

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 10 月 25 日 (25.10.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/192499 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01) *A61K 31/7088* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/083412

(22) 国际申请日: 2018 年 4 月 17 日 (17.04.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710258136.6 2017 年 4 月 19 日 (19.04.2017) CN

(71) 申请人: 香港中文大学 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) [CN/CN]; 中国香港特别行政区新界沙田, Hong Kong (CN)。山大生殖研发中心有限公司 (SDIVF R&D CENTRE LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行

政区沙田香港科学园生物科技中心二座 5 楼 520 室, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 黄国柱(WONG, Kwow Chu, George); 中国香港特别行政区威尔斯亲王医院吕志和临床医学大楼神经外科 4 楼, Hong Kong (CN)。马金龙(MA, Jinlong); 中国香港特别行政区沙田香港科学园生物科技中心二座 5 楼 520 室, Hong Kong (CN)。潘伟生(POON, Wai Sang); 中国香港特别行政区威尔斯亲王医院神经外科 4 楼, Hong Kong (CN)。陈伟仪(CHAN, Wai Yee); 中国香港特别行政区中文大学罗桂祥生物医学大楼 G03, Hong Kong (CN)。路钢(LU, Gang); 中国香港特别行政区中文大学罗桂祥生物医学大楼 709, Hong Kong (CN)。熊志强(XIONG, Zhiqiang); 中国香港特别行政区沙田香港科学园生物科技中心二座 5 楼 520 室, Hong Kong (CN)。

(54) Title: CIRCULATING MICRORNA BIOMARKER FOR SUBARACHNOID HEMORRHAGE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 蛛网膜下腔出血的循环 microRNA 生物标记物和其应用

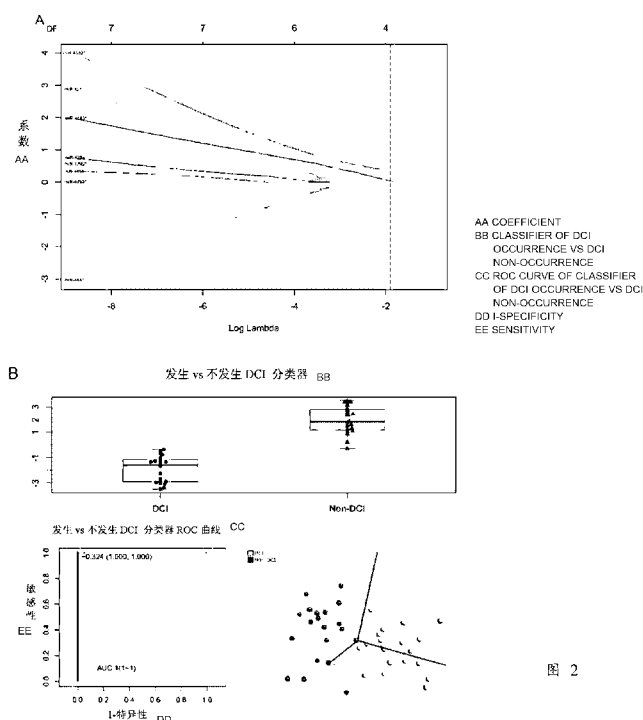


图 2

(57) Abstract: Provided is a biomarker for subarachnoid hemorrhage indicating a poor prognosis, wherein the poor prognosis is the onset of late cerebral infarction. The biomarker consists of the following miRNAs: miR-4463, miR-4532 and miR-1290, and the biomarker may also comprise miR-4793. Also provided are a method for diagnosing a subarachnoid hemorrhage or the prognosis thereof using the biomarker, a kit and a chip comprising the biomarker for diagnosing a subarachnoid hemorrhage or the prognosis thereof, and a preparation method therefor.

(74) 代理人: 北京汉昊知识产权代理事务所 (普通合伙) (HANHOW INTELLECTUAL PROPERTY PARTNER); 中国北京市海淀区海淀大街3号鼎好电子大厦A座19层1919室黄可峻, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(57) 摘要: 提供了表明不良预后的蛛网膜下腔出血的生物标记物, 所述不良预后为发生迟发性脑梗塞, 所述标记物由以下 miRNA 组成: miR-4463, miR-4532 和 miR-1290, 还可以包括 miR-4793。还提供了采用所述生物标记物诊断蛛网膜下腔出血或其预后的方法, 包含所述生物标记物诊断蛛网膜下腔出血或其预后的试剂盒和芯片, 及其制备方法。

蛛网膜下腔出血的循环 microRNA 生物标记物和其应用

5 本申请要求 2017 年 4 月 19 日提交的、申请号为 201710258136.6、
发明名称为“蛛网膜下腔出血的循环 microRNA 生物标记物和其应用”
的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

10 本发明涉及分子生物学和疾病诊断试剂制备领域。具体的，本发明
涉及蛛网膜下腔出血和其后发生迟发性脑梗塞的 microRNA 生物标记
物，以及所述 microRNA 在用于诊断或检测蛛网膜下腔出血和其后发
生迟发性脑梗塞，以及制备用于所述诊断或检测的试剂盒或基因芯片
的应用，特别是用在外周血样品，包括血清和血浆样品中。

背景技术

15 蛛网膜下腔出血（Subarachnoid hemorrhage, SAH）占中风的 3-5
%左右，而且是年轻人中风的重要原因，在全球带来严重的社会经济
负担。三分之一以上的 SAH 患者患有认知障碍，生活质量受损，可能
20 无法回到患病前的工作。

 迟发性脑梗塞（Delayed cerebral infarction, DCI）在高达 44% 的
SAH 患者中发生，通常在初次出血后第 4 至 7 天开始。DCI 是一个公
认的 SAH 后神经性影响的临床相关替代性标志。据已知报道，引起
蛛网膜下腔出血后的迟发性脑梗塞的相关因素包括年龄，初期神经功
25 能损伤，脑室内出血，蛛网膜下腔出血负荷和动脉瘤大小等。

 微小 RNA（miRNA）是一种小的（19-23bp），非编码和非常保守

的 RNA 分子。miRNA 在转录后通过抑制 mRNA 翻译或使 mRNA 分子去稳定（destablize）来调节基因的表达。人类基因组中有 1,881 个 miRNA，其中 296 个在 miRBase 21.0 被注释为高置信度。循环 miRNAs 已经被证明是脑血管病症的可能的诊断或预后生物标志物，这些脑血管病症包括例如在心肌梗塞，动脉粥样硬化，中风，脑梗死，高血压，
5 颅内动脉瘤（IA）和蛛网膜下腔出血（SAH）等。

对蛛网膜下腔出血后的迟发性脑梗塞做出及时的预测和诊断对及时防治有重要的意义。然而本领域还需要一种对蛛网膜下腔出血后的迟发性脑梗塞的诊断，特别是通过特异性相关 miRNA 的表达水平来对
10 蛛网膜下腔出血后的迟发性脑梗塞进行准确和快速的检测或预测的方法、试剂盒或基因芯片。

发明内容

本发明提供了表明蛛网膜下腔出血后的迟发性脑梗塞的由 miRNA 组成的生物标记物。本发明提供了通过在外周血样品，包括血清和血浆样品中检测所述生物标记物的 miRNA 的表达水平变化来检测或诊断蛛网膜下腔出血的预后（特别是对迟发性脑梗塞的预后）的方法以及用于这些方法的试剂盒或基因芯片。

在本发明的一个方面，提供了表明不良预后的蛛网膜下腔出血
20 （SAH）的生物标记物，所述不良预后为发生迟发性脑梗塞（DCI），所述标记物包括以下 miRNA：miR-4463，miR-4532，miR-1290，miR-4793，miR-421，miR-4492，miR-574，miR-4689，miR-4449，miR-93-5p，miR-4497 和 miR-297。上述 miRNA 中的一个，或其中多个 miRNA 的任意组合，可用于诊断蛛网膜下腔出血的不良预后，
25 所述不良预后为发生迟发性脑梗塞（DCI）。

在本发明的一个方面，提供了表明不良预后的蛛网膜下腔出血（SAH）的生物标记物，所述不良预后为发生迟发性脑梗塞（DCI），所述标记物由以下 miRNA 组成：miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。在本发明的其中又一个方面，所述标记物还包括 miR-4793。在本发明的更进一个方面，所述标记物还包括一个或多个以下 miRNA：miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。

