



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0158036
(43) 공개일자 2022년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/48 (2006.01) A61K 38/49 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/484 (2013.01)
A61K 38/49 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7036798
(22) 출원일자(국제) 2021년03월24일
심사청구일자 2022년10월21일
(85) 번역문제출일자 2022년10월21일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/082715
(87) 국제공개번호 WO 2021/190561
국제공개일자 2021년09월30일
(30) 우선권주장
202010212922.4 2020년03월24일 중국(CN)

(71) 출원인
탈렌젠 인터내셔널 리미티드
중국 홍콩 999077 완차이 하버 로드 26 차이나 리
소시즈 빌딩 룸 2609
(72) 발명자
리 지난
중국 베이징 100089 하이디안 디스트릭트 시상환
노스 로드 19 빌딩 20 게이트 8 룸 101
(74) 대리인
하영욱

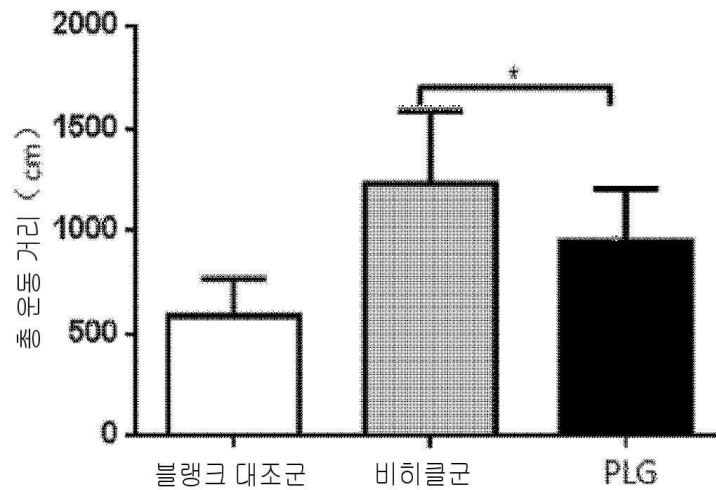
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **파킨슨병의 치료 방법 및 약물**

(57) 요약

피험자에게 치료 유효량의 플라스미노겐 활성화 경로의 성분을 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 예방 및 치료 방법을 제공하며; 상기 병증의 치료를 위한 플라스미노겐 활성화 경로의 성분을 포함하는 약물, 약학적 조성물, 제품, 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

파킨슨병의 예방 및 치료 방법으로서,

치료 유효량의 플라스미노겐 활성화 경로의 성분, 플라스미노겐을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노겐 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노겐을 간접적으로 활성화할 수 있는 화합물, 플라스미노겐 또는 플라스민의 활성을 모방하는 화합물, 플라스미노겐 또는 플라스미노겐 활성화제의 발현을 상향 조절할 수 있는 화합물, 플라스미노겐 유사체, 플라스민 유사체, tPA 또는 uPA 유사체 및 피브린 용해 억제제의 길항제로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 파킨슨병 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 플라스미노겐 활성화 경로의 성분은 플라스미노겐, 재조합 인간 플라스민, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐 및 플라스민의 하나 이상의 kringle 도메인 및 프로테아제 도메인을 포함하는 플라스미노겐 및 플라스민의 변이체 및 유사체, 미니플라스미노겐(mini-plasminogen), 미니플라스민(mini-plasmin), 마이크로플라스미노겐(micro-plasminogen), 마이크로플라스민(micro-plasmin), 델타-플라스미노겐, 델타-플라스민(delta-plasmin), 플라스미노겐 활성화제, tPA 및 uPA로부터 선택되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 피브린 용해 억제제의 길항제는 PAI-1, 보체 C1 억제제, α_2 항플라스민 또는 α_2 매크로글로불린의 억제제, 예를 들어 항체인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 파킨슨병 피험자에 대해 기억 기능 회복 촉진, 인지 능력 개선, 흑질 DTA 발현 촉진, 선조체 니슬소체 회복 촉진, 흑질 GLP-1R 발현 촉진, 흑질 TH 양성 세포 수 증가, 선조체 수초 복구 촉진, 뇌 조직 내 α -시누클레인 분해 촉진, 선조체 NF 발현 촉진, 축삭 손상 복구 촉진, 선조체 GFAP 발현 감소, 선조체 뉴런 손상 경감, BDNF의 형성을 위한 뇌 조직 내 Pro-BDNF의 절단 촉진, 우울 또는 불안 증상 완화 중 하나 이상의 작용을 갖는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 플라스미노겐인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라스미노겐은 인간 전장 플라스미노겐 또는 이의 보존적 치환 변이체인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라스미노겐은 서열번호 2와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖고, 플라스미노겐의 라이신 결합 활성화 또는 단백질 분해 활성을 여전히 갖는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라스미노젠은 서열번호 14와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 플라스미노젠의 단백질 분해 활성을 여전히 갖는 단백질을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라스미노젠은 Glu-플라스미노젠, Lys-플라스미노젠, 미니플라스미노젠, 마이크로플라스미노젠, 델타-플라스미노젠 또는 플라스미노젠의 단백질 분해 활성을 유지하는 이들의 변이체로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 플라스미노젠은 서열번호 2, 6, 8, 10, 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 2, 6, 8, 10, 12로 표시되는 아미노산 서열의 보존적 치환 변이체를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 하나 이상의 다른 치료 방법 또는 다른 약물과 병용되는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 다른 치료 방법은 세포 치료(줄기 세포 치료 포함) 및 물리 치료를 포함하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 다른 약물은 파킨슨병의 치료를 위한 다른 약물인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 비강 흡입, 에어로졸 흡입, 점비액, 점안액, 점이액, 정맥내, 복막내, 피하, 두개내, 척추강내, 동맥내(예를 들어, 경동맥을 통해) 또는 근육내에 의해 투여되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피험자에게 유효량의 플라스미노젠 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물, 예를 들어 플라스미노젠을 투여하여 임상 증상 및 징후를 개선하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 흔한 신경퇴행성질환으로, 노인들한테서 많이 볼 수 있고, 평균 발병 연령은 약 60세이며, 40세 미만에서 파킨슨병이 발병하는 젊은이는 드물다. 대부분의 파킨슨병 환자는 산발성 사례로 가족력이 있는 환자는 10% 미만이다. 파킨슨병의 가장 중요한 병리학적 변화는 중뇌 흑질 도파민(dopamine, DA)성 뉴런의 변성 사멸이며, 이로부터 선조체 DA 함량이 현저히 감소하여 질병을 유발한다. 이러한 병리학적 변화를 초래하는 정확한 병인은 아직 명확하지 않으며, 유전적 요인, 환경적 요인, 연령적 노화, 산화스트레스 등이 모두 PD 도파민성 뉴런의 변성 사멸 과정에 관여할 수 있다.

[0003] 파킨슨병의 두드러진 병리학적 변화는 중뇌 흑질 도파민(dopamine, DA)성 뉴런의 변성 사멸, 선조체 DA 함량의

현저한 감소 및 흑질 잔류 뉴런 세포질 내에서 호산성 봉입체, 즉 루이소체(Lewy body)의 발생이다. 도파민성 시스템 외에, 파킨슨병 환자의 비도파민성 시스템에도 유의한 손상이 있다. 예를 들어 Meynert 기저핵의 콜린 작동성 뉴런, 청반의 노르아드레날린성 뉴런, 뇌간 내 솔기핵의 5-세로토닌성 뉴런, 및 대뇌피질, 뇌간, 척수 및 말초 자율신경계의 뉴런이다. 선조체 도파민 함량의 현저한 감소는 파킨슨병 운동 증상의 발생과 밀접한 관련이 있다. 중뇌-변연계 및 중뇌-피질계 도파민 농도의 현저한 감소는 파킨슨병 환자의 지능 감퇴, 기분 장애 등과 밀접한 관련이 있다.

[0004] 파킨슨병은 서서히 발병되고 천천히 진행된다. 초기 증상은 통상적으로 한쪽의 팔다리가 떨리거나 움직임이 둔탁하여 반대쪽의 팔다리에 영향을 미친다. 임상적으로 주로 정지시 떨림, 운동 느림, 근육 긴장 및 자세 및 보행 장애로 나타난다. 최근 몇 년 동안 사람들은 우울증, 변비, 수면 장애와 같은 비운동 증상도 파킨슨병 환자의 흔한 주호소라는 것에 점점 더 많은 관심을 기울이고 있으며, 환자의 삶의 질에 대한 이의 영향은 심지어 운동 증상을 초과한다.

[0005] 약물 치료는 파킨슨병의 가장 중요한 치료 수단으로, 일정한 정도로 증상을 개선할 수 있지만, 질병의 진행을 막을 수 없으므로, 다른 치료 방법 및 약물을 찾아야 한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 연구는 플라스미노젠이 파킨슨병 피험자의 기억 기능 회복, 인지 능력 개선, 흑질 DTA 발현 촉진, 선조체 니슬소체 회복 촉진, 흑질 GLP-1R 발현 촉진, 흑질 TH 양성 세포 수 증가, 선조체 수초 복구 촉진, 뇌 조직 내 α-시누클레인 분해 촉진, 선조체 NF 발현 촉진, 축삭 손상 복구 촉진, 선조체 GFAP 발현 감소, 선조체 뉴런 손상 경감, BDNF의 형성을 위한 뇌 조직 내 Pro-BDNF의 절단 촉진, 우울 또는 불안 증상 개선을 촉진하여 파킨슨병의 치료를 위한 약물로 개발될 수 있는 잠재력을 갖는다는 것을 발견하였다.

[0007] 구체적으로, 본 발명은 하기와 같은 각 항에 관한 것이다.

[0008] 1. 일 양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 플라스미노젠 활성화 경로의 성분, 플라스미노젠을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노젠 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노젠을 간접적으로 활성화할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스민의 활성을 모방하는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스미노젠 활성화제의 발현을 상향 조절할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 유사체, 플라스민 유사체, tPA 또는 uPA 유사체 및 피브린 용해 억제제의 길항제로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 파킨슨병 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다.

[0009] 일 양태에서, 본 발명은 플라스미노젠 활성화 경로의 성분, 플라스미노젠을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노젠 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노젠을 간접적으로 활성화할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스민의 활성을 모방하는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스미노젠 활성화제의 발현을 상향 조절할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 유사체, 플라스민 유사체, tPA 또는 uPA 유사체 및 피브린 용해 억제제의 길항제로부터 선택되는 하나 이상의 화합물의 파킨슨병의 치료를 위한 약물의 제조에서의 용도에 관한 것이다.

[0010] 일 양태에서, 본 발명은 플라스미노젠 활성화 경로의 성분, 플라스미노젠을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노젠 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노젠을 간접적으로 활성화할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스민의 활성을 모방하는 화합물, 플라스미노젠 또는 플라스미노젠 활성화제의 발현을 상향 조절할 수 있는 화합물, 플라스미노젠 유사체, 플라스민 유사체, tPA 또는 uPA 유사체 및 피브린 용해 억제제의 길항제로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 파킨슨병의 치료를 위한 약물 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0011] 2. 1항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노젠 활성화 경로의 성분은 플라스미노젠, 재조합 인간 플라스민, Lys-플라스미노젠, Glu-플라스미노젠, 플라스민, 플라스미노젠 및 플라스민의 하나 이상의 kringle 도메인 및 프로테아제 도메인을 포함하는 플라스미노젠 및 플라스민의 변이체 및 유사체, 미니플라스미노젠(mini-plasminogen), 미니플라스민(mini-plasmin), 마이크로플라스미노젠(micro-plasminogen), 마이크로플라스민(micro-plasmin), 델타-플라스미노젠, 델타-플라스민(delta-plasmin), 플라스미노젠 활성화제, tPA 및 uPA로부터 선택된다.

[0012] 3. 1항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 피브린 용해 억제제의 길항제는 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 또는 α2 매크로글로불린의 억제제, 예를 들어 항체이다.

[0013] 4. 1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 파킨

슨병 피험자에 대해 기억 기능 회복 촉진, 인지 능력 개선, 흑질 DTA 발현 촉진, 선조체 니슬소체 회복 촉진, 흑질 GLP-1R 발현 촉진, 흑질 TH 양성 세포 수 증가, 선조체 수초 복구 촉진, 뇌 조직 내 α -시누클레인 분해 촉진, 선조체 NF 발현 촉진, 축삭 손상 복구 촉진, 선조체 GFAP 발현 감소, 선조체 뉴런 손상 경감, BDNF의 형성을 위한 뇌 조직 내 Pro-BDNF의 절단 촉진, 우울 또는 불안 증상 완화로부터 선택되는 하나 이상의 작용을 갖는다.

- [0014] 5. 1항 내지 4항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 플라스미노겐이다.
- [0015] 6. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노겐은 인간 전장 플라스미노겐 또는 이의 보존적 치환 변이체이다.
- [0016] 7. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖고, 플라스미노겐의 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성을 여전히 갖는다.
- [0017] 8. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 14와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 아미노산 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열, 및 플라스미노겐의 단백질 분해 활성을 여전히 갖는 단백질을 포함한다.
- [0018] 9. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노겐은 Glu-플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, 미니플라스미노겐, 마이크로플라스미노겐, 델타-플라스미노겐 또는 플라스미노겐의 단백질 분해 활성을 유지하는 이들의 변이체로부터 선택된다.
- [0019] 10. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10, 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 서열번호 2, 6, 8, 10, 12로 표시되는 아미노산 서열의 보존적 치환 변이체를 포함한다.
- [0020] 11. 1항 내지 10항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 하나 이상의 다른 치료 방법 또는 다른 약물과 병용된다.
- [0021] 12. 11항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 다른 치료 방법은 세포 치료(줄기 세포 치료 포함) 및 물리 치료를 포함한다.
- [0022] 13. 11항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 다른 약물은 파킨슨병의 치료를 위한 다른 약물이다.
- [0023] 14. 1항 내지 13항 중 어느 한 항에 따른 방법, 용도, 약물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 비강 흡입, 에어로졸 흡입, 점비액, 점안액, 점이액, 정맥내, 복막내, 피하, 두개내, 척추강내, 동맥내(예를 들어, 경동맥을 통해) 또는 근육내에 의해 투여된다. 본 발명의 상기 어느 하나의 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖고, 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12의 기초상에서 1 ~ 100, 1 ~ 90, 1 ~ 80, 1 ~ 70, 1 ~ 60, 1 ~ 50, 1 ~ 45, 1 ~ 40, 1 ~ 35, 1 ~ 30, 1 ~ 25, 1 ~ 20, 1 ~ 15, 1 ~ 10, 1 ~ 5, 1 ~ 4, 1 ~ 3, 1 ~ 2, 1개의 아미노산을 첨가, 삭제 및/또는 치환하고, 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 갖는 단백질이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 플라스미노겐 활성 단편을 포함하고, 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 갖는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 Glu-플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, 미니플라스미노겐, 마이크로플라스미노겐, 델타-플라스미노겐 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 유지하는 이들의 변이체로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 천연 또는 합성 인간 플라스미노겐, 또는 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 유지하는 이들의 변이체 또는 단편이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 영양류 동물 또는 설치류 동물로부터 유래되는 인간 플라스미노겐 동원체 또는 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 유지하는 이들의 변이체 또는 단편이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐의 아미노산은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시된 바와 같다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 인간 천연 플라스미노겐이다.

- [0025] 일부 실시형태에서, 상기 피험자는 인간이다. 일부 실시형태에서, 상기 피험자는 플라스미노겐이 결핍하거나 결핍되어 있다. 일부 실시형태에서, 상기 결핍 또는 결실은 선천적, 이차적 및/또는 국소적이다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 벡터 및 전술한 방법에 사용되는 플라스미노겐을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 예방 또는 치료 키트일 수 있는 바, (i) 전술한 방법에 사용되는 플라스미노겐 및 (ii) 상기 피험자에게 상기 플라스미노겐을 전달하기 위한 수단(means)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 수단은 주사기 또는 바이알이다. 일부 실시형태에서, 상기 키트는 라벨 또는 사용설명서를 더 포함하고, 상기 라벨 또는 사용설명서는 전술한 어느 하나의 방법을 구현하기 위해 상기 플라스미노겐을 상기 피험자에게 투여하도록 지시한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 상기 제품은 라벨을 포함하는 용기; 및 (i) 전술한 방법에 사용되는 플라스미노겐 또는 플라스미노겐을 포함하는 약학적 조성물을 포함하고, 여기서 상기 라벨은 전술한 어느 하나의 방법을 구현하기 위해 상기 플라스미노겐 또는 조성물을 상기 피험자에게 투여하도록 지시한다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 상기 키트 또는 제품은 하나 이상의 다른 수단 또는 용기를 더 포함하고, 상기 수단 또는 용기에는 다른 약물이 포함된다.
- [0029] 전술한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 전신 또는 국소 투여되고, 바람직하게는 정맥내, 근육내, 피하에 의해 플라스미노겐을 투여하여 치료한다. 전술한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 적절한 폴리캡티드 벡터 또는 안정화제와 병용된다. 전술한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 매일 0.0001 ~ 2000 mg/kg, 0.001 ~ 800 mg/kg, 0.01 ~ 600 mg/kg, 0.1 ~ 400 mg/kg, 1 ~ 200 mg/kg, 1 ~ 100 mg/kg, 10 ~ 100 mg/kg(체중 킬로그램당 계산) 또는 0.0001 ~ 2000mg/cm², 0.001 ~ 800 mg/cm², 0.01 ~ 600 mg/cm², 0.1 ~ 400 mg/cm², 1 ~ 200 mg/cm², 1 ~ 100 mg/cm², 10 ~ 100 mg/cm²(체표면적의 제곱센티미터당 계산)의 용량으로 투여되고, 바람직하게는 적어도 1회 반복되며, 바람직하게는 적어도 매일 투여된다.
- [0030] 본 발명은 본 발명의 실시형태에 속하는 기술특징의 모든 조합을 명시적으로 포함하고, 이러한 조합된 기술적 해결수단은 상기 기술적 해결수단이 단독으로 명시적으로 공개된 것처럼 본 발명에서 명시적으로 공개되었다. 또한, 본 발명은 각 실시형태 및 이들의 구성요소 간의 조합을 명시적으로 포함하고, 상기 조합된 기술적 해결수단은 본문에서 명시적으로 공개된다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 총 운동 거리의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 실험 기간에 일정한 거리를 운동하고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 총 운동 거리는 비히클 대조군보다 유의하게 짧으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 P<0.05를 나타냄), 플라스미노겐 투여군 마우스의 총 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- 도 2는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 휴식 시간 백분율의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 휴식 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 휴식 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 크며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 P<0.01을 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 휴식 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- 도 3은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 운동 거리의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 운동 거리를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 운동 거리는 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고(P=0.05), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- 도 4는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 운동 거리 백분율의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군은 일정한 경계 영역 운동 거리 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 운동 거리 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 크며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 P<0.01을 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 운동 거리 백분율은 블랭크 대조군

에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 5는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 저속 운동 시간 백분율의 계산 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 저속 운동 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 저속 운동 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄); 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 저속 운동 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 6은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 시간 백분율의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 시간 백분율은 비히클 대조군보다 높으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고($P = 0.06$), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성 행동 수준을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 7은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 경계 영역 진입 횟수의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 진입 횟수를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 진입 횟수는 비히클군보다 유의하게 적으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄), 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 진입 횟수는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 8은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 중심 영역 운동 거리의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 운동 거리를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리는 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 9는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 중심 영역 운동 거리 백분율의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 운동 거리 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리 백분율은 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 10은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 중심 영역 최대 운동 속도의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 최대 운동 속도를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 최대 운동 속도는 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 중심 영역 최대 운동 속도는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 11은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 중심 영역 시간 백분율의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 진입 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고($P = 0.06$); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 진입 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 12는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 중심 영역 진입 횟수의 통계적 결과를 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 진입 횟수를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 진입 횟수는 비히클 대조군보다 유의하게 적으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 진입 횟수는 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 13은 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 오픈 필드 실험에서 운동 궤적의 대표적인

사진을 도시한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 중심 영역 활동이 거의 없고; 플라스미노겐 투여군 마우스는 비히클 대조군에 비해 중심 영역 활동이 유의하게 감소된 경향을 보이며, 블랭크 대조군 마우스에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

도 14의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 DTA 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 대조군이며, C는 플라스미노겐 투여군이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 흑질 도파민 뉴런은 일정량의 DTA(화살표로 표시)를 발현하고, 비히클군 마우스의 흑질 DTA의 발현량은 블랭크 대조군보다 낮지만, 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 DTA의 발현량은 비히클군보다 높으며, 블랭크 대조군에 근접한다. 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 DTA의 발현을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 15의 A ~ D는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 선조체 크레실 바이올렛 염색 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 대조군이며, C는 플라스미노겐 투여군이고, D는 선조체 니슬소체의 개수 분석 결과이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 선조체 뉴런에는 일정한 개수의 니슬소체(화살표로 표시)가 존재하고; 비히클 대조군 마우스의 선조체 뉴런의 니슬소체 개수는 블랭크 대조군보다 유의하게 많으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고($P=0.085$); 플라스미노겐 투여군 마우스의 선조체 뉴런의 니슬소체 개수는 블랭크 대조군과 현저한 차이가 없지만, 비히클 대조군보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하다(*는 $P<0.05$ 를 나타냄). 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 니슬소체의 개수에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

도 16의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 크레실 바이올렛 염색 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 대조군이며, C는 플라스미노겐 투여군이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 흑질에는 일정량의 니슬소체(화살표로 표시)가 있고; 비히클 대조군 마우스의 흑질 내 니슬소체 수는 블랭크 대조군보다 적으며; 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 니슬소체 수는 비히클군보다 높다. 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 니슬소체 회복을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 17의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 GLP-1R 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 비히클 PBS군이고, B는 플라스미노겐 투여군이며, C는 평균 광학 밀도의 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 GLP-1R의 발현량(화살표로 표시)은 비히클 PBS 대조군보다 유의하게 많고, 통계학적 차이가 현저하다(*는 $P<0.05$ 를 나타냄). 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 GLP-1R의 발현을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 18의 A ~ D는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 TH 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 PBS군이며, C는 플라스미노겐 투여군이고, D는 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 흑질에는 일정량의 TH 양성 세포(화살표로 표시)가 존재하고, 비히클군 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포 수는 감소되며, 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포 수는 비히클군보다 유의하게 높다. 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포를 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

도 19의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 Iba-1 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 PBS군이며, C는 플라스미노겐 투여군이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 흑질에는 일정량의 미세아교세포(화살표로 표시)가 존재하고, 비히클군 마우스의 흑질 내 미세아교세포 수는 블랭크 대조군보다 높으며, 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 내 미세아교세포 수는 비히클군보다 유의하게 낮고, 블랭크 대조군에 근접한다. 상기 결과에 따르면 플라스미노겐은 파킨슨 모델 마우스의 흑질 미세아교세포 회복을 촉진할 수 있다.

