

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2018 年 6 月 21 日 (21.06.2018)

(10) 国际公布号
WO 2018/107686 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/48 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089045

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

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2016/110168
2016 年 12 月 15 日 (15.12.2016) CN
PCT/CN2016/110172
2016 年 12 月 15 日 (15.12.2016) CN

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(71) 申请人: 深圳瑞健生命科学研究院有限公司(TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES, CO. LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市罗湖区田贝三路12号510室, Guangdong 518020 (CN)。

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

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所(BEIJING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路17号富海国际港1902室, Beijing 100081 (CN)。

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

(54) Title: METHOD FOR TREATING ATHEROSCLEROSIS AND COMPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 一种治疗动脉粥样硬化及其并发症的方法

(57) Abstract: A method for treating atherosclerosis and related diseases thereof of a subject, comprising administering a preventively and/or therapeutically effective amount of plasminogen to a subject suffering or suspected to suffer atherosclerosis and related diseases thereof. Also provided are a medicine, pharmaceutical composition, product, and kit comprising plasminogen and used for treating atherosclerosis and related diseases thereof of a subject.

(57) 摘要: 用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的方法, 包括给药受试者预防和/或治疗有效量的纤溶酶原, 所述受试者患有或怀疑患有动脉粥样硬化及其相关病症。以及用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。



WO 2018/107686 A1

一种治疗动脉粥样硬化及其并发症的方法

技术领域

- 5 本发明涉及纤溶酶原在预防和/或治疗动脉粥样硬化及其相关病症方面的作用,进而为预防和/或治疗动脉粥样硬化及其相关病症提供全新的治疗策略。

背景技术

- 10 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病、脑梗死、外周血管病的主要原因。脂质代谢障碍为动脉粥样硬化的病变基础,其特点是受累动脉病变从内膜开始,一般先有脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成,进而纤维组织增生及钙质沉着,并有动脉中层的逐渐蜕变和钙化,导致动脉壁增厚变硬、血管腔狭窄。病变常累及大中肌性动脉,一旦发展到足以阻塞动脉腔,则该
- 15 动脉所供应的组织或器官将缺血或坏死。

- 动脉粥样硬化是众多心脑血管疾病共同的病理基础,也是心血管系统疾病中最常见的疾病,严重危害人类健康。动脉粥样硬化的发生发展包括脂质入侵、血小板活化、血栓形成、内膜损伤、炎症反应、氧化应激、血管平滑肌细胞(VSMC)激活、选择性基质代谢及血管重建等^[1]。虽经历了近一个世纪
- 20 的研究,很多学者也提出了关于 AS 发病机制的不同学说,如脂质渗入学说、巨噬细胞受体缺失学说、致平滑肌突变学说、损伤应答学说、炎症反应学说、血流动力学说及免疫学说等,但任何一种学说均不能单独全面的解释 AS 的发生发展。近年来,大量细胞及分子水平的实验研究资料扩展了人们对内皮细胞、VSMC、单核巨噬细胞及血小板正常自稳态的认识,从而对其在 AS
- 25 的形成和发病机制方面的作用有了进一步的认识。

1. 血管内皮细胞损伤的作用

- 研究发现,动脉粥样硬化斑块出现前很长时间血管内皮功能损伤就早已形成。Esper 等^[2]报道,内皮细胞能够产生大量具有双向功能的分子,能够使促进和抑制效应达到平衡。当内皮细胞失去维持这一细微平衡的能力时,脂
- 30 质和白细胞(主要是单核细胞和 T 淋巴细胞)就会侵入到内皮,从而引起炎症反应的发生和脂纹的形成。内皮细胞的功能障碍、活化及形态学损伤,可引

发血液中的单核细胞、血小板及血管壁中膜 VSMC 的变化而最终形成 AS。其具体机制如下：(1)内皮细胞的通透性增加是 AS 的主要的起始环节，是脂质进入动脉壁内皮下的最早病理变化^[3]；(2)使血小板和单核细胞的黏附增加。Ott 等^[4]报道，一个功能失调的内皮细胞由于其表面的细胞黏附分子表达增加可能会促进单核细胞的黏附，从而促使含有细菌的单核细胞从循环血渗入到 AS 斑块中；(3)分泌多种生长因子，如单核细胞趋化蛋白 21(MCP21)、成纤维细胞生长因子、转化生长因子(TGF)和血小板源性生长因子(PDGF)等，从而吸引单核细胞聚集并黏附于内皮，并迁入内皮下的间隙，经其表面的清道夫受体、CD36 受体和 Fc 受体介导，大量摄取进入内膜下被氧化的脂质，形成单核细胞源性的泡沫细胞。Boos 等^[3]研究指出，内皮损伤程度在某种程度上可作为 AS 的发病指征及其严重程度的新型指标。

2. 血小板的作用

动脉内皮细胞损伤后，可促进血小板黏附到受损的内皮细胞上，从而促进 PDGF 的释放，导致肌内膜细胞不断增生，最终导致胶原合成，形成 AS 斑块。在 AS 血栓形成的最终阶段，血小板的黏附、活化和聚集可导致动脉闭塞和继发性缺血^[5]。血小板与内皮细胞、结缔组织相互作用，对局部管壁 AS 的发生有重要意义。血小板在 AS 中的作用主要表现在：(1)任何形式的内皮损伤，均能使血小板大量黏附聚集于内皮局部，激活凝血系统，引起血栓形成。(2)分泌和释放多种活性物质，如 PDGF、血小板第 4 因子、 β 血栓球蛋白等对 VSMC 及单核细胞均具有强烈的化学趋化作用，参与 VSMC 游出、增殖及修饰主动脉内膜，吸引单核细胞黏附内皮。有学者指出 PDGF 具有趋化成纤维作用和促进单核细胞增殖各自的抗原决定簇，在致 AS 过程中起重要作用。(3)静脉内皮细胞能产生一氧化氮和前列环素，并不断在肺内释放，调节血小板的功能。

3. 脂质在动脉粥样硬化发生、发展中的作用

大量研究证明，AS 的病理改变与血脂水平，特别是血浆胆固醇及三酰甘油水平密切相关^[6]。有学者提出，脂质和脂肪酸的沉积是内皮细胞功能障碍和 AS 形成过程中重要的病理机制。研究发现，与正常动脉相比，有 AS 斑块的动脉载脂蛋白 C1 和载脂蛋白 E 的蛋白和基因表达均明显升高，这可能是 AS 形成的原因而不单单是一种结果^[7]。现已得到公认的是，高脂血症在 AS 发病中的作用机制除直接引起内皮细胞损伤外，主要是使内皮细胞的

通透性增加,这与低密度脂蛋白(LDL)的氧化修饰成为氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)有关。当 ox-LDL 穿过未受损的内皮时,血浆 LDL 被运输到内皮下间隙进行氧化修饰。LDL 引起巨噬细胞的清除反应和中膜 VSMC 的增生形成粥样斑块。以上变化可最终导致动脉内膜脂纹、纤维斑块和/或粥样斑块的
5 形成。

4. 单核巨噬细胞的作用

研究表明,AS 斑块中含有包括单核细胞、单核细胞来源的巨噬细胞、ox-LDL 负载的巨噬细胞(即泡沫细胞)和 T 淋巴细胞等炎症反应细胞浸润^[8]。单核-巨噬细胞在 AS 中的作用可以概括为:(1)吞噬作用:病变早期的泡沫细胞多来源于血中的单核细胞,后者进入内皮下转变为巨噬细胞,其表面的特异性受体可与 ox-LDL 结合,从而摄入大量胆固醇,成为泡沫细胞。(2)参与炎症反应和免疫反应:上述吞噬过程能够通过向细胞外基质释放炎症反应因子而诱发特有的炎症反应。在 AS 病灶内可见 T 淋巴细胞的浸润,同时与非破裂的斑块相比,破裂的 AS 斑块的纤维帽中含有更多的巨噬细胞。(3)参与增殖反应:巨噬细胞被激活后可释放多种细胞因子和生长因子,促进中膜 VSMC 的迁移和增生。同时,巨噬细胞表达多种金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶类,使细胞外基质退化,斑块不稳定甚至有破裂的趋势^[9]。
10
15

5. VSMC 的作用

经过近些年的研究,人们认识到中膜 VSMC 增殖、游走进入内膜及基质蛋白的合成,是参与 AS 进展期病变形成的主要环节,并在 AS 和再狭窄的内膜增厚中起重要作用^[10]。AS 斑块和再狭窄的发病和进展包含血管壁细胞间的复杂的交互效应,细胞因子、炎症反应、趋化因子、生长因子从中发挥了重要作用。游走的 VSMC 经其表面的 LDL 受体介导吞噬脂质,形成 VSMC 源性泡沫细胞,参与病变的形成。同时,这些增生的内膜 VSMC 还能合成胶原蛋白、弹性蛋白和糖蛋白等,以及巨噬细胞吞噬 LDL 释放游离脂质,使病变的内膜增厚变硬,促进硬化斑块的形成。对此,人们做出很多努力来抑制上述细胞的蓄积,并在支架术后再狭窄方面取得了很大成功^[11]。
20
25

糖尿病与动脉粥样硬化关系密切,表现为糖尿病患者出现动脉粥样硬化的时间早、程度重和预后差,而动脉粥样硬化又是糖尿病患者的主要死亡原因。
30

临床发现糖尿病患者的冠状动脉血管病理改变的特点主要是病变累及

的血管较多、冠状动脉狭窄严重，病变更加弥漫严重，其机制多认为是血糖代谢异常引起动脉粥样硬化，随着更进一步深入的研究，更多的结果表明，糖尿病引起动脉粥样硬化并非单一因素所致，而是通过多种途径以及较为复杂的机制来诱发和促进动脉粥样硬化的发生及发展，例如巨噬细胞极化、巨噬细胞移动抑制因子途径、糖基化终产物途径、清道夫受体上调、胰岛素抵抗、泛素-蛋白酶体系统（ubiquitin proteasome system, UPS）激活、血小板源性生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）激活途径等^[12]。

在 2 型糖尿病患者体内白色脂肪等组织中，存在巨噬细胞极化失衡，表现为 M1 型巨噬细胞增多。M1 型巨噬细胞主要分泌 TNF- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白 1 等，发挥促炎作用，上述细胞因子不仅诱导胰岛素抵抗的发生而且促进动脉粥样硬化^[13]。

巨噬细胞移动抑制因子（macrophagemigration inhibitory factor, MIF）是一种重要的参与免疫和炎症反应的因子。在糖尿病患者中，MIF 的表达增加，可能与糖尿病合并动脉粥样硬化有关^[14]。其引起动脉粥样硬化机制如下：

（1）MIF 使巨噬细胞在炎症部位浸润、活化，加速脂质的吞噬，诱导泡沫细胞的产生。有研究发现，巨噬细胞摄取氧化低密度脂蛋白使 MIF 上调，相应的 MIF 可以增加氧化低密度脂蛋白的摄取，促进泡沫细胞形成。（2）MIF 可以活化血管内皮细胞及平滑肌细胞，使其分别表达单核细胞趋化蛋白 1 和细胞间黏附分子 1，使单核巨噬细胞趋化迁移增加，从而加速动脉粥样硬化。在各种动脉模型中使用 MIF 抗体，可以使内皮下巨噬细胞、泡沫细胞、巨噬细胞活化的标志物减弱。

糖尿病患者中，糖基化终产物（advanced glycation end products, AGEs）与可以促进动脉粥样硬化病变的发生及进展。AGEs 动脉壁内葡萄糖与蛋白质和脂蛋白的非酶糖基化反应产物，其与相应受体结合后通过如下机制加速动脉粥样硬化：（1）长期高血糖可使 AGEs 产生增加，AGEs 可以修饰蛋白质、核酸和脂质，使活性氧簇产生增加，增强氧化应激，AGEs 在通过增加中性粒细胞氧自由基的产生的同时能够增加中性粒细胞 NADPH 氧化酶活性，促进血管氧化应激，增加糖尿病患者心血管疾病的发生率^[15]。（2）AGEs 增加黏附分子表达，髓系与非髓系细胞表面上 AGEs 受体可以增加血管黏附分子 1 的表达，加速糖尿病相关的动脉粥样硬化^[16]。

胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）是胰岛素作用的靶组织对外源性或

者内源性胰岛素的敏感性以及反应性下降。2 型糖尿病常合并有胰岛素抵抗。胰岛素抵抗通过如下机制可以加速糖尿病动脉粥样硬化：（1）胰岛素抵抗加速巨噬细胞凋亡：研究发现，糖尿病患者进展期的动脉粥样硬化斑块核心较非糖尿病患者明显增大^[17]。糖尿病进展期动脉粥样硬化病变处，由于巨噬细胞胰岛素抵抗，内质网应激所诱导的细胞凋亡明显增加，促进斑块核心增大。（2）在胰岛素抵抗和代谢综合征患者中发现 CX3CL1/CX3CL1 轴活化明显增加，与动脉粥样硬化加速呈正相关。动物模型中发现该轴的活化增加斑块的不稳定性。胰岛素抵抗通过活化 CX3CL1/CX3CL1 轴诱导血管平滑肌细胞凋亡加速动脉粥样硬化^[18]。巨噬细胞维生素 D3 受体敲除促进胰岛素抵抗，加速动脉粥样硬化^[19]。

糖尿病患者的内源性氧化应激增强使得巨噬细胞的 UPS 被过度激活^[20]。UPS 的过度激活，促进糖尿病炎症因子（如血管细胞黏附因子 1 以及细胞间黏附分子 1）的表达和分泌，引起血管内皮细胞不可逆性损伤，导致动脉粥样硬化^[21]。

此外，糖尿病患者的 AGEs、血管紧张素 II、内皮素、炎症和高血脂状态增加 PDGF 途径的活性，而 PDGF 途径活性的增加具有促进炎症反应的作用。PDGF 具有上调结缔组织生长因子表达的作用，促进内皮细胞和成纤维细胞的迁移、黏附和增殖，加剧动脉粥样硬化的发生^[22]。

目前为止，对动脉粥样硬化的药物治疗主要有降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物。我们在研究中惊奇地发现纤溶酶原可以消减动脉管壁的脂质积聚、沉积、降低纤维组织增生，修复动脉粥样硬化对血管壁的损伤，改善动脉粥样硬化导致的组织器官缺血损伤和由于组织器官缺血所致的相关病症。

发明概述

本发明涉及治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症。

一方面，本发明涉及用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的方法，包括给药受试者预防和/或治疗有效量的纤溶酶原，所述受试者患有或怀疑患有动脉粥样硬化及其相关病症。本发明还涉及纤溶酶原用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。

进一步地,本发明还涉及用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

5 在一些实施方案中,所述动脉粥样硬化包括主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化、肝动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化、肠系膜动脉粥样硬化、下肢动脉粥样硬化。在一些实施方案中,所述动脉粥样硬化相关病症包括由于动脉粥样硬化导致组织、器官缺血而引发的相关病症,包括冠状动脉粥样硬化引发的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、心衰;脑动脉粥样硬化引起的脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血、脑栓塞;肾动脉粥样硬化引发的肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰、尿毒症;肠系膜动脉粥样硬化引发的饱餐后腹痛、消化不良、便秘、肠壁坏死、便血;下肢动脉粥样硬化引发的间歇性跛行、坏疽。在一些实施方案中,所述动脉粥样硬化选自:冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化和肾动脉粥样硬化。在一些实施方案中,所述动脉粥样硬化为与糖尿病并发的动脉粥样硬化。在
10 一些实施方案中,所述纤溶酶原通过选自如下的一项或多项预防和/或治疗动脉粥样硬化;降低受试者血清总胆固醇水平、降低受试者血清甘油三酯水平、降低受试者血清低密度脂蛋白水平、升高受试者血清高密度脂蛋白水平。在一些实施方案中,所述纤溶酶原通过降低受试者动脉管壁的脂质沉积预防和/或治疗动脉粥样硬化。在一些实施方案中,所述纤溶酶原通过选自如下的一项或多
15 项预防和/或治疗动脉粥样硬化:促进肝脏的脂肪代谢、促进肝脏的脂肪运输和降低受试者肝脏的脂肪沉积。
20

在又一方面,本发明涉及预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地,本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者由于动
25 脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。
30

在一些实施方案中，所述受试者的组织、器官缺血损伤为冠状动脉粥样硬化导致的心肌损伤。在一些实施方案中，所述病症为冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰。在一些实施方案中，所述受试者的组织、器官缺血损伤为脑动脉粥样硬化导致的脑缺血损伤。在一些实施方案中，所述病症为脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血或脑栓塞。在一些实施方案中，所述病症为肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰或尿毒症。

在又一方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。在一些实施方案中，所述病症包括冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、心衰、脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血、脑栓塞、脑梗死、肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰、尿毒症、肠坏死、间歇性跛行、坏疽。

在又一方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。在一些实施方案中，所述动脉粥样硬化选自如下的一项或多项：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化、肠系膜动脉粥样硬化、下肢动脉粥样硬化。

在又一方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的用途。本发明还

涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

在又一方面，本发明涉及预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

在又一方面，本发明涉及治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的纤溶酶原。本发明还涉及用于治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

在一些实施方案中，所述受试者具有如下的一项或多项：血清总胆固醇水平升高、血清甘油三酯水平升高、血清低密度脂蛋白水平升高、血清高密度脂蛋白水平降低。在一些实施方案中，所述高脂血症通过选自如下的一项或多项得到改善；降低受试者血清总胆固醇水平、降低受试者血清甘油三酯水平、降低受试者血清低密度脂蛋白水平、升高受试者血清高密度脂蛋白水平。

在又一方面，本发明涉及预防或消减受试者动脉管壁脂质沉积的方法，其中所述受试者易患动脉粥样硬化或已患动脉粥样硬化，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于预防或消减受试者动脉管壁脂

质沉积的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防或消减受试者动脉管壁脂质沉积的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于预防或消减受试者动脉管壁脂质沉积的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防或消减受试者动脉管壁脂质沉积的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

在一些实施方案中，所述易患动脉粥样硬化的受试者为患有原发性或继发性脂肪代谢紊乱的受试者。在一些实施方案中，所述易患动脉粥样硬化的受试者为患有肝脏疾病、肾脏疾病、肥胖症、高脂血症或糖尿病的受试者。

在一些实施方案中，所述纤溶酶原可与受试者需要的一种或多种其它药物或疗法联合施用。在一些实施方案中，所述其它药物包括：降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物，保肝药物，抗心律失常药物，强心药物，利尿药物，抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。在一些实施方案中，所述药物包括降血脂药物：他汀类；贝特类；烟酸；消胆胺；安妥明；不饱和脂肪酸如益寿宁、血脂平及心脉乐；藻酸双酯钠；抗血小板药物：阿司匹林；潘生丁；氯吡格雷；西洛他；扩张血管药物：胍苯哒嗪；硝酸甘油和消心痛；硝普钠； α 1 受体阻断剂如哌唑嗪； α 2 受体阻断剂如酚妥拉明； β 1 受体兴奋剂如舒喘灵；卡托普利、依那普利；心痛定、硫氮卓酮；柳丁氨酸、长压定、前列腺素、心钠素；溶血栓药物：尿激酶和链激酶；组织型纤溶酶原激活剂；单链尿激酶型纤溶酶原激活剂；TNK-组织型纤溶酶原激活剂；抗凝血药物：肝素；依诺肝素；那曲肝素；比伐卢定。

在一些实施方案中，所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性。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。

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。

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。

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授予所述受试者以实施前述任一方法。

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授予所述受试者以实施前述任一方法。

在一些实施方案中，所述试剂盒或制品还包含另外的一个或多个构件或容器，该构件或容器中含有其他药物。在一些实施方案中，所述其他药物选自下组：降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物，保肝药物，抗心律失常药物，强心药物，利尿药物，抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。

在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原可通过全身或局部给药，优选通过以下途径施用：静脉内、肌内、皮下给予纤溶酶原来进行治疗。在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。在前述方法的一些实施方案中，所述纤溶酶原以每天 0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg（以每公斤体重计算）或 0.0001-2000mg/cm²、0.001-800 mg/cm²、0.01-600 mg/cm²、0.1-400 mg/cm²、1-200 mg/cm²、1-100

mg/cm²、10-100 mg/cm²（以每平方厘米体表面积计算）的剂量施用，优选至少重复一次，优选至少每天施用。

本发明明确涵盖了属于本发明实施方案之间的技术特征的所有组合，并且这些组合后的技术方案在本申请中已经明确公开，就像上述技术方案已经
5 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。

发明详述

“动脉粥样硬化”是一种慢性的、渐进性动脉疾病，发病时动脉中沉积的
10 脂肪部分或全部堵塞血流。当原本光滑、坚实的动脉内膜变粗糙、增厚，并被脂肪、纤维蛋白、钙和细胞碎屑堵塞时，便出现动脉粥样硬化。动脉粥样硬化是个渐进的过程。当血液中的脂类浓度大大增加时，便会沿着动脉壁形成脂肪条纹。这些条纹会导致脂肪和胆固醇沉积，这些沉淀依附在原本平滑的动脉内膜上，从而形成小结。这些小结下面继而长出纤维化的瘢痕组织，
15 导致钙沉积。沉积的钙逐渐演变为无法除去的白垩状坚硬薄膜（称为动脉粥样斑）。动脉内部的这层永久薄膜会阻碍动脉的正常扩张和收缩，从而减缓了动脉内的血流速度，从而很容易形成血块，妨碍或阻止血液流经动脉。

仅就动脉粥样硬化症而言，人们感觉不到任何症状。仅当与体内的某个重要器官相连的动脉被堵塞后，才会发现此病。因该器官中的动脉受阻而引起
20 的症状较为明显。例如，如果心脏供血动脉部分受阻，人们就可能感到心绞痛；但是如果完全被阻塞，就可能导致心脏病（由受阻动脉供血的心脏组织死亡）。如果动脉粥样硬化影响到脑部动脉，人们会感觉眩晕、视线模糊和晕厥，甚至可能导致中风（由受阻动脉供血的脑组织死亡，从而引起神经损伤，如受死亡脑组织控制的肢体出现瘫痪）。通向肾部的动脉受阻还可能
25 导致肾衰竭。通向眼部的血管受阻可能导致失明。四肢动脉阻塞可能导致各肢体的病变。

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^[23]。此外，纤溶酶能将一些金属蛋白酶前
30 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^[24,25]。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。

5 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 (α 纤溶酶抑制剂。纤溶酶的主)。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)^[26,27]。

10 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^[28,29]。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 μ 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^[30,31]。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^[32]。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。

25 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^[33]。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^[29,34,35]。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^[36]。此外,

30

纤溶酶具有激活某些潜在形式的生长因子的能力^[37-39]。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。

5 “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
10 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。

15 Glu-纤溶酶原是天然全长的纤溶酶原，由 791 个氨基酸组成(不含有 19 个氨基酸的信号肽)，编码该序列的 cDNA 序列如序列 1 所示，其氨基酸序列如序列 2 所示。在体内，还存在一种是从 Glu-纤溶酶原的第 76-77 位氨基酸处水解从而形成的 Lys-纤溶酶原，如序列 6 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 5 所示。Delta-纤溶酶原(酶原 α-aminogen)是全长纤溶
20 酶原缺失了 Kringle2-Kringle5 结构的片段，仅含有 Kringle1 和丝氨酸蛋白酶域^[40,41]，有文献报道了 delta-纤溶酶原的氨基酸序列(序列 8)^[41]，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 7。小纤溶酶原(Mini-plasminogen)由 Kringle5 和丝氨酸蛋白酶域组成，有文献报道其包括残基 Val443-Asn791(以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸)^[42]，其氨基酸序列如
25 序列 10 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 9 所示。而微纤溶酶原(Micro-plasminogen)仅含有丝氨酸蛋白酶结构域，有文献报道其氨基酸序列包括残基 Ala543-Asn791(以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸)^[43]，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
30 基酸)，本专利序列参考专利文献 CN102154253A，其氨基酸序列如序列 12 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 11 所示。

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

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

本领域技术人员可以理解，本发明纤溶酶原的所有技术方案适用于纤溶酶，因此，本发明描述的技术方案涵盖了纤溶酶原和纤溶酶。

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

“纤溶酶原活性片段”溶是指在纤溶酶原蛋白中，能够与底物中的靶序列结合并发挥蛋白水解功能的活性片段。本发明涉及纤溶酶原的技术方案涵盖了用纤溶酶原活性片段代替纤溶酶原的技术方案。本发明所述的纤溶酶原活性片段为包含纤溶酶原的丝氨酸蛋白酶域的蛋白质，优选，本发明所述的纤溶酶原活性片段包含序列 14、与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列的蛋白质。因此，本发明所述的纤溶酶原包括含有该纤溶酶原活性片段、并且仍然保持该纤溶酶原活性的蛋白。

