(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월07일
(11) 등록번호 10-1517626
(24) 등록일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/48 (2006.01) *A61K 38/36* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7005738
(22) 출원일자(국제) 2007년08월28일
심사청구일자 2012년08월28일
(85) 번역문제출일자 2009년03월20일
(65) 공개번호 10-2009-0059122
(43) 공개일자 2009년06월10일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2007/050585
(87) 국제공개번호 WO 2008/026999
국제공개일자 2008년03월06일
(30) 우선권주장
60/823,665 2006년08월28일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003020297 A2
WO2003045466 A2
US20040265968 A1

(73) 특허권자
옴니오 헤아레르 에이비
스웨덴 에스-903 36 우메오 빌라베엔 1
(72) 발명자
뉘 토르
스웨덴 에스-901 87 우메오 빌라베엔 1
리 지난
스웨덴 에스-114 32 스톡홀름 엥겔브렉트스가탄 33
궈 융즈
스웨덴 에스-907 30 우메오 페다고그렌드 3에이치
(74) 대리인
특허법인코리아나

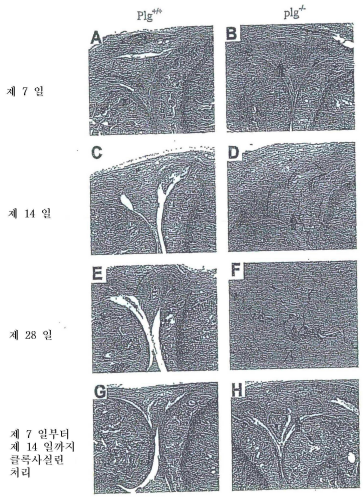
전체 청구항 수 : 총 20 항 심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **감염에 대항하는 후보물질**

(57) 요 약

본 발명은 플라스미노겐/플라스민 및 이의 유도체의, 감염 또는 기타 감염성 질환에 대항한 숙주 방어를 강화하는 작용제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 동물 모델에서 세균성 관절염 및 자발적 중이염에 대항하는 숙주 방어를 평가함으로써 감염에 대항한 숙주 방어를 강화하는 화합물들을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스미노겐의 변형체, 플라스미노겐의 크링글 도메인 및 미니-플라스미노겐으로부터 선택되는 유효량의 화합물을 포함하는, 세균성 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 세균성 감염성 질환이 중이염 및 세균성 관절염으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 세균성 감염성 질환이 폐렴, 감염에 의해 유발된 호흡 기관의 손상 및 감염에 의해 유발된 관절 조직의 손상으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 세균성 감염성 질환이 치은염, 치근막염 및 결막염으로부터 선택되는 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 제 1 항에 따른 둘 이상의 화합물의 조합물을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 적어도 하나의 항생제를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 항생제가 테트라사이클린계, 암페니콜계, 베타-락탐계, 페니실린계, 술폰아미드계, 마크로라이드계, 린코사미드계, 스트렙토그라민계, 스트렙토마이신계, 퀴놀론계 및 메트로니다졸계로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상이 포유동물인 약학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 대상은 플라스민 또는 플라스미노겐이 결핍된 것인 약학 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 결핍이 선천적, 후천적 및/또는 국부적인 것인 약학 조성물.

청구항 12

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 전신적으로, 국부적으로, 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 흡입을 통해, 척수강내로, 국소 주사를 통해, 관절내 주사를 통해 또는 직장으로 투여되는 약학 조성물.

청구항 13

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 폴리펩티드 담체 또는 안정화제와 조합하여 투여되는 약학 조성물.

청구항 14

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 0.05 mg 내지 10 mg 의 용량으로 투여되는 약학 조성물.

청구항 15

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물의 투여가 적어도 1 회 반복되는 약학 조성물.

청구항 16

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스미노겐의 변형체, 미니-플라스미노겐 및 플라스미노겐의 크링글 도메인으로부터 선택되는 화합물의 유효량 및 적어도 하나의 항생제 또는 항진균제를 별개의 바이알에 포함하는 창상 드레싱 (wound dressing) 을 감염 부분에 적용하는 것에 의해, 상기 화합물이 투여되는 약학 조성물.

청구항 17

제 1 항 및 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 세균성 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료가 세균성 감염성 병원균에 대항하여 면역 반응을 유도하는 것을 포함하는 약학 조성물.

청구항 18

플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스미노겐의 변형체, 미니-플라스미노겐 및 플라스미노겐의 크링글 도메인으로부터 선택되는 화합물의 유효량 및 적어도 하나의 항생제 또는 항진균제를 별개의 바이알들에 포함하는, 세균성 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용하기 위한 부품 키트.

청구항 19

제 9 항에 있어서, 대상이 인간인 약학 조성물.

청구항 20

제 14 항에 있어서, 상기 화합물이 0.5 내지 5 mg 의 용량으로 투여되는 약학 조성물.

청구항 21

제 15 항에 있어서, 상기 화합물의 투여가 적어도 매일 반복되는 약학 조성물.

청구항 22

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포외 기질에 영향을 미치는, 특별히 세균으로 인한, 감염성 질환 및 괴사성 상태의 예방, 방지 및/또는 치료를 위한 화합물 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 향상된 감염 방어, 보다 나은 괴사 조직 제거 및 기능적이고 심미적으로 만족스러운 조직 재형성 창출을 야기하는 그러한 화합물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세균 감염 및 조직 괴사의 연구를 위한 동물 모델, 세균 감염 및 조직 괴사에 대항하는 약물을 규명 및 평가하고 상기에 대한 치료 방법을 강화하는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 감염성 질환은 세균 및 바이러스와 같은 병원균, 및 단세포 진균 및 원생동물로부터, 기생충과 같은 대형의 복잡한 후생동물에 이르는 진핵 생물에 의해 유발된다. 병원성 세균은 숙주와의 상호작용을 매개하는 독성 인자를 함유하여, 상기 숙주 세포로부터 상기 병원균의 복제 및 유포를 촉진하는 특정 반응들을 이끌어낼 수 있다. 바이러스는 자신의 단백질을 생산하고 자신의 게놈을 복제하기 위해 숙주 세포의 장치를 전복시키는 것에 의존한다. 병원균은 종종 주위환경과 직접 접촉하는 상피 표면에 부착하거나 또는 그에 침입하여 숙주에 정착한다. 바이러스는 숙주 세포 내로 들어가기 위해 수용체-매개 세포내이입에 주로 의존하는 반면, 세균은 세포 부착 및 식세포성 (phagocytic) 경로를 이용한다(1). 병원성 진균, 원생동물 및 기타 진핵 기생충은 전형적으로 감염 진행 동안 여러 상이한 형태를 거치는데; 이들 형태들 간에 전환하는 능력은 숙주에서 생존하여 질환을 유발할 수 있기 위해 기생충에 보통 요구되는 것이다.

[0003] 숙주가 새로운 병원균에 노출된 초기 수시간 및 수일 동안에는, 고유 면역 체계가 침입한 병원균에 대항하는 일차적 방어선이다. 그러나, 특이적 적응 면역 반응의 개시가 또한 필요하다. 고유의 면역 반응은 감염되지 않은 숙주에는 존재하지 않는 병원균의 보존된 특징들을 인식하는 신체의 능력에 의존한다. 이들로는, 미생물의 표면 상의 다수 유형의 분자들 및 일부 바이러스의 이중가닥 RNA 가 있다. 미생물의 표면 분자들은 또한, 이들 유기체들을 대식세포 및 호중구에 의한 식세포작용에 대한 표적으로 하고 염증 반응을 일으키는 보체계를 활성화한다.

[0004] 세균은 식세포로부터 벗어나는 상이한 전략들을 개발해 왔다. 일례로, 이들은 주화성 및 식세포작용을 저해하거나, 식세포를 죽이거나 또는 그에 정착할 수 있다. 포식 세포들은 분해 효소, 항균성 펩티드 및 활성 산소종을 병용하여 침입한 미생물들을 살상한다(2). 또한, 이들은 염증 반응을 유발하고 적응 면역 체계의 힘을 집결시키기 시작하는 신호전달 분자들을 방출한다. 세균은, 한편, 분자 모방, 항체 억제, 세포 내부로 잠복, 또는 혈류 내로 항원 방출과 같은 적응 면역 체계에 대항한 상이한 전략들을 개발해 왔다(3).

[0005] 모든 바이러스 및 다수의 세균 및 원생동물을 비롯한 세포내 병원균들은 숙주 세포 내부에서 복제되는데, 이들은 다양한 기작 중 하나로 숙주 세포에 침입한다. 바이러스는 숙주 세포 내로 들어가기 위해 수용체-매개 세포내이입에 주로 의존하는 반면, 세균은 세포 부착 및 식세포성 (phagocytic) 경로를 이용한다. 원생동물은 보통 상당한 대사상의 비용을 요하는 독특한 침입 전략을 이용한다. 일단 내부로 들어오면, 세포내 병원균은 자신들의 복제에 유리한 기생 위치 (niche) 를 찾아내는데, 빈번히 숙주 세포막의 소통을 변경시키고, 세포내 이동을 위해 세포 골격을 이용한다.

[0006] *스타필로코커스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*) 은 세균성 관절염에 빈번히 관련되는 미생물로서, 이는 활막 염증, 연골 및 골 파괴를 야기하며, 궁극적으로 관절 변형을 야기한다. 포유류, 조류 및 파충류를 비롯한 각종 동물 종들에서는 자발적인 *S. 아우레우스* 관절염이 발병하는 것으로 관찰되었으며, 따라서 이들은 상기 질환의 유도를 위한 가능성 있는 모델들이다.

[0007] 플라스미노겐 활성인자 (plasminogen activator, PA) 시스템은 상이한 유형의 관절염들의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 제안되어온 일반적인 단백질분해 시스템이다. 플라스미노겐은 두 생리학적 PA 인, 조직형 PA (tPA) 또는 유로키나아제형 PA (uPA) 중 하나에 의해 광범위 프로테아제인 플라스민으로 활성화될 수 있다.

[0008] 중이염은 귀의 염증 상태로 정의된다. 중이염은 감기를 제외하고는 가장 흔한 아동 질환이다. 중이염과 관련된 가장 중요한 유병 인자 (etiological factor) 는 상부 기도의 세균성 또는 바이러스성 감염이다. 중이염은 일반적으로 양성 (benign) 의 자기-제한성 (self-limiting) 질환이나, 그럼에도 불구하고, 항생제 처방률이 높다. 사실상, 중이염 치료에 있어서 항생제의 효과는 증거가 부족하며, 지금까지는 외과적 치료가 재발성 급성 중이염 (AOM) 및 만성 중이염 또는 삼출성 중이염 (OME) 의 치료에 대해 선택되는 치료법이다.

[0009] 상해 후에 환자의 피부 정상세균총 (예컨대, *S. 아우레우스* 및 스트렙토코커스 피오게네스) 에 의한 즉각적인 집락화가 일어난다는 것은 잘 알려져 있다. 특별히 1950 년대 초에, 화상을 입은 환자에서 감염의 원인인 스트렙토코커스 피오게네스의 실질적인 제거를 가져온 페니실린 G 의 도입 후, *S. 아우레우스*가 창상 감염의 주요한 병인체 (etiological agent) 가 되었다. 따라서 *S. 아우레우스*는 개방창 (open-wound) 감염에 대한 가장 흔한 세균 종 중 하나이다. 절개창 (incisional wound) 및 화상 창상은 임상 실무에서 관찰되는 가장 흔한 창상 유형이다.

[0010] 항생제 및 기타 항균성 약물은 2차 세계 대전 시기 이래로 감염성 질환의 치료에 널리 사용되어 왔다. 질환-유발 미생물에 대항한 항균제의 성공은 현대 의학의 위대한 업적에 속한다. 그러나, 약물 내성의 발달로

인해 많은 항균제들이 과거만큼 효과적이지 않다. 항생제 내성의 발달의 핵심 요인은 새로운 환경 조건에 신속히 적응할 수 있는 감염성 유기체의 능력이다. 시간이 흐름에 따라, 일부 세균들은 항생제의 효과를 회피하는 방법들을 개발하였다. 만연한 항생제 사용은 세균으로 하여금 이들 강력한 약물들에 대항하여 생존할 수 있게 하는 적응성을 진화적으로 고무시킨 것으로 여겨진다. 항균제 내성은 미생물에 생존의 유익을 제공하여, 신체로부터 감염을 제거하는 것을 더 어렵게 만든다. 궁극적으로, 미생물 퇴치의 어려움의 증가는 병원 또는 기타 환경에서 감염을 얻을 위험성을 증가시킨다. 결핵, 임질, 말라리아, 및 아동의 귀 감염과 같은 질환들은 불과 몇 년 전보다 이제 치료하기가 더욱 곤란하다. 약물 내성은 항생제의 도움없이는 감염을 격퇴할 수 있는 능력이 부족한 치명적 질병 환자들을 수용한 병원에 있어서 특히 곤란한 문제이다. 이들 환자에서는 약물 내성을 야기하는 세균의 변화에 대비해 다량의 항생제 사용이 선택된다. 불행히도, 이는 심지어 가장 강한 항생제의 존재 하에서도 생존할 수 있는 더 큰 능력을 가진 세균을 생성함으로써 상기 문제를 악화시킨다. 이러한 심지어 더 강한 약물 내성 세균은 취약한 병원 환자들을 계속해서 괴롭힌다. 따라서, 감염에 대항한 감염 방어를 향상시킬 신규한 치료 전략이 매우 필요하다는 인식이 증가하고 있다.

[0011] 괴사는 세포 및 살아있는 조직의 프로그램화되지 않은 또는 우발적인 사멸에 붙여진 명칭이다. 이는 프로그램화된 세포 사멸의 일부분인 아포토시스 (apoptosis) 보다 덜 정연하다. 아포토시스와 대조적으로, 면역 체계의 식세포에 의한 괴사로부터 초래되는 세포 잔해물의 제거는 일반적으로 더 어려운데, 그 이유는 상기 규칙없는 사멸은 근처의 식세포에게 죽어가는 세포를 삼키라고 전하는 "잇-미(eat-me)" 세포 신호를 일반적으로 보내지 않기 때문이다. 이러한 신호전달 결여는, 해당 세포가 아포토시스를 거친 것으로 가정한 경우보다 면역 체계가 괴사를 통해 사멸한 죽은 세포를 발견하고 재순환시키는 것을 더욱 어렵게 만든다. 세포막 손상 후 세포내 내용물의 방출은 괴사에서 염증의 원인이다.

[0012] 상해, 감염, 암, 경색, 동물성 중독증 및 염증을 포함하여, 괴사의 원인에는 다수가 존재한다. 세포 내 한 가지 필수 시스템의 심각한 손상은, 다른 시스템들에의 이차적 손상인 소위 말하는 "다단계 효과(cascade of effects)"를 유발한다. 괴사는 세포 성분들 또는 전체 세포 자체를 소화할 수 있는 리소좀에 의해 방출되는 특수한 효소들에 의해 유발된다. 상기 세포가 입은 상해는 리소좀 막을 손상시키거나, 또는 효소들의 방출을 유발하는 조직화되지 않은 연쇄 반응을 촉발할 수 있다. 아포토시스에서와는 달리, 괴사로 죽는 세포는 다른 세포들에 해를 입히는 유해한 화학물질들을 방출할 수 있다. 생검 재료 괴사는 고정 또는 동결로 정지시킨다.

[0013] 현재 괴사를 치유하는 주요 치료 방법은 4 가지가 존재한다. 첫번째는 외과적 제거로서, 이는 가장 신속하며, 따라서 대형 괴사성 부분 또는 두꺼운 가피 (eschar) 가 존재하는 경우 권장된다. 두번째는 기계적 제거로서, 이에는 수치료, 덱스트라노머 (dextranomer) 및 창상 세척 (wound irrigation) 이 포함된다. 세번째는 효소적 제거로서, 사용되는 효소는 주로 콜라게나아제(예컨대: Santyl) 이며, 그러나, 감염이 존재하는 경우 그 효과가 너무 느리다; 네번째로는 자가용해 방법을 통한 것으로, 이는 창상액 (wound fluid) 내의 효소들을 이용한 것이나 이의 효과는 극도로 느리다. 그러나, 상기 4 가지 치료 방법 중 어느 것도 기능적이고 심미적으로 만족스러운 괴사 제거 및 조직 재형성을 제공하지 못한다. 따라서, 성공적인 괴사의 제거를 달성하기 위해 신규한 치료 전략이 크게 요구된다.

[0014] 세균성 관절염, 개방창 감염, 중이염 및 괴사와 같은 감염을 치료하는 현재의 치료 방법은 상기 논의한 바와 같은 결점들을 갖고 있다. 따라서, 당업계에서는 일반적인 감염을 치료하는 개선된 전략이 크게 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

[0015] **발명의 요약**

[0016] 본 발명은 감염성 질환 및 조직 괴사에 대한 새롭고 개선된 전략에 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들, 및 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물들을 사용할 수 있다는 놀라운 발견에 관한 것이다. 본 발명의 일 측면은, 염증 세포들을 활성화하여, 세균을 살상하고, 괴사 조직을 제거하며 사이토카인 발현을 증강함으로써, 예컨대 *S. 아우레우스*-유도성 관절염 및 개방창 감염에 대항하여 보호하는 역할을 하는, 플라스미노겐, 또는 플라스미노겐-활성화 경로의 기타 구성원들 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물들의 능력에 관한 것이다. 이러한 감염 상태들에는 또한, 감염성 질환 및, 일례로 조직-특이적 감염 방어, 전신성 감염 방어, 급성 감염, 만성 감염, 만성 궤양, 개방창 감염 및 당뇨병성 궤양 동안에, 조직 감염이 흔히 관찰되는 기타 질환이 있다.

[0017] 특정 구현예들에서, 본 발명은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분이거나 또는 직접적으로 또는 상기 플라스미노겐-활성화 경로를 통해 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0018] 특정 구현예들에서, 상기 직접적으로 또는 플라스미노겐-활성화 경로를 통해 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물들에는 스트렙토키나아제 (streptokinase), 사루플라제 (saruplase), 알테플라제 (alteplase), 레테플라제 (reteplase), 테넥테플라제 (tenecteplase), 아니스트레플라제 (anistreplase), 몬테플라제 (monteplase), 라노테플라제 (lanoteplase), 파미테플라제 (pamiteplase), 스타필로키나아제 (staphylokinase) 및 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들의 재조합 형태 및 변형체들이 있다.

[0019] 특정 구현예들에서, 감염성 질환은 세균성 감염성 질환 또는 바이러스성 감염성 질환이다.

[0020] 부가적인 구현예들에서, 세균성 감염성 질환은 중이염, 세균성 관절염, 치은염, 치근막염, 결막염, 창상 감염, 수술 창상 감염, 괴사, 폐렴, 화상 및/또는 감염에 의해 유발된 호흡 기관의 손상, 및 당뇨병, 정맥 또는 복합 정맥/동맥 부전증 또는 감염성 관절염 등을 앓는 환자에서의 감염성 만성 하지 궤양, 감염에 의해 유발된 관절 조직의 손상으로부터 선택되며, 바람직하게는 중이염 또는 세균성 관절염이다.

[0021] 특정 구현예들에서, 상기 조성물은 둘 이상의 화합물들의 조합물을 포함한다. 특정 구현예들에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 항생제를 추가로 포함한다.

[0022] 부가적인 구현예들에서, 상기 항생제는 테트라사이클린계, 암페니콜계, 베타-락탐계, 페니실린계, 술폰아미드계, 마크로라이드계, 린코사미드계, 스트렙토그라민계, 스트렙토마이신계, 퀴놀론계 및 메트로니다졸계로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 특정 구현예들에서, 상기 대상은 포유동물, 및 특히 인간이다. 부가적인 구현예들에서 상기 대상은 플라스민 또는 플라스미노겐이 부족한 것이다. 이러한 부족은 선천적인 것, 후천적인 것 및/또는 국부적인 것일 수 있다.

[0024] 특정 구현예들에서, 상기 화합물은 전신적으로, 국부적으로, 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 흡입을 통해, 척수강내로, 국소 주사를 통해, 관절내 주사를 통해 또는 직장으로 투여된다. 바람직한 구현예에서는 국소 투여 및/또는 국소 주사가 사용된다.

[0025] 특정 구현예들에서, 상기 화합물은 적당한 폴리펩티드 담체 및/또는 하나 이상의 안정화제와 조합하여 투여된다.

[0026] 또 다른 부가적인 구현예들에서, 상기 화합물은 0.0001 내지 약 1 g, 바람직하게는 0.005 mg 내지 약 100 mg, 더욱 바람직하게는 약 0.05 내지 약 50 mg 의 용량으로 투여된다. 상기 mg 단위의 용량은 감염 부분 1 제곱 센티미터에 대한 것이다(즉 mg/감염 부분 제곱 센티미터).

[0027] 또 다른 구현예들에서, 상기 화합물의 투여는 적어도 1 회, 바람직하게는 적어도 매일 반복된다.

[0028] 또 다른 구현예들에서, 상기 투여는 본 발명의 화합물을 포함하는 창상 드레싱 (wound dressing) 을 감염 부분에 적용하는 것에 의해 수행된다.

[0029] 부가적인 구현예들에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 유효량의 적합한 화합물을 포함하는 약학 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함한다.

[0030] 특정 구현예들에서, 본 발명은 유효량의 적합한 화합물을 포함하는, 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0031] 특정 구현예들에서, 본 발명은 유효량의 적합한 화합물 및 적어도 하나의 항생제 또는 항진균제를 별개의 바이알들에 포함하는 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0032] 특정 구현예들에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 감염에 대항한 숙주 방어를 촉진시키는데 유용한 작용제를 규명하는 방법에 관한 것이다: a) 시험 작용제를 세균성 관절염을 가진 동물에 투여하는 단계; b) 감염 예컨대 세균성 관절염의 하기 매개변수들 중 적어도 하나를 평가하는 단계: (i) 세균 살상 정도, (ii) 괴사 조직 형성, (iii) 염증 세포 활성화, (iv) 사이토카인 발현: c) 단계 (b) 의 선택된 매개변수(들)를 대조군 값과 비교하는 단계; 및 d) 선택된 매개변수(들)가 상기 대조군 값과 비교할 때 더 유익한 임의의 시험 작용제를, 감염

에 대항한 숙주 방어를 촉진시키는데 유용한 작용제로서 선택하는 단계.

[0033] 특정 구현예들에서, 상기 동물은 야생형 동물 및 플라스미노겐의 내인성 발현이 부족한 형질전환 동물로 이루어진 군의 구성원으로부터 선택된다.

[0034] 특정 구현예들에서, 본 발명은 플라스미노겐에 대한 진단상의 존재여부를 결정하는 것을 포함하는, 진행중인 감염의 진단 방법에 관한 것이다.

[0035] 특정 구현예들에서, 본 발명은, 진행중인 감염 및/또는 진행중인 치료의 효과를 측정하기 위해 체액, 혈청, 배설된 노폐물, 예컨대 소변 또는 대변, 호기 (exhalation air), 등으로부터인 환자로부터의 시료에서 플라스미노겐을 측정하는데 사용하기 위한 키트로서, 플라스미노겐 결정인자 및 상기 환자 시료를 수집, 저장 및/또는 검사하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0036] 발명의 상세한 설명

[0037] 귀에서의 본 발명의 결과는 플라스미노겐이 만성 중이염의 자연 발병에 대항하여 보호하는 역할을 하는 것을 보여주었다. 본 발명의 결과는 또한 특정 유형의 중이염에 대한 임상 요법에 플라스미노겐을 사용하는 것을 제안한다. 따라서, 이들 발견은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들이 임의의 감염성 질환의 방지 및 치료에서 신규한 전염증 인자로서 역할을 한다는 것을 시사한다. 특히, 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들의 전염증 효과로는, 염증 세포 활성화, 세균 살상, 괴사 조직 제거 및 사이토카인 발현 증강 및 적절한 조직 재형성 향상이 있다. 이러한 결론은 모든 감염성 병원균에 대한 총체적인 숙주 방어 기작, 본 발명자들의 연구에서 사용된 주요한 세균 종인 *S. 아우레우스*에 의해 유도되는 방대한 다방면의 감염성 질환, 및 본 특허 출원에서 연구된 다양한 감염 모델 (감염성 관절염, 화상 유도 감염, 절개 유도 감염 및 중이염 포함) 에 기초하여 도출된 것이다.

[0038] 현재 감염성 질환은, 모든 형태의 암을 합친 것 보다도 더 많은 전 세계 모든 인간 사망의 약 1/3 의 원인이다. 다수 유형의 병원균들이 인간에서 질병을 유발한다. 가장 친숙한 것은 바이러스 및 세균이다. 기타 감염성 병원균은, 단세포 진균 및 원생동물로부터 기생충과 같은 대형의 복잡한 후생동물에 이르는 진핵 생물이다. 각 개개의 병원균은 상이한 방식으로 질병을 유발하는데, 이는 감염에 대한 기본적인 생물학을 이해하도록 요구한다. 그러나, 모든 병원균이 자신의 복제 및 유포를 촉진하는 방식으로 숙주 세포와 상호작용하는 능력을 공유하지만, 이러한 숙주-병원균 상호작용은 다양하다. 병원균은 종종 주위환경과 직접 접촉하는 피부 표면과 같은 상피 표면을 통한 부착 또는 침입에 의해 숙주에 정착한다. 모든 바이러스 및 다수의 세균 및 원생동물을 비롯한 세포내 병원균은, 숙주 세포 내부에서 복제하는데, 이들은 다양한 기작 중 하나에 의해 숙주 세포에 침입한다. 바이러스는 숙주 세포 내로 들어가기 위해 주로 수용체-매개 세포내이입에 의존하는 반면, 세균은 세포 부착 및 식세포성 경로를 이용한다. 원생동물은 보통 상당한 대사상의 비용을 요하는 독특한 침입 전략을 이용한다. 일단 내부로 들어오면, 세포내 병원균은 자신들의 복제에 유리한 기생 위치를 찾아내는데, 빈번히 숙주 세포막의 소통을 변경시키고, 세포내 이동을 위해 세포 골격을 이용한다. 개별 숙주 세포의 거동을 변경시키는 것 외에, 병원균은 종종 새로운 숙주로의 확산에 유리한 방식으로 숙주 유기체의 거동을 변경한다. 병원균은 빠르게 진화하기 때문에, 새로운 감염성 질환이 빈번히 출현하며, 기존의 질환들은 인간의 치료, 방지 및 근절 시도를 피하는 새로운 방식을 획득한다. 나아가, 백신 및 항생제와 같은 감염성 질환에 대항한 위대한 진보에 대해, 병원균은 또한 하기를 통해 약물 내성을 발달시켜 왔다: 1) 해당 약물을 파괴하는 효소 생산, 2) 해당 약물의 분자 표적을 변경하여, 더 이상 상기 약물에 민감하지 않도록 함, 또는 3) 상기 표적에의 접근을 방지함. 따라서, 약물 내성 병원균은 증대하고 있는 문제이다.

