지 여부를 식별하는 단계를 포함한다.
- [0071] 대상체가 TBI를 갖는 것으로 확인된 경우, 적절한 치료는 하기의 단계: 추가로 대상체를 검사하는 단계, 예를 들어 추가의 테스트 (예를 들어, 언어(verbal), 인지(cognitive), 운동(motor) 및/또는 광학(optical) 검사), CT 및/또는 MRI 스캐닝; 활동(예를 들어, TBI가 발생되었던 동안의 활동)으로부터 대상체를 제거하는 단계; 병원 또는 전문 클리닉에 대상체를 입원시키는 단계; 외과 수술하는 단계; 및 대상체에게 TBI를 경감시키기 위한 치료법을 시행하는 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0072] TBI를 경감시키는 치료법은 신경 보호제, 예를 들어 만니톨(mannitol) 및 고장 식염수(hypertonic saline)와 같은 대뇌 팽윤(cerebral swelling)을 치료하기 위한 약물, 및/또는 다른 신경 보호제의 사용, 예를 들어 고혈압 소생(hypertensive resuscitation)의 회피 및 진정제(sedation)의 사용을 포함할 수 있다.
- [0073] 일부 구현예에서, 대상체는 이들의 회복을 추적하기 위해 예를 들어 병원 또는 클리닉 설정에서, 연속적으로 모니터링될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 추가의 실시양태에 따라서, 대상체에서 표적 miRNA의 수준을 검출 및/또는 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계; 및 (b) 표적 miRNA에 특이적인 프로브와 샘플을 접촉시킴으로써 샘플에서 표적 miRNA의 수준을 검출 및/또는 결정하는 단계를 포함한다.
- [0075] 상기 샘플은 상기에서 정의된 바와 같이, 대상체로부터 수득된 임의의 적절한 유체 또는 조직 샘플일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 소변 또는 타액일 수 있다.
- [0076] 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플에서 2개 이상의 표적 miRNA의 수준을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 추가의 실시양태에 따르면, TBI 경감시키는 치료법은 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로 사용하기 위해 제공되고, 상기 대상체는 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정함으로써 TBI를 갖는 것으로 확인된다.
- [0078] 상기 표적 miRNA의 수준을 결정하는 단계는 프로브로 기능화된 기재(substrate), 예를 들어 프로브를 포함하는 칩(chip)과 상기 샘플을 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 기재 또는 칩은 상이한 표적 miRNA에 각각 특이적인, 다수의 프로브를 용이하게 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 대상체는 손상, 특히 두부 손상을 앓고 있을 수 있다. 상기 대상체는 TBI를 갖는 것으로 의심될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 손상 후 72시간 이하, 48시간 이하, 36시간 이하, 24시간 이하, 12시간 이하, 6시간 이하, 4시간 이하, 2시간 이하 또는 1시간 이내에 수득된다.
- [0080] 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 상기 치료는 하나 이상의 하기 단계: 추가로 대상체를 평가하는 단계, 예를 들어 추가로 테스트(예를 들어, 언어, 인지, 운동 및/또는 광학 검사), CT 및/또는 MRI 스캐닝; 대상체를 병원 또는 전문 클리닉에 입원시키는 단계; 및 TBI를 경감시키기 위한 치료법을 대상체에게 시행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 치료는 신경 보호제의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0081] 따라서, 여전히 추가의 실시 양태에서, 본 발명은 TBI를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은:
- [0082] 대상체로부터의 샘플에서 적어도 하나의 miRNA의 수준을 결정하는 단계; 및

- [0083] 적어도 하나의 miRNA의 수준이 mTBI를 나타내는 경우, mTBI에 대한 적절한 치료를 시행하는 단계; 또는
- [0084] 적어도 하나의 miRNA의 수준이 m-sTBI를 나타내는 경우, m-sTBI에 적절한 치료를 시행하는 단계를 포함한다.
- [0085] 상이한 치료 경로가 mTBI 및 m-sTBI를 위해 사용될 수 있다는 것은 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.
- [0086] mTBI에 대한 적절한 치료는 활동으로부터 대상체를 제거하는 것; 현장 또는 지역 사회에서의 치료; 밤새 입원하지 않고 병원에서 대상체를 추가로 평가하는 것(전형적으로 mTBI 환자는 두부 손상에 대한 조연과 함께 즉시 퇴원됨); 또는 관찰 기간(전형적으로 1-2일) 동안 병원에 입원하는 것을 포함할 수 있다. 대상체는 추가로 테스트(예를 들어, 언어, 인지, 운동 및/또는 광학 검사)를 사용하여 평가될 수 있다. CT 스캐닝은 일반적으로 의심되는 두개골 골절, 외상 후 발작(seizure), 국소 신경계 이상(focal neurological deficit), 반복되는 구토(vomiting), NICE 지침에 따르는, 초기 평가 시 13 미만(어린이의 경우 14 미만, 또는 1년 이하의 유아의 경우 15 미만)의 GCS 점수를 포함하는, 특정 징후가 있는 경우에만 필요시 된다.
- [0087] m-sTBI에 대한 적절한 치료는 MRI 또는 CT 스캐닝(특히 손상 후 1시간 이내); 병원에 입원(중환자실 입원 및/또는 신경외과 시설이 있는 전문 클리닉 또는 주요 외상 센터로의 이전을 포함할 수 있음); 신경 모니터링; 외과 수술; TBI를 경감시키기 위한 치료법을 시행하는 것, 예를 들어 신경 보호제, 예를 들어 만니톨 및 고장 식염수와 같은 대뇌 팽윤을 치료하기 위한 약물, 및/또는 다른 신경 보호 조치(measure)의 사용, 예를 들어 고혈압 쇼크의 회피 및 진정제의 사용을 포함할 수 있다.
- [0088] 따라서, 본 발명은 TBI를 갖는 대상체가 mTBI 또는 m-sTBI로 신속하게 계층화될 수 있게 하여, 이들이 가장 적절한 치료를 받을 수 있도록 한다.
- [0089] 본 발명의 추가의 실시양태에 따르면, TBI를 진단 및/또는 모니터링하기 위한 검출 시스템을 제공하며, 상기 검출 시스템은 표적 miRNA에 특이적인 프로브로 기능화된 기관을 포함하는 센서 요소를 포함한다. 상기 검출 시스템은 프로브에 표적 miRNA의 결합을 검출할 수 있는 검출 장치를 추가로 포함할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 여전히 또 다른 실시양태에 따르면, TBI를 진단 및/또는 모니터링하기 위한 검출 시스템을 사용하기 위한 센서 요소가 제공되며, 상기 센서 요소는 표적 miRNA에 특이적인 프로브로 기능화된 기재를 포함한다.
- [0091] 상기 센서 요소는 샘플(예를 들어 유체 샘플)을 수용하기 위한 샘플 부가 영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [0092] 상기 프로브는 목적 miRNA에 선택적으로 결합할 수 있다. 상기 기제는 복수의 프로브로 기능화될 수 있다. 상기 프로브는 모두 동일할 수 있고, 또는 2개 이상의 상이한 프로브가 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 기제는 제1의 miRNA에 특이적인 제1의 프로브로 기능화될 수 있고, 제2의 miRNA에 특이적인 제2의 프로브로 기능화될 수 있다. 제1 및 제2의 프로브는, 예를 들어 센서 요소에 상이한 부분 상에 함께 그룹화될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 대상체에서 외상성 뇌 손상(TBI)을 진단 및/또는 모니터링하는 방법에 사용하기 위한 조성물이 제공되고, 상기 조성물은 표적 miRNA에 특이적인 프로브를 포함한다. 상기 조성물은 나열된 miRNA 중 임의의 하나 또는 나열된 miRNA의 임의의 다수(예를 들어, 나열된 miRNA의 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상)를 포함할 수 있다.
- [0094] 일부 구현예에서, 상기 표적 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, miR-671-3p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p, miR-424-5p, miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p 및 miR-629로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0095] 일부 구현예에서, 표적 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g, miR-335, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625*, 및 miR-671-3p로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 마이크로RNA는 모든 TBI

환자(경증 또는 중증)에서 발현되는 바이오마커로 밝혀졌다.

