



---

(21) 申請案號：110104801

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 08 日

(51) Int. Cl. :

*A61K38/48 (2006.01)*

*A61P21/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2020/05/11

世界智慧財產權組織

PCT/CN2020/089631

(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：侯德銘

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：11 共 73 頁

---

(54) 名稱

一種治療脊髓性肌萎縮症的方法和藥物

(57) 摘要

本發明涉及一種治療脊髓性肌萎縮症(SMA)的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖維溶酶原途徑激活劑。本發明還涉及用於治療脊髓性肌萎縮症之包含纖維溶酶原途徑激活劑的藥物組合物、製品和試劑盒。

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

一種治療脊髓性肌萎縮症的方法和藥物

### 【英文發明名稱】

無

### 【中文】

本發明涉及一種治療脊髓性肌萎縮症（SMA）的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖維溶酶原途徑激活劑。本發明還涉及用於治療脊髓性肌萎縮症之包含纖維溶酶原途徑激活劑的藥物組合物、製品和試劑盒。

### 【英文】

無

【指定代表圖】

無

【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】

一種治療脊髓性肌萎縮症的方法和藥物

### 【英文發明名稱】

無

### 【技術領域】

【0001】 本發明涉及一種治療脊髓性肌萎縮症（SMA）及其相關病症的方法，包括給藥患有脊髓性肌萎縮症（SMA）及其相關病症的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，以修復損傷神經，改善臨床症狀和體徵。

### 【先前技術】

【0002】 脊髓性肌萎縮症（Spinal Muscular Atrophy）簡稱SMA，又稱脊髓性肌萎縮或脊肌萎縮症，是一類由脊髓前角運動神經元變性導致肌無力、肌萎縮的疾病。屬常染色體隱性遺傳病。SMA最常見的形式是由運動神經元生存（SMN）基因中的突變所引起的，嬰兒SMA是這種神經退行性病的最嚴重形式。症狀包括肌無力、肌張力低下、哭泣無力、跛行或摔倒傾向、吮吸或吞咽困難、肺或咽喉分泌物積聚、攝食困難和易患呼吸道感染。腿部往往比手臂更無力，並且不能達到發育標誌，如抬頭或坐起。一般地，症狀出現得越早，壽命就越短。

【0003】 SMA的進程與運動神經元細胞惡化速度以及所造成的無力程度直接相關。患有嚴重形式的SMA的嬰兒由於支持呼吸的肌肉無力而經常死於呼吸道疾病。患有較輕形式的SMA的兒童存活時間較長，但是他們可能需要廣泛的醫療支撐。

【0004】 SMA是一種常染色體隱性遺傳疾病。約95%的SMA是由5號染色體上的SMN1（Survival Motor Neuron 1）基因突變所引起，因此也被稱作5q型SMA。5q型SMA根據患者的發病年齡和疾病的嚴重程度，脊肌萎縮症分為5種亞型：0型患者：一般多見於胎兒或新生兒，胎兒期即發作表現為胎動減少，新生兒表現為肌肉反射消失、面部癱瘓、房間隔缺損和關節攣縮，最嚴重的表現為呼吸衰竭，病兒預期壽命大大縮短，大多數生存期在6個月以內；I型患者：即

嬰兒型，也稱為Werdnig-Hoffman病，占SMA患者的50%。患者出生後6個月內出現肌張力低下，頭部控制不佳和肌腱反射減弱或消失。嚴重的肌張力低下，呼吸肌無力而產生呼吸衰竭。在無輔助通氣情況下，92%的I型SMA患兒通常在20個月前因呼吸衰竭而死亡；II型患者：即中間型，約占SMA患者的20%，一般在出生後6-18個月內發病，患者可以在發育過程中的某一階段獨坐，但無法獨立行走。該類患者多出現脊柱側凸、關節攣縮和下頷關節強直等併發症，脊柱側凸和肋間肌無力往往導致嚴重的肺部疾病。這些兒童的認知能力是正常的；III型患者：即少年型，也稱為Kugelberg-Welander病，約占SMA患者的30%，患者一般在出生後18個月-5歲內發病，在輔助物支撐的幫助下可行走。與II型SMA不同的是，這些人大多沒有脊柱側彎和呼吸肌無力等併發症，這個群體的認知和預期壽命一般不受疾病的影響；IV型患者：在少年之後發病，運動能力逐漸降低，大約占SMA患者總數的5%。與III型相似，但是發病在成年期，通常認為在30歲或更晚時候發病。4%的SMA不是由SMN1基因的突變所致，它們被稱為非5q型SMA，意思就是說它們的致病基因並不位於5號染色體的SMN區域。和5q型SMA類似，非5q型SMA的患兒很早也就會出現肌肉無力的症狀，但會有一些不同之處，其中包括是遠端肌肉而非近端肌肉無力、較早出現的遠端關節攣縮、隔肌麻痹伴隨較早出現的呼吸衰竭及小腦變性等（Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmüller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017 Jul 4;12(1):124.; Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf s EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto BA. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jan;20(1):27-32）。

【0005】 SMA是由兩個染色體上基因（SMN1）的端粒拷貝的失活突變或缺失，從而導致SMN1基因功能喪失所引起的。SMN1蛋白在RNA成熟中具有輔助因子的功能，是所有真核細胞存活力所需要的（Talbot and Tizzano(2017)*Gene Ther* 24(9):529-533）。SMN2蛋白除在RNA信息的剪接中起作用的單突變外與SMN1幾乎相同。所有SMA患者保留了基因（SMN2）的著絲點拷貝，並且SMA患者中SMN2基因的拷貝數通常與疾病嚴重性負相關，即SMA不太嚴重的患者具

有更多的SMN2拷貝。儘管如此，由於外顯子7中翻譯沉默的C向T的突變所引起的外顯子7的選擇性剪接，SMN2不能完全補償SMN1功能的損失。因此，由SMN2產生的大部分轉錄物缺乏外顯子7 ( $\Delta 7$  SMN2) 並且編碼具有受損的功能並且被快速降解為截短的SMN蛋白。

**【0006】** 在臨床上，通常通過臨床症狀結合至少一個SMN1基因拷貝的測試診斷SMA。在一些情況下，當SMN1基因測試未顯示異常時，其他測試如肌電描記術 (EMG) 或肌肉活組織檢查也可以輔助診斷。到目前為止，SMA的治療僅限於支持療法，包含呼吸、營養和康復的治療和護理，尚無藥物能夠有效治療這種疾病。

### **【發明內容】**

**【0007】** 有本發明研究發現纖維溶酶原途徑激活劑例如纖維溶酶原可以明顯改善SMA受試者神經損傷症狀、改善肺功能、延長生存期、促進SMN基因的轉錄和表達、提高腦組織和肌肉組織中SMN蛋白水平、促進腦組織和肌肉組織中NF- $\kappa$ B蛋白的表達、促進腦組織成熟NGF的形成、改善肺組織損傷，從而有效預防和治療SMA。

**【0008】** 一方面，本發明涉及一種治療脊髓性肌萎縮症 (SMA) (包括0型、I型、II型、III型、IV型和非5q型SMA) 的方法，包括給藥患運動神經元病例如脊髓性肌萎縮症 (SMA) 的受試者治療有效量之選自如下的一種或多種纖維溶酶原途徑激活劑：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類似物和纖維溶抑制劑的拮抗劑。

**【0009】** 在一些具體實施方案中所述纖維溶酶原途徑激活劑對所述患脊髓性肌萎縮症 (SMA) (包括0型、I型、II型、III型、IV型和非5q型SMA) 的受試者具有選自如下的一種或多種活性：1. 減小或改善SMA的嚴重程度；2. 延遲SMA的發作；3. 抑制SMA的進展；4. 延長受治者的存活時間；5. 提高受治者的生活品質和/或改善受試者精神狀態；6. 減少SMA相關症狀的數目；7. 減小或改善與SMA相關的一種或多種症狀的嚴重程度；8. 縮短與SMA相關的症狀的持續時

間；9. 防止與SMA相關的症狀的復發；10. 抑制SMA症狀的發展或發作；11. 抑制與SMA相關的症狀的進展；12. 改善肺功能；13. 提高血氧飽和度；14. 促進SMN基因的轉錄和表達；15. 提高腦組織和肌肉組織中SMN蛋白水平；16. 促進腦組織和肌肉組織中NF- $\kappa$ B蛋白的表達；17. 促進腦組織成熟NGF的形成；18. 減輕肺組織損傷；19. 增加肌力；20. 減少肌萎縮；21. 減少運動神經元損失；22. 促進生長、發育；和/或23. 提高運動功能。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑改善受試者的肌肉萎縮、增強肌力、和/或改善肌張力。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑延長受試者生存期。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑促進SMN基因的轉錄和/或表達。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑促進受試者的肌肉功能恢復。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑促進受試者的脊髓前角神經元損傷修復。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑促進受試者NF- $\kappa$ B蛋白的表達。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑促進受試者成熟NGF的形成。所述纖維溶酶原途徑激活劑促進受試者成熟NGF的形成。

**【0010】** 在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑與一種或多種其它藥物和/或治療方法聯合施用，較佳地，所述治療方法包括細胞療法（例如幹細胞療法）和基因療法，例如反義RNA、小分子剪接修飾劑。

**【0011】** 在一些實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑為纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分。

**【0012】** 在一些實施方案中，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（簡稱：纖維溶酶原）、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）、微纖維溶酶原（micro-plasminogen）、微纖維溶酶（micro-plasmin）、delta-纖維溶酶原、delta-纖維溶酶（delta-plasmin）、纖維蛋白溶酶原激活劑、tPA和uPA。在一些具體實施方案中，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巨球蛋白的拮抗劑，例如PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha$ 2抗纖維溶酶或 $\alpha$ 2巨球蛋白的抗體。

**【0013】** 在一些具體實施方案中，所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分

為纖維溶酶原。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原包含或具有與序列2、6、8、10或12所示胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的胺基酸序列，並且具有纖維溶酶原活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性和纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。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個胺基酸，並且具有纖維溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原為包含纖維溶酶原活性片段、並且具有纖維溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性片段包含或具有纖維溶酶原的絲胺酸蛋白酶結構域或稱纖維溶酶原蛋白酶結構域。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性片段的胺基酸序列如序列14所示。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原（人全長纖維溶酶原）、Lys-纖維溶酶原（在第76-77位胺基酸之間切割後的人全長纖維溶酶原）、小纖維溶酶原（包含Kringle 5（K5）和絲胺酸蛋白酶結構域）、微纖維溶酶原（包含絲胺酸蛋白酶結構域）、delta-纖維溶酶原（包含Kringle 1和絲胺酸蛋白酶結構域）或它們的保留纖維溶酶原活性的變體。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原為人全長纖維溶酶原、或其仍然保留纖維溶酶原活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性和纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原為來自靈長類動物或齧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的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原包含如序列2、6、8、10或12所示的胺基酸序列。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原是人天然纖維溶酶原。

**【0014】** 在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑以全身或局

部方式給藥，例如通過靜脈內、肌肉內、鞘內、鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液或滴眼液形式給藥。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。在一些實施方案中，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>（以每平方釐米體表面積計算）的劑量，每天、每二天或每三天連續施用。

**【0015】** 在一些實施方案中，上述SMA為0型、I型、II型、III型、IV型或非5q型SMA。

**【0016】** 一方面，本申請還涉及用於治療脊髓性肌萎縮症（SMA）的藥物組合物、藥物、製劑、試劑盒、製品，包含以上所述的纖維溶酶原途徑激活劑，例如以上所述的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分，例如以上所述的纖維溶酶原。

**【0017】** 在一些實施方案中，所述藥物組合物、藥物、製劑包含藥學上可接受的載體和纖維溶酶原途徑激活劑，例如以上所述的纖維溶酶原激活途徑的組分，例如以上所述的纖維溶酶原。在一些實施方案中，所述試劑盒和製品包含一個或多個容器，所述容器中包含所述藥物組合物、藥物或製劑。在一些實施方案中，所述試劑盒或製品還包含標籤或使用說明書，該標籤或使用說明書指示使用纖維溶酶原途徑激活劑，例如以上所述的纖維溶酶原激活途徑的組分，例如以上所述的纖維溶酶原治療脊髓性肌萎縮症的方法。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容器，該容器中含有一種或多種其他藥物。在一些實施方案中，上述SMA為0型、I型、II型、III型、IV型或非5q型SMA。

**【0018】** 一方面本申請還涉及用於治療脊髓性肌萎縮症（SMA）的以上所述的纖維溶酶原途徑激活劑，例如以上所述的纖維溶酶原。在一些實施方案中，上述SMA為0型、I型、II型、III型、IV型或非5q型SMA。

**【0019】** 一方面，本申請還涉及以上所述的纖維溶酶原途徑激活劑，例如以上所述的纖維溶酶原用於治療脊髓性肌萎縮症（SMA）的用途。在一些實施方案中，上述SMA為0型、I型、II型、III型、IV型或非5q型SMA。

**【0020】** 一方面，本申請還涉及治療有效量的上述纖維溶酶原途徑激活劑

(例如以上所述的纖溶酶原激活途徑的組分，例如以上所述的纖溶酶原)在製備治療脊髓性肌萎縮症(SMA)的藥物組合物、藥物、製劑、試劑盒、製品中的用途。

【0021】 在一些實施方案中，所述纖溶酶原途徑激活劑是選自如下的一種或多種纖溶酶原途徑激活劑：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。

