

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年8月12日 (12.08.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/155867 A1**

(51) 国际专利分类号: *A61K 38/43* (2006.01) RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/075921

(22) 国际申请日: 2021年2月8日 (08.02.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010081324.8 2020年2月6日 (06.02.2020) CN

(71) 申请人: 泰伦基国际有限公司 (TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区湾仔告士打道108号光大中心2409号, Hong Kong 999077 (CN)。

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

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

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

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

本国际公布:

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

(54) **Title:** METHOD AND DRUG FOR PREVENTING AND TREATING MULTIPLE SCLEROSIS

(54) 发明名称: 一种预防和治疗多发性硬化症的方法和药物

(57) **Abstract:** A method for preventing and treating multiple sclerosis, comprising administering a therapeutically effective amount of a plasminogen activation pathway component to a subject. The present invention further relates to a drug, a pharmaceutical composition, a product, and a kit that contain a plasminogen activation pathway component and that are used for the treatment of said disease.

(57) 摘要: 一种预防和治疗多发性硬化症的方法, 包括给药受试者治疗有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径组分, 还涉及用于治疗上述病症的包含纤维蛋白溶酶原激活途径组分的药物、药物组合物、制品、试剂盒。



WO 2021/155867 A1

## 一种预防和治疗多发性硬化症的方法和药物

### 5 技术领域

本发明涉及一种预防或治疗多发性硬化症的方法，包括给药受试者有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物，例如纤溶酶原，以修复损伤神经，改善临床症状和体征。

### 10 背景技术

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是最常见的一种中枢神经脱髓鞘疾病，磁共振成像检查 (MRI) 可以看见大脑以及脊髓内多发的斑块样的病灶。该病的病因尚不明确，与遗传因素、病毒感染、自身免疫反应等有一定关系。本病急性活动期中枢神经白质有多发性炎性脱髓鞘斑，陈旧病变则由于胶质纤维增生而形成钙化斑，以多发病灶、缓解、复发病程为特点，好发于视神经、脊髓和脑干。目前的治疗方法包括激素治疗、 $\beta$ -干扰素和免疫抑制剂治疗，不甚理想，需要寻找其他的治疗方法。

### 发明概述

20 本发明研究发现纤溶酶原可以明显促进神经髓鞘的再生和修复，预防和治疗多发性硬化症。

具体地，本发明涉及如下各项：

1. 一方面，本申请涉及一种预防和治疗多发性硬化症的方法，包括给药受试者治疗有效量的选自如下的一种或多种化合物：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

30 一方面，本申请涉及选自如下的一种或多种化合物在制备预防和治疗

多发性硬化症的药物中的用途，所述选自如下的一种或多种化合物为：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

一方面，本申请涉及预防和治疗多发性硬化症的药物，包含选自如下的一种或多种化合物：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

一方面，本申请涉及选自如下的一种或多种化合物用于预防和治疗多发性硬化症的用途，其中选自如下的一种或多种化合物为：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

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

3. 项 1 的方法、用途、或药物，所述纤溶抑制剂的拮抗剂为 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$  抗纤溶酶或  $\alpha 2$  巨球蛋白的抑制剂，例如抗体。

4. 项 1-3 任一项的方法、用途、或药物，其中所述化合物具有选自如下一项或多项的活性：促进神经髓鞘的再生、促进髓鞘蛋白表达（例如促进 PLP 或 MBP 蛋白的表达）、促进神经组织 NFP 的表达、促进神经纤维再生、促进神经组织 NFP 的表达、提高神经组织 MBP 水平、增加神经组织小胶质细胞数量、促进神经组织炎症修复、促进神经组织星形胶质细胞活性、提高神经组织 BDNF 水平、促进神经组织 GFAP 表达、改善受试者的社交行为能力、改善受试者的社交记忆能力、缓解受试者的抑郁行为、缓解受试者的焦虑行为。

5. 项 1-4 任一项的方法、用途、或药物，其中所述纤溶酶原缓解受试者的精神症状，例如抑郁症状或焦虑症状。

6. 项 1-5 任一项的方法、用途、或药物，其中所述化合物为纤溶酶原（也称纤维蛋白原）。

7. 项 1-6 任一项的方法、用途、或药物，其中所述纤溶酶原与序列 2 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性，例如蛋白水解活性、赖氨酸结合活性、或蛋白水解活性和赖氨酸结合活性。

8. 项 1-6 任一项的方法、用途、或药物，所述纤溶酶原包含与序列 14 所示的纤溶酶原活性片段具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性的氨基酸序列、并且具有纤溶酶原的蛋白水解活性。

在一些实施方案中，上述纤溶酶原为序列 2 所述纤溶酶原的保守取代变体。

9. 项 1-6 任一项的方法、用途、或药物，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

10. 项 1-6 任一项的方法、用途、或药物，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

11. 项 1-10 任一项的方法、用途、或药物，其中所述化合物与一种或多种其他治疗方法或药物联合使用。

12. 项 11 的方法、用途、或药物，其中所述其他治疗方法包括手术治

疗、细胞治疗（包括干细胞治疗）和物理治疗（例如物理的支持治疗，例如医疗器械辅助治疗，比如人机接口技术）。

13. 项 11 的方法、用途、或药物，其中所述其他药物包括激素、免疫抑制剂、神经营养药物、抗菌素和抗病毒药物。

5 14. 项 1-13 任一项的方法、用途、或药物，其中所述化合物通过选自如下的任一或多种方式或途径给药：鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、静脉内、腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内和肌肉内。

在本发明的上述任一实施方案中，所述纤溶酶原可与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性，例如蛋白水解活性、赖氨酸结合活性、或蛋白水解活性和赖氨酸结合活性。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质，例如蛋白水解活性、赖氨酸结合活性、或蛋白水解活性和赖氨酸结合活性。

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

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

30 在一些实施方案中，所述药物组合物包含药学上可接受的载剂和用于前述方法的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述试剂盒可以是预防性或治

疗性试剂盒，其包含：(i)用于前述方法的纤溶酶原和(ii)用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件(means)。在一些实施方案中，所述构件为注射器或小瓶。在一些实施方案中，所述试剂盒还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施前述任一方法。

5 法。  
在一些实施方案中，所述制品包含：含有标签的容器；和包含(i)用于前述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施前述任一方法。

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

在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原通过全身或局部给药，优选通过以下途径施用：静脉内、肌内、皮下给予纤溶酶原来进行治疗。在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原以每天 0.0001-  
15 2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg（以每公斤体重计算）或 0.0001-2000mg/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>（以每平方厘米体表面积计算）的剂量施用，优选至少重复一次，优选至少每天施用。

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

### 附图简述

25 图 1A-D 己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠给予纤溶酶原 14 天胼胝体 LFB 染色结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为定量分析结果。结果显示，空白对照组胼胝体髓鞘形态基本正常，给纤溶酶原组胼胝体髓鞘阳性着色(箭头标识)明显多于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著（\*为 P<0.05）。说明纤溶酶原能够减少胼胝体脱  
30 髓鞘，促进己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠髓鞘损伤的修复。

图 2A-C 己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠给予纤溶酶原 3 天脑胼胝体蛋白脂蛋白 (PLP) 免疫染色代表性图片。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组胼胝体 PLP 的表达 (箭头标识) 明显多于给溶媒 PBS 对照组, 与后者相比表达更加接近空白对照组小鼠。说明纤溶酶原促进胼胝体 PLP 的表达, 促进己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠髓鞘再生。

图 3A-D 己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠给予纤溶酶原 14 天神经丝蛋白 (NFP) 免疫染色观察结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠胼胝体 NFP 的表达 (箭头标识) 明显多于给溶媒 PBS 对照组, 统计差异显著 (\*为  $P<0.05$ ), 且与给溶媒 PBS 对照组 (全文也简称为溶媒组) 相比给纤溶酶原组胼胝体 NFP 的表达更加接近空白对照组。说明纤溶酶原能够促进 NFP 的表达, 从而促进神经纤维再生。

图 4 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠胼胝体 NFP 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为平均光密度定量分析结果。结果显示, 空白对照组胼胝体表达一定水平的 NFP (箭头标识), 溶媒组小鼠胼胝体 NFP 的表达明显减少, 给纤溶酶原组 (全文也简称为给药组) 小鼠胼胝体 NFP 表达水平明显高于溶媒小鼠, 且统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )。该结果提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 NFP 的表达。

图 5A-C 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠胼胝体 PLP 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 空白对照组胼胝体表达一定水平的 PLP (箭头标识), 溶媒组小鼠胼胝体 PLP 的表达明显减少, 给药组小鼠胼胝体 PLP 的表达水平明显高于溶媒小鼠。该结果提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 PLP 的表达。

图 6A-D 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠胼胝体 MBP 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为平均光密度定量分析结果。结果显示, 空白对照组胼胝体表达一定水平的 MBP (箭头标识), 给药组小鼠胼胝体 MBP 明显高于溶

媒组小鼠，且统计差异接近显著 ( $P=0.063$ )。该结果提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 MBP 的水平增加。

5 图 7A-D 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠海马 Iba-1 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为平均光密度定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠海马存在一定量的小胶质细胞(箭头标识)，溶媒组小鼠海马小胶质细胞量明显增加，给药组小鼠海马小胶质细胞数量明显多于溶媒组，且统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ ，\*\*\*表示  $P<0.001$ )。提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马损伤炎症修复。

10 图 8A-D 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠海马 BDNF 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为平均光密度定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠海马具有一定水平的 BDNF(箭头标识)，溶媒组小鼠海马 BDNF 水平增加，给药组小鼠海马 BDNF 水平明显高于溶媒组，且统计差异接近显著 15 ( $P=0.095$ )。提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马 BDNF 水平增加。

20 图 9A-D 给予纤溶酶原 35 天后多发性硬化症模型小鼠海马 GFAP 免疫组织化学染色结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为平均光密度定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠海马表达一定水平的 GFAP (箭头标识)，溶媒组小鼠海马 GFAP 表达减少，给药组小鼠海马 GFAP 表达明显高于溶媒组，且统计差异接近显著 ( $P=0.051$ )。提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马 GFAP 表达增加，促进星形胶质细胞活性增加。

25 图 10 给予纤溶酶原 28 天后多发性硬化症模型小鼠旷场实验总运动路程统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的总运动路程，溶媒组小鼠总运动路程明显增加，给药组小鼠总运动路程明显小于溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为。

30 图 11 边界区静息时间百分率=边界区静息时间/总观察时间。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区静息时间百分率，约为 57.8%；溶

媒组小鼠边界区静息时间百分率明显降低, 约为 49.3%, 给药组小鼠边界区静息时间百分率约为 58.4%, 明显大于溶媒组, 统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )), 且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度地缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为。

5 图 12 给予纤溶酶原 34 天后多发性硬化症模型小鼠三箱实验第二阶段陌生小鼠 2 接触范围内静息时间百分率统计结果。静息时间百分率=静息时间/总观察时间。三箱社交测试实验第二阶段结果显示, 空白对照组小鼠具有一定的陌生小鼠 2 接触范围内的静息时间百分率, 约为 13.7%; 溶媒组明显降低, 约为 10.6%; 给药组约为 16.1%, 明显高于溶媒组, 且统计差异接近显著 ( $P=0.075$ )。说明纤溶酶原能够改善多发性硬化症模型小鼠的社交记忆。

15 图 13 给予纤溶酶原 6 天后多发性硬化症模型模型大鼠旷场实验边界区运动路程百分率统计结果。边界区运动路程为旷场实验测试时间内边界区运动轨迹长度。结果显示, 空白对照组具有一定的边界区运动路程百分率, 约为 91.1%; 溶媒组明显增加, 约为 93.6%; 给药组约为 88.1%, 明显低于溶媒组, 且统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能够缓解多发性硬化症模型小鼠的抑郁行为。图 14 给予纤溶酶原 6 天后多发性硬化症模型大鼠旷场实验中心区运动路程百分率统计结果。结果显示, 空白对照组具有一定的中心区路程百分率, 约为 8.9%; 溶媒组明显降低, 约为 6.4%; 给药组约为 11.9%, 明显高于溶媒组, 且统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能够缓解多发性硬化症模型大鼠的焦虑行为。

25 图 15 给药纤溶酶原 20 天后多发性硬化症模型小鼠高架十字迷宫测试开放臂进入百分率统计结果。结果显示, 空白对照组小鼠具有一定的开放臂进入百分率, 约为 14.9%; 溶媒组小鼠开放臂进入百分率明显增加, 约为 23.0%; 给药组小鼠开放臂进入百分率约为 14.5%, 明显少于溶媒组, 统计差异显著 ( $P=0.015$ ), 且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑行为。

30 图 16 给药纤溶酶原 20 天后多发性硬化症模型小鼠高架十字迷宫测试闭合臂进入百分率统计结果。结果显示, 空白对照组小鼠具有一定的闭合臂进入百分率, 约为 34.4%; 溶媒组小鼠闭合臂进入百分率明显降低, 约

为 28.1%；给药组小鼠闭合臂进入百分率约为 37.1%，明显大于溶媒组，统计差异显著 ( $P=0.007$ )，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。图 17 给予纤溶酶原 27 天后多发性硬化症模型小鼠高架十字迷宫测试闭合臂运动路程统计结果。闭合臂运动总路程为高架十字迷宫实验测试时间内小鼠闭合臂运动总路程。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的闭合臂运动总路程，溶媒组小鼠闭合臂运动总路程明显增加，给药组小鼠闭合臂运动总路程明显少于溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。图 18 给予纤溶酶原 27 天后多发性硬化症模型小鼠高架十字迷宫测试闭合臂静息时间百分率统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的闭合臂休息时间百分率，约为 51.8%；溶媒组小鼠闭合臂休息时间百分率明显降低，约为 36.8%；给药组小鼠闭合臂休息时间百分率约为 50.1%，明显大于溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ )，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。

