



(21)申請案號：110110713

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 24 日

(51)Int. Cl. : A61K38/48 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

(30)優先權：2020/03/24 中國大陸

202010212922.4

(71)申請人：大陸商深圳瑞健生命科學研究院有限公司(中國大陸) TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES, CO. LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：李季男 LI, JINAN (CN)

(74)代理人：李貞儀；童啓哲

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：27 共 130 頁

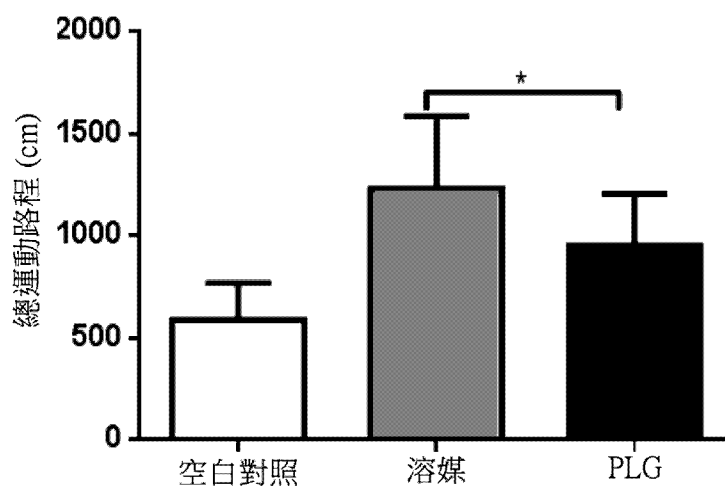
## (54)名稱

一種治療帕金森氏症的方法和藥物

## (57)摘要

本發明涉及一種預防和治療帕金森氏症的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖維蛋白溶酶原激活途徑組分。本發明還涉及用於治療上述病症的包含纖維蛋白溶酶原激活途徑組分的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

指定代表圖：



【圖1】



202144000

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】一種治療帕金森氏症的方法和藥物

【中文】

本發明涉及一種預防和治療帕金森氏症的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖維蛋白溶酶原激活途徑組分。本發明還涉及用於治療上述病症的包含纖維蛋白溶酶原激活途徑組分的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】一種治療帕金森氏症的方法和藥物

### 【技術領域】

【0001】 本發明涉及一種治療帕金森氏症的方法，包括給藥受試者有效量的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物，例如纖溶酶原，以改善臨床症狀和體徵。

### 【先前技術】

【0002】 帕金森氏症（Parkinson's disease, PD）是一種常見的神經系統變性疾病，老年人多見，平均發病年齡為60歲左右，40歲以下起病的青年帕金森氏症較少見。大部分帕金森氏症患者為散發病例，僅有不到10%的患者有家族史。帕金森氏症最主要的病理改變是中腦黑質多巴胺（dopamine, DA）能神經元的變性死亡，由此而引起紋狀體DA含量顯著性減少而致病。導致這一病理改變的確切病因目前仍不清楚，遺傳因素、環境因素、年齡老化、氧化應激等均可能參與PD多巴胺能神經元的變性死亡過程。

【0003】 帕金森氏症突出的病理改變是中腦黑質多巴胺（dopamine, DA）能神經元的變性死亡、紋狀體DA含量顯著性減少以及黑質殘存神經元胞質內出現嗜酸性包涵體，即路易小體（Lewy body）。除多巴胺能系統外，帕金森氏症患者的非多巴胺能系統亦有明顯的受損。如Meynert基底核的膽鹼能神經元，藍斑的去甲腎上腺素能神經元，腦幹中縫核的5-羥色胺能神經元，以及大腦皮質、腦幹、脊髓、以及外周自主神經系統的神經元。紋狀體多巴胺含量顯著下降與帕

金森氏症運動症狀的出現密切相關。中腦-邊緣系統和中腦-皮質系統多巴胺濃度的顯著降低與帕金森氏症患者出現智能減退、情感障礙等密切相關。

【0004】 帕金森氏症起病隱襲，進展緩慢。首發症狀通常是一側肢體的震顫或活動笨拙，進而累及對側肢體。臨床上主要表現為靜止性震顫、運動遲緩、肌強直和姿勢步態障礙。近年來人們越來越多的注意到抑鬱、便秘和睡眠障礙等非運動症狀亦是帕金森氏症患者常見的主訴，它們對患者生活質量的影響甚至超過運動症狀。

【0005】 藥物治療是帕金森氏症最主要的治療手段，能在一定程度上改善症狀，但不能阻止病情的進展，需要尋找其他的治療方法和藥物。

#### 【發明內容】

【0006】 本發明研究發現纖維溶酶原能夠促進帕金森氏症受試者記憶功能恢復、改善認知能力、促進黑質DTA表達、促進紋狀體尼氏體恢復、促進黑質GLP-1R表達、增加黑質TH陽性細胞數量、促進紋狀體髓鞘修復、促進腦組織中 $\alpha$ -突觸核蛋白降解、促使紋狀體NF表達、促進軸索損傷修復、減少紋狀體GFAP表達、減輕紋狀體神經元損傷、促進腦組織中Pro-BDNF裂解形成BDNF、改善抑鬱或焦慮症狀，從而具有開發成爲治療帕金森氏症藥物的潛力。

【0007】 具體地，本發明涉及如下各項：

【0008】 一方面，本申請涉及一種預防和治療帕金森氏症的方法，包括給藥帕金森氏症受試者治療有效量的選自如下的一種或多種化合物：纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分、能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的化合物、模擬纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶之活性的化合物、能夠上調纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶

原激活劑表達的化合物、纖維蛋白溶酶原類似物、纖維蛋白溶酶類似物、tPA或uPA類似物和纖溶抑制劑的拮抗劑。

**【0009】** 一方面，本申請涉及選自如下的一種或多種化合物在製備治療帕金森氏症的藥物中的用途，所述一種或多種化合物選自：纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分、能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的化合物、模擬纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶之活性的化合物、能夠上調纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶原激活劑表達的化合物、纖維蛋白溶酶原類似物、纖維蛋白溶酶類似物、tPA或uPA類似物和纖溶抑制劑的拮抗劑。

**【0010】** 一方面，本申請涉及用於治療帕金森氏症的包含選自如下的一種或多種化合物的藥物或藥物組合物，所述一種或多種化合物選自：纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分、能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的化合物、模擬纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶之活性的化合物、能夠上調纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶原激活劑表達的化合物、纖維蛋白溶酶原類似物、纖維蛋白溶酶類似物、tPA或uPA類似物和纖溶抑制劑的拮抗劑。

**【0011】** 2. 項1所述的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分選自纖維蛋白溶酶原、重組人纖維蛋白溶酶、Lys-纖維蛋白溶酶原、Glu-纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、含有纖維蛋白溶酶原和纖維蛋白溶酶的一個或多個kringle結構域和蛋白酶結構域的纖維蛋白溶酶原和纖維蛋白溶酶變體及類似物、小纖維蛋白溶酶原(mini-plasminogen)、小纖維蛋白溶酶(mini-plasmin)、微纖溶酶原(micro-plasminogen)、微纖溶酶(micro-plasmin)、delta-纖溶酶原、delta-纖溶酶(delta-plasmin)、纖維蛋白溶酶原激活劑、tPA和uPA。

【0012】 3. 項1的方法、用途、藥物或藥物組合物，所述纖維溶抑制劑的拮抗劑為PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha$ 2抗纖維溶酶或 $\alpha$ 2巨球蛋白的抑制劑，例如抗體。

【0013】 4. 項1-3任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述化合物對帕金森氏症受試者具有如下一項或多項作用：促進記憶功能恢復、改善認知能力、促進黑質DTA表達、促進紋狀體尼氏體恢復、促進黑質GLP-1R表達、增加黑質TH陽性細胞數量、促進紋狀體髓鞘修復、促進腦組織中 $\alpha$ -突觸核蛋白降解、促使紋狀體NF表達、促進軸索損傷修復、減少紋狀體GFAP表達、減輕紋狀體神經元損傷、促進腦組織中Pro-BDNF裂解形成BDNF、緩解抑鬱或焦慮症狀。

【0014】 5. 項1-4任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述化合物為纖維溶酶原。

【0015】 6. 項1-5任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述纖維溶酶原為人全長纖維溶酶原或其保守取代變體。

【0016】 7. 項1-5任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述纖維溶酶原與序列2具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維溶酶原的賴氨酸結合活性或蛋白水解活性。

【0017】 8. 項1-5任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，所述纖維溶酶原包含與序列14具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列、並且仍然具有纖維溶酶原的蛋白水解活性的蛋白質。

【0018】 9. 項1-5任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，所述纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原、Lys-纖維溶酶原、小纖維溶酶原、微纖維溶酶原、delta-纖維溶酶原或它們的保留纖維溶酶原的蛋白水解活性的變體。

【0019】 10. 項1-5任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，所述纖維溶酶原包含序列2、6、8、10、12所示的氨基酸序列或包含序列2、6、8、10、12所示氨基酸序列的保守取代變體。

【0020】 11. 項1-10任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述化合物與一種或多種其他治療方法或藥物聯合使用。

【0021】 12. 項11的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述其他治療方法包括細胞治療（包括幹細胞治療）和物理治療。

【0022】 13. 項11的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述其他藥物為治療帕金森氏症的其它藥物。

【0023】 14. 項1-13任一項的方法、用途、藥物或藥物組合物，其中所述化合物通過鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、靜脈內、腹膜內、皮下、顱內、鞘內、動脈內(例如經由頸動脈)或肌肉內給藥。在本發明的上述任一實施方案中，所述纖維溶酶原可與序列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，並且仍然具有纖維溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/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個氨基酸，並且仍然具有纖維溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的蛋白質。

【0024】 在一些實施方案中，所述纖維溶酶原是包含纖維溶酶原活性片段、並且仍然具有纖維溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的蛋白質。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原、Lys-纖維溶酶原、小纖維溶酶原、微纖維溶酶原、delta-纖維溶酶原或它們的保留纖維溶酶原活性，例如蛋白水解活性的變體。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原為天然或合成的人纖維溶酶原、或其仍然

保留纖維溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原為來自靈長類動物或嚙齒類動物的人纖維溶酶原直向同系物或其仍然保留纖維溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原的氨基酸如序列2、6、8、10或12所示。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原是人天然纖維溶酶原。

**【0025】** 在一些實施方案中，所述受試者是人。在一些實施方案中，所述受試者缺乏或缺失纖維溶酶原。在一些實施方案中，所述缺乏或缺失是先天的、繼發的和/或局部的。

**【0026】** 在一些實施方案中，所述藥物組合物包含藥學上可接受的載劑和用於前述方法的纖維溶酶原。在一些實施方案中，所述試劑盒可以是預防性或治療性試劑盒，其包含：**(i)**用於前述方法的纖維溶酶原和**(ii)**用於遞送所述纖維溶酶原至所述受試者的構件(means)。在一些實施方案中，所述構件為注射器或小瓶。在一些實施方案中，所述試劑盒還包含標籤或使用說明書，該標籤或使用說明書指示將所述纖維溶酶原投予所述受試者以實施前述任一方法。

**【0027】** 在一些實施方案中，所述製品包含：含有標籤的容器；和包含**(i)**用於前述方法的纖維溶酶原或包含纖維溶酶原的藥物組合物，其中所述標籤指示將所述纖維溶酶原或組合物投予所述受試者以實施前述任一方法。

**【0028】** 在一些實施方案中，所述試劑盒或製品還包含另外的一個或多個構件或容器，該構件或容器中含有其他藥物。

**【0029】** 在前述方法的一些實施方案中，所述纖維溶酶原通過全身或局部給藥，較佳通過以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下給予纖維溶酶原來進行治療。在前述方法的一些實施方案中，所述纖維溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在前述方法的一些實施方案中，所述纖維溶酶原以每天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 (以每公斤體重計算)或0.0001-2000mg/cm<sup>2</sup>、0.001-800 mg/cm<sup>2</sup>、0.01-600 mg/cm<sup>2</sup>、0.1-400 mg/cm<sup>2</sup>、1-200 mg/cm<sup>2</sup>、1-100 mg/cm<sup>2</sup>、10-100 mg/cm<sup>2</sup> (以每平方公分體表面積計算)的劑量施用,較佳至少重複一次,較佳至少每天施用。

**【0030】** 本發明明確涵蓋了屬於本發明實施方案之間的技術特徵的所有組合,並且這些組合後的技術方案在本申請中已經明確公開,就像上述技術方案已經單獨且明確公開一樣。另外,本發明還明確涵蓋各個實施方案及其要素的之間的組合,該組合後的技術方案在本文中明確公開。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0031】** 圖1給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗總運動路程統計結果。結果顯示,空白對照組小鼠在實驗期間會運動一定路程;給藥纖溶酶原組小鼠總運動路程明顯短於溶媒對照組,統計差異顯著(\*表示 $P<0.05$ ),且給纖溶酶原組小鼠總運動路程接近於空白對照組。說明纖溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性,緩解其焦慮。

**【0032】** 圖2給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗邊界區靜息時間率統計結果。結果顯示,空白對照組小鼠具有一定的邊界區靜息時間率;給纖溶酶原組小鼠邊界區靜息時間率明顯大於溶媒對照組,統計差異極為顯著(\*\*表示 $P<0.01$ ),且給纖溶酶原組邊界區靜息時間率接近於空白對照組。說明纖溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性,緩解其焦慮。

**【0033】** 圖3給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗邊界區運動路程統計結果。結果顯示,空白對照組小鼠具有一定的邊界區運動路程;給纖溶酶原組小鼠邊界區運動路程明顯小於溶媒對照組,統計差異接近顯著( $P=0.05$ ),

且給藥纖維溶酶原組邊界區運動路程接近於空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0034】 圖4給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗邊界區運動路程百分率統計結果。結果顯示，空白對照組具有一定的邊界區運動路程百分率；給纖維溶酶原組小鼠邊界區運動路程百分率明顯大於溶媒對照組，統計極為差異顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ），且給纖維溶酶原組邊界區運動路程百分率接近於空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0035】 圖5 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗邊界區慢速運動時間百分率計算結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界區慢速運動時間百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠邊界慢速運動時間百分率明顯低於溶媒對照組，統計差異極為顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ）；且給纖維溶酶原組邊界慢速運動時間百分率接近於空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0036】 圖6 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗邊界區時間百分率統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界區時間百分率；給纖維溶酶原組小鼠邊界區時間百分率高於溶媒對照組，統計差異接近顯著（ $P=0.06$ ），且給藥纖維溶酶原組邊界區時間百分率接近空白對照組。說明纖維溶酶原可提高帕金森模型小鼠趨避性行為水平，緩解其焦慮。

【0037】 圖7 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗進入邊界區次數統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定進入邊界區次數；給藥纖維溶酶原組小鼠進入邊界區次數明顯少於溶媒組，統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ），且給藥纖維溶酶原組小鼠進入邊界次數接近空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0038】 圖8 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗中心區運動路程統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區運動路程；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程明顯低於溶媒對照組小鼠，統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程接近空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0039】 圖9 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗中心區運動路程百分率統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區運動路程百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程百分率明顯低於溶媒對照組小鼠，統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程百分率接近空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0040】 圖10 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗中心區最大運動速度統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區最大運動速度；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區最大運動速度明顯小於溶媒對照組，統計差異極為顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ），且給藥纖維溶酶原組中心區最大運動速度接近於空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0041】 圖11 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗中心區時間百分率統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定地進入中心區時間百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區時間百分率明顯小於溶媒對照組，統計差異接近顯著（ $P=0.06$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠進入中心區時間百分率接近於空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0042】 圖12 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗進入中心區次數統計結果。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的進入中心區次數；給藥纖維溶酶原組小鼠進入中心區次數明顯少於溶媒對照組，統計差異明顯（\*表示

P<0.05)；且給藥纖維溶酶原組小鼠進入中心區次數接近空白對照組。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0043】 圖13 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠曠場實驗運動軌跡代表性圖片。結果顯示，空白對照組小鼠幾乎沒有中心區活動；給藥纖維溶酶原組小鼠表現出中心區活動明顯減少的趨勢相比於溶媒對照組，且接近於空白對照組小鼠。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0044】 圖14A-C給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質DTA免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒對照組，C為給纖維溶酶原組。結果顯示，空白對照組小鼠黑質多巴胺神經元表達一定量的DTA（箭頭標識），溶媒組小鼠黑質DTA的表達量低於空白對照組，而給藥纖維溶酶原組小鼠黑質DTA的表達量高於溶媒組，且接近空白對照組。該結果表明纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質DTA的表達。

【0045】 圖15A-D 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠紋狀體焦油紫染色結果。A為空白對照組，B為溶媒對照組，C為給纖維溶酶原組，D為紋狀體尼氏體數量分析結果。結果顯示，空白對照組小鼠紋狀體神經元存在一定數量的尼氏體（箭頭標識）；溶媒對照組小鼠紋狀體神經元尼氏體數量明顯多於空白對照組，且統計差異接近顯著（ $P=0.085$ ）；給纖維溶酶原組小鼠紋狀體神經元尼氏體數量與空白對照組無明顯差異，但明顯低於溶媒對照組，且統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）。該結果表明纖維溶酶原能夠影響帕金森模型小鼠紋狀體尼氏體數量。

【0046】 圖16A-C 給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質焦油紫染色結果。A為空白對照組，B為溶媒對照組，C為給纖維溶酶原組。結果顯示，空白對照組小鼠黑質中有一定量的尼氏體（箭頭標識）；溶媒對照組小鼠黑質中尼氏體數少於空白對照組；給纖維溶酶原組小鼠黑質尼氏體數高於溶媒組。該結果表明纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質尼氏體恢復。

【0047】 圖17A-C 給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質GLP-1R免疫組化結果。A為溶媒PBS組，B為給纖溶酶原組，C為平均光密度定量分析結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠黑質GLP-1R的表達量（箭頭標識）明顯多於溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）。該結果表明，纖溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠黑質GLP-1R的表達。

【0048】 圖18A-D 給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質TH免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒PBS組，C為給纖溶酶原組，D為定量分析結果。結果顯示，空白對照組小鼠黑質中存在一定量的TH陽性細胞（箭頭標識），溶媒組小鼠黑質中TH陽性細胞數減少，給纖溶酶原組小鼠黑質中TH陽性細胞數明顯高於溶媒組。該結果表明纖溶酶原可恢復帕金森模型小鼠黑質中TH陽性細胞。

【0049】 圖19 A-C給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質Iba-1免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒PBS組，C為給纖溶酶原組。結果顯示，空白對照組小鼠黑質有一定量的小膠質細胞（箭頭標識），溶媒組小鼠黑質中小膠質細胞數高於空白對照組，給纖溶酶原組小鼠黑質中小膠質細胞數明顯低於溶媒對照組，且接近於空白對照組。該結果顯示纖溶酶原可促使帕金森模型小鼠黑質小膠質細胞恢復。

【0050】 圖20 A-C 給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠紋狀體LFB免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒PBS組，C為給纖溶酶原組。結果顯示，空白對照組小鼠紋狀體存在一定量的髓鞘，溶媒組小鼠紋狀體髓鞘數少於空白對照組，給纖溶酶原組小鼠紋狀體髓鞘數明顯高於溶媒組。該結果顯示纖溶酶原可使帕金森模型小鼠紋狀體髓鞘恢復。

【0051】 圖21 A-D給予纖溶酶原14天後帕金森模型小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白（ $\alpha$ -synuclein）免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒組，C為給纖溶酶原組，D為平均光密度定量分析結果。結果顯示，空白對照組小鼠黑質僅有少量的

$\alpha$ -突觸核蛋白；溶媒組小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯高於空白對照組（\*表示 $P<0.05$ ）；給纖維溶酶原組小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒組，且統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）；給纖維溶酶原組小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的量趨近於空白對照組的。說明纖維溶酶原可減少帕金森模型小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的表達，改善神經損傷變性。

【0052】 圖22 A-D給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠紋狀體NF免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒組，C為給纖維溶酶原組，D為平均光密度定量分析結果。結果顯示，空白對照組小鼠紋狀體有一定量的NF（箭頭標識）；溶媒組小鼠紋狀體NF的量低於空白對照組；給纖維溶酶原組小鼠紋狀體中NF的量明顯高於溶媒組，且統計差異極顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ）。說明纖維溶酶原可促使帕金森模型小鼠紋狀體NF表達的恢復，改善帕金森紋狀體軸索損傷。

【0053】 圖23 A-C給予纖維溶酶原14天後帕金森模型小鼠紋狀體GFAP免疫組化結果。A為空白對照組，B為溶媒組，C為給纖維溶酶原組。結果顯示，空白對照組小鼠紋狀體有少量的GFAP表達（箭頭標識），溶媒組小鼠紋狀體GFAP的表達明顯高於空白對照組；給纖維溶酶原組小鼠紋狀體GFAP的表達低於溶媒組。說明纖維溶酶原可減少帕金森模型小鼠紋狀體GFAP表達，減輕紋狀體損傷。

【0054】 圖24 A-D在小鼠腦勻漿中纖維溶酶原對 $\alpha$ -突觸核蛋白的作用結果。A為Tricine-page，B、C、D分別為 $\alpha$ -突觸核蛋白、聚合物a、聚合物b條帶掃描定量分析結果。結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組（\*\*\*代表 $P<0.001$ ），且其聚合物a、b的量均明顯低於溶媒對照組（\*\*代表 $P<0.01$ ，\*\*\*代表 $P<0.001$ ）；在正常小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組（\*\*\*代表 $P<0.001$ ），且其聚合物a、b的量均明顯低於溶媒對照組（\*代表 $P<0.05$ ，\*\*代表 $P<0.01$ ）。表明在帕

金森模型小鼠和正常小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原可有效地促進人 $\alpha$ -突觸核蛋白及其聚合物降解。

**【0055】** 圖25 A-C 在小鼠腦勻漿中纖維溶酶原對重組人 $\alpha$ -突觸核蛋白的作用結果。A為Western-blotting圖，B、C分別為 $\alpha$ -突觸核蛋白、聚合物條帶掃描定量分析結果。結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組（\*\*代表 $P < 0.01$ ），且其聚合物的量均明顯低於溶媒對照組（\*\*\*代表 $P < 0.001$ ）；在正常小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組（\*\*代表 $P < 0.01$ ），且其聚合物的量均明顯低於溶媒對照組（\*\*\*代表 $P < 0.001$ ）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠腦勻漿中，纖維溶酶原可有效地促進重組人 $\alpha$ -突觸核蛋白及其聚合物降解。

