

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0141043
(43) 공개일자 2024년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/7105* (2006.01)*A61P 31/14* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)*A61K 31/7105* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0034510

(22) 출원일자 2023년03월16일

심사청구일자 2023년03월16일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

전남대학교산학협력단

광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

박춘구

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 165, 102동 1106호(화순유창허니문맨션2차)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

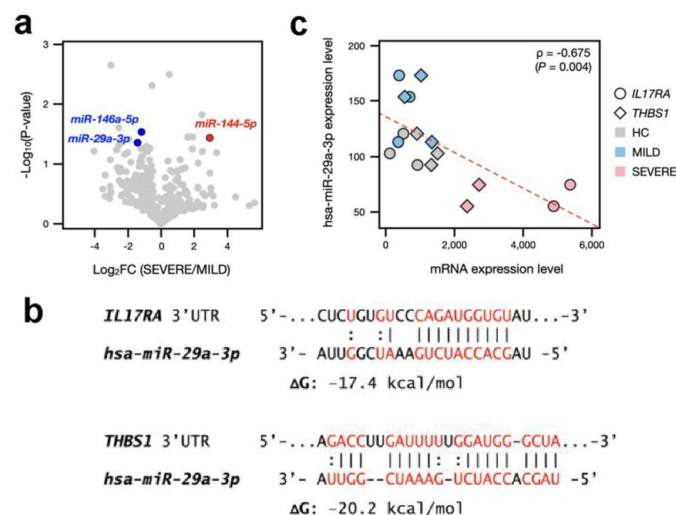
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 바이오마커 조성물, 진단을 위한 정보 제공 방법, 진단용 조성물 및 진단 키트

(57) 요약

본 발명은 COVID-19 환자의 중증 여부를 신속하고 정확하게 확인하여 효과적인 치료를 가능하게 하고 치사율을 줄일 수 있도록 하는 바이오마커 조성물과, 상기 바이오마커의 측정에 의한 정보 제공 방법, 바이오마커 측정을 위한 조성물 및 진단 키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA를 포함하는 COVID-19 중증 환자 진단용 바이오마커 조성물과 상기 바이오마커의 측정에 의한 정보 제공 방법, 바이오마커 측정을 위한 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

김연숙

대전광역시 유성구 상대남로 26, 917동 2004호 (상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)

정형석

세종특별자치시 해밀3로 32, 101동 1503호 (해밀동, 해밀마을1단지)

이성권

광주광역시 남구 서문대로663번안길 2, 101동 110호 (진월동, 호반아파트)

신슬기

대전광역시 중구 문화로105번안길 29, 402호 (유천동)

김인수

강원도 원주시 우산공단길 23, 109동 1702호(우산동, 신일유토빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182622
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA를 포함하는 COVID-19 중증 환자 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

(A) 검사 대상자로부터 분리된 생물학적 시료에서 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(B) 상기 (A) 단계에서 측정된 발현 수준과 정상 대조구의 상응하는 마이크로RNA의 발현 수준을 비교하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 생물학적 시료는 비인두 도말물, 구인두 도말물, 객담, 혈액 또는 그의 가공물인 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

청구항 2 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

검사 대상자로부터 분리된 생물학적 시료에서 IL17RA, SMPDL3A, SNX10, THBS1 및 TRABD2A 유전자, 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하여 비교하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 유전자 발현 수준의 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq 및 luciferase assay로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 단백질 발현 수준의 측정에는 웨스턴 블랏, 엘라이자, 방사선면역분석, 방사 면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법 및 유세포분석으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물.

청구항 10

청구항 8 또는 청구항 9에 의한 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물을 포함하는 COVID-19 중증 환자 진단용 키트.

청구항 11

- (A) SARS-CoV-2 감염 세포에 시험 물질을 처리하는 단계; 및
 - (B) 시험 물질이 처리된 상기 세포에서 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현량을 측정하는 단계;
 - (C) 상기 발현량을 시험물질이 처리되지 않은 세포에서의 발현량과 비교하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증의 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법.

청구항 12

- (A) COVID-19 중증 환자에서 분리한 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및
 - (B) 후보 물질의 처리에 의한 시료 중 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준의 변화를 측정하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자 맞춤형 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 13

miR-29a-3p 및 miR-146a-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA와 동일 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 miR-144-5p의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 함유하는 COVID-19 중증 환자의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 COVID-19 환자의 중증 여부를 신속하고 정확하게 확인하여 효과적인 치료를 가능하게 하고 치사율을 줄일 수 있도록 하는 바이오마커 조성물과, 상기 바이오마커의 측정에 의한 정보 제공 방법, 바이오마커 측정을 위한 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 코로나바이러스감염증-19(COVID-19, corona virus disease 19)는 새로운 유형의 코로나바이러스인 SARS-CoV-2의 감염에 의한 호흡기 질환이다. 2019년 12월 중국 후베이성 우한에서 처음 발생하였으며, 이후 전세계로 확산되어 유례없는 팬데믹을 일으켰다. 주된 전파경로는 감염자와의 밀접접촉에 의해 감염자의 비말이 호흡기나 눈/코/입의 점막으로 침투되는 것을 통하여 전파되는 것이며, 공기전파는 특정 환경에서 제한적으로 전파되는 것으로 알려져 있다. 감염되면 약 2~14일의 잠복기를 거친 뒤 발열 및 기침이나 호흡곤란 등 호흡기 증상, 폐렴이 주 증상으로 나타난다. 2023년 2월 14일 현재 전 세계적으로 6.7억명이 확진되었으며, 총 사망자수는 686만명에 달한다. 코로나바이러스의 변이로 COVID-19의 감염 시에도 특이한 증상을 나타내지 않는 무증상자의 비율이 증가하고 있고, 치사율 역시 감소하고 있기는 하지만 여전히 하루 평균 1,000명 이상이 COVID-19 감염으로 사망하고 있다. 더욱이 상기 통계는 COVID-19 검사가 이루어진 환자를 대상으로 한 것이므로, 실제 그 규모는 통계치보다도 훨씬 심각할 것으로 짐작할 수 있으며, 여전히 전 세계 많은 지역에서 통제되지 못하고 있는 실정이다.

[0003] COVID-19 관리를 위한 WHO 생활지침에 따르면 유증상 COVID-19 환자의 15%는 호흡곤란을 특징으로 하는 중증질환으로 발전하고 5%는 위독한 상태에 이르게 된다. 특히 고령자, 심장질환, 폐질환, 당뇨병 등 중증 기저질환이 있는 환자의 경우 중증화 및 사망 위험도가 높은 것으로 확인되었으며, 성별에 따라서는 여성에 비해 남성이 중증 질환으로 발전될 가능성이 높다. 중환자실에 입원한 중증 환자는 일반적으로 입원기간이 길고, 호흡부전으로 인해 기계적 인공호흡이 필요할 가능성이 높으며, 사망률 또한 높다.

[0004] 현재 COVID-19의 중증도 여부는 "산소포화도 94% 미만, (PaO₂/FiO₂) < 300 mmHg, 호흡빈도 분당 30회 초과 또는 폐실질 침투 50% 초과 (미국 NIH 기준)" 또는 "중등증의 COVID-19 증상이 발현되거나, 휴식 시 숨가쁨 또는 호흡곤란 증상 발현. 호흡수 $\geq$ 분당 20회, 심박수 $\geq$ 분당 90회, 실내 공기에서 산소포화도(SpO₂) $\leq$ 93% 또는 PaO₂/FiO₂ < 300 mmHg (미국 FDA 기준)"에 따라 결정하고 있다. 중증 환자의 경우 집중치료(intensive care)가 필요할 수도 있는 고위험 환자로 분류되어, 중환자 진료팀과 진료계획을 수립한다. 환자의 대부분(>90%)에서 저산소성 호흡부전이 발생하므로 산소공급이 필요하고, 이 중 70%는 기계환기를 적용하여 24시간 모니터링하며 일반 폐렴 가능성을 염두에 두어 경험적 항생제가 투여된다. 중환자실에 입실한 중증 환자의 약 30%에서 쇼크가 발생하고, 약 10~30%에서 신부전이 발생할 수 있다. 폐보호를 위한 기계환기에도 불구하고 반응하지 않는 중증 저산소혈증의 경우 체외막산화장치(ECMO)의 적용을 고려하게 된다.

[0005] 중증 환자의 경우 급성 호흡곤란증후군, 폐혈증 및 폐혈성 쇼크로 진행할 수 있으므로, 중증 징후가 있는 환자를 조기에 식별하여 최적화된 진료가 이루어지도록 하는 것이 중요하다. 그러나 현재와 같이 생체 징후를 기준으로 환자를 분류하면, 장치를 통해 생체지수를 지속적으로 측정하여야 하고, '대증적'이므로 사전 선별이 어려운 것이 현실이다. 따라서 코로나 중증 환자 또는 중증으로 악화될 위험성이 있는 환자를 신속하고 정확하게 구별하기 위한 방법이 요구된다.

