



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0166052
(43) 공개일자 2023년12월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/48 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/485 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0068385
(22) 출원일자 2023년05월26일
심사청구일자 2023년05월26일
- (30) 우선권주장
1020220065341 2022년05월27일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
성혜
서울특별시 종로구 사직로1나길 13, 2층 201호 (행촌동, 행촌동 다세대 주택)
- 송준영
서울특별시 양천구 목동남로4길 80, 106동 1201호 (신정동, 목동파크자이)
- (74) 대리인
특허법인 무한

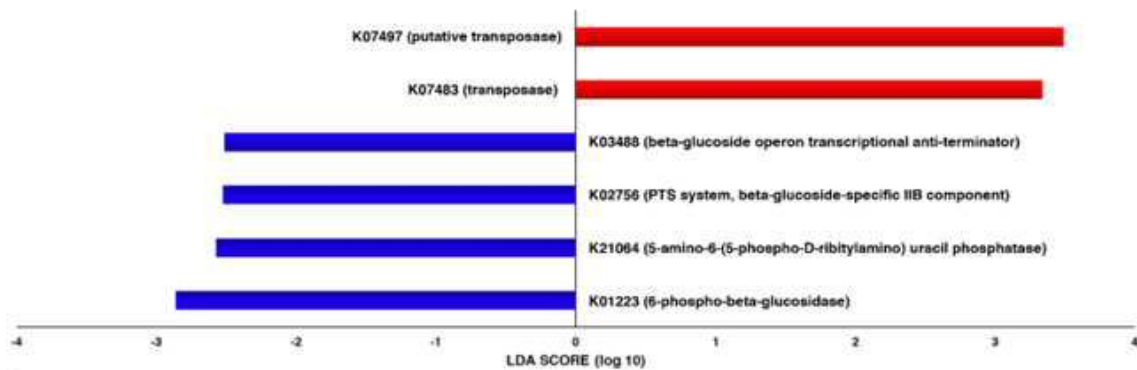
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 장내 기능적 바이오마커 프로파일을 통해 코로나바이러스 감염증의 예후를 예측하기 위한 정보제공방법

(57) 요약

본 발명은 코로나바이러스 감염증의 예후를 예측하기 위한 정보제공방법 및 좋은 예후를 나타내는 기능적 바이오마커를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 장내 미생물총의 분류적 구성 및 미생물과 관련한 대사체/대사경로의 기능적마커가 코로나바이러스 감염증 환자의 예후와 유의한 상관관계가 있음을 확인하여 예후 예측을 위한 정보제공을 할 수 있도록 한 것이다. 본 발명에 따르면 감염 초기 단계 대상체의 장내 기능적 바이오마커를 파악하여 대상체의 예후가 좋을 것인지 여부를 예측할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345351121

과제번호 2021R1I1A1A01050391

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 코로나바이러스-19 백신을 투여받은 사람의 면역원성에 영향을 미치는 마이크로바이

옴 요소 규명

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711159300

과제번호 2021M3E5D1A01015187

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 혁신형의사과학자공동연구(과기정통부, 복지부)

연구과제명 코로나바이러스-19환자의 치료 경과 개선을 위한 핵심 마이크로바이옴 요소 규명과 이를 활용한 프로바이오틱스 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제(putative transposase, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 오소로그 K07497), 트랜스포사아제(transposase, KEGG 오소로그 K07483), 6-포스포-베타-글루코시다제(6-phospho-beta-glucosidase, KEGG 오소로그 K01223), 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제(5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino) uracil phosphatase, KEGG 오소로그 K21064), PTS 시스템, 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific IIB component, KEGG 오소로그 K02756), 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터(beta-glucoside operon transcriptional antiterminator, KEGG 오소로그 K03488), PTS 시스템, 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific II component, KEGG 모듈 M00271), 갈락토스 분해, Leloir 경로, 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P(Galactose degradation, Leloir pathway, galactose $\Rightarrow$ alpha-D-glucose-1P, KEGG 모듈 M00632), 전분/수크로스 대사(Starch and sucrose metabolism, KEGG 경로 ko00500) 및 갈락토스 대사(Galactose metabolism, KEGG 경로 ko00052)로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 환자의 예후 예측 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제 및 트랜스포사아제로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 좋은 대상체로 판정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 나쁜 대상체로 판정하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 4

추정 트랜스포사아제, 트랜스포사아제, 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 제제를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제 4항의 조성물을 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코로나바이러스 감염증 환자의 예후를 예측하기 위한 장내 기능적 바이오마커를 이용한 정보제공방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 장내 미생물총의 분류적 구성과 장내 미생물 대사에 관한 기능적 마커가 코로나바이러스 감염증 환자의 예후와 유의한 상관관계가 있다는 점을 확인하고, 좋은 예후를 보여주는 장내 기능적 바이오마커를 확인하여 코로나바이러스 감염증 환자의 예후를 예측하는 정보제공방법과 함께 이를 검출하는 제제를 포함하는 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

배경 기술

[0003] 코로나바이러스 감염증 2019(COVID-19)는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)에 의해 유발되는 새로운 호흡기 감염 질환이다. 2019년 12월 중국 우한에서 퍼졌고 현재 범유행(pandemic)을 일으키고 있으며 전 세계적으로 심각한 건강 위기를 초래하고 있다. 2022년 3월 3일을 기준으로 전 세계적으로 4억 4200만 명 이상의 코로나19 확진자와 590만 명 이상의 사망자가 기록되었다.

[0004] COVID-19 대유행의 초기 단계에서 대부분의 COVID-19 환자는 자가 제한적인 경증 호흡기 질환을 나타내었지만 20%는 중증 질환으로 고통받았고 이 중 5%는 사망하였다. 고령 및 기저 질환은 중증 질환 및 불량한 예후의 중요한 위험 요소로 보고되고 있다. 그러나 연령 및 동반 질환에 관계없이 큰 개인차가 존재하였으며, 바이러스 독성 인자 외에도 개별 숙주 인자를 더 잘 이해하는 것이 COVID-19의 예후 예측에 필수적이다.

[0005] SARS-CoV-2는 주로 호흡기 및 위장관을 비롯한 다양한 신체 부위에 분포하는 안지오텐신 전환 효소 2 수용체(ACE2)를 통해 인간 세포에 침투한다[Wang B, Zhang L, Wang Y, Dai T, Qin Z, Zhou F, et al. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: Potential mechanisms and therapeutic interventions. Signal Transduct Target Ther (2022) 7:143]. 따라서 COVID-19 환자는 분변으로의 SARS-CoV-2 배출이 연장되고, 이것이 질병 중증도와 관련된 장 염증 손상 및 미생물 불균형을 유발한다[Chhibber-Goel J, Gopinathan S, Sharma A. Interplay between severities of COVID-19 and the gut microbiome: Implications of bacterial co-infections Gut Pathog (2021) 13:14.]. SARS-CoV-2의 직접적인 세포독성 효과와 함께 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템의 조절 장애, 혈전 염증 및 사이토카인 조절 장애의 세 가지 주요 기전이 질병 진행에 기여하는 것으로 최근 보고되었다[Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. Nat Med (2020) 26:1017-32.]. 따라서 장내 미생물총은 면역 조절에 영향을 미치고 사이토카인 생산의 균형을 유지함으로써 COVID-19에서 중요한 역할을 할 수 있다. 이러한 측면에서 대변 미생물군 이식(FMT)은 손상된 장내 미생물군유전체를 복원하는 추가 치료 방법으로 제안되었다[Bilipski J, Winter K, Jasipski M, Szczê A, Bilinska N, Mullish BH, et al. Rapid resolution of COVID-19 after faecal microbiota transplantation. Gut (2022) 71:230-2.].

[0006] 이러한 선행된 다양한 연구에도 불구하고, 장내 미생물군 조성과 COVID-19의 중증도 사이의 연관성을 평가한 연구는 거의 없으며 질병 예후와 관련된 장내 미생물 변화에 대한 연구결과 데이터는 제한적이다. 본 발명자들은 숙주의 면역반응(사이토카인 분비 및 항체 생산) 및 장내 미생물에 의한 대사체 등과 코로나19 예후와의 상관관계를 확인하고자 하였고, 증상 발현 후 최대 4주까지 장내 미생물총 및 이와 관련한 대사체/대사경로의 연속적인 변화를 조사하고 코로나19의 예후와의 상관관계를 분석하여 이를 발명으로 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 추정 트랜스포사아제, 트랜스포사아제, 6-포스포-베타-글루코시다제,

5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 환자의 예후 예측 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 상기 기능적 바이오마커를 검출하는 체제를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제(putative transposase, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 오소로그 K07497), 트랜스포사아제(transposase, KEGG 오소로그 K07483), 6-포스포-베타-글루코시다제(6-phospho-beta-glucosidase, KEGG 오소로그 K01223), 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제(5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase, KEGG 오소로그 K21064), PTS 시스템, 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific IIB component, KEGG 오소로그 K02756), 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터(beta-glucoside operon transcriptional antiterminator, KEGG 오소로그 K03488), PTS 시스템, 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific II component, KEGG 모듈 M00271), 갈락토스 분해, Leloir 경로, 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P(Galactose degradation, Leloir pathway, galactose $\Rightarrow$ alpha-D-glucose-1P, KEGG 모듈 M00632), 전분/수크로스 대사(Starch and sucrose metabolism, KEGG 경로 ko00500) 및 갈락토스 대사(Galactose metabolism, KEGG 경로 ko00052)로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 환자의 예후 예측 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0013] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제 및 트랜스포사아제로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 좋은 대상체로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 나쁜 대상체로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 추정 트랜스포사아제, 트랜스포사아제, 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 체제를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 조성물이 제공된다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 키트가 제공된다.