도 20의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 선조체 LFB 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클 PBS군이며, C는 플라스미노겐 투여군이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 선조체에는 일정량의 수초가 존재하고, 비히클군 마우스의 선조체 수초 수는 블랭크 대조군보다 적으며, 플라스미노겐 투여군 마우스의 선조체 수초 수는 비히클군보다 유의하게 높다. 상기 결과에 따르면 플라스미노겐은 파킨슨 모델 마우스의 선조체 수초를 회복시킬 수 있다.

도 21의 A ~ D는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 흑질 α -시누클레인(α -synuclein) 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클군이며, C는 플라스미노겐 투여군이고, D는 평균 광학 밀도의 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 흑질에는 소량의 α -시누

클레인만 있고; 비히클군 마우스의 흑질 α-시누클레인의 양은 블랭크 대조군보다 유의하게 높으며(*는 P<0.05를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 α-시누클레인의 양은 비히클군보다 유의하게 낮고, 통계학적 차이가 현저하며(*는 P<0.05를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 흑질 α-시누클레인의 양은 블랭크 대조군에 근접한다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 α-시누클레인의 발현을 감소시키고 신경 손상 변성을 개선할 수 있음을 나타낸다.

도 22의 A-D는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 선조체 NF 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클군이며, C는 플라스미노겐 투여군이고, D는 평균 광학 밀도의 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 선조체에는 일정량의 NF(화살표로 표시)가 있고; 비히클군 마우스의 선조체 NF의 양은 블랭크 대조군보다 낮으며; 플라스미노겐 투여군 마우스의 선조체 내 NF의 양은 비히클군보다 유의하게 높고, 통계학적 차이가 매우 현저하다(**는 P<0.01을 나타냄). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 NF 발현의 회복을 촉진하고 파킨슨 선조체 축삭 손상을 개선할 수 있음을 나타낸다.

도 23의 A ~ C는 플라스미노겐을 14일 동안 투여한 후 파킨슨 모델 마우스의 선조체 GFAP 면역조직화학적 결과를 도시한다. A는 블랭크 대조군이고, B는 비히클군이며, C는 플라스미노겐 투여군이다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스의 선조체에는 소량의 GFAP 발현(화살표로 표시)이 있고, 비히클군 마우스의 선조체 GFAP의 발현은 블랭크 대조군보다 유의하게 높으며; 플라스미노겐 투여군 마우스의 선조체 GFAP의 발현은 비히클군보다 낮다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 GFAP의 발현을 감소시키고 선조체 손상을 경감시킬 수 있음을 나타낸다.

도 24의 A ~ D는 마우스의 뇌 균질물에서 α-시누클레인에 대한 플라스미노겐의 작용 결과를 도시한다. A는 Tricine-page이고, B, C, D는 각각 α-시누클레인, 중합체 a, 중합체 b 밴드 스캐닝 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고(***는 P<0.001을 나타냄), 이의 중합체 a, b의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮으며(**는 P<0.01을 나타내고, ***는 P<0.001을 나타냄); 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고(***는 P<0.001을 나타냄), 이의 중합체 a, b의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮다(*는 P<0.05를 나타내고, **는 P<0.01을 나타냄). 이는 파킨슨 모델 마우스 및 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐이 인간 α-시누클레인 및 이의 중합체의 분해를 효과적으로 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 25의 A ~ C는 마우스의 뇌 균질물에서 재조합 인간 α-시누클레인에 대한 플라스미노겐의 작용 결과를 도시한다. A는 Western-blotting 다이어그램이고, B, C는 각각 α-시누클레인, 중합체 밴드 스캐닝 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고(**는 P<0.01을 나타냄), 이의 중합체의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮으며(***는 P<0.001을 나타냄); 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고(**는 P<0.01을 나타냄), 이의 중합체의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮다(***는 P<0.001을 나타냄). 이는 파킨슨 모델 마우스 및 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노겐이 재조합 인간 α-시누클레인 및 이의 중합체의 분해를 효과적으로 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 26의 A ~ B는 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 재조합 인간 Pro-BDNF에 대한 플라스미노겐의 작용을 도시하고, A는 SDS-PAGE 이미지이며, B는 SDS-PAGE 밴드 정량적 분석 결과이다. 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 플라스미노겐 투여군의 Pro-BDNF의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하다(***는 P<0.001을 나타냄). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 재조합 인간 Pro-BDNF의 절단을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

도 27의 A ~ C는 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 재조합 인간 Pro-BDNF에 대한 플라스미노겐의 작용을 도시한다. A는 Western blot 이미지이고, B는 Western blot의 Pro-BDNF 밴드 광학 밀도(OD) 값의 분석 결과이며, C는 Western blot의 BDNF 밴드 광학 밀도(OD) 값의 분석 결과이다. 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 플라스미노겐 투여군의 Pro-BDNF의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 현저하며(*는 P<0.05를 나타내고, ***는 P<0.001을 나타냄); 플라스미노겐 투여군 BDNF의 양은 비히클 대조군보다 유의하게 높고, 차이가 매우 현저하다. 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 재조합 인간 Pro-BDNF의 절단 및 성숙한 BDNF의 형성을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 피브린 용해 시스템(Fibrinolytic system)은 섬유소 용해 시스템이라고도 하며, 피브린 용해(섬유소 용해) 과정에 관여하는 일련의 화학 물질로 구성된 시스템으로, 주로 플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐 활성화제, 피브린 용해 억제제를 포함한다. 플라스미노겐 활성화제는 조직형 플라스미노겐 활성화제(t-PA) 및 유로키나아제형 플라스미노겐 활성화제(u-PA)를 포함한다. t-PA는 혈관 내피 세포로 합성된 세린 프로테아제이다. t-PA는 플라스미노겐을 활성화하고, 이 과정은 주로 피브린에서 수행되며; 유로키나아제형 플라스미노겐 활성화제(u-PA)는 신세뇨관 상피 세포 및 혈관 내피 세포에서 생성되고, 보조 인자로 피브린을 사용하지 않고도 플라스미노겐을 직접적으로 활성화할 수 있다. 플라스미노겐(PLG)은 간에서 합성되고, 혈액이 응고되는 경우 PLG는 피브린 네트워크에 대량으로 흡착되며, t-PA 또는 u-PA의 작용하에 플라스민으로 활성화되어 피브린 용해를 촉진한다. 플라스민(PL)은 세린 프로테아제로, 이의 작용은 피브린 및 피브리노겐을 분해하고; 다양한 혈액 응고 인자 V, VIII, X, VII, II 등을 가수분해하며; 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시키고; 보체를 가수분해하는 등이다. 피브린 용해 억제제는 플라스미노겐 활성화제 억제제(PAI) 및 α_2 항플라스민(α_2 -AP)을 포함한다. PAI는 주로 PAI-1 및 PAI-2의 두 가지 형태가 있는데, 이는 t-PA에 1:1의 비율로 특이적으로 결합되어 이를 불활성화시키는 동시에 PLG를 활성화시킬 수 있다. α_2 -AP는 간에서 합성되고, PL과 1:1의 비율로 결합하여 착물을 형성하여 PL 활성을 억제하며; FXIII는 α_2 -AP를 피브린과 공유 결합시켜 PL 작용에 대한 피브린의 민감도를 감소시킨다. 체내에서 피브린 용해 시스템 활성을 억제하는 물질은 PAI-1, 보체 C1 억제제; α_2 항플라스민; α_2 마크로글로불린이다.
- [0033] 본 발명의 용어 “플라스미노겐 활성화 경로의 성분”은,
- [0034] 1. 플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 마이크로플라스미노겐(micro-plasminogen), 델타-플라스미노겐; 이들의 변이체 또는 유사체;
- [0035] 2. 플라스민 및 이들의 변이체 또는 유사체; 및
- [0036] 3. 플라스미노겐 활성화제, 예를 들어 tPA, uPA 및 하나 이상의 tPA 또는 uPA의 도메인(예를 들어, 하나 이상의 kringle 도메인 및 단백질 분해 도메인)을 포함하는 tPA 또는 uPA의 변이체 및 유사체를 포함한다.
- [0037] 상기 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA의 “변이체”는 천연적으로 존재하는 모든 인간 유전 변이체 및 이러한 단백질의 다른 포유동물 형태, 및 예를 들어 1 ~ 100, 1 ~ 90, 1 ~ 80, 1 ~ 70, 1 ~ 60, 1 ~ 50, 1 ~ 45, 1 ~ 40, 1 ~ 35, 1 ~ 30, 1 ~ 25, 1 ~ 20, 1 ~ 15, 1 ~ 10, 1 ~ 5, 1 ~ 4, 1 ~ 3, 1 ~ 2, 1개의 아미노산의 첨가, 삭제 및/또는 치환을 통해 플라스미노겐, 플라스민, tPA 또는 uPA 활성을 여전히 갖는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA의 “변이체”는 예를 들어 1 ~ 100, 1 ~ 90, 1 ~ 80, 1 ~ 70, 1 ~ 60, 1 ~ 50, 1 ~ 45, 1 ~ 40, 1 ~ 35, 1 ~ 30, 1 ~ 25, 1 ~ 20, 1 ~ 15, 1 ~ 10, 1 ~ 5, 1 ~ 4, 1 ~ 3, 1 ~ 2, 1개의 보존적 아미노산 치환을 통해 획득된 이러한 단백질의 돌연변이체를 포함한다.
- [0038] 본 발명의 “플라스미노겐 변이체”는 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖고, 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 갖는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 “플라스미노겐 변이체”는 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12의 기초상에서 1 ~ 100, 1 ~ 90, 1 ~ 80, 1 ~ 70, 1 ~ 60, 1 ~ 50, 1 ~ 45, 1 ~ 40, 1 ~ 35, 1 ~ 30, 1 ~ 25, 1 ~ 20, 1 ~ 15, 1 ~ 10, 1 ~ 5, 1 ~ 4, 1 ~ 3, 1 ~ 2, 1개의 아미노산을 첨가, 삭제 및/또는 치환하고, 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 여전히 갖는 단백질일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 플라스미노겐 변이체는 천연적으로 존재하는 모든 인간 유전 변이체 및 이러한 단백질의 다른 포유동물 형태, 및 1 ~ 100, 1 ~ 90, 1 ~ 80, 1 ~ 70, 1 ~ 60, 1 ~ 50, 1 ~ 45, 1 ~ 40, 1 ~ 35, 1 ~ 30, 1 ~ 25, 1 ~ 20, 1 ~ 15, 1 ~ 10, 1 ~ 5, 1 ~ 4, 1 ~ 3, 1 ~ 2, 1개의 보존적 아미노산 치환을 통해 획득된 이러한 단백질의 돌연변이체를 포함한다.
- [0039] 본 발명의 플라스미노겐은 영장류 동물 또는 설치류 동물로부터 유래되는 인간 플라스미노겐 동원체 또는 라이신 결합 활성 또는 단백질 분해 활성과 같은 플라스미노겐 활성을 유지하는 이들의 변이체, 예를 들어 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시되는 플라스미노겐, 예를 들어 서열번호 2로 표시되는 인간 천연 플라스미노겐일 수 있다.
- [0040] 상기 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA의 “유사체”는 각각 플라스미노겐, 플라스민, tPA 또는 uPA와 기본적으로 유사한 작용을 제공하는 화합물을 포함한다.
- [0041] 상기 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA의 “변이체” 및 “유사체”는 하나 이상의 도메인(예를 들어, 하나

이상의 kringle 도메인 및 단백질 분해 도메인)을 포함하는 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA의 “변이체” 및 “유사체”를 포함한다. 예를 들어, 플라스미노겐의 “변이체” 및 “유사체”는 하나 이상의 플라스미노겐 도메인(예를 들어, 하나 이상의 kringle 도메인 및 단백질 분해 도메인)을 포함하는 플라스미노겐 변이체 및 유사체, 예를 들어 미니플라스미노겐(mini-plasminogen)을 포함한다. 플라스민의 “변이체” 및 “유사체”는 하나 이상의 플라스민 도메인(예를 들어, 하나 이상의 kringle 도메인 및 단백질 분해 도메인)을 포함하는 플라스민 “변이체” 및 “유사체”, 예를 들어 미니플라스민(mini-plasmin) 및 δ-플라스민(delta-plasmin)을 포함한다.

[0042] 상기 플라스미노겐, 플라스민, tPA 또는 uPA의 “변이체” 또는 “유사체”가 각각 플라스미노겐, 플라스민, tPA 또는 uPA의 활성을 갖는지 여부, 또는 각각 플라스미노겐, 플라스민, tPA 또는 uPA와 기본적으로 유사한 작용을 제공하는지 여부는 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 검출될 수 있고, 예를 들어 효소측정법(enzymography), ELISA(효소 결합 면역 흡착 측정) 및 FACS(형광 활성 세포 분류 방법)에 기반하여 활성화된 플라스민 활성 수준을 통해 측정되며, 예를 들어 하기 문헌에 기재된 방법을 참조하여 측정할 수 있다. Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C, Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P.and Ny, T.(1999).Ovulation inplasminogen-deficient mice.Endocrinology 140, 5030-5035; Silverstein RL,Leung LL,Harpel PC,Nachman RL(November 1984)."Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen.Modulation of activation by tissue activator".J.Clin.Invest.74(5):1625-33; Gravanis I,Tsirka SE(February2008)."Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke".Expert Opinion on Therapeutic Targets.12(2):159-70; Geiger M,Huber K,Wojta J,Stingl L,Espana F,Griffin JH,Binder BR(Aug 1989)."Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo".Blood.74(2):722-8.

[0043] 본 발명의 일부 실시형태에서, 본 발명의 “플라스미노겐 활성화 경로의 성분”은 플라스미노겐이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 인간 전장 플라스미노겐 또는 플라스미노겐 활성화(예를 들어, 이들의 라이신 결합 활성화 및 단백질 분해 활성화)를 유지하는 이들의 보존적 치환 변이체이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 Glu-플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, 미니플라스미노겐, 마이크로플라스미노겐, 델타-플라스미노겐 또는 플라스미노겐 활성화(예를 들어, 이들의 라이신 결합 활성화 또는 단백질 분해 활성화)를 유지하는 이들의 변이체로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 천연 또는 합성 인간 플라스미노겐, 또는 플라스미노겐 활성화(예를 들어, 이들의 라이신 결합 활성화 또는 단백질 분해 활성화)를 여전히 유지하는 이들의 보존적 치환 변이체 또는 이들의 단편이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 영장류 동물 또는 설치류 동물로부터 유래되는 인간 플라스미노겐 동원체 또는 플라스미노겐 활성을 여전히 유지하는 이들의 보존적 돌연변이체 또는 이들의 단편이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시되는 아미노산 서열의 보존적 치환 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐의 아미노산은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시된 바와 같다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2, 6, 8, 10 또는 12로 표시되는 플라스미노겐의 보존적 치환 변이체이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 인간 천연 플라스미노겐 또는 이의 보존적 돌연변이체이다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 서열번호 2로 표시되는 인간 천연 플라스미노겐 또는 이의 보존적 치환 변이체이다.

[0044] “플라스미노겐을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노겐 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노겐을 간접적으로 활성화할 수 있는 화합물”은 플라스미노겐을 직접적으로 활성화하거나 또는 플라스미노겐 활성화 경로의 업스트림 성분을 활성화하여 플라스미노겐을 간접적으로 활성화할 수 있는 임의의 화합물을 의미하며, 예를 들어, tPA, uPA, 스트렙토키나아제(streptokinase), 사루플라제(saruplase), 알테플라제(alteplase), 레테플라제(reteplase), 테넥테플라제(tenecteplase), 아니스트레플라제(anistreplase), 몬테플라제(montepulse), 라노테플라제(lanoteplase), 파미테플라제(pamiteplase), 스태필로키나아제(staphylokinase)이다.

[0045] 본 발명의 “피브린 용해 억제제의 길항제”는 피브린 용해 억제제의 작용을 길항, 약화, 차단 및 방지하는 화합물이다. 상기 피브린 용해 억제제는 예를 들어 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 및 α2 마크로글로불린이다. 상기 길항제는 예를 들어 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 또는 α2 마크로글로불린의 항체, 또는 예를 들어 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 또는 α2 마크로글로불린 발현을 차단 또는 하향 조절하는 안티센스 RNA 또는 작은 RNA, 또는 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 또는 α2 마크로글로불린의 결합 부위를 점유하지만 PAI-1, 보체 C1 억제제, α2 항플라스민 또는 α2 마크로글로불린의 기능이 없는 화합물, 또

는 PAI-1, 보체 C1 억제제, $\alpha 2$ 항플라스민 또는 $\alpha 2$ 마크로글로불린의 결합 도메인 및/또는 활성 도메인을 차단하는 화합물이다.

[0046] 플라스민은 플라스미노겐 활성화 시스템(PA 시스템)의 핵심 성분이다. 이는 피브린, 젤라틴(gelatin), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 및 프로테오글리칸(proteoglycan)을 포함하여 세포의 매트릭스(ECM)의 여러 성분을 가수분해할 수 있는 광범위 스펙트럼의 프로테아제이다. 또한, 플라스민은 일부 메탈로프로테이나제 전구체(pro-MMPs)를 활성화하여 활성을 갖는 메탈로프로테이나제(MMPs)를 형성할 수 있다. 따라서 플라스민은 세포와 단백질 분해 작용의 하나의 중요한 업스트림 조절자로 간주된다. 플라스민은 플라스미노겐이 조직형 플라스미노겐 활성화제(tPA) 또는 유로키나아제형 플라스미노겐 활성화제(uPA)의 두 가지 생리학적 PAs를 통해 단백질 분해되어 형성된 것이다. 혈장 및 다른 체액에서 플라스미노겐의 상대적 수준이 비교적 높기 때문에 전통적으로 PA 시스템의 조절은 주로 PAs의 합성 및 활성 수준을 통해 구현되는 것으로 간주된다. PA 시스템 성분의 합성은 호르몬, 성장 인자 및 사이토카인과 같은 상이한 요인에 의해 엄격하게 조절된다. 또한, 플라스민과 PAs의 특정 생리학적 억제제도 있다. 또한, 플라스민과 PAs의 특정 생리학적 억제제도 있다. 플라스민의 주요 억제제는 $\alpha 2$ -항플라스민($\alpha 2$ -antiplasmin)이다. PAs의 활성은 동시에 uPA 및 tPA의 플라스미노겐 활성화제 억제제-1(PAI-1)에 의해 억제되고, 주로 uPA를 억제하는 플라스미노겐 활성화제 억제제-2(PAI-2)에 의해 조절된다. 일부 세포 표면에는 직접적인 가수분해 활성을 갖는 uPA 특이적 세포 표면 수용체(uPAR)가 있다.