[0039] 병원균이 인간에 침입하기 위해 개발해 온 방식이 다양함에도 불구하고, 숙주 방어 장치가 상기 감염에 대항하여 반응하는 양식은 단지 제한적이다. 숙주 방어 장치에는 적응 면역 체계 및 고유 면역 체계가 모두 포함된다. 적응 면역 체계는 특정 병원균에 대해 이전에 조우한 것을 기억하고 이들이 다시 공격해올 때 고유 면역 체계의 조력을 받아 이들을 파괴하는 반면, 고유 면역 체계는 적응 면역 체계가 하는 방식으로 특정 병원균에 특이적이지 않다. 따라서, 고유 면역 체계는 침입한 병원균에 대한 일차적 방어선이며, 특이적인 적응 면역 반응을 개시하는 것이 또한 필요하다.

[0040] 고유의 면역 반응은 감염되지 않은 숙주에는 존재하지 않는 병원균들의 보존된 특징들을 인식하는 신체의 능력에 의존한다. 이러한 특징들에는, 일례로, 세균의 펩티도글리칸 세포벽 및 편모, 뿐만 아니라 그람-음성 세균 상의 지질다당체 (LPS) 및 그람-양성 세균 상의 테이코산, 진균의 세포벽에 있는 자이모산 (zymosan), 글루칸 및 키틴 및 대부분의 바이러스의 이중가닥 RNA 가 있다. 이들 병원균-특이적 분자 중 다수는 염증 세포

상에 있는 톨 유사 (Toll-like) 수용체 단백질에 의해 인식된다. 척추동물에서, 미생물의 표면 분자들은 또한 미생물의 막을 파괴하고, 대식세포 및 호중구에 의한 식세포작용을 위해 미생물을 표적화하고, 염증 반응을 생성하는데 함께 작용하는 혈액 단백질들의 그룹인 보체를 활성화한다. 포식 세포들은 분해성 효소, 항균성 펩티드 및 활성 산소종의 조합을 사용하여 침입한 미생물을 살상한다. 염증 세포도 또한 감염의 결과로서 형성된 괴사 조직을 분비성 또는 내부 효소들을 통해 분해한다. 또한, 이들은 염증 반응을 일으키는 신호전달 분자를 방출하여 적응 면역 체계의 힘을 집결시키기 시작한다. 바이러스에 감염된 세포는 죽은/죽어가는 세포, 톨 유사 수용체 및 디펜신 (defensin) 을 통해 대식세포에 의해 인식된다. 이들 대식세포는 나아가 염증성 사이토카인을 분비하고, 포식리소좀 (phagolysosome) 에서 바이러스성 단백질을 가수분해하고 근처의 림프절 및 비장에 상기 바이러스성 단백질을 나타내 보임으로써 반응하여 더 많은 염증 세포를 활성화한다. 보체계도 또한 바이러스를 인식하고, 상기 바이러스를 살상하도록 염증 세포를 활성화하고, 나아가 항체를 생성하도록 적응 면역 체계를 유도할 수 있다.

[0041] 상기 논의한 바와 같이, 고유 면역 체계에서, 염증 세포 (호중구 및 대식세포) 는 바이러스 및 세균으로부터, 단세포 진균 및 원생동물, 기생충과 같은 대형의 복잡한 후생동물에 이르기까지의 모든 종류의 감염에 대항한 숙주 방어에서 중추적인 역할을 한다. 염증 세포는 직접 또는 톨 유사 수용체 및 보체 수용체와 같은 다양한 세포-표면 수용체를 통해 활발히 병원균을 찾아서 삼키고 파괴한다. 병원균이 대형 기생충과 같이 너무 크면, 일군(一群)의 대식세포 및 호중구가 상기 침입자 주위로 모여들 것이다. 활성화된 대식세포는 또한 추가적인 포식 세포들을 감염 부위로 불러들인다. 염증 세포는 또한 염증 반응을 매개 및 증폭하는 다양한 신호전달 분자를 분비한다. 감염성 병원균에 대항한 B 세포-매개 적응 면역 반응에서, 새로 생성된 항체는 자신의 Fab 절편을 통해 병원균 상의 항원에 및 자신의 Fc 절편을 통해 염증 세포 (주로 대식세포) 상의 표면 수용체 (FcR) 에 결합하여, 상기 염증 세포를 병원균에 연결하고 그들을 추가로 살상한다.

[0042] 상기 개시한 발견에 기초하여, 플라스미노겐 및 이의 유도체의 투여는 염증 세포 활성화, 세균 살상, 괴사 조직 제거, 사이토카인 발현 증강 및 정상적 조직 재형성 촉진을 통해, 예컨대 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염, 개방창 감염 및 중이염에 대항하여 보호하는데 다능적인 역할을 한다. 이들 모든 효과는 염증 세포가 모든 종류의 감염에 대항하여 발휘하는 강력한 기능의 상이한 측면들이다. 본 발명자들이 가진 모든 데이터를 설명하기 위해 작업 가설을 개발하였다. 상기 가설에서, 핵심 포인트는 플라스미노겐이 염증 세포의 활성을 유력하게 하며, 따라서 세균 살상, 괴사 조직 제거, 사이토카인 발현 증강 및 정상적 조직 재형성 촉진과 같은 과정을 매개한다는 것이다. 상기 지적한 바와 같이, 염증 세포 (호중구 및 대식세포) 는 바이러스 및 세균으로부터, 단세포 진균 및 원생동물, 기생충과 같은 대형의 복잡한 후생동물에 이르기까지의 모든 종류의 감염에 대항하는 숙주 방어에서 중추적인 역할을 한다. 따라서, 본 발명에서 보고한 발견들은 플라스미노겐 및 이의 유도체가 모든 감염성 질환 및 괴사에 대항하는 숙주 방어에서 신규한 약물 후보물질이라는 결론을 지지한다.

[0043] 상이한 견지에서 및 상이한 모델들에서 플라스미노겐-활성인자 시스템의 강력한 항-감염성 역할을 입증하기 위해 본 발명의 실시예들을 나타내었다. **실시예 1** 은 plg-/- 마우스가 plg+/+ 마우스와 비교하여 세균성 관절염 유도 후에 훨씬 더 심한 조직 파괴 및 더 심한 만성 염증을 갖는다는 것을 증명한다. 이들 plg-/- 마우스들은 또한 세균 살상 장애 (**실시예 3**) 및 더 낮은 수준의 IL-10 발현 (**실시예 9**) 을 가지나, 감염된 관절에서의 대식세포 및 호중구의 침윤 (infiltration) 은 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 명백히 손상되어 있지는 않다(**실시예 4**).

항생제 처리는 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 세균을 살상하고, 염증을 감소시키나, 괴사 조직의 형성을 감소시키지는 않는다(**실시예 2**). 그러나, $plg^{-/-}$ 마우스에 인간 플라스미노겐 (hPlg) 을 전신적 또는 국소적으로 보충하자 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염에 대항하는 정상 숙주 방어가 회복되었으며(**실시예 5 & 6**), 감염된 무릎 관절에서 IL-6 단백질 발현이 증가되었다(**실시예 8**). $plg^{+/+}$ 마우스에 인간 플라스미노겐을 국소적으로 보충하면 *S. 아우레우스* 감염에 대항하는 숙주 방어가 강화되는데(**실시예 7**), 이는 플라스미노겐이 항생제보다 더 우수한 뛰어난 항-감염제이며 야생형 정상 동물에 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 강력히 나타낸다. 감염에 대항한 숙주 방어 및 조직 재형성에서 플라스미노겐-활성화 시스템의 중요성은 uPA-/- 마우스를 사용함으로써 추가로 입증된다(**실시예 10**). 실시예 10 은 플라스미노겐이 활성인자의 부재시에 덜 효과적인 것으로 보이기 때문에 플라스미노겐을 활성화하는 인자들이 또한 치료제로서 유용할 수 있다는 것을 보여준다. 나아가, 감염에 대항하는 숙주 방어에서 플라스미노겐의 필수불가결한 역할은 또 다른 세균성 관절염 모델 (세균의 정맥 주사, **실시예 11 & 12**) 및 또 다른 두 개방창 감염 모델인, 절개창 (**실시예 13**) 및 열탕화상 창상 (**실시예 14**) 에서의 plg-/- 마우스 사용에 의해 추가로 확인되었다. 중이염의 자연 발병에 대한 조사는, 연구

된 모든 plg-/- 마우스가 귀 감염을 가진 반면 모든 plg+/+ 마우스는 감염되지 않은채로 존재하였다는 것을 나타낸다(**실시예 17**). 귀 조직으로부터 세균을 회수함으로써, 6 마리의 plg+/+ 마우스 중 하나에서 단 하나의 유형의 세균이 동정되었고, 6 마리의 plg-/- 마우스 중 5 마리에서 4 개 유형의 세균이 동정된 것이 입증되었다(**실시예 15 & 16**). 전체적으로 이들 실시예들은 다양한 항-감염성 측면에서 플라스미노겐의 다능적인 역할이라는 특성을 밝혀내었으며, 플라스미노겐 및 이의 유도체가 모든 감염성 질환에 대항한 숙주 방어에서 신규한 약물 후보물질이라는 결론을 강력하게 지지한다.

[0044] 본 발명의 플라스미노겐 화합물 및 방법이 감염 또는 괴사성 상태를 표적으로 하는 염증 반응을 제공하므로, 상기 본 발명의 화합물 및 방법은 모든 감염성 질환, 특별히 세균성 감염성 질환, 및 괴사에 대항하는 방어를 제공할 수 있다. 이러한 감염 상태에는, 감염성 질환 및, 일례로 감염 방어, 만성 궤양 및 당뇨병성 궤양 중에, 조직 감염이 공통적으로 관찰되는 기타 질환이 있다. 이러한 괴사는 본원에서 연구된 질환 모델에서뿐 아니라, 조직 괴사를 역시 유도할 수 있는 다른 유형의 질환, 예컨대 무혈성 대퇴골두 괴사, 유두 괴사, 골반골괴사 (hip osteonecrosis), 신피질 괴사, 급성 세뇨관 괴사, 급성 망막 괴사, 급성 세뇨관 괴사, 심근 경색, 췌장 괴사, 허혈성 대장염, 괴사 근막염에서도 존재한다. 상해, 감염, 암, 경색, 동물성 중독증, 더딘 및 치유되지 않는 창상, 당뇨병 및 염증을 포함하여, 다수의 괴사 원인이 존재한다. 또한, 플라스미노겐-결핍 동물에서는 심한 염증, 조직 파괴, 괴사 및 세균 증식이 모두 영구적으로 지속된다는 것이 발견되었는데, 이는 따라서 세균 감염 및 조직 괴사를 연구하기 위한 신규한 모델 및 세균 감염 및 조직 괴사를 강화하는 약물 및 치료 방법을 규명 및 평가하는 스크리닝 방법을 제공한다.

[0045] 따라서, 제 1 측면에서 본 발명은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분인 화합물 또는 직접적으로 또는 플라스미노겐-활성화 경로 중의 상류 성분을 활성화함을 통해 간접적으로 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의, 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료를 위한 약학 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.

[0046] 바람직한 구현예에서 상기 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분은 플라스미노겐, 인간 재조합 플라스민, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐 및 플라스민의 크링글 및 프로테아제 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스미노겐 및 플라스민의 변형체 및 유사체, 미니-플라스미노겐, 미니-플라스민, 플라스미노겐 활성인자들인, tPA 및 uPA 로부터 선택된다.

[0047] 또 다른 바람직한 구현예에서 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물은 스트렙토키나아제, 사루플라제, 알테플라제, 레테플라제, 테넥테플라제, 아니스트레플라제, 몬테플라제, 라노테플라제, 파미테플라제, 스타필로키나아제 및 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들의 재조합 형태 및 변형체로부터 선택된다.

[0048] 일반적으로, 상기 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물은 전신적으로, 국부적으로, 국소적으로, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 흡입을 통해, 척수강내로, 국소 주사를 통해, 관절내 주사를 통해 또는 직장으로 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서는, 국소 투여 및/또는 국소 주사가 사용된다.

[0049] 또한, 상기 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물은 적당한 폴리펩티드 담체, 예컨대 알부민, 젤라틴, 등 및/또는 하나 이상의 안정화제(들), 예컨대 세정제 (detergent), 시클로덱스트린, 당류, 디메틸 술폭시드, 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 산화방지제, 금속 킬레이트제, 효소 저해제 등과 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 첨가제들을 사용하여 생성물의 안정성을 다수의 방식으로 향상시킬 수 있는데, 이에는 흡착/흡수를 최소화하는 것, 응집을 감소시키는 것, 용해도를 향상시키는 것, 산화를 감소시키는 것 및 분해를 감소시키는 것이 포함된다. 주어진 단백질에 적합한 담체를 고안하는 방법은 당업계 내에 잘 알려져 있다.

[0050] 또한, 예로서 상기 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물은 0.0001 내지 약 1 g, 바람직하게는 0.005 mg 내지 약 100 mg, 더욱 바람직하게는 약 0.05 내지 약 50 mg 의 용량으로 투여될 수 있다. 상기 mg 단위의 용량은 감염 부분 1 제곱 센티미터 (즉 mg/감염 부분 제곱 센티미터) 에 대한 것이다.

[0051] 나아가, 상기 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의 투여는 예를 들어 적어도 1 회, 바람직하게는 적어도 매일 반복될 수 있다.

[0052] 본 발명 및 청구의 범위의 맥락에서 상기 대상은 임의의 포유동물 대상, 특별히 인간 대상일 수 있다.

[0053] 또한, 또 다른 바람직한 구현예에서 상기 감염성 질환은 세균성 감염성 질환이다.

[0054] 특별히, 상기 세균성 감염성 질환은 중이염, 세균성 관절염, 치은염, 치근막염, 결막염, 각막염, 창상 감염, 수술 창상 감염, 질 (virginal) 감염/손상, 괴사, 폐렴과 같은 감염, 화상 및/또는 감염에 의해 유발된 호흡 기관의 손상 및 당뇨병, 전신 감염, 정맥 또는 복합 정맥/동맥 부전증 또는 감염성 관절염에 기인한 감염 등을 앓는 환자에서의 감염된 만성 하지 궤양, 감염에 의해 유발된 관절 조직에서의 손상에 대한 이차적인 감염으로부터 선택된다. 특별히, 첨부된 실시예에서 예시된 바와 같이, 본 발명은 중이염, 세균성 관절염, 화상-관련 감염 및 절개창-관련 감염을 치료하는데 효과적이다.

[0055] *스타필로코커스 아우레우스*는, 활막 염증, 연골 및 골 파괴, 및 궁극적으로 관절 변형을 일으키는 세균성 관절염과 가장 빈번히 관련되는 미생물이다.

[0056] 세균성 관절염은 인간에서 급속 진행성 및 고도 파괴성 관절 질환이다. 류마티스 관절염과 같은 염증성 장애를 포함하는 모든 파괴성 관절 질환은 세균성 관절염의 발병 증가와 관련되어 있다. 관절 임플란트 및 면역억제 치료와 같은 특정 형태의 치료법은 세균성 관절염의 발생 빈도 증가를 나타낸다. *S. 아우레우스*는 비임균성 세균성 관절염 사례의 약 60% 에서 원인체이다. 류마티스 질환을 가진 환자에서, 상기 수치는 훨씬 더 높은데, 75% 에 근접한다. 세균성 관절염에 대한 실험실 모델이 이전에 사용되었다. 대부분의 경우에 세균은 관절내로 주사되었다. 관절에서의 *S. 아우레우스* 감염에 의한 이환률 및 사망률은 더 새로운 항생제의 사용에도 불구하고 여전히 높다. *S. 아우레우스*에서 다항생제 내성의 확산 증가는 주요한 공중 보건 관심사이다. 따라서, 숙주 방어를 유의하게 증가시킬 수 있는 신규한, 강력한 작용제가 크게 요구되고 있다.

[0057] 중이염은 감기를 제외하고는 가장 흔한 아동 질환이다. 중이염과 관련된 가장 중요한 유병 인자는 상부 기도의 세균성 또는 바이러스성 감염이다. 중이염은 일반적으로 양성이며 자기-제한성 질환이나, 그럼에도 불구하고, 항생제 처방률이 높다. 사실상, 중이염 치료에 있어서 항생제의 효과는 증거가 부족하며, 지금까지는 외과적 치료가 재발성 급성 중이염 (AOM) 및 삼출성 중이염 (OME) 의 치료에 대해 선택되는 치료법이다.

[0058] 상해 후에 환자의 피부 정상세균총 (예컨대, *S. 아우레우스* 및 스트렙토코커스 피오게네스) 에 의한 즉각적인 집락화가 일어난다는 것은 잘 알려져 있다. 특별히 1950 년대 초에, 화상을 입은 환자에서 감염의 원인인 스트렙토코커스 피오게네스의 실질적인 제거를 가져온 페니실린 G 의 도입 후, *S. 아우레우스*가 창상 감염의 주요한 병인체가 되었다. 따라서 *S. 아우레우스*는 개방창 감염에 대한 가장 흔한 세균 종 중 하나이다. 절개창 및 화상 창상은 임상 실무에서 관찰되는 가장 흔한 창상 유형이다. 세균성 관절염에서의 상황과 유사하게, 증가하는 세균의 약물 내성 문제 때문에, 숙주 방어를 유의하게 증가시킬 수 있는 신규한, 강력한 작용제가 크게 요구되고 있다.

[0059] 기본적으로, 본 발명은 세균성, 바이러스성 및 진균성 감염에 의해 유도된 감염성 질환을 비롯한 모든 감염성 질환의 치료에 효과적이다.

[0060] 기본적으로, 본 발명의 플라스미노겐 화합물 및 방법은 감염 또는 감염성 질환 또는 괴사성 상태를 표적으로 하는 염증 반응을 제공하므로, 본 발명의 화합물 및 방법은 모든 감염성 질환, 특히 세균성, 바이러스성 및 진균성 감염에 의해 유도된 감염성 질환에 대한 효과적인 치료를 제공할 수 있다.

[0061] 본 발명에 따라 치료가능한 감염성 질환 또는 증상을 유발할 수 있는 세균 및 진균 원인체에는 이들에 제한되는 것은 아니나 하기 그람-음성 및 그람-양성 세균, 세균 과 (family), 및 진균이 있다: 악티노마이세스 (Actinomyces) (예컨대, 노카르디아 (Norcardia)), 아시네토박터 (Acinetobacter), 크립토코커스 네오포르만스 (Cryptococcus neoformans), 아스퍼질러스 (Aspergillus), 바실라세아에 (Bacillaceae) (예컨대, 바실러스 안트라시스 (Bacillus anthrasis)), 박테로이데스 (Bacteroides) (예컨대, 박테로이데스 프라길리스 (Bacteroides fragilis)), 블라스토마이코시스 (Blastomycosis), 보르데텔라 (Bordetella), 보렐리아 (Borrelia) (예컨대, 보렐리아 부르그도르페리 (Borrelia burgdorferi)), 브루셀라 (Brucella), 칸디디아 (Candidia), 캄필로박터 (Campylobacter), 클라미디아 (Chlamydia), 클로스트리디움 (Clostridium) (예컨대, 클로스트리디움 보툴리눔 (Clostridium botulinum), 클로스트리디움 디피실 (Clostridium dificile), 클로스트리디움 퍼프린겐스 (Clostridium perfringens), 클로스트리디움 테타니 (Clostridium tetani)), 콕시디오이데스 (Coccidioides), 코리네박테리움 (Corynebacterium) (예컨대, 코리네박테리움 디프테리아에 (Corynebacterium diptheriae)), 크립토코커스 (Cryptococcus), 데르마토마이코세스 (Dermatomycoses), 대장균 (E. coli) (예컨대, 장관독소원성 대장균 및 장출혈성 대장균), 엔테로박터 (Enterobacter) (예컨대 엔테로박터 아에로게네스 (Enterobacter aerogenes)), 엔테로박테리아세아에 (Enterobacteriaceae) (클렙시엘라 (Klebsiella), 살모넬라 (Salmonella) (예컨대, 살모넬라 타이피 (Salmonella typhi), 살모넬라 엔테리티디스

(Salmonella enteritidis), 살모넬라 타이피), 세라티아 (Serratia), 예르시니아 (Yersinia), 시겔라 (Shigella)), 에리시펠로트릭스 (Erysipelothrix), 해모필루스 (Haemophilus) (예컨대, 해모필루스 인플루엔자 B 형), 헬리코박터 (Helicobacter), 레지오넬라 (Legionella) (예컨대, 레지오넬라 뉴모필라 (Legionella pneumophila)), 렙토스피라 (Leptospira), 리스테리아 (Listeria) (예컨대, 리스테리아 모노사이토게네스 (Listeria monocytogenes)), 마이코플라스마 (Mycoplasma), 마이코박테리움 (Mycobacterium) (예컨대, 마이코박테리움 레프라에 (Mycobacterium leprae) 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis)), 비브리오 (Vibrio) (예컨대, 비브리오 콜레라에 (Vibrio cholerae)), 나이세리아세아에 (Neisseriaceae) (예컨대, 나이세리아 고노레아 (Neisseria gonorrhea), 나이세리아 메닝기티디스 (Neisseria meningitidis)), 파스테우렐라세아 (Pasteurellacea), 프로테우스 (Proteus), 슈도모나스 (Pseudomonas) (예컨대, 슈도모나스 아에루기노사 (Pseudomonas aeruginosa)), 리켓시아세아에 (Rickettsiaceae), 스피로케테스 (Spirochetes) (예컨대, 트레포네마 종, 렙토스피라 종, 보렐리아 종), 시겔라 종, 스타필로코커스 (Staphylococcus) (예컨대, 스타필로코커스 아우레우스), 메닝고코커스 (Meningococcus), 뉴모코커스 (Pneumococcus) 및 스트렙토코커스 (Streptococcus) (예컨대, 스트렙토코커스 뉴모니아에 (Streptococcus pneumoniae) 및 그룹 A, B, 및 C 스트렙토코시 (Streptococci)), 및 우레아플라스마 (Ureaplasmas).

[0062] 이들 세균, 기생체, 및 진균 과들은, 이들에 제한되는 것은 아니나 하기를 포함하는 질환 또는 증상을 유발할 수 있는데, 이들은 그에 알맞게 본 발명에 따라 치료될 수 있다: 패혈증, 예컨대 균혈증, 출혈성 패혈증; 및 진균혈증; 중추 신경계 세균 감염, 예컨대 라임 신경보렐리아증, 세균성 뇌수막염 및 뇌염, 뇌 톡소플라스마증 및 신경매독; 세균성 눈 감염, 예컨대 세균성 결막염, 감염성 각결막염, 감염성 각막염, 안결핵, 및 포도막염; 세균성 귀 감염, 예컨대 중이염, 외이도염; 성 전염성 질환, 예컨대 클라미디아 감염, 임질, 및 매독; 감염성 피부 질환, 예컨대 봉와직염, 피부진균증, 및 세균성 피부 질환, 예컨대 방선균증, 혈관종증, 농창, 단독, 포도상구균 피부 감염, 피부 매독, 및 피부 결핵; 세균성 질증; 기도 감염, 예컨대 백일해 및 폐렴, 예컨대 폐렴구균성 폐렴, 포도상구균 폐렴 및 마이코플라스마 폐렴; 요로 감염, 예컨대 세균뇨; 창상 감염, 예컨대 수술 창상 감염, 만성 감염된 피부 궤양, 괴사, 개방창 감염; 세균성 관절염; 감염성 골 질환, 예컨대 골염, 골수염, 골막염, 척추염, 및 골관절 결핵; 심장혈관 감염, 예컨대 세균성 심내막염, 심장혈관 매독, 및 심장혈관 결핵; 치주 질환, 예컨대 치은염 및 치근막염; AIDS-관련 기회 감염; 골반 감염; 감염성 임신 합병증. 본 발명이 효과적인 감염성 질환의 더 광범위한 목록에 대해서는, 웹페이지 http:/www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/quicklinks.htm 또는 감염성 질환을 개시하는 당업계의 임의의 관련된 리뷰 저널을 참조할 수 있다(참조문헌 목록 참고).

[0063] 본 발명의 플라스미노겐-활성화 경로 및 화합물은 세균 감염 및 괴사성 상태에 대해서와 유사한 방식으로 바이러스성 감염에 대한 염증 반응을 제공하므로, 본 발명의 화합물 및 방법은 하기 나열된 것들을 포함하는 바이러스성 감염 및 상태에 대항하여 유사하게 유용한 방어를 제공한다.

[0064] 본 발명에 따라 치료가능한 감염성 질환 또는 증상을 유발할 수 있는 바이러스성 원인체에는, 이들에 제한되는 것은 아니나, 하기가 포함된다: 아르보바이러스 감염, 예컨대 청설병, 뎅기열, 아르보바이러스 뇌염, 플레보토무스열, 리프트밸리열, 진드기-매개 (Tick-Borne) 질환, 및 황열; 바이러스성 세기관지염; 중추 신경계 바이러스성 질환, 예컨대 뇌염, 바이러스성 뇌수막염, 척수염, 소아마비, 및 가성광견병; DNA 바이러스 감염, 예컨대 아데노바이러스 (Adenoviridae) 감염, 아프리카 돼지 콜레라, 서코바이러스 (Circoviridae) 감염, 헤파드나바이러스 (Hepadnaviridae) 감염, 헤르페스바이러스 (Herpesviridae) 감염 (이들에 제한되는 것은 아니나 단순 포진, 대상 포진, 및 거대세포바이러스 감염이 포함됨), 유두종 바이러스 (Papillomavirus) 감염, 파보바이러스 (Parvoviridae) 감염, 폴리오마바이러스 (Polyomavirus) 감염, 및 폭스바이러스 (Poxviridae) 감염; 바이러스성 뇌염, 예컨대 아르보바이러스 뇌염, 단순 포진 뇌염, 및 수두 대상포진 (Varicella Zoster) 뇌염, 바이러스성 눈 감염, 예컨대 바이러스성 결막염, 거대세포바이러스 망막염, 안부 대상 포진, 및 헤르페스성 각막염; 바이러스성 간염, 예컨대 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, 및 E형 간염; 기회 감염, 예컨대 AIDS-관련 기회 감염; 바이러스성 폐렴; RNA 바이러스 감염, 예컨대 아레나바이러스 (Arenaviridae) 감염, 아스트로바이러스 (Astroviridae) 감염, 버나바이러스 (Birnaviridae) 감염, 분야바이러스 (Bunyaviridae) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 한타바이러스 (Hantavirus) 감염 포함), 칼리시바이러스 (Caliciviridae) 감염, 아르보바이러스 뇌염, 플라비바이러스 (Flaviviridae) 감염, 바이러스성 출혈열, 모노네가비랄레스 (Mononegavirales) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 광견병과 같은 라브도바이러스 (Rhabdoviridae) 감염 포함), 파라믹소바이러스 (Paramyxoviridae) 감염, 예컨대 모르빌리바이러스 (Morbillivirus) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 홍역 포함), 뉴모바이러스 (Pneumovirus) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 호흡기 세포융합 바이러스 (Respiratory Syncytial virus) 감염 포함), 및 루불라바이러스 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 볼거리 포함), 니도비랄레

스 (Nidovirales) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 코로나바이러스 감염, 예컨대 중증 급성 호흡기 증후군 포함), 오르토믹소바이러스 (Orthomyxoviridae) 감염, 예컨대 인플루엔자, 피코르나바이러스 (Picornaviridae) 감염, 예컨대 장바이러스 (enterovirus) 감염, 레오바이러스 (Reoviridae) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 로타바이러스 (Rotavirus) 감염 포함), 레트로바이러스 (Retroviridae) 감염 (이에 제한되는 것은 아니나 렌티바이러스 (Lentivurs) 감염 포함), 및 토가바이러스 (Togaviridae) 감염; 바이러스성 성 전염성 질환; 바이러스성 피부 질환, 예컨대 전염성 홍반, 돌발성 발진, 단순 포진, 전염성 연속종, 및 사마귀; 슬로우 바이러스 질환, 예컨대 AIDS, 진행성 다발초점성 백질뇌병증, 및 아급성 경화성 범뇌염; 종양 바이러스 감염, 예컨대 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 마렉병 (Marek disease), 및 유두종 바이러스 감염, 및 바이러스혈증.

