

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2020年11月19日 (19.11.2020)

(10) 国际公布号
WO 2020/228681 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/49 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01) IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/089632

(22) 国际申请日: 2020年5月11日 (11.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2019/086431
2019年5月10日 (10.05.2019) CN

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列列表部分 (细则5.2(a))。

(71) 申请人: 泰伦基国际有限公司 (TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区愉景湾海蓝居10座2B室, Hong Kong 999077 (CN)。

(72) 发明人: 李季男 (LI, Jinan); 中国广东省深圳市罗湖区田贝三路12号510室, Guangdong 518020 (CN)。

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所 (BEIJING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海国际港1602室, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

(54) **Title:** METHOD AND MEDICINE FOR TREATING AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

(54) 发明名称: 一种治疗肌萎缩侧索硬化的方法和药物

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for treating amyotrophic lateral sclerosis (ALS), comprising administering a therapeutically effective amount of a plasminogen pathway activator to a subject. Further disclosed are a pharmaceutical composition, product and kit, which contain the plasminogen pathway activator, for treating amyotrophic lateral sclerosis.

(57) 摘要: 本发明公开了一种治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的方法, 包括给药受试者治疗有效量的纤溶酶原途径激活剂。本发明还公开了用于治疗肌萎缩侧索硬化的包含纤溶酶原途径激活剂的药物组合物、制品、试剂盒。



WO 2020/228681 A1

一种治疗肌萎缩侧索硬化的方法和药物

5 技术领域

本发明涉及一种治疗肌萎缩侧索硬化及其相关病症的方法，包括给药患有肌萎缩侧索硬化及其相关病症的受试者有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物，例如纤溶酶原，以修复损伤神经，改善临床症状和体征。

10

背景技术

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)，又称渐冻症，为致命性神经系统变性疾病，主要累及锥体束、脑干和脊髓前角细胞，临床表现为呈进行性加重的肌肉萎缩、无力及痉挛，60%以上患者于发病后 3~5 年后因呼吸肌麻痹死亡 (Kiernan MC, Vucis S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet, 2011, 377:942-955.)。

肌萎缩侧索硬化的临床表现以上运动神经元变性 (主要特征为腱反射亢进、肌张力增高) 和下运动神经元变性 (肌萎缩、肌无力、束颤和腱反射丧失) 为主要症状与体征。发病症状常不对称，从发病部位逐渐进展至其他部位，但眼外肌和括约肌多不受累。虽然一些患者可能有轻微的感觉症状，但通常感觉系统检查阴性。传统观念认为，肌萎缩侧索硬化患者认知功能保存完好，但随着神经影像学、神经心理学等诊断技术的发展，发现认知功能受损亦是肌萎缩侧索硬化的常见特征。

该病患病率约为 4-6/100,000，目前唯一的治疗药物为兴奋性氨基酸拮抗剂力如太 (Rilutek) 获各国药品监督部门批准，但只能减缓病情进展。

发明概述

本发明研究发现纤溶酶原途径激活剂例如纤溶酶原可以明显改善脊髓前角运动神经元损伤，治疗 ALS，改善 ALS 的症状。

30 本发明涉及如下各项：

1. 一种治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的方法, 包括给药患肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的受试者治疗有效量的选自如下的一种或多种纤溶酶原途径激活剂: 纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

2. 项 1 所述的方法, 其中所述纤维蛋白溶酶原激活途径的组分选自纤维蛋白溶酶原、重组人纤维蛋白溶酶、Lys-纤维蛋白溶酶原、Glu-纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、含有纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶的一个或多个 kringle 结构域和蛋白酶结构域的纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶变体及类似物、小纤维蛋白溶酶原(mini-plasminogen)、小纤维蛋白溶酶(mini-plasmin)、微纤溶酶原 (micro-plasminogen)、微纤溶酶 (micro-plasmin)、delta-纤溶酶原、delta-纤溶酶 (delta-plasmin)、纤维蛋白溶酶原激活剂、tPA 和 uPA。

3. 项 1 的方法, 所述纤溶抑制剂的拮抗剂为 PAI-1、补体 C1 抑制物、 α 2 抗纤溶酶或 α 2 巨球蛋白的拮抗剂, 例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、 α 2 抗纤溶酶或 α 2 巨球蛋白的抗体。

4. 项 1-3 任一项的方法, 其中所述肌萎缩侧索硬化包括包括遗传型和散发型 ALS。

5. 项 1-4 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂对所述患肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的受试者具有选自如下的一种或多种活性: 延长寿命和中位生存期、延缓肌肉萎缩和肌力减退、减缓体重下降的速度、减轻脊髓前角细胞损伤、变性和坏死、促进脊髓前角 chAT 的合成、促进胆碱能神经元功能恢复、促进脊髓前角突触素表达、脊髓前角 SMN 蛋白表达、促进脊髓前角炎症修复、促进突触损伤修复。

6. 项 1-5 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌肉萎缩、肌力减退、痉挛和/或肌束震颤症状。

7. 项 1-6 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂减轻受试者的体

重下降和/或延长生存期。

8. 项 1-7 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌张力。

5 9. 项 1-8 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的肌肉功能恢复。

10. 项 1-9 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的脊髓前角神经元损伤修复。

10 11. 项 1-10 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂与一种或多种其它药物和/或治疗方法联合施用，优选地，所述治疗方法包括细胞疗法（例如干细胞疗法）和基因疗法、反义 RNA、小分子剪接修饰剂等。

12. 项 1-11 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂为纤维蛋白溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原。

15 13. 项 12 的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性。

14. 项 12 的方法，所述纤溶酶原为包含纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。

20 15. 项 12 的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

16. 项 12 的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。

17. 项 12 的方法，其中所述纤溶酶原通过静脉内、肌肉内、鞘内、鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液形式给药。

25 在本申请的上述任一实施方案中，所述纤溶酶原可与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 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、1 个氨基酸，并且仍然

30

具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。

在一些实施方案中，所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。

5 在一些实施方案中，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的
10 变体或片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

在一些实施方案中，所述受试者是人。在一些实施方案中，所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。在一些实施方案中，所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

15 在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原通过全身或局部给药。在一些实施方案中，所述纤溶酶原通过鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液给药。在一些实施方案中，所述纤溶酶原通过静脉内、肌肉、皮下、鞘内注射给予纤溶酶原来进行治疗。在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原以每天 0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、
20 0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg（以每公斤体重计算）或 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（以每平方厘米体表面积计算）的剂量施用，重复一次或多次，优选至少每天、每二天、每三天施用。

25 在一些实施方案中，本申请涉及以下实施方式

1. 一种治疗肌萎缩侧索硬化（ALS）的方法，包括给药患肌萎缩侧索硬化（ALS）的受试者治疗有效量的纤溶酶原途径激活剂。

2. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂对所述患肌萎缩侧索硬化（ALS）的受试者具有选自如下的一种或多种活性：延长寿命和中位生存期、延缓肌肉萎缩和肌力减退、减缓体重下降的速度、减轻脊髓前角细
30

胞损伤、变性和坏死、促进脊髓前角 chAT 的合成、促进胆碱能神经元功能恢复、促进脊髓前角突触素表达、脊髓前角 SMN 蛋白表达、促进脊髓前角炎症修复、促进突触损伤修复。

3. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌肉萎缩、肌力减退、痉挛和/或肌束震颤症状。

4. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂减轻受试者的体重下降和/或延长生存期。

5. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌张力。

6. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的肌肉功能恢复。

7. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的脊髓前角神经元损伤修复。

8. 项 1-7 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂与一种或多种其它药物和/或治疗方法联合施用。

9. 项 1-8 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂通过静脉内、皮下、肌肉内、鞘内、鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液形式给药。

10. 项 1-9 任一项的方法，其中所述纤溶酶原途径激活剂为纤溶酶原激活途径的组分。

11. 项 10 的方法，所述纤溶酶原激活途径的组分为纤溶酶原。

12. 项 11 的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性。

13. 项 11 的方法，所述纤溶酶原为纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。

14. 项 11 的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

15. 项 11 的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。

30 本发明还涉及治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的药物组合物、药物、制

剂、试剂盒、制品，包含治疗有效量的纤溶酶原途径激活剂。

5 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂对所述患肌萎缩侧索硬化（ALS）的受试者具有选自如下的一种或多种活性：延长寿命和中位生存期、延缓肌肉萎缩和肌力减退、减缓体重下降的速度、减轻脊髓前角细胞损伤、变性和坏死、促进脊髓前角 chAT 的合成、促进胆碱能神经元功能恢复、促进脊髓前角突触素表达、脊髓前角 SMN 蛋白表达、促进脊髓前角炎症修复、促进突触损伤修复。在一些实施方案中，中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌肉萎缩、肌力减退、痉挛和/或肌束震颤症状。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂减轻受试者的体重下降和/或延长生存期。在
10 一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌张力。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的肌肉功能恢复。在一些实施方案中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的脊髓前角神经元损伤修复。

15 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂为纤溶酶原激活途径的组分。在一些实施方案中，纤溶酶原激活途径的组分为纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为包含纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。在
20 一些实施方案中，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。

25 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原与一种或多种其它药物和/或治疗方法联合施用。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原通过静脉内、肌肉内、皮下、鞘内、鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液形式给药。

5 在一些实施方案中，所述药物组合物、药物、制剂包含药学上可接受的载体和纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原。在一些实施方案中，所述试剂盒和制品包含一个或多个容器，所述容器中包含所述药物组合物、药物或制剂。在一些实施方案中，所述试剂盒或制品还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示使用纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原治疗肌萎缩侧索硬化的方法。

在一些实施方案中，所述试剂盒或制品还包含另外的一个或多个容器，该容器中含有其他药物。

10 本发明还涉及治疗有效量的纤溶酶原途径激活剂在制备治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的药物组合物、药物、制剂、试剂盒、制品中的用途。

15 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂对所述患肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的受试者具有选自如下的一种或多种活性：延长寿命和中位生存期、延缓肌肉萎缩和肌力减退、减缓体重下降的速度、减轻脊髓前角细胞损伤、变性和坏死、促进脊髓前角 chAT 的合成、促进胆碱能神经元功能恢复、促进脊髓前角突触素表达、脊髓前角 SMN 蛋白表达、促进脊髓前角炎症修复、促进突触损伤修复。在一些实施方案中，中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌肉萎缩、肌力减退、痉挛和/或肌束震颤症状。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂减轻受试者的体重下降和/或延长生存期。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌张力。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的肌肉功能恢复。在一些实施方案中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的脊髓前角神经元损伤修复。

