

(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
2018 年 6 月 21 日 (21.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/107700 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/48 (2006.01) **A61P 13/12** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089060

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 19 日 (19.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2016/110169
2016 年 12 月 15 日 (15.12.2016) CN
PCT/CN2016/110174
2016 年 12 月 15 日 (15.12.2016) CN

(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, 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)。

本国际公布:

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

(71) 申请人: 深圳瑞健生命科学研究院有限公司 (TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES, CO. LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市罗湖区田贝三路 12 号 510 室, Guangdong 518020 (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 1902 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING AND TREATING PATHOLOGICAL RENAL TISSUE INJURY

(54) 发明名称: 一种预防和治疗病理性肾组织损伤的方法

(57) Abstract: A method for preventing and/or treating renal tissue injury of a subject, comprising administering an effective amount of plasminogen to a subject. The subject is at the risk of suffering renal tissue injury, is suspected to suffer renal tissue injury, or suffers renal tissue injury. Also provided are a drug, a pharmaceutical composition, a product, and a kit comprising plasminogen and used for preventing and/or treating renal tissue injury and related diseases thereof of a subject.

(57) 摘要: 一种预防和/或治疗受试者肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原, 其中该受试者有肾组织损伤风险、怀疑有肾组织损伤、或罹患肾组织损伤。还提供了在用于预防和/或治疗受试者肾组织损伤及其相关病症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。



WO 2018/107700 A1

一种预防和治疗病理性肾组织损伤的方法

技术领域

本发明涉及纤溶酶原在预防和治疗肾脏病变方面的作用，进而为治疗不同原因导致的肾脏病变及其相关病症提供全新的治疗策略。

发明背景

肾脏病变是各种原因引起的肾脏结构变化和功能障碍。肾脏病变导致肾组织结构的损伤，继而影响其功能。肾脏病变可以是原发的，例如感染、炎症、变态反应等引发的肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾小球硬化、肾小球系膜增生、肾小管间质病变、肾小管萎缩等；也可以继发于其它疾病，例如可以由于缺血、代谢紊乱，例如糖代谢、脂肪代谢紊乱、肿瘤等其他疾病导致肾脏病变。

例如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等疾病常伴有肾脏病变。高血压是常见的慢性疾病之一，该病的主要表现为体循环动脉压增高，如果对高血压患者的血压控制不好，容易发生脑卒中、冠心病、视网膜病变以及慢性肾脏疾病等并发症。并且长时间的高血压可以使越来越多的组织器官受到影响。所以要加强和预防高血压及高血压的并发症，从而降低高血压带来的危害^[1]。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)，是糖尿病常见的重要并发症，是糖尿病致死、致残的主要原因。如诊治不及时，DN发展到肾病末期时，将只能采用透析甚至是肾移植。DN早期的主要病理特征是肾小球肥大，肾小球和肾小管基底膜增厚及系膜区细胞外基质的进行性积聚；后期为肾小球、肾小管间质纤维化。临床上早期可表现为肾小球滤过率减少，然后出现微量白蛋白尿、动脉血压升高、蛋白尿和体液潴留，最终导致肾衰竭^[2]。

糖尿病肾病属糖尿病微血管并发症，其发生与高血糖、氧化应激等因素相关，其中高血糖是产生微量白蛋白尿的重要因素^[3]。尿微量白蛋白可以预示糖尿病肾病的进展。而糖尿病动脉粥样硬化属于糖尿病大血管并发症，与高血糖、血管内皮功能紊乱、胰岛素抵抗等因素密切相关。近年有研究发现，蛋白尿与动脉粥样硬化密切相关^[4]。

在发达国家，糖尿病肾病、高血压肾小动脉硬化已成为慢性肾脏病的主要原因。在中国，这两种疾病在各种病因中仍位居原发性肾小球肾炎之后，但近年也有明显增高趋势。

5 全身性变态反应疾病，例如系统性硬化症、系统性红斑狼疮、系统性血管炎、过敏性紫癜、多发性肌炎、血栓性微血管病等常常累及肾脏。

大部分药物及其代谢产物经肾脏排出体外，因而药物引起的肾损害发生率很高。研究显示药物导致急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN) 或急性间质性肾炎 (acute interstitial nephritis, AIN) 的发生率高达 18.3%，其中

10 抗生素肾损害的发生率达 36%^[5]。
抗感染类药物，例如氨基糖苷类氨基糖苷类抗生素广泛应用于革兰阴性细菌感染的治疗，然而肾毒性限制了其临床应用^[6]。

抗病毒制剂阿昔洛韦 (aciclovir, ACV) 是抗疱疹病毒的脱氧鸟苷的环状类似物。胃肠道外给予大剂量阿昔洛韦可导致 10%~48% 患者出现急性肾功能衰竭 (acute renal failure, ARF)，这可能由于阿昔洛韦在肾小管内沉积、发生毒性免疫反应或超敏反应等引起肾内梗阻所致^[7]。阿德福韦 (adefovir, ADV) 和齐多福韦 (cidofovir, CDV) 作为核苷类似物，在临床上则常用来治疗乙肝和艾滋病。其肾毒性发生时常表现为肾小管坏死和间质纤维化^[8]。

免疫抑制剂例如环孢素环孢素 (cyclosporine A, CsA) 作为免疫抑制剂广泛用于器官移植和自身免疫性疾病的治疗。据报道，约有 30% 接受 CsA 治疗的

20 患者会出现中到重度肾功能失调。其肾损伤机制是由于肾血管收缩和内皮细胞损伤引起缺血，以及 CsA 对肾小管上皮细胞的直接毒性作用^[9]。

抗肿瘤药物例如顺铂(cisplatin, Cis) 是一种细胞增殖抑制剂，广泛用于睾丸癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、骨癌和头颈癌等实体瘤的治疗中。Cis 的抗肿瘤效率高，但同时具有剂量依赖性的肾毒性等^[10]，主要表现为氮质血症、

25 多尿症和肾功能衰竭，以肾小球与肾小管均受损为特征。

非甾体类抗炎药例如乙酰水杨酸乙酰水杨酸 (acetylsalicylic acid, ASA) 是世界上应用最广泛的解热镇痛抗炎药。其用于解热镇痛的剂量很少引起不良反应，但长期大量用药时则较易出现副作用，表现为因氧化磷酸化解耦联而使钾离子从肾小管细胞外逸，导致缺钾、尿中尿酸排出过高；较大损害时，

30 可发生间质性肾炎、肾乳头坏死和肾功能减退^[11]。

天然产物活性成分例如马兜铃酸马兜铃酸 (aristolochic acid, AA) 作为马兜铃科植物来源的肾毒素, 它是著名的马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 的病因^[12]。AA 引起的肾脏损伤部位主要在肾小管, 引起细胞凋亡或死亡, 并抑制肾间质成纤维细胞增生, 导致肾小管萎缩及寡细胞性间质纤维化。

利尿剂是一类通过抑制肾小管对水、电解质的重吸收, 使尿量排出增多的药物。各种利尿剂均有潜在的肾毒性, 应用后均有引起肾损害的可能。利尿剂引起的肾毒性与该类药物的细胞毒作用、免疫反应、过敏反应和代谢紊乱等不良反应有关, 应尽量避免与肾毒性药物联用, 防止加重肾损害。此外, 还有多种药物可引起肾损伤, 如磺胺类药物常引起形成磺胺结晶阻塞输尿管引发梗阻性肾病^[13]。降脂药他汀类可引起横纹肌溶解, 继而导致肾小管坏死^[14]。

肾脏疾病发展到后期都会引起肾功能部分或者全部丧失, 即导致肾衰竭的病理状态。肾衰竭可分为急性肾衰竭及慢性肾衰竭, 急性肾衰竭的病情进展快速, 通常是因肾脏血流供应不足、肾脏因某种因素阻塞造成功能受损或是受到毒物的伤害, 引起急性肾衰竭的产生。而慢性肾衰竭主要原因为长期的肾脏病变, 随着时间及疾病的进行, 肾脏的功能逐渐下降, 造成肾衰竭的发生。

慢性肾功能衰竭是指各种肾脏疾病引起的缓慢进行性肾功能损害, 最后导致尿毒症和肾功能完全丧失, 引起一系列临床症状和生化内分泌等代谢紊乱组成的临床综合征, 从原发病起病到肾功能衰竭的开始, 间隔时间可为数年到十余年。

尿毒症是慢性肾功能衰竭的终末期。慢性肾功能衰竭是各种病因引起肾脏损害和进行性恶化的结果。常见的基础疾病有原发性肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎、糖尿病肾病等。其临床表现主要为肾功能减退, 代谢废物潴留, 水、电解质和酸碱平衡失调, 以至不能维持机体内环境的稳定, 根据肾功能损害的不同程度, 可以将慢性肾功能衰竭分为四个阶段: 肾功能不全代偿期、肾功能不全失代偿期、肾功能衰竭期、尿毒症期。

慢性肾功能不全的早期, 临床上仅有原发疾病的症状, 只在检查中可见到肌酐清除率下降。尿毒症代偿期的患者常在应激情况下, 肾功能突然恶化, 并出现水、电解质、酸碱代谢紊乱、蛋白质、糖类、脂肪和维生素代谢紊乱、

食欲不振或消化不良，病情加重时可出现厌食，恶心、呕吐或腹泻等胃肠道症状等尿毒症的早期症状，临床上称为可逆性尿毒症，一旦应激因素去除，肾功能常可恢复到代偿期。若病情发展到“健存”肾单位不能适应机体最低要求时，即使没有应激因素，尿毒症状也会逐渐表现出来，表现为水电解质代谢紊乱、体内代谢产物蓄积等全身症状以及心血管系统、呼吸系统、血液系统的中度症状。

慢性肾功能不全的药物治疗主要集中在缓解症状、延缓病程进展以及防治并发症三个方面，具体例如纠正酸中毒和水、电解质紊乱、治疗高血压、防治感染、治疗高脂血症，以及针对心血管系统、呼吸系统和血液系统并发症的治疗，同时可进行尿毒症的替代透析治疗，例如血液透析或腹膜透析，或者进行肾移植。

“急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)”是近年来提出的一个新名词，用于取代使用多年的急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)，并已获得广泛认可。它是一种常见的临床综合征，主要表现为肾功能的快速下降及代谢废物的蓄积。AKI发病率高，且呈逐年上升趋势。国外报道近10年来AKI的发病率从0.65%增长到5%，需要透析的AKI发病率为0.295%^[15-16]。住院患者AKI发生率为1.9%，重症监护病房则可高达60%^[17]。目前尚没有治疗AKI的特效药物，重症患者需要肾脏替代治疗^[18]。AKI的预后亦不容乐观，ATN和RENAL研究^[19-20]报道重症患者发生AKI后的病死率分别为53.0%和44.7%，且存活的患者也容易进展至慢性肾病乃至终末期肾病^[21]。因此，AKI越来越引起临床医师的重视。

对于各种原因导致的肾组织损伤，人们一直渴望寻找到更有效的治疗药物。本发明经过研究发现，纤溶酶原能够促进损伤的肾脏组织修复、肾功能的恢复，同时纤溶酶原还能抑制损伤的肾脏组织细胞凋亡、降低其纤维化。因此，纤溶酶原有望成为一种新型的肾脏疾病治疗药物。

发明概述

本发明涉及如下各项：

在一方面，本发明涉及：项1. 一种预防和/或治疗受试者肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原，其中所述受试者有肾组织损伤风险、怀疑有肾组织损伤、或罹患肾组织损伤。

项 2. 项 1 的方法, 其中所述肾组织损伤包括感染、炎症、变态反应、自身免疫、缺血、微血管病变、血栓、创伤、辐射损伤、糖代谢紊乱、电解质紊乱、脂肪代谢紊乱、癌症所致肾组织损伤。

5 项 3. 项 1 或 2 的方法, 其中所述肾组织损伤为选自如下的全身性疾病导致的肾组织损伤: 高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、系统性硬化症、系统性红斑狼疮、高脂血症、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、系统性血管炎、过敏性紫癜、多发性肌炎、血栓性微血管病。

项 4. 项 1 或 2 的方法, 其中所述肾组织损伤为慢性肾脏疾病导致的肾组织损伤。

10 项 5. 项 4 的方法, 其中所述慢性肾脏疾病为慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾衰或尿毒症。