[0065] 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 둘 이상의 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분들인 화합물 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물들의 조합물을 포함한다.

[0066] 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 항생제를 추가로 포함한다.

[0067] 상기 항생제는 예컨대 테트라사이클린계, 암페니콜계, 베타-락탐계, 페니실린계, 술폰아미드계, 마크로라이드계, 린코사미드계, 스트렙토그라민계, 스트렙토마이신계, 퀴놀론계 및 메트로니다졸계, 뿐만 아니라 임의의 적절한 항균제, 마이코사이드 (mycocide) 또는 살진균제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0068] 나아가, 또 다른 구현예에서, 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료는 감염성 병원균에 대항하여 면역 반응을 유도하는 것을 포함한다.

[0069] 제 2 측면에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분인 화합물 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의 유효량을 포함하는 약학 조성물을 이러한 치료를 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함한다.

[0070] 또 다른 측면에서 본 발명은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분인 화합물 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의 유효량, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료를 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[0071] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분인 화합물 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물의 유효량 및 적어도 하나의 항생제, 항바이러스제 또는 항진균제를 별개의 바이알들에 포함하는, 감염성 질환의 예방, 방지 및/또는 치료에 사용하기 위한 부품 키트 (kit of parts) 에 관한 것이다.

[0072] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계들을 포함하는, 감염에 대항한 숙주 방어의 촉진에 유용한 작용제를 규명하는 방법에 관한 것이다: (a) 시험 작용제를 세균성 관절염을 가진 동물에 투여하는 단계; (b) 형광성 또는 방사성동위원소 바이오마커 표지, 체액 또는 조직 균질 현탁액으로부터의 미생물학적 플라크 분석법, FACs 분석, ELISA, 조직학적 검사, 및/또는 세포독성 분석법을 사용하여 감염 예컨대 세균성 관절염의 하기 매개변수들 중 적어도 하나를 평가하는 단계: (i) 세균 살상 정도, (ii) 괴사 조직 형성, (iii) 염증 세포 활성화, (iv) 사이토카인 발현 (세균 살상에 있어서는, 하나의 조직/기관으로부터 세균을 단순히 회수할 수 있고, 괴사 조직 형성에 있어서는, 조직 부검을 통해 정량할 수 있고, 염증 세포 활성화에 있어서는, 상이한 염증 세포 표지자에 대한 ELISA, 웨스턴 블랏팅을 통해 조직화학적으로 측정할 수 있고, 사이토카인 발현에 있어서는, 사이토카인의 수준 검출을 위한 키트가 있음. 사용될 수 있는 이들 모든 방법들은 본 개시의 실시예 부분에 포함되어 있음); (c) 단계 (b) 의 선택된 매개변수(들)를 대조군 값과 비교하는 단계 (이 때 플라스미노겐을 양성 대조군으로 사용할 수 있고 비처리군을 음성 대조군으로 사용할 수 있음); 및 (d) 상기 선택된 매개변수(들)가 대조군 값과 비교하여 더 유익한 임의의 시험 작용제를 감염에 대항한 숙주 방어를 촉진시키는데 유용한 작용제로 선택하는 단계.

[0073] 바람직한 구현예에서는, 시험 모델 동물은 야생형 동물 및 플라스미노겐의 내인성 발현이 부족한 형질전환 동물로 이루어진 군의 구성원으로부터 선택된다.

[0074] 또 다른 측면에서, 본 발명은 플라스미노겐에 대한 진단상의 존재여부를 결정하는 것을 포함하는 진행중인 감염의 진단 방법에 관한 것이다.

[0075] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진행중인 감염 및/또는 진행중인 치료의 효과를 측정하기 위해 체액, 혈청, 배설된 노폐물, 예컨대 소변 또는 대변, 호기 등으로부터인 환자로부터의 시료에서 플라스미노겐을 측정하는데 사용하기 위한 키트로서, 플라스미노겐 결정인자 및 상기 환자 시료를 수집, 저장 및/또는 검사하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다

[0076] 따라서, 본 발명은 플라스미노겐-활성화 경로 중의 성분이거나 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물인 활성제를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 감염에 대항한 숙주 방어를 향상시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 활성제는 플라스민 또는 플라스미노겐 또는 플라스민 또는 플라스미노겐의 유사체로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 활성 성분은 플라스미노겐이다. 상기 활성제는 당업계에 공지된 임의의 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 바람직한, 비제한적인 투여 경로에는 국소 적용 및 국소 주사가 있다. 상기 활성제는 또한 감염 부분 상에 적용되는 창상 드레싱 중에 함유될 수 있는데, 가능한 경우, 이로부터 해당 감염 부위로 전달된다. 상기 활성제는 또한 해당 감염 부분을 청결하게 하기 위해 적용되는 헹굼 용액, 점안액 및 구강세척액 등에 함유될 수도 있다.

[0077] 본 발명은 또한, 플라스민 또는 플라스미노겐인 활성 성분을 투여하는 것을 포함하는, 감염 숙주 방어가 지체되거나 또는 손상된 상태에서 감염에 대항하는 숙주 방어를 개시하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 국부적으로 또는 전신적으로 플라스민 또는 플라스미노겐의 수준이 낮은 상태에서 감염 방어를 향상시키는데 사용될 수 있다. 이러한 상태는 선천적 및/또는 후천적인 것일 수 있다.

[0078] 플라스민 또는 플라스미노겐이 전신적으로 부족한 선천적 상태의 예로서는, 이들에 제한되는 것은 아니나, ALA601THR, VAL355PHE, SER572PRO 및 GLY732ARG 와 같은 디스플라스미노게니아스 (dysplasminogenias), 또는 ARG216HIS, TRP597TER, GLU460TER, LYS212DEL 및 LYS19GLU 와 같은 I형 플라스미노겐 결핍증을 야기하는 플라스미노겐 (PLG) 유전자 (GenBank Reference 서열 등록번호: NM 000301, GeneID:5340; 여기서 아미노산 잔기 번호는 GenBank 등록번호: NP 000292 에 정의된 성숙한 인간 펩티드를 지칭함) 의 변이가 포함된다. 선천적 플라스미노겐 결핍증이 존재하는 경우, 플라스미노겐인 약물을 투여하는 것이 바람직하다.

[0079] 후천적 전신성 및/또는 국부성 플라스민 또는 플라스미노겐 결함의 예는 임신, 노령, 스트레스, 비만, 및 온도 변화와 같은 생리적 상태의 변화에 기인한 것일 수 있다. 각종 질환 상태, 수술, 방사선, 및 식이조절 또한 피브린 용해 부전 상태를 초래하는 기작들을 유발할 수 있다. 항암제, 경구 피임약, 사이토카인, 및 혈액 성분들을 비롯한 여러 약물들도 또한 일시적인 피브린 용해 결손을 생성할 수 있는데, 이는 환자들을 혈전 합병증에 걸리게 할 수 있다. 피브린 용해 부전 상태의 환자 집단을 규명하는 것은 심근 경색 및 혈전성 뇌졸중과 같은 파국적 사례로 이어질 수 있는 혈전 합병증의 방지를 향한 중요한 단계이다. 기능적 및 면역적 방법 모두 현재 피브린 용해 결손에 대한 신속한 진단에 이용가능하게 되었다. 따라서, 피브린 용해 결손으로 인해 혈전 합병증의 위험이 있는 환자들을 평가하는 것은 중요하다.

[0080] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐의 활성인자, 또는 플라스민의 단백질 분해 활성을 강화하는 화합물인 화합물 또는 약물을 투여함에 의한 인간 또는 비(非)-인간 대상에서의 감염 치료 및 감염 방어 강화 방법을 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은, 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분이거나 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물인 활성 성분을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 세균성 관절염 및/또는 중이염에 대항하여 감염 방어를 향상시키는 방법을 제공한다. 바람직한 구현예에서는, 상기 활성 성분은 플라스미노겐이고, 상기 조성물은 국소 적용을 통해 투여된다.

[0082] 나아가, 본 발명은 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분인 화합물 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물을 포함하는 조성물을 국소 또는 전신 투여함으로써 괴사 형성을 감소 또는 방지하는 방법을 제공한다. 상기 조성물은 겔, 로션, 밤 (balm), 페이스트, 창상 붕대, 또는 창상 드레싱의 일부분일 수 있다. 다르게는, 상기 조성물은 전신적으로 투여될 수 있다. 일 구현예에서는, 감염, 궤양 및 괴사의 발생 및 형성을 감소시키기 위해 본 발명의 방법을 성형 수술과 함께 적용한다.

[0083] 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐의 활성인자, 또는 플라스민의 단백질 분해 활성을 강화하는 화합물인 화합물 또는 약물을 투여함에 의한, 플라스민-플라스미노겐 시스템 활성의 결함을 가진 대상에서의 감염 치료 및 감염 방어 강화 방법을 제공한다.

[0084] 본 발명은 또한 동물 모델에서 감염 방어를 향상시키는데 유용한 화합물을 규명하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면, 플라스미노겐-결핍 동물에 감염을 일으키고, 해당 시험 화합물을 미리 결정된 경로를 통해 상기 동물에 투여한다. 그런 다음, 상기 플라스미노겐-결핍 동물에서의 감염 방어를 대조군 값, 예컨대 예컨대, 야생형 동물에서의 감염 방어와 비교하여, 상기 시험 화합물이 감염 방어율을 향상시켰는지 또는 괴사 형성을 감소시켰는지의 여부를 평가한다. 당해 방법에 바람직한 한 가지 동물 모델은 플라스미노겐의 대립유전자 중 하나 또는 둘 다가 결여된 넉아웃 (knock-out) 마우스, 또는 형질전환 마우스이다. 일 구현예에

서, 무릎 관절을 감염시키고, 플라스미노겐 첨가 및 미첨가 하에 해당 관절들의 숙주 방어를 연구한다. 또 다른 구현예에서는, 중이염의 자연 발병이 후속된다. TM 의 육안적 형태를 신중하게 검사하고, 이현미경 하에 상세히 기록하고, 플라스미노겐 첨가 및 미첨가 하에 TM 의 숙주 방어를 연구한다. 또 다른 구현예에서, 개방창, 일례로 화상 및 절개창을 감염시키고, 플라스미노겐 첨가 및 미첨가 하에 상기 상처 부위에서 감염에 대항하는 숙주 방어를 연구한다.

[0085] 나아가, 본 발명은, 플라스미노겐이 발현되는 시험관내 또는 생체내 모델을 포함하는, 감염에 대항한 숙주 방어를 향상시키는 데 사용할 수 있는 약물에 대한 생체내 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 생체내 모델은 야생형 또는 플라스미노겐-결핍 동물을 포함한다. 스크리닝 대상인 하나 이상의 약물 투여 후에, 플라스미노겐 및/또는 플라스민의 활성 또는 수준이 측정될 것이다. 바람직한 구현예에서는, 상기 동물 모델은 무릎 관절에서의 세균성 관절염 모델이고, 세균성 관절염은 상기 약물의 투여 전, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 유도된다. 또 다른 구현예에서, 상기 동물 모델은 개방창 감염 모델이고, 상기 개방창 감염은 상기 약물의 투여 전, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 유도된다.

[0086] 본 발명은 또한 플라스미노겐 활성의 활성인자, 또는 플라스미노겐 발현의 화합물 모방체를 포함하는 조성물을 투여함으로써 감염성 질환에 대항한 숙주 방어를 향상시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 플라스미노겐을 국소적으로 투여하여 해당 감염 부분에서 고농도가 되게 한다. 또 다른 구현예에서는, 상기 조성물은 플라스미노겐/플라스민 활성을 모방하는 화합물 및 유사한 활성을 가진 분자를 포함한다. 또 다른 구현예에서는, 상기 조성물은 플라스미노겐의 발현을 상향조절하는 약물을 포함한다.

[0087] 부가적으로, 본 발명은 플라스미노겐 또는 플라스미노겐-활성인자의 발현을 상향조절하는 약물을 투여함으로써 만성 감염 및 괴사를 치료하는 방법을 제공한다.

[0088] 또한, 본 발명은 하기를 포함하는 군의 화합물의, 세균성 관절염 및 중이염 및 개방창 감염에 대한 숙주 방어의 촉진, 및/또는 치유 중인 창상에서 괴사 조직 제거 및/또는 감염에 대항한 숙주 방어 향상 및/또는 괴사 조직 형성 감소를 위한 약제의 제조를 위한 용도에 관한 것이다: 플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐 또는 플라스민의 절편, 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분, 플라스미노겐 유사체, 플라스민 유사체, 또는 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분의 유사체, 또는 플라스미노겐을 활성화하는 능력을 가진 화합물.

[0089] 도면의 간단한 설명

[0090] 본 발명의 상기 특징 및 다수의 기타 이점들은 하기 상세한 설명을 첨부된 도면과 함께 참조할 때 더욱 이해될 것이다.

[0091] **도 1A-H.** $plg^{+/+}$ (좌) 및 $plg^{-/-}$ (우) 마우스들로부터의 관절염성 무릎 관절의 대표적인 단면들의 조직 구조들. $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들에 1 x 10^6 CFU *S. 아우레우스*를 관절강내로 주사하였다. (A, C, E): 각각, 관절염 유도 후 제 7, 14, 및 28 일의 $plg^{+/+}$ 마우스로부터의 관절염성 무릎 관절. (B, D, F): 각각, 관절염 유도 후 제 7, 14, 및 28 일의 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 관절염성 무릎 관절. (G): 항생제 처리 후 제 7 일의 $plg^{+/+}$ 마우스로부터의 관절염성 무릎 관절. (H): 항생제 처리 후 제 7 일의 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 관절염성 무릎 관절. 관절강에서 괴사 조직이 관찰된다(화살표). 활막 (Sm).

[0092] **도 2.** 각 시점에서 감염된 관절에서의 괴사 조직의 정량. 감염된 관절에서의 괴사 조직의 양을, 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 조직학적으로 점수화하였다. $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들을 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* 주사 후 제 7 일, 제 14 일 및 제 28 일에 비교하였다. 결과는 평균±SD 로 표시된다. ** = $P < 0.01$ (스튜던트 t 검정 기준).

[0093] **도 3.** 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스*가 관절강내 주사된 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들의 감염된 무릎 관절에서의 호중구 및 대식세포의 수. A. 세균 주사 후 제 1 일, 제 7 일 및 제 14 일에 침윤된 호중구의 수를 비교하였다. 막대는 5 마리의 마우스들의 평균치를 나타낸다. B. 세균 주사 후 제 1 일, 제 7 일 및 제 14 일에 침윤된 대식세포의 수를 비교하였다. 막대는 5 마리의 마우스들의 평균치를 나타낸다. 오차 막대는 SD 를 나타낸다.

[0094] **도 4A-F.** 플라스미노겐 보충 후 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 전체 무릎 관절에 대한 조직학적 분석. A,

B: 각각, 세균 주사 후 제 7 일 및 제 14 일의 $plg^{+/+}$ 마우스로부터의 대조군 관절염성 무릎 관절. C, D: 각각, 세균 주사 후 제 7 일 및 제 14 일의 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 대조군 관절염성 무릎 관절 (PBS 주사). E: 세균 주사 후 제 0 일에서부터 제 7 일까지 인간 플라스미노겐 (hPlg) 으로 보충된 $plg^{-/-}$ 관절염성 무릎 관절. F: 세균 주사 후 제 7 일에서부터 제 14 일까지 인간 플라스미노겐으로 보충된 $plg^{-/-}$ 관절염성 무릎 관절.

[0095] **도 5A-C.** 활막에서 IL-6 단백질 발현 수준. $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들로부터의 무릎 관절의 대표적인 단면의 면역염색. A: 세균 주사 후 제 7 일의 $plg^{+/+}$ 마우스로부터의 PBS 처리한 대조군 관절염성 무릎 관절. B: 세균 주사 후 제 7 일의 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 PBS 처리한 대조군 관절염성 무릎 관절. C: 세균 주사 후 제 0 일에서부터 제 7 일까지 인간 플라스미노겐 (hPlg) 으로 보충된 $plg^{-/-}$ 관절염성 무릎 관절. 분홍색은 활막에서의 IL-6 을 나타낸다(화살표).

[0096] **도 6A-B.** 감염되지 않은 및 감염된 무릎 관절에서 IL-10 단백질의 발현 수준에 대한 웨스턴 블랏 분석. A, 용해물 중의 IL-10 의 수준. 1 레인: $plg^{-/-}$ 마우스의 감염되지 않은 무릎 관절 용해물; 2 레인: $plg^{+/+}$ 마우스의 감염되지 않은 무릎 관절 용해물; 3 레인: 세균 주사 후 제 3 일의 $plg^{-/-}$ 관절염성 무릎 관절 용해물; 4 레인: 세균 주사 후 제 3 일의 $plg^{+/+}$ 관절염성 무릎 관절 용해물; 5 레인: 세균 주사 후 제 7 일의 $plg^{-/-}$ 관절염성 무릎 관절 용해물; 6 레인: 세균 주사 후 제 7 일의 $plg^{+/+}$ 관절염성 무릎 관절 용해물. B, 대조군으로서 A 의 각 레인에 대응하는 용해물 중의 β-액틴의 수준. 실험을 적어도 3 회 반복하고, 대표적인 결과를 나타내었다.

[0097] **도 7A-F.** 야생형 마우스 및 plg-결핍 마우스로부터의 대표적인 중이 (middle ear) 단면의 형태로서, 톨루이딘 블루로 염색한 것 (A 및 B) 및 피브린 (C 및 D) 및 케라틴 (E 및 F) 에 대한 면역조직화학적 염색물. A. 야생형 마우스의 중이. 중이강 (MEC) 에서 삼출 물질이 검출되지 않음. B. plg-결핍 마우스의 중이. MEC 에 중이염이 존재함. C 및 D. 각각 야생형 마우스 및 plg-결핍 마우스의 중이로서, 피브린(피브리노겐)에 대한 면역조직화학적 염색으로 분석한 것. E 및 F. 각각 야생형 마우스 및 plg-결핍 마우스의 중이로서, 케라틴에 대한 면역조직화학적 염색으로 분석한 것. O, 소골. 막대 50 μm.

[0098] **도 8A-H.** 야생형 및 plg-결핍 마우스의 중이 내의 T 세포, B 세포, 대식세포 및 호중구에 대한 면역조직화학적 염색. 야생형 대조군 (A, C, E, G) 및 대표적인 plg-결핍 마우스 (B, D, F, H) 의 중이들을 T 세포 (A 및 B), B 세포 (C 및 D), 대식세포 (E 및 F) 및 호중구 (G 및 H) 에 대한 면역조직화학적 염색으로 분석하였다. O, 소골. 막대 50 μm.

[0099] **도 9.** 무릎 관절에 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 접종한 후 상이하게 국소 및 전신 처치된 plg-/- 및 plg+/+ 마우스들의 무릎 관절에서의 세균의 수.

[0100] **도 10.** 무릎 관절에 *S. 아우레우스* 접종 후 3 일 후에 Plg (검은 상자) 또는 PBS (흰 상자) 로 국소 주사한 후의 plg+/+ 마우스의 무릎 관절 내 세균의 수. plg 를 국소 주사한 야생형 마우스에서 세균의 수가 PBS 를 국소 주사한 야생형에서보다 5 배 정도 유의하게 낮아진 것을 주목해야 한다.

[0101] **도 11.** uPA-결핍 및 야생형 마우스들의 무릎 관절 내 세균의 수. 야생형 마우스에서는 제 0 일의 *S. 아우레우스*의 접종 후 세균의 수가 빠르게 감소된 반면, uPA-결핍 마우스에서 세균의 수는 실험 기간 내내 일정하게 2.0 x 10^5 CFU 이상이었다는 것을 주목해야 한다.

[0102] **도 12A-F.** 1 x 10^6 CFU *S. 아우레우스*의 관절강내 주사 후 제 7 일 (A, D), 제 14 일 (B, E) 및 제 28 일 (C, F) 의 uPA-결핍 ($uPA^{-/-}$, 좌) 및 야생형 ($uPA^{+/+}$, 우) 마우스들의 관절염성 무릎 관절의 대표적인 단면들의 조직 구조. uPA-/- 마우스에서는 실험 내내 훨씬 더 많은 부종, 조직 파괴 및 괴사 조직 형성이 존재하는 반면, uPA+/+ 마우스에서는 염증이 관절염 유도 후 제 7 일에 단지 일시적으로 존재하였고, 그 후에는 감퇴된 것을 주목해야 한다.

[0103] **도 13:** $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들 간의 체중 변화 비교. 1 x 10^6 CFU 의 세균 주사 후 체중 변화의 시간적 추이. 마우스 체중을 제 1 일에서부터 제 21 일까지 24 시간마다 점검하였다.

[0104] **도 14.:** 화농성 관절염의 중증도. 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 관절염 지수를 사용하여 화농성 관절염의 중증도를 평가한 결과. 1 x 10^6 CFU *S. 아우레우스* Phillips 를 정맥내로 주사하여 관절염을 유도하였다. $plg^{+/+}$ 마우스들 (n = 15) 및 $plg^{-/-}$ 마우스들 (n= 16). 각 시점에 있어서, 평균±SEM 을 나타내었다. 맨-휘트니 (Mann-whitney) u-검정을 사용하여 통계학적 유의성 검정을 실시하였다(결핍 마우스 대 대조군 마우스). * P < 0.05 는 유의한 것으로 간주되었다.

[0105] **도 15A-H:** 플라스미노겐 결핍증은 화농성 관절염의 조직학적 특징을 악화시킨다. Safranin-O 로 염색한 발 관절 단면의 조직 구조. $plg^{+/+}$ (좌) 및 $plg^{-/-}$ (우) 마우스들에 1 x 10^6 CFU *S. 아우레우스*를 정맥내 주사한 후의 관절염성 발 관절의 대표적인 단면의 형태. 관절염 발병 후 제 1 일 (*A*), 제 3 일 (*B*), 제 7 일 (*C*) 및 제 14 일 (*D*) 의 야생형 마우스로부터의 관절염성 발 관절. 관절염 발병 후 제 1 일 (*E*), 제 3 일 (*F*), 제 7 일 (*G*) 및 제 14 일 (*H*) 의 $plg^{-/-}$ 마우스로부터의 관절염성 발 관절.

[0106] **도 16A-B:** 감염된 발목 관절에서의 괴사 조직. 괴사는 조직학적 관찰을 기초로 하였다. 괴사로 확인된 일부 시료를 TUNEL 염색으로 추가로 확인하였다.

[0107] **도 17A-B:** 감염된 발목 관절에서의 피브린 침착. 관절염성 무릎 관절에서 피브린에 대한 면역조직화학적 검출. 파라핀-포매 조직 단면을 토끼 항-쥣과 피브린(피브리노겐) 항체로 염색하였다. 갈색은 양성을 나타낸다. 관절염 발병 후 $plg^{+/+}$ (좌) 및 $plg^{-/-}$ (우) 마우스들에서 제 14 일의 관절염성 무릎 관절. $plg^{-/-}$ 및 $plg^{+/+}$ 감염된 관절에서 유사한 피브린 침착.

[0108] **도 18.** 등 피부에 1 x 10^7 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 가 국소 접종된 절개창 유도 후 plg 또는 PBS 로 국소 처리한 $plg^{-/-}$ 마우스의 창상 조직에서의 세균의 수.

[0109] **도 19A-B.** 등 피부에 1 x 10^7 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 가 국소 접종된 절개창 유도 후 plg 또는 PBS 로 국소 처리한 plg-/- 마우스의 대표적인 외관.

[0110] **도 20.** 화상 피부에 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 가 국소 접종된 화상 창상 유도 후 plg 또는 PBS 로 국소 처리한 plg-/- 마우스의 창상 조직에서의 세균의 수.

[0111] **정의**

[0112] 본 명세서에서 사용된 용어들은 일반적으로 당업계에서의, 본 발명의 맥락에서의 및 각 용어가 사용된 특정 문맥에서의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어들은 하기에 또는 본 명세서의 다른 곳에서 논의되는데, 이는 본 발명의 조성물 및 방법 및 이들을 제조 및 사용하는 방법을 기술함에 있어서 당업자에 부가적인 지침을 제공하기 위해서이다.

[0113] "하기를 포함하는 군의 화합물: 플라스미노겐, 플라스민, 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분, 플라스미노겐 유사체, 예컨대 미니-플라스민, 플라스민 유사체, 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분의 유사체, 플라스미노겐 활성인자"란 각각 플라스미노겐 또는 플라스민의 효과를 직접적으로 또는 간접적으로 제공하는 화합물을 지칭한다.

[0114] "플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분"이란 플라스미노겐, Lys-플라스미노겐, Glu-플라스미노겐, 플라스미노겐의 하나 이상의 도메인 예컨대 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스미노겐의 변형체 및 유사체 (예로서, 미니-플라스미노겐); 플라스민 및, 플라스민의 적어도 하나 이상의 도메인 예컨대 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 플라스민의 변형체 및 유사체 (예로서, 미니-플라스민 및 델타-플라스민); 예컨대 플라스미노겐의 형성 또는 활성화를 일으키는 일련의 단계적 사건들에 의해서, 플라스미노겐을 활성화하는 최종적 효과를 갖는 플라스미노겐 활성인자 (예로서, uPA 및 tPA 및 tPA 또는 uPA 의 하나 이상의 도메인 예컨대 이들의 크링글 도메인 및 단백질 분해 도메인 중 하나 이상을 포함하는 tPA 및 uPA 의 변형체 및 유사체) 를 지칭한다. 플라스미노겐, 플라스민, tPA 및 uPA 의 변형체들에는 이들 단백질들의 인간 및 기타 포유동물 형태의 모든 자연 발생적인 유전적 변형체, 뿐만 아니라 보존적 아미노산 대체에 의해 수득되는 이들 단백질들의 돌연변이 변형체가 포함된다. 플라스미노겐 또는 플라스민의 "유사체"는, 엔자이모그래피 (enzymography), ELISA (효소-결합 면역흡착 분석법) 및 FACS (형광 활성화 세포 분류기) 로 측정한 바, 각각 플라스미노겐 또는 플라스민과 유사한 효과를 본질적으로 제공하는 화합물이다.