【0022】 在一些具體實施方案中，所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分是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。在一些具體實施方案中，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。

【0023】 在一些實施方案中，所述纖溶酶原途徑激活劑為纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分。

【0024】 在一些實施方案中，所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分是選自纖維蛋白溶酶原(簡稱：纖溶酶原)、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。在一些具體實施方案中，所述纖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 $\alpha 2$ 巨球蛋白的拮抗劑，例如PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha 2$ 抗纖維溶酶或 $\alpha 2$ 巨球蛋白的抗體。

【0025】 在一些具體實施方案中，所述纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分為纖維溶酶原。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原包含或具有與序列2、6、8、10或12所示胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的胺基酸序列，並且具有纖維溶酶原活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性和纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。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個胺基酸，並且具有纖維溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原為包含纖維溶酶原活性片段、並且具有纖維溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性片段包含或具有纖維溶酶原的絲胺酸蛋白酶結構域或稱纖維溶酶原蛋白酶結構域。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原活性片段的胺基酸序列如序列14所示。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原（人全長纖維溶酶原）、Lys-纖維溶酶原（在第76-77位胺基酸之間切割後的人全長纖維溶酶原）、小纖維溶酶原（包含Kringle 5（K5）和絲胺酸蛋白酶結構域）、微纖維溶酶原（包含絲胺酸蛋白酶結構域）、delta-纖維溶酶原（包含Kringle 1和絲胺酸蛋白酶結構域）或它們的保留纖維溶酶原活性的變體。在一些具體實施方案中，所述纖維溶酶原為人全長纖維溶酶原、或其仍然保留纖維溶酶原活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原活性為纖維溶酶原的蛋白水解活性和纖維溶酶原與反應物分子的賴胺酸結合活性。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原為來自靈長類動物或齧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的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原包含如序列2、

6、8、10或12所示的胺基酸序列。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原是人天然纖維溶酶原。

**【0026】** 在一些實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑，例如上述纖維溶酶原激活途徑的組分，例如上述纖維溶酶原與一種或多種其它藥物和/或治療方法聯合施用。在一些實施方案中，所述纖維溶酶原途徑激活劑，例如纖維溶酶原激活途徑的組分，例如纖維溶酶原通過靜脈內、肌肉內、鞘內、鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液或滴眼液形式給藥。

**【0027】** 在一些實施方案中，所述藥物組合物、藥物、製劑包含藥學上可接受的載體和纖維溶酶原途徑激活劑，例如纖維溶酶原激活途徑的組分，例如纖維溶酶原。在一些實施方案中，所述試劑盒和製品包含一個或多個容器，所述容器中包含所述藥物組合物、藥物或製劑。在一些實施方案中，所述試劑盒或製品還包含標籤或使用說明書，該標籤或使用說明書指示使用纖維溶酶原途徑激活劑，例如纖維溶酶原激活途徑的組分，例如纖維溶酶原治療脊髓性肌萎縮症的方法。

**【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容器，該容器中含有一種或多種其他藥物。

**【0029】** 在一些實施方案中，上述SMA為0型、I型、II型、III型、IV型或非5q型SMA。

**【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揭露，就像上述技術方案已經單獨且明確揭露一樣。另外，本發明還明確涵蓋各個實施方案及其要素之間的組合，該組合後的技術方案在本文中明確揭露。

#### **【圖式簡單說明】**

##### **【0031】**

圖1示出實施例1所述II型SMA患者治療前和治療後運動神經肌電圖波幅結果；結果顯示，與用藥前相比，患者脛神經、腓總神經動作電位波幅均有不同程度的提高；結果表明，纖維溶酶原可改善II型SMA患者周圍神經元傳導功能，改善神經肌肉損傷。

圖2示出實施例2所述患者治療前後上下肢運動神經肌電圖波幅結果；與用藥前相比，患者左側股神經、右側尺神經、雙側腓總神經及脛神經動作電位波

幅均有不同程度的提高；結果表明，纖溶酶原可改善 II 型 SMA 患者周圍神經元傳導功能，改善神經肌肉損傷。

圖 3 示出實施例 3 所述患者治療前後上下肢運動神經肌電圖波幅結果；與用藥前相比，患者雙側正中神經、脛神經、腓總神經、尺神經動作電位波幅均有不同程度的提高；結果表明，纖溶酶原可改善 II 型 SMA 患者周圍神經元傳導功能，改善神經肌肉損傷。

圖 4A-4B 示出給予纖溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠生存曲線和生存時間統計結果；A 為生存曲線統計結果，B 為生存時間統計結果；生存曲線統計結果顯示，纖溶酶原能夠明顯改善 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠生存曲線，統計差異顯著( $P=0.029$ )。生存時間統計結果顯示，溶媒組小鼠中位生存時間為 14 天，所有小鼠在第 15 天全部死亡；給藥組中位生存時間為 16 天，所有小鼠在第 17 天全部死亡，且統計分析差異顯著 ( $P=0.03$ )；說明纖溶酶原能夠延長 SMA 模型小鼠生存時間。

圖 5 示出給予纖溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠脊髓 SMN 基因 qPCR 檢測結果；結果顯示，空白對照組小鼠脊髓具有一定的 SMN 基因轉錄水平，溶媒組小鼠 SMN 基因轉錄水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠 SMN 基因轉錄水平明顯高於溶媒組小鼠和空白對照組小鼠；該結果提示纖溶酶原能夠促進 SMN 基因轉錄。

圖 6 示出給予纖溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠腦 NF- $\kappa$ B 蛋白 Western blot 檢測結果和光密度值定量分析結果；結果顯示，空白對照組小鼠腦具有一定的 NF- $\kappa$ B 蛋白，溶媒組小鼠腦 NF- $\kappa$ B 蛋白水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠腦 NF- $\kappa$ B 蛋白水平明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異接近顯著 ( $P=0.05$ )；該結果提示纖溶酶原能夠促進 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠腦組織 NF- $\kappa$ B 蛋白水平增加。

圖 7 示出給予纖溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠代表性後肢肌肉 NF- $\kappa$ B 蛋白 Western blot 檢測結果和光密度值定量分析結果；結果顯示，空白對照組小鼠肌肉具有一定的 NF- $\kappa$ B 蛋白，溶媒組小鼠肌肉 NF- $\kappa$ B 蛋白水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠肌肉 NF- $\kappa$ B 蛋白水平明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異顯著 (\*表示  $P<0.05$ )；該結果提示纖溶酶原能夠促進 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠肌肉 NF- $\kappa$ B 蛋白水平增加。

圖 8 示出給予纖溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠代表性腦 SMN 蛋白 Western blot 檢測結果和光密度 (OD) 值定量分析結果；結果顯示，空白對照組小鼠腦

表達一定量的 SMN 蛋白，溶媒組小鼠 SMN 蛋白表達水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠 SMN 蛋白表達水平明顯高於溶媒組小鼠；該結果提示纖維溶酶原能夠促進 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠腦 SMN 蛋白表達。

圖 9 示出給予纖維溶酶原後 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠代表性後肢肌肉 SMN 蛋白 Western blot 檢測結果和光密度 (OD) 值定量分析結果；結果顯示，空白對照組小鼠肌肉表達一定量的 SMN 蛋白，溶媒組小鼠肌肉 SMN 蛋白表達水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠肌肉 SMN 蛋白表達水平明顯高於溶媒組小鼠；該結果提示纖維溶酶原能夠促進 SMN $\Delta$ 7 SMA 小鼠肌肉 SMN 蛋白表達。

圖 10 示出給予纖維溶酶原後 SMA 小鼠後腦組織 Western blot 檢測結果和 NGF/Pro-NGF 光密度 (OD) 比值定量分析結果。結果顯示，空白對照組小鼠腦組織具有一定 NGF/ProNGF 比值，給藥組小鼠腦組織 NGF/ProNGF 比值明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異極為顯著 (\*\*\*)表示  $P < 0.001$ )。提示纖維溶酶原能夠促進 SMA 模型小鼠腦組織中 ProNGF 轉化形成 NGF，促進成熟 NGF 的形成。

圖 11 示出給予纖維溶酶原後 SMA 小鼠代表性後肺組織 H&E 染色圖片結果，空白對照組小鼠肺組織終末細支氣管上皮細胞排列整齊，清晰可辨；肺泡腔大小均勻，肺泡間隔未見增厚，血管周圍未見炎細胞浸潤；溶媒組小鼠肺組織呼吸性細支氣管上皮脫落，肺泡管、肺泡囊擴大，肺泡隔增寬，肺泡塌陷至結構紊亂，肺血管周圍伴嗜酸性粒細胞、泡沫細胞、淋巴細胞；給藥組小鼠肺組織呼吸性細支氣管上皮排列有序，肺泡管、肺泡囊擴大，肺泡腔均勻擴大，但可見由單層肺泡上皮組成的肺泡壁；提示纖維溶酶原能夠改善 SMA 模型小鼠肺組織損傷。

### 【實施方式】

【0032】 術語“脊髓性肌萎縮 (症)” (或 Spinal Muscular Atrophy, SMA) 是指由兩個染色體上 SMN1 基因的失活突變或缺失，從而導致 SMN1 基因功能喪失引起的疾病。SMA 的症狀包括肌無力、肌張力低下、哭泣無力、咳嗽無力、跛行或摔倒傾向、吮吸或吞咽困難、呼吸困難、肺或咽喉中分泌物積累、緊握的拳頭和汗手、舌頭顫動/振動、常常傾向一側的頭部 (即使在躺下時)、傾向於弱於臂部的腿部、經常呈“蛙腿”位置的腿部、攝食困難、對呼吸道感染敏感度提高、腸/膀胱無力、低於正常的體重、不能無支撐坐立、不能行走、不能爬行、

和張力減退、反射消失、以及與前horn細胞喪失相關的多發性先天性攣縮（關節攣縮）。

**【0033】** 本申請術語“治療脊髓性肌萎縮（SMA）”或“脊髓性肌萎縮（SMA）的治療”包括獲得以下效果中的一個或多個：1. 減小或改善SMA的嚴重程度；2. 延遲SMA的發作；3. 抑制SMA的進展；4. 延長受治者的存活時間；5. 提高受治者的生活品質和/或改善受試者精神狀態；6. 減少SMA相關症狀的數目；7. 減小或改善與SMA相關的一種或多種症狀的嚴重程度；8. 縮短與SMA相關的症狀的持續時間；9. 防止與SMA相關的症狀的復發；10. 抑制SMA症狀的發展或發作；11. 抑制與SMA相關的症狀的進展；12. 改善肺功能；13. 提高血氧飽和度；14. 促進SMN基因的轉錄和表達；15. 提高腦組織和肌肉組織中SMN蛋白水平；16. 促進腦組織和肌肉組織中NF- $\kappa$ B蛋白的表達；17. 促進腦組織成熟NGF的形成；18. 減輕肺組織損傷；19. 增加肌力；20. 減少肌萎縮；21. 減少運動神經元損失；22. 促進生長、發育；和/或23. 提高運動功能。

**【0034】** 在一些實施方案中，本申請的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物，例如以上所述的纖溶酶原增強SMN基因轉錄和/或表達。在一些實施方案中，本申請的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物，例如以上所述的纖溶酶原增加SMN蛋白在有此需要的人受試者中的表達。

**【0035】** 在一些實施方案中，本申請的纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分或其相關化合物，例如纖溶酶原可以單獨地或與其他藥物組合地用於治療或預防由SMN基因的失活突變或缺失引起的和/或與SMN基因功能喪失或缺陷相關的疾病。這些疾病包括但不限於脊髓性肌萎縮（SMA）。

**【0036】** 在一些實施方案中，本申請涉及一種治療SMN基因的失活突變或缺失引起的和/或與SMN基因功能喪失或缺陷相關的疾病，例如SMA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的組分或其相關化合物，例如纖溶酶原。在一些實施方案中，本申請涉及治療SMA的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖溶酶原。

**【0037】** 在一些實施方案中，本申請涉及治療SMA的方法，包括給藥受試者治療有效量的纖溶酶原，所述纖溶酶原具有選自以下的一項或多項活性：1. 減小或改善SMA的嚴重程度；2. 延遲SMA的發作；3. 抑制SMA的進展；4. 延長受治者的存活時間；5. 提高受治者的生活品質和/或改善受試者精神狀態；6. 減

少SMA相關症狀的數目；7. 減小或改善與SMA相關的一種或多種症狀的嚴重程度；8. 縮短與SMA相關的症狀的持續時間；9. 防止與SMA相關的症狀的復發；10. 抑制SMA症狀的發展或發作；11. 抑制與SMA相關的症狀的進展；12. 改善肺功能；13. 提高血氧飽和度；14. 促進SMN基因的轉錄和表達；15. 提高腦組織和肌肉組織中SMN蛋白水平；16. 促進腦組織和肌肉組織中NF- $\kappa$ B蛋白的表達；17. 促進腦組織成熟NGF的形成；18. 減輕肺組織損傷；19. 增加肌力；20. 減少肌萎縮；21. 減少運動神經元損失；22. 促進生長、發育；和/或23. 提高運動功能。