- [0096] 일부 구현예에서, 표적 miRNA는 miR-505, miR-203, miR-654-3p, miR-655, miR-184, miR-301b, miR-425-5p, miR-502, miR-21, miR-let-7g 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0097] 일부 구현예에서, 표적 miRNA는 let-7c-5p, let-7i-5p, miR-142-3p, miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-181a-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-221-3p, miR-24-3p, miR-27b-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, and miR-424-5p; miR-30a-5p; miR-107; miR-135b-5p; miR-199b-5p; miR-324-5p; miR-652-3p로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0098] 일부 구현예에서, 표적 miRNA는 miR-10a, miR-132, miR-223, miR-143, miR-148b, miR-18a, miR-192, miR-429, miR-618, miR-95, miR-130a, miR-152, miR-194, miR-27b, miR-301, miR-326, miR-345, miR-361, miR-422a, miR-579, miR-642, miR-99a, miR-520D-3p 및 miR-629로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0099] 일부 구현예에서, 표적 miRNA는 miR-425-5p, miR-502, miR-21 및 miR-335로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0100] 프로브는 단백질(예를 들어, 항체) 또는 핵산과 같은 생물학적 분자를 포함할 수 있다. 상기 핵산은 표적 miRNA의 전장 서열의 상보체인 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 핵산은 표적 miRNA의 서열의 상보체인 서열과 100% 동일성을 갖는 서열을 포함한다(즉, 수용체(receptor)는 표적 miRNA 서열과 정확한 상보체인 핵산 서열을 포함한다).
- [0101] 프로브는 임의의 적합한 수단, 예를 들어 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 커플링 화학에 의해 기관의 표면에 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 프로브는 링커(linker)를 통해 기관의 표면에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 프로브는 기관 상에 프로브를 고정시키기 위한 부분(moiety), 또는 기관 상에서 링커에 프로브를 부착하기 위한 부분을 포함한다.
- [0102] 대안적으로 또는 부가적으로, 상기 프로브는 검출 가능한 표지(label)를 포함할 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는, 예를 들어, 방사성, 형광성, 발광성, 또는 항체-기질일 수 있다(예를 들어, 통상적인 사량체인 항체 또는 이의 검출 가능한 단편을 구성할 수 있다).
- [0103] 센서 요소의 기관은 임의의 적절한 재료로부터 형성될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 기관은 금속, 플라스틱, 유리, 실리카(silica), 규소(silicon), 그래파이트(graphite), 그래핀(graphene), 또는 이들의 임의의 조합으로부터 형성되거나 또는 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기관은 다중층을 포함한다. 예를 들어, 기관은 탄화 규소(silicon carbide) 또는 실리카의 층상에 그래핀의 표면 또는 층을 형성함으로써 제조될 수 있다. 그래핀 표면은 예를 들어 그래핀-산화물(GO) 또는 그래핀-아민(GA)과 같이, 화학적으로 변형될 수 있다. 에피택셜 성장(epitaxial growth) 및 승화 성장(sublimation growth)과 같은 그래핀 층을 형성하는 방법은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다.
- [0104] 편리하게도, 핵산을 포함하거나 또는 구성된 프로브는 아미드 커플링 시약(예를 들어, (0-(7-아자벤조트라이아졸-1-일)-N,N,N,N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HATU))을 사용하여, 링커를 통해 GO 표면에 부착될 수 있다. 핵산 프로브로 기능화된 표면을 포함하는 센서 요소는 이의 상보적인 miRNA를 선택적으로 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0105] 적합한 링커는 아닐린(aniline) 부분(또는 이의 유도체)을 포함할 수 있고, 벤조산(benzoic acid) 부분(또는 이의 유도체) 또는 에텐디아민(ethendiamine) 부분(또는 이의 유도체)을 포함할 수 있다. 아닐린 링커는 니트로벤젠 분자(또는 유도체)를 그래핀 표면에 부착시키고(예를 들어, 디아조늄염(diazonium salt)을 사용하여), 니트로벤젠을 아닐린으로 환원시킴으로써 형성될 수 있다. 이어서, 아닐린의 아민기가 프로브에 부착하기 위해 사용될 수 있다. 유사하게도, 디아조늄염(예를 들어, 4-벤조산 디아조늄 테트라플루오로보레이트)은 벤조산 또는 벤조산 유도체를 그래핀 표면에 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 에탄디아민(ethanediamine) 부분은 카복실화 그래핀 또는 그래핀 산화물에 부착될 수 있다.
- [0106] 센서 요소는 테스트 스트립 내 포함될 수 있다. 상기 테스트 스트립은 일회용(disposable)일 수 있다.
- [0107] 검출 장치는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 적합한 수단, 예를 들어 전기 임피던스 내 변화, 수소 이온 농도의 변화, 또는 혼성화로 인한 구조의 변화를 검출함에 의해 수용체에 대한 표적 miRNA의 결합을 검출하도록 구성될 수 있다.

- [0108] 상기 검출 장치는 추가로 사용자에게 데이터를 출력하기 위한 사용자 인터페이스(interface)를 더 포함할 수 있다.
- [0109] 일부 구현예에서, 상기 검출 장치는 치료 정보의 데이터베이스를 포함한다. 상기 장치는 목적 miRNA의 수준에 따르는 데이터베이스로부터 적절한 치료 선택사항을 식별할 수 있다. 상기 치료 정보는 사용자 인터페이스를 통해 사용자에게 제공될 수 있다.
- [0110] 편리하게는, 검출 장치는 휴대용, 예를 들어 소형 기기(hand-held)일 수 있다. 상기 검출 장치는 miRNA의 수준 및 대상체와 관련된 다른 정보를 저장하기 위한 데이터 저장 유닛을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 장치는 데이터를 다른 장치들과 통신하기 위한 데이터 통신 수단을 포함한다. 예를 들어, 상기 장치는 WiFi, 3G, 4G, 블루투스(Bluetooth), 또는 모바일 앱(mobile app)을 통해 무선으로 데이터를 교환할 수 있다. 이는 필요한 경우 의료 전문가에 의해 용이하게 접근될 수 있는 데이터를 편리하게 이용할 수 있다.
- [0111] 따라서, 본 발명의 검출 장치는 TBI를 비-침습적으로 진단 및 모니터링하기 위한 합리적인 가격의, 휴대용, 케어 포인트 수단을 제공하는 것으로 고려된다. 상기 장치는 구급차 대원, 군대, 학교, 스포츠 클럽 및 의료 전문가에 의해 사용될 수 있고, TBI를 갖는 것으로 의심되는 환자의 정확한 평가 및 분류를 가능하게 할 수 있다.
- [0112] 추가의 실시양태에서, 본 방법에 사용하기 위한 키트(kit)가 제공된다. 상기 키트는 적어도 목적 miRNA에 선택적으로 결합할 수 있는 프로브(예를 들어, 항체, 또는 핵산과 같은 단백질)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 다수의 프로브를 포함하는 어레이(array)를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 프로브는 PCR을 수행하기 위한 프라이머이다. 상기 키트는 추가로 예를 들어, TBI의 진단 및/또는 모니터링에 사용하기 위한 지침서와 같은, 사용 지침서를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 추가로 예를 들어 프라이머 및 효소(예를 들어, DNA 중합효소, miRNA를 cDNA로 전환시키는 역전사 효소)와 같은, 적합한 완충액 및 시약을 더 포함할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 임의의 실시양태와 관련하여 본원에서 기술된 내용은 적절하게, 본 발명의 다른 측면에 동일하게 적용될 수 있음은 이해될 것이다.
- [0114] **본 발명의 상세한 설명**
- [0115] 본 발명의 구현예들은 하기의 첨부 도면들을 참조하여 실시예로서 기술될 것이다 :

도면의 간단한 설명

[0116] 도 1. 외상 및 HV의 3가지 상이한 범주에서 miR-425-5p 및 miR-502 발현

qRT-PCR 분석에 의해 검출된, 10 HV, 10 mTBI+EC (1 일), 10 mTBI+EC (15 일), 10 EC (1 일), 10 EC (15 일), 10 sTBI+EC (1 일) 및 10 sTBI+EC (15 일) 환자에서의 MiR-425-5p 및 miR-502 발현. MiR-425-5p 발현은 HV ($p<0.01$), mTBI+EC (15 일) ($p<0.001$) 및 sTBI+EC (1 일) ($p<0.01$)와 비교하여 mTBI+EC (1 일)가 현저하게 감소되는 것으로 발견되었다(도 1A). MiR-502 발현은 HV ($p<0.05$), mTBI+EC (15 일) ($p<0.01$) 및 sTBI+EC (1 일) ($p<0.05$)와 비교하여 mTBI+EC (1 일)가 현저하게 감소된 것으로 발견되었다(도 1B).

도 2. 외상 및 HV의 3가지 상이한 범주에서 miR-21 및 miR-335 발현

qRT-PCR 분석에 의해 검출된, 10 HV, 10 mTBI+EC (1 일), 10 mTBI+EC (15 일), 10 EC (1 일), 10 EC (15 일), 10 sTBI+EC (1 일) 및 10 sTBI+EC (15 일) 환자에서 MiR-21 및 miR-335 발현. MiR-21 발현은 HV ($p<0.01$)와 비교하여 sTBI+EC(1일 내지 15일)가 유의하게 상향-조절된 것으로 발견되었다(도 2A). MiR-335 발현은 HV ($p<0.001$), EC (15 일) ($p<0.001$) 및 mTBI+EC (1 일) ($p<0.05$)와 비교하여 sTBI+EC (1일)가 현저하게 상향-조절된 것으로 발견되었다(도 2B).

도 3. 외상 및 HV의 3가지 상이한 범주에서 miR-425-5p(도3A) 및 miR-502 (도 3B) 발현의 시간 경과

qRT-PCR 분석에 의해 검출된 손상 후 상이한 시점(T0, T4-12h, T48-72h, 15일)에서 30 HV, 30 mTBI+EC, 30 EC, 30 sTBI+EC 환자에서의 MiR-425-5p 및 miR-502 발현. MiR-425-5p 발현은 HV, sTBI+EC 및 EC ($p<0.05$)와 비교하여 T0 및 T4-12h에서 mTBI+EC가 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. MiR-502 발현은 HV, sTBI+EC 및 EC ($p<0.05$)와 비교하여 T0 및 T4-12h에서 mTBI+EC가 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. P값은 Tukey 사후 검정 테스트(Tukey's post-hoc test)에 의해 결정되었다.

* HV 와는 유의한 차이가 있다.