### 发明详述

纤维蛋白溶解系统 (Fibrinolytic system) 也称纤溶系统，为参与纤维蛋白溶解 (纤溶) 过程的一系列化学物质组成的系统，主要包括纤维蛋白溶解酶原 (纤溶酶原)、纤溶酶、纤溶酶原激活物、纤溶抑制剂。纤溶酶原激活物包括组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 和尿激酶型纤溶酶原激活物 (u-PA)。t-PA 是一种丝氨酸蛋白酶，由血管内皮细胞合成。t-PA 激活纤溶酶原，此过程主要在纤维蛋白上进行；尿激酶型纤溶酶原激活物 (u-PA) 由肾小管上皮细胞和血管内皮细胞产生，可以直接激活纤溶酶原而不需要纤维蛋白作为辅因子。纤溶酶原 (PLG) 由肝脏合成，当血液凝固时，PLG 大量吸附在纤维蛋白网上，在 t-PA 或 u-PA 的作用下，被激活为纤溶酶，促使纤维蛋白溶解。纤溶酶 (PL) 是一种丝氨酸蛋白酶，作用如下：降解纤维蛋白和纤维蛋白原；水解多种凝血因子 V、VIII、X、VII、XI、II 等；使纤溶酶原转变为纤溶酶；水解补体等。纤溶抑制物：包括纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI) 和  $\alpha_2$  抗纤溶酶 ( $\alpha_2$ -AP)。PAI 主要有 PAI-1 和 PAI-2 两种形式，能特异性与 t-PA 以 1:1 比例结合，从而使其失活，同

时激活 PLG。 $\alpha$ 2-AP 由肝脏合成，与 PL 以 1:1 比例结合形成复合物，抑制 PL 活性；FXIII 使 $\alpha$ 2-AP 以共价键与纤维蛋白结合，减弱了纤维蛋白对 PL 作用的敏感性。体内抑制纤溶系统活性的物质：PAI-1，补体 C1 抑制物； $\alpha$ 2 抗纤溶酶； $\alpha$ 2 巨球蛋白。

5 本发明的术语“纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”涵盖：

1. 纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、Glu-纤维蛋白溶酶原、微纤溶酶原 (micro-plasminogen)、delta-纤溶酶原；它们的变体或类似物；

2. 纤维蛋白溶酶以及它们的变体或类似物；和

3. 纤维蛋白溶酶原激活剂，例如 tPA 和 uPA 以及包含一个或多个 tPA  
10 或 uPA 的结构域(如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域)的 tPA 或 uPA 变体和类似物。

上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式，以及通过添加、删除和/或取代例如 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-  
15 45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸、仍然具有纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 活性的蛋白质。例如，纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的“变体”包括通过例如 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个保守性氨基酸取代获得的这些蛋白质的突变变体。  
20

本发明的“纤溶酶原变体”涵盖与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。例如本发明的“纤溶酶原变体”可以是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-  
25 90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。具体地，本发明纤溶酶原变体包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式，以及通过保守性氨基酸取代例如 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-

20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸获得的这些蛋白质的突变变体。

本发明的纤溶酶原可以为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体，例如序列 2、6、8、10 或 5 12 所示的纤溶酶原，例如序列 2 所示的人天然纤溶酶原。

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

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

上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的“变体”或“类似物”是否分别具有纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的活性，或者是否分别提供与纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 基本相似的作用可以通过本领域已知方法进行检测，例如，通过基于酶谱法(enzymography)、ELISA(酶联免疫吸附测定)和 FACS(荧光激活细胞分选方法)通过激活的纤维蛋白溶酶活性水平来衡量，例如可以参照选自如下文献 25 中记载的方法测量：Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C, Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P. and Ny, T. (1999). Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* 140, 5030-5035; Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL (November 1984). "Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue 30 activator". *J. Clin. Invest.* 74 (5): 1625-33; Gravanis I, Tsirka SE (February

2008). "Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke". Expert Opinion on Therapeutic Targets. 12 (2): 159–70; Geiger M, Huber K, Wojta J, Stingl L, Espana F, Griffin JH, Binder BR (Aug 1989). "Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo".

5 Blood. 74 (2): 722–8.

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

10 天然纤溶酶原。

15

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

20

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

25

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

人纤溶酶原是一个单链糖蛋白, 由 791 个氨基酸组成, 分子量约为 92 kDa。纤溶酶原主要在肝脏合成, 大量存在于胞外液中。血浆中纤溶酶原含量约为 2  $\mu$ M。因此纤溶酶原是组织和体液中蛋白质水解活性的一个巨大的潜在来源。纤溶酶原存在两种分子形式: 谷氨酸-纤溶酶原 (Glu-plasminogen) 和赖氨酸-纤溶酶原(Lys-plasminogen)。天然分泌和未裂解形式的纤溶酶原具有一个氨基末端 (N-末端) 谷氨酸, 因此被称为谷氨酸-纤溶酶原。然而, 在纤溶酶存在时, 谷氨酸-纤溶酶原在 Lys76-Lys77 处水解成为赖氨酸-纤溶酶原。与谷氨酸-纤溶酶原相比, 赖氨酸-纤溶酶原与纤维蛋白具有更高的亲和力, 并可以更高的速率被 PAs 激活。这两种形式的纤溶酶原的 Arg560-Val561 肽键可被 uPA 或 tPA 切割, 导致二硫键连接的双链蛋白酶纤溶酶的形成。纤溶酶原的氨基末端部分包含五个同源三环, 即所谓的 kringles, 羧基末端部分包含蛋白酶结构域。一些 kringles 含有介导纤溶酶原与纤维蛋白及其抑制剂  $\alpha$ 2-AP 特异性相互作用的赖氨酸结合位点。最新发现一个纤溶酶原为 38 kDa 的片段, 其中包括 kringles1-4, 是血管生成的有效抑制剂。这个片段被命名为血管抑素, 可通过几个蛋白酶水解纤溶酶原产生。

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

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

“纤溶酶原”是纤溶酶的酶原形式，根据 swiss prot 中的序列，按含有信号肽的天然人源纤溶酶原氨基酸序列（序列 4）计算由 810 个氨基酸组成，分子量约为 90kD，主要在肝脏中合成并能够在血液中循环的糖蛋白，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 3 所示。全长的纤溶酶原包含七个结构域：位于 C 末端的丝氨酸蛋白酶结构域、N 末端的 Pan Apple(PAP)结构域以及 5 个 Kringle 结构域(Kringle1-5)。参照 swiss prot 中的序列，其信号肽包括残基 Met1-Gly19，PAP 包括残基 Glu20-Val98，Kringle1 包括残基 Cys103-Cys181，Kringle2 包括残基 Glu184-Cys262，Kringle3 包括残基 Cys275-Cys352，Kringle4 包括残基 Cys377-Cys454，Kringle5 包括残基 Cys481-Cys560。根据 NCBI 数据，丝氨酸蛋白酶域包括残基 Val581-Arg804。

Glu-纤溶酶原是人天然全长的纤溶酶原，由 791 个氨基酸组成（不含有 19 个氨基酸的信号肽），编码该序列的 cDNA 序列如序列 1 所示，其氨基酸序列如序列 2 所示。在体内，还存在一种是从 Glu-纤溶酶原的第 76-77 位氨基酸处水解从而形成的 Lys-纤溶酶原，如序列 6 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 5 所示。Delta-纤溶酶原 ( $\delta$ -plasminogen) 是全长纤溶酶原缺失了 Kringle2-Kringle5 结构的片段，仅含有 Kringle1 和丝氨酸蛋白酶域（也称蛋白酶结构域（protease domain, PD）），有文献报道了 delta-纤溶酶原的氨基酸序列（序列 8），编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 7 所示。小纤溶酶原 (Mini-plasminogen) 由 Kringle5 和丝氨酸蛋白

酶域组成，有文献报道其包括残基 Val443-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸），其氨基酸序列如序列 10 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 9 所示。而微纤溶酶原（Microplasminogen）仅含有丝氨酸蛋白酶结构域，有文献报道其氨基酸序列包括残基 Ala543-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸），也有专利文献 CN102154253A 报道其序列包括残基 Lys531-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸），在本专利申请中微纤溶酶原序列参考专利文献 CN102154253A，其氨基酸序列如序列 12 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 11 所示。

全长纤溶酶原的结构也描述在 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。在该文章中，Aisina 等描述纤溶酶原包括 Kringle1、2、3、4、5 结构域和丝氨酸蛋白酶结构域（也称蛋白酶结构域（protease domain, PD）），其中，Kringles 负责纤溶酶原与低分子量和高分子量的配体结合（即赖氨酸结合活性），导致纤溶酶原转变成一个更加开放的构型，从而更容易被活化；蛋白酶结构域（PD）为残基 Val562-Asn791，tPA 和 UPA 特异性切割纤溶酶原的 Arg561-Val562 位活化键，从而使纤溶酶原形成纤溶酶，因此，蛋白酶结构域（PD）是赋予纤溶酶原蛋白水解活性的区域。

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

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

本领域技术人员可以理解，本发明纤溶酶原的所有技术方案适用于纤溶酶，因此，本发明描述的技术方案涵盖了纤溶酶原和纤溶酶。在循环过程中，纤溶酶原采用封闭的非活性构象，但当结合至血栓或细胞表面时，

在纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)的介导下,其转变为呈开放性构象的活性纤溶酶。具有活性的纤溶酶可进一步将纤维蛋白凝块水解为纤维蛋白降解产物和 D-二聚体,进而溶解血栓。其中纤溶酶原的 PAp 结构域包含维持纤溶酶原处于非活性封闭构象的重要决定簇,而 KR 结构域则能够与存在于受体和底物上的赖氨酸残基结合。已知多种能够作为纤溶酶原激活剂的酶,包括:组织纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)、激肽释放酶和凝血因子 XII(哈格曼因子)等。

“纤溶酶原活性片段”是指具有与底物靶序列中赖氨酸结合的活性(赖氨酸结合活性)、或发挥蛋白水解功能的活性(蛋白水解活性)、或蛋白水解活性和赖氨酸结合活性的片段。本发明涉及纤溶酶原的技术方案涵盖了用纤溶酶原活性片段代替纤溶酶原的技术方案。在一些实施方案中,本发明所述的纤溶酶原活性片段包含纤溶酶原的丝氨酸蛋白酶结构域或由纤溶酶原的丝氨酸蛋白酶结构域组成,优选,本发明所述的纤溶酶原活性片段包含序列 14、或与序列 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、或与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,本发明所述的纤溶酶原活性片段包含选自 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4、Kringle 5 中一个或多个的区域,或由选自 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4、Kringle 5 中一个或多个的区域组成。在一些实施方案中,本发明所述的纤溶酶原包括含有上述纤溶酶原活性片段的蛋白质。

目前,对于血液中纤溶酶原及其活性测定方法包括:对组织纤溶酶原激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤溶酶原激活剂抗原的检测(t-PAAg)、对血浆组织纤溶酶原活性的检测(plgA)、血浆组织纤溶酶原抗原的检测(plgAg)、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物抗原的检测、血浆纤维蛋白溶酶-抗纤维蛋白溶酶复合物检测(PAP)。其中最常用的检测方法为发色底物法:向受检血浆中加链激酶(SK)和发色底物,受检血浆中的 PLG 在 SK 的作用下,转变成 PLM,后者作用于发色底物,随后用分光光度计测定,吸光度增加与纤溶酶原活性成

正比。此外也可采用免疫化学法、凝胶电泳、免疫比浊法、放射免疫扩散法等对血液中的纤溶酶原活性进行测定。

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

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

“分离的”纤溶酶原是指从其天然环境分离和/或回收的纤溶酶原蛋白。在一些实施方案中，所述纤溶酶原会纯化(1)至大于 90%、大于 95%、或大于 98% 的纯度(按重量计)，如通过 Lowry 法所确定的，例如超过 99% (按重量计)，(2)至足以通过使用旋转杯序列分析仪获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度，或(3)至同质性，该同质性是通过使用考马斯蓝或银染在还原性或非还原性条件下的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 确定的。分离的纤溶酶原也包括通过生物工程技术从重组细胞制备，并通过至少一个纯化步骤分离的纤溶酶原。

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指任何长度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸，化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸，和具有经修饰的肽主链的多肽。该术

语包括融合蛋白，包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白，具有异源和同源前导序列(具有或没有N端甲硫氨酸残基)的融合物；等等。

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

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

$$\text{分数 } X/Y \text{ 乘 } 100$$

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

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

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

“治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时足以实现对疾病的所述预防和/或治疗的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物(例如纤溶酶原)的量。“治疗有效量”会根据所使用的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物(例如纤溶酶原)、要治疗的受试者的疾病和/或其症状的严重程度以及年龄、体重等而变化。

#### 本发明纤溶酶原的制备

10 纤溶酶原可以从自然界分离并纯化用于进一步的治疗用途，也可以通过标准的化学肽合成技术来合成。当通过化学合成多肽时，可以经液相或固相进行合成。固相多肽合成(SPPS)(其中将序列的C末端氨基酸附接于不溶性支持物，接着序贯添加序列中剩余的氨基酸)是适合纤溶酶原化学合成的方法。各种形式的SPPS，诸如Fmoc和Boc可用于合成纤溶酶原。用于固相合成的技术描述于Barany和Solid-Phase Peptide Synthesis;第3-284页于The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology.第2卷: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield,等J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart等, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984);和Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10和Camarero JA等2005 Protein Pept Lett. 12:723-8中。简言之，用其上构建有肽链的功能性单元处理小的不溶性多孔珠。在偶联/去保护的重复循环后，将附接的固相游离N末端胺与单个受N保护的氨基酸单元偶联。然后，将此单元去保护，露出可以与别的氨基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上，之后将其切掉。

25 可以使用标准重组方法来生产本发明的纤溶酶原。例如，将编码纤溶酶原的核酸插入表达载体中，使其与表达载体中的调控序列可操作连接。表达调控序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达调控可以是载体中的真核启动子系统，所述载体能够转化或转染真核宿主细胞(例如COS或CHO细胞)。

一旦将载体掺入合适的宿主中，在适合于核苷酸序列的高水平表达及纤溶酶原的收集和纯化的条件下维持宿主。

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

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

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

在微生物外，哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达并生成本发明的抗-Tau 抗体(例如编码主题抗-Tau 抗体的多核苷酸)。参见 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、和经转化的 B 细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列，如复制起点，启动子和增强子(Queen 等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986))，以及必需的加工信息位点，诸如核糖体结合位点，RNA 剪接位点，多聚腺苷酸化位点，和转录终止子序列。

合适的表达控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见 Co 等, J. Immunol. 148:1149 (1992)。

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

10

#### 药物配制剂

可以通过将具有所需纯度的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物(例如纤溶酶原)与可选的药用载体, 赋形剂, 或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性, 并包括缓冲剂例如磷酸盐, 柠檬酸盐及其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化己烷双胺; 氯化苄烷铵(benzalkonium chloride), 苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 间甲酚); 低分子量多肽(少于约 10 个残基); 蛋白质如血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸, 谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖, 二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精; 螯合剂如 EDTA; 糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇; 成盐反离子如钠; 金属复合物(例如锌-蛋白复合物); 和/或非离子表面活性剂, 例如 TWEENTM, PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。优选冻干的抗-VEGF 抗体配制剂在 WO 97/04801 中描述, 其包含在本文中作为参考。