【0038】 纖維蛋白溶解系統（Fibrinolytic system）也稱纖溶系統，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是一種絲胺酸蛋白酶，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）是一種絲胺酸蛋白酶，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；FX III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。

【0039】 本發明“纖維蛋白溶酶原途徑激活劑”或“纖溶酶原途徑激活劑”術語涵蓋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。

【0040】 本發明的術語“纖維蛋白溶酶原激活途徑的組分”或“纖溶酶原激活途徑的組分”涵蓋：

【0041】 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-纖溶酶原；它們的變體或類似物；

【0042】 2. 纖維蛋白溶酶以及它們的變體或類似物；和

【0043】 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。

【0044】 所述的“纖溶抑制劑的拮抗劑”術語涵蓋PAI-1、補體C1抑制物、 $\alpha$ 2抗纖溶酶或 $\alpha$ 2巨球蛋白的拮抗劑，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。

【0045】 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個胺基酸、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個保守性胺基酸取代獲得的這些蛋白質的突變變體。

【0046】 本發明的“纖溶酶原變體”涵蓋包含或具有與序列2、6、8、10或12所示胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且具有纖溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。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個胺基酸，並且仍然具有纖溶酶原的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的蛋白質。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，以及通過保守性胺基酸取代例如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個胺基酸獲得的這些蛋白質的突變變體。

【0047】 本發明的纖溶酶原可以為來自靈長類動物或齧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的蛋白水解活性和/或賴胺酸結合活性的變體，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。

【0048】 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。

【0049】 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溶酶原結構域（例如一個或多個kringle (k) 結構域和蛋白水解結構域（或稱絲胺酸蛋白酶結構域，或稱纖溶酶原蛋白酶結構域）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）。

【0050】 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已知方法進行檢測，例如，通過基於酶譜法（enzymography）、ELISA（酶聯免疫吸附測定）和FACS（螢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". *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。

【0051】 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，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和/或賴胺酸結合活性的保守突變變體或其片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為來自靈長類動物或齧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和/或賴胺酸結合活性的保守突變變體或其片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原的胺基酸序列包含或具有如序列2、6、8、10或12所示的胺基酸序列。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是人全長纖溶酶原。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是如序列2所示的人全長纖溶酶原。

【0052】 “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。

【0053】 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，或佔據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。

【0054】 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、層黏連蛋白和蛋白聚糖。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特異性細胞表面受體（uPAR）。

**【0055】** 纖溶酶原是一個單鏈糖蛋白，由791個胺基酸組成，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：穀胺酸-纖溶酶原（Glu-plasminogen）和賴胺酸-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胺基末端（N-末端）穀胺酸，因此被稱為穀胺酸-纖溶酶原。然而，在纖溶酶存在時，穀胺酸-纖溶酶原在Lys76-Lys77處水解成為賴胺酸-纖溶酶原。與穀胺酸-纖溶酶原相比，賴胺酸-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。纖溶酶原的胺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胺酸結合位點。最新發現一個纖溶酶原為38 kDa的片段，其中包括kringles1-4，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。

**【0056】** 纖溶酶的主要反應物是纖維蛋白，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幾個組分的反應物特異性，包括層黏連蛋白、纖連蛋白、蛋白聚糖和明膠，表明纖溶酶在ECM重建中也起著重要作用。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。

【0057】 “纖維溶酶”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。

【0058】 “纖維溶酶原”是纖維溶酶的酶原形式，根據swiss prot中的序列，按含有信號肽的天然人源纖維溶酶原胺基酸序列（序列4）計算由810個胺基酸組成，分子量約為90kD，主要在肝臟中合成並能夠在血液中循環的糖蛋白，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全長的纖維溶酶原包含七個結構域：位於C末端的絲胺酸蛋白酶結構域、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資料，絲胺酸蛋白酶域包括殘基Val581-Arg804。

【0059】 Glu-纖維溶酶原是天然全長的纖維溶酶原，由791個胺基酸組成（不含有19個胺基酸的信號肽），編碼該序列的cDNA序列如序列1所示，其胺基酸序列如序列2所示。在體內，還存在一種是從Glu-纖維溶酶原的第76-77位胺基酸處水解從而形成的Lys-纖維溶酶原，如序列6所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列5所示。Delta-纖維溶酶原 ( $\delta$ -plasminogen) 是全長纖維溶酶原缺失了Kringle2-Kringle5結構的片段，僅含有Kringle1和絲胺酸蛋白酶（結構）域（也可稱為蛋白水解結構域，或稱纖維溶酶原蛋白酶結構域），有文獻報導了delta-纖維溶酶原的胺基酸序列（序列8），編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列7。小纖維溶酶原 (Mini-plasminogen) 由Kringle5和絲胺酸蛋白酶域組成，有文獻報導其包括殘基Val443-Asn791（以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸），其胺基酸序列如序列10所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列9所示。而微纖維溶酶原 (Micro-plasminogen) 僅含有絲胺酸蛋白酶結構域，有文獻報導其胺基酸序列包括殘基Ala543-Asn791（以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸），也有專利文獻CN102154253A報導其序列包括殘基Lys531-Asn791（以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸），本專利序列參考專利文獻CN102154253A，其胺基酸序列如序列12所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列11所示。

【0060】 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。

【0061】 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。

【0062】 本領域技術人員可以理解，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反應物上的賴胺酸殘基結合。已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。

【0063】 “纖溶酶原活性片段”在本申請中包括1）在纖溶酶原蛋白中，能夠與反應物中的靶序列結合的活性片段，也稱為賴胺酸結合片段，例如包含Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4和/或 Kringle 5的片段（所述纖溶酶原結構參見 Aisina R B , Mukhametova L I . Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6):590-605所述）；2）在纖溶酶原蛋白中發揮蛋白水解功能的活性片段，例如包含序列14所示的纖溶酶原活性（蛋白水解功能）的片段；3）在纖溶酶原蛋白中，既具有與反應物中的靶序列結合活性（賴胺酸結合活性）又具有纖溶酶原活性（蛋白水解功能）的片段。在本申請的一些實施方案中，所述纖溶酶原為包含序列14所示的纖溶酶原活性片段的蛋白質。在本申請的一些實施方案中，所述纖溶酶原為包含Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4和/或 Kringle 5的賴胺酸結合片段的蛋白質。在一些實施方案中，本申請的纖溶酶原活性片段包含序列14、與序列14具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源

性的胺基酸序列的蛋白質。因此，本發明所述的纖溶酶原包括含有該纖溶酶原活性片段、並且仍然保持該纖溶酶原活性的蛋白。在一些實施方案中，本申請的纖溶酶原包括Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4和/或 Kringle 5、或與 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4或 Kringle 5具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性並且仍然具有賴胺酸結合活性的蛋白質。

**【0064】** 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反應物法：向受檢血漿中加鏈激酶(SK)和發色反應物，受檢血漿中的PLG在SK的作用下，轉變成PLM，後者作用於發色反應物，隨後用分光光度計測定，吸光度增加與纖溶酶原活性成正比。此外也可採用免疫化學法、凝膠電泳、免疫比濁法、放射免疫擴散法等對血液中的纖溶酶原活性進行測定。

**【0065】** “直系同源物或直系同系物（ortholog）”指不同物種之間的同源物，既包括蛋白同源物也包括DNA同源物，也稱為直向同源物、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。本發明的纖溶酶原包括人的天然纖溶酶原，還包括來源於不同物種的、具有纖溶酶原活性的纖溶酶原直系同源物或直系同系物。

**【0066】** “保守取代變體”是指其中一個給定的胺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）的胺基酸取代親本蛋白質中胺基酸序列中的胺基酸。具有類似性質的胺基酸是眾所周知的。例如，精胺酸、組胺酸和賴胺酸是親水性的鹼性胺基酸並可以互換。同樣，異亮胺酸是疏水胺基酸，則可被亮胺酸、蛋胺酸或纈胺酸替換。因此，相似功能的兩個蛋白或胺基酸序列的相似性可能會不同。例如，基於MEGALIGN演算法的70%至99%的相似度（同一性）。“保守取代變體”還包括通過BLAST或FASTA演算法確定具有60%以上的胺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。

【0067】 “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端或內部胺基酸序列的至少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。分離的纖維溶酶原也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。

【0068】 術語“多肽”、“肽”和“蛋白質”在本文中可互換使用，指任何長度的胺基酸的聚合形式，其可以包括遺傳編碼的和非遺傳編碼的胺基酸、化學或生物化學修飾的或衍生化的胺基酸，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胺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端甲硫胺酸殘基）的融合物；等等。

【0069】 關於參照多肽序列的“胺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胺基酸殘基相同的胺基酸殘基的百分率。為測定百分比胺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電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign（DNASTAR）軟體。本領域技術人員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演算法。然而，為了本發明的目的，胺基酸序列同一性百分數值是使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生的。

【0070】 在採用ALIGN-2來比較胺基酸序列的情況中，給定胺基酸序列A相對於給定胺基酸序列B的%胺基酸序列同一性（或者可表述為具有或包含相對於、與、或針對給定胺基酸序列B的某一%胺基酸序列同一性的給定胺基酸序列A）如下計算：

分數 $X/Y$  乘 100，

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胺基酸殘基的數目，且其中Y是B中的胺基酸殘基的總數。應當領會，在胺基酸序列A的長度與胺基酸序列B的長度不相等的情况下，A相對於B的%胺基酸序

列同一性會不等於B相對於A的%胺基酸序列同一性。除非另有明確說明，本文中使用的所有%胺基酸序列同一性的值都是依照上一段所述，使用ALIGN-2電腦程式獲得的。

**【0071】** 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。

**【0072】** “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/或治療的纖維溶酶原的量。“治療有效量”會根據所使用的纖維溶酶原、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。

**【0073】** 術語疾病狀態的“治療”包括抑制或阻止所述疾病狀態或其臨床症狀的發展，或減輕所述疾病狀態或症狀，使得所述疾病狀態或其臨床症狀暫時或永久性的退去。

**【0074】** 術語“肌力”指肢體作隨意運動時肌肉收縮的力量或肌肉主動運動時的力量。根據肌力的情況，通常將肌力分為以下0--5級：0級，完全癱瘓，測不到肌肉收縮；1級，僅測到肌肉收縮，但不能產生動作；2級，肢體能在床上平行移動，但不能抵抗自身重力，即不能抬離床面；3級，肢體可以克服地心引力，能抬離床面，但不能抵抗阻力；4級，肢體能做對抗外界阻力的運動，但不完全；5級，肌力正常。

**【0075】** 術語“肌張力”指肌肉靜止鬆弛狀態下的緊張度。肌張力是維持身體各種姿勢以及正常運動的基礎。肌張力表現為多種形式，例如人在靜臥休息時，身體各部肌肉所具有的張力稱靜止性肌張力。軀體站立時，雖不見肌肉顯著收縮，但軀體前後肌肉亦保持一定張力，以維持站立姿勢和身體穩定，稱為姿勢性肌張力。肌肉在運動過程中的張力，稱為運動性肌張力，是保證肌肉運動連續、平滑（無顫抖、抽搐、痙攣）的重要因素。在病理狀況下，肌張力增高或者減低，影響人體正常的姿勢或運動。

#### 本發明纖維溶酶原的製備

**【0076】** 纖維溶酶原可以從自然界分離並純化用於進一步的治療用途，也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末端胺基酸附接於不

溶性支援物，接著序貫添加序列中剩餘的胺基酸）是適合纖維溶酶原化學合成的方法。各種形式的SPPS，諸如Fmoc和Boc可用於合成纖維溶酶原。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, 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); 及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保護的胺基酸單元偶聯。然後，將此單元去保護，露出可以與別的胺基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上，之後將其切掉。

**【0077】** 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。

**【0078】** 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（例如安比西林抗性、潮黴素抗性、四環素抗性、卡那黴素抗性 or 新黴素抗性）以有助於對外源期望的DNA序列轉化的那些細胞進行檢測。

**【0079】** 大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 是可以用於選殖纖維溶酶原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，也可以生成表達載體，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，色胺酸 (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。

【0080】 其他微生物，諸如酵母也可用於表達。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。

【0081】 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）也可以用於表達並生成本發明的纖維溶酶原（例如編碼纖維溶酶原的多核苷酸）。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)。

【0082】 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，除纖維溶酶原以外的大分子，等等。

#### 藥物配製劑

【0083】 可以通過將具有所需純度的纖維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)）混合來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胺酸；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；胺基酸如甘胺酸、穀胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或賴胺酸；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）。

【0084】 本發明的配製劑也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。例如，抗高血壓的藥物、抗心律失常的藥物、治療糖尿病的藥物等。

【0085】 本發明的纖維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、奈米顆粒和奈米膠囊）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。這些技術揭露於Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

【0086】 用於體內給藥的本發明的纖維酶原必需是無菌的。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。

【0087】 本發明的纖維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(乙醇醇)、聚交酯（美國專利3773919, EP 58,481）、L-穀胺酸與 $\gamma$ 乙基-L-穀胺酸的共聚物（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 DepotTM（由乳酸-羥基乙酸共聚物和亮胺醯脯胺酸（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-乙酸乙烯酯和乳酸-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卻較短。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。