本发明提供了通过测量下述 miRNA 的表达水平来诊断蛛网膜下腔出血的不良预后的方法：miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。在本发明的其中又一个方面，所述标记物还包括 miR-4793。所述不良预后为发生迟发性脑梗塞（DCI）。在本发明的其中一个方面，所述方法通过下述步骤诊断蛛网膜下腔出血（SAH）的不良预后：a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水平；b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。在本发明的其中又一个方面，当受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中对应 miRNA 的水平相比，测试样品中所述 miRNA 的水平的降低，指示着不良预后，即发生 DCI 的可能性较大。在本发明的其中一个方面，其中所述样品为外周血样品，例如血清和血浆样品中。

在本发明的更进一个方面，上述本发明的通过测量 miRNA 的表达水平来诊断蛛网膜下腔出血（SAH）的不良预后的方法中还包括测量一个或多个以下 miRNA 的表达水平：miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。

本发明还提供了测量 miRNA 的表达水平的试剂在用于制备诊断蛛网膜下腔出血（SAH）的预后的试剂盒或装置中的用途，其中包括用测量下述 miRNA 的表达水平的试剂：miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。

在本发明的其中又一个方面，其中还包括用于测量下述 miRNA 的表达水平的试剂：miR-4793。所述不良预后为发生迟发性脑梗塞（DCI）。

在本发明的其中一个方面，其中所述试剂盒和装置通过下述步骤诊断蛛网膜下腔出血（SAH）：a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水

5 平；b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。在本发明的其中又一个方面，当受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中对应 miRNA 的水平相比，测试样品中所述 miRNA 的水平的降低，指示着不良预后，即发生 DCI 的可能性较大。在本发明的其中一个方面，其中所述样品为外
10 周血样品，例如血清和血浆样品中。

在本发明的更进一个方面，上述本发明的测量 miRNA 的表达水平的试剂在用于制备诊断蛛网膜下腔出血（SAH）的预后的试剂盒或装置中的用途中，所述测量 miRNA 的表达水平的试剂还包括测量一个或多个以下 miRNA 的表达水平的试剂：miR-421，miR-4492，miR-574，

15 miR-4689，miR-4449，miR-93-5p，miR-4497 和 miR-297。

本发明还提供了用于诊断蛛网膜下腔出血（SAH）的预后的试剂盒或装置中，其中包括用于测量下述 miRNA 的表达水平的试剂：

miR-4463，miR-4532 和 miR-1290。在本发明的其中又一个方面，其中还包括用于测量下述 miRNA 的表达水平的试剂：miR-4793。所述不良

20 预后为发生迟发性脑梗塞（DCI）。在本发明的其中一个方面，其中所述试剂盒和装置通过下述步骤诊断蛛网膜下腔出血（SAH）：a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水平；b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。在本发明的其中又一个方面，当受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与
25 无患病对照样品中对应 miRNA 的水平相比，测试样品中所述 miRNA

的水平降低，指示着不良预后，即发生 DCI 的可能性较大。在本发明的其中一个方面，其中所述样品为外周血样品，例如血清和血浆样品中。

在本发明的更进一个方面，上述本发明的用于制备蛛网膜下腔出血（SAH）的预后的试剂盒或装置中，还包括测量一个或多个以下 miRNA 的表达水平的试剂：miR-421，miR-4492，miR-574，miR-4689，miR-4449，miR-93-5p，miR-4497 和 miR-297。

在本发明的其中又一个方面，前述试剂盒中包含所述 miRNA 的基因产物。在所述试剂盒中，还可以包含检测所述 miRNA 的基因产物的试剂，例如与所述基因产物结合的抗体或抗体片段。所述试剂还可被标记，例如被放射性标记或生物素标记等。

在本发明的其中又一个方面，前述装置为基因芯片，或称为微矩阵。所述芯片包括对针对 miRNA 的抗体和标记。

在本发明中，对 miRNA 的表达水平的测量通过检测转录的多核苷酸或其部分的存在来进行，其中转录的多核苷酸包含 miRNA 的编码区。

在本文中，术语“微小 RNA”、“microRNA”、“miR 基因产物”、“miR”和“miRNA”互换使用，是指来自 miR 基因的未加工的或加工过的 RNA 转录物。由于 miR 基因产物不翻译成蛋白，术语“miR 基因产物”不包括蛋白。未加工的 miR 基因转录物也称作“miR 前体”，通常包含长度为约 70-100 个核苷酸的 RNA 转录物。miR 前体可以消化加工成有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。该有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子也称作“加工过的 miR 基因转录物”或“成熟的 miRNA”。本发明的 miRNA 主要是指哺乳动物的 miRNA，特别是指人的 miRNA。

所述有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子可以通过天然加工途径 (例如, 使用完整细胞或细胞裂解物) 或通过合成加工途径 (例如, 使用分离的加工酶, 例如分离的 Dicer, Argonaut, 或 RNA 酶 III) 从 miR 前体得到。应当理解, 所述有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子也可以通

5 过生物或化学合成直接生成, 不必从 miR 前体加工。当在本文中用名称提及 miRNA 时, 该名称对应着前体和成熟形式两者, 除非另有说明。

本发明的 miRNA 主要是指人的 miRNA。例如, 在本文中, “miR-4433” 也代表 “hsa-miR-4433”。在本发明中涉及的 miRNA 包括其 miRNA 家族, 其家族成员和序列在例如 <http://www.mirbase.org/>

10 等网站公开。

在本文中, 蛋白符号不用斜体, 并全部大写; 基因符号使用斜体。但有时在本文中基因符号也不使用斜体。例如有时本文中的 miRNA “*miR-4463*” 也写为 “miR-4463”。

有关 miRNA 的序列如下:

miRNA	miRBase Accession	序列 (5' to 3')	SEQ ID No.
<i>hsa-miR-93-5p</i>	MIMAT0000093	5'-CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG-3'	SEQ ID No. 1
<i>hsa-miR-4463</i>	MI0016811	5'-AAUAGAUUAUUGGUCACCACC UCCAGUUUCUGAAUUUGUGAGAC UGGGUGGGGCCUGAGAAUUUGC -3'	SEQ ID No. 2
<i>hsa-miR-421</i>	MI0003685	5'-GCACAUUGUAGGCCUCAUUAA AUGUUUGUUGAAUGAAAAAUG AAUCAUCAACAGACAUUAAUUGG GCGCCUGCUCUGUGAUCUC-3'	SEQ ID No. 3
<i>hsa-mir-4492</i>	MI0016854	5'-CUGCAGCGUGCUUCUCCAGGCC CCGCGCGCGGACAGACACACGGA CAAGUCCCCGCCAGGGCUGGGCG CGCGCCAGCCGG-3'	SEQ ID No. 4
<i>hsa-miR-4793</i>	MI0017440	5'-UUUCUCCUCGCGCCCCGCACAU CCUGCUCCACAGGGCAGAGGGAG GCCAAGAAGACCUCUGCACUGUG AGUUGGCUGGCUGGAGGAA-3'	SEQ ID No. 5
<i>hsa-miR-4689</i>	MI0017322	5'-GGUUUCUCCUUGAGGAGACAU GGUGGGGGCCGGUCAGGCAGCCC AUGCCAUGUGUCCUCAUGGAGAG GCC-3'	SEQ ID No. 6
<i>hsa-miR-4449</i>	MI0016792	5'-AGCAGCCCUCGGCGGCCCGGGG GGCGGGCGGCGUGCCCCGUCCCG GGGUCGCGGAGGCACAGGCG-3'	SEQ ID No. 7

<i>hsa-miR-1290</i>	MI0006352	5'-GAGCGUCACGUUGACACUCAA AAAGUUUCAGAUUUUUGGAACA UCGGAUUUUGGAUUUUUGGAUCA GGGAUGCUCAA-3'	SEQ ID No. 8
<i>hsa-miR-4497</i>	MI0016859	5'-ACCUCCGGGACGGCUGGGCGCC GGCGGCCGGGAGAUCGCGCUUC CUGAAUCCCGGCCCGCCCGCCCG GCGCCCGUCCGCCCGCGGGUC-3'	SEQ ID No. 9
<i>hsa-miR-297</i>	MI0005775	5'-UGUAUGUAUGUGUGCAUGUGC AUGUAUGUGUAUAUACAUAUAUA UGUAUUAUGUACUCAUAUAUCA-3'	SEQ ID No. 10
<i>hsa-miR-574</i>	MI0003581	5'-GGGACCUGCGUGGGUGCGGGC GUGUGAGUGUGUGUGUGAGU GUGUGUCGCUCCGGGUCCACGCU CAUGCACACACCCACACGCCCCAC ACUCAGG-3'	SEQ ID No. 11
<i>hsa-miR-4532</i>	MI0016899	5'-ACAGACCCCGGGGAGCCCGGCG GUGAAGCUCCUGGUAUCCUGGGU GUCUGA-3'	SEQ ID No. 12