**【0056】** 圖26 A-B在帕金森模型小鼠腦勻漿液中，纖維溶酶原對重組人Pro-BDNF的作用，A為SDS-PAGE成像圖片，B為SDS-PAGE條帶定量分析結果。結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿液中，給藥纖維溶酶原組Pro-BDNF的量明顯低於溶媒對照組，差異極顯著（\*\*\*代表 $P < 0.001$ ）。提示纖維溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠腦勻漿中重組人Pro-BDNF裂解。

**【0057】** 圖27A-C在帕金森模型小鼠腦勻漿液中，纖維溶酶原對重組人Pro-BDNF的作用。A為Western blot成像圖片，B為Western blot中Pro-BDNF條帶光密度(OD)值分析結果，C為Western blot中BDNF條帶光密度(OD)值分析結果。結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿液中，給藥纖維溶酶原組Pro-BDNF的量明顯低於溶媒對照組，差異顯著（\*代表 $P < 0.05$ ，\*\*\*表示 $P < 0.001$ ）；給藥纖維溶酶原組BDNF的量明顯高於溶媒對照組，差異極為顯著。提示纖維溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠腦勻漿液重組人Pro-BDNF裂解和成熟BDNF形成。

## 【實施方式】

**【0058】** 纖維蛋白溶解系統 (Fibrinolytic system) 亦稱纖溶系統，為參與纖維蛋白溶解 (纖溶) 過程的一系列化學物質組成的系統，主要包括纖維蛋白溶解酶原 (纖溶酶原)、纖溶酶、纖溶酶原激活物、纖溶抑制劑。纖溶酶原激活物包括組織型纖溶酶原激活物 (t-PA) 和尿激酶型纖溶酶原激活物 (u-PA)。t-PA 是一種絲氨酸蛋白酶，由血管內皮細胞合成。t-PA 激活纖溶酶原，此過程主要在纖維蛋白上進行；尿激酶型纖溶酶原激活物 (u-PA) 由腎小管上皮細胞和血管內皮細胞產生，可以直接激活纖溶酶原而不需要纖維蛋白作為輔因子。纖溶酶原 (PLG) 由肝臟合成，當血液凝固時，PLG 大量吸附在纖維蛋白網上，在 t-PA 或 u-PA 的作用下，被激活為纖溶酶，促使纖維蛋白溶解。纖溶酶 (PL) 是一種絲氨酸蛋白酶，作用如下：降解纖維蛋白和纖維蛋白原；水解多種凝血因子 V、VIII、X、VII、XI、II 等；使纖溶酶原轉變為纖溶酶；水解補體等。纖溶抑制物：包括纖溶酶原激活物抑制劑 (PAI) 和  $\alpha$ 2 抗纖溶酶 ( $\alpha$ 2-AP)。PAI 主要有 PAI-1 和 PAI-2 兩種形式，能特異性與 t-PA 以 1:1 比例結合，從而使其失活，同時激活 PLG。 $\alpha$ 2-AP 由肝臟合成，與 PL 以 1:1 比例結合形成複合物，抑制 PL 活性；FXIII 使  $\alpha$ 2-AP 以共價鍵與纖維蛋白結合，減弱了纖維蛋白對 PL 作用的敏感性。體內抑制纖溶系統活性的物質：PAI-1，補體 C1 抑制物； $\alpha$ 2 抗纖溶酶； $\alpha$ 2 巨球蛋白。

**【0059】** 本發明的術語“纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分”涵蓋：

**【0060】** 1. 纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、Glu-纖維蛋白溶酶原、微纖溶酶原 (micro-plasminogen)、delta-纖維溶酶原；它們的變體或類似物；

**【0061】** 2. 纖維蛋白溶酶以及它們的變體或類似物；和

**【0062】** 3. 纖維蛋白溶酶原激活劑，例如 tPA 和 uPA 以及包含一個或多個 tPA 或 uPA 的結構域 (如一個或多個 kringle 結構域和蛋白水解結構域) 的 tPA 或 uPA 變體和類似物。

**【0063】** 上述纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA和uPA的“變體”包括所有天然存在的人類遺傳變體以及這些蛋白質的其他哺乳動物形式，以及通過添加、刪除和/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個氨基酸、仍然具有纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA或uPA活性的蛋白質。例如，纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA和uPA的“變體”包括通過例如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個保守性氨基酸取代獲得的這些蛋白質的突變變體。

**【0064】** 本發明的“纖溶酶原變體”涵蓋與序列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，並且仍然具有纖溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的蛋白質。例如本發明的“纖溶酶原變體”可以是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/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個氨基酸，並且仍然具有纖溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的蛋白質。具體地，本發明纖溶酶原變體包括所有天然存在的人類遺傳變體以及這些蛋白質的其他哺乳動物形式，以及通過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個氨基酸獲得的這些蛋白質的突變變體。

**【0065】** 本發明的纖溶酶原可以為來自靈長類動物或嚙齒類動物的人纖溶酶原直向同系物或其仍然保留纖溶酶原活性，例如賴氨酸結合活性或蛋白水解活性的變體，例如序列2、6、8、10或12所示的纖溶酶原，例如序列2所示的人天然纖溶酶原。

【0066】 上述纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA和uPA的“類似物”包括分別提供與纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA或uPA基本相似的作用的化合物。

【0067】 上述纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA和uPA的“變體”和“類似物”涵蓋包含一個或多個結構域(例如一個或多個kringle結構域和蛋白水解結構域)的纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA和uPA的“變體”和“類似物”。例如，纖維蛋白溶酶原的“變體”和“類似物”涵蓋包含一個或多個纖維溶酶原結構域(例如一個或多個kringle結構域和蛋白水解結構域)的纖維蛋白溶酶原變體和類似物，例如小纖維蛋白溶酶原(mini-plasminogen)。纖維蛋白溶酶的“變體”和“類似物”涵蓋包含一個或多個纖維蛋白溶酶結構域(例如一個或多個kringle結構域和蛋白水解結構域)的纖維蛋白溶酶“變體”和“類似物”，例如小纖維蛋白溶酶(mini-plasmin)和 $\delta$ -纖維蛋白溶酶(delta-plasmin)。

【0068】 上述纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA或uPA的“變體”或“類似物”是否分別具有纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA或uPA的活性，或者是否分別提供與纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、tPA或uPA基本相似的作用可以通過本領域習知方法進行檢測，例如，通過基於酶譜法(enzymography)、ELISA(酶聯免疫吸附測定)和FACS(熒光激活細胞分選方法)通過激活的纖維蛋白溶酶活性水平來衡量，例如可以參照選自如下文獻中記載的方法測量：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".

第16頁，共 56 頁(發明說明書)

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.

**【0069】** 在本發明的一些實施方案中，本發明的“纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分”為纖溶酶原。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為人全長纖溶酶原或其保留纖溶酶原活性（例如其賴氨酸結合活性和蛋白水解活性）的保守取代變體。在一些實施方案中，所述纖溶酶原選自Glu-纖溶酶原、Lys-纖溶酶原、小纖溶酶原、微纖溶酶原、delta-纖溶酶原或它們的保留纖溶酶原活性（例如其賴氨酸結合活性或蛋白水解活性）的變體。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為天然或合成的人纖溶酶原、或其仍然保留纖溶酶原活性（例如其賴氨酸結合活性或蛋白水解活性）的保守取代變體或其片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為來自靈長類動物或啮齒類動物的人纖溶酶原直向同系物或其仍然保留纖溶酶原活性的保守取代變體或其片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原包含如序列2、6、8、10或12所示氨基酸序列。在一些實施方案中，所述纖溶酶原包含序列2、6、8、10或12所示的氨基酸序列的保守取代序列。在一些實施方案中，所述纖溶酶原的氨基酸如序列2、6、8、10或12所示。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為序列2、6、8、10或12所示的纖溶酶原的保守取代變體。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是人天然纖溶酶原或其保守突變體。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是如序列2所示的人天然纖溶酶原或其保守取代變體。

**【0070】** “能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的化合物”指能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的任何化合物，例如tPA、uPA、鏈激酶、沙蘆普酶、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、阿尼普酶、孟替普酶、拉諾替普酶、帕米普酶、葡激酶。

【0071】 本發明“纖溶抑制劑的拮抗劑”為拮抗、減弱、封閉、阻止纖溶抑制劑作用的化合物。所述纖溶抑制劑例如PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶和 $\alpha 2$ 巨球蛋白。所述拮抗劑例如PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的抗體，或阻斷或下調例如PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白表達的反義RNA或小RNA，或占據PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的結合位點但無PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白功能的化合物”，或封閉PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的結合結構域和/或活性結構域的化合物。

【0072】 纖溶酶是纖溶酶原激活系統（PA系統）的關鍵組分。它是一種廣譜的蛋白酶，能夠水解細胞外基質（ECM）的幾個組分，包括纖維蛋白、明膠、纖連蛋白、層粘連蛋白和蛋白聚糖。此外，纖溶酶能將一些金屬蛋白酶前體（pro-MMPs）激活形成具有活性的金屬蛋白酶（MMPs）。因此纖溶酶被認為是胞外蛋白水解作用的一個重要的上游調節物。纖溶酶是由纖溶酶原通過兩種生理性的PAs：組織型纖溶酶原激活劑（tPA）或尿激酶型纖溶酶原激活劑（uPA）蛋白水解形成的。由於纖溶酶原在血漿和其他體液中相對水平較高，傳統上認為PA系統的調節主要通過PAs的合成和活性水平實現。PA系統組分的合成受不同因素嚴格調節，如激素、生長因子和細胞因子。此外，還存在纖溶酶和PAs的特定生理抑制劑。纖溶酶的主要抑制劑是 $\alpha 2$ -抗纖溶酶（ $\alpha 2$ -antiplasmin）。PAs的活性同時被uPA和tPA的纖溶酶原激活劑抑制劑-1（PAI-1）抑制以及主要抑制uPA的溶酶原激活劑抑制劑-2（PAI-2）調節。某些細胞表面具有直接水解活性的uPA特异性細胞表面受體（uPAR）。

【0073】 纖溶酶原是一個單鏈糖蛋白，由791個氨基酸組成，分子量約為92 kDa。纖溶酶原主要在肝臟合成，大量存在於胞外液中。血漿中纖溶酶原含量約為2  $\mu$ M。因此纖溶酶原是組織和體液中蛋白質水解活性的一個巨大的潛在來

源。纖溶酶原存在兩種分子形式：谷氨酸-纖溶酶原（Glu-plasminogen）和賴氨酸-纖溶酶原(Lys-plasminogen)。天然分泌和未裂解形式的纖溶酶原具有一個氨基末端（N-末端）谷氨酸，因此被稱為谷氨酸-纖溶酶原。然而，在纖溶酶存在時，谷氨酸-纖溶酶原在Lys76-Lys77處水解成為賴氨酸-纖溶酶原。與谷氨酸-纖溶酶原相比，賴氨酸-纖溶酶原與纖維蛋白具有更高的親和力，並可以更高的速率被PAs激活。這兩種形式的纖溶酶原的Arg560-Val561肽鍵可被uPA或tPA切割，導致二硫鍵連接的雙鏈蛋白酶纖溶酶的形成。纖溶酶原的氨基末端部分包含五個同源三環，即所謂的kringles，羧基末端部分包含蛋白酶結構域。一些kringles含有介導纖溶酶原與纖維蛋白及其抑制劑 $\alpha$ 2-AP特異性相互作用的賴氨酸結合位點。最新發現一個纖溶酶原為38 kDa的片段，其中包括kringles 1-4，是血管生成的有效抑制劑。這個片段被命名為血管抑素，可通過幾個蛋白酶水解纖溶酶原產生。

**【0074】** 纖溶酶的主要底物是纖維蛋白，纖維蛋白的溶解是預防病理性血栓形成的關鍵。纖溶酶還具有對ECM幾個組分的底物特異性，包括層粘連蛋白、纖連蛋白、蛋白聚糖和明膠，表明纖溶酶在ECM重建中亦起著重要作用。間接地，纖溶酶還可以通過轉化某些蛋白酶前體為活性蛋白酶來降解ECM的其他組分，包括MMP-1，MMP-2，MMP-3和MMP-9。因此，有人提出，纖溶酶可能是細胞外蛋白水解的一個重要的上游調節器。此外，纖溶酶具有激活某些潛在形式的生長因子的能力。在體外，纖溶酶還能水解補體系統的組分並釋放趨化補體片段。

**【0075】** “纖溶酶”是存在於血液中的一種非常重要的酶，能將纖維蛋白凝塊水解為纖維蛋白降解產物和D-二聚體。

**【0076】** “纖溶酶原”是纖溶酶的酶原形式，根據swiss prot中的序列，按含有信號肽的天然人源纖溶酶原氨基酸序列（序列4）計算由810個氨基酸組成，分

第19頁，共 56 頁(發明說明書)

子量約為90kD，主要在肝臟中合成並能夠在血液中循環的糖蛋白，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全長的纖溶酶原包含七個結構域：位於C末端的絲氨酸蛋白酶結構域、N末端的Pan Apple(PAp)結構域以及5個Kringle結構域(Kringle1-5)。參照swiss prot中的序列，其信號肽包括殘基Met1-Gly19，PAp包括殘基Glu20-Val98，Kringle1包括殘基Cys103-Cys181，Kringle2包括殘基Glu184-Cys262，Kringle3包括殘基Cys275-Cys352，Kringle4包括殘基Cys377-Cys454，Kringle5包括殘基Cys481-Cys560。根據NCBI數據，絲氨酸蛋白酶域包括殘基Val581-Arg804。

【0077】 Glu-纖溶酶原是人天然全長的纖溶酶原，由791個氨基酸組成(不含有19個氨基酸的信號肽)，編碼該序列的cDNA序列如序列1所示，其氨基酸序列如序列2所示。在體內，還存在一種是從Glu-纖溶酶原的第76-77位氨基酸處水解從而形成的Lys-纖溶酶原，如序列6所示，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列5所示。Delta-纖溶酶原( $\delta$ -plasminogen)是全長纖溶酶原缺失了Kringle2-Kringle5結構的片段，僅含有Kringle1和絲氨酸蛋白酶域(亦稱蛋白酶結構域(protease domain, PD))，有文獻報導了delta-纖溶酶原的氨基酸序列(序列8)，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列7所示。小纖溶酶原(Mini-plasminogen)由Kringle5和絲氨酸蛋白酶域組成，有文獻報導其包括殘基Val443-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖溶酶原序列的Glu殘基為起始氨基酸)，其氨基酸序列如序列10所示，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列9所示。而微纖溶酶原(Micro-plasminogen)僅含有絲氨酸蛋白酶結構域，有文獻報導其氨基酸序列包括殘基Ala543-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖溶酶原序列的Glu殘基為起始氨基酸)，亦有專利文獻CN102154253A報導其序列包括殘基Lys531-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖溶酶原序列的Glu殘基為起始氨基酸)，在本專利申

請中微纖溶酶原序列參考專利文獻CN102154253A，其氨基酸序列如序列12所示，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列11所示。

**【0078】** 全長纖溶酶原的結構亦描述在 Aisina 等 (Aisina R B , Mukhametova L I . Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6):590-605)的文章中。在該文章中，Aisina等描述纖溶酶原包括Kringles 1、2、3、4、5結構域和絲氨酸蛋白酶結構域（亦稱蛋白酶結構域（protease domain，PD）），其中，Kringles負責纖溶酶原與低分子量和高分子量的配體結合（即賴氨酸結合活性），導致纖溶酶原轉變成一個更加開放的構型，從而更容易被活化；蛋白酶結構域（PD）為殘基Val562-Asn791，tPA和UPA特異性切割纖溶酶原的Arg561-Val562位活化鍵，從而使纖溶酶原形成纖溶酶，因此，蛋白酶結構域（PD）是賦予纖溶酶原蛋白水解活性的區域。本發明的“纖溶酶”與“纖維蛋白溶酶”、“纖維蛋白溶解酶”可互換使用，含義相同；“纖溶酶原”與“纖維蛋白溶酶原”、“纖維蛋白溶解酶原”可互換使用，含義相同。

**【0079】** 在本申請中，所述纖溶酶原“缺乏”的含義或活性為受試者體內纖溶酶原的含量比正常人低，低至足以影響所述受試者的正常生理功能；所述纖溶酶原“缺失”的含義或活性為受試者體內纖溶酶原的含量顯著低於正常人，甚至活性或表達極微，只有通過外源提供才能維持正常生理功能。

**【0080】** 所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，本發明纖溶酶原的所有技術方案適用於纖溶酶，因此，本發明描述的技術方案涵蓋了纖溶酶原和纖溶酶。在循環過程中，纖溶酶原採用封閉的非活性構象，但當結合至血栓或細胞表面時，在纖溶酶原激活劑(plasminogen activator，PA)的介導下，其轉變為呈開放性構象的活性纖溶酶。具有活性的纖溶酶可進一步將纖維蛋白凝塊水解為纖維蛋白降解產物和D-二聚體，進而溶解血栓。其中纖溶酶原的PAp結構域包含維持

纖溶酶原處於非活性封閉構象的重要決定簇，而KR結構域則能夠與存在於受體和底物上的賴氨酸殘基結合。習知多種能夠作為纖溶酶原激活劑的酶，包括：組織纖溶酶原激活劑(tPA)、尿激酶纖溶酶原激活劑(uPA)、激肽釋放酶和凝血因子XII(哈格曼因子)等。

**【0081】** “纖溶酶原活性片段”是指具有與底物靶序列中賴氨酸結合的活性（賴氨酸結合活性）、或發揮蛋白水解功能的活性（蛋白水解活性）、或蛋白水解活性和賴氨酸結合活性的片段。本發明涉及纖溶酶原的技術方案涵蓋了用纖溶酶原活性片段代替纖溶酶原的技術方案。在一些實施方案中，本發明所述的纖溶酶原活性片段包含纖溶酶原的絲氨酸蛋白酶結構域或由纖溶酶原的絲氨酸蛋白酶結構域組成。在一些實施方案中，本發明所述的纖溶酶原活性片段包含序列14、或包含與序列14具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列，或由序列14組成、或由與序列14具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列組成。在一些實施方案中，本發明所述的纖溶酶原活性片段包含選自Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4、Kringle 5中一個或多個的區域或其保守取代變體，或由選自Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4、Kringle 5中一個或多個的區域或其保守取代變體組成。在一些實施方案中，本發明所述的纖溶酶原包括含有上述纖溶酶原活性片段的蛋白質。目前，對於血液中纖溶酶原及其活性測定方法包括：對組織纖溶酶原激活劑活性的檢測(t-PAA)、血漿組織纖溶酶原激活劑抗原的檢測(t-PAAg)、對血漿組織纖溶酶原活性的檢測(plgA)、血漿組織纖溶酶原抗原的檢測(plgAg)、血漿組織纖溶酶原激活劑抑制物活性的檢測、血漿組織纖溶酶原激活劑抑制物抗原的檢測、血漿纖維蛋白溶酶-抗纖維蛋白溶酶複合物檢測(PAP)。其中最常用的檢測方法為發色底物法：向受檢血漿中加鏈激酶(SK)和發色底物，受檢血漿中的PLG在SK的作用下，轉變成PLM，後者作用於發色底物，隨後用分光光度計測定，

吸光度增加與纖維溶酶原活性成正比。此外亦可採用免疫化學法、凝膠電泳、免疫比濁法、放射免疫擴散法等對血液中的纖維溶酶原活性進行測定。

**【0082】** “直系同源物或直系同系物（ortholog）”指不同物種之間的同源物，既包括蛋白同源物亦包括DNA同源物，亦稱為直向同源物、垂直同源物。其具體指不同物種中由同一祖先基因進化而來的蛋白或基因。本發明的纖維溶酶原包括人的天然纖維溶酶原，還包括來源於不同物種的、具有纖維溶酶原活性的纖維溶酶原直系同源物或直系同系物。

**【0083】** “保守取代變體”是指其中一個給定的氨基酸殘基改變但不改變蛋白質或酶的整體構象和功能，這包括但不限於以相似特性（如酸性，鹼性，疏水性，等）的氨基酸取代親本蛋白質中氨基酸序列中的氨基酸。具有類似性質的氨基酸是眾所周知的。例如，精氨酸、組氨酸和賴氨酸是親水性的鹼性氨基酸並可以互換。同樣，異亮氨酸是疏水氨基酸，則可被亮氨酸，蛋氨酸或纈氨酸替換。因此，相似功能的兩個蛋白或氨基酸序列的相似性可能會不同。例如，基於MEGALIGN算法的70%至99%的相似度（同一性）。“保守取代變體”還包括通過BLAST或FASTA算法確定具有60%以上的氨基酸同一性的多肽或酶，若能達75%以上更好，最好能達85%以上，甚至達90%以上為最佳，並且與天然或親本蛋白質或酶相比具有相同或基本相似的性質或功能。

**【0084】** “分離的”纖維溶酶原是指從其天然環境分離和/或回收的纖維溶酶原蛋白。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原會純化(1)至大於90%、大於95%、或大於98%的純度(按重量計)，如通過Lowry法所確定的，例如超過99% (按重量計)，(2)至足以通過使用旋轉杯序列分析儀獲得N端或內部氨基酸序列的至少15個殘基的程度，或(3)至同質性，該同質性是通過使用考馬斯藍或銀染在還原性或非還原性條件下的十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)確定的。分離

的纖維溶酶原亦包括通過生物工程技術從重組細胞製備，並通過至少一個純化步驟分離的纖維溶酶原。

**【0085】** 術語“多肽”、“肽”和“蛋白質”在本文中可互換使用，指任何長度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遺傳編碼的和非遺傳編碼的氨基酸，化學或生物化學修飾的或衍生化的氨基酸，和具有經修飾的肽主鏈的多肽。該術語包括融合蛋白，包括但不限於具有異源氨基酸序列的融合蛋白，具有異源和同源前導序列(具有或沒有N端甲硫氨酸殘基)的融合物；等等。

**【0086】** 關於參照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分數(%)”定義為在必要時引入缺口以實現最大百分比序列同一性後，且不將任何保守替代視為序列同一性的一部分時，候選序列中與參照多肽序列中的氨基酸殘基相同的氨基酸殘基的百分率。為測定百分比氨基酸序列同一性目的的對比可以以本領域技術範圍內的多種方式實現，例如使用公眾可得到的計算機軟件，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalyn (DNASTAR) 軟件。所屬技術領域中具有通常知識者能決定用於比對序列的適宜參數，包括對所比較序列全長實現最大對比需要的任何算法。然而，為了本發明的目的，氨基酸序列同一性百分數值是使用序列比較計算機程序ALIGN-2產生的。

**【0087】** 在採用ALIGN-2來比較氨基酸序列的情況中，給定氨基酸序列A相對於給定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可表述為具有或包含相對於、與、或針對給定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的給定氨基酸序列A)如下計算：