도 4. 외상 및 HV의 3가지 상이한 범주에서 miR-21 (도 4A) and miR-335 (도 4B) 발현의 시간 경과

qRT-PCR 분석에 의해 검출된 손상 후 상이한 시점(T0, T4-12h, T48-72h, 15일)에서 30 HV, 30 mTBI+EC, 30 EC, 및 30 sTBI+EC 환자에서의 MiR-21 및 miR-335 발현. MiR-21 발현은 HV ($p<0.01$)와 비교하여 T4-12h, T48-72h 및 15 일에 유의하게 상향-조절되는 것으로 발견되었다. MiR-335 발현은 HV 및 mTBI+EC ($p<0.001$)와 비교하여 T0, T4-12h, T48-72h 및 15 일에 현저하게 상향-조절되는 것으로 발견되었으나 EC 만은 아닌 것으로 발견되었다. P값은 Tukey 사후 검정 테스트에 의해 결정되었다.

* HV 와는 유의한 차이가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시에

miRNA가 다양한 병리의 범위에서 유망한 바이오마커로 부상함에 따라, 본 발명자들은 TBI에서 이의 역할을 조사하고자 하였다.

실시예 1

재료 및 방법

환자 및 샘플 수집

연구 참여자는 외상 (황금 시간 연구) 연구 (윤리 Ref. 13/WA/0399) 후 뇌 바이오마커의 일부로서 버밍엄(UK)의 Queen Elizabeth 병원의 외과 재건 및 미생물학 연구 센터(SRMRC)로부터 모집되었다.

먼저, 본 발명자들은 두개외의 손상(EC) 환자, 5명의 sTBI+EC 손상 환자 및 건강한 지원자 (HV)가 있는 5 mTBI에서 754개의 miRNA의 스크리닝을 손상으로부터 1일 및 15일에 수행하여 특정 후보 바이오마커를 선택할 목적으로 중증의 TBI로부터 경증을 구분할 수 있었고 15일 후에 mTBI의 회복을 예측할 수 있었다. 따라서 상기 정보 (표 2)를 바탕으로, 4가지 상이한 범주: HV ($n=10$), EC ($n=10$), mTBI+EC ($n=10$), sTBI+EC ($n=10$)로 그룹화된 40명의 환자 집단에서 연구 결과를 확인할 수 있었다. 건강한 지원자는 RECON 연구에 동의하고 등록되었다. EC 손상 환자는 방사선학적으로-확인된 골절(fracture)을 가지고 있었고, 두부 외상이 없었고, 감염이 없었고, 신경학적 또는 정신적 장애의 병력이 없었고 알코올이나 또는 약물의 의존성이 없었다. EC가 있는 경증의 TBI는 비-침습적인 두부 외상 및 글래스고 코마 스케일(GCS) 점수가 >13인 사람들을 포함하였다. EC가 있는 중증의 TBI는 GCS 점수가 8 이하인 환자들을 포함하였다. 모든 환자는 HV와 일치된 성별 및 연령이었다.

샘플 처리

말초 혈액 샘플은 각각의 환자에서 손상으로부터 1일 및 15일에 채취되었다. 상기 혈액 샘플은 채취 후 2시간 이내에 혈청 격리를 위해 처리되었다. 전혈은 4°C에서 10분 동안 3000rpm으로 원심분리되기 전에 상온에서 약 30분 동안 방치되었다. 혈청은 분취액(aliquot)으로 나누었고 분석할 때까지 -80°C에서 보관되었다.

RNA 분리, TaqMan 저밀도 어레이(TLDA)에 의한 역전사 및 miRNA 프로파일링

초기 스크리닝(발견 세트)은 5 mTBI+EC 및 5 sTBI+EC 환자에서 수행되었고, 이는 2가지 상이한 시점(손상 후로부터 1일 및 15일)에서 HV와 비교되었다. 상기 환자들의 혈청은 754개의 miRNA의 전사체를 규명하기 위해 사용되었다. 혈청 샘플은 임의의 순환하는 세포 또는 파편을 펠렛화하고 제거하기 위해 2000rpm에서 10분 동안 원심분리되었다. miRNA는 혈청 및 혈장으로부터 작은 RNA를 정제하고 최종적으로 30 μ l의 부피의 RNase가 없는 수용액에서 용출시키는 Qiagen 보조 프로토콜에 따르는, Qiagen miRNeasy 미니 키트(Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 400 μ l의 혈청 샘플로부터 추출되었다. 결과 RNA의 농도 및 순도는 ND-1000 UV-Vis 분광광도계 (NanoDrop)를 사용하여 측정되었다. 제조업체의 지시에 따라, 20 ng의 혈청 RNA는 역전사되었고 사전-증폭되었다. 사전-증폭된 제품은 TLDA, TaqMan Human MicroRNA Array v3.0 A 및 B (Applied Biosystems LifeTechnologies™)에 로드(load)되었다. TLDA에 대한 PCR은 7900HT Fast RealTime PCR 시스템(Applied Biosystem, LifeTechnologies™)에서 수행되었다.

데이터 분석

[0129] 정확한 miRNA 프로파일링을 수득하기 위해, 본 발명자들은 전역 중앙 표준화 방법(global median normalization method)을 사용하였다. 마이크로어레이 분석과 유사하게, 각각의 샘플로부터의 Ct 값은 어레이의 Ct 중앙값으로 표준화되었다. 더욱이, 각각의 miRNA의 Ct 및 각각의 배열의 평균과 Ct 중앙값 사이의 피어슨 상관 관계(Pearson correlation)를 계산하여, 본 발명자들은 TLDA, 즉 miR-331 및 miR-223*의 중앙값과 평균에 근접한 발현 프로파일을 나타내는 2개의 miRNA를 확인하였다. 상기 miRNA는 또한 [DataAssist v.3 software (AppliedBiosystem Life Technologies™)] 및 geNorm 알고리즘의 2가지 상이한 방법을 적용하여 TLDA에 가장 안정한 것으로 확인되었다. 따라서, miR-331 및 miR-223*은 단일 TaqMan 분석법에 의한 검증을 위한 기준 유전자로서 사용되었다. 발현 배수 변화는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법에 의해 계산되었다. 차별적으로 발현된 miRNA (DE miRNA)는 다중 실험 뷰어 v4.8.1에 의해 계산된 마이크로어레이 분석의 중요성(SAM)에 의해 확인되었으며, ΔCt 중에서 2급의 짝이 없는 테스트를 적용하였고 100순열에 기반한 p-값을 사용하였다; 대체 엔진: K-가장 근접한 이웃(10 이웃); 잘못된 발견 비율<0.15은 다중 비교에 대한 보정으로 사용되었다. 본 발명자들은 모든 내인성 대조군을 사용하여 일치하는 DE miRNA만을 신뢰할 수 있는 것으로 받아들였다.

[0130] 단일 TaqMan 분석법

[0131] 10개의 차별적으로 발현된 miRNA는 중증의 TBI로부터 경증을 감별하고 경증의 회복을 모니터링하기 위한 목적으로 잠재적인 후보 바이오마커로서 어레이로부터 선택되었다. 상기 후보자들은 단일 TaqMan 분석법 (AppliedBiosystems, Life Technologies™)에 의한 상이한 2개의 시점(손상 후 1 및 15일)에서 10개의 대조군(HV) 및 상이한 3개의 범주(mTBI+EC, sTBI+EC 및 오직 EC)로 그룹화된 30명의 환자의 확대된 코호트(cohort)에서 데이터를 확인하기 위해 사용되었다. 샘플은 상기에 기술된 바와 같이 추출 및 역전사되고 RT-qPCR 분석법은 Bio-Rad iQ5 Real-time PCR 검출 시스템(Bio-Rad, CA, USA)에서 수행되었다. 발현 배수 변화는 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법에 의해 계산되었다.

[0132] 통계 분석

[0133] 데이터는 정규 분포로 확인되었고 지표 검정(parametric test)을 수행하기 위해 변형되었다. 각 시간 및 그룹 내에서 각각의 시간에 따른 그룹 간 비교는 변수의 단방향 분석 및 변환된 데이터에 대한 Tukey의 사후 검정 테스트로 수행되었다. 수신자 작동 특성 분석은 곡선 아래의 면적(AUC)으로 표현된 mTBI 또는 sTBI를 진단하는 경우 각각의 바이오마커의 민감도 및 특이도를 계산하기 위해 사용되었다. 모든 분석은 SPSS v.20 (IBM)에서 수행되었다. 차이는 p-값 < 0.05에서 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

[0134] 결과

[0135] TaqMan 저밀도 분석 (TLDA)에 의한 발현 프로파일

[0136] TLDA의 754개의 스크리닝 가능한 miRNA로부터, 본 발명자들은 mTBI+EC에서 1일에 10개의 순환 miRNA 및 15일에 13개, 차별적으로 발현된 sTBI+EC에서 15일에 22개, 1일에 19개를 확인하였다(표 2). 상기 목록에서, hsa-miR-126*, miR-193a-5p, miR-144*, miR-190, miR-194, miR-365, miR-590-3p, miR-624, miR-625* 및 miR-671-3p는 대부분의 환자에서 발현되었기 때문에 추가의 분석에서 제외되었고, 이에 따라 경증 또는 중증의 외상만을 위한 적절한 후보 바이오마커는 되지 못하였다. 그러나, 상기 마이크로RNA는 임의의 중증도의 TBI를 확인할 수 있으므로 유용한 TBI 바이오마커이다. 한편, miR-184, miR-301b, miR-502 및 miR-505는 1일에 mTBI+EC에서 독특하고 차별적으로 발현되었고, mTBIdml 초기 후보 바이오마커로서 선택되었다. 또한, mTBI+EC 후 15일에 차별적으로 발현되는 miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p 및 miR-655는 mTBI의 회복을 추적할 수 있는 후보 바이오마커로서 선택되었다.