25 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂为纤溶酶原激活途径的组分。在一些实施方案中，纤溶酶原激活途径的组分为纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为包含纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。在一些实施方案中，所述纤溶酶原

30

选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。

5 在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原与一种或多种其它药物和/或治疗方法联合施用。在一些实施方案中，所述纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原通过静脉内、肌肉内、皮下、鞘内、鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液形式给药。

10 在一些实施方案中，所述药物组合物、药物、制剂包含药学上可接受的载体和纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原。在一些实施方案中，所述试剂盒和制品包含一个或多个容器，所述容器中包含所述药物组合物、药物或制剂。在一些实施方案中，所述试剂盒或制品还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示使用纤溶酶原途径激活剂，例如纤溶酶原激活途径的组分，例如纤溶酶原治疗肌萎缩侧索硬化的方法。

在一些实施方案中，所述试剂盒或制品还包含另外的一个或多个容器，该容器中含有其他药物。

20 本发明明确涵盖了属于本发明实施方案之间的技术特征的所有组合，并且这些组合后的技术方案在本申请中已经明确公开，就像上述技术方案已经单独且明确公开一样。另外，本发明还明确涵盖各个实施方案及其要素的之间的组合，该组合后的技术方案在本文中明确公开。

附图简述

25 图 1 给予纤溶酶原后 ALS 模型小鼠寿命和生存时间统计结果。图 1A 为寿命统计结果，图 1B 为生存时间统计结果。结果显示，给纤溶酶原组小鼠平均寿命为 164 ± 8.6 天，溶媒对照组小鼠平均寿命为 153 ± 0 天，给纤溶酶原组寿命相对于溶媒对照组延长了约 11 天；给纤溶酶原小鼠中位生存期为 53 ± 9 天，溶媒对照组中位生存期为 40 ± 0 天，给纤溶酶原组中位生存期相对于溶媒对照组延长了约 13 天，约延长了 30%。该结果表明纤溶酶原能够延长 ALS 小鼠寿命和中位生存期。

30

图 2 结果显示，给药期间虽然两组小鼠悬挂潜伏时间均在减少，但给纤溶酶原组小鼠悬挂潜伏时间始终长于溶媒对照组小鼠，且给药第 6、21、23 天，给纤溶酶原组悬挂潜伏时间与溶媒组相比，统计差异显著或极为显著，P 值分别为 0.03、0.02、0.008。说明纤溶酶原能够延缓 ALS 小鼠肌力减退。

图 3 给予纤溶酶原后 ALS 模型小鼠出现 2 分神经行为表现的时间。结果显示，给纤溶酶原组小鼠出现 2 分神经表现的时间点明显晚于溶媒组，且统计差异显著（*表示 $P < 0.05$ ）。

图 4 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠体重相对于其第 1 天体重百分比统计结果。结果显示，给药期间，空白对照组小鼠体重波动不大，有逐渐上升趋势；溶媒对照组小鼠体重逐渐下降；给纤溶酶原组小鼠体重前 25 天虽然波动较大，但均接近或略大于空白对照组体重，25 天后体重渐呈降低趋势，但始终大于溶媒对照组小鼠体重，且与溶媒对照组相比，P 值小于或接近 0.001。说明纤溶酶原可以显著缓解 ALS 模型小鼠体重下降的速度，延缓 ALS 病情的恶化。

图 5 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠脊髓前角 H&E 染色中空泡面积统计结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组，D 为空泡面积统计结果。结果显示，空白对照小鼠脊髓前角呈现出一定水平的空泡面积，溶媒组小鼠脊髓前角空泡面积明显大于空白对照（ $P < 0.001$ ），给药组小鼠脊髓前角空泡面积明显低于溶媒组，且统计差异极为显著。提示纤溶酶原能够减少 ALS 模型小鼠脊髓前角空泡面积，减少脊髓前角运动神经元的死亡。

图 6 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠脊髓前角 chAT 免疫组化染色结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组，D 为平均光密度统计结果。结果显示。空白对照小鼠脊髓前角表达一定量的 chAT，溶媒组小鼠 chAT 表达水平明显低于空白对照组小鼠，给药组小鼠脊髓前角 chAT 的表达明显高于溶媒组小鼠，统计学差异显著（ $P < 0.05$ ）。提示纤溶酶原 6 能够促进 SOD1-G93A 小鼠脊髓前角 chAT 的合成与表达，促进胆碱能神经元功能恢复。

图 7 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠脊髓前角突触素免疫组化染色结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组，D 为平均光密度统计结果。结果显示，空白对照组小鼠脊髓前角表达一定水平的突触素，溶媒组小鼠突触素的表达水平明显低于空白对照小鼠，给药组小鼠脊髓前角突触素的表达明显高于溶媒组小鼠，且统计差异显著 ($P < 0.05$)。提示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角突触素的表达，促进突触损伤修复。

图 8 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠脊髓前角 Iba-1 免疫组化染色结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组，D 为平均光密度统计结果。结果显示，空白对照组小鼠脊髓前角表达一定水平的 Iba-1，给药组小鼠脊髓前角 Iba-1 的表达水平明显高于溶媒组和空白对照组小鼠，且统计差异显著 ($P < 0.05$ 或 0.01)。提示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角炎症修复。

图 9 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠腓肠肌 H&E 染色代表性图片。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组。结果显示，空白对照组小鼠腓肠肌肌纤维结构完整，形态大小比较均一，而溶媒组腓肠肌肌纤维出现严重的萎缩现象，并有局部炎症细胞浸润(红色箭头)，肌纤维圆性变，给药组肌纤维萎缩现象相比溶媒组较轻，但也有炎症细胞浸润的现象。提示纤溶酶原能够改善模型小鼠肌肉萎缩。

图 10 给予纤溶酶原后正常小鼠和 ALS 模型小鼠臀肌 H&E 染色代表性图片。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给药组。结果显示，空白对照组小鼠肌纤维结构比较完整，形态大小比较均一。溶媒组小鼠臀肌的肌纤维有圆性变，大小不一，萎缩严重，伴有炎性细胞浸润，给药组小鼠臀肌肌纤维结构形态相比溶媒组有一定程度的恢复。提示纤溶酶原能够改善模型小鼠肌肉萎缩。

图 11 给予纤溶酶原后 ALS 模型小鼠脊髓前角 SMN 蛋白免疫组化染色代表性图片。A 为溶媒组，B 为给药组。结果显示，给药组小鼠脊髓前角 SMN 蛋白的表达水平明显高于溶媒组。提示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角 SMN 蛋白的表达。

本发明“肌萎缩侧索硬化”是指由运动神经元损伤导致的一系列病理变化的总称。所述病理变化包括运动神经元退化、神经胶质增生、神经纤维异常、皮层脊髓束和脊神经前根中有髓纤维的丧失。延髓运动神经元损伤的表现例如面部肌肉、语言和吞咽功能障碍；脊髓运动神经元损伤的表现包括肌肉痉挛、肌肉衰弱、肌萎缩、瘫痪和呼吸衰竭。

ALS 的特征在于下运动神经元和上运动神经元的功能障碍的进行性表现。下运动神经元将脑干和脊髓连接到肌肉纤维，其功能障碍导致肌肉萎缩、痉挛和肌束震颤。上运动神经元源于大脑皮质或脑干的运动区域，运载运动信息至直接响应的运动神经元以刺激目标肌肉。它们的功能障碍导致痉挛(干扰步态、运动和语音的持续的肌肉收缩)和病理反射。ALS 根据是否具有家族遗传性可以分为散发性 ALS (sALS) 和家族性 ALS (fALS)。散发性 ALS 没有 ALS 家族史，家族性 ALS 在家族中存在 1 个以上 ALS 患者。根据遗传方式的不同，家族性 ALS 可分为常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传和伴 X 染色体遗传。

运动神经对肌肉组织有营养作用。切断运动神经后，肌肉内的糖原合成减慢、蛋白质分解加速，肌肉逐渐萎缩。本申请也涉及纤溶酶原对由于运动神经损伤所导致的肌萎缩及其相关病症的治疗。

纤维蛋白溶解系统 (Fibrinolytic system) 也称纤溶系统，为参与纤维蛋白溶解 (纤溶) 过程的一系列化学物质组成的系统，主要包括纤维蛋白溶解酶原 (纤溶酶原)、纤溶酶、纤溶酶原激活物、纤溶抑制剂。纤溶酶原激活物包括组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 和尿激酶型纤溶酶原激活物 (u-PA)。t-PA 是一种丝氨酸蛋白酶，由血管内皮细胞合成。t-PA 激活纤溶酶原，此过程主要在纤维蛋白上进行；尿激酶型纤溶酶原激活物 (u-PA) 由肾小管上皮细胞和血管内皮细胞产生，可以直接激活纤溶酶原而不需要纤维蛋白作为辅因子。纤溶酶原 (PLG) 由肝脏合成，当血液凝固时，PLG 大量吸附在纤维蛋白网上，在 t-PA 或 u-PA 的作用下，被激活为纤溶酶，促使纤维蛋白溶解。纤溶酶 (PL) 是一种丝氨酸蛋白酶，作用如下：降解纤维蛋白和纤维蛋白原；水解多种凝血因子 V、VIII、X、VII、XI、II 等；使纤溶酶原转变为纤溶酶；水解补体等。纤溶抑制物：包括纤溶酶原激活

物抑制剂 (PAI) 和 $\alpha 2$ 抗纤溶酶 ($\alpha 2$ -AP)。PAI 主要有 PAI-1 和 PAI-2 两种形式, 能特异性与 t-PA 以 1: 1 比例结合, 从而使其失活, 同时激活 PLG。 $\alpha 2$ -AP 由肝脏合成, 与 PL 以 1: 1 比例结合形成复合物, 抑制 PL 活性; FX III 使 $\alpha 2$ -AP 以共价键与纤维蛋白结合, 减弱了纤维蛋白对 PL 作用的敏感性。体内抑制纤溶系统活性的物质: PAI-1, 补体 C1 抑制物; $\alpha 2$ 抗纤溶酶; $\alpha 2$ 巨球蛋白。

本发明“纤维蛋白溶酶原途径激活剂”或“纤溶酶原途径激活剂”术语涵盖纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

本发明的术语“纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”或“纤溶酶原激活途径的组分”涵盖:

1. 纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、Glu-纤维蛋白溶酶原、微纤溶酶原 (micro-plasminogen)、delta-纤溶酶原; 它们的变体或类似物;
2. 纤维蛋白溶酶以及它们的变体或类似物; 和
3. 纤维蛋白溶酶原激活剂, 例如 tPA 和 uPA 以及包含一个或多个 tPA 或 uPA 的结构域(如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域)的 tPA 或 uPA 变体和类似物。

所述的“纤溶抑制剂的拮抗剂”术语涵盖 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的拮抗剂, 例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的抗体。

上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式, 以及通过添加、删除和/或取代例如 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、1 个氨基酸、仍然具有纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 活性的蛋白质。例如, 纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”

包括通过例如 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、1 个保守性氨基酸取代获得的这些蛋白质的突变变体。

5 本发明的“纤溶酶原变体”涵盖与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。例如本发明的“纤溶酶原变体”可以是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 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、1 个氨基酸，并且仍然
10 具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。具体地，本发明纤溶酶原变体包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式，以及通过保守性氨基酸取代例如 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、1 个氨基酸获得的这些蛋白质的突变变体。

15 本发明的纤溶酶原可以为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体，例如序列 2、6、8、10 或 12 所示的纤溶酶原，例如序列 2 所示的人天然纤溶酶原。

20 上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“类似物”包括分别提供与纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 基本相似的作用的化合物。

25 上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”和“类似物”涵盖包含一个或多个结构域(例如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域)的纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”和“类似物”。例如，纤维蛋白溶酶原的“变体”和“类似物”涵盖包含一个或多个纤溶酶原结构域(例如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域)的纤维蛋白溶酶原变体和类似物，例如小纤维蛋白溶酶原(mini-plasminogen)。纤维蛋白溶酶的“变体”和“类似物”涵盖包含一个或多个纤维蛋白溶酶结构域(例如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域)的

纤维蛋白溶酶“变体”和“类似物”，例如小纤维蛋白溶酶(mini-plasmin)和 δ -纤维蛋白溶酶(delta-plasmin)。

上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的“变体”或“类似物”是否分别具有纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的活性，或者是否分别提供与纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 基本相似的作用可以通过本领域已知方法进行检测，例如，通过基于酶谱法(enzymography)、ELISA(酶联免疫吸附测定)和 FACS(荧光激活细胞分选方法)通过激活的纤维蛋白溶酶活性水平来衡量，例如可以参照选自如下文献中记载的方法测量：Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C, Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P. and Ny, T. (1999). Ovulation in plasminogen-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 (February 2008). "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.

在本发明的一些实施方案中，本发明的“纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”为纤溶酶原，选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的保守突变变体或其片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的保守突变变体或其片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是如序列 2 所示的人天然纤溶酶原。

“能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物”指能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的任何化合物，例如 tPA、uPA、链激酶、沙芦普酶、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、阿尼普酶、孟替普酶、拉诺替普酶、帕米普酶、葡激酶。

本发明“纤溶抑制剂的拮抗剂”为拮抗、减弱、封闭、阻止纤溶抑制剂作用的化合物。所述纤溶抑制剂例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶和 $\alpha 2$ 巨球蛋白。所述拮抗剂例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的抗体，或阻断或下调例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白表达的反义 RNA 或小 RNA，或占据 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的结合位点但无 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白功能的化合物”，或封闭 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的结合结构域和/或活性结构域的化合物。

纤溶酶是纤溶酶原激活系统 (PA 系统) 的关键组分。它是一种广谱的蛋白酶，能够水解细胞外基质 (ECM) 的几个组分，包括纤维蛋白、明胶、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖。此外，纤溶酶能将一些金属蛋白酶前体 (pro-MMPs) 激活形成具有活性的金属蛋白酶 (MMPs)。因此纤溶酶被认为是胞外蛋白水解作用的一个重要的上游调节物。纤溶酶是由纤溶酶原通过两种生理性的 PAs: 组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 或尿激酶型纤溶酶原激活剂 (uPA) 蛋白水解形成的。由于纤溶酶原在血浆和其他体液中相对水平较高，传统上认为 PA 系统的调节主要通过 PAs 的合成和活性水平实现。PA 系统组分的合成受不同因素严格调节，如激素、生长因子和细胞因子。此外，还存在纤溶酶和 PAs 的特定生理抑制剂。纤溶酶的主要抑制剂是 $\alpha 2$ -抗纤溶酶 ($\alpha 2$ -antiplasmin)。PAs 的活性同时被 uPA 和 tPA 的纤溶酶原激活剂抑制剂-1 (PAI-1) 抑制以及主要抑制 uPA 的溶酶原激活剂抑制剂-2 (PAI-2) 调节。某些细胞表面具有直接水解活性的 uPA 特异性细胞表面受体 (uPAR)。

纤溶酶原是一个单链糖蛋白，由 791 个氨基酸组成，分子量约为 92 kDa。纤溶酶原主要在肝脏合成，大量存在于胞外液中。血浆中纤溶酶原含

量约为 2 μM 。因此纤溶酶原是组织和体液中蛋白质水解活性的一个巨大的潜在来源。纤溶酶原存在两种分子形式：谷氨酸-纤溶酶原 (Glu-plasminogen) 和赖氨酸-纤溶酶原(Lys-plasminogen)。天然分泌和未裂解形式的纤溶酶原具有一个氨基末端 (N-末端) 谷氨酸，因此被称为谷氨酸-纤溶酶原。然而，在纤溶酶存在时，谷氨酸-纤溶酶原在 Lys76-Lys77 处水解成为赖氨酸-纤溶酶原。与谷氨酸-纤溶酶原相比，赖氨酸-纤溶酶原与纤维蛋白具有更高的亲和力，并可以更高的速率被 PAs 激活。这两种形式的纤溶酶原的 Arg560-Val561 肽键可被 uPA 或 tPA 切割，导致二硫键连接的双链蛋白酶纤溶酶的形成。纤溶酶原的氨基末端部分包含五个同源三环，即所谓的 kringles，羧基末端部分包含蛋白酶结构域。一些 kringles 含有介导纤溶酶原与纤维蛋白及其抑制剂 α 2-AP 特异性相互作用的赖氨酸结合位点。最新发现一个纤溶酶原为 38 kDa 的片段，其中包括 kringles1-4，是血管生成的有效抑制剂。这个片段被命名为血管抑素，可通过几个蛋白酶水解纤溶酶原产生。

纤溶酶的主要底物是纤维蛋白，纤维蛋白的溶解是预防病理性血栓形成的关键。纤溶酶还具有对 ECM 几个组分的底物特异性，包括层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖和明胶，表明纤溶酶在 ECM 重建中也起着重要作用。间接地，纤溶酶还可以通过转化某些蛋白酶前体为活性蛋白酶来降解 ECM 的其他组分，包括 MMP-1, MMP-2, MMP-3 和 MMP-9。因此，有人提出，纤溶酶可能是细胞外蛋白水解的一个重要的上游调节器。此外，纤溶酶具有激活某些潜在形式的生长因子的能力。在体外，纤溶酶还能水解补体系统的组分并释放趋化补体片段。

“纤溶酶”是存在于血液中的一种非常重要的酶，能将纤维蛋白凝块水解为纤维蛋白降解产物和 D-二聚体。

“纤溶酶原”是纤溶酶的酶原形式，根据 swiss prot 中的序列，按含有信号肽的天然人源纤溶酶原氨基酸序列 (序列 4) 计算由 810 个氨基酸组成，分子量约为 90kD，主要在肝脏中合成并能够在血液中循环的糖蛋白，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 3 所示。全长的纤溶酶原包含七个结构域：位于 C 末端的丝氨酸蛋白酶结构域、N 末端的 Pan Apple(PAP)结构域以及 5 个 Kringle 结构域(Kringle1-5)。参照 swiss prot 中的序列，其信号肽

包括残基 Met1-Gly19, PAp 包括残基 Glu20-Val98, Kringle1 包括残基 Cys103-Cys181, Kringle2 包括残基 Glu184-Cys262, Kringle3 包括残基 Cys275-Cys352, Kringle4 包括残基 Cys377-Cys454, Kringle5 包括残基 Cys481-Cys560。根据 NCBI 数据, 丝氨酸蛋白酶域包括残基 Val581-Arg804。

Glu-纤溶酶原是天然全长的纤溶酶原, 由 791 个氨基酸组成 (不含有 19 个氨基酸的信号肽), 编码该序列的 cDNA 序列如序列 1 所示, 其氨基酸序列如序列 2 所示。在体内, 还存在一种是从 Glu-纤溶酶原的第 76-77 位氨基酸处水解从而形成的 Lys-纤溶酶原, 如序列 6 所示, 编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 5 所示。Delta-纤溶酶原 (δ -plasminogen) 是全长纤溶酶原缺失了 Kringle2-Kringle5 结构的片段, 仅含有 Kringle1 和丝氨酸蛋白酶域, 有文献报道了 delta-纤溶酶原的氨基酸序列 (序列 8), 编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 7。小纤溶酶原 (Mini-plasminogen) 由 Kringle5 和丝氨酸蛋白酶域组成, 有文献报道其包括残基 Val443-Asn791 (以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸), 其氨基酸序列如序列 10 所示, 编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 9 所示。而微纤溶酶原 (Micro-plasminogen) 仅含有丝氨酸蛋白酶结构域, 有文献报道其氨基酸序列包括残基 Ala543-Asn791 (以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸), 也有专利文献 CN102154253A 报道其序列包括残基 Lys531-Asn791 (以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸), 本专利序列参考专利文献 CN102154253A, 其氨基酸序列如序列 12 所示, 编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 11 所示。

本发明的“纤溶酶”与“纤维蛋白溶酶”、“纤维蛋白溶解酶”可互换使用, 含义相同; “纤溶酶原”与“纤维蛋白溶酶”、“纤维蛋白溶解酶原”可互换使用, 含义相同。

在本申请中, 所述纤溶酶原“缺乏”的含义或活性为受试者体内纤溶酶原的含量比正常人低, 低至足以影响所述受试者的正常生理功能; 所述纤溶酶原“缺失”的含义或活性为受试者体内纤溶酶原的含量显著低于正常人, 甚至活性或表达极微, 只有通过外源提供才能维持正常生理功能。