**【0088】** 分數 $X/Y$  乘 100

**【0089】** 其中X是由序列比對程序ALIGN-2在該程序的A和B比對中評分為相同匹配的氨基酸殘基的數目，且其中Y是B中的氨基酸殘基的總數。應當領會，在氨基酸序列A的長度與氨基酸序列B的長度不相等的情况下，A相對於B的

%氨基酸序列同一性會不等於B相對於A的%氨基酸序列同一性。除非另有明確說明，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計算機程序獲得的。

**【0090】** 如本文中使用的，術語“治療”指獲得期望的藥理和/或生理效果。所述效果可以是完全或部分預防疾病或其症狀的發生、發作，部分或完全減輕疾病和/或其症狀，和/或部分或完全治愈疾病和/或其症狀，包括：(a)預防疾病在受試者體內發生或發作，所述受試者可以具有疾病的素因，但是尚未診斷為具有疾病；(b)抑制疾病，即阻滯其形成；和(c)減輕疾病和/或其症狀，即引起疾病和/或其症狀消退或消失。

**【0091】** 術語“個體”、“受試者”和“患者”在本文中可互換使用，指哺乳動物，包括但不限於鼠(大鼠、小鼠)、非人靈長類、人、犬、貓、有蹄動物(例如馬、牛、綿羊、豬、山羊)等。

**【0092】** “治療有效量”或“有效量”指在對哺乳動物或其它受試者施用以治療疾病時足以實現對疾病的所述預防和/或治療的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物(例如纖溶酶原)的量。“治療有效量”會根據所使用的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物(例如纖溶酶原)、要治療的受試者的疾病和/或其症狀的嚴重程度以及年齡、體重等而變化。

**【0093】** 本發明纖溶酶原的製備

**【0094】** 纖溶酶原可以從自然界分離並純化用於進一步的治療用途，亦可以通過標準的化學肽合成技術來合成。當通過化學合成多肽時，可以經液相或固相進行合成。固相多肽合成(SPPS)(其中將序列的C末端氨基酸附接於不溶性支持物，接著序貫添加序列中剩餘的氨基酸)是適合纖溶酶原化學合成的方法。各種形式的SPPS，諸如Fmoc和Boc可用於合成纖溶酶原。用於固相合成的技術描述於Barany和Solid-Phase Peptide Synthesis; 第3-284頁於The Peptides: Analysis, 第25頁，共56頁(發明說明書)

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。簡言之，用其上構建有肽鏈的功能性單元處理小的不溶性多孔珠。在偶聯/去保護的重複循環後，將附接的固相游離N末端胺與單個受N保護的氨基酸單元偶聯。然後，將此單元去保護，露出可以與別的氨基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上，之後將其切掉。

**【0095】** 可以使用標準重組方法來生產本發明的纖維溶酶原。例如，將編碼纖維溶酶原的核酸插入表達載體中，使其與表達載體中的調控序列可操作連接。表達調控序列包括但不限於啟動子(例如天然關聯的或異源的啟動子)、信號序列、增強子元件、和轉錄終止序列。表達調控可以是載體中的真核啟動子系統，所述載體能夠轉化或轉染真核宿主細胞(例如COS或CHO細胞)。一旦將載體摻入合適的宿主中，在適合於核苷酸序列的高水平表達及纖維溶酶原的收集和純化的條件下維持宿主。

**【0096】** 合適的表達載體通常在宿主生物體中作為附加體或作為宿主染色體DNA的整合部分複製。通常，表達載體含有選擇標誌物(例如氨苄青黴素抗性、潮黴素抗性、四環素抗性、卡那黴素抗性 or 新黴素抗性)以有助於對外源用期望的DNA序列轉化的那些細胞進行檢測。

**【0097】** 大腸桿菌(*Escherichia coli*)是可以用於複製主題抗體編碼多核苷酸的原核宿主細胞的例子。適合於使用的其它微生物宿主包括桿菌，諸如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)和其他腸桿菌科(*enterobacteriaceae*)，諸如沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*)、和各種假單胞菌屬(*Pseudomonas*)物種。在這些原核宿主中，亦可以生成表達載體，其通常會含有與宿主細胞相容的表達控制

序列(例如複製起點)。另外，會存在許多公知的啟動子，諸如乳糖啟動子系統，色氨酸(trp)啟動子系統，beta-內醯胺酶啟動子系統，或來自噬菌體λ的啟動子系統。啟動子通常會控制表達，任選在操縱基因序列的情況中，並且具有核糖體結合位點序列等，以啟動並完成轉錄和翻譯。

**【0098】** 其他微生物，諸如酵母亦可用於表達。酵母(例如釀酒酵母(*S. cerevisiae*))和畢赤酵母(*Pichia*)是合適的酵母宿主細胞的例子，其中合適的載體根據需要具有表達控制序列(例如啟動子)、複製起點、終止序列等。典型的啟動子包含3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分解酶。誘導型酵母啟動於特別包括來自醇脫氫酶、異細胞色素C、和負責麥芽糖和半乳糖利用的酶的啟動子。

**【0099】** 在微生物外，哺乳動物細胞(例如在體外細胞培養物中培養的哺乳動物細胞)亦可以用於表達並生成本發明的抗-Tau抗體(例如編碼主題抗-Tau抗體的多核苷酸)。參見Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合適的哺乳動物宿主細胞包括CHO細胞系、各種Cos細胞系、HeLa細胞、骨髓瘤細胞系、和經轉化的B細胞或雜交瘤。用於這些細胞的表達載體可以包含表達控制序列，如複製起點，啟動子和增強子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986))，以及必需的加工信息位點，諸如核糖體結合位點，RNA剪接位點，多聚腺苷酸化位點，和轉錄終止子序列。合適的表達控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳頭瘤病毒、巨細胞病毒等衍生的啟動子。參見Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

**【0100】** 一旦合成(化學或重組方式)，可以依照本領域的標準規程，包括硫酸銨沉澱，親和柱，柱層析，高效液相層析(HPLC)，凝膠電泳等來純化本發明所述的纖維溶酶原。該纖維溶酶原是基本上純的，例如至少約80%至85%純的，至少約85%至90%純的，至少約90%至95%純的，或98%至99%純的或更純的，例如不含污染物，所述污染物如細胞碎片，除目標產物以外的大分子，等等。

**【0101】** 藥物配製劑

**【0102】** 可以通過將具有所需純度的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物(例如纖溶酶原)與可選的藥用載體,賦形劑,或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol, A. ed.(1980))混合形成凍乾製劑或水溶液製備治療配製劑。可接受的載體、賦形劑、穩定劑在所用劑量及濃度下對受者無毒性,並包括緩衝劑例如磷酸鹽,檸檬酸鹽及其它有機酸;抗氧化劑包括抗壞血酸和蛋氨酸;防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨;氯化己烷雙胺;氯化苄烷銨(benzalkonium chloride), 苯索氯銨;酚、丁醇或苯甲醇;烷基對羥基苯甲酸酯如甲基或丙基對羥基苯甲酸酯;鄰苯二酚;間苯二酚;環己醇;3-戊醇;間甲酚);低分子量多肽(少於約10個殘基);蛋白質如血清白蛋白,明膠或免疫球蛋白;親水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,穀氨醯胺、天冬醯胺、組氨酸、精氨酸或賴氨酸;單糖,二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合劑如EDTA;糖類如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇;成鹽反離子如鈉;金屬複合物(例如鋅-蛋白複合物);和/或非離子表面活性劑,例如 TWEENTM, PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。較佳凍乾的抗-VEGF抗體配製劑在WO 97/04801中描述,其包含在本文中作為參考。

**【0103】** 本發明的配製劑亦可含有需治療的具體病症所需的一種以上的活性化合物,較佳活性互補並且相互之間沒有副作用的那些。

**【0104】** 本發明的纖溶酶原可包裹在通過諸如凝聚技術或界面聚合而製備的微膠囊中,例如,可置入在膠質藥物傳送系統(例如,脂質體,白蛋白微球,微乳劑,納米顆粒和納米膠囊)中或置入粗滴乳狀液中的羥甲基纖維素或凝膠-微膠囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊中。這些技術公開於 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

【0105】 用於體內給藥的本發明的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物(例如纖溶酶原)必需是無菌的。這可以通過在冷凍乾燥和重新配製之前或之後通過除菌濾膜過濾而輕易實現。

【0106】 本發明的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物(例如纖溶酶原)可製備緩釋製劑。緩釋製劑的適當實例包括具有一定形狀且含有糖蛋白的固體疏水聚合物半通透基質，例如膜或微膠囊。緩釋基質實例包括聚酯、水凝膠(如聚(2-羥基乙基-異丁烯酸酯)(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(美國專利3773919, EP 58,481)，L-谷氨酸與 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman，等，Biopolymers 22:547(1983))，不可降解的乙烯-乙基乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer，等，出處同上)，或可降解的乳酸-羥基乙酸共聚物如Lupron Depot<sup>TM</sup>(由乳酸-羥基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯組成的可注射的微球體)，以及聚D-(-)-3-羥丁酸。聚合物如乙烯-乙酸乙基酯和乳酸-羥基乙酸能持續釋放分子100天以上，而一些水凝膠釋放蛋白的時間却較短。可以根據相關機理來設計使蛋白穩定的合理策略。例如，如果發現凝聚的機理是通過硫代二硫鍵互換而形成分子間S-S鍵，則可通過修飾巯基殘基、從酸性溶液中凍乾、控制濕度、採用合適的添加劑、和開發特定的聚合物基質組合物來實現穩定。

【0107】 給藥和劑量

【0108】 可以通過不同方式，例如通過鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液或滴眼液，靜脈內，腹膜內、皮下、顱內、鞘內、動脈內(例如經由頸動脈)、肌內、直腸給藥來實現本發明藥物組合物的施用。

【0109】 用於胃腸外施用的製備物包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液和乳劑。非水性溶劑的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄欖油，和可注射有機酯，如油酸乙酯。水性載體包括水、醇性/水性溶液、乳劑或懸浮液，包括鹽水

和緩衝介質。胃腸外媒介物包含氯化鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化鈉、或固定油。靜脈內媒介物包含液體和營養補充物、電解質補充物，等等。亦可以存在防腐劑和其他添加劑，諸如例如，抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑、和惰性氣體，等等。

**【0110】** 醫務人員會基於各種臨床因素確定劑量方案。如醫學領域中公知的，任一患者的劑量取決於多種因素，包括患者的體型、體表面積、年齡、要施用的具體化合物、性別、施用次數和路徑、總體健康、和同時施用的其它藥物。本發明包含纖維溶酶原的藥物組合物的劑量範圍可以例如為每天約0.0001至2000 mg/kg，或約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)受試者體重。例如，劑量可以是1 mg/kg體重或50 mg/kg體重或在1-50 mg/kg的範圍，或至少1 mg/kg。高於或低於此例示性範圍的劑量亦涵蓋在內，特別是考慮到上述的因素。上述範圍中的中間劑量亦包含在本發明的範圍內。受試者可以每天、隔天、每周或根據通過經驗分析確定的任何其它日程表施用此類劑量。例示性的劑量日程表包括連續幾天0.01-100mg/kg。在本發明的藥物施用過程中需要實時評估治療效果和安全性。

**【0111】** 製品或藥盒

**【0112】** 本發明的一個實施方案涉及一種製品或藥盒，其包含纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物（例如纖維溶酶原）。所述製品較佳包括一個容器，標籤或包裝插頁。適當的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各種材料如玻璃或塑料製成。所述容器含有組合物，所述組合物可有效治療本發明的疾病或病症並具有無菌入口(例如所述容器可為靜脈內溶液包或小瓶，其含有可被皮下注射針穿透的塞子的)。所述組合物中至少一種活性劑為纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物（例如纖維溶酶原）。所述容器上或所附的標籤說明所述組合物用於治療本發明所述病症。所述製品可進一步包含含有可藥用緩衝

液的第二容器，諸如磷酸鹽緩衝的鹽水，林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可進一步包含從商業和使用者角度來看所需的其它物質，包括其它緩衝液，稀釋劑，過濾物，針和注射器。此外，所述製品包含帶有使用說明的包裝插頁，包括例如指示所述組合物的使用者將包含纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物（例如纖溶酶原）的組合物以及治療伴隨的疾病的其它藥物給藥患者。

### 【0113】 實施例

【0114】 以下所有實施例中使用的人纖溶酶原來自捐贈者血漿，基於如下文獻描述的方法：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；Summaria L, Spitz F, Arzadon L et al. Isolation and characterization of the affinity chromatography forms of human Glu- and Lys-plasminogens and plasmins. J Biol Chem. 1976 Jun 25;251(12):3693-9；HAGAN JJ, ABLONDI FB, DE RENZO EC. Purification and biochemical properties of human plasminogen. J Biol Chem. 1960 Apr;235:1005-10，並進行製程優化，從人捐贈者血漿中純化所得。纖溶酶原單體的純度>98%。

### 【0115】 實施例1 纖溶酶原改善帕金森模型小鼠自發活動及趨避性行爲

【0116】 取10-12周齡雄性C57BL/6J小鼠28隻，造模前1天所有小鼠稱重並根據體重隨機分爲2組，空白對照組8隻，模型組20隻。空白對照組小鼠腹腔注射生理鹽水溶液200 $\mu$ l，模型組小鼠按照35mg/kg/隻腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[1]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP（Sigma，M0896）溶解在9ml生理鹽水溶液中，配製最終濃度爲5mg/ml。造模完成後即造模第6天所有小鼠進行體重測量及曠場行爲學檢測。模型組小鼠按體重及曠場結果隨機分爲2組，給藥組10隻小鼠和溶媒組10隻小鼠，並開始給藥，記爲第1天，給藥組

第31頁，共 56 頁(發明說明書)

小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ l /隻纖溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ l/隻溶媒溶液(10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4)，持續給藥14天，於給藥第15天進行曠場實驗。

**【0117】** MPTP是一種特定的強黑質毒素，其代謝產物MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium)是線粒體複合體I抑制劑，可透過血腦屏障，阻斷線粒體氧化呼吸鏈等途徑損傷黑質體和紋狀體中多巴胺神經元，模擬人類帕金森症狀<sup>[2]</sup>。

**【0118】 曠場實驗**

**【0119】** 實驗時，小鼠放入曠場(40×40×40cm)底面中心，同時進行攝像和計時，持續觀察5分鐘，每隻小鼠進行3次實驗。記錄參數包括總移動距離、邊界靜息時間率、邊界區運動路程、邊界區運動路程百分率、邊界區慢速運動時間百分率、邊界區時間百分率、進入邊界區次數、中心區運動路程、中心區運動路程百分率、中心區最大運動速度、中心區時間百分率、進入中心區次數、運動軌跡。每次實驗後採用70%酒精擦拭箱體防止嗅覺產生的偏好。

**【0120】** 曠場實驗的設計原理是基於小鼠的趨避性，指的是小鼠畏懼開闊、未知、可能存在潛在危險的場所，因而其有“貼牆”活動的天性。總路程和平均速度被視為反映小鼠自發活動的主要數據，趨避性是以小鼠在曠野周邊區(四個角和四個邊)的活動來評價的。從反映趨避性的周邊區活動時間看，時間減少，說明小鼠更富有“冒險”傾向。在中央區活動時間顯著增多，說明趨避性和焦慮(抑鬱)水平較低。

**【0121】 總體活動情況**

**【0122】 總運動路程**

**【0123】** 總運動路程是指規定測試時間內運動軌跡的長度。

**【0124】** 結果顯示，空白對照組在實驗期間會運動一定路程；給纖溶酶原組小鼠總運動路程明顯短於溶媒對照組，統計差異顯著(\*表示P<0.05)，且給

纖維溶酶原組總運動路程接近於空白對照組（圖1）。說明纖維溶酶原可使帕金森模型小鼠自發活動行為恢復。

**【0125】 邊界區活動情況**

**【0126】 邊界區靜息時間率**

**【0127】** 邊界區為曠野周邊區（四個角和四個邊）。邊界區靜息時間率是指：邊界區靜息時間與總靜息時間（包括邊界區靜息時間和中心區靜息時間）的比值。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界區靜息時間率；給纖維溶酶原組小鼠邊界區靜息時間率明顯大於溶媒對照組，統計差異極為顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ），且給纖維溶酶原組邊界靜息時間率接近於空白對照組（圖2）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性行為，緩解其焦慮。

**【0128】 邊界區運動路程**

**【0129】** 邊界區運動路程指規定測試時間內邊界區運動軌跡的長度。結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界運動路程；溶媒對照組小鼠邊界運動路程長於給纖維溶酶原組，統計差異接近顯著（ $P=0.05$ ）；且給纖維溶酶原組邊界區運動路程接近空白對照組（圖3）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠的趨避性，緩解其焦慮。

**【0130】 邊界區運動路程百分率**

**【0131】** 邊界區運動路程百分率指邊界區運動路程與總運動路程（包括邊界區運動路程和中心區運動路程）的比值。

**【0132】** 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界運動路程百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠邊界區運動路程百分率明顯高於溶媒對照組，統計差異極為顯著（\*\*表示 $P<0.01$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠邊界運動路程百分率接近空白對照組（圖4）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性行為，緩解其焦慮。

**【0133】 邊界區慢速運動時間百分率**

第33頁，共 56 頁(發明說明書)

【0134】 邊界區慢速運動時間百分率指測試時間內邊界區慢速運動的時間與總測試時間的比值。

【0135】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界區慢速運動時間百分率；給纖維溶酶原組小鼠邊界慢速運動時間百分率明顯小於溶媒對照組，統計差異極為顯著 (\*\*表示 $P<0.01$ )；且給纖維溶酶原組邊界慢速運動時間百分率接近於空白對照組 (圖5)。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0136】 邊界區時間百分率

【0137】 邊界區時間百分率指邊界區時間與總的測試時間的比值。

【0138】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的邊界區時間百分率；給纖維溶酶原組小鼠邊界區時間百分率明顯高於溶媒對照組小鼠，統計差異接近顯著 ( $P=0.06$ )，且給藥纖維溶酶原組邊界區時間百分率接近空白對照組 (圖6)。說明纖維溶酶原可提高帕金森模型小鼠趨避性行為水平，緩解其焦慮。

【0139】 進入邊界區次數

【0140】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定進入邊界區次數；給纖維溶酶原組小鼠進入邊界區次數明顯低於溶媒對照組小鼠，統計差異顯著 (\*表示 $P<0.05$ )；且給藥纖維溶酶原組小鼠進入邊界區的次數接近空白對照組 (圖7)。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0141】 中心區活動情況

【0142】 中心區運動路程

【0143】 中心區運動路程指測試時間內中心區運動軌跡的長度。

【0144】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區運動路程；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程明顯低於溶媒對照組小鼠，統計差異顯著 (\*表示 $P<0.05$ )；且給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程接近空白對照組 (圖8)。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠的趨避性，緩解其焦慮。

【0145】 中心區運動路程百分率

【0146】 中心區運動路程百分率指測試時間內中心區運動軌跡的長度與總的運動軌跡長度的比值。

【0147】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區運動路程百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程百分率明顯低於溶媒對照組小鼠，統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠中心區運動路程百分率接近空白對照組（圖9）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0148】 中心區最大運動速度

【0149】 中心區最大運動速度指測試時間內中心區的最快運動速度。

【0150】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定的中心區最大運動速度；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區最大運動速度明顯小於溶媒對照組，統計差異極為明顯（\*\*表示 $P<0.01$ ），且給藥纖維溶酶原組中心區最大運動速度接近於空白對照組（圖10）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0151】 中心區時間百分率

【0152】 中心區時間百分率指中心區的運動時間與總測試時間的比值。

【0153】 結果顯示，空白對照組小鼠具有一定地進入中心區時間百分率；給藥纖維溶酶原組小鼠中心區時間百分率明顯小於溶媒對照組，統計差異接近顯著（ $P=0.06$ ）；且給藥纖維溶酶原組中心區時間百分率接近於空白對照組（圖11）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

【0154】 進入中心區次數

【0155】 結果顯示，空白對照組小鼠很少進入中心區，表現出正常的趨避天性；給藥纖維溶酶原組小鼠進入中心區次數明顯少於溶媒對照組，統計差異明顯（\*表示 $P<0.05$ ）；且給藥纖維溶酶原組小鼠進入中心區次數接近空白對照組（圖12）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

**【0156】 運動軌跡**

**【0157】** 結果顯示，曠場實驗期間空白對照組小鼠具有一定的總運動路程並且幾乎沒有中心區活動；相比於溶媒對照組，給藥纖維溶酶原組小鼠表現出總運動路程和中心區活動均有明顯減少的趨勢，且接近於空白對照組小鼠（圖13）。說明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠趨避性，緩解其焦慮。

**【0158】 實施例2 纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質DTA表達**

**【0159】** 取10-12周齡雄性C57BL/6J小鼠40隻，造模前1天所有小鼠稱重並根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組32隻。空白對照組小鼠腹腔注射溶媒溶液200 $\mu$ l，模型組小鼠按照40mg/kg/隻腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[1]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP（Sigma，M0896）溶解在9ml生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/ml。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各16隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ l/隻纖維溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ l/隻溶媒溶液（10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4），持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠黑質於10%中性甲醛溶液固定24-48小時。固定後的黑質組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01MPBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗鼠多巴胺轉運蛋白(dopamine transporter，DAT)抗體(ab7260, Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam)二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc, USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗

5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

**【0160】** 帕金森氏症 (Parkinson disease, PD) 是一種神經退行性疾病，其病理特徵為黑質紋狀體多巴胺能神經元進行性死亡，以及殘存的多巴胺能神經元胞漿內路易小體形成，基底節區多巴胺缺乏，進而導致發生PD經典運動障礙症狀。多巴胺轉運蛋白(dopamine transporter, DAT)位於多巴胺神經元突觸前膜，能重新攝取釋放至突觸間隙的多巴胺遞質，反映多巴胺神經元突觸前功能。DAT減少與PD發展關係密切<sup>[3]</sup>。

**【0161】** 結果顯示，空白對照組 (圖14A) 小鼠黑質多巴胺神經元表達一定量的DTA (箭頭標識)，溶媒組 (圖14B) 小鼠黑質DTA的表達量低於空白對照組，給藥纖維溶酶原組 (圖14C) 小鼠黑質DTA的表達量高於溶媒組。該結果表明纖維溶酶原可增強帕金森模型小鼠黑質DTA的表達。

**【0162】 實施例3 纖維溶酶原可促使帕金森模型小鼠紋狀體尼氏體恢復**

**【0163】** 取10-12周齡雄性C57BL/6J小鼠40隻，造模前1天所有小鼠稱重並根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組32隻。空白對照組小鼠腹腔注射溶媒溶液200 $\mu$ l，模型組小鼠按照40mg/kg/隻腹腔注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[1]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP (Sigma, M0896) 溶解在9ml生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/ml。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各16隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ l/隻纖維溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ l/隻溶媒溶液(10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4)，持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠紋狀體於10%中性甲醛溶液固定24-48小時。固定後的紋狀體組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為3 $\mu$ m，脫蠟至