발명의 효과

[0017] 상기 정보제공방법에 따르면 코로나바이러스 감염증 초기의 대상체의 장내 미생물총 분류군 및 이와 관련한 기능적 바이오마커의 구성을 파악하여 대상체의 질환의 예후를 예측할 수 있다. 이를 통해 대상체 맞춤형 치료전략을 수립할 수 있어 부작용을 최소화하고, 적절한 의료자원 배분이 이루어질 수 있다.

[0018] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 환자군 및 대조군의 알파다양성 지수를 ACE 지수와 Shannon 지수로 나타낸 것이다.

도 2는 Charlson 동반 이환지수를 알파다양성에 대해 나타낸 것이다.

도 3은 임상 경과, CCI 및 경과시간(주)에 따른 베타 다양성 분석 결과이다.

도 4는 각 그룹에서 주차에 따른 베타다양성을 비교한 결과이다.

도 5는 각 환자그룹간 차이에 대한 정준상관분석을 1-2주차와 3-6주차에 대해 나타낸 것이다.

도 6은 각 환자그룹간 차이에 대한 정준상관분석을 1주차, 2주차, 3주차 및 4-6주차에 대해 나타낸 것이다.

도 7은 우수한 예후의 마커와 불량한 예후의 마커의 LDA 점수를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명자들은 장내 미생물군유전체에 관한 기능적 대사체마커 및 대사경로 등이 COVID-19 환자의 예후에 영향을 미침을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었으며, 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 하기와 같다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제(putative transposase, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 오소로그 K07497), 트랜스포사아제(transposase, KEGG 오소로그 K07483), 6-포스포-베타-글루코시다제(6-phospho-beta-glucosidase, KEGG 오소로그 K01223), 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제(5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino) uracil phosphatase, KEGG 오소로그 K21064), PTS 시스템, 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific IIB component, KEGG 오소로그 K02756), 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터(beta-glucoside operon transcriptional antiterminator, KEGG 오소로그 K03488), PTS 시스템, 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소(PTS system, beta-glucoside-specific II component, KEGG 모듈 M00271), 갈락토스 분해, Leloir 경로, 갈락토스 ≥알파-D-글루코스-1P(Galactose degradation, Leloir pathway, galactose > alpha-D-glucose-1P, KEGG 모듈 M00632), 전분/수크로스 대사(Starch and sucrose metabolism, KEGG 경로 ko00500) 및 갈락토스 대사(Galactose metabolism, KEGG 경로 ko00052)로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 환자의 예후 예측 정보를 제공하는 방법이 제공된다.

[0023] 상기 대상체는 바람직하게는 코로나바이러스 감염증에 감염된 대상체일 수 있고, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료는 바람직하게는 대상체의 분변일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 기능적 바이오마커를 정의하는 데 사용된 KEGG 오소로그(ortholog), 모듈(Module) 및 경로(pathway)는 교토 유전자 및 게놈 백과(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에서 제공하는 게놈에서 상동성 유전자의 그룹, 유전자 세트의 기능적 단위 및 경로를 각각 의미한다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 용어 "기능적 바이오마커(functional biomarker)"란 대사물질의 대사경로에서의 기능에 기초하여 코로나바이러스 감염증을 가진 대상체의 예후를 예측할 수 있도록 선별된 바이오마커이며, 바람직하게는 장내 미생물의 대사경로와 관련한 대사체 바이오마커일 수 있다.

[0026] 상기 기능적 바이오마커의 검출은 당 업계에 공지된 방법을 이용해 이루어질 수 있으며, 검출하고자 하는 성분이 아미노산인 경우 상보적 결합이 가능한 프라이머, 프로브, 압타머, 또는 항체일 수 있으며, 단백질인 경우 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry) 기법을 통해 또는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 이루어질 수 있고, 이 외의 경우에 대해서는 이들을 정량화할 수 있는 시약 또는 화학 물질을 통해 검출될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "예후"란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자가질환을 차후에 가지게 될지의 여부를 판단하거나 치료에 대한 검사 대상자의 반응성을 판단하는 것을 포함한다. 보다 구체적으로는 코로나바이러스 환자의 보조산소 필요 여부, 자가호흡 가능 여부, 폐렴증세 발현 여부를 비롯한 병증 및 질병에

기인한 사망 등의 병의 경과, 그리고 완치 여부를 의미한다. 본 발명의 목적상 예후는 코로나바이러스 감염증 환자의 질병의 경과 또는 생존 예후를 의미한다. 본 발명의 상기 방법을 이용하면, 코로나바이러스 감염증에 따른 예후가 호전될 것인지 여부를 판단할 수 있어, 추가적인 치료 방법의 사용 여부를 손쉽게 결정할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예측"이란, 환자의 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후 예측이란 질환의 치료 후 경과를 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0029] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 추정 트랜스포사아제 및 트랜스포사아제로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 좋은 대상체로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0030] 일 측에 따르면, 상기 단계 이후에, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\tilde{A}$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사로 이루어지는 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커가 검출되면, 코로나바이러스 감염증에 대한 예후가 나쁜 대상체로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 "예후가 좋은"은 상술한 본 명세서에서 사용되는 용어 "예후"가 치료학적으로 긍정적인 변화를 나타내는 모든 것을 의미하며, 바람직하게는 하기 표 1에 개시된 국립 알레르기 및 전염병 연구소-서수 척도(NIAID-OS)의 단계가 낮아지는 것을 의미한다.

[0032] 상기 "예후가 나쁜"은 상술한 본 명세서에서 사용되는 용어 "예후"가 치료학적으로 부정적인 변화를 나타내는 모든 것을 의미하며, 바람직하게는 하기 표 1에 개시된 국립 알레르기 및 전염병 연구소-서수 척도(NIAID-OS)의 단계가 높아지는 것을 의미한다. 본 발명에 따르면, 코로나바이러스 감염증 환자의 예후와 장내 대사체 프로파일과의 상관관계를 규명하여, 환자의 예후의 바이오마커 역할을 할 수 있는 장내 대사체 프로파일을 확보하였고, 이에 따라 대상체의 예후를 예측할 수 있는 정보제공방법을 제공한다.

[0033] 본 발명에 따르면 코로나바이러스 감염증 환자를 국립 알레르기 및 전염병 연구소-서수 척도(NIAID-OS) 기준, 중등도에서 회복된 그룹(하기 B그룹)과 악화된 그룹(하기 D그룹)으로 나누어, 감염 초기 시기(1주차 내지 2주차)에 두 그룹간 장내 기능적 마커의 차이를 확인하고, LEfSe 분석을 사용하여 LDA 효과 크기 2.5를 기준으로 좋은 예후를 보인 그룹의 유의미한 기능적 마커인 추정 트랜스포사아제 및 트랜스포사아제를 확인하였고, 나쁜 예후를 보인 그룹의 유의미한 기능적 마커인 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\tilde{A}$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사를 확인하였다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 추정 트랜스포사아제, 트랜스포사아제, 6-포스포-베타-글루코시다제, 5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, PTS 시스템 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, 베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, PTS 시스템 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, 갈락토스 분해 Leloir 경로 갈락토스 $\tilde{A}$ 알파-D-글루코스-1P, 전분/수크로스 대사 및 갈락토스 대사 로 이루어진 군 중 어느 하나 이상의 기능적 바이오마커를 검출하는 제제를 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 조성물이 제공된다.

[0035] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 코로나바이러스 감염증 예후 예측용 키트가 제공된다.

[0036] 상기 키트는 검출용 제제를 필수 구성요소로 포함할 수 있다. 비 제한적인 일 예로서 ELISA 키트의 경우, 캡처 항체, 검출항체, 완충액, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 상기 키트에는 이외에 기능적 바이오마커의 측정을 용이하게 하는 당업계에서 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따르면, 코로나바이러스 감염증의 예후는 장내 미생물의 종다양성과 사이토카인 레벨에도 관련이 있

음을 확인하였다. 상기 종다양성은 바람직하게는 알파 다양성일 수 있고, 더욱 바람직하게는 ACE 및 Shannon 중 어느 하나 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는 ACE 다양성일 수 있다. 하기 실시예 3 등에 따르면, 코로나바이러스 감염 후 알파 다양성이 감소하였으며, 예후가 좋지 않은 그룹에서는 알파 다양성이 회복되지 않음을 확인하였다.