[0047] 플라스미노겐은 하나의 단일 사슬 당단백질로 791개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 약 92 kDa이다. 플라스미노겐은 주로 간에서 합성되고 세포외액에 대량으로 존재한다. 혈장 내 플라스미노겐 함량은 약 2 μ M이다. 따라서 플라스미노겐은 조직 및 체액에서 단백질 분해 활성의 큰 잠재적 유래이다. 플라스미노겐은 글루타메이트-플라스미노겐(Glu-plasminogen) 및 라이신-플라스미노겐(Lys-plasminogen)의 두 가지 분자 형태로 존재한다. 자연적으로 분비되고 절단되지 않은 형태의 플라스미노겐은 하나의 아미노 말단(N-말단) 글루타메이트를 갖기 때문에 글루타메이트-플라스미노겐이라고 한다. 그러나, 플라스민의 존재하에 글루타메이트-플라스미노겐은 Lys76-Lys77에서 라이신-플라스미노겐으로 가수분해된다. 글루타메이트-플라스미노겐에 비해 라이신-플라스미노겐은 피브린과 더 높은 친화력을 갖고 더 높은 속도로 PAs에 의해 활성화될 수 있다. 이 두 가지 형태의 플라스미노겐의 Arg560-Val561 펩티드 결합은 uPA 또는 tPA에 의해 절단되어 이황화 결합으로 연결된 이중 사슬 프로테아제 플라스민이 형성될 수 있다. 플라스미노겐의 아미노 말단 부분은 5개의 상동 삼중 고리, 즉 소위 kringles를 포함하고, 카르복시 말단 부분은 프로테아제 도메인을 포함한다. 일부 kringles은 플라스미노겐과 피브린 및 이의 억제제 $\alpha 2$ -AP의 특이적 상호작용을 매개하는 라이신 결합 부위를 포함한다. 최근에 발견된 하나의 플라스미노겐은 kringle1-4를 포함하는 38 kDa의 단편으로, 강력한 혈관신생 억제제이다. 이 단편은 엔지오스타틴(angiotatin)으로 명명되며, 여러 프로테아제에 의한 플라스미노겐의 가수분해에 의해 생성될 수 있다.

[0048] 플라스민의 주요 기질은 피브린이고, 피브린의 용해는 병리학적 혈전증을 예방하는 관건이다. 플라스민은 또한 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸 및 젤라틴을 비롯한 ECM의 여러 성분에 대한 기질 특이성을 갖고, 이는 플라스민이 ECM 리모델링에서도 중요한 작용을 일으킨다는 것을 나타낸다. 간접적으로, 플라스민은 또한 일부 프로테아제 전구체를 활성 프로테아제로 전환함으로써 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9를 비롯한 ECM의 다른 성분을 분해할 수 있다. 따라서, 플라스민이 세포의 단백질 분해의 하나의 중요한 업스트림 조절자일 수 있다고 제시하였다. 또한, 플라스민은 일부 잠재적 형태의 성장 인자를 활성화하는 능력을 갖는다. 시험관 내에서 플라스민은 또한 보체 시스템의 성분을 가수분해하고 주화성 보체 단편을 방출할 수 있다.

[0049] “플라스민”은 피브린 응괴를 피브린 분해 산물 및 D-이량체로 가수분해할 수 있는 혈액에 존재하는 매우 중요한 효소이다.

[0050] “플라스미노겐”은 플라스민의 자이모젠(zymogen) 형태로, swiss prot 중의 서열에 따르면 신호 펩티드를 포함하는 천연 인간 플라스미노겐 아미노산 서열(서열번호 4)에 따라 계산되는 810개의 아미노산으로 구성되고 분자량은 약 90 kD이며, 주로 간에서 합성되고 혈액에서 순환될 수 있는 당단백질이며, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 3으로 표시된 바와 같다. 전장 플라스미노겐은 C 말단의 세린 프로테아제 도메인, N 말단의 Pan Apple(PAP) 도메인 및 5개의 kringle 도메인(Kringle1-5) 등 7개의 도메인을 포함한다. swiss prot 중의 서열을 참조하면, 이의 신호 펩티드는 잔기 Met1-Gly19를 포함하고, PAp는 잔기 Glu20-Val198을 포함하며, Kringle1은 잔기 Cys103-Cys181을 포함하고, Kringle2는 잔기 Glu184-Cys262를 포함하며, Kringle3은 잔기 Cys275-Cys352를 포함하고, Kringle4는 잔기 Cys377-Cys454를 포함하며, Kringle5는 잔기 Cys481-Cys560을 포함한다. NCBI 데이터에 따르면, 세린 프로테아제 도메인은 잔기 Val1581-Arg804를 포함한다.

- [0051] Glu-플라스미노젠은 인간 천연 전장 플라스미노젠으로, 791개의 아미노산으로 구성(19개의 아미노산의 신호 펩티드를 포함하지 않음)되고, 상기 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 1로 표시된 바와 같으며, 이의 아미노산 서열은 서열번호 2로 표시된 바와 같다. 체내에는 또한 Glu-플라스미노젠의 76 ~ 77번 아미노산에서 가수분해되어 형성된 Lys-플라스미노젠이 존재하고, 서열번호 6으로 표시된 바와 같으며, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 5로 표시된 바와 같다. 델타-플라스미노젠(δ -plasminogen)은 Kringle2-Kringle5 구조가 결실된 전장 플라스미노젠의 단편으로, Kringle1 및 세린 프로테아제 도메인(프로테아제 도메인(tease domain, PD)이라고도 함)만 포함하고, 문헌에 델타-플라스미노젠의 아미노산 서열(서열번호 8)이 보고되어 있으며, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 7로 표시된 바와 같다. 미니플라스미노젠(Mini-plasminogen)은 Kringle5 및 세린 프로테아제 도메인으로 구성되고, 문헌에 잔기 Val443-Asn791(신호 펩티드를 포함하지 않는 Glu-플라스미노젠 서열의 Glu 잔기를 시작 아미노산으로 함)을 포함하는 것으로 보고되어 있으며, 이의 아미노산 서열은 서열번호 10으로 표시된 바와 같고, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 9로 표시된 바와 같다. 마이크로플라스미노젠(Micro-plasminogen)은 세린 프로테아제 도메인만 포함하고, 문헌에 이의 아미노산 서열이 잔기 Ala543-Asn791(신호 펩티드를 포함하지 않는 Glu-플라스미노젠 서열의 Glu 잔기를 시작 아미노산으로 함)을 포함하는 것으로 보고되어 있으며, 특히 문헌 CN102154253A에도 이의 서열이 잔기 Lys531-Asn791(신호 펩티드를 포함하지 않는 Glu-플라스미노젠 서열의 Glu 잔기를 시작 아미노산으로 함)을 포함하는 것으로 보고되어 있으며, 본 특허 출원에서 마이크로플라스미노젠 서열은 특허 문헌 CN102154253A를 참조하고, 이의 아미노산 서열은 서열번호 12로 표시된 바와 같으며, 상기 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA 서열은 서열번호 11로 표시된 바와 같다.
- [0052] 전장 플라스미노젠의 구조도 Aisina 등(Aisina R B, Mukhametova L I. Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6): 590-605)의 문장에 기재되어 있다. 상기 문장에서 Aisina 등은 플라스미노젠이 Kringle1, 2, 3, 4, 5 도메인 및 세린 프로테아제 도메인(프로테아제 도메인(tease domain, PD)이라고도 함)을 포함하고, 여기서 Kringles이 플라스미노젠과 저분자량 및 고분자량의 리간드의 결합(즉, 라이신 결합 활성)을 담당하여 플라스미노젠이 보다 개방된 배열로 전환되도록 함으로써 더 쉽게 활성화되며; 프로테아제 도메인(PD)은 잔기 Val562-Asn791이고, tPA 및 UPA가 플라스미노젠의 Arg561-Val562 활성화 결합을 특이적으로 절단하여 플라스미노젠이 플라스민으로 형성되도록 함으로써, 프로테아제 도메인(PD)은 플라스미노젠 단백질 분해 활성을 부여하는 영역이라는 것을 설명하였다. 본 발명의 “플라스민”과 “섬유소 용해 효소”, “피브린 용해 효소”는 상호교환하여 사용될 수 있고 의미는 동일하며; “플라스미노젠”과 “섬유소 용해 자이모젠”, “피브린 용해 자이모젠”은 상호교환하여 사용될 수 있고 의미는 동일하다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 플라스미노젠 또는 플라스미노젠 활성의 “결핍”은 피험자 체내의 플라스미노젠 함량이 상기 피험자의 정상적인 생리학적 기능에 영향을 미칠만큼 정상인보다 낮다는 것을 의미하고; 상기 플라스미노젠 또는 플라스미노젠 활성의 “결실”은 피험자 체내의 플라스미노젠 함량이 정상인보다 현저히 낮고, 심지어는 활성 또는 발현이 극히 낮으며, 외부 공급에 의해서만 정상적인 생리학적 기능을 유지할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0054] 당업자는 본 발명의 플라스미노젠의 모든 기술적 해결수단이 플라스민에 적용되기 때문에 본 발명에 기재된 기술적 해결수단이 플라스미노젠 및 플라스민을 포함하는 것을 이해할 수 있다. 순환 과정에서, 플라스미노젠은 폐쇄된 비활성 형태를 사용하지만, 혈전 또는 세포 표면에 결합되는 경우 플라스미노젠 활성화제(plasminogen activator, PA)의 매개하에 개방형 형태를 갖는 활성 플라스민으로 전환된다. 활성을 갖는 플라스민은 피브린 응괴를 피브린 분해 산물 및 D-이량체로 추가 가수분해하여 혈전을 용해할 수 있다. 여기서 플라스미노젠의 PAp 도메인은 플라스미노젠이 비활성 폐쇄 형태로 유지하도록 하는 중요한 결정 인자를 포함하고, KR 도메인은 수용체 및 기질에 존재하는 라이신 잔기에 결합될 수 있다. 조직 플라스미노젠 활성화제(tPA), 유로키나아제 플라스미노젠 활성화제(uPA), 칼리크레인(kallikrein) 및 혈액 응고 인자 XII(하계만 인자) 등을 비롯한 다양한 효소가 플라스미노젠 활성화제로 사용될 수 있다는 것이 알려져 있다.
- [0055] “플라스미노젠 활성 단편”은 기질 표적 서열 중 라이신에 결합되는 활성(라이신 결합 활성), 또는 단백질 분해 기능을 발휘하는 활성(단백질 분해 활성), 또는 단백질 분해 활성 및 라이신 결합 활성을 갖는 단편을 의미한다. 본 발명에 따른 플라스미노젠의 기술적 해결수단은 플라스미노젠 활성 단편으로 플라스미노젠을 대체하는 기술적 해결수단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 플라스미노젠 활성 단편은 플라스미노젠의 세린 프로테아제 도메인을 포함하거나 또는 플라스미노젠의 세린 프로테아제 도메인으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 플라스미노젠 활성 단편은 서열번호 14를 포함하거나, 또는 서열번호 14와 적어도 80%,

90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 14로 구성되거나, 또는 서열번호 14와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 플라스미노겐 활성 단편은 Kringle 1, Kringle 2, Kringle 3, Kringle 4, Kringle 5로부터 선택되는 하나 이상의 도메인 또는 이들의 보존적 치환 변이체를 포함하거나, 또는 Kringle 1, Kringle 2, Kringle 3, Kringle 4, Kringle 5로부터 선택되는 하나 이상의 도메인 또는 이들의 보존적 치환 변이체로 구성된다. 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 플라스미노겐은 상기 플라스미노겐 활성 단편을 포함하는 단백질을 포함한다. 현재, 혈액 내 플라스미노겐 및 이의 활성 측정 방법은 조직 플라스미노겐 활성화제 활성의 검출(t-PAA), 혈장 조직 플라스미노겐 활성화제 항원의 검출(t-PAAg), 혈장 조직 플라스미노겐 활성화제의 검출(plgA), 혈장 조직 플라스미노겐 항원의 검출(plgAg), 혈장 조직 플라스미노겐 활성화제 억제제 활성의 검출, 혈장 조직 플라스미노겐 활성화제 억제제 항원의 검출, 혈장 플라스민-항플라스민 착물 검출(PAP)을 포함한다. 여기서 가장 일반적으로 사용되는 검출 방법은 발색 기질 방법으로, 검출할 혈장에 스트렙토키나아제(SK) 및 발색 기질을 첨가하고, 검출할 혈장 내의 PLG를 SK의 작용하에 PLM으로 전환하며, 후자를 발색 기질에 작용시키고, 그 다음 분광 광도계로 측정하며, 흡광도의 증가는 플라스미노겐 활성에 정비례한다. 또한, 면역화학적 방법, 겔 전기영동, 면역비탁법, 방사면역측정법을 사용하여 측정할 수도 있다.

[0056] “동원체 또는 병렬상동체(ortholog)”는 단백질 동원체 뿐만 아니라 DNA 동원체도 포함하는 상이한 종 사이의 동원체를 의미하고, 이종상동체 및 수직 동원체라고도 한다. 구체적으로 상이한 종의 동일한 조상 유전자에서 진화한 단백질 또는 유전자를 의미한다. 본 발명의 플라스미노겐은 인간 천연 플라스미노겐을 포함하고, 상이한 종으로부터 유래되고 플라스미노겐 활성을 갖는 플라스미노겐 동원체 또는 병렬상동체를 더 포함한다.

[0057] “보존적 치환 변이체”는 그 중 하나의 주어진 아미노산 잔기가 변경되나 단백질 또는 효소의 전체 형태 및 기능이 변경되지 않는 것을 의미하며, 이는 유사한 특성(예를 들어 산성, 염기성, 소수성 등)의 아미노산으로 모 단백질의 아미노산 서열 중의 아미노산을 치환하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 유사한 특성을 갖는 아미노산은 잘 알려져 있다. 예를 들어 아르기닌, 히스티딘 및 라이신은 친수성 염기성 아미노산이고 상호교환할 수 있다. 이와 같이, 이소류신이 소수성 아미노산이면, 류신, 메티오닌 또는 발린으로 대체될 수 있다. 따라서, 유사한 기능의 두 단백질 또는 아미노산 서열의 유사성은 상이할 수 있다. 예를 들어, MEGALIGN 알고리즘 기반의 70% 내지 99%의 유사성(동일성)이다. “보존적 치환 변이체”는 BLAST 또는 FASTA 알고리즘을 통해 결정된 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 또는 가장 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩티드 또는 효소를 더 포함하고, 천연 또는 모 단백질 또는 효소에 비해 동일하거나 기본적으로 유사한 특성 또는 기능을 갖는다.

[0058] “분리된” 플라스미노겐은 자연 환경에서 분리 및/또는 회수된 플라스미노겐 단백질을 의미한다. 일부 실시형태에서, 상기 플라스미노겐은 (1) 90%, 95% 또는 98%보다 큰 순도(중량 기준), 예를 들어 Lowry 방법에 의해 결정된 99%(중량 기준)를 초과한 순도, (2) 스피닝 컵 서열 분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 획득하기에 충분한 정도, 또는 (3) 환원 또는 비환원 조건에서 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 통해 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용하여 결정된 균질성으로 정제된다. 분리된 플라스미노겐은 또한 생물공학 기술을 통해 재조합 세포로부터 제조되고 적어도 하나의 정제 단계를 통해 분리된 플라스미노겐을 포함한다.

[0059] 용어 “폴리펩티드”, “펩티드” 및 “단백질”은 본문에서 상호교환하여 사용될 수 있고, 유전적으로 코딩된 아미노산 및 비유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산, 및 변형된 펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있는 임의의 길이의 아미노산의 중합 형태를 의미한다. 상기 용어는 이종 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질, 이종 및 상동 리더 서열(N 말단 메티오닌 잔기가 있거나 없음)을 갖는 융합체 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 융합 단백질을 포함한다.

[0060] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 “아미노산 서열 상동성 백분율(%)”은 최대 백분율 서열 상동성을 달성하기 위해 필요시 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환을 서열 상동성의 일부로 고려하지 않는 경우, 참조 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로 정의한다. 백분율 아미노산 서열 상동성을 측정하기 위한 정렬은 본 기술분야의 기술적 범위 내에서 다양한 방식으로 구현될 수 있고, 예를 들어 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용할 수 있다. 당업자는 비교될 서열의 전장에 대해 최대 정렬을 구현하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해 아미노산 서열 상동성의 백분율 값은 서열 비교를 위한 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다.

- [0061] ALIGN-2를 사용하여 아미노산 서열을 비교하는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 상동성(또는 주어진 아미노산 서열 B에 대하여, 주어진 아미노산 서열 B와 또는 이와 관련하여 % 아미노산 서열 상동성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다.
- [0062] 분수 X/Y 곱하기 100
- [0063] 여기서 X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B 정렬에서 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, 여기서 Y는 B 중의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 상동성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 상동성과 같지 않다는 것을 이해해야 한다. 달리 명시적으로 설명되지 않는 한, 본문에 사용된 모든 % 아미노산 서열 상동성 값은 상술한 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 획득된다.
- [0064] 본문에 사용된 바와 같이, 용어 “치료”는 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득함을 의미한다. 상기 효과는 질환 또는 이의 증상의 발생, 발작을 완전히 또는 부분적으로 예방하거나, 질환 및/또는 이의 증상을 부분적으로 또는 완전히 경감하거나, 및/또는 질환 및/또는 이의 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유할 수 있는 것이며, (a) 질환의 소인을 가질 수 있지만 질환이 있는 것으로 진단되지 않은 피험자 체내에서 질환의 발생 또는 발작을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 질환의 발달을 막는 것; 및 (c) 질환 및/또는 이의 증상을 완화시키는 것, 즉 질환 및/또는 이의 증상을 퇴행 또는 소실시키는 것을 포함한다.
- [0065] 용어 “개체”, “피험자” 및 “환자”는 본문에서 상호교환하여 사용될 수 있고, 쥐(랫트, 마우스), 비인간 영장류, 인간, 개, 고양이, 발굽이 있는 동물(예를 들어 말, 소, 양, 돼지, 염소) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유동물을 의미한다.
- [0066] “치료 유효량” 또는 “유효량”은 질환을 치료하기 위해 포유동물 또는 다른 피험자에게 투여될 때 질환을 예방 및/또는 치료하기에 충분한 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)의 양을 의미한다. “치료 유효량”은 사용된 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐), 치료할 피험자의 질환 및/또는 이의 증상의 중증도, 연령, 체중 등에 따라 변화된다.
- [0067] 본 발명의 플라스미노겐의 제조
- [0068] 플라스미노겐은 자연계에서 분리되고 정제되어 추가적인 치료 용도에 사용되거나, 표준 화학 펩티드 합성 기술을 통해 합성될 수 있다. 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 액상 또는 고상을 통해 합성될 수 있다. 고상 폴리펩티드 합성(SPPS)(여기서 서열의 C 말단 아미노산을 불용성 지지체에 부착한 다음, 서열의 나머지 아미노산을 순차적으로 첨가함)은 플라스미노겐의 화학적 합성에 적합한 방법이다. Fmoc 및 Boc와 같은 다양한 형태의 SPPS는 플라스미노겐의 합성에 사용할 수 있다. 고상 합성 기술은 Barany 및 Solid-Phase Peptide Synthesis; 제3-284페이지 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 제2권: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, 등. J.Am.Chem.Soc., 85:2149-2156(1963); Stewart 등, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem.Co., Rockford, Ill.(1984); 및 Ganesan A.2006Mini Rev.Med Chem.6:3-10 및 Camarero JA 등 2005 Protein Pept Lett.12:723-8에 기재되어 있다. 간단히 말해서, 펩티드 사슬이 구축되어 있는 기능성 단위로 작은 불용성 다공성 비드를 처리한다. 커플링/탈보호의 반복된 주기 후에, 부착된 고상이 없는 N 말단 아민과 단일 N 보호 아미노산 단위를 커플링한다. 그 다음 이 단위를 탈보호하여 다른 아미노산에 부착될 수 있는 새로운 N 말단 아민을 나타낸다. 펩티드는 고상에 고정된 상태로 유지되며, 그 후에 이를 절단한다.
- [0069] 표준 재조합 방법을 사용하여 본 발명의 플라스미노겐을 생산할 수 있다. 예를 들어, 플라스미노겐을 코딩하는 핵산을 발현 벡터에 삽입하여 발현 벡터 중의 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 한다. 발현 조절 서열은 프로모터(예를 들어, 천연적으로 연관된 또는 이중 프로모터), 신호 서열, 인핸서 요소 및 전사 종결 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 발현 조절은 진행 숙주 세포(예를 들어, COS 또는 CHO 세포)를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 중의 진행 프로모터 시스템일 수 있다. 벡터가 적합한 숙주에 통합되면, 뉴클레오티드 서열의 고수준 발현 및 플라스미노겐의 수집 및 정제에 적합한 조건하에 숙주가 유지된다.
- [0070] 적합한 발현 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에서 에피솜 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 복제된다. 통상적으로, 발현 벡터는 선택 가능한 마커(예를 들어, 암피실린(ampicillin) 내성, 하이그로마이신(hygromycin) 내성, 테트라사이클린(tetracycline) 내성, 카나마이신(kanamycin) 내성 또는 네오마이신(neomycin) 내성)을 포함하여 원하는 외인성 DNA 서열로 형질전환된 세포를 검출하는 데 도움이 된다.