目前，对于血液中纤溶酶原及其活性测定方法包括：对组织纤溶酶原激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤溶酶原激活剂抗原的检测(t-PAAg)、对血浆组织纤溶酶原活性的检测(plgA)、血浆组织纤溶酶原抗原的检测(plgAg)、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物抗原的检测、血浆纤维蛋白溶酶-抗纤维蛋白溶酶复合物检测(PAP)。其中最常用的检测方法为发色底物法：向受检血浆中加链激酶(SK)和发色底物，受检血浆中的 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：

分数 X/Y 乘 100

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

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

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

“治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时足以实现对疾病的所述预防和/或治疗的纤溶酶原的量。“治疗有效量”会根据所使用的纤溶酶原、要治疗的受试者的疾病和/或其症状的严重程度以及年龄、体重等而变化。

5

本发明纤溶酶原的制备

纤溶酶原可以从自然界分离并纯化用于进一步的治疗用途，也可以通过标准的化学肽合成技术来合成。当通过化学合成多肽时，可以经液相或固相进行合成。固相多肽合成(SPPS) (其中将序列的 C 末端氨基酸附接于不溶性支持物，接着序贯添加序列中剩余的氨基酸)是适合纤溶酶原化学合成的方法。各种形式的 SPPS，诸如 Fmoc 和 Boc 可用于合成纤溶酶原。用于固相合成的技术描述于 Barany 和 Solid-Phase Peptide Synthesis; 第 3-284 页于 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology.第 2 卷: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield,等 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); 10 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 15 可以与别的氨基酸附接的新的 N 末端胺。肽保持固定在固相上，之后将其切掉。

可以使用标准重组方法来生产本发明的纤溶酶原。例如，将编码纤溶酶原的核酸插入表达载体中，使其与表达载体中的调控序列可操作连接。表达调控序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、 25 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 30 DNA 的整合部分复制。通常，表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗

性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)以有助于对外源用期望的 DNA 序列转化的那些细胞进行检测。

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

其他微生物, 诸如酵母也可用于表达。酵母(例如酿酒酵母(*S. cerevisiae*))和毕赤酵母(*Pichia*)是合适的酵母宿主细胞的例子, 其中合适的载体根据需要有表达控制序列(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，除主题抗体以外的大分子，等等。

药物配制剂

5 可以通过将具有所需纯度的纤溶酶原与可选的药用载体，赋形剂，或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性，并包括缓冲剂例如磷酸盐，柠檬酸盐及其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化己烷双胺；氯化苄烷铵(benzalkonium chloride)，苯索氯铵；酚、
10 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，
15 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。

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

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，
25 微乳剂，纳米颗粒和纳米胶囊)中或置入粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。这些技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

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

30 本发明的纤溶酶原可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质，例如膜或微胶囊。缓释基

质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer 等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277(1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇), 聚交酯(美国专利 3773919, EP 58,481), L-谷氨酸与 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, Biopolymers 22:547(1983)), 不可降解的乙烯-乙酸乙酯(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 DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体), 以及聚 D-(-)-3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子 100 天以上, 而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如, 如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间 S-S 键, 则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

给药和剂量

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

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

医务人员会基于各种临床因素确定剂量方案。如医学领域中公知的, 任一患者的剂量取决于多种因素, 包括患者的体型、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施用次数和路径、总体健康、和同时施用的其它药物。本发明包含纤溶酶原的药物组合物的剂量范围可以例如每天约 0.0001 至 2000 mg/kg, 或约 0.001 至 500 mg/kg (例如 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg 等等)受试者体重。例如, 剂量可以是 1 mg/kg 体重或 50 mg/kg 体重或在 1-50 mg/kg 的范围, 或至少 1 mg/kg。高于或低于此例示性范围的剂量也涵盖在内, 特别是考虑到上述的因素。上述范围中的

中间剂量也包含在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类剂量。例示性的剂量日程表包括连续几天 1-10 mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估治疗效果和安全性。

5

制品或药盒

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

15

附图简述

图 1 26 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后血清中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量检测结果。结果显示，在注射人源纤溶酶源 35 天后，给纤溶酶原组小鼠血清中 HDL-C 的含量显著高于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。说明注射纤溶酶原能促进血清 HDL-C 含量的升高。

图 2 24-25 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后血清中低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 含量检测结果。结果显示，糖尿病模型小鼠连续注射人源纤溶酶源 31 天后，给纤溶酶原组小鼠血清中的 LDL-C 含量低于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能降低血清中 LDL-C 的含量。

图 3 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后体重的变化。结果显示,给予纤溶酶原 30 天后小鼠体重无明显改变,说明给药处理对 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠的体重无明显影响。

图 4 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后血清总胆固醇的检测结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠总胆固醇浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组,且统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中总胆固醇的含量。

图 5 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后血清甘油三酯检测结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠甘油三酯浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组,且统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中甘油三酯的含量。

图 6 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的检测结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠 LDL-C 浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组,且统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中 LDL-C 的含量。

图 7 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后心脏脏器系数统计结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠心脏脏器系数明显低于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能改善 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠心脏损伤所致的心脏代偿性肥大。

图 8 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 10 天后大体主动脉油红 O 染色图片。结果显示,给纤溶酶原组小鼠主动脉弓、胸主动脉以及腹主动脉脂质斑块(箭头标识)面积明显小于给溶媒 PBS 对照组,给溶媒 PBS 对照组脂质占血管面积比为 36.0%,给纤溶酶原组为 29.6%。说明纤溶酶原能减少 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠动脉粥样斑块沉积,促进动脉粥样硬化血管壁损伤的修复。

图 9 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予 PBS 或纤溶酶原 20 天后大体主动脉油红 O 染色图片。结果显示,给纤溶酶原组小鼠主动脉弓、胸主动脉以及腹主动脉脂质斑块(箭头标识)面积明显小于给溶媒 PBS 对照组。给溶媒 PBS 对照组脂质占血管面积比为 48.1%,给纤溶酶原组为 39.4%。说明纤溶酶原能减少 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠动脉粥样斑块沉积,促进动脉粥样硬化血管损伤的修复。

图 10 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后肝脏油红 O 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组, C 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠肝脏脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (*表示 $P < 0.05$)。说明纤溶酶原能改善动脉粥样硬化模型小鼠肝脏脂肪沉积。

图 11 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉窦油红 O 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠主动脉窦脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能改善脂肪在主动脉窦的沉积。

图 12 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉瓣 HE 染色代表性图片。A、C 为给溶媒 PBS 对照组, B、D 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组 (图 12B、12D) 小鼠主动脉瓣斑块沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 12A、12C), 且主动脉瓣膜融合程度前者小于后者。说明纤溶酶原能改善动脉粥样硬化模型小鼠主动脉瓣膜损伤。

图 13 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉油红 O 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示给纤溶酶原组主动脉油红 O 着色面积(箭头标识)明显小于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能明显减少动脉粥样硬化模型小鼠主动脉脂质的沉积, 改善主动脉内壁的损伤。

图 14 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后心脏 IgM 免疫染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠心脏 IgM 的阳性表达(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 说明纤溶酶原能促进动脉粥样硬化所致心脏损伤的修复。

图 15 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后心脏天狼星红染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组胶原的沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 说明纤溶酶原能减轻 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠心脏纤维化。

图 16 26 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后心室油红 O 染色代表性图片。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠心室脂质沉积 (箭头标识) 明显少于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能够减少糖尿病小鼠心室脂质沉积, 促进心室损伤的修复。

图 17 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉窦天狼星红染色代表性图片。A、C 为给溶媒 PBS 对照组，B、D 为给纤溶酶原组。结果显示给纤溶酶原组主动脉窦血管内壁胶原蛋白沉积（箭头标识）的面积明显小于给溶媒 PBS 对照组，说明纤溶酶原能够消减动脉粥样硬化模型小鼠主动脉窦纤维化水平。

图 18 24-25 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后主动脉 HE 染色图片。A 为给溶媒 PBS 对照组，B 为给纤溶酶原组。结果显示，给溶媒 PBS 对照组血管管壁有泡沫细胞沉积（箭头标识），中层弹性膜排列紊乱，管壁凹凸不均；给纤溶酶原组中层弹性膜结构规则，呈波浪形。表明注射纤溶酶原对糖尿病所致的主动脉损伤具有一定的修复作用。

图 19 24-25 周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后血清中肌钙蛋白含量检测结果。结果显示，给纤溶酶原组心肌肌钙蛋白 I 的浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异极显著（**表示 $P < 0.01$ ）。说明纤溶酶原能显著促进糖尿病后期小鼠心肌损伤的修复。

图 20 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 10 天和 20 天后血清高密度脂蛋白胆固醇检测结果。结果显示，给予纤溶酶原后给纤溶酶原组小鼠血清 HDL-C 浓度明显高于给溶媒 PBS 对照组，且二者在给药 10 天和 20 天后高密度脂蛋白浓度均统计差异极显著（**表示 $P < 0.01$ ）。说明纤溶酶原能有效提高高脂血症模型小鼠血清中高密度脂蛋白胆固醇的含量，改善高脂血症模型小鼠血脂紊乱。

图 21 显示 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天动脉粥样硬化指数计算结果。计算结果显示，给纤溶酶原组小鼠动脉粥样硬化指数明显低于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著。说明纤溶酶原能降低高脂血症模型小鼠发生动脉粥样硬化的风险。

图 22 显示 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天心脏风险指数计算结果。结果显示，给纤溶酶原组 CRI 明显小于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异极其显著。说明纤溶酶原能有效的降低高脂血症模型小鼠发生心脏疾病的风险。

实施例：

实施例 1 纤溶酶原升高糖尿病小鼠血清中的高密度脂蛋白胆固醇

26 周龄 db/db 雄性小鼠 20 只随机分组，给纤溶酶原组 11 只，给溶媒 PBS 对照组 9 只。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。连续注射 35 天后摘眼球采全血，4° C, 3500r/min 离心 10 分钟，取上清液进行高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 检测。高密度脂蛋白胆固醇的检测采用试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A112-1），并按照该试剂盒所述方法进行。

检测结果显示，db/db 鼠连续注射人源纤溶酶源 35 天后，给纤溶酶原组小鼠血清中 HDL-C 的含量高于给溶媒 PBS 对照组（图 1），且统计差异显著。

糖尿病通常伴有心血管动脉粥样硬化^[45,46]，而高密度脂蛋白是一种抗动脉粥样硬化的血浆脂蛋白，是冠心病的保护因子，俗称“血管清道夫”。该检测结果证明纤溶酶原能提高血清 HDL-C 的水平，从而有助于改善糖尿病小鼠的动脉粥样硬化。

实施例 2 纤溶酶原降低糖尿病小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 10 只随机分组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组各 5 只，并取 3 只 db/m 作为正常对照组。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，正常对照组小鼠不作任何处理。开始给药定为第 0 天，连续注射 31 天后小鼠摘眼球采全血，4° C, 3500r/min 离心 10 分钟，取上清液进行低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）检测。低密度脂蛋白胆固醇的检测采用试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A113-1），并按照该检测试剂盒所述方法进行。

检测结果显示，db/db 小鼠连续注射人源纤溶酶源 31 天后，给纤溶酶原组小鼠血清中的 LDL-C 含量低于给溶媒 PBS 对照组（图 2）。

低密度脂蛋白是一种运载胆固醇进入外周组织细胞的脂蛋白颗粒，可被氧化成氧化低密度脂蛋白，当低密度脂蛋白，尤其是氧化修饰的低密度脂蛋白（OX-LDL）过量时，它携带的胆固醇便积存在动脉壁上，引发动脉硬化。因此低密度脂蛋白胆固醇被称为“坏的胆固醇”^[52]。该实验结果证明纤溶酶原能降低血清中低密度脂蛋白胆固醇的含量，从而有利于控制动脉粥样硬化。

实施例 3 纤溶酶原对 ApoE 动脉粥样硬化小鼠体重的影响

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇 (T-CHO) 含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于给药的第 1、31 天称量小鼠体重。

结果显示, 给予纤溶酶原 30 天后小鼠体重无明显改变 (图 3), 说明给药处理对 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠的体重无明显影响。

10 实施例 4 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠血脂含量

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇 (T-CHO) 含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。在第 30 天小鼠禁食 16 小时, 第 31 天摘除眼球取血, 离心获得上清, 用以检测血清总胆固醇(T-CHO)、血清甘油三酯(TG)和血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量。

20 1. 血清总胆固醇含量

使用检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A111-1)、并按照该检测试剂盒所述方法检测血清总胆固醇含量。

检测结果显示, 给纤溶酶原组小鼠总胆固醇浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (图 4)。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中总胆固醇的含量。