[0038] 염증성 사이토카인은 전염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 및 IFN- γ 의 경우 예후가 불량한 군에서 그 수치가 낮고, 항염증성 사이토카인인 IL-10 수치가 높았다. 특히, 감염증의 초기 단계에서 전염증성 사이토카인의 불충분한 방출이 코로나바이러스 감염증의 예후에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0040] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0041] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0043] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0045] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0047] 실시예 1: 실험 방법

[0048] 1-1: 실험 개요

[0049] 본 발명에서는 2021년 1월 8일부터 2021년 9월 9일까지 대한민국의 2개 상급 병원(고려대학교 구로병원 및 충북대학교 병원)에 입원한 COVID-19 환자 30명과 건강한 대조군 16명을 대상으로 코호트 연구를 수행하였다. SARS-CoV-2 감염은 비인두 표본의 실시간 중합효소연쇄반응(RT-PCR)에 의해 확인되었다. 4주 이내에 프로바이오틱스를 투여받은 환자는 제외하였다. 연구 등록 전 4주 이내에 미생물군유전체에 영향을 미칠 수 있는 항생제, 프로바이오틱스, 완하제 및 운동성 약물을 포함한 약물을 복용한 사람들을 제외하고 기저 질환이 없는 건강한 개인을 대조군으로 등록했다. 모든 대조군은 비인두 RT-PCR 및 혈청학적 검사에서 SARS-CoV-2에 대해 음성으로 확인되었다. 대변 및 혈액 샘플은 0일(등록)차, 7일차, 14일차 및 28일차에 연속적으로 수집되었다. 인구 통계, 약물, 흉부 방사선 촬영 결과, 실험실 결과 및 식이기록과 관련된 환자 데이터는 훈련된 두 명의 의사가 수집했다. 분석 기간은 감염 후 기간의 1주차(0-7일), 2주차(8-14일차), 3주차(15-21일차), 4주차(22-28일차), 5주차(29-35일차) 및 6주차(36-42일)로 분류하였다.

[0050] 환자는 8개 범주의 국립 알레르기 및 전염병 연구소-서수 척도 (NIAID-OS, 하기 표 1)에 따라 등록 시 평가하였다. 임상 과정에 따라 환자를 4개의 그룹으로 분류했다. A그룹은 경증에서 회복된 그룹이었다(OS4를 유지). B그룹은 중등도에서 경증으로 개선된 군이었다(OS 5에서 OS 4로 개선됨). C그룹은 중증에서 경증으로 개선된 군이었다(OS 6에서 OS 4로 개선됨). D그룹은 악화되었다(OS 4 또는 5에서 OS 7 또는 8로 악화됨).

표 1

Patients	NIAID-OS	단계
	1	입원하지 않음, 활동에 제한 없음(Not hospitalized, no limitations on activities)
	2	입원, 활동 제한 없음 및/또는 가정용 산소 필요 없음(Not hospitalized, no limitations on activities and/or requiring home oxygen)
	3	입원, 보조 산소가 필요하지 않음 - 더 이상 지속적인 치료가 필요하지 않음(Hospitalized, not requiring supplemental oxygen- no longer requires ongoing medical care)
Population enrolled	4	입원, 보조 산소가 필요하지 않음 - 지속적인 치료가 필요함 (Hospitalized, nor requiring supplemental oxygen- requiring ongoing medical care)
	5	입원, 보조 산소 필요(Hospitalized, requiring supplemental oxygen)
	6	입원, 비침습적 환기 또는 고유량 산소 장치 사용 (Hospitalized, on non-invasive ventilation or high flow oxygen devices)
	7	입원, 기계적 환기 또는 ECMO (Hospitalized, on mechanical ventilation or ECMO)
	8	사망(Death)

본 연구는 고려대학교 구로병원 기관심사위원회(2020GR0570)와 충북대학교병원 기관심사위원회(2020-12-021)의 승인을 받았다. 모든 참가자는 사전 동의를 제공했다. 모든 절차는 기관 및/또는 국가 연구 위원회의 윤리 기준과 1964년 헬싱키 선언 및 이후 개정된 윤리 기준에 따라 수행되었다.

1-2: 샘플 수집 방법

대변 샘플은 핵산 보존 배지가 포함된 Fecal Swab DNA Preservation and Transport Kits(Noble Bio, Hwaseong, Korea)를 사용하여 수집되었다. 분변 면봉 수송 배지의 분변 샘플은 -80° C에서 보관되었다. 정맥 천자에 의해 혈액 샘플을 채취하고 혈청 분리 튜브에 수집한 후 -4° C에서 2500rpm으로 10분 동안 원심분리하고 혈청 함유 상등액을 깨끗한 플라스틱 스크류 캡 바이알에 피펫팅하여 -80° C에서 보관했다.

1-3: 사이토카인 분석

COVID-19의 임상 경과에 영향을 미치는 것으로 알려진 5가지 사이토카인을 선택했다[Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. J Leukoc Biol (2020) 108:17-41. 및 Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine storm. N Engl J Med (2020) 383:2255-73.]. COVID-19 환자의 혈액 샘플을 테스트하고 IL-6, IL-10, 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), 인터페론-감마(IFN- γ) 및 IL-2를 포함한 사이토카인 패널을, 다중 동시 정량화를 허용하는 표준화된 Luminex xMAP 시스템을 사용하여 정량화하였다. 이 시스템은 스펙트럼으로 처리된 비드 세트를 사용하며, 각 비드 세트는 주어진 표적 분자에 대한 특정 포획 단일클론 항체와 접합된다. Luminex 200 기계를 사용하여 비드 혼합물을 분석하여 비드 주소당 신호를 정량화하고 이러한 분석물의 수준을 결정했다. 개별 분석을 위한 Human Magnetic Luminex Assay(5 Plex) 키트는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입했다.

1-4: 미생물 분석

총 DNA는 제조업체의 지침에 따라 PowerFecal® Pro DNA 키트(Qiagen, Germany)를 사용하여 추출되었다. ChunLab, Inc.(서울, 대한민국)에서는 16S rRNA 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하는 융합 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하고 제조업체의 지침에 따라 Illumina MiSeq Sequencing System(Illumina, San 디에고, 캘리포니아, 미국)으로 시퀀싱하였다. 사용된 프라이머를 하기 표 2에 나타내었다. 하기 밑줄 표시된 부분이 타겟 부위이다. 미생물 분석 과정은 DNA 추출, PCR 증폭, 16s rRNA 염기서열 분석뿐 아니라 EzBioCloud 16S 기반 MTP와 천렵의 생물정보학 클라우드 플랫폼(온라인 부록 참조)을 활용한 염기서열 데이터 처리 및 분석을 포함한다.

표 2

[0061]

	프라이머 명칭	서열(5'→3')
서열번호 1	341F	AGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
서열번호 2	805R	AGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

[0062]

