



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월09일
 (11) 등록번호 10-1685107
 (24) 등록일자 2016년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0123602
 (22) 출원일자 2013년10월16일
 심사청구일자 2014년11월04일
 (65) 공개번호 10-2015-0044332
 (43) 공개일자 2015년04월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 EP02487255 A2
 US20120214694 A1
 Shuangli Mi, et al. *Microna*, Vol.2(1), pp.64-72. (2013)
 Meng-Hsuan Mo et al. *Journal of Cancer*, Vol.3, pp.432-448. (2012)

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
 김용백
 서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 수의과대학 임상병리학 실험실
 류덕영
 서울 서초구 신반포로 9, 91동 105호 (반포동, 주공아파트)
 (74) 대리인
 리엔특허법인

전체 청구항 수 : 총 11 항

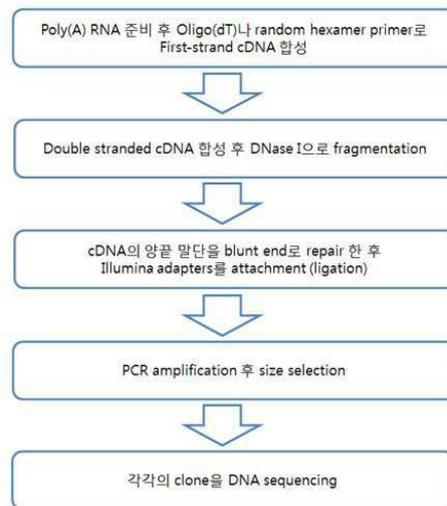
심사관 : 신원혜

(54) 발명의 명칭 **개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물 및 키트, 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법 및 치료제를 탐색하는 방법**

(57) 요약

개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물 및 키트, 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법 및 개체의 조직 또는 장기 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111159-4

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 말의 microRNA 지도 제작 및 주요 질병 진단을 위한 활용법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2011.12.27 ~ 2015.12.26

명세서

청구범위

청구항 1

eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488에 특이적으로 결합하는 물질인 것인 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488, 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 또는 그 조합인 것인 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 조성물.

청구항 4

eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 키트.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 제제는 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488에 특이적으로 결합하는 물질인 것인 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 키트.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 제제는 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488, 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 또는 그 조합인 것인 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상 진단용 키트.

청구항 7

에쿠스 카발루스로부터 분리된 시료 중의 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 측정하는 단계, 및

상기 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 대조군에서 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상을 예측 또는 진단하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준이 대조군에서 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상이 일어난 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 측정하는 단계는 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 양을 측정하는 것인 방법.

청구항 10

후보물질을 에쿠스 카발루스에 투여하는 단계;

상기 에쿠스 카발루스로부터 분리된 시료 중의 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준을 대조군에서 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준이 대조군에서 측정된 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488의 발현 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 에쿠스 카발루스의 발적을 동반하는 결장 손상의 치료에 효과적인 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물 및 키트, 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법 및 조직 또는 장기 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] miRNAs는 mRNA에 결합하여 유전자 발현을 직접 조절하는 역할을 갖고 있다. miRNA는 영장류, 설치류, 및 어류 등의 척추동물, 곤충 등의 무척추 동물, 및 바이러스에도 존재하며 진화론적으로 잘 보존되어 있다. 연구에 따르면 miRNA는 발생 과정에서 중요한 역할을 담당하며, 발현 양상이 조직 특이적인 것으로 알려져 있다. 사람의 경우 소장과 대장 유래 장 상피세포가 각각 독특한 miRNA 발현 양상을 보이며, 분화 정도에 따른 차이도 관찰되었다. 또 다른 연구는 쥐의 공장을 대상으로 장 점막에서 발현되는 miRNA 종류 및 양상을 보고하였고, 형질전환 마우스를 이용하여 miRNA가 상피세포의 분화, 조직화, 이동 및 보호 장벽 기능 부여 등 다양한 위장관계 생리학적 기능에 역할을 하고 있음을 증명하였다. 간, 공장, 및 췌장 등 내배엽 유래 장기의 miRNA 발현 양상을 분석한 보고에 따르면, 많은 수의 miRNA가 조직 특이성을 보이며, 또한 조직 특이적인 단백질 발현 양상과도 상관관계가 있음이 제시되었다.