[0137] 최종적으로, sTBI+EC의 2가지 시점 모두에서 지속적으로 발현되는, 2개의 miRNA, miR-21 및 miR-335는, 추가의 연구를 위해 선택되었다.

표 2

[0138] TLDA에 의해 검출되고 5 HV와 비교하여, 5 mTBI+EC (1 및 15일) 및 5 sTBI+EC (1 및 15일) 환자에서 차별적으로 발현되는 마이크로RNA의 배수 변화.

mTBI+EC 1 일 VS HV			mTBI+EC 15 일 VS HV		sTBI+EC 1 일 VS HV		sTBI+EC 15 일 VS HV
hsa-miR-184	0.1383	hsa-miR-193a-5p	24.901	hsa-let-7g	0.3250	hsa-miR-130a	14.979
hsa-miR-190	0.1278	hsa-miR-194	20.946	hsa-miR-10a	11.953	hsa-miR-152	9.8921
hsa-miR-425-5p	0.0798	hsa-miR-203	4.1763	hsa-miR-132	8.1875	hsa-miR-190	0.0277
hsa-miR-502	0.0538	hsa-miR-365	3.7087	hsa-miR-143	26.193	hsa-miR-193a-5p	13.655
hsa-miR-505	7.7696	hsa-miR-425-5p	3.0166	hsa-miR-148b	20.095	hsa-miR-194	12.301
hsa-miR-126*	0.1570	hsa-miR-654-3p	0.0878	hsa-miR-18a	26.806	hsa-miR-21	12.662
hsa-miR-144*	0.2758	hsa-miR-655	0.0756	hsa-miR-190	0.0634	hsa-miR-27b	18.977
hsa-miR-590-3p	0.3842	hsa-miR-671-3p	4.0584	hsa-miR-192	0.2245	hsa-miR-301	21.954
hsa-miR-624	0.0836	hsa-miR-126*	0.2978	hsa-miR-193a-5p	29.785	hsa-miR-326	93.099
hsa-miR-301b	0.0435	hsa-miR-144*	0.2645	hsa-miR-21	7.1654	hsa-miR-335	45.050
		hsa-miR-590-3p	0.3035	hsa-miR-223	4.6799	hsa-miR-345	37.699
		hsa-miR-624	0.1643	hsa-miR-335	37.192	hsa-miR-361	37.295
		hsa-miR-625*	0.1521	hsa-miR-365	5.5771	hsa-miR-422a	77.373
				hsa-miR-429	0.1294	hsa-miR-579	4.7203
				hsa-miR-618	29.527	hsa-miR-642	41.515
				hsa-miR-95	20.788	hsa-miR-671-3p	8.4425
				hsa-miR-144*	0.2759	hsa-miR-99a	12.218
				hsa-miR-624	0.0304	hsa-miR-144*	0.2905
				hsa-miR-625*	0.0981	hsa-miR-520D-3p	0.2579
						hsa-miR-590-3p	0.4188
						hsa-miR-625*	0.1575
						hsa-miR-629	0.2793

[0139]

mTBI의 후보 바이오마커에 대한 단일 TaqMan 분석

[0140]

상기 결과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 이후에 단일 TaqMan 분석을 사용하여 2개의 선택된 시점 (손상 후 1 및 15일)에서 3개의 분리 및 독립된 그룹 (10 mTBI + EC, 10 sTBI + EC, 10 EC)으로 선택된 miRNA의 발현을 테스트하였다. 결과는 10 HV와 비교되었다. 배수 변화는 기준 유전자로서 miR-331 및 miR-223*를 사용하여 2-△△CT 방법에 의해 계산되었다.

[0141]

2가지 시점 모두에서 mTBI의 후보 바이오마커(miR-184, miR-301b, miR-502, miR-505, miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p 및 miR-655) 중에서, 2개는 흥미로운 결과를 보였고 HV와 비교하여 3가지 상이한 범주에서 유의하고 차별적으로 발현되었다. 특히, miR-425-5p 및 miR-502는 유사한 경향을 나타냈다(도 1). 이들은 둘다 HV ($p<0.001$), EC ($p<0.001$) 및 sTBI+EC ($p<0.001$)와 비교하여 손상 후 1일에 각각 mTBI+EC (0.387 ± 0.201 및 0.314 ± 0.146 의 평균)에서 유의하게 하향 조절되었다. 경미한 손상 후 15일에, miR425-5p 및 miR-502는 정상 수준(0.886 ± 0.310 및 1.157 ± 0.258)으로 되돌아갔다. miR-425-5p 및 miR-502의 발현은 또한 손상으로부터 1일 및 15일 모두 EC 샘플에서 HV와 유사하게 발견되었으며, 따라서 상기 2가지 바이오마커는 뇌 손상 환자에서만 차별적으로 발현된다는 것을 시사한다. 또한, 2가지 시점 모두 HV와 비교하여 sTBI+EC에서 임의의 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서, miR-425-5p 및 miR-502는 외상 후 15일에 mTBI의 조기 진단 및 모니터링을 위한 가장 유망한 후보 바이오마커로 간주될 수 있었다. 상기 바이오마커에 대한 AUC는 표 3에 나타난다.

[0142]

sTBI의 후보 바이오마커에 대한 단일 TaqMan 분석

[0143]

miR-21 및 miR-335는 sTBI의 잠재적인 바이오마커로서 분석되었는데 이들은 둘 모두 초기 스크리닝에서 sTBI+EC의 2가지 시점에서 상향 조절되는 것으로 나타났기 때문이다. 이들은 또한 환자의 제2의 데이터세트에서도 강력한 후보자로 나타났다(도 2). Mir-21은 HV ($p,0.001$), EC ($p<0.001$) 및 mTBI ($p<0.001$)에 비해 sTBI의 2시점 모두에서 EC (7.106 ± 4.192 및 4.012 ± 1.577)에서 유의하게 상향 조절되었다. HV와 비교하여 나머지 범주에서는

유의한 차이는 발견되지 않았다. miR-335는 sTBI+EC 및 2가지 시점에서 상향조절로 나타났다(각각, 16.824 ± 14.195 및 12.324 ± 8.931). 1일에, 상기 그룹은 대조군($p=0.001$) 및 mTBI+EC($p=0.031$)와 유의한 차이를 보였지만 EC는 없었다. 흥미롭게도, EC 환자에서 유의한 상향조절은 1일(7.951 ± 4.870)에 발견되었으나, 손상 후 15일(1.260 ± 0.531)에는 발견되지 않았다. 이러한 이유로, 15일에, miR-335는 HV($p=0.002$), EC ($p=0.007$) 및 mTBI+EC ($p=0.001$)와 관련하여 sTBI+EC 그룹에서 유의하게 더 높았다. miR-335는 HV와 비교하여 두 시점 모두에서 mTBI+EC에서 임의의 유의하나 차이를 보이지 않았다. 상기 바이오마커에 대한 AUC도 또한 표 3에 나타낸다.

표 3

곡선 아래 영역

변수(들)	영역	점근선 95% 신뢰구간	
		하한	상한
miR-502 1 일	.993	.972	1.000
miR-502 15 일	유의하지 않음	-	-
miR-425-5p 1 일	.994	.977	1.000
miR-425-5p 15 일	유의하지 않음	-	-
miR-21 1 일	.979	.934	1.000
miR-21 15 일	.975	.929	1.000
miR-335 1 일	.758	.592	.921
miR-335 15 일	.957	.884	1.000

논의

본 연구는 miRNA의 수준의 변화가 TBI의 진단에 적용될 수 있는지, 그리고 이의 중증도를 평가할 수 있는지를 조사하였다. 4개의 miRNA; miR-425-5p, miR 502, miR-21 및 miR-335는 TBI에서 차별적으로 발현되는 것으로 확인되었다.

miR-425-5p는 HV와 비교하여 mTBI+EC에서 1일에 유의한 결과를 나타내었고 유사한 결과는 모든 다른 범주에서 얻어졌다. 경미한 부상으로부터 처음 24시간 내에 하향 조절되고 15일 후에 다시 정상 수준으로 돌아오는 경우, miR-425-5p는 경미한 외상의 적합한 후보 바이오마커가 된다.

miR-502는 또한 mTBI+EC에서 차별적으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 상기 miRNA의 경향은 miR-425-5p와 매우 유사하다. 이는 뇌 손상 환자에 대한 특이성을 보여주었고 또한 회복을 추적하기 위해 사용될 수 있었는데, 이는 경미한 손상으로부터 15일 후 정상값으로 돌아왔기 때문이다.

sTBI 이후, 2개의 miRNA(miR-21, miR-335)는 1일 및 15일 모두에서 발현되는 것으로 나타났고 이에 따라 sTBI의 잠재적인 바이오마커로서 선택되었다. miR-21 및 miR-335는 sTBI+EC의 대조군과 비교하여 두 시점 모두에서 유의하게 상향-조절되었다. 따라서, 과발현은 어레이의 결과를 확인하였고 이들 분자가 sTBI의 바이오마커로서의 잠재성을 보여주었다.

선택된 miRNA 패널은 TBI를 정확하게 진단하는 잠재성을 가지고 중증도에 따라 환자의 계층화(stratification)를 가능하게 하여, 결과적으로, 가장 적절한 치료를 제공하도록 허용할 수 있다.