상기 서열번호 1의 프라이머는 P5 그라프트 결합, i5 인덱스, NexTera 컨센서스로 구성된 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-XXXXXXXXTCGTCGGCAGCGTC-3'의 3'말단에 융합되어 사용되었다. 상기 서열번호 2의 프라이머는 P7 그라프트 결합, i7 인덱스, NexTera 컨센서스로 구성된 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXXGTCTCGTGGGCTCGG-3'의 3'말단에 융합되어 사용되었다. 상기 "X"는 Illumina NexTera 바코드 영역을 나타낸다. PCR 증폭은 다음 조건에서 수행되었다: 95° C에서 3분 동안 초기 변성, 이어서 95° C에서 30초 동안 변성의 25사이클, 55° C에서 30초 동안 프라이머 결합, 72° C에서 30초동안 신장, 그리고 72° C에서 5분 동안 최종 신장 단계를 거쳤다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔을 사용한 전기영동 후 Gel Doc 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 시각화하여 확인했다. 증폭된 산물은 CleanPCR kit(CleanNA)를 이용하여 정제하였다. 동일한 농도의 정제된 생성물을 풀링하고, CleanPCR 키트(CleanNA)를 사용하여 짧은 단편(비표적 생성물)을 제거하였다. 품질과 제품 크기는 DNA 7500 칩을 사용하여 Bioanalyzer 2100 시스템(Agilent, 팔로 알토, 캘리포니아, 미국)으로 평가하였다. 혼합 앰플리콘을 풀링하고 제조사의 지침에 따라 Illumina MiSeq Sequencing System(Illumina, 샌디에이고, 캘리포니아, 미국)을 사용하여 ChunLab, Inc.(서울, 한국)에서 시퀀싱을 수행하였다. 원 판독값은 먼저 품질 검사를 하여 품질이 낮은(<Q25) 판독값은 트리모메틱(Trimmomatic, ver. 0.32)을 사용하여 필터링되었다. QC 처리 후 VSEARCH ver.2.13.4의 fastq_mergepairs 명령을 사용하여 디폴트 파라미터(default parameters)로 페어드-엔드 시퀀스(paired-end sequence) 데이터를 병합했다. 다음으로, 프라이머는 유사성 컷오프 0.8에서 Myers-Miller 정렬 알고리즘을 사용하여 트리밍(trimming)하였다(Myers EW, Miller W. Optimal alignments in linear space. Comput Appl Biosci 1988; 4: 11-7.). 비특이적 앰플리콘(amplicon), 즉 16S rRNA를 인코딩하지 않는 앰플리콘은 hmm 프로파일이 있는 HMMER 소프트웨어 패키지 버전 3.2.1의 nhmmer 알고리즘을 사용하여 검출되었다(Wheeler TJ, Eddy SR. nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. Bioinformatics 2013; 29: 2487-2489.). 유니크 리즈(unique reads)를 추출하고 리던던트 리즈(redundant reads)를 VSEARCH의 deep-full-length 명령어를 사용하여 유니크 리즈로 클러스터링했다(Rognes T, Flouris T, Nichols B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 2016; 4: e2584.). EzBioCloud 16S rRNA 데이터베이스(Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. Int J Syst Evol Microbiol 2017; 67: 1613-1617.)는 VSEARCH의 usearch_global 명령어를 사용하여 분류학적 할당에 사용되었으며, 이후 더 정확한 페어와이즈(pairwise) 정렬이 수행되었다. 키메라 리즈(chimeric reads)는 CHIME 알고리즘과 EzBioCloud의 논-키메라(non-chimeric) 16S rRNA 데이터베이스를 사용한 참조 기반 키메라 리즈 감지에 의해 <97% 유사성의 리즈를 얻기 위해 필터링되었다. 키메라 리즈 필터링 후 EzBioCloud 데이터베이스에서 종 수준(<97% 유사성)으로 식별되지 않은 리즈를 컴파일하고 cluster_fast 명령어를 사용하여 새로운 클러스터링을 수행하여 추가 OTU(operational taxonomic units)를 생성했다. 다음으로 싱글 리즈(single reads, singletons)가 있는 OTU는 추가 분석에서 제외되었다. 다양성 계산 및 바이오마커 발견을 포함한 2차 분석은 ChunLab, Inc.의 자체 프로그램을 사용하여 수행되었다.

[0063]

다음의 알파 다양성 지수들이 추산되었다: ACE(Chao A, Lee S-M. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. J Am Stat Assoc 1992; 87: 210-217.) 및 Shannon(Magurran AE. Measuring biological diversity: John Wiley & Sons, 2013.). 샘플 차이를 시각화하기 위해 Bray-Curtis 알고리즘(Beals EW. Bray-Curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. Adv Ecol Res 1984; 14: 1-55.)을 사용하여 베타 다양성 거리를 계산했다 분류학적 미생물 바이오마커는 통계 비교 알고리즘(선형 판별 분석 효과 크기[linear discriminant analysis effect size, LEfSe](Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol 2011; 12: R60.)을 사용하여 발견하였다. 상기 선형 판별 분석을 로그단위로 점수화한 것을 LDA score로 나타내었다. 모든 미생물군집 수 데이터는 추가 사용 전에 1000개의 리즈(reads) 수에 대해 정규화되었다. 앞서 언급한 모든 분석은 ChunLab, Inc.의 생물정보학 클라우드 플랫폼인 EzBioCloud 16S 기반 MTP를 사용하여 수행되었다.

[0065] 1-5: 통계 분석

[0066] 모든 연속 변수는 중앙값 $\pm$ 사분위수 범위(IQR)로 표시하고 범주형 변수는 숫자(백분율)로 표시하였다. 그룹 간 차이를 감지하기 위해 비모수 테스트(페어드 t-테스트 또는 Wilcoxon 순위 합 테스트)를 사용했다. Kruskal-Wallis test는 4개의 그룹 간의 측정값의 차이를 평가하기 위해 사용되었으며 다중 비교는 Bonferroni 보정을 사용하여 조정되었다. 상관분석을 위해 112개의 식품과 영양소 섭취에 대해 Spearman rank test를 수행하였다. R 버전 4.1.2(R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)를 사용하여 통계 분석을 수행했다. COVID-19의 장내 미생물 조성 및 혈청 염증성 사이토카인 및 항체 농도 간의 연관성은 R의 VEGAN, ggPLOT2 패키지를 사용하여 분석되었다. 분산의 주성분 분석을 수행하여 커뮤니티 구조를 설명하는 최적의 변수 세트를 식별했다. 모델을 거리 행렬로 변환하고 순열 테스트를 사용했다. 예후 계층화 그룹과 관련하여 5개의 혈청 염증성 사이토카인이 방향을 따라 제시되었으며 약한 예측 변수가 강한 예측 변수보다 짧은 화살표를 갖도록 이들의 상관 관계에 의해 척도화되었다. 플롯된 사이토카인 화살표는 ggplot2 그래프를 사용하여 미생물군집 NMDS 플롯에 표시되며, 이는 R 패키지의 VEGAN을 사용하여 화살표의 상대적 r2 스케일 길이를 유지하도록 하였다.

[0068] 실시예 2. 4개 그룹의 분류와 특성

[0069] COVID-19 환자 30명 중 5명은 A그룹(경증에서 회복), 9명은 B그룹(중등도에서 경증으로 개선), 12명은 C그룹(중증에서 경증으로 개선), 4명은 그룹 D(악화)에 속했다. 하기 표 3 및 표4에 표시한 바와 같이 그룹 A, B, C, D 및 건강한 대조군의 환자의 중앙 연령은 각각 62, 70, 63, 59 및 43.5세였다. 2명의 환자(그룹 A에서 1명, 그룹 B에서 1명)는 두 번째 추적 조사 후 연구를 중단했고 한 명의 환자는 세 번째 추적 조사 후에 사망했다. 기본 의학적 상태에서 그룹 간 차이는 통계적으로 유의하지 않았지만 Charlson 동반이환 지수는 다소 높았고 말기 신질환(ESRD) 환자 2명은 그룹 A에 포함되었다(n=2, 40%). 실험실 결과와 관련하여 젖산 탈수소효소(LDH) 수준(A: 중앙값 525.0, IQR 225.0 vs. B: 중앙값 695.0, IQR 551.0 vs. C: 중앙값 929.0, IQR 248.0 vs. D: 중앙값 808.0) p = 0.033)은 A군이 다른 군보다 낮았다.

표 3

[0070]

특성	COVID-19 환자군 (n = 30)				P value	건강한 대조군 (n = 16)
	A (n = 5)	B (n = 9)	C (n = 12)	D (n = 4)		
나이 (만)	62.0 $\pm$ 32.0	70.0 $\pm$ 21.0	63.0 $\pm$ 27.0	59.0 $\pm$ 35.0	0.466	43.5 $\pm$ 27.0
남성 비율 (%)	2 (40.0%)	7 (77.8%)	7 (58.3%)	3 (75.0%)	0.585	7 (43.8)
BMI (kg/m ²)	23.3 $\pm$ 11.2	23.7 $\pm$ 6.7	25.4 $\pm$ 5.0	25.5 $\pm$ 8.6	0.581	25.4 $\pm$ 3.7
증상 발현부터 등록까지의 기간(일)	3.0 $\pm$ 6.0 ^a	7.0 $\pm$ 6.0 ^a	8.5 $\pm$ 7.0 ^a	4.5 $\pm$ 4.0 ^a	0.028	-
1주일 이내 ATB 사용(%)	1 (20.0%)	3 (33.3%)	10 (83.3%)	2 (50.0%)	0.039	-
총 ATB 사용 기간(일)	0.0 $\pm$ 17 ^a	9.0 $\pm$ 9 ^{ac}	10.0 $\pm$ 6 ^{ab}	24.0 $\pm$ 17 ^b	0.011	-
텍사메타손 사용(%)	0 (0.0%)	8 (88.9%)	12 (100.0%)	4 (100.0%)	<0.001	-
렘데시비르 사용(%)	0 (0.0%)	6 (66.7%)	12 (100%)	3 (75.0%)	<0.001	-
폐렴(%)	3 (60.0%)	9 (100.0%)	12 (100.0%)	4 (100.0%)	0.037	-
Ct 값, RdRp 유전자	20.25 $\pm$ 14.18	27.53 $\pm$ 8.75	27.07 $\pm$ 6.82	21.55 $\pm$ 7.72	0.218	-
Charlson 동반이환 지수	4.0 $\pm$ 3.0	3.0 $\pm$ 3.0	2.5 $\pm$ 4.0	2.0 $\pm$ 5.0	0.541	0.0 $\pm$ 2.0
기저 질환						
고혈압	3 (60.0%)	1 (11.1%)	5 (41.7%)	2 (50.0%)	0.234	-
심근경색증	0 (0.0%)	1 (11.1%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)	>0.999	-
뇌혈관발작	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0.133	-
치매	1 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0.083	-
진성당뇨병	4 (80.0%)	3 (33.3%)	3 (25.0%)	2 (50.0%)	0.214	-
편마비	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0.133	-
말기신장질환	2 (40.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.037	-