[0003] miRNA는 동물의 생리 및 병리적 조건에 의하여 발현량이 달라진다. 현재까지 질병과 관련된 miRNA 연구는 주로 암을 대상으로 수행되어 왔다. 최근에는 다양한 miRNA가 각종 암에서 특이적으로 발현되고 있으며 발암기전에 큰 역할을 하고 있음에 착안하여 암의 조기 진단 및 세분화에 활용하고자 하는 노력이 계속되고 있다. 현재 일부의 연구팀은 폐암에서 miRNA 발현 양상을 이용한 진단과 예후 판정마커로 활용한 방법을 개발하는데 성공하였다. 암 이외에도 위장관계 질병 중 염증성 및 자가 면역성 질병으로 알려진 궤양성 대장염 및 크론병 환자의 혈액 내 miRNA의 발현 양상이 서로 다름이 보고되었으며, 말초 혈액에 존재하는 microRNA 양상을 이용한 장관계 질병의 감별 진단에 대한 효용성과 가능성이 제시된 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 일 양상은 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물을 제공한다.
- [0005] 다른 양상은 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 키트를 제공한다.
- [0006] 다른 양상은 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법을 제공한다.
- [0007] 다른 양상은 개체의 조직 또는 장기 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 eca-mir-365-2, eca-mir-190, eca-mir-29b, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을

측정하기 위한 제제를 포함하는, 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물을 제공한다.

- [0009] 용어 "miRNA"는 microRNA 또는 miRs로 지칭될 수 있다. miRNA의 길이는 약 19 내지 25, 또는 약 21 내지 23개의 뉴클레오티드인 RNA 가닥일 수 있다. miRNA는 DNA로부터 전사되지만 단백질로 번역되지 않으므로, 비-코딩 RNA를 포함하는 유전자에 의해 코딩된다. miRs는 공지의 원발성 전사체 pri-miRNA로부터 pre-miRNA라고 불리는 짧은 스템-루프 (stem-loop) 구조로 프로세스되고, 최종적으로 생성된 단일 가닥 miRNA로 프로세스된다. pre-miRNA는 자가-상보 영역내에서 자체적으로 안으로 접히는 구조를 형성할 수 있다. 그 후 상기 구조는 동물에서는 뉴클레아제에 의해 프로세스된다. 성숙 miRNA 분자는 하나 이상의 mRNA 분자에 부분적으로 상보적이며, 단백질의 전사를 조절하는 기능을 할 수 있다. miRNA의 확인된 서열은 www.microRNA.org, www.mirbase.org, 또는 www.mirz.unibas.ch/cgi/miRNA.cgi. 와 같은 공개된 이용가능한 데이터베이스에서 평가할 수 있다. miRNAs는 "mir-[숫자]"와 같은 작명 협정에 따라 일반적으로 번호를 할당받는다. miRNA의 숫자는 이미 확인된 miRNA 종에 대해 발견된 순서에 따라 할당된다. miRNA가 상이한 유기체의 공지의 miRNA에 유사한 것으로 발견되었다면, 이름은 [유기체 확인자]- mir-[숫자]의 형태로, 선택적 유기체 확인자 이름이 제공된다. 성숙한 microRNA는 보통 접두사 "miR"가 붙고, 유전자 또는 전구물질 miRNA는 접두사 "mir"가 붙는다. 본 발명의 내용에서, 접두사 mir-* 또는 miR-*를 가진 임의의 microRNA (miRNA 또는 miR)는 명시적으로 다른 언급이 없는 한, 전구물질 및/또는 성숙 종을 모두 포함하는 것으로 이해해야 한다. miR 명명에 대한 상세한 내용은 www.mirbase.org 또는 Ambros et al., A uniform system for microRNA annotation, RNA 9:277-279 (2003)을 참고한다.
- [0010] 상기 eca-mir-365-2, eca-mir-190, eca-mir-29b, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488는 각각 서열번호 1 내지 10의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있으며, 이를 표 1에 나타내었다.
- [0011] 표 1에 나타낸 miRNA는 장기로부터 특이적으로 발현되며 높은 발현 수준을 나타내며, 정상인 개체의 혈장에는 낮은 농도로 존재한다. 상기 miRNA는 조직 손상 정도에 비례하여 혈장으로 누출된다.
- [0012] miRNA는 RNase A와 같은 핵산 분해 효소, 동결과 해동의 반복, 또는 pH 변화 등의 외부 조건에 따라 분해되지 않고 안정적이며, 상기 miRNA의 발현량이 반복적이고 일관되게 측정될 수 있다. 또한, miRNA는 증폭을 통한 정량이 가능하므로 검체 내에 미량으로 존재하여도 검출할 수 있고, 또한 miRNA 발현 수준의 미세한 변화 정도까지 검출할 수 있다.
- [0013] 상기 miRNA는 에쿠스 카발루스 유래이다. 상기 eca-mir-365-2, eca-mir-190, eca-mir-29b, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현의 증가는 개체의 조직 또는 장기 손상과 연관된 것으로 본 발명자들에 의해 밝혀졌다. 따라서, 상기 하나 이상의 miRNA의 발현 수준은 개체의 조직 또는 장기의 손상, 예를 들면 결장, 간장 또는 근육의 손상을 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0014] 상기 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, 및 eca-mir-488로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 개체의 결장 손상 진단용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 상기 eca-mir-106b, eca-mir-450, 및 eca-mir-101-2로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 개체의 간장 손상 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 상기 eca-mir-365-2, eca-mir-190, 및 eca-mir-29b 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 개체의 근육 손상 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] eca-mir-155의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0013182이고 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012927의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-196b의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0012939이고 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012693의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-18a의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0013085이고 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012832의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-488의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0012965이고 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012718의 Accession Number를 갖는다.
- [0018] eca-mir-106b의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0013054이고 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012797의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-450의 mature 서열의 Accession Number는