[0006] 마이크로RNA(miRNA)는 작은 비코딩 RNA로 수많은 인간 질병의 바이오마커 및 조절자로 널리 연구되고 있다. 최근 COVID-19 환자의 말초 혈액으로부터 임상적 중증도와 상관관계가 있는 miRNA 프로파일을 파악하려는 시도가 있었다. 그럼에도 불구하고 중증 COVID-19의 실제 예측 마커는 최근까지도 모호한 상태로 남아있다. 본 발명자들은 이전 nCounter Human Immunology 유전자 발현 분석을 통하여 면역 관련 전사체 프로파일의 맥락에서, 경증/중등도/중증 COVID-19 사례 간에 유의미한 차이가 없음을 확인한 바 있다. 임상적 중증도와 관련된 효과적인 표적을 확인하면, COVID-19 중증 환자를 빠르게 선별할 수 있을 뿐 아니라, COVID-19에 대한 새로운 예방 및 치료전략을 개발하는 토대를 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국제공개공보 W02022-125702

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) WHO. Living Guidance for Clinical Management of COVID-19: Living Guidance, 23 November 2021 (World Health Organization, 2021)

(비특허문헌 0002) Sohn, K. M. 등. COVID-19 patients upregulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory signaling that mimics bacterial sepsis. J. Korean Med. Sci. 35, e343 (2020).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 COVID-19 중증 환자의 중증 여부를 신속하고 정확하게 확인하여 효과적인 치료를 가능하게 하고 치사율을 줄일 수 있도록 하는 바이오마커 조성물과 상기 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 것에 의한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 또한 상기 정보 제공 방법에 이용될 수 있는 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물과 이를 포함하는 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0011] 더 나아가 본 발명은 상기 정보 제공 방법에 사용되는 바이오마커를 이용하여 COVID-19 중증 환자의 예방 또는 치료용 약물을 스크리닝하고, COVID-19 중증 환자 개개인에 맞춤형 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은 정상인 대조군 및 COVID-19 경증 환자 및 중증 환자로부터 생물학적 시료를 채취하고 이로부터 RNA를 분리한 후 smRNA 서열 분석을 통해 차등 발현되는 마이크로RNA(miRNA)의 발현수준을 비교 분석한 결과, 정상인 및 COVID-19 경증 환자에 비해 COVID-19 중증 환자에서 miR-29a-3p와 miR-146a-5p의 발현은 유의하게 감소하는 한편, miR-144-5p의 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다. 이에 본 발명은 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA를 포함하는 COVID-19 중증 환자 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 miR-29a-3p는 Genbank Accession No. MIMAT0000086의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 상기 miR-146a-5p는 Genbank Accession No. MIMAT0000449의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 상기 miR-144-5p는 Genbank Accession No. MIMAT0004600의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 "COVID-19 중증 환자"는 WHO 중증도 점수가 6-7인 환자 또는 미국 NIH나 FDA 중증도 기준을 만족하는 환자를 의미한다. 본 발명에서 "진단"은 의사가 적절한 처치를 위하여 환자의 병리상태를 파악하는 것으로 단순히 질환명을 결정하는 것 뿐 아니라, 환자가 나타내는 병리상태의 정도, 실태를 파악하는 것을 포함하는 포괄적인 의미이다. 본 발명에서 "바이오마커"는 정상인 또는 COVID-19 경증 환자로부터 COVID-19 중증 환자의 병적인 상태를 구분할 수 있으며, 객관적으로 측정이 가능한 표지자를 의미한다. 이하 본 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

[0018] 본 발명은 또한 상기 바이오마커를 사용하여 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로 본 발명은 (A) 검사 대상자로부터 분리된 생물학적 시료에서 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (B) 상기 (A) 단계에서 측정된 발현 수준과 정상 대조군의 상응하는 마이크로RNA의 발현 수준을 비교하는 단계;를

포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

- [0019] 상기 "정상 대조구"는 적어도 COVID-19 중증 환자가 아닌 실험군을 의미하며, SARS-CoV-2에 감염되지 않은 군과 COVID-19 경증 환자군을 포함할 수 있다. 더 나아가 COVID-19 뿐 아니라 다른 만성 질환이 없는 개체일 수 있다. 상기 "검사 대상자"는 COVID-19 중증 환자의 특징적인 생체 징후를 나타내는 환자일 수도 있고, 혹은 특징적인 생체 징후를 나타내지는 않지만 고령이거나 기저질환이 있어 중증으로 발전할 가능성이 있는 환자일 수 있다. 혹은 예방적 차원에서 모든 COVID-19 확진자 또는 검사자를 대상으로 할 수도 있다. 상기 "생물학적 시료"는 검사 대상자로부터 채취된 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 시료 채취의 용이성을 고려하여 비인두 도말물, 구인두 도말물, 객담, 혈액 또는 그의 가공물인 것이 바람직하다. 가공물이란 채취된 시료를 그대로 사용하는 것이 아니라, 추가로 가공하여 사용하는 것을 의미한다. 예를 들어 전혈 시료를 처리하여 얻은 분류된 혈소판, 단핵구, 호중구 등의 시료를 의미할 수 있다. 그러나 이외의 생물학적 시료를 제외하는 것은 아니다.
- [0020] 상기 miRNA의 발현 수준 측정을 위하여 당업계에 사용되는 어떠한 방법을 사용하여도 무방하다. 상기 miRNA의 분석을 위해서는 종래기술에 의해 알려진 해당 유전자를 특이적으로 증폭시키는 프라이머나 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 사용할 수 있다. miRNA의 증폭을 위하여 종래 알려진 서열 이외에도 새로운 서열의 프라이머나 프로브를 디자인하는 것은 당업자에게 용이할 것이다. 상기 유전자 발현 수준의 측정은 예를 들어, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq 및 luciferase assay 등의 방법으로 측정할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명자들은 COVID-19 중증 환자와 대조구 및 COVID-19 경증 환자에서 발현되는 RNA를 함께 분석한 결과, IL17RA, SMPDL3A, SNX10, THBS1 및 TRABD2A 유전자가 COVID-19 중증 환자에서 차등 발현되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 정보 제공 방법은 검사 대상자로부터 분리된 생물학적 시료에서 IL17RA, SMPDL3A, SNX10, THBS1 및 TRABD2A 유전자, 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하여 비교할 수 있다. 서로 다른 바이오마커를 함께 분석하는 것에 의해 COVID-19 중증에 대한 더 많은 정보를 제공할 수 있어, 더욱 신뢰도 높은 진단을 가능하게 할 수 있다.
- [0022] 상기 IL17RA 유전자는 Genbank Accession No. NM_014339.7 또는 NM_001289905.2의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 SMPDL3A 유전자는 Genbank Accession No. NM_006714.5 또는 NM_001286138.2의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 SNX10 유전자는 Genbank Accession No. NM_001199835.1, NM_013322.3, NM_001199837.3, NM_001199838.2, NM_001318198.1, NM_001318199.3, NM_001362753.1 또는 NM_001362754.1의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 THBS1 유전자는 Genbank Accession No. NM_003246.4의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 TRABD2A 유전자는 Genbank Accession No. NM_001277053.2, NM_001080824.3 또는 NM_001307978.2의 염기서열일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 유전자 또는 이에 의해 암호화되는 단백질의 발현 수준은 유전자 또는 단백질의 발현 수준 측정을 위하여 당업계에서 사용되는 어떠한 방법을 사용하여도 무방하다. 상기 유전자의 분석을 위해서는 종래기술에 의해 알려진 해당 유전자를 특이적으로 증폭시키는 프라이머나 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 사용할 수 있다. 유전자의 증폭을 위하여 종래 알려진 서열 이외에도 새로운 서열의 프라이머나 프로브를 디자인하는 것은 당업자에게 용이할 것이다. 상기 유전자 발현 수준의 측정은 예를 들어, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, ChIP-Seq, ChIP-qPCR, ATAC-Seq, DNase-seq, FAIRE-seq 및 luciferase assay 등의 방법으로 측정할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 단백질의 발현 수준을 측정하기 위해서 상기 단백질에 특이적인 항체, 펩타이드, 리간드, 앵타머(aptamer) 또는 뉴클레오티드를 이용할 수 있다. 종래에 알려진 항체, 펩타이드 등 이외에서 본 발명의 상기 단백질을 구성하는 아미노산 서열을 기반으로, 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 리간드 등을 제작하는 것 또한 당업자에게는 용이할 것이다. 단백질 발현 수준의 측정 방법의 예로는 웨스턴 블랏, 엘라이자, 방사선면역분석, 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법 및 유세포분석을 들 수 있으며, 역시 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0028] 또한 본 발명은 COVID-19 중증 환자의 진단을 위한 정보 제공 방법에 사용되는 진단용 조성물, 즉, miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물에 관한 것이다. 상기 마이크로RNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태는 상기 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물을 포함하는 COVID-19 중증 환자 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 진단용 키트는 예를 들면 RT-PCR 키트 또는 마이크로어레이 칩의 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것이 아님은 당연하다. 본 발명의 진단용 키트에는 상기 COVID-19 중증 환자의 진단용 조성물 이외에도 분석 방법에 적합한 한 종류 이상의 다른 구성 성분을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트가 RT-PCR 키트라면 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA에 특이적인 프라이머 이외에도 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드, 각종 효소, 테스트 튜브, 사용 매뉴얼 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명은 본 발명에서 확인한 COVID-19 중증 환자에 대한 바이오마커를 이용한 COVID-19 중증의 예방 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로 상기 방법은 (A) SARS-CoV-2 감염 세포에 시험 물질을 처리하는 단계; 및 (B) 시험 물질이 처리된 상기 세포에서 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현량을 측정하는 단계; (C) 상기 발현량을 시험물질이 처리되지 않은 세포에서의 발현량과 비교하는 단계;를 포함한다. COVID-19 중증 환자에서 상향조절되는 마이크로RNA miR-144-5p의 발현량이 시험 물질의 처리에 의해 감소하였다면, 상기 시험물질은 COVID-19 중증 환자의 예방 또는 치료에 유효할 것이라 판단할 수 있다. 반면 COVID-19 중증 환자에서 하향조절되는 마이크로RNA miR-146a-5p 및/또는 miR-29a-3p의 경우에는, 시험 물질의 처리에 의해 발현량이 증가하는 경우 상기 시험물질이 COVID-19 중증 환자의 예방 또는 치료에 유효할 것이라 판단할 수 있다.
- [0031] 더 나아가 본 발명은 COVID-19 중증 환자 개개인에 맞춤형된 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. COVID-19 중증 환자는 과도한 염증반응과 확산성 폐혈관내 혈전증 등 치사에 이를 수 있으므로, 보다 빠르게 감응성이 높은 약물을 투약할 필요가 있다. 이에 본 발명은 (A) COVID-19 중증 환자에서 분리한 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (B) 후보 물질의 처리에 의한 시료 중 miR-29a-3p, miR-146a-5p 및 miR-144-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA의 발현 수준의 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 COVID-19 중증 환자 맞춤형 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다. 맞춤형 치료제로 유효할 것이라 판단하는 기준은 COVID-19 중증의 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법과 동일하게 적용할 수 있다. 상기 방법에 의하면 치료에 사용하고 있는 약제 중에서도 중증 환자 개인에게 높은 감응성을 나타내는 약물을 스크리닝하여 투여할 수 있으므로, 치사율을 낮추고 보다 빠른 치유를 가능하게 할 수 있다.
- [0032] COVID-19 중증 환자에서 하향조절되는 miR-29a-3p의 표적 유전자를 예측한 결과 COVID-19 중증 환자에서 차등발현되는 유전자 중 IL17RA 및 THBS1과 결합할 수 있음을 확인하였다. miR-29a-3p 모방체로 THP-1 세포를 형질감염시킨 추가 실험에서는 형질감염에 사용한 miR-29a-3p 모방체의 농도가 증가할수록 THBS1의 발현이 억제되어 miR-29a-3p의 감소된 수준이 중증 COVID-19 사례에서 THBS1의 과도한 발현에 기여하며, 따라서 miR-29a-3p를 중증 COVID-19의 치료에 이용할 수 있음을 보여주었다. 이에 본 발명은 miR-29a-3p 및 miR-146a-5p로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 마이크로RNA와 동일 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드 또는 miR-144-5p의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 함유하는 COVID-19 중증 환자의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 miR-144-5p와 상보서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 RNA는 물론 DNA, DNA/RNA 하이브리드 또는 당염기에서 공지된 방법으로 변형된 올리고머의 모방체인 펩티드핵산(PNA) 또는 고정핵산(LNA), 당 또는 백본의 전체 또는 그 일부분이 치환 또는 변형된 염기를 모두 포함한다. 또한 일부 영역의 서열에 돌연변이를 포함한 것 역시 본 발명의 범위에서 제외되는 것은 아니다.
- [0033] 한편, 본 발명의 조성물에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드를 발현하는 발현 벡터의 형태로 제공될 수도 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있는데, 이를 위해 상기 올리고뉴클레오타이드는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용 가능하다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 상기 올리고뉴클레오타이드를 세포 내로 도입시켜 COVID-19 중증의 치료에 사용될 수 있는데,