2. 血清甘油三酯含量

使用 TG 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A110-1)、并按照该试剂盒的说明采用 COD-PAP 法检测血清 TG 含量。检测结果显示, 给纤溶酶原组小鼠 TG 浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (图 5)。

3. 血清低密度脂蛋白胆固醇含量

使用低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 按照检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A113-1)、并按照该试剂盒所述方法检测血清低密度脂蛋白含量。

检测结果显示, 给纤溶酶原组小鼠 LDL-C 浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (图 6)。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中 LDL-C 的含量, 改善动脉粥样硬化。

上述结果证明纤溶酶原能显著降低动脉粥样硬化模型小鼠的血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇含量, 改善动脉粥样硬化。同时, 通过降低血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇的含量, 降低动脉粥样硬化并发症, 例如动脉粥样硬化性心血管疾病的风险。

实施例 5 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠心脏代偿性肥大

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料 (南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇 (T-CHO) 含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于给药的第 31 天称重后处死小鼠, 取心脏称重, 并计算心脏系数。心脏系数 (%) = 心脏重量/体重 $\times$ 100。

结果显示, 给纤溶酶原组小鼠心脏系数明显低于给溶媒 PBS 对照组 (图 7)。说明纤溶酶原能减轻 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠由于心脏损伤所致的心脏代偿性肥大。

实施例 6 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉脂质斑块沉积

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料 (南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇 (T-CHO) 含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 10 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料, 第 11 天两组小鼠各随机取一只处死, 取主动脉于 4% 多聚甲醛固定 24-48 小时, 剖开后进行油红 O 大体染色, 主动脉在体式显微镜 7 倍镜下观察拍照。

油红 O 染色可显示脂质沉积,反映损伤的严重程度^[49]。染色结果(图 8)显示,给纤溶酶原组小鼠主动脉弓、胸主动脉以及腹主动脉脂质斑块(箭头标识)面积明显小于给溶媒 PBS 对照组,给溶媒 PBS 对照组脂质占血管面积比为 36.0%,给纤溶酶原组为 29.6%。实验证明纤溶酶原能减少 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠动脉粥样斑块沉积,促进动脉粥样硬化的修复。

实施例 7 纤溶酶原减少 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉脂质斑块沉积

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲,TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量,并根据 T-CHO 含量随机分为两组,给溶媒 PBS 对照组 7 只,给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天,给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天,给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 20 天,给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料,第 21 天两组小鼠各随机取一只处死,取主动脉于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时,剖开后进行油红 O 大体染色,主动脉在体式显微镜 7 倍镜下观察拍照。

主动脉弓、胸主动脉以及腹主动脉脂质斑块(箭头标识)面积明显小于给溶媒 PBS 对照组,给溶媒 PBS 对照组脂质占血管面积比为 48.1%,给纤溶酶原组为 39.4%(图 9)。说明纤溶酶原能减少 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠动脉粥样斑块,促进动脉粥样硬化的修复。

实施例 8 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲,TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量,并根据 T-CHO 含量随机分为两组,给溶媒 PBS 对照组 7 只,给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天,给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天,给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天,给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于第 31 天处死小鼠,取肝脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时,分别于 15%、30%蔗糖中 4 $^{\circ}$ C 过夜沉底,OCT 包埋,冰冻切片厚度 8 μ m,油红 O 染色 15min,75%酒精分化 5 秒,苏木素染核 30 秒,甘油明胶封片。切片在 400 倍光学显微镜下观察。

染色结果显示, 给纤溶酶原组(图 10B)小鼠肝脏脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组(图 10A), 且定量分析统计差异显著(图 10C)。说明纤溶酶原可改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠肝脏脂肪沉积。

实施例 9 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉窦脂质沉积

5 6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天, 给溶媒 PBS 对照组 10 尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 并于第 31 天处死小鼠, 取心脏于 4% 多聚甲醛固定 24-48 小时, 分别于 15%、30%蔗糖中 4℃过夜沉底, OCT 包埋, 冰冻切片厚度 8 μ m, 油红 O 染色 15min, 75%酒精分化 5 秒, 苏木素染核 30 秒, 甘油明胶封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 给纤溶酶原组(图 11B)小鼠主动脉窦脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组(图 11A)。说明纤溶酶原可改善动脉粥样硬化中主动脉窦脂肪沉积。

实施例 10 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉窦损伤

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 20 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于第 31 天处死小鼠, 取心脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的 25 组织样本经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。主动脉窦组织切片厚度为 3 μ m, 切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE 染色), 1%盐酸酒精分化后氨水返蓝并酒精梯度脱水封片, 切片分别在在 40 倍(图 12A 和 12B) 和 200 倍(图 12C 和 12D)光学显微镜下观察。

染色结果显示, 给纤溶酶原组(图 12B、12D)小鼠主动脉窦脂质斑块 30 沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组(图 12A、12C), 且主动脉瓣

膜融合程度前者小于后者。说明纤溶酶原能改善动脉粥样硬化中主动脉瓣膜损伤。

实施例 11 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉脂质沉积

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于第 31 天处死小鼠, 取主动脉于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时, 分别于 15%、30%蔗糖中 4℃过夜沉底, OCT 包埋, 冰冻切片厚度 8 μ m, 油红 O 染色 15min, 75%酒精分化 5 秒, 苏木素染核 30 秒, 甘油明胶封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

染色结果显示, 给纤溶酶原组(图 13B)主动脉油红 O 染色沉积(箭头标识)面积明显小于给溶媒 PBS 对照组(图 13A)。说明纤溶酶原能够明显降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠主动脉脂质在血管内壁的沉积, 改善主动脉的损伤。

实施例 12 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠心脏损伤

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇(T-CHO)含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于第 31 天处死小鼠, 取心脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织, 以 3%双氧水孵育 15 分钟, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭 30 分钟; 时间到后, 弃除羊血清液, 滴加山羊抗鼠 IgM (HRP)抗体(Abcam), 室温孵育 1 小时, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色, 水洗后苏

木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水、二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。IgM 抗体在清除凋亡和坏死细胞过程中发挥着重要作用，组织器官损伤局部 IgM 抗体的水平与损伤程度呈正相关^[50,51]。因此，检测组织器官局部 IgM 抗体的水平能够反映该组织器官的损伤情况。实验发现，给纤溶酶原组小鼠(图 14B)心脏 IgM 的阳性表达明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 14A）。

说明纤溶酶原能够明显改善 ApoE 小鼠心肌损伤。

实施例 13 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠心脏纤维化水平

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料(南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[47,48]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μ l 以检测总胆固醇（T-CHO）含量，并根据 T-CHO 含量随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组 7 只，给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天，给药期间继续饲喂高脂高胆固醇饲料。于第 31 天处死小鼠，取材心脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次，以 0.1%天狼星红饱和苦味酸染色 30 分钟后，流水冲洗 2min，苏木素染色 1 分钟，流水冲洗，1%盐酸酒精分化，氨水返蓝，流水冲洗，烘干后中性树胶封片，在 200 倍光学显微镜下观察。

天狼星红染色可使胶原持久染色，是对病理切片中胶原组织的特殊染色方法，以特异显示胶原组织。

染色结果显示，给纤溶酶原组（图 15B）胶原的沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 15A），说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠心脏组织中胶原的沉积，降低心脏纤维化。

实施例 14 纤溶酶原降低糖尿病小鼠心室脂质沉积

糖尿病通常伴有心血管动脉粥样硬化^[45,46]。心血管动脉粥样硬化可导致心肌细胞的缺血损伤。油红 O 染色可显示脂质沉积，反映损伤的严重程度^[49]。

26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只，随机分为两组，给纤溶酶原组 4 只，给溶媒 PBS 对照组 5 只。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，给药 35 天。于第 36 天处死小鼠，取心脏于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时，分别于 15%、30%蔗糖

中 4℃过夜沉底, OCT 包埋, 冰冻切片厚度 8 μm, 油红 O 染色 15min, 75% 酒精分化 5 秒, 苏木素染核 30 秒, 甘油明胶封片。切片在 400 倍光学显微镜下观察。

结果显示, 给纤溶酶原组小鼠 (图 16B) 心室脂质沉积 (箭头标识) 明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 16A)。说明纤溶酶原能够减少糖尿病小鼠心室脂质沉积, 促进心室损伤的修复。

实施例 15 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉窦纤维化

6 周龄雄性 ApoE 小鼠 13 只饲喂高脂高胆固醇饲料 (南通特洛菲, TP2031) 16 周以诱导动脉粥样硬化模型^[31,32]。成模后的小鼠在给药前三天每只取血 50 μl 以检测总胆固醇 (T-CHO) 含量, 并根据 T-CHO 含量随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 7 只, 给纤溶酶原组 6 只。开始给药定为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1mL/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。给药 30 天, 并于第 31 天处死小鼠, 取心脏于 4% 多聚甲醛固定 24-48 小时, 分别于 15%、30% 蔗糖中 4℃过夜沉底, OCT 包埋, 冰冻切片厚度 8 μm, 以 0.1% 天狼星红饱和苦味酸染色 30 分钟后, 流水冲洗 2min, 苏木素染色 1 分钟, 流水冲洗, 1% 盐酸酒精分化, 氨水返蓝, 流水冲洗, 烘干后中性树胶封片, 在 40 倍光学显微镜下观察, 图 17C、17D 分别为图 17A、17B 黑框区域放大图片。

结果显示给纤溶酶原组 (图 17B、17D) 胶原蛋白沉积 (箭头标识) 的面积明显小于给溶媒 PBS 对照组 (图 17A、17C), 说明纤溶酶原能够消减动脉粥样硬化模型小鼠主动脉窦纤维化水平。

实施例 16 纤溶酶原对糖尿病小鼠主动脉内壁损伤的保护作用

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 10 只, 实验开始当天记为第 0 天并称重, 根据体重随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 5 只。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS (PBS 为磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Saline), 本文中为纤溶酶原的溶媒), 连续给药 31 天。给纤溶酶原组小鼠按 2mg/0.2ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组以相同方式给予相同体积的 PBS。在第 32 天处死小鼠并取主动脉在 10% 中性福尔马林固定液中固定 24 小时。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。组织切片

厚度为 5 μ m, 切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE 染色), 1%盐酸酒精分化后氨水返蓝并酒精梯度脱水封片, 切片在 400 倍光学显微镜下观察。

HE 染色结果显示, 给溶媒 PBS 对照组血管管壁有泡沫细胞沉积(箭头标识), 中层弹性膜排列紊乱, 管壁凹凸不均(图 18A); 给纤溶酶原组中层弹性膜结构规则, 呈波浪形(图 18B)。表明注射纤溶酶原对糖尿病所致的主动管内壁的损伤具有一定的修复作用。

实施例 17 纤溶酶原对糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用

糖尿病通常伴有心血管动脉粥样硬化^[45,46]。心血管动脉粥样硬化可导致心肌细胞的缺血损伤。心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, CTNI) 是心肌损伤的重要标志物, 其血清浓度能够反映心肌损伤的程度^[44]。本实验通过检测心肌肌钙蛋白 I 观察纤溶酶原对心肌损伤的修复作用。

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 28 只, 随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组 12 只, 给纤溶酶原组 16 只。实验开始当天记为第 0 天并称重分组, 第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS, 连续给药 31 天。给纤溶酶原组小鼠按 2mg/0.2ml/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射给予相同体积的 PBS。第 32 天摘除眼球取血, 以 3500 r/min 离心 15-20 分钟, 并取上清检测进行心肌肌钙蛋白 I 的浓度测定。结果显示, 给纤溶酶原组心肌肌钙蛋白 I 的浓度明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异极为显著(图 19)。说明纤溶酶原能显著促进糖尿病小鼠心血管动脉粥样硬化所致的心肌损伤的修复。

实施例 18 纤溶酶原提高 3%胆固醇高脂血症模型小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇浓度

9 周龄雄性 C57 小鼠 16 只饲喂 3%胆固醇高脂饲料(南通特洛菲)4 周, 诱导高脂血症^[52,53], 此模型定为 3%胆固醇高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂 3%胆固醇高脂饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ L, 检测总胆固醇, 并根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组, 每组各 8 只。开始给药记为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 给药 20 天。在第 10、20 天小鼠禁食 16 小时, 第 11、21 天扎眼眶静脉丛取血 50 μ l, 离心获得上清, 用以检测血

清高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)。本文中高密度脂蛋白胆固醇含量通过检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A112-1) 所述方法检测。