- [0071] 대장균(*Escherichia coli*)은 주체 항체를 클로닝하여 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 원핵 숙주 세포의 예일 수 있다. 사용하기에 적합한 다른 미생물 숙주는 간균, 예를 들어 고초균(*Bacillus subtilis*) 및 다른 장내세균과 (*enterobacteriaceae*), 예를 들어 살모넬라속(*Salmonella*), 셀라티아속(*Serratia*), 및 다양한 슈도모나스속 (*Pseudomonas*) 종을 포함한다. 이러한 원핵 숙주에서 또한 발현 벡터를 생성할 수 있고, 이는 통상적으로 숙주 세포와 양립할 수 있는 발현 조절 서열(예를 들어, 복제 기점)을 포함할 수 있다. 또한, 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판(*trp*) 프로모터 시스템, beta-락타마제 프로모터 시스템, 또는 박테리오파지 λ 로부터의 프로모터 시스템과 같은 공지된 다양한 프로모터가 있다. 프로모터는 선택적으로 작동 유전자 서열의 경우 통상적으로 발현을 제어하고, 전사 및 번역을 개시 및 완료하기 위해 리보솜 결합 부위 서열 등을 갖는다.
- [0072] 효모와 같은 다른 미생물도 발현에 사용될 수 있다. 효모(예를 들어, 출아형 효모(*S.cerevisiae*)) 및 피키아 (*Pichia*)는 적절한 효모 숙주 세포의 예로, 여기서 적절한 벡터는 필요에 따라 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터), 복제 기점, 종결 서열 등을 갖는다. 전형적인 프로모터는 3-포스포글리세르산 키나아제 및 기타 당분해 효소를 포함한다. 특히 유도성 효모 프로모터는 에탄올 탈수소 효소, 이소시토크롬 C, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당한 효소로부터의 프로모터를 포함한다.
- [0073] 미생물 외에, 포유동물 세포(예를 들어, 시험관내 세포 배양물에서 배양된 포유동물 세포)는 또한 본 발명의 항-Tau 항체(예를 들어, 주체 항-Tau 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)를 발현 및 생성하는 데 사용될 수 있다. Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)를 참조한다. 적합한 포유동물 숙주 세포는 CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 골수종 세포주, 및 형질전환된 B 세포 또는 하이브리도마를 포함한다. 이러한 세포에 사용되는 발현 벡터는 복제 기점, 프로모터 및 인핸서(Queen 등, Immunol.Rev.89:49(1986))와 같은 발현 조절 서열, 및 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이싱 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결자 서열과 같은 필수적인 가공 정보 부위를 포함할 수 있다. 적합한 발현 조절 서열의 예는 면역글로불린 유전자, SV40, 아데노바이러스, 소우두종바이러스, 거대세포바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다. Co 등, J.Immunol.148:1149(1992)를 참조한다.
- [0074] 일단 합성(화학적 또는 재조합적 방식)되면, 황산암모늄 침전, 친화성 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 겔 전기영동 등을 포함하는 본 기술분야의 표준 절차에 따라 본 발명에 따른 플라스미노젠을 정제할 수 있다. 상기 플라스미노젠은 기본적으로 순수하고, 예를 들어 적어도 약 80% 내지 85%, 적어도 약 85% 내지 90%, 적어도 약 90% 내지 95% 순수하거나, 또는 98% 내지 99% 순수하거나 더 순수하며, 예를 들어 세포 파편, 주체 항체 이외의 거대 분자 등과 같은 오염 물질을 포함하지 않는다.
- [0075] 약물 제제
- [0076] 원하는 순도의 플라스미노젠 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노젠)을 선택 가능한 약학적으로 허용 가능한 벡터, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16판, Osol, A.ed.(1980))와 혼합하여 동결건조제 또는 수용액을 형성함으로써 치료 제제를 제조할 수 있다. 허용 가능한 벡터, 부형제, 안정화제는 사용된 용량 및 농도에 의해 피험자에게 무독성이고, 인산염, 시트르산염 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예를 들어 옥타데실디메틸벤질암모늄 클로라이드; 핵산디아민 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부탄올 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라히드록시벤조에이트; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; m-크레졸); 저분자량 폴리펩티드(약 10개 미만의 잔기); 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 포도당, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 푸코스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 착물(예를 들어, 아연-단백질 착물); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다. 바람직한 동결 건조된 항-VEGF 항체 제제는 WO 97/04801에 기재되어 있고, 이는 본문에서 참조로 포함된다.
- [0077] 본 발명의 제제는 또한 치료해야 할 구체적인 병증에 필요한 하나 이상의 활성 화합물을 포함할 수 있고, 바람직하게는 활성이 상보적이며 서로 부작용이 없는 것이다.
- [0078] 본 발명의 플라스미노젠은 코아세르베이션(*coacervation*) 또는 계면 중합과 같은 기술을 통해 제조된 마이크로캡슐에 캡슐화될 수 있으며, 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전의 히드록시메틸셀룰로스 또는 겔-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 배치할 수 있다. 이러한 기술은 Remington's Pharmaceutical

Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 공개되어 있다.

- [0079] 체내 투여를 위한 본 발명의 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)은 무조건 멸균된 것이다. 이는 동결 건조 및 재조제 전후에 멸균 필터를 통한 여과에 의해 쉽게 구현될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)은 서방형 제제로 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 멤브레인 또는 마이크로캡슐과 같이 일정한 형태를 갖고 당단백질을 포함하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트)(Langer 등, J.Biomed.Mater.Res., 15:167-277(1981); Langer, Chem.Tech., 12:98-105(1982)) 또는 폴리(비닐 알코올), 폴리락티드(미국 특허 3773919, EP 58,481), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루탐산의 공중합체(Sidman, 등, Biopolymers 22:547(1983)), 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 등, 출처는 상기와 같음), 또는 Lupron Depot™(젯산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드(leuprolide) 아세테이트로 구성된 주사 가능한 마이크로스피어)과 같은 분해성 젯산-글리콜산 공중합체, 및 폴리D(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 젯산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 이상 동안 연속적으로 분자를 방출할 수 있지만 일부 하이드로겔은 단백질을 방출하는 시간이 비교적 짧다. 관련 메커니즘에 따라 단백질의 안정화를 위한 합리적인 전략을 설계할 수 있다. 예를 들어, 축합 메커니즘이 티오디설피드 교환을 통해 분자간 S-S 결합을 형성하는 것으로 발견되면, 설프히드릴 잔기를 변형시키고 산성 용액에서 동결 건조하며 습도를 조절하고 적절한 첨가제를 사용하며 특정된 중합체 매트릭스 조성을 개발하여 안정화를 구현할 수 있다.
- [0081] 투여 및 용량
- [0082] 비강 흡입, 에어로졸 흡입, 점비액 또는 점안액, 정맥내, 복막내, 피하, 두개내, 척추강내, 동맥내(예를 들어, 경동맥을 통해), 근육내, 직장내 투여와 같이 상이한 방식을 통해 본 발명의 약학적 조성물의 투여를 구현할 수 있다.
- [0083] 비경구 투여를 위한 제조물은 멸균된 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 비수성 용액의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르이다. 수성 액체는 물, 알코올성/수성 용액, 염수 및 완충 매질을 포함한 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 비히클은 액체 및 영양 보충제, 전해질 보충제 등을 포함한다. 또한 방부제 및 다른 첨가제, 예를 들어 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제 및 불활성 가스 등이 존재할 수 있다.
- [0084] 의료진은 다양한 임상 요인에 기반하여 용량 방법을 결정한다. 의료 분야에 공지된 바와 같이, 임의의 환자의 용량은 환자의 체격, 체표면적, 연령, 투여할 구체적인 화합물, 성별, 투여 횟수 및 경로, 일반적인 건강 및 동시에 투여되는 다른 약물을 비롯한 다양한 요인에 따라 결정된다. 본 발명의 플라스미노겐을 포함하는 약학적 조성물의 용량 범위는 예를 들어 매일 약 0.0001 내지 2000 mg/kg, 또는 약 0.001 내지 500 mg/kg(예를 들어 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg 등) 피험자 체중일 수 있다. 예를 들어, 용량은 1 mg/kg 체중 또는 50 mg/kg 체중 또는 1 ~ 50 mg/kg 범위, 또는 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 이 예시적인 범위보다 높거나 낮은 용량도 특히 상기 요인을 고려하여 포함된다. 상기 범위 중의 중간 용량도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 피험자는 매일, 격일, 매주 또는 경험적 분석에 의해 결정된 임의의 다른 일정에 따라 이러한 용량을 투여할 수 있다. 예시적인 용량 일정은 연속적으로 몇일 0.01 ~ 100 mg/kg을 포함한다. 본 발명의 약물 투여 과정에서 치료 효과 및 안전성을 실시간으로 평가해야 한다.
- [0085] 제품 또는 키트
- [0086] 본 발명의 일 실시형태는 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)을 포함하는 제품 또는 키트에 관한 것이다. 상기 제품은 바람직하게는 하나의 용기, 라벨 또는 패키지 인서트를 포함한다. 적합한 용기는 병, 바이알, 주사기 등이 있다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 제조될 수 있다. 상기 용기는 조성물을 포함하고, 상기 조성물은 본 발명의 질환 또는 병증을 효과적으로 치료하고 멸균 접근 포트(예를 들어, 상기 용기는 피하 주사바늘이 관통할 수 있는 마개를 포함하는 정맥내 용액 팩 또는 바이알일 수 있음)를 갖는다. 상기 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)이다. 상기 용기 상의 또는 부착된 라벨은 상기 조성물이 본 발명에 따른 병증의 치료에 사용됨을 나타낸다. 상기 제품은 약학적으로 허용 가능한 완충액을 포함하는 제2 용

기를 추가로 포함할 수 있는 바, 예를 들어 인산완충식염수, 링거 용액 및 포도당 용액이다. 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 요구되는 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 제품은 사용 지침이 있는 패키지 인서트를 포함하고, 예를 들어 상기 조성물의 사용자가 플라스미노겐 활성화 경로의 성분 또는 이의 관련 화합물(예를 들어, 플라스미노겐)의 조성물 및 수반되는 질환의 치료를 위한 다른 약물을 환자에게 투여하도록 지시하는 것을 포함한다.

[0087] **실시예**

[0088] 하기 모든 실시예에서 사용되는 인간 플라스미노겐은 공여자 혈장에서 유래되고, KennethC Robbins,Louis Summaria,David Elwyn et al.Further Studies on the Purification and Characterization of Human Plasminogen and Plasmin.Journal of Biological Chemistry,1965,240(1):541-550; Summaria L,Spitz F,Arzadon L et al.Isolation and characterization of the affinity chromatography forms of human Glu-and Lys-plasminogens and plasmins.J Biol Chem.1976 Jun 25; 251(12):3693-9; HAGAN JJ,ABLONDI FB,DE RENZO EC.Purification and biochemical properties of human plasminogen.J Biol Chem.1960 Apr; 235:1005-10에 기재된 방법에 기반하여, 공정 최적화를 수행하고, 인간 공여자 혈장으로부터 정제하여 획득한다. 플라스미노겐 단량체의 순도는 >98%이다.

[0089] **실시예 1 파킨슨 모델 마우스의 자발적 활동 및 회피성 행동을 개선하는 플라스미노겐**

[0090] 28마리의 10 ~ 12주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 모든 마우스의 체중을 측정하고 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 블랭크 대조군 마우스는 200 μl의 생리식염수 용액을 복강내 주사하고, 모델군 마우스는 35 mg/kg/마리에 따라 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 용액을 복강내 주사하며, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[11]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모든 마우스의 체중을 측정하고 오픈 필드 행동학 검출을 수행하였다. 모델군 마우스는 체중 및 오픈 필드 결과에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 투여군 10마리와 비히클군 10마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μl/마리에 따라 플라스미노겐 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μl/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 오픈 필드 실험을 수행하였다.

[0091] MPTP는 특정된 강한 흑질 독소로, 이의 대사산물 MPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium)는 미토콘드리아 복합체 I의 억제제이며, 혈뇌장벽을 통과하여 미토콘드리아 전자전달계 등 경로를 차단하여 흑질 및 선조체의 도파민 뉴런을 손상시켜 인간 파킨슨 증상을 시뮬레이션할 수 있다^[2].

[0092] **오픈 필드 실험**

[0093] 실험 시, 마우스를 오픈 필드(40×40×40 cm) 바닥면 중앙에 놓는 동시에 촬영 및 시간 측정을 수행하고, 5분 동안 지속적으로 관찰하며, 각 마우스는 3번의 실험을 수행하였다. 기록 파라미터는 총 운동 거리, 경계 영역 휴식 시간 백분율, 경계 영역 운동 거리, 경계 영역 운동 거리 백분율, 경계 영역 저속 운동 시간 백분율, 경계 영역 시간 백분율, 경계 영역 진입 횟수, 중심 영역 운동 거리, 중심 영역 운동 거리 백분율, 중심 영역 최대 운동 속도, 중심 영역 시간 백분율, 중심 영역 진입 횟수, 운동 궤적을 포함한다. 각 실험에서 후각으로 인한 선호도를 방지하기 위해 70% 알코올을 사용하여 박스를 닦았다.

[0094] 오픈 필드 실험의 설계 원리는 마우스의 회피성을 기반으로 하는데, 마우스가 개방된 곳, 미지의 곳, 잠재적으로 위험한 곳을 두려워하여, “벽에 붙어” 활동하는 성질을 갖는다는 것을 의미한다. 총 거리 및 평균 속도는 마우스의 자발적 활동을 반영하는 주요 데이터로 간주되고, 회피성은 오픈 필드 주변 영역(4개의 모서리 및 4개의 변두리)에서 마우스의 활동으로 평가되었다. 회피성을 반영하는 주변 영역의 활동 시간으로부터 보다시피 시간이 단축되었으며, 이는 마우스가 “모험적”인 경향이 더 풍부함을 나타낸다. 중앙 영역의 활동 시간이 현저히 증가하였는데, 이는 회피성 및 불안(우울) 수준이 낮음을 나타낸다.

[0095] **총 활동 상황**

[0096] **총 운동 거리**

[0097] 총 운동 거리는 지정된 테스트 시간 내 운동 궤적의 길이를 의미한다.

- [0098] 결과에 따르면, 블랭크 대조군은 실험 기간에 일정한 거리를 운동하고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 총 운동 거리는 비히클 대조군보다 유의하게 짧으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 총 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다(도 1). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 자발적 활동 행동을 회복시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0099] **경계 영역 활동 상황**
- [0100] 경계 영역 휴식 시간 백분율
- [0101] 경계 영역은 오픈 필드 주변 영역(4개의 모서리 및 4개의 번두리)이다. 경계 영역 휴식 시간 백분율은 경계 영역 휴식 시간과 총 휴식 시간(경계 영역 휴식 시간 및 중심 영역 휴식 시간 포함)의 비율을 의미한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 휴식 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 휴식 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 크며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 휴식 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 2). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성 행동을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0102] 경계 영역 운동 거리
- [0103] 경계 영역 운동 거리는 지정된 테스트 시간 내 경계 영역 운동 궤적의 길이를 의미한다. 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 운동 거리를 갖고; 비히클 대조군 마우스의 경계 영역 운동 거리는 플라스미노겐 투여군보다 길며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고($P = 0.05$), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다(도 3). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0104] 경계 영역 운동 거리 백분율
- [0105] 경계 영역 운동 거리 백분율은 경계 영역 운동 거리와 총 운동 거리(경계 영역 운동 거리 및 중심 영역 운동 거리 포함)의 비율을 의미한다.
- [0106] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 운동 거리 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 운동 거리 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 높으며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 운동 거리 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 4). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성 행동을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0107] 경계 영역 저속 운동 시간 백분율
- [0108] 경계 영역 저속 운동 시간 백분율은 테스트 시간 내 경계 영역 저속 운동 시간과 총 테스트 시간의 비율을 의미한다.
- [0109] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 저속 운동 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 저속 운동 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄); 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 저속 운동 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 5). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0110] 경계 영역 시간 백분율
- [0111] 경계 영역 시간 백분율은 경계 영역 시간과 총 테스트 시간의 비율을 의미한다.
- [0112] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 시간 백분율은 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 높으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고 ($P = 0.06$), 플라스미노겐 투여군의 경계 영역 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 6). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성 행동 수준을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0113] 경계 영역 진입 횟수
- [0114] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 경계 영역 진입 횟수를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 진입 횟수는 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 경계 영역 진입 횟수는 블랭크 대조군에 근접한다(도 7). 이는 플라스미노

겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.

- [0115] **중심 영역 활동 상황**
- [0116] 중심 영역 운동 거리
- [0117] 중심 영역 운동 거리는 테스트 시간 내 중심 영역 운동 궤적의 길이를 의미한다.
- [0118] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 운동 거리를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리는 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리는 블랭크 대조군에 근접한다(도 8). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0119] 중심 영역 운동 거리 백분율
- [0120] 중심 영역 운동 거리 백분율은 테스트 시간 내 중심 영역 운동 궤적의 길이와 총 운동 궤적의 비율을 의미한다.
- [0121] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 운동 거리 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리 백분율은 비히클 대조군 마우스보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이가 현저하고(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 운동 거리 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 9). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0122] 중심 영역 최대 운동 속도
- [0123] 중심 영역 최대 운동 속도는 테스트 시간 내 중심 영역의 가장 빠른 운동 속도를 의미한다.
- [0124] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 최대 운동 속도를 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 최대 운동 속도는 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 매우 현저하고(**는 $P < 0.01$ 를 나타냄), 플라스미노겐 투여군의 중심 영역 최대 운동 속도는 블랭크 대조군에 근접한다(도 10). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0125] 중심 영역 시간 백분율
- [0126] 중심 영역 시간 백분율은 중심 영역의 운동 시간과 총 테스트 시간의 비율을 의미한다.
- [0127] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 일정한 중심 영역 진입 시간 백분율을 갖고; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 시간 백분율은 비히클 대조군보다 유의하게 작으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고($P = 0.06$); 플라스미노겐 투여군의 중심 영역 시간 백분율은 블랭크 대조군에 근접한다(도 11). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0128] 중심 영역 진입 횟수
- [0129] 결과에 따르면, 블랭크 대조군 마우스는 중심 영역을 거의 진입하지 않고, 정상적인 회피성을 보이며; 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 진입 횟수는 비히클 대조군보다 유의하게 적고, 통계학적 차이가 현저하며(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄); 플라스미노겐 투여군 마우스의 중심 영역 진입 횟수는 블랭크 대조군에 근접한다(도 12). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0130] **운동 궤적**
- [0131] 결과에 따르면, 오픈 필드 실험 기간에 블랭크 대조군 마우스는 일정한 총 운동 거리를 갖고 중심 영역 활동이 거의 없으며; 비히클 대조군에 비해 플라스미노겐 투여군 마우스는 총 운동 거리 및 중심 영역 활동이 모두 유의하게 감소된 경향을 보이고, 블랭크 대조군 마우스에 근접한다(도 13). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 회피성을 향상시키고 불안을 완화시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0132] **실시에 2 파킨슨 모델 마우스의 흑질 DTA 발현을 촉진할 수 있는 플라스미노겐**
- [0133] 40마리의 10 ~ 12주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 모든 마우스의 체중을 측정하고 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 32마리이다. 블랭크 대조군 마우스는 200 μ l의 비히클 용액을 복강내 주사하고, 모델군 마우스는 40 mg/kg/마리에 따라 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 용액을 복강내 주사하며, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[11]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하

여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클군 및 투여군으로 각각 16마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μ l/마리에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μ l/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 흑질을 취하여 10% 중성 포르말데히드 용액에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 흑질 조직을 알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편의 두께는 3 μ m이고, 절편을 탈납 및 재수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 도파민 수송 단백질(dopamine transporter, DAT) 항체(ab7260, Abcam)를 적가하여 4°C에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0134] 파킨슨병(Parkinson disease, PD)은 신경퇴행성질환으로, 이의 병리학적 특징은 흑질 선조체 도파민성 뉴런의 진행성 사멸, 및 잔류된 도파민성 뉴런 세포질 내 루이소체의 형성이며, 기저핵 영역에 도파민이 결핍되어 PD의 고전적인 운동 장애 증상을 유발한다. 도파민 수송 단백질(dopamine transporter, DAT)은 도파민 뉴런의 전시냅스막에 위치하여, 시냅스 간극으로 방출된 도파민 전달자를 재흡수하여, 도파민 뉴런의 전시냅스 기능을 반영한다. DAT 감소는 PD 진행과 밀접한 관련이 있다^[3].