项 6. 项 1 或 2 的方法, 其中所述慢性肾脏疾病为药物导致的慢性肾损伤。

15 项 7. 项 6 的方法, 其中所述药物包括化疗药物、降血压药物、降血脂药物、降血糖药物、非类固醇抗炎药物、抗生素药物、抗病毒药物。

项 8. 项 7 的方法, 其中所述药物为化疗药物, 具体为顺铂。

在另一方面, 本发明涉及: 项 9. 一种预防和/或治疗受试者急性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原保护肾组织。

20 项 10. 项 9 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻急性肾组织损伤所致的肾组织细胞凋亡。

项 11. 项 9 或 10 的方法, 其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

项 12. 项 9-11 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

项 13. 项 9-12 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

25 项 14. 项 1-13 任一项的方法, 其中所述肾损伤为急性肾小球肾炎、急性肾盂肾炎、急性肾损伤、急性肾功能衰竭、急性肾功能不全、急性肾小管坏死。

项 15. 项 1-13 的方法, 其中所述急性肾损伤为化疗药物导致的急性肾损伤。

30 在另一方面, 本发明涉及: 项 16. 一种预防和/或治疗受试者慢性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原保护肾组织。

项 17. 项 16 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

项 18. 项 16 或 17 的方法, 其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

项 19. 项 16-18 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

5 项 20. 项 16-19 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

项 21. 项 16-20 任一项的方法, 其中所述慢性肾损伤为肾脏组织的慢性疾病导致的肾组织损伤。

项 22. 项 16-20 任一项的方法, 其中所述慢性肾损伤为其它疾病引发或伴有的肾组织损伤。

10 项 23. 项 22 的方法, 其中所述其它疾病包括高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、高脂血症、肝炎、肝硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死。

项 24. 项 23 的方法, 其中所述其它疾病为高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、高脂血症。

15 在另一方面, 本发明涉及: 项 25. 一种预防和/或治疗受试者脂质沉积导致的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

项 26. 项 25 的方法, 其中所述脂质沉积是由于受试者脂肪代谢异常或糖代谢异常导致的高脂血症所致。

在另一方面, 本发明涉及: 项 27. 一种预防和/或治疗受试者糖尿病引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

20 在另一方面, 本发明涉及: 项 28. 一种预防和/或治疗受试者高脂血症引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

在另一方面, 本发明涉及: 项 29. 一种预防和/或治疗受试者动脉粥样硬化引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

25 在另一方面, 本发明涉及: 项 30. 一种预防和/或治疗受试者缺血性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

项 31. 项 30 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

项 32. 项 30 或 31 的方法, 其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

项 33. 项 30-32 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

30 项 34. 项 30-33 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

项 35. 项 30-34 任一项的方法, 其中所述缺血由血管管腔狭窄所致。

项 36. 项 30-34 任一项的方法, 其中所述缺血由血栓堵塞血管所致。

项 37. 项 35 或 36 的方法, 其中所述缺血由高血压、糖尿病、动脉粥样硬化, 心脏病所致。

5 在另一方面, 本发明涉及: 项 38. 一种预防和/或治疗受试者缺血再灌注性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

在另一方面, 本发明涉及: 项 39. 一种预防和/或治疗受试者自身免疫反应性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

项 40. 项 39 的方法, 其中所述自身免疫反应性肾组织损伤由系统性硬化症所致。

10 在另一方面, 本发明涉及: 项 41. 一种预防和/或治疗受试者炎症性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原

项 42. 项 41 的方法, 其中所述炎症为急慢性肾实质炎症或肾间质炎症。

项 43. 项 42 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

项 44. 项 42 或 43 的方法, 其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

15 项 45. 项 41-44 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

项 46. 项 41-45 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

20 项 47. 项 1-46 任一项的方法, 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。

项 48. 项 1-47 任一项的方法, 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, 并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

25 项 49. 项 1-48 任一项的方法, 所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

项 50. 项 1-49 任一项的方法, 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。

30 项 51. 根据项 1-50 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联合施用: 降血压药物、降血脂药物、抗生素药物、抗凝药

物、溶血栓药物、利尿药、抗肿瘤药、降血糖药、非甾体类抗炎药、免疫调节药物、抗感染药物、抗病毒药物、激素、天然产物活性成分。

项 52. 项 1-51 任一项的方法，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的变体或片段。

5 项 53. 项 1-51 任一项的方法，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的变体或片段。

项 54. 项 1-53 任一项的方法，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

项 55. 项 1-54 任一项的方法，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

10 项 56. 项 1-55 任一项的方法，其中所述受试者是人。

项 57. 项 1-26 任一项的方法，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

项 58. 项 57 的方法，其中所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

15 在另一方面，本发明涉及：项 59. 一种用于项 1-58 任一项的方法的纤溶酶原。

在另一方面，本发明涉及：项 60. 一种药物组合物，其包含药学上可接受的载剂和用于项 1-58 中任一项所述方法的纤溶酶原。

20 在另一方面，本发明涉及：项 61. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：
(i)用于项 1-58 中任一项所述方法的纤溶酶原和(ii)用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件(means)。

项 62. 根据项 61 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

项 63. 项 61 或 62 的试剂盒，其还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施项 1-58 中任一项所述方法。

25 在另一方面，本发明涉及：项 64. 一种制品，其包含：
含有标签的容器；和

包含(i)用于项 1-58 中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施项 1-58 中任一项所述方法。

30 项 65. 项 61-63 中任一项的试剂盒或项 64 的制品，还包含另外的一个或多个构件或容器，该构件或容器中含有其他药物。

项 66. 项 65 的试剂盒或制品, 其中所述其他药物选自下组: 降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物, 保肝药物, 抗心律失常药物, 强心药物, 利尿药物, 抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。

本发明还涉及纤溶酶原用于实施项 1-58 任一项的方法的用途。

本发明还涉及纤溶酶原在制备用于项 1-58 任一项的方法的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。

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, 优选通过以下途径施用: 静脉内、肌内、皮下给予纤溶酶原来进行治疗。在前述方法的一些实施方案中, 所述纤溶酶原与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。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、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, 优选至少重复一次, 优选至少每天施用。

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之间的组合, 该组合后的技术方案在本文中明确公开。

发明详述

“肾脏病变”是各种原因引起的肾脏结构和功能障碍。

“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 92kD, 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。 δ -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^[22, 23],有文献报道了 δ -纤溶酶原的氨基酸序列(序列 8)^[23],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)^[24],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)^[25],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“纤维蛋白溶酶原”、“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”的含义为受试者体内纤溶酶原的含量或活性比正常人低,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”的含义为受试者体内纤溶酶原的含量或活性显著低于正常人,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”是指在纤溶酶原蛋白中，能够与底物中的靶序列结合并发挥蛋白水解功能的活性片段。本发明涉及纤溶酶原的技术方案涵盖了用纤溶酶原活性片段代替纤溶酶原的技术方案。本发明所述的纤溶酶原活性片段为包含纤溶酶原的丝氨酸蛋白酶域的蛋白质，优选，本发明所述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。

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，受检血浆中的纤溶酶原在 SK 的作用下，转变成纤溶酶，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。

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。

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。

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：

$$\text{分数 } X/Y \text{ 乘 } 100$$

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”和“处理”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(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。

2. 本发明纤溶酶原的制备

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 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。

- 10 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。

- 20 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*)是可以用于克隆主题抗体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。
- 25 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, β -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。

- 30 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(例如编码主题抗-Tau 抗体的多核苷酸)。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, 除主题抗体以外的大分子, 等等。

3. 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)。优选冻干的抗-VEGF 抗体配制剂在 WO 97/04801 中描述，其包含在本文中作为参考。

- 5 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。

10 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)。

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。

- 15 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., 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利 3773919, EP 58, 481)，L-谷氨酸与 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, Biopolymers 22:547(1983))，不可降解的乙烯-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-(-)-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定。
- 20
- 25

4. 给药和剂量

- 30 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、鼻内、表面或皮内施用或脊髓或脑投递来实

现本发明药物组合物的施用。气溶胶制剂如鼻喷雾制剂包含活性剂的纯化的水性或其它溶液及防腐剂和等渗剂。将此类制剂调节至与鼻粘膜相容的 pH 和等渗状态。

5 在一些情况中，可以以下方式修饰或配制本发明的纤溶酶原药物组合物，从而提供其穿过血脑屏障的能力。可以通过各种肠内和胃肠外施用路径，包括口服、静脉内等对患有血栓和/或血栓相关疾病的个体施用此类纤溶酶原的组合物。

10 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。

15 在一些实施方案中，本发明的纤溶酶原与促进穿过血脑屏障的药剂配制在一起。在一些情况中，本发明的纤溶酶原直接或经接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些实施方案中，本发明的纤溶酶原与结合内源血脑屏障(BBB)受体的多肽融合。连接纤溶酶原与结合内源 BBB 受体的多肽，促进穿过 BBB。结合内源 BBB 受体的合适的多肽包括抗体，例如单克隆抗体，或其抗原结合片段，其特异性结合内源 BBB 受体。合适的内源 BBB 受体包括但不限于胰岛素受在一些情况中，抗体是囊封于脂质体中的。参见例如美国专利公开文本 No. 2009/0156498。

25 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例如每天约 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
30 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、定期评估血栓和血栓相关疾病的治疗效果和安全性。

5. 治疗效力

5 本发明的一个实施方案涉及使用纤溶酶原治疗受试者后，对治疗效力和治疗安全性的判断。其中临床上对治疗效力的判断方法包括但不限于检测如下指标，从而评估肾功能：血清肌酸酐水平、肌酸酐清除率、24-小时尿蛋白排出率(UAER)、肾小球滤过率、尿白蛋白/肌酸酐比例、白蛋白分泌率和肾脏活检等。例如，肾小球滤过率可以说明肾小球过度滤过和过度灌注的情况，指示糖尿病肾病早期症状缓解程度。肾小球滤过率是肾脏每分钟产生的滤液的体积，可用各种方法确定，如测量过滤标记物如聚糖、碘酞酸盐或碘海醇的尿清除率。更常用的方法是，可通过确定肌酸酐(一种由肌肉产生并释放到血液中的蛋白质)清除率来估算肾小球滤过率。肌酸酐清除率(通常表示为毫升/分钟)可通过比较给定时间(例如 12 或 24 小时)内尿液中收集的肌

10 酸酐水平和血液中的肌酸酐水平来确定。成年男性的典型肌酸酐清除率约为 97-137 毫升/分钟，成年女性约为 88-128 毫升/分钟。肌酸酐清除率与尿肌酸酐排泄成正比，与血清肌酸酐浓度成反比。

通常将肌酸酐清除率/肾小球滤过率或尿白蛋白排出率作为主要效力评估指标。同时可以增添其他次要指标以评估本发明药物对相关并发症的效力，

20 例如增加甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白等检测来评估血脂变化，增加治疗前后收缩压、舒张压水平检测来评估高血压状况缓解程度等。

6. 制品或药盒

本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒，其包含可用于治疗糖尿病肾病的本发明纤溶酶原。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

25 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。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糖尿病肾病和糖尿病肾病相关疾病。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，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

30

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。

附图简述

5 **图 1** 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 10 天后肾脏 HE 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C、D 为 $PLG^{-/-}$ 组。结果显示, $PLG^{-/-}$ 小鼠肾脏病变最严重, 可看见有大量的脓管型(粗箭头所示), 少量的嘌呤结晶(三角标识), 肾小管大面积萎缩, 上皮细胞扁平化; 与 $PLG^{-/-}$ 小鼠相比, 给溶媒 PBS 对照组小鼠肾脏损伤较轻, 虽然肾小球
10 萎缩和肾小管坏死仍然严重, 但未发现明显的嘌呤结晶, 脓管型相对较轻; 给纤溶酶原组小鼠肾小管萎缩的面积比 PBS 对照组小, 肾小管扩张也较之轻, 未发现脓管型。说明纤溶酶原可减轻慢性肾衰竭模型小鼠肾脏的损伤。

图 2 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 10 天后肾脏天狼星红染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C 为 $PLG^{-/-}$
15 组, D 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组的胶原的沉积明显少于 $PLG^{-/-}$ 组, 且统计差异显著(*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$)。此外, 给纤溶酶原组胶原的沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原在修复慢性肾衰模型的肾脏纤维化过程中起关键作用。

图 3 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 10 天后肾脏 Bcl-2
20 免疫组化染色代表性图片。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组肾脏阳性着色明显深于给溶媒 PBS 对照组, 并且与空白对照组小鼠的表达水平相近。这表明纤溶酶原能促进慢性肾衰竭模型小鼠肾脏细胞凋亡抑制分子 Bcl-2 的表达, 从而抑制小鼠肾脏组织细胞的凋亡。