可以测量从受试者得到的生物样品的细胞中的 miR 基因产物的水平。例如，通过常规活检技术，可以从被怀疑患有肺癌的受试者取出组织样品。在另一个实施方案中，可以从受试者取出血液样品，并通

5 过标准技术，分离白细胞用于 DNA 提取。优选地，在放疗、化疗或其它治疗性处理之前，从受试者得到血液或组织样品。相应的对照组织或血液样品或对照参照样品，可以从受试者的未受影响的组织、从正常人个体或正常个体的群体、或从与受试者样品中大多数细胞相对应的培养细胞得到。然后与来自受试者的样品一起，加工处理对照组织

10 或血液样品，从而可以将来自受试者样品的细胞中从给定 miR 基因产生的 miR 基因产物的水平与来自对照样品的细胞的相应 miR 基因产物水平相对比。或者，可以与测试样品单独分开地得到和加工处理参照样品(例如在不同时间)，并将来自测试样品的细胞中从给定 miR 基因产生的 miR 基因产物的水平与来自参照样品的相应的 miR 基因产物水

15 平相对比。

在一个实施方案中，测试样品中至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平(即，miR 基因产物的表达被

“增量调节”)。如本文使用的,当来自受试者的细胞或组织样品中 miR 基因产物的量大于对照细胞或组织样品中相同基因产物的量时,该 miR 基因产物的表达被“增量调节”。在另一个实施方案中,测试样品中至少一种 miR 基因产物的水平小于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平(即, miR 基因产物的表达被“减量调节”)。如本文使用的,当从来自受试者的细胞或组织样品的基因产生的 miR 基因产物的量小于从对照细胞或组织样品中相同基因产生的量时,该 miR 基因产物的表达被“减量调节”。可以相对于一种或多种 RNA 表达标准,测定对照和正常样品中的相对 miR 基因表达。所述标准可包括,例如,零 miR 基因表达水平,标准细胞系中的 miR 基因表达水平,受试者的未受影响的组织中的 miR 基因表达水平,或以前对正常人对照群体得到的 miR 基因表达的平均水平。

使用适用于检测生物样品中的 RNA 表达水平的任意技术,可以测量样品中 miR 基因产物的水平。用于测定生物样品(例如,细胞,组织)中 RNA 表达水平的合适技术(例如, RNA 印迹分析, RT-PCR, 原位杂交)是本领域技术人员已知的。

通过逆转录 miR 基因转录物,随后通过聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增逆转录的转录物,也可以测定细胞中 miR 基因转录物的相对数目。可通过与内部标准例如来自存在于相同样品中的“管家”基因的 mRNA 的水平比较,来定量 miR 基因转录物的水平。用作内部标准的合适的“管家”基因包括例如肌球蛋白或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)。用于定量和半-定量 RT-PCR 的方法和其变化形式,是本领域技术人员众所周知的。

另外,还可构建基因芯片(即=微阵列)的寡物文库,其包含对于一组 miR 基因特异性的一组寡核苷酸(例如,寡脱氧核苷酸)探针。通过使用

该微阵列，可通过逆转录 RNA 以产生一组靶寡脱氧核苷酸，然后使其与微阵列上的探针寡脱氧核苷酸杂交，从而产生杂交或表达谱，来测定生物样品中多种微小 RNA 的表达水平。然后将测试样品的杂交谱与对照样品进行比较，以确定在实体癌细胞中具有改变的表达水平的微小 RNA。如本文所用的，“探针寡核苷酸”或“探针寡脱氧核苷酸”是指能够与靶寡核苷酸杂交的寡核苷酸。“靶寡核苷酸”或“靶寡脱氧核苷酸”是指待检测(例如通过杂交)的分子。“miR-特异性的探针寡核苷酸”或“对 miR 特异性的探针寡核苷酸”是指具有经选择与特定 miR 基因产物杂交或与该特定 miR 基因产物的逆转录物杂交的序列的探针寡核苷酸。

可以从由已知的 miRNA 序列产生的基因特异性寡核苷酸探针制备基因芯片，即微阵列。

附图说明

图 1 为对样品的 miRNA 实时荧光定量 PCR 测量和分析图。

图 2 为对样品中的本发明的 miRNA 组合（即 miR-4463, miR-4532, 和 miR-1290, 以及 miR-4793）在发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中的表达水平的 LASSO 算法分析以及结果示意图。

图 3 为对样品中的本发明的 miRNA 的组合（即 miR-4463, miR-4532, 和 miR-1290, 以及 miR-4793）在发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品，以及在对照组血液样品中的表达水平的 LASSO 算法分析以及结果示意图。

图 4 本发明的生物标记物中的 miRNA（即 miR-4463, miR-4532, 和 miR-1290, 以及 miR-4793）的下游靶标分析图。

具体实施方式

下面将结合实施例进一步说明本发明的实质内容和有益效果，该实施例仅用于说明本发明而非对本发明的限制。

5 实施例 1 病人和样品

该研究获得香港新界东医院联网-中文大学 (NTEC-CUHK) 临床研究伦理联合委员会批准，并获得所有参与患者或其最近血亲的书面知情同意书。在健康对照 (N = 20)，发生迟发性脑梗塞 (DCI) 的蛛网膜下腔出血 (SAH) 患者 (N = 20) 的 SAH 后第 7 天，无发生 DCI 的 SAH 患者 (N = 20) 的 SAH 后第 7 天，收集外周血 miRNA。SAH 患者自 2012 年至 2013 年期间来自香港中文大学威尔斯亲王医院。破裂性脑通过计算机断层扫描血管造影 (CTA) 诊断。相对于 SAH 患者，健康对照 (n = 20) 是从没有重大医学风险 (包括无吸烟史和高血压) 的 SAH 患者家属招募的。病人情况和体征如表 1 所示。

15 表 1 受试者体征

	对照 N=20	发生 DCI 的 SAH N=20	无发生 DCI 的 SAH N=20	P
统计项目				
年龄, 年	50 ± 17	59 ± 12	59 ± 11	
女性%	65 (13)	45 (9)	65 (13)	
接收病人时 WFNS%				
1-2	-	60 (12)	75 (15)	0.311
3-5	-	40 (8)	25 (5)	
接收病人时 CT 特征				
Fisher 3/4 级别%	-	100 (20)	100 (20)	1.000
风险因子				
高血压%	-	55 (11)	30 (6)	0.200
吸烟%	-	10 (2)	0 (0)	0.487
结果				
梗塞%	-	65 (13)	0 (0)	<0.001
中级 mRS 3mo	-	2	1	0.034
mRS 3mo > 2	-	45 (9)	15 (3)	0.082
mRS 3mo ≤ 2	-	55 (11)	85 (17)	

表中数据为 % (N), 平均值 ±SD, 或中位数。

其中：GCS, 格拉斯哥昏迷分级 (Glasgow Coma Scale) ; IVH, 脑室内出血 (Intraventricular hemorrhage) ; mRS, 改良 Rankin 量表评分 (modified Rankin Scale); 3mo, 3 个月; WFNS Grade, 世界神经外科学会分级 (World Federation of Neurosurgical Societies Grade)

5

实施例 2 迟发性脑梗塞 (DCI) 定义

在本研究中, 迟发性脑梗塞 (DCI) 被定义为在排除手术相关梗塞 (Procedure related infarction) 后, 由 CT 鉴定的脑梗塞 (Wong GK 等, Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2012;83:1112-1117; Vergouwen MD 等, Proposal of a multidisciplinary research group. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2010;41:2391-2395)。手术相关梗塞是指治疗后在约 12-24 h 时在术后 CT 显示的低密度区。所有参与研究的病人在 2-3 周后进行 CT 延时扫描。DCI 由两个神经放射医师达至一致同意确诊。