### 給藥和劑量

【0088】 可以通過不同方式，例如通過靜脈內、腹膜內、皮下、顱內、鞘內、動脈內（例如經由頸動脈）、肌內來實現本發明藥物組合物的施用。

【0089】 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。也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。

【0090】 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。本發明包含纖溶酶原的藥物組合物的劑量範圍可以為每天約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也涵蓋在內，特別是考慮到上述的因素。上述範圍中的中間劑量也包含在本發明的範圍內。受試者可以每天、隔天、每週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1-10 mg/kg。在本發明的藥物施用過程中需要即時評估治療效果和安全性。

### 製品或藥盒

【0091】 本發明的一個實施方案涉及一種製品或藥盒，其包括可用於治療由糖尿病引起的心血管病及其相關病症的本發明纖溶酶原或纖溶酶。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膠製成。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溶酶原/纖溶酶。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由糖尿病引起的心血管病及其相關病症。所述製品可進一步包括含有可

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纖溶酶原組合物以及治療伴隨的疾病的其它藥物給藥患者。

## 實施例

【0092】 以下所有實施例中使用的人纖溶酶原來自捐贈者血漿，基於文獻[1-3]所描述的方法並進行工藝優化，從人捐贈者血漿純化獲得，其中人Lys-纖維蛋白溶酶原(Lys-纖溶酶原)和Glu-纖維蛋白溶酶原(Glu-纖溶酶原)>98%。

【0093】 以下實施例1-7中所有患者均簽署知情同意書，自願接受上述純化自人血漿的纖溶酶原的治療，並獲得醫院倫理委員會批准。根據病情嚴重程度和病程不同，調節用法用量。給藥方式為霧化吸入或靜脈注射。霧化吸入、靜脈注射的藥品濃度均為5mg/ml，以生理鹽水為溶媒。

## 實施例1 II型SMA

【0094】 患者，女，38個月。出生10個月時無法爬行，雙腿無力，1歲以後運動能力幾乎沒有提高。1歲9個月基因檢測確診為SMA，肌力二級，下肢不能持重，開始服用沙丁胺醇、甲鈷胺、輔酶Q10，2周歲時已經退化到不能爬，只能短時間坐立。2歲2個月時開始間充質幹細胞治療，平衡力有所好轉，不容易生病，但是仍然無法站立。2歲11個月開始穴位注射鼠神經生長因子，平衡力有所好轉，下肢開始有支撐力，肌力測試達3級。

【0095】 用藥情況

【0096】 靜脈注射；劑量：100-200mg/次；頻率：每隔1天一次、每隔2天一次或每隔3天一次；2周為一個療程；每個療程間隔2-3周。共治療6個療程。

【0097】 Hammersmith 運動功能評分量表 (Expanded Hammersmith Functional Motor Scale, HFMS) 專門用以評估II型和III型SMA患者運動功能，反映疾病嚴重性。它相較於基線的變化而定義，評估患兒運動功能的變化情況，分值越高，運動功能越好[4-6]。

【0098】 神經肌電圖檢查是運動神經元病主要診斷和鑑別手段，複合肌肉動作電位波幅反應神經元軸突損傷。SMA是一種運動神經元退行性疾病，運

動神經元大量死亡，出現肌無力和複合肌肉動作電位波幅降低甚至無法檢測出[7]。

#### 藥效情況

【0099】 HFMSE評分：用藥前20分，第1個療程治療後評分為21分。第2療程治療前評分為23分，治療後評分為24分。第6個療程治療後評分為25分。

【0100】 運動功能評價：治療前患者不能無輔助站立，用藥2個療程後患者能夠輔助站立，用藥3個療程後患者實現輔助行走，並且患者的頭控能力明顯改善。隨著治療的進行，患者的運動功能進一步改善，包括輔助站立時間延長和輔助行走距離增加等。

【0101】 肌電圖：較用藥前，用藥後雙側脛神經和腓總神經及股神經動作電位波幅明顯升高（圖1）。

【0102】 此外，用藥後患者的精神狀態明顯改善，活力增加。治療過程中未見藥物相關的副作用。

【0103】 以上結果說明纖維溶酶原可提高II型SMA患者HFMSE評分，改善患者運動功能，改善患者的神經肌肉功能和精神狀態。

#### 實施例 2 II型SMA患者

【0104】 患者，男，30個月。出生後，無異常。9個月時，無法獨站，無法自主翻身，雙手偶爾有輕微顫抖，無法抓握，無法抬頭。10個月時基因檢測確診為II型SMA患者。1-2歲時，開始在康復中心做康復，一週一次，可以保持獨坐，雙手可以抓取輕物，小腿緩慢伸展，輔助下可完成翻身動作。2歲2個月時，靜脈輸注骨髓間充質幹細胞三次，每次兩個單位，改善並不明顯。2歲4個月時，注射了兩次神經幹細胞，每次兩個單位，注射後改善比較明顯。現狀：可以獨坐，獨坐時，身體可以向兩側稍微傾斜，用雙手支撐身體，但雙臂無法舉起。頭部控制有所改善，可以來回快速搖頭，在家長輔助四點支撐的情況下保持抬頭狀態。腿部力量增加，可以坐在座椅上小腿來回踢踹。可以斜靠家長身上保持站立，但需輕微輔助膝蓋。

#### 用藥情況

【0105】 第一次：靜脈注射，50mg；第二次：靜脈注射，50mg；第三次和第四次：靜脈注射，100mg。用藥頻率為每隔2天一次或每隔3天一次，共用藥2周。

### 藥效情況

【0106】 用藥前HFMSE評分表為2分，第四次用藥後HFMSE評分為8分，患者可獨坐雙手舉起。肌電圖結果顯示，較用藥前，用藥後左側股神經、右側尺神經、腓總神經及脛神經動作電位波幅增加（圖2）。

【0107】 以上結果說明纖維溶酶原可提高II型SMA患者HFMSE評分，改善患者運動功能，改善神經肌肉功能，且治療過程中未見藥物相關的副作用。

### 實施例3 II型SMA患者

【0108】 患者，女，24個月。1歲時可扶站，不會四點支撐爬。16個月時肌電圖顯示神經元受損，基因檢測確診為II型SMA患者。現狀：獨坐不穩，躺著自己坐不起來，能扶站，靠站，扶走，狀態時好時壞，雙手舉起困難。

### 用藥情況

【0109】 靜脈注射；劑量：50mg-100mg每次；頻率：每隔1天一次或每隔3天一次；2周為一個療程，每個療程間隔3-4周，共治療8個療程。

### 藥效情況

【0110】 HFMSE評分：用藥前為23分，第1個療程用藥後為24分。患者第1個療程和第2個療程之間間隔了大約兩個月。第2個療程治療前為23分，治療後為24分。第8個療程治療後評分為28分。

【0111】 運動功能：用藥前患者不能將手舉過頭頂。治療兩個療程後，患者實現無輔助站立和輔助行走，並且能夠將手舉過頭頂。經過持續用藥，患者的運動功能進一步改善，獨坐、扶站、扶走平穩且時間逐漸延長。

【0112】 肌電圖：治療後雙側正中神經、脛神經、腓總神經、尺神經的動作電位波幅均有不同程度增加（圖3）。

【0113】 此外，治療過程中未見藥物相關的副作用。

【0114】 以上結果說明纖維溶酶原可提高II型SMA患者HFMSE評分，改善患者運動功能，改善神經肌肉功能。

### 實施例4 II型SMA患者

【0115】 患者，男，43個月。12個月大時檢查肌電圖顯示神經元損害，14個月大做基因檢測確診為II型SMA。到24個月大時已經退化到不能獨坐，只能靠坐。29個月開始吃沙丁胺醇、甲鈷胺、輔酶q10，運動功能逐漸輕微改善。36個月開始用間充質幹細胞治療，共靜脈注射過5針間充質幹細胞，注射間充質幹

細胞後患者整體狀態有明顯進步，精神狀態好轉，不容易累，不容易生病，但是仍然不能站立。38個月時穴位注射鼠神經生長因子，未見明顯效果。

#### 用藥情況

【0116】 第一次：靜脈注射，50mg；第二次：靜脈注射，50mg；第三次：靜脈注射，100mg；第四次：靜脈注射，150mg，每次間隔3天，用藥2周。

#### 藥效情況

【0117】 患者用藥後右臂功能有所改善，不需借助左手力量可以自行抬起90度，但HFMSE評分沒有提高。治療過程中未見藥物相關的副作用。

### 實施例5 II型SMA患者

【0118】 患者，男，26個月。10個月時，基因檢測確定為SMA，SMN2（運動神經元存活基因2）拷貝數是3。12個月時，失去翻身能力，胳膊無力支撐身體，只能完全趴在床上，手指不能自主用力。13個月時，開始注射臍帶間充質幹細胞，注射幹細胞後，腿部力量增大，呼吸有所改善，睡眠品質有所提高。16個月時，開始服用中藥。在間充質幹細胞、中藥和康復訓練綜合治療後，患者能獨坐並自己掌握平衡，但不能左右轉身或左右撿玩具。能自主連續翻身。腿部力量增加明顯，呼吸有所改善，聲音變大，漏斗胸改善明顯，肋骨外翻跡象好轉，胳膊和手的力量有所增加，但還不能抓著大人的手被拽起來。胳膊抬高有所退化，之前胳膊能自己抬高到頭頂位置，但在下述治療時只能到臉部位位置。

#### 用藥情況

【0119】 靜脈注射兩周，隔天1次，第一周用藥4次，劑量分別為10mg，20mg，30mg，40mg；第二周用藥4次，劑量分別為50mg，50mg，100mg，100mg。

#### 藥效情況

【0120】 第一周第二次用藥後，小腿和腳踝力量有所增強。兩周用藥結束9天後，手和胳膊力量增加，手抓物品力量增加50%。且治療過程中未見藥物相關的副作用。

【0121】 以上結果說明纖維溶酶原可改善II型SMA患者運動功能。

### 實施例6 I型SMA患者

【0122】 患者，男，11月齡，6個月時基因檢測確診為I型SMA；醫生確診時告知此類病患者生存週期平均在2周歲，家屬未採取任何治療措施。症狀：

頭支撐無力；上肢雙臂無力、無法抬起，雙手擺動少、抓握無力、中指無力；下肢無力、擺動少，腳趾可動；無法獨坐，不可自主翻身，吮吸力小、吞咽困難，全天24小時進行血氧監測，血氧飽和度為92-97%，呼吸時胸部起伏弱。

#### 用藥方法

【0123】 霧化吸入（2-3次/天）+靜脈推注（3天一次），治療週期為十個療程（2周為1個療程）。每個療程間隔2周。霧化吸入劑量為5-10mg，靜脈注射劑量為50-200mg。

【0124】 以CHOP INTEND評分表（費城兒童醫院嬰兒神經肌肉疾病測試量表）評估該 I 型SMA患者運動功能改善情況，評分高說明運動功能越好[8]。

#### 治療效果

【0125】 生存狀態：患者接受10個療程治療後，患者年齡大於25個月，超過了I型SMA患者自然史研究顯示的大多數患者10個月的存活時間[9]。此外，本研究發現用藥SMA後患者精神狀態和生長發育（身高、體重、胸圍）狀況明顯好轉，且相較於同年齡未用纖維溶酶原治療的患者，用纖維溶酶原治療患者肌肉萎縮情況也明顯改善，SMA典型的胸廓塌陷體征明顯改善。此外，研究中觀察到用藥纖維溶酶原後患者睡眠狀態也明顯改善。

【0126】 CHOP INTEND評分：治療前CHOP INTEND評分為30分，用藥5個療程後評分增加到50分。由於一些原因第5個和第6個療程間間隔大約2個月，評分降至36分，第6個療程用藥後評分為44分。第6個療程和第7個療程間隔大約2個月。第7個療程用藥前為44分，用藥後為45分。第10個療程治療後，評分為46分。

【0127】 運動功能：第1個療程治療後患者可獨坐，頭部支撐約為30秒。

【0128】 第4個療程後獨坐時間延長，約為30秒。隨著治療的進行，患者的運動功能持續改善，手抓握有力，手臂可自主輕微抬起，腳活動、擺動頻率增加。

【0129】 吞咽功能：用藥後患者吃飯和飲水時嗆咳的次數減少，並且說話功能良好。

【0130】 呼吸功能：第1個療程用藥第2天患者的血氧飽和度即達到97-98%，偶爾為95-96%。用藥2個療程後，患者呼吸力量增強。10個療程後，患者已經大於25個月，在無通氣支持的條件下，患者仍保持良好的呼吸狀態。I型

SMA自然史研究顯示，在沒有通氣支援的條件下，20個月時的存活率僅有8% [10]。

【0131】 以上結果說明纖溶酶原可提高I型SMA患者CHOP INTEND評分，改善患者運動功能，可實現無輔助支撐坐立30秒和頭支撐30秒運動的里程碑式改善；還可改善患者的吞咽功能和說話能力；改善患者胸廓塌陷體徵，改善肺部功能，升高血氧飽和度；並可改善患者精神狀態和睡眠。