25 **图 4** 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 10 天后肾脏 IgM 免疫组化染色图片。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠肾脏 IgM 的阳性着色浅于给溶媒 PBS 对照组, 并且范围较对照组小, 着色与正常小鼠更加接近。这表明给纤溶酶原后肾脏的损伤得到了明显的改善, 反映出纤溶酶原对慢性肾损伤小鼠肾脏
30 损伤有显著修复作用。

图 5 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 4 天后肾脏纤维蛋白免疫组化染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C 为 PLG^{-/-}组。结果显示, 给溶媒 PBS 对照组肾脏纤维蛋白的阳性着色深于给纤溶酶原组小鼠, 且 PLG^{-/-}组着色深于给溶媒 PBS 对照组。这表明纤溶酶原可减轻肾脏的损伤。

图 6 顺铂损伤模型小鼠给予纤溶酶原 7 天后肾脏 IgM 免疫染色观察结果。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组 IgM 阳性表达明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。说明纤溶酶原能促进顺铂所致肾脏损伤的修复。

图 7 顺铂损伤模型小鼠给予纤溶酶原 7 天后肾脏 IV 型胶原免疫染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组 IV 型胶原阳性表达明显低于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能改善顺铂所致的肾脏纤维化。

图 8 24-25 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后肾脏 IV 型胶原免疫染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组 IV 型胶原阳性着色明显浅于给溶媒 PBS 对照组, 说明纤溶酶原能改善糖尿病小鼠肾脏纤维化。

图 9 26 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后肾脏 masson 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给溶媒 PBS 对照组肾间质轻度纤维化, 增生的纤维化呈蓝色。给纤溶酶原组肾间质纤维化明显减少。说明纤溶酶原能降低糖尿病小鼠肾脏间质的纤维化。

图 10 博莱霉素诱导的系统性硬化症模型小鼠给予纤溶酶原 21 天后肾脏天狼星红染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 在博莱霉素诱导的系统性硬化症小鼠模型中, 给溶媒 PBS 对照组肾脏胶原沉积明显多于给纤溶酶原组。说明纤溶酶原有效降低系统性硬化症小鼠的肾脏纤维化。

图 11 嘌呤诱导慢性肾损伤小鼠血清尿素氮检测结果。结果显示, PLG^{+/+}组血清中尿素氮浓度明显低于 PLG^{-/-}组, 且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。说明纤溶酶原能显著改善慢性肾衰竭模型小鼠的肾功能。

图 12 嘌呤诱导的慢性肾损伤模型小鼠给予纤溶酶原 4 天后血清肌酐浓度检测结果。结果显示, 给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组血清中肌酐浓度明显低于 PLG^{-/-}组小鼠, 且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。此外, 给纤溶酶原组血清中肌酐浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能显著改善慢性肾损伤模型小鼠的肾功能。

图 13 叶酸诱导急性肾损伤小鼠血清尿素氮检测结果。结果显示, 给纤溶酶原组血清中尿素氮浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异接近显著 ($P = 0.06$)。说明纤溶酶原能显著改善急性肾损伤模型小鼠的肾功能。

图 14 给予纤溶酶原 30 天后 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏油红 O 染色观察结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠肾脏脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 且定量分析统计差异显著; 此外, 给纤溶酶原组脂质沉积水平与空白对照组小鼠相似。说明纤溶酶原能消减脂肪在高脂血症模型小鼠肾脏中的沉积, 从而减少脂肪沉积所致的肾脏损伤。

图 15 给予纤溶酶原 7 天后叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏 HE 染色代表性图片。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 空白对照组肾脏核呈圆形或椭圆形, 胞浆红染, 肾小球及肾小管均形态正常; 给溶媒 PBS 对照组肾脏观察到大量的肾小管上皮细胞扁平化(粗箭头标识), 刷状缘脱落, 部分细胞核固缩, 只有部分肾小管呈现淡染的胞浆, 部分肾小管还可见脓管型(细箭头标识), 肾小球及肾间质轻度的炎细胞浸润; 给纤溶酶原组与给溶媒 PBS 对照组相比, 肾小管扩张及上皮细胞扁平化明显好转, 可见大部分的肾小管胞浆呈现红染, 未见脓管型。说明纤溶酶能改善叶酸诱导的急性肾损伤。

图 16 给予纤溶酶原 7 天后叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏 Bcl-2 免疫组化观察结果。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组肾脏 Bcl-2 阳性着色明显多于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。这表明纤溶酶原能促进急性肾损伤模型小鼠肾脏中细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达, 从而保护急性肾损伤小鼠肾脏组织细胞免于凋亡。

图 17 给予纤溶酶原 7 天后叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏 IgM 免疫组化观察结果。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶

酶原组小鼠肾脏 IgM 的阳性着色比给溶媒 PBS 对照组浅，并且范围较对照组小。这表明注射纤溶酶原后肾脏 IgM 的表达明显降低，反映出纤溶酶原能有效减少叶酸急性肾损伤小鼠肾脏损伤。

图 18 给予纤溶酶原 30 天后 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏天狼星红染色观察结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为定量分析结果。结果显示，给纤溶酶原组肾脏胶原蛋白沉积（箭头标识）明显少于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著；给纤溶酶原组纤维化基本恢复到正常水平。说明纤溶酶原能有效的减少 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化。

图 19 给予纤溶酶原 7 天后缺血再灌注急性肾损伤模型小鼠肾脏 HE 染色代表性图片。A 为假手术组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，假手术组肾小球毛细血管通畅，肾小管胞浆红染，呈正常的肾小管形态；给溶媒 PBS 对照组可见肾小球轻度的炎细胞浸润（三角标识），肾间质大量的炎细胞浸润，部分肾小管呈现脓管型（细箭头标识），少量肾小管细胞核固缩，大面积的上皮细胞扁平化（粗箭头标识），肾小管扩张；相较于给溶媒 PBS 对照组，给纤溶酶原组只有少量的肾小管上皮扁平化，大部分的肾小管已经恢复正常肾小管形态，胞浆红染，未发现明显的肾小管萎缩，只有肾间质有轻度的炎细胞浸润，已接近假手术组形态。说明纤溶酶能改善缺血再灌注急性肾损伤模型小鼠肾脏损伤。

实施例

实施例 1 纤溶酶原对慢性肾损伤模型肾脏的保护作用

8-9 周龄的 $PLG^{+/+}$ 小鼠 20 只以及 $PLG^{-/-}$ 小鼠 6 只， $PLG^{+/+}$ 小鼠随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 10 只。给纤溶酶原组、给溶媒 PBS 对照组以及 $PLG^{-/-}$ 小鼠每天饲喂 0.25% 嘌呤饲料(南通特洛菲)，建立慢性肾损伤模型^[26]。造模当天记为第 1 天，同时开始给药。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS，连续造模给药 10 天， $PLG^{-/-}$ 小鼠不做处理。第 11 天处死小鼠取肾脏于 4% 的多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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，切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE 染色)，1% 盐酸酒精分化，氨水返蓝，并酒精梯度

脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，切片在 200（图 1A、B、C）、400(1D) 倍光学显微镜下观察。

结果显示，PLG^{-/-}小鼠肾脏（图 1C、1D）病变最严重，可观察到大量的脓管型（箭头所示），少量的嘌呤结晶（三角标识），肾小管大面积萎缩，上皮细胞扁平化；与 PLG^{-/-}小鼠相比，给溶媒 PBS 对照组小鼠肾脏（图 1A）损伤轻，尽管肾小球萎缩和肾小管坏死还很严重，但未发现明显的嘌呤结晶，脓管型相对较轻；给纤溶酶原组小鼠（图 1B）肾小管萎缩的面积比 PBS 对照组小，肾小管扩张也较之轻，未发现脓管型。说明纤溶酶原能修复慢性肾损伤模型小鼠肾脏的损伤。

实施例 2 纤溶酶原修复慢性肾损伤模型肾脏的纤维化

8-9 周龄雄性 PLG^{+/+}小鼠 12 只以及 PLG^{-/-}小鼠 6 只，PLG^{+/+}小鼠随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组各 6 只，慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，同时开始给药。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS，连续造模给药 10 天，PLG^{-/-}小鼠不做处理。第 11 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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 3μm，切片脱蜡至水后水洗 1 次，以 0.1%天狼星红染色 60 分钟后，流水冲洗，苏木素染色 1 分钟，流水冲洗，1%盐酸酒精和氨水分化返蓝，流水冲洗，烘干后封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

天狼星红染色可使胶原持久染色，作为病理切片特殊染色方法，天狼星红染色可以特异显示胶原组织。

结果显示，给纤溶酶原组（图 2B）和给溶媒 PBS 对照组（图 2A）胶原的沉积明显少于 PLG^{-/-}组（图 2C），且统计差异显著（图 2D）。此外，给纤溶酶原组胶原的沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原在修复慢性肾损伤模型的肾脏纤维化过程中起关键作用。

实施例 3 纤溶酶原促进慢性肾损伤小鼠肾脏的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达

8-9 周龄雄性 PLG^{+/+}小鼠 18 只，随机分为三组，空白对照组、给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 6 只。慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，同时开始给药。空白对照组饲喂正常维持饲料。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对

照组以相同方式给予相同体积的 PBS，连续造模给药 10 天，空白对照组小鼠组不做任何处理。开始造模给药定为第 1 天，第 11 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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，滴加兔抗小鼠 Bcl-2 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胶封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

Bcl-2 为细胞凋亡抑制蛋白，在凋亡刺激因子作用下表达下调^[27,28]。Bcl-2 免疫组化结果显示，给纤溶酶原组（图 3C）肾 Bcl-2 阳性着色明显深于给溶媒 PBS 对照组（图 3B），并且与空白对照组（图 3A）Bcl-2 阳性着色程度近似。这表明纤溶酶原能促进慢性肾损伤模型小鼠肾脏中细胞凋亡抑制分子 Bcl-2 的表达，从而有助于保护慢性肾损伤小鼠肾脏组织细胞免于凋亡。

实施例 4 纤溶酶原改善慢性肾损伤小鼠肾脏的局部损伤

8-9 周龄雄性 PLG^{+/+}小鼠 18 只，随机分为三组，空白对照组、给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 6 只。慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，同时开始给药，空白对照组饲喂正常维持饲料。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS，连续造模给药 10 天，空白对照组不做任何处理。第 11 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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，滴加山羊抗鼠 IgM（HRP）抗体（Abcam）室温孵育 1 小时，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。梯度脱水透明并封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

IgM 抗体在清除凋亡和坏死细胞过程中发挥着重要作用，损伤的组织器官局部 IgM 抗体的水平与损伤程度呈正相关^[29,30]。因此，检测组织器官局部

5 IgM 抗体的水平能够反映该组织器官的损伤程度。

结果显示，给纤溶酶原组（图 4C）小鼠肾脏 IgM 的阳性着色比给溶媒 PBS 对照组浅（图 4B），并且范围较对照组小，着色与空白对照小鼠（图 4A）非常接近。这表明注射纤溶酶原后肾小球的损伤得到了明显的改善，反映出纤溶酶原对慢性肾损伤小鼠肾脏损伤有显著修复作用。

10 实施例 5 纤溶酶原减少慢性肾损伤小鼠肾脏纤维蛋白的表达

8-9 周龄雄 PLG^{+/+}小鼠 12 只以及 PLG^{-/-}小鼠 6 只，PLG^{+/+}小鼠随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 6 只。慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，同时开始给药，造模给药周期 4 天，空白对照组饲喂正常维持饲料。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾

15 静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS，PLG^{-/-}不做任何处理。第 5 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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

20 laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠纤维蛋白抗体（Abcam）4℃孵育过夜，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，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。梯度脱水透明并封片，切片在 200

25 倍光学显微镜下观察。

纤维蛋白原是纤维蛋白的前体，在组织存在损伤的情况下，作为机体对损伤的一种应激反应，纤维蛋白原水解成纤维蛋白沉积在损伤部位^[31,32]。因此，可将损伤局部纤维蛋白水平作为损伤程度的一个标志。

结果显示，给溶媒 PBS 对照组（图 5A）肾脏纤维蛋白的阳性着色深于给纤溶酶原组小鼠（图 5B），且 PLG^{-/-}组（图 5C）着色深于给溶媒 PBS 对照组。这表明纤溶酶原能在一定程度上修复肾脏组织的损伤。