检测结果显示, 给纤溶酶原组小鼠血清 HDL-C 浓度明显高于给溶媒 PBS 对照组, 且二者在给药 10、20 天后 HDL-C 浓度均有统计学差异 (图 20)。

- 5 说明纤溶酶原能提高高脂血症模型小鼠血清中高密度脂蛋白胆固醇的含量, 改善高脂血症小鼠血脂紊乱。

实施例 19 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠动脉粥样硬化形成的风险

- 9 周龄雄性 C57 小鼠 16 只饲喂 3%胆固醇高脂饲料(南通特洛菲)4 周, 诱导高脂血症[52,53], 此模型定为 3%胆固醇高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂 3%胆固醇高脂饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ l, 检测总胆固醇 (T-CHO), 并根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组, 每组各 8 只。开始给药记为第 1 天, 给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。在第 20 天给药后小鼠开始禁食, 禁食 16 小时, 第 21 天扎眼眶静脉丛取血 50 μ L, 离心获得上清, 总胆固醇含量采用总胆固醇检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A111-1) 进行检测; 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 含量采用高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A112-1) 进行检测。

- 20 动脉粥样硬化指数, 是临床上预测动脉粥样硬化的综合指标, 认为它在用作对冠心病风险程度的估计方面临床意义比单项的总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白更大[54]。动脉粥样硬化指数=(T-CHO-HDL-C)/HDL-C。

- 25 计算结果显示, 给纤溶酶原组小鼠动脉粥样硬化指数明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著 (图 21)。说明纤溶酶原能降低高脂血症模型小鼠发生动脉粥样硬化的风险。

实施例 20 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠心脏发病风险

- 9 周龄雄性 C57 小鼠 16 只饲喂 3%胆固醇高脂饲料(南通特洛菲)4 周, 诱导高脂血症[52,53], 此模型定为 3%胆固醇高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂 3%胆固醇高脂饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ l, 检测总胆固醇 (T-CHO), 并根据总胆固醇浓度随机分为两组, 每组各 8 只。开始

给药记为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠尾静脉注射人源纤溶酶原 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS。在第 20 天给药后小鼠开始禁食，禁食 16 小时，第 21 天扎眼眶静脉丛取血 50 μ L，离心获得上清，总胆固醇含量采用总胆固醇检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A111-1）进行检测；高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）含量采用高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A112-1）进行检测。心脏危险指数=T-CHO/HDL。

心脏危险指数(cardiac risk index, CRI)用以评估血脂紊乱诱发心脏疾病的风险[54]。

结果显示，给纤溶酶原组 CRI 明显小于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异极其显著（图 22）。说明纤溶酶原能有效的降低高脂血症模型小鼠发生心脏疾病的风险。

参考文献

- [1] Libby, Ridker PM, Maseri A. Inflammation in atherosclerosis [J]. Circulation, 2002, 105(9):1135-1143.
- [2] Esper RJ, Vilarino JO, Machado RA, et al. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucosemetabolism [J]. Adv Cardiol, 2008, 45:17-43.
- [3] Boos CJ, Blann AD, Lip GY. Assessment of endothelial damage/dysfunction: A focus on circulating endothelial cells [J]. Methods Mol Med, 2007,139:211-224.
- [4] Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease [J]. Circulation,2006,113(7):929-937.
- [5] Ellahham S. Role of antiplatelet agents in the primary and secondary prevention of atherothrombotic events in high risk-patients [J]. South Med J,2008,101(3):273-283.
- [6] Kanani PM, Sperling MA. Hyperlipidemia in adolescents[J]. Adolesc Med, 2002,13(1):37-52.
- [7] Eo HS, Kim D I. Apolipoprotein C1 and apolipoprotein E are differentially expressed in atheroma of the carotid and femoral artery [J]. J Surg Res, 2008,144 (1):132-137.

- [8] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2002,91(4):281-291.
- [9] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: Pathogenesis and pharmacology of plaque rupture [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005,3(1):63-68.
- 5 [10] Jia G, Cheng G, grawal DK. Differential effects of insulin-like growth factor-1 and atheroma-associated cytokines on cell proliferation and apoptosis in plaque smooth muscle cells of symptomatic and asymptomatic patients with carotidstenosis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2006,84(5):422-429.
- [11] Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in
10 atherosclerosis and plaques tability [J]. *Am J Nephrol*, 2006, 26(6):531-535.
- [12] Wen ting et al., Study on the mechanism of diabetes mellitus combined with atherosclerosis. *Chin J Clinicians(Electronic Edition)*, April 1,2016,Vol.10,No.7.
- [13] Lopez-Pedera C, Aguirre MA. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches[J]. *J Biomed*
15 *Biotechnol*, 2010, 2010: 6070-6084.
- [14] Gong Z, Xing S, Zheng F, et al. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor in aorta of patients with coronary atherosclerosis[J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2015, 56(4): 631-637.
- [15] Kim J, Kim KM, Kim CS, et al. Puerarin inhibits the retinal pericyte apoptosis induced by
20 advanced glycation end products in vitro and in vivo by inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(2): 357-365.
- [16] Koulis C, Kanellakis P. Role of bone-marrow and non-bonemarrow-driven receptor for advanced glycation end-products(RAGE) in a mouse model of diabetes-associated atherosclerosis[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2014, 127(7): 485-497.
- 25 [17] Tsukano H, Gotoh T, Endo M, et al. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(10): 1925-1932.
- [18] Martínez-Hervás S, Vinué A, Núñez L, et al. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis[J].
30 *Cardiovasc Res*, 2014, 103(2): 324-336.

- [19] Oh J, Riek AE, Darwech I, et al. Deletion of macrophage Vitamin D receptor promotes insulin resistance and monocyte cholesterol transport to accelerate atherosclerosis in mice[J]. *Cell Rep*, 2015,10(11): 187218-187286.
- [20] Marfella R, D' Amico M, Di Filippo C, et al. The possible role of the ubiquitin proteasome system in the development of atherosclerosis in diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2007, 6: 35.
- 5 [21] Lassila M, Allen TJ, Cao Z, et al. Imatinib attenuates diabetesassociated atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(5): 935-942.
- [22] He C, Medley SC, Hu T, et al. PDGFR β signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:
- 10 7770.
- [23] Alexander CM and Werb, Z. (1991). Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Hay ED, ed. (New York: Plenum Press), pp. 255-302.
- [24] Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., and Harris, E.D., Jr. (1977). Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of
- 15 plasminogen activator. *N. Engl. J. Med.* 296, 1017-1023.
- [25] He, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., and Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2632-2636.
- [26] Stoppelli, M.P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F., and Assoian, R.K. (1985).
- 20 Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4939-4943.
- [27] Vassalli, J.D., Baccino, D., and Belin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55, 000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 100, 86-92.
- 25 [28] Wiman, B. and Wallen, P. (1975). Structural relationship between "glutamic acid" and "lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH₂-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 50, 489-494.
- [29] Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.
- 30 [30] Raum, D., Marcus, D., Alper, C.A., Levey, R., Taylor, P.D., and Starzl, T.E. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208, 1036-1037.

- [31] Wallén P (1980). Biochemistry of plasminogen. In Fibrinolysis, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC).
- [32] Sottrup-Jensen, L., Zajdel, M., Claeys, H., Petersen, T.E., and Magnusson, S. (1975). Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 2577-2581.
- [33] Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.
- [34] Alexander, C.M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.
- [35] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.
- [36] Collen, D. (2001). Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 1-9.
- [37] Rifkin, D.B., Moscatelli, D., Bizik, J., Quarto, N., Blei, F., Dennis, P., Flaumenhaft, R., and Mignatti, P. (1990). Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ. Dev.* 32, 313-318.
- [38] Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72, 1-22.
- [39] Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.
- [40] Marder V J, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3): 433-444.
- [41] Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- [42] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"-plasminogen (MW, 38, 000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis [J]. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 1978, 3: 191-209.

- [43] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2): 307-313.
- [44] R. Langhorn and J.L. Willesen. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 5 2016;30:36–50.
- [45] Sun Mi Hwang, Jin Sook Kim, Yun Jung Lee et al. Anti-Diabetic Atherosclerosis Effect of *Prunella vulgaris* in db/db Mice with Type 2 Diabetes. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 40, No. 5, 937–951.
- [46] Hardy, D.S., D.M. Hoelscher, C. Aragaki et al. Association of glycemic index and 10 glycemic load with risk of incident coronary heart disease among Whites and African Americans with and without type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Ann. Epidemiol.* 20: 610–616, 2010.
- [47] Yutaka Nakashima, Andrew S. Plump, Elaine W. Raines et al. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jan;14(1):133-40.
- 15 [48] Yvonne Nitschke , Gabriele Weissen-Plenz , Robert Terkeltaub et al. Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 15, No 11, 2011 pp. 2273-2283.
- [49] Siobhan M. Craige, PhD, Shashi Kant et al. Endothelial NADPH oxidase 4 protects ApoE^{-/-} mice from atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med.* 2015 December ; 89: 1–7.
- 20 [50] Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. (2006) Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 177: 4727–4734.
- [51] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural 25 Immunoglobulin M Antibodies and Complement.
- [52] Dominika Nackiewicz, Paromita Dey, Barbara Szczerba et al. Inhibitor of differentiation 3, a transcription factor regulates hyperlipidemia associated kidney disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2014 ; 126(3): 141–147.
- [53] Ming Gu1, Yu Zhang., Shengjie Fan et al. Extracts of *Rhizoma Polygonati Odorati* 30 Prevent High-Fat Diet-Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 8(11): e81724.

[54] Sungwon Lee, Youngjoo Lee, Jiyeon Kim et al. Atorvastatin and rosuvastatin improve physiological parameters and alleviate immune dysfunction in metabolic disorders. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 23;478(3):1242-7

权 利 要 求 书

1. 一种用于治疗受试者动脉粥样硬化及其相关病症的方法,包括给药受试者预防和/或治疗有效量的纤溶酶原,所述受试者患有或怀疑患有动脉粥样硬化及其相关病症。

5 2. 权利要求 1 的方法,其中所述动脉粥样硬化包括主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化、肝动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化、肠系膜动脉粥样硬化、下肢动脉粥样硬化、颈动脉粥样硬化。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述动脉粥样硬化相关病症包括由于动脉粥样硬化导致组织、器官缺血而引发的相关病症,包括冠状动脉粥样硬化引发的
10 的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、心衰;脑动脉粥样硬化引起的脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血、脑栓塞;肾动脉粥样硬化引发的肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰、尿毒症;肠系膜动脉粥样硬化引发的饱餐后腹痛、消化不良、便秘、肠壁坏死、便血;下肢动脉粥样硬化引发的间歇性跛行、坏疽。

15 4. 权利要求 1-3 任一项的方法,其中所述动脉粥样硬化选自:冠状动脉粥样硬化、主动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化和肾动脉粥样硬化。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中所述动脉粥样硬化为与糖尿病并发的动脉粥样硬化。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中所述纤溶酶原通过选自如下的一项或多项预防和/或治疗动脉粥样硬化;降低受试者血清总胆固醇水平、降低
20 受试者血清甘油三酯水平、降低受试者血清低密度脂蛋白水平、升高受试者血清高密度脂蛋白水平。

7. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中所述纤溶酶原通过降低受试者动脉管壁的脂质沉积预防和/或治疗动脉粥样硬化。

25 8. 权利要求 1-5 任一项的方法,其中所述纤溶酶原通过选自如下的一项或多项预防和/或治疗动脉粥样硬化:促进肝脏的脂肪代谢、促进肝脏的脂肪运输和降低受试者肝脏的脂肪沉积。

9. 一种预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的组织、器官缺血损伤及其相关病症的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

30 10. 权利要求 9 的方法,其中所述受试者的组织、器官缺血损伤为冠状动

脉粥样硬化导致的心肌损伤。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述病症为冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰。

5 12. 权利要求 9 的方法，其中所述受试者的组织、器官缺血损伤为脑动脉粥样硬化导致的脑缺血损伤。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述病症为脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血或脑栓塞。

14. 权利要求 9 的方法，其中所述病症为肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰或尿毒症。

10 15. 一种预防和/或治疗受试者由于动脉粥样硬化所致的动脉血栓及其相关病症的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述病症包括冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、心衰、脑缺血、脑血栓、脑萎缩、脑出血、脑栓塞、脑梗死、肾功能不全、高血压、肾小球纤维化、肾衰、尿毒症、肠坏死、间歇性跛行、坏疽。

17. 一种预防和/或治疗受试者糖尿病并发的动脉粥样硬化的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述动脉粥样硬化选自如下的一项或多项：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化、肠系膜动脉粥样硬化、下肢动脉粥样硬化。