15

实施例 3 实时荧光定量 PCR

根据标准程序采用 EDTA 管获得外周血样品。将样品立即置于冰上, 并以在 4° C, 1000g 离心 15 分钟。收集血浆部分, 在 -80°C 等分分储。根据常规方法进行 RNA 分离和定量实时 PCR, 包括通过将 20% w/v CaCl₂ (Sigma, St.Louis, MO) 加入到血浆样品中来制备血清, 然后凝固过夜并离心。根据制造商的说明书, 使用 miRNeasy 血清/血浆试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从得到的血清样品中分离总 RNA。提取的 RNA 的量由 Nanodrop 2000UV-Vis 分光光度计 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 测量。用 Applied Biosystems SDS 软件 (Applied Biosystems, Waltham, MA) 对 Ct 值和溶解曲线进行分析。

25

本研究对总共 28 个特定的 miRNA 进行表达分析。这 28 个 miRNA 是从与 SAH 相关的 99 种可能异常调控(deregulated)的 miRNAs 中(Su XW 等, PLoS One. 2015;10:e0144724), 选择了在发生 DCI 和无发生 DCI 的 SAH 患者之间存在差异调节的前 20 个 miRNA, 以及选择了在 SAH 患者与健康对照之间存在差异调节的前 8 个 miRNA (其中有两个与前述 20 个 miRNA 有重叠), 以及 miR-132-3p 和 miR-324-3p 共有。表 2 是本研究中使用的 miRNAs 表达谱的 qPCR 引物的列表。

表 2 用于对 miRNA 进行 qPCR 的对应引物

miRNA	上游引物 (5' to 3')	下游引物 (5' to 3')
<i>hsa-miR-4433</i>	GGAGCCAGTTGGACAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTATGTC
<i>hsa-miR-93-5p</i>	GCAAAGTGCTGTTCTGTG	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTCTACCT
<i>hsa-miR-339-5p</i>	CAGTCCCTGTCCTCCAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCGT
<i>hsa-miR-3651-5p</i>	CATAGCCCGGTGCGCT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCATGT
<i>hsa-miR-27a</i>	CAGTTCACAGTGGCTAAGTTC	CAGTTTTTTTTTTTTTTGCGGAA
<i>hsa-miR-27b</i>	CAGTTCACAGTGGCTAAGTTC	TCCAGTTTTTTTTTTTTTGCAGA
<i>hsa-miR-15a</i>	CAGTAGCAGCACATAATGGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCAC
<i>hsa-miR-125a</i>	CCCTGAGACCCTTTAACCT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCAC
<i>hsa-miR-4454</i>	GCAGGGATCCGAGTCAC	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTGGT
<i>hsa-miR-132-3p</i>	GCAGTAACAGTCTACAGCCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTCGAC
<i>hsa-miR-4463</i>	GCAGGAGACTGGGGTG	GTTTTTTTTTTTTTTGGCCCCAC
<i>hsa-miR-324</i>	AGAACATTTCATTGTTGTCGGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTACAC
<i>hsa-miR-421</i>	GCAGATCAACAGACATTAATTGG	GTTTTTTTTTTTTTTGCGCCCA
<i>hsa-miR-4492</i>	GGGCTGGGCGC	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTGGC
<i>hsa-miR-4793</i>	TGCACTGTGAGTTGGCT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTAGC
<i>hsa-miR-4689</i>	CAGTTGAGGAGACATGGTG	GTTTTTTTTTTTTTTGGCCCCCA
<i>hsa-miR-4449</i>	GGGGCTGCGCGA	TCCAGTTTTTTTTTTTTTGCCT
<i>hsa-miR-1290</i>	CGCAGTGGAATTTTGGATCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTCCCT
<i>hsa-miR-4497</i>	TCCGGGACGGCTG	CCAGTTTTTTTTTTTTTGCCCA
<i>hsa-miR-4690-5p</i>	GAGCAGGCGAGGCT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCAG
<i>hsa-miR-4459</i>	GGAGGCGGAGGAGGT	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCTC
<i>hsa-miR-4674</i>	GCTGGGCTCGGGAC	CCAGTTTTTTTTTTTTTAGCCG
<i>hsa-miR-1268</i>	GGGCGTGGTGGTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCAC
<i>hsa-miR-3178</i>	GCGCGGCCGGA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCGAT
<i>hsa-miR-297</i>	GCAGATGTATGTGTGCATGTG	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCAT
<i>hsa-miR-574</i>	GTGAGTGTGTGTGTGTGAG	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTACA
<i>hsa-miR-4532</i>	CCCGGGGAGCCC	CAGTTTTTTTTTTTTTTCGCCG
<i>hsa-miR-4440</i>	TCGTGGGGCTTGCT	CAGTTTTTTTTTTTTTCAAGCCA
<i>cel-miR-39</i>	GTCACCGGGTGAAATCAG	CCAGTTTTTTTTTTTTTCAAGCTG

实施例 4 统计分析方法

使用 R package 3.0.1 (R Foundation for Statistical Computing, Austria, Austria) 分别使用来自 stats 包的函数 pHeatmap 和 prcomp 来计算并显示具有分层聚类 and PCA (主成分分析) 的热图。采用 R package pROC 用于绘制和可视化 ROC 曲线, 计算 AUC 和置信区间以评估基于 miRNA 的分类器 (miRNA-based classifier) 的有效性 (Robin X, 等, BMC Bioinformatics. 2011;12:77)。使用不同的 R package 和函数构建四个分类模型来找到可以区分发生 DCI 或无发生 DCI 的 SAH 患者的分类器, 即: 线性支持向量机 (the linear support vector machine, L-SVM: R package e1071, function svm, kernel = "linear"), 非线性支持向量器 (the non-linear support vector machine, Non-L-SVM: R package e1071, function svm, kernel = "redial"), 线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA: R package MASS, function lda) 和逻辑回归 (LR: R package stats, function glm, family= "binomial") (Lin XJ 等, Lancet Oncol. 2015;16:804-815)。采用 R package glmnet 用于通过补偿最大似然度拟合 LASSO 回归模型来定义基于 miRNA 的分类器 (Friedman J 等, J Stat Softw. 2010;33:1-22)。基于交叉验证 (cross-validation) 的 λ 值为 0.07765104。采用 t 检验计算 p 值。p < 0.05 的值被认为具有统计学意义。

实施例 5 发生 DCI 或无发生 DCI 的 SAH 相关 miRNA 的分类群聚 (Hierarchical clustering) 分析

对来自以下三组被测者的 28 个 miRNA 进行分类群聚来对 miRNA 的平均表达进行作图分析: 发生 DCI 的 SAH、无发生 DCI 的 SAH 和

健康对照。根据制造商提供的操作方法手册，采用芯片 Affymetrix GeneChip miRNA3.0 Arrays Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) 测量 miRNA 表达；采用 Affymetrix Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA) 对芯片信号进行扫描和采集分析。从显示上述三组受试者的全数
5 据矩阵的热图代表的系统树图看出，这三组受试者的 miRNA 表达图谱具有明显的聚类差异性，即表示这 28 个 miRNA 的分组能够区分发生 DCI 或无发生 DCI 的 SAH 患者。

实施例 6

10 对这 28 个 SAH 相关 miRNA 的表达水平进行实时荧光定量 PCR (qPCR)，并采用主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 进行模式识别，以评估发生或不发生 DCI 的两种 SAH 类型的间距联系 (distance connectivity)。图 1 显示实时荧光定量 PCR 的结果。其中图 1A 给出的是实时荧光定量 PCR 测得的 28 个 SAH 相关 miRNA 的表达
15 水平；miRNA 表达水平经过相对对照的标准化，以 $\Delta\Delta C_t$ 表示；图 1B 是所述发生或不发生 DCI 的两种 SAH 类型的 miRNA 表达水平的 PCA 图。

如图所示，PCA 分析得到两个明显区别的发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH 类型的群聚，其产生的重叠很小，证明了可以通过特定
20 的 miRNA 组合来对这两种 SAH 类型进行区分和分类。

实施例 7 评估用于表征发生 DCI 的 SAH 的单个 miRNA

采用受试者特征曲线分析 (receiver operating characteristics analysis, ROC analysis) 对可以用于区分和分类发生 DCI 的 SAH 和
25 不发生 DCI 的 SAH 的单个 miRNA 进行评估 (Hajian-Tilaki K. Caspian J

Intern Med. 2013;4:627-635)。根据在不同阈值的敏感度（真阳性率）和特异性（假阳性率），ROC 分析能被用于选择可区分发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH。