25

本发明的配制剂也可含有需治疗的具体病症所需的一种以上的活性化合物, 优选活性互补并且相互之间没有副作用的那些。

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

用于体内给药的本发明的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物(例如纤溶酶原)必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

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

#### 给药和剂量

25 可以通过不同方式，例如通过鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液，静脉内，腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内(例如经由颈动脉)、肌内、直肠给药来实现本发明药物组合物的施用。

用于胃肠外施用的制备物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和可注射  
30 有机酯，如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳剂或悬浮液，

包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包含氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、或固定油。静脉内媒介物包含液体和营养补充物、电解质补充物，等等。也可以存在防腐剂和其他添加剂，诸如例如，抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体，等等。

- 5 医务人员会基于各种临床因素确定剂量方案。如医学领域中公知的，任一患者的剂量取决于多种因素，包括患者的体型、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施用次数和路径、总体健康、和同时施用的其它药物。本发明包含纤溶酶原的药物组合物的剂量范围可以例如为每天约 0.0001 至 2000 mg/kg，或约 0.001 至 500 mg/kg (例如 0.02 mg/kg, 0.25
- 10 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg 等等)受试者体重。例如，剂量可以是 1 mg/kg 体重或 50 mg/kg 体重或在 1-50 mg/kg 的范围，或至少 1 mg/kg。高于或低于此例示性范围的剂量也涵盖在内，特别是考虑到上述的因素。上述范围中的中间剂量也包含在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类
- 15 剂量。例示性的剂量日程表包括连续几天 0.01-100 mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估治疗效果和安全性。

#### 制品或药盒

- 本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒，其包含纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）。所述制品优选包括一个容器，标签或包装插页。适当的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。所述容器含有组合物，所述组合物可有效治疗本发明的疾病或病症并具有无菌入口(例如所述容器可为静脉内溶液包
- 20 或小瓶，其含有可被皮下注射针穿透的塞子的)。所述组合物中至少一种活性剂为纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）。所述容器上或所附的标签说明所述组合物用于治疗本发明所述病症。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器，诸如磷酸盐缓冲的盐水，林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者角度来看所需的其它物质，包括其它缓冲液，稀释剂，过滤物，针和注射器。此外，所述制品包含带有使用说明的包装插页，包括例如指示所述组
- 25

合物的使用者将包含纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）的组合物以及治疗伴随的疾病的其它药物给药患者。

### 实施例

以下实施例中使用的人纤溶酶原来自捐赠者血浆，基于如下文献描述的方法：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，并进行工艺优化，从人血浆中纯化所得从人捐赠者血浆纯化获得，其中人纤维蛋白溶酶原单体>98%。

### 15 **实施例 1 纤溶酶原促进己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠胼胝体髓鞘的再生**

取 8 周龄 C57 雄性小鼠 20 只，随机分为 2 组，空白对照组 6 只，模型组 14 只。空白对照组小鼠饲喂正常维持饲料（购自北京科澳协力有限公司），模型组小鼠饲喂 0.2% 双环己酮草酰双胍（cuprizone）模型饲料（南通特洛菲饲料科技有限公司），饲喂 6 周，诱导小鼠髓鞘脱落模型<sup>[1]</sup>。6 周后模型组小鼠根据体重再次随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，每组各 7 只。给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml/只/天尾静脉注射给予纤溶酶原，给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS，空白对照组小鼠不做注射处理，连续给药 14 天。给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。开始给药定为第 1 天，第 15 天解剖小鼠取脑于 4%多聚甲醛固定，脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m，脱蜡至水后，用髓鞘染色液进行 LFB 染色。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂胶封片。在光学显微镜下，观察拍照。

结果显示，空白对照组（图 1A）胼胝体髓鞘形态基本正常，给纤溶酶原组(图 1C)胼胝体髓鞘阳性着色（箭头标识）明显多于给溶媒 PBS 对照组

(图 1B), 且统计差异显著 (图 1D) (\*表示  $P < 0.05$ )。说明纤溶酶原能够促进己酮草酰双踪诱导脱髓鞘模型小鼠髓鞘的再生。

## 实施例 2 纤溶酶原促进己酮草酰双踪诱导脱髓鞘模型小鼠胼胝体 PLP 表达

- 5 取 8 周龄 C57 雄性小鼠 20 只, 随机分为 2 组, 空白对照组 6 只, 模型组 14 只。空白对照组小鼠饲喂正常维持饲料 (购自北京科澳协力有限公司), 模型组小鼠饲喂 0.2% 己酮草酰双踪模型饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司), 饲喂 6 周, 诱导小鼠髓鞘脱落模型<sup>[1]</sup>。6 周后模型组小鼠根据体重再次随机分为两组, 给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组, 每组各 7 只。
- 10 给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml/只/天尾静脉注射给予纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS, 空白对照组小鼠不做注射处理, 连续给药 3 天。给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。开始给药定为第 1 天, 第 4 天解剖小鼠取脑于 4% 多聚甲醛固定, 脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟, 室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟, 用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时; 时间到后, 弃除羊血清液。兔源抗蛋白脂质蛋白 (proteolipid protein, PLP) 抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam)
- 15 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水返蓝 5 分钟, 然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片, 切片在 200 倍光学显微镜下观察。

25 蛋白脂质蛋白 (Proteolipid Protein, PLP) 是一种高度疏水的膜蛋白, 是中枢神经系统中含量最多的髓磷脂<sup>[2]</sup>。

结果显示, 给纤溶酶原组(图 2C)胼胝体 PLP 的表达 (箭头标识) 明显多于给溶媒 PBS 对照组(图 2B), 与后者相比表达更加接近空白对照组小鼠 (图 2A)。说明纤溶酶原促进胼胝体 PLP 的表达, 促进己酮草酰双踪诱导脱髓鞘模型小鼠髓鞘再生。

### 实施例 3 纤溶酶原促进己酮草酰双胍诱导脱髓鞘模型小鼠胼胝体神经丝蛋白 (NFP) 表达

取 8 周龄 C57 雄性小鼠 20 只, 随机分为 2 组, 空白对照组 6 只, 模型组 14 只。空白对照组小鼠饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司), 模型组小鼠饲喂 0.2% 己酮草酰双胍 模型饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司), 饲喂 6 周, 诱导小鼠髓鞘脱落模型<sup>[1]</sup>。6 周后模型组小鼠根据体重再次随机分为两组, 给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组, 每组各 7 只。给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml/只/天尾静脉注射给予纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS, 空白对照组小鼠不做注射处理, 连续给药 14 天。给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。开始给药定为第 1 天, 第 15 天解剖小鼠取脑于 4% 多聚甲醛固定, 脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟, 室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟, 用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时; 时间到后, 弃除羊血清液。兔源抗 NF 抗体 (Abcam, ab207176) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水返蓝 5 分钟, 然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片, 切片在 200 倍光学显微镜下观察。

神经丝蛋白 (Neurofilament protein, NFP) 是构成神经细胞轴突中间丝的蛋白质。其功能是提供弹性使神经纤维易于伸展和防止断裂, 在维持细胞骨架、稳定细胞形态和轴突转运方面均有十分重要意义<sup>[3]</sup>。

结果显示, 给纤溶酶原组 (图 3C) 小鼠胼胝体 NFP 的表达 (箭头标识) 明显多于给溶媒 PBS 对照组(图 3B), 且统计差异显著 (\*为  $P < 0.05$ )

(图 3D), 与给溶媒 PBS 对照组相比给纤溶酶原组胼胝体 NFP 的表达更加接近空白对照组(图 3A)。说明纤溶酶原能够促进 NFP 的表达, 从而促进神经纤维再生。

实施例 4 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体神经丝蛋白的表达增加

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二胺 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症<sup>[1]</sup>。

5 造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给

10 药 35 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 36 天处死小鼠，取材脑组织于 10% 甲醛溶液中固定，脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟，室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟，用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector

15 laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时；时间到后，弃除羊血清液。兔源抗 NFP 抗体 (Abcam, ab207176) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水返蓝 5 分钟，然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明

20 并封片，切片在 100 倍光学显微镜下观察。

结果显示，空白对照组 (图 4A) 胼胝体表达一定水平的 NFP (箭头标识)，溶媒组 (图 4B) 小鼠胼胝体 NFP 的表达明显减少，给药组 (图 4C) 小鼠胼胝体 NFP 表达水平明显高于溶媒小鼠，且统计差异显著 (\*表示  $P < 0.05$ ) (图 4D)。该结果提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 NFP 的表达。

25

#### **实施例 5 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体蛋白脂蛋白的水平增加**

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂维持饲料，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二胺

30

(CPZ) (厂商: 上海源叶生物科技有限公司, 货号: S30349) 的造模饲料, 持续饲喂 42 天, 诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后, 所有小鼠进行旷场实验检测, 根据检测结果对模型组小鼠进行分组, 溶媒组 11 只小鼠, 给药组 11 只小鼠。分组完成后, 所有小鼠开始给药, 记为给药第 1 天, 空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒, 给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 连续给药 35 天, 给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)。于第 36 天处死小鼠, 取材脑组织于 10%甲醛溶液中固定, 脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟, 室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3%双氧水孵育 15 分钟, 用 PAP 笔圈出组织。10%的羊血清 (Vector laboratories, Inc.,USA) 封闭 1 小时; 时间到后, 弃除羊血清液。兔源抗 PLP 抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc.,USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水返蓝 5 分钟, 然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片, 切片在 100 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 空白对照组 (图 5A) 胼胝体表达一定水平的 PLP (箭头标识), 溶媒组 (图 5B) 小鼠胼胝体 PLP 的表达明显减少, 给药组(图 5C)小鼠胼胝体 PLP 的表达水平明显高于溶媒小鼠。该结果提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 PLP 的表达。

#### **实施例 6 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠胼胝体 MBP 水平增加**

取 C57 小鼠雌性 30 只, 造模前进行称重, 根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组, 空白对照组 8 只小鼠, 模型组 22 只小鼠。分组完成后, 空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司), 模型组饲喂含有 0.6%双环己酮草酰二胺 (CPZ) (厂商: 上海源叶生物科技有限公司, 货号: S30349) 的造模饲料, 持续饲喂 42 天, 诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后, 所有小鼠进行旷场实验检测, 根据检测结果对模型组小鼠进行分组, 溶媒组 11 只小鼠, 给药组 11 只小鼠。分组完成后, 所有小鼠开始给药, 记为给药第 1 天, 空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/

天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续  
给药 35 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 36 天处死小鼠，  
取材脑组织于 10% 甲醛溶液中固定，脱水包埋。固定后的组织样本经酒精  
梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m，切  
5 片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟，室温冷却 10 分钟后水轻柔  
冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟，用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清  
(Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时；时间到后，弃除羊血清液。  
兔源抗髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育  
过夜，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗  
10 室温孵育 1 小时，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector  
laboratories, Inc., USA) 显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水返蓝 5  
分钟，然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片，切片在 100 倍光学显微镜  
下观察。

髓鞘碱性蛋白 (MBP) 是脊椎动物中枢神经系统少突细胞和周围神经  
15 系统雪旺细胞合成的一种强碱性膜蛋白。含有多种碱性氨基酸。

结果显示，空白对照组 (图 6A) 胼胝体表达一定水平的 MBP (箭头  
标识)，给药组 (图 6C) 小鼠胼胝体 MBP 明显高于溶媒组 (图 6B) 小鼠，且  
统计差异接近显著 ( $P=0.063$ ) (图 6D)。该结果提示纤溶酶原能够促进多  
发性硬化症模型小鼠胼胝体 MBP 的水平增加。

#### 20 实施例 7 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠海马损伤炎症修复

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所  
有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成  
后，空白对照组饲喂正常维持饲料 (购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲  
喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公  
25 司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型  
[1]。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠  
进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠  
开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/  
天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续  
30 给药 35 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 36 天处死小鼠，

取材脑组织于 10% 甲醛溶液中固定，脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟，室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟，用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时；时间到后，弃除羊血清液。兔源抗离子钙接头蛋白-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 抗体 (Abcam, ab178847) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水返蓝 5 分钟，然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察拍照，拍照图片用 Imaging-Pro 软件进行阳性染色光密度分析。

离子钙接头蛋白-1 ( Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 是中枢神经系统中的小胶质细胞表面标志物。小胶质细胞做为中枢神经系统中的免疫细胞，在其病变或者损伤时快速感测神经障碍并被活化。活化的小胶质细胞在数量与形态上有显著的变化并迁移到损伤部位，发挥多种功能，例如吞噬死细胞、促炎性细胞因子产量增加等<sup>[4]</sup>。

结果显示，空白对照组 (图 7A) 小鼠海马存在一定量的小胶质细胞 (箭头标识)，溶媒组(图 7B)小鼠海马小胶质细胞量明显增加，但给药组小鼠海马小胶质细胞数量明显多于溶媒组 (图 7C)，且统计差异显著 (图 7D) (\*表示  $P < 0.05$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ )。提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马损伤炎症修复。

#### 实施例 8 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠海马 BDNF 水平增加

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠

开始给药, 记为给药第 1 天, 空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒, 给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 连续给药 35 天, 给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 36 天处死小鼠, 取材脑组织于 10% 甲醛溶液中固定, 脱水包埋。固定后的组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟, 室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟, 用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时; 时间到后, 弃除羊血清液。兔源抗脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (BosterBio, PB9075) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水返蓝 5 分钟, 然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片, 切片在 400 倍光学显微镜下观察拍照, 拍照图片用 Imaging-Pro 软件进行阳性染色光密度分析。

成熟的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 及其受体广泛分布于中枢神经系统内, 在中枢神经系统发育过程中, 对神经元存活、分化、生长发育起重要作用, 并能防止神经元受损伤死亡, 改善神经元的病理状态, 促进受损伤神经元再生及分化等生物效应, 而且是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必须<sup>[5]</sup>。

结果显示, 空白对照组 (图 8A) 小鼠海马具有一定水平的 BDNF (箭头标识), 溶媒组 (图 8B) 小鼠海马 BDNF 水平增加, 给药组小鼠海马 BDNF 水平明显高于溶媒组 (图 8C), 且统计差异接近显著 (图 8D) (P=0.095)。提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马 BDNF 水平增加。

### 实施例 9 纤溶酶原促进多发性硬化症模型小鼠海马星形胶质细胞活性增加

取 C57 小鼠雌性 30 只, 造模前进行称重, 根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组, 空白对照组 8 只小鼠, 模型组 22 只小鼠。分组完成后, 空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司), 模型组饲