水後，用0.4%焦油紫染液（pH=3）進行染色。梯度酒精脫水，二甲苯透明，中性樹膠封片。切片在400倍光學顯微鏡下觀察拍照。

**【0164】** PD主要的病理變化是黑質紋狀體多巴胺能神經元進行性變性壞死，導致紋狀體多巴胺遞質水平下降，從而引起整個基底神經節環路功能紊亂<sup>[3]</sup>。尼氏體又稱嗜染質，是神經細胞所特有的結構，由許多平行排列的粗面內質網和分布期間的游離核糖體組成，具有合成蛋白的功能，其數量和分布與神經元的功能狀態密切相關，被視為神經細胞存活的標誌<sup>[4]</sup>。結果顯示，空白對照組（圖15A）小鼠紋狀體神經元存在一定數量的尼氏體（箭頭標識）；溶媒對照組（圖15B）小鼠紋狀體神經元尼氏體數量明顯多於空白對照組，且統計差異接近顯著（ $P=0.085$ ）；給纖溶酶原組（圖15C）小鼠紋狀體神經元尼氏體數量與空白對照組無明顯差異，但明顯低於溶媒對照組，且統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）（圖15D）。該結果表明纖溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠紋狀體尼氏體恢復。

**【0165】 實施例4 纖溶酶原可促使帕金森模型小鼠黑質尼氏體數量恢復**

**【0166】** 取10~12周齡C57BL/6J雄性小鼠28隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組20隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ l生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/ml MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在9ml生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/ml。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各10隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ l /隻纖溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ l/隻溶媒溶液（10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4），持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠黑質於10%中性甲醛溶液固定24-48小時。固定後的黑質組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為3 $\mu$ m，脫

蠟至水後，用0.4%焦油紫染液（pH=3）進行染色。梯度酒精脫水，二甲苯透明，中性樹膠封片。切片在400倍光學顯微鏡下觀察拍照。

**【0167】** 結果顯示，空白對照組（圖16A）小鼠黑質中有一定量的尼氏體（箭頭標識），溶媒組（圖16B）小鼠黑質中尼氏體數減少，給纖維溶酶原組（圖16C）小鼠黑質尼氏體數高於溶媒組。該結果表明纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質尼氏體數量恢復。

**【0168】 實施例5 纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質GLP-1R的表達**

**【0169】** 取9周齡C57雄性小鼠12隻，造模前1天稱重，小鼠按照30mg/kg體重每天腹腔注射5mg/ml MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[6-7]</sup>。MPTP溶液配製：用注射器吸取10ml去離子水，加入到100mg MPTP粉末（sigma，M0896）中，配製成10mg/ml的母液，然後吸取1ml母液於安瓶中，再加入1ml去離子水，最終濃度為5mg/ml。造模完成後小鼠隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各6隻小鼠，並開始給藥，記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠按照1mg/0.1ml/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原溶液，給溶媒PBS對照組尾靜脈給予相同體積PBS，持續給藥14天。於給藥第15天犧牲小鼠，快速取材大腦於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的腦組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為4 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠GLP-1R抗體（NOVUS, NBP1-97308）4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔IgG（HRP）抗體（Abcam）二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒（Vector laboratories, Inc., USA）顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在200倍光學顯微鏡下觀察。

【0170】 胰高血糖素樣肽1受體( glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R ) 是胰高血糖素受體家族成員之一，是一種G蛋白偶聯受體，能通過促進胰島素的分泌調節血糖水平<sup>[8-9]</sup>。帕金森氏病的特點是黑質紋狀體神經元多巴胺能信號缺失，而黑質紋狀體亦表達GLP-1R<sup>[10]</sup>。

【0171】 結果顯示，給纖維溶酶原組(圖17B)小鼠黑質GLP-1R的表達量(箭頭標識)明顯多於溶媒PBS對照組(圖17A)，且統計差異顯著(\*表示 $P < 0.05$ ) (圖17C)。該結果表明，纖維溶酶原能夠增強帕金森模型小鼠黑質GLP-1R的表達。

#### 【0172】 實施例6 纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠黑質TH的表達

【0173】 取9周齡C57雄性小鼠12隻，造模前1天稱重，小鼠按照30mg/kg體重每天腹腔注射5mg/ml MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[6-7]</sup>。MPTP溶液配製：用注射器吸取10ml去離子水，加入到100mg MPTP粉末( sigma, M0896 ) 中，配製成10mg/ml的母液，然後吸取1ml母液於安瓶中，再加入1ml去離子水，最終濃度為5mg/ml。造模完成後小鼠隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各6隻小鼠，並開始給藥，記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠按照1mg/0.1ml /隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原溶液，給溶媒PBS對照組尾靜脈給予相同體積 PBS，持續給藥14天。於給藥第15天犧牲小鼠，取材小鼠黑質於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的腦組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液( Vector laboratories, Inc., USA ) 封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠TH抗體(Proteintech, 25859-1-AP) 4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam)二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc., USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30

秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

**【0174】** 酪氨酸羥化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 是酪氨酸合成左旋多巴 (L-dopa) 的限速酶，僅在胞漿中表達，多巴胺神經元中含量豐富。黑質中TH陽性神經元大多是多巴胺能的，因此TH可作為黑質中多巴胺能神經元的標誌物，黑質中TH表達量成為檢測PD的指標<sup>[11]</sup>。

**【0175】** 結果顯示，空白對照組 (圖18A) 小鼠黑質中有一定量的TH陽性細胞 (箭頭標識)，溶媒組 (圖18B) 小鼠黑質中TH陽性細胞數減少，給纖維溶酶原組 (圖18C) 小鼠黑質中TH陽性細胞數明顯高於溶媒組。該結果表明纖維溶酶原可增加帕金森模型小鼠黑質中TH陽性細胞數量。

#### **【0176】 實施例7 纖維溶酶原影響帕金森模型小鼠黑質小膠質細胞數量**

**【0177】** 取9周齡C57雄性小鼠12隻，造模前1天稱重，小鼠按照30mg/kg體重每天腹腔注射5mg/ml MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[6-7]</sup>。MPTP溶液配製：用注射器吸取10ml去離子水，加入到100mg MPTP粉末 (sigma, M0896) 中，配製成10mg/ml的母液，然後吸取1ml母液於安瓶中，再加入1ml去離子水，最終濃度為5mg/ml。造模完成後小鼠隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各6隻小鼠，並開始給藥，記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠按照1mg/0.1ml/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原溶液，給溶媒PBS對照組尾靜脈給予相同體積PBS，持續給藥14天。於給藥第15天犧牲小鼠，取材小鼠中腦黑質於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的黑質經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠Iba-1抗體 (Abcam, ab178847) 4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊

抗兔 IgG (HRP) 抗體 (Abcam) 二抗室溫孵育 1 小時，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分鐘。按 DAB 試劑盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 顯色，水洗 3 次後蘇木素複染 30 秒，流水沖洗 5 分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在 400 倍光學顯微鏡下觀察。

**【0178】** 小膠質細胞是中樞神經系統固有免疫細胞，在腦病變或損傷時被活化。活化的小膠質細胞遷移到損傷部位，發揮多種功能，例如吞噬死細胞、增加促炎性細胞因子等，參與各種中樞神經系統疾病<sup>[12-14]</sup>。Iba-1 ( Ionized calcium binding adapter molecule 1 ) 是一約 17kDa 的鈣結合蛋白，在中樞神經系統小膠質細胞中特異性表達，已被廣泛用作小膠質細胞標記物<sup>[15-17]</sup>。

**【0179】** 結果顯示，空白對照組 (圖 19A) 小鼠黑質有一定數量的小膠質細胞 (箭頭標識)，溶媒對照組 (圖 19B) 小鼠黑質中小膠質細胞數高於空白對照組，給纖維溶酶原組 (圖 19C) 小鼠黑質中小膠質細胞數明顯低於溶媒對照組，且接近於空白對照組。該結果顯示纖維溶酶原影響帕金森模型小鼠黑質小膠質細胞數量。

#### **【0180】 實施例 8 纖維溶酶原可促進帕金森模型小鼠紋狀體髓鞘恢復**

**【0181】** 取 9 周齡 C57 雄性小鼠 12 隻，造模前 1 天稱重，小鼠按照 30mg/kg 體重每天腹腔注射 5mg/ml MPTP 溶液，連續注射 5 天，建立帕金森模型<sup>[6-7]</sup>。MPTP 溶液配製：用注射器吸取 10ml 去離子水，加入到 100mg MPTP 粉末 (sigma, M0896) 中，配製成 10mg/ml 的母液，然後吸取 1ml 母液於安瓶中，再加入 1ml 去離子水，最終濃度為 5mg/ml。造模完成後小鼠隨機分為兩組，給溶媒 PBS 對照組和給纖維溶酶原組各 6 隻，並開始給藥，記為第 1 天，給纖維溶酶原組小鼠按照 1mg/0.1ml /隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原溶液，給溶媒 PBS 對照組尾靜脈給予相同體積 PBS，持續給藥 14 天。於給藥第 15 天犧牲小鼠，取材小鼠紋狀體於 10% 中性甲醛溶液固定 24-48 小時。固定後的紋狀體組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組

織切片厚度為3 $\mu$ m，脫蠟至水後，用0.1%LFB染液進行染色密封浸染8-16h。梯度酒精脫水，二甲苯透明，中性樹膠封片。切片在400倍光學顯微鏡下觀察拍照。

**【0182】** 神經退行性疾病是指由大腦和脊髓的神經元或其髓鞘的喪失所導致的疾病。LFB (Luxol fast blue) 是一種髓鞘特異性染色方法，可反映髓鞘受損情況<sup>[18-19]</sup>。

**【0183】** 結果顯示，空白對照組(圖20A)小鼠紋狀體存在一定量的髓鞘，溶媒組(圖20B)小鼠紋狀體髓鞘染色少於空白對照組，給纖維溶酶原組(圖20C)小鼠紋狀體髓鞘染色明顯多於溶媒組，且接近空白對照組。該結果顯示纖維溶酶原可使帕金森模型小鼠紋狀體髓鞘一定程度地恢復。

**【0184】 實施例9 纖維溶酶原可減少帕金森模型小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白表達**

**【0185】** 取10~12周齡C57BL/6J雄性小鼠28隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組20隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP (sigma, M0896) 溶解在9mL 生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各10隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ L/隻纖維溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ L/隻溶媒溶液(10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4)，持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠黑質於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的腦組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠 $\alpha$ -synuclein抗體

(Proteintech, 10842-1-AP) 4°C 孵育過夜，0.01M PBS 洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗體(Abcam) 二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS 洗2次，每次5分鐘。按 DAB 試劑盒(Vector laboratories, Inc., USA) 顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

【0186】 目前認為帕金森氏症是由於中腦黑質多巴胺能神經元缺失及出現路易小體所導致。 $\alpha$ -突觸核蛋白( $\alpha$ -synuclein)是一個由140個氨基酸殘基組成的神經元蛋白，可導致神經元損傷，而且參與中樞神經系統神經變性的過程，研究表明神經細胞路易小體和神經突觸內聚合的 $\alpha$ -synuclein是帕金森氏症中大腦病變的標誌<sup>[20]</sup>。

【0187】 結果顯示，空白對照組（圖21A）小鼠黑質僅有少量的 $\alpha$ -突觸核蛋白( $\alpha$ -synuclein)，溶媒組（圖21B）小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯高於空白對照組（\*表示 $P < 0.05$ ），給纖溶酶原組（圖21C）小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒組，且趨近於空白對照組，統計差異顯著（\*表示 $P < 0.05$ ）（圖21D）。說明纖溶酶原可減少帕金森模型小鼠黑質 $\alpha$ -突觸核蛋白表達，改善神經元損傷變性。

#### 【0188】 實施例10 纖溶酶原可改善帕金森模型小鼠紋狀體軸索損傷

【0189】 取10~12周齡C57BL/6J雄性小鼠28隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組20隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在9mL生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各10隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ L/隻纖溶酶原溶液，

第44頁，共 56 頁(發明說明書)

溶媒組注射100 $\mu$ L/隻溶媒溶液（10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4），持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠黑質於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的腦組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠NF抗體(Abcam, ab207176) 4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam, ab6721)二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

**【0190】** 帕金森患者疾病過程中存在軸索損傷，且軸索損傷嚴重程度可能隨病程延長持續加重。神經絲蛋白（Neurofilaments，NF）是神經軸索的主要骨架蛋白，對維持神經元正常形態和軸索運輸具有至關重要的作用，可作為軸索損傷的相關生物標記物<sup>[21]</sup>。

**【0191】** 結果顯示，空白對照組（圖22A）小鼠紋狀體有一定量的NF（箭頭標識），溶媒組（圖22B）小鼠紋狀體NF的量低於空白對照組，給纖溶酶原組（圖22C）小鼠紋狀體中NF的量明顯高於溶媒組，且統計差異極顯著（\*\*表示P<0.01）（圖22D）。說明纖溶酶原可促使帕金森模型小鼠紋狀體NF恢復，修復帕金森軸索損傷。

**【0192】 實施例11 纖溶酶原可減少帕金森模型小鼠紋狀體GFAP表達**

**【0193】** 取10~12周齡C57BL/6J雄性小鼠28隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組8隻，模型組20隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶

液，連續注射5天，建立帕金森模型[5]。MPTP溶液配製：取45mg MPTP (sigma, M0896) 溶解在9mL 生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，模型組小鼠按體重隨機分為兩組，溶媒組和給藥組，每組各10隻，並開始給藥，記為第1天，給藥組小鼠尾靜脈注射1mg/100 $\mu$ L /隻纖溶酶原溶液，溶媒組注射100 $\mu$ L/隻溶媒溶液（10mM檸檬酸-檸檬酸鈉溶液，pH7.4），持續給藥14天，於給藥第15天犧牲，取材小鼠黑質於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的腦組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。定位切片黑質，切片厚度為3 $\mu$ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清液，滴加兔抗小鼠GFAP抗體(Abcam, ab7260) 4 $^{\circ}$ C孵育過夜，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam, ab6721)二抗室溫孵育1小時，0.01M PBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水，二甲苯透明并中性樹膠封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

【0194】 膠質細胞纖維酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)是構成星形膠質細胞胞體膠原蛋白的重要成分，且其僅存在於星形膠質細胞膠質原纖維中間絲中，是星形膠質細胞活化的特徵性標記物<sup>[22]</sup>，對神經元具有炎性損壞作用，使神經元變性<sup>[23]</sup>，從而引起帕金森的發生。

【0195】 結果顯示，空白對照組（圖23A）小鼠紋狀體表達少量的GFAP（箭頭標識），溶媒組（圖23B）小鼠紋狀體GFAP的表達量明顯高於空白對照組，給纖溶酶原組小鼠（圖23C）紋狀體GFAP的表達量低於溶媒組。說明纖溶酶原可減少帕金森模型小鼠紋狀體GFAP表達，減輕紋狀體神經元損傷。

**【0196】 實施例12 纖維溶酶原促進 $\alpha$ -突觸核蛋白在帕金森模型小鼠腦勻漿中降解**

**【0197】** 取11~12周齡、18-25g的C57BL/6J雄性小鼠8隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組4隻，模型組4隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在9mL生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，所有小鼠進行曠場實驗，鑒定造模成功。所有小鼠犧牲後取整個腦部並稱重，按150mg組織/mL PBS分別加入1 $\times$  PBS（Thermo Fisher，pH7.4；10010-031，4 $^{\circ}$ C下勻漿（1min，3-4次），勻漿後於4 $^{\circ}$ C離心（12000rpm，20min），取上清液置於新的EP管中。

**【0198】** 取Eppendorf (EP) 管分別設為①空白對照組、②溶媒對照組、③纖維溶酶原組，各組設置5個平行。空白對照組加入21.5 $\mu$ L生理鹽水、4.6 $\mu$ L纖維溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；溶媒對照組加入21.5 $\mu$ L  $\alpha$ -突觸核蛋白溶液（上海強耀生物科技有限公司，定制表達人 $\alpha$ -突觸核蛋白，UniProtKB - P37840，1.0mg/mL）、4.6 $\mu$ L溶媒溶液（10mM檸檬酸鈉，2%鹽酸精氨酸，3%甘露醇，PH7.4）、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；纖維溶酶原組加入21.5 $\mu$ L  $\alpha$ -突觸核蛋白溶液（1.0mg/mL）、4.6 $\mu$ L纖維溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿。各組樣品加好後，37 $^{\circ}$ C溫育6h後分別加入50 $\mu$ L 0.1%三氟乙酸溶液終止反應。

**【0199】** 根據Tris-Tricine-SDS-PAGE凝膠製備試劑盒（Solarbio，P1320）配膠說明製備12%凝膠。各組樣品分別與4 $\times$ 上樣緩衝液（TaKaRa，e2139）以體積比為3:1混勻後，100 $^{\circ}$ C加熱5 min，冷卻後離心2 min，然後取20 $\mu$ L上樣。電泳條件為30V跑1.5h，然後100V電泳至膠底。電泳結束後剝凝膠置於1%考馬斯亮藍染色液（1g考馬斯亮藍R250溶於1000ml乙醇：冰醋酸：純化水體積比為5:2:13

的混合液中)中染色30min,再用脫色液(純化水:冰醋酸:無水乙醇=17:2:1體積比混合)脫色至乾淨。凝膠在生物分子成像儀下拍照並定量掃描分析。

**【0200】** 結果顯示,在帕金森模型小鼠腦勻漿中,纖溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組,差異極顯著(\*\*\*)代表 $P < 0.001$ ),且其聚合物a、b的量均明顯低於溶媒對照組,差異極顯著(\*\*代表 $P < 0.01$ ,\*\*\*代表 $P < 0.001$ );在正常小鼠腦勻漿中,纖溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組,差異極顯著(\*\*\*)代表 $P < 0.001$ ),且其聚合物a、b的量均明顯低於溶媒對照組,差異顯著(\*代表 $P < 0.05$ ,\*\*代表 $P < 0.01$ ) (圖24)。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠腦勻漿中,纖溶酶原可有效地降解人 $\alpha$ -突觸核蛋白及其聚合物。

#### **【0201】 實施例13纖溶酶原促進 $\alpha$ -突觸核蛋白在帕金森模型小鼠腦勻漿中降解**

**【0202】** 取11~12周齡、18-25g的C57BL/6J雄性小鼠8隻,造模前1天稱重,根據體重隨機分為2組,空白對照組4隻,模型組4隻。造模時間定在每日早上9點,空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水;模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液,連續注射5天,建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製:取45mg MPTP (sigma, M0896)溶解在9mL生理鹽水溶液中,配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天,所有小鼠進行曠場實驗,鑒定造模成功。所有小鼠犧牲後取整個腦部並稱重,按150mg組織/mL PBS分別加入1 $\times$ PBS(Thermo Fisher, pH7.4; 10010-031, 4 $^{\circ}$ C下勻漿(1min, 3-4次),勻漿後於4 $^{\circ}$ C離心(12000rpm, 20min),取上清液置於新的EP管中。

**【0203】** 取Eppendorf (EP) 管分別設為①空白組、②空白對照組、③溶媒對照組、④纖溶酶原組,各組設置5個平行。空白組加入21.5 $\mu$ L生理鹽水、4.6 $\mu$ L溶媒溶液(10 mM 檸檬酸鈉, 2%鹽酸精氨酸, 3%甘露醇, pH 7.4)、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿;空白對照組加入21.5 $\mu$ L生理鹽水、4.6 $\mu$ L纖溶酶原溶液(2mg/mL)、

第48頁,共56頁(發明說明書)

23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；溶媒對照組加入21.5 $\mu$ L  $\alpha$ -突觸核蛋白溶液（上海強耀生物科技有限公司，定制表達人 $\alpha$ -突觸核蛋白，UniProtKB - P37840，1.0mg/mL）、4.6 $\mu$ L溶媒溶液、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；纖溶酶原組加入21.5mL  $\alpha$ -突觸核蛋白溶液（1.0mg/mL）（1.0mg/mL）、4.6 $\mu$ L纖溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿。各組樣品加好後，37°C溫育6h後分別加入50 $\mu$ L 0.1%三氟乙酸溶液終止反應。

**【0204】** 根據Tris-Tricine-SDS-PAGE凝膠製備試劑盒（Solarbio，P1320）配膠說明製備12%凝膠。各組樣品分別與4 $\times$ 上樣緩衝液（TaKaRa，e2139）以體積比為3:1混勻後，100°C加熱5 min，冷卻後離心2 min，然後取20 $\mu$ L上樣。電泳條件為30V跑1.5h，然後100V電泳至膠底。電泳結束後剝取凝膠轉移到PVDF膜（GE，A29433753）上，電泳條件為15V，2h。轉移後的PVDF膜浸泡在封閉液（5%脫脂乳液）中於4°C冰箱中封閉過夜，TBST（0.01M Tris-NaCl，pH7.6緩衝液）洗4次後，加入兔抗人 $\alpha$ -突觸核蛋白抗體（Proteintech, 10842-1-AP）室溫孵育3h，TBST洗4次後，加入山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam，ab6721)二抗室溫孵育1h，TBST洗4次後，將PVDF膜放於乾淨成像板上，加入Immobilon Western HRP Substrate(MILLIPORE，WBKLS0100)顯色，在生物分子成像儀下拍照並用Image J定量分析。

**【0205】** 結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿中，纖溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組，差異極顯著（\*\*代表 $P < 0.01$ ），且其聚合物的量均明顯低於溶媒對照組，差異極顯著（\*\*\*代表 $P < 0.001$ ）；在正常小鼠腦勻漿中，纖溶酶原組 $\alpha$ -突觸核蛋白的量明顯低於溶媒對照組，差異極顯著（\*\*代表 $P < 0.01$ ），且其聚合物的量均明顯低於溶媒對照組，差異顯著（\*\*\*代表 $P < 0.001$ ）（圖25）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠腦勻漿中，纖溶酶原可有效地降解人 $\alpha$ -突觸核蛋白及其聚合物。

**【0206】 實施例14纖維溶酶原促進Pro-BDNF在帕金森模型小鼠腦勻漿中裂解**

**【0207】** 取11~12周齡、18-25g的C57BL/6J雄性小鼠4隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP (sigma, M0896) 溶解在9mL 生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，所有小鼠進行曠場實驗，鑒定造模成功。所有小鼠犧牲後取整個腦部並稱重，按150mg組織/mL PBS分別加入1 $\times$  PBS (Thermo Fisher, pH7.4; 10010-031, 4 $^{\circ}$ C下勻漿 (1min, 3-4次)，勻漿後於4 $^{\circ}$ C離心 (12000rpm, 20min)，取上清液即腦勻漿液置於新的EP管中。