### 實施例7 非5q型SMA患者

【0132】 患者，女，40月齡（3歲4個月）。6個月大時發病，1.5歲（18月齡）時經基因檢測確診為非5q型SMA，因肺感染、排痰困難堵塞呼吸道導致呼吸無力，由間斷使用呼吸機後逐漸自主呼吸衰竭無法離線，使用呼吸機約1.5年。語言功能喪失，面癱，無法活動，肌力0級。症狀表現：使用呼吸機至今，每日使用排痰器、吸痰器、吸氧、霧化（每日2次），鼻飼進食。肌電圖結果顯示，雙側上下肢運動神經元嚴重損傷，未見動作電位。

#### 用藥方案

【0133】 第一療程（2周）：霧化吸入，10mg/次，3次/天，合併50-100mg靜脈注射給藥，3天一次。

【0134】 第一療程結束後月2個月進行第二療程。

【0135】 第二至第四療程（每個療程中間間隔2周）：靜脈注射，每隔2天一次，劑量為150mg-250mg。

#### 治療效果

【0136】 第一療程：雙手懸掛晃動時間增長，幅度增大，力度提高，左上臂可以在輔助托起情況下自主向內移動。下肢輔助屈膝立起持續30分鐘，面部表情增多，可眨眼，嘴可自主抽動。

【0137】 第二療程：偶爾可吞咽湯水，睡眠改善

【0138】 第三療程：排便正常，頭可左右晃動，有輔助支撐可抬頭維持幾秒。手腕略有力，指尖可循環轉動，左臂可自主晃動，幅度更大。血氧維持在97%，不再輸氧。

【0139】 第四療程：左臂協調性更好，右臂動作幅度小，但是擺動頻率快。雙下肢肌肉柔軟不僵硬，面部表情增多，可自主排便。

【0140】 通過治療發現患者的精神狀態明顯改善，呼吸能力明顯加強，

對通氣支持需求逐漸減少。

【0141】 結果表明，纖溶酶原可改善非5q型SMA患者運動功能，包括肢體運動力度、幅度、範圍增加，豐富患者的面部表情；改善患者肺部功能和呼吸功能，減少輸氧，升高血氧飽和度；改善患者的吞咽功能；改善患者睡眠品質。

【0142】 以下實施例8-15為對動物模型的用藥研究，所述纖溶酶原仍為上述從人捐贈者血漿提純的纖溶酶原蛋白。

【0143】 FVB.Cg-Grm7Tg(SMN2)89Ahmb Snn1tm1MsdTg(SMN2\*delta7)4299Ahmb/J基因突變小鼠（以下簡稱SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠）具有SMN1基因純合突變並且表達人的SMN2基因，該小鼠臨床及病理表現類似於人類SMA。種鼠於美國Jackson實驗室購買（譜系號：005025）。

#### 實施例8 纖溶酶原延長SMA模型小鼠生存時間

【0144】 SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠出生稱量體重，根據體重隨機分為溶媒組（6隻）和給藥組（5隻）。小鼠出生3天後開始給藥，溶媒組小鼠腹腔每天注射溶媒6ml/kg，給藥組小鼠按照60mg/kg腹腔每天注射給予纖溶酶原。記錄小鼠的存活情況。

【0145】 生存曲線統計結果顯示，纖溶酶原能夠明顯改善SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠生存曲線，統計差異顯著（ $P=0.029$ ）。生存時間統計結果顯示，溶媒組小鼠中位生存時間為14天，所有小鼠在第15天全部死亡；給藥組中位生存時間為16天，所有小鼠在第17天全部死亡，且統計分析差異顯著（ $P=0.03$ ）。說明纖溶酶原能夠延長SMA模型小鼠生存時間，見圖4A和4B。

#### 實施例9 纖溶酶原促進SMA模型小鼠脊髓SMN基因轉錄

【0146】 取出生3天的SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠2隻，一隻為溶媒組小鼠，每天上、下午各腹腔注射一次給予6  $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml）；一隻為給藥組小鼠，按照30 $\mu$ g/6 $\mu$ l每天上、下午各腹腔注射一次給予纖溶酶原；取野生型（FVB）小鼠一隻做為空白對照組，每天上、下午各腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml）。連續用藥9天。犧牲後取材脊髓，進行所有SMN基因轉錄產物qPCR檢測，正向引子為F: GCGGCGGCAGTGGTGGCGGC（序列15）；反向引子為R: AGTAGATCGGACAGATTTTGCT（序列16）。

【0147】 結果顯示，空白對照組小鼠脊髓具有一定的SMN基因轉錄水

平，溶媒組小鼠SMN基因轉錄水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠SMN基因轉錄水平明顯高於溶媒組小鼠和空白對照組小鼠（圖5）。該結果提示纖溶酶原能夠促進SMN基因轉錄。

#### **實施例10 纖溶酶原促進SMA模型小鼠腦NF- $\kappa$ B水平增加**

**【0148】** 取出生3天的SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠7隻，4隻為溶媒組小鼠，前9天每天上、下午各腹腔注射一次給予6  $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml），第10天開始，每天腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（10mg/ml）；3隻為給藥組小鼠，前9天按照30 $\mu$ g/6 $\mu$ l每天上、下午各腹腔注射一次給予纖溶酶原，第10天開始，每天按照60 $\mu$ g/6 $\mu$ l腹腔注射一次纖溶酶原；取野生型小鼠4隻做為空白對照組，前9天每天上、下午各腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml），第10天開始，每天腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（10mg/ml）。第12天，犧牲小鼠取材腦組織，製備腦組織勻漿，進行NF- $\kappa$ B蛋白的Western blot檢測。根據SDS-PAGE凝膠製備試劑盒（Solarbio，P1320）的配膠說明製備10%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跑膠30min，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，電轉條件為15V，2.5h。轉移後的PVDF膜浸泡在封閉液（5%脫脂乳液）中於4 $^{\circ}$ C冰箱中封閉過夜，TBST（0.01M Tris-NaCl，pH7.6緩衝液）洗4次後，加入兔抗小鼠NF- $\kappa$ B抗體（Cell Signaling Technology, 8242）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獲取每個條帶的光密度值，進行定量分析。

**【0149】** 核因子 $\kappa$ B（nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B）是一類關鍵性的核轉錄因子。NF- $\kappa$ B 家族成員主要包括RelA（p65）、c-Rel、RelB、NF- $\kappa$ B1（p50 蛋白及其前體p105）和NF- $\kappa$ B2（p52 蛋白及其前體p100），各成員可形成同源或異源二聚體而行使功能。在哺乳動物細胞中最常見的是p65與p50 結合形成p65/p50 二聚體。在未受刺激的細胞中，NF- $\kappa$ B 轉錄因子與抑制性I $\kappa$ B（Inhibitor of kappa B）蛋白結合在一起，因而被滯留在細胞質中。上游信號的刺激導致I $\kappa$ B 蛋白在IKK（I $\kappa$ B kinase）的作用下被磷酸化修飾，繼而被泛素連接酶複合體識

別，促使I $\kappa$ B蛋白以蛋白酶體依賴的方式被降解，NF- $\kappa$ B從而被釋放出來，進入細胞核並啟動靶基因的表達[11]。在幾乎所有的動物細胞中都能發現NF- $\kappa$ B，它們參與細胞對外界刺激的回應，在細胞的炎症反應、免疫應答等過程起關鍵性作用。NF- $\kappa$ B也與突觸的可塑性、記憶有關[12]。

**【0150】** 結果顯示，空白對照組小鼠腦具有一定量的NF- $\kappa$ B蛋白，溶媒組小鼠腦NF- $\kappa$ B蛋白水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠腦NF- $\kappa$ B蛋白水平明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異接近顯著（ $P=0.05$ ）（圖6）。該結果提示纖溶酶原能夠促進SMN  $\Delta$  7 SMA小鼠腦組織NF- $\kappa$ B蛋白水平增加。

#### **實施例11 纖溶酶原促進SMA模型小鼠肌肉NF- $\kappa$ B水平增加**

**【0151】** 從上述實施例10的犧牲小鼠取材肌肉，按照上述實施例10所述方法進行NF- $\kappa$ B蛋白的Western blot檢測。

**【0152】** 結果顯示，空白對照組小鼠肌肉具有一定量的NF- $\kappa$ B蛋白，溶媒組小鼠肌肉NF- $\kappa$ B蛋白水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠肌肉NF- $\kappa$ B蛋白水平明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異顯著（\*表示 $P<0.05$ ）（圖7）。該結果提示纖溶酶原能夠促進SMN  $\Delta$  7 SMA小鼠肌肉NF- $\kappa$ B蛋白水平增加。

#### **實施例12 纖溶酶原促進SMA模型小鼠腦組織SMN蛋白水平增加**

**【0153】** 取出生3天的SMN  $\Delta$  7 SMA小鼠2隻，1隻為溶媒組小鼠，每天上、下午各腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml）；1隻為給藥組小鼠，按照30 $\mu$ g/6 $\mu$ l每天上、下午各腹腔注射一次給予纖溶酶原；取野生型（FVB）小鼠2隻做為空白對照組，每天上、下午各腹腔注射一次給予6 $\mu$ l牛血清白蛋白溶液（5mg/ml）。用藥9天後，犧牲小鼠取材腦組織，製備腦組織勻漿，進行SMN蛋白的Western blot檢測。根據SDS-PAGE凝膠配膠說明製備12%凝膠。各組樣品分別與4 $\times$ 上樣緩衝液（TaKaRa, c2139）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跑膠30min，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，電轉條件為15V，2.5h。轉移後的PVDF膜浸泡在封閉液（5%脫脂乳液）中於4 $^{\circ}$ C冰箱中封閉過夜，TBST（0.01M Tris-NaCl, pH7.6緩衝液）洗4次後，加入兔抗小鼠SMN抗體（Proteintech, 11708-1-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軟體獲取每個條帶的光密度值，進行定量分析。

【0154】 結果顯示，空白對照組小鼠腦表達一定量的SMN蛋白，溶媒組小鼠SMN蛋白表達水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠SMN蛋白表達水平明顯高於溶媒組小鼠（圖8）。該結果提示纖溶酶原能夠促進SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠腦SMN蛋白表達。

### 實施例13 纖溶酶原促進SMA模型小鼠肌肉SMN蛋白水平增加

【0155】 從實施例12所述犧牲小鼠取材後肢肌肉組織，製備組織勻漿，進行SMN蛋白的Western blot檢測，檢測方法如實施例12所述。

【0156】 結果顯示，空白對照組小鼠肌肉表達一定量的SMN蛋白，溶媒組小鼠肌肉SMN蛋白表達水平低於空白對照組小鼠，給藥組小鼠肌肉SMN蛋白表達水平明顯高於溶媒組小鼠（圖9）。該結果提示纖溶酶原能夠促進SMN $\Delta$ 7 SMA小鼠肌肉SMN蛋白表達。

### 實施例14 纖溶酶原促進SMA模型小鼠腦組織成熟NGF形成

【0157】 從實施例12的犧牲小鼠取材腦組織，製備組織勻漿，進行NGF蛋白的Western blot檢測。根據SDS-PAGE凝膠配膠說明製備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30min，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，電轉條件為15V，2.5h。轉移後的PVDF膜浸泡在封閉液（5%脫脂乳液）中於4 $^{\circ}$ C冰箱中封閉過夜，TBST（0.01M Tris-NaCl, pH7.6緩衝液）洗4次後，加入兔抗小鼠NGF抗體室溫孵育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軟體獲取每個條帶的光密度值進行定量分析。

【0158】 神經生長因子（Nerve growth factor, NGF）是神經營養因子家族中的重要成員。在體內以前體形式合成，包括信號肽、前導肽和成熟肽。研究報導神經生長因子NGF前體（ProNGF）與其裂解形成NGF發揮相反的作用。ProNGF能夠促進神經細胞凋亡。成熟的NGF參與調節神經細胞的生長、發育、分化、生存和損傷後再修復等過程，對中樞及周圍神經元功能性表達也有重要

調控作用[12]。NGF/ProNGF比值=NGF光密度(OD)/ProNGF光密度(OD)值。

【0159】 結果顯示，空白對照組小鼠腦組織具有一定NGF/ProNGF比值，

【0160】 給藥組小鼠腦組織NGF/ProNGF比值明顯高於溶媒組小鼠，且統計差異極為顯著 (\*\*\*)表示 $P<0.001$ ) (圖10)。提示纖溶酶原能夠促進SMA模型小鼠ProNGF轉化形成NGF，促進成熟NGF的形成。

#### 實施例15 纖溶酶原改善SMA模型小鼠肺組織損傷

【0161】 從實施例12的犧牲小鼠取材肺組織，在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的肺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5 $\mu$ m，切片脫蠟復水並用蘇木素和伊紅染色(H&E染色)，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，並酒精梯度脫水封片，切片在顯微鏡下200倍下觀察。

【0162】 結果顯示，空白對照組小鼠肺組織終末細支氣管上皮細胞排列整齊，清晰可辨；肺泡腔大小均勻，肺泡間隔未見增厚，血管周圍未見炎細胞浸潤；溶媒組小鼠肺組織呼吸性細支氣管上皮脫落，肺泡管、肺泡囊擴大，肺泡隔增寬，肺泡塌陷至結構紊亂，肺血管周圍伴嗜酸性粒細胞、泡沫細胞、淋巴細胞；給藥組小鼠肺組織呼吸性細支氣管上皮排列有序，肺泡管、肺泡囊擴大，肺泡腔均勻擴大，但可見由單層肺泡上皮組成的肺泡壁(圖11)。提示纖溶酶原能夠改善SMA模型小鼠肺組織損傷。

【0163】 參考文獻：

[1] KENNETH C. ROBBINS, LOUIS SUMMARIA, DAVID ELWYN et al. Further Studies on the Purification and Characterization of Human Plasminogen and Plasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240 (1) :541-550.