실시예 2

환자 및 샘플 수집

연구 참여자는 SIR(손상으로부터 재활(rehabilitation)로의 스테로이드 및 면역) 연구(윤리 Ref. 11/SW/0177)의 일환으로서 버밍엄(UK)의 Queen Elizabeth 병원의 외과 재건 및 미생물학 연구 센터(SRMRC), ReCoS (스포츠 중재술(The REpetitive Concussion in Sport)) 연구(윤리 Ref. 11-0429AP28) 및 황금 시간 연구(윤리 Ref. 13/WA/0399)로부터 모집되었다. 연구에 포함되기 전에 참가자 또는 유효한 대리인(연구에 직접 관여하지 않은 가족 또는 전문가)으로부터 서면 동의를 받았다.

샘플의 제2의 데이터세트는 4가지 상이한 범주: HV (n=30), EC (n=30), mTBI+EC (n=30), sTBI+EC (n=30)로 그룹화된 총 120 개체로부터의 혈청 샘플을 사용하였고 혈액은 각 환자에서 상이한 시점(T0-1h, T4-12h, T48-72h,

15일)에 채취되었다. 건강한 지원자는 ReCoS연구에 동의하고 등록되었다. EC 손상 환자는 방사선학적으로 확인된 정형외과적 골절(orthopaedic fracture)을 가지고 있었고, 두부 외상은 없었고, 감염이 없었으며, 신경학적 또는 정신적 장애의 병력도 없었고 알코올 또는 약물 의존성이 없었다. EC가 있는 경증의 TBI는 비-침습 두부 외상과 글래스고 코마 스케일(GCS) 점수가 ≥ 13 인 사람들이 포함하였다. EC가 있는 중증의 TBI는 GCS 점수가 ≤ 8 인 환자들을 포함하였다.

[0155] 샘플 처리

[0156] 혈액 샘플은 채취 후 2시간 이내에 혈청 분리를 위해 처리되었다. 전혈은 4°C 에서 10분 동안 3000rpm으로 원심 분리되기 전에 상온에서 30분 동안 방치되었다. 혈청은 분취액으로 나누었고 분석할 때까지 -80°C 에서 보관되었다.

[0157] RNA 분리, 데이터 분석, 분석 및 통계 분석은 실시예 1에서 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0158] 결과

[0159] mTBI의 후보 바이오마커에 대한 단일 TaqMan 분석

[0160] 실시예 1의 결과를 확인하기 위해, 3개의 분리되고 독립적인 그룹(30 mTBI + EC, 30 sTBI + EC, 30 EC)에서 선택된 miRNA의 발현은 상이한 시점(손상 후 T0, T4-12h, T48-72h 및 15일)에서 단일 TaqMan 분석을 사용하여 측정되었다. 결과는 10HV와 비교되었다. 배수 변화는 miR-331 및 miR-223^{*}를 기준으로 사용하여, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 방법에 의해 계산되었다.

[0161] 2가지 시점 모두에서 mTBI의 후보 바이오마커(miR-184, miR-502, miR-505, miR-301b, miR-203, miR-425-5p, miR-654-3p 및 miR-655) 중에서, 오직 2개만이 흥미로운 결과를 보였고 HV와 비교하여 3가지 상이한 범주에서 유의하고 차별적으로 발현되었다. 특히, miR-425-5p 및 miR-502는 유사한 경향을 보였다(도 3). 이들은 둘다 mTBI+EC에서 유의하게 하향 조절되었고, miR-425-5p는 HV, 또는 EC 및 sTBI+EC ($p < 0.05$)와 비교하여 각각 T0-1h ($p = 0.01845$), 및 T4-12h ($p = 0.01962$)에서, 및 miR-502는 HV (각각 $p = 0.02538$ 및 $p = 0.03718$), 또는 EC 및 sTBI+EC ($p < 0.01$)와 비교하여 T0-1h 및 T4-12h에서 유의하게 하향 조절되었다. 경미한 부상으로부터 48시간 후, miR425-5p 및 miR-502의 발현은 정상 수준으로 되돌아왔다. miR-425-5p 및 miR-502의 발현은 HV와 유사한 수준에서 EC 그룹에서도 또한 발견되었고, 이에 따라 상기 2개의 바이오마커는 뇌 손상 환자에서만 오직 하향 조절된다는 것을 시사한다. 또한, 이들 중 어느 것도 모든 시점에서 HV와 비교하여 sTBI+EC에서 임의의 유의한 하향 조절을 나타내지 않았다. 따라서, miR-425-5p 및 miR-502는 mTBI의 조기 진단 및 모니터링을 위한 가장 유망한 바이오마커로 간주될 수 있었다. 가장 관련성이 높은 시점에서 상기 바이오마커에 대한 AUC는 표 4에 나타나있다.

[0162] sTBI의 후보 바이오마커에 대한 단일 TaqMan 분석

[0163] MiR-21 및 miR-335는 sTBI의 잠재적인 바이오마커로서 분석되었는데, 이는 이들 모두가 초기 스크리닝에서 sTBI+EC의 두 시점 모두에서 상향 조절된 것으로 나타났기 때문이다. 이들은 또한 환자의 제 2의 데이터세트에서도 강력한 후보자로 나타났다(도 4). MiR-21은 HV, EC 및 mTBI+EC와 관련하여 손상으로부터 4시간 후 모든 시점에서 EC를 갖는 sTBI에서 유의하게 상향 조절되었다(T4-12h에서 $p = 0.00306$, T48-72h에서 $p = 0.00844$ 및 15일에서 $p = 0.00077$). HV와 비교하여 나머지 범주에서는 유의한 차이가 발견되지 않았다. MiR-335는 HV와 비교하여 모든 시점(T0-1h에서 $p = 0.00109$, T4-12h에서 $p = 0.00284$, T48-72h에서 $p = 0.00012$ 및 15일에서 $p = 0.01284$)에서 sTBI+EC에서 상향 조절을 보였고 EC와 비교하여 mTBI+EC에서는 유의한 상향조절은 발견되지 않았다. 상기 바이오마커에 대한 AUC는 표 4에 나타나있다.

표 4

[0164] 상이한 시점에서 TBI의 4가지 후보 바이오마커의 곡선 아래 면적. 가장 관련 있는 시점만 표시된다.

변수(들)	영역	Sig	점근선 95% 신뢰구간	
			하한	상한
miR-425-5p T0				
mTBI vs HV	1	.002	1	1
mTBI vs sTBI	.911	.020	.778	1.000
mTBI vs EC	.950	.01	.860	1.000

miR-502 T0				
mTBI vs HV	1	.001	1.000	1.000
mTBI vs sTBI	.990	.001	.960	1.000
mTBI vs EC	.990	.001	.940	1.000
miR-21 T4-12h				
sTBI vs HV	.961	.003	.880	1.000
sTBI vs mTBI	.960	.001	.870	1.000
sTBI vs EC	.900	.004	.740	1.000
miR-335 T0				
sTBI vs HV	.990	.000	.960	1.000
sTBI vs mTBI	.780	.023	.590	.960
sTBI vs EC	.500	1	.240	0.780

[0165] 논의

[0166] 본 연구는 miRNA의 수준의 변화가 TBI의 진단에 적용될 수 있고, 이의 중증도를 평가할 수 있다는 이전의 발견을 입증하였다. 본 연구는 하기의 4개의 miRNA; miR-425-5p, miR 502, miR-21 및 miR-335는 TBI에서 차별적으로 발현되는 것을 확인하였다.

[0167] miR-425-5p는 HV와 비교하여 mTBI+EC에서 T0 및 T4-12h에 유의한 결과를 보였고 유사한 결과는 다른 모든 범주에서 얻어졌다. 이의 하향조절은 T48-72h 이후에 정상 수준으로 되돌아가고, miR-425-5p는 경미한 외상의 적합한 후보 바이오마커임을 확인한다.

[0168] miR-502는 또한 mTBI+EC에서 차별적으로 발현되는 것으로 확인되었다. 상기 miRNA의 경향은 miR-425-5p와 매우 유사하였다. 이것은 뇌 손상 환자에 대한 특이성을 보였고 회복을 추적하기 위해 또한 사용될 수 있었는데, 이것은 경미한 손상으로부터 T48-72h 이후에 정상 값으로 되돌아가기 때문이다.

[0169] sTBI 이후, 2개의 miRNA (miR-21, miR-335)는 분석된 모든 시점에서 발현되는 것으로 나타났고 이에 따라 sTBI의 잠재적인 바이오마커로서 확인되었다. miR-21 및 miR-335는 sTBI+EC에서 대조군과 비교하였을 경우 유의하게 상향-조절되었다. 따라서, 과발현은 sTBI의 바이오마커로서 이들 분자의 잠재성을 확인하였다.

[0170] 실시예 3

[0171] 타액 샘플은 손상으로부터 2-3일 후에 뇌진탕의 프로 운동 선수들로부터 수집되었고 타액에 존재하는 마이크로RNA는 분석되었다. 상기 운동선수는 임상적으로 mTBI를 갖는 것으로 진단되었다.

[0172] 재료 및 방법

[0173] 마이크로RNA는 nCounter 기술 (nanoString Technologies®)을 사용하여 분석되었고, 이는 하나의 혼성화 반응에서 수백개의 독특한 전사체를 탐지하고 계수하기 위해 분자 "바코드" 및 현미경 영상을 사용하였다. 각각의 색으로 코딩된(colour-coded) 바코드는 목적 마이크로RNA에 대응하는 단일 표적-특이적 프로브에 부착된다.