표 4

특성	COVID-19 환자군(<i>n</i> = 30)				<i>P</i> value	건강한 대조군(<i>n</i> = 15)
	A (<i>n</i> = 5)	B (<i>n</i> = 9)	C (<i>n</i> = 12)	D (<i>n</i> = 4)		
WBC (10 ³ cells/uL)	4.08±8.63	6.20±4.43	7.65±3.83	6.95±4.95	0.666	6.00±2.00
호중구(cells/uL)	2212.50 ±6674.75	4622.02 ±3596.52	5580.25 ±4341.00	6002.80 ±4475.68	0.711	3405.70 ±2185.58
림프구(cells/uL)	888.54 ±1850.38	456.57±636.71	694.35±719.55	336.50±360.43	0.083	1867.20 ±991.00
단핵구(cells/uL)	452.88±636.28	462.80±445.96	486.50±573.75	266.50±485.37	0.489	408.80 ±181.60
헤모글로빈(g/dL)	12.7±1.9	13.7±2.0	12.3±2.4	13.1±5.0	0.557	14.0±2.0
MCV (fL)	94.5±10.1	90.6±3.2	91.4±5.0	94.1±5.1	0.283	90.7±7.2
MCH (pg)	31.7±2.6	30.2±1.6	31.1±1.8	31.7±2.9	0.410	30.3±2.6
MCHC (g/dL)	32.6±1.1	33.4±0.9	33.8±1.1	33.5±1.5	0.075	32.95±1.3
혈소판 수 (10 ³ /uL)	152.0±131.0	177.0±122.0	189.5±91.0	165.0±75.0	0.374	282.0±90.0
BUN (mg/dL)	46.4±40.8	14.6±9.2	16.4±4.3	17.5±10.7	0.206	16.1±6.5
크레아티닌(mg/dL)	1.12±7.53	0.69±0.22	0.67±0.39	0.62±0.26	0.174	0.67±0.28
총 단백질(g/dL)	6.3±0.8	6.4±1.3	6.2±0.7	6.7±1.6	0.822	N/A
알부민(g/dL)	3.5±1.1	3.5±0.6	3.4±0.5	3.4±0.7	0.519	4.3±0.3
HDL 콜레스테롤(mg/dL)	50.0±25.0	36.0±24.0	41.5±19.0	44.5±24.0	0.703	53.5±17.0
LDL 콜레스테롤(mg/dL)	73.0±74.0	67.0±34.0	65.5±36.0	101.0±91.0	0.412	129.0±45.0
트리글리세리드(mg/dL)	110.0±150.0	77.0±75.0	87.5±48.0	146.0±135.0	0.726	74.5±93.0
AST (IU/L)	20.0±40.0	43.0±21.0	49.5±30.0	38.0±15.0	0.164	24.5±13.0
ALT (IU/L)	15.0±18.0	33.0±28.0	43.5±40.0	30.0±41.0	0.100	25.0±31.0
총 빌리루빈(mg/dL)	0.30±0.16 ^a	0.55±0.13 ^a	0.51±0.27 ^a	0.39±0.29 ^a	0.039	N/A
ESR (mm/hr)	44.0±44.0	57.0±36.0	55.0±32.0	42.0±53.0	0.840	N/A
CRP (mg/L)	10.42±43.03	15.61±127.24	34.96±83.63	46.69±56.72	0.141	0.54±1.22
프로칼시토닌(ng/mL)	0.27±0.63	0.08±0.12	0.065±0.05	0.09±0.09	0.286	N/A
LDH (IU/L)	525.0±225.0 ^a	695.0±551.0 ^{ab}	929.0±248.0 ^b	818.5±441.0 ^{ab}	0.033	N/A
페리틴(ng/mL)	418.30±430.03	562.70±389.73	592.35±607.00	1236.50 ±1980.15	0.895	N/A

실시예 3. 장내 미생물군, 사이토카인 및 항체변화 분석

알파 다양성을 ACE 지수와 Shannon-Wiener 지수로 계산하여 각각 도 1의 A 및 B로 나타내었다. ACE 지수와 관련하여 대조군과 각 COVID-19환자군 그룹 간에 상당한 차이가 있었다. 그러나 1주차의 그룹 B와 2주차 그룹 A의 알파 다양성은 대조군의 알파 다양성과 구별할 수 없었다(도 1의 A). Shannon-Wiener 지수에 따르면 건강한 대조군은 장내 미생물군이 가장 다양한 반면 그룹 D는 다양성이 가장 적었다(도 1의 B). 대조군과 각 COVID-19 환자 그룹 사이에는 3주차까지 상당한 차이가 있었다. 그러나 이러한 차이는 4주차에 유의하게 완화되었지만 그룹 D와 대조군 간에 알파 다양성의 큰 차이가 유지되었다. ACE로 분석했을 때 대조군과 각 COVID-19 그룹 간의 알파 다양성 차이는 4주차까지 지속되었다. 그룹 B와 C와 대조적으로 그룹 A의 알파 다양성은 가벼운 질병의 중증도에도 불구하고 연구 기간 동안 대조군보다 유의하게 낮음을 확인할 수 있었다. 이러한 차이는 기본적인 환자의 의학적 상태와 관련이 있을 수 있다.

Charlson 동반 이환지수(Charlson comorbidity index, CCI)에 대한 알파 다양성을 ACE 지수와 Shannon지수에 대해 각각 도 2의 A 및 B로 나타내었다. 그룹 A는 알파 다양성과 음의 상관 관계가 있는 Charlson 동반 질환 지

수가 더 높았다.

[0075] 임상 경과, CCI 및 경과시간(주)에 따른 베타 다양성 분석을 수행해 도 3에 나타내었다. 도 3의 A는 Bray-Curtis 거리를 이용한 주좌표 분석(PCA), B는 IFN- γ , IL-2, IL-10, TNF- α 및 항-S 면역글로불린G(IgG)과의 정규 상관 분석(CCA)결과이다. 도 3의 A에서 확인할 수 있듯이 그룹 간 유의한 차이가 나타났다($p = 0.003$). CCI($p < 0.001$)와 입원 후 시간(주)에 따라 베타 다양성에 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$). 포괄적인 분석을 위해 증상 발병 후 시간 경과에 따른 네 그룹의 미생물군집 변화를 분석하여 도 4에 나타내었다. 초기 기간 동안 베타 다양성의 변화는 증상 발병 후 첫 7일(1주차) 이내에 유의한 차이를 찾을 수 없었다($p = 0.218$). 그러나 시간이 지남에 따라 그룹 간 차이가 2주차에 확인되었다($p = 0.017$). 증상 발병 15일 후(3주와 4주), 그룹 간 차이는 확인할 수 없었다(3주와 4주에 각각 $p = 0.116$ 및 $p = 0.133$). 임상적 호전을 보인 그룹(그룹 B, C)과 대조군은 회복기에 더 가까운 미생물 조성을 보인 반면, 임상 경과가 악화된 그룹 D에서는 미생물 조성이 대조군과 멀게 유지되었다. A그룹에서는 임상적 호전에도 불구하고 대조군과의 거리가 멀게 유지되었다. 이는 기저질환으로 인한 것으로 예측되었다.

[0076] 표준 상관 분석(CCA)을 사용하여 30명의 COVID-19 환자의 장내 미생물 구성을 5가지 혈청 사이토카인(IFN- γ , IL-2, IL-10, TNF- α 및 항-S IgG)으로 예후 그룹별로 시각화하여 도 3의 B에 나타내었다. 이 중 IFN- γ 와 IL-2는 도 3의 B에 나타난 바와 같이 임상군에서 미생물군 구성과 유의한 상관관계를 보였다(IFN- γ , $p < 0.001$; IL-2, $p = 0.038$). 또한, CCA는 Charlson 동반질환 지수(IFN- γ , $p < 0.001$; IL-2, $p = 0.038$) 및 증상 발현 후 경과된 시간을 사용하여 분석했을 때 장내 미생물총과 사이토카인 사이에 유의한 상관관계를 보였다(IFN- γ , $p = 0.005$, IL-2, $p = 0.048$)(도 3의 B).

[0077] 1주차, 2주차 및 3주차에서 6주차까지 각 환자그룹간 차이에 대한 정준상관분석(Canonical Correlation Analysis)결과를 도 5에 나타내었다. 마이크로바이옴, 사이토카인 및 항-S IgG에 대한 분석을 도 5의 A에, 시간 경과에 따른 미생물 및 염증마커에 대한 분석을 도 5의 B에 나타내었다. 도 5의 A를 참조하면, 사이토카인 수준이 1주에서 2주(IL-2, $p = 0.046$)와 3주에서 4주(IFN- γ , $p = 0.002$; IL-10, $p = 0.005$)에 그룹 간에 유의하게 다른 반면 항-S IgG 항체 역가는 유사하게 나타났다. 도 5의 B를 참조하면, CRP($p = 0.043$) 및 LDH($p = 0.002$) 증분은 1주에서 2주 사이에 그룹 간에 유의하게 다른 반면 CRP($p = 0.004$), LDH($p = 0.037$), 프로칼시토닌($p = 0.018$) 및 D-이량체($p = 0.030$) 수준은 3주에서 4주 사이에 그룹 간에 유의하게 달랐다.