本领域技术人员可以理解，本发明纤溶酶原的所有技术方案适用于纤溶酶，因此，本发明描述的技术方案涵盖了纤溶酶原和纤溶酶。在循环过程中，纤溶酶原采用封闭的非活性构象，但当结合至血栓或细胞表面时，在纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)的介导下，其转变为呈开放性构象的活性纤溶酶。具有活性的纤溶酶可进一步将纤维蛋白凝块水解为纤维蛋白降解产物和 D-二聚体，进而溶解血栓。其中纤溶酶原的 PAp 结构域包含维持纤溶酶原处于非活性封闭构象的重要决定簇，而 KR 结构域则能够与存在于受体和底物上的赖氨酸残基结合。已知多种能够作为纤溶酶原激活剂的酶，包括：组织纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)、激肽释放酶和凝血因子 XII(哈格曼因子)等。

“纤溶酶原活性片段”在本申请中包括 1) 在纤溶酶原蛋白中，能够与底物中的靶序列结合的活性片段，也称为赖氨酸结合片段，例如包含 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4 和/或 Kringle 5 的片段（所述纤溶酶原结构参见 Aisina R B , Mukhametova L I . Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6):590-605 所述）；2) 在纤溶酶原蛋白中发挥蛋白水解功能的活性片段，例如包含序列 14 所示的纤溶酶原活性（蛋白水解功能）的片段；3) 在纤溶酶原蛋白中，既具有与底物中的靶序列结合活性(赖氨酸结合活性)又具有纤溶酶原活性（蛋白水解功能）的片段。在本申请的一些实施方案中，所述纤溶酶原为包含序列 14 所示的纤溶酶原活性片段的蛋白质。在本申请的一些实施方案中，所述纤溶酶原为包含 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4 和/或 Kringle 5 的赖氨酸结合片段的蛋白质。在一些实施方案中，本申请的纤溶酶原活性片段包含序列 14、与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列的蛋白质。因此，本发明所述的纤溶酶原包括含有该纤溶酶原活性片段、并且仍然保持该纤溶酶原活性的蛋白。在一些实施方案中，本申请的纤溶酶原包含 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4 和/或 Kringle 5、或与 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4 或 Kringle 5 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性并且仍然具有赖氨酸结合活性的蛋白质。

目前，对于血液中纤溶酶原及其活性测定方法包括：对组织纤溶酶原
激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤溶酶原激活剂抗原的检测(t-
PAAg)、对血浆组织纤溶酶原活性的检测(plgA)、血浆组织纤溶酶原抗原的
检测(plgAg)、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤溶
酶原激活剂抑制物抗原的检测、血浆纤维蛋白溶酶-抗纤维蛋白溶酶复合物
5 检测(PAP)。其中最常用的检测方法为发色底物法：向受检血浆中加链激酶
(SK)和发色底物，受检血浆中的 PLG 在 SK 的作用下，转变成 PLM，后者
作用于发色底物，随后用分光光度计测定，吸光度增加与纤溶酶原活性成
10 正比。此外也可采用免疫化学法、凝胶电泳、免疫比浊法、放射免疫扩散
法等对血液中的纤溶酶原活性进行测定。

“直系同源物或直系同系物 (ortholog)”指不同物种之间的同源物，既
包括蛋白同源物也包括 DNA 同源物，也称为直向同源物、垂直同源物。其
具体指不同物种中由同一祖先基因进化而来的蛋白或基因。本发明的纤溶
酶原包括人的天然纤溶酶原，还包括来源于不同物种的、具有纤溶酶原活
15 性的纤溶酶原直系同源物或直系同系物。

“保守取代变体”是指其中一个给定的氨基酸残基改变但不改变蛋白质
或酶的整体构象和功能，这包括但不限于以相似特性（如酸性，碱性，疏
水性，等）的氨基酸取代亲本蛋白质中氨基酸序列中的氨基酸。具有类似
性质的氨基酸是众所周知的。例如，精氨酸、组氨酸和赖氨酸是亲水性的
20 碱性氨基酸并可以互换。同样，异亮氨酸是疏水氨基酸，则可被亮氨酸，
蛋氨酸或缬氨酸替换。因此，相似功能的两个蛋白或氨基酸序列的相似性
可能会不同。例如，基于 MEGALIGN 算法的 70%至 99%的相似度（同一
性）。“保守取代变体”还包括通过 BLAST 或 FASTA 算法确定具有 60%以
25 上的氨基酸同一性的多肽或酶，若能达 75%以上更好，最好能达 85%以
上，甚至达 90%以上为最佳，并且与天然或亲本蛋白质或酶相比具有相同
或基本相似的性质或功能。

“分离的”纤溶酶原是指从其天然环境分离和/或回收的纤溶酶原蛋白。
在一些实施方案中，所述纤溶酶原会纯化(1)至大于 90%、大于 95%、或大
于 98%的纯度(按重量计)，如通过 Lowry 法所确定的，例如超过 99% (按重
30 量计)，(2)至足以通过使用旋转杯序列分析仪获得 N 端或内部氨基酸序列的

至少 15 个残基的程度，或(3)至同质性，该同质性是通过使用考马斯蓝或银染在还原性或非还原性条件下的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定的。分离的纤溶酶原也包括通过生物工程技术从重组细胞制备，并通过至少一个纯化步骤分离的纤溶酶原。

5 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指任何长度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸，化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸，和具有经修饰的肽主链的多肽。该术语包括融合蛋白，包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白，具有异源和同源前导序列(具有或没有 N 端甲硫氨酸残基)的融合物；等等。

10 关于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时，候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式实现，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员能决定用于比对序列的适宜参数，包括对所比较序列全长实现最大对比需要的任何算法。然而，为了本发明的目的，氨基酸序列同一性百分数值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生的。

15 在采用 ALIGN-2 来比较氨基酸序列的情况中，给定氨基酸序列 A 相对于给定氨基酸序列 B 的%氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列 B 的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列 A) 如下计算：

分数 X/Y 乘 100

25 其中 X 是由序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目，且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基的总数。应当领会，在氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等的情况下，A 相对于 B 的%氨基酸序列同一性会不等于 B 相对于 A 的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明，本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述，使用 ALIGN-2 计算机程序获得的。

如本文中使用的，术语“治疗”指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果可以是完全或部分预防疾病或其症状，和/或部分或完全治愈疾病和/或其症状，并且包括：(a)预防疾病在受试者体内发生，所述受试者可以具有疾病的素因，但是尚未诊断为具有疾病；(b)抑制疾病，即阻滞其形成；和

5 (c)减轻疾病和/或其症状，即引起疾病和/或其症状消退。

术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用，指哺乳动物，包括但不限于鼠(大鼠、小鼠)、非人灵长类、人、犬、猫、有蹄动物(例如马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

“治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病

10 时足以实现对疾病的所述预防和/或治疗的纤溶酶原的量。“治疗有效量”会根据所使用的纤溶酶原、要治疗的受试者的疾病和/或其症状的严重程度以及年龄、体重等而变化。

本发明纤溶酶原的制备

15 纤溶酶原可以从自然界分离并纯化用于进一步的治疗用途，也可以通过标准的化学肽合成技术来合成。当通过化学合成多肽时，可以经液相或固相进行合成。固相多肽合成(SPPS) (其中将序列的 C 末端氨基酸附接于不溶性支持物，接着序贯添加序列中剩余的氨基酸)是适合纤溶酶原化学合成的方法。各种形式的 SPPS，诸如 Fmoc 和 Boc 可用于合成纤溶酶原。用于

20 固相合成的技术描述于 Barany 和 Solid-Phase Peptide Synthesis; 第 3-284 页于 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 第 2 卷: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, 等 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart 等, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 和 Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10 和

25 Camarero JA 等 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8 中。简言之，用其上构建有肽链的功能性单元处理小的不溶性多孔珠。在偶联/去保护的重复循环后，将附接的固相游离 N 末端胺与单个受 N 保护的氨基酸单元偶联。然后，将此单元去保护，露出可以与别的氨基酸附接的新的 N 末端胺。肽保持固定在固相上，之后将其切掉。

可以使用标准重组方法来生产本发明的纤溶酶原。例如，将编码纤溶酶原的核酸插入表达载体中，使其与表达载体中的调控序列可操作连接。表达调控序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达调控可以是载体中的真核启动子系统，所述载体能够转化或转染真核宿主细胞(例如 COS 或 CHO 细胞)。一旦将载体掺入合适的宿主中，在适合于核苷酸序列的高水平表达及纤溶酶原的收集和纯化的条件下维持宿主。

合适的表达载体通常在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体 DNA 的整合部分复制。通常，表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)以有助于对外源用期望的 DNA 序列转化的那些细胞进行检测。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是可以用于克隆纤溶酶原编码多核苷酸的原核宿主细胞的例子。适合于使用的其它微生物宿主包括杆菌，诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和其他肠杆菌科(*enterobacteriaceae*)，诸如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、和各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中，也可以生成表达载体，其通常会含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外，会存在许多公知的启动子，诸如乳糖启动子系统，色氨酸(*trp*)启动子系统，*beta*-内酰胺酶启动子系统，或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常会控制表达，任选在操纵基因序列的情况中，并且具有核糖体结合位点序列等，以启动并完成转录和翻译。

其他微生物，诸如酵母也可用于表达。酵母(例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*))和毕赤酵母(*Pichia*)是合适的酵母宿主细胞的例子，其中合适的载体根据需要具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包含 3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分解酶。诱导型酵母启动子特别包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

在微生物外，哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达并生成本发明的纤溶酶原(例如编码纤溶酶原的多核苷酸)。参见 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y.