对前述在发生或不发生 DCI 的 SAH 患者组别获得的 28 个 SAH 相关 miRNA 的 qPCR 测量的表达水平绘制受试者特征曲线(ROC curve)。结果如下表 3 所示，其曲线下面积(AUC)超过 80% ($p < 0.0005$)的包括以下 miRNA： miR-4463, miR-4532, miR-1290, miR-4793, miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。其中，miR-1290 在阈值水平 8.653 的 AUC，敏感度（真阳性率）和特异性分别为 95.3% (95% CI: 0.897-1), 0.900 和 0.850。

表 3 SAH 分类中各 miRNA 的表达

miRNA	AUC (95% CI)	p value
<i>miR-4532</i>	0.9475 (0.873-1.000)	1.80E-08
<i>miR-4793</i>	0.93 (0.584-1.000)	2.14E-07
<i>miR-1290</i>	0.9525 (0.897-1.000)	3.54E-07
<i>miR-421</i>	0.9175 (0.836-0.999)	3.24E-06
<i>miR-4492</i>	0.895 (0.798-0.992)	7.26E-06
<i>miR-574</i>	0.8625 (0.753-0.972)	2.70E-05
<i>miR-4689</i>	0.86 (0.748-0.972)	2.87E-05
<i>miR-4449</i>	0.855 (0.741-0.969)	3.16E-05
<i>miR-93-5p</i>	0.835 (0.713-0.957)	9.31E-05
<i>miR-1268</i>	0.795 (0.648-0.942)	2.69E-04
<i>miR-4497</i>	0.8175 (0.685-0.950)	3.77E-04
<i>miR-3178</i>	0.7875 (0.640-0.935)	6.71E-04
<i>miR-4674</i>	0.765 (0.602-0.928)	7.94E-04
<i>miR-297</i>	0.81 (0.671-0.949)	9.15E-04
<i>miR-4463</i>	0.815 (0.677-0.953)	1.03E-03
<i>miR-4690</i>	0.7325 (0.568-0.897)	5.38E-03
<i>miR-4459</i>	0.73 (0.560-0.900)	9.75E-03
<i>miR-3651</i>	0.705 (0.534-0.876)	1.99E-02
<i>miR-132</i>	0.7125 (0.547-0.878)	2.37E-02
<i>miR-4433</i>	0.67 (0.497-0.843)	7.86E-02
<i>miR-339-5p</i>	0.6625 (0.490-0.835)	7.95E-02
<i>miR-125a</i>	0.66 (0.483-0.837)	1.58E-01
<i>miR-324</i>	0.59875 (0.419-0.779)	2.29E-01
<i>miR-4440</i>	0.5675 (0.385-0.750)	4.16E-01
<i>miR-4454</i>	0.5075 (0.321-0.694)	7.66E-01

<i>miR-27b</i>	0.49 (0.304-0.676)	8.62E-01
<i>miR-27a</i>	0.485 (0.299-0.671)	9.24E-01
<i>miR-15a</i>	0.525 (0.339-0.711)	9.52E-01

从这些 miRNA 中需要选择出能够区分发生或不发生 DCI 的 SAH 的 miRNA 组合。

5 实施例 8 用于表征发生 DCI 的 SAH 的 miRNA 组合

对本发明提供的用于区别发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH, 即可表征发生 DCI 的 SAH 的 miRNA 组合进行分析。

采用最小绝对值收敛和选择算子算法, 即 LASSO 算法 (least absolute shrinkage and selection operator method) 分析采用四个 miRNA
10 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 在区别发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 的准确性。结果如图 2 所示。图 2 为对样品中的四个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 在发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中的表达水平的 LASSO 算法分析以及结果示意图。其中图 2A 是
15 LASSO 算法获得的系数; 图 2B 显示出 LASSO 算法分析得到的上述四个 miRNA 组合用于区别发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 的结果: 图 2B 上部是 LASSO 算法结果箱线图; 下部左侧为 4 个 miRNA 的 ROC 曲线; 下部右侧是 4 个 miRNA 的 PCA 曲线。

ROC 分析显示, 根据 LASSO 算法得到的系数 (其中 miR-4463 的
20 为 0.16589606; miR-4532 的为 0.43352951 ; miR-4793 x 0.09569081; miR-1290 的为 0.2602013), 采用公式 $\ln(Y/1-Y) = -4.29759355 + \text{miR-4463} \times 0.16589606 + \text{miR-4532} \times 0.43352951 + \text{miR-4793} \times 0.09569081 + \text{miR-1290} \times 0.2602013$ 进行计算, 所述四个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的曲线下面积

(AUC)达到 100% (95% CI: 1-1, $p < 0.0001$)。PCA 分析证明, 所述四个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 能够产生两个明显区别发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH 类型的群聚。

由于 miR-4793 的系数为 0.09569081, 在公式中的贡献相对其它三个 miRNA (即 miR-4463, miR-4532 和 miR-1290) 的较小, 可以计算出由三个 miRNA (即 miR-4463, miR-4532 和 miR-1290) 形成的组合也能够明显区别发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH 类型。

图 3 为对样品中的所述四个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 在发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品, 以及在对照组血液样品中的表达水平的 LASSO 算法分析以及结果示意图。其中图 3A 中是所述 4 个 miRNA 在发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品和在对照组血液样品中的表达水平; 图 3B 是所述 4 个 miRNA 在不发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品和在对照组血液样品中的表达水平。

意想不到的是, 如图 3 所显示的, 所述四个 miRNA (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的活性在发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中被强烈地抑制, 而不发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中还是具有很高的活性。这四个 miRNA 在发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH 患者中的表达具有两相性, 其中, 在 ROC 分析中, 四个 miRNA (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的活性在发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中与对照组受试者的血液样品中比较, 曲线下面积(AUC)达到 99.3% (95% CI: 0.977 - 1, $p < 0.0001$); 不发生 DCI 的 SAH 患者的血液样品中与对照组受试者的血液样品中比较, AUC 达到 82.0% (95% CI: 0.685-0.955, $p < 0.0005$)。这进一步证明了本发明的这

三个 miRNA (miR-4463, miR-4532 和 miR-1290) 或四个 miRNA (miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的组合能够用于区别和定义发生 DCI 的 SAH 和不发生 DCI 的 SAH。

5 实施例 9

由于本发明采用的 4 个 miRNA (miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的下游靶标和特定作用还没有明确的研究, 发明人采用了 3 种算法(即 TargetScan 算法, miRanda 算法和 PITA 算法)对这几个 miRNA 进行基因中心性分析 (gene-centric analysis) 来研究其共同和特
10 异性的潜在靶标。图 5 是本发明 4 个 miRNA (miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290) 的下游靶标分析和结果图。图 5A 显示 3 种算法(即 TargetScan 算法, miRanda 算法和 PITA 算法)的结果; 图 5B 是分析结果的网络图。

如图 4 所示, 这 4 个 miRNA 的下游靶点有相当多的重叠。由此,
15 进一步证明这 4 个存在于影响到蛛网膜下腔出血后迟发性脑梗塞的共同调节途径中。

结论

本发明第一次提供了可区别和定义发生或不发生迟发性脑梗塞的
20 蛛网膜下腔出血的生物标记物, 该生物标记物包括三个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532 和 miR-1290) 或是四个 miRNA 的组合 (即 miR-4463, miR-4532, miR-4793 和 miR-1290)。在本发明之前, 本发明发现的上述生物标记物中的 miRNA 都没有被发现与 SAH 的病理相关。曾经有报道, miR-4532 与乳腺癌细胞化学耐药有关; miR-4793 的表达
25 在散发性结直肠癌 (sCRC) 患者的肝转移中升高。miR-1290 与不同类

型的癌症相关，包括结肠直肠癌，子宫颈癌，癌症，非小细胞肺癌，乳腺癌，肝细胞癌，胃癌，喉癌，淋巴细胞白血病，食管鳞状细胞癌（ESCC），肺腺癌，前列腺癌，胰腺癌和膀胱癌以及口腔黏膜下层纤维化，非酒精性脂肪性肝病和慢性鼻鼻窦炎；miR-4463 已被证明是多囊卵巢综合征（PCOS）和闭塞性动脉硬化症（ASO）的生物标志物。但没有报道这些 miRNA 与蛛网膜下腔出血的关联。