[0135] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 14의 A) 마우스의 흑질 도파민 뉴런은 일정량의 DTA(화살표로 표시)를 발현하고, 비히클군(도 14의 B) 마우스의 흑질 DTA의 발현량은 블랭크 대조군보다 낮으며, 플라스미노젠 투여군(도 14의 C) 마우스의 흑질 DTA의 발현량은 비히클군보다 높다. 상기 결과는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 DTA의 발현을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0136] **실시에 3 파킨슨 모델 마우스의 선조체 니슬소체 회복을 촉진할 수 있는 플라스미노젠**

[0137] 40마리의 10 ~ 12주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 모든 마우스의 체중을 측정하고 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 블랭크 대조군 마우스는 200 μ l의 비히클 용액을 복강내 주사하고, 모델군 마우스는 40 mg/kg/마리에 따라 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 용액을 복강내 주사하며, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[1]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클군 및 투여군으로 각각 16마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μ l/마리에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μ l/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 선조체를 취하여 10% 중성 포르말데히드 용액에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 선조체 조직을 알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 조직 절편의 두께는 3 μ m이고, 물로 탈납한 후 0.4% 크레실 바이올렛 염색액(pH=3)으로 염색하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하였다. 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰 및 촬영하였다.

[0138] PD의 주요 병리학적 변화는 흑질 선조체 도파민성 뉴런의 진행성 변성 및 괴사로, 선조체 도파민 전달자의 수준을 감소시켜, 전체 기저신경절 회로 기능 장애를 유발한다^[3]. 호색소체라고도 하는 니슬소체는 신경 세포의 고유한 구조로, 여러 평행하게 배열된 거친면 소포체 및 분포 기간의 유리 리보솜으로 구성되고, 단백질 합성 기능을 가지며, 이의 개수 및 분포는 뉴런의 기능 상태와 밀접한 관련이 있고, 신경 세포 생존의 표지로 간주된다^[4]. 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 15의 A) 마우스의 선조체 뉴런에는 일정한 개수의 니슬소체(화살표로 표시)가 존재하고; 비히클 대조군(도 15의 B) 마우스의 선조체 뉴런의 니슬소체 개수는 블랭크 대조군보다 유의하게 많으며, 통계학적 차이가 유의에 근접하고(P=0.085); 플라스미노젠 투여군(도 15의 C) 마우스의 선조체 뉴런의 니슬소체 개수는 블랭크 대조군과 현저한 차이가 없지만, 비히클 군보다 유의하게 낮으며, 통계학적 차이

가 현저하다(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄)(도 15의 D). 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 니슬소체 회복을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0139] **실시예 4 파킨슨 모델 마우스의 흑질 니슬소체의 개수 회복을 촉진할 수 있는 플라스미노겐**

[0140] 28마리의 10 ~ 12주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μ l의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클군 및 투여군으로 각각 10마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μ l/마리에 따라 플라스미노겐 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μ l/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 흑질을 취하여 10% 중성 포름알데히드 용액에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 흑질 조직을 알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 조직 절편의 두께는 3 μ m이고, 물로 탈납한 후 0.4% 크레실 바이올렛 염색액(pH=3)으로 염색하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하였다. 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰 및 촬영하였다.

[0141] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 16의 A) 마우스의 흑질에는 일정량의 니슬소체(화살표로 표시)가 있고, 비히클군(도 16의 B) 마우스의 흑질 내 니슬소체 수는 감소되며, 플라스미노겐 투여군(도 16의 C) 마우스의 흑질 니슬소체 수는 비히클군보다 높다. 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 니슬소체의 개수 회복을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0142] **실시예 5 파킨슨 모델 마우스의 흑질 GLP-1R의 발현을 촉진할 수 있는 플라스미노겐**

[0143] 12마리의 9주령 C57 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 마우스는 30 mg/kg 체중에 따라 매일 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[6-7]. MPTP 용액의 조제: 주사기로 10 ml의 탈이온수를 취하고, 100 mg의 MPTP 분말(sigma, M0896)에 첨가하여, 10 mg/ml의 모액으로 조제하며, 앰플에 1 ml의 모액을 취한 다음, 1 ml의 탈이온수를 첨가하고, 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후 마우스를 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클 PBS 투여 대조군 및 플라스미노겐 투여군으로 각각 6마리의 마우스이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 플라스미노겐 투여군 마우스는 1 mg/0.1 ml/마리/일에 따라 플라스미노겐 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클 PBS 투여 대조군은 동일한 부피의 PBS를 꼬리 정맥 주사하며, 14일 동안 연속 투여하였다. 투여 15일차에 마우스를 희생시키고, 뇌를 신속하게 취하여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 4 μ m이며, 절편을 탈납 및 계수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 GLP-1R 항체(NOVUS, NBP1-97308)를 적가하여 4°C에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 200배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0144] 글루카곤 유사 펩티드 1 수용체(glucagon-like peptide 1receptor, GLP-1R)는 글루카곤 수용체 패밀리 구성원 중 하나로, 인슐린 분비를 촉진하여 혈당 수준을 조절할 수 있는 G 단백질 연결 수용체이다^[8-9]. 파킨슨병의 특징은 흑질 선조체 뉴런의 도파민성 신호의 결실이며, 흑질 선조체는 GLP-1R도 발현한다^[10].

[0145] 결과에 따르면, 플라스미노겐 투여군(도 17의 B) 마우스의 흑질 GLP-1R의 발현량(화살표로 표시)은 비히클 PBS 대조군보다 유의하게 많고(도 17의 A), 통계학적 차이가 현저하다(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄)(도 17의 C). 상기 결과는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 GLP-1R의 발현을 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0146] **실시예 6 파킨슨 모델 마우스의 흑질 TH의 발현을 촉진할 수 있는 플라스미노겐**

[0147] 12마리의 9주령 C57 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 마우스는 30 mg/kg 체중에 따라 매일 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[6-7]. MPTP 용액의 조제: 주사기로 10 ml의 탈이온수를 취하고, 100 mg의 MPTP 분말(sigma, M0896)에 첨가하여, 10 mg/ml의 모액으로 조제하며, 앰플에 1 ml의 모액을 취한 다음, 1 ml의 탈이온수를 첨가하고, 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후 마우스를 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클 PBS 투여 대조군 및 플라스미노젠 투여군으로 각각 6마리의 마우스이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 플라스미노젠 투여군 마우스는 1 mg/0.1 ml/마리/일에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클 PBS 투여 대조군은 동일한 부피의 PBS를 꼬리 정맥 주사하며, 14일 동안 연속 투여하였다. 투여 15일차에 마우스를 희생시키고, 마우스의 흑질을 취하여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 3 μm이고, 절편을 탈납 및 재수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 TH 항체(Proteintech, 25859-1-AP)를 적가하여 4℃에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 증성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0148] 티로신하이드록시아제(tyrosine hydroxylase, TH)는 티로신으로부터 레보도파(L-dopa)의 합성을 위한 제한 효소로, 세포질에서만 발현되고 도파민 뉴런에 함량이 풍부하다. 흑질 내 TH 양성 뉴런의 대부분은 도파민성이므로, TH는 흑질 내 도파민성 뉴런의 마커로 사용될 수 있으며, 흑질 내 TH 발현량은 PD를 검출하는 지표로 된다^[11].

[0149] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 18의 A) 마우스의 흑질에는 일정량의 TH 양성 세포(화살표로 표시)가 존재하고, 비히클군(도 18의 B) 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포 수는 감소되며, 플라스미노젠 투여군(도 18의 C) 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포 수는 비히클군보다 유의하게 높다. 상기 결과는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 내 TH 양성 세포의 개수를 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

[0150] **실시예 7 파킨슨 모델 마우스의 흑질 미세아교세포의 개수에 영향을 미치는 플라스미노젠**

[0151] 12마리의 9주령 C57 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 마우스는 30 mg/kg 체중에 따라 매일 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[6-7]. MPTP 용액의 조제: 주사기로 10 ml의 탈이온수를 취하고, 100 mg의 MPTP 분말(sigma, M0896)에 첨가하여, 10 mg/ml의 모액으로 조제하며, 앰플에 1 ml의 모액을 취한 다음, 1 ml의 탈이온수를 첨가하고, 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후 마우스를 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클 PBS 투여 대조군 및 플라스미노젠 투여군으로 각각 6마리의 마우스이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 플라스미노젠 투여군 마우스는 1 mg/0.1 ml/마리/일에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클 PBS 투여 대조군은 동일한 부피의 PBS를 꼬리 정맥 주사하며, 14일 동안 연속 투여하였다. 투여 15일차에 마우스를 희생시키고, 마우스의 중뇌 흑질을 취하여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 흑질 알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 3 μm이고, 절편을 탈납 및 재수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 Iba-1 항체(Abcam, ab178847)를 적가하여 4℃에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 증성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0152] 미세아교세포는 중추신경계의 고유한 면역 세포로, 뇌 병변 또는 손상 시 활성화된다. 활성화된 미세아교세포는 손상 부위에 이동하여 죽은 세포의 식균, 염증 유발 사이토카인의 증가와 같은 다양한 기능을 발휘하고, 다양한 중추신경계 질환에 관여한다^[12-14]. Iba-1(Ionized calcium binding adapter molecule 1)는 약 17 kDa의 칼슘

결합 단백질로, 중추신경계 미세아교세포에서 특이적으로 발현되고— 미세아교세포 마커로 널리 사용되어 왔다 [15-17]

[0153] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 19의 A) 마우스의 흑질에는 미세아교세포(화살표로 표시)가 존재하고, 비히클 대조군(도 19의 B) 마우스의 흑질 내 미세아교세포 수는 블랭크 대조군보다 높으며, 플라스미노젠 투여군(도 19의 C) 마우스의 흑질 내 미세아교세포 수는 비히클 군보다 유의하게 낮고, 블랭크 대조군에 근접한다. 상기 결과에 따르면 플라스미노젠은 파킨슨 모델 마우스의 흑질 미세아교세포 수에 영향을 미친다.

[0154] **실시예 8 파킨슨 모델 마우스의 선조체 수초 회복을 촉진할 수 있는 플라스미노젠**

[0155] 12마리의 9주령 C57 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 마우스는 30 mg/kg 체중에 따라 매일 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[6-7]. MPTP 용액의 조제: 주사기로 10 ml의 탈이온수를 취하고, 100 mg의 MPTP 분말(sigma, M0896)에 첨가하여, 10 mg/ml의 모액으로 조제하며, 앰플에 1 ml의 모액을 취한 다음, 1 ml의 탈이온수를 첨가하고, 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후 마우스를 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는데, 비히클 PBS 투여 대조군 및 플라스미노젠 투여군으로 각각 6마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 플라스미노젠 투여군 마우스는 1 mg/0.1 ml/마리/일에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클 PBS 투여 대조군은 동일한 부피의 PBS를 꼬리 정맥 주사하며, 14일 동안 연속 투여하였다. 투여 15일차에 마우스를 희생시키고, 마우스의 선조체를 취하여 10% 중성 포름알데히드 용액에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 선조체 조직을 알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 조직 절편의 두께는 3 μm이고, 물로 탈납한 후 0.1% LFB 염색액을 사용하여 밀봉하에 8 ~ 16 h 동안 딥 염색하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하였다. 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰 및 촬영하였다.

[0156] 신경퇴행성질환은 뇌 및 척수의 뉴런 또는 이의 수초의 소실로 인한 질환을 의미한다. LFB(Luxol fast blue)는 수초 특이적 염색 방법으로 수초의 손상 상황을 반영할 수 있다^[18-19].

[0157] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 20의 A) 마우스의 선조체에는 일정량의 수초가 존재하고, 비히클군(도 20의 B) 마우스의 선조체 수초 염색은 블랭크 대조군보다 적으며, 플라스미노젠 투여군(도 20의 C) 마우스의 선조체 수초 염색은 비히클군보다 유의하게 많고, 블랭크 대조군에 근접한다. 상기 결과에 따르면 플라스미노젠은 파킨슨 모델 마우스의 선조체 수초를 일정한 정도로 회복시킬 수 있다.

[0158] **실시예 9 파킨슨 모델 마우스의 흑질 α-시누클레인 발현을 감소시킬 수 있는 플라스미노젠**

[0159] 28마리의 10 ~ 12주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는데, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μl의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는데, 비히클군 및 투여군으로 각각 10마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μl/마리에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μl/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 흑질을 취하여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 3 μm이고, 절편을 탈납 및 재수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 α-synuclein 항체(Proteintech, 10842-1-AP)를 적가하여 4°C에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 중성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0160] 파킨슨병은 현재 중뇌 흑질 도파민성 뉴런의 결실 및 루이소체의 발생으로 유발된 것으로 간주하고 있다. α-시

누클레인(α -synuclein)은 140개의 아미노산 잔기로 구성된 하나의 뉴런 단백질로, 뉴런 소상을 유발할 수 있고, 중추신경계 신경 변성 과정에 관여하며, 연구에 따르면 신경 세포의 루이소체 및 시냅스에 응집된 α -synuclein은 파킨슨병의 뇌 병변의 표지로 나타났다^[20].

[0161] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 21의 A) 마우스의 흑질에는 소량의 α -시누클레인(α -synuclein)만 있고, 비히클군(도 21의 B) 마우스의 흑질 α -시누클레인의 양은 블랭크 대조군보다 유의하게 높으며(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄), 플라스미노젠 투여군(도 21의 C) 마우스의 흑질 α -시누클레인의 양은 비히클군보다 유의하게 낮고, 블랭크 대조군에 근접하며, 통계학적 차이가 현저하다(*는 $P < 0.05$ 를 나타냄)(도 21의 D). 이는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 흑질 α -시누클레인의 발현을 감소시키고 신경 손상 변성을 개선할 수 있음을 나타낸다.

[0162] **실시예 10 파킨슨 모델 마우스의 선조체 축삭 손상을 개선할 수 있는 플라스미노젠**

[0163] 28마리의 10 ~ 12주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μ l의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클군 및 투여군으로 각각 10마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μ l/마리에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μ l/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 흑질을 취하여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 3 μ m이고, 절편을 탈납 및 제수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 NF 항체(Abcam, ab207176)를 적가하여 4°C에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam, ab6721) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 증성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0164] 파킨슨 환자는 질병 과정에서 축삭 손상이 있고, 축삭 손상의 중증도는 질병의 경과가 연장됨에 따라 계속 증가될 수 있다. 신경세사(Neurofilaments, NF)는 신경 축삭의 주요 골격 단백질로, 뉴런의 정상적인 형태 유지 및 축삭 수송에 중요한 역할을 하며, 축삭 손상의 관련 바이오마커로 사용될 수 있다^[21].

[0165] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 22의 A) 마우스의 선조체에는 일정량의 NF(화살표로 표시)가 있고, 비히클군(도 22의 B) 마우스의 선조체 NF의 양은 블랭크 대조군보다 낮으며, 플라스미노젠 투여군(도 22의 C) 마우스의 선조체 내 NF의 양은 비히클군보다 유의하게 높고, 통계학적 차이가 매우 현저하다(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄)(도 22의 D). 이는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 NF 회복을 촉진하고 파킨슨 축삭 손상을 복구할 수 있음을 나타낸다.

[0166] **실시예 11 파킨슨 모델 마우스의 선조체 GFAP 발현을 감소시킬 수 있는 플라스미노젠**

[0167] 28마리의 10 ~ 12주령 C57BL/6J 수컷 마우스를 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 8마리이며, 모델군은 20마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μ l의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모델군 마우스는 체중에 따라 랜덤으로 두 그룹으로 나누었는 바, 비히클군 및 투여군으로 각각 10마리이며, 투여하기 시작하고, 1일차로 기록하며, 투여군 마우스는 1 mg/100 μ l/마리에 따라 플라스미노젠 용액을 꼬리 정맥 주사하고, 비히클군은 100 μ l/마리의 비히클 용액(10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 용액, pH 7.4)을 주사하며, 14일 동안 연속 투여하고, 투여 15일차에 희생시키며, 마우스의 흑질을 취하

여 4% 파라포름알데히드에 24 ~ 48시간 동안 고정시켰다. 고정된 뇌 조직알코올 구배로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 파라핀 포매를 수행하였다. 절편 흑질을 정위하고, 절편의 두께는 3 μm이고, 절편을 탈납 및 재수화하고 물로 1회 세척하였다. PAP 펜으로 조직에 동그라미를 치고, 3% 과산화수소로 15분 동안 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 5%의 정상 염소 혈청액(Vector laboratories, Inc., USA)으로 30분 동안 차단하고; 시간이 다 되면 염소 혈청을 버리고, 토끼 항 마우스 GFAP 항체(Abcam, ab7260)를 적가하여 4°C에서 밤새 배양하며, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam, ab6721) 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양하고, 0.01 M의 PBS로 매회 5분씩 2회 세척하였다. DAB 키트(Vector laboratories, Inc., USA)에 따라 발색하고, 물로 3회 세척한 다음 헤마톡실린으로 30초 동안 대조염색하며, 흐르는 물로 5분 동안 세척하였다. 구배 알코올로 탈수하고 자일렌으로 투명하게 한 다음 증성 검으로 절편을 밀봉하며, 절편은 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0168] 신경교섬유질산성단백질(gilaI fibrillary acidic protein, GFAP)은 정상교세포 콜라겐을 구성하는 중요한 성분이고, 정상교세포 신경아교원섬유 중간 섬유에만 존재하며, 정상교세포 활성화의 특징적인 마커이고^[22], 뉴런에 대해 염증성 손상 작용이 있으며, 뉴런을 변성시켜 파킨슨의 발생을 유발한다.

[0169] 결과에 따르면, 블랭크 대조군(도 23의 A) 마우스의 선조체는 소량의 GFAP(화살표로 표시)를 발현하고, 비히클 군(도 23의 B) 마우스의 선조체 GFAP의 발현량은 블랭크 대조군보다 유의하게 높으며, 플라스미노젠 투여군 마우스(도 23의 C)의 선조체 GFAP의 발현량은 비히클군보다 낮다. 이는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 선조체 GFAP 발현을 감소시키고 선조체 손상을 경감시킬 수 있음을 나타낸다.

[0170] **실시예 12 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 α-시누클레인의 분해를 촉진하는 플라스미노젠**

[0171] 11 ~ 12주령, 18 ~ 25 g의 C57BL/6J 수컷 마우스를 8마리 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 4마리이고, 모델군은 4마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μl의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모든 마우스에 대해 오픈 필드 실험을 수행하고, 모델링이 성공적임을 동정하였다. 모든 마우스를 희생시킨 다음 전체 뇌를 취하여 무게를 측정하고, 150 mg 조직/mL PBS에 따라 각각 1×PBS(Thermo Fisher, pH 7.4; 10010-031)를 첨가하며, 4°C에서 균질화(1 min, 3 ~ 4회)하고, 균질화 후 4°C에서 원심분리(12000 rpm, 20 min)하며, 상층액을 취하여 새로운 EP 튜브에 넣었다.

[0172] Eppendorf(EP) 튜브를 취하여 각각 ① 블랭크 대조군, ② 비히클 대조군, ③ 플라스미노젠군으로 설정하고, 각 그룹에 5개의 평행 그룹을 설정하였다. 블랭크 대조군에 21.5 μL의 생리식염수, 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 비히클 대조군에 21.5 μL의 α-시누클레인 용액(Shanghai Qiangyao Biotechnology Co., Ltd, 인간 α-시누클레인의 맞춤 제작 및 발현, UniProtKB-P37840, 1.0 mg/mL), 4.6 μL의 비히클 용액(10 mM의 시트르산나트륨, 2% 아르기닌염산염, 3% 만니톨, pH 7.4), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하며; 플라스미노젠군에 21.5 mL의 α-시누클레인 용액(1.0 mg/mL), 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하였다. 각 그룹의 샘플을 첨가한 후, 37°C에서 6 h 동안 배양하고 50 μL의 0.1% 트리플루오로아세트산 용액을 각각 첨가하여 반응을 종결시켰다.

[0173] Tris-Tricine-SDS-PAGE 겔 제조 키트(Solarbio, P1320)의 겔 조제 지침에 따라 12% 겔을 제조하였다. 각 그룹의 샘플은 각각 4×로딩 완충액(TaKaRa, e2139)과 3:1의 부피비로 골고루 혼합한 다음, 100°C에서 5 min 동안 가열하고, 냉각 후 2 min 동안 원심분리하며, 그 다음 20 μL의 샘플을 로딩하였다. 전기영동 조건은 30 V에서 1.5 h 동안 실행한 다음, 100 V에서 겔 바닥까지 전기영동하는 것이다. 전기영동 후 겔을 벗겨내고 1% 쿠마시브릴리언트 블루 염색액(1 g의 쿠마시브릴리언트 블루 R250을 에탄올:빙초산:정제수의 부피비가 5:2:13인 1000 ml의 혼합액에 용해시킴)에서 30 min 동안 염색한 다음, 탈색액(정제수:빙초산:무수 에탄올=17:2:1 부피비 혼합)으로 깨끗해질 때까지 탈색하였다. 겔은 바이오 분자 이미지 분석기로 촬영 및 정량적 스캐닝 분석하였다.