여기서 "도입"은 형질감염(transfection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 외래 뉴클레오티드를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물 활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 질병의 중증도 등에 따라 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 이상과 같이 본 발명의 정보 제공방법, 조성물 및 진단용 키트는 COVID-19 중증 환자에게 공통적으로 발현 수준이 변화하는 바이오마커를 이용하는 것으로, 생체 징후를 기준으로 하지 않고도 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 것에 의해 COVID-19 중증 환자를 신속하고 정확하게 진단할 수 있도록 하여 보다 빠르고 효과적인 치료를 가능하게 하여 치사율을 낮추는 데 유용하게 사용할 수 있다.

[0036] 더 나아가 본 발명은 중증 환자에 특이적인 바이오마커를 활용하여 새로운 예방 및 치료용 약물을 개발하는데 활용될 수 있으며, 환자 개개인에 보다 효과적인 약물의 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 실험군 간 유전자 발현 프로파일을 비교 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.
 도 2는 실험군 간의 차등 발현 유전자를 보여주는 볼케이노 도표이다.
 도 3은 실험군 간 네 개의 카테고리에서 유전자 온톨로지의 강화 및 KEGG 경로를 비교 분석한 결과 그래프이다.
 도 4는 실험군 간 차등 발현 유전자의 수를 보여주는 벤다이어그램 및 히트맵을 나타낸다.
 도 5는 실험 데이터 및 코호트 데이터에 공통된 차등 발현 유전자의 벤다이어그램 및 단백질-단백질 상호관계를 보여주는 그래프이다.
 도 6은 scRNA-서열 데이터를 UMAP 방법을 사용하여 2차원적으로 시각화한 도면이다.
 도 7은 IL17RA 및 THBS1 유전자 발현의 UMAP 프로젝션 및 단핵구, 호중구 및 혈소판에서의 발현량을 중증도 점수에 대해 도시한 그래프이다.
 도 8은 실험군 간 차등발현되는 miRNA와 IL17RA 및 THBS1와의 관계를 보여주는 그래프이다.
 도 9는 각 실험군의 PMBC에서 THBS1과 miRNA의 발현 수준을 보여주는 그래프이다.
 도 10은 miR-29a-3p 모방체의 형질감염에 의한 miR-29a-3p와 THBS1의 발현 수준 변화를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0039] [실시예]

[0040] 실시예 1 : COVID-19 환자의 유전자 발현 분석

[0041] 환자 및 검체의 채취

[0042] 충남대학교병원에 입원한 COVID-19 환자 19명은 환자의 비인두 및 구인두 도말물 또는 객담으로부터 PCR을 통해 SARS-CoV-2의 존재를 확인하여 COVID-19를 확진하였다. WHO의 중증도 점수에 따라 '0-1'과 '6-7'로 분류된 환자를 각각 경증과 중증 환자로 분류하였다. 연령/성별이 일치하는 건강한 성인을 대조군(HC)으로 함께 분석하였으며, 19세 미만의 환자는 실험 대상에서 제외하였고 모든 피험자에게는 사전 동의를 받았다. 본 연구는 충남대학교병원 기관연구윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(CNUH 2019-04-046, CNUH-2020-07-082).

[0043] 환자군 및 대조군으로부터 정맥혈을 채취하여 시료로 사용하였으며, 모든 임상 및 실험실 소견은 시료를 채취한 시점을 기준으로 하였다. 이들의 임상적 특징과 실험실 소견을 표 1에 요약하였다. 데이터는 평균(범위) 또는 수(%)로 기재하였으며, P-값은 Mann-Whitney 검정에 의해 계산하였다.