实施例 6 纤溶酶原促进顺铂所致的肾脏损伤的修复

8-9 周龄健康的雄性 C57 小鼠 10 只，随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组，每组各 5 只。分组完成后，按 10mg/Kg 体重单次腹腔注射顺铂^[33]，建立化疗损伤模型。建立模型后，给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS。实验开始当天为第 0 天称量体重并分组，第 1 天开始腹腔注射顺铂造模，造模后 3 小时内给予纤溶酶原或溶媒 PBS，给药期为 7 天。第 8 天处死小鼠，取肾脏在 10%中性福尔马林固定液中固定 24-48 小时。固定后的肾脏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 4 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟，室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。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，滴加山羊抗鼠 IgM (HRP)抗体（Abcam）室温孵育 1 小时，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。梯度脱水透明并封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

IgM 抗体在清除凋亡和坏死细胞过程中发挥着重要作用，组织器官损伤局部 IgM 抗体的水平与损伤程度呈正相关^[29,30]。因此，检测组织器官局部 IgM 抗体的水平能够反映该组织器官的损伤情况。

结果显示，给纤溶酶原组（图 6B）IgM 阳性表达明显低于给溶媒 PBS 对照组（图 6A），且统计差异显著（图 6C）。说明纤溶酶原能促进肾脏损伤的修复。

实施例 7 纤溶酶原减轻顺铂化疗损伤模型小鼠肾脏的纤维化

8-9 周龄健康的雄性 C57 小鼠 10 只，随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组，每组各 5 只。分组完成后，建立化疗损伤模型，按 10mg/Kg 体重单次腹腔注射顺铂^[33]。建立模型后，给纤溶酶原组 1mg/0.1ml/只/天经尾静脉注射给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射给予相同体积的 PBS。实验开始当天为第 0 天并称重分组，第 1 天开始腹腔注射顺铂造模，造模后 3 小时内给予纤溶酶原或溶媒 PBS，给药期为 7 天。第 8 天处死小鼠，取肾脏在 4%多聚甲醛固定液中固定 24 小时。固定后的肾脏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 4 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，滴加兔抗小鼠 IV 胶原抗体（Abcam）4℃孵育过夜，TBS 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，TBS 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，流水返蓝 5 分钟，然后 TBS 洗 1 次。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，给溶媒 PBS 对照组（图 7A）肾脏 IV 型胶原阳性表达明显高于给纤溶酶原组（图 7B）。说明纤溶酶原能够减轻顺铂损伤模型小鼠肾脏的纤维化。

实施例 8 纤溶酶原减轻糖尿病小鼠肾脏纤维化

24-25 周龄雄性 db/db 小鼠 10 只，随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组，每组各 5 只。实验开始当天记为第 0 天并称重分组，第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS，连续给药 31 天。给纤溶酶原组小鼠按 2mg/0.2ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS。给纤溶酶原 31 天后处死小鼠并取肾脏组织在 4%多聚甲醛固定液中固定 24 小时。固定后的肾脏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 4 μm，切片脱蜡复水后水洗 1 次。以 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 IV 胶原的兔多克隆抗体（Abcam）4℃孵育过夜，TBS 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，TBS 洗 2 次。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，梯度脱水透明并封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

糖尿病肾病是糖尿病慢性并发症，肾小球硬化以及肾间质纤维化是其典型的病理改变^[34]。本发明实验结果显示，给纤溶酶原组（图 8B）IV 胶原阳性着色明显浅于给溶媒 PBS 对照组（图 8A），说明纤溶酶原能减轻糖尿病小鼠肾脏的纤维化。

实施例 9 纤溶酶原减轻糖尿病小鼠肾脏纤维化

26 周龄雄性 db/db 小鼠 10 只，随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组，每组各 5 只。实验开始当天记为第 0 天称重分组，第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS，连续给药 35 天。给纤溶酶原组小鼠按 2mg/0.2ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS。第 36 天处死小鼠并取肾脏组织在 4%多聚甲醛固定液中固定 24 小时。固定后的肾脏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 4 μ m，切片脱蜡复水后放入重铬酸钾溶液过夜。铁苏木素染 3 到 5 分钟，流水洗。1%盐酸酒精分化，氨水处理 1 秒，水洗。丽春红酸性品红液染 8 分钟，水中快速漂洗。1%磷钼酸水溶液处理约 2 分钟，苯胺蓝液复染 6 分钟。1%冰醋酸漂洗约 1 分钟。无水乙醇脱水二甲苯透明后封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

Masson 染色可以显示组织的纤维化。结果显示，给溶媒 PBS 对照组（图 9A），肾间质轻度纤维化，增生的纤维化呈蓝色。给纤溶酶原组（图 9B）与给溶媒 PBS 对照组相比肾间质纤维化明显减少。说明纤溶酶原能降低糖尿病小鼠肾脏的纤维化。

实施例 10 纤溶酶原降低系统性硬化症小鼠肾脏纤维化

取 12 周龄 C57 雄鼠 10 只，称重后随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 5 只。所有小鼠按 0.1mg/0.1ml/只/天皮下注射博莱霉素诱导系统性硬化症^[35]，当天开始给纤溶酶原或 PBS 并记为第 1 天，连续给药 21 天。给纤溶酶原组小鼠按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射给予相同体积的 PBS。在第 22 天处死小鼠并取肾脏在 4%多聚甲醛固定液中固定 24 小时。固定后的肾脏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，切片脱蜡至水后水洗 1 次，以 0.1%天狼星红饱和苦味酸染色 30 分钟后，流水冲洗 2min，苏木素染色 1 分钟，流水冲洗，1%盐酸酒精分化，氨水返蓝，流水冲洗，烘干后中性树脂封片，在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示，在博莱霉素诱导的系统性硬化症小鼠模型中，给溶媒 PBS 对照组（图 10A）肾脏胶原沉积明显多于给纤溶酶原组（图 10B）。说明纤溶酶原有效降低系统性硬化症小鼠的肾脏纤维化。

实施例 11 纤溶酶原促进慢性肾损伤模型小鼠肾脏功能的修复

8-9 周龄的 PLG^{+/+}小鼠 10 只以及 PLG^{-/-}小鼠 6 只，慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，造模周期 10 天。在第 11 天摘除眼球取血，离心取上清，检测血清中尿素氮浓度。尿素氮含量采用尿素氮检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 C013-2），并按该尿素氮检测试剂盒所述方法进行检测。

结果显示，PLG^{+/+}组血清中尿素氮浓度明显低于 PLG^{-/-}组，且统计差异显著（图 11）。说明纤溶酶原能显著改善慢性肾损伤模型小鼠的肾功能。

实施例 12 纤溶酶原促进慢性肾损伤模型小鼠肾脏功能的修复

8-9 周龄的 PLG^{+/+}小鼠 20 只以及 PLG^{-/-}小鼠 6 只，PLG^{+/+}小鼠随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组各 10 只。慢性肾损伤模型造模方式同实施例 1 所述。造模当天记为第 1 天，同时开始给药，给药周期 4 天。给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS，PLG^{-/-}小鼠不做任何处理。第 5 天摘除眼球取血，离心取上清，检测血清中肌酐浓度。血清肌酐浓度采用肌酐检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 C011-2），并按该试剂盒所述方法进行检测。

结果显示，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组血清中肌酐浓度明显低于 PLG^{-/-}组小鼠，且统计差异显著。此外，给纤溶酶原组血清中肌酐浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组（图 12）。说明纤溶酶原能显著改善慢性肾损伤模型小鼠的肾功能。

实施例 13 纤溶酶原促进急性肾损伤模型小鼠肾脏功能的修复

7 周龄雄性 C57 小鼠 9 只，随机分为两组，给纤溶酶原组 5 只，给溶媒 PBS 对照组 4 只。所有小鼠按照 250mg/kg 体重单次腹腔注射叶酸（sigma A7876）溶液，诱导急性肾损伤^[36]。叶酸溶解在 0.3mol/L NaHCO₃。造模当天记为第 1 天，同时开始给纤溶酶原或溶媒 PBS，给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS，给药为期 7 天。在第 8 天摘眼球取血，离心取上清，检测血清中尿素氮浓度。尿素氮含量采用尿素氮检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 C013-2），并按该尿素氮检测试剂盒所述方法进行检测。

结果显示,给纤溶酶原组血清中尿素氮浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组,且统计差异接近显著($P=0.06$) (图 13)。说明纤溶酶原能显著改善急性肾损伤模型小鼠的肾功能。

实施例 14 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏脂肪沉积

5 9 周龄雄性 C57 小鼠 16 只饲喂 3%胆固醇高脂饲料(南通特洛菲)4 周,诱导高脂血症^[37, 38],此模型定为 3%胆固醇高脂血症模型,成模后的小鼠继续饲喂 3%胆固醇高脂饲料。另取相同周龄的雄性 C57 小鼠 5 只作为空白对照组,实验期间饲喂普通维持饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ L,检测总胆固醇,模型小鼠根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组,给纤溶酶原
10 组和给溶媒 PBS 对照组,每组各 8 只。开始给药记为第 1 天,给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天,给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS,给药 30 天。第 31 天处死小鼠,取肾脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时,分别于 15%、30%蔗糖中 4 $^{\circ}$ C 过夜沉底, OCT 包埋,冰冻切片厚度 8 μ m,油红 O 染色 15min, 75%酒精分化 5 秒,苏木素染核 30 秒,
15 甘油明胶封片。切片在 400 倍光学显微镜下观察。

油红 O 染色可显示脂质沉积,反映脂质沉积的程度^[37]。结果显示,给纤溶酶原组(图 14C)小鼠肾脏脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组(图 14B),且定量分析统计差异显著(图 14D);此外,给纤溶酶原组脂质沉积水平与空白对照组小鼠(图 14A)相似。说明纤溶酶原能消减脂
20 肪在高脂血症模型小鼠肾脏中的沉积,从而减少脂肪沉积所致肾的脏损伤。

实施例 15 纤溶酶原改善叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏损伤

7 周龄雄性 C57 小鼠 15 只,随机分为三组,空白对照组 3 只,给纤溶酶原组 7 只,给溶媒 PBS 对照组 5 只。给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组小鼠按照 250mg/kg 体重单次腹腔注射叶酸(sigma A7876)溶液,诱导急性肾
25 损伤模型^[36],空白对照组单次腹腔注射相应体积的 NaHCO₃ 溶液。叶酸溶解在 0.3mol/L NaHCO₃ 溶液中。造模当天记为第 1 天,同时开始给纤溶酶原或溶媒 PBS,给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原,给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS,给药为期 7 天。第 8 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。组织切片厚度为 3 μ m,切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE 染色), 1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,酒精梯度脱水,
30 二甲苯透明,中性树胶封片,切片在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 空白对照组(图 15A)肾脏核呈圆形或椭圆形, 胞浆红染, 肾小球及肾小管均形态正常; 给溶媒 PBS 对照组(图 15B)肾脏呈大部分的肾小管上皮细胞扁平化(粗箭头标识), 刷状缘脱落, 部分细胞核固缩, 只有部分肾小管呈现淡染的胞浆, 部分肾小管还可见脓管型(细箭头标识), 肾小球及肾间质轻度的炎细胞浸润; 给纤溶酶原组(图 15C)与给溶媒 PBS 对照组相比, 肾小管扩张及上皮细胞扁平化明显好转, 可见大部分的肾小管胞浆呈现红染, 未见脓管型。说明, 纤溶酶能改善叶酸诱导的急性肾损伤。

实施例 16 纤溶酶原促进叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏 Bcl-2 的表达

7 周龄雄性 C57 小鼠 12 只, 随机分为两组, 给纤溶酶原组 7 只, 给溶媒 PBS 对照组 5 只。所有小鼠按照 250mg/kg 体重单次腹腔注射叶酸 (sigma A7876) 溶液, 诱导急性肾损伤^[36]。叶酸溶解在 0.3mol/L NaHCO₃。造模当天记为第 1 天, 同时开始给纤溶酶原或溶媒 PBS, 给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS, 给药为期 7 天。第 8 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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, 滴加兔抗小鼠 Bcl-2 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胶封片, 切片在 200 倍光学显微镜下观察。

Bcl-2 免疫组化结果显示, 给纤溶酶原组(图 16B)肾脏 Bcl-2 阳性着色明显多于给溶媒 PBS 对照组(图 16A), 且统计差异显著(图 16C)。这表明纤溶酶原能促进急性肾损伤模型小鼠肾脏中细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达, 从而有助于保护急性肾损伤小鼠肾脏组织细胞免于凋亡。