[0174] 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(***는 P<0.001을 나타냄), 이의 중합체 a, b의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(**는 P<0.01을 나타내고, ***는 P<0.001을 나타냄); 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠군의 α-시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(***는 P<0.001을 나타냄), 이의 중합체 a, b의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 현저하다(*는 P<

0.05를 나타내고, **는 $P < 0.01$ 을 나타냄)(도 24). 이는 파킨슨 모델 마우스 및 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠이 인간 α -시누클레인 및 이의 중합체를 효과적으로 분해할 수 있음을 나타낸다.

[0175] **실시예 13 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 α -시누클레인의 분해를 촉진하는 플라스미노젠**

[0176] 11 ~ 12주령, 18 ~ 25 g의 C57BL/6J 수컷 마우스를 8마리 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 4마리이고, 모델군은 4마리이다. 모델링 시간을 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μ l의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모든 마우스에 대해 오픈 필드 실험을 수행하고, 모델링이 성공적임을 동정하였다. 모든 마우스를 희생시킨 다음 전체 뇌를 취하여 무게를 측정하고, 150 mg 조직/mL PBS에 따라 각각 1×PBS(Thermo Fisher, pH 7.4; 10010-031)를 첨가하며, 4°C에서 균질화(1 min, 3 ~ 4회)하고, 균질화 후 4°C에서 원심분리(12000 rpm, 20 min)하며, 상층액을 취하여 새로운 EP 튜브에 넣었다.

[0177] Eppendorf(EP) 튜브를 취하여 각각 ① 블랭크군, ② 블랭크 대조군, ③ 비히클 대조군, ④ 플라스미노젠군으로 설정하고, 각 그룹에 5개의 평행 그룹을 설정하였다. 블랭크군에 21.5 μ L의 생리식염수, 4.6 μ L의 비히클 용액(10 mM의 시트르산나트륨, 2% 아르기닌염산염, 3% 만니톨, pH 7.4), 23.9 μ L의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 블랭크 대조군에 21.5 μ L의 생리식염수, 4.6 μ L의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μ L의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하며; 비히클 대조군에 21.5 μ L의 α -시누클레인 용액(Shanghai Qiangyao Biotechnology Co., Ltd, 인간 α -시누클레인의 맞춤형 제작 및 발현, UniProtKB-P37840, 1.0 mg/mL), 4.6 μ L의 비히클 용액, 23.9 μ L의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 플라스미노젠군에 21.5 mL의 α -시누클레인 용액(1.0 mg/mL)(1.0 mg/mL), 4.6 μ L의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μ L의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하였다. 각 그룹의 샘플을 첨가한 후, 37°C에서 6 h 동안 배양하고 50 μ L의 0.1% 트리플루오로아세트산 용액을 각각 첨가하여 반응을 종결시켰다.

[0178] Tris-Tricine-SDS-PAGE 겔 제조 키트(Solarbio, P1320)의 겔 조제 지침에 따라 12% 겔을 제조하였다. 각 그룹의 샘플은 각각 4×로딩 완충액(TaKaRa, e2139)과 3:1의 부피비로 글고루 혼합한 다음, 100°C에서 5 min 동안 가열하고, 냉각 후 2 min 동안 원심분리하며, 그 다음 20 μ L의 샘플을 로딩하였다. 전기영동 조건은 30 V에서 1.5 h 동안 실행한 다음, 100 V에서 겔 바닥까지 전기영동하는 것이다. 전기영동 후 겔을 벗겨내고 PVDF 필름(GE, A29433753)에 전이하며, 전기영동 조건은 15 V, 2 h이다. 전이된 PVDF 필름을 차단 용액(5% 탈지 에멀션)에 담그고 4°C의 냉장고에서 밤새 차단하며, TBST(0.01 M의 Tris-NaCl, pH 7.6 완충액)로 4회 세척한 다음, 토끼 항 인간 α -시누클레인 항체(Proteintech, 10842-1-AP)를 첨가하고 실온에서 3 h 동안 배양하며, TBST로 4회 세척한 다음, 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam, ab6721) 2차 항체를 첨가하고 실온에서 1 h 동안 배양하며, TBST로 4회 세척한 다음, PVDF 필름을 깨끗한 이미징 플레이트에 놓고, Immobilon Western HRP Substrate(MILLIPORE, WBKLS0100)를 첨가하여 발색하며, 바이오 분자 이미지 분석기로 촬영하고 Image J로 정량적 분석하였다.

[0179] 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠군의 α -시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄), 이의 중합체 의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄); 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠군의 α -시누클레인의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하며(**는 $P < 0.01$ 을 나타냄), 이의 중합체의 양은 모두 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 현저하다(**는 $P < 0.001$ 을 나타냄)(도 25). 이는 파킨슨 모델 마우스 및 정상 마우스의 뇌 균질물에서 플라스미노젠이 인간 α -시누클레인 및 이의 중합체를 효과적으로 분해할 수 있음을 나타낸다.

[0180] **실시예 14 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 Pro-BDNF의 절단을 촉진하는 플라스미노젠**

[0181] 11 ~ 12주령, 18 ~ 25 g의 C57BL/6J 수컷 마우스를 4마리 취하였다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μ l의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모든 마우스에 대해 오픈 필드 실험을 수행하고, 모델링이 성공적임을 동정하였다. 모든 마우스를 희생시킨 다음 전체 뇌를 취하여 무게를 측정하고, 150 mg 조직/mL PBS에 따라 각각 1×

PBS(Thermo Fisher, pH 7.4; 10010-031)를 첨가하며, 4°C에서 균질화(1 min, 3 ~ 4회)하고, 균질화 후 4°C에서 원심분리(12000 rpm, 20 min)하며, 상층액, 즉 뇌 균질액을 취하여 새로운 EP 튜브에 넣었다.

[0182] Eppendorf(EP) 튜브를 취하여 각각 ① 블랭크군, ② 블랭크 대조군, ③ 비히클 대조군, ④ 플라스미노젠군으로 설정하고, 각 그룹에 5개의 평행 그룹을 설정하였다. 블랭크군에 21.5 μL의 생리식염수, 4.6 μL의 비히클 용액(10 mM의 시트르산나트륨, 2% 아르기닌염산염, 3% 만니톨, pH 7.4), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 블랭크 대조군에 21.5 μL의 생리식염수, 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하며; 비히클 대조군에 21.5 μL Pro-BDNF(Nanjing Jinsirui, 인간 Pro-BDNF의 맞춤형 제작 및 발현, UniProtKB-P23560, 1.0 mg/mL), 4.6 μL의 비히클 용액, 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 플라스미노젠군에 21. μL Pro-BDNF(1.0 mg/mL), 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하였다. 각 그룹의 샘플을 첨가한 후, 37°C에서 6 h 동안 배양하고 50 μL의 0.1% 트리플루오로 아세트산 용액을 각각 첨가하여 반응을 종결시켰다.

[0183] SDS-PAGE의 겔 조제 지침에 따라 12% 겔을 제조하였다. 각 그룹의 샘플은 각각 4×로딩 완충액(TaKaRa, e213 9)과 3:1의 부피비로 골고루 혼합한 다음, 100°C에서 5 min 동안 가열하고, 냉각 후 2 min 동안 원심분리하며, 그 다음 20 μL의 샘플을 로딩하였다. 전기영동 조건은 30 V에서 45 min 동안 실행한 다음, 100 V에서 겔 바닥까지 전기영동하는 것이다. 전기영동 후 겔을 벗겨내고 1% 쿠마시 브릴리언트 블루 염색액(1 g의 쿠마시 브릴리언트 블루 R250을 에탄올:빙초산:정제수의 부피비가 5:2:13인 1000 ml의 혼합액에 용해시킴)에서 30 min 동안 염색한 다음, 탈색액(정제수:빙초산:무수 에탄올=17:2:1 부피비 혼합)으로 깨끗해질 때까지 탈색하였다. 겔은 바이오 분자 이미지 분석기로 촬영 및 정량적 스캐닝 분석하였다.

[0184] 뇌 유래 신경 영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)는 분자량이 12.3 kD인 알칼리성 단백질의 일종으로, 119개의 아미노산 잔기로 구성되고, 3쌍의 이황화 결합을 포함하며, 체내에서 이량체의 형태로 존재하고, BDNF 전구체의 형태로 합성되며, BDNF 전구체(Pro-BDNF)는 효소 분해 작용을 통해 절단되어 성숙한 BDNF를 형성할 수 있다. 문헌에는 Pro-BDNF가 절단되어 형성된 성숙한 BDNF와 반대 작용을 갖는다는 것이 보고되어 있다. Pro-BDNF는 신경 세포 사멸을 촉진하고, 시냅스의 가소성을 감소시킨다. 성숙한 BDNF 및 이의 수용체는 중추신경계 내에 널리 분포되고, 중추신경계 발육 과정에서 뉴런의 생존, 분화, 성장 및 발육에 중요한 작용을 하며, 뉴런이 손상되어 사멸되는 것을 방지하고 뉴런의 병리학적 상태를 개선하며 손상된 뉴런의 재생 및 분화 등 생물학적 효과를 촉진할 수 있고, 성숙한 중추 및 말초 신경계의 뉴런의 생존 및 정상적인 생리학적 기능을 유지하는 데 필수적인 것이다^[24].

[0185] 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 플라스미노젠군의 Pro-BDNF의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 매우 현저하다(***는 P<0.001을 나타냄)(도 26). 이는 플라스미노젠이 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 Pro-BDNF의 절단을 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[0186] **실시에 15 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질물에서 Pro-BDNF의 절단을 촉진하여 성숙한 BDNF를 형성하는 플라스미노젠**

[0187] 11 ~ 12주령, 18 ~ 25 g의 C57BL/6J 수컷 마우스를 8마리 취하고, 모델링 1일 전에 무게를 측정하며, 체중에 따라 랜덤으로 2 그룹으로 나누었는 바, 블랭크 대조군은 4마리이고, 모델군은 4마리이다. 모델링 시간은 매일 아침 9시로 정하고, 블랭크 대조군은 200 μl의 생리식염수를 복강내 주사하며; 모델군은 35 mg/kg/마리에 따라 5 mg/ml의 MPTP 용액을 복강내 주사하고, 5일 동안 연속 주사하여, 파킨슨 모델을 구축하였다^[5]. MPTP 용액의 조제: 45 mg의 MPTP(Sigma, M0896)를 취하여 9 ml의 생리식염수 용액에 용해시키고, 조제 최종 농도는 5 mg/ml이다. 모델링 완료 후, 즉 모델링 6일차에 모든 마우스에 대해 오픈 필드 실험을 수행하고, 모델링이 성공적임을 동정하였다. 모든 마우스를 희생시킨 다음 전체 뇌를 취하여 무게를 측정하고, 150 mg 조직/mL PBS에 따라 각각 1×PBS(Thermo Fisher, pH 7.4; 10010-031)를 첨가하며, 4°C에서 균질화(1 min, 3 ~ 4회)하고, 균질화 후 4°C에서 원심분리(12000 rpm, 20 min)하며, 상층액, 즉 뇌 균질액을 취하여 새로운 EP 튜브에 넣었다.

[0188] Eppendorf(EP) 튜브를 취하여 각각 ① 블랭크군, ② 블랭크 대조군, ③ 비히클 대조군, ④ 플라스미노젠군으로 설정하고, 각 그룹에 5개의 평행 그룹을 설정하였다. 블랭크 대조군에 21.5 μL의 생리식염수, 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하고; 비히클 대조군에 21.5 μL의 Pro-BDNF(Nanjing Jinsirui, 인간 Pro-BDNF의 맞춤형 제작 및 발현, UniProtKB-P23560, 1.0 mg/mL), 4.6 μL의 비히클 용액(시트르산-시트르산나트륨 용액), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하며; 플라스미노젠군에 21. μL의 Pro-BDNF(1.0 mg/mL), 4.6 μL의 플라스미노젠 용액(2 mg/mL), 23.9 μL의 마우스의 뇌 균질물을 첨가하였

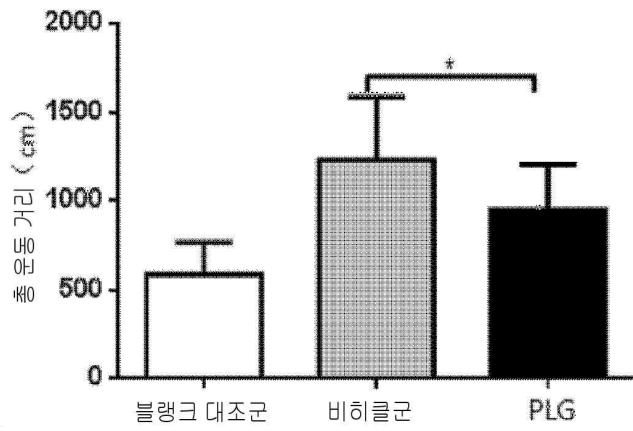
다. 각 그룹의 샘플을 첨가한 후, 37°C에서 6 h 동안 배양하고 50 μ L의 0.1% 트리플루오로아세트산 용액을 각각 첨가하여 반응을 종결시켰다.

- [0189] SDS-PAGE의 겔 조제 지침에 따라 12% 겔을 제조하였다. 각 그룹의 샘플은 각각 4×로딩 완충액(TaKaRa, e2139)과 3:1의 부피비로 글고루 혼합한 다음, 100°C에서 5 min 동안 가열하고, 냉각 후 2 min 동안 원심분리하며, 그 다음 20 μ L의 샘플을 로딩하였다. 전기영동 조건은 30 V에서 45 min 동안 실행한 다음, 100 V에서 겔 바닥까지 전기영동하는 것이다. 전기영동 후 겔을 벗겨내고 활성화된 PVDF 필름(GE, A29433753)에 전이하며, 전기영동 조건은 15 V, 2.5 h이다. 전이된 PVDF 필름을 차단 용액(5% 탈지 에멀션)에 담그고 4°C의 냉장고에서 밤새 차단하며, TBST(0.01 M의 Tris-NaCl, pH 7.6 완충액)로 4회 세척한 다음, 토끼 항 인간 BDNF 항체(Boster Biological Technology, PB9075)를 첨가하고 실온에서 3 h 동안 배양하며, TBST로 4회 세척한 다음, 염소 항 토끼 IgG(HRP) 항체(Abcam, ab6721) 2차 항체를 첨가하고 실온에서 1 h 동안 배양하며, TBST로 4회 세척한 다음, PVDF 필름을 깨끗한 이미징 플레이트에 놓고, Immobilon Western HRP Substrate(MILLIPORE, WBKLS0100)를 첨가하여 발색하며, 바이오 분자 이미지 분석기로 촬영하고 Image J로 정량적 분석하였다.
- [0190] 결과에 따르면, 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 플라스미노겐군의 Pro-BDNF의 양은 비히클 군보다 유의하게 낮고, 차이가 현저하며(*는 $P < 0.05$ 를 나타내고, ***는 $P < 0.001$ 을 나타냄); 플라스미노겐군의 BDNF의 양은 비히클 대조군보다 유의하게 높고, 차이가 매우 현저하다(도 27). 이는 플라스미노겐이 파킨슨 모델 마우스의 뇌 균질액에서 Pro-BDNF의 절단 및 성숙한 BDNF의 형성을 촉진할 수 있음을 나타낸다.
- [0191] 참고 문헌
- [0192] [1]M.Sedelis et al.Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's Disease[J].Behavioural Brain Research 125(2001)109-122.
- [0193] [2]Meredith G E,Totterdell S,Potashkin J A,et al.Modeling PD pathogenesis in mice advantages of a chronic MPTP protocol[J].Parkinsonism Relat Disord,2008,14(Suppl 2):S112-S115.
- [0194] [3]Ken Ikeda,Junya Ebina,Kiyokazu Kawabe and Yasuo Iwasaki.Dopamine Transporter Imaging in Parkinson Disease:Progressive Changes and Therapeutic Modification after Anti-parkinsonian Medications [J].Internal Medicine,2019,58:1665-1672.
- [0195] [4]HEBERT AE,DASH PK.Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage [J].Pharmacology Biochemistry and Behavior,2004,79(1):143-153.
- [0196] [5]Won-Seok Choi,et al.Conditional deletion of Ndufs4 in dopaminergic neurons promotes Parkinson's disease-like nonmotor symptoms without loss of dopamine neurons.Scientific Reports.
- [0197] [6]Vernice Jackson-Lewis1 & Serge Przedborski.Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's Disease [J].Nature protocols VOL.2 NO.1,2007(141).
- [0198] [7]N.A.Tatton and S.J.Kish.In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labeling and acridine orange staining[J].Neuroscience Vol.77,No.4,pp.1037-1048,1997.
- [0199] [8]D J Drucker,J Philippe,S Mojsov et al.Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line.Proc Natl Acad Sci U S A.1987 May; 84(10):3434-3438.
- [0200] [9]Mojsov S,Weir GC,Habener JF.Insulinotropin:glucagon-like peptide I(7-37)co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas.J Clin Invest.1987 Feb; 79(2):616-9.
- [0201] [10]Li Y,Perry T,Kindy M.S,et al.(2009).GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.106,1285-1290.
- [0202] [11]Toshiharu Nagatsu,Akria Nakashima,et al.Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders.Journal of Neural Transmission,2019,126:397-409.

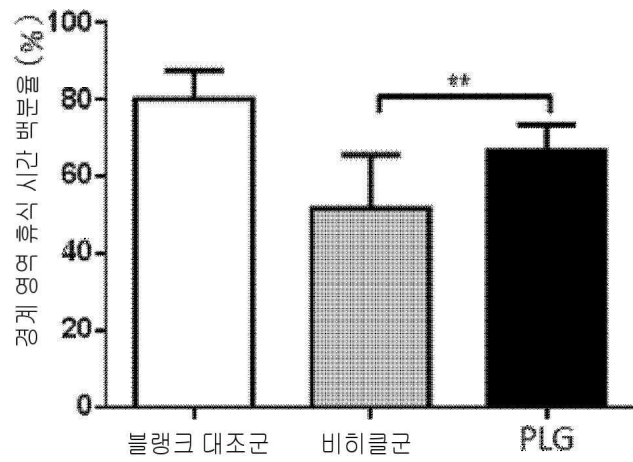
- [0203] [12]Lee TI, Yang CS, Fang KM, Tzeng SF (2009) Role of ciliary neurotrophic factor in microglial phagocytosis. *Neurochem Res* 34:109-117.
- [0204] [13]Liuzzi GM, Latronico T, Rossano R, Viggiani S, Fasano A, Riccio P (2007). Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on MMP-9 release from microglial cells-implications for complementary multiple sclerosis treatment. *Neurochem Res* 32:2184-2193.
- [0205] [14]Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Un ~ a AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF (2007) The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res* 32:279-292.
- [0206] [15]Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y et al (2005) Visualization of microglia in living tissues using Ibal-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81:357-362.
- [0207] [16]Kalm M, Lannering B, Björk-Eriksson T, Blomgren K (2009). Irradiation-induced loss of microglia in the young brain. *J Neuroimmunol* 206:70-75.
- [0208] [17]Li ZH, Lu J, Tay SS, Wu YJ, Strong MJ, He BP (2006) Mice with targeted disruption of neurofilament light subunit display formation of protein aggregation in motoneurons and downregulation of complement receptor type 3 alpha subunit in microglia in the spinal cord at their earlier age: a possible feature in preclinical development of neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1113:200-209.
- [0209] [18]Khodanovich M Y, Sorokina I V, Glazacheva V Y, et al. Histological validation of fast macromolecular proton fraction mapping as a quantitative myelin imaging method in the cuprizone demyelination model [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46686.
- [0210] [19]Wang C, Sun C, Hu Z, et al. Improved neural regeneration with olfactory ensheathing cell inoculated PLGA scaffolds in spinal cord injury adult rats [J]. *Neurosignals*, 2017, 25(1):1-14.
- [0211] [20]KALIA L V, KALIA S K. Alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol*, 2015, 28(4): 375-381.
- [0212] [21]Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1998, 61:1-23.
- [0213] [22]Middelorp J, Hol E. GFAP in health and disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 93:421-443.
- [0214] [23]Yokoyama H, Uchida H, Kuroiwa H, et al. Role of glial cells in neurotoxin induced animal models of Parkinson's disease [J]. *Neurol Sci*, 2011, 32(1):1-7.
- [0215] [24]Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr; 38(3):579-593.