[0078] 1주차, 2주차, 3주차 및 4-6주차에 대해 같은 분석을 수행해 도 6에 나타내었다. 페리틴 수치는 2주차($p = 0.014$)와 3주차($p = 0.007$)에 그룹 D에서 유의하게 증가했다. 4주차에 IFN- γ ($p = 0.022$), IL-10($p = 0.010$), IL-6($p = 0.014$) 수준은 예후군 간에 유의한 차이가 있었다. 감염 초기 단계(1~2주)에서 IFN- γ 및 IL-6 수준은 그룹 A와 B보다 그룹 C와 D에서 더 낮았다. 구체적인 주차별 사이토카인 수치는 하기 표 5에 나타내었다. 이에 비해 후기 단계(3~4주)에 IFN- γ 와 IL-6 수치는 A그룹과 B그룹에서 감소한 반면 C그룹과 D그룹에서는 증가했다. 초기 단계에서 IL-2 수치는 모든 그룹에서 낮았지만 4주차에 그룹 D에서 유의하게 높아졌다. TNF- α 수준은 다른 그룹에 비해 그룹 D에서 초기 단계에서 더 낮았고 후기 단계에서 더 높았다. IL-10 수치는 D그룹이 다른 그룹보다, 특히 4주차에 더 높았다. 항-S IgG 항체 역가는 1주차에 C그룹에서 다른 군보다 유의하게 높았으나 2주차부터 비슷해졌으며 구체적인 수치는 하기 표 6에 나타내었다.

표 5

[0079]

1주차					
사이토카인(pg/mL)	A	B	C	D	P value
IFN- γ	1.77 $\pm$ 9.60	1.54 $\pm$ (N.A)	0.65 $\pm$ 10.82	0.00 $\pm$ 11.13	0.945
IL-10	1.44 $\pm$ 2.70	4.24 $\pm$ (N.A)	1.23 $\pm$ 1.55	6.60 $\pm$ 4.66	0.059
IL-2	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 2.90	0.00 $\pm$ 6.72	0.427
IL-6	11.89 $\pm$ 12.79	11.50 $\pm$ (N.A)	2.59 $\pm$ 6.30	9.40 $\pm$ 64.35	0.116
TNF- α	8.21 $\pm$ 11.94	2.95 $\pm$ (N.A)	3.27 $\pm$ 12.43	1.84 $\pm$ 2.40	0.127
2주차					
사이토카인(pg/mL)	A	B	C	D	P value
IFN- γ	1.55 $\pm$ 5.96	0.00 $\pm$ 0.32	3.67 $\pm$ 11.62	0.00 $\pm$ 5.01	0.230
IL-10	0.00 $\pm$ 7.06	0.64 $\pm$ 1.87	0.65 $\pm$ 2.18	3.21 $\pm$ 5.15	0.355
IL-2	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.18 $\pm$ 5.47	0.00 $\pm$ 4.65	0.079

IL-6	3.63±20.25	3.01±14.60	5.98±18.78	16.96±34.24	0.434
TNF-α	6.49±10.63	3.46±1.02	2.32±3.43	1.95±4.52	0.098
3 주차					
사이토카인 (pg/mL)	A	B	C	D	P value
IFN-γ	0.22±2.11	0.00±5.41	6.91±10.44	0.00±5.87	0.652
IL-10	0.00±0.00 ^a	0.00±1.95 ^{ab}	1.07±1.53 ^{ab}	1.61±2.20 ^b	0.033
IL-2	0.00±0.00	0.00±3.74	3.74±3.76	0.00±3.77	0.185
IL-6	3.49±22.11	2.38±3.96	1.95±2.79	5.95±10.38	0.352
TNF-α	7.99±8.12	3.01±3.14	1.95±2.46	2.68±4.79	0.070
4 주차					
사이토카인 (pg/mL)	A	B	C	D	P value
IFN-γ	0.00±2.69	0.43±8.69	6.91±9.42	11.62±(N.A)	0.136
IL-10	0.00±0.00 ^a	0.00±0.64 ^a	0.00±1.30 ^{ab}	2.76±(N.A) ^b	0.011
IL-2	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.33±5.47 ^a	5.47±(N.A) ^a	0.027
IL-6	3.44±41.84	1.76±1.60	1.46±2.10	10.32±(N.A)	0.093
TNF-α	5.06±5.33	3.72±9.68	2.67±2.11	4.60±(N.A)	0.058

표 6

항-SARS-CoV-2 S IgG (U/mL)	A	B	C	D	P value
Week 1	0.4±0.0 ^a	0.4±(N.A) ^{ab}	1.96±115.43 ^b	0.4±0.10 ^{ab}	0.024
Week 2	24.8±114.05	3.71±207.88	23.7±228.28	53.80±71.75	0.732
Week 3	160.55±959.97	153.0±338.30	236.0±484.0	328.0±324.70	0.696
Week 4	250.0±866.2	279.50±396.80	728.0±1212.0	728.0±(N.A)	0.230

실시예 4. 장내 미생물 분석

COVID-19 예후를 예측하기 위한 잠재적인 분류학적 마커를 탐색하기 위해 박테리아 분류군의 상대적인 풍부도를 평가했다. A그룹은 ESRD를 기저질환으로 하는 2명을 포함하고 있으므로, 미생물군은 B그룹에서 D그룹으로 갈수록 비율이 감소하고 LDA 효과크기가 2.5 이상인 것을 우수한 분류학적 표지자로 간주하였다. 구체적인 우수한 분류군과 LDA 효과크기를 하기 표 7에 나타내었다. 반대로, 그룹 B에서 D로 비율이 증가하고 LDA 효과 크기가 >2.5인 요인은 분류학적 마커가 불량한 것으로 간주하였다.

표 7

분류군명	분류단위	분류	LDA 효과 크기	P value
Peptoniphilus lacrimalis	종	Bacteria: Firmicutes: Tissierellia: Tissierellales: Peptoniphilaceae: Peptoniphilus	4.00551	0.02019
Anaerococcus prevotii	종	Bacteria: Firmicutes: Tissierellia: Tissierellales: Peptoniphilaceae: Anaerococcus	4.00885	0.00736
Dialister	속	Bacteria: Firmicutes: Negativicutes: Veillonellales: Veillonellaceae	3.97856	0.00414
JRNA_g	속	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Mogibacterium_f	3.46909	0.03179
JRNA_s	종	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Mogibacterium_f: JRNA_g	3.44772	0.03179

[0085] 우리는 LEfSe 분석을 사용하여 증상 발병 후 초기 기간(1주에서 2주) 동안 예후 관련 분류학적 마커를 식별했다. 우리는 펩토니필루스 라크리말리스(*Peptoniphilus lacrimalis*, LDA 효과 크기: 4.00551, $p = 0.02019$), 아나에로코쿠스 프레보티(*Anaerococcus prevotii*, LDA 효과 크기: 4.00885, $p = 0.00736$), 다이얼리스터(*Dialister*) 속(LDA 효과 크기: 3.97856, $p = 0.00414$), 모기박테리움(*Mogibacterium*) JRNA_g(LDA 효과 크기: 3.46909, $p = 0.03179$), 모기박테리움(*Mogibacterium*) JRNA_g JRNA_s(LDA 효과 크기: 3.44772, $p = 0.03179$)는 좋은 예후 관련 분류학적 마커로 확인되었다. 그러나 나쁜 예후를 의미하는 분류학적 표지자는 없었다.

[0087] 실시예 5. 기능적 마커 분석

[0088] 분류학적 마커와 동일한 방식으로 예후를 예측하기 위한 기능적 바이오마커를 조사하여 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0089]

좋은 예후의 기능적 마커			
KEGG 오소로그	정의	LDA 효과 크기	P value
K07497	putative transposase	3.488876	0.014721
K07483	transposase	3.340157	0.037935
나쁜 예후의 기능적 마커			
KEGG 오소로그	정의	LDA 효과 크기	P value
K01223	6-phospho-beta-glucosidase	2.861785	0.03848
K21064	5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino) uracil phosphatase	2.574397	0.038698
K02756	PTS system, beta-glucoside-specific IIB component	2.524706	0.010420
K03488	beta-glucoside operon transcriptional antiterminator	2.515448	0.006972
KEGG 모듈	정의	LDA 효과 크기	P value
M00271 ^c	PTS system, beta-glucoside-specific II component	3.210534	0.010931
M00632 ^c	Galactose degradation, Leloir pathway, galactose => alpha-D-glucose-1P	2.968915	0.010707
KEGG 경로	정의	LDA 효과 크기	P value
ko00500 ^c	Starch and sucrose metabolism	3.415623	0.017574
ko00052 ^d	Galactose metabolism	3.393237	0.042615

[0090] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) 오소로그(ortholog) K07497(추정 트랜스포사아제, putative transposase, LDA 효과 크기: 3.488876, $p = 0.015$) 및 K07483(트랜스포사아제, transposase, LDA 효과 크기: 3.340157, $p = 0.015$)이 우수한 기능적 바이오마커로 확인되었다.