本发明发现的生物标记物可有效和准确地区分发生或不发生迟发性脑梗塞的蛛网膜下腔出血。本发明由此提供了用于区分和判断发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 的方法。本发明提供的用于分辨和区分发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 的分类器（即简便这两种 SAH 的 miRNA 组合）还可以区分健康对照与发生或不发生 DCI 的 SAH 类型，进一步证明了本发明 miRNA 组合针对发生 DCI 的 SAH 和无发生 DCI 的 SAH 的特异性。

本发明的方法可用于在外周血样品中检测相关 miRNA 的表达水平由此实现对蛛网膜下腔出血引起的迟发性脑梗塞的预后诊断。外周血样品具有取样操作简单的优点，能大大方便对脑部病症的诊断。并且外周血循环 miRNA 具有相对较高的稳定性，使得本发明发现的 miRNA 生物标记物具有比其它生物标记物更好的应用前景。

上面是对本发明进行的说明，不能将其看成是对本发明进行的限制。除非另外指出，本发明的实践将使用有机化学、聚合物化学、生物技术等的常规技术，显然除在上述说明和实施例中所特别描述之外，还可以别的方式实现本发明。其它在本发明范围内的方面与改进将对本发明所属领域的技术人员显而易见。根据本发明的教导，许多改变和变化是可行的，因此其在本发明的范围之内。

如无特别表示，本文中出现的温度的单位“度”是指摄氏度，即℃。

权 利 要 求 书

1. 一种表明蛛网膜下腔出血的不良预后的生物标记物,所述不良预后为发生迟发性脑梗塞,所述标记物由以下 miRNA 组成: miR-4463,
5 miR-4532 和 miR-1290。

2. 权利要求 2 的生物标记物,其中所述标记物还包括 miR-4793。

3. 权利要求 1 的生物标记物,其中还包括一个或多个以下 miRNA:
miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p,
miR-4497 和 miR-297。

10 4. 测量 miRNA 的表达水平的试剂在用于制备诊断蛛网膜下腔出血的不良预后的试剂盒或装置中的用途,所述不良预后为发生迟发性脑梗塞,其中所述测量 miRNA 的表达水平的试剂用于测量下述 miRNA 的表达水平: miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述标记物还包括 miR-4793。

15 6. 权利要求 4 的用途,其中所述 miRNA 还包括一个或多个以下 miRNA: miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。

7. 权利要求 4 的用途,其中所述试剂盒和装置通过下述步骤诊断蛛网膜下腔出血的不良预后:

20 a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水平;

b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。

8 权利要求 7 的用途,其中所述受试者样品为外周血样品。

9. 诊断蛛网膜下腔出血的不良预后的试剂盒或装置,所述不良预后为发生迟发性脑梗塞,其中包含测量下述 miRNA 的表达水平的试
25

剂：miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。

10. 权利要求 9 的试剂盒或装置，其中所述标记物还包括 miR-4793。

11. 权利要求 9 的试剂盒或装置，其中所述 miRNA 还包括一个或多个以下 miRNA：miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。

12. 权利要求 9 的试剂盒或装置，其中所述试剂盒和装置通过下述步骤诊断蛛网膜下腔出血：

a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水平；

10 b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。

13. 权利要求 12 的试剂盒或装置，其中所述受试者样品为外周血样品。

14. 诊断蛛网膜下腔出血的不良预后的方法，所述不良预后为发生迟发性脑梗塞，其中包括测量受试者样品中下述 miRNA 的表达水平的步骤：miR-4463, miR-4532 和 miR-1290。

15. 权利要求 14 的方法，其中还包括测量 miR-4793 的表达水平。

16. 权利要求 14 的方法，其中所述 miRNA 还包括一个或多个以下 miRNA：miR-421, miR-4492, miR-574, miR-4689, miR-4449, miR-93-5p, miR-4497 和 miR-297。

17. 权利要求 14 的方法，其中包括以下步骤：

a. 测量受试者样品中所述 miRNA 的表达水平；

b. 比较受试者样品中所述 miRNA 的表达水平与无患病对照样品中所述 miRNA 的表达水平。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述受试者样品为外周血样品。

19. 权利要求 15 的方法，其中所述 miRNA 还包括一个或多个以下 miRNA：miR-421，miR-4492，miR-574，miR-4689，miR-4449，miR-93-5p，miR-4497 和 miR-297。