[2] Summaria L, Spitz F, Arzadon L et al. Isolation and characterization of the affinity chromatography forms of human Glu- and Lys-plasminogens and plasmins. *J Biol Chem*. 1976 Jun 25;251(12):3693-9.

[3] HAGAN JJ, ABLONDI FB, DE RENZO EC. Purification and biochemical properties of human plasminogen. *J Biol Chem*. 1960 Apr; 235:1005-10.

[4] Main M, Kairon H, Mercuri E, Muntoni F. The Hammersmith functional motor scale for children with spinal muscular atrophy: a scale to test ability and monitor progress in children with limited ambulation. *Eur J Paediatr Neurol*. 2003;7(4):155-9.

- [5] O'Hagen JM, Glanzman AM, McDermott MP, Ryan PA, Flickinger J, Quigley J, Riley S, Sanborn E, Irvine C, Martens WB, et al. An expanded version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III patients. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(9-10):693-7.
- [6] Mercuri E, Messina S, Battini R, Berardinelli A, Boffi P, Bono R, Bruno C, Carboni N, Cini C, Colitto F, et al. Reliability of the Hammersmith functional motor scale for spinal muscular atrophy in a multicentric study. *Neuromuscul Disord.* 2006;16(2):93-8.
- [7] Kelly JJ, Thibodeau L, Andros PA. Use of electrophysiological tests to measure disease progression in ALS therapeutic trials[J]. *Muscle Nerve*, 1990, 13(3):471.
- [8] Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, et al. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord* 2010; 20:155-161.
- [9] Sithara Ramdas, Laurent Servais. New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data. *Expert Opin Pharmacother.* 2020 Feb;21(3):307-315.
- [10] Linda P. Lowes, Lindsay N. Alfano, W. David et al. Impact of Age and Motor Function in a Phase 1/2A Study of Infants with SMA Type 1 Receiving Single-Dose Gene Replacement Therapy. *Pediatr Neurol.* 2019 Sep; 98:39-45.
- [11] Lenardo M J, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control[J]. *Cell*, 1989, 58(2):227-229.
- [12] Aloe L, Rocco M L, Bianchi P, et al. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10(1).