[0091] 대조적으로, KEGG 오소로그 K01223(6-포스포-베타-글루코시다제, 6-phospho-beta-glucosidase, LDA 효과 크기: 2.861785, $p = 0.038$), K21064(5-아미노-6-(5-포스포-D-리비틸아미노)우라실 포스파타제, 5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino) uracil phosphatase, LDA 효과 크기 : 2.574397, $p = 0.038$), K02756(PTS 시스템, 베타-글루코시드 특이적 IIB 구성요소, PTS system, beta-glucoside-specific IIB component, LDA 효과 크기: 2.524706, $p = 0.010$) 및 K03488(베타-글루코시드 오페론 전사 항-터미네이터, beta-glucoside operon transcriptional antiterminator, LDA 효과 크기: 2.515448, $p = 0.007$)는 불량한 기능적 바이오마커로 확인되었다.

[0092] PICRUSt 알고리즘은 KEGG 모듈 M00271(PTS 시스템, 베타 글루코사이드 특이적 II 구성요소, PTS system, beta-

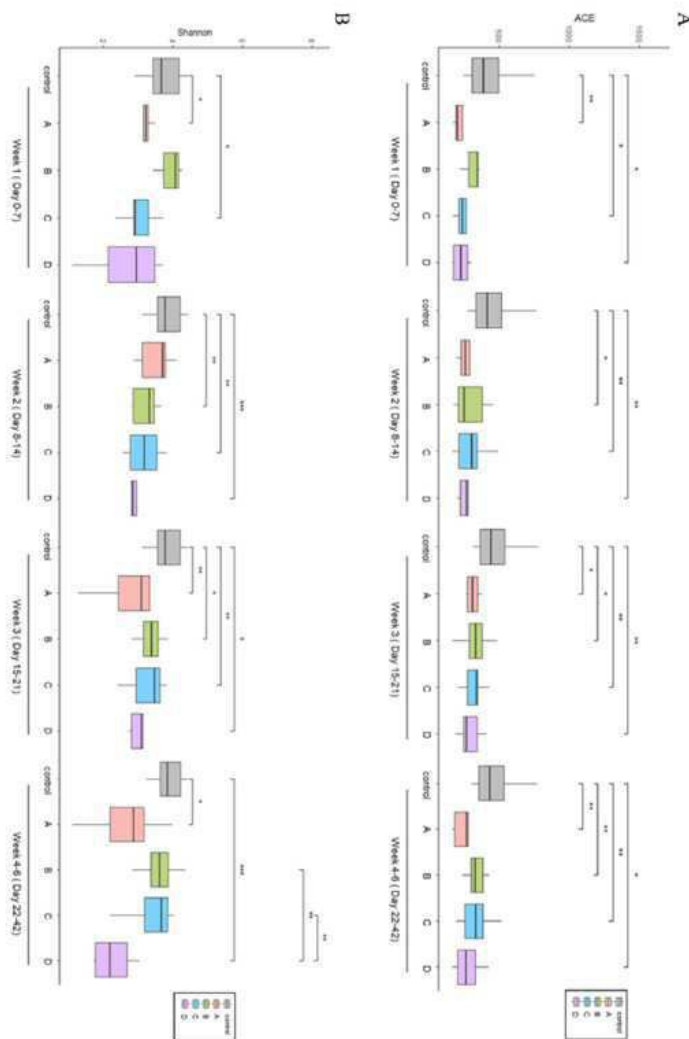
glucoside-specific II component, LDA 효과 크기: 3.210534, $p = 0.011$) 및 M00632(갈락토스 분해, Leloir 경로, 갈락토스 $\geq$ 알파-D-글루코스-1P, Galactose degradation, Leloir pathway, galactose $\Rightarrow$ alpha-D-glucose-1P, LDA 효과 크기: 2.968915, $p = 0.011$)이 불량한 예후 그룹에서 우세했다. MinPath 알고리즘을 사용한 경우 KEGG 경로 ko00500(전분/수크로스 대사, Starch and sucrose metabolism, LDA 효과 크기: 3.415623, $p = 0.018$) 및 ko00052(갈락토스 대사, Galactose metabolism, LDA 효과 크기: 3.393237, $p = 0.043$)가 불량한 예후군에서 풍부하게 검출되었다. 상기 LDA 효과 크기를 도 7에 나타내었다.

[0094] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

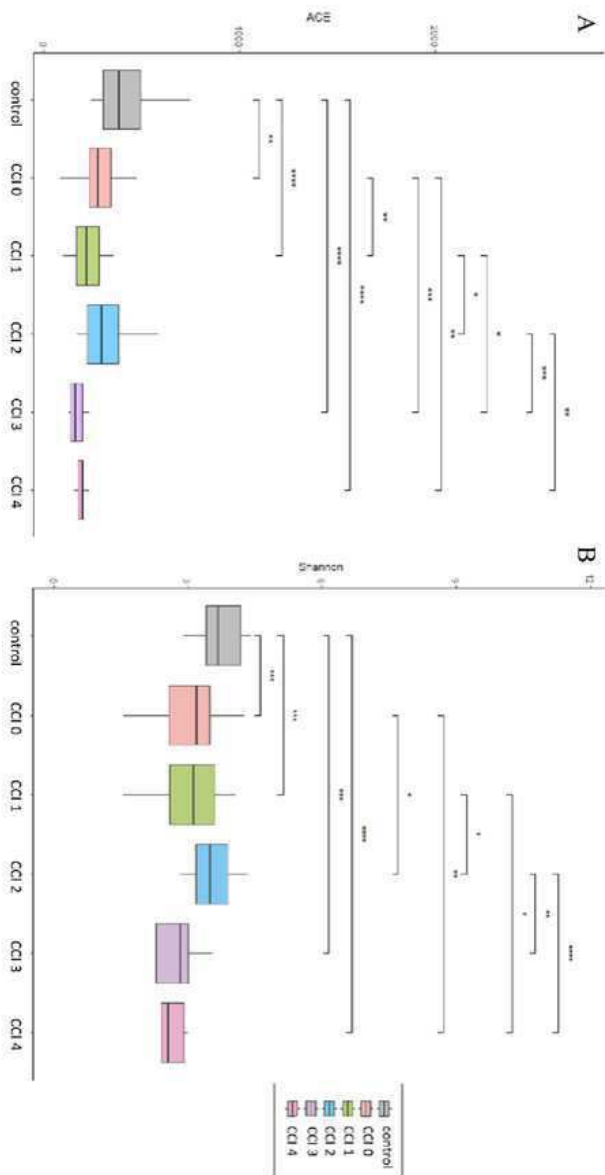
[0095] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