20. 权利要求19的方法，其中所述受试者样品为外周血样品。

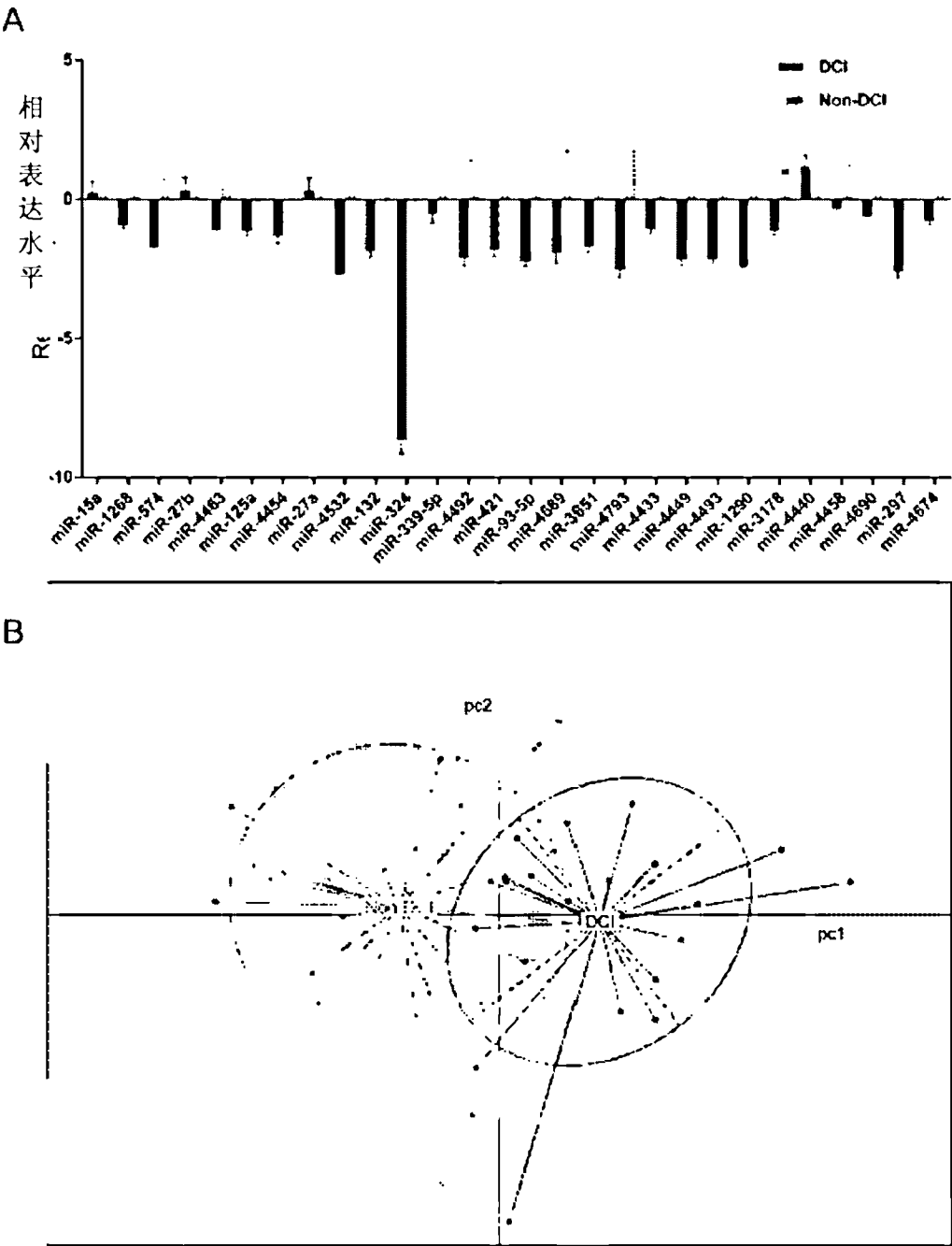


图 1

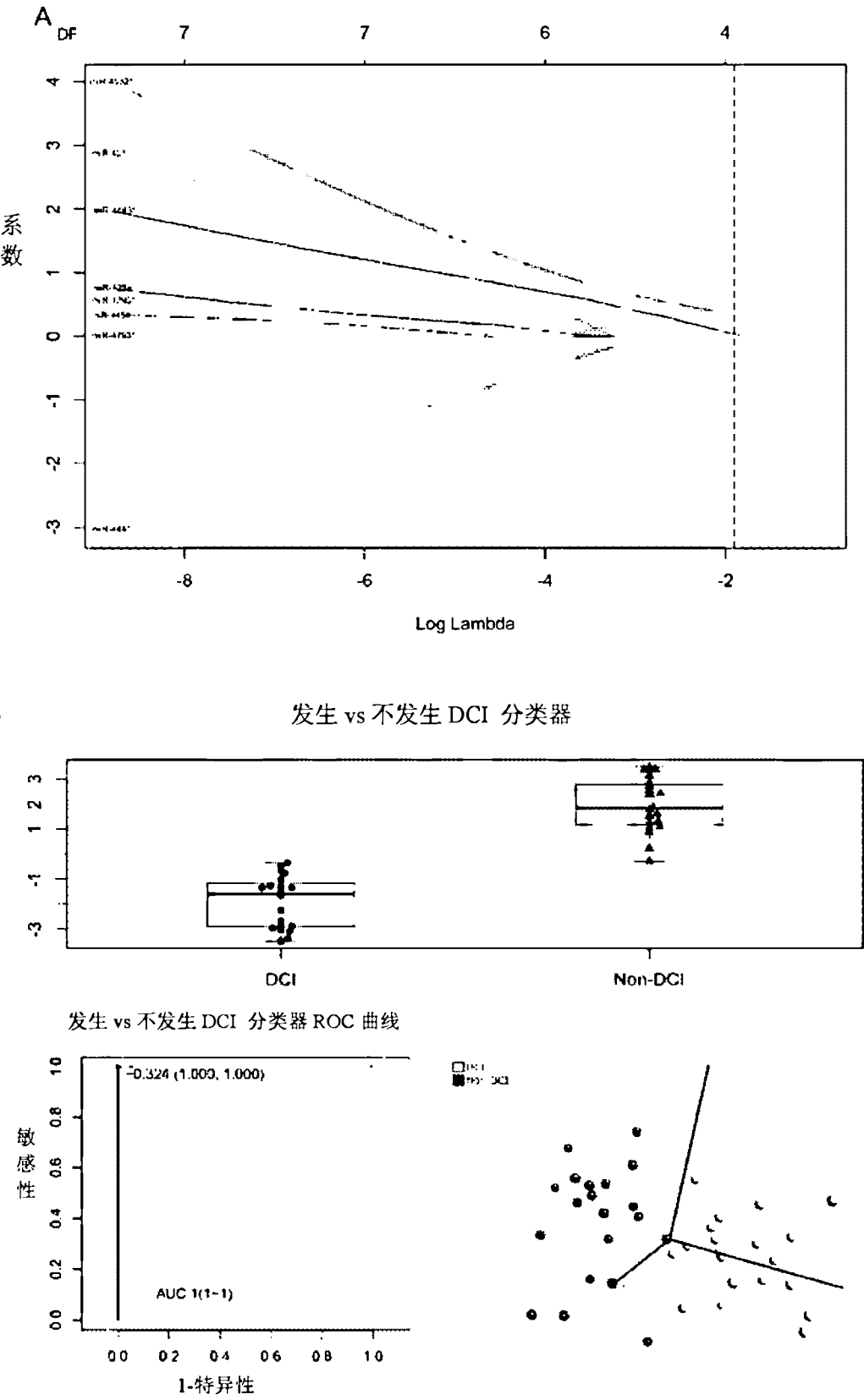


图 2

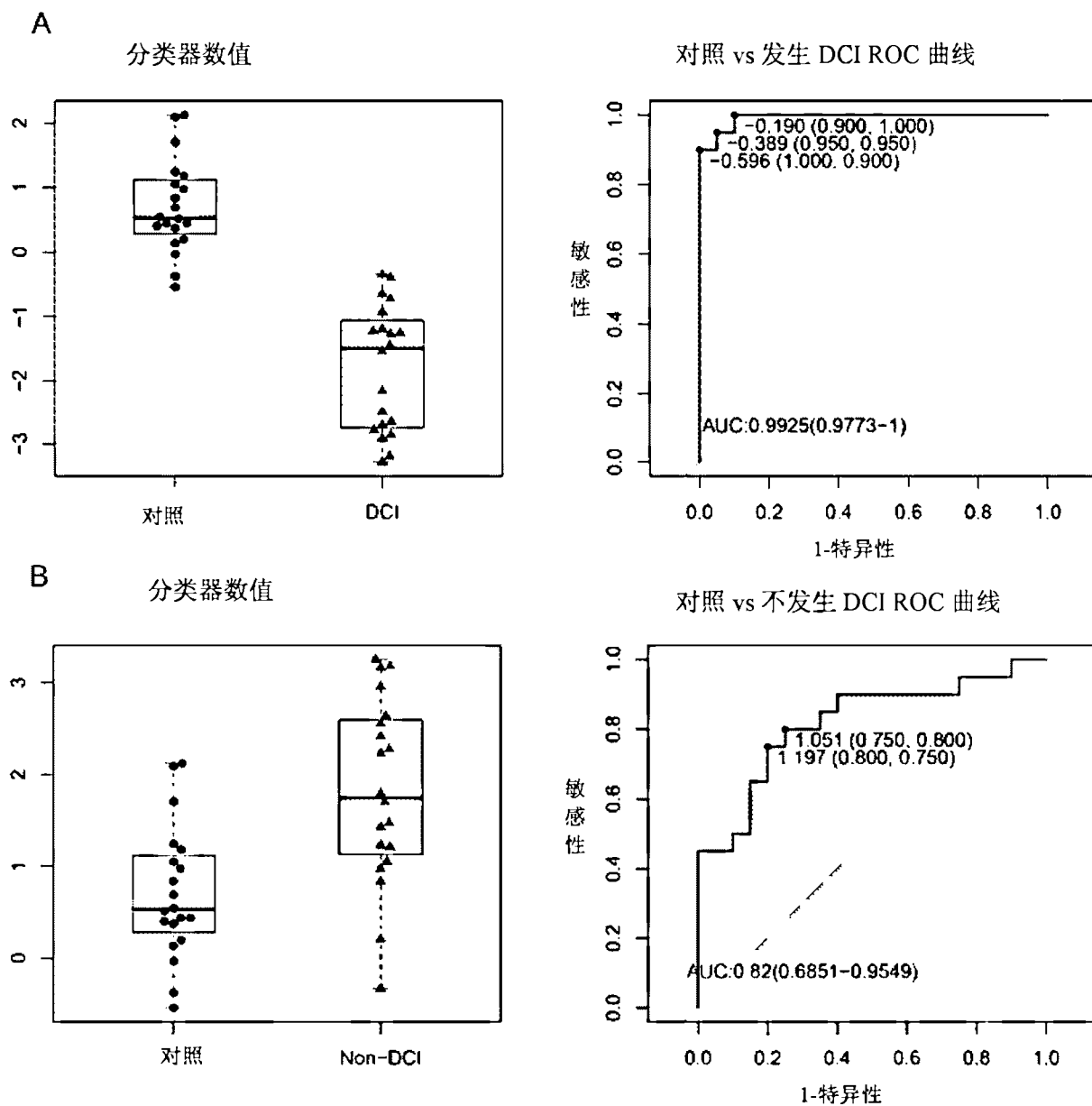


图 3

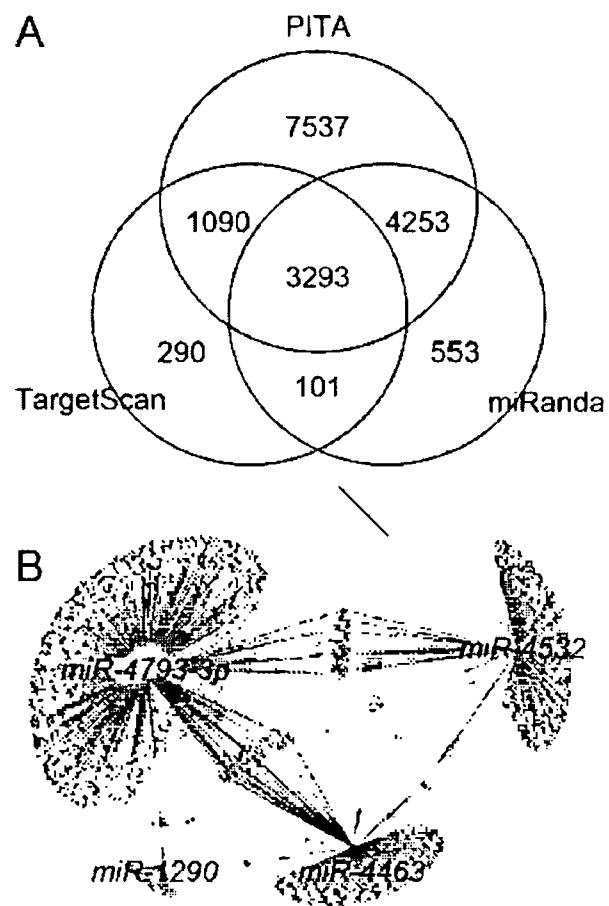


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/083412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2018.01) i; A61K 31/7088 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1-, A61K 31/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, VEN, DWPI, CJFD, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED, BAIDU, ISI web of Knowledge, NCBI, EBI, 迟发性脑梗塞, 脑梗塞, 脑梗死, 蛛网膜下腔出血, 标记, 标志, 生物标记物, 中风, 脑中风, mirna, microRNA, circulating mirna, mir-4463/4532/1290/4793, has-mir-4463/4532/1290/4793, mir4463/4532/1290/4793, delayed cerebral infarction, subarachnoid hemorrhage, dci, sah, stroke, biomarker, cerebral apoplexy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103421905 A (ZHANG, Biao), 04 December 2013 (04.12.2013), claim 1, and description, paragraphs 24-29 and 42-49	1-20
A	CN 105349666 A (BEIJING YANGSHEN BIOINFORMATICS TECHNOLOGY CO., LTD.), 24 February 2016 (24.02.2016), claims 1-10	1-20
A	CN 105543389 A (FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF SHANTOU UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE), 04 May 2016 (04.05.2016), claims 1-6	1-20
A	WO 2004059293 A2 (BIOSITE INC.), 15 July 2004 (15.07.2004), claims 1-2, 20-23 and 125, and description, embodiment 9	1-20
A	MIRZAEI, H. et al., MicroRNA: Relevance to Stroke Diagnose, Prognosis and Therapy, Journal of Cellular Physiology, 09 January 2017 (09.01.2017), abstract, and pages 861-862, and table 2	1-20
A	TAN, K.S. et al., Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients, Plos One, 4(11), 02 November 2009 (02.11.2009), abstract, and page 3, right-hand column, paragraph 1 and page 4, table 2	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 June 2018	Date of mailing of the international search report 16 July 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PENG, Haihang Telephone No. 86-(010)-53961949

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/083412

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LU, G. et al., Circulating MicroRNAs in Delayed Cerebral infarction After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage, J. Am. Heart Assoc., 4(6), 25 April 2017 (25.04.2017), abstract, and page 3, left-hand column, paragraphs 2-3 and page 8, right-hand column, paragraph 2, and figure 5	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/083412

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103421905 A	04 December 2013	None	
CN 105349666 A	24 February 2016	None	
CN 105543389 A	04 May 2016	CN 105543389 B	03 May 2017
WO 2004059293 A2	15 July 2004	AU 2003302340 B8	11 September 2008
		WO 2004059293 A3	31 March 2005
		AU 2003302340 B2	21 August 2008
		EP 1587955 A2	26 October 2005
		EP 1587955 A4	14 March 2007
		JP 2006526140 A	16 November 2006
		CA 2511501 A1	15 July 2004
		AU 2003302340 A1	22 July 2004

A. 主题的分类 C12Q 1/68(2018.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12Q1-;A61K31/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN, DWPI, CJFD, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED, BAIDU, ISI web of Knowledge, NCBI, EBI, 迟发性脑梗塞, 脑梗塞, 脑梗死, 蛛网膜下腔出血, 标记, 标志, 生物标记物, 中风, 脑中风, mirna, microRNA, circulating mirna, mir-4463/4532/1290/4793, has-mir-4463/4532/1290/4793, mir4463/4532/1290/4793, delayed cerebral infarction, subarachnoid hemorrhage, dci, sah, stroke, biomarker, cerebral apoplexy。																							