【符號說明】

【0164】

無

## 序列表

<110> 大陸商深圳瑞健生命科學研究院有限公司

<120> 一種治療脊髓性肌萎縮症的方法和藥物

<130> FD00294TW

<150> PCT/CN2020/089631

<151> 2020-05-11

<160> 16

<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 gaataccag ggggcttcac tgtcagtgt cactaagaag    60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc    120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac    180
aggaagtctt ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tattgaaaa gaaagtgtat    240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaa aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa    300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctccc acagacctag attctcacct    360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg    420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagal atgactactg cgacattctt    480
gagtgtgaag aggaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacggcaa aattccaag    540
accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gccacacgc tcatggatac    600
atfcctcca aattccaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa cccgatagg    660
gagctgcggc ctgggtgttt caccaccgac cccaacaagc gctgggaact ttgtgacatc    720
ccccgtgca caacacctcc accatcttct ggtcccact accagtgtct gaagggaaca    780
ggtgaaaact atcgcgggaa tgggctgtt accgtgtccg ggcacacctg tcagcactgg    840
agtgcacaga cccctcacac acataacagg acaccagaaa actcccctg caaaaatttg    900
gatgaaaact actccgcaa tctgacgga aaaagggcc catggtgcca tacaaccaac    960

```

## 序列表

agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata cgcctctgtg actcctcccc agtatccacg 1020  
 gaacaattgg ctcccacagc accacctgag ctaaccctg tggccagga ctgctacat 1080  
 ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag 1140  
 tcttggatcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacc cagaaaacta cccaatgct 1200  
 ggctgacaaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgttttacc 1260  
 acagacccca gcgtcaggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg 1320  
 agtgtgtag cacctccgcc tgtgtcctg cttccagatg tagagactcc ttccgaagaa 1380  
 gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440  
 acgccatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcattt cactccagag 1500  
 acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaat tactgccgta acctgatgg tgatgtaggt 1560  
 ggtccctggt gctacacgac aaatcaaga aaactttacg actactgtga tgcctcag 1620  
 tgtgcggccc ctccattga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgcctgga 1680  
 agggtttag gggggtgtgt ggcccacca catcctggc cctggcaagt cagcttaga 1740  
 acaaggttg gaatgcactt ctgtggagc acctgatat cccagagtg ggtgttact 1800  
 gctgccact gcttgagaa gtcccaagg ccttcactc acaaggatc cctgggtgca 1860  
 caccaagaag tgaatctga accgatgtt caggaaatag aagtgttag gctgttctg 1920  
 gagccacac gaaaagatat tgccttgta aagctaagca gtcctgccg catcactgac 1980  
 aaagtaatcc cagctgtct gccatccca aattatgtg tcgtgaccg gaccgaatg 2040  
 ttcactcctg gctggggaga aaccaaggt actttggag ctggccttct caaggaagcc 2100  
 cagctccctg tgattgagaa taaagtgtc aatcgctatg agtttctgaa tgaagagtc 2160  
 caatccaccg aactctgtc tgggcattg gccggaggca ctgacagtg ccagggtgac 2220  
 agtggaggtc ctctggttg cttcagaag gacaaataca tttacaagg agtcacttct 2280  
 tggggtctg gctgtgcacg cccaataag cctgggtgtct atgttcgtt tcaaggtt 2340  
 gttactgga ttgaggagat gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2  
 <211> 791  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

## 序列表

<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> 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

## 序列表

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

## 序列表

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

## 序列表

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 aggaagtgggt tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag   60

cctctggatg actatgtgaa taccagggg gcttactgt tcaagtgcac taagaagcag   120

ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaaatgtg aggaggacga agaattcacc   180

tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg   240

## 序列表

aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagtttat ttgaaaagaa agtgtatctc	300
tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtccaa aacaaaaaat	360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctcccaca gacctagatt ctcaactgct	420
acacaccct cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagacaa cgatccgcag	480
gggccctggt gctatactac tgatccagaa aagagatatg actactgca cattctgag	540
tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc	600
atgtctggac tggaatcca ggccctggac tctcagagcc cacacgctca tggatacatt	660
ccttccaaat ttccaacaa gaacctgaag aagaattact gtcgtaacc cgatagggag	720
ctgcggcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgt gggaacttg tgacatccc	780
cgctgcacaa cacctccacc atctctggt cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt	840
gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gtgtccggc acacctgtca gcaactggagt	900
gcacagacc ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttggat	960
gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc	1020
caagtgcggg gggagtactg taagataccg tctgtgact cctcccagc atccacggaa	1080
caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt	1140
gatggacaga gctaccgagg cacatctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct	1200
tggtcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagaccccag aaaactaccc aaatgctggc	1260
ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctggtg tttaccaca	1320
gaccccagcg tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaat gctcaggaac agaagcgagt	1380
gttgtagcac ctccgcctgt tgcctgctt ccagatgtag agactcctc cgaagaagac	1440
tgtatgttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg	1500
ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttac tccagagaca	1560
aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga ttaggtggt	1620
ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctftacgact actgtgatgt cctcagtgt	1680
gcggccctt catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcttgaagg	1740
gltgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggccct ggcaagttag tcttagaaca	1800
aggtttgaa tgcacttctg tggaggcacc ttgataccc cagagtgggt gttgactgct	1860

## 序列表

gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatacctaca aggtcatcct ggtgacac 1920  
 caagaagtga atctgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gtcttgag 1980  
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgcat cactgacaaa 2040  
 gtaatccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtgctg ctgaccggac cgaatgttc 2100  
 atcactggct ggggagaaac ccaaggctact ttggagctg gccttctca ggaagcccag 2160  
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtcaa 2220  
 tccaccgaac tctgtctgg gcattggcc ggaggcactg acagtgcca gggtgacagt 2280  
 ggaggtcctc tggttgctt cgagaaggac aaatacatt tacaaggagt cacttctgg 2340  
 ggtctggct gtgcacccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggttgg 2400  
 acttgattg agggagtgat gagaaataat taa 2433

<210> 4  
 <211> 810  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 含有信號肽的天然纖維溶酶原(來源於swiss prot)的胺基酸序列  
 <400> 4

Met Glu His Lys Glu Val Val 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

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

## 序列表

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

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

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

## 序列表

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

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

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

## 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

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

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

## 序列表

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  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LYS77-PLG(Lys-纖維溶酶原)核酸序列

<400> 5  
 aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc 60  
 aaaacaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagtcca ctctcccca cagacctaga 120  
 ttctcacctg ctacacaccc ctcagaggga 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 ttcttcaa atttcaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac 420  
 cccgataggg agctgcggcc ttggtgttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt 480  
 tgtgacatcc ccgctgcac aacacctcca ccatcttctg gtcccaccta ccagtgtctg 540  
 aagggaacag gtgaaaacta tcgcgggaat gtggctgtta ccgtgtccgg gcacacctgt 600  
 cagcactgga gtgcacagac cctcacaca cataacagga caccagaaa ctcccctgc 660  
 aaaaatttg atgaaaacta ctgccgaat cctgacggaa aaaggcccc atggtgcat 720  
 acaaccaaca gccaaagtgc gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctctcccca 780  
 gtatccacgg aacaattggc tcccacagca ccacctgagc taaccctgt ggtccaggac 840  
 tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacagaaaag 900  
 aagtgtcagt ctggtcatc tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac 960

## 序列表

ccaaatgctg gcctgacaat gaactactgc aggaatccag atgccgataa aggcccttgg 1020  
 tgtttacca cagaccccag cgtcaggtgg gagtactgca acctgaaaaa atgctcagga 1080  
 acagaagcga gtgtttagc acctccgctt gttgtcctgc ttccagatgt agagactcct 1140  
 tccgaagaag actgtatgtt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 1200  
 gttactggga cgccatgcca ggactgggct gccaggagc cccatagaca cagcatttcc 1260  
 actccagaga caaatccacg ggcggtctg gaaaaaaft actgccgtaa ccctgatggt 1320  
 gatgtaggtg gtcctggtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 1380  
 gtccctcagt gtgcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa 1440  
 tgtcctggaa gggtttagg ggggtgtgtg gccaccac attcctggcc ctggcaagtc 1500  
 agtcttagaa caaggttgg aatgcacttc tgtggaggca ccttgatgc cccagagtgg 1560  
 gtgtgactg ctgcccactg ctgggagaag tcccaaggc ctcatccta caaggtcatc 1620  
 ctgggtgcac accaagaagt gaatctgaa ccgcatgtc aggaaataga agtgtctagg 1680  