표 1

	경증사례 (n=8)	중증사례(n=7)	P-값
특성			
나이, 살	51.3 (26-97)	62 (36-78)	0.1787
남성	6 (75)	4 (57)	0.6084
체질량지수, kg/m ²	22.3 (11.8-26.6)	23.3 (20.3-27.7)	>0.9999
발열	1 (12.5)	6 (85.7)	0.0101
증상발현일로부터 채혈 시점(일)	6.9 (5-10)	7.6 (5-11)	0.5859
기계식 인공호흡기 사용	0 (0)	7 (100)	0.0002
수정된 조기 경보 점수 (MEWS)	1.3 (1-2)	2.6 (2-3)	0.0023
국가 조기 경보 점수 (NEWS)	0.1 (0-1)	5 (1-8)	0.0005
순차적 장기부전평가(SOFA) 점수	0.1 (0-1)	2.7 (0-6)	0.0039
기본조건			
심혈관 질환	0 (0)	0 (0)	>0.9999
뇌혈관 질환	0 (0)	0 (0)	>0.9999
당뇨병	0 (0)	1 (14.3)	0.4667
만성 신장질환	0 (0)	1 (14.3)	0.4667
찰슨 동반질환 지수(CCI)	1.3 (0-5)	3.1 (0-6)	0.0847
실험실 결과			
백혈구 수, ×10 ³ /mm ³	4.3 (3.7-5.5)	6.3 (2.8-11.8)	0.267
호중구, × 10 ³ /mm ³	2.8 (1.9-3.6)	4.7 (2.1-10.4)	0.1206
림프구, × 10 ³ /mm ³	1.1 (0.5-1.9)	1.1 (0.6-1.9)	0.8665
호중구 대 림프구 비율	3.1 (1.1-5.8)	4.8 (2.5-11.0)	0.1893
단핵구, × 10 ³ /mm ³	0.4 (0.2-0.6)	0.5 (0.1-0.9)	0.4129
단핵구, %	8.4 (5.8-13.0)	7.8 (3.1-14.3)	0.8665
혈소판, × 10 ³ /mm ³	192.8 (107-314)	187.7 (97-269)	>0.9999
알라닌 아미노트랜스퍼라제, U/L	37.8 (12-121)	23.9 (8-53)	0.9282
아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, U/L	27.1 (13-50)	41.6 (19-110)	0.2922
알부민, g/dL	4.1 (3.4-4.6)	3.0 (2.3-4.1)	0.0068
총 빌리루빈, mg/dL	0.6 (0.1-1.9)	0.7 (0.1-2.27)	0.4834
젖산 탈수소효소, U/L	404.4 (280-554)	701.3 (340-1461)	0.0541
C-반응성 단백질, mg/dL	0.7 (0.3-1.7)	8.1 (2.3-12.4)	0.0003

[0044]

[0045]

임상적으로 경증 환자는 단 한명만이 발열을 호소하였으나, 중증 환자는 85% 이상이 채혈 당시 발열이 있었다. 기저질환과 관련해서는 경증 그룹과 중증 그룹간 유의한 차이는 없었다. 모든 중증 환자에게 기계적 인공호흡기가 필요했던 것과 달리, 모든 경증 환자는 격리기간동안 일부 진통제 투여를 제외하고는 의료개입없이 안정된 상태를 유지하였다(p=0.0002). 본 연구의 채혈시점은 질병 발병 후 5~7일인 비교적 이른 시점이었으며, 종래기술에서 알려진 바와 같이 C 반응성 단백질(P=0.0003)과 알부민(P=0.0068)은 경증과 중증 그룹간에 유의미한 차이를 나타내었다.

[0046]

시료의 준비 및 총 RNA 추출

[0047]

J. Korean Med. Sci. 35, e343 (2020)에 기재한 방법에 의해, 폐파관을 처리한 정맥혈로부터 말초혈액단핵세포(PBMC, peripheral blood mononuclear cell)를 밀도구배배지인 Lymphoprep(STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)을 사용하여 분리하였다. PBMC로부터 제조사의 지침에 따라 QIAzol lysis 시약(Qiagen,

Hilden, Germany) 및 miRNeasy Mini Kits(Qiagen)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA의 품질은 RNA 6000 피코칩(Agilent Technologies, CA, USA)이 장착된 Agilent 2100 bioanalyzer를 사용하여 평가하였으며, RNA는 NonoDrop 2000 Spectrophotometer system(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 정량하였다.

[0048] 라이브러리 준비 및 시퀀싱

[0049] RNA 시퀀싱(RNA-Seq)을 위하여, QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Wien, Austria)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 라이브러리를 구축하였다. 간략하게는, 5' 말단에서 Illumina 호환 서열과 연결된 올리고-dT 프라이머를 사용하여 혼성화 후, 각각 500 ng의 총 RNA에 대해 역전사 시퀀싱을 수행하였다. RNA 템플릿을 분해한 다음, 두 번째 가닥은 5' 말단에 Illumina 호환 링커 서열을 포함하는 무작위 프라이머로 합성하였다. 모든 반응 성분들은 이중 가닥 라이브러리를 정제하는 자기 비드를 사용하여 제거하였다. 클러스터 생성을 위한 전체 어댑터 서열은 라이브러리를 증폭하여 추가하였다. 완성된 라이브러리를 정제한 후, NextSeq 500(Illumina, CA, USA)을 사용하여 단일-말단 75 시퀀싱을 수행하였다.

[0050] small RNA(smRNA) 시퀀싱의 경우에는, NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep 키트(New England BioLabs, MA, USA)를 사용하여 라이브러리를 구성하였다. 즉, 각 1 µg의 총 RNA에 어댑터를 연결한 후 어댑터 특이적인 프라이머를 사용하여 역전사를 수행하였다. QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen) 및 AMPure XP 비드(Beckman Coulter, CA, USA)를 사용하여 라이브러리를 증폭 및 정제하였다. smRNA 라이브러리의 수율 및 크기 분포는 고 감도 DNA 분석용 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies)기기를 사용하여 평가하였다. 단일-말단 75 시퀀싱은 NextSeq500 시스템(Illumina)으로 수행하였다.

[0051] RNA 서열 분석

[0052] 저품질 염기(<Q20)를 제거하기 위해 모든 원시 시퀀스 판독값을 BBDuk 패키지(<https://sourceforge.net/projects/bbmap>)의 도구인 BBduk에 공급하였다. 이후, QuantSeq 3'mRNA 서열 및 smRNA-서열의 남은 판독값을 Bowtie2 소프트웨어를 사용하여 각각 인간 참조 게놈(GRCh37/hg19) 및 miRBase 데이터베이스의 성숙miRNA 서열에 매핑하였다. Bedtools로 유전자의 판독수를 계산하고 EdgeR을 사용하여 분위수 정규화를 수행하였다. 달리 명시되지 않는 한, 하기 실시예에서 발현 수준의 단위는 분위수 정규화된 판독수이다. 상이하게 발현된 유전자(DEG)를 확인하기 위하여, 프로토콜에서 권장하는 스튜던트 t 테스트를 적용하여 그룹 간 유전자 발현 수준을 통계적으로 분석하였으며, p-값 < 0.05 및 2배의 변화가 있는 유전자를 DEG로 정의하였다. COVID-19의 원인 유전자를 특성화하기 위해 DAVID(Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery(<http://david.ncifcrf.gov>))를 사용하여 유전자 온톨로지(GO)의 강화를 분석하였다. DEG의 발현 히트맵은 R pheatmap package(버전 1.0.12)를 사용하여 묘사하였다.

[0053] 도 1은 두 명의 중증 환자군(SEVERE), 세 명의 경증 환자군(MILD) 및 건강한 대조군(HC)의 말초혈관 단핵세포로부터 생성된 RNA-서열 데이터로부터 실험군 간 유전자 발현 프로파일을 분석한 산포도이다. 도 1은 건강한 대조군과 경증 환자군 사이의 스피어만 상관관계수($\rho = 0.966$)가 건강한 대조군과 중증 환자군 사이의 스피어만 상관관계수($\rho = 0.951$)보다 약간 높기는 하지만 전체 전사체 프로파일은 크게 다르지 않음을 보여준다.

[0054] 이어, 통합 생물학 정보분석을 통해 각 데이터 세트의 DEG를 개별적으로 식별하고 관련 경로와 기능을 확인하였다. 도 2는 각 실험군 간의 DEG를 보여주는 볼케이노 도표로 빨간 점과 파란 점은 각각 상향조절 및 하향조절된 유전자를 나타낸다. 두 실험군 간 비교에서 얻어진 DEG는 각각 279개(HC vs MILD), 595개(SEVERE vs HC) 및 455개(SEVERE vs MILD)였다.

[0055] 각 실험군 간의 DEG를 사용하여 유전자 온톨로지 강화 분석을 수행하여 표적 유전자의 주요 기능을 조사하였다. HC와 MILD의 비교에서 얻는 279 DEG에는 유의미하게 강화된 GO term이나 경로가 없었지만, SEVERE와의 비교에서 얻은 DEG는 강화된 GO term이 확인되었다. 도 3의 a와 b는 각각 HC vs SEVERE, MILD vs SEVERE 실험군 간 유전자 온톨로지의 강화 및 KEGG 경로를 비교 분석한 결과이다. 도 3의 a를 참조하면 SEVERE와 HC 간의 595 DEG는 막을 표적으로 하는 SRP 의존적 공동번역 단백질(cotranslational protein), rRNA 처리 및 번역 개시를 포함하여 리보솜 관련 경로와 관련된 강화 기능을 나타내었다. 도 3의 d에서 SEVERE와 MILD 간의 455 DEG는 T 세포 활성화 및 그 신호 전달 경로와 관련된 유전자의 특이적인 강화가 확인되었다. 이는 중증 COVID-19 환자에서 면역 관련 유전자의 발현 변화를 설득력 있게 나타낸다.

[0056] 중증 환자에 특이적인 발현 마커 유전자를 확인하기 위하여 SEVERE vs HC 및 SEVERE vs MILD 모두에서 차등적으로 발현되는 유전자를 분류하여 도 4에 도시하였다. 도 4는 경증 환자나 건강한 대조군에 비해 중증 COVID-19 환자에서 공통적으로 변경된 131개의 DEG 중, 64개의 유전자가 상향조절되었고 67개의 유전자가 하향조절되었

음을 나타낸다.