MIMAT0013219이고 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012965의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-101-2의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0012951이고 서열번호 7의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012861의 Accession Number를 갖는다.

[0019] eca-mir-365-2의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0013038이고 서열번호 8의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012802의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-190의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0012896이고 서열번호 9의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012652의 Accession Number를 갖는다. eca-mir-29b의 mature 서열의 Accession Number는 MIMAT0012941이고 서열번호 10의 뉴클레오티드 서열을 갖고, stem-loop 서열은 MI0012695의 Accession Number를 갖는다.

[0020] 본 명세서에 있어서, 용어 "eca-mir-155", "eca-mir-196b", "eca-mir-18a", "eca-mir-488", "eca-mir-106b", "eca-mir-450", "eca-mir-101-2", "eca-mir-365-2", "eca-mir-190" 및 "eca-mir-29b"는 천연적으로 존재하는 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-365-2, eca-mir-190 및 eca-mir-29b, 및 그의 기능적 변이체를 포함하는 것으로 해석된다.

표 1

miRNA	서열
eca-mir-155	UUAU GCUA UCGUG AUAGG GGU (서열번호 1)
eca-mir-196b	UAGGU AGUUU CCUGU UGUUG GG (서열번호 2)
eca-mir-18a	UAAGG UGCAU CUAGU GCAGA UAG (서열번호 3)
eca-mir-488	UUGAA AGGCU AUUUC UUGGU C (서열번호 4)
eca-mir-106b	UAAAG UGCUG ACAGU GCAGA U (서열번호 5)
eca-mir-450	UUUUG CGAUG UGUUC CUAU AU (서열번호 6)
eca-mir-101-2	UACAG UACUG UGAUA ACUGA A (서열번호 7)
eca-mir-365-2	UAAUG CCCCU AAAAA UCCUU AU (서열번호 8)
eca-mir-190	UGAUA UGUUU GAUUA AUUAG GU (서열번호 9)
eca-mir-29b	UAGCA CCAUU UGAAA UCAGU GUU (서열번호 10)

[0022] 상기 개체의 제염염 진단용 조성물은 상기 하나 이상의 miRNA의 양을 측정하기 위한 제제를 포함하는 것일 수 있다. 상기 제제는 상기 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 물질일 수 있다. 상기 제제는 상기 하나 이상의 miRNA 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 또는 이들의 안티센스 서열; 또는 그 조합일 수 있다. 상기 프라이머는 중합효소에 의한 중합 반응에서 중합개시점을 제공하는 것일 수 있다. 상기 프라이머는 핵산 증폭 반응에서 사용되는 것일 수 있다. 용어 "증폭 (amplification)"은 표적 서열 또는 그의 상보적인 서열의 카피 수를 증가시키는 것을 나타낸다. 상기 핵산 증폭 반응은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 핵산의 증폭은 증폭 동안 복수의 사이클을 필요로 하는 방법 또는 단일 온도에서 수행되는 방법을 포함한다. 순환 방법 (cycling techniques)의 예는 열 순환을 필요로 하는 방법을 포함한다. 열 순환을 필요로 하는 방법은 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 포함한다. PCR은 당업계에 알려져 있다. PCR은 보통 열 변성에 의하여 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 변성시키는 단계, 프라이머를 상기 단일가닥 DNA에 어닐링하는 단계; 및 상기 프라이머로부터 상보적 가닥을 합성하는 단계를 포함한다. 등온 증폭 방법은 단일 온도 또는 증폭 과정의 주요 양상이 단일 온도에서 수행되는 방법이다. 이중가닥을 분리하기 위하여 반응 산물을 가열하여 추가적 프라이머가 결합할 수 있도록 하는 PCR과는 대조적으로, 등온 방법은 이중가닥을 분리하고 주형을 재카피하기 위하여 가닥 치환 폴리머라제 (strand displacing polymerase)에 의존한다. 등온 방법은 반복 주형 카피 (reiterative template copying)를 개시하기 위하여 프라이머의 치환에 의존하는 방법과 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법으로 구분할 수 있다. 프라이머의 치환에 의존하는 방법은 헬리카제 의존적 증폭 (helicase dependant amplification: HDA), 엑소뉴클레아제 의존적 증폭 (exonuclease dependant amplification), 리코비나제 중합효소증폭 (recombinase polymerase amplification: RPA) 및 루프 매개된 증폭 (loop mediated amplification: LAMP)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다. 단일 프라이머 분자의 연속된 재사용 또는 신규 합성에 의존하는 방법은 가닥치환증폭 (strand displacement amplification: SDA) 및 핵산 기반 증폭 (nucleic acid based amplification: NASBA 및 TMA)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함한다. 상기 프라이머는 선택되는 증폭 방법에 따라 하나, 2, 3, 4, 5, 6 이상의 세트로 포함될 수 있다. 상기 프라이머는 PCR용 프라이머일 수 있다.