 ctgttctgg agccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgccgtc 1740  
 atcactgaca aagtaatccc agcttctg ccatcccaa attatgtgtt cgctgaccgg 1800  
 accgaatgtt tcactactgg ctggggagaa accaaggtta ctttggagc tggccttctc 1860  
 aaggaaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920  
 ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccggaggcac tgacagttgc 1980  
 cagggtgaca gtggagggtc tctggttgc ttcgagaagg acaatacat ttacaagga 2040  
 gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctgggtgcta tgttctgtt 2100  
 tcaaggittg ttacttgat tgaggagtg atgagaaata attaa 2145

<210> 6  
 <211> 714  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> LYS77-PLG(Lys-纖維溶酶原)胺基酸序列

<400> 6

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg  
 1           5           10           15

## 序列表

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser  
 20 25 30

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

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

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His  
 225 230 235 240

## 序列表

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

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

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

## 序列表

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  
 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  
 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

## 序列表

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

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 gaataccag ggggcttcac tgtcagtgt cactaagaag 60  
 cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc 120  
 acctgcaggg cattccaata tcacagtaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180  
 aggaagtctt ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tattgaaaa gaaagtgtat 240  
 ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa 300  
 aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctccc acagacctag attctcacct 360  
 gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg 420  
 caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480  
 gagtgtgaag aggcggcccc ttcattgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa 540  
 tgtcctggaa ggggtgtagg ggggtgtgtg gccaccac attcctggcc ctggcaagtc 600  
 agtcttagaa caaggttgg aatgcactt tgtggaggca cctgatata ccagagtgg 660  
 gtgttgactg ctgccactg ctggagaag tcccaaggc ctctccta caagtcac 720  
 ctgggtgcac accaagaagt gaatctgaa ccgatgttc aggaaataga agtgtctagg 780  
 ctgttctgg agccacacg aaaagatatt gcctgctaa agctaagcag tcctgccgtc 840  
 atcactgaca aagtaatccc agctgtctg ccatcccaa attatgtgt cgctgaccgg 900  
 accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa acccaaggta ctttggagc tggccttctc 960  
 aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1020

## 序列表

ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg cgggaggcac 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-纖維溶酶原)胺基酸序列

<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

## 序列表

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

## 序列表

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  
 gcacagtgagg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgtttagca 60  
 cctccgcctg ttgtcctgct tccagatgta gagactcctt ccgaagaaga ctgtatgttt 120  
 gggaatggga aaggataccg aggcaagagg gcgaccactg ttactgggac gccatgccag 180  
 gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcattttca ctccagagac aaatccacgg 240  
 gcgggtctgg aaaaaaatta ctgccgtaac cctgatggtg atgtaggtgg tcctggtgc 300  
 tacacgacaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tcctcagtg tgcggcccct 360  
 tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtctggaag ggtttaggg 420  
 ggggtgtggg cccaccaca ttctggccc tggcaagtca gtcttagaac aaggtttgga 480  
 atgcacttct gtggaggcac ctfgatatcc ccagagtggg tgttgactgc tgcccactgc 540  
 ttggagaagt cccaaggcc ttatcctac aaggtcatcc tgggtgcaca ccaagaagtg 600  
 aatctcgaac cgcattgtca ggaaatagaa gtgtctaggc tgttcttga gccacacga 660  
 aaagatattg ccttgctaaa gtaagcagt cctgccgta tcaactgaaa agtaatccca 720  
 gcttctctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgftt catcactggc 780  
 tggggagaaa cccaaggtac ttttgagct ggccttctca aggaagccca gctccctgtg 840  
 attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa 900  
 ctctgtgctg ggcatttggc cggaggcact gacagttgcc aggggtgacag tggaggctct 960  
 ctggtttgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcaactcttg gggctttggc 1020

## 序列表

tgtgcacgcc ccaataagcc tgggtctat gttcgtgttt caaggittgt tacttggatt 1080

gagggagtga tgagaaataa ttaa 1104

<210> 10  
 <211> 367  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Mini-plg(小纖維蛋白溶酶原)胺基酸序列

<400> 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

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

His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly  
 145 150 155 160

## 序列表

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

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

## 序列表

<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  
 gcccttcat ttgattgtgg gaagcctcaa gtggagccga agaatgtcc tggaaagggt 60  
 gtaggggggt gtgtggccca cccacattcc tggccctggc aagtcagtct tagaacaagg 120  
 tttggaatgc acttctgtgg aggcaccttg atatccccag agtgggtgtt gactgctgcc 180  
 cactgcttg agaagtcccc aaggccttca tctacaagg tcactctggg tgcacaccaa 240  
 gaagtgaatc tcgaaccgca tgttcaggaa atagaagtgt ctaggctgtt ctggagccc 300  
 acacgaaaag atattgcctt gctaaagcta agcagtcctg ccgtcatcac tgacaaagta 360  
 atcccagctt gtctgccatc cccaaattat gtggtcgtg accggaccga atgttcatc 420  
 actggctggg gagaaaccca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480  
 cctgtgattg agaataaagt gtcaatcgc tatgagttc tgaatggaag agtccaatcc 540  
 accgaactct gtctgggca ttggccgga ggcactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600  
 ggtcctctgg ttgcttga gaaggacaaa tacattttac aaggagtcac ttcttggggt 660  
 ctggctgtg cagccccaa taagcctggt gtctatgtc gtgttcaag gttgttact 720  
 tggattgagg gagtgatgag aaataattaa 750

<210> 12  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Micro-plg(微纖維蛋白溶酶原)胺基酸序列

<400> 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

## 序列表

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

## 序列表

<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 絲胺酸蛋白酶(結構)域的核酸序列

<400> 13  
 gttgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggcct ggcaagtcag tctagaaca 60  
 aggtttgaa tgcaactctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 120  
 gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatictaca aggtatcct ggggtcacac 180  
 caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gticttgag 240  
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300  
 gtaatccag cttgtctgcc atcccctaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgttc 360  
 atcactggct ggggagaaac ccaaggctact ttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420  
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctaatgg aagagtcaa 480  
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttgccc ggaggcactg acagttgcca ggtgacagt 540  
 ggaggtcctc tggtttctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttg 600  
 ggtcttgct gtgcacgcc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggtttgt 660  
 acttgattg agggagtgat gaga 684

<210> 14  
<211> 228  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 絲胺酸蛋白酶(結構)域的胺基酸序列

<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

## 序列表

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  
 Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu  
                   210                    215                    220  
 Gly Val Met Arg  
 225

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 正向引子

序列表

<400> 15  
gcggcggcag tggcggcggc 20

<210> 16  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 反向引子

<400> 16  
agtagatcgg acagatttg ct 22

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療脊髓性肌萎縮症（SMA）的方法，包括給藥患脊髓性肌萎縮症（SMA）的受試者治療有效量的纖溶酶原途徑激活劑。

【請求項2】如請求項1的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑促進SMN基因的轉錄和/或表達。

【請求項3】如請求項1或2的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑改善受試者的肌力。

【請求項4】如請求項1至3中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑延長受試者生存期。

【請求項5】如請求項1至4中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑改善受試者的肌張力。

【請求項6】如請求項1至5中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑促進受試者NF- $\kappa$ B蛋白的表達。

【請求項7】如請求項1至6中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑促進受試者生長發育。

【請求項8】如請求項1至7中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑與一種或多種其它藥物或治療方法聯合施用。

【請求項9】如請求項1至8中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑通過靜脈內、肌肉內、鞘內、鼻腔吸入、霧化吸入、滴鼻液或滴眼液形式給藥。

【請求項10】如請求項1至9中任一項的方法，其中所述纖溶酶原途徑激活劑為纖溶酶原激活途徑的組分。

【請求項11】如請求項1至10中任一項的方法，所述纖溶酶原途徑激活劑為纖溶酶原。

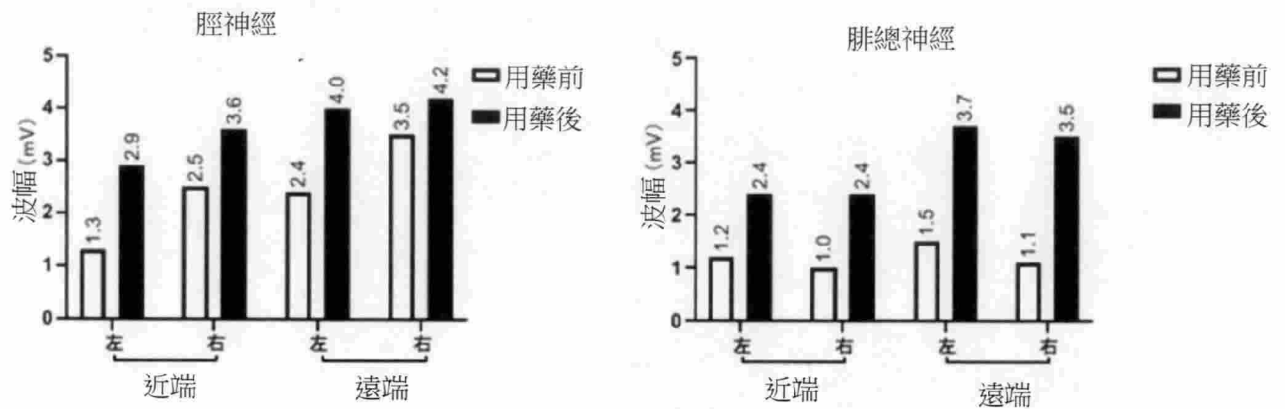
【請求項12】如請求項11的方法，其中所述纖溶酶原包含與序列2、6、8、10或12所示胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的胺基酸序列，並且具有纖溶酶原活性。

【請求項13】如請求項11的方法，所述纖維溶酶原為包含纖維溶酶原活性片段、並且具有纖維溶酶原活性的蛋白質。

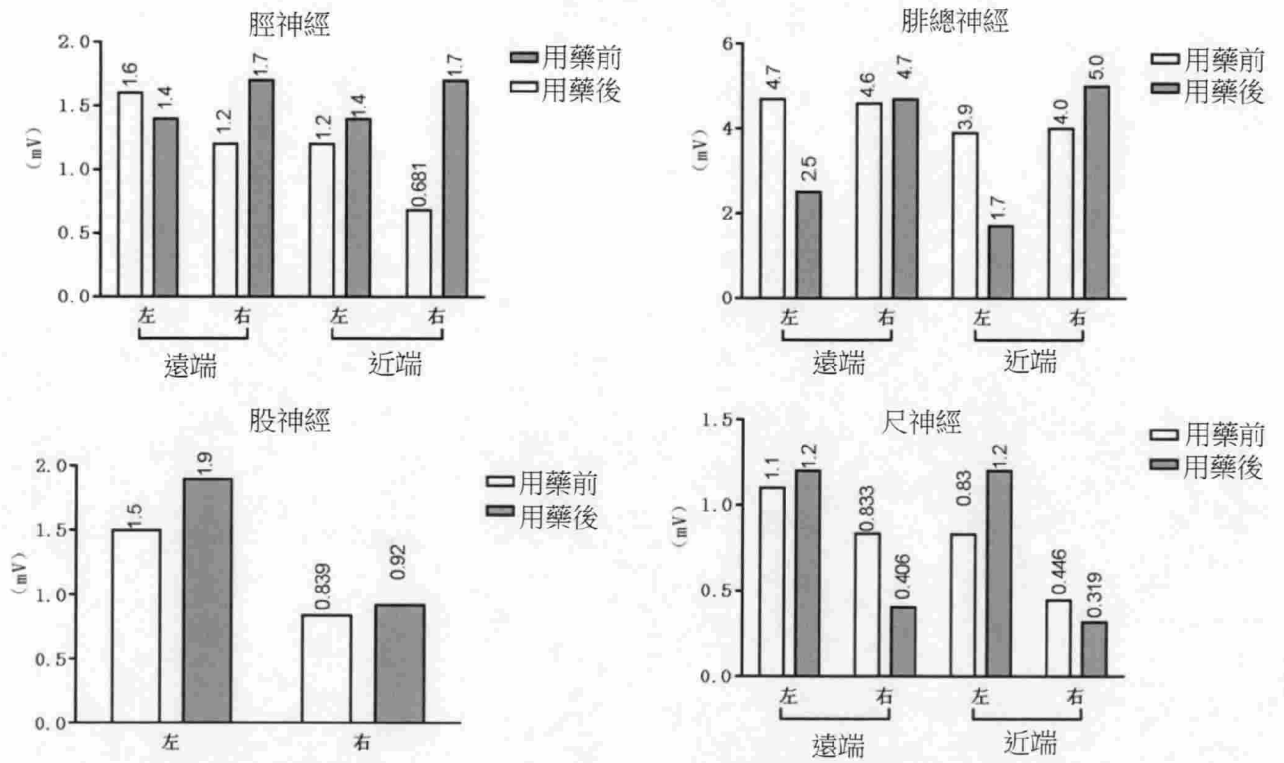
【請求項14】如請求項11的方法，所述纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原、Lys-纖維溶酶原、小纖維溶酶原、微纖維溶酶原、delta-纖維溶酶原或它們的保留纖維溶酶原活性的變體。

【請求項15】如請求項11的方法，所述纖維溶酶原包含序列2、6、8、10或12所示胺基酸序列。

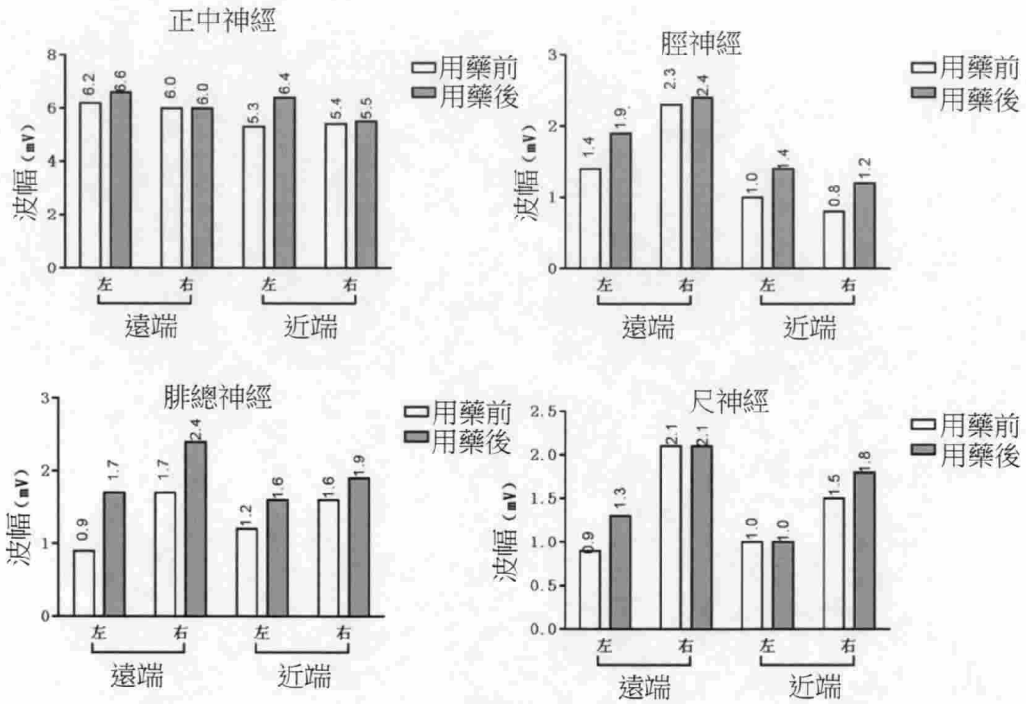
【發明圖式】



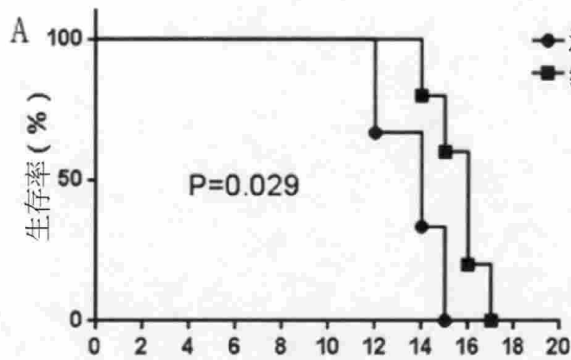
【圖 1】



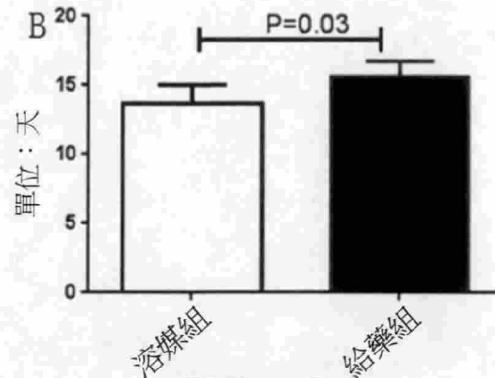
【圖 2】



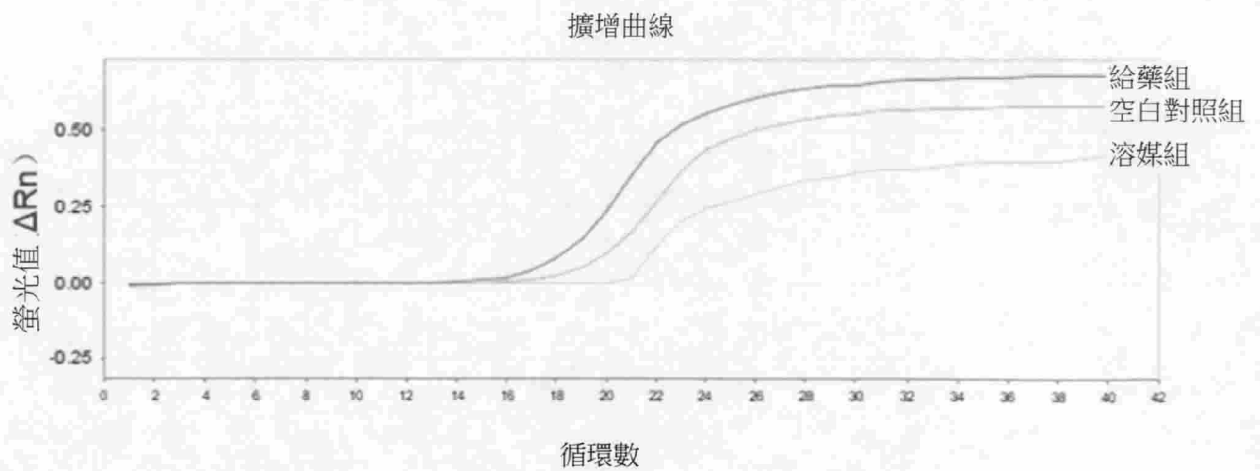
【圖 3】



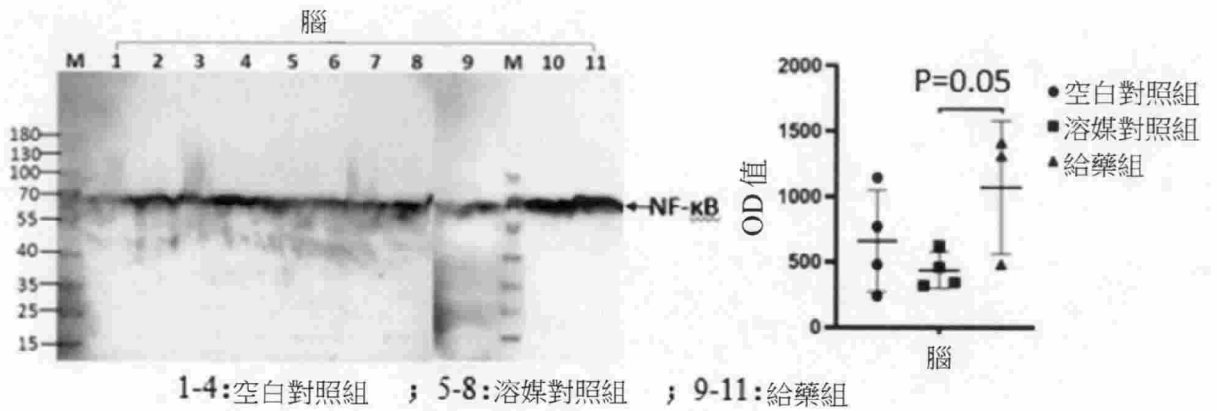
【圖 4A】



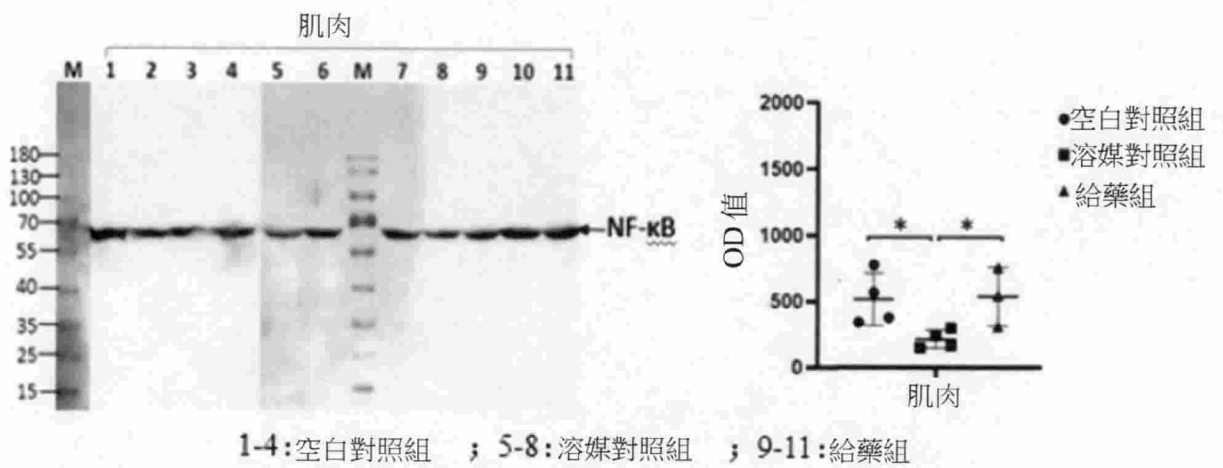
【圖 4B】



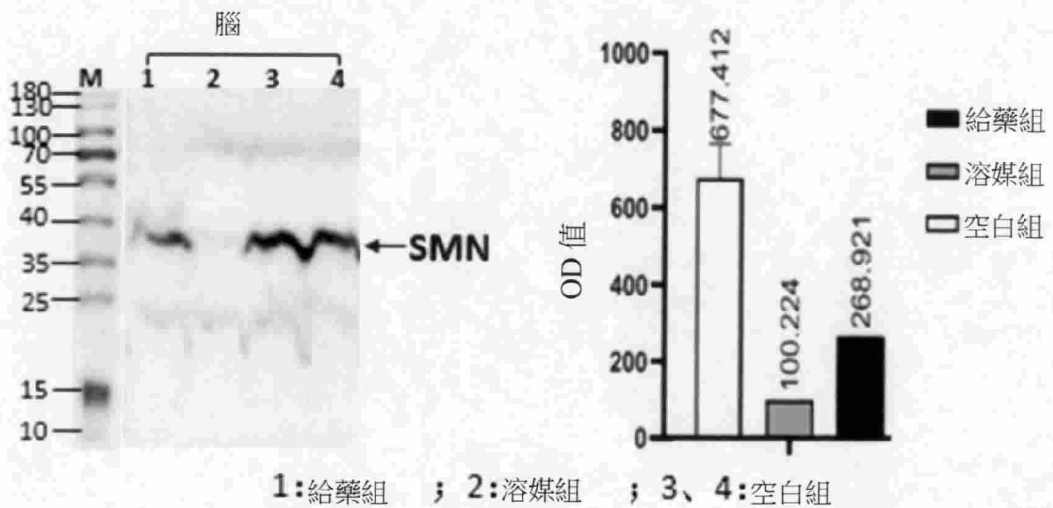
【圖 5】



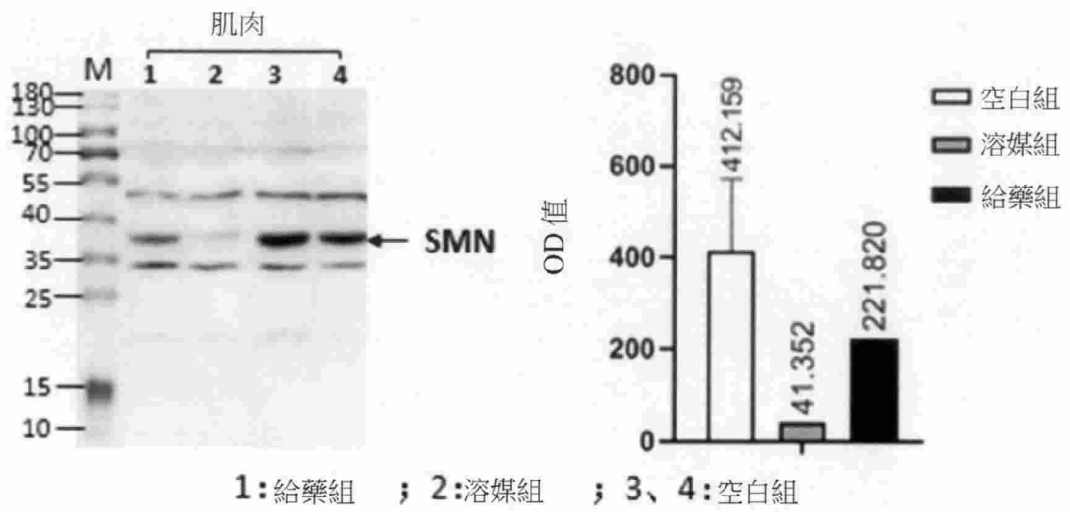
【圖 6】



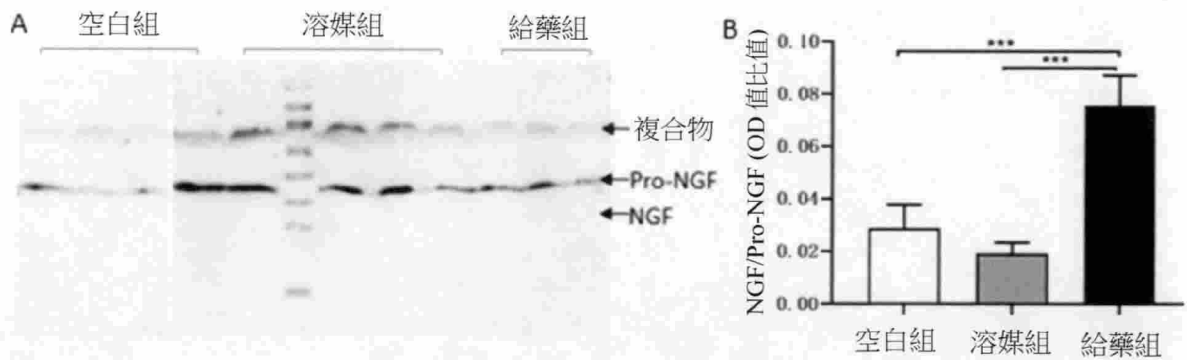
【圖 7】



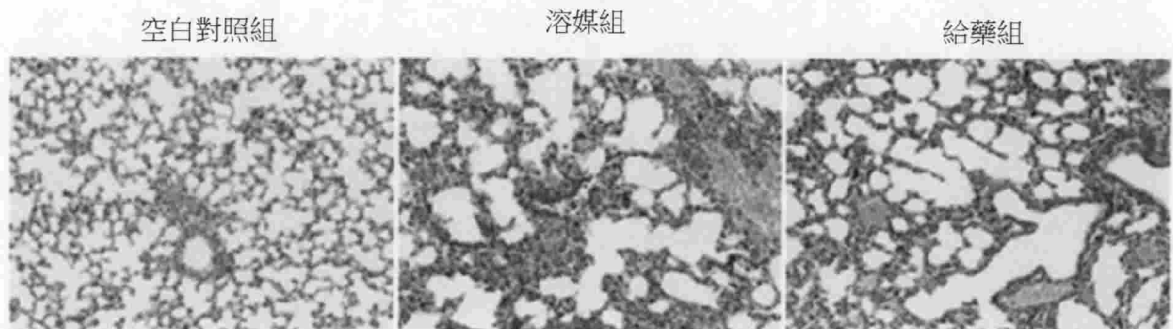
【圖 8】



【圖 9】



【圖 10】



【圖 11】