喂含有 0.6% 双环己酮草酰二胺 (CPZ) (厂商: 上海源叶生物科技有限公司, 货号: S30349) 的造模饲料, 持续饲喂 42 天, 诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后, 所有小鼠进行旷场实验检测, 根据检测结果对模型组小鼠进行分组, 溶媒组 11 只小鼠, 给药组 11 只小鼠。分组完成后, 所有小鼠

5 开始给药, 记为给药第 1 天, 空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒, 给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 连续给药 35 天, 给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 36 天处死小鼠, 取材脑组织于 10% 甲醛溶液中固定, 脱水包埋。固定后的组织样本经酒精

10 梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。脑组织冠状切片厚度为 3 $\mu$ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。柠檬酸修复 30 分钟, 室温冷却 10 分钟后水轻柔冲洗。以 3% 双氧水孵育 15 分钟, 用 PAP 笔圈出组织。10% 的羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 1 小时; 时间到后, 弃除羊血清液。兔源抗胶质细胞纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (Abcam, ab4648) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水返蓝 5 分钟, 然后 PBS 洗 1 次。梯度脱水透明并封片, 切片在 200 倍光学显微镜下观察拍照, 拍照图片用 Imaging-Pro 软件进行阳性染色光密度分析。

20 胶质细胞纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形胶质细胞中标志性的中间丝蛋白, 参与细胞骨架构成并维持其张力强度<sup>[6]</sup>。

结果显示, 空白对照组 (图 9A) 小鼠海马表达一定水平的 GFAP (箭头标识), 溶媒组 (图 9B) 小鼠海马 GFAP 表达减少, 给药组小鼠海马 GFAP 表达明显高于溶媒组 (图 9C), 且统计差异接近显著 (图 9D) ( $P=0.051$ )。

25 提示纤溶酶原能够促进多发性硬化症模型小鼠海马 GFAP 表达增加, 促进星形胶质细胞活性增加。

#### 实施例 10 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为

取 C57 小鼠雌性 30 只, 造模前进行称重, 根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组, 空白对照组 8 只小鼠, 模型组 22 只小鼠。分组完成后,

30 空白对照组饲喂正常维持饲料 (购自北京科澳协力有限公司), 模型组饲

喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脞 (CPZ) (厂商: 上海源叶生物科技有限公司, 货号: S30349) 的造模饲料, 持续饲喂 42 天, 诱导多发性引证症<sup>[1]</sup>。造模完成后, 所有小鼠进行旷场实验检测, 根据检测结果对模型组小鼠进行分组, 溶媒组 11 只小鼠, 给药组 11 只小鼠。分组完成后, 所有小鼠开始给药, 记为给药第 1 天, 空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒, 给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 连续给药 28 天, 给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。第 29 天进行旷场实验。

多发性硬化患者中常会出现精神类症状, 多表现为抑郁、易怒和脾气暴, 部分患者出现欣快、兴奋、也可表现为淡漠、嗜睡、强哭强笑、反应迟钝、智能低下、重复语言、猜疑和被害妄想等。还可出现记忆力减退, 注意力损害等认知功能障碍<sup>[7]</sup>。

### 旷场实验

实验时, 小鼠放入旷场 (40x40x40cm) 底面中心, 同时进行摄像和计时, 观察持续 5 分钟, 每只小鼠进行 3 次实验。Smart 系统是一个完整且方便使用的视频跟踪系统, 用于评估实验动物的行为。它允许记录轨迹, 活动, 特定行为 (如旋转, 拉伸和饲养) 和事件, 并执行各种分析参数的计算。本实验使用 Smart3.0 系统记录分析小鼠的运动情况, 参数包括总移动距离、边界静息时间率、中心区平均运动速度和边界平均运动速度。每次实验中采用 70% 酒精擦拭箱体防止嗅觉产生的偏好<sup>[8]</sup>。

旷场实验的设计原理是基于小鼠的趋避性, 指的是小鼠畏惧开阔、未知、可能存在潜在危险的场所, 因而其有“贴墙”活动的天性。趋避性是以小鼠在旷野周边区 (四个角和四个边) 的活动来评价的。从反映趋避性的周边区活动时间看, 时间减少, 说明小鼠更富有“冒险”倾向。在中央区活动时间显著增多, 说明趋避性和焦虑 (抑郁) 水平较低。

总运动路程为旷场实验期间小鼠在各个区域的总运动路程。结果显示, 空白对照组小鼠具有一定的总运动路程, 溶媒组小鼠总运动路程明显增加, 给药组小鼠总运动路程明显小于溶媒组, 统计差异显著 (\*表示  $P < 0.05$ ) (图 10), 且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为。

### 实施例 11 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症<sup>[1]</sup>。

5 造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给

10 药 28 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 29 天进行旷场实验。

边界区静息时间百分率=边界区静息时间/总观察时间。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区静息时间百分率，约为 57.8%；溶媒组小鼠边界区静息时间百分率明显降低，约为 49.3%，给药组小鼠边界区静息时间百分率约为 58.4%，明显大于溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P < 0.05$ ) (图 11)，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度地缓解多发性硬化症模型小鼠抑郁行为。

15

### 实施例 12 纤溶酶原改善多发性硬化症模型小鼠社交记忆能力

20 取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症<sup>[1]</sup>。

25 造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给

30 药 34 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 35 天进行三箱社交测试实验。

三箱实验开始前，将小鼠放在行为测试室适应半个小时；用透明的玻璃树脂板将三个箱子隔开，并将测试实验小鼠放进中间的箱子里适应 5 分钟；将陌生小鼠 1 随机放进左侧或右侧箱子中的金属笼子里，另外一侧箱子的金属笼子空着；去掉隔開箱子的玻璃树脂板，使测试小鼠可以在三个箱子中自由活动十分钟；马上开始拍摄并记录下相关参数：**第一阶段：**1) 实验小鼠与陌生小鼠 1 或空的金属笼之间的直接接触的次数以及持续时间，金属笼周围 3- 5 cm 定义为接触范围；2) 实验小鼠进入每个箱子的次数以及持续的时间，当小鼠的头和四爪都进入一个箱子就认为它处在那个箱子中。**第二阶段：**在第二阶段实验中向空着的金属笼子中放入第二只陌生小鼠（陌生小鼠 2），然后记录十分钟，观察实验小鼠与陌生小鼠 1 和陌生小鼠 2 之间相互接触的时间和次数。正常小鼠会表现出社交行为，在一阶段的实验中，通常正常小鼠与陌生小鼠 1 交流的时间和次数明显多于空的金属笼。同时，小鼠还具有记忆力和“喜新厌旧”的特性，因此在第二阶段中，小鼠会更喜欢与之前素未谋面的陌生小鼠 1 交流，而不是已经沟通通过十分钟的陌生小鼠 1。

静息时间百分率=静息时间/总观察时间。三箱社交测试实验第二阶段结果显示，空白对照组小鼠具有一定的陌生小鼠 2 接触范围内的静息时间百分率，约为 13.7%；溶媒组明显降低，约为 10.6%；给药组约为 16.1%，明显高于溶媒组，且统计差异接近显著（ $P=0.075$ ）（图 12）。说明纤溶酶原能够改善多发性硬化症模型小鼠的社交记忆。

### 实施例 13 纤溶酶原改善多发性硬化症模型大鼠抑郁行为

取 3 周龄的雄性大鼠 26 只，造模前进行称重，根据体重排除异常大鼠后所有大鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只大鼠，模型组 18 只大鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料（购自北京科澳协力有限公司），模型组饲喂含有 0.6%CPZ 的造模饲料，造模 14 天，建立多发性硬化症<sup>[9]</sup>。同时所有大鼠开始饲喂正常维持饲料。造模完成后，所有大鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组大鼠进行分组，溶媒组 7 只大鼠，给药组 8 只大鼠。分组完成后，溶媒组及给药组大鼠开始给药，记为给药第 1 天，给药组大鼠按照 35mg/kg 尾静脉注射纤溶酶原，溶媒组大鼠尾静脉注射 3.5ml/kg 溶媒，连续给药 6 天，空白对照组大鼠不做给药处理。于给药第 7

天进行旷场实验。

边界区路程为旷场实验测试时间内边界区运动轨迹长度。边界区路程百分率=边界区路程/边界区与中心区路程之和。结果显示，空白对照组具有一定的边界区运动路程百分率，约为 91.1%；溶媒组明显增加，约为 93.6%；给药组约为 88.1%，明显低于溶媒组，且统计差异显著（\*表示  $P<0.05$ ）（图 13）。说明纤溶酶原能够改善多发性硬化症模型小鼠抑郁行为。

#### 实施例 14 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型大鼠抑郁行为

取 3 周龄的雄性大鼠 26 只，造模前进行称重，根据体重排除异常大鼠后所有大鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只大鼠，模型组 18 只大鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6%CPZ 的造模饲料，造模 14 天，建立多发性硬化症模型<sup>[9]</sup>。同时所有大鼠开始饲喂正常维持饲料。造模完成后，所有大鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组大鼠进行分组，溶媒组 7 只大鼠，给药组 8 只大鼠。分组完成后，溶媒组及给药组大鼠开始给药，记为给药第 1 天，给药组大鼠按照 35mg/kg 尾静脉注射纤溶酶原，溶媒组大鼠尾静脉注射 3.5ml/kg 溶媒，连续给药 6 天，空白对照组大鼠不做给药处理。于给药第 7 天进行旷场实验。

中心区路程为旷场实验测试时间内中心区运动轨迹长度。中心区路程百分率=中心区路程/边界区与中心区路程之和。结果显示，空白对照组具有一定的中心区路程百分率，约为 8.9%；溶媒组明显降低，约为 6.4%；给药组约为 11.9%，明显高于溶媒组，且统计差异显著（\*表示  $P<0.05$ ）（图 14）。说明纤溶酶原能够改善多发性硬化症模型大鼠的焦虑行为。

#### 实施例 15 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6%双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型<sup>[11]</sup>。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠

开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给药 20 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 21 天进行高架十字迷宫实验。

- 5 高架十字迷宫是利用动物对新异环境的探究特性和对高悬敞开臂的恐惧形成矛盾冲突行为来考察动物的焦虑状态。高架十字迷宫具有一对开臂和一对闭臂，啮齿类动物由于嗜暗性会倾向于在闭臂中活动，但出于好奇心和探究性又会在开臂中活动，在面对新奇刺激时，动物同时产生探究的冲动与恐惧，这就造成了探究与回避的冲突行为，从而产生焦虑心理。而
- 10 抗焦虑药物能明显增加进入开臂的次数与时间，十字迷宫距离地面较高，相当于人站在峭壁上，使实验对象产生恐惧和不安心理。高架十字迷宫被广泛应用于新药开发/筛选/评价、药理学、毒理学、预防医学、神经生物学、动物心理学及行为生物学等多个学科的科学-研究和计算机辅助教学等领域，是医学院校与科研机构开展行为学研究尤其是焦虑抑郁研究的经典
- 15 实验。

- 实验开始时将小鼠从中央格面向闭合臂放入迷宫，记录 5 分钟内的活动情况。观察指标包括：开放臂进入次数(必须有两只前爪进入臂内)，开放臂停留时间，闭合臂进入次数，闭合臂停留时间。计算开放臂停留时间比例，开放臂进入次数比例，高架十字迷宫中总进入次数。实验完成后将小
- 20 鼠取出，将两臂清理干净，喷洒酒精除去气味。最后用动物行为学软件进行分析。

- 开放臂进入百分率=开放臂进入总次数/开放臂与闭合臂进入总次数之和。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的开放臂进入百分率，约为 14.9%；溶媒组小鼠开放臂进入百分率明显增加，约为 23.0%；给药组小鼠
- 25 开放臂进入百分率约为 14.5%，明显少于溶媒组，统计差异显著 (P=0.015) (图 15)，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑行为。

#### **实施例 16 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑行为**

- 取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所
- 30 有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成

后，空白对照组饲喂维持饲料，模型组饲喂含有 0.6%双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给药 20 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)。于第 21 天进行高架十字迷宫实验。

- 10 闭合臂进入百分率=闭合臂进入总次数/开放臂和闭合臂进入总次数。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的闭合臂进入百分率，约为 34.4%；溶媒组小鼠闭合臂进入百分率明显降低，约为 28.1%；给药组小鼠闭合臂进入百分率约为 37.1%，明显大于溶媒组，统计差异显著 (P=0.007) (图 16)，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。

#### 15 实施例 17 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为

- 取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6%双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给药 27 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 28 天进行高架十字迷宫实验。

- 25 闭合臂运动总路程为高架十字迷宫实验测试时间内小鼠闭合臂运动总路程。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的闭合臂运动总路程，溶媒组小鼠闭合臂运动总路程明显增加，给药组小鼠闭合臂运动总路程明显少于

溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ ) (图 17)，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度地缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。

### 实施例 18 纤溶酶原缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为

取 C57 小鼠雌性 30 只，造模前进行称重，根据体重排除异常小鼠后所有小鼠随机分为 2 组，空白对照组 8 只小鼠，模型组 22 只小鼠。分组完成后，空白对照组饲喂正常维持饲料(购自北京科澳协力有限公司)，模型组饲喂含有 0.6% 双环己酮草酰二脲 (CPZ) (厂商：上海源叶生物科技有限公司，货号：S30349) 的造模饲料，持续饲喂 42 天，诱导多发性硬化症模型<sup>[1]</sup>。造模完成后，所有小鼠进行旷场实验检测，根据检测结果对模型组小鼠进行分组，溶媒组 11 只小鼠，给药组 11 只小鼠。分组完成后，所有小鼠开始给药，记为给药第 1 天，空白对照组小鼠和溶媒组小鼠按照 0.1ml/只/天尾静脉注射溶媒，给药组小鼠按照 1mg/只/天尾静脉注射纤溶酶原，连续给药 27 天，给药期间所有小鼠饲喂正常维持饲料。于第 28 天进行高架十字迷宫实验。

闭合臂休息时间百分率=闭合臂休息时间/闭合臂运动时间与闭合臂休息时间之和。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的闭合臂休息时间百分率，约为 51.8%；溶媒组小鼠闭合臂休息时间百分率明显降低，约为 36.8%；给药组小鼠闭合臂休息时间百分率约为 50.1%，明显大于溶媒组，统计差异显著 (\*表示  $P<0.05$ ) (图 18)，且与空白对照组相近。说明纤溶酶原能够一定程度缓解多发性硬化症模型小鼠焦虑抑郁行为。

#### 参考文献

1. M. Lindner, S. Heine, K. Haastert, Sequential myelin protein expression during remyelination reveals fast and efficient repair after central nervous system demyelination, *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2008), 34, 105–114.
2. Tuohy VK1, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA et al. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol.* 1989 Mar 1;142(5):1523-7.
3. Gotow T. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc.* 2000;33(4):173-99.
4. Ahmed Z, Shaw G, Sharma V P, et al. Actin-binding Proteins Coronin-1a and IBA-1 Are Effective Microglial Markers for Immunohistochemistry[J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2007, 55(7):687-700.
5. Kowiański, Przemysław, Lietzau G, Czuba E, et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity[J]. *Cellular & Molecular Neurobiology*, 2017.
6. Hol E M, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system.[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 32(1):121-130.
7. Murphy R, O'Donoghue S, Counihan T, McDonald C, Calabresi PA, Ahmed MA, Kaplin A, Hallahan B. Neuropsychiatric syndromes of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Aug;88(8):697-708.