**【0208】** 取Eppendorf (EP) 管分別設為①空白組、②空白對照組、③溶媒對照組、④纖維溶酶原組，各組設置5個平行。空白組加入21.5 $\mu$ L生理鹽水、4.6 $\mu$ L溶媒溶液 (10 mM 檸檬酸鈉，2%鹽酸精氨酸，3%甘露醇，pH 7.4)、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；空白對照組加入21.5 $\mu$ L生理鹽水、4.6 $\mu$ L纖維溶酶原溶液 (2mg/mL)、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；溶媒對照組加入21.5 $\mu$ L Pro-BDNF (南京金斯瑞，定制表達人Pro-BDNF, UniProtKB - P23560, 1.0mg/mL)、4.6 $\mu$ L溶媒溶液、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿；纖維溶酶原組加入21.5 $\mu$ L Pro-BDNF (1.0mg/mL)、4.6 $\mu$ L纖維溶酶原溶液 (2mg/mL)、23.9 $\mu$ L小鼠腦勻漿。各組樣品加好後，37 $^{\circ}$ C溫育6h後分別加入50 $\mu$ L 0.1%三氟乙酸溶液終止反應。

**【0209】** 根據SDS-PAGE配膠說明製備12%凝膠。各組樣品分別與4 $\times$ 上樣緩衝液 (TaKaRa, e2139) 以體積比為3:1混勻後，100 $^{\circ}$ C加熱5 min，冷卻後離心2 min，然後取20 $\mu$ L上樣。電泳條件為30V跑45min，然後100V電泳至膠底。電泳結束後剝凝膠於1%考馬斯亮藍染色液 (1g考馬斯亮藍R250溶於1000ml乙醇：冰醋酸：純化水體積比為5:2:13的混合液中) 染色30min，再用脫色液 (純化水：冰

醋酸：無水乙醇=17:2:1體積比混合)脫色至乾淨。凝膠在生物分子成像儀下拍照並定量掃描分析。

**【0210】** 腦源性神經營養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是一類分子量為12.3 kD的鹼性蛋白質，由119個氨基酸殘基構成，並含有3對二硫鍵，在體內以二聚體的形式存在，以BDNF前體的形式合成，BDNF前體 (Pro-BDNF) 可經酶解作用裂解形成成熟的BDNF。文獻報導Pro-BDNF與其裂解形成的成熟的BDNF具有相反的作用。Pro-BDNF促進神經細胞離亡，降低神經突觸可塑性。成熟的BDNF及其受體廣泛分布於中樞神經系統內，在中樞神經系統發育過程中，對神經元存活、分化、生長發育起重要作用，並能防止神經元受損傷死亡，改善神經元的病理狀態，促進受損傷神經元再生及分化等生物效應，而且亦是成熟的中樞及周圍神經系統的神經元維持生存及正常生理功能所必需的<sup>[24]</sup>。

**【0211】** 結果顯示，在帕金森模型小鼠腦勻漿液中，纖維溶酶原組Pro-BDNF的量明顯低於溶媒對照組，差異極顯著 (\*\*\*)代表 $P < 0.001$ ) (圖26)。提示纖維溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠腦勻漿中Pro-BDNF裂解。

**【0212】 實施例15纖維溶酶原促進Pro-BDNF在帕金森模型小鼠腦勻漿中裂解形成成熟的BDNF**

**【0213】** 取11~12周齡、18-25g的C57BL/6J雄性小鼠8隻，造模前1天稱重，根據體重隨機分為2組，空白對照組4隻，模型組4隻。造模時間定在每日早上9點，空白對照組腹腔注射200 $\mu$ L生理鹽水；模型組腹腔注射35mg/kg/隻5mg/mL MPTP溶液，連續注射5天，建立帕金森模型<sup>[5]</sup>。MPTP溶液配製：取45mg MPTP (sigma, M0896) 溶解在9mL生理鹽水溶液中，配製最終濃度為5mg/mL。造模完成後即造模第6天，所有小鼠進行曠場實驗，鑒定造模成功。所有小鼠犧牲後取整個腦部並稱重，按150mg組織/mL PBS分別加入1 $\times$  PBS (Thermo Fisher, pH7.4;

10010-031, 4°C下勻漿(1min, 3-4次), 勻漿後於4°C離心(12000rpm, 20min), 取上清液即腦勻漿液置於新的EP管中。

**【0214】** 取Eppendorf (EP) 管分別設為①空白組、②空白對照組、③溶媒對照組、④纖溶酶原組, 各組設置5個平行。空白對照組加入21.5μL生理鹽水、4.6μL纖溶酶原溶液(2mg/mL)、23.9μL小鼠腦勻漿; 溶媒對照組加入21.5μL Pro-BDNF(南京金斯瑞, 定制表達人Pro-BDNF, UniProtKB - P23560, 1.0mg/mL)、4.6μL溶媒溶液(檸檬酸-檸檬酸鈉溶液)、23.9μL小鼠腦勻漿; 纖溶酶原組加入21.5μL Pro-BDNF(1.0mg/mL)、4.6μL纖溶酶原溶液(2mg/mL)、23.9μL小鼠腦勻漿。各組樣品加好後, 37°C溫育6h後分別加入50μL 0.1%三氟乙酸溶液終止反應。

**【0215】** 根據SDS-PAGE配膠說明製備12%凝膠。各組樣品分別與4×上樣緩衝液(TaKaRa, e2139)以體積比為3:1混勻後, 100°C加熱5 min, 冷卻後離心2 min, 然後取20μL上樣。電泳條件為30V跑45min, 然後100V電泳至膠底。電泳結束後剝取凝膠轉移到活化的PVDF膜(GE, A29433753)上, 電泳條件為15V, 2.5h。轉移後的PVDF膜浸泡在封閉液(5%脫脂乳液)中於4°C冰箱中封閉過夜, TBST(0.01M Tris-NaCl, pH7.6緩衝液)洗4次後, 加入兔抗人BDNF抗體(Boster Biological Technology, PB9075)室溫孵育3h, TBST洗4次後, 加入山羊抗兔IgG(HRP)抗體(Abcam, ab6721)二抗室溫孵育1h, TBST洗4次後, 將PVDF膜放於乾淨成像板上, 加入Immobilon Western HRP Substrate(MILLIPORE, WBKLS0100)顯色, 在生物分子成像儀下拍照並用Image J定量分析。

**【0216】** 結果顯示, 在帕金森模型小鼠腦勻漿液中, 纖溶酶原組Pro-BDNF的量明顯低於溶媒對照組, 差異顯著(\*代表 $P < 0.05$ , \*\*\*表示 $P < 0.001$ ); 纖溶酶原組BDNF的量明顯高於溶媒對照組, 差異極為顯著(圖27)。提示纖溶酶原能夠促進帕金森模型小鼠腦勻漿液Pro-BDNF裂解和成熟BDNF形成。

第52頁, 共 56 頁(發明說明書)

【0217】 參考文獻

【0218】 [1] M. Sedelis et al. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's Disease[J]. Behavioral Brain Research 125 (2001) 109-122.

【0219】 [2] Meredith G E, Totterdell S, Potashkin J A, et al. Modeling PD pathogenesis in mice advantages of a chronic MPTP protocol[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2008, 14(Suppl 2): S112-S115.

【0220】 [3] Ken Ikeda, Junya Ebina, Kiyokazu Kawabe and Yasuo Iwasaki. Dopamine Transporter Imaging in Parkinson Disease: Progressive Changes and Therapeutic Modification after Anti-parkinsonian Medications [J]. Internal Medicine, 2019, 58: 1665-1672.

【0221】 [4] HEBERT AE, DASH PK. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage [J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2004, 79(1) :143-153.

【0222】 [5] Won-Seok Choi, et al. Conditional deletion of Ndufs4 in dopaminergic neurons promotes Parkinson's disease-like nonmotor symptoms without loss of dopamine neurons. Scientific Reports.

【0223】 [6] Vernice Jackson-Lewis & Serge Przedborski. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's Disease [J]. Nature protocols VOL.2 NO.1, 2007(141).

【0224】 [7] N. A. Tatton and S. J. Kish. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labeling and acridine orange staining[J]. Neuroscience Vol.77, No.4, pp.1037-1048, 1997.

【0225】 [8] D J Drucker, J Philippe, S Mojsov et al. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 May; 84(10): 3434–3438.

【0226】 [9] Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. J Clin Invest. 1987 Feb;79(2):616-9.

【0227】 [10] Li Y, Perry T, Kindy M.S, et al. (2009). GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.106, 1285-1290.

【0228】 [11] Toshiharu Nagatsu, Akria Nakashima, et al. Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders. Journal of Neural Transmission, 2019, 126:397-409.

【0229】 [12] Lee TI, Yang CS, Fang KM, Tzeng SF (2009) Role of ciliary neurotrophic factor in microglial phagocytosis. Neurochem Res 34:109–117.

【0230】 [13] Liuzzi GM, Latronico T, Rossano R, Viggiani S, Fasano A, Riccio P (2007) .Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on MMP-9 release from microglial cells-implications for complementary multiple sclerosis treatment. Neurochem Res 32:2184-2193.

【0231】 [14] Pasquini LA, Calatayud CA, Bertone Un~a AL, Millet V, Pasquini JM, Soto EF (2007) The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. Neurochem Res 32:279-292.

【0232】 [15] Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y et al (2005) Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81:357-362.

【0233】 [16] Kalm M, Lannering B, Bjoörk-Eriksson T, Blomgren K (2009). Irradiation-induced loss of microglia in the young brain. *J Neuroimmunol* 206:70-75.

【0234】 [17] Li ZH, Lu J, Tay SS, Wu YJ, Strong MJ, He BP (2006) Mice with targeted disruption of neurofilament light subunit display formation of protein aggregation in motoneurons and downregulation of complement receptor type 3 alpha subunit in microglia in the spinal cord at their earlier age: a possible feature in preclinical development of neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1113:200-209.

【0235】 [18] Khodanovich M Y, Sorokina I V, Glazacheva V Y, et al. Histological validation of fast macromolecular proton fraction mapping as a quantitative myelin imaging method in the cuprizone demyelination mode[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46686.

【0236】 [19] Wang C, Sun C, Hu Z, et al. Improved neural regeneration with olfactory ensheathing cell inoculated PLGA scaffolds in spinal cord injury adult rats [J]. *Neurosignals*, 2017, 25(1):1-14.

【0237】 [20] KALIA L V, KALIA S K. Alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease[J]. *Curr Opin Neurol* , 2015 , 28 ( 4 ) : 375-381.

【0238】 [21] Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease[J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1998, 61:1-23 .

【0239】 [22] Middeldorp J, Hol E. GFAP in health and disease[J] . *Prog Neurobiol*, 2011, 93:421-443.

【0240】 [23] Yokoyama H, Uchida H, Kuroiwa H, et al. Role of glial cells in neurotoxin induced animal models of Parkinson's disease[J]. Neurol Sci, 2011, 32(1):1-7.

【0241】 [24] Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. Cell Mol Neurobiol. 2018 Apr;38(3):579-593.

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

【序列表】

<110> 深圳瑞健生命科學研究院有限公司

<120> 一種治療帕金森氏症的方法和藥物

<130> FE00367TW

<150> 2020102129224

<151> 2020-03-24

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2376

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 不含有信號肽的天然纖維溶酶原(Glu-PLG，Glu-纖維蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 1

gagcctctgg atgactatgt gaatacccag ggggcttcac tgttcagtgt cactaagaag 60

cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc 120

acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180

aggaagtctt ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat 240

ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa 300

aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctcccc acagacctag attctcacct 360

gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg 420

caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480

gagtgtgaag aggaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacggcaa aattccaag 540

accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gcccacacgc tcatggatac 600

attcctcca aattccaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa ccccgatagg 660

gagctgcggc cttggtgttt caccaccgac cccaacaage gctgggaact ttgtgacatc 720

ccccgctgca caacacctcc accatcttct ggtcccacct accagtgtct gaagggaaca 780

ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctggt accgtgtccg ggcacacctg tcagcaactgg 840

agtgcacaga ccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg 900

gatgaaaact actgccgcaa tctgacgga aaaagggcc catggtgcc tacaaccaac 960

agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata cgtctctgtg actctcccc agtatccag 1020

gaacaattgg ctcccacagc accacctgag ctaaccctg tggccagga ctgctacat 1080

ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag 1140

tcttggtcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacc cagaaaacta cccaatgct 1200

ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgtttacc 1260

acagaccca gcgtcaggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg 1320

agtgtgtag cacctccgcc tgtgtcctg ctccagatg tagagactcc ttccgaagaa 1380

gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440

acgcatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcatttt cactccagag 1500

acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaat tactgccgta accctgatgg tgatgtaggt 1560

ggtccctggt gctacacgac aatccaaga aaactttacg actactgtga tgtccctcag 1620

tgtgcggccc cttcatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgtcctgga 1680

agggtttag gggggtgtgt ggcccacca cattcctggc cctggcaagt cagtcttaga 1740

acaaggtttg gaatgcactt ctgtggaggc accttgatat ccccagagtg ggtgttgact 1800

gctgcccact gcttgagaaa gtcccgaagg ccttcactct acaaggtcat cctgggtgca 1860

caccaagaag tgaatctega accgcatggt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920

gagcccacac gaaaagatat tgccttgcta aagctaagca gtctgcccgt catcactgac 1980

aaagtaatcc cagcttgtct gccatcccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040

ttcatcactg gctggggaga aaccaaggt acttttgag ctggccttct caaggaagcc 2100

cagctccctg tgattgagaa taaagtgtgc aatcgctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160

caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220

agtggaggtc ctctggtttg cttcgagaag gacaaataca tttacaagg agtcacttct 2280

tggggtcttg gctgtgcaag cccaataag cctgggtgtct atgttcgtgt ttcaaggttt 2340

gttacttga ttgagggagt gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2

<211> 791

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 不含有信號肽的天然纖維溶酶原(Glu-PLG，Glu-纖維蛋白溶酶原)氨基酸序列

<400> 2

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu

145

150

155

160

Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly

165

170

175

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

180

185

190

Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys

195

200

205

Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro

210

215

220

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile

225

230

235

240

Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys

245

250

255

Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val

260

265

270

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

275

280

285

Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr

290

295

300

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

305                      310                      315                      320

Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser

                    325                      330                      335

Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr

                    340                      345                      350

Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly

                    355                      360                      365

Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser

                    370                      375                      380

Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala

385                      390                      395                      400

Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro

405

410

415

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu

420

425

430

Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val

435

440

445

Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe

450

455

460

Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly

465

470

475

480

Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile

485

490

495

Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys

500

505

510

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn

515

520

525

Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro

530

535

540

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

545

550

555

560

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

565

570

575

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

580

585

590

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

595

600

605

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

610

615

620

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

625

630

635

640

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

645

650

655

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

660

665

670

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

675

680

685

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

690

695

700

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

705

710

715

720

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

725

730

735

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

740

745

750

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

755

760

765

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

770

775

780

Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

785

790

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2433

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 含有信號肽的天然纖維溶酶原(來源於swiss prot)的核酸序列

&lt;400&gt; 3

atggaacata aggaagtgtg tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag 60

cctctggatg actatgtgaa taccagggg gcttcactgt tcagtgtcac taagaagcag 120

ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaaatgtg aggaggacga agaattcacc 180

tgcaggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg 240

aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc 300

tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagagga cgatgtccaa aacaaaaaat 360

第14頁，共 60 頁(序列表)

ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctcccaca gacctagatt ctcacctgct 420

acacaccct cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagaaa cgatccgcag 480

gggccctggt gctatactac tgatccagaa aagagatatg actactgcga cattcttgag 540

tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc 600

atgtctggac tggaatgcca ggctgggac tctcagagcc cacacgctca tggatacatt 660

ccttccaaat ttcaaacia gaacctgaag aagaattact gtcgtaacce cgatagggag 720

ctgcggcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgt gggaactttg tgacatcccc 780

cgctgcacia cacctccacc atcttctggt cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt 840

gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gtgtccgggc acacctgca gcaactggagt 900

gcacagacc ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttgat 960

gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc 1020

caagtgcggt gggagtactg taagataccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa 1080

caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt 1140

gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct 1200

tggtcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagaccccag aaaactaccc aaatgctggc 1260

ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctggtg tttaccaca 1320

gaccccagcg tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaaat gctcaggaac agaagcgagt 1380

gttgtagcac ctccgctgt tgtcctgctt ccagatgtag agactccttc cgaagaagac 1440

tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg 1500

ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca 1560

aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga ttaggtggt 1620

ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt 1680

gcggccccct catttgattg tggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tctggaagg 1740

gtttagggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggcct ggcaagtcag tcttagaaca 1800

第16頁，共 60 頁(序列表)

aggtttgaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 1860

gcccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatactaca aggtcatcct gggcgcacac 1920

caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag 1980

cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 2040

gtaatcccag cttgtctgcc atcccaaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgttcc 2100

atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 2160

ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 2220

tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggcgcacgt 2280

ggaggtctc tggtttgcct cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 2340

ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttcc aaggtttggt 2400

acttgattg agggagtgat gagaataat taa 2433

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 810

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 含有信號肽的天然纖維溶酶原(來源於swiss prot)的氨基酸序列

&lt;400&gt; 4

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

第18頁，共 60 頁(序列表)

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

第19頁，共 60 頁(序列表)

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu

225

230

235

240

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu

245

250

255

第20頁，共 60 頁(序列表)

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr

260

265

270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala

275

280

285

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

290

295

300

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp

305

310

315

320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His

325

330

335

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys

340

345

350

第21頁，共 60 頁(序列表)

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

355

360

365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser

370

375

380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser

385

390

395

400

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr

405

410

415

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp

420

425

430

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr

435

440

445

第22頁，共 60 頁(序列表)

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro

450

455

460

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

465

470

475

480

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr

485

490

495

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg

500

505

510

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys

515

520

525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr

530

535

540

第23頁，共 60 頁(序列表)

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys

545                      550                      555                      560

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

565                      570                      575

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

580                      585                      590

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

595                      600                      605

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

610                      615                      620

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

625                      630                      635                      640

第24頁，共 60 頁(序列表)

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

645

650

655

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

660

665

670

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

675

680

685

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

690

695

700

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

705

710

715

720

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

725

730

735

第25頁，共 60 頁(序列表)

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

740

745

750

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

755

760

765

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

770

775

780

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

785

790

795

800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

805

810

<210> 5

<211> 2145

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; LYS77-PLG(Lys-纖維溶酶原)核酸序列

&lt;400&gt; 5

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc 60

aaaacaaaa atgcatcac ctgtcaaaaa tggagtcca cttctccca cagacctaga 120

ttctacctg ctacacacc ctacagagg ctggaggaga actactgcag gaatccagac 180

aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc 240

gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa 300

attccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacgct 360

catggataca ttcttccaa atttccaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac 420

cccgataggg agctgcggcc ttggtgttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt 480

tgtgacatcc cccgctgcac aacacctcca ccatctctg gtcccaccta ccagtgtctg 540

第27頁，共 60 頁(序列表)

aagggaacag gtgaaaacta tcgcggaat gtggctgta ccgtgtccgg gcacacctgt 600

cagcactgga gtgcacagac cctcacaca cataacagga caccagaaaa ctcccctgc 660

aaaaattgg atgaaaacta ctgccgcaat cctgacggaa aaagggcccc atggtgcat 720

acaaccaaca gccaaagtgc gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctctcccca 780

gtatccacgg aacaattgac tcccacagca ccacctgagc taaccctgt ggtccaggac 840

tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag 900

aagtgcagt ctggtcac tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac 960

ccaatgctg gctgacaat gaactactgc aggaatccag atgccgataa aggcccctgg 1020

tgtttacca cagaccccag cgtcaggtgg gagtactgca acctgaaaa atgctcagga 1080

acagaagcga gtgtgtagc acctccgct gttgtctgc tccagatgt agagactcct 1140

tccgaagaag actgtatgt tgggaatgg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 1200

gttactggga cgccatgcca ggactgggct gccaggagc cccatagaca cagcatttc 1260

actccagaga caaatccacg ggcgggtctg gaaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt 1320

gatgtagtg gtcctggtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 1380

gtccctcagt gtgcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa 1440

tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccaccac attcctggcc ctggcaagtc 1500

agtcttagaa caaggtttg aatgcactc tgtggaggca ccttgatc cccagagtgg 1560

gtgtgactg ctgccactg cttggagaag tcccaaggc cttcactca caagtcac 1620

ctgggtgcac accaagaagt gaatctcga ccgatgtc aggaaataga agtgtctagg 1680

ctgttcttg agcccacag aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgc 1740

atcactgaca aagtaatccc agcttctctg ccatcccaa attatgtggt cgctgaccg 1800

accgaatgtt tcactactg ctggggagaa accaaggta ctttggagc tggcctctc 1860

aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920

ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttg ccggaggcac tgacagttgc 1980

第29頁，共 60 頁(序列表)

cagggtgaca gtggaggtcc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 2040

gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 2100

tcaaggtttg ttacttgat tgagggagtg atgagaaata attaa 2145

<210> 6

<211> 714

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LYS77-PLG(Lys-纖維溶酶原)氨基酸序列

<400> 6

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

1

5

10

15

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

20

25

30

第30頁，共 60 頁(序列表)

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

第31頁，共 60 頁(序列表)

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu

130

135

140

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu

145

150

155

160

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr

165

170

175

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala

180

185

190

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

195

200

205

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp

210

215

220

第32頁，共 60 頁(序列表)

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His

225

230

235

240

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys

245

250

255

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

260

265

270

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser

275

280

285

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser

290

295

300

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr

305

310

315

320

第33頁，共 60 頁(序列表)

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp

325

330

335

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr

340

345

350

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro

355

360

365

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

370

375

380

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr

385

390

395

400

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg

405

410

415

第34頁，共 60 頁(序列表)

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys

420

425

430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr

435

440

445

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys

450

455

460

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

465

470

475

480

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

485

490

495

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

500

505

510

第35頁，共 60 頁(序列表)

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

515

520

525

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

530

535

540

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

545

550

555

560

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

565

570

575

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

580

585

590

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

595

600

605

第36頁，共 60 頁(序列表)

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

610

615

620

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

625

630

635

640

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

645

650

655

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

660

665

670

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

675

680

685

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

690

695

700

第37頁，共 60 頁(序列表)

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

705

710

<210> 7

<211> 1245

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> delta-plg(delta-纖維溶酶原)核酸序列