实施例 17 纤溶酶原减少叶酸急性肾损伤模型小鼠肾脏损伤

7 周龄雄性 C57 小鼠 12 只, 随机分为两组, 给纤溶酶原组 7 只, 给溶媒 PBS 对照组 5 只。所有小鼠按照 250mg/kg 体重单次腹腔注射叶酸 (sigma A7876) 溶液, 诱导急性肾损伤^[36]。叶酸溶解在 0.3mol/L NaHCO₃ 溶液中。

造模当天记为第 1 天, 同时开始给纤溶酶原或溶媒 PBS, 给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS, 给药为期 7 天。第 8 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。固定后的肾脏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, 滴加山羊抗鼠 IgM (HRP) 抗体 (Abcam) 室温孵育 1 小时, 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。梯度脱水透明并封片, 切片在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 给纤溶酶原组 (图 17B) 小鼠肾脏 IgM 的阳性着色比给溶媒 PBS 对照组 (图 17A) 浅, 并且范围较对照组小。这表明注射纤溶酶原后肾脏 IgM 的表达明显降低, 反映出纤溶酶原能有效减少叶酸急性肾损伤小鼠肾脏损伤。

实施例 18 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化

9 周龄雄性 C57 小鼠 16 只饲喂 3%胆固醇高脂饲料(南通特洛菲)4 周, 诱导高脂血症^[37, 38], 此模型定为 3%胆固醇高脂血症模型, 成模后的小鼠继续饲喂 3%胆固醇高脂饲料。另取相同周龄的雄性 C57 小鼠 5 只作为空白对照组, 实验期间饲喂普通维持饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ L, 检测总胆固醇, 模型小鼠根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组, 给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组, 每组各 8 只。开始给药记为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。在第 30 天给药后小鼠给药 30 天, 于第 31 天处死小鼠, 取肾脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。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 0.1%天狼星红饱和苦味酸染色 30 分钟后, 流水冲洗 2min, 苏木素染色 1 分钟, 流水冲洗, 1%盐酸酒精分化, 氨水返蓝, 流水冲洗, 烘干后中性树胶封片, 在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 给纤溶酶原组 (图 18C) 肾脏胶原蛋白沉积 (箭头标识) 明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 18B), 且统计差异显著 (图 18D); 给纤溶

酶原组纤维化基本恢复到正常水平（图 18A）。说明纤溶酶原能有效的减少 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化。

实施例 19 纤溶酶原减少缺血再灌注急性肾损伤模型小鼠肾脏损伤

7-9 周龄雄性 PLG^{+/+}小鼠 9 只，随机分为三组，假手术组、给纤溶酶原
5 组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 3 只。所有小鼠用戊巴比妥钠按照 50mg/kg
体重腹腔注射麻醉。给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组小鼠在腹部开个缺口，
暴露肾脏，分离双侧动静脉，用血管夹夹住双侧动静脉，夹好后肾脏移入腹
腔，闭合伤口。时间到后再次暴露肾脏，移除血管夹，观察肾脏情况，确定
再灌注后，缝合伤口。假手术组组腹部开个缺口，仅暴露肾脏，不做缺血
10 处理，时间到后缝合伤口^[39]。手术完成后每只小鼠腹腔注射 1mL 37℃ 生理
盐水。手术期间保持体温在 36.5-38℃。造模当天记为第 1 天，同时开始给
纤溶酶原或溶媒 PBS，给纤溶酶原组按 1mg/0.1ml/只/天尾静脉给予纤溶酶原，
给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积的 PBS，假手术小鼠不做注射处理，
给药为期 7 天。第 8 天处死小鼠取肾脏于 4%多聚甲醛中固定 24 小时。组织
15 切片厚度为 3μm，切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE 染色)，1%盐酸
酒精分化，氨水返蓝，酒精梯度脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，切片在
200 倍光学显微镜下观察。

结果显示，假手术组（图 19A）肾小球毛细血管通畅，肾小管胞浆红染，
呈正常的肾小管形态；给溶媒 PBS 对照组（图 19B）可见肾小球轻度的炎细
20 胞浸润（三角标识），肾间质大量的炎细胞浸润，部分肾小管呈现脓管型（细
箭头标识），少量肾小管细胞核固缩，大面积的上皮细胞扁平化（粗箭头标
识），肾小管扩张；相较于给溶媒 PBS 对照组，给纤溶酶原组（图 19C）只
有少量的肾小管上皮扁平化，大部分的肾小管已经恢复正常肾小管形态，胞
浆红染，未发现明显的肾小管萎缩，只有肾间质有轻度的炎细胞浸润，已接
25 近假手术组形态。说明纤溶酶能改善缺血再灌注急性肾损伤模型小鼠肾脏损
伤。

参考文献:

- 30 [1] James L. Pirkle, MD1 and Barry I. Freedman, MD. Hypertension and chronic kidney
disease: controversies in pathogenesis and treatment, Minerva Urol Nefrol. 2013 March ;
65(1): 37-50.
[2] Nguyen DCA, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system-focusing on the
vascular system [J]. Peptides, 2011, 32 (10) : 2141-2150.
[3] Kimoto E, Shoji T. Shinohara K, et al. Regional arterial stiffness inpatient with type 2

diabetes and chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(8):2245-2252.

- [4] Mogensen CE, Damsgaard Em, Frland A, et al, Microalbuminuria in non-insulin dependent diabetes [J]. *Clin Nephrol*. 1992, 38(1):28-39.
- [5] Choudhury D, Ahmed Z. Drug-associated renal dysfunction and injury [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2: 80–91.
- [6] Colares VS, Oliveira RB, Abdulkader RC. Nephrotoxicity of vancomycin in patients with normal serum creatinine [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21: 3608.
- [7] Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral drug-induced nephrotoxicity [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45: 804–817.
- [8] Uwai Y, Ida H, Tsuji Y, et al. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2) [J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 811–815.
- [9] Servais H, Ortiz A, Devuyst O, et al. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation [J]. *Apoptosis*, 2008, 13: 11–32.
- [10] Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, et al. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events [J]. *Contrib Nephrol*, 2005, 148: 107–121.
- [11] Harirforoosh S, Jamali F. Renal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2009, 8: 669–681.
- [12] Lincoln T. Toxicology: danger in the diet [J]. *Nature*, 2007, 448: 148.
- [13] Guitard J, Kamar N, Mouzin M, et al. Sulfadiazine-related obstructive urinary tract lithiasis: an unusual cause of acute renal failure after kidney transplantation [J]. *Clin Nephrol*, 2005, 63: 405–407.
- [14] Boucher BJ. Renal failure and rhabdomyolysis associated with sitagliptin and simvastatin use. But what about the amiodarone? [J]. *Diabet Med*, 2009, 26: 192–193.
- [15] Hsu CY, McCulloch CE, Fan D, et al. Community-based incidence of acute renal failure [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(2): 208-212.
- [16] Liangos O, Wald R, O'Bell JW, et al. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(1): 43-51.
- [17] Hoste EA, Clermont G, Kersten A, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis [J]. *Crit Care*, 2006, 10(3): R73.
- [18] Zhang L, Yang YY, Fu P. The development and problems of continuous renal replacement therapy [J]. *Chin J Pract Inter Med*, 2011, 31(4):301-304.
- [19] RENAL Replacement Therapy Study Investigators, Bellomo R, Cass A, et al. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(17): 1627-1638.
- [20] VA/NIH Acute Renal Failure Trial Network, Palevsky PM, Zhang JH, et al. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(1): 7-20.
- [21] Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, et al. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 53(6): 961-973.
- [22] Marder V J, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3): 433-444.
- [23] Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- [24] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one “mini”-plasminogen (MW, 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis [J]. *Progress in chemical fibrinolysis and*

thrombolysis, 1978, 3: 191-209.

- [25] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2): 307-313.
- 5 [26] Cristhiane Favero Aguiar, Cristiane Naffah-de-Souza, Angela Castoldi et al. Administration of α -Galactosylceramide Improves Adenine-Induced Renal Injury. *Mol Med*. 2015 Jun 18;21:553-62.
- 10 [27] Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y (2006). Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 downregulation. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1062–1069.
- [28] Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, Rojanasakul Y (2008). Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 73, 119–127.
- 15 [29] Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. (2006) Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 177: 4727–4734.
- [30] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655–665.
- 20 [31] Dimitrios Davalos, Katerina Akassoglou. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 2012. 34(1):43-62.
- [32] Valvi D, Mannino DM, Mullerova H, et al. Fibrinogen, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and outcomes in two United States cohorts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:173–82.
- 25 [33] Blanca Humanes, Alberto Lazaro, Sonia Camano et al. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int*. 2012 Sep;82(6):652-63.
- 30 [34] Donnelly SM, Zhou XP, Huang JT et al. Prevention of early glomerulopathy with tolrestat in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(3):355-62.
- [35] Yosuke Kanno, En Shu, Hiroyuki Kanoh and Mariko Seishima. The Antifibrotic Effect of α 2AP Neutralization in Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts and Mouse Models of Systemic Sclerosis. *Journal of Investigative Dermatology* (2016) 136, 762e769
- 35 [36] Szczytko MS, Westover AJ, Clouthier SG et al. Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells*. 2005;23(1):44-54.
- [37] Dominika Nackiewicz, Paromita Dey, Barbara Szczerba et al. Inhibitor of differentiation 3, a transcription factor regulates hyperlipidemia associated kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2014 ; 126(3): 141–147.
- 40 [38] Ming Gu, Yu Zhang, Shengjie Fan et al. Extracts of *Rhizoma Polygonati Odorati* Prevent High-Fat Diet-Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 8(11): e81724.
- 45 [39] Li Yang, Craig R. Brooks, Sheng Xiao et al. KIM-1 – mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest*. 2015 Apr;125(4):1620-36.

权 利 要 求 书

1. 一种预防和/或治疗受试者肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原，其中所述受试者有肾组织损伤风险、怀疑有肾组织损伤、或罹患肾组织损伤。

5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述肾组织损伤包括感染、炎症、变态反应、自身免疫、缺血、血栓、微血管病变、创伤、辐射损伤、糖代谢紊乱、电解质紊乱、脂肪代谢紊乱、癌症所致肾组织损伤。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述肾组织损伤为选自如下的全身性疾病导致的肾组织损伤：高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、系统性硬化症、系
10 统性红斑狼疮、高脂血症、非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、系统性血管炎、过敏性紫癜、多发性肌炎、血栓性微血管病。

4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述肾组织损伤为慢性肾脏疾病导致的肾组织损伤。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述慢性肾脏疾病为慢性肾小球肾炎、慢性
15 肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾衰或尿毒症。

6. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述慢性肾脏疾病为药物导致的慢性肾损伤。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述药物包括化疗药物、降血压药物、降血脂药物、降血糖药物、非类固醇抗炎药物、抗生素药物、抗病毒药物。

20 8. 权利要求 7 的方法，其中所述药物为化疗药物，具体为顺铂。

9. 一种预防和/或治疗受试者急性肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原保护肾组织。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述纤溶酶原减轻急性肾组织损伤所致的肾组织细胞凋亡。

25 11. 权利要求 9 或 10 的方法，其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

12. 权利要求 9-11 任一项的方法，其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

13. 权利要求 9-12 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法，其中所述肾损伤为急性肾小球肾炎、
30 急性肾盂肾炎、急性肾损伤、急性肾功能衰竭、急性肾功能不全、急性肾小管坏死。

15. 权利要求 1-13 的方法, 其中所述急性肾损伤为化疗药物导致的急性肾损伤。

16. 一种预防和/或治疗受试者慢性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原保护肾组织。

5 17. 权利要求 16 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

18. 权利要求 16 或 17 的方法, 其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

19. 权利要求 16-18 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

10 20. 权利要求 16-19 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

21. 权利要求 16-20 任一项的方法, 其中所述慢性肾损伤为肾脏组织的慢性疾病导致的肾组织损伤。

22. 权利要求 16-20 任一项的方法, 其中所述慢性肾损伤为其它疾病引发或伴有的肾组织损伤。

15 23. 权利要求 22 的方法, 其中所述其它疾病包括高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、高脂血症、肝炎、肝硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述其它疾病为高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、高脂血症。

20 25. 一种预防和/或治疗受试者脂质沉积导致的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述脂质沉积是由于受试者脂肪代谢异常或糖代谢异常导致的高脂血症所致。

27. 一种预防和/或治疗受试者糖尿病引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

25 28. 一种预防和/或治疗受试者高脂血症引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

29. 一种预防和/或治疗受试者动脉粥样硬化引发或伴随的肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

30 30. 一种预防和/或治疗受试者缺血性肾组织损伤的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