이전에 기술된 바 전환된 플라스민 활성 수준을 측정하는 분석법도 있다: [Ny,A., Leonardsson,G., Hagglund,A.C., Hagglof,P., Ploplis,V.A., Carmeliet,P., 및 Ny,T. (1999). Ovulation in plasminogen-deficient mice. Endocrinology 140, 5030-5035.]. 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분의 "유사체"는, 상기 유사체에 의해 활성화되는 플라스민 활성의 수준으로 측정하여, 플라스미노겐 활성화 경로 중의 성분과 유사한 효과를 본질적으로 제공하는 화합물이다.

[0115] "괴사"는 신체 내의 조직의 사멸을 지칭한다. 이는, 상해, 방사선 조사, 또는 화학물질 등 어느 것으로부터 이든지, 해당 조직에 충분한 혈액이 공급되지 않을 때 일어난다. 괴사는 가역적이지 않다. 상해, 감염, 암, 경색, 동물성 중독증, 만성 창상, 궤양 및 염증을 비롯하여 괴사의 원인에는 다수가 있다.

[0116] "국소" 및 "국소 적용"은 활성 성분의 비(非)-전신적인, 국부적인 투여를 지칭한다. 즉, 국소 적용은 관심 부분의 외부 표면에 활성 성분을 적용하는 것을 지칭할 수 있다.

[0117] "국소 주사"는 관심 부분의/부분 근처의 조직 내로의 활성 성분의 비(非)-전신적인, 국부적인 투여를 지칭한다.

[0118] "관절내 주사"는 두 개의 연결된 골 사이의 관절 공간 내로의 활성 성분의 국부적 투여를 지칭한다.

[0119] "감염성 질환" 및 "감염"은 외래 종이 숙주 유기체에 유해하게 정착하는 것을 지칭한다. 감염에서, 감염시키는 유기체는 복제하기 위해 숙주의 자원들을 이용하고자 한다(보통 숙주가 대가를 치르게 함). 상기 감염시키는 유기체, 또는 병원균은 숙주의 정상적인 기능을 방해하고, 만성 창상, 괴저, 감염된 사지의 절단, 및 심지어 사망에 이르게 할 수 있다. 감염에 대한 숙주의 반응은 염증이다. 구어적으로, 병원균은 보통 미생물 (microscopic organism) 로 간주되는데, 가장 친숙한 것은 바이러스와 세균이다. 기타 감염성 병원균은 비로이드 및, 단세포 진균 및 원생동물로부터, 기생충과 같은 대형의 복잡한 후생동물에 이르는 진핵 생물이다.

[0120] 단백질 또는 화합물의 "활성"이란 단백질 또는 화합물이 특정 반응에 대하여 갖는 효과를 지칭하며, 상기 반응에 영향을 미치거나, 그것을 조절하거나, 그에 참여하거나 또는 그것을 촉진하는 능력에 대한 척도이다. 일반적으로, 단백질 또는 기타 화합물의 활성은 측정가능하다. 예를 들어, 효소, 예컨대 플라스민, PA, 및 MMP, 및 조절자 (modulator) 의 경우 효소 활성은, 예컨대, 단위 시간 및 효소 당 생성되는 생성물의 양 (예컨대, 농도 또는 중량) 으로 표시되는, 해당 반응의 생성물이 생성되는 속도로 표현될 수 있다. PAI-1 또는 uPA 와 같은 조절자의 경우, 활성은 반응의 속도 또는 상기 반응으로부터 형성되는 생성물의 양을 저해 또는 촉진, 증가 또는 감소, 상향- 또는 하향-조절하는 상기 조절자의 능력을 지칭할 수 있다.

[0121] "창상"은 외부 인자에 의해 유발된, 상피, 결합조직, 및 근육조직을 비롯한 기관 또는 조직의 구조의 파손이다. 창상의 예로서는, 이들에 제한되는 것은 아니나, 타박상, 찰과상, 열상, 절단 (cut), 천공, 및 화상이 있다. 특정 유형의 창상은 성형 외과 수술의 결과인 것들이다.

[0122] "중이염"은 귀의 염증성 상태로 정의된다. 급성 중이염 (AOM) 및 삼출성 중이염 (OME) 을 비롯한 중이염은 감기를 제외하고는 가장 흔한 아동 질환이다(5). 중이염과 관련된 가장 중요한 유병 인자는 상부 기도의 세균성 또는 바이러스성 감염이다. 중이염에서 중이 삼출물의 생화학적 조성은 중이 점막에서의 염증 변화를 반영한다. 상기 유체는 삼출액 및 선 (gland) 들로부터의 분비 생성물, 및 염증 세포 및 세균으로부터의 생성물의 혼합물이다.

[0123] 질환 또는 상태에 대한 대상의 "치료", 또는 대상을 "치료하는 것"은 본원에서 부전의 또는 더딘 창상-치유와 같은 질환 또는 상태의 임상적 증상을 감소 또는 완화시키는 것을 의미한다.

[0124] 창상 치유를 "강화하는 것"은 창상이 치유되는 속도를 증가시키는 것을 의미한다. 다르게는, 창상 치유를 "강화하는 것"은 치유 동안 또는 후에 반흔 조직의 형성을 감소시키는 것을 의미한다.

[0125] 본원에서 "대상"에는, 인간 및 비(非)-인간 동물이 모두 포함된다. 비(非)-인간 동물에는, 비제한적으로, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터, 기니피그 등과 같은 실험 동물; 개 및 고양이와 같은 가축; 및 양, 염소, 돼지, 말 및 소와 같은 사육 동물이 포함된다. 본 발명의 비(非)-인간 동물은 포유류 또는 비(非)-포유류인 동물; 척추동물 또는 무척추동물일 수 있다.

[0126] 검정에서 "대조군", "대조군 값" 또는 "기준값"은, 예컨대, 피부 창상의 치유, 또는 고막 천공의 치유에서, 또는 본원에 기술된 임의의 기타 검정에서 변동을 검출하는데 사용되는 값이다. 일례로, 고막 천공 치유에 대한 연구시, 작용제의 저해/자극 효과는 창상 또는 천공의 치유를 대조군의 것과 비교함으로써 평가할 수 있다. 대조군 또는 기준은, 예컨대, 미리 결정된 기준값일 수 있고, 또는 실험적으로 결정한 것일 수도 있다.

이러한 검정에서, 예를 들어, 대조군 또는 기준은 해당 약물 또는 활성제에 노출되지 않은 동물에서 유사한 창상 또는 천공의 치유일 수도 있다.

[0127] 질환 또는 상태"의 위험이 있는", "~에 걸리기 쉬운" 또는 "~에 취약한" 대상이란 상기 개체에 있어서 질환 또는 상태에 걸리거나 그것이 발병할 위험이 평균 집단에서보다 높은 것을 의미한다.

[0128] 화합물의 "결핍"이란 상기 화합물의 양, 수준, 또는 농도가 대조군 값보다 유의하게 더 낮은 것을 의미한다. 예를 들어, 플라스미노겐-결핍 동물에서, 플라스미노겐의 체액 및 조직 수준은 야생형 동물에서보다 유의하게 더 낮다.

[0129] 본원에서 사용된 바, "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 50 % 이내, 바람직하게는 20 % 이내, 더욱 바람직하게는 5 % 이내를 의미할 것이다.

[0130] 또 다른 값과 "실질적으로 상이한" 값은 상기 두 값 사이에 통계학적으로 유의한 차이가 존재함을 의미할 수 있다. 차이가 유의한지 아닌지를 평가하기 위해서는 당업계에 공지된 임의의 적당한 통계학적 방법을 사용할 수 있다. "통계학적으로 유의한" 차이는 유의성이 적어도 90% 의 신뢰 구간, 더욱 바람직하게는 95% 신뢰 구간에서 결정되는 것을 의미한다.

[0131] **분자 생물학 정의**

[0132] 본 발명에 따라서는, 당업계의 기술 내의 통상의 분자 생물학, 미생물학, 및 재조합 DNA 기법이 이용될 수 있다. 이러한 기법들은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 하기를 참조할 수 있다: 예컨대, Sambrook 등 (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I 및 II, 1985); Hames 및 Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames 및 Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); 및 Ausubel 등 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. ,1994).

[0133] 본원에서 나타난다면, 하기 용어들은 하기 개시된 정의를 가질 것이다.

[0134] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는, 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어들로서, 펩티드 결합이라 불리는 화학 결합에 의해 서로 연결되어 있는, 아미노산으로 불리는 화학적 구성 단위 (building block) 들의 하나 이상의 사슬들을 포함한다.

[0135] "효소"는, 다소 구체적으로는, 하나 이상의 화학 또는 생화학 반응을 촉매하거나 또는 촉진하는, 바람직하게는 전적으로 또는 주로 단백질로 구성된, 임의의 물질을 의미한다. "효소"라는 용어는 또한 촉매적 폴리뉴클레오티드 (예컨대 RNA 또는 DNA) 를 지칭할 수도 있다. "시험" 효소는 효소의 특성들을 갖고 있는지의 여부를 결정하기 위해 시험되는 물질이다.

[0136] "본래의" 또는 "야생형" 단백질, 효소, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포는 자연에서 발생하는 단백질, 효소, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포를 의미한다.

[0137] "변이체", "변경된", "변형체" 또는 "변형된" 단백질, 효소, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포는 모 단백질, 효소, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포로부터 변경된 또는 유래된, 또는 어떠한 방식으로 상이하거나 또는 변화된 단백질, 효소, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포를 의미한다. 유전자의 변경에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 프로모터 영역, 또는 전사에 영향을 미치는 기타 영역들의 변경으로서 단백질의 발현 수준을 변경시킬 수 있는 것이 포함된다. 변이체 또는 변형된 단백질 또는 효소는 보통, 반드시는 아니지만, 변이체 폴리뉴클레오티드 또는 유전자로부터 발현된다.

[0138] "변이" 또는 "변경"은 변이체 단백질, 폴리뉴클레오티드, 유전자, 또는 세포를 초래하는 임의의 과정 또는 기작을 의미한다. 이에는, 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 유전자 서열이 변경된 임의의 변이, 변이로부터 발생한 임의의 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 유전자 서열, 변이된 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 서열로부터 발현된 임의의 발현 생성물 (예컨대 단백질), 및 상기와 같은 변이로부터 일어난 세포 내 임의의 검출가능한 변화가 포함된다.

[0139] "기능-보존적 변형체"는 주어진 아미노산 잔기가 단백질 또는 효소의 전체적인 형태 및 기능을 변경시키지 않으면서 변화된 단백질 또는 효소로서, 여기에는, 이에 제한되는 것은 아니나, 한 아미노산을 유사한 특성들 (예컨대, 예를 들어, 산성, 염기성, 소수성, 등) 을 가진 것으로 대체하는 것인 "보존적 아미노산 대체"가 포함된다.

유사한 특성들을 가진 아미노산은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 아르기닌, 히스티딘 및 리신은 친수성-염기성 아미노산들이며, 상호 교환가능할 수 있다. 유사하게, 소수성 아미노산인 이소류신은 류신, 메티오닌 또는 발린으로 대체될 수 있다. 보존적인 것으로 지적된 것들 외의 아미노산들은 단백질 또는 효소에서 상이할 수 있어, 유사한 기능을 가진 임의의 두 단백질들 간의 % 단백질 또는 아미노산 서열 유사성이 다양할 수 있고, 예를 들어, Cluster 방법 (여기서 유사성은 MEGALIGN 알고리즘에 기초함) 에 의한 것과 같은 정렬 방식에 따라 결정할 때 70% 내지 99% 일 수 있다. "기능-보존적 변형체"에는 또한, BLAST 또는 FASTA 알고리즘으로 결정할 때 아미노산 동일성이 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 가장 바람직하게는 적어도 85%, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 90% 이고, 그와 비교되는 본래의 또는 모 단백질 또는 효소와 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 특성들 또는 기능들을 갖는 폴리펩티드 또는 효소가 포함된다.

[0140] **플라스미노겐- 활성화 시스템**

[0141] 플라스민은 PA 시스템의 핵심 성분이다. 이는 피브린, 젤라틴, 피브로넥틴, 라미닌 및 프로테오글리칸을 포함하는 ECM 의 여러 성분들을 분해하는 능력을 가진 광범위 프로테아제이다(6). 또한, 플라스민은 일부 전구-기질 금속단백분해효소 (pro-matrix metalloproteinase, 전구-MMP) 를 활성 MMP 로 전환시킬 수 있다. 따라서 플라스민이 세포외 단백질분해에 대한 중요한 상류 조절인자 (regulator) 일 수 있다는 것이 제안되었다. 플라스민은 효소원 (zymogen) 인 플라스미노겐으로부터 두 가지 생리학적 PA 들인 tPA 또는 uPA 중 하나에 의한 단백분해 절단을 통해 형성된다. 플라스미노겐이 혈장 및 기타 체액에서 비교적 높은 수준으로 존재하므로, PA 시스템에 대한 조절은 주로 PA 의 합성 및 활성의 수준에서 일어난다. PA 시스템의 성분들의 합성은 호르몬, 성장인자 및 사이토카인과 같은 다양한 인자들에 의해 크게 조절된다. 또한, 플라스민과 PA 들에 대한 특이적 생리학적 저해제들이 존재한다. 플라스민에 대한 주된 저해제는 α_2-항플라스민이다(7). PA 들의 활성은, uPA 및 tPA 를 모두 저해하는 PAI-1 및 주로 uPA 를 저해하는 PAI-2 에 의해 조절된다. 특정 세포들은 또한 단백질 분해 활성을 자신의 세포 표면으로 향하게 할 수 있는 uPA (uPAR) 에 대한 특이적 세포-표면 수용체를 갖는다.

[0142] 플라스미노겐은 분자량이 대략 92 kDa 인, 791 개 아미노산으로 이루어진 단쇄 당단백질 (성숙 인간 펩티드, GenBank 등록번호: NP 000292) 이다(8;9). 플라스미노겐은 주로 간에서 합성되며, 대부분의 세포외액에 풍부하다. 혈장에서 플라스미노겐의 농도는 대략 2 μM 이다. 플라스미노겐은 따라서 조직 및 체액에서 단백질 분해 활성의 잠재적인 대규모의 원천을 구성한다. 플라스미노겐은 하기 두 가지 분자적 형태로 존재한다: Glu-플라스미노겐 및 Lys-플라스미노겐. 분비되는 본래의 비절단 형태는 아미노-말단 (N-말단) 글루탐산을 가지며, 따라서 Glu-플라스미노겐으로 지칭된다. 그러나, 플라스민의 존재 하에서, Glu-플라스미노겐은 Lys^{76}-Lys^{77} 에서 절단되어 Lys-플라스미노겐이 된다. Glu-플라스미노겐과 비교하여, Lys-플라스미노겐은 피브린에 대해 더 높은 친화성을 가지며, PA 에 의해 더 높은 속도로 활성화된다. 이들 두 가지 형태의 플라스미노겐은 uPA 또는 tPA 에 의해 Arg^{560}-Val^{561} 펩티드 결합이 절단될 수 있는데, 이에 의해 디술피드-결합된 2-사슬 프로테아제 플라스민이 형성된다. 플라스미노겐의 아미노-말단은 소위 말하는 크링글인 5 개의 상동 3중 루프를 포함하며, 카르복실-말단 부분은 프로테아제 도메인을 포함한다. 상기 크링글 중 일부는 플라스미노겐과 피브린 및 이의 저해제인 α_2-AP 와의 특이적 상호작용을 매개하는 리신-결합 부위를 포함한다.

흥미로운 신규한 발견은, 크링글 1-4 로 이루어진 플라스미노겐의 38-kDa 절편이 신생혈관형성에 대한 강력한 저해제라는 것이다. 이 절편은 안지오스타틴으로 불리며, 플라스미노겐으로부터 여러 MMP 들에 의한 단백분해 절단을 통해 생성될 수 있다.

[0143] 플라스민에 대한 주된 기질은 피브린이며, 피브린 용해는 병리학적 혈병 형성의 방지에 있어 중추적이다(10).

플라스민은 또한 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸 및 젤라틴을 포함하는 ECM 의 여러 다른 성분들에 대해 기질 특이성을 갖는데, 이는 플라스민이 또한 ECM 재형성에서도 중요한 역할을 함을 나타낸다. 간접적으로, 플라스민은 또한, 일부 전구-MMP 를 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9 를 비롯한 활성 MMP 로 전환시키는 능력을 통해 ECM 의 부가적 성분들을 분해할 수 있다. 따라서 플라스민이 세포외 단백질분해에 대한 중요한 상류 조절인자일 수 있다는 것이 제안되었다.

[0144] **감염 연구를 위한 세균성 관절염 모델**

[0145] 스타필로코커스 아우레우스는 활막 염증, 연골 및 골 파괴, 및 궁극적으로 관절 변형을 야기하는 세균성 관절염에 가장 빈번히 관련되는 미생물이다(11). 포유류, 조류 및 파충류를 포함하는 다양한 동물 종들에서 자발적인 *S. 아우레우스* 관절염이 발병하는 것으로 관찰되었으며, 따라서 이들은 상기 질환의 유도를 위한 가능성

있는 모델이다. 상기 포도상구균이 어떻게 하여 신체를 통해 퍼져 관절에 이르는지에 대한 경로 (이는 중요한 특색임) 를 고려할 때, 인간에서의 세균성 관절 감염의 대다수가 혈행성으로 퍼진다는 것이 명백하게 나타났다. 즉, 감염의 모델을 제공하기 위해 살아있는 세균을 전달하는 최적의 방법은 정맥내 (i.v.) 주사를 통해서이다. 한편, 세균 접종의 관절내 경로는 발병기전의 초기 단계들을 건너뛰며, 따라서 세균성 관절염에 대한 보다 한정된 모델을 제공한다. 즉, 본 연구에서는, 국부적 세균 증식, 조직 파괴, 괴사 조직 형성 및 염증을 더 잘 연구하기 위해 관절내 세균 전달 방식을 주로 상기 모델로서 사용하였다. 그러나, 본 발명자들은 또한 정맥 주사를 통해 *S. 아우레우스*를 사용하는 일련의 세균성 관절염 연구도 수행하였다. 상기 두 모델 모두로부터 수득한 데이터는 비교가능한 결과를 나타내었고, 둘 다 플라스미노겐/플라스민이 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염에 대항하는 숙주 방어에서 필수적이라는 결론을 지지하였다.

[0146] 상해 후에 환자의 피부 정상세균총 (예컨대, *S. 아우레우스* 및 스트렙토코커스 피오게네스) 에 의한 즉각적인 집락화가 일어난다는 것은 잘 알려져 있다. 특별히 1950 년대 초에, 화상을 입은 환자에서 감염의 원인인 스트렙토코커스 피오게네스의 실질적인 제거를 가져온 페니실린 G 의 도입 후, *S. 아우레우스*가 창상 감염의 주요한 병인체가 되었다. 따라서 *S. 아우레우스*는 개방창 감염에 대한 가장 흔한 세균 종 중 하나이다. 절개창 및 화상 창상은 임상 실무에서 관찰되는 가장 흔한 창상 유형이다. 따라서, 본 특허 출원에서, 본 발명자들이 사용한 개방창 감염 모델은 실제로 가장 흔한 창상 유형인 화상 및 절개창에서 창상 감염의 주요한 병인체인 *S. 아우레우스*에 의한 감염이다. 따라서, 본 발명자들은 이들 두 개방창 감염 모델로부터 수득한 데이터가 상기 지식을 임상적 상황에 적용할 수 있는 가능성에 대해 매우 중요한 표지를 제공한다고 생각한다.

실 시 예

[0147] 본 발명을 하기 실시예를 이용하여 더욱 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 예시가 되는 것으로서, 어떤 방식으로든 본 발명의 범위 및 의의를 제한하는 것이 아니다. 실제로, 본 발명의 많은 변형 및 변화는 본 명세서를 독해할 때 당업자들에 명백할 것이며, 이들은 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

[0148] **실시예 1**

[0149] ***S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염 동안 $plg^{-/-}$ 마우스에서의 지속된 염증 및 조직 파괴**

[0150] 본 실시예는 플라스미노겐-결핍 마우스가 야생형의 형제 대조군 (control sibling) 과 비교할 때 지속된 염증 및 조직 파괴를 가졌음을 보여준다. *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염 동안 $plg^{+/+}$ 마우스에서보다 $plg^{-/-}$ 마우스에서 유의하게 더 심한 조직병리학적 변화가 존재한다.

[0151] **방법**

[0152] **마우스.** 혼합형 유전적 배경의 플라스미노겐-이종접합 ($plg^{+/-}$) 마우스들 (129 x C57BL/6) 을 이종교배하여 $plg^{+/+}$, $plg^{+/-}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들을 생성하였다. 8-12 주령의 수컷 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들을 상기 실험에 사용하였다(Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. Circulation 1995, 92:2585-2593).

[0153] **세균성 관절염의 유도.** 본 연구에 사용된 세균 균주는 *S. 아우레우스* Phillips 였다[Dr. Hook (스웨덴 Gothenburg 대학 류마티스학 및 임상면역학과) 로부터 무상으로 받음]. 관절염은 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 집락-형성 단위 (CFU) 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 마우스의 오른쪽 무릎 관절에 국소 주사하여 유도하였다. 대조군으로서, 왼쪽 무릎 관절에 10 μl 멸균 PBS 만을 단독으로 주사하였다. 접종 후 마우스들을 상이한 시점에 희생시키고, 시료들을 취하여 상기 질환의 중증도를 평가하였다. 모든 실험 프로토콜은 Umea 대학의 지역 윤리위원회의 승인을 받았다.

[0154] **조직학적 분석.** 세균 주사 후 제 7, 14, 및 28 일에, 마우스들을 희생시키고, 조직학적 분석을 위해 전체 무릎 관절의 시료들을 수집하였다. 간략히, 무릎 관절들을 먼저 4% 파라포름알데히드 중에 고정시키고, 파라핀에 포매하고, 그 후 8-μm 절편들을 제조하였다. 조직학적 분석을 위해 조직 절편들을 포함한 슬라이드를 Safranin-O 로 염색하였다. 각 실험군에 적어도 10 개의 무릎 관절을 포함시켰다.

[0155] **감염된 관절에서의 괴사 조직의 정량.** 상기 무릎 관절 조직학적 절편들의 영상을 Leica DM LB 현미경

(Leica, Wetzlar, 독일) 에 부착된 Leica DC300F 디지털 카메라로 찍었다. 감염된 관절에서의 괴사 조직의 양을 결정하기 위해, 전체 무릎 관절들의 조직학적 절편의 영상을 x50 배율에서 50 x 40 격자로 나누었다. 상기 괴사 조직을 포함한 격자 내의 각 정사각형을 '히트'로 계수하였다. 각 관절로부터 3 개의 독립적인, 무작위 선택된 절편들을 계수하고, 각 시점에서 동일 유전자형의 별개의 마우스들로부터의 5 개 관절을 사용하였다. '히트'의 평균치를 계산하고 나타내었다.

[0156] **결과**

[0157] 세균성 관절염의 임상적 결과에 대한 플라스민의 효과를 연구하기 위해, 마우스들의 무릎 관절에 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Philips 를 주사하였다. 그 후, 마우스들을 상이한 시점들에서 희생시키고, 무릎 관절들을 절개하였다. 관절내 주사 후 제 7, 14, 및 28 일로부터의 무릎 관절 시료를 현미경으로 조사한 결과 $plg^{+/+}$ 마우스들의 무릎 관절에서는 유사한 수준의 약한 부종이 있는 것으로 나타났다. 그러나, $plg^{-/-}$ 마우스들에서는, 세균 감염된 무릎 관절의 크기가 전체 실험 기간 동안 증가하였다. 제 28 일에, 세균 감염된 무릎 관절은 유의하게 커졌고, 관절강들은 화농성 물질로 가득 찼으며, 활막 표면은 심하게 불룩해졌다.

[0158] 조직학적 분석을 위해 제 7, 14 및 28 일의 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들의 세균 감염된 무릎 관절을 준비하였다.

도 1 에 나타난 바와 같이, 모든 관찰 시점에서 $plg^{+/+}$ 마우스들에서보다 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 현저히 더 심한 관절염이 관찰되었다. 제 7 일에 $plg^{+/+}$ 마우스에서는, 관절강에 염증 세포들이 침윤되었고, 활막은 정상보다 더 두꺼웠으며, 연골 표면은 분해되었다(도 1A, Sm). 제 14 일에, 상기 침식된 골 부근에서 염증 세포들이 관찰되었다(도 1C, 화살표). 그러나, 제 28 일에, 염증 세포의 수는 감소하였고, 손상된 연골 및 골의 조직 수복이 시작되었다(도 1E). 상기 질환 전개 양상은 $plg^{-/-}$ 마우스에서와 완전히 상이하였다. $plg^{-/-}$ 마우스에서는 제 7 일에, 다량의 염증 세포가 관절강에 침윤되었으며, 골의 여러 부분이 침식되었고, 괴사 조직이 관찰되었다(도 1B). 제 14 일에는, 활막이 제 7 일에서보다 더 두꺼워졌고, 괴사성 부위가 증가되었다. 연골 파괴 및 골 침식이 제 7 일에서보다 훨씬 더 심하였다(도 1D). 제 28 일에는, 전체 무릎 관절이 거의 완전히 분해되었고, 단지 괴사 조직과 연골의 작은 일부만 남아있었다(도 1F). 상기 시료 절편들의 반-정량적 (Semi-quantitive) 연구는 전체 질환 전개 동안 $plg^{+/+}$ 마우스에서보다 $plg^{-/-}$ 마우스에서 조직 괴사 수준이 유의하게 더 높았음을 나타내었다(도 2). 이들 데이터는 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염 동안 $plg^{+/+}$ 마우스에서보다 $plg^{-/-}$ 마우스에서 유의하게 더 심각한 조직병리학적 변화가 존재함을 나타낸다.

[0159] **실시예 2**

[0160] **$plg^{-/-}$ 마우스에서 항생제 처리는 세균을 살상하고, 염증을 감소시키나, 괴사 조직의 형성을 감소시키지는 않음**

[0161] **방법**

[0162] 당해 실험은 동물들 중 일부에 항생제를 투여하는 것을 제외하고는 실시예 1 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0163] **항생제 처리.** 항생제 클록사실린 (AstraZeneca, Sodertalje, 스웨덴) 을 멸균 PBS 중에 용해시키고, 세균 주사 후 제 7 일에 시작하여 체중 1 g 당 0.5 mg 의 투여량으로 12 시간마다 마우스에 복강내 주사하였다. 세균 주사 후 제 14 일에 마우스를 죽였다.