도면

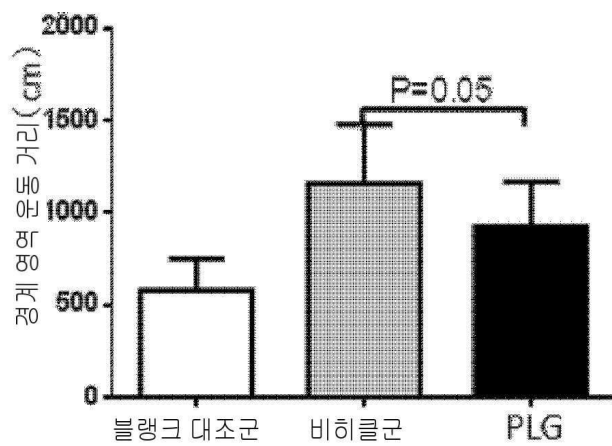
도면1



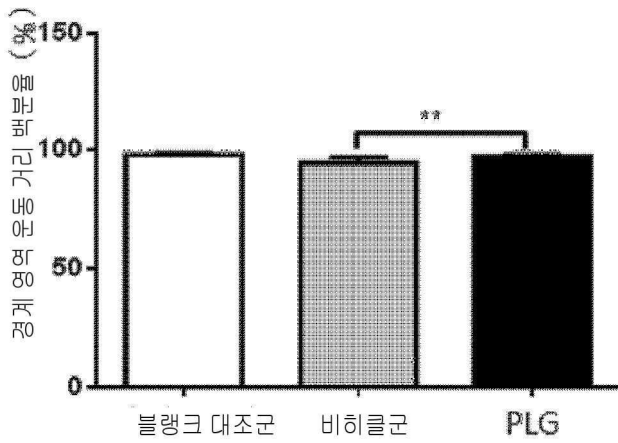
도면2



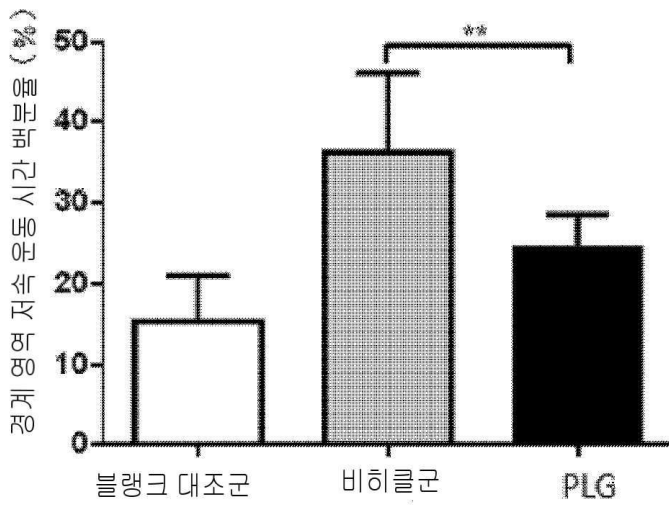
도면3



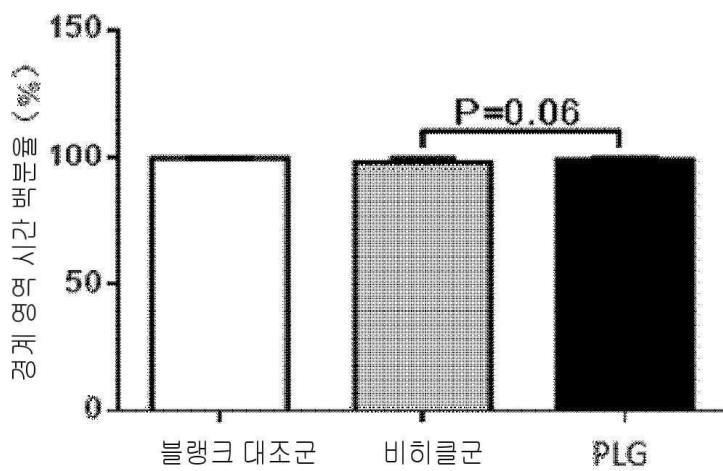
도면4



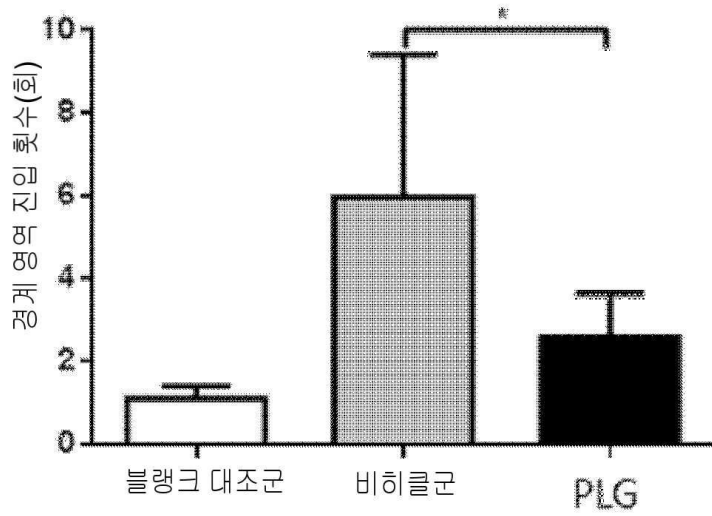
도면5



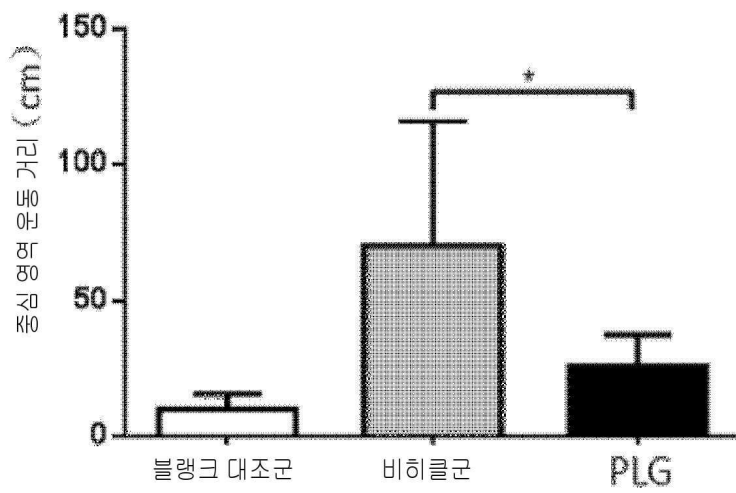
도면6



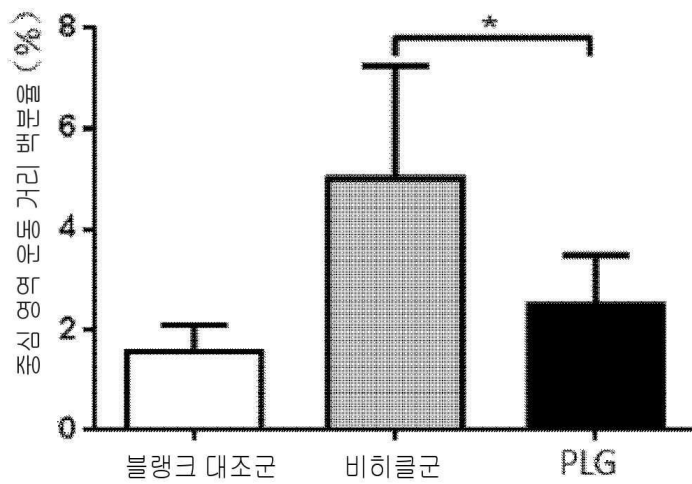
도면7



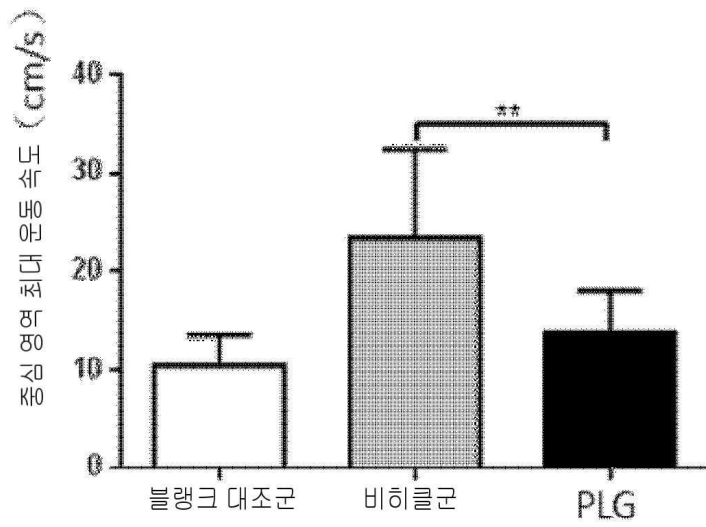
도면8



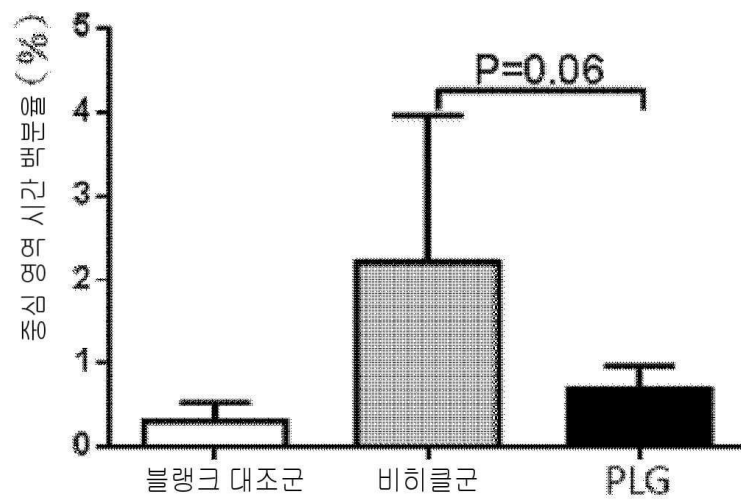
도면9



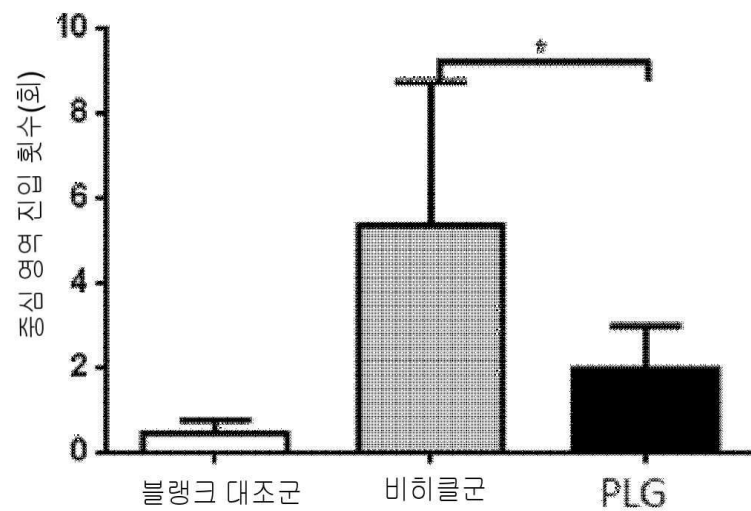
도면10



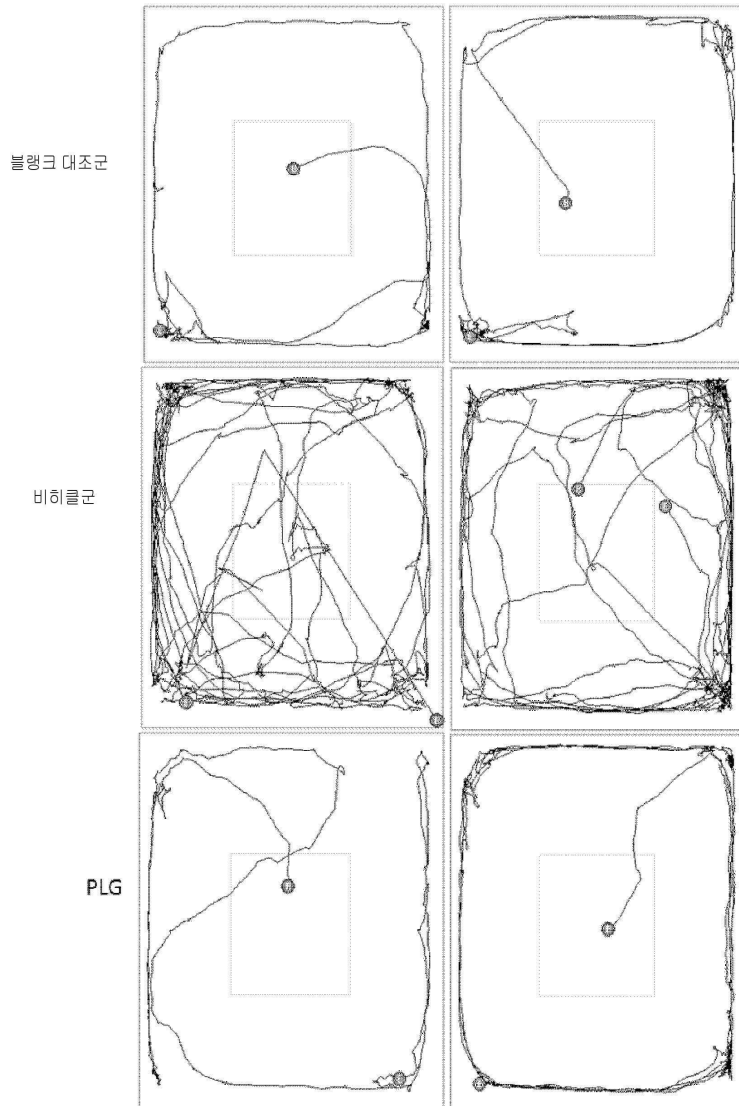
도면11



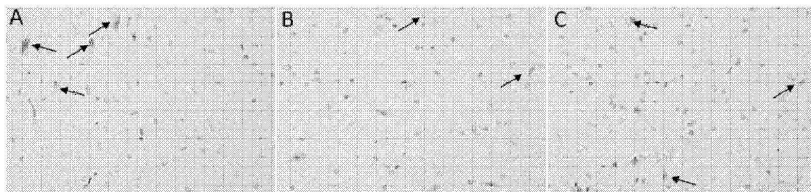
도면12



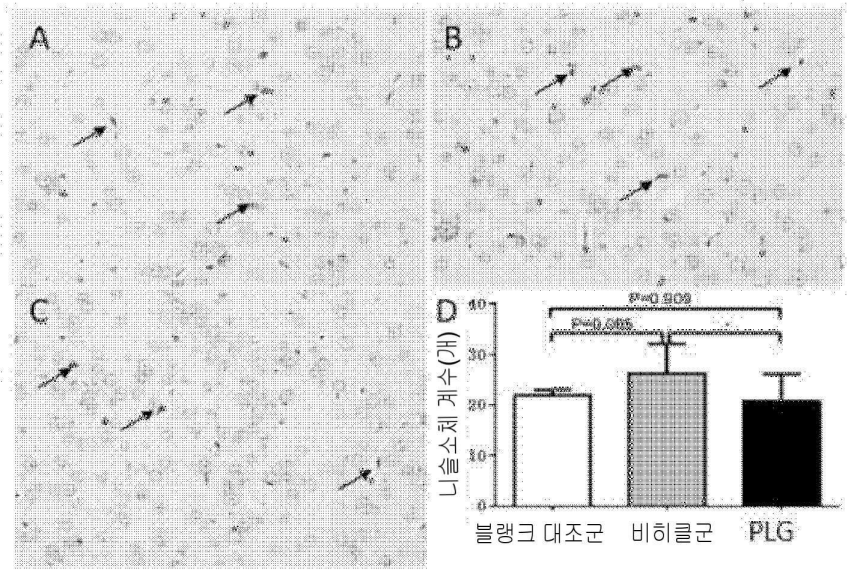
도면13



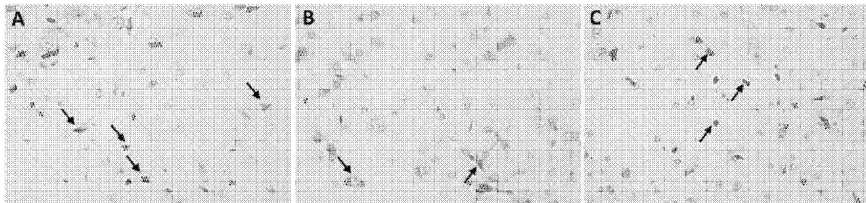
도면14



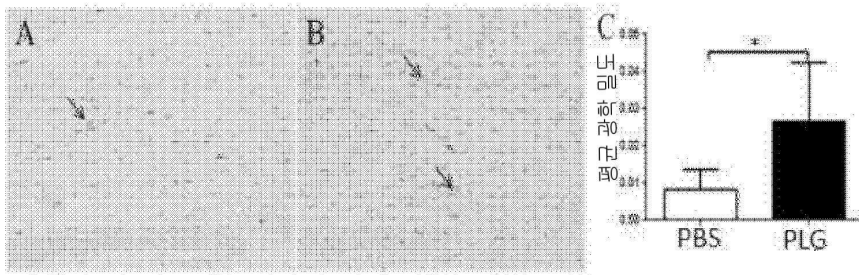
도면15



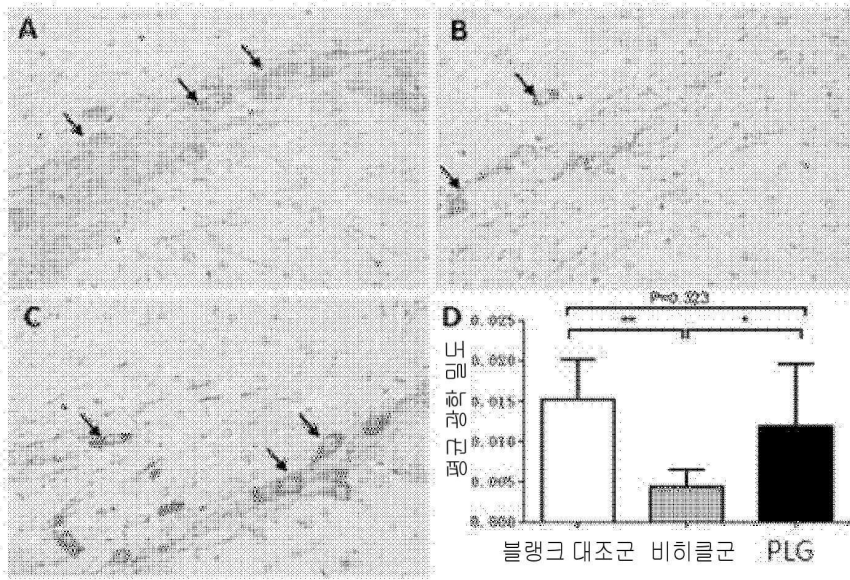
도면16



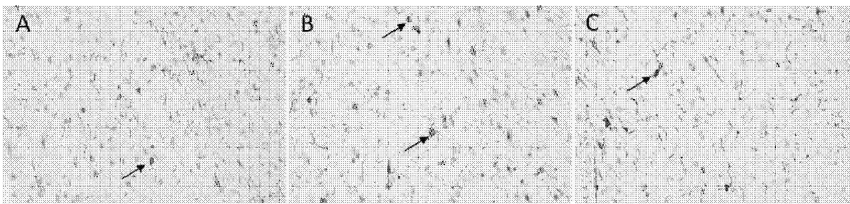
도면17



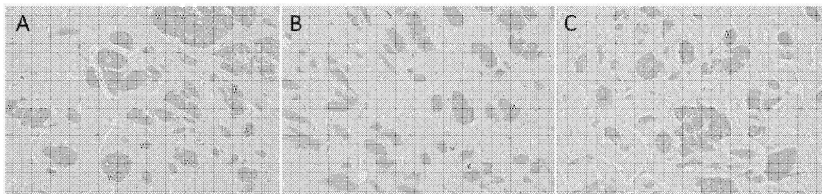
도면18



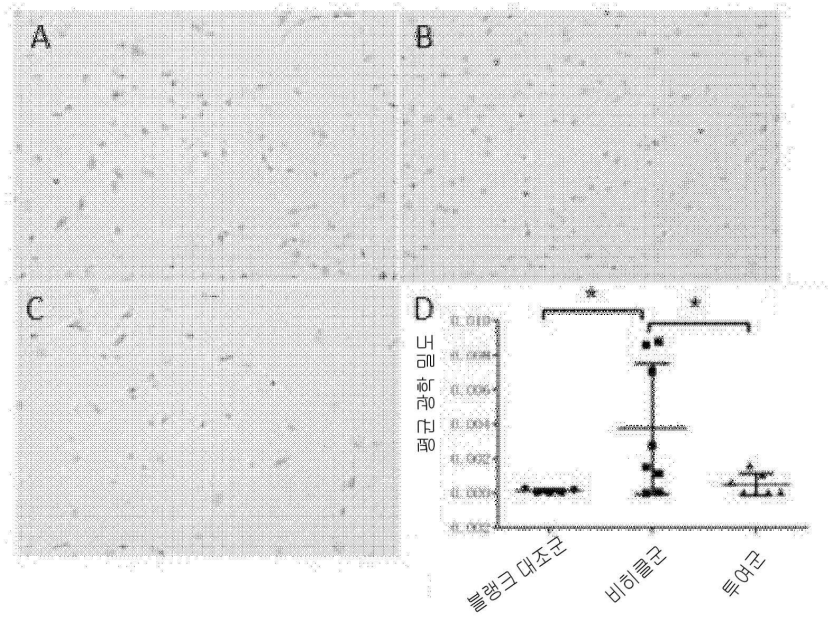
도면19



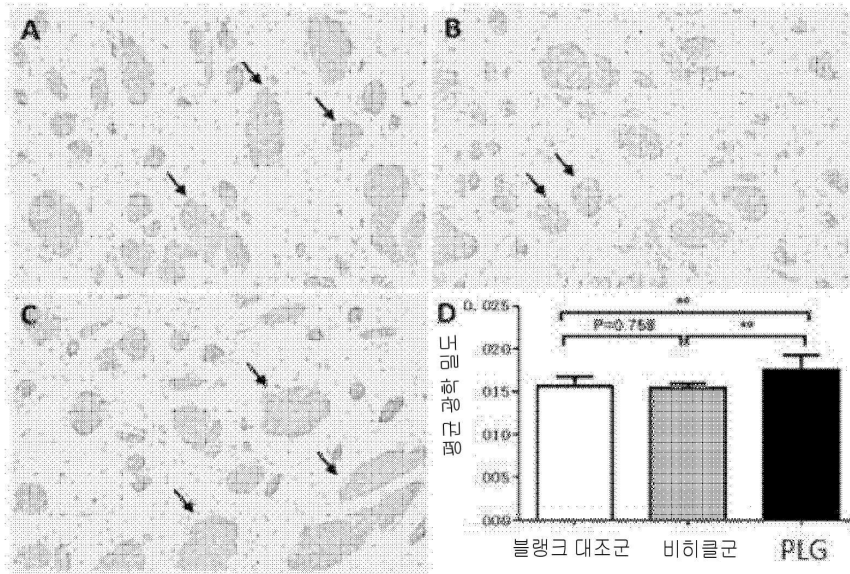
도면20



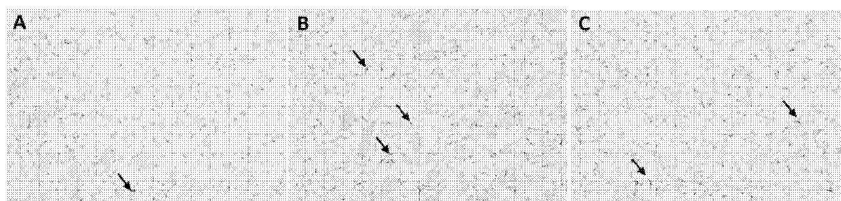
도면21



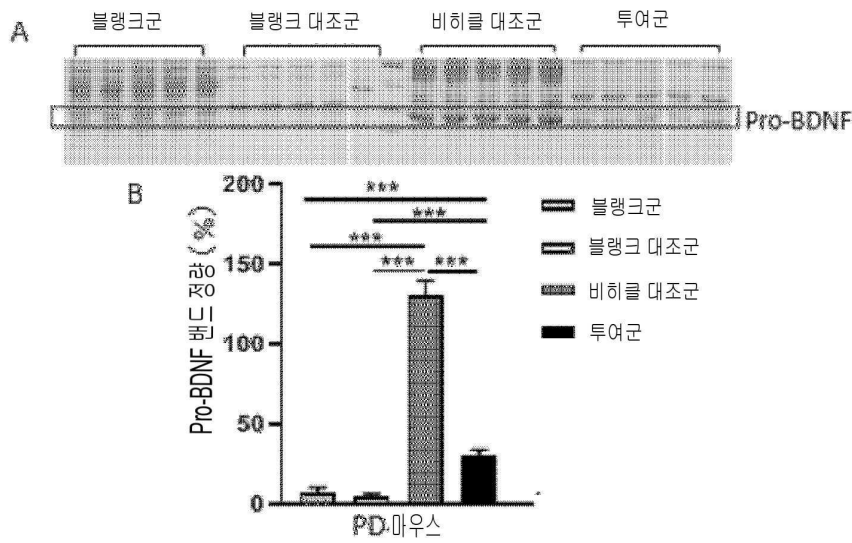
도면22



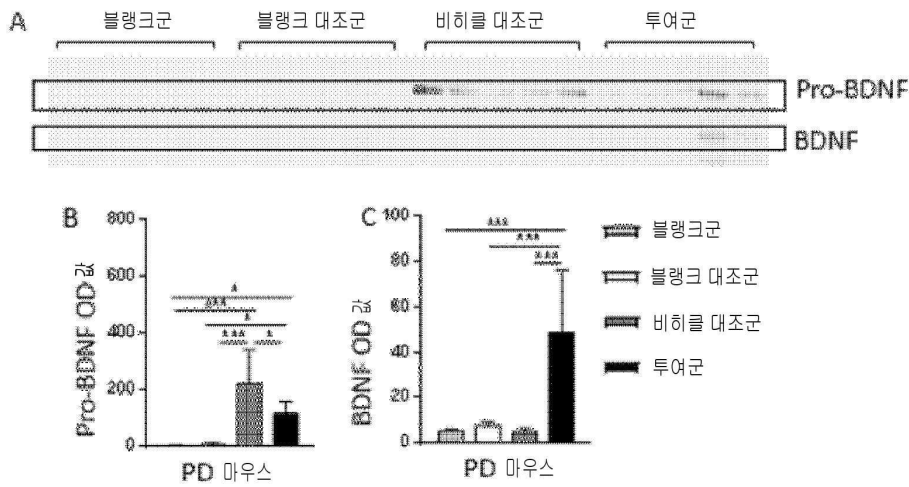
도면23



도면26



도면27



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED

<120> METHOD AND DRUG FOR TREATING PARKINSON' S DISEASE

<130> FE00367PCT

<150> 2020102129224

<151> 2020-03-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2376

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleotide sequence of the natural plasminogen(Glu-PLG,Glu-plasminogen)without the signal peptide

<400> 1

```

gagcctctgg atgactatgt gaatacccag ggggcttcac tgttcagtgt cactaagaag      60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc      120

acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac      180
aggaagtctt ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat      240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa      300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagttcc acttctcccc acagacctag attctcacct      360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg      420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt      480
gagtgtgaag aggaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacggcaa aatttccaag      540

accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gcccacacgc tcatggatac      600
attccttcca aatttcaaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa ccccgatagg      660
gagctgcggc ctigggtgtt caccaccgac cccaacaagc gctgggaact ttgtgacatc      720
ccccgtgca caacacctcc accatcttct ggtcccact accagtgtct gaaggggaaca      780
ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctgtt accgtgtccg ggcacacctg tcagcactgg      840
agtgcacaga ccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg      900
gatgaaaact actgccgcaa tctgacgga aaaagggccc catggtgcca tacaaccaac      960

agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata ccgtcctgtg actcctcccc agtatccacg     1020
gaacaattgg ctcccacagc accacctgag ctaaccctg tggfccagga ctgctacat      1080
ggtgatggac agagctaccg aggccatcc tcaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag      1140
tcttggtcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacc cagaaaacta ccaaatgct      1200
ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggccccctg gtgttttacc      1260
acagacccca gcgtcaggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg      1320
agtgtttagt cacctccgcc tgttgtcctg cttccagatg tagagactcc ttccgaagaa      1380

```

gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440
 acgcatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcatttt cactccagag 1500
 acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaat tactgcccga accctgatgg tgatgtaggt 1560
 ggtccctggt gctacacgac aaatccaaga aaactttacg actactgtga tgtccctcag 1620
 tgtgcggccc cttcatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccaagaa atgtcctgga 1680
 agggttgtag gggggtgtgt ggcccacca cttcctggc cctggcaagt cagtcttaga 1740
 acaaggtttg gaatgcactt ctgtggaggc accttgatat cccagagtg ggtgttact 1800

gctgcccact gcttgagaa gtcccgaagg cttcatcct acaagtcac cctgggtgca 1860
 caccaagaag tgaatctga accgcatgtt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920
 gagccacac gaaaagatat tgccctgcta aagctaagca gtcctgccgt catcactgac 1980
 aaagtaatcc cagcttgtct gccatccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040
 ttcactactg gctggggaga aaccaaggt acttttgag ctggccttct caaggaagcc 2100
 cagctccctg tgattgagaa taaagtgtc aatcgctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160
 caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220

agtggaggtc ctctggtttg cttcgagaag gacaaatata tttacaagg agtcacttct 2280
 tggggtcttg gctgtgcacg cccaataag cctggtgtct atgttcgtgt ttcaagttt 2340
 gttacttga ttgaggagat gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2

<211> 791

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of the natural plasminogen (Glu-PLG,Glu-plasminogen) without the signal peptide

<400> 2

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser

1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala

20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His

35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser

50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met
 85 90 95

Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100 105 110

Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115 120 125

Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130 135 140

Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu
 145 150 155 160

Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly
 165 170 175

Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser
 180 185 190

Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys
 195 200 205

Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro
 210 215 220

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile
 225 230 235 240

Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys
 245 250 255

Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val
 260 265 270

Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His
 275 280 285

Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr
 290 295 300

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn

Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln
 565 570 575

Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu
 580 585 590

Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser
 595 600 605

Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val
 610 615 620

Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu
 625 630 635 640

Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala
 645 650 655

Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr
 660 665 670

Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr
 675 680 685

Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val
 690 695 700

Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val
 705 710 715 720

Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser
 725 730 735

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys
 740 745 750

Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro
 755 760 765

Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile
 770 775 780

Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 785 790

<210> 3

<211> 2433

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleotide sequence of the natural plasminogen(from swiss prot)with the signal peptide

<400> 3

```

atggaacata aggaagtgtt tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag      60
cctctggatg actatgtgaa taccagggg gcttctactgt tcagtgtcac taagaagcag      120
ctgggagcag gaagataga agaatgtgca gcaaatgtg aggaggacga agaattcacc      180
tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaacagg      240

aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc      300
tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtcca aacaaaaaat      360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctcccaca gacctagatt ctcacctgct      420
acacaccctt cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagaca cgatccgag      480
gggcctgtgt gctatactac tgatccagaa aagagatag actactgcga cattcttgag      540
tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtgga gaaaactatg acggcaaat tccaagacc      600
atgtctggac tggaatgcca ggcctgggac tctcagagcc cacacgtca tggatacatt      660

ccttccaaat ttcaaacia gaacctgaag aagaattact gtcgtaacc cgatagggag      720
ctgcgcctt ggtgtttcac caccgacccc acaagcgtt gggaaacttg tgacatcccc      780
cgctgcacaa cacctccacc atcttctgtt cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt      840
gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gtgtccgggc acacctgtca gcaactggagt      900
gcacagacce ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttggat      960
gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccccatt ggtgccatac aaccaacagc      1020
caagtgcggt gggagtactg taagataaccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa      1080

caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt      1140
gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaagaa gtgtcagtct      1200
tggatcatct tgacaccaca ccggcaccag aagacccag aaaactacc aatgtctggc      1260
ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctgtgtg ttttaccaca      1320
gaccccagcg tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaaat gctcaggaac agaagecagt      1380
gtttagcac ctccgcctgt tgtcctgctt ccagatgtag agactccttc cgaagaagac      1440
tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg      1500

ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca      1560

```

aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga ttaggtggt 1620
 ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt 1680
 gcggcccctt catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcctggaagg 1740
 gttgtagggg ggigtgtggc ccaccacat tcttggccct ggcaagtcag tcttagaaca 1800
 aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 1860
 gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatcctaca aggtcatcct gggtgcacac 1920

caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag 1980
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 2040
 gtaatcccag ctigtctgcc atcccacaaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgtttc 2100
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 2160
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 2220
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 2280
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 2340

ggctcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttggt 2400
 acttggattg agggagtgat gagaataat taa 2433

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of the natural plasminogen(from swiss prot)with the signal peptide

<400> 4

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser

1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser

20 25 30

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu

35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe

50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg

65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 225 230 235 240
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His

Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 580 585 590
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 595 600 605
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 610 615 620
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 625 630 635 640
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 645 650 655
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670
 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 675 680 685
 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700
 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720
 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 725 730 735
 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750
 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 755 760 765
 Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 770 775 780
 Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 785 790 795 800
 Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 5

<211> 2145

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleotide sequence of LYS77-PLG(Lys-plasminogen)

<400> 5

```

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc      60
aaaacaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagtcca cttctccca cagacctaga      120
ttctcacctg ctacacacc ctcagaggga ctggaggaga actactgcag gaatccagac      180

aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc      240
gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa      300
atccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacgct      360
catggataca ttcttccaa atttccaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac      420