- [0023] miRNA 발현 수준 측정은 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상을 진단하기 위하여 개체의 miRNA의 존재여부와 발현정도를 확인하는 과정으로서 miRNA 양의 측정일 수 있다. 이는 miRNA를 직접 분리하거나, 상기 miRNA에 대한 프라이머 또는 프로브를 이용하여 측정할 수 있다. 이를 위한 분석방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting), DNA를 포함한 핵산 마이크로어레이 또는 그 조합을 이용하는 것을 포함할 수 있다. RT-PCR은 RNA를 분석하는 방법으로, miRNA를 역전사하여 얻어진 cDNA를 PCR로 증폭하여 분석하는 방법이다. 상기 RT-PCR 중 증폭 단계에서 상기 유전자에 특이적으로 제조된 프라이머 쌍을 사용하며, RT-PCR 후 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 상기 유전자의 miRNA 발현 여부와 발현 수준을 확인할 수 있고 이를 정상대조군과 비교함으로써, 개체의 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 유무 및 그 정도를 판단할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에 있어서 용어 "프라이머"는 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 (즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들면 상기 하나 이상의 miRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 유무 또는 그 정도를 확인할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0025] 본 명세서에 있어서 용어 "프로브"란 표적 핵산 예를 들면, miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 miRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들면 상기 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 miRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 유무 또는 그 정도를 확인할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등) 로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 또는 바이오 틴을 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 발현 수준은 개체로부터 분리된 시료 중의 발현 수준일 수 있다. 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 대변, 타액, 눈물, 뇌척수액, 세포, 조직 또는 그 조합일 수 있다. 상기 조직은 결장, 간장, 또는 근육일 수 있다. 상기 개체는 단체류 (*Perissodactyla*)에 속하는 것일 수 있다. 상기 개체는 에쿠스 (*Equus*) 속일 수 있다. 에쿠스 속은 말, 당나귀, 또는 얼룩말을 포함할 수 있다. 상기 말은 에쿠스 페루스 (*equus ferus*) 종일 수 있다. 상기 에쿠스 페루스 (*equus ferus*) 종은 에쿠스 페루스 카발루스 (*Equus ferus caballus*), 에쿠스 페루스 페루스 (*Equus ferus ferus*), 또는 에쿠스 페루스 프르즈왈스키 (*Equus ferus przewalskii*) 아종을 포함할 수 있다. 상기 개체는 말, 물소, 코뿔소, 또는 낙타를 포함할 수 있다.
- [0028]
- [0029] 다른 양상은 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-365-2, eca-mir-190, 및 eca-mir-29b로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 키트를 제공한다.