[0174] 분석은 하기의 단계를 포함하는 제조업자의 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0175] 혼성화

[0176] 이 기술은 용액 내 혼성화하는 마이크로RNA 당 2~20 염기 프로브를 사용한다. 수용체 프로브는 신호를 전달하는 반면에, 포획 프로브는 데이터 수집을 위해 복합체를 고정시키도록 허용한다.

[0177] 정제 및 고정화

[0178] 혼성화 이후에, 과량의 프로브는 제거하고 프로브/표적 복합체는 정렬하여 nCounter 카트리지에 고정시킨다.

[0179] 데이터 수집

[0180] 샘플 카트리는 데이터 수집을 위해 디지털 분석기에 배치된다. 카트리지 표면에 있는 색상 코드는 각각의 표적 분자에 대해 계수되고 도표로 표시된다.

[0181] 결과

[0182] 하기의 표 5는 건강한 지원자와 비교하여 뇌진탕의 운동선수에서 유의하고 차별적으로 발현된 것으로 밝혀진 마

이크로RNA의 목록이다. 표는 대조군과 비교하여 환자에서 마이크로RNA의 발현에서의 배수 변화를 나타낸다. 상기 배수변화는 기준 유전자로서 miR-23a-3p 및 miR-148b-3p을 사용하여 계산되었다.

표 5

마이크로RNA	배수 변화
hsa-let-7c-5p	2.80
hsa-let-7i-5p	1.82
hsa-miR-142-3p	1.41
hsa-miR-148a-3p	1.72
hsa-miR-15b-5p	2.30
hsa-miR-16-5p	2.32
hsa-miR-181a-5p	1.54
hsa-miR-20a-5p+hsa-miR-20b-5p [§]	2.16
hsa-miR-221-3p	2.90
hsa-miR-24-3p	1.94
hsa-miR-27b-3p	3.45
hsa-miR-29a-3p	4.03
hsa-miR-29c-3p	1.44
hsa-miR-424-5p	2.88
hsa-miR-30a-5p	2.16
hsa-miR-107	1.72
hsa-miR-135b-5p	1.97
hsa-miR-199b-5p	1.88
hsa-miR-324-5p	5.61
hsa-miR-652-3p	3.43

[0183]

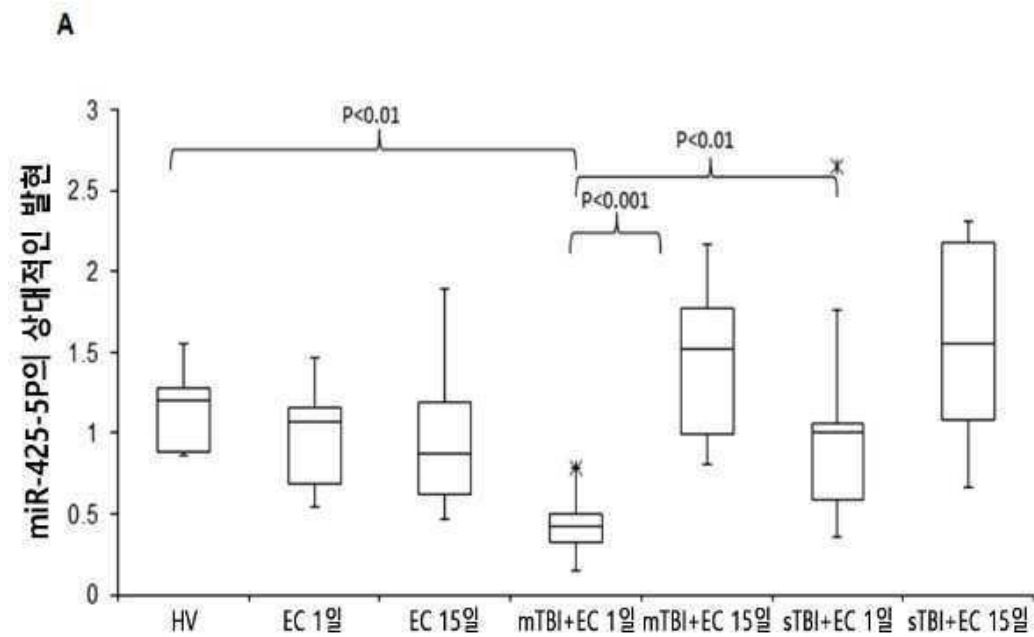
[0184] [§] miR-20a-5p 및 miR-20b-5p에 대한 값은 이들 사이를 구별할 수 없는 nCounter 기술로 인하여 결합되었다.

[0185] 논의

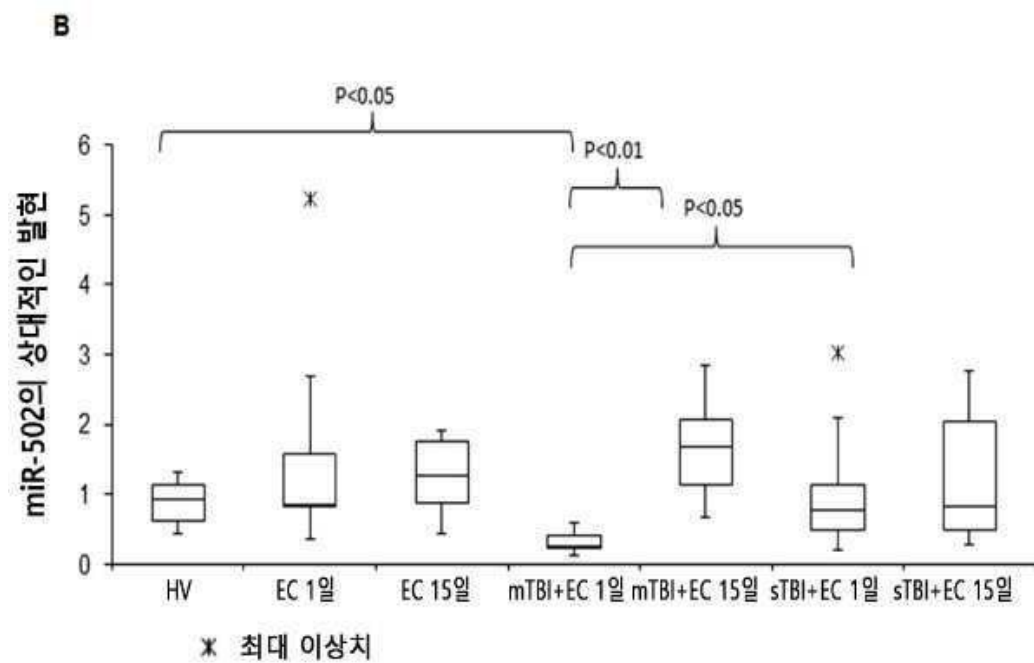
[0186] 본 연구는 타액에 존재하는 마이크로RNA가 뇌진탕/mTBI의 지표임을 입증한다. 이는 타액이 혈액보다 훨씬 더 용이하게 획득되기 때문에 중요하며, 따라서 타액의 마이크로RNA의 검출은 TBI, 특히 피치-사이드(pitch-side)의 진단을 위한 빠르고 편리한 수단을 제공한다.