[0164] **결과**

[0165] $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 질환 전개에 대한 항생제 처리의 영향을 또한 조사하였다. 마우스들에 제 0 일에 세균을 주사하고, 세균 주사 후 제 7 일부터 제 14 일까지 1 일 2 회 클록사실린으로 처리하였다. 제 14 일에 감염된 관절로부터 세균을 회수한 결과 클록사실린 치료 후 $plg^{-/-}$ 마우스들에서는 세균이 완전히 사멸된 것으로 나타났다(데이터는 나타나지 않음). 조직병리학적 분석결과, 클록사실린으로 처리되지 않은 마우스 (도 1C) 와 비교할 때, 항생제 처리 후의 $plg^{+/+}$ 마우스 (도 1G) 에서는 염증이 가라앉은 것으로 나타났다.

클록사실린으로 처리된 $plg^{-/-}$ 마우스에서는, 염증의 수준이 동일한 처치를 받은 $plg^{+/+}$ 마우스에서보다 훨씬 더 컸다. 이의 연골 및 골은 대부분 수복되었다(도 1H). 주목할 만하게, 활막에서는 적은 괴사 조직 부

분이 남아 있었다(화살표, 도 1H). 이들 데이터는 $plg^{-/-}$ 마우스에서 클록사실린의 복강내 투여에 의해 무릎 관절로부터 세균이 성공적으로 제거되었고, 조직 파괴가 감소되었고, 조직 수복 과정이 복구되었다는 것을 나타낸다. 그러나, 상기 항생제 처리 후 $plg^{-/-}$ 마우스의 무릎 관절에서는 큰 괴사 조직 부분이 남아 있었다.

[0166] **실시예 3**

[0167] **플라스미노겐 결핍증은 세균 제거를 손상시킴**

[0168] **방법**

[0169] 당해 실험은 세균수 측정을 제외하고는 실시예 1 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0170] **세균수 측정.** 세균 주사 후 제 2, 3, 4, 5, 7, 14 및 28 일에, 무릎 관절들을 취한 후, 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물들의 용액을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그런 다음, 생존 세균 집락을 계수하여 각 균질 현탁액 내의 세균의 수를 평가하였다.

[0171] **결과**

[0172] 본 발명자들은 그 후 세균성 관절염 유도 후의 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들의 무릎 관절에서의 세균 증식을 조사하였다. 표 1 에 나타난 바와 같이, $plg^{+/+}$ 마우스에서, 감염된 무릎 관절에서의 *S. 아우레우스*의 양은 세균 주사 후 제 2 일로부터 즉시 감소하였다. 제 7 일에는, $plg^{+/+}$ 마우스의 50% (7/14) 에서 *S. 아우레우스*가 검출불가하였다. 제 14 일에는, $plg^{+/+}$ 마우스의 80% (8/10) 에서 *S. 아우레우스*가 검출불가하였고, 나머지 2 마리에서도 1 x 10^3 CFU 미만이 발견되었다. 제 28 일에는, 모든 $plg^{+/+}$ 마우스에서 상기 세균이 완전히 제거되었다. 이와 뚜렷이 대조적으로, 모든 $plg^{-/-}$ 마우스에서는 전체 실험 기간 내내 감염된 무릎 관절에 *S. 아우레우스*가 존재하였다(표 1). 제 28 일에, $plg^{-/-}$ 마우스의 접종된 관절들에서 *S. 아우레우스*의 양은 제 0 일에 주사된 양보다 27 배나 더 높았다. 이들 데이터는 $plg^{-/-}$ 마우스의 무릎 관절에서 세균의 제거가 손상된 것을 나타내는데, 이는 감염에 대항한 숙주 방어 동안 플라스민이 세균-살상 과정에 연루된 것을 시사한다.

표 1

1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* **Philips** 의 관절강내 주사 후 **$plg^{+/+}$** 및 **$plg^{-/-}$** 마우스들의 무릎 관절에서의 세균 회수

세균 주사 후 일수	평균 세균 수*		발생률**	
	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
2	$(7.6 \pm 3.7) \times 10^5$	$(2.9 \pm 1.5) \times 10^6$	5/5	3/3
3	$(3.7 \pm 0.9) \times 10^5$	$(2.3 \pm 0.5) \times 10^6$	5/5	5/5
4	$(3.0 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^6$	5/5	5/5
5	$(2.2 \pm 0.5) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^6$	5/5	5/5
7	$(8.6 \pm 1.3) \times 10^3$	$(1.9 \pm 0.3) \times 10^6$	7/14	11/11
14	$(4.0 \pm 2.0) \times 10^2$	$(3.7 \pm 0.6) \times 10^6$	2/10	10/10
28	검출불가	$(2.7 \pm 0.6) \times 10^7$	0/10	10/10

*검출가능한 수준의 살아있는 세균을 가진 무릎 관절에서 평균 세균수.

**데이터는 검출가능한 수준의 살아있는 세균을 가진 무릎 관절의 수를 각 군에서 조사된 전체 무릎 관절의 수로 나눈 것을 나타낸다.

[0173]

[0174] **실시예 4**

[0175] **감염된 관절에서 대식세포 및 호중구의 침윤이 $plg^{-/-}$ 마우스에서 명백히 손상된 것은 아님**

[0176] **방법**

[0177] 당해 실험은 면역조직화학적 분석 및 염증 세포 계수를 제외하고는 실시예 1 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0178] **면역조직화학적 분석.** 파라핀-포매 절편들 (8-μm) 을 탈파라핀화하고, 재수화하고, 내인성 과산화효소 활성을 10 분간 0.3% H_2O_2 로 차단하였다. 실온에서 20 분간 5% 토끼 혈청으로 인큐베이션 후, 슬라이드들을 각각 대식세포에 대한 (Clone F4/80, MCAP497, Serotec, UK) 또는 호중구에 대한 (MCA771G, Serotec, UK) 래트 항-마우스 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후, 대식세포 및 호중구 면역염색을 위해, 슬라이스들을 헹구고, 염소 항-래트 IgG (SC-2019, Santa Cruz, California) 항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 추가로 인큐베이션하였다.

[0179] **염증 세포 계수.** x400 배율에서 5 개 필드 (field) 의 영역으로부터 도출한 절편 당 총 세포수. 각 절편에 대해 전체 계수 절차를 2중으로 수행하고, 절편 당 평균치를 산출하였다. 각 관절로부터 3 개의 독립적인 절편들을 계수하고, 각 시점에서 동일 유전자형의 별개의 마우스들로부터의 5 개 관절들을 사용하였다.

[0180] **결과**

[0181] $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 감염된 무릎 관절 내로의 대식세포 및 호중구들의 침윤을 조사하기 위해 면역조직화학적 분석을 수행하였다. 염증 세포 침윤은 절편들 상에 나타난 양성으로 염색된 세포들의 수를 계수하여 정량하였다. 본 연구에서는 각 관절로부터 3 개의 독립적인 절편들을 계수하였고, 각 시점에서 각 유전자형으로부터의 5 개 관절 시료를 포함시켰다(도 3A 및 3B). $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스 모두에서, 세균 주사 후 24 시간 이내에는 유사한 수의 호중구 및 대식세포가 감염된 무릎 관절의 활막 내로 침윤되었다. 그 후 제 7 일 및 제 14 일에, $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스 둘 다에서 축적된 호중구 및 대식세포의 수는 제 1 일에서와 비교하여 유의하게 증가하였다. 이들 데이터는 세균 주사 후 24 시간 이내부터 제 14 일까지는, $plg^{+/+}$ 마우스와 비교할 때 $plg^{-/-}$ 마우스에서 감염된 관절에의 호중구 또는 대식세포 침윤이 손상되지 않았음을 나타낸다. 그러나, $plg^{-/-}$ 마우스에서 호중구 및 대식세포의 침윤이 명백하게 손상되지 않았음에도 불구하고, 이들 세포의 정상적인 기능, 특별히 세균 살상 능력은 심하게 손상되었다.

[0182] **실시예 5**

[0183] **$plg^{-/-}$ 마우스에 인간 플라스미노겐 (hPlg) 을 전신적으로 보충함으로써 *S. 아우레우스* 감염에 대항한 정상 숙주 방어가 회복되었음**

[0184] **방법**

[0185] 당해 실험은 마우스들의 일부에 인간 플라스미노겐을 투여한 것 및 웨스턴 분석을 제외하고는, 실시예 1 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0186] **$plg^{-/-}$ 마우스에의 인간 플라스미노겐 보충.**

[0187] **실험 프로토콜 1 에 있어서,** 마우스들의 양 무릎 관절에 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 국소 접종하여 관절염을 유도하였다. 세균 접종 6 시간 전에, 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스 각각에 7 일간 24 시간 간격으로 100 μl 멸균 PBS 중의 1 mg 인간 플라스미노겐 (hPlg) (Biopool, Umea, 스웨덴) 을 정맥내 (i.v.) 주사로 보충하였다. 대조군으로서, 6 마리의 $plg^{+/+}$ 및 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스들에 7 일의 실험 기간 동안 24 시간 간격으로 멸균 PBS 만을 단독으로 주사하였다. 세균 주사 후 제 7 일에 마우스들을 희생시키고, 무릎 관절 시료들을 절개하고, 탈회 (decalcification) 한 후, 조직학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 가공하였다.

[0188] **실험 프로토콜 2 에 있어서,** 관절염을 실험 프로토콜 1 과 같이 유도하였다. 세균 접종 후 제 7 일부터, 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스 각각에 100 μl 멸균 PBS 중의 1 mg hPlg 를 i.v. 주사로 보충하였다. 그 후 동일 양

의 플라스미노겐을 7 일간 24 시간 간격으로 주사하였다. 대조군으로서, 6 마리의 $plg^{+/+}$ 및 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스들에 7 일간 24 시간 간격으로 멸균 PBS 만을 단독으로 주사하였다. 주사 후 제 14 일에 마우스들을 희생시키고, 무릎 관절 시료들을 절개하고, 탈회한 후, 조직학적 분석을 위해 가공하였다.

[0189] **결과**

[0190] 플라스민이 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염에 대항하여 숙주 방어에서 역할을 하는 것을 확인하기 위해, 본 발명자들은 hPlg 가 보충된 $plg^{-/-}$ 마우스들에서 세균성 관절염의 전개를 조사하였다. 본 발명자들은 먼저 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스들에 세균 주사 후 제 0 일부터 제 7 일까지 hPlg 를 보충한 실험을 수행하였다. 그 후 본 발명자들은 이미 7 일간 세균성 관절염이 발병해 있는 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스에 대한 hPlg 의 보충의 효과를 조사하였다. 도 4A 및 4B 에 나타난 바와 같이, 멸균 PBS 를 투여받은 $plg^{+/+}$ 마우스의 경우, 활막에서 보통 수준의 염증이 관찰되었고, 골의 구조가 비교적 온전하였다. 도 4C 및 4D 에 나타난 바와 같이, 멸균 PBS 만을 투여받은 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우, 활막 조직의 부분들에서 괴사 조직이 발견되었고, $plg^{+/+}$ 군에서보다 염증 및 조직 파괴가 훨씬 더 심하였다. 제 0 일부터 제 7 일까지 hPlg 를 보충한 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우 (도 4E), 이의 조직병리학적 특징은 PBS 를 투여받은 $plg^{+/+}$ 마우스와 비슷하였다. 도 4F 에 나타난 바와 같이, 제 7 일부터 제 14 일까지 hPlg 를 투여받은 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우, 이의 관절 형태는 PBS 를 투여받은 $plg^{-/-}$ 마우스에서보다 실질적으로 더 온전하였고, 염증의 수준은 $plg^{+/+}$ 대조군에 필적하였다. 또한, hPlg 를 투여받은 군의 활막에서는 매우 작은 괴사 조직 부분이 존재하였다. 표 2 에 나타난 바와 같이, 세균 주사 후 7 일간 hPlg 이 보충된 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우 세균 살상 능력이 또한 회복되었다. 이들 데이터는, 플라스민 (플라스미노겐)이 관절염성 무릎 관절에서 *S. 아우레우스*의 제거 및 감염에 대항한 숙주 방어의 완전성에 있어서 본질적으로 필요하다는 것을 명백히 보여준다.

표 2

$plg^{-/-}$ 마우스에 플라스미노겐을 보충한 후 감염된 무릎 관절에서의 세균 회수

	관절에서의 평균 세균수* (CFU)		
	PBS 투여된 $Plg^{+/+}$ 마우스	PBS 투여된 $Plg^{-/-}$ 마우스	인간 플라스미노겐 투여된 $Plg^{-/-}$ 마우스
제 0–7 일	$(3.2 \pm 2.0) \times 10^3$, n = 6	$(1.3 \pm 0.12) \times 10^6$, n = 6	$(1.3 \pm 0.43) \times 10^{3}$**, n = 6
제 7–14 일	$(7.2 \pm 4.3) \times 10^2$, n = 6	$(2.2 \pm 0.59) \times 10^6$, n = 6	$(1.8 \pm 0.56) \times 10^{3}$**, n = 6

*검출가능한 양의 살아있는 세균을 가진 무릎 관절에서 평균 세균수.

** $P < 0.01$. 인간 플라스미노겐 투여된 $plg^{-/-}$ 마우스의 군을 PBS 투여된 $plg^{-/-}$ 마우스의 군과 비교하였음.

[0191]

[0192] **실시예 6**

[0193] **$plg^{-/-}$ 마우스에 인간 플라스미노겐 (hPlg) 을 국소 보충함에 의해 *S. 아우레우스* 감염에 대항한 정상 숙주 방어가 회복됨**

[0194] **방법**

[0195] 마우스들의 양 무릎 관절 내로 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 국소 접종하여 세균성 관절염을 유도하였다. 세균 접종 15 분 후에, 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스의 무릎 관절 중 한쪽에 40μl 의 인간 플라스미노겐 (PBS 1 μl 당 10 μg, Biopool, Umea, 스웨덴) 을 무릎 관절 조직 주위로의 국소 주사로 보충하였다. 그 후 7 일간 24 시간 간격으로 인간 플라스미노겐을 보충하였다. 국소 주사에 대한 대조군으로서, 6 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스에 세균 접종 15 분 후에, 그 후 7 일의 실험 기간 동안 24 시간 간격으로 40

ul 의 멸균 PBS 를 단독으로 무릎 관절 조직 주위에 국소적으로 주사하였다. 야생형 마우스 대조군으로서, 2 마리의 $plg^{+/+}$ 마우스에 세균 접종 15 분 후에, 및 그 후 7 일간 24 시간마다 40 ul 의 멸균 PBS 만을 단독으로 투여하였다. 전신 주사된 $plg^{-/-}$ 마우스 대조군으로서, 2 마리의 $plg^{-/-}$ 마우스에 세균 접종 1 시간 전에 및 그 후 7 일간 24 시간마다 100 μl 인간 플라스미노겐 (10 μg/μl) 을 정맥내로 투여하였다.

[0196] 세균 접종 후 제 7 일에 마우스들을 희생시키고, 무릎 관절들을 취하여 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물 용액들을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그런 다음, 생존 세균 집락들을 계수하여, 각 균질 현탁액 중의 *S. 아우레우스* 세균수를 평가하였다.

[0197] **결과**

[0198] *S. 아우레우스*가 접종된 $plg^{-/-}$ 마우스에 플라스미노겐을 7 일간 국소 주사한 것은 이들 마우스에서의 PBS 국소 처리와 비교하여 성공적으로 및 유의하게 세균의 양을 100-배로 감소시켰다(표 3 및 도 9). 인간 플라스미노겐이 전신 주사된 $plg^{-/-}$ 마우스 또는 PBS 가 국소 주사된 $plg^{+/+}$ 마우스들 모두 또한 자신들의 무릎 관절 내의 *S. 아우레우스*를 성공적으로 살상하였다. 이들 데이터는 인간 플라스미노겐의 국소 주사에 의해 $plg^{-/-}$ 마우스에서 정상적인 세균 살상 능력이 회복될 수 있음을 명백히 증명한다.

표 3

1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 접종 후 제 3 일에 상이하게 국소 및 전신 처치된 plg-/- 및 plg+/+ 마우스들에서의 세균의 수

군	시료의 수	평균 세균수 (평균±SD, $\times 10^6$ CFU)
hPlg 가 국소 주사된 Plg-/-	6	0.019±0.044*
PBS 가 국소 주사된 Plg-/-	6	1.09±0.55
hPlg 가 전신 주사된 Plg-/-	2	0.00075±0.0011*
PBS 가 국소 주사된 Plg+/+	2	0.00065±0.00092*

*, P<0.05, PBS 가 국소 주사된 plg-/- 마우스의 군과 비교.

[0199]

[0200] **실시예 7**

[0201] **$plg^{+/+}$ 마우스에 인간 플라스미노겐을 국소 보충함에 의해 *S. 아우레우스* 감염에 대항하는 숙주 방어가 강화됨**

[0202] **방법**

[0203] 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 마우스의 무릎 관절에 국소 접종하여 세균성 관절염을 유도하였다. 세균 접종 15 분 후, 7 마리의 $plg^{+/+}$ 마우스의 무릎 관절 중 한쪽에 50μl 의 인간 플라스미노겐 (hPlg, PBS 중 10 μg/μl, Biopool, Umea, 스웨덴) 을 무릎 피부 하 및 무릎 관절 조직 주위로 국소 주사하여 보충하였다. 그 후 제 0 일에서 제 2 일까지 24 시간 간격으로 인간 플라스미노겐을 동일한 양식으로 보충하였다. 국소 주사 대조군으로서, 세균 접종 15 분 후에 7 마리의 $plg^{+/+}$ 마우스의 무릎 피부 하 및 무릎 관절 조직 주위에 50 ul 의 멸균 PBS 를 단독으로 국소적으로 주사하고, 그 후 실험 기간의 제 0 일

에서 제 2 일까지 24 시간 간격으로 동일한 국소 주사를 실시하였다.

[0204] 세균 접종 후 제 3 일에 마우스들을 희생시키고, 무릎 관절들을 취하여 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물 용액들을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후 생존 세균 집락들을 계수하여 각 균질 현탁액 내의 *S. 아우레우스* 세균수를 평가하였다.

[0205] **결과**

[0206] $plg^{+/+}$ 마우스의 무릎 관절에 인간 플라스미노겐을 3 일간 국소 주사함에 의해 성공적으로 및 유의하게 살아있는 *S. 아우레우스*의 수가 PBS 처리한 대조 $plg^{+/+}$ 군에 비해 5 배 감소되었다. 이들 데이터는 인간 플라스미노겐이 심지어 야생형 동물에서도 세균 감염에 대항하는 숙주 방어를 강화하는 강력한 전염증 인자라는 것을 명백히 증명한다. 이들 데이터 (표 4, 도 10) 는 플라스미노겐이 임상적 용도를 위한 신규한 항-감염성 약물 후보물질임을 더욱 나타낸다.

표 4

1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 접종 후 제 3 일에 인간 플라스미노겐 또는 PBS 이 국소 주사된 야생형 (plg+/+) 마우스에서의 세균의 수

군	시료의 수	평균 세균수 (평균±SE, $\times 10^6$ CFU)
hPlg 가 국소 주사된 Plg+/+	7	0.031±0.011*
PBS 가 국소 주사된 Plg+/+	7	0.14±0.047

[0207] *, P<0.05, PBS 가 국소 주사된 Plg+/+ 마우스의 군과 비교.

[0208] **실시예 8**

[0209] **$plg^{-/-}$ 마우스에 플라스미노겐을 보충함에 의해 감염된 무릎 관절에서 IL-6 단백질 발현이 증가되었음**

[0210] **방법**

[0211] 당해 실험은 IL-6 에 대한 면역조직화학적 염색을 제외하고는 실시예 5 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0212] IL-6 면역염색을 위해, 슬라이스들을 헹구고, 돼지 항-토끼 IgG 항체 (P0217, DAKO, Denmark) 와 함께 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. DAKO 기질 키트 (substrate kit) (K3464, DakoCytomation AEC 기질, USA) 로 발색 반응을 전개시키고, 슬라이드들을 헤마톡실린 (hematoxylin) 으로 대조염색하였다. 음성 대조군으로 기능한 상기 1차 항체 대신 토끼 혈청과 함께 인큐베이션된 슬라이드들은 모두 음성을 나타내었다.

[0213] **결과**

[0214] IL-6 은 림프구 활성화, 성장 및 분화에 연루된 것으로 보고되었으며, IL-6 결핍은 감염에 대한 취약성을 강화시킨다. 본 발명자들은 따라서 세균성 관절염 동안 플라스민이 IL-6 발현에 대해 임의의 효과를 갖는지를 조사하였다. $plg^{-/-}$ 마우스에 hPlg 를 보충하는 동안 조직 절편을 위한 시료들을 취하고, 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 세균 주사 후 7 일간 멸균 PBS 가 투여된 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우, $plg^{+/+}$ 마우스와 비교하여 IL-6 단백질 수준이 유의하게 저하되었다(도 5A 및 5B). 도 5C 에 나타난 바와 같이, 세균 주사 후 7 일간 hPlg 이 투여된 $plg^{-/-}$ 마우스의 경우에는, IL-6 단백질 발현이 $plg^{+/+}$ 마우스와 유사한 수준으로 증가되었다. 이들 데이터는 세균성 관절염 동안 플라스민이 무릎 관절에서의 IL-6 발현 조절에 연루됨을 나타낸다.

[0215] **실시예 9**

[0216] **$plg^{-/-}$ 관절과 비교하여 $plg^{+/+}$ 관절에서 IL-10 발현 수준이 더 높음**

[0217] **방법**

[0218] 당해 실험은 웨스턴 블랏 분석을 제외하고는 실시예 1 에서와 유사한 방식으로 수행되었다.

[0219] **웨스턴 블랏 분석.**

[0220] 세균 주사 후 제 3 및 7 일에, 마우스들을 희생시키고, 전체 무릎 관절들을 수집하였다. 관절들을 균질화하고, 얼음 상에서 30 분간 NP-40 완충액 (0.5% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1 mM EDTA, ImM Na_3VO_4, 0.25 mM PMSF, 5 μg/ml 아프로티닌, 1 μg/ml 류펩틴 (leupeptin), 1 μg/ml 펩스타틴, 및 15% 글리세롤) 중에서 용해시켰다. 용해물들을 동일한 단백질 농도가 되도록 조정하였다. 염소-항-마우스 IL-10 항체 (AF-417-NA, R & D systems, UK) 및 β-액틴에 대한 마우스 단일클론 항체 (Sigma-Aldrich 스웨덴 AB, Stockholm, 스웨덴) 를 사용하여, 기술된 바와 같이 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다(12). 양고추냉이 과산화효소 (HRP) 가 결합된 항-염소 및 항-마우스 이차 항체들은 Biorad (Hecules, CA, USA) 로부터의 것이었다.

[0221] **결과**

[0222] 이전의 연구들은 인터류킨-10 (IL-10) 이 화농성 관절염의 동물 모델에서 항-염증 효과를 가짐을 증명하였다(13). 세균성 관절염 동안 플라스민이 IL-10 발현에 대해 임의의 효과를 갖는지 연구하기 위해, 웨스턴 블랏 분석을 수행하여 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스들의 IL-10 수준을 비교하였다. 세균 주사 후 제 3 및 7 일에, 관절 균질 현탁액을 용해시키고, IL-10 을 위한 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. $plg^{-/-}$ 마우스는 $plg^{+/+}$ 마우스와 비교하여 감염되지 않은 무릎 관절에서 IL-10 수준이 극적으로 낮았다(도 6A, 각각 1 및 2 레인). 제 3 일에, 두 유전자형 마우스 모두에서 IL-10 수준이 증가되었으나, $plg^{-/-}$ 은 $plg^{+/+}$ 마우스와 비교할 때 여전히 IL-10 수준이 현저히 낮았다(도 6A, 3 및 4 레인). 제 7 일에, $plg^{-/-}$ 마우스는 여전히 IL-10 수준이 제 3 일과 동일한 반면, $plg^{+/+}$ 마우스에서는 IL-10 수준이 감소하였다(도 6A, 5 레인, 6 레인). 이들 데이터들을 총체적으로 감안할 때, 세균성 관절염 동안 IL-10 은 IL-6 과 협력하여 염증 과정을 조절할 수 있으며 플라스민은 IL-6 및 IL-10 발현의 조절에 연루되어 있다는 것이 제안된다.

[0223] **실시예 10**

[0224] **uPA 는 S. 아우레우스 유도성 무릎 감염에 대한 숙주 방어 및 조직 재형성에 있어서 중요함**

[0225] **방법**

[0226] 제 0 일에, 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 야생형 및 uPA-결핍 (uPA-/-) 마우스의 무릎 관절 내로 국소 관절내 접종하여 세균성 관절염을 유도하였다(14). 제 7, 14, 21 및 28 일에 마우스들을 희생시키고, 무릎 관절들을 취하여 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물 용액들을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후 생존 세균 집락들을 계수하여 각 균질 현탁액 내의 *S. 아우레우스* 세균수를 평가하였다.

[0227] 또 다른 실험에서는, uPA-결핍 및 야생형 마우스에 10 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 무릎 관절 내로 국소 관절내 접종하여 세균성 관절염을 유도하였다. 제 7, 14, 및 28 일에 세균 주사 후, 마우스들을 희생시키고, 조직학적 분석을 위해 전체 무릎 관절들의 시료들을 수집하였다. 간략히, 무릎 관절들을 먼저 4% 파라포름알데히드에 중에 고정시키고, 파라핀에 포매하고, 그 후 8-μm 절편들을 제조하였다. 조직학적 분석을 위해 조직 절편을 포함한 슬라이드를 Safranin-O 로 염색하였다. 각 실험군에 적어도 10 개의 무릎 관절을 포함시켰다.

[0228] **결과**

[0229] 야생형 및 uPA-결핍 마우스에서 *S. 아우레우스*-유도성 세균성 관절염 유도 후, 야생형 군에서, 평균 세균수는 제 7 일부터 제 28 일까지 계속해서 감소하고 있다. 제 14 일에, 7 마리 마우스 중 4 마리에서는 세균이 완전히 제거되었다. 그러나, uPA-결핍 군에서, 평균 세균수는 제 0 일부터 제 28 일까지 기본적으로 일정하다(도 11). 제 14 일 후에 세균수가 감소하고 있었지만, 제 14 일 및 제 28 일 사이에 유의한 차이는 존재하지 않았다. 세균 접종 후 제 28 일에 상기 실험을 종결하였지만, uPA-결핍 마우스는 제 14 일 후 무릎 관절이 완전히 파괴되었기 때문에 이후의 시점에서 세균을 살상할 수 있을 가능성은 매우 낮다. 제 14 일부터 거대한 수준의 괴사 조직이 uPA-결핍 무릎 관절에 축적된다. 조직학적 검사에 있어서, 야생형 마우스는 제 7 일에 일시적인 염증을 나타내었고 그 후에는 염증 수준이 급격히 가라앉은 반면, uPA-결핍 마우스는 실험 기간 내내 지속적인 조직 염증 및 부종, 광대한 조직 파괴 및 괴사 조직 형성을 나타내었다(도 12). 이들 데

이터 (표 5, 도 11 및 12) 는 uPA 가 *S. 아우레우스*-유도성 관절염에 대항하는 숙주 방어 동안 세균 살상에 중요하다는 것을 명백히 증명하며, 나아가, 플라스미노겐 활성인자 경로 중의 성분들이 감염에 대항한 숙주 방어 동안 중대한 역할을 한다는 것을 내포한다.