<400> 7

gagcctctgg atgactatgt gaatacccag ggggcttcac tggtcagtgt cactaagaag 60

cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc 120

acctgcagg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180

aggaagtcct ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat 240

ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa 300

第38頁，共 60 頁(序列表)

aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctcccc acagacctag attctcacct 360  
  
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg 420  
  
caggggcct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480  
  
gagtgtgaag aggcggcccc ttcattgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa 540  
  
tgtctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccaccac attctggcc ctggcaagtc 600  
  
agtcttagaa caaggtttg aatgcacttc tgtggaggca ccttgatc cccagagtgg 660  
  
gtgtgactg ctgccactg cttggagaag tcccaaggc cttcactca caagtcac 720  
  
ctgggtgcac accaagaagt gaatctgaa ccgatgttc aggaaataga agtgtctagg 780  
  
ctgttcttg agcccacag aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgc 840  
  
atcactgaca aagtaatccc agcttctctg ccatcccaa attatgtggt cgctgaccgg 900  
  
accgaatgtt tcactactgg ctggggagaa acccaaggta ctttggagc tggccttctc 960  
  
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1020

第39頁，共 60 頁(序列表)

ggaagagtc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg cggaggcac tgacagttgc 1080

cagggtgaca gtggaggtcc tctggttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 1140

gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 1200

tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 1245

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> delta-plg(delta-纖維酶原)氨基酸序列

<400> 8

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

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

245

250

255

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

260

265

270

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

275

280

285

Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe

290

295

300

Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu

305 310 315 320

Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr

325 330 335

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

340 345 350

Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

405

410

<210> 9

<211> 1104

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Mini-plg(小纖維蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 9

gtcaggtggg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgtttagca 60

cctccgctg ttgtctgct tccagatgta gagactcctt ccgaagaaga ctgtatgtt 120

gggaatggga aaggataccg aggcaagagg gcgaccactg ttactgggac gccatgccag 180

gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcatttca ctccagagac aaatccacgg 240

gcggtctgg aaaaaatta ctgccgaac cctgatggtg atgtaggtg tcctggtgc 300

tacacgaaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tcctcagtg tgcggccct 360

第45頁，共 60 頁(序列表)

tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtctggaag gggttaggg 420

gggtgtgtgg cccacccaca ttctggccc tggcaagtca gtcttagaac aaggtttgga 480

atgcacttct gtggaggcac ctgatatcc ccagagtggg tgttgactgc tgcccactgc 540

ttggagaagt cccaaggcc ttcatctac aaggteatcc tgggtgcaca ccaagaagtg 600

aatctegaac cgcatgttca ggaaatagaa gtgtctagge tgttcttga gccacacga 660

aaagatattg ctttgctaaa gctaagcagt cctgccgca tcaactgaaa agtaatccca 720

gcttgtctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcaactgc 780

tggggagaaa cccaaggtac ttttgagct ggccttctca aggaagccca gctccctgtg 840

attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa 900

ctctgtgctg ggcatttggc cggaggcact gacagttgcc agggtgacag tggaggtcct 960

ctggttctgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcaacttctg gggctcttggc 1020

tgtgcacgcc ccaataagcc tgggtctat gttcgtgttt caaggtttgt tacttgatt 1080

第46頁，共 60 頁(序列表)

gagggagtga tgagaaataa ttaa

1104

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 367

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Mini-plg(小纖維蛋白溶酶原)氨基酸序列

&lt;400&gt; 10

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

第47頁，共 60 頁(序列表)

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

第48頁，共 60 頁(序列表)

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

145                      150                      155                      160

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

                    165                      170                      175

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

                    180                      185                      190

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

                    195                      200                      205

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

                    210                      215                      220

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

225                      230                      235                      240

Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys

245

250

255

Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu

260

265

270

Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg

275

280

285

Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly

290

295

300

His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

305

310

315

320

Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser

325

330

335

第50頁，共 60 頁(序列表)

Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg

340

345

350

Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

355

360

365

<210> 11

<211> 750

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Micro-plg(微纖維蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 11

gccccatcat ttgattgtgg gaagcctcaa gtggagccga agaaatgtcc tggaagggtt 60

gtaggggggt gtgtggccca cccacattcc tggcctggc aagtcagtct tagaacaagg 120

tttgaatgc acttctgtgg aggcaccttg atatccccag agtgggtgtt gactgctgcc 180

第51頁，共 60 頁(序列表)

cactgcttgg agaagtcgcc aaggccttca tcctacaagg tcatcctggg tgcacaccaa 240  
 gaagtgaatc tcgaaccgca tgffcaggaa atagaagtgt ctaggctggt cttggagccc 300  
 acacgaaaag atattgcctt gctaaagcta agcagtctg ccgtcatcac tgacaaagta 360  
 atcccagctt gtctgccatc cccaaattat gtggtcgtg accggaccga atgtttcatc 420  
 actggctggg gagaaacca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480  
 cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtffc tgaatggaag agtccaatcc 540  
 accgaactct gtgctgggca tttggccgga ggcaactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600  
 ggtcctctgg tttgcttcca gaaggacaaa tacattttac aaggagtcac ttcttggggt 660  
 cttggctgtg cacgccccaa taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gttgttact 720  
 tggattgagg gactgatgag aaataattaa 750

<210> 12

<211> 249

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Micro-plg(微纖維蛋白溶酶原)氨基酸序列

&lt;400&gt; 12

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

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

225

230

235

240

Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

245

<210> 13

<211> 684

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 絲氨酸蛋白酶(結構)域的核酸序列

<400> 13

gttgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggccct ggcaagtcag tcttagaaca 60

aggtttgaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 120

gcccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcactctaca aggtcactct ggggtgcacac 180

caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttgag 240

cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300

gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggctg ctgaccggac cgaatgttcc 360

atcactggct ggggagaaac ccaaggtact ttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420

ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 480

第56頁，共 60 頁(序列表)

tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca ggtgacagt 540

ggaggtctc tggtttgcct cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 600

ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttcc aaggtttgtt 660

acttgattg agggagtgat gaga 684

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 絲氨酸蛋白酶(結構)域的氨基酸序列

<400> 14

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

202144000

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

210

215

220

Gly Val Met Arg

225

## 【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種選自如下的一種或多種化合物在製備預防和治療帕金森氏症的藥物的用途，所述如下的一種或多種化合物選自：纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分、能夠直接激活纖維蛋白溶酶原或通過激活纖維蛋白溶酶原激活途徑上游組分而間接激活纖維蛋白溶酶原的化合物、模擬纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶之活性的化合物、能夠上調纖維蛋白溶酶原或纖維蛋白溶酶原激活劑表達的化合物、纖維蛋白溶酶原類似物、纖維蛋白溶酶類似物、tPA 或 uPA 類似物和纖溶抑制劑的拮抗劑。

【請求項 2】 如請求項 1 所述的用途，其中所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分選自纖維蛋白溶酶原、重組人纖維蛋白溶酶、Lys-纖維蛋白溶酶原、Glu-纖維蛋白溶酶原、纖維蛋白溶酶、含有纖維蛋白溶酶原和纖維蛋白溶酶的一個或多個 kringle 結構域和蛋白酶結構域的纖維蛋白溶酶原和纖維蛋白溶酶變體及類似物、小纖維蛋白溶酶原(mini-plasminogen)、小纖維蛋白溶酶(mini-plasmin)、微纖溶酶原(micro-plasminogen)、微纖溶酶(micro-plasmin)、delta-纖溶酶原、delta-纖溶酶(delta-plasmin)、纖維蛋白溶酶原激活劑、tPA 和 uPA。

【請求項 3】 如請求項 1 的用途，所述纖溶抑制劑的拮抗劑為 PAI-1、補體 C1 抑制物、 $\alpha 2$  抗纖溶酶或  $\alpha 2$  巨球蛋白的抑制劑，例如抗體。

【請求項 4】 如請求項 1-3 任一項的用途，其中所述化合物對帕金森氏症受試者具有如下一項或多項作用：促進記憶功能恢復、改善認知能力、促進黑質 DTA 表達、促進紋狀體尼氏體恢復、促進黑質 GLP-1R 表達、增加黑質 TH 陽性細胞數量、促進紋狀體髓鞘修復、促進腦組織中  $\alpha$ -突觸核蛋白降解、促使紋狀體 NF 表達、促進軸索損傷修復、減少紋狀體 GFAP 表達、減輕紋狀體神經元損傷、促進腦組織中 Pro-BDNF 裂解形成 BDNF、緩解抑鬱或焦慮症狀。

【請求項 5】 如請求項 1-4 任一項的用途，其中所述化合物為纖溶酶原。

【請求項 6】 如請求項 1-5 任一項的用途，其中所述纖溶酶原為人全長纖溶酶原或其保守取代變體。

【請求項 7】 如請求項 1-5 任一項的用途，其中所述纖溶酶原與序列 2 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，並且仍然具有纖溶酶原的賴氨酸結合活性或蛋白水解活性。

【請求項 8】 如請求項 1-5 任一項的用途，所述纖溶酶原包含與序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序

列、並且仍然具有纖維溶酶原的蛋白水解活性的蛋白質。

**【請求項 9】** 如請求項 1-5 任一項的用途，所述纖維溶酶原選自 Glu-纖維溶酶原、Lys-纖維溶酶原、小纖維溶酶原、微纖維溶酶原、delta-纖維溶酶原或它們的保留纖維溶酶原的蛋白水解活性的變體。

**【請求項 10】** 如請求項 1-5 任一項的用途，所述纖維溶酶原包含序列 2、6、8、10、12 所示的氨基酸序列或包含序列 2、6、8、10、12 所示氨基酸序列的保守取代變體。

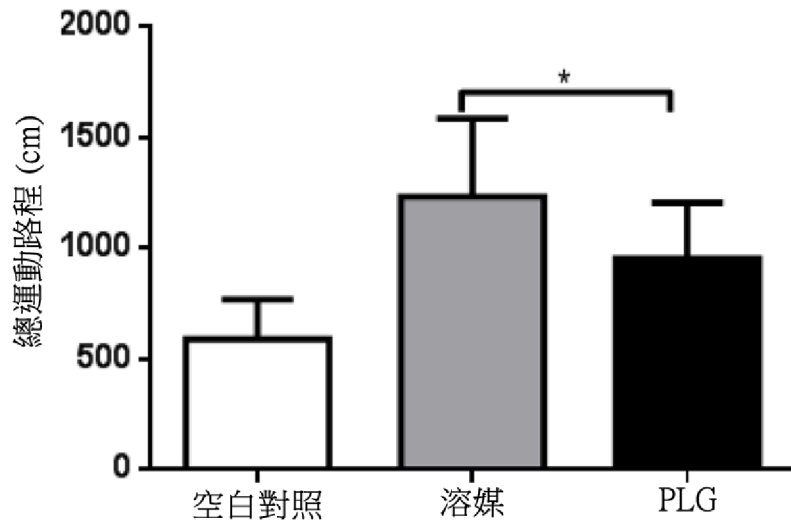
**【請求項 11】** 如請求項 1-10 任一項的用途，其中所述化合物與一種或多種其他治療方法或藥物聯合使用。

**【請求項 12】** 如請求項 11 的用途，其中所述其他治療方法包括細胞治療（包括幹細胞治療）和物理治療。

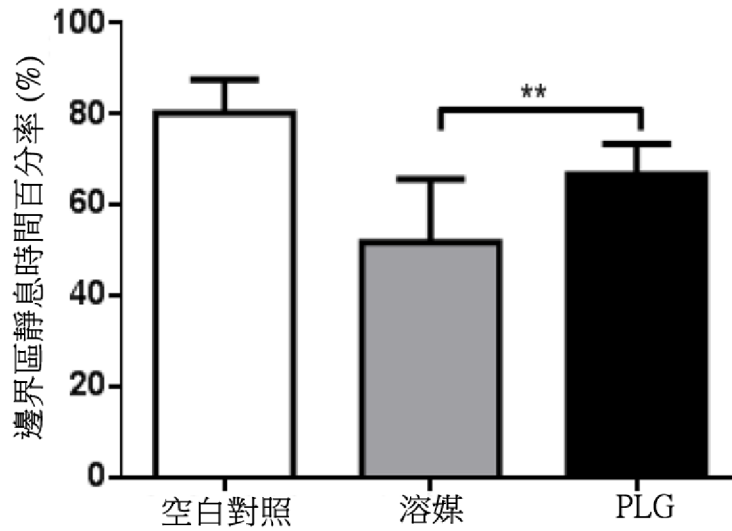
**【請求項 13】** 如請求項 11 的用途，其中所述其他藥物為治療帕金森氏症的其它藥物。

**【請求項 14】** 如請求項 1-13 任一項的用途，其中所述化合物通過鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、靜脈內、腹膜內、皮下、顱內、鞘內、動脈內(例如經由頸動脈)或肌肉內給藥。