- [0030] "하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 체제", "개체" 및 "조직 또는 장기 손상 진단용"에 대하여는 상기 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 진단용 조성물에 대한 설명에서 기술한 바와 같다.
- [0031] 상기 키트는 예를 들면 miRNA의 발현량을 측정할 수 있는, 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 진단용 마이크로어레이일 수 있다. 상기 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기의 손상 진단용 마이크로어레이는 상기 miRNA를 이용하여 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있다. 상기 마이크로어레이는 상술한 miRNA 또는 그와 상보적 서열, 또는 그에 대응되는 핵산 서열이 프로브로서 기관에 부착되어 있는 것일 수 있다. 상기 핵산 서열은 DNA, PNA (peptide nucleic acids), LNA (locked nucleic acids), 이들의 조합, 및 이들의 유사체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 상기 키트가 예를 들면 상술한 유전자의 miRNA의 발현량을 측정하기 위한 경우, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자의 miRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시리보뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(dEPC-water), 또는 멸균수를 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0033] 다른 양상은 개체로부터 분리된 시료 중의 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-365-2, eca-mir-190, 및 eca-mir-29b로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계, 및 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 개체는 단제류 (*Perissodactyla*)에 속하는 것일 수 있다. 에쿠스(*Equus*) 속일 수 있다. 에쿠스 속은 말, 당나귀, 또는 얼룩말을 포함할 수 있다. 상기 말은 에쿠스 페루스 (*equus ferus*) 종일 수 있다. 상기 에쿠스 페루스 (*equus ferus*) 종은 에쿠스 페루스 카발루스 (*Equus ferus caballus*), 에쿠스 페루스 페루스 (*Equus ferus ferus*), 또는 에쿠스 페루스 프르즈왈스키 (*Equus ferus przewalskii*) 아종을 포함할 수 있다. 상기 개체는 말, 물소, 코뿔소, 또는 낙타를 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 발현 수준은 miRNA의 발현 수준일 수 있다. 따라서, 상기 측정은 miRNA의 양일 수 있다. 상기 miRNA의 양의 측정에 대하여는 상기한 바와 같다.
- [0036] 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 대변, 타액, 눈물, 뇌척수액, 세포, 조직 또는 그 조합일 수 있다. 상기 조직은 결장, 간장, 또는 근육일 수 있다.
- [0037] 상기 방법은 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함한다. 상기 대조군은 조직 또는 장기가 손상되지 않은 개체일 수 있다.
- [0038] 상기 방법은 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 개체의 조직 또는 장기가 손상된 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 유전자의 miRNA 발현 수준이 정상대조군의 miRNA의 발현 수준에 비하여 약 2 내지 8배 이상, 예를 들면 약 3 내지 8배 이상, 4 내지 8배 이상, 5 내지 8배 이상, 6 내지 8배 이상, 또는 7 내지 8배 이상인 경우, 해당 장기의 손상이 있는 것으로 결정할 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준보다 같거나 낮은 경우, 상기 개체는 조직 또는 장기가 손상되지 않은 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0040] 다른 양상은 후보물질을 개체에 투여하는 단계; 상기 개체로부터 분리된 시료 중의 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-365-2, eca-mir-190, 및 eca-mir-29b로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 개체의 조직 또는 장기의 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법을 제공한다.
- [0041] 상기 방법은 후보 물질을 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 후보 물질은 결장 치료에 효과적인 것으로 예

상되는 임의의 물질일 수 있다. 상기 투여는 선택되는 물질에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피 (transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여된다. 상기 물질은 전신적으로 또는 국부적, 예를 들면 결장, 간장, 또는 근육에 투여될 수 있다.

[0042] "상기 개체로부터 분리된 시료 중의 eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-106b, eca-mir-450, eca-mir-101-2, eca-mir-365-2, eca-mir-190, 및 eca-mir-29b로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계" 및 "상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준을 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준과 비교하는 단계"에 대하여는 상기한 바와 같다.

[0043] 상기 개체는 조직 또는 장기, 예를 들면 결장, 간장 및 근육이 손상된 개체일 수 있다.

[0044] 상기 방법은, 상기 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준이 대조군에서 측정된 하나 이상의 miRNA의 발현 수준보다 낮은 경우, 상기 후보 물질을 상기 후보 물질을 개체의 조직 또는 장기 손상의 치료에 효과적인 것으로 결정하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0045] 일 양상에 따른 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 조성물에 따르면, 개체의 조직 또는 장기 손상 유무를 효율적으로 진단할 수 있다. 또한 상기 조성물은 시료 처리와 저장 과정 등의 외부적 요인에 의해서 변질되지 않아 안정적일 수 있다.

[0046] 일 양상에 따른 개체의 조직 또는 장기 손상 진단용 키트에 따르면, 개체의 조직 또는 장기 손상 유무를 효율적으로 진단할 수 있다.

[0047] 일 양상에 따른 개체의 조직 또는 장기 손상을 예측 또는 진단하는 방법에 따르면, 개체의 조직 또는 장기 손상을 효율적으로 예측 또는 진단할 수 있다.

[0048] 일 양상에 따른 개체의 조직 또는 장기 손상에 대한 치료제를 탐색하는 방법에 따르면, 개체의 조직 또는 장기 손상에 대한 치료제를 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 라이브러리 제작 과정을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1. miRNA를 이용한 결장, 간장 및 근육과 같은 조직 또는 장기 손상의 진단

[0052] 본 실시예에서는 말의 결장, 간장 및 근육에서 특이적으로 발현되는 miRNA를 확인하고, 상기 miRNA의 발현 수준이 결장, 간장 및 근육과 같은 말의 조직 또는 장기 손상의 진단에 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0053] 1. 혈장 및 조직 내 miRNA NGS 분석과 조직 손상 특이적 miRNA 선별

[0054] (1) 혈장 샘플링

[0055] 혈장은 경정맥으로부터 채혈하여 BD vacutainer EDTA-K2 10.8 mg (6 ml)에 넣은 후 원심분리기로 3000 rpm, 10분 원심 분리하여 샘플링하였다.