18. 一种预防和/或治疗受试者糖尿病并发的冠状动脉粥样硬化的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

19. 一种预防和/或治疗糖尿病受试者的冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

25 20. 一种治疗糖尿病或动脉粥样硬化受试者高脂血症的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述受试者具有如下的一项或多项：血清总胆固醇水平升高、血清甘油三酯水平升高、血清低密度脂蛋白水平升高、血清高密度脂蛋白水平降低。

30 22. 权利要求 21 的方法，其中所述高脂血症通过选自如下的一项或多项得到改善；降低受试者血清总胆固醇水平、降低受试者血清甘油三酯水平、

降低受试者血清低密度脂蛋白水平、升高受试者血清高密度脂蛋白水平。

23. 一种预防或消减受试者动脉管壁脂质沉积的方法，其中所述受试者易患动脉粥样硬化或已患动脉粥样硬化，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述易患动脉粥样硬化的受试者为患有原发性或继发性脂肪代谢紊乱的受试者。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述易患动脉粥样硬化的受试者为患有肝脏疾病、肾脏疾病、肥胖症、高脂血症或糖尿病的受试者。

26. 根据权利要求 1-25 任一项的方法，其中所述纤溶酶原可与受试者需要的一种或多种其它药物或疗法联合施用。

27. 根据权利要求 26 的方法，其中所述其它药物包括：降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物，保肝药物，抗心律失常药物，强心药物，利尿药物，抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述药物包括降血脂药物：他汀类；贝特类；烟酸；消胆胺；安妥明；不饱和脂肪酸如益寿宁、血脂平及心脉乐；藻酸双酯钠；抗血小板药物：阿司匹林；潘生丁；氯吡格雷；西洛他；扩张血管药物：胍苯哒嗪；硝酸甘油和消心痛；硝普钠； α 受体阻断剂如哌唑嗪； α_1 受体阻断剂如酚妥拉明； β 受体兴奋剂如舒喘灵；卡托普利、依那普利；心痛定、硫氮卓酮；柳丁氨酸、长压定、前列腺素、心钠素；溶血栓药物：尿激酶和链激酶；组织型纤溶酶原激活剂；单链尿激酶型纤溶酶原激活剂；TNK-组织型纤溶酶原激活剂；抗凝血药物：肝素；依诺肝素；那曲肝素；比伐卢定。

29. 权利要求 1-28 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性。

30. 权利要求 1-29 任一项的方法，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

31. 权利要求 1-30 任一项的方法，所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片

段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

32. 权利要求 1-31 任一项的方法,所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

5 33. 权利要求 1-32 任一项的方法,所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

34. 权利要求 1-32 任一项的方法,所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

10 35. 权利要求 1-34 任一项的方法,所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

36. 权利要求 1-35 任一项的方法,其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

37. 权利要求 1-36 任一项的方法,其中所述受试者是人。

38. 权利要求 1-37 任一项的方法,其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

15 39. 权利要求 38 的方法,其中所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

40. 一种用于权利要求 1-39 任一项的方法的纤溶酶原。

41. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载剂和用于权利要求 1-39 中任一项所述方法的纤溶酶原。

20 42. 一种治疗性试剂盒,其包含: (i)用于权利要求 1-39 中任一项所述方法的纤溶酶原和(ii)用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件(means)。

43. 根据权利要求 42 所述的试剂盒,其中所述构件为注射器或小瓶。

44. 权利要求 42 或 43 的试剂盒,其还包含标签或使用说明书,该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施权利要求 1-39 中
25 任一项所述方法。

45. 一种制品,其包含:

含有标签的容器; 和

包含(i)用于权利要求 1-39 中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物,其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试
30 者以实施权利要求 1-39 中任一项所述方法。

46. 权利要求 42-44 中任一项的试剂盒或权利要求 45 的制品, 还包含另外的一个或多个构件或容器, 该构件或容器中含有其他药物。

5 47. 权利要求 46 的试剂盒或制品, 其中所述其他药物选自下组: 降血脂药物、抗血小板药物、降血压药物、扩张血管药物、降血糖药物、抗凝血药物、溶血栓药物, 保肝药物, 抗心律失常药物, 强心药物, 利尿药物, 抗感染药物、抗病毒药物、免疫调节药物、炎症调节类药物、抗肿瘤药物、激素类药物、甲状腺素。