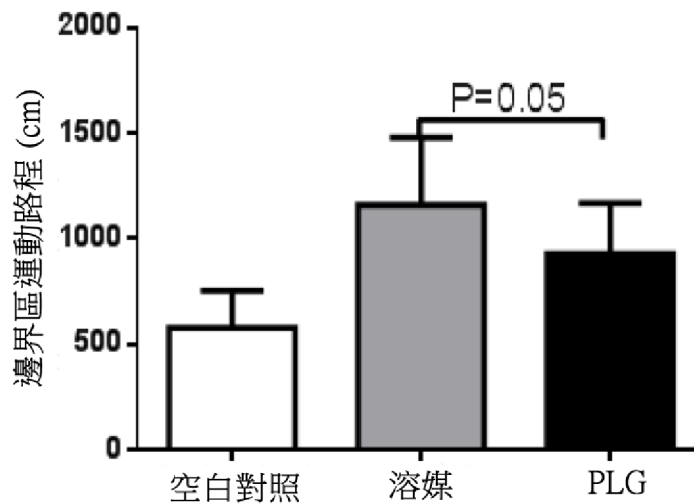
【發明圖式】



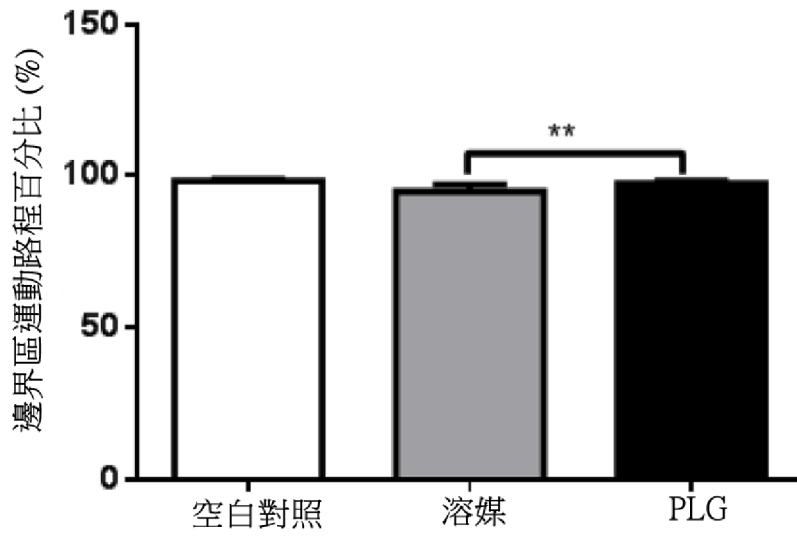
【圖1】



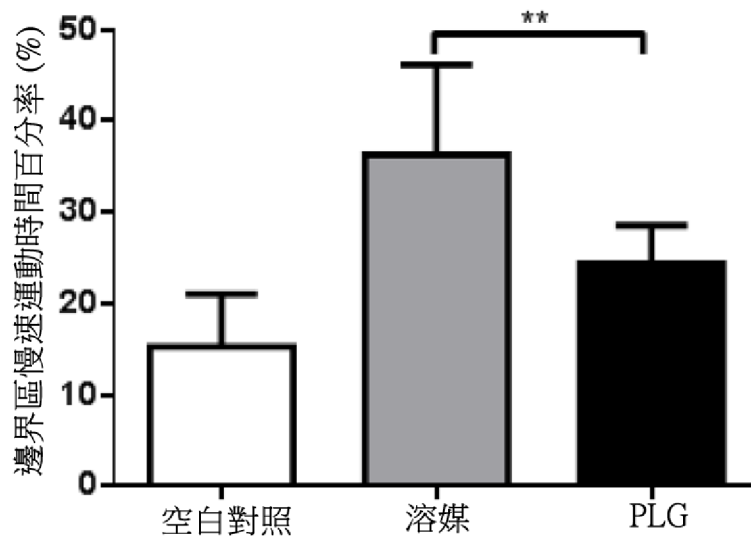
【圖2】



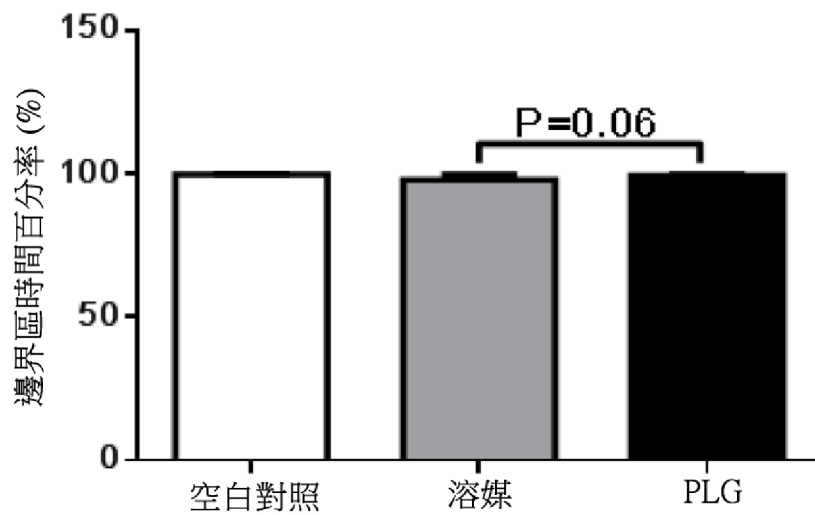
【圖3】



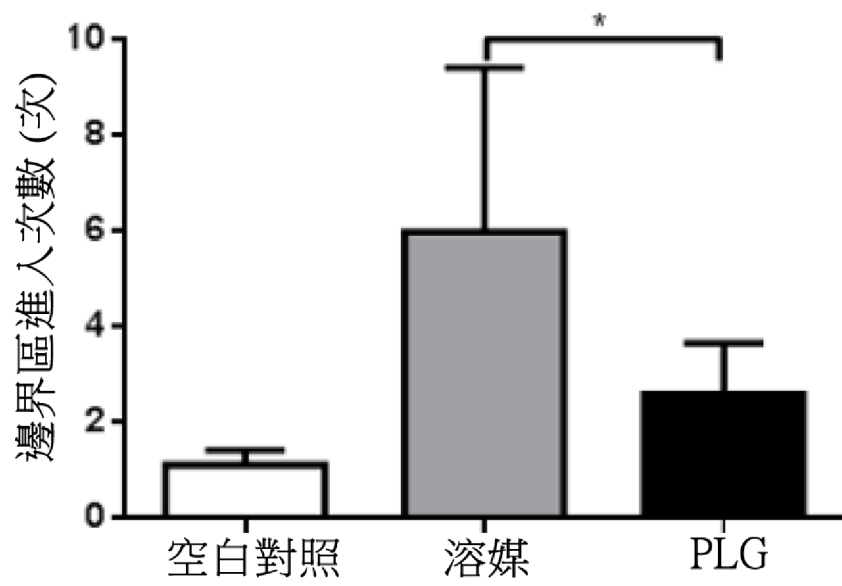
【圖4】



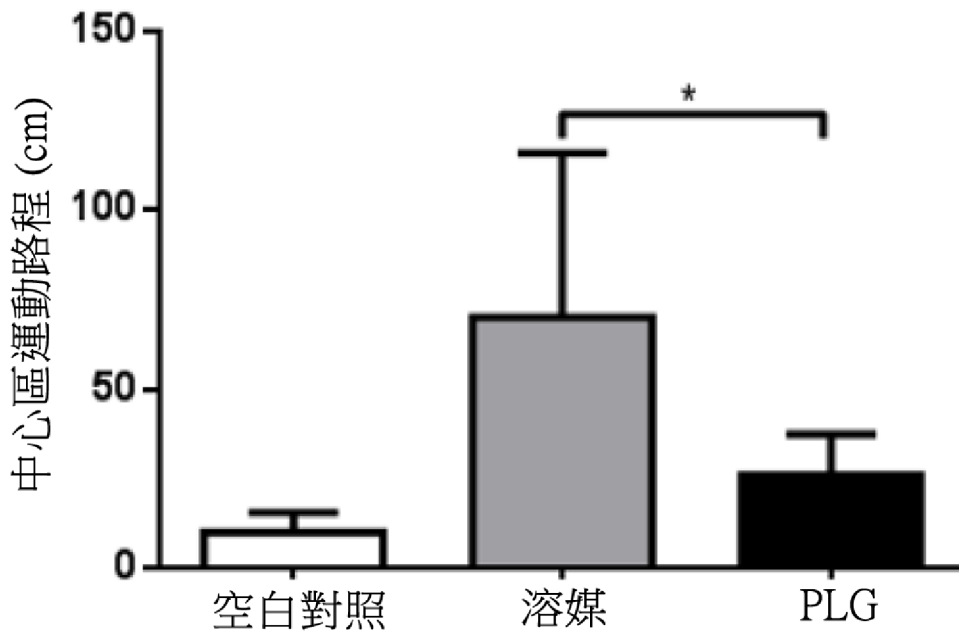
【圖5】



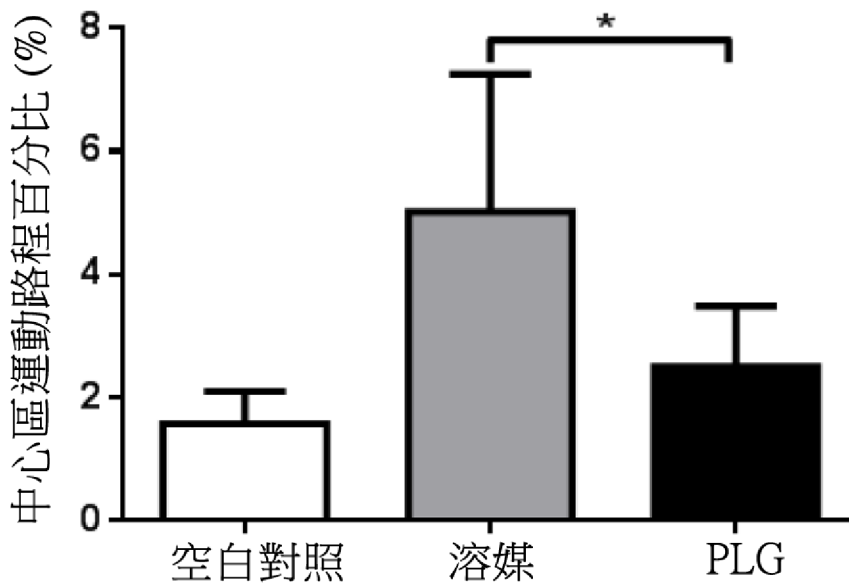
【圖6】



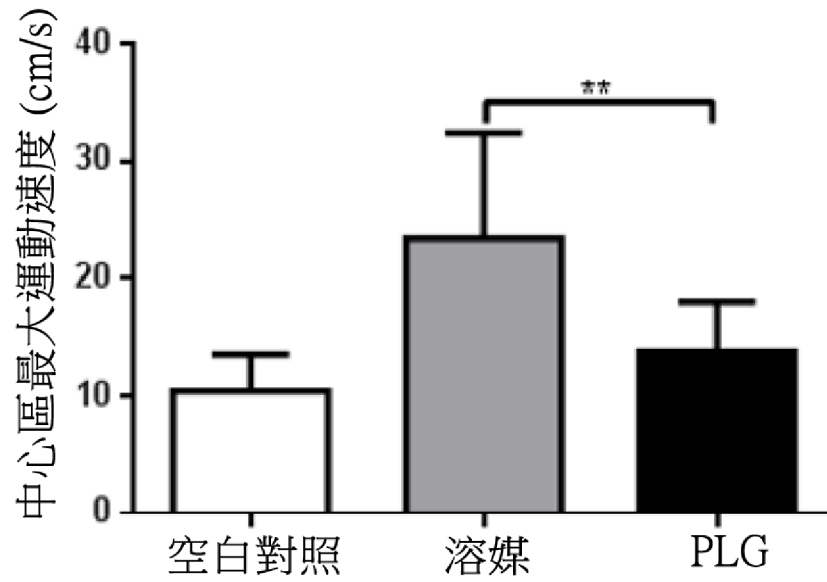
【圖7】



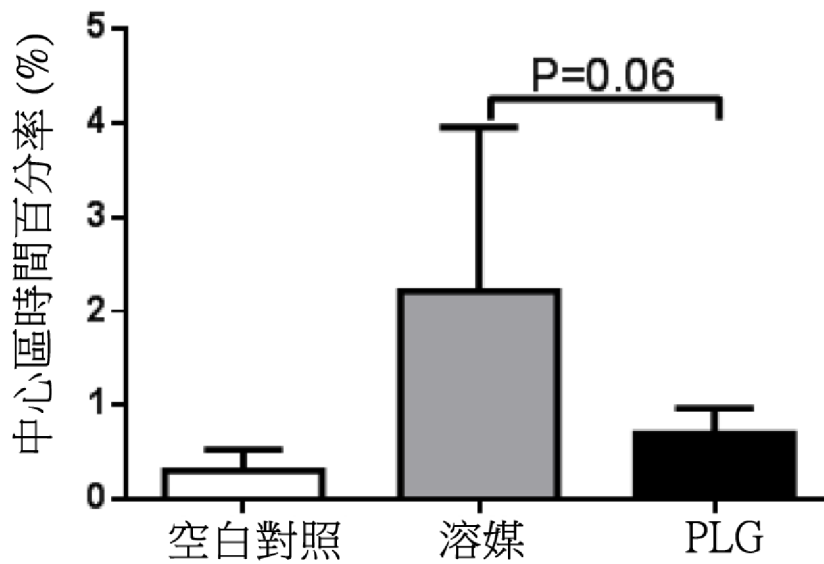
【圖8】



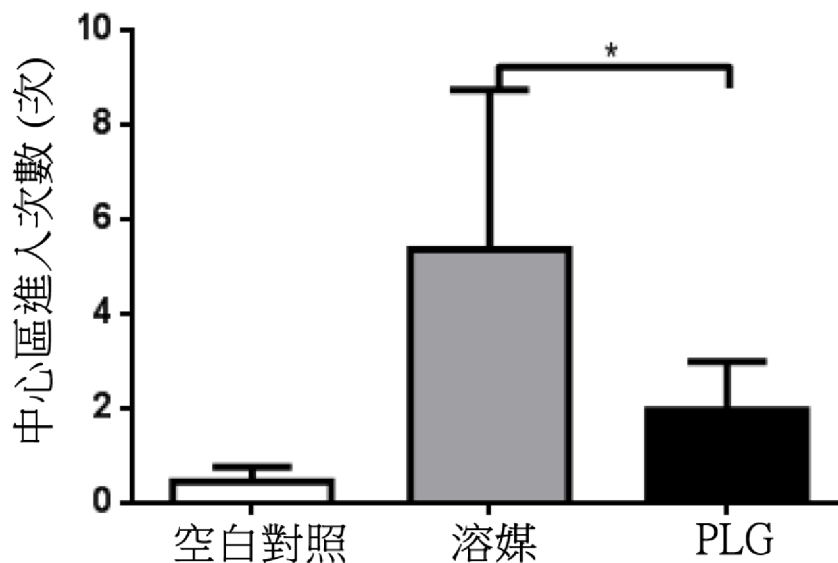
【圖9】



【圖10】

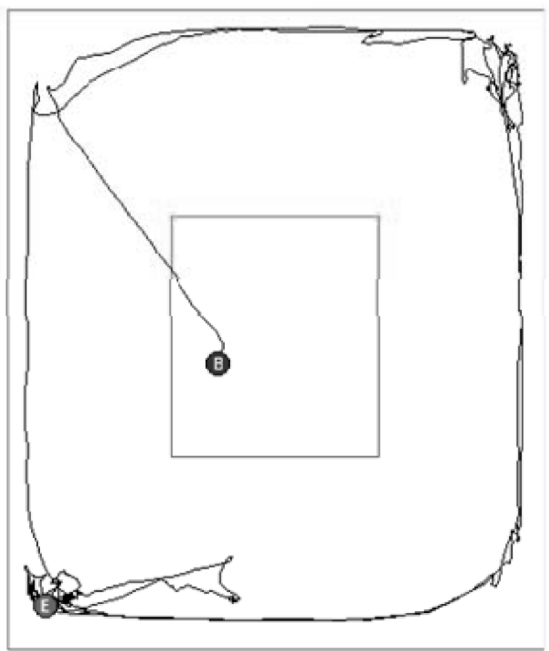
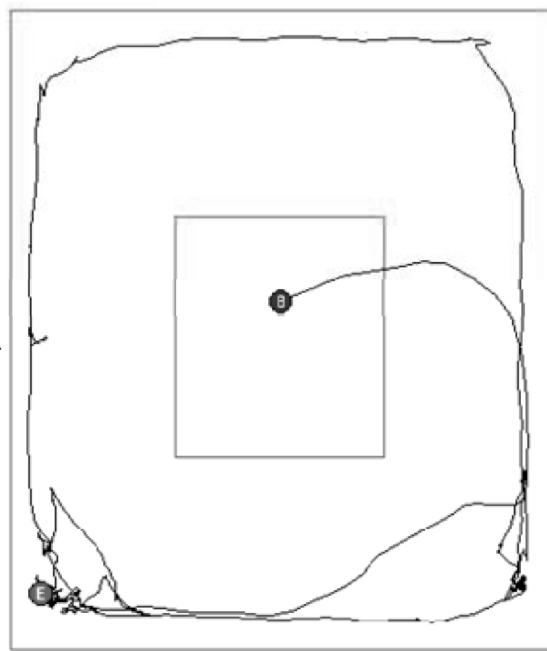


【圖11】

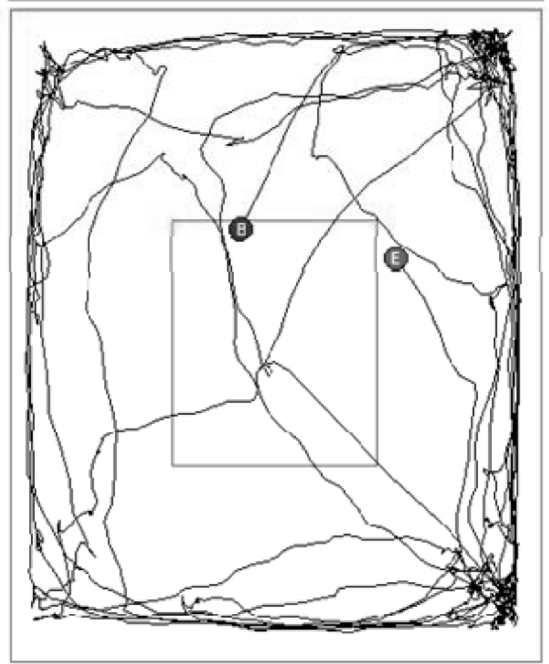
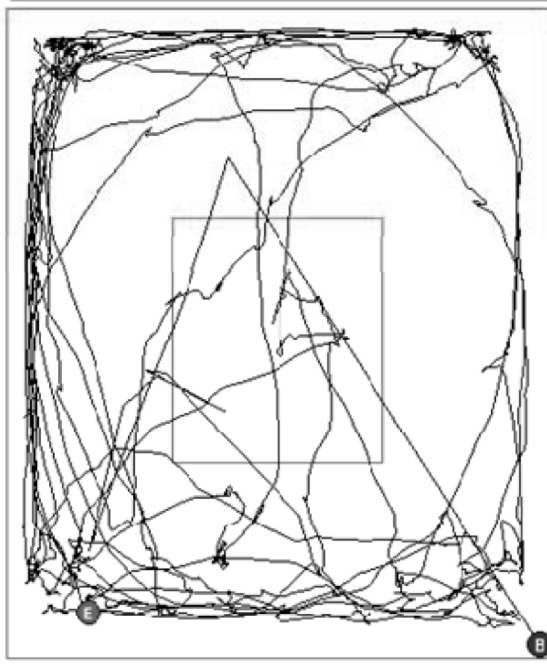


【圖12】

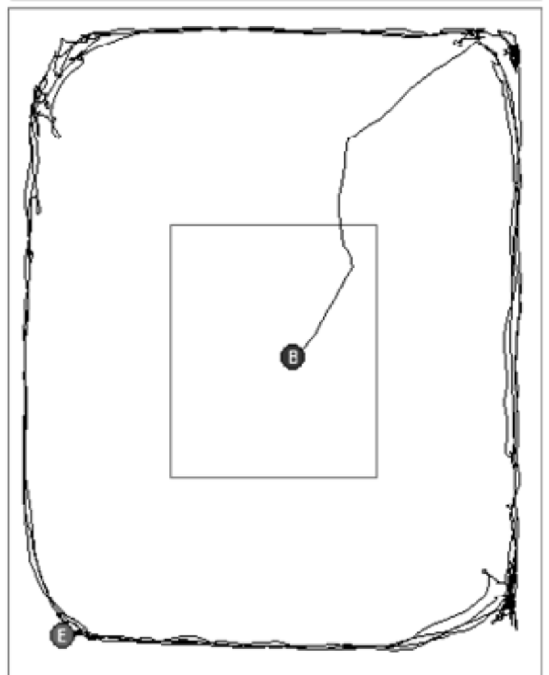
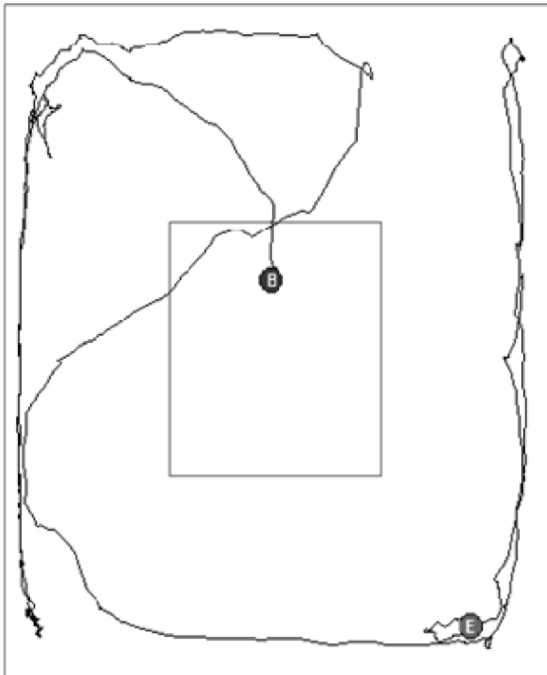
空白對照組