[0057] 실시예 2 : 공개적으로 사용가능한 RNA 서열 데이터의 메타데이터 분석

[0058] 이어, 공개적으로 사용가능한 COVID-19 환자의 PBMC 시료 유래의 인간 RNA 서열 데이터세트를 이용하여 상기 결과를 검증하였다. 이용가능한 RNA 서열 데이터 세트는 NCBI GEO 데이터베이스에서 검색하였다. 첫 번째 코호트 데이터(GSE157103)는 100명의 COVID-19 양성 환자 유래의 말초혈액 백혈구 전사체에 대해 연구하였다. 기계식 인공호흡기 사용 여부에 의해 COVID-19 양성 환자를 중증사례 42건과 중등도 사례 58건으로 구분하였다. 두 번째 코호트 데이터(GSE152418)에는 중증 8명, ICU 4명, 중등도 4명으로 구성된 16명의 급성 COVID-19 입원 환자 유래의 PBMC 전사체를 포함한다. 중증 또는 ICU로 분류된 12명의 환자는 중증 사례로 간주하였으며, 중등도로 분류된 4명의 환자는 중등도 사례로 그룹화하였다. 각각에서 얻어진 정량화된 전사체 발현 데이터로부터, edgeR R-package(버전 3.36.0)를 사용하여 발현이 매우 낮은 유전자를 제외하고 원시 개수를 CPM(백만개 당 개수)으로 변환하였다. 최소 2개의 시료에서 $\log_2\text{-CPM} \geq 1$ 인 유전자는 추가 분석을 위해 보관하였다. 필터링 후 원시 라이브러리의 크기를 조정하기 위해 R-package(버전 3.36.0)의 edgeR에 있는 calcNormFactors 함수를 사용하여 TMM(Trimmed Mean of M-values) 방법으로 정규화 계수를 계산하였다. 차등화된 발현 분석(Differential expression analysis)은 edgeR 패키지에 내장된 glmFit 및 glmLRT 함수를 사용하여 수행하였다. 다중 테스트를 보정하기 위하여 Benjamini 및 Hochberg의 FDR(False Discovery Rate)를 사용하였으며, $FDR < 0.05$ 및 1.5배 변화 컷오프를 갖는 유전자만이 유의미하게 차등 발현되는 것으로 간주하였다.

[0059] GSE157103 코호트에서는 42명의 중증 환자와 58명의 중등도 환자 사이에서 2890개의 DEG가 확인되었으며, 이 중 1234개의 DEG가 상향조절 되었으며 1656개의 DEG가 하향조절 되었다. GSE152418 코호트에서는 12명의 중증 환자와 4명의 중등도 환자 사이에서 1019개의 DEG가 확인되었으며, 686개의 DEG가 상향조절 되고, 33개의 DEG가 하향조절 되었다.

[0060] 이를 실시예 1의 결과와 비교한 결과, 4개의 상향조절 유전자(IL17RA, SMPDL3A, SNX10 및 THBS1) 및 1개의 하향조절 유전자(TRABD2A)로 구성된 5개의 예상 중증 특이적 발현 마커 유전자를 확인하였다(도 5의 a). 도 5의 b는 상기 발현된 단백질-단백질 상호작용 관계를 STRING protein interaction database(버전 11)를 사용하여 분석한 결과이다. 도 5의 b로부터 IL17RA와 THBS1이 특징적인 허브로 나타나며, 면역계의 사이토카인 및 인터루킨 신호 전달 경로와 관련된 여러 유전자가 직접적으로 연결되어 있음을 보여준다. 이는 중증 COVID-19 환자의 PMBC에서 건강한 대조군이나 경증 환자에 비해 IL17RA와 THBS1 수준이 모두 상향조절 되는 것을 시사한다.

[0061] 어떤 면역관련 세포 유형이 IL17RA 및 THBS1에 반응하는지 조사하기 위하여, WHO COVID-19 심각도 점수를 가진 33명의 COVID-19 환자와 8명의 건강한 대조군을 포함하는 코호트 데이터(GSE174072)를 NCBI GEO 데이터베이스에서 검색하여 사용하였다. GSE174072에는 175,000개 이상의 단일 전사체로 구성된 RBC-용해 전혈 단일세포 RNA 서열(scRNA-서열) 데이터세트가 있다.

[0062] COVID-19 Cell Atlas(<https://www.covid19cellatlas.org/>)에서 이들의 가공된 scRNA-Seq 데이터를 얻었다. 전처리된 scRNA-서열 데이터를 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)방법을 사용하여 2차원적으로 시각화하여 도 6에 도시하였다.

[0063] 세포 집단 사이에서 차등 발현되는 유전자를 식별하기 위해 기본 매개변수를 사용하여 Seurat(버전 4.0.5)의 'FindAllMarkers' 함수를 사용하였다. Bonferroni의 보정을 통한 Seurat's implementation of the two-sided Wilcoxon rank-sum test에 의해 통계적 유의성을 결정하였다. 도 7의 a는 코호트 GSE174072에서 IL17RA 및 THBS1 유전자의 발현을 UMAP 프로젝트에 나타난 것이며, b는 단핵구, 호중구 및 혈소판에서의 각각의 발현량을 중증도 점수에 대해 나타낸 것이다. 도 7의 a를 참조하면 UMAP 플로팅에 의한 14개의 별개의 세포 유형 클러스터에서, IL17RA 발현은 'CD14-양성 단핵구' 및 '호중구' 세포 유형에서 가장 풍부하게 관찰되었다. 반면, THBS1 발현은 'CD14-양성 단핵구'에서는 발현이 약하고 '호중구' 세포 유형에서는 뚜렷한 발현이 관측되지 않았으며, 주로 '혈소판'에서 발현이 관찰되는 현저하게 다른 패턴을 나타내었다. 도 7의 b는 이러한 유전자 발현 패턴과 COVID-19 심각도 점수와의 관련성을 나타낸다. 일반적으로 IL17RA 유전자의 발현 수준은 CD14-양성 단핵구($p=0.474$ 및 $P=0.0017$) 및 호중구($p=0.488$ 및 $P=0.0016$)에서 COVID-19 중증도 점수와 유의한 양의 상관관계를 나타내었다. 특히 IL17RA 유전자 발현은 중증도 점수가 0인 경우보다 중증도 점수가 6-7인 경우 CD14-양성 단핵구($P=0.0015$) 및 호중구($P=0.00100$) 세포 유형에서 유의하게 높았으나, THBS1 유전자 발현 패턴에서는 이러한 변화가 관측되지 않았다. 이와 대조적으로 THBS1 유전자의 발현은 중증 COVID-19 환자의 혈소판에서 유의미하게($P=0.0009$) 상향조절되었다.

[0064] **실시예 3 : miRNA 서열 분석 및 miRNA 표적 유전자 예측**

[0065] 최근 숙주 및 바이러스 인코딩 miRNA가 SARS-CoV-2의 복제 및 감염에 필수적이라는 것이 입증되고 있다. 이에 중증 COVID-19 환자의 시료에서 차등 발현되는 인간 miRNA를 식별하기 위해 smRNA-서열 분석 실험을 수행하였다. 도 8의 a는 그 결과를 보여주는 것으로 정규화된 판독수 < 5을 임계값으로 저발현 miRNA를 필터링한 결과, 유의미하게 하향조절된 2개의 miRNA(hsa-miR-29a-3p 및 hsa-miR-146a-5p)와 유의미하게 상향조절된 1개의 miRNA를 식별하였다.

[0066] 하향조절된 miRNA가 중증 COVID-19 환자에게서 발현이 증가한 것으로 밝혀진 IL17RA 및/또는 THBS1의 3'-UTR에 결합하는 지 확인하였다. 지정된 마이크로RNA(miRNA)의 예상 표적 유전자와 결합 부위는 miWalk 3.0 온라인 예측 소프트웨어(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>, 2022년 2월 최종 액세스)를 사용하여 예측하였다. 각 miRNA-표적 쌍에 대한 최소 자유 에너지(ΔG)는 miWalk3.0으로 계산하였다. 그 결과 도 8의 b에 도시된 바와 같이 hsa-miR-29a-3p가 IL17RA 및 THBS1 모두에 결합할 수 있음을 확인하였다. IL17RA mRNA의 경우, hsa-miR-29a-3p의 5'-말단에서 세 번째 위치에서 시작하여 이론적으로 계산된 자유 에너지가 -17.4 kcal/mol인 경우 2개의 불안정한(wobble) G-U 염기쌍을 포함하여 총 13개의 염기쌍이 페어링되었다. THBS1 mRNA의 경우, miRNA 표적 부위는 시드 페어링과 3'-보상 페어링이 모두 완벽하지는 않았으나, 대신 17개의 왓슨-크릭 쌍과 3개의 불안정한 쌍이 있어 이론적으로 계산된 자유 에너지는 -20.2 kcal/mol였다. 또한 hsa-miR-29a-3p의 발현 수준과 두 개의 표적 유전자 사이에 상당한 음의 상관관계($\rho = -0.675$ 및 $P = 0.004$)가 있음을 도 8의 c에서 확인할 수 있다. 이는 중증 COVID-19 환자의 경우 IL17RA 및 THBS1 mRNA의 발현이 중증 hsa-miR-29a-3p의 조절장애와 적어도 부분적으로 연관될 수 있음을 시사한다.