(1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、和经转化的 B 细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列，如复制起点，启动子和增强子(Queen 等, Immunol. Rev. 89:49 (1986))，以及必需的加工信息位点，诸如核糖体结合位点，RNA 剪接位点，多聚腺苷酸化位点，和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见 Co 等, J. Immunol. 148:1149 (1992)。

一旦合成(化学或重组方式)，可以依照本领域的标准规程，包括硫酸铵沉淀，亲和柱，柱层析，高效液相层析(HPLC)，凝胶电泳等来纯化本发明所述的纤溶酶原。该纤溶酶原是基本上纯的，例如至少约 80%至 85%纯的，至少约 85%至 90%纯的，至少约 90%至 95%纯的，或 98%至 99%纯的或更纯的，例如不含污染物，所述污染物如细胞碎片，除纤溶酶原以外的大分子，等等。

15 药物配制剂

可以通过将具有所需纯度的纤溶酶原与可选的药用载体，赋形剂，或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性，并包括缓冲剂例如磷酸盐，柠檬酸盐及其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化己烷双胺；氯化苄烷铵(benzalkonium chloride)，苯索氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；间甲酚)；低分子量多肽(少于约 10 个残基)；蛋白质如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸，谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂如 EDTA；糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇；成盐反离子如钠；金属复合物(例如锌-蛋白复合物)；和/或非离子表面活性剂，例如 TWEENTM，PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。

本发明的配制剂也可含有需治疗的具体病症所需的一种以上的活性化合物，优选活性互补并且相互之间没有副作用的那些。例如，抗高血压的药物，抗心律失常的药物，治疗糖尿病的药物等。

5 本发明的纤溶酶原可包裹在通过诸如凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊中，例如，可置入在胶质药物传送系统(例如，脂质体，白蛋白微球，微乳剂，纳米颗粒和纳米胶囊)中或置入粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。这些技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

10 用于体内给药的本发明的纤溶酶原必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

本发明的纤溶酶原可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质，例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer 等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277(1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-15 105(1982))或聚(乙烯醇)，聚交酯(美国专利 3773919, EP 58,481)，L-谷氨酸与 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, Biopolymers 22:547(1983))，不可降解的乙烯-乙烯乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 等, 出处同上)，或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 Lupron DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体)，以及聚 D-(-)-20 3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子 100 天以上，而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如，如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间 S-S 键，则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳
25 定。

给药和剂量

可以通过不同方式，例如通过静脉内，腹膜内，皮下，颅内，鞘内，动脉内(例如经由颈动脉)，肌内来实现本发明药物组合物的施用。

用于胃肠外施用的制备物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和可注射有机酯，如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳剂或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包含氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、或固定油。静脉内媒介物包含液体和营养补充物、电解质补充物，等等。也可以存在防腐剂和其他添加剂，诸如例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体，等等。

医务人员会基于各种临床因素确定剂量方案。如医学领域中公知的，任一患者的剂量取决于多种因素，包括患者的体型、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施用次数和路径、总体健康、和同时施用的其它药物。本发明包含纤溶酶原的药物组合物的剂量范围可以为每天约0.0001至2000 mg/kg，或约0.001至500 mg/kg (例如0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg等等)受试者体重。例如，剂量可以是1 mg/kg 体重或50 mg/kg 体重或在1-50 mg/kg 的范围，或至少1 mg/kg。高于或低于此例示性范围的剂量也涵盖在内，特别是考虑到上述的因素。上述范围中的中间剂量也包含在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类剂量。例示性的剂量日程表包括连续几天1-10 mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估治疗效果和安全性。

20

制品或药盒

本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒，其包含可用于治疗由糖尿病引起的心血管病及其相关病症的本发明纤溶酶原或纤溶酶。所述制品优选包括一个容器，标签或包装插页。适当的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。所述容器含有组合物，所述组合物可有效治疗本发明的疾病或病症并具有无菌入口(例如所述容器可为静脉内溶液包或小瓶，其含有可被皮下注射针穿透的塞子的)。所述组合物中至少一种活性剂为纤溶酶原/纤溶酶。所述容器上或所附的标签说明所述组合物用于治疗本发明所述由糖尿病引起的心血管病及其相关病症。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器，诸如磷酸盐缓冲的盐水，

30

林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者角度来看所需的其它物质，包括其它缓冲液，稀释剂，过滤物，针和注射器。此外，所述制品包含带有使用说明的包装插页，包括例如指示所述组合物的使用者将纤溶酶原组合物以及治疗伴随的疾病的其它药物给药患者。

5

实施例

实施例 1 纤溶酶原延长肌萎缩性侧索硬化症模型小鼠寿命和中位生存期

本实施例中使用的人纤溶酶原来自捐赠者血浆，基于文献^[1-3]所描述的方法并进行工艺优化，纯化获得。人纤溶酶原单体的纯度>95%。以下所有
10 实施例相同。

转基因突变 SOD1 具有在散发性和家族性肌萎缩性侧索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) 临床中观察到的组织病理学特征。本
15 申请 ALS 模型小鼠为 B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J 转基因小鼠 (简称 SOD1-G93A)，购自 Jackson 实验室，在 SPF 级环境下进行动物相关试验。SOD1-G93A 模型小鼠大约在 100 天左右出现后肢颤抖，之后病情快速
恶化，50%存活率为 157.1 ± 9.3 天^[4]。目前已被广泛应用于 ALS 的机制研究及新药研发的临床前试验研究当中。

取 16 周龄 SOD1-G93A 雄性小鼠 9 只，根据体重将小鼠随机分为两
20 组，溶媒对照组 5 只和给纤溶酶原组 4 只，溶媒对照组小鼠按照 0.1ml/天尾静脉注射溶媒 (PBS, pH7.4)，给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原，每天观察记录小鼠的生存情况。

结果显示，给纤溶酶原组小鼠平均寿命为 164 ± 8.6 天，溶媒对照组小鼠平均寿命为 153 ± 0 天，给纤溶酶原组寿命相对于溶媒对照组延长了约 11
25 天 (图 1A)；给纤溶酶原小鼠中位生存期为 53 ± 9 天，溶媒对照组中位生存期为 40 ± 0 天，给纤溶酶原组中位生存期相对于溶媒对照组延长了约 13 天，约增加了 30% (图 1B)。该结果表明纤溶酶原能够延长 ALS 小鼠寿命和中位生存期。

实施例 2 纤溶酶原改善 ALS 模型小鼠神经肌肉功能

取 16 周龄 SOD1-G93A 雄性小鼠 9 只，根据体重将小鼠随机分为两组，溶媒对照组 5 只和给纤溶酶原组 4 只，溶媒对照组小鼠尾静脉注射 0.1ml/天溶媒 (PBS, pH7.4)，给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射 1mg/0.1ml/只/天纤溶酶原，连续给药 34 天，开始给药定为第 0 天，于给药第 6、8、12、16、21、23、27、30、34 天如下进行悬挂抓力测试，考察纤溶酶原对于 ALS 模型小鼠神经肌肉功能的药效作用，并且如下统计分析 ALS 小鼠神经行为学表现。

悬挂抓力测试

悬挂实验一般用以评价小鼠运动能力 (肌力)。单只小鼠放在鼠笼的金属笼盖上，轻轻晃动笼盖使小鼠抓住笼盖，翻转笼盖，记录小鼠两后肢松开的潜伏时间^[5]。每只小鼠做 3 次实验，单次实验最长持续时间为 90s，每只小鼠最长的潜伏时间进入统计分析。

结果显示，给药期间虽然两组小鼠悬挂潜伏时间均减少，但给纤溶酶原组小鼠悬挂潜伏时间始终长于溶媒对照组小鼠，且给药第 6、21、23 天，给纤溶酶原组悬挂潜伏时间与溶媒组相比，统计差异显著或极为显著，P 值分别为 0.03、0.02、0.008 (图 2)。说明纤溶酶原能够延缓 ALS 小鼠肌力减退。

ALS 运动障碍表征评分，0 分：没有运动功能障碍的迹象；1 分：在尾悬挂期间，后肢出现明显的震颤；2 分：步态异常，步行 75cm 距离期间脚趾至少 2 次卷曲，或者腿部沿着笼底拖动；3 分：至少 1 天后肢出现拖曳，僵硬无力 (刚性瘫痪)，腿不能用于向前运动；4 分：小鼠置为仰卧位，30s 内不能翻身为俯卧位 (判定为濒死状态)^[5]。

结果显示，给纤溶酶原组小鼠出现评分为 2 分的神经表现的时间点明显晚于溶媒对照组，且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$) (图 3)。

以上结果表明，纤溶酶原能够显著延缓 ALS 疾病肌力减退，延缓 ALS 疾病进展。

实施例 3 纤溶酶原减缓 ALS 模型小鼠体重的降低

取周龄相近野生型小鼠 20 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 29 只，雌性 SOD1-G93A 小鼠 31 只。野生型小鼠作为空白对照组 (不做任何给药处理)，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每

只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒对照组和给纤溶酶原组，其中溶媒对照组小鼠 32 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给纤溶酶原组 28 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药 35 天。开始给药定为第 0 天，给药期间每 3 天测量一次体重，考察纤溶酶原对 ALS 模型小鼠体重下降的影响。

ALS 通常伴有明显的体重减轻，是 ALS 的主要特征之一^[5]。每次体重测量结果用第 0 天体重进行标准化处理，即：每次体重测定值/第 0 天体重*100。

结果显示，给药期间，空白对照组小鼠体重波动不大，有逐渐上升趋势；溶媒对照组小鼠体重逐渐下降；给纤溶酶原组小鼠体重前 25 天虽然波动较大，但均接近或略大于空白对照组体重，25 天后体重渐呈降低趋势，但始终大于溶媒对照组小鼠体重，且与溶媒对照组相比，P 值小于或接近 0.001（图 4）。说明纤溶酶原可以显著缓解 ALS 模型小鼠体重下降的速度，延缓 ALS 病情的恶化。

实施例 4 纤溶酶原减少 ALS 模型小鼠脊髓前角空泡面积

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给药组 4 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材脊髓于福尔马林固定液中固定。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次，以苏木素染液染色 10min 后，流水冲洗 5min，1%盐酸乙醇分化 10 秒，流水冲洗 10 分钟，0.2%伊红染液 10 秒，梯度脱水透明并封片。切片在 400 倍光学显微镜下观察。

脊髓前角运动神经元变性和死亡是 ALS 主要病理特征之一^[6]。结果显示，空白对照（图 5A）小鼠脊髓前角呈现出一定水平的空泡面积，溶媒组（图 5B）小鼠脊髓前角空泡面积明显大于空白对照（ $P < 0.001$ ），给药组（图

5C)小鼠脊髓前角空泡面积明显低于溶媒组,且统计差异极为显著(图 5D)。提示纤溶酶原能够减少 ALS 模型小鼠脊髓前角空泡面积,减少脊髓前角运动神经元的死亡。

实施例 5 纤溶酶原促进 ALS 模型小鼠脊髓前角乙酰胆碱转移酶的表达

5 取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组, SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录,记录每只小鼠发病时间,发病 14 天后开始给药,所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组,其中溶媒组小鼠 5 只,每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒(10mM 柠檬酸钠缓冲液, pH7.4); 给药组 4 只,每天尾静脉
10 注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原, SPF 环境下连续给药,濒死时取材,最长给药 61 天。取材脊髓于福尔马林固定液中固定。固定后组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m,切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织,以 3%双氧水孵育 15 分钟, 0.01MPBS 洗 2 次,每次 5 分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭 30 分钟;
15 时间到后,弃除羊血清液,滴加兔源抗乙酰胆碱转移酶抗体(ab178850, Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.01M PBS 洗 2 次,每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时, 0.01M PBS 洗 2 次,每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗 3 次后苏木素复染 30 秒,流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树脂胶封
20 片,切片在 400 倍光学显微镜下观察。