표 5

S. 아우레우스-유도성 세균성 관절염의 유도 후의 uPA-결핍 및 야생형 마우스에서 발생률 및 세균수.

	uPA-결핍		야생형		
일수	세균수 (CFU)	발생률*	세균수 (CFU)	발생률*	*P* 값**
제 0 일	1.0×10^6	2/3	1.0×10^6	2/3	
제 7 일	$5.6 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	6/6	$1.1 \times 10^4 \pm 7.9 \times 10^3$	6/6	0.0103
제 14 일	$8.8 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5$	7/7	$7.5 \times 10^2 \pm 4.2 \times 10^2$	3/7	0.006
제 21 일	$3.7 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$	5/5	$6.0 \times 10^2 \pm 6.0 \times 10^2$	1/5	0.0023
제 28 일	$2.8 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$	5/5	$6.0 \times 10^2 \pm 6.0 \times 10^2$	1/5	0.0003

*, 발생률은 해당 시점에서 조사된 총 무릎 관절의 수에 대한 감염된 무릎 관절의 수의 비율로 정의된다.

**, P 값은 각 시점에서 uPA-결핍 및 야생형 마우스 간의 모든 무릎 관절들의 세균수를 비교하여 계산된 것이다.

[0230]

[0231] **실시예 11**

[0232] **200 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 정맥내 주사한 후의 세균성 관절염 plg$^{-/-}$ 마우스에서 체중 감소 및 관절염의 중증도 수준이 더 높음**

[0233] **방법**

[0234] 200 μl 멸균 PBS 중의 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 정맥내 (i.v.) 주사하여 plg$^{+/+}$ 및 plg$^{-/-}$ 마우스에서 세균성 관절염을 유도하였다. 마우스들을 접종 후 매일 개별적으로 추적관찰하였다. 발을 24 시간마다 면밀히 조사하고, 접종 후 제 21 일에 모든 마우스들을 희생시켰다. 발바닥, 손목 및 발목의 가시적인 관절 부종 및/또는 홍반으로 관절염을 정의하였다. 관절염의 강도를 평가하기 위해, 육안 검사로 각 발에 대해 0-5 점의 점수를 부여한 시스템을 사용하여 임상소견 점수화 (관절염 지수) 를 실시하였다(0 = 정상, 1 = 미미한 부종 또는 홍반; 2 = 경미한 부종 및 홍반; 3 = 중등도의 부종 및 홍반; 4 = 뚜렷한 부종 및 홍반; 5 = 뚜렷한 부종 및 변형). 총 점수는 시험된 각 동물의 모든 4 개의 발로부터의 점수를 합하여 산출하였는데, 이로써 각 개별 마우스에 있어서 관절염 점수는 0 내지 20 범위가 되었다. 마우스들의 중량은 제 0 일에서부터 제 21 일까지 매일 측정되었다.

[0235] **결과**

[0236] 정맥내 주사로 유도된 세균성 관절염 모델에서 플라스미노겐 결핍증이 관절로의 세균 침입에 영향을 미치는지 평가하기 위해, 미미한 부종 및 홍반으로 정의되는 관절염의 발병일 및 발생률을 세균 접종 후 24 시간마다 추적관찰하였다(표 6). plg$^{+/+}$ 및 plg$^{-/-}$ 마우스에서 발병일은 각각 5.0 ± 2.2 및 4.4 ± 2.0 이었다(P = 0.5021). 나아가, plg$^{+/+}$ 및 plg$^{-/-}$ 마우스 간의 관절염 발생률은 동일하였다. 이들 결과는 plg$^{+/+}$ 및 plg$^{-/-}$ 마우스 모두 정맥내 접종에 의한 *S. 아우레우스* 유도성 관절염에 취약하다는 것을 나타낸다. 그러나, 본 연구에서 놀라운 관찰 결과가 주목되었는데, plg$^{-/-}$ 마우스의 38% (12/32) 가 뒤쪽 부분이 마비된 반면, plg$^{+/+}$ 마우스는 3.3% (1/30) 만이 마비를 보였다.

[0237] *S. 아우레우스*의 정맥내 접종 후 전반적인 건강 상황을 추적관찰하기 위해, 각 마우스의 중량을 실험 기간 동안 매일 측정하였다. 도 13 에 나타난 바와 같이, 감염 첫 주 동안에는, plg$^{+/+}$ 및 plg$^{-/-}$ 마우스 모두 상당한

중량 감소를 나타내었는데, 상기 감소는 제 7 일에 각각 체중의 최대 24% 및 26%에 달했다. 감염 7 일 후, $plg^{+/+}$ 마우스의 체중은 점차 증가하였다. 이와 대조적으로, $plg^{-/-}$ 마우스에서는 본 실험 내내 계속하여 현저한 중량 감소가 관찰되었다($p < 0.05$).

[0238] 1×10^6 *S. 아우레우스*를 i.v. 접종한 후 3 주 동안 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스에서 세균성 관절염의 임상적 전개를 또한 추적관찰하였다. 도 14 에 나타난 바와 같이, $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스 모두 세균성 관절염이 발병하였다. 처음 3 일 동안에는 염증의 중증도에 있어서 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스 간에 차이가 없었다. 그러나, 제 7 일부터는, $plg^{-/-}$ 마우스가 $plg^{+/+}$ 마우스보다 염증이 더 심하였고, 그 차이는 유의했다($p < 0.05$). $plg^{+/+}$ 마우스에서, 중증도는 제 14 일에 최고조에 달했고, 그 후에는 점차 가라앉았다. 실험 말미에, 28 마리 $plg^{+/+}$ 마우스 중 8 마리는 관절염에서 회복되었다. $plg^{-/-}$ 마우스에서는, 전체 실험 동안 관절염의 중증도가 증가하였고, $plg^{-/-}$ 마우스 중 어떤 것도 실험 말미에 관절염으로부터 회복되지 않았다. 종합해볼 때, 이들 데이터는, 플라스미노겐이 혈액 순환으로부터의 세균의 침입에 필수적이지는 않으나, 무릎 관절에서의 세균 감염에 대항한 숙주 방어 및 세균성 관절염 동안 건강 상태를 유지함에 있어서는 필수적임을 명백히 나타낸다.

표 6

1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 의 정맥내 주사 후 plg+/+ 및 plg-/- 마우스에서 세균성 관절염의 주된 특징들의 비교

	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
발병일 (평균 ± SEM)	5.0 ± 2.2	4.4 ± 2.0
세균성 관절염의 발생률	93% (28/30)	93% (30/32)
마비의 발생률	3.3%	37.5%
감염된 관절에서 괴사의 발생률	0	100%
제 21 일의 체중	22.8g	16.7g

[0239]

[0240] **실시예 12**

[0241] **멸균 PBS 중의 1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 의 정맥내 주사 후 $plg^{-/-}$ 마우스의 세균성 관절염에서 조직 파괴 및 괴사 조직 형성의 발달이 더 심함**

[0242] **방법**

[0243] 200 μl 멸균 PBS 중의 1×10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 정맥내 (i.v.) 주사하여 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스에서 세균성 관절염을 유도하였다. 접종 후 매일 마우스들을 개별적으로 추적관찰하였다.

[0244] 발목 및 발의 조직병리학적 검사를 수행하기 위해, 발목 및 발을 절개하고 24 시간 동안 4% 완충된 포르말린 중에 고정시켰다. 고정된 조직들을 15% EDTA 중에서 3 주 동안 탈회하고, 탈수하고, 파라핀 중에 포매하였다. 손목-관절의 8 μm 절편들을 Safranin-O 로 염색하고, 패스트그린(fast green)/철 헤마톡실린으로 대조염색하였다.

[0245] 면역조직화학적 분석을 위해, Saraffin-포매 절편 (8μm) 들을 탈파라핀화하고, 에탄올 및 증류수 중에서 재수화하였다. 내인성 과산화효소 활성을 10 분간 3% H_2O_2 로 차단하였다. 그 후, 피브린 검출을 위해 5% 토끼 혈청과 함께 실온에서 20 분간 인큐베이션하였다. 그 후 슬라이드들에 염소 항-마우스 fbn/fbg 를 덧발라 실온에서 30 분간 두었다. 세척 후, 토끼 IgG 항-염소 IgG 를 덧발라 RT 에서 20 분간 두었다. 세

척 후, PAP 를 덧발라 RT 에서 20 분간 두었다. (DAKO 기질 색원체 시스템 AEC) 키트로 색을 발현시키고, 세척 후 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색하였다.

[0246] **결과**

[0247] 관찰된 관절 염증의 존속이 조직학적 변화와 관련되는지를 결정하기 위해, 감염된 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스의 발 관절에 대해 조직학적 분석을 수행하였다. 상기 관절들을 safranin-O 로 염색하고, 패스트그린/철 및 헤마톡실린을 대조염색하였다. 도 15 에 나타난 바와 같이, $plg^{+/+}$ 마우스에서는, 발병일 1 일 후, 염증이 매우 경미하였다(도 15*A*). 발병일 3 일 후, 활막이 과형성성이 되었지만, 연골은 온전하였다(도 15*B*). 발병일 7 일 후, 염증 세포들에 관절강에 침윤되었다(도 15*C*). 발병일 14 일 후, 활막은 제 7 일보다 훨씬 더 두꺼웠다(도 15*D*). $plg^{-/-}$ 마우스에서는, 도 15*E* 에 나타난 바와 같이, 발병일 1 일 후에는, 염증 수준이 또한 경미하였다. 그러나, 발병일 3 일 후, 활막은 제 1 일보다 훨씬 더 두꺼웠고, 염증 세포들이 골에 침입하기 시작했다(도 15*F*). 발병일 7 일 후, 염증 세포들은 전체 발 관절에 가득 찼으며, 골의 일부분은 분해되었다(도 15*G*). 발병일 14 일 후에는, 대부분의 골 및 연골이 완전히 분해되었다(도 15*H*). 또한, 발병일 14 일 후, $plg^{+/+}$ 마우스에서는, 염증은 심하였지만, 중증도는 $plg^{-/-}$ 마우스와 비교하여 매우 경미하였다.

상기 임상적 발견은 조직병리학적 검사에 의해 입증되었는데, 상기 검사는 $plg^{-/-}$ 마우스가 연골 및 골 파괴 둘 다에서 유의하게 더 높은 수준을 나타낸 것을 맹백히 보여주었다. 종합하면, $plg^{+/+}$ 마우스는 $plg^{-/-}$ 마우스보다 유의하게 덜한 관절염 중증도를 나타내었다. 플라스민은 조직 재형성에 유익한 효과를 갖는다.

[0248] 세포 수준에서의 관절염의 발병 및 해소를 조사하기 위해, 괴사 조직에 대한 $plg^{+/+}$ 및 $plg^{-/-}$ 마우스에서 현미경 분석을 실시하였다. $plg^{-/-}$ 마우스에서는 관절에서 괴사 조직이 세균 접종 후 제 3 일 정도로 일찍 발견되었다. 도 16 및 도 15G,H 에 나타난 바와 같이, $plg^{-/-}$ 마우스에서는 커다란 괴사 조직 부분이 발견되었다.

이와 대조적으로, $plg^{+/+}$ 마우스에서는 심한 염증을 갖고 있을 때조차도 괴사가 거의 발견되지 않았다. 이들 데이터는 plg 결핍 마우스가 괴사 조직을 제거할 수 없어 조직 파괴를 유발함을 나타낸다.

[0249] 확립되어 있는 피브린 용해에서의 플라스미노겐 활성화의 역할에 기초하면, 플라스미노겐 감소는 피브린 침착 증가를 야기한다. 피브린 면역조직화학법으로 무릎 관절 내의 피브린 함량을 분석하였다(도 17). 그러나, 본 발명자들은 $plg^{+/+}$ 대조군 마우스들의 부종이 있는 모든 관절에서 피브린 침착의 수준이 $plg^{-/-}$ 마우스와 유사한 것을 발견하였다. 이들 데이터는, 피브린 침착은 아마도 $plg^{-/-}$ 마우스에서 관찰된 더 심각한 세균성 관절염에 대한 원인이 아님을 명백히 나타낸다.

[0250] **실시예 13**

[0251] **$plg^{-/-}$ 마우스의 절개창의 치유 동안 플라스미노겐은 *S. 아우레우스*-유도성 감염에 대항한 숙주 방어 동안 중요함**

[0252] **방법**

[0253] 절개창을 유도하기 위해, 먼저 $plg^{-/-}$ 마우스의 등쪽 면을 이발기를 사용하여 주의깊게 면도하고 70% 에탄올을 사용하여 세척하였다. 그 후, 상기 마우스의 등쪽 면 상의 정중선을 따라 15 ㎜ 길이 절개를 유도하였다.

15 분 후에, 10 ul 의 PBS 중의 1 x 10^7 CFU 의 *S. 아우레우스*를 국소적으로 적용하여 상기 개방창 상에 도말하였다. 나아가, 창상 개구부로부터 5 ㎜ 떨어진 창상 개구부의 두 측면의 두 부위에 50ul 의 플라스미노겐을 피하로 주사하였다. $plg^{-/-}$ 마우스의 대조를 위해, 상기 세균 접종된 개방창에 50 ul 의 PBS 만을 국소 주사하였다. 그 후, 50ul 의 플라스미노겐 (10 ug/ul) 또는 PBS 를 제 0 일에 실시한 바와 유사한 방식으로 제 10 일까지 24 시간마다 주사하였다. 제 11 일에, 마우스들을 죽이고, 창상 경계부분 주위 및 조직 아래의 창상 시료들을 주의깊게 절개해내고, 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물 용액들을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후 생존 세균 집락들을 계수하여 각 균질 현탁액 내의 *S. 아우레우스* 세균의 수를 평가하였다.

[0254] **결과**

[0255] 개방창 감염 모델에서 플라스미노겐이 세균성 관절염 모델과 유사한 세균 살상 기능을 하는지를 조사하기 위해, plg$^{-/-}$ 마우스들에 절개창을 유도하고, 또한 10^7 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 국소 접종하였다. 그 후 이들 마우스에 인간 플라스미노겐 또는 대조 PBS 를 10 일간 국소 주사하였다. 이들 마우스들의 조직 시료로부터 세균 회수 결과, 인간 플라스미노겐을 국소 처리한 것이 대조군인 PBS 처리한 plg$^{-/-}$ 마우스와 비교하여 세균수를 10 배 정도로 성공적으로 저하시킨 것으로 나타난다(표 7, 도 18). 이들 데이터는 플라스미노겐이 개방창에 동반된 감염에 대항한 숙주 방어 (예컨대 세균 살상) 에 중대한 역할을 한다는 것을 명확히 보여준다.

나아가, 플라스미노겐의 국소 주사는 또한 감염된 창상의 치유를 크게 향상시켰다(도 19). 종합해보면, 이들 결과들은, 두 가지 유형의 세균성 관절염에 대항하는 숙주 방어, 개방창의 치유 및 개방창 감염에 대항한 숙주 방어로 평가한 바, 플라스미노겐이 상이한 유형의 외상들에 대항한 숙주 방어에서 필수적임을 나타낸다.

표 7

1×10^7 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 로 접종한 절개 상해 후 제 11 일에 hPlg 또는 PBS 로 국소 처리한 plg-/- 마우스에서의 세균의 수

군	시료의 수	조직 1 g 당 평균 세균수 (평균±SE, $\times 10^5$ CFU/g)
hPlg 가 국소 주사된 Plg-/-	4	2.6±2.5*
PBS 가 국소 주사된 Plg-/-	2	26.8±25.2

*, P<0.05, PBS 가 국소 주사된 plg-/- 마우스의 군과 비교.

[0256]

[0257] **실시예 14**

[0258] **플라스미노겐은 plg$^{-/-}$ 마우스에서 화상 창상의 치유 동안 S. 아우레우스-유도성 감염에 대항한 숙주 방어에 중요함**

[0259] **방법**

[0260] 열탕화상 모델을 유도하기 위해, 마우스들을 먼저 마취로 잠들게 하였다. 그 후 화상을 입힐 부분을 주의깊게 면도하고, 25 g 의 100 도의 뜨거운 금속 막대를 겸자를 이용하여 6 초간 수직으로 및 자유로이 두었다. 상기 금속 막대는 비등 온도의 뜨거운 물에서 예열된 것이다. 6 초의 화상은 상기 부분에 심한 열상을 유도하였다. 상기 부분에 열탕화상을 입힌 후, 마우스의 등 표면을 주의깊게 닦아 과량의 물을 제거하였다.

약 15 분 후에, 30ul 의 1x10^6 CFU 의 *S. 아우레우스*를 상기 화상 부분의 중앙에 피부 바로 아래로 주사하였다. 추가로 15 분 후에, 50ul 의 플라스미노겐 (10ug/ul) 을 상기 열탕화상 부분의 가장자리 주변의 2 부위 내로 부위당 25ul 씩 피하 주사하였다. plg-/- PBS 대조군에 대해서는, 50ul 의 PBS 를 플라스미노겐과 동일한 방식으로 주사하였다. 그 후 제 0 일부터 제 9 일까지, 매일 상기 화상 부분의 위-아래 또는 좌-우에 1일 1회 주사를 실시하였다. plg+/+ 군에 있어서는, 마우스들에 화상만을 입히고, 임의의 국소 처리없이 방치하였다. 실험 말미에, 상기 화상 부분의 창상 출현을 카메라로 기록하고, 조직 시료들 (상기 화상 부분 및 조직의 얕은 층 바로 아래) 을 주의깊게 절개하고, 1 ml 멸균 PBS 중에 균질화하였다. 계단 희석 후, 균질 현탁물 용액들을 LB 한천 플레이트 상에 도말하고, 37℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 그 후 생존 세균 집락들을 계수하여 각 균질 현탁액 내의 *S. 아우레우스* 세균의 수를 평가하였다.

[0261] **결과**

[0262] 플라스미노겐이 화상 창상 감염 모델에서 세균성 관절염 모델과 유사한 세균 살상 기능을 하는지 조사하기 위해, plg$^{-/-}$ 마우스에 화상 창상을 유도하고, 나아가 1 x 10^6 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 를 국소 접종하였다. 그 후 이들 마우스들에 인간 플라스미노겐 또는 대조를 위한 PBS 로 9 일간 국소 주사하였다. 화상 후 제 10 일에 취한 이들 마우스의 조직 시료들로부터 세균을 회수한 결과, 인간 플라스미노겐의 국소 처리에 의해 plg$^{-/-}$ 마우스에서 대조군인 PBS 처리 plg$^{-/-}$ 마우스와 비교하여 세균수가 10 배 정도로 성공적으로 저하되었는데(표 8, 도 20), 이는 심지어 국소 주사하지 않은 plg$^{+/+}$ 마우스에서의 세균수보다 더 낮은 것이다. 이

들 데이터는 플라스미노겐이 개방 화상 창상에 수반된 감염에 대항한 숙주 방어 (예컨대 세균 살상) 에 중대한 역할을 한다는 것을 명백히 나타낸다. 종합해보면, 이들 결과들은, 두 가지 유형의 세균성 관절염에 대항하는 숙주 방어, 개방창 (화상, 절개) 의 치유 및 개방창 감염에 대항한 숙주 방어로 평가한 바, 플라스미노겐이 상이한 유형의 외상에 대항한 숙주 방어에 필수적임을 나타낸다.

표 8

[0263]

1×10^7 CFU 의 *S. 아우레우스* Phillips 로 접종한 화상 창상 후 제 10 일에 hPlg 또는 PBS 로 국소 처리한 plg-/- 마우스에서의 세균의 수		
군	시료의 수	조직 1 g 당 평균 세균수 (평균±SE, $\times 10^6$ CFU/g)
hPlg 가 국소 주사된 Plg-/-	5	0.43±0.13*
PBS 가 국소 주사된 Plg-/-	5	4.6±1.4
국소 주사되지 않은 Plg+/+	4	3.6±2.1
*, P<0.05, PBS 가 국소 주사된 plg-/- 마우스의 군과 비교.		

[0264] **실시예 15**

[0265] **야생형 및 plg-결핍 마우스에서 자발적 만성 중이염의 발생률**

[0266] **방법**

[0267] **실험 절차.** 18-주 기간 동안, 마우스들을 25 μl Dormicum® (Roche AB, Stockholm, 스웨덴), 25 μl Hypnorm™ (Janssen Pharmaceutica, Beerse, 벨기에) 및 50 μl 멸균수의 100 μl 혼합물을 복강내 주사하여 상이한 시간 간격으로 마취하였다. 고막 (tympanic membrane, TM) [상세한 철자] 의 육안적 외관을 주의깊게 조사하고, 이현미경 하에 기록하였다. 18-주 기간의 말미에, 모든 동물을 죽이고, 18 마리 동물 (야생형, n = 7; plg-결핍, n = 11) 의 귀를 무작위로 3 개 군으로 나누었는데, 각각 세균학적 규명 (야생형, n = 6; plg-결핍, n = 6), 플라스틱 포매 (야생형, n = 4; plg-결핍, n = 6) 및 파라핀 포매 (야생형, n = 4; plg-결핍, n = 10) 를 목적으로 한 것이었다.

[0268] **플라스틱 및 파라핀 포매.** 이전에 기술된 바와 같은 플라스틱 및 파라핀 포매를 위해 두개골들을 모았다 (15). 형태 분석을 위해 플라스틱-포매된 시료들을 MEC 전체에 걸쳐 횡단절개 (1 μm) 하고, 톨루이딘 블루로 염색하였다. 상기 파라핀-포매 시료들은 면역조직화학법을 위해 MEC 전체에 걸쳐 횡단절개 (5 μm) 하였다.

[0269] **결과**

[0270] 만성 중이염의 발병을 연구하기 위해, 6 주령의 야생형 및 plg-결핍 마우스들을 선택하였다. 실험 시작시에 및 9 주, 13 주, 18 주 및 24 주의 시기에 실험 마우스들에서 TM 및 MEC 의 상태를 검사하였다. 이현미경으로, 자발적 만성 중이염을, MEC 에서 삼출 물질이 존재하거나 또는 존재하지 않는 상태에서 TM 이 불투명하고, 희끄무레하고, 두꺼워져 있는 것으로 정의하였다. 표 9 에 나타난 바와 같이, 야생형 마우스 (수컷 및 암컷 모두) 중에서는 어느 것에서도 본 18-주 실험 기간 동안 외이도 (EEC) 로부터 임의의 중이 삼출 또는 배액이 나타나지 않았다. 이현미경에 의해 밝혀진 것으로서, 이들의 TM 은 얇고, 투명하였으며, 정상적으로 위치되었다(데이터는 나타나지 않음). 이와 대조적으로, plg-결핍 마우스에서는 자발적 중이염을 가진 귀의 수가 수컷 및 암컷 모두에서 유사한 정도로 실험 기간 동안 점차 증가하였다. 실험 말미에, 염증 변화 정도가 다양한 자발적 중이염이 남아있는 plg-결핍 마우스들의 모든 귀에서 나타났다(표 9).

표 9

상이한 시기에 야생형 및 plg-결핍 마우스에서 자연 발병 만성 중이염의 발생률

마우스 군	하기 시기에 자연 발병 만성 중이염[a]의 발생률:				
	6 주	9 주	13 주	18 주	24 주
야생형, 수컷	0/18	0/18	0/16	0/16	0/16
야생형, 암컷	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Plg-결핍, 수컷	0/20	3/20	5/18	8/18	6/10[b]
Plg-결핍, 암컷	0/24	1/24	3/24	8/22	11/16[b]

[a]데이터는 각 군에서 감염된/염증성 귀의 수를 귀의 총 수로 나눈 것으로 나타낸 것이다.

[b]형태학적으로 분석할 때, 이현미경 하에 정상으로 나타난 plg-결핍 마우스에서의 중이들은 염증 변화를 갖는 것으로 나타났으나 TM 에 부착된 MEC 에서 얇은 무정형 조직 덩어리 층만을 가졌기에 그렇게 선고되지 않았다.

[0271]

[0272] **실시예 16**

[0273] **야생형 및 plg-결핍 마우스의 MEC 에서 단리한 세균의 동정**

[0274] **방법**

[0275] 본 실험은 세균학적 규명을 제외하고는 실시예 8 에서와 동일한 방식으로 수행되었다.

[0276] **세균학적 규명.** 야생형 및 plg-결핍 군들로부터 고실포 (tympanic bulla) 들을 연부 조직으로부터 자유로이 절개하고, 상기 고실포의 골질 바닥 (bony floor) 의 작은 조각을 칼로 제거하였다. 멸균 면봉을 중이강 (MEC) 내로 넣었다가 꺼낸 후, 상기 면봉을 이용하여 Luria-broth (LB) 플레이트 상에 물질들을 도말하고, 즉시 37℃에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. 수득한 집락들을 Cowan & Steel 에 따라 동정하였다 (16).

[0277] **결과**

[0278] 실험 말미에, 6 마리 야생형 및 6 마리 plg-결핍 마우스의 귀로부터의 고실포들을 무작위로 수집하여 세균 동정하였다. 표 10 에 나타난 바와 같이, 세균은 야생형 시료 6 개 중 1 개 에서만 발견되었다. 상기 세균은 *스트렙토코커스 산귀니스* (*Streptococcus sanguinis*) 로 동정되었다. 그러나, plg-결핍 마우스로부터 수득한 6 개의 MEC 시료 중 5 개에서 세균이 단리되었다. 동정된 종은 *스타필로코커스 아우레우스*, *마이크로코커스 루테우스* (*Micrococcus luteus*), *스트렙토코커스 소브리너스* (*Streptococcus sobrinus*) 및 *스트렙토코커스 뮤탄스* (*Streptococcus mutans*) 였다. 동정된 모든 세균은 그람-양성이었다.

표 10

[0279]

24 주령 시의 야생형 및 plg-결핍 마우스의 MEC 로부터의 세균 회수

[a]ND, 검출불가.

마우스 귀 번호	하기 마우스에서 발견된 세균	
	야생형	plg-결핍
1	*스트렙토코커스 산귀니스*	*스타필로코커스 아우레우스*
2	ND[a]	*마이크로코커스 루테우스*
3	ND	*스트렙토코커스 소브리너스*
4	ND	*스트렙토코커스 소브리너스* 및 *스트렙토코커스 뮤탄스*
5	ND	*스트렙토코커스 뮤탄스*
6	ND	ND

[0280] **실시예 17**

[0281] **야생형 및 plg-결핍 마우스의 중이에 대한 광학현미경 연구**

[0282] **방법**

[0283] 본 실험은 면역조직화학적 염색을 제외하고는 실시예 8 에서와 동일한 방식으로 수행되었다.