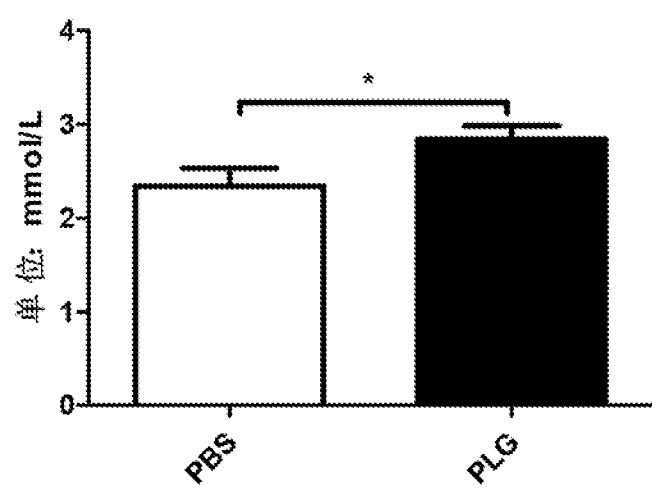


图1

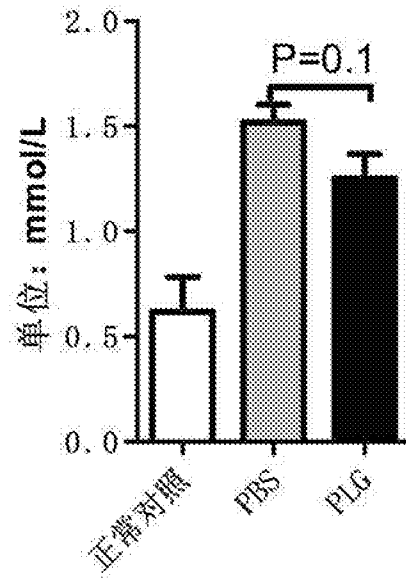


图2

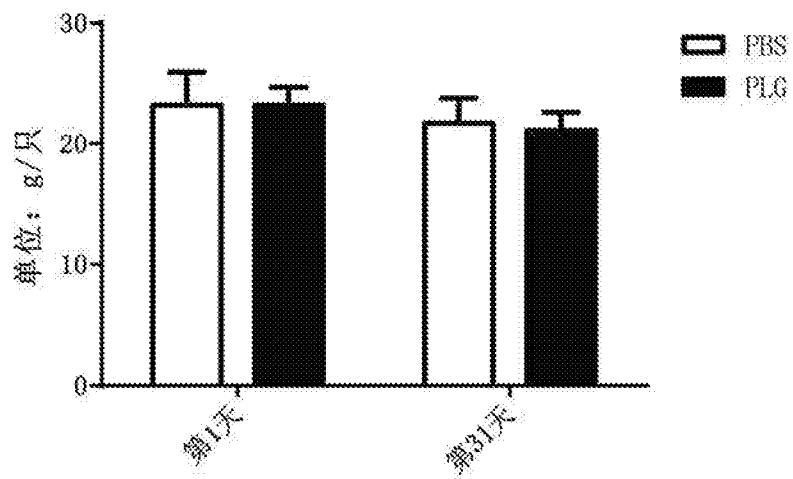


图3

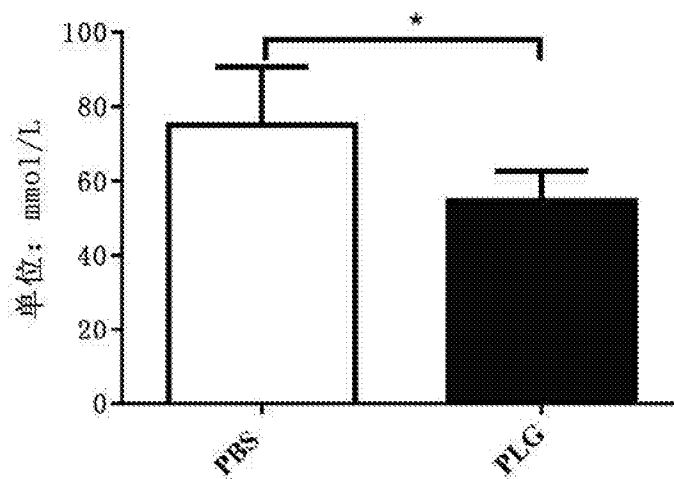


图4

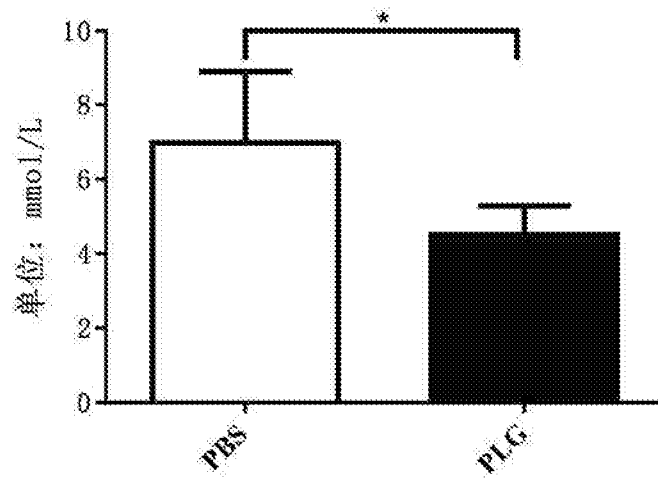


图5

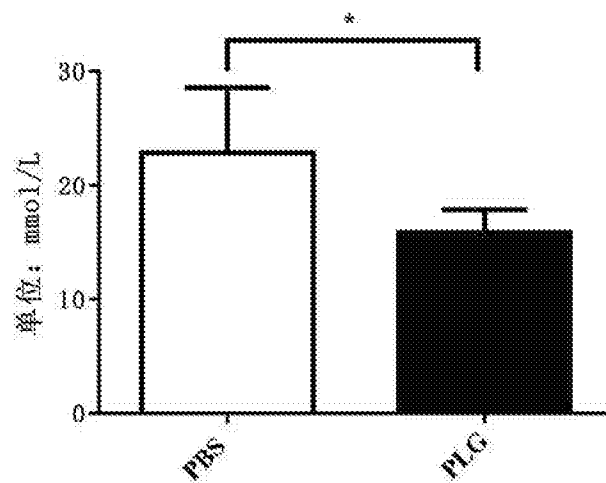


图6

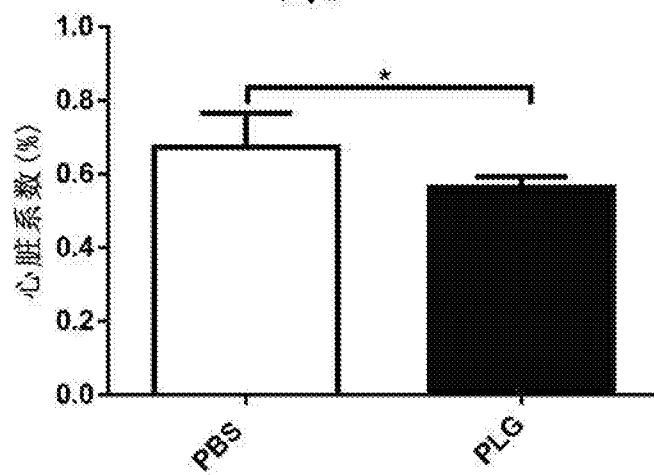


图7

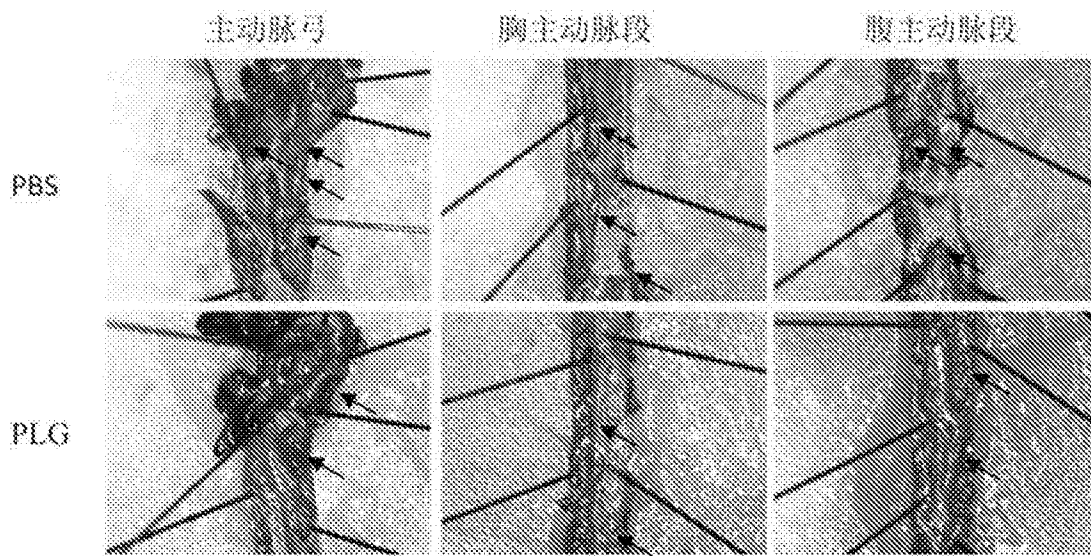


图8

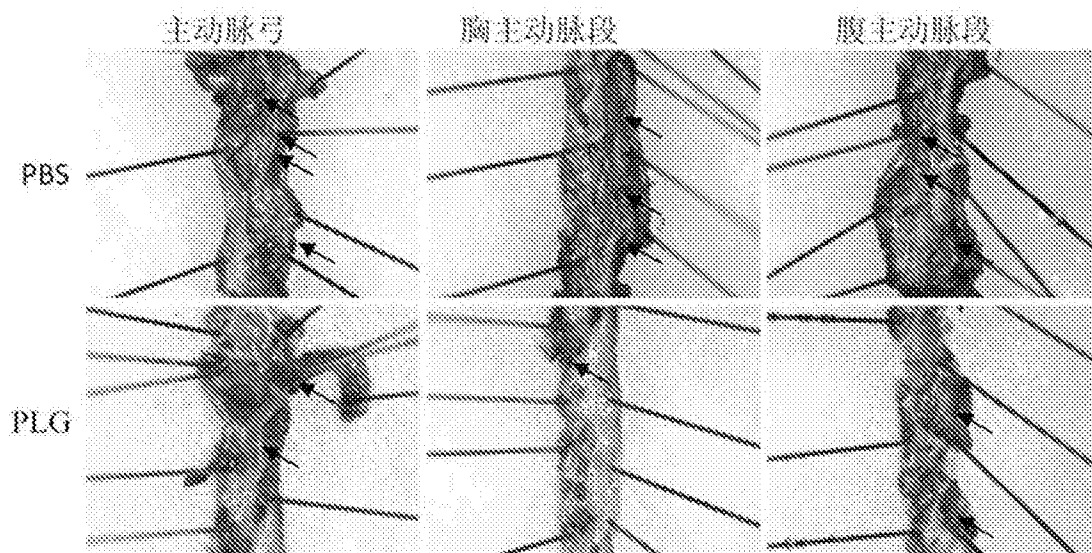


图9

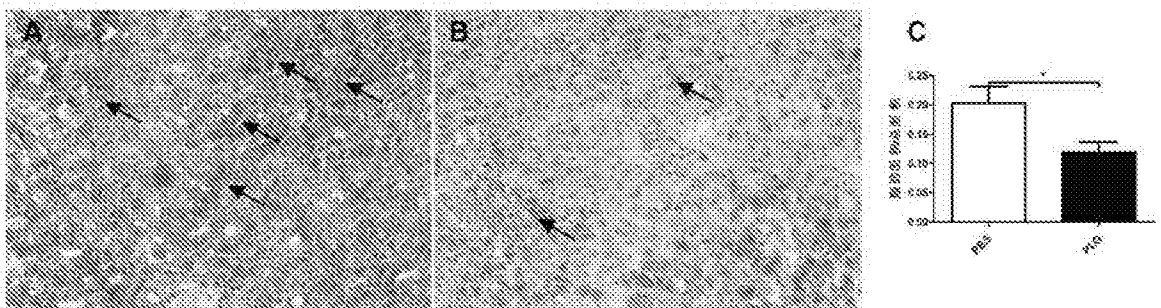


图10

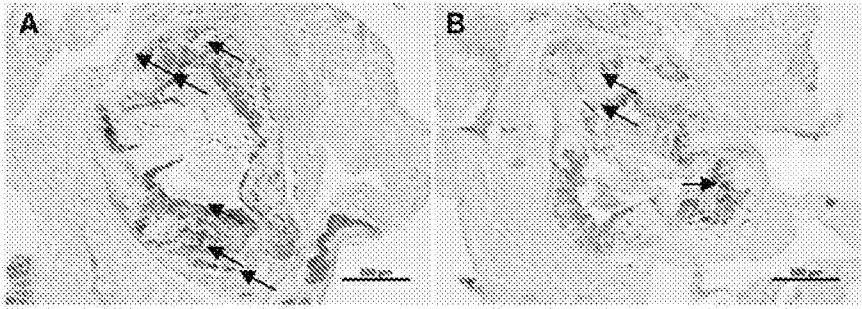


图11

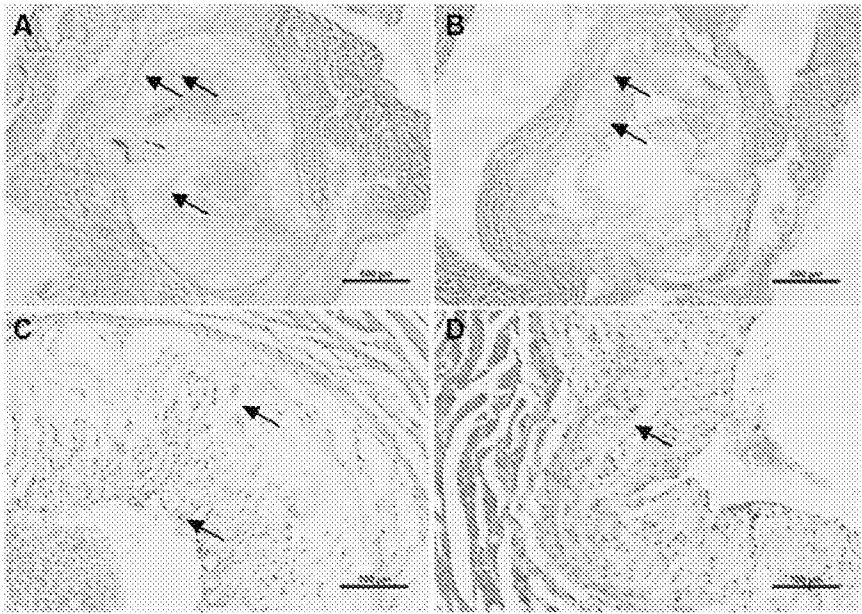


图12

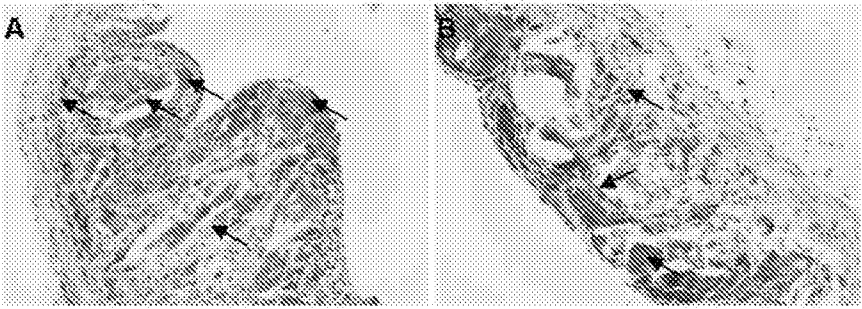


图13

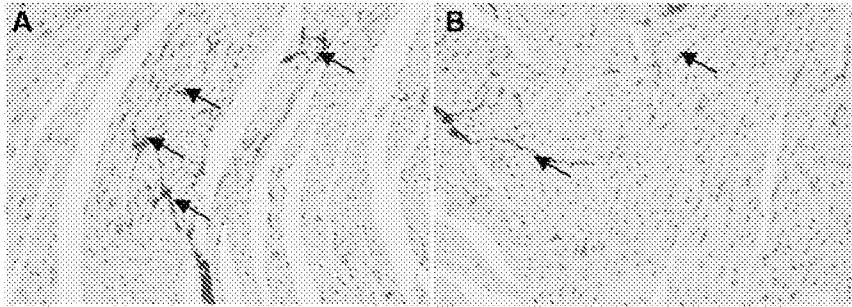


图14

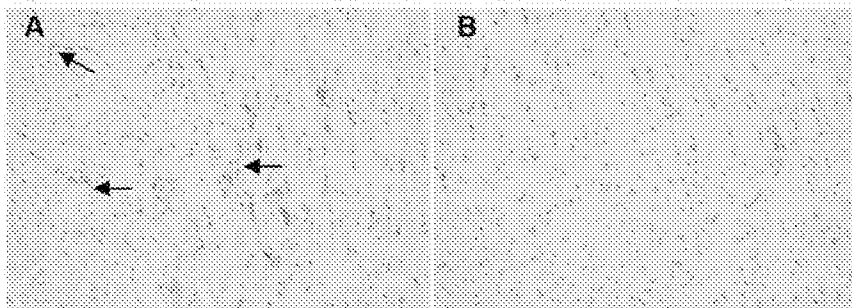


图15

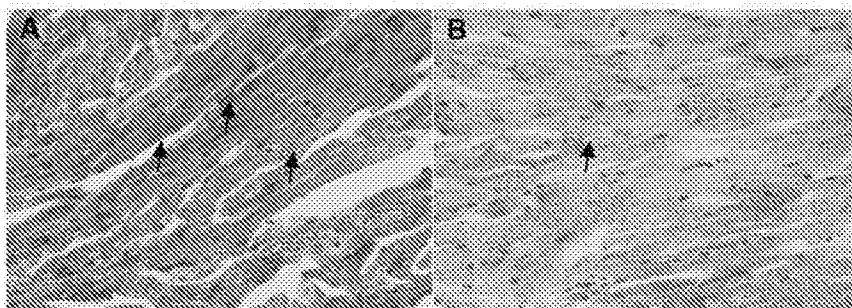


图16

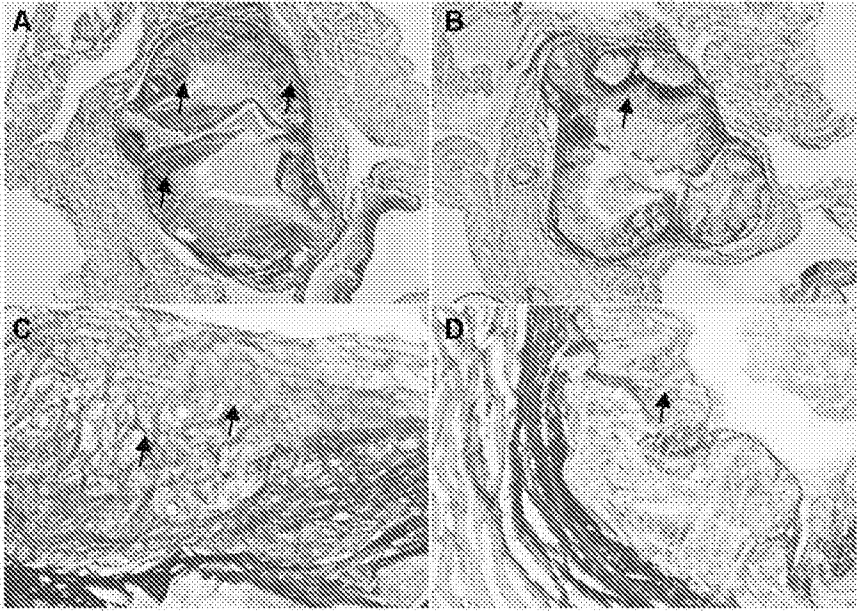


图17

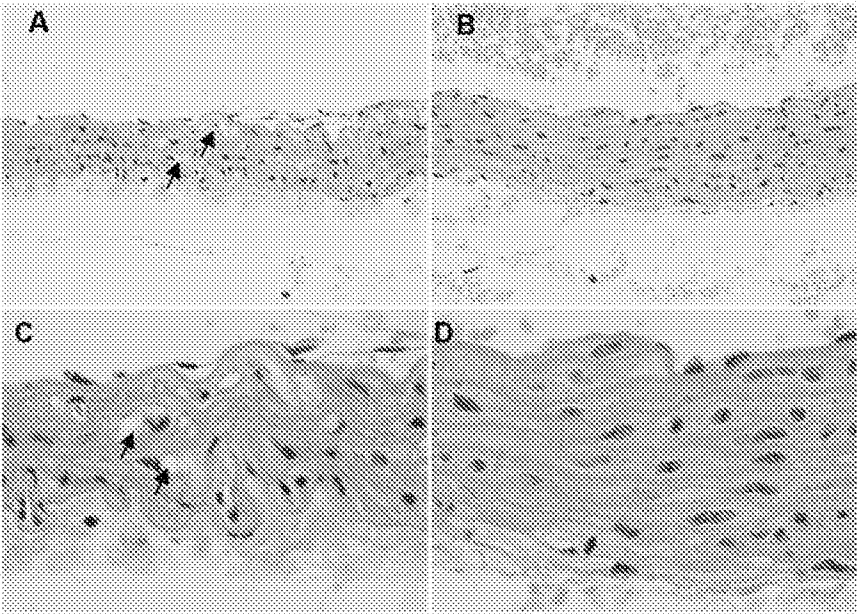


图18

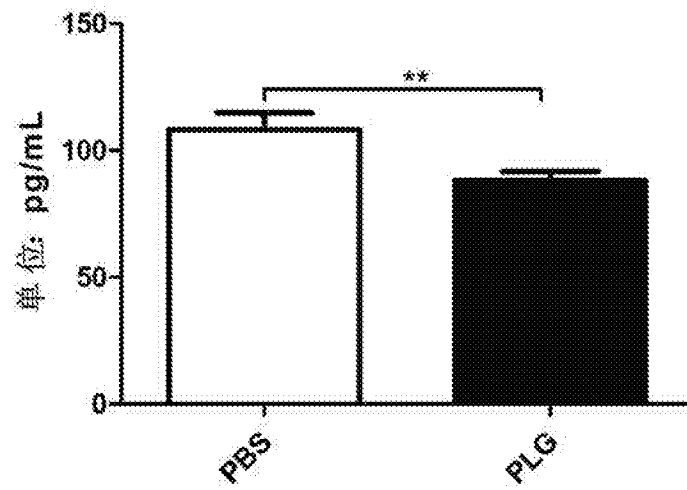


图19

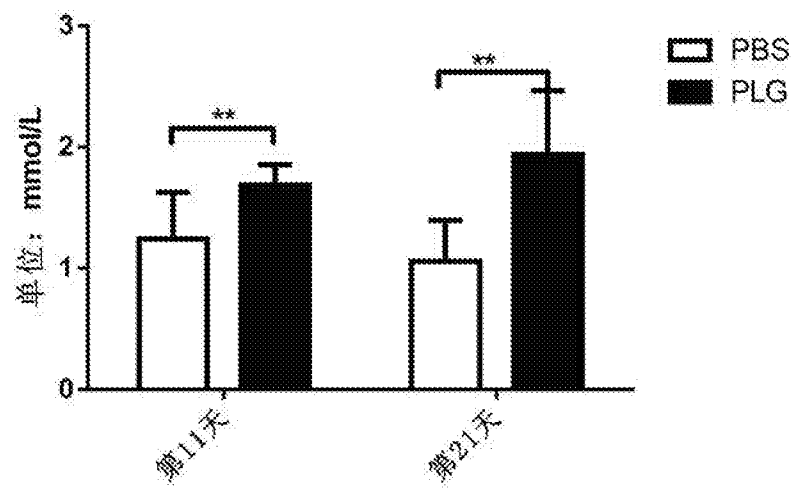


图20

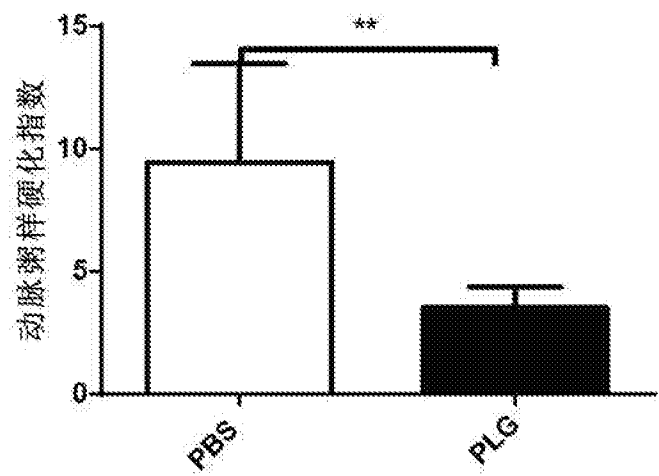


图21

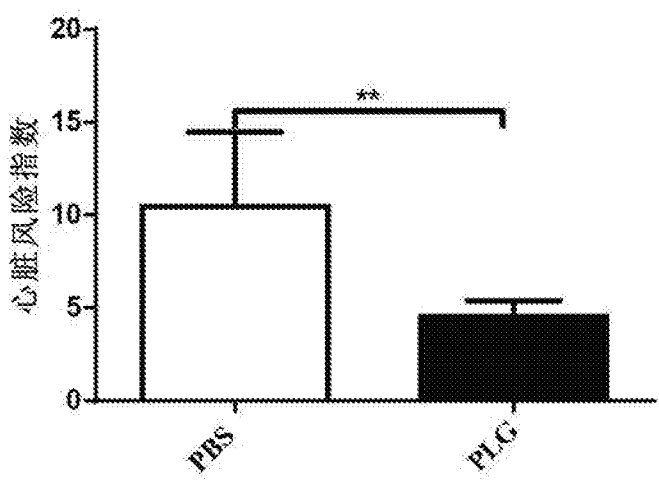


图22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/48 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; CNKI; CNTXT; WOTXT; USTXT; EPTXT; PubMed; GenBank; EBI-EMBL; ISI Web of Knowledge; PATENTICS: 李季男, 深圳瑞健生命科学研究院有限公司, 纤溶酶原, 变体, 片段, 动脉粥样硬化, 并发症, 高脂血症, 糖尿病, 冠心病, 心绞痛, 心肌梗死, 心律失常, 心衰, 脑缺血, 脑血栓, 脑萎缩, 脑出血, 脑栓塞, 高血压, 肾衰, 尿毒症, 肠坏死, 脂蛋白, 沉积, 联用, plasminogen, PLG, atheroscler+, artherosclerosis, arteriosclerosis, thromb+, heart disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	尹桂芝等. 人纤溶酶原 Kringle5 区的基因克隆的表达及纯化. 上海第二医科大学学报. 28 February 2005 (28.02.2005), 25(02), pp. 151-154. (Academic Journal of Shanghai Second Medical University), non-official translation (YIN, Guizhi et al. Expression and purification of the gene clone of human plasminogen Kringle5 region.)	1, 2, 4-8, 17, 18, 26-47
Y	尹桂芝等. 人纤溶酶原 Kringle5 区的基因克隆的表达及纯化. 上海第二医科大学学报. 28 February 2005 (28.02.2005), 25(02), pp. 151-154. (Academic Journal of Shanghai Second Medical University), non-official translation (YIN, Guizhi et al. Expression and purification of the gene clone of human plasminogen Kringle5 region.)	3, 9-14, 16, 19-25

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 24 August 2017	Date of mailing of the international search report 08 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Ying Telephone No. (86-10) 62413889

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	姜国辉等. 抗栓与溶栓药物的研究进展. 生化药物杂志. 31 December 1991 (31.12.1991), no. 01, pp. 1-4. (Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics), non-official translation (JIANG, Guohui et al. Research progress of antithrombotic and thrombolytic drugs.)	15, 26-47
Y	姜国辉等. 抗栓与溶栓药物的研究进展. 生化药物杂志. 31 December 1991 (31.12.1991), no. 01, pp. 1-4. (Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceutics), non-official translation (JIANG, Guohui et al. Research progress of antithrombotic and thrombolytic drugs.)	3, 9-14, 16, 19-25
X	CN 102199587 A (GUANGDONG PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 28 September 2011 (28.09.2011), claim 10, description, paragraph [0001]	15, 26-47
X	CN 102482338 A (THROMBOGENICS N.V.) 30 May 2012 (30.05.2012), claims 14-16, description, paragraphs [0109]-[0111]	20-47
Y	CN 102482338 A (THROMBOGENICS N.V.) 30 May 2012 (30.05.2012), claims 14-16, description, paragraphs [0109]-[0111]	3, 9-14, 16
A	WO 0048595 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 24 August 2000 (24.08.2000), entire document	1-47
A	WO 0049871 A1 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 31 August 2000 (31.08.2000), entire document	1-47