[0056] (2) 조직 샘플링

[0057] 진정 (Domosedan[®], 10mg/kg, Orion Co./ Ketamine, 1500mg/kg, 유한양행) 후 안락사 (1 ml당 Embutramide 200 mg Mebezonium iodine 50 mg Tetracaine 5 mg, T-61[®], 50 ml, 유림연합)하였으며, 부검을 실시한 다음 말의 결장, 간장 및 근육의 장기 조직을 채취한 후 액체 질소에서 급냉 후 -70℃에서 보관하였다.

[0058] 장기 손상의 확인 및 정도 판정은 조직 병리학적 검사를 통하여 실시하였다. 조직 병리학적 검사를 위해 채취한 조직을 10% 포르말린에 고정한 후, 통상적인 방법에 따라 파라핀으로 포매(包埋)하고 4~6 μ m로 절편하여 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 결장, 간장 및 근육의 3가지 장기 조직 각각이 손상된 것을 확인하였다. 채취한 결장, 간장 및 근육은 전반적으로 발적되어 있었다.

[0059] **(3) RNA 추출**

[0060] 혈장, 및 결장, 간장 및 근육의 3가지 장기 조직 50 mg 당 Trizol 0.75 ml을 넣고 균질화시켰다(homogenize). 균질화된 샘플을 상온에서 5분간 인큐베이션 한 후 Trizol 0.75 ml 당 클로로폼 0.2 ml을 넣고 15초 동안 흔들어 혼합하였다. 혼합물을 RT에서 3분 동안 인큐베이션한 후 14000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 상층액 약 500 μ l를 확보하여 이소프로필알콜과 1:1로 혼합한 후, RT에서 10분 동안 인큐베이션을 하였다. 그리고 14000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리를 하고, RNA 펠릿을 확인한 후 상층액을 모두 제거하였다. 세척 과정으로 70% EtOH 1 ml을 넣은 후 8000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 모두 제거한 후 RT에서 튜브 뚜껑을 열어놓은 채 RNA 펠릿을 완전히 건조하였다. 펠릿이 완전히 마르면 HPLC 물 20~100 μ l를 넣어서 용리시켰다. 그 후 Dnase I을 RT에서 15분 동안 처리하여 DNA를 완전히 제거함으로써 순수한 RNA를 추출하였다.

[0061] **(4) RNA 농도 및 품질 분석**

[0062] 말의 혈장 및 근육, 간장, 결장의 3가지 장기 조직에서 분리된 전체 RNA는 Nano drop기계와 bioanalyzer기계를 사용하여 RNA 농도 및 품질(quality)을 아래 기준을 이용하여 분석하였다.

[0063] 핵산과 단백질은 각각 260 nm, 280 nm에서 최대의 흡광도를 가진다. 이러한 260 nm 와 280 nm에서의 흡광도 비(260/280)는 DNA, RNA의 순도를 평가하는 기준이 되며 ratio 1.8은 일반적으로 순수한 DNA를, ratio 2.0은 순수한 RNA를 의미한다. 추출된 RNA의 260/280 값이 1.6 - 2.0 일 때 순도가 높다고 판단하여 후속 분석에 사용하였다.

[0064] 대상 말의 혈장으로부터 전체 RNA를 분리한 결과 평균 혈장 1 ml 당 123 ng의 순도가 높은 전체 RNA를 얻을 수 있었다.

[0065] **(5) NGS (Next Generation Sequencing)를 이용한 조직 내 miRNA 분석**

[0066] **(5.1) stem loop RT-PCR를 이용한 정량**

[0067] 추출한 전체 RNA를 Size-fractionation방법을 이용하여 18-32 nt 크기의 small RNAs를 분리하였다. 이들 small RNA에 adapter를 부착한 뒤 RT-PCR 및 cDNA 클로닝의 일련 과정을 거쳐 Size-fractionated cDNA 라이브러리를 제작하였다. 도 1은 라이브러리 제작 과정을 나타내는 도면이다.

[0068] 추출된 전체 RNA를 폴리아크릴아마이드젤 상에 로딩한 후 전기영동을 통하여 크기별로 분리한 후 small <40-nt RNA에 상당하는 부분을 잘라내었다. <40-nt fraction을 flashPAGE clean up kit (Life Technologies Corp.)를 이용하여 씻어내고 30 μ l의 용리 버퍼 (elution buffer)로 녹여서 분리하였다. 그 후 약 80% 에탄올로 세척하였다. 펠릿은 50 μ l의 RNase-free TE로 재현탁시켰다. 그 다음 <40-nt RNA의 품질 검사를 하였다.