32. 权利要求 30 或 31 的方法，其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

33. 权利要求 30-32 任一项的方法，其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

5 34. 权利要求 30-33 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

35. 权利要求 30-34 任一项的方法，其中所述缺血由血管管腔狭窄所致。

36. 权利要求 30-34 任一项的方法，其中所述缺血由血栓堵塞血管所致。

37. 权利要求 35 或 36 的方法，其中所述缺血由高血压、糖尿病、动脉粥样硬化，心脏病所致。

10 38. 一种预防和/或治疗受试者缺血再灌注性肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

39. 一种预防和/或治疗受试者自身免疫反应性肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

15 40. 权利要求 39 的方法，其中所述自身免疫反应性肾组织损伤由系统性硬化症所致。

41. 一种预防和/或治疗受试者炎症性肾组织损伤的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原

42. 权利要求 41 的方法，其中所述炎症为急慢性肾实质炎症或肾间质炎症。

20 43. 权利要求 42 的方法，其中所述纤溶酶原减轻肾组织细胞凋亡。

44. 权利要求 42 或 43 的方法，其中所述纤溶酶原促进损伤肾组织的修复。

45. 权利要求 41-44 任一项的方法，其中所述纤溶酶原减轻损伤肾组织的纤维化。

25 46. 权利要求 41-45 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进肾功能恢复。

47. 权利要求 1-46 任一项的方法，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。

30 48. 权利要求 1-47 任一项的方法，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，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

49. 权利要求 1-48 任一项的方法，所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

50. 权利要求 1-49 任一项的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-
5 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。

51. 根据权利要求 1-50 任一项的方法，其中所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联合施用：降血压药物、降血脂药物、抗生素药物、抗凝
10 药物、溶血栓药物、利尿药、抗肿瘤药、降血糖药、非甾体类抗炎药、免疫调节药物、抗感染药物、抗病毒药物、激素、天然产物活性成分。

52. 权利要求 1-51 任一项的方法，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的变体或片段。

53. 权利要求 1-51 任一项的方法，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮
15 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的变体或片段。

54. 权利要求 1-53 任一项的方法，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、
8、10 或 12 所示。

55. 权利要求 1-54 任一项的方法，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

56. 权利要求 1-55 任一项的方法，其中所述受试者是人。

20 57. 权利要求 1-26 任一项的方法，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

58. 权利要求 57 的方法，其中所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

59. 一种用于权利要求 1-58 任一项的方法的纤溶酶原。

60. 一种药物组合物，其包含药学上可接受的载剂和用于权利要求 1-58
25 中任一项所述方法的纤溶酶原。

61. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：(i)用于权利要求 1-58 中任一项所述方法的纤溶酶原和(ii)用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件
(means)。

62. 根据权利要求 61 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

63. 权利要求 61 或 62 的试剂盒，其还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施权利要求 1-58 中任一项所述方法。

64. 一种制品，其包含：

5 含有标签的容器；和

包含(i)用于权利要求 1-58 中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施权利要求 1-58 中任一项所述方法。

10 65. 权利要求 61-63 中任一项的试剂盒或权利要求 64 的制品，还包含另外的一个或多个构件或容器，该构件或容器中含有其他药物。

15 66. 权利要求 65 的试剂盒或制品，其中所述其他药物选自下组：降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物，保肝药物，抗心律失常药物，强心药物，利尿药物，抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。