[0067] **실시예 4 : COVID-19 환자 혈액시료의 qRT-PCR 분석**

[0068] 바이오인포메틱스 결과를 COVID-19 환자의 혈액을 이용하여 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 분석(qRT-PCR)으로 추가 검증하였다. 중증 환자 7명, 경증 환자 8명과 건강한 대조군 8명의 PBMC 시료에서 IL17RA과 THBS1 및 has-miR-29a-3p에 대한 qRT-PCR 분석을 실시하였다. 도 9는 그 결과를 나타낸 것으로, 경증 및 중증 환자에서 THBS1의 발현이 유의적으로 증가하였으며, has-miR-29a-3p의 발현은 유의적으로 감소하였다. 반면 IL17RA의 발현 수준에는 유의적인 차이가 없었다.

[0069] 총 RNA 추출 후, mRNA 발현 분석을 위한 reverse transcription master mix(EBT-1515C, Elpis Biotech, London, England) 및 miRNA 발현 분석을 위한 miScript II RT 키트(218161, Qiagen)를 사용하여 상보적 DNA를 합성하였다. qPCR은 Quantinova SYBR Green PCR Kit(208056, Qiagen) 또는 miScript SYBR Green PCR Kit(218073, Qiagen)를 사용하여 Rotor-Gen Q 2plex 시스템(9001620, Qiagen)에서 수행하였다. 내부 대조군 유전자로서 인간 ACTIN 또는 RNU6-2를 사용하여 델타-델타 CT 상대 정량 방법을 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0070] qPCR에 사용된 프라이머 서열은 표 2에 기재하였다. RNU6-2의 qPCR을 위한 프라이머는 Qiagen에서 구입하였다(MS00033740)

표 2

유전자	서열	서열번호
ACTIN	f : 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'	서열번호 1
	r : 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	서열번호 2
IL17RA	f : 5'-AGTTCCACCAGCGATCCAAC-3'	서열번호 3
	r : 5'-GGCATGTAGTCCGGAATTGG-3'	서열번호 4
THBS1	f : 5'-CAGGGATACTCGGGCCTTTC-3'	서열번호 5
	r : 5'-GAAACCCGTCTTTGGCCTGT-3'	서열번호 6
Hsa-miR-29a-3p	5'-TAGCACCATCTGAAATCGGTGA-3'	서열번호 7

[0071]

[0072] **실시예 5 : miRNA의 형질감염**

[0073] COVID-19 중증 환자에서 발현이 감소하는 것으로 확인된 miR-29a-3p를 감염시키는 것에 의해, COVID-19 중증 환

자에서 발현이 증가하며 miR-29a-3p와 결합하는 것으로 확인된 THBS1의 발현 수준이 변화하는 지 확인하였다.

[0074]

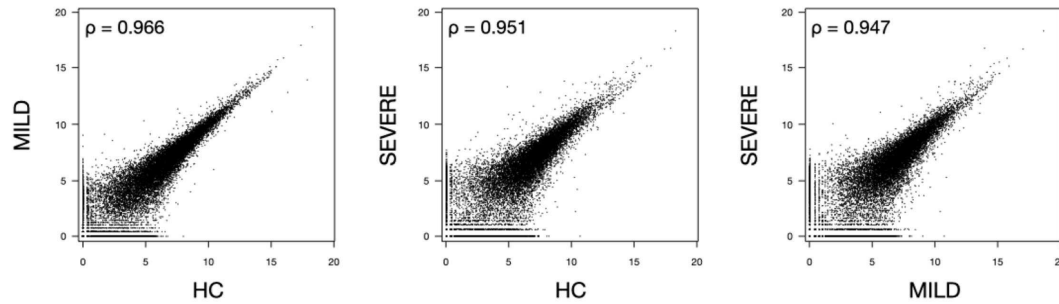
THP-1 세포는 American Type Culture Collection(TIB-202, ATCC, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지(12-702F, Lonza, Basel, Switzerland)를 사용하여, 37℃ 및 5% CO₂ 조건의 가습 인큐베이터에서 유지하였다. 형질감염을 위하여, THP-1 세포를 48-웰 플레이트에 웰 당 3×10^5 개씩 분주하고 500 nM 농도의 Phorbol-12-myristate-13-acetate (P8139, Sigma-Aldrich, MO, USA)로 3시간 동안 분화시켰다. 3시간 후, THP-1 세포를 Lipofectamine 2000(12566014, Invitrogen, MA, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 모방 음성 대조군(50 nM) 또는 hsa-miR-29a-3p 모방체(5, 20, 50 nM)로 형질감염시켰다. has-miR-29a-3p 모방체(5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3', 서열번호 8)는 Genolution(서울, 대한민국)에서 구입하였으며, 모방 음성 대조군은 Ambion(4464058, TX, Austin)에서 구입하였다.

[0075]

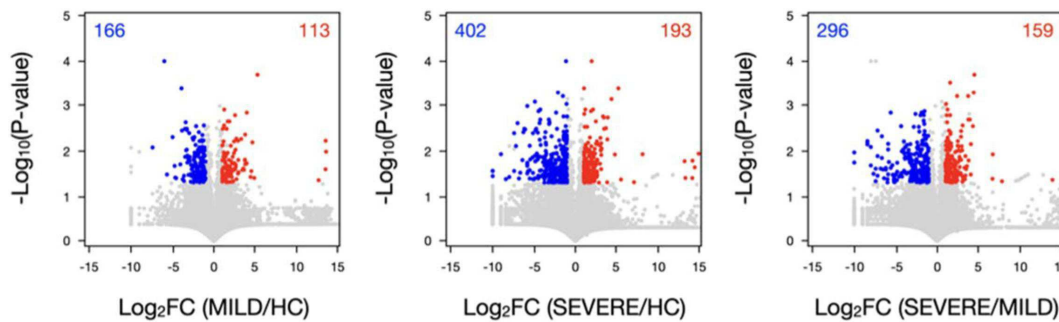
도 10은 감염 후 총 RNA를 추출하여 has-miR-29a-3p 및 THBS1의 발현 수준을 측정한 결과로, miR-29a-3p 모방체의 감염에 의해, COVID-19 중증 환자에서 발현이 감소하는 것으로 확인된 miR-29a-3p의 발현은 증가하는 한편, COVID-19 중증에서 발현이 증가하며 miR-29a-3p와 결합하는 것으로 분석된 THBS1은 발현이 감소되어 miR-29a-3p가 COVID-19 중증 환자의 치료에 이용될 수 있음을 나타내었다.