도면

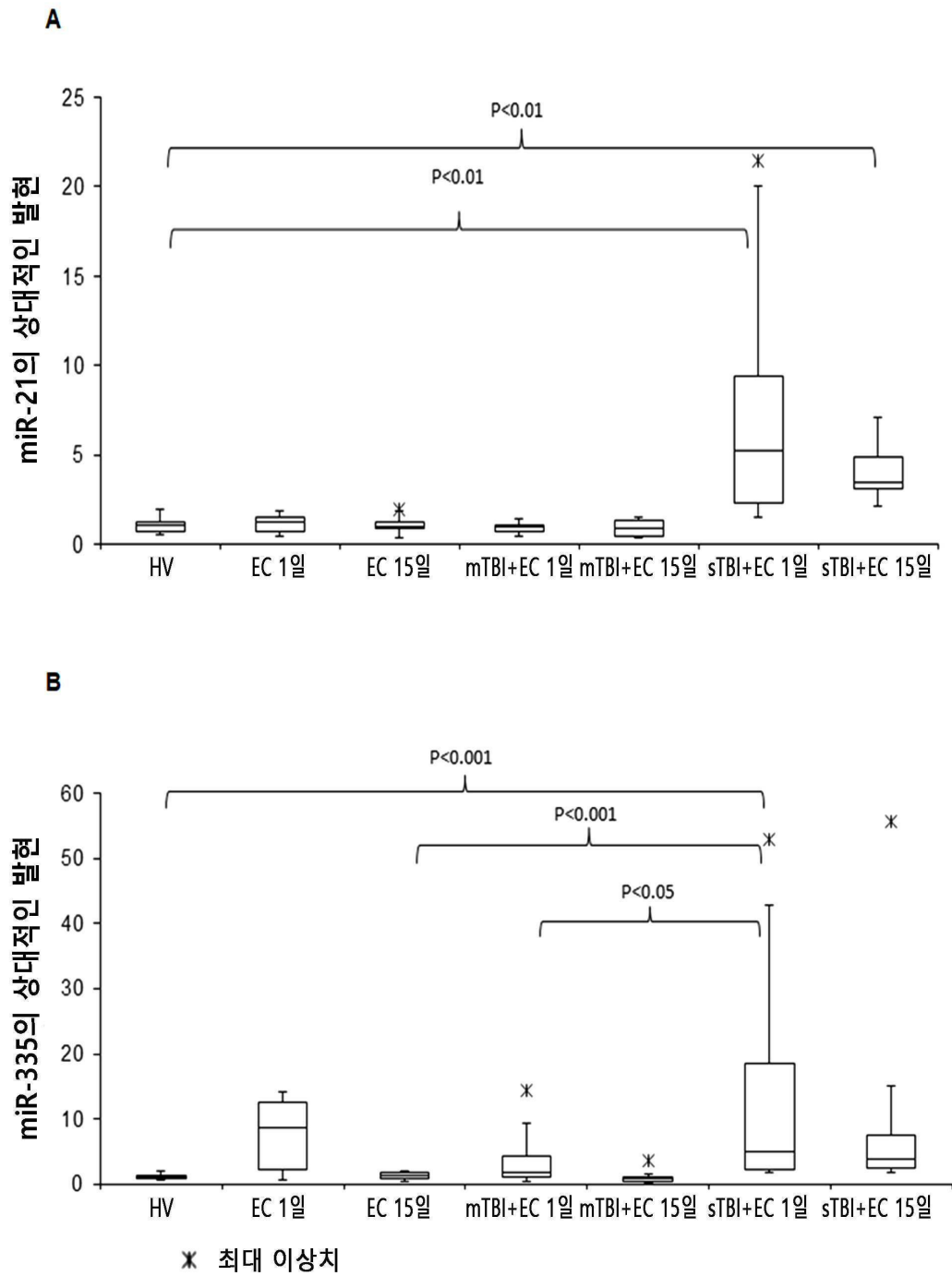
도면1a



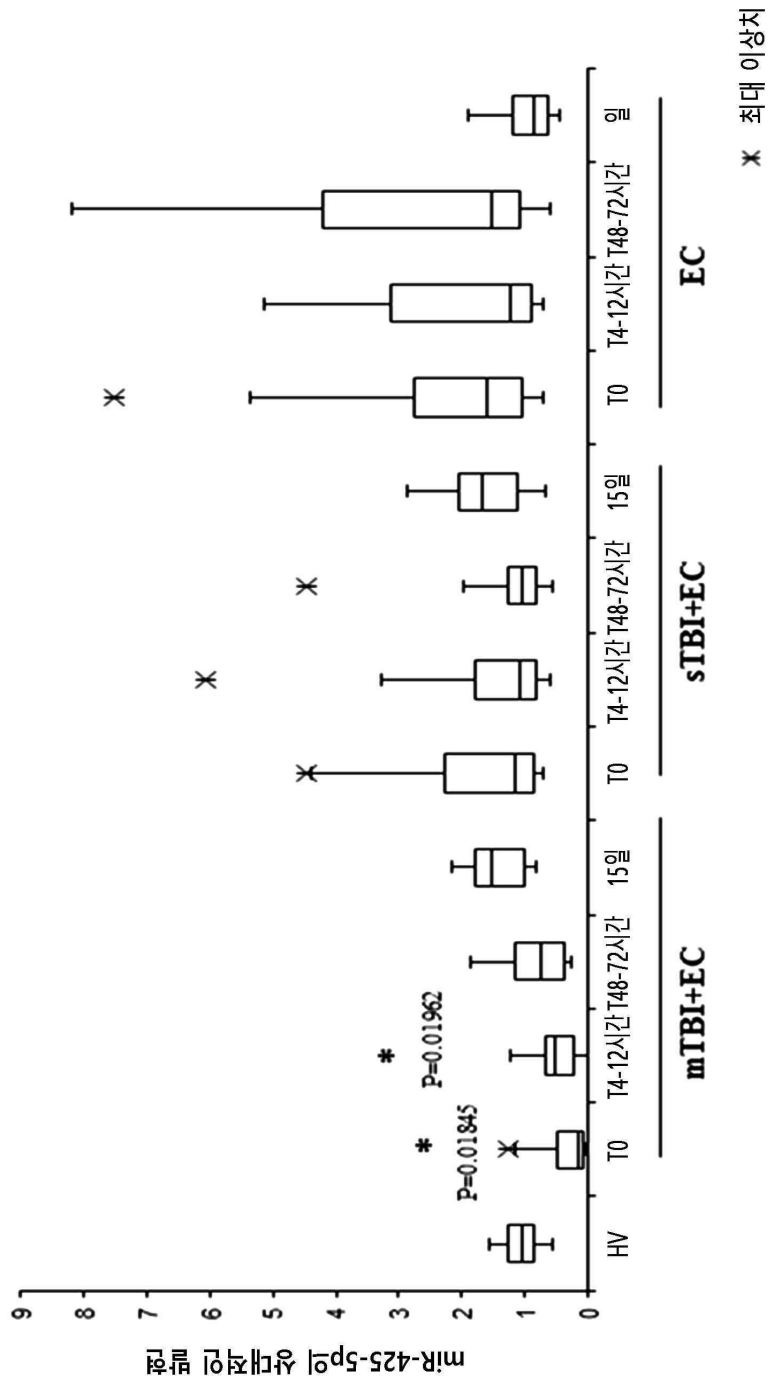
도면1b



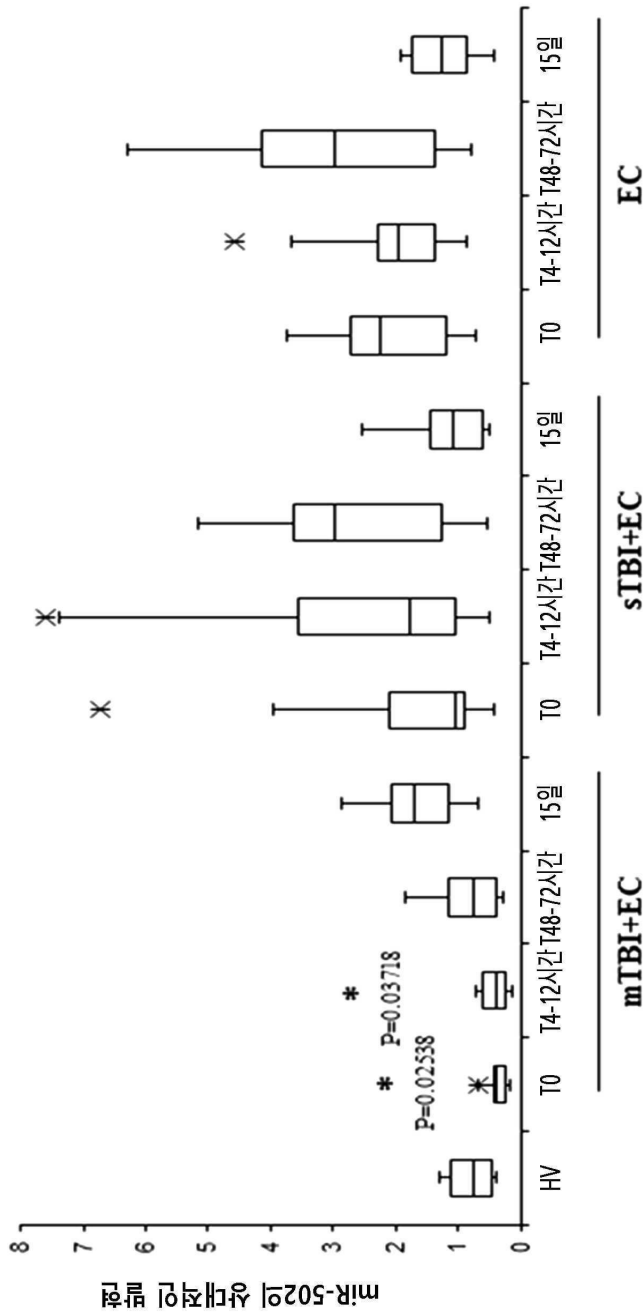
도면2



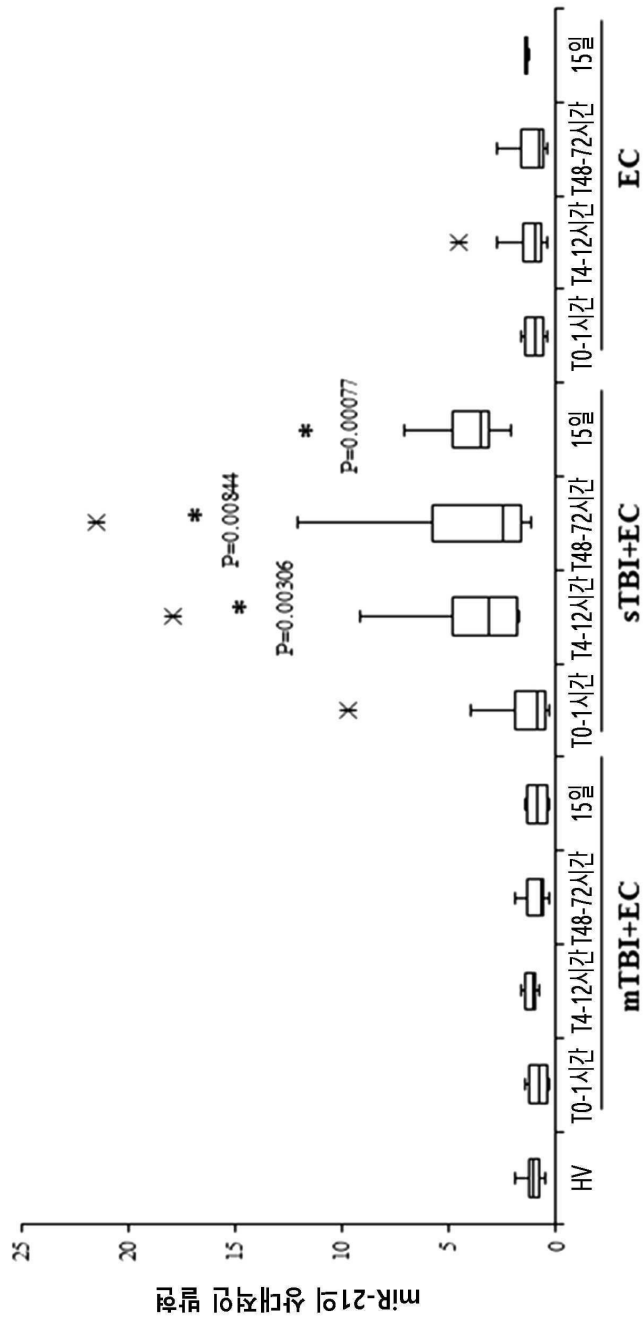
도면3a



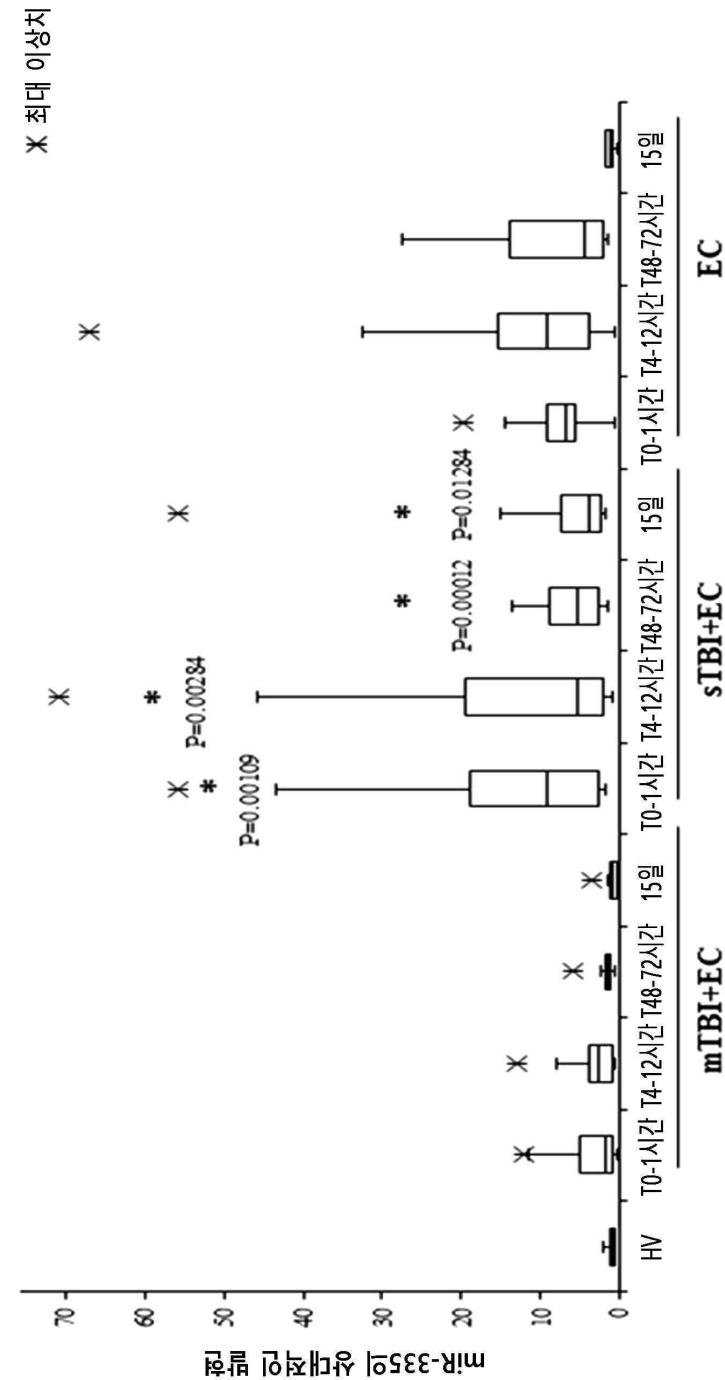
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Birmingham

<120> Biomarkers of traumatic brain injury

<130> PB150144W0

<131> IPA180950-GB-D1-1

<150> GB1603967.9
 <151> 2016-03-08
 <160> 69
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 uagcuuauca gacugauguu ga 22
 <210> 2
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 aaugacacga ucacucccg uga 23
 <210> 3
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 auccuugcua ucugggugcu a 21
 <210> 4
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 ucaagagcaa uaacgaaaaa ugu 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 cagugcaaug auauuguc aa agc 23
 <210> 6

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 uggacggaga acugauaagg gu 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 cgucaacacu ugcugguuuc cu 22

<210> 8
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 gugaaauguu uaggaccacu ag 22

<210> 9
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 uaugucugcu gaccaucacc uu 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 auaauacaug guuaaccucu uu 22

<210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11	
gccccugggc cuauccuaga a	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
cguguauuug acaagcugag uu	22
<210> 13	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
ugagguagua guuuguacag uu	22
<210> 14	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
cauuauuacu uuugguacgc g	21
<210> 15	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
ugggucuuug cgggcgagau ga	22
<210> 16	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
ggauaucauc auauacugua ag	22
<210> 17	
<211> 21	

<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
cuauauauca aacauauucc u	21
<210> 18	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
uguaacagca acuccaugug ga	22
<210> 19	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
uaaugcccu aaaaauccu au	22
<210> 20	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 20	
uaauuuuauug uauaagcuag u	21
<210> 21	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 21	
uaguaccagu accuuguguu ca	22
<210> 22	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 22	

gacuauagaa cuuucccccu ca	22
<210> 23	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
uccgguucuc agggcuccac c	21
<210> 24	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
ugagguagua gguuguaugg uu	22
<210> 25	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
ugagguagua guuugugcug uu	22
<210> 26	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 26	
uguaguguuu ccuacuuuau gga	23
<210> 27	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 27	
ucagugcacu acagaacuuu gu	22
<210> 28	
<211> 22	
<212> RNA	

<213> Homo sapiens

<400> 28

uagcagcaca ucaugguuuu ca

22

<210> 29

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

uagcagcacg uaaaauuugg cg

22

<210> 30

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

aacauucaac gcugucggug agu

23

<210> 31

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

uaaagugcuu auagucagg uag

23

<210> 32

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

caaagugcuc auagucagg uag

23

<210> 33

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

agcuacauug ucugcugggu uuc

23