[0069] 역전사 반응 (Reverse transcriptase reaction)은 다음과 같이 실시하였다: 정제된 총 RNA 샘플과 50 nM stem-loop RT 프라이머, 1x RT 버퍼, 0.25 mM dNTPs, 역전사효소 및 RNase inhibitor가 포함된 RT 반응 프리믹스를 섞어 약 7.5 μ l의 반응 혼합물을 제조하였다. 제조된 혼합물을 96-well 플레이트에 로딩하고 약 16 $^{\circ}$ C에서 약 30분, 약 42 $^{\circ}$ C에서 약 30분, 약 85 $^{\circ}$ C에서 약 5분 동안, 및 약 4 $^{\circ}$ C에서 홀딩하는 순차적인 반응을 실시하였다. 역전사반응은 no-template control과 reverse transcriptase minus controls를 negative controls로 하여 상기 반응을 수행하였다. 또한 상기 반응을 duplicate 또는 triplicate로 수행하여 오차범위를 줄였다.

[0070] 실시간 정량적 중합반응 (Real-time qPCR)은 다음과 같이 실시하였다: 정방향 프라이머, 역방향 프라이머, 및 가수분해 프로브 (hydrolysis probe)를 포함하는 약 18.7 μ l의 PCR 프리믹스를 준비하였다. 이 프리믹스를 96-

well 플레이트에 로딩하고, 여기에 약 1.3 ul의 RT 산물을 옮겨 넣었다. 상기 실시간 정량적 증합반응은 약 95 °C에서 약 10 분씩 40 사이클로 하여 약 95°C에서 약 15 초, 약 60°C에서 약 1분으로 순차적으로 반응을 triplicate로 수행하였다.

[0071] (5.2) NGS (Next Generation Sequencing) 수행

[0072] Small RNA cDNA를 로딩한 후, HiSeq 2000 machine(Illumina inc.)을 이용하여 50 bp single-end로 리딩하여 NGS (Next Generation Sequencing)를 수행하였다. 그 후 말의 혈장으로부터 취득된 NGS 결과에 대하여 1차적으로 아래와 같은 기준에 따라 Data cleaning을 다음과 같이 실시하였다:

[0073] 낮은 품질의 리드 데이터 (read data)를 제거하였다. 그 후, 5' 프라이머 contaminant를 지닌 리드 데이터를 제거하였다. 그 후, 3' 프라이머가 없는 리드 데이터를 제거하였다. 그 후, Poly A를 가진 리드 데이터를 제거하였다. 그 후, 18 nt보다 더 짧은 리드 데이터를 제거하였다. 그 후, insert tag가 없는 리드 데이터를 제거하였다.

[0074] 그 결과, 혈장 및 장기 시료로부터 확보된 NSG 결과에 대하여 각각 95%, 및 94% 이상의 clean reads를 확인할 수 있었다. 이는 말의 혈장 및 조직으로부터 전체 RNA 분리 및 Size fractionation이 잘 수행되었으며, 표준 바이오인포매틱스 (Standard Bioinformatics) 분석에 대한 데이터 신뢰도가 높음을 보여준다. Data cleaning을 통하여 확인된 양질의 small RNA중 Clean Read data만 선별한 후, 표준 바이오인포매틱스 분석을 통해 기준에 알려진 microRNAs, 새로운 microRNA, rRNA, tRNA, snRNA, 및 snoRNA의 small RNA에 대한 발현양상을 분석하였다. 표준 바이오인포매틱스 분석은 논문 등으로 발표된 miRNA의 염기서열과 annotation에 대한 정보가 데이터베이스로 구축되어 있는 miRBase (www.mirbase.org)를 이용하여 수행하였다.

[0075] 혈장과 장기별 small RNA 분석 결과 총 250 여개의 기준에 보고된 miRNA가 확인되었으며, 각 샘플별로 약 55-460 개의 miRNA 후보가 새롭게 발견되었다. 말 혈장과 조직 miRNA 염기서열분석을 통해 도출된 기존의 miRNA, 새로이 발견된 miRNA의 염기서열을 포함한 총 15개 Sample에 대한 miRNA NGS 원본 데이터를 미국 NCBI SRA(Sequence Read Archive) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>)에 등록하였으며, Submission Number: SRA056221와 SRA058805을 부여 받았다. 샘플별로 발견된 새로운 miRNA 종류 및 염기서열은 결과지에 적시하였으며, 원본 데이터를 NCBI에 보고하였다.

[0076] 확인된 miRNA에 대한 보다 구체적인 분석을 통하여 위치별 염기서열 편향성을 확인하였다. 예를 들면 근육에서 발견된 microRNA는 “position 23” 을 제외한 나머지 position에서 80%이상의 base pair consistency를 보였다. 또한 19, 21, 25, 26 length miRNA를 제외한 다른 부분에서 60% 이상의 first base pair consistency를 보였다.

[0077] 3. 결과

[0078] 말의 결장, 간장, 및 근육과 같은 장기와 혈장 전체의 miRNA의 발현 수준을 비교 분석한 결과, 말의 결장, 간장, 및 근육과 같은 장기에서 특이적으로 발현되는 miRNA를 확인하였고, 이 중 표 2에 기재된 miRNA가 혈액 내에 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.