乙酰胆碱转移酶(chAT)是胆碱能神经元的标志酶,在神经细胞内合成。研究显示 ALS 动物模型动物脊髓运动神经元和患者体内 chAT 水平降低^[7,8]。

结果显示,空白对照(图 6A)小鼠脊髓前角表达一定量的 chAT,溶媒组(图 6B)小鼠 chAT 表达水平明显低于空白对照组小鼠,给药组(图 6C)小鼠脊髓前角 chAT 的表达明显高于溶媒组小鼠,统计学差异显著(P<0.05)(图 6D)。提示 TP01HN106 能够促进 SOD1-G93A 小鼠脊髓前角 chAT 的合成与表达,促进胆碱能神经元功能恢复。

实施例 6 纤溶酶原促进 ALS 模型小鼠脊髓前角突触素的表达

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给药组 4 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材脊髓于福尔马林固定液中固定。固定后组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔源抗突触素抗体(17785-1-AP, Proteintech) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体 (Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树脂封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

突触素(synaptophysin)是突触前膜上的磷酸化蛋白，是轴突生长和突触形成的标志，与突触可塑性密切相关。ALS 模型小鼠在在临床症状出现前出现明显的突触变性和运动神经元胞体丢失^[9]。

结果显示，空白对照组（图 7A）小鼠脊髓前角表达一定水平的突触素，溶媒组（图 7B）小鼠突触素的表达水平明显低于空白对照小鼠，给药组（图 7C）小鼠脊髓前角突触素的表达明显高于溶媒组小鼠，且统计差异显著（ $P<0.05$ ）（图 7D）。提示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角突触素的表达，促进突触损伤修复。

25 实施例 7 纤溶酶原促进 ALS 模型小鼠脊髓前角炎症修复

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给药组 4 只，每天尾静脉

注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材脊髓于福尔马林固定液中固定。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3% 双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，
5 每次 5 分钟。5% 的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔源抗 Iba-1(ab178847, Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗
10 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

离子钙接头蛋白-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 是中枢神经系统中的小胶质细胞表面标志物。小胶质细胞做为中枢神经系统中的免疫细胞，在其病变或者损伤时快速感测神经障碍并被活化。活
15 化的小胶质细胞在数量与形态上有显著的变化并迁移到损伤部位，发挥多种功能，例如吞噬死细胞、促炎性细胞因子产量增加等^[10]。

结果显示，空白对照组 (图 8A) 小鼠脊髓前角表达一定水平的 Iba-1，给药组 (图 8C) 小鼠脊髓前角 Iba-1 的表达水平明显高于溶媒组 (图 8B) 和空白对照组小鼠，且统计差异显著 ($P < 0.05$ 或 0.01) (图 8D)。提
20 示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角炎症修复。

实施例 8 纤溶酶原改善 ALS 模型小鼠肌肉萎缩

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发
25 病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒 (10mM 柠檬酸钠缓冲液, pH7.4)；给药组 4 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材腓肠肌于福尔马林固定液中固定。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1
30 次，以苏木素染液染色 10min 后，流水冲洗 5min，1% 盐酸乙醇分化 10

秒，流水冲洗 10 分钟，0.2%伊红染液 10 秒，梯度脱水透明并封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示，空白对照组（图 9A）小鼠腓肠肌肌纤维结构完整，形态大小比较均一，而溶媒组（图 9B）腓肠肌肌纤维出现严重的萎缩现象，并有局部炎症细胞浸润（红色箭头），肌纤维圆性变，给药组（图 9C）肌纤维萎缩现象相比溶媒组较轻，但也有炎症细胞浸润的现象。提示纤溶酶原能够改善模型小鼠肌肉萎缩。

实施例 9 纤溶酶原改善 ALS 模型小鼠肌肉萎缩

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。野生型小鼠作为空白对照组，SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给药组 4 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材臀肌于福尔马林固定液中固定。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次，以苏木素染液染色 10min 后，流水冲洗 5min，1%盐酸乙醇分化 10 秒，流水冲洗 10 分钟，0.2%伊红染液 10 秒，梯度脱水透明并封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示，空白对照组（图 10A）小鼠肌纤维结构比较完整，形态大小比较均一。溶媒组（图 10B）小鼠臀肌的肌纤维有圆性变，大小不一，萎缩严重，伴有炎性细胞浸润，给药组（图 10C）小鼠臀肌肌纤维结构形态相比溶媒组有一定程度的恢复。提示纤溶酶原能够改善 ALS 模型小鼠肌肉萎缩。

实施例 10 纤溶酶原促进 ALS 模型小鼠脊髓前角 SMN 蛋白的表达

取周龄相近野生型雄性小鼠 5 只和雄性 SOD1-G93A 小鼠 9 只。SOD1-G93A 小鼠从第 14 周发病后腿颤抖时开始观察记录，记录每只小鼠发病时间，发病 14 天后开始给药，所有小鼠根据发病情况随机分成溶媒组和给药组，其中溶媒组小鼠 5 只，每天尾静脉注射 0.1ml/只溶媒（10mM 柠檬酸钠缓冲液，pH7.4）；给药组 4 只，每天尾静脉注射 1mg/0.1ml/只纤溶酶原，

SPF 环境下连续给药，濒死时取材，最长给药 61 天。取材脊髓于福尔马林固定液中固定。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔源抗 SMN 抗体(Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树脂胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

运动神经元存活（Survival Motor Neuron，SMN）蛋白研究显示 SOD1-ALS 模型运动神经元存活（Survival Motor Neuron，SMN）蛋白水平降低，且增加 SMN 蛋白可改善疾病表型^[11]。

结果显示，给药组（图 11B）小鼠脊髓前角 SMN 蛋白的表达水平明显高于溶媒组（图 11A）。提示纤溶酶原能够促进模型小鼠脊髓前角 SMN 蛋白的表达。

参考文献

- [1] KENNETH C. 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.
- [2] 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.
- [3] HAGAN JJ, ABLONDI FB, DE RENZO EC. Purification and biochemical properties of human plasminogen. *J Biol Chem.* 1960 Apr;235:1005-10.
- [4] Dobrowolny, G. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 168(2):193-199.
- [5] Weydt P, Hong S Y, Klot M, et al. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS.[J]. *Neuroreport*, 2003, 14(7):1051-4.
- [6] L. M. Murray, K. Talbot, T. H. Gillingwater. Review: Neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy[J]. *neuropathology & applied neurobiology*, 2010, 36(2):133-156.
- [7] Michael L. Berger, Mario Veitl, Susanne Malessa et al. Cholinergic markers in ALS spinal cord[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 1992, 108(1):114.

[8] Jordan K, Murphy J , Singh A , et al. Astrocyte-Mediated Neuromodulatory Regulation in Preclinical ALS: A Metadata Analysis[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12.

5 [9] L. M. Murray, K. Talbot, T. H. Gillingwater. Review: Neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy[J]. *neuropathology & applied neurobiology*, 2010, 36(2):133-156.

[10]Min, Kyoung-Jin, Yang, Myung-Soon, et al. Protein kinase A mediates microglial activation induced by plasminogen and gangliosides [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2004, 36(5):461-467.

10 [11] L. M. Murray, K. Talbot, T. H. Gillingwater. Review: Neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy [J]. *neuropathology & applied neurobiology*, 2010, 36(2):133-156.

权 利 要 求 书

1. 一种治疗肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的方法, 包括给药患肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的受试者治疗有效量的纤溶酶原途径激活剂。
- 5 2. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂对所述患肌萎缩侧索硬化 (ALS) 的受试者具有选自如下的一种或多种活性: 延长寿命和中位生存期、延缓肌肉萎缩和肌力减退、减缓体重下降的速度、减轻脊髓前角细胞损伤、变性和坏死、促进脊髓前角 chAT 的合成、促进胆碱能神经元功能恢复、促进脊髓前角突触素表达、脊髓前角 SMN 蛋白表达、促进脊髓前角炎症修复、促进突触损伤修复。
- 10 3. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌肉萎缩、肌力减退、痉挛和/或肌束震颤症状。
4. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂减轻受试者的体重下降和/或延长生存期。
- 15 5. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂改善受试者的肌张力。
6. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的肌肉功能恢复。
7. 权利要求 1 的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂促进受试者的脊髓前角神经元损伤修复。
- 20 8. 权利要求 1-7 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂与一种或多种其它药物和/或治疗方法联合施用。
9. 权利要求 1-8 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂通过静脉内、皮下、肌肉内、鞘内、鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液形式给药。
- 25 10. 权利要求 1-9 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原途径激活剂为纤溶酶原激活途径的组分。
11. 权利要求 10 的方法, 所述纤溶酶原激活途径的组分为纤溶酶原。
12. 权利要求 11 的方法, 其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性, 并且仍然具有纤溶酶原活性。
- 30

13. 权利要求 11 的方法，所述纤溶酶原为纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的蛋白质。

14. 权利要求 11 的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

15. 权利要求 11 的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性和/或赖氨酸结合活性的变体或片段。