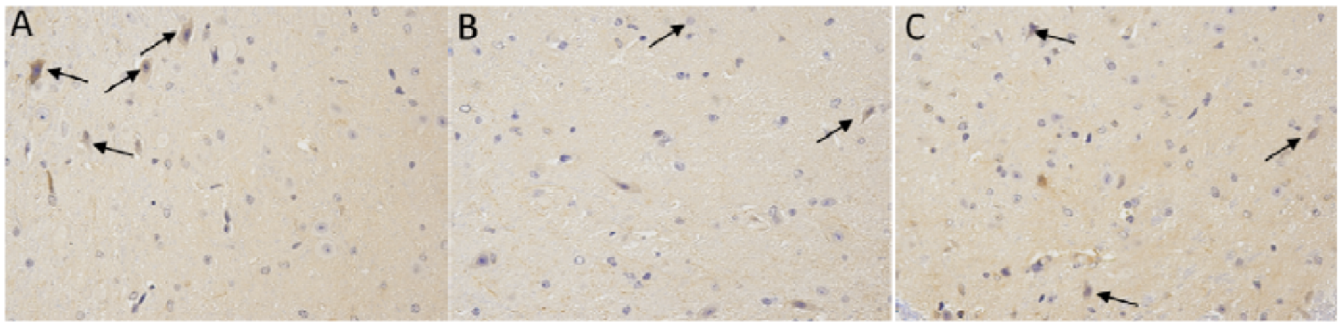
溶媒組



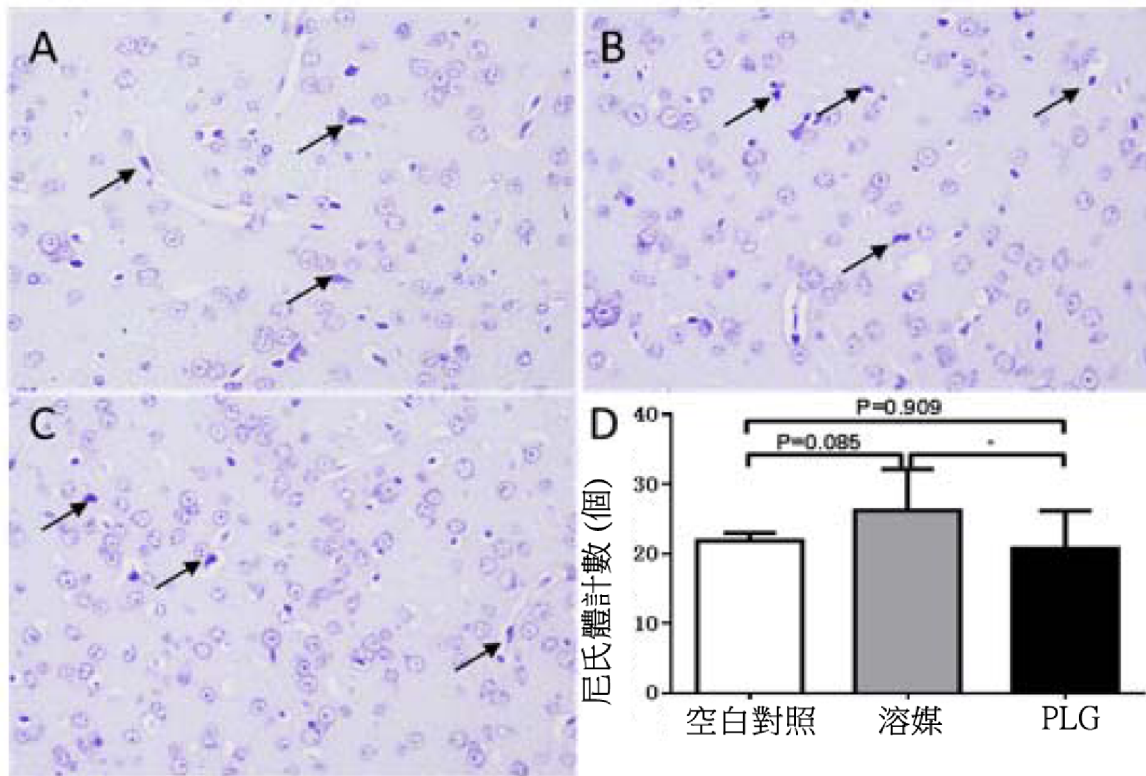
PLG



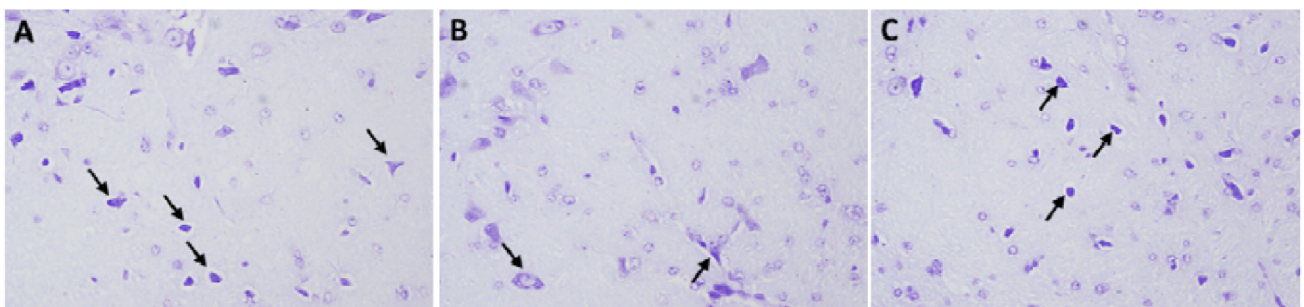
【圖13】



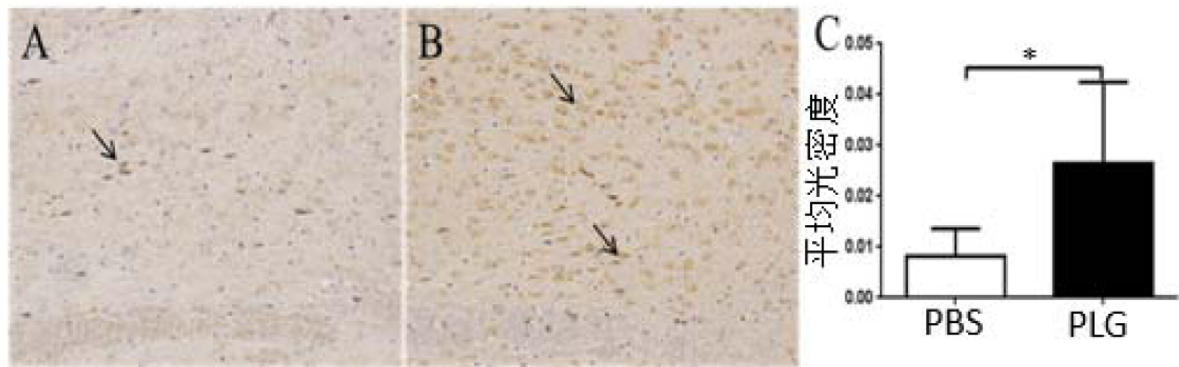
【圖14】



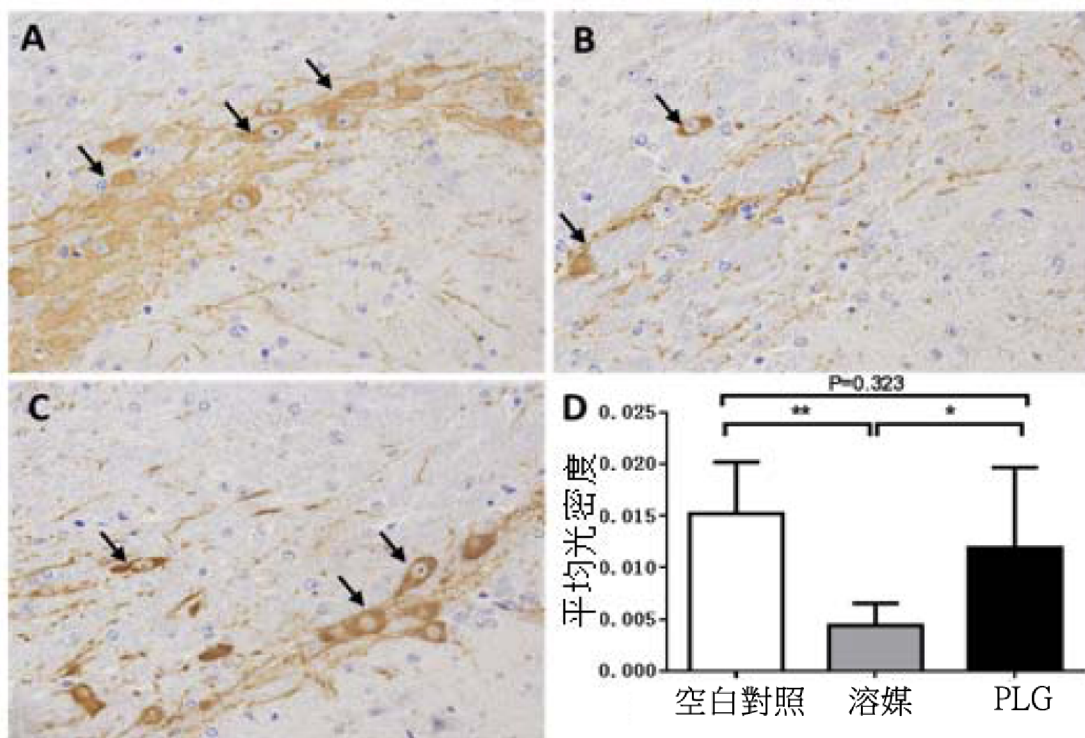
【圖15】



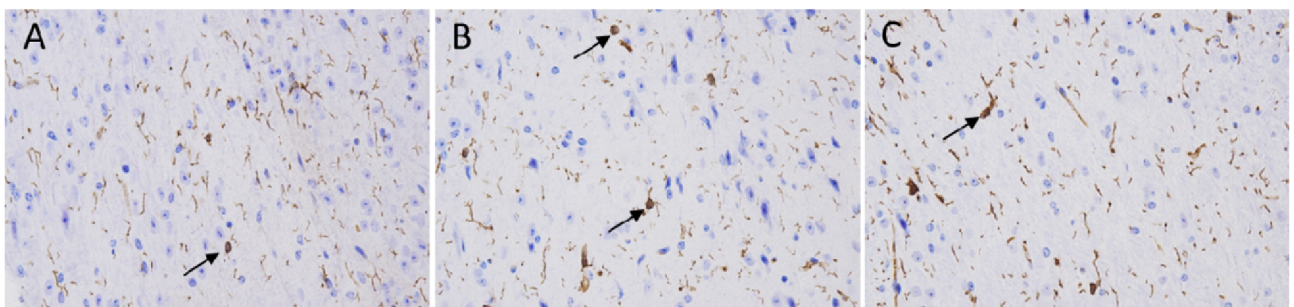
【圖16】



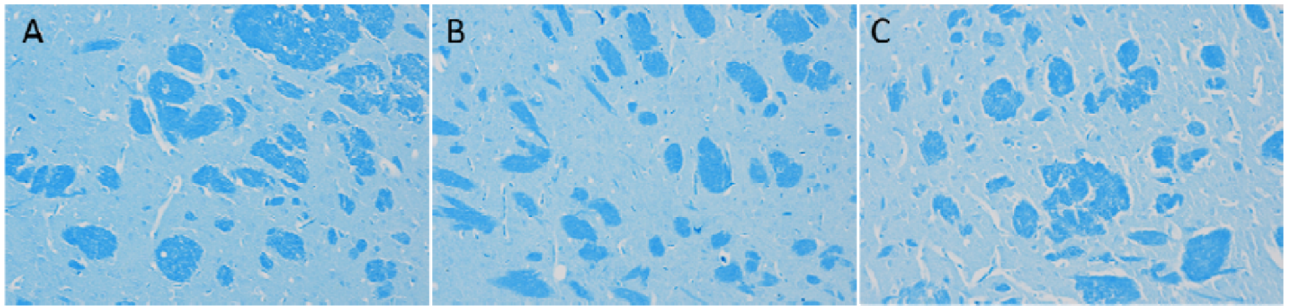
【圖17】



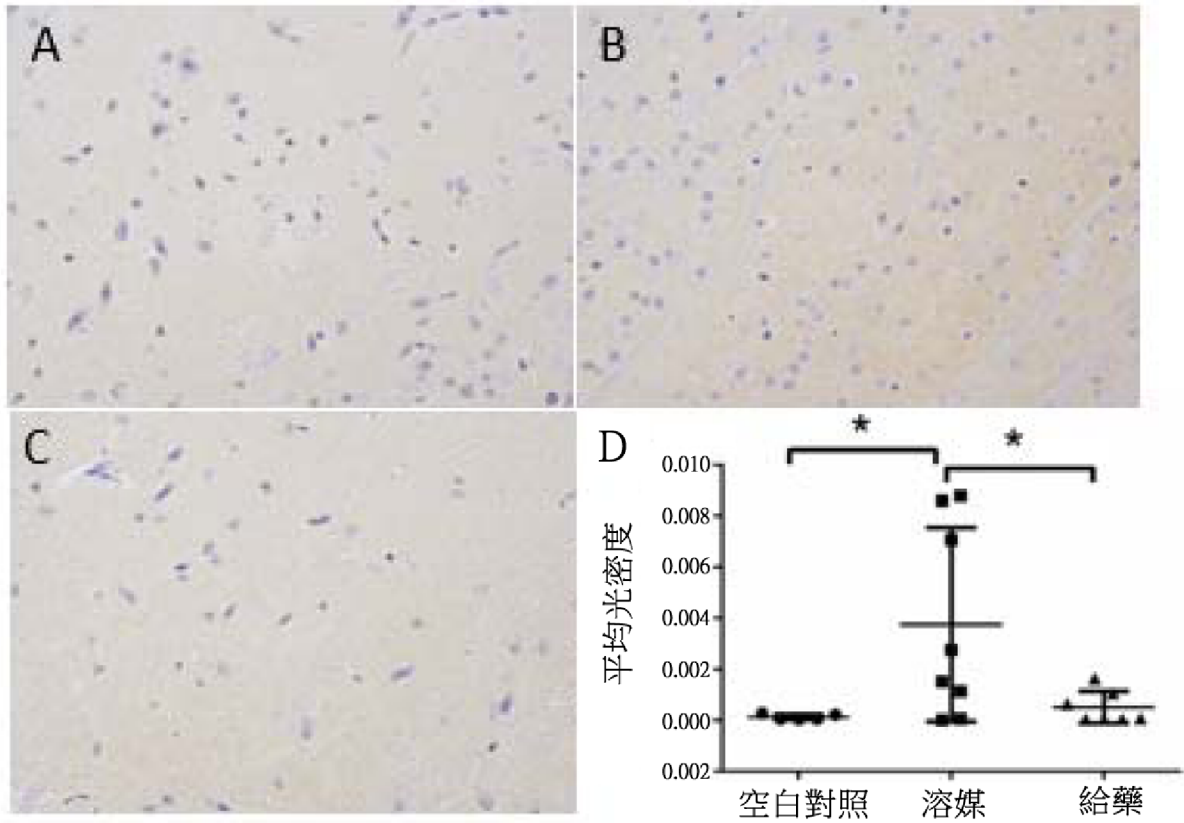
【圖18】



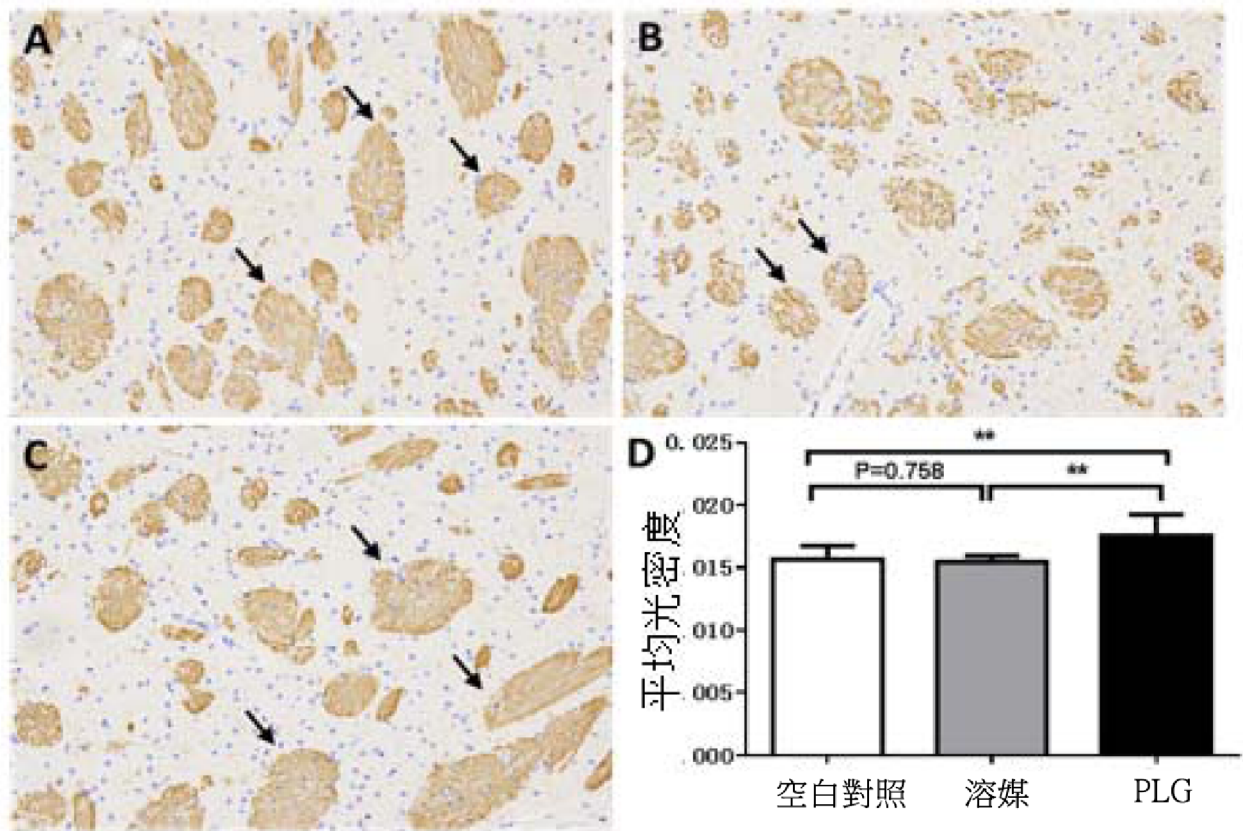
【圖19】



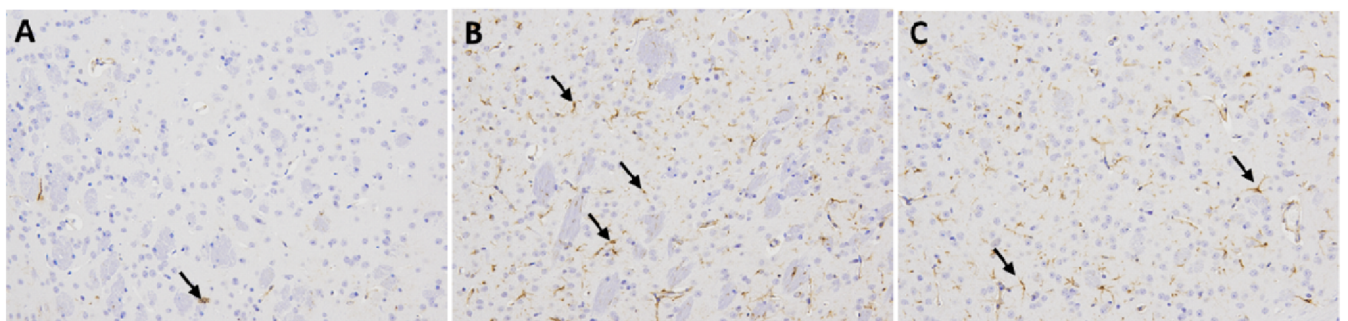
【圖20】



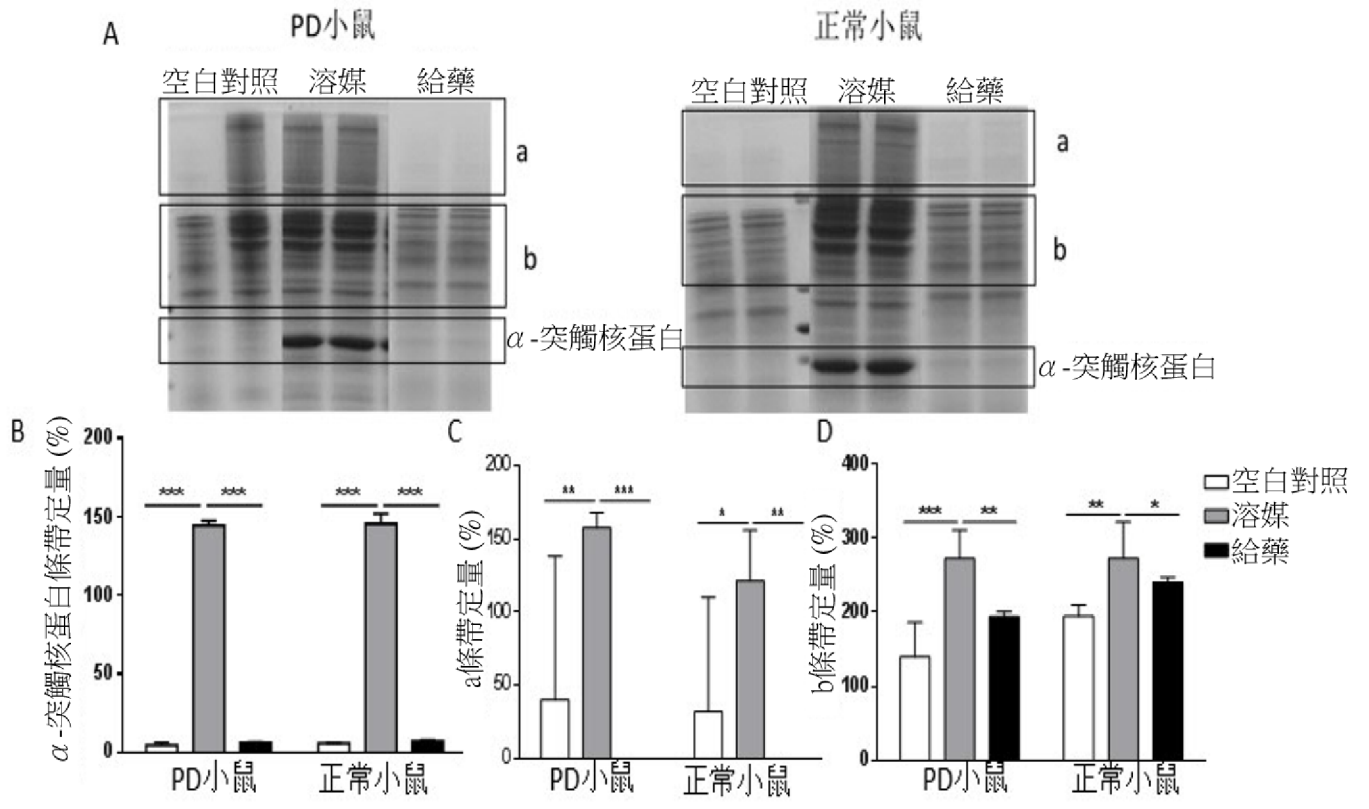
【圖21】



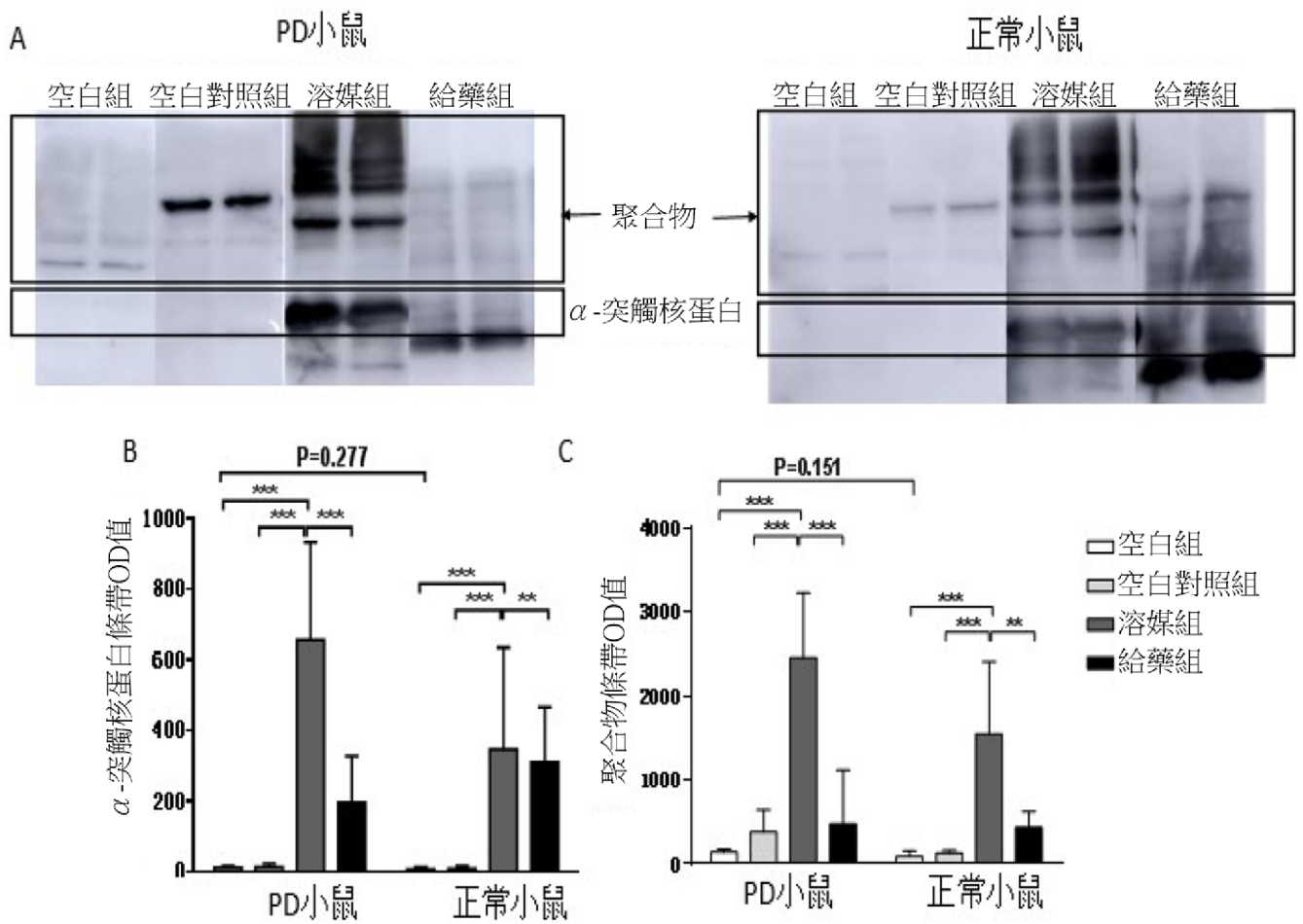
【圖22】



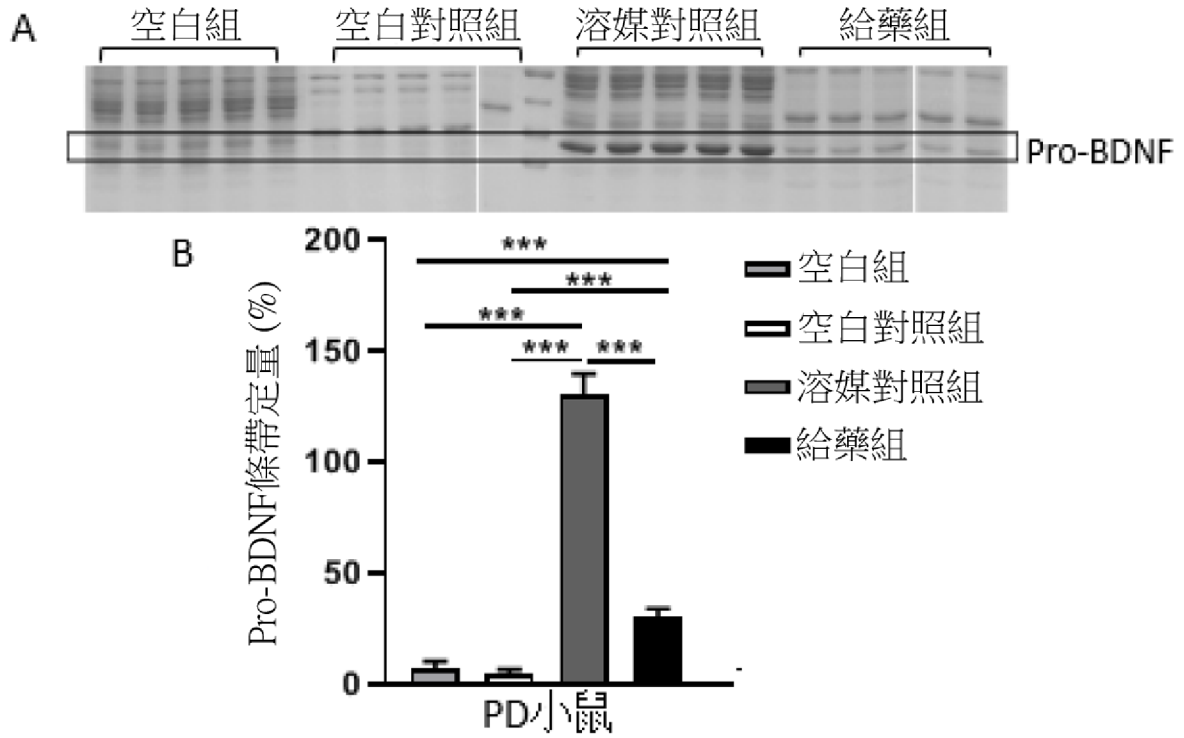
【圖23】



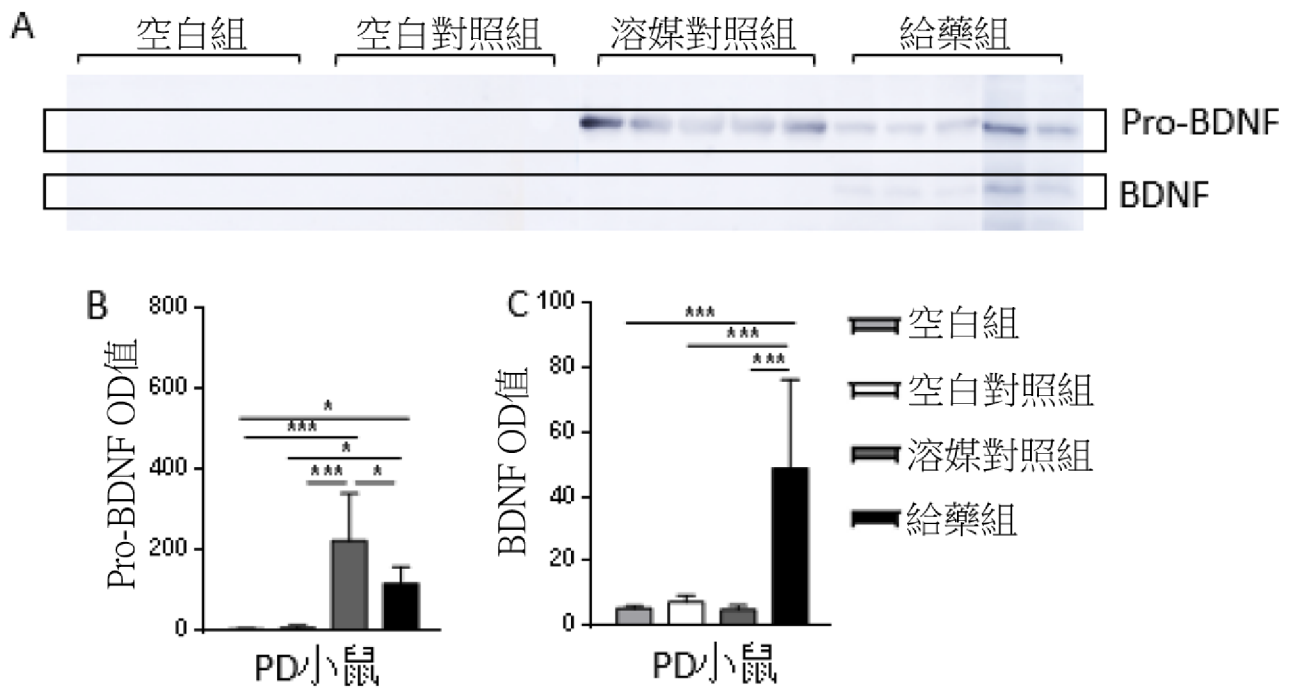
【圖24】



【圖25】



【圖26】



【圖27】