[0284] **면역조직화학적 염색.** 파라핀-포매 절편들을 농도가 점점 감소하는 일련의 에탄올 중에 재수화하고, 증류수 중에 헹구었다. 내인성 과산화효소 활성을 10 분간 3% H_2O_2 로 차단하고, 슬라이드들을 추가로 PBS 중에 세정하였다. 그 후 연속적인 절편들을 하기 나타낸 항체들로 처리하였다. 모든 면역조직화학적 염색에서, 상기 1차 항체 대신에 비(非)-면역화된 동물로부터의 혈청과 함께 인큐베이션된 인접한 슬라이드들을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0285] 염증 세포의 검출을 위해, T 세포에 대한 래트 항-마우스 단일클론 1차 항체 (Clone 53-7.3, 1:50 희석; BD Biosciences Pharmingen, Stockholm, 스웨덴), B 세포 (Clone RA3-6B2, 1:250 희석; BD Biosciences Pharmingen), 대식세포 (MCAP497, 1:500 희석; Serotec, Oxford, U.K.) 및 호중구 (CL8993AP, 1:200 희석; Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, 캐나다) 를 사용하였다. 면역조직화학적 염색을 수행하기 위해, 슬라이드들을 먼저 회수한 후 정상 토끼 혈청 (Dako Patts, Copenhagen, Denmark) 과 함께 인큐베이션한 후, 적절한 농도의 상이한 1차 항체들과 함께 인큐베이션하였다. 그 후 슬라이드들을 비오티닐화 토끼 항-래트 IgG (Dako Patts) 와 함께 인큐베이션하고, 아비딘-비오틴-과산화효소 복합체 (ABC) 방법 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 을 사용하여 추가 처리하였다.

[0286] 토끼 항-인간 다클론 항체 (10550, ICN Pharmaceuticals, Aurora, Ohio) 를 상기 1차 항체로 사용하여 과산화효소 항-과산화효소 (PAP) 방법으로 면역조직화학적으로 사이토케라틴을 검출하였다. 간략히, 조직 절편들이 포함된 슬라이드들을 먼저 37℃에서 8 분간 0.1% 트립신 (pH 7.8) 으로 회수하고, 5% 비(非)-면역화된 돼지 혈청 (Dako Patts) 으로 차단한 후, PBS 중에 1:100 희석된 상기 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 돼지 항-토끼 결합 (link) 항체 (Dako Patts) 를 적용한 후, 이어서 토끼 PAP 복합체 (Dako Patts) 를 적용하였다.

[0287] 염소 항-마우스 다클론 항체 (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, 네덜란드) 를 상기 1차 항체로 사용하여 PAP 방법으로 피브린(피브리노겐)을 면역조직화학적으로 검출하였다. 토끼 혈청 (Dako Patts) 와 함께 및 그 후 PBS 중 1:500 희석의 상기 1차 항체와 함께 먼저 인큐베이션한 후, 슬라이드들을 토끼 항-염소 결합 항체 (Dako Patts) 와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 슬라이드들을 염소 PAP 복합체 (Dako Patts) 와 함께 인큐베이션하였다.

[0288] 디아미노벤지딘 (DAB) 반응 (Vector Laboratories) 으로 모든 슬라이드들이 갈색 침전물로서 가시화되었고, 이들을 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 슬라이드들을 Leica DMLB 현미경 하에 광학현미경으로 검사하고, 영상들을 개인용 컴퓨터에 연결된 Leica DC 300F 카메라를 이용하여 디지털방식으로 기록하였다. 개별 영상들에서 명암 (contrast) 과 밝기의 조정은 Adobe Photoshop 7.0 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0289] **결과**

[0290] 실험 말미에, 야생형 및 plg-결핍 마우스로부터의 플라스틱-포매된 시료들에 대해 형태학적 염색을 수행하였다. 도 7A 에 나타난 바와 같이, 야생형 마우스의 TM 및 중이들은 정상적인 구조를 나타내었다. 상기 TM 은 전형적인 얇은 3 개 층의 구조를 나타내었다: 외부의 케라틴화된 표피층, 가운데의 고유판 및 MEC 의 것과 인접한 내부의 상피 내층 (epithelial lining). 이의 MEC 에서 중이 삼출은 검출되지 않았다. 그러나, plg-결핍 마우스에서는, 검사된 모든 중이에서 염증 변화가 관찰되었다. 이의 TM 은 두꺼워졌고, 무정형 조직 덩어리가 부착되었는데, 이는 간혹 거의 전체의 MEC 를 가득 채우기도 했다(도 7B). 상기 시료의 다수에서 EEC 는 또한 무정형 조직으로 채워졌다(도 7D).

[0291] 실험 기간 말미에, 중이 내의 피브린 및 케라틴의 분포를 연구하기 위해 면역조직화학적 염색을 수행하였다(도 7C, 7D, 7E, 7F). 야생형 마우스에서는, TM 의 상피 표면에서 피브린(피브리노겐) 및 케라틴에 대한 단지 약한 면역반응성이 관찰되었다(도 7C 및 7E). 그러나, plg-결핍 마우스에서는, 도 7D 에 나타난 바와 같이, TM 및 MEC 의 점막을 덮은 무정형 조직이 피브린에 대한 면역반응성이 있는 것으로 관찰되었다. 상기 무정형 조직의 구조는, 느슨한 망상 (loose-net) 인 것부터 얼룩 (smear) 같은 것, 또는 심지어 조밀하게 뭉쳐진 것까지, 상이한 부분들 및 상이한 시료들에서 다양하였다(데이터는 나타나지 않음). 피브린 면역반응성은 또

한 EEC 내의 무정형 조직에서도 관찰되었다. plg-결핍 마우스 대부분에서, TM 및 EEC 의 주위 표피층 내의 케라틴 염색층은 상당히 두꺼워졌다(도 7F).

[0292] 염증 세포의 침윤을 연구하기 위해, 야생형 및 plg-결핍 마우스들로부터의 파라핀 절편들을 T 세포, B 세포, 대식세포 및 호중구에 대해 염색하였다. 도 8A, 8C, 8E 및 8G 에 나타난 바와 같이, 야생형 마우스의 TM 및 중이 점막에서는 염증 세포가 거의 검출가능하지 않았다. 그러나, plg-결핍 마우스에서는, TM 및 중이 및 EEC 를 채운 무정형 조직에서 T 세포, B 세포, 대식세포 및 호중구가 모두 발견되었다(도 8B, 2D, 8F 및 8H). T 세포 및 B 세포들은 상대적으로 더 적었으며, 이들은 TM 및 중이 점막에서는 드물게 분포하였다(도 8B 및 8D). 중이 점막에서는 대식세포가 가장 풍부한 염증 세포 유형이었고(도 8F), EEC 내로 확장된 무정형 조직에서는 호중구가 지배적인 세포 유형이었다(도 8H). 결국, 이들 결과들은 플라스미노겐이 만성 중이염의 자연 발병에 대항한 보호에 있어서 필수적인 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0293] 전술한 실시예들은 예시로서 제시된 것으로, 첨부된 청구의 범위에 개시된 바의 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하도록 의도된 것이 아니다. 상세한 설명에 개시된 모든 참조문헌들은 참조로서 포함된다.

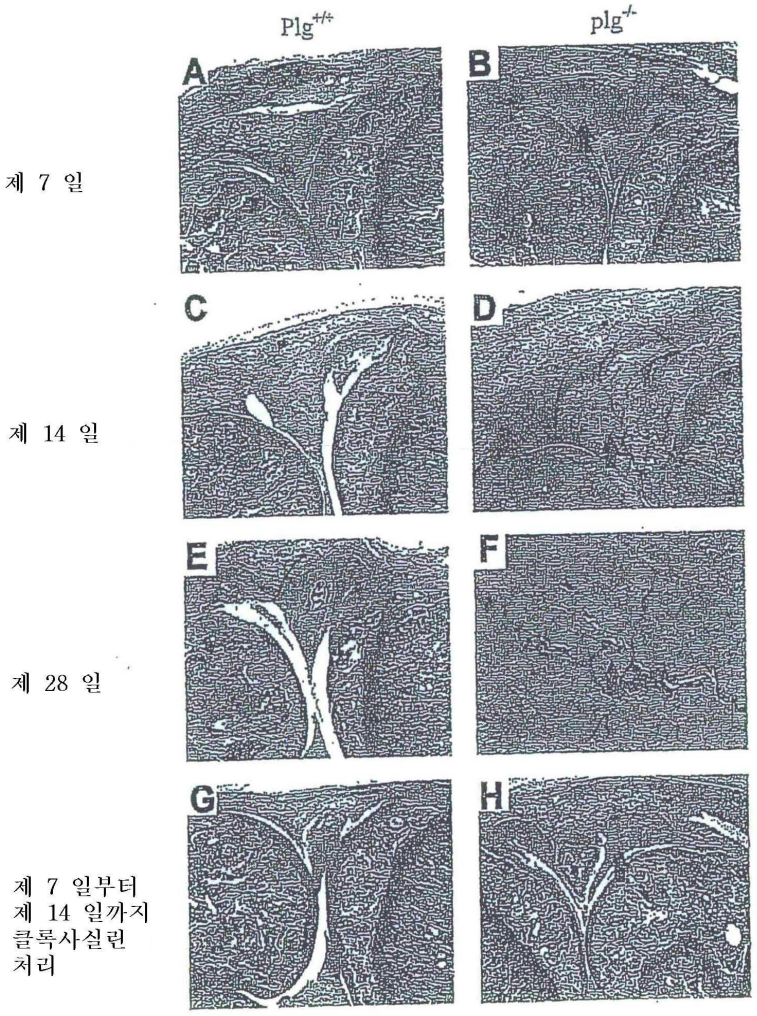
[0294] 참조문헌 목록

1. Aderem,A. 2003. Phagocytosis and the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* **187 Suppl 2**:S340-S345.
2. Hauschildt,S., 및 Kleine,B. 1995. Bacterial stimulators of macrophages. *Int. Rev. Cytol.* **161**:263-331.
3. Chertov,O., Yang,D., Howard,O.M., 및 Oppenheim,J.J. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.* **177**:68-78.
4. Ny,A., Leonardsson,G., Hagglund,A.C., Hagglof,P., Ploplis,V.A., Carmeliet,P., 및 Ny,T. 1999. Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* **140**:5030-5035.
5. Teele,D.W., Klein,J.O., 및 Rosner,B. 1989. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J. Infect. Dis.* **160**:83-94.
6. Alexander CM, 및 Werb,Z. 1991. Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED, editor. Plenum Press. New York. 255-302.
7. Travis,J., 및 Salvesen,G. 1983. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst. Mitt.*56-65.
8. Wiman,B., 및 Wallen,P. 1975. Structural relationship between "glutamic acid" and "lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH2-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* **50**:489-494.
9. Saksela,O., 및 Rifkin,D.B. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:93-126.
10. Collen,D., 및 Lijnen,H.R. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**:3114-3124.
11. Liu,Z.Q., Deng,G.M., Foster,S., 및 Tarkowski,A. 2001. Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res.* **3**:375-380.
12. Qasimi,P., Ming-Lum,A., Ghanipour,A., Ong,C.J., Cox,M.E., Ihle,J., Cacalano,N., Yoshimura,A., 및 Mui,A.L. 2006. Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**:6316-6324.
13. Gjertsson,I., Hultgren,O.H., 및 Tarkowski,A. 2002. Interleukin-10 ameliorates the outcome of Staphylococcus aureus arthritis by promoting bacterial clearance. *Clin. Exp. Immunol.* **130**:409-414.
14. Carmeliet,P., Schoonjans,L., Kieckens,L., Ream,B., Degen,J., Bronson,R., De,V.R., van den Oord,J.J., Collen,D., 및 Mulligan,R.C. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**:419-424.
15. Eriksson,P.O., Mattsson,C., 및 Hellstrom,S. 2003. First forty-eight hours of developing otitis media: an experimental study. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **112**:558-566.
16. COWAN,S.T., 및 STEEL,K.J. 1961. Diagnostic tables for the common medical bacteria. *J. Hyg. (Lond)* **59**:357-372.

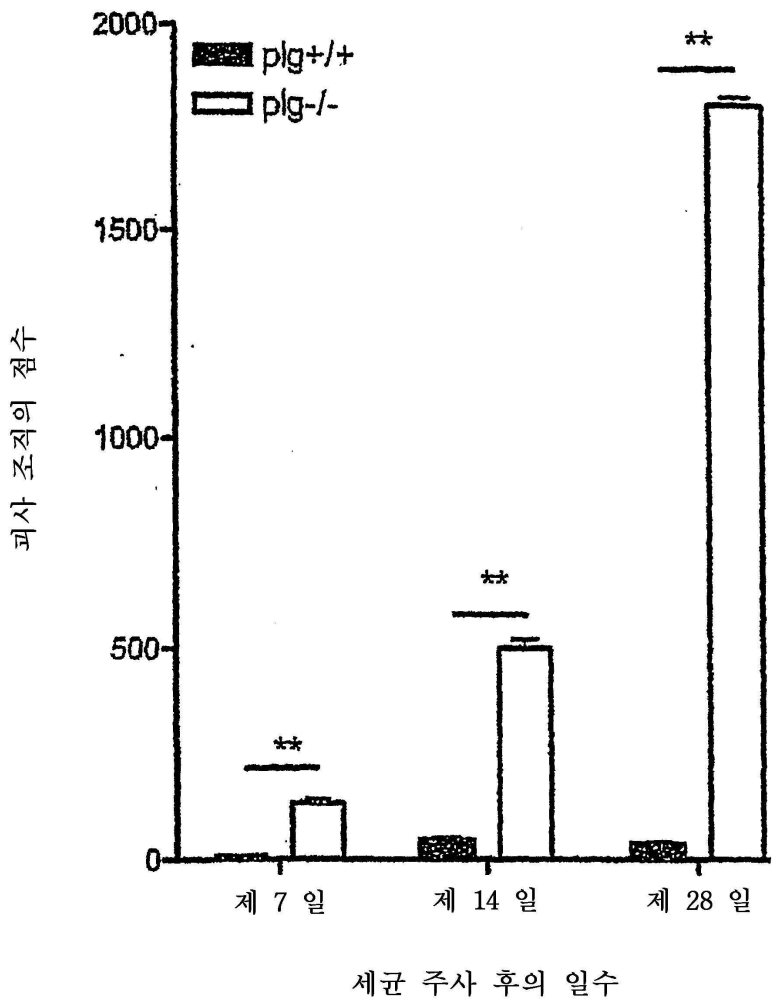
[0295]

도면

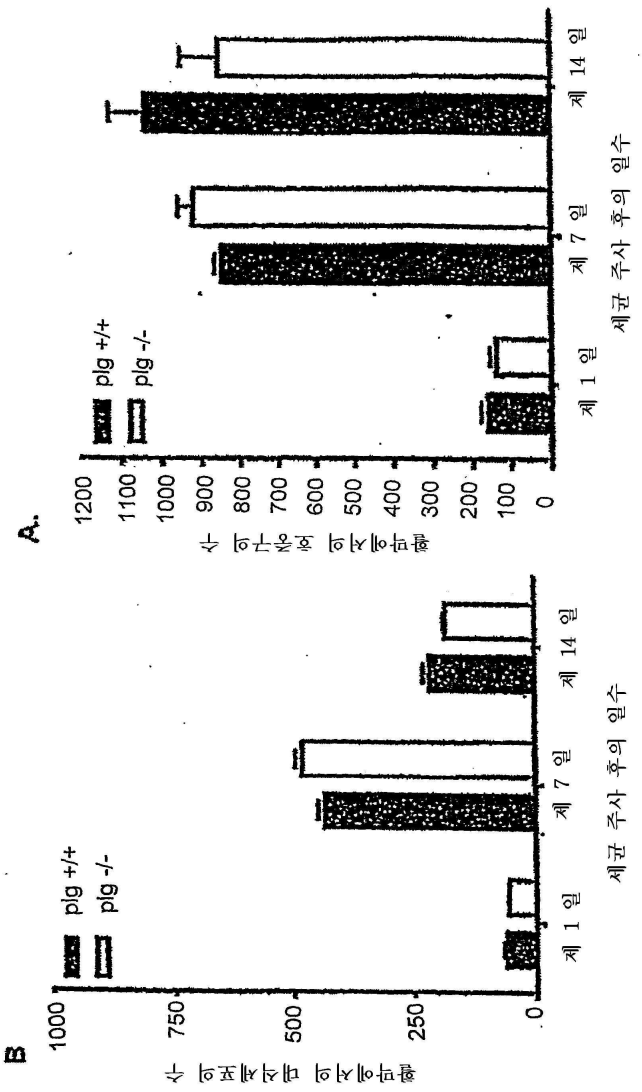
도면1



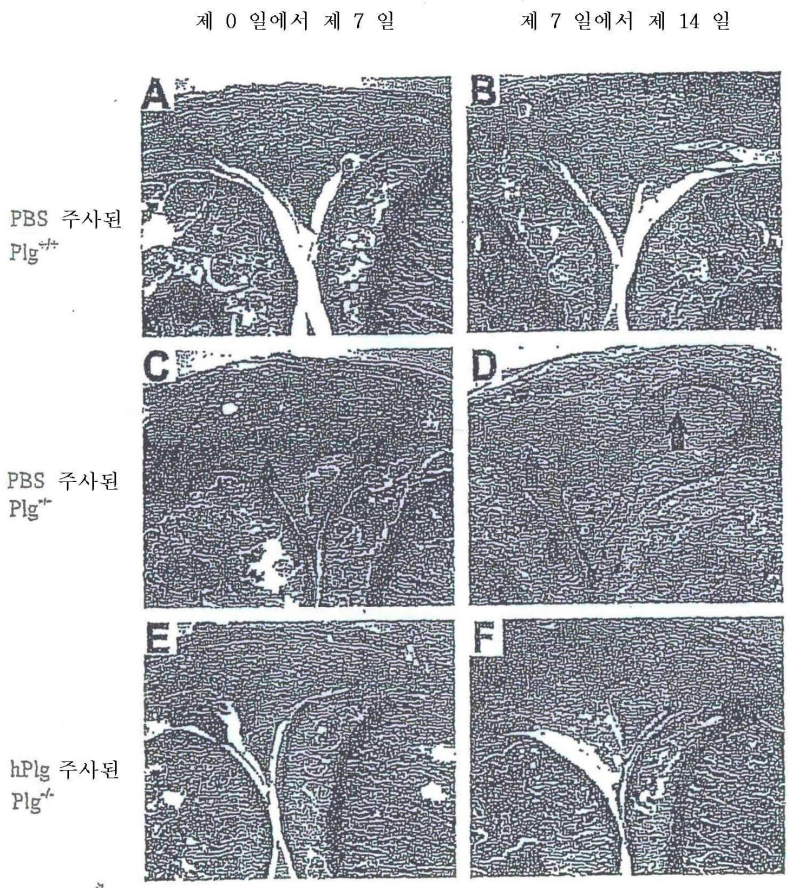
도면2



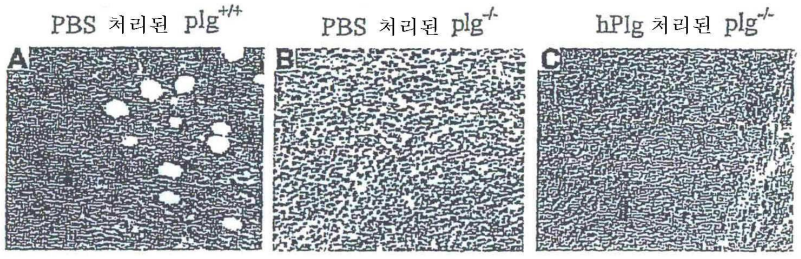
도면3


A.
폴락에서의 효능구의 수
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
plg +/+
plg -/-
제 1 일
제 7 일
제 14 일
세균 주사 후의 일수
B
폴락에서의 대식세포의 수
1000
750
500
250
0
plg +/+
plg -/-
제 1 일
제 7 일
제 14 일
세균 주사 후의 일수

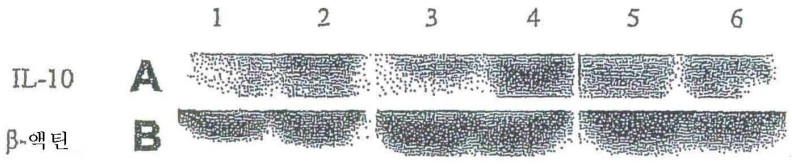
도면4


제 0 일에서 제 7 일
제 7 일에서 제 14 일
A
B
C
D
E
F
PBS 주사된
Plg+/+
PBS 주사된
Plg-/-
hPlg 주사된
Plg-/-