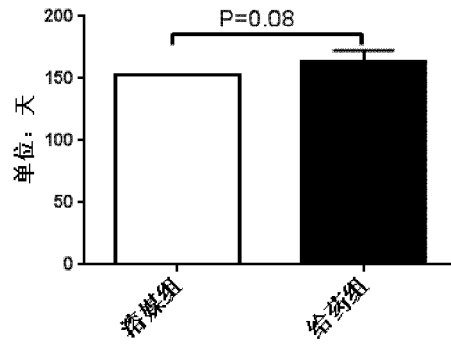


图 1A

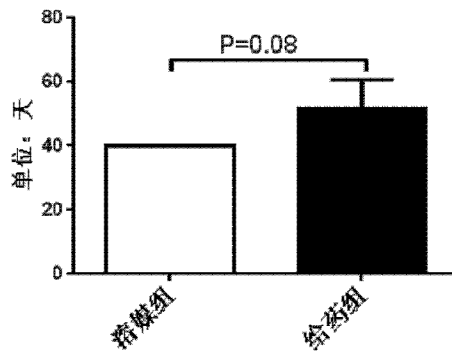


图 1B

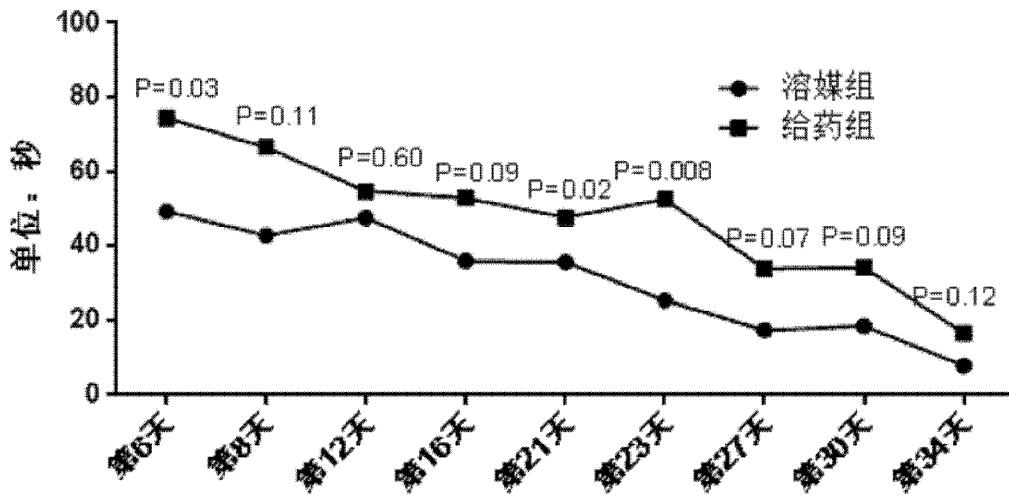


图 2

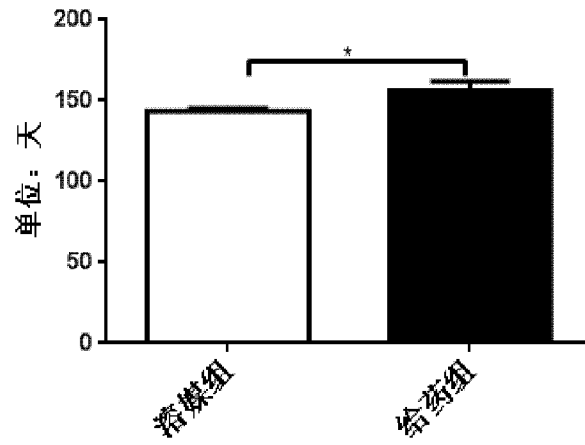


图 3

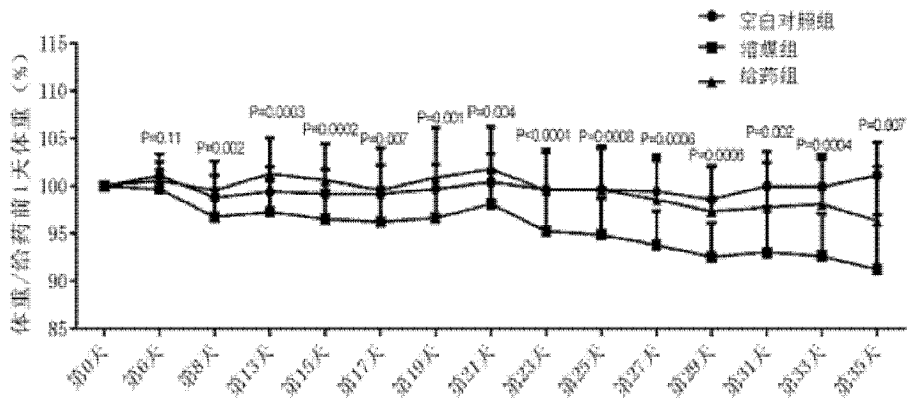


图 4

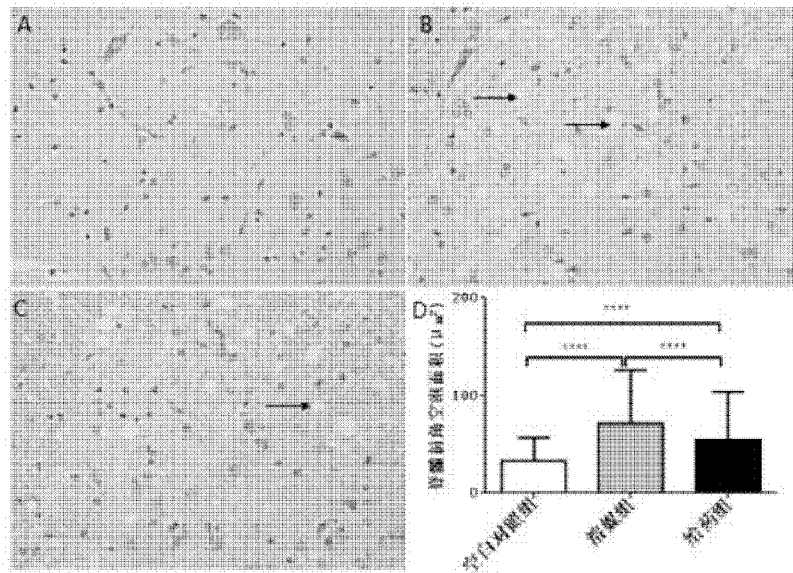


图 5

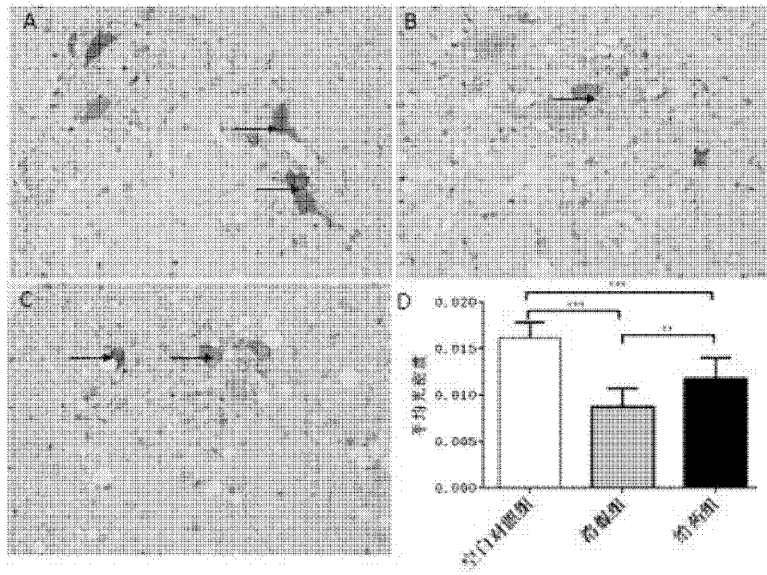


图 6

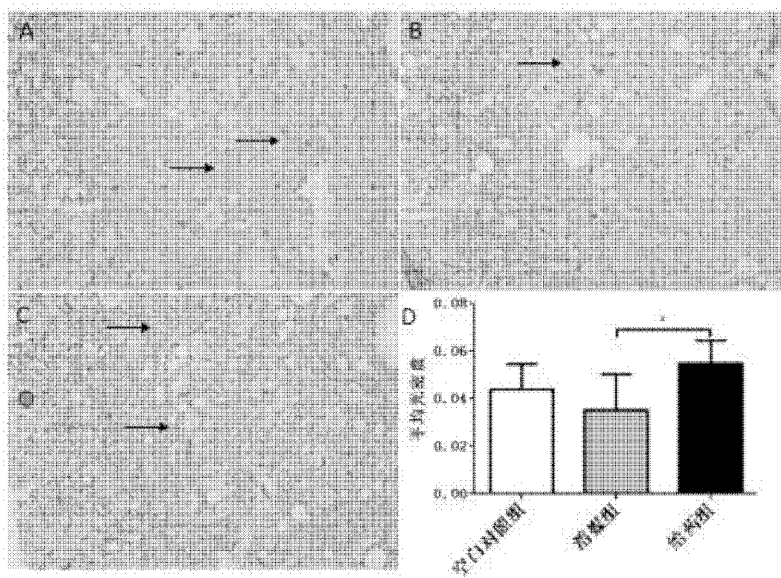


图 7

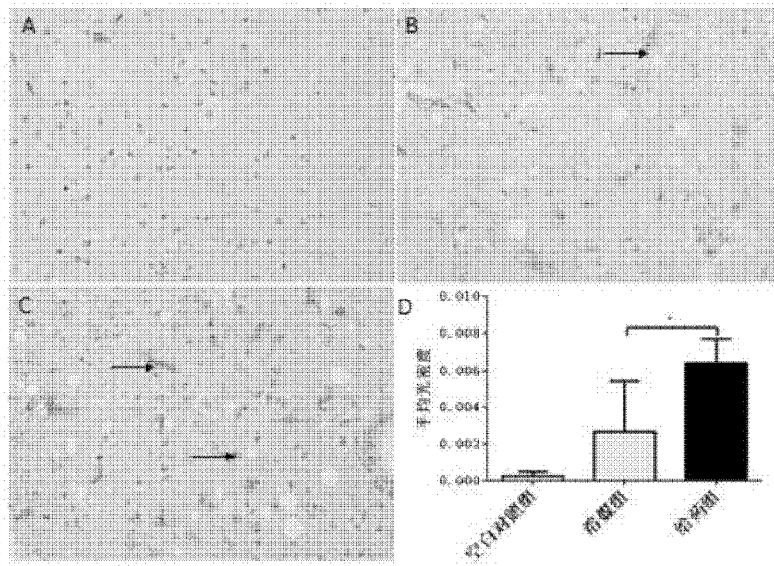


图 8

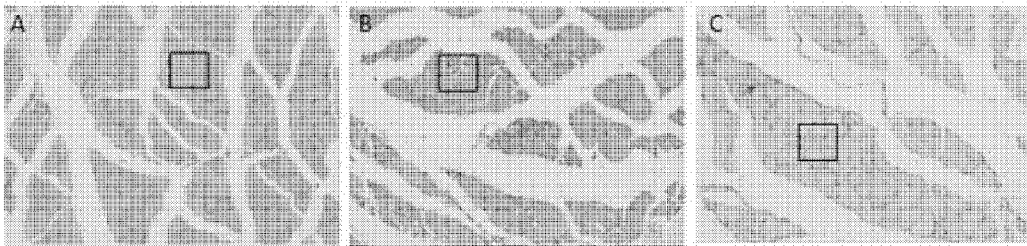


图 9



图 10

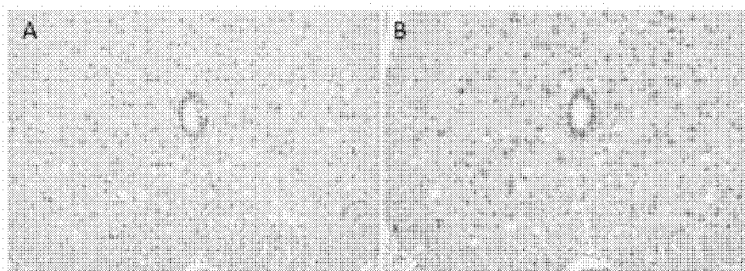


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/089632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/49(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, Baidu Xueshu Search, WEB OF SCIENCE, PubMed, GenBank, 中国生物序列检索数据库, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 肌萎缩侧索硬化, 纤溶酶原激活剂, 纤溶酶原, 纤溶酶, 治疗, 组合物, 试剂盒, Glu-纤溶酶原, Lys-纤溶酶原, 小纤溶酶原, 微纤溶酶原, delta-纤溶酶原, amyotrophic lateral sclerosis, ALS, proteolytic enzyme, plasminogen activator, plasmin, composition, kit, SEQ ID NOS: 1-14		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009146178 A1 (HARVARD COLLEGE et al.) 03 December 2009 (2009-12-03) see claims	1-15
X	WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 12 April 2001 (2001-04-12) see claims, and description, pages 2 and 13-17	1-15
X	WO 2010124185 A1 (UNIVERSITY OF CINCINNATI et al.) 28 October 2010 (2010-10-28) see claims	1-15
X	WO 2012145428 A2 (WASHINGTON UNIVERSITY et al.) 26 October 2012 (2012-10-26) see claims	1-15
A	US 2004203101 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC. et al.) 14 October 2004 (2004-10-14) see entire document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 August 2020		Date of mailing of the international search report 21 August 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/089632

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011086894 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 14 April 2011 (2011-04-14) see entire document	1-15
A	M. Flint Beal. "The Urokinase System of Plasminogen Activator Plays a Role in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Pathogenesis" <i>Experimental Neurology</i> , Vol. 211, No. 2, 14 March 2008 (2008-03-14), pp. 332 and 333	1-15
A	WO 2009036336 A2 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION et al.) 19 March 2009 (2009-03-19) see entire document	1-15
A	CN 102482338 A (THROMBOGENICS NV) 30 May 2012 (2012-05-30) see entire document	1-15

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **1-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The in vivo method according to claims 1-15 relates to a method of treatment of the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)), however, a search is still made by the examiner on the basis of the use of a plasminogen pathway activator in the preparation of a medicine for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/089632

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009146178	A1	03 December 2009	US	2011016141	A1	20 January 2011
				US	2011078804	A1	31 March 2011
WO	0124784	A2	12 April 2001	WO	0124784	A3	10 May 2002
				JP	2003510351	A	18 March 2003
				EP	1223969	A2	24 July 2002
WO	2010124185	A1	28 October 2010	EP	2421367	A1	29 February 2012
				US	2012128654	A1	24 May 2012
				EP	2421367	A4	23 May 2012
WO	2012145428	A2	26 October 2012	WO	2012145428	A3	17 January 2013
				US	2014377319	A1	25 December 2014
US	2004203101	A1	14 October 2004	US	7235529	B2	26 June 2007
US	2011086894	A1	14 April 2011	US	8465727	B2	18 June 2013
				US	2013280733	A1	24 October 2013
WO	2009036336	A2	19 March 2009	US	2012115173	A1	10 May 2012
				US	2009104639	A1	23 April 2009
CN	102482338	A	30 May 2012	US	2012114630	A1	10 May 2012
				IL	217113	D0	29 February 2012
				RU	2564131	C2	27 September 2015
				US	9226953	B2	05 January 2016
				AU	2010270146	B9	02 April 2015
				MX	2012000475	A	26 March 2012
				HK	1167265	A1	28 July 2017
				JP	2012532596	A	20 December 2012
				WO	2011004011	A1	13 January 2011
				NZ	597452	A	25 October 2013
				JP	5819293	B2	24 November 2015
				AU	2010270146	A1	02 February 2012
				CN	102482338	B	28 September 2016
				KR	20120050442	A	18 May 2012
				ZA	201200191	B	26 September 2012
				CA	2767612	A1	13 January 2011
				EP	2451835	A1	16 May 2012
RU	2012103949	A	20 August 2013				
AU	2010270146	B2	05 February 2015				