8. Hirahara Y , Matsuda K I , Yamada H , et al. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination[J]. *Glia*, 2013, 61(3):420-431.

9. Di Biase A , Salvati S , Di Benedetto R , et al. Eicosapentaenoic acid pre-treatment reduces biochemical changes induced in total brain and myelin of weanling Wistar rats by cuprizone feeding[J].

5 Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2014, 90(4):99-104.

58(1-2):40.

序列表

序列 1:

10 gagcctctggatgactatgtgaataccaggggcttactgttcagtgtcactaagaagcagctggagcaggaagtatagaagaatgtgcagc  
 aaaaatgtaggaggcgaagaattcactgacgggcatccaatacacagtaaagagcaacaatgtgtgataatggctgaaaacaggaagctccataat  
 cattagatgagagatgtatgtttttgaaaagaagtatctctcagagtgcaagactgggaatggaagaactacagaggacgatgtccaaaaaaa  
 aatggcatcacctgtcaaaaatggagttccacttctccccacagacctagattctacactgtacacacccctcagaggactggaggaactactgcagga  
 atccagacaacgacccgagggccctgtgtctatactactgtatccagaaaagagatatgactactgcgacattctgtagtggaagaggaaatgtatgcattgc  
 agtggagaaaactatgacggcaaaattccaaagaccatgtctgactggaaatccaggcctggactctcagagcccacacgctcatgatacattcctcca  
 15 aattccaacaagaacctgaagaagaactactgtcgaaccccgataggagctgctggcctgtgtttaccaccgaccccaacaagcgtgggaactttg  
 tgcacacacccctgtcacacacccctaccatcttctgtcccacctaccagtgctgaagggaacagggtgaaaactatgcgggaatgtggctgtaccgtgt  
 ccgggcacacctgtcagcactggagtgacacacacacataacaggacaccagaaaacttcccctgcaaaaattggatgaaaactactgccc  
 aatcctgacggaaaaaggccccatgggtccatacaaccaacagcaagtgctgggagctactgaagataccgtcctgtgactcctcccagatccacg  
 gaacaattgctcccacagcaccacctgagctaaccctgtgtccaggactgtaccatgggtatggacagagctaccgagcacaatcctccaccaccac  
 20 cacaggaagaagtgtcagctctgtctatgacaccacaccggcaccagaagaccccagaaaactaccaaatgctggcctgacaatgaactactgca  
 ggaatccagatgccgataaaggccccgtgttttaccacagccccagcgtcagggtggagctactgcaacctgaaaaaatgctcaggaaacagaagcaggt  
 gttgtagcacctccgctgttctctctccagatgtagagactcctccgaaagactgtatgtttgggaatgggaagataccgaggaagaggcgga  
 ccactgtactgggacccatgcccaggactggcgtcccaggagccccatagacacagcatttactccagagacaatccacgggctgtggaaaaa  
 aattactgcccgaacctgatggtatgtaggtgctccctgtgtctacagcaaatccaagaaaactttacgactactgtatgtccctcagtgctggcccct  
 25 tcattgtatgtgggaagcctaagtgagccgaagaatgtcctggaaaggtgtgtagggggtgtgtgcccaccacattcctgcccctggaagtcagtc  
 ttagaacaaggtttggaatgcacttctgtggaggcacttgatccccagagtggtgtgactgctgcccactgctggagaagtccccaggccttcacct  
 acaaggtcatcctgggtgcacaccaagaagtgaatctgaaccgcatgttcaggaaatagaagtgtctagctgttctggagcccacagaaaagatattgc  
 cttgctaagctaagcagctctgcccgtatcactgacaagaatcccagctgtctccatccccaaattatgtgtcctgaccggaccgaatgttcatcact  
 ggctggggaagaacccaaggtactttggagctggccttctcaaggaagcccagctccctgigtatgagataaagtggtcaatcgctatgagtttctaatgg  
 30 aagagtccaatccaccgaactctgtctggcatttgccggagggcactgacagttgccagggtgacagtgaggctcctctgtttgcttcgagaaggacaa  
 atacattttacaaggagtcacttctgggctctgtgtgacgccccaaagcctggtgtctatgttctgtttcaaggtttgtactgtgattgaggagtgat  
 gagaataaataa

序列 2:

35 EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEDEEFTCRAFQYHSKEQQCVIMAENRK  
 SSIHRMRDVVLFKVKVYLSECKTGNNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEE  
 NYCRNPNDPQGPWCYTDDPEKRYDYCDILECEEECMHCSGENYDGKISKTMSGLECAWDSQSP  
 HAHGYPKFPNKNLKNYCRNPDRRLPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTPPSSGPTYQCLKGTGE  
 NYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTHNRTPENFPCKNLDENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWE  
 YCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTSSTTTTGKKCQSWSSMTPHRHQKT  
 40 PENYPNAGLTMNYCRNPADKGPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTPPSSGPTYQCLKGTGE  
 EEDCMFNGKGYRGRATTVTGTPCQDWAQAEPHRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGP  
 WCYTTNPRKLYDYCDVPQCAAPSFDCGKQVEPKKCPGRVVGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMH  
 FCGGTLISPEWVLTAHACLEKSPRPSSYKVLGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALKLSSP  
 AVITDKVIPACLSPNYVVADRTECFITGWGETQGTGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVQS  
 45 TELCAGHLAGGTDSCQGDGSGGPLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVRVSRFVTWIEGV  
 MRNN

序列 3:

atggaacataagggaagtgggtctctactcttttattctgaaatcaggctcaaggagagcctctggatgactatgtgaaatcccagggggctcactgt  
 tcagtgtcactaagaagcagctggagcaggaaagtatagaagaatgtgcagcaaaatgtgaggaggcgaagaattcacctgcaggcattccaatatcac  
 agtaaagagcaacaatgtgtgataatggctgaaaacaggaaagtcctccaataatcattaggtatgagagatgtatgtttattgaaaagaaagtgtatctcagagt  
 gcaagactgggaatggaaagaactacagaggagcagatgccaaaacaaaaatggcatcacctgtcaaaaatggagttccacttccccacagacctagat  
 5 tctcacctgtacacaccctcagaggactggaggagaactactgcaggaaatccagacaacgatccgcaggggccctgtgtatatactactgatccagaa  
 aagagatagactactgcgacattctgagtgtgaaaggaaatgtatgcatgagtgaggaaaactatgacggcaaaatccaaagacctgtctggactgga  
 atgccaggcctgggactctcagagcccacagctcatggatacattctccaaatccaaacaagaacctgaagaattactgtcgtaacccccgatagg  
 gagctgcggccttgggtttaccaccgaccccaacaagcgtgggaactttgtgacatccccctgcacaaacacctccaccatcttctggcccactacc  
 agtctctgaagggaacagggtgaaaactatcgcgggaatgtggctgttaccgtgtccgggcacacctgtcagcactggagtcacagaccccacacacat  
 10 aacaggacaccagaaaactccccctgcaaaaattggatgaaaactactgcggcaatcctgacggaaaaaggccccatggtccatacaaccaacagcca  
 agtgcgggtgggactgtgaagataccgtcctgtgactcctccccagatccacggaaacaattggtcctccacagcaccacctgagctaaccctgtgtccag  
 gactgtaccatggtgatggacagagctaccaggcacatcctccaccaccacacaggaaagaagtgcagcttggctatctatgacaccacaccggca  
 ccagaagaccccagaaaactacccaaatctggcctgacaatgaactactgcaggaaatccagatgccgataaaggccccgtgtgtttaccacagaccca  
 ggcctcagggtggagfactgcaacctgaaaaaatgctcaggaaacagaagcagtggtgtgacacctccctgtgtctctccagatgtagagactcctc  
 15 cgaagaagactgtatgttgggaatgggaagataccaggcaagaggcgaccactgttactgggacgcatgcccaggactggcgtcccaggagcc  
 ccatagacacagcatttctactccagagacaaatccacggcggtctggaaaaaattactgcgtaacctgtagtgtagtaggtgtccctgtgtctac  
 acgacaaatccaagaaaactttactactactgtatgtccctcagtgctggcccccttcttctgattgtgggaagcctcaagtggagccgaagaatgtcctgg  
 aagggtgttaggggggtgtgtggcccaccacattcctggccctgcaagtcagtcttagaacaagggttggaaatgcacttctgtggaggcacttgatcccc  
 cagagtgggtgtactgctgcccactgcttggagaagtccccaaagccttctcctacaaggtcctcctgggtgcacaccaagaagtgaatctgaaccgc  
 20 atgttcaggaaatagaagtgtctaggtcttcttggagcccacagaaaagatattgcttgcctaaagcagcctcctgacactgacaagaatattcc  
 cagcttctcctccccaaatattgtgtcgtgaccggaccgaatgttcatcactgctggggagaaacccaaggtactttgtgagctggtcttcaagg  
 aagcccagctccctgtgattgagaataaagtgtcaatcgtatgatttctgaatggaagagtcacatccaccgaactctgtctggcatttggccggaggc  
 actgacagttgccagggtgacagtggaggtcctctgttcttctgagaaagcaaaatatactttacaaggagtcacttctggggtcttggctgtgcacgcccc  
 aataagcctggtctatgtctgtgttcaagggttcttacttggatgaggaggatgagaataaata

25 序列 4:

MEHKEVVLVLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCR  
 AFQYHSKEQQCVIMAENRKSSIIIRMRDVVLFKVVYLSECKTGNNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWS  
 STSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDNDPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEECMHCSGENYD  
 GKISKMSGLECAWDSQSPHAGHYIPSKFPNKNLKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWELCDIP  
 30 RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPHTRNTPENFPCKNLDENYCR  
 NPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTSS  
 TTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPNKRWELCDIP  
 GTEASVVAPPPVLLPDVETPSEEDCMFNGNGKYRGRATTVTGTPCQDWAQEPHRHSIFTPETN  
 PRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQCAAPSFDGKQPVEPKKCPGRVVGCC  
 35 VAHPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGLISPEWVLTAAHCLEKSPRPSSYKILGAHQEVNLEPHVQE  
 IEVSRFLFLEPTRKDIALKLSSPAVIDKVIPACLPSPNYVADRTECFITGWGETQGTGAGLLKEAQ  
 LPVIENKVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAAGTDSCQGDSSGGLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCA  
 RPNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN

40 序列 5:

aaagtgtatctctcagagtgcagactgggaatggaagaactacagaggacgatgtcaaaacaaaaatggcatcacctgtcaaaaatggag  
 tccacttccccacagacctagattctacctgtacacaccctcagaggactggaggagaactactgcaggaaatccagacaacgatccgaggggcc  
 ctggtgtatactactgatccagaaaagagatgactactgcgacattcttggatgtgaaagggaatgtatgcatgagtgaggaaaactatgacggcaaaa  
 ttccaagaccatgtctgactggaatccaggcctgggactctcagagcccacagctcatggatacattcctccaaatccaaacaagaacctgaagaag  
 aattactgtcgtaacccccatagggagctgcggccttgggtttaccaccgaccccaacaagcgtgggaactttgtgacatccccctgcacaaacactc  
 45 caccatcttctgtcccactcaccagtctgaagggaacagggtgaaaactatcgcgggaatgtggctttaccgtgtccgggcacacctgtcagcactggag  
 tgcacagaccccacacacatacaggacaccagaaaactccccctgcaaaaatggatgaaaactactgcggcaatcctgacggaaaaaggccccat  
 ggtgccatacaaccaacgccaagtgcgggtggagactgtgaagataccgtcctgtgactcctccccagatccacggaaacaattgctcccacagcaccac  
 ctgagctaaccctgtgtccagactgtaccatggtatggacagagctaccaggacatcctccaccaccaccacaggaaagaagtgcagtcttgg

catctatgacaccacaccggcaccagaagaccccagaaaactacccaatgctggcctgacaatgaactactgcaggaaatccagatgccgataaaggccc  
ctggtgtttaccacagaccccagcgtcaggtggagtagtcaacctgaaaaatgctcaggaaacagaagcagtgtagcacctccgctgtgtcctg  
ctccagatgtagagactcctccgaagaagactgtatgttgggaatgggaaaggataccgaggcaagaggcggaccactgttactgggacgccaatgcca  
5 ggactgggctgcccaggagccccatagacacagcatttactccagagacaaatccacggggcgggtctggaaaaaataactgcccgaacctgatggtg  
atgtaggtggcctggtgctacacgacaaatccaagaaaactttacgactactgtgtagtccctcagtgctggcccccttcttattgtgggaagcctcaagt  
ggagccgaagaatgctcctggaaagggttaggggggtgtgtggcccaccacattcctggccctggcaagtcagcttagaacaagfittggaatgactt  
ctgtggaggcacctgataccccagagtggtgtgactgctgcccactgcttgagaaagccccaaagccttcatcctacaaggtcactcctgggtgcacac  
10 caagaagtgaatctcgaaaccgatgtcaggaatagaagtgtctaggtgttctggagcccacagaaaagataatgcttgcctgaagctaagcagctctgc  
cgtcactactgacaaagtaatcccagctgtctgcccccaaatatgtgtgctgctgaccggaccgaaatgttcatcactggctggggagaaccaaggtta  
ctttggagctggccttcaaggaagcccagctccctgtgattgagaataaagtgtgcaatcgtatgatttctgaaagagtccaatccaccgaactct  
gtgctgggcatitggccggaggcactgacagttgcccgggtgacagttggaggtcctctgtgttctctgagaaagacaaatacatttcaaggagtcacttct  
tggggtcttggctgtgcacgcccccaataagcctggtgtctatgtctgtttcaaggfittgacttggattgaggagtgatgagaataaataa

序列 6:

KVYLSECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPDN  
15 DPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEECMHCSGENYDGGKISKTMSGLECAWDSQSPHAHGYYPSK  
FPNKNLKKNYCRNPDRELRPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTTPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAV  
TVSGHTCQHWSAQTPHTHNRTPENFPCKNLDENYCRNPDGKRAPWCHTTNSQVRWEYCKIPSCDS  
SPVSTEQLAPTAPPELTPVVQDCYHGDGQSYRGTSSSTTTGKKCQSWSSMTPHRHQKTPENYPNAG  
20 LTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPSPVRWEYCNLKKCSGTEASVVAPPVVLLPDVETPSEEDCMFGN  
GKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAQEPHRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRK  
LYDYCDVPQCAAPSFDCGKPQVEPKKCPGRVVGGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPE  
WVLTAHACLEKSPRPSSYKVILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALKLSSPAVITDKVIPA  
CLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVIENKVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLA  
GGTDSCQGDSSGGLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPGVYVVRVSRFVTWIEGVMRNN

序列 7:

gagcctctggatgactatgtaataaccaggggcttactgttactgactaagaagcagctgggagcaggaaatagaaatgagcagc  
aaaatgtgaggaggacgaagaattcactgacgggcatccaataacagtaaaagacaacaatgtgtgataatgctgaaaacaggaagctccataat  
cattagatgagagatgtatgtttatgttggaaaagaaagtgtatctctcagagtgcaagactgggaatggaagaaactacagaggacgatgccaaaaaaaa  
aatggcatacctgtcaaaaatggagtccacttctcccacagacctagattctcactgctacacaccctcagaggcactggaggagaactactgcaggga  
30 atccagacaacgatccgcaggggccctggtgctatactactgatacagaaaagagatactactgacattctgagtgtaagaggcggcccccttctt  
gattgtgggaagcctcaagtgagcggaaagaatgctctggaagggtgttaggggggtgtgtggcccaccacattcctgcccctggcaagtcagcttaga  
acaaggttggaaatgacttctgtggaggcacctgataccccagagtggtgtgactgctgcccactgctggagaaagccccaaagccttcatctacaa  
ggcctcctgggtgcacaccaagaagtgaatctcgaaaccgatgtcaggaaatagaagtgtctagctgttcttggagcccacacgaaaagataatgcttgc  
taaagctaagcagctcctgctcactgacaaagtaatcccagctgtctgcccccaaatatgtgtgctgaccggaccgaaatgttcatcactggct  
35 ggggagaaaccaaggtacttggagctggccttcaaggaagcccagctccctgtgattgagaataaagtgtgcaatcgtatgatttctgaaaggaag  
gtccaatccaccgaactctgtgctggcattggccggaggcactgacagttgcccagggtgacagttggaggctcctgtgttcttctgagaaagacaaataca  
ttitacaaggagtcacttctggggtctgtgtgcacgcccccaataagcctggtgtctatgttctgtttcaaggfittgacttggattgaggagtgatgaga  
ataaataa

序列 8:

EPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAFQYHSKEQQCVIMAENRK  
40 SSIHRMRDVLFEKKVYLSECKTGNGKNYRGTMSKTKNGITCQKWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEE  
NYCRNPDNDPQGPWCYTTDPEKRYDYCDILECEEAAPSFDCGKPQVEPKKCPGRVVGGCVAPHS  
WPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTAHACLEKSPRPSSYKVILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLF  
LEPTRKDIALKLSSPAVITDKVIPACLSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVIEN  
45 KVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAAGTDSCQGDSSGGLVCFEKDKYILQGVTSWGLGCARPKNKPG  
VYVVRVSRFVTWIEGVMRNN

序列 9:

gtcagggtggagactgcaacctgaaaaatgctcaggaacagaagcgagtgtagcacctccgctgtgctctccagatgtagagact  
 ccttccgaagaagactgtatgttgggaatgggaaaggataccgaggcaagagggcgaccactgttactgggacgccatgccaggactgggctgccagg  
 agccccatagacacagcatttctactccagagacaaatccacggcggggtctggaaaaaatactgcccgaacctgatggtgatgtaggtgctccctggtg  
 ctacacgacaaatccaagaaaactttacgactactgtgatgtccctcagtgctggcccccttcatttgattgtgggaagcctcaagtgtagccgaagaatgtc  
 5 ctggaaggggtgtaggggggtgtgtggccaccacattcctggccctggcaagtcagcttagaacaaggttggaaatgcacttctgtgaggcacctgtat  
 atccccagagtggtgtgactgctgccactgctggagaagtccccaaaggccttcatctacaaggtcatcctgggtgcacaccaagaagtgaatctcgaa  
 ccgcatgttcaggaaatagaagtgtctaggtcttctggagcccacacgaaaagatattgcttgaagctaagcagctcctgcccgtatcactgacaaaat  
 10 aatccccagctgtctgcatccccaaatattgtgtcgtgaccggaccgaatgtttcactctgctgggagaacccaaggtacttttggagctggccctt  
 caaggaaagccagctccctgtgattgagaataaagtgtgcaatcgtatgagttctgaaatgaagagccaatccaccgaactctgtctggcatttggccg  
 gaggcactgacagttccagggtgacagtgaggctcctgtgttctcctgagaaggacaatacattttacaaggagtcacttctggggtctgctgtgca  
 cgccccaaataagcctgtgtctatgttcgtttcaagggttttacttggattgaggggagtgatgagaataattaa

序列 10:

VRWEYCNLKKCSGTEASVVAPPPVLLPDVETPSEEDCMFNGKGYRGKRATTVTGTPCQD  
 WAAQEPHRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQCAAPSFDCGK  
 15 PQVEPKKCPGRVVGGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTAHCLEKSPRPSSYK  
 VILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALLLKSSPAVITDKVIPACLSPNYVVADRTECFITG  
 WGETQGTFGAGLLKEAQLPVIENTVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGDSSGGLVCFE  
 KDKYILQGVTSWGLGCARPNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN

序列 11:

gcccccttcatttgattgtgggaagcctcaagtgagccgaagaatgtcctggaaaggtgtgtaggggggtgtgtggccaccacattcctggccc  
 20 tggcaagtcagcttagaacaaggttggaaatgcacttctgtggaggcacctgatatccccagagtggtgtgactgctcccactgcttgagaagtcccc  
 aaggccttcatctacaaggtcatcctgggtgcacaccaagaagtgaatctgaaccgcaitctcaggaaatagaagtgtctagctgttcttggagcccaca  
 cgaaaagatattgcttctaagctaagcagctcctgcccgtcactgacaaagttaaccagcttctgcatccccaaatattgtgtcgtgaccggacc  
 gaatgttctcactgctggggagaaaccaaggacttttggagctggccttctcaaggaaagccagctccctgtgattgagaataaagtgtgcaatcgtat  
 25 gaggttctgaaatgaagagccaatccaccgaactctgtcctggcatttggccggaggcactgacagttgccaggggtgacagtgaggctcctgtgttct  
 cgagaaggacaatacattttacaaggagtcacttctgggtcttggctgtgcacgccccaaataagcctgtgtctatgttcgtttcaagggttttacttggat  
 tgaggggagtgatgagaataattaa

序列 12:

APSFDCGKQPVEPKKCPGRVVGGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTA  
 30 HCLEKSPRPSSYKVVILGAHQEVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALLLKSSPAVITDKVIPACLSPN  
 YVVADRTECFITGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVIENTVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSC  
 QGDSSGGLVCFEKKDKYILQGVTSWGLGCARPNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMRNN

序列 13:

gtgtaggggggtgtgtggccaccacattcctggccctggcaagtcagcttagaacaaggttggaaatgcacttctgtgaggcaccttgatatac  
 35 cccagagtggtgtgactgctgccactgcttggagaagtccccaaaggccttcatctacaaggtcatcctgggtgcacaccaagaagtgaatctgaacc  
 gcatgttcaggaaatagaagtgtctaggtgttcttggagcccacagaaaagatattgcttctaagctaagcagctcctgcccgtcactgacaaagtfaat  
 cccagctgtctgcatccccaaatattgtgtcgtgaccggaccgaatgttctcactgctggggagaaaccaaggacttttggagctggccttctcaa  
 ggaagcccagctccctgtgattgagaataaagtgtgcaatcgtatgagttctgaaatgaagagccaatccaccgaactctgtctggcatttggccggag  
 40 gcactgacagttccagggtgacagtgaggctcctgtgttctcctgagaaggacaatacattttacaaggagtcacttctggggtcttggctgtgcacgc  
 cccaataagcctgtgtctatgttcgtttcaagggttttacttggattgaggggagtgatgaga

序列 14:

VVGGCVAPHSWPWQVSLRTRFGMHFCGGTLISPEWVLTAHCLEKSPRPSSYKVVILGAHQ  
 45 EVNLEPHVQEIEVSRLFLEPTRKDIALLLKSSPAVITDKVIPACLSPNYVVADRTECFITGWGETQGT  
 FGAGLLKEAQLPVIENTVCNRYEFLNGRVQSTELCAGHLAGGTDSCQGDSSGGLVCFEKKDKYILQG  
 VTSWGLGCARPNKPGVYVRVSRFVTWIEGVMR

## 权 利 要 求 书

1. 一种预防和治疗多发性硬化症的方法，包括给药受试者治疗有效量的选自如下的一种或多种化合物：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够  
5 直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。
- 10 2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述纤维蛋白溶酶原激活途径的组分选自纤维蛋白溶酶原、重组人纤维蛋白溶酶、Lys-纤维蛋白溶酶原、Glu-纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、含有纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶的一个或多个 kringle 结构域和蛋白酶结构域的纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶  
15 变体及类似物、小纤维蛋白溶酶原(mini-plasminogen)、小纤维蛋白溶酶(mini-plasmin)、微纤溶酶原 (micro-plasminogen)、微纤溶酶 (micro-plasmin)、delta-纤溶酶原、delta-纤溶酶 (delta-plasmin)、纤维蛋白溶酶原激活剂、tPA 和 uPA。
3. 权利要求 1 的方法，所述纤溶抑制剂的拮抗剂为 PAI-1、补体 C1 抑制物、 $\alpha 2$  抗纤溶酶或  $\alpha 2$  巨球蛋白的抑制剂，例如抗体。
- 20 4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述化合物具有选自如下一项或多项的活性：促进神经髓鞘的再生、促进髓鞘蛋白表达、促进神经组织 NFP 的表达、促进神经纤维再生、促进神经组织 NFP 的表达、提高神经组织 MBP 水平、增加神经组织小胶质细胞数量、促进神经组织炎症修复、促进神经组织星形胶质细胞活性、提高神经组织 BDNF 水平、促进神经组织  
25 GFAP 表达、改善受试者的社交行为能力、改善受试者的社交记忆能力、缓解受试者的抑郁行为、缓解受试者的焦虑行为。
5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述化合物为纤溶酶原。
6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2 具有至少  
30 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且具有纤溶酶原的蛋白水解活性。
7. 权利要求 1-6 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2 具有至少

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，并且具有纤溶酶原的赖氨酸结合活性。

8. 权利要求 1-6 任一项的方法，所述纤溶酶原包含与序列 14 所示的纤溶酶原活性片段具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、  
5 98%或99%的序列同一性的氨基酸序列、并且具有纤溶酶原的蛋白水解活性。

9. 权利要求 1-6 任一项的方法，所述纤溶酶原为序列 2 所述纤溶酶原的保守取代变体。

10. 权利要求 1-6 任一项的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原。

11. 权利要求 1-10 任一项的方法，其中所述化合物与一种或多种其他治疗方法或药物联合使用。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述其他治疗方法选自如下的一项或多项：手术治疗、细胞治疗（包括干细胞治疗）和物理治疗。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述其他药物选自如下的一项或多项：  
15 激素、免疫抑制剂、神经营养药物、抗菌素和抗病毒药物。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法，其中所述化合物通过选自如下的任一或多种方式或途径给药：鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、静脉内、腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内和肌肉内。