[0079] 표 2에 결장, 간장, 및 근육과 같은 장기에서 특이적으로 발현되는 miRNA 중 혈장 내에서의 발현 수준이 높은 miRNA를 나타내었다. 상기 miRNA의 발현 수준은 정상인 말로부터 분리한 혈장 내에서의 miRNA의 발현 수준에 비해 약 8 배 이상 (3 Ct (threshold cycle)) 높았다.

표 2

[0080]

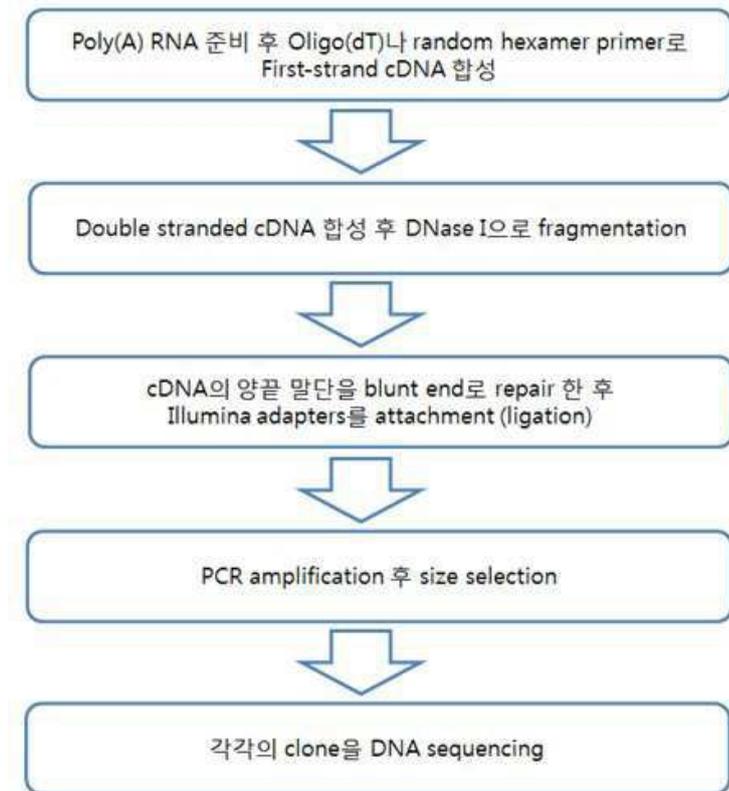
장기의 종류	miRNA
결장 (colon)	eca-mir-155, eca-mir-196b, eca-mir-18a, eca-mir-488, eca-mir-7-2, eca-mir-345, eca-mir-328, eca-mir-301a, eca-mir-138, eca-mir-342, eca-mir-1842, eca-mir-361, eca-mir-138-2, eca-mir-500-2, eca-mir-101, eca-mir-132, eca-mir-592, eca-mir-301b, eca-mir-153-2, eca-mir-184, eca-mir-551a
간장 (liver)	eca-mir-106b, eca-mir-101-2, eca-mir-450b
근육 (muscle)	eca-mir-365-2, eca-mir-190, eca-mir-29b, eca-mir-32, eca-mir-33b, eca-mir-449a, eca-mir-499

[0081]

이상의 결과로부터, 표 2에 기재된 miRNA는 결장, 간장, 및 근육의 특이적 손상시 각 장기에 특이적 miRNA가 혈장으로 누출되어 상기 miRNA가 혈장 내 발현 수준이 높아지는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 miRNA의 혈액 중 발현 수준의 변화 정도를 검사하여 결장, 간장, 및 근육의 손상을 예측 또는 진단할 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

도면1



서열 목록

- <110> SNU R&DB Foundation
- <120> Composition and kit for detecting tissue or organ damage in a subject, method for predicting or detecting tissue or organ damage in a subject and method for screening a therapeutic agent for tissue or organ damage
- <130> PN102419
- <160> 10
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 23

<212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 1
 uuaaugcuaa ucgugauagg ggu 23
 <210>
 > 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 2
 uagguaguuu ccuguuguug gg 22
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 3
 uaaggugcau cuagucaga uag 23
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 4
 uugaaaggcu auuucuuggu c 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 5
 uaaagugcug acagucaga u 21
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Equus caballus
 <400> 6

uuuugcgaug uguuccaaau au	22
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Equus caballus	
<400> 7	
uacaguacug ugauaacuga a	21
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Equus caballus	
<400> 8	
uaaugccccu aaaaauccuu au	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Equus caballus	
<400> 9	
ugauauguuu gauauuuuag gu	22
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Equus caballus	
<400> 10	
uagaccauu ugaaucagu guu	23