<210>	34	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	34	
	uggcucaguu cagcaggaac ag	22
<210>	35	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	35	
	uucacagugg cuaaguucug c	21
<210>	36	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	36	
	uagcaccauc ugaaaucggu ua	22
<210>	37	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	37	
	uagcaccauu ugaaaucggu ua	22
<210>	38	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	38	
	uguaaacauc cucgacugga ag	22
<210>	39	
<211>	23	
<212>	RNA	

<213> Homo sapiens
 <400> 39
 agcagcauug uacagggcua uca 23
 <210> 40
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 uauggcuuuu cauuccaug uga 23
 <210> 41
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 cccaguguuu agacuaucug uuc 23
 <210> 42
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

 cgcauccccu agggcauugg ugu 23
 <210> 43
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 aauggcgcca cuagguugu g 21
 <210> 44
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 cagcagcaau ucauguuuug aa 22
 <210> 45

<211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 uaccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 46
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 uaacagucua cagccauggu cg 22

<210> 47
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 ugucaguuug ucaaaauaccc ca 22

<210> 48
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 ugagaugaag cacuguagcu c 21

<210> 49
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 49

ucagugcauc acagaacuuu gu 22

<210> 50
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 50	
uaaggugcau cuagugcaga uag	23
<210> 51	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
cugaccuaug aaugacagc c	21
<210> 52	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 52	
uaauacuguc ugguaaaacc gu	22
<210> 53	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 53	
aaacucuacu uguccuucug agu	23
<210> 54	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 54	
ucaauaaug ucuguugaau u	21
<210> 55	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 55	
cagugcaaug uaaaaagggc au	22
<210> 56	
<211> 23	

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

agguucugug auacacuccg acu

23

<210> 57

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

uucacagugg cuaaguucug c

21

<210> 58

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

cagugcaaua guauugucac agc

23

<210> 59

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

ccucugggcc cuuccuccag

20

<210> 60

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

gcugacuccu aguccagggc uc

22

<210> 61

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 61

uuaucaagaau cuccaggggu ac	22
<210> 62	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 62	
acuggacuua gggucagaag gc	22
<210> 63	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 63	
uucauuuggu auaaacgcg auu	23
<210> 64	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 64	
guccucucc aaaugugucu ug	22
<210> 65	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 65	
aaccguaga uccgaucuug ug	22
<210> 66	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 66	
aaagugcuuc uuuugggu gu	22
<210> 67	
<211> 21	

<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 67	
uggguuuacg uugggagaac u	21
<210> 68	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 68	
aucacauugc cagggauuuc c	21
<210> 69	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 69	
ucagugcauc acagaacuuu gu	22