20

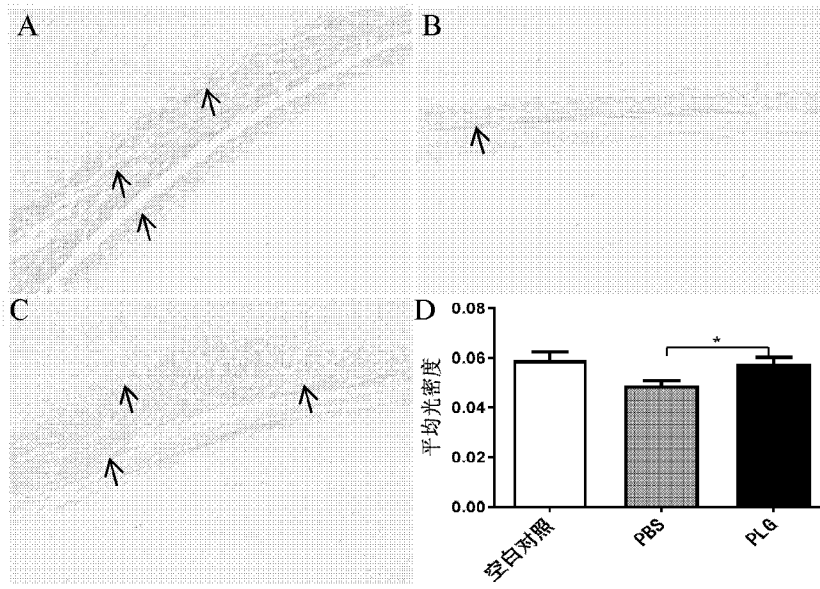


图 1

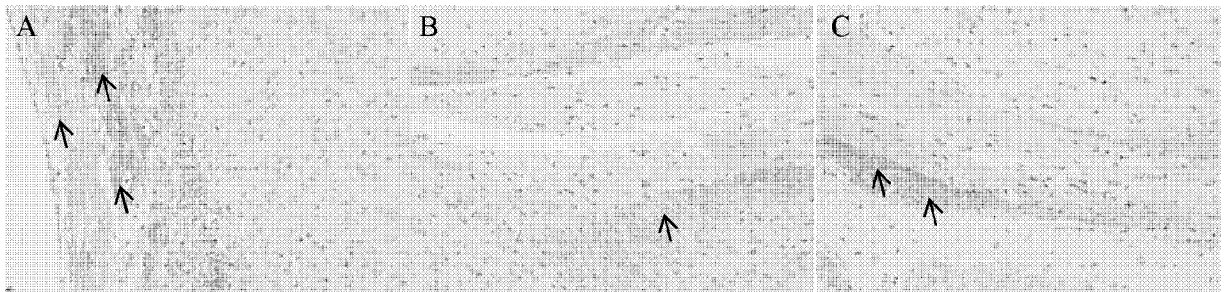


图 2

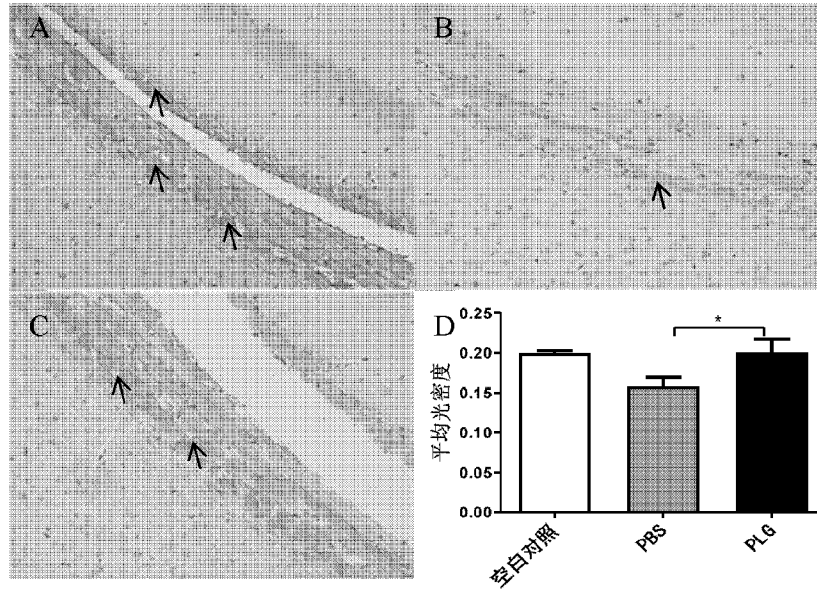


图 3

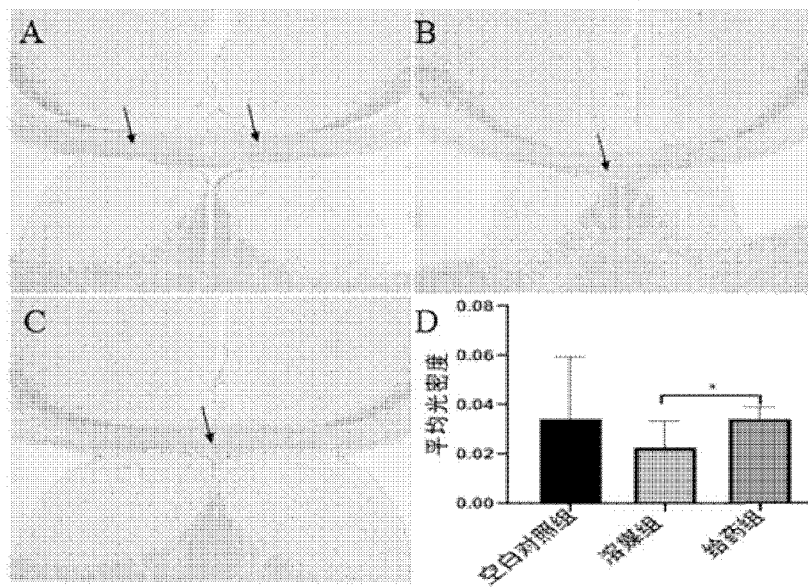


图 4

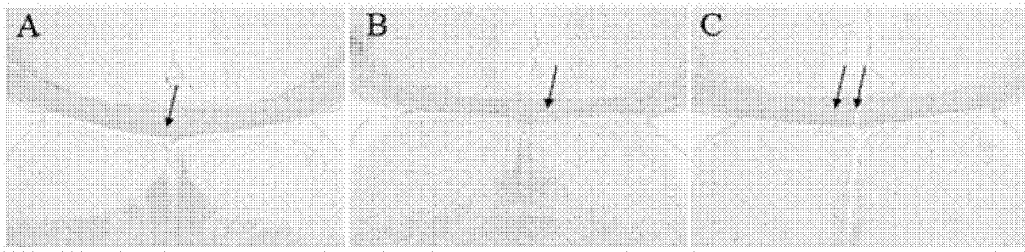


图 5

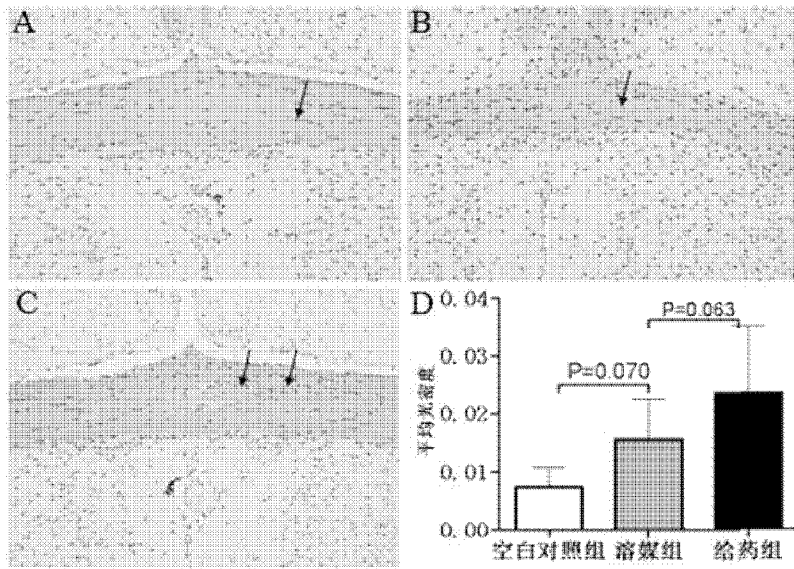


图 6

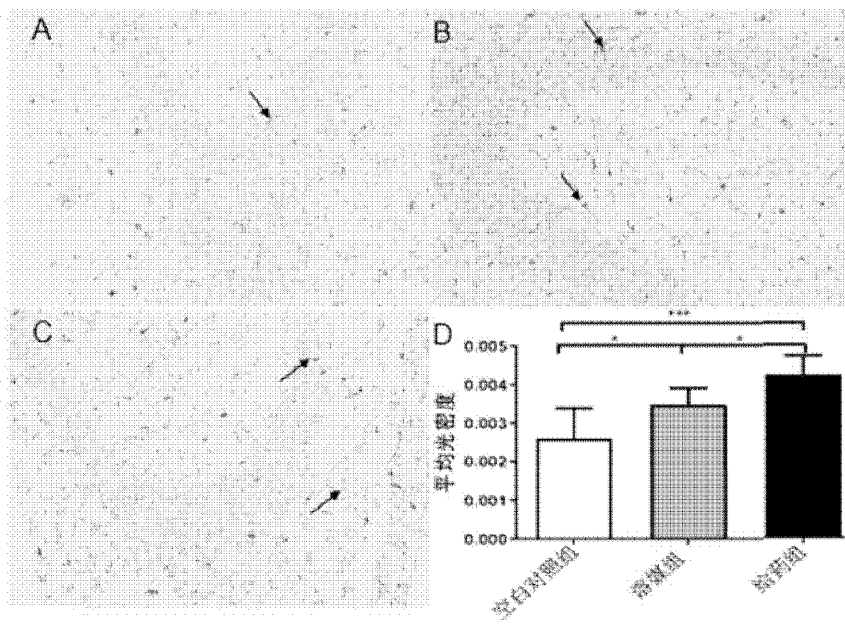


图 7

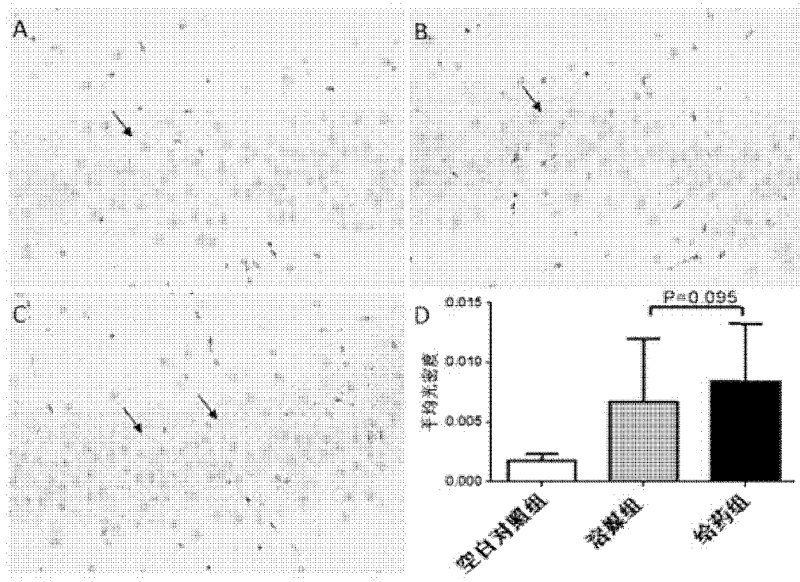


图 8

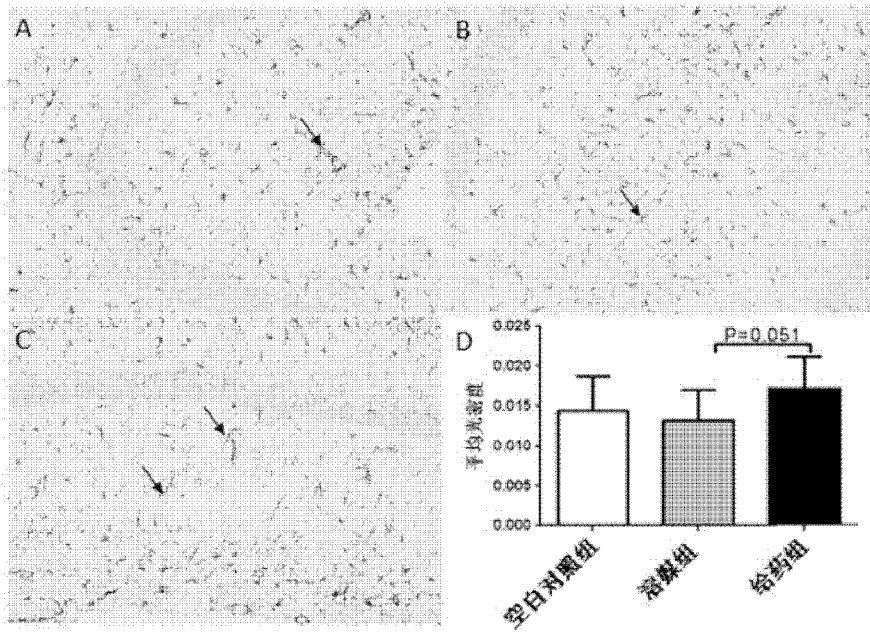


图 9

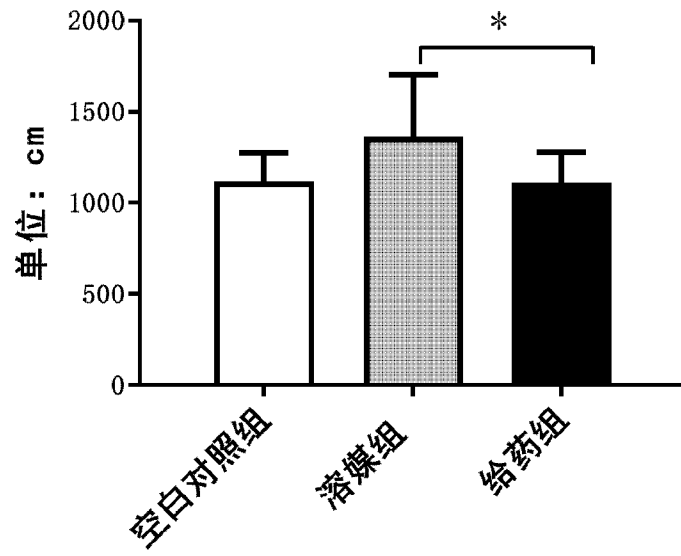


图 10

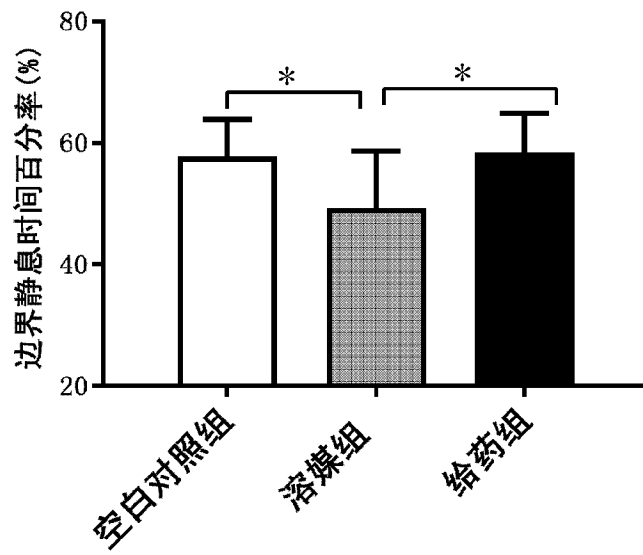


图 11

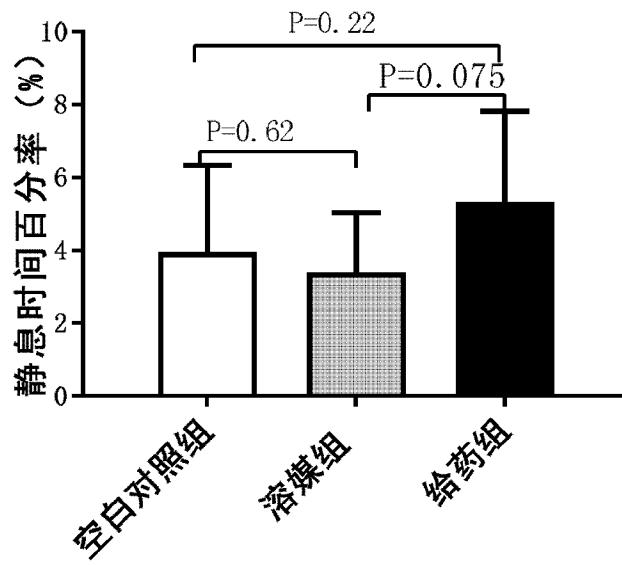


图 12

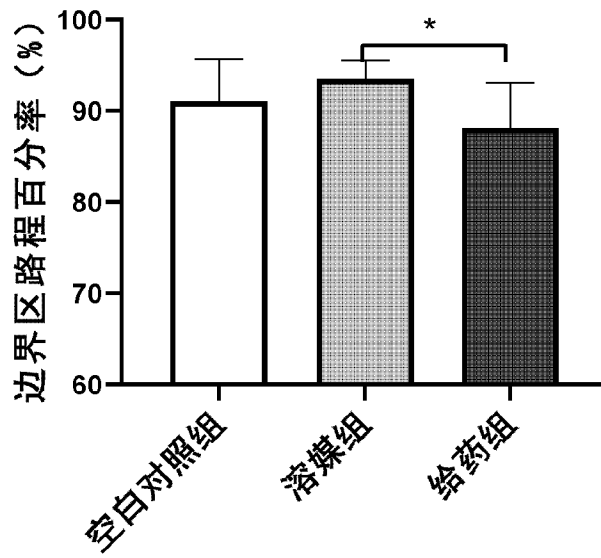


图 13

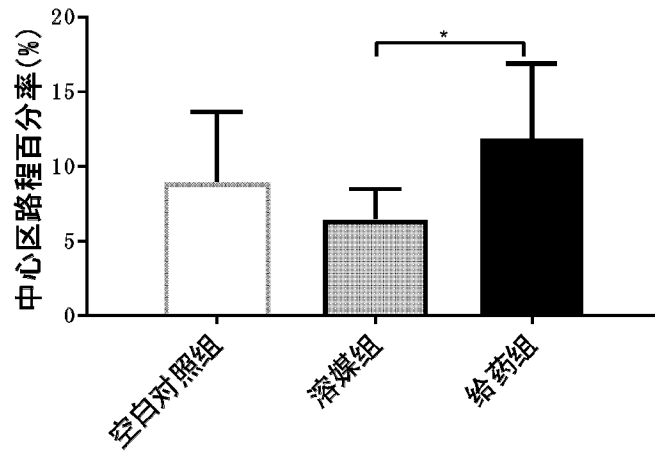


图 14

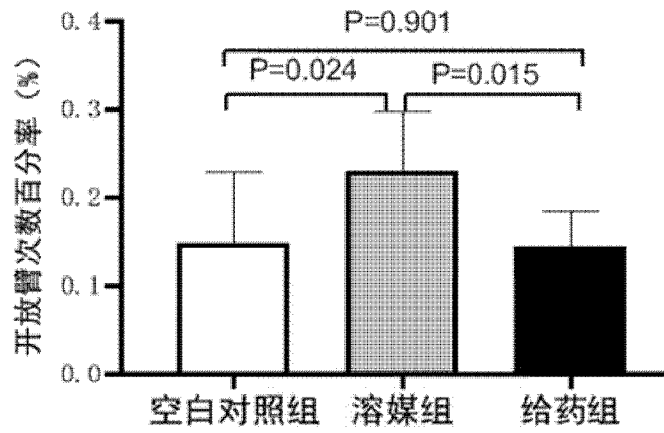


图 15

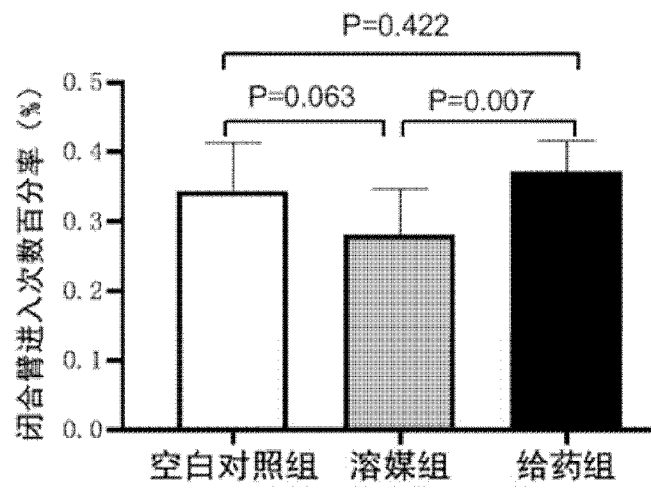


图 16

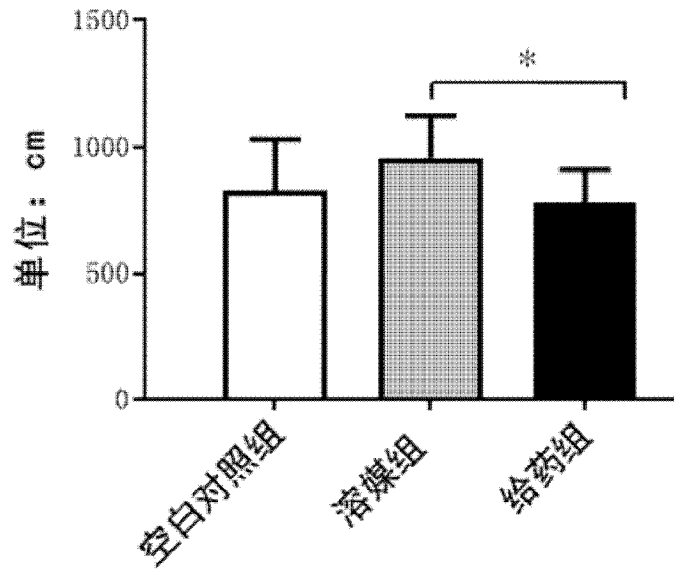


图 17

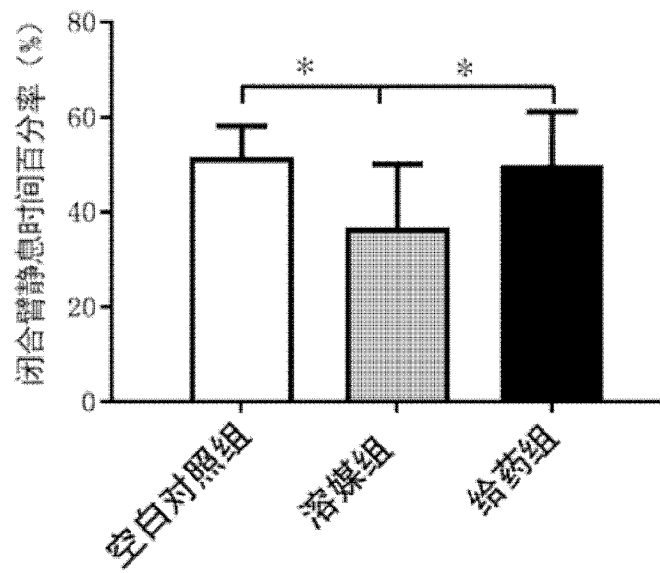


图 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/075921

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 38/43(2006.01)j		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Genbank, EMBL, VEN, CNKI, CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge: plasminogen, Multiple, sclerosis, tPA, uPA, 纤维蛋白溶酶原激活, 纤溶酶原, 多发性硬化症		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 12 April 2001 (2001-04-12) the abstract, and page 114, lines 23-30	1
Y	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 12 April 2001 (2001-04-12) the abstract, and page 2, paragraphs 2-4, and page 114, lines 23-30	1-14
Y	ZEA, M. et al. "Relationship between Fibrinolytic System and Neurological Diseases" <i>Reviews Neurology</i> , Vol. 51, No. 5, 01 September 2010 (2010-09-01), page 298, right column, paragraph 2	1-14
Y	FORSGREN, M. et al. "Plasminogen[Homo sapiens]" <i>GenBank: NP_000292.1</i> , 19 March 1999 (1999-03-19), entire document	6-14
A	WO 2012107567 A2 (OXPROTECT GMBH) 15 November 2012 (2012-11-15) entire document	1-14
A	CN 108210910 A (TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES, CO. LTD.) 29 June 2018 (2018-06-29) entire document	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 April 2021		07 May 2021
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/075921

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TEESALU, T. et al. "Tissue Plasminogen Activator as a Key Effector in Neurobiology and Neuropathology" <i>Biochemical Society Transactions</i> , Vol. 30, No. 2, 30 April 2002 (2002-04-30), pp. 183-189	1-14
A	CUZNER, M. L. et al. "Plasminogen Activators and Matrix Metalloproteases, Mediators of Extracellular Proteolysis in Inflammatory Demyelination of the Central Nervous System" <i>Journal of Neuroimmunology</i> , Vol. 94, No. 1-2, 01 February 1999 (1999-02-01), pp. 1-14	1-14
A	SHAW, M. A. et al. "Plasminogen Deficiency Delays the Onset and Protects from Demyelination and Paralysis in Autoimmune Neuroinflammatory Disease" <i>Journal of Neuroscience</i> , Vol. 37, No. 14, 08 March 2017 (2017-03-08), pp. 3776-3788	1-14

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

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

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

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

1.  Claims Nos.: **1-14**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claims 1-14 relate to a method for the treatment or diagnosis of a living human or animal body, and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). This search report is made on the basis of "the application of the preparation of drugs for the prevention and treatment of multiple sclerosis".
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/075921**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	0124815	A1	12 April 2001	US	2002094955	A1	18 July 2002
				CA	2385703	A1	12 April 2001
				US	2003180934	A1	25 September 2003
				EP	1227833	A1	07 August 2002
				JP	2003524413	A	19 August 2003
				AU	1191001	A	10 May 2001
WO	2012107567	A2	15 November 2012	DE	102011003944	A1	16 August 2012
				US	10416170	B2	17 September 2019
				EP	2673640	A2	18 December 2013
				US	9316650	B2	19 April 2016
				WO	2012107567	A3	15 November 2012
				US	2014044796	A1	13 February 2014
				US	2016208235	A1	21 July 2016
				EP	2673640	B1	30 September 2020
CN	108210910	A	29 June 2018	CN	108210899	A	29 June 2018
				HK	1257584	A1	25 October 2019
				HK	1257585	A1	25 October 2019
				CN	108210905	A	29 June 2018
				HK	1257587	A1	25 October 2019
				HK	1257588	A1	25 October 2019
				HK	1257589	A1	25 October 2019