도면

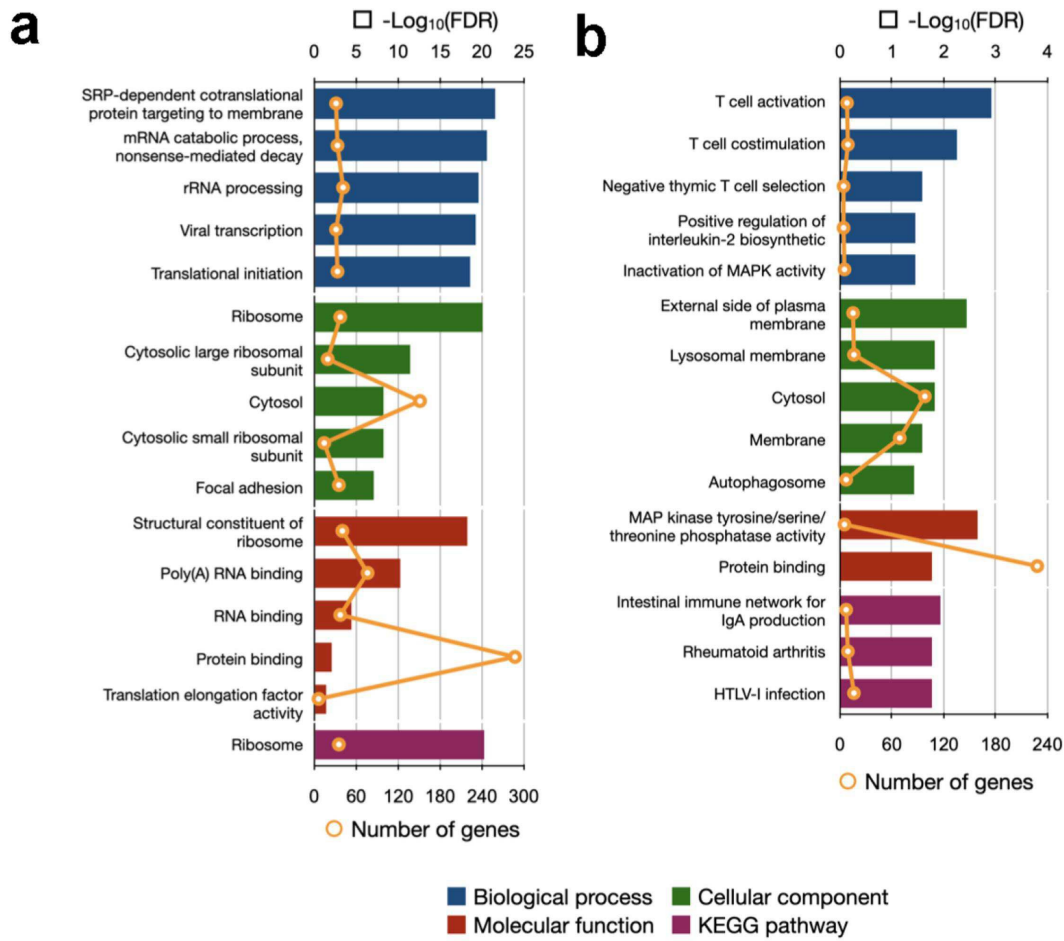
도면1



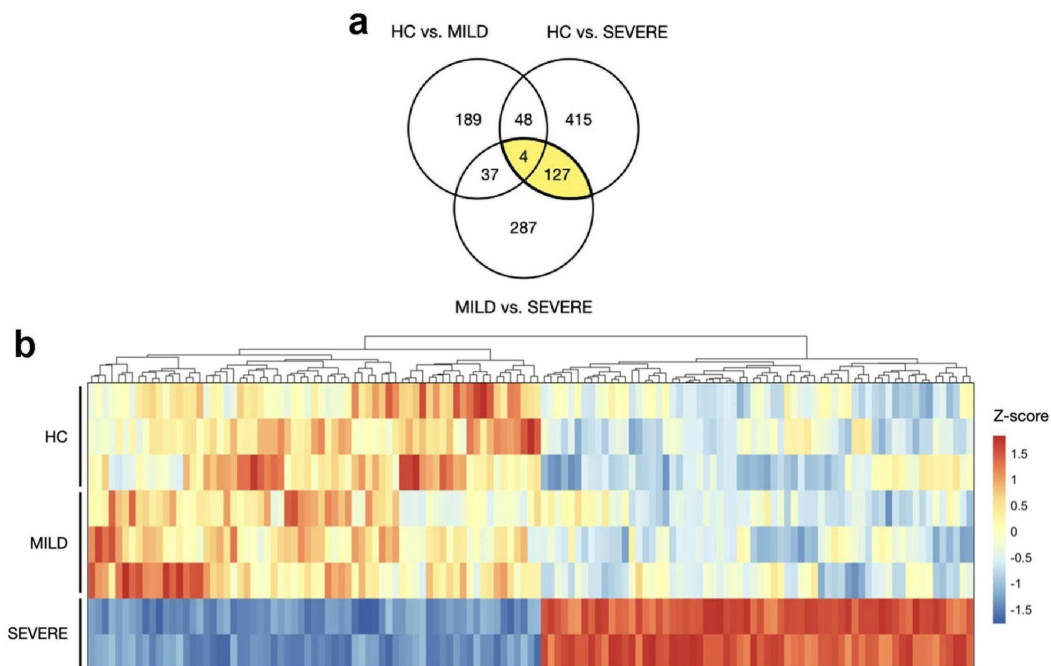
도면2



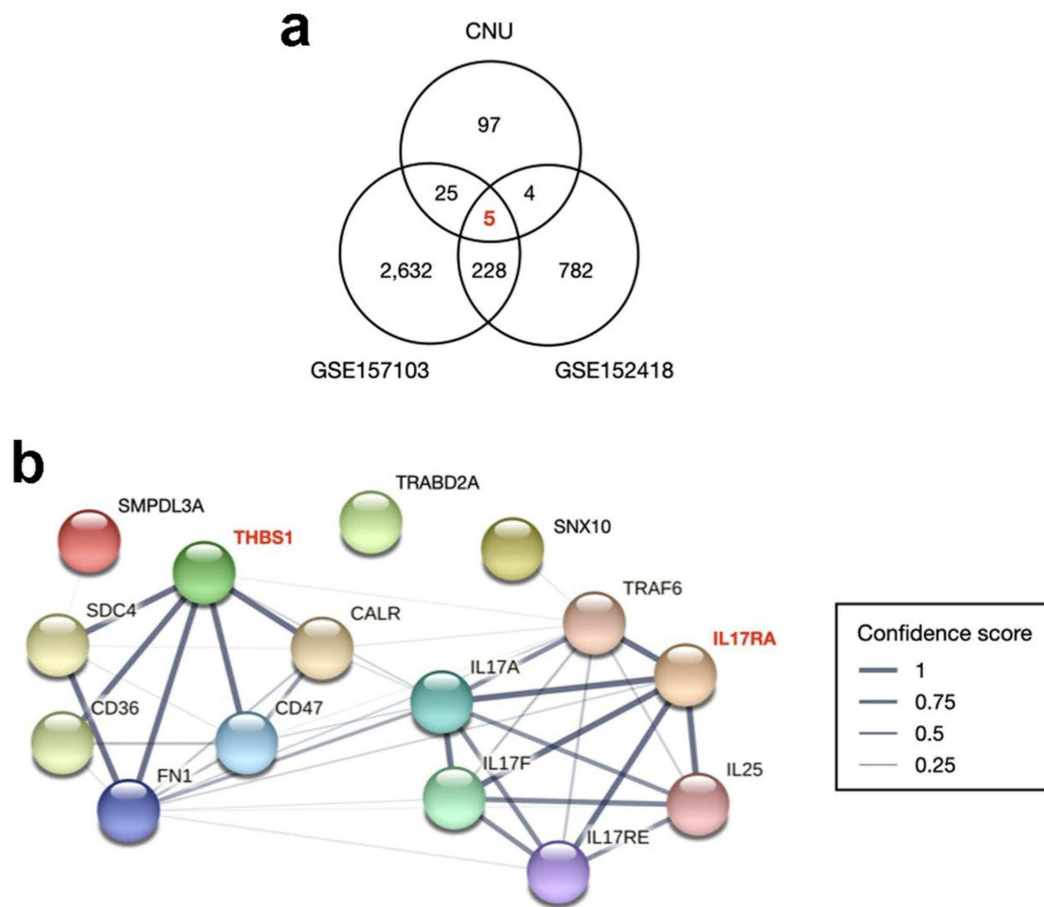
도면3



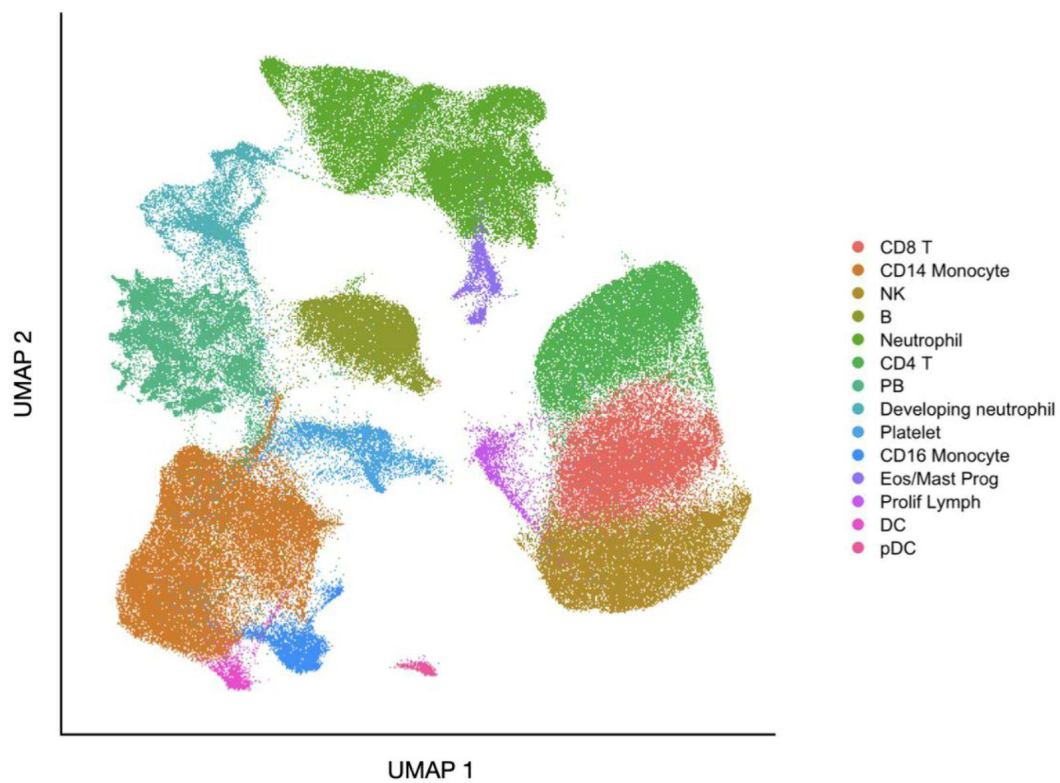
도면4



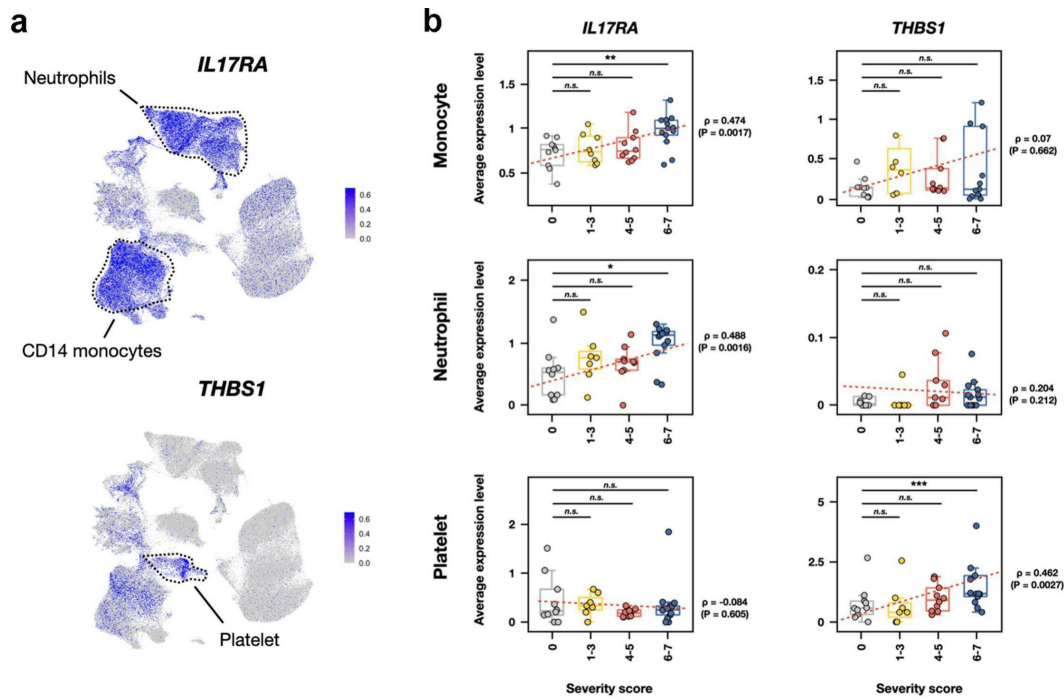