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 38/49(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed, GenBank, 中国生物序列检索数据库: 肌萎缩侧索硬化, 纤溶酶原激活剂, 纤溶酶原, 纤溶酶, 治疗, 组合物, 试剂盒, Glu-纤溶酶原, Lys-纤溶酶原, 小纤溶酶原, 微纤溶酶原, delta-纤溶酶原, amyotrophic lateral sclerosis, ALS, proteolytic enzyme, plasminogen activator, plasmin, composition, kit, SEQ ID NOs: 1-14</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2009146178 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2009年 12月 3日 (2009 - 12 - 03) 参见权利要求书</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO等) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 参见权利要求书, 说明书第2, 13-17页</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010124185 A1 (UNIV CINCINNATI等) 2010年 10月 28日 (2010 - 10 - 28) 参见权利要求书</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2012145428 A2 (UNIV WASHINGTON等) 2012年 10月 26日 (2012 - 10 - 26) 参见权利要求书</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004203101 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC等) 2004年 10月 14日 (2004 - 10 - 14) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011086894 A1 (UNIV PITTSBURGH) 2011年 4月 14日 (2011 - 04 - 14) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2009146178 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2009年 12月 3日 (2009 - 12 - 03) 参见权利要求书	1-15	X	WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO等) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 参见权利要求书, 说明书第2, 13-17页	1-15	X	WO 2010124185 A1 (UNIV CINCINNATI等) 2010年 10月 28日 (2010 - 10 - 28) 参见权利要求书	1-15	X	WO 2012145428 A2 (UNIV WASHINGTON等) 2012年 10月 26日 (2012 - 10 - 26) 参见权利要求书	1-15	A	US 2004203101 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC等) 2004年 10月 14日 (2004 - 10 - 14) 参见全文	1-15	A	US 2011086894 A1 (UNIV PITTSBURGH) 2011年 4月 14日 (2011 - 04 - 14) 参见全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	WO 2009146178 A1 (HARVARD COLLEGE等) 2009年 12月 3日 (2009 - 12 - 03) 参见权利要求书	1-15																					
X	WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO等) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 参见权利要求书, 说明书第2, 13-17页	1-15																					
X	WO 2010124185 A1 (UNIV CINCINNATI等) 2010年 10月 28日 (2010 - 10 - 28) 参见权利要求书	1-15																					
X	WO 2012145428 A2 (UNIV WASHINGTON等) 2012年 10月 26日 (2012 - 10 - 26) 参见权利要求书	1-15																					
A	US 2004203101 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES INC等) 2004年 10月 14日 (2004 - 10 - 14) 参见全文	1-15																					
A	US 2011086894 A1 (UNIV PITTSBURGH) 2011年 4月 14日 (2011 - 04 - 14) 参见全文	1-15																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 8月 21日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>魏春宝</p> <p>电话号码 62411028</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	M. Flint Beal. "The urokinase system of plasminogen activator plays a role in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathogenesis" Experimental Neurology, 第211卷, 第2期, 2008年 3月 14日 (2008 - 03 - 14), 第332-333页	1-15
A	WO 2009036336 A2 (UNIV PITTSBURGH等) 2009年 3月 19日 (2009 - 03 - 19) 参见全文	1-15
A	CN 102482338 A (斯路姆基因公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 参见全文	1-15

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 1-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求1-15涉及的体内方法属于人体/动物体上实施的治疗方法（PCT实施细则39.1 (iv)），但审查员还是基于纤溶酶原途径激活剂在制备治疗肌萎缩侧索硬化(ALS)的药物中的应用进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/089632

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2009146178	A1	2009年 12月 3日	US	2011016141	A1	2011年 1月 20日
				US	2011078804	A1	2011年 3月 31日
WO	0124784	A2	2001年 4月 12日	WO	0124784	A3	2002年 5月 10日
				JP	2003510351	A	2003年 3月 18日
				EP	1223969	A2	2002年 7月 24日
WO	2010124185	A1	2010年 10月 28日	EP	2421367	A1	2012年 2月 29日
				US	2012128654	A1	2012年 5月 24日
				EP	2421367	A4	2012年 5月 23日
WO	2012145428	A2	2012年 10月 26日	WO	2012145428	A3	2013年 1月 17日
				US	2014377319	A1	2014年 12月 25日
US	2004203101	A1	2004年 10月 14日	US	7235529	B2	2007年 6月 26日
US	2011086894	A1	2011年 4月 14日	US	8465727	B2	2013年 6月 18日
				US	2013280733	A1	2013年 10月 24日
WO	2009036336	A2	2009年 3月 19日	US	2012115173	A1	2012年 5月 10日
				US	2009104639	A1	2009年 4月 23日
CN	102482338	A	2012年 5月 30日	US	2012114630	A1	2012年 5月 10日
				IL	217113	D0	2012年 2月 29日
				RU	2564131	C2	2015年 9月 27日
				US	9226953	B2	2016年 1月 5日
				AU	2010270146	B9	2015年 4月 2日
				MX	2012000475	A	2012年 3月 26日
				HK	1167265	A1	2017年 7月 28日
				JP	2012532596	A	2012年 12月 20日
				WO	2011004011	A1	2011年 1月 13日
				NZ	597452	A	2013年 10月 25日
				JP	5819293	B2	2015年 11月 24日
				AU	2010270146	A1	2012年 2月 2日
				CN	102482338	B	2016年 9月 28日
				KR	20120050442	A	2012年 5月 18日
				ZA	201200191	B	2012年 9月 26日
				CA	2767612	A1	2011年 1月 13日
				EP	2451835	A1	2012年 5月 16日
				RU	2012103949	A	2013年 8月 20日
				AU	2010270146	B2	2015年 2月 5日