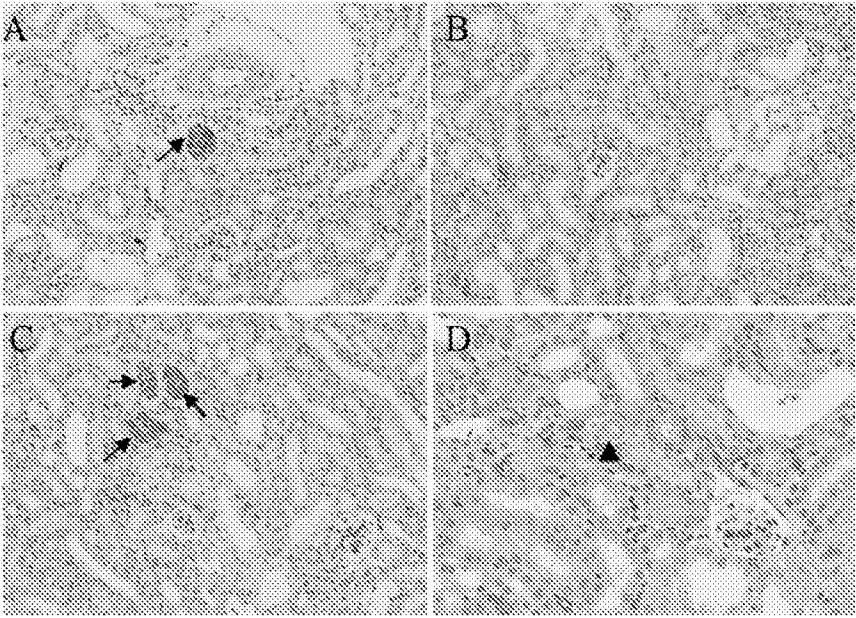


图1

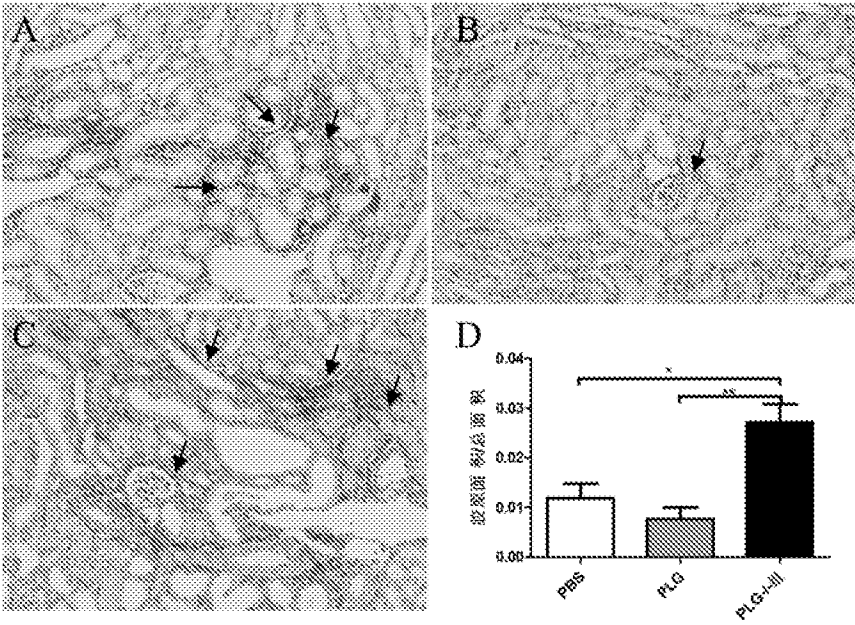


图2

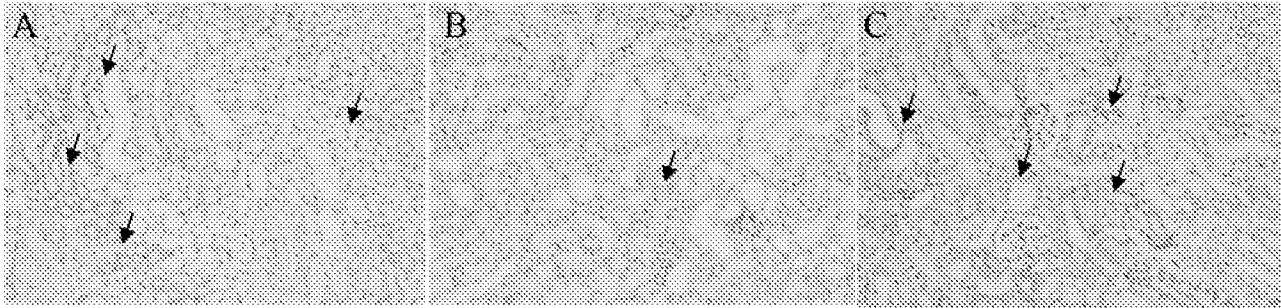


图3

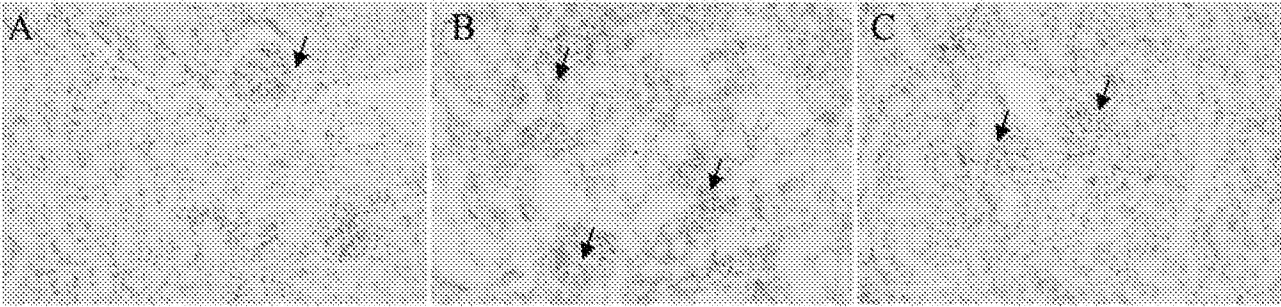


图4

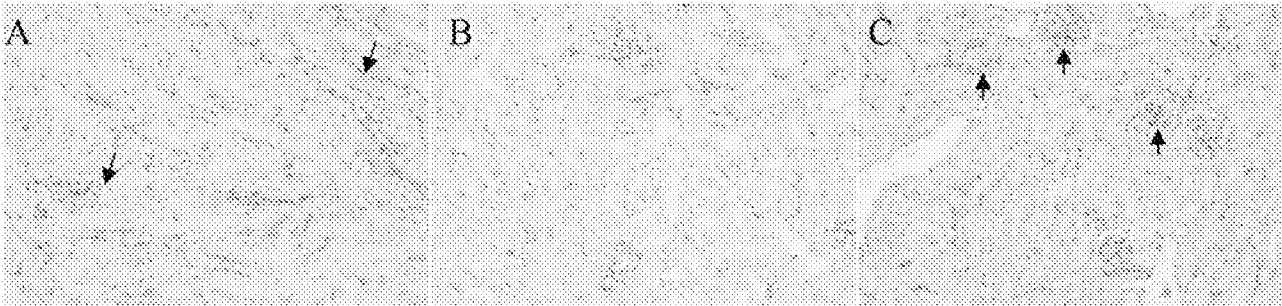


图5

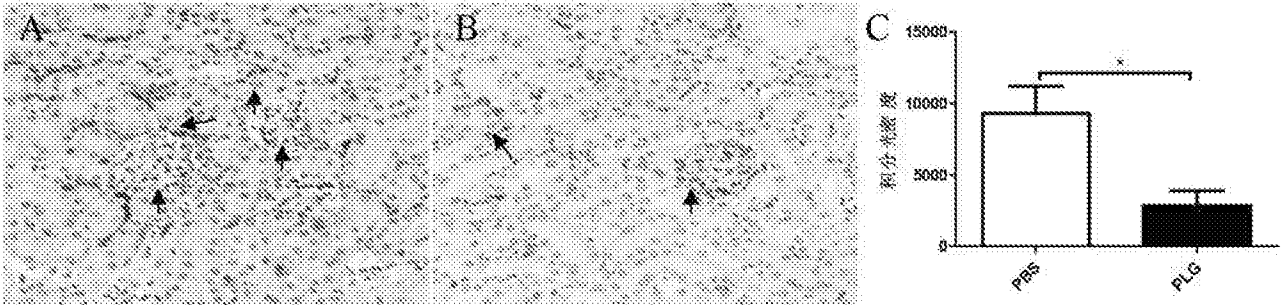


图6

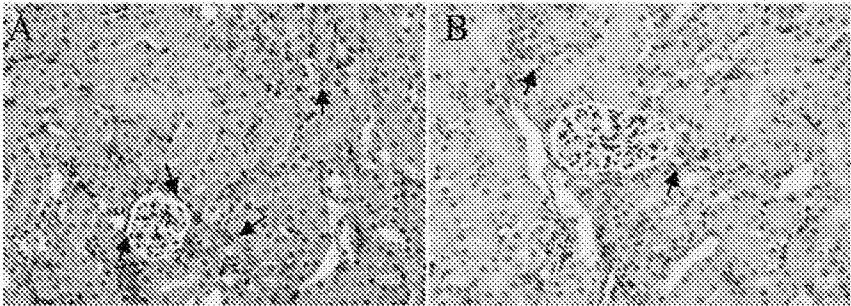


图7

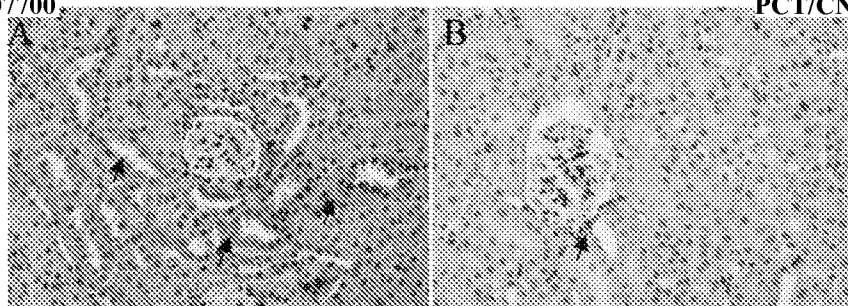


图8

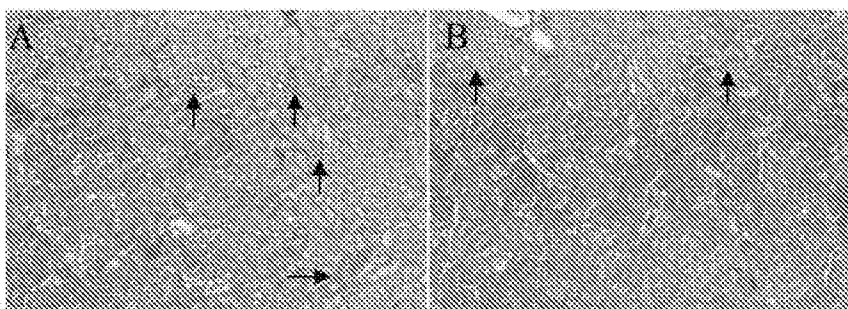


图9

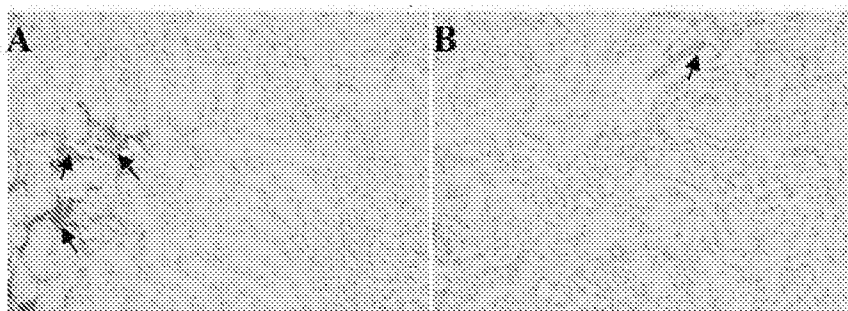


图10

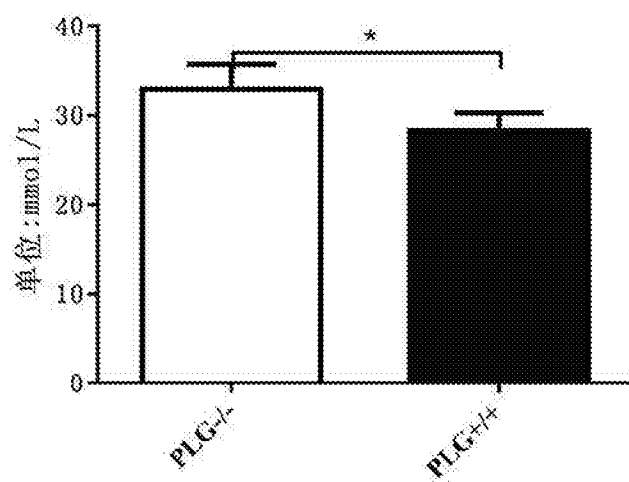


图11

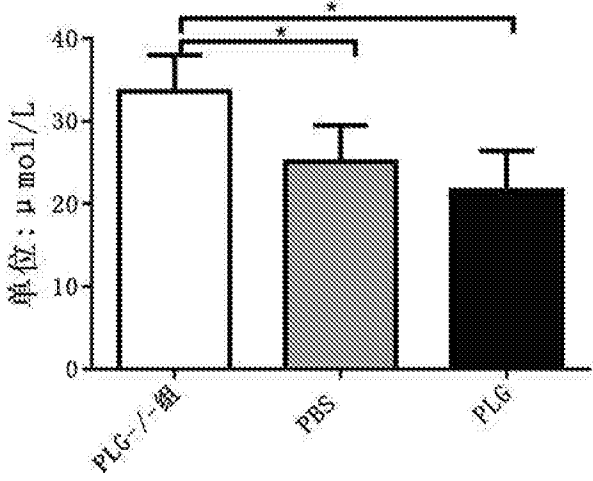


图12

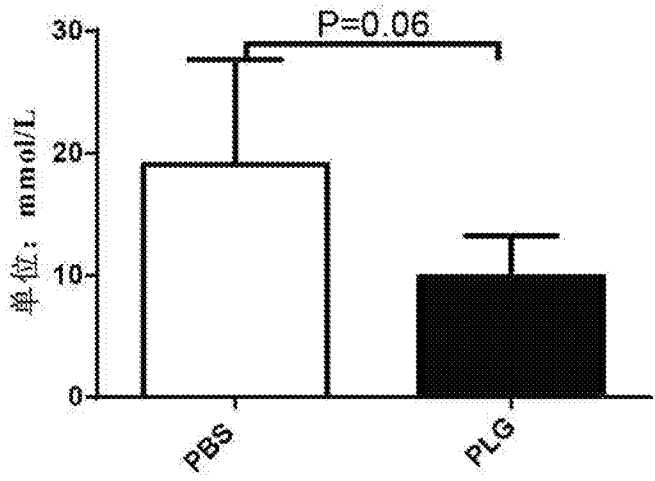


图13

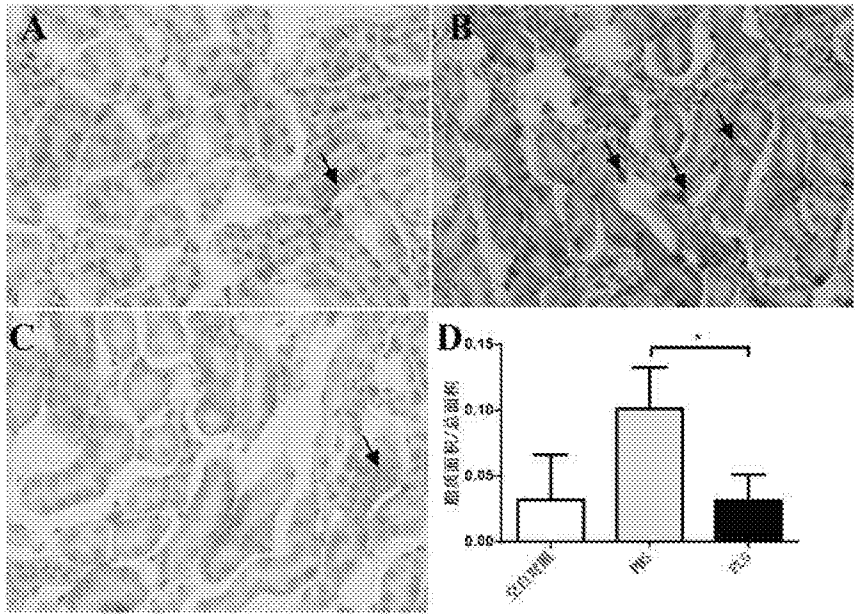


图14

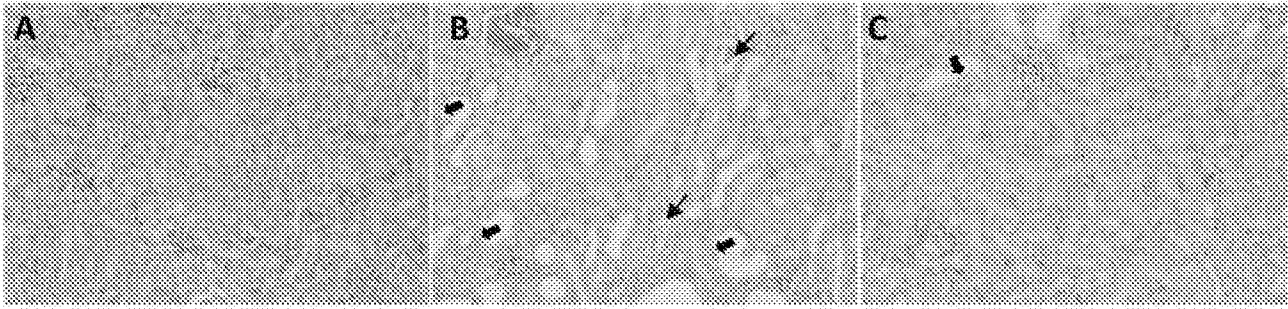


图15

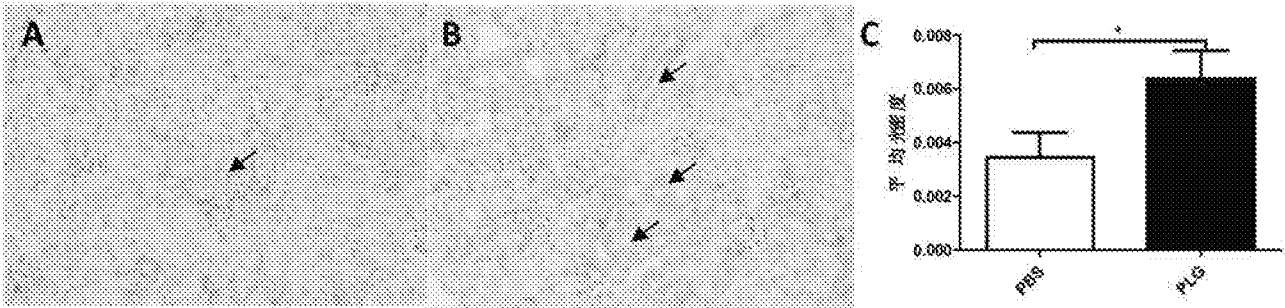


图16

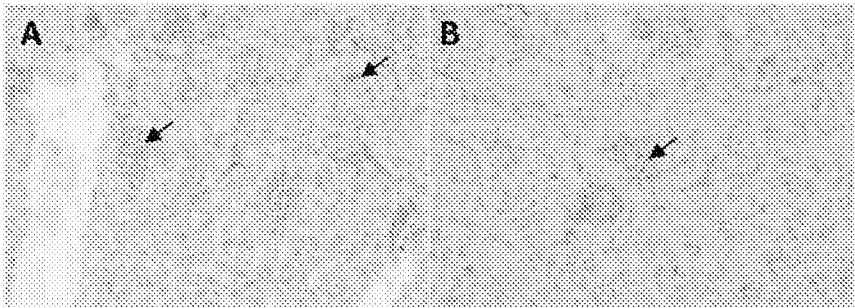


图17

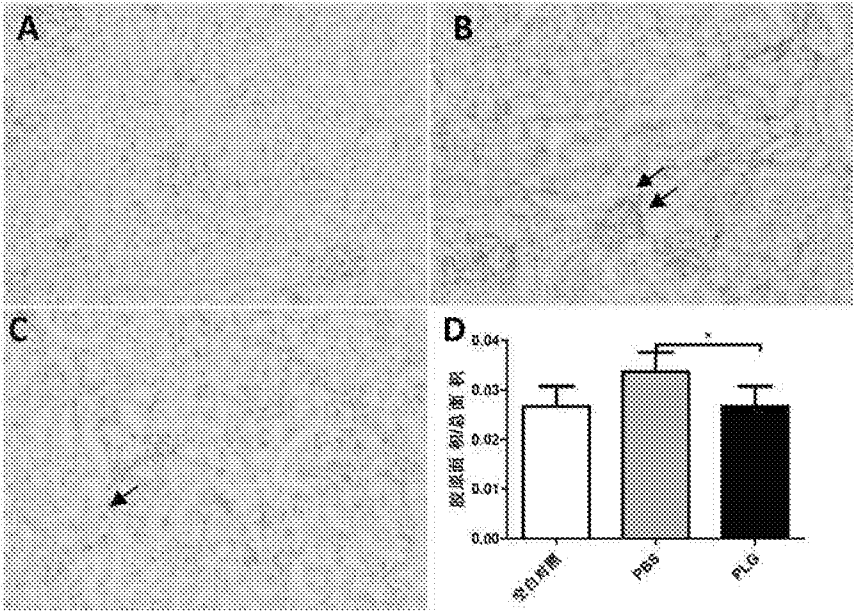


图18

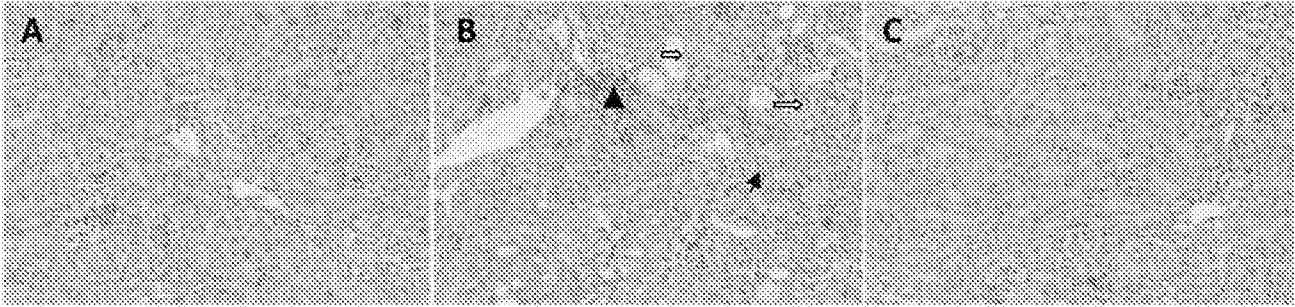


图19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/48 (2006.01) i; A61P 13/12 (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)