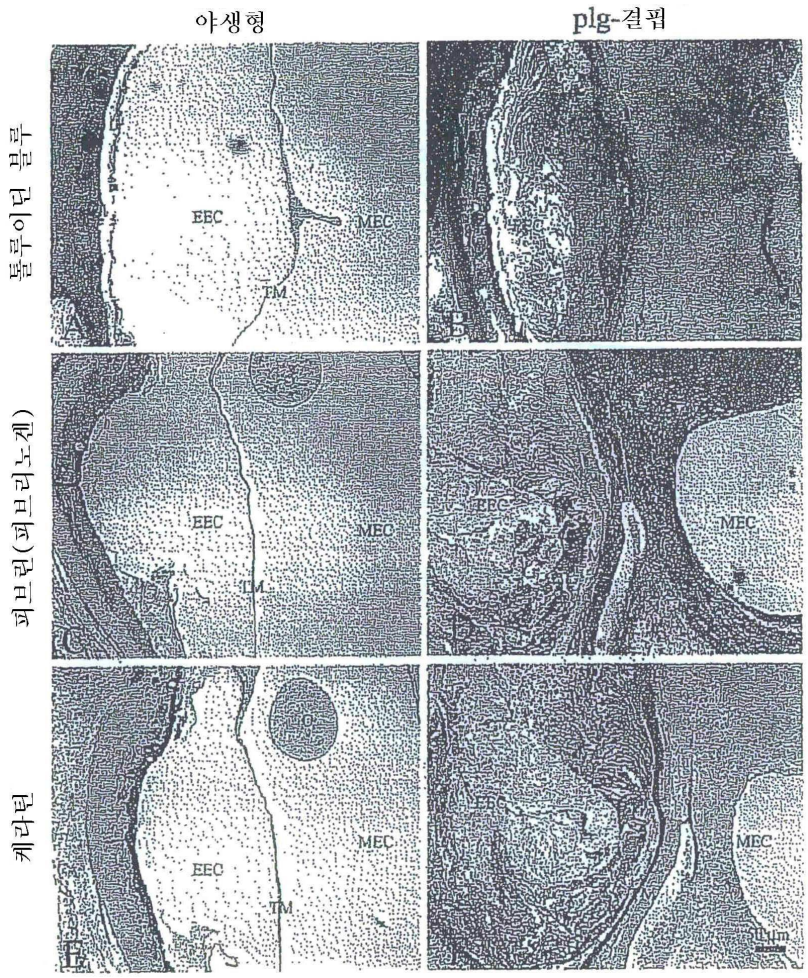
도면5


PBS 처리된 plg+/+
PBS 처리된 plg-/-
hPlg 처리된 plg-/-
A
B
C

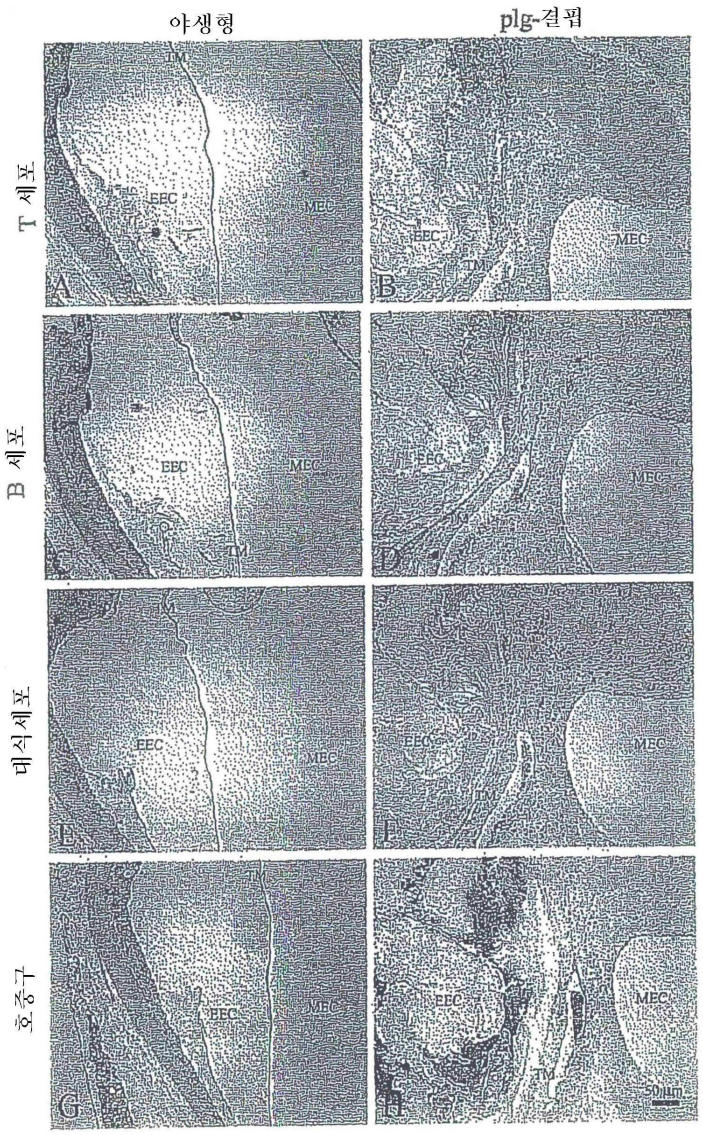
도면6


1
2
3
4
5
6
IL-10
A
β-액틴
B

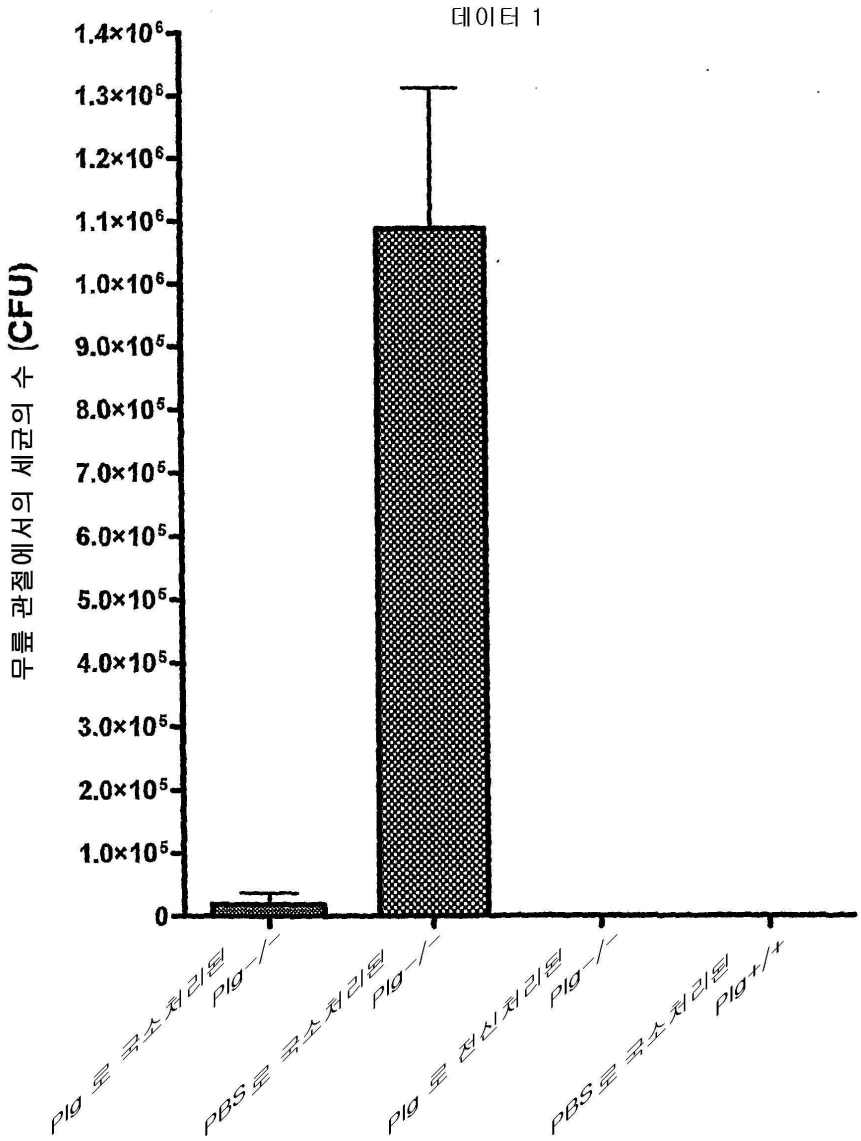
도면7



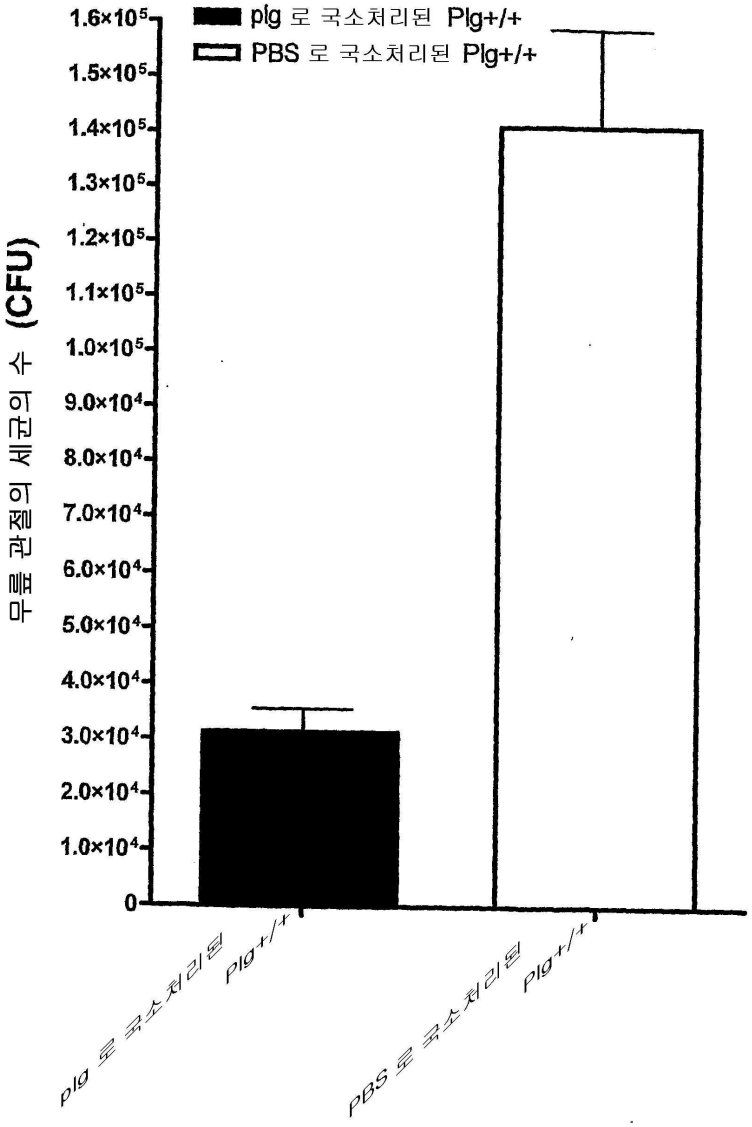
도면8



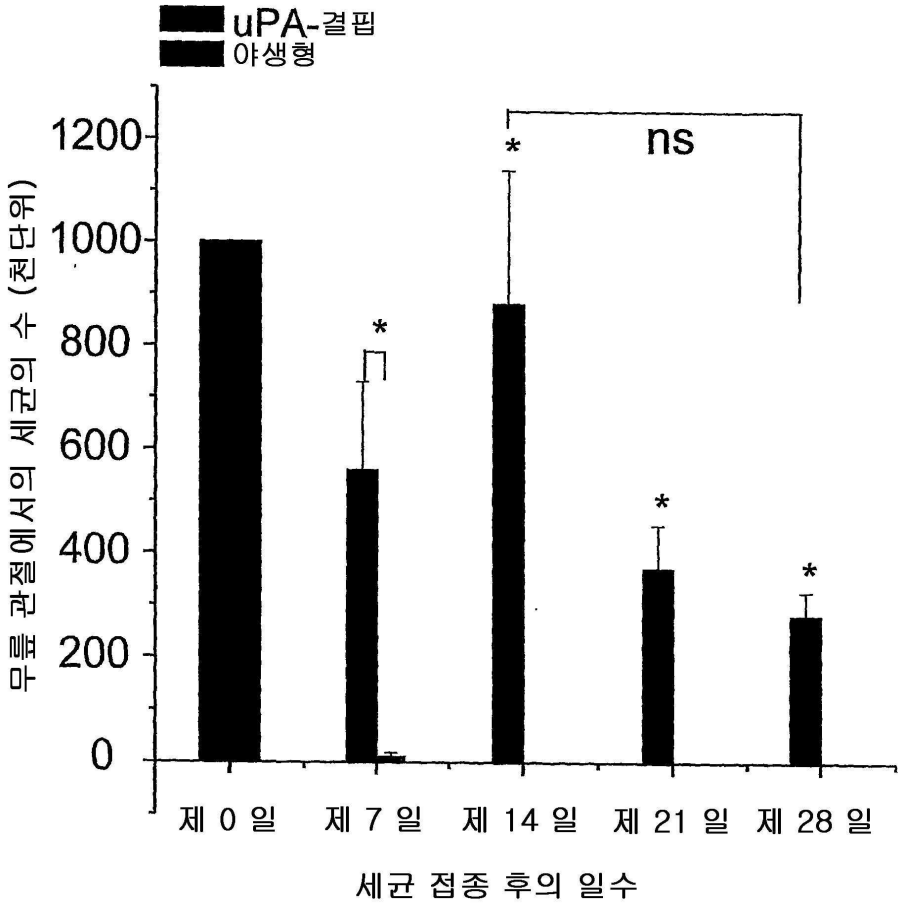
도면9


데이터 1
무릎 관절에서의 세균의 수 (CFU)
1.4×10⁶
1.3×10⁶
1.2×10⁶
1.1×10⁶
1.0×10⁶
9.0×10⁵
8.0×10⁵
7.0×10⁵
6.0×10⁵
5.0×10⁵
4.0×10⁵
3.0×10⁵
2.0×10⁵
1.0×10⁵
0
PIG 로 콕소처리된 PIG-/-
PBS 로 콕소처리된 PIG-/-
PIG 로 전신처리된 PIG-/-
PBS 로 콕소처리된 PIG+/+

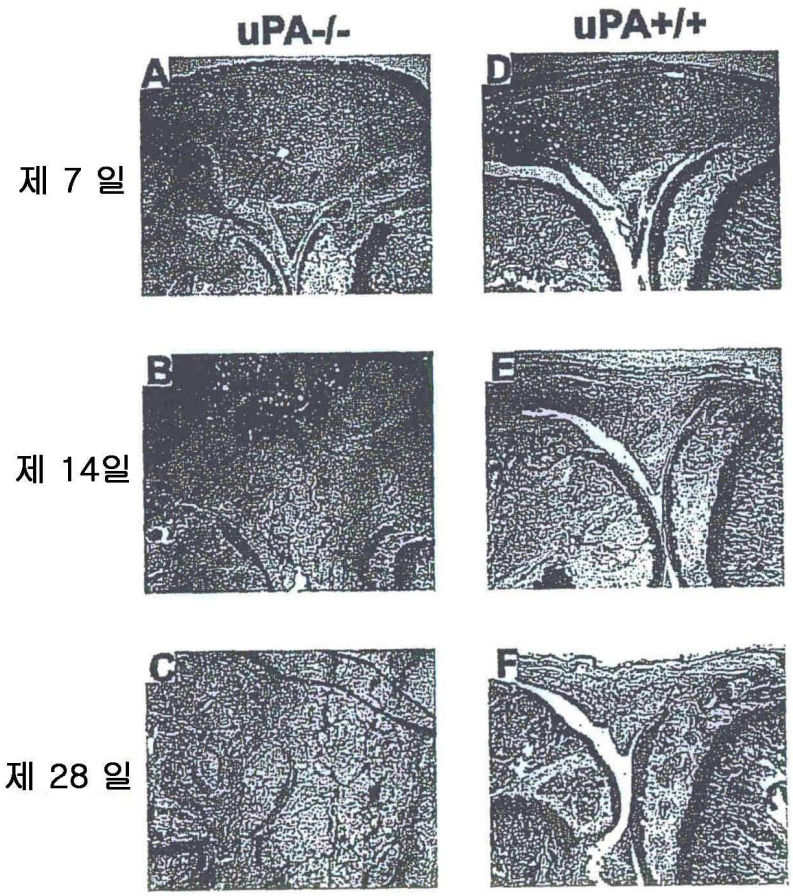
도면10


plg 로 국소처리된 Plg+/+
PBS 로 국소처리된 Plg+/+
무릎 관절의 세균의 수 (CFU)
1.6×10⁵
1.5×10⁵
1.4×10⁵
1.3×10⁵
1.2×10⁵
1.1×10⁵
1.0×10⁵
9.0×10⁴
8.0×10⁴
7.0×10⁴
6.0×10⁴
5.0×10⁴
4.0×10⁴
3.0×10⁴
2.0×10⁴
1.0×10⁴
0
plg 로 국소처리된 plg+/+
PBS 로 국소처리된 plg+/+

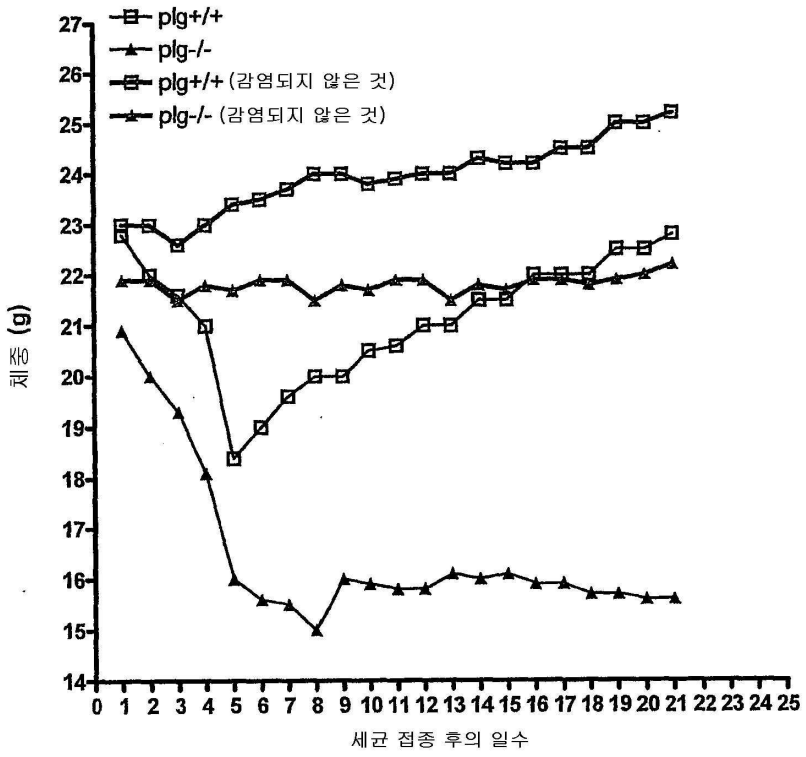
도면11


uPA-결핍
야생형
무릎 관절에서의 세균의 수 (천단위)
1200
1000
800
600
400
200
0
*
*
ns
*
*
제 0 일
제 7 일
제 14 일
제 21 일
제 28 일
세균 접종 후의 일수

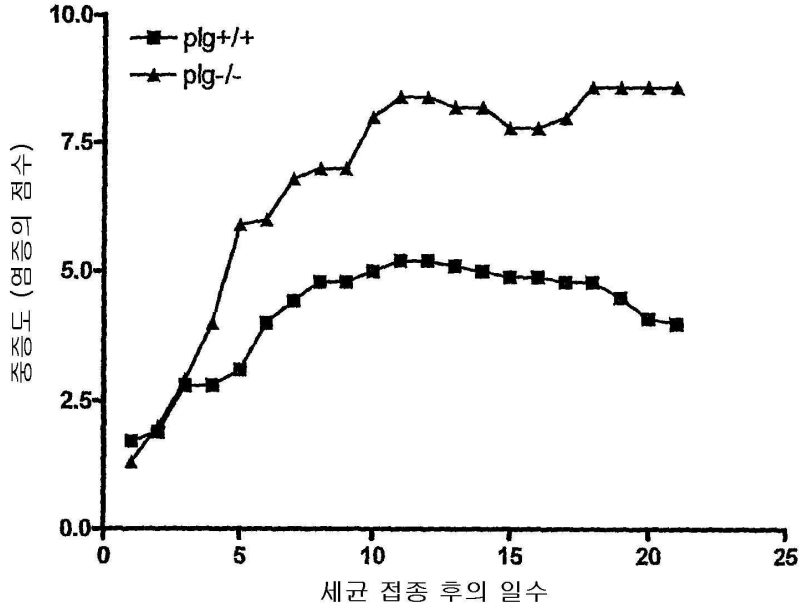
도면12



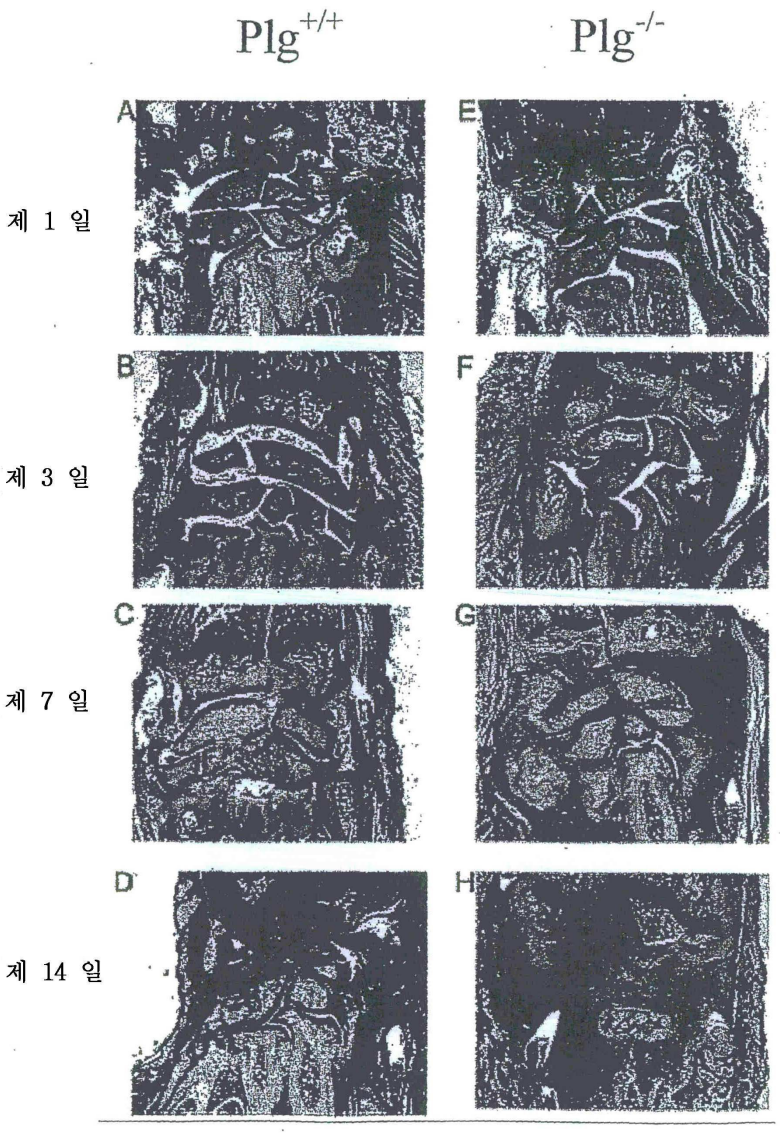
도면13


plg+/+
plg-/-
plg+/+ (감염되지 않은 것)
plg-/- (감염되지 않은 것)
체중 (g)
세균 접종 후의 일수

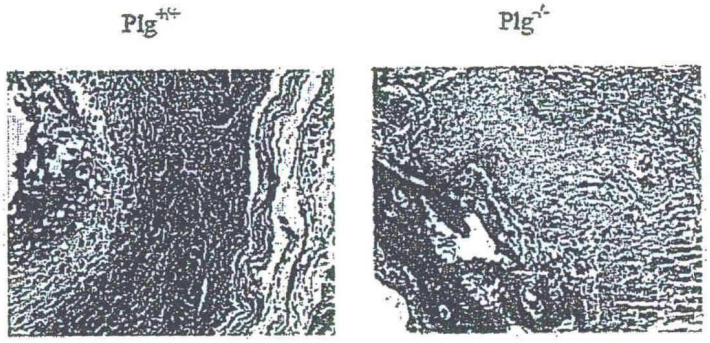
도면14


plg+/+
plg-/-
중증도 (염증의 점수)
세균 접종 후의 일수

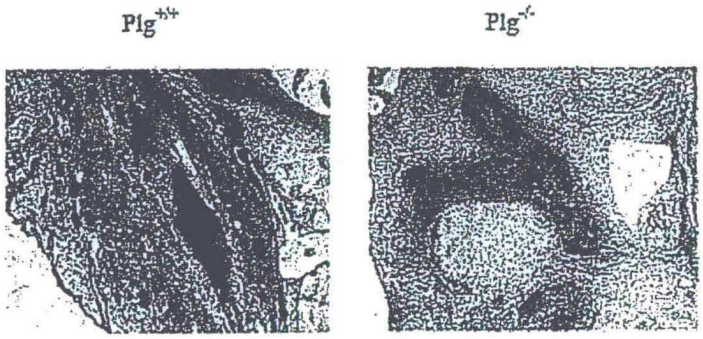
도면15



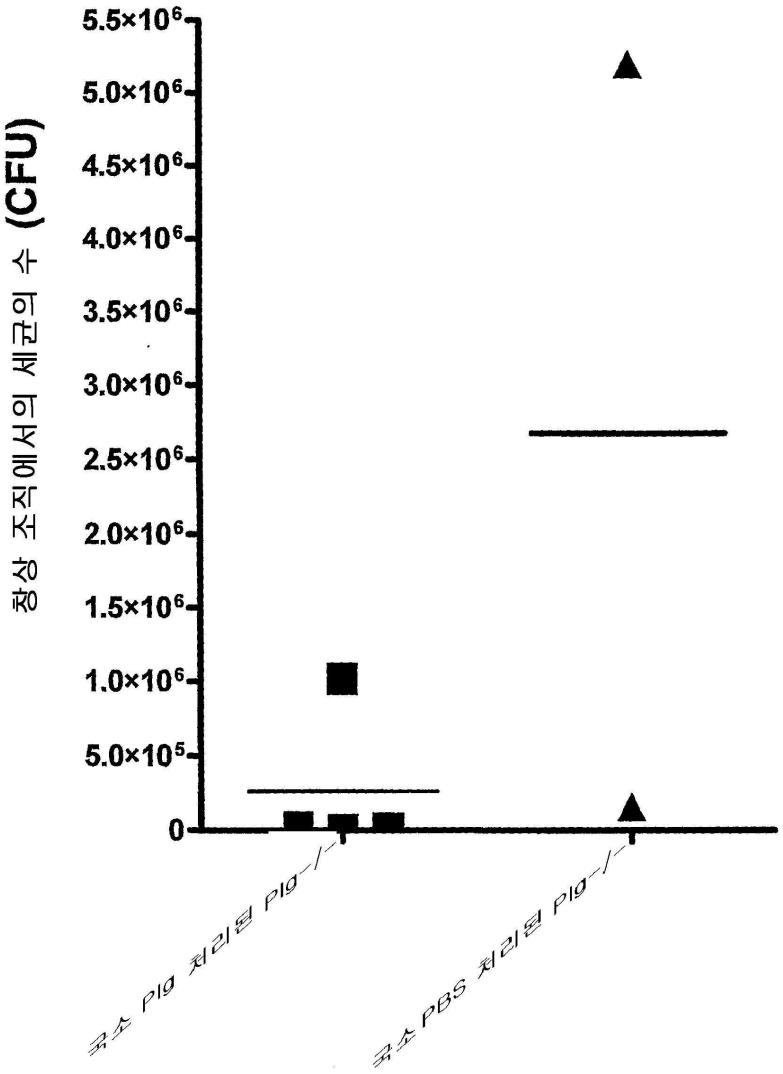
도면16



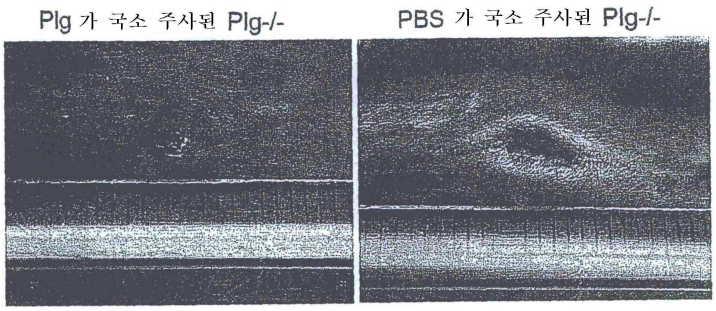
도면17


Plg+/+
Plg-/-

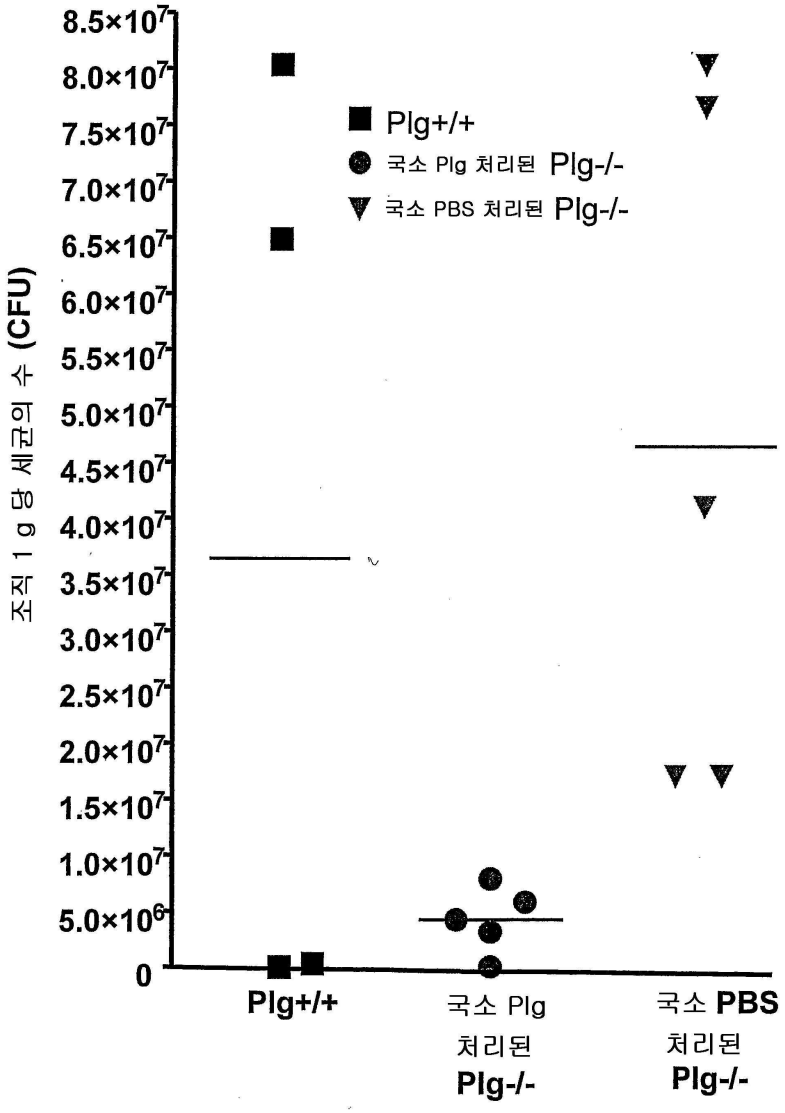
도면18


5.5×10⁶
5.0×10⁶
4.5×10⁶
4.0×10⁶
3.5×10⁶
3.0×10⁶
2.5×10⁶
2.0×10⁶
1.5×10⁶
1.0×10⁶
5.0×10⁵
0
창상 조직에서의 세균의 수 (CFU)
국소 Plg 처리된 Plg-/-
국소 PBS 처리된 Plg-/-

도면19


Plg 가 국소 주사된 Plg-/-
PBS 가 국소 주사된 Plg-/-

도면20


8.5×10^7
8.0×10^7
7.5×10^7
7.0×10^7
6.5×10^7
6.0×10^7
5.5×10^7
5.0×10^7
4.5×10^7
4.0×10^7
3.5×10^7
3.0×10^7
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
조직 1 g 당 세균의 수 (CFU)
Plg+/+
국소 Plg 처리된 Plg-/-
국소 PBS 처리된 Plg-/-
Plg+/+
국소 Plg 처리된 Plg-/-
국소 PBS 처리된 Plg-/-