도면5



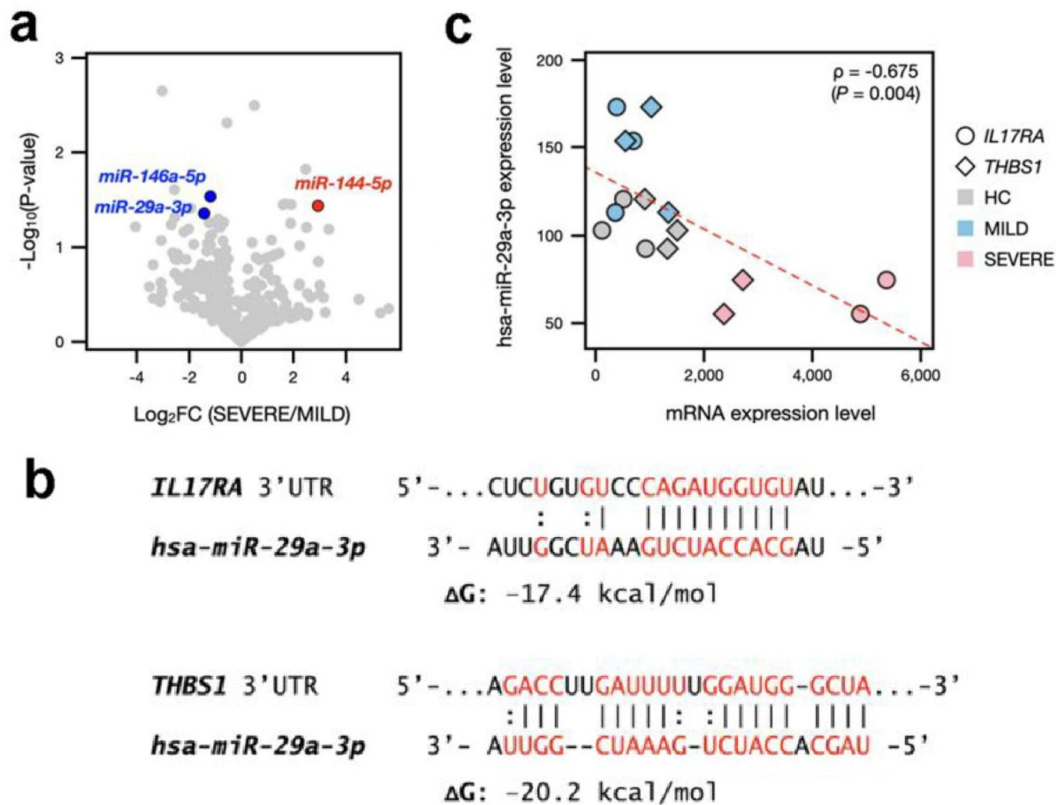
도면6



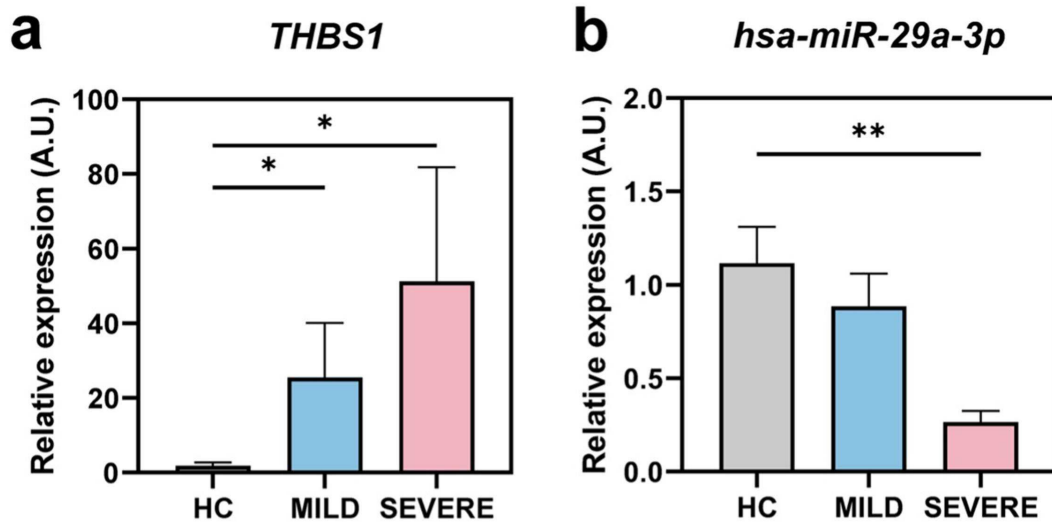
도면7



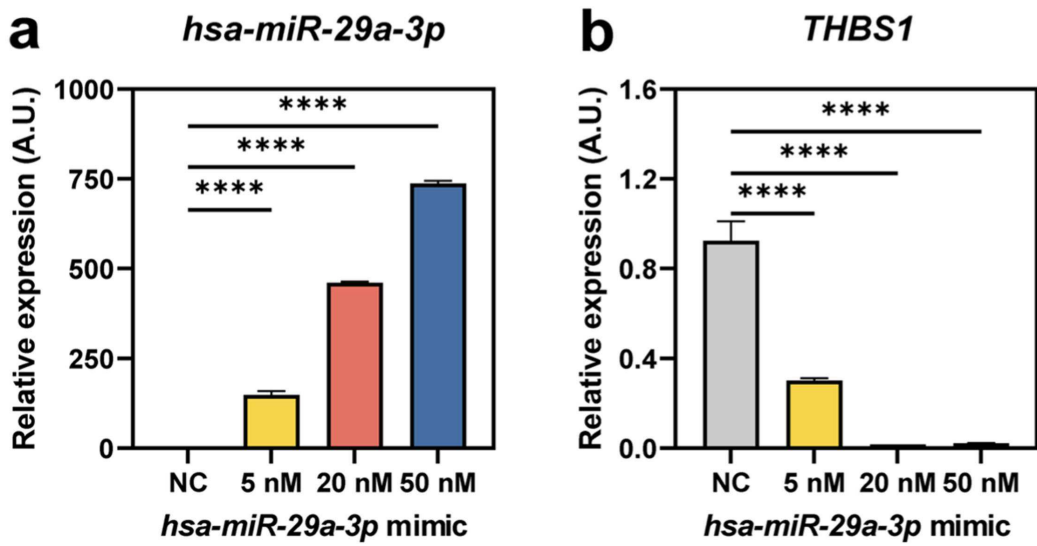
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.