CJFD; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; GOOGLE; PUBMED; GenBank; EBI; ISI Web of knowledge; CNKI: profibrinolysin, 肾损伤, plasminogen, 损伤, 肾组织损伤, plg, 纤维溶酶原, 肾炎, 纤维蛋白溶解酶原, 肾功能衰竭, kidney injury, 纤溶酶原, profibrolysin, 肾小管坏死, 纤维蛋白溶酶原, SEQ ID NOs: 2, 6, 8, 10, 12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101573134 A (OMNIO HEALER AB) 04 November 2009 (04.11.2009), description, page 5, paragraph 5, page 10, paragraphs 2-7, page 12, paragraph 5, page 15, paragraphs 3, 4, 6 and 7 and page 34, paragraph 4	1-5, 9-14, 16-46, 49-53, 55-66
Y	CN 101573134 A (OMNIO HEALER AB) 04 November 2009 (04.11.2009), description, page 5, paragraph 5, page 10, paragraphs 2-7, page 12, paragraph 5, page 15, paragraphs 3, 4, 6 and 7 and page 34, paragraph 4	6-8, 15, 47, 48, 54
Y	孙海鸥. 药物性肾损害的机制及其临床表现. 肾脏病与透析肾移植杂志. 30 June 2006 (30.06.2006), 15(3), page 252, left column, paragraph 1, page 253, left column, paragraph 2, and page 255, table 1. (Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation), non-official translation (Sun, Haiou, The Mechanism and Clinical Manifestations of Drug-induced Renal Damage.)	6-8, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 04 September 2017	Date of mailing of the international search report 14 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanqing Telephone No. (86-10) 61648130

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/089060

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1768138 A (N ZYME BIOTECHNOLOGY GMBH) 03 May 2006 (03.05.2006), description, sequence list, sequence 17, 18 and 32	47, 48, 54
X	CN 102121023 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 13 July 2011 (13.07.2011), description, paragraphs [0002], [0005], [0008], [0009], and [0023]-[0025]	1-3, 16, 22-24, 27, 49-53, 55-66
A	CN 101563100 A (OMNIO HEALER AB) 21 October 2009 (21.10.2009), entire document	1-66
A	CN 87104683 A (EMORY UNIVERSITY) 21 December 1988 (21.12.1988), entire document	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089060

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☒ in electronic form

b. (time)

- ☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089060

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.: 1-58
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 1-58 are related to methods of treatment of diseases and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). This search report has been made based on the pharmaceutical uses of plasminogen.
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089060

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101573134 A	04 November 2009	CN 101563100 B	07 August 2013
		CA 2662101 A1	06 March 2008
		EP 2056864 A2	13 May 2009
		KR 20090059122 A	10 June 2009
		US 2013149321 A1	13 June 2013
		CN 101573134 B	06 March 2013
		JP 2010502600 A	28 January 2010
		EP 2056864 A4	25 January 2012
		JP 5566105 B2	06 August 2014
		DK 2056864 T3	10 March 2014
		AU 2007290881 B2	07 March 2013
		EA 200970233 A1	28 August 2009
		EA 016250 B1	30 March 2012
		EP 2056864 B1	11 December 2013
		CA 2662101 C	07 July 2015
		WO 2008026999 A2	06 March 2008
		WO 2008026999 A3	22 May 2008
		AU 2007290881 A1	06 March 2008
		US 8318661 B2	27 November 2012
		ES 2451015 T3	26 March 2014
		US 2016243204 A1	25 August 2016
		CN 101563100 A	21 October 2009
		MX 2009002226 A	07 September 2009
		US 2010099600 A1	22 April 2010
CN 1768138 A	03 May 2006	AU 2003210137 A1	02 September 2003
		WO 03066842 A3	10 June 2004
		JP 2005525798 A	02 September 2005
		WO 03066842 A2	14 August 2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089060

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		MX PA04007585 A	20 September 2005
		CA 2475277 A1	14 August 2003
		AU 2003210137 A8	02 September 2003
		EP 1472346 A2	03 November 2004
CN 102121023 A	13 July 2011	CN 102121023 B	04 July 2012
CN 101563100 A	21 October 2009	CN 101563100 B	07 August 2013
		CA 2662101 A1	06 March 2008
		CN 101573134 A	04 November 2009
		EP 2056864 A2	13 May 2009
		KR 20090059122 A	10 June 2009
		US 2013149321 A1	13 June 2013
		CN 101573134 B	06 March 2013
		JP 2010502600 A	28 January 2010
		EP 2056864 A4	25 January 2012
		JP 5566105 B2	06 August 2014
		DK 2056864 T3	10 March 2014
		AU 2007290881 B2	07 March 2013
		EA 200970233 A1	28 August 2009
		EA 016250 B1	30 March 2012
		EP 2056864 B1	11 December 2013
		CA 2662101 C	07 July 2015
		WO 2008026999 A2	06 March 2008
		WO 2008026999 A3	22 May 2008
		AU 2007290881 A1	06 March 2008
		US 8318661 B2	27 November 2012
		ES 2451015 T3	26 March 2014
		US 2016243204 A1	25 August 2016
		MX 2009002226 A	07 September 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089060

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2010099600 A1	22 April 2010
CN 87104683 A	21 December 1988	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089060

A. 主题的分类

A61K 38/48(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CJFD;CNABS;DWPI;SIPOABS;VEN;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;GOOGLE;PUBMED;GenBank;EBI;ISI Web of knowledge;CNKI:profibrinolysin, 肾损伤, plasminogen, 损伤, 肾组织损伤, plg, 纤维溶酶原, 肾炎, 纤维蛋白溶解酶原, 肾功能衰竭, kidney injury, 纤溶酶原, profibrolysin, 肾小管坏死, 纤维蛋白溶酶原, SEQ ID NOs: 2、6、8、10、12

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
X	CN 101573134 A (欧姆尼治疗有限公司) 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04) 说明书第5页第5段, 第10页第2-4段, 第12页第5段, 第15页第3-4, 6-7段, 第34页第4段	1-5, 9-14, 16-46, 49-53, 55-66
Y	CN 101573134 A (欧姆尼治疗有限公司) 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04) 说明书第5页第5段, 第10页第2-4段, 第12页第5段, 第15页第3-4, 6-7段, 第34页第4段	6-8, 15, 47-48, 54
Y	孙海鸥. “药物性肾损害的机制及其临床表现” 肾脏病与透析肾移植杂志, 第15卷, 第3期, 2006年 6月 30日 (2006 - 06 - 30), 第252页左栏第1段, 第253页左栏第2段, 第255页表1	6-8, 15
Y	CN 1768138 A (N-酶生物技术有限公司) 2006年 5月 3日 (2006 - 05 - 03) 说明书序列表序列17, 18, 32	47-48, 54
X	CN 102121023 A (中山大学) 2011年 7月 13日 (2011 - 07 - 13) 说明书第2, 5, 8-9, 23-25段	1-3, 16, 22-24, 27, 49-53, 55-66
A	CN 101563100 A (欧姆尼治疗有限公司) 2009年 10月 21日 (2009 - 10 - 21) 全文	1-66

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 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

国际检索实际完成的日期

2017年 9月 4日

国际检索报告邮寄日期

2017年 9月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

张艳青

电话号码 (86-10)010-61648130

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	CN 87104683 A (埃默里大学) 1988年 12月 21日 (1988 - 12 - 21) 全文	1-66

第I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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，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申请中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： 1-58
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1-58涉及疾病治疗的方法，属于PCT细则第39.1(iv)规定的不必进行检索的主题。本次检索基于纤溶酶原的制药用途作出。
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/CN2017/089060

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)
CN	101573134	A	2009年 11月 4日	CN	101563100	B	2013年 8月 7日
				CA	2662101	A1	2008年 3月 6日
				EP	2056864	A2	2009年 5月 13日
				KR	20090059122	A	2009年 6月 10日
				US	2013149321	A1	2013年 6月 13日
				CN	101573134	B	2013年 3月 6日
				JP	2010502600	A	2010年 1月 28日
				EP	2056864	A4	2012年 1月 25日
				JP	5566105	B2	2014年 8月 6日
				DK	2056864	T3	2014年 3月 10日
				AU	2007290881	B2	2013年 3月 7日
				EA	200970233	A1	2009年 8月 28日
				EA	016250	B1	2012年 3月 30日
				EP	2056864	B1	2013年 12月 11日
				CA	2662101	C	2015年 7月 7日
				WO	2008026999	A2	2008年 3月 6日
				WO	2008026999	A3	2008年 5月 22日
				AU	2007290881	A1	2008年 3月 6日
				US	8318661	B2	2012年 11月 27日
				ES	2451015	T3	2014年 3月 26日
				US	2016243204	A1	2016年 8月 25日
				CN	101563100	A	2009年 10月 21日
				MX	2009002226	A	2009年 9月 7日
				US	2010099600	A1	2010年 4月 22日
CN	1768138	A	2006年 5月 3日	AU	2003210137	A1	2003年 9月 2日
				WO	03066842	A3	2004年 6月 10日
				JP	2005525798	A	2005年 9月 2日
				WO	03066842	A2	2003年 8月 14日
				MX	PA04007585	A	2005年 9月 20日
				CA	2475277	A1	2003年 8月 14日
				AU	2003210137	A8	2003年 9月 2日
				EP	1472346	A2	2004年 11月 3日
CN	102121023	A	2011年 7月 13日	CN	102121023	B	2012年 7月 4日
CN	101563100	A	2009年 10月 21日	CN	101563100	B	2013年 8月 7日
				CA	2662101	A1	2008年 3月 6日
				CN	101573134	A	2009年 11月 4日
				EP	2056864	A2	2009年 5月 13日
				KR	20090059122	A	2009年 6月 10日
				US	2013149321	A1	2013年 6月 13日
				CN	101573134	B	2013年 3月 6日
				JP	2010502600	A	2010年 1月 28日
				EP	2056864	A4	2012年 1月 25日
				JP	5566105	B2	2014年 8月 6日
				DK	2056864	T3	2014年 3月 10日
				AU	2007290881	B2	2013年 3月 7日
				EA	200970233	A1	2009年 8月 28日
				EA	016250	B1	2012年 3月 30日
				EP	2056864	B1	2013年 12月 11日
				CA	2662101	C	2015年 7月 7日
				WO	2008026999	A2	2008年 3月 6日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/089060

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 2008026999 A3	2008年 5月 22日
		AU 2007290881 A1	2008年 3月 6日
		US 8318661 B2	2012年 11月 27日
		ES 2451015 T3	2014年 3月 26日
		US 2016243204 A1	2016年 8月 25日
		MX 2009002226 A	2009年 9月 7日
		US 2010099600 A1	2010年 4月 22日
CN 87104683 A	1988年 12月 21日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)