				CN	108210897	A	29 June 2018
				CN	108210892	A	29 June 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/075921

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 38/43 (2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>Genbank, EMBL, VEN, CNKI, CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, PubMed, ISI Web of Knowledge: plasminogen, Multiple, sclerosis, tPA, uPA, 纤维蛋白溶酶原激活, 纤溶酶原, 多发性硬化症</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第114页第23-30行</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第2页第2-4段, 第114页第23-30行</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZEA, M. 等. "Relationship between fibrinolytic system and neurological diseases" Rev Neuro1, 第51卷, 第5期, 2010年 9月 1日 (2010 - 09 - 01), 第298页右栏第2段</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>FORSGREN, M. 等. "plasminogen[Homo sapiens]" GenBank: NP_000292.1, 1999年 3月 19日 (1999 - 03 - 19), 全文</td> <td>6-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2012107567 A2 (OXPROTECT GMBH) 2012年 11月 15日 (2012 - 11 - 15) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108210910 A (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 全文</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第114页第23-30行	1	Y	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第2页第2-4段, 第114页第23-30行	1-14	Y	ZEA, M. 等. "Relationship between fibrinolytic system and neurological diseases" Rev Neuro1, 第51卷, 第5期, 2010年 9月 1日 (2010 - 09 - 01), 第298页右栏第2段	1-14	Y	FORSGREN, M. 等. "plasminogen[Homo sapiens]" GenBank: NP_000292.1, 1999年 3月 19日 (1999 - 03 - 19), 全文	6-14	A	WO 2012107567 A2 (OXPROTECT GMBH) 2012年 11月 15日 (2012 - 11 - 15) 全文	1-14	A	CN 108210910 A (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 全文	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
X	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第114页第23-30行	1																					
Y	WO 0124815 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001年 4月 12日 (2001 - 04 - 12) 摘要, 第2页第2-4段, 第114页第23-30行	1-14																					
Y	ZEA, M. 等. "Relationship between fibrinolytic system and neurological diseases" Rev Neuro1, 第51卷, 第5期, 2010年 9月 1日 (2010 - 09 - 01), 第298页右栏第2段	1-14																					
Y	FORSGREN, M. 等. "plasminogen[Homo sapiens]" GenBank: NP_000292.1, 1999年 3月 19日 (1999 - 03 - 19), 全文	6-14																					
A	WO 2012107567 A2 (OXPROTECT GMBH) 2012年 11月 15日 (2012 - 11 - 15) 全文	1-14																					
A	CN 108210910 A (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 全文	1-14																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 4月 17日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 5月 7日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>刘新蕾</p> <p>电话号码 86-(10)-53962097</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	TEESALU, T.等. "Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology" Biochemical Society Transactions, 第30卷, 第2期, 2002年 4月 30日 (2002 - 04 - 30), 第183-189页	1-14
A	CUZNER, M.L.等. "Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system" Journal of Neuroimmunology, 第94卷, 第1-2期, 1999年 2月 1日 (1999 - 02 - 01), 第1-14页	1-14
A	SHAW, M.A.等. "Plasminogen Deficiency Delays the Onset and Protects from Demyelination and Paralysis in Autoimmune Neuroinflammatory DiseaseJ Neurosci" J Neurosci, 第37卷, 第14期, 2017年 3月 8日 (2017 - 03 - 08), 第3776-3788页	1-14

## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 1-14  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求1-14涉及对有生命的人体或动物体的治疗或诊断方法，属于PCT细则39.1(IV)中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备预防和治疗多发性硬化症药物的应用”进行检索。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/075921

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	0124815	A1	2001年 4月 12日	US	2002094955	A1	2002年 7月 18日
				CA	2385703	A1	2001年 4月 12日
				US	2003180934	A1	2003年 9月 25日
				EP	1227833	A1	2002年 8月 7日
				JP	2003524413	A	2003年 8月 19日
				AU	1191001	A	2001年 5月 10日
WO	2012107567	A2	2012年 11月 15日	DE	102011003944	A1	2012年 8月 16日
				US	10416170	B2	2019年 9月 17日
				EP	2673640	A2	2013年 12月 18日
				US	9316650	B2	2016年 4月 19日
				WO	2012107567	A3	2012年 11月 15日
				US	2014044796	A1	2014年 2月 13日
				US	2016208235	A1	2016年 7月 21日
				EP	2673640	B1	2020年 9月 30日
CN	108210910	A	2018年 6月 29日	CN	108210899	A	2018年 6月 29日
				HK	1257584	A1	2019年 10月 25日
				HK	1257585	A1	2019年 10月 25日
				CN	108210905	A	2018年 6月 29日
				HK	1257587	A1	2019年 10月 25日
				HK	1257588	A1	2019年 10月 25日
				HK	1257589	A1	2019年 10月 25日
				CN	108210897	A	2018年 6月 29日
				CN	108210892	A	2018年 6月 29日