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 103421905 A (张飏) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 权利要求1, 说明书第24-29和42-49段.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105349666 A (北京洪深生物信息技术有限公司) 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24) 权利要求1-10.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105543389 A (汕头大学医学院第一附属医院) 2016年 5月 4日 (2016 - 05 - 04) 权利要求1-6.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2004059293 A2 (BIOSITE INC.) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 权利要求1-2, 20-23, 125及说明书实施例9.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>MIRZAEI, H. 等. "MicroRNA:Relevance to Stroke Diagnose, Prognosis and Therapy." Journal of Cellular Physiology., 2017年 1月 9日 (2017 - 01 - 09), 摘要, 第861-862页表2.</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TAN, K. S. 等. "Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients." PLOS ONE., 第4卷, 第11期, 2009年 11月 2日 (2009 - 11 - 02), 摘要, 第3页右栏第1段, 第4页表2.</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 103421905 A (张飏) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 权利要求1, 说明书第24-29和42-49段.	1-20	A	CN 105349666 A (北京洪深生物信息技术有限公司) 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24) 权利要求1-10.	1-20	A	CN 105543389 A (汕头大学医学院第一附属医院) 2016年 5月 4日 (2016 - 05 - 04) 权利要求1-6.	1-20	A	WO 2004059293 A2 (BIOSITE INC.) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 权利要求1-2, 20-23, 125及说明书实施例9.	1-20	A	MIRZAEI, H. 等. "MicroRNA:Relevance to Stroke Diagnose, Prognosis and Therapy." Journal of Cellular Physiology., 2017年 1月 9日 (2017 - 01 - 09), 摘要, 第861-862页表2.	1-20	A	TAN, K. S. 等. "Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients." PLOS ONE., 第4卷, 第11期, 2009年 11月 2日 (2009 - 11 - 02), 摘要, 第3页右栏第1段, 第4页表2.	1-20
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 103421905 A (张飏) 2013年 12月 4日 (2013 - 12 - 04) 权利要求1, 说明书第24-29和42-49段.	1-20																					
A	CN 105349666 A (北京洪深生物信息技术有限公司) 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24) 权利要求1-10.	1-20																					
A	CN 105543389 A (汕头大学医学院第一附属医院) 2016年 5月 4日 (2016 - 05 - 04) 权利要求1-6.	1-20																					
A	WO 2004059293 A2 (BIOSITE INC.) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 权利要求1-2, 20-23, 125及说明书实施例9.	1-20																					
A	MIRZAEI, H. 等. "MicroRNA:Relevance to Stroke Diagnose, Prognosis and Therapy." Journal of Cellular Physiology., 2017年 1月 9日 (2017 - 01 - 09), 摘要, 第861-862页表2.	1-20																					
A	TAN, K. S. 等. "Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients." PLOS ONE., 第4卷, 第11期, 2009年 11月 2日 (2009 - 11 - 02), 摘要, 第3页右栏第1段, 第4页表2.	1-20																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期 2018年 6月 26日		国际检索报告邮寄日期 2018年 7月 16日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 彭海航 电话号码 86-(010)-53961949																					

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	LU, G. 等. "Circulating MicroRNAs in Delayed Cerebral infarction After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." J. Am. Heart Assoc., 第4卷, 第6期, 2017年 4月 25日 (2017 - 04 - 25), 摘要, 第3页左栏第2-3段, 第8页右栏第2段, 图5.	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/083412

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103421905	A	2013年 12月 4日	无			
CN	105349666	A	2016年 2月 24日	无			
CN	105543389	A	2016年 5月 4日	CN	105543389	B	2017年 5月 3日
WO	2004059293	A2	2004年 7月 15日	AU	2003302340	B8	2008年 9月 11日
				WO	2004059293	A3	2005年 3月 31日
				AU	2003302340	B2	2008年 8月 21日
				EP	1587955	A2	2005年 10月 26日
				EP	1587955	A4	2007年 3月 14日
				JP	2006526140	A	2006年 11月 16日
				CA	2511501	A1	2004年 7月 15日
				AU	2003302340	A1	2004年 7月 22日