cccgataggg agctgcggcc ttggtgttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt      480
tgtgacatcc cccgctgcac aacacctcca ccatctctg gtcccaccta ccagtgtctg      540
aagggaacag gtgaaaacta tcgcgggaat tggctgtta ccgtgtccgg gcacacctgt      600

cagcactgga gtgcacagac ccctcacaca cataacagga caccagaaaa ctcccctgc      660
aaaaatttgg atgaaaacta ctgccgcaat cctgacggaa aaaggcccc atggtgccat      720
acaaccaaca gccaaagtgcg gtgggagtac tgtaagatac cgtctctgta ctctccca      780
gtatccacgg acaatttgc tcccacagca ccacctgagc taaccctgt ggtccaggac      840
tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag      900
aagtgtcagt cttggtcatc tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac      960
ccaaatgctg gcctgacaat gaactactgc aggaatccag atgccgataa aggcccctgg      1020

tgttttacca cagaccccag cgtcaggttg gagtactgca acctgaaaa atgctcagga      1080
acagaagcga gtgtttagc acctccgct gttgtctctgc ttccagatgt agagactcct      1140
tccgaagaag actgtatgtt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact      1200
gttactggga cgccatgcca ggactgggct gcccaggagc cccatagaca cagcattttc      1260
actccagaga caaatccagc ggcgggtctg gaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt      1320
gatgtaggtg gtcctggtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat      1380
gtccctcagt gtgcggcccc ttcatattgat tgtgggaagc ctcaagtgga gccgaagaaa      1440

tgtcctggaa gggttttagg ggggtgtgtg gccaccacc attcctggcc ctggcaagtc      1500
agtcttagaa caaggtttgg aatgcacttc tgtggaggca ccttgatc cccagagtgg      1560

```

gtgttgactg ctgcccactg cttggagaag tccccaaggc cttcatccta caaggcatc 1620
 ctgggtgcac accaagaagt gaatctcga cccatgttc aggaataga agtgtctagg 1680
 ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgc 1740
 atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccatcccaa attatgtggt cgctgaccgg 1800
 accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggccttctc 1860

aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920
 ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccggaggcac tgacagtgc 1980
 cagggtgaca gtggaggtcc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 2040
 gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 2100
 tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 2145

<210> 6

<211> 714

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of LYS77-PLG(Lys-plasminogen)

<400> 6

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg

1 5 10 15

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser

20 25 30

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser

35 40 45

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln

50 55 60

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys

65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn

85 90 95

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala

100 105 110

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe

Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 370 375 380

 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 405 410 415
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 420 425 430
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445

 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 450 455 460
 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 465 470 475 480
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 485 490 495
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 500 505 510

 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 515 520 525
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 530 535 540
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 545 550 555 560
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 565 570 575

 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 580 585 590
 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 595 600 605
 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln

ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg 780
 ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgc 840
 atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccatcccaaa attatgtggt cgctgaccgg 900
 accgaatggt tcatcactgg ctggggagaa acccaaggta cttttggagc tggccttctc 960
 aaggaagccc agtcacctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1020
 ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg cggaggcac tgacagtgc 1080

caggtgaca gtggaggctc tctggttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 1140
 gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 1200
 tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 1245

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of delta-plg(delta-plasminogen)

<400> 8

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser

1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala

20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His

35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser

50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr

65 70 75 80

Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met

85 90 95

Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser

100 105 110

Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu

115 120 125

Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp

130 135 140
 Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu

 145 150 155 160
 Glu Cys Glu Glu Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val
 165 170 175
 Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His
 180 185 190
 Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met
 195 200 205
 His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala

 210 215 220
 Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile
 225 230 235 240
 Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile
 245 250 255
 Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu
 260 265 270
 Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala

 275 280 285
 Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe
 290 295 300
 Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr
 325 330 335
 Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His

 340 345 350
 Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 355 360 365
 Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp
 370 375 380

Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

405 410

- <210> 9
- <211> 1104
- <212> DNA
- <213> Artificial sequence
- <220><223> nucleotide sequence of Mini-plg(mini-plasminogen)
- <400> 9

```

gtcaggtggg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgtttagca      60
cctccgcctg ttgtcctgct tccagatgia gagactcctt ccgaagaaga ctgtatgttt      120
gggaatggga aaggataccg aggcaagagg gcgaccactg ttactgggac gccatgccag      180
gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcattttca ctccagagac aaatccacgg      240
gcgggtctgg aaaaaaatta ctgccgtaac cctgatggtg atgtaggtgg tccctggtgc      300

tacacgaaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tccctcagtg tgcggcccct      360
tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtcttgaag ggtttaggg      420
gggtgtgtgg cccaccaca ttctggccc tggcaagtca gtcttagaac aaggtttgga      480
atgcacttct gtggaggcac cttgatatcc ccagagtggg tgttactgc tgcccactgc      540
ttggagaagt cccaaggcc ttatcctac aaggtcatcc tgggtgcaca ccaagaagtg      600
aatctgaac cgatgttca ggaaatagaa gtgtctaggc tgttcttga gccacacga      660
aaagatattg ctttctaaa gctaagcagt cctgccgtca tcaactgaaa agtaatccca      720

gcttgtctgc catcccaaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcactggc      780
tggggagaaa ccaaggtac ttttgagct ggccttctca aggaagcca gtcctctgtg      840
attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa      900
ctctgtgctg ggcatttggc cggaggcact gacagttgcc aggtgacag tggagtcct      960
ctggtttgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcaactcttg ggtcttggc      1020
tgtgcacgcc ccaataagcc tgggtctat gttcgtgttt caaggtttgt tacttggatt      1080
gagggagtga tgagaaataa ttaa                                          1104
    
```

- <210> 10
- <211> 367

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of Mini-plg(mini-plasminogen)

<400> 10

Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala

1 5 10 15

Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr

 20 25 30

Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly

 35 40 45

Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala

 50 55 60

Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg

65 70 75 80

Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly

 85 90 95

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys

 100 105 110

Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln

 115 120 125

Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala

 130 135 140

His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly

145 150 155 160

Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr

 165 170 175

Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val

 180 185 190

Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu

 195 200 205

Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala

 210 215 220

actggctggg gagaaaccca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480
 cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtttc tgaatggaag agtccaatcc 540
 accgaactct gtgctgggca tttggccgga ggcactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600
 ggtcctctgg ttgcttcga gaaggacaaa tacattttac aaggagtcac ttcttggggt 660
 cttggctgtg cagcccca taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gtttgttact 720

tggattgagg gagtgatgag aaataattaa 750

<210> 12

<211> 249

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of Micro-plg(micro-plasminogen)

<400> 12

Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys

1 5 10 15

Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro

20 25 30

Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly

35 40 45

Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu

50 55 60

Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln

65 70 75 80

Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu

85 90 95

Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser

100 105 110

Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro

115 120 125

Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly

130 135 140

Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu

145 150 155 160

Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly

165 170 175

Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr

180 185 190

Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys

195 200 205

Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala

210 215 220

Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr

225 230 235 240

Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

245

<210> 13

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleotide sequence of the serine protease domain

<400> 13

gttgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tcttggcct ggcaagtcag tcttagaaca 60

aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 120

gcccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatectaca aggtcatcct ggtgcacac 180

caagaagtga atctgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctagct gttcttgag 240

cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300

gtaatccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgttc 360

atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420

ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 480

tcccacgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca ggtgacagt 540

ggaggtcctc tggtttgett cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 600

ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggtttgtt 660

acttggattg agggagtgat gaga 684

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of the serine protease domain

<400> 14

Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val

1 5 10 15

Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile

 20 25 30

Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro

 35 40 45

Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn

 50 55 60

Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu

65 70 75 80

Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val

 85 90 95

Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val

 100 105 110

Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln

 115 120 125

Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile

 130 135 140

Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln

145 150 155 160

Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys

 165 170 175

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr

 180 185 190

Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn

 195 200 205

Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu

210

215

220

Gly Val Met Arg

225