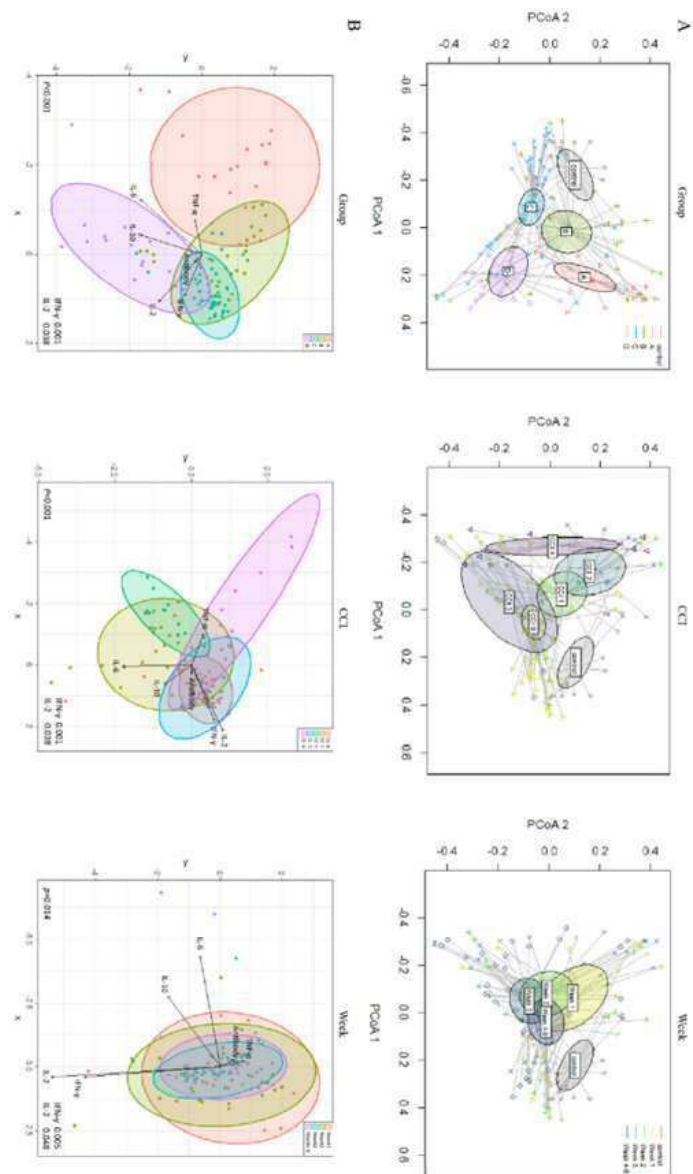
도면1



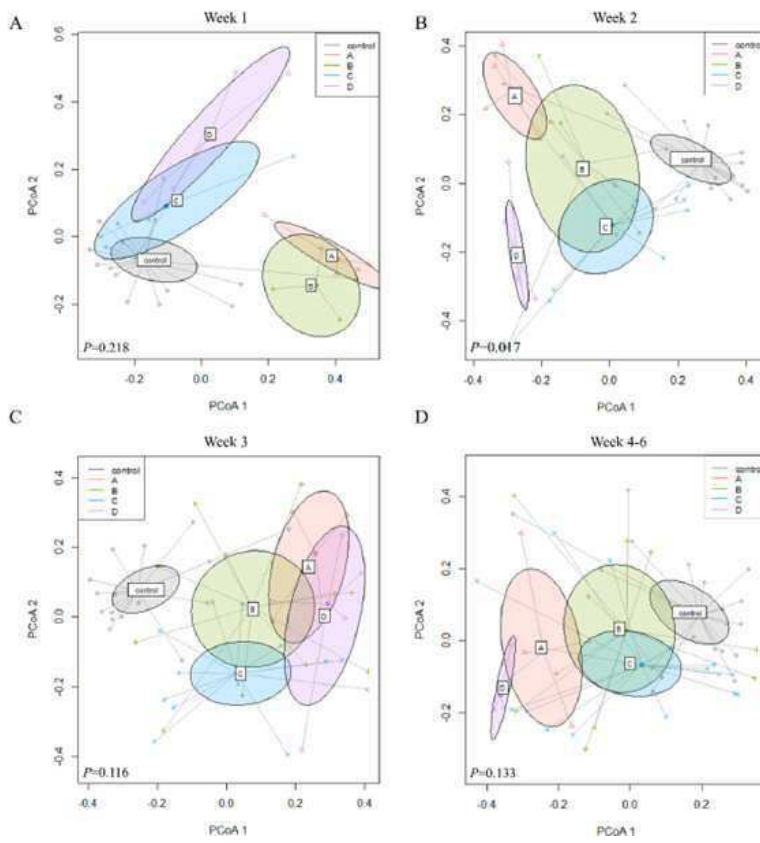
도면2



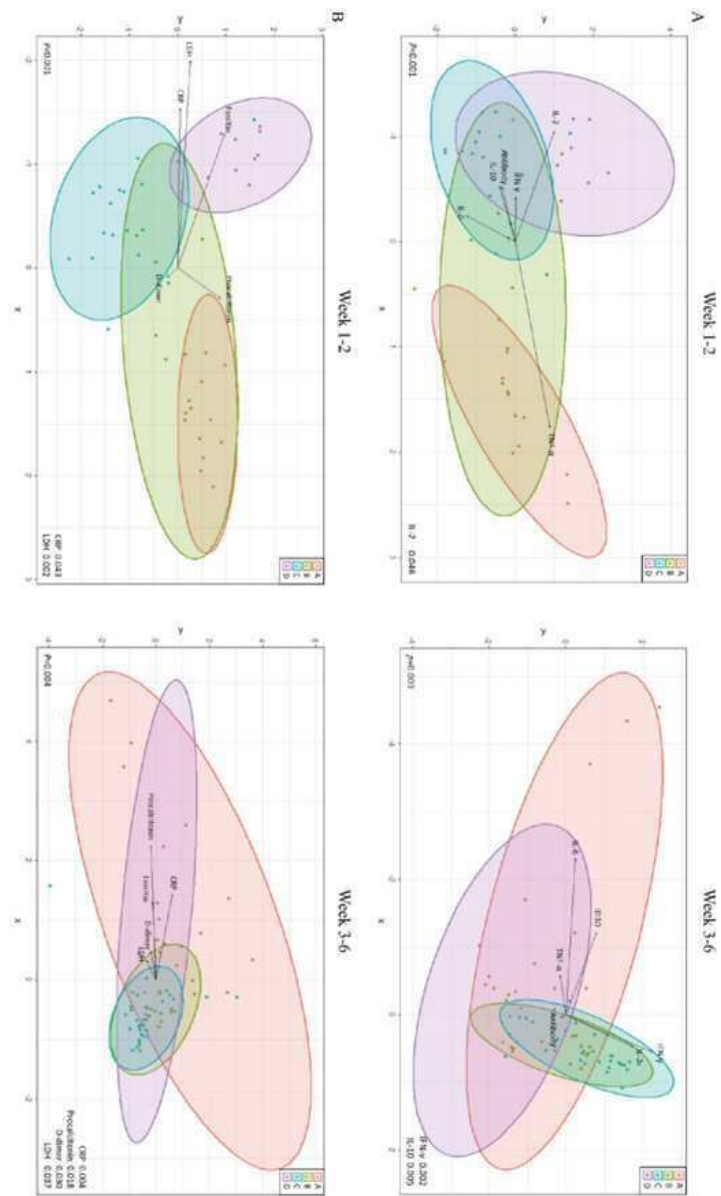
도면3



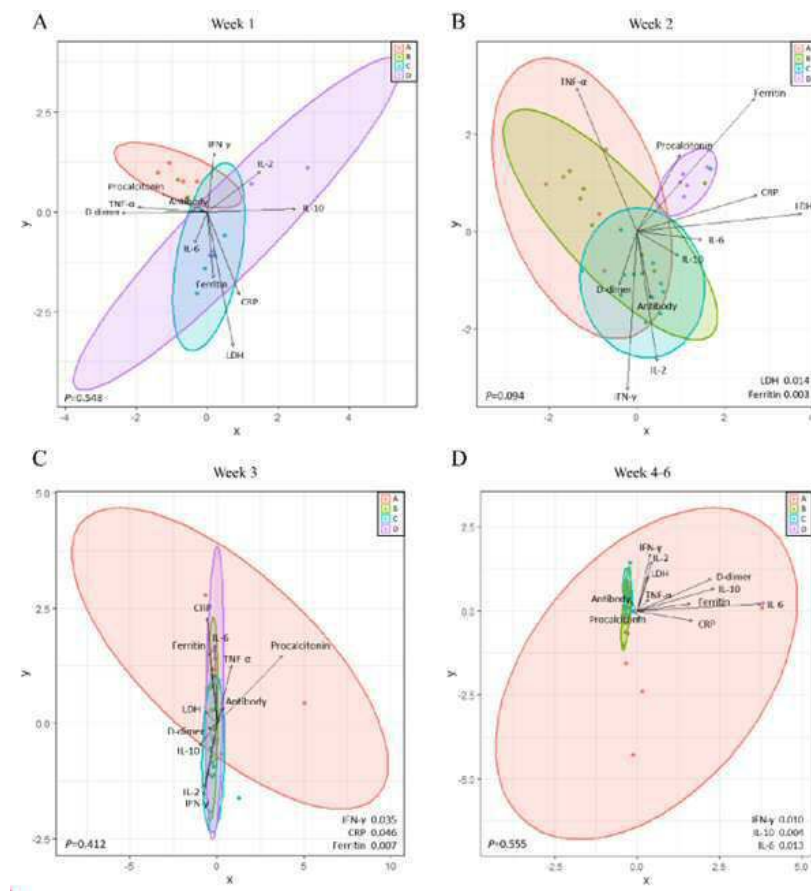
도면4



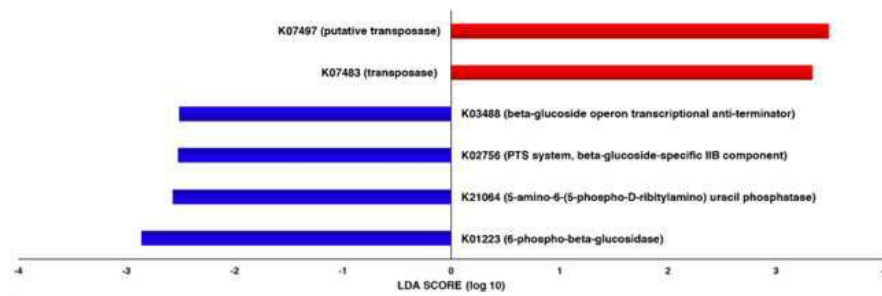
도면5



도면6



도면7



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.