A	CN 101918548 A (TALECRIS BIOTHERAPEUTICS INC.) 15 December 2010 (15.12.2010), entire document	1-47
A	马端. 血栓形成和动脉粥样硬化的分子学关系. 国外医学. 脑血管疾病分册. 31 December 1994 (31.12.1994), 02(04), pp.195-197. (Cerebrovascular Diseases Foreign Medical Sciences), non-official translation (Ma, Duan. Molecular relations between thrombosis and atherosclerosis.)	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089045

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☒ in electronic form

b. (time)

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

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089045

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.: 1-39
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 1-39 are directed to methods of treatment of diseases and therefore do not comply with the provisions of PCT Rule 39.1(iv). This report has been made based on that the claims 1-39 are modified as claims of pharmaceutical use.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089045

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102199587 A	28 September 2011	CN 102199587 B	19 June 2013
CN 102482338 A	30 May 2012	US 2012114630 A1	10 May 2012
		RU 2564131 C2	27 September 2015
		IL 217113 D0	29 February 2012
		US 9226953 B2	05 January 2016
		AU 2010270146 B9	02 April 2015
		MX 2012000475 A	26 March 2012
		WO 2011004011 A1	13 January 2011
		JP 2012532596 A	20 December 2012
		JP 5819293 B2	24 November 2015
		AU 2010270146 A1	02 February 2012
		NZ 597452 A	25 October 2013
		CN 102482338 B	28 September 2016
		KR 20120050442 A	18 May 2012
		ZA 201200191 B	26 September 2012
		CA 2767612 A1	13 January 2011
		EP 2451835 A1	16 May 2012
		RU 2012103949 A	20 August 2013
		AU 2010270146 B2	05 February 2015
WO 0048595 A1	24 August 2000	AU 772186 B2	08 April 2004
		IL 144027 A	19 August 2007
		IL 144027 D0	21 April 2002
		CA 2362330 A1	24 August 2000
		JP 2002537254 A	05 November 2002
		AU 2758500 A	04 September 2000
		EP 1154769 A1	21 November 2001
		US 6465424 B1	15 October 2002
		EP 1154769 A4	11 September 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089045

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 0049871 A1	31 August 2000	WO 0049871 A9	20 June 2002
		AU 3605800 A	14 September 2000
CN 101918548 A	15 December 2010	HK 1146089 A1	23 October 2015
		IL 205936 D0	30 November 2010
		CA 2707266 A1	11 June 2009
		NZ 585715 A	25 November 2011
		ZA 201003730 B	28 November 2012
		US 2011003332 A1	06 January 2011
		KR 20100102135 A	20 September 2010
		AU 2008331545 B2	16 January 2014
		CN 101918548 B	16 October 2013
		JP 5539896 B2	02 July 2014
		ES 2534040 T3	16 April 2015
		EP 2220221 A1	25 August 2010
		NZ 593837 A	25 January 2013
		US 8512980 B2	20 August 2013
		US 8182808 B2	22 May 2012
		PT 2220221 E	16 April 2015
		US 8101394 B2	24 January 2012
		US 2012093799 A1	19 April 2012
		IL 205936 A	30 April 2015
		WO 2009073471 A1	11 June 2009
		KR 101529743 B1	17 June 2015
		CA 2707266 C	31 December 2013
		AU 2008331545 A1	11 June 2009
		HU E024916 T2	29 February 2016
		MX 2010005947 A	10 September 2010
		JP 2011505140 A	24 February 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/089045

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2012276611 A1	01 November 2012
		BR PI0819780 A2	11 August 2015
		EP 2220221 B1	31 December 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089045

A. 主题的分类

A61K 38/48(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNKI;CNTXT;WOTXT;USTXT;EPTXT;PubMed;GenBank;EBI-EMBL;ISI Web of Knowledge;PATENTICS:李季男, 深圳瑞健生命科学研究院有限公司, 纤溶酶原, 变体, 片段, 动脉粥样硬化, 并发病, 高脂血症, 糖尿病, 冠心病, 心绞痛, 心肌梗死, 心律失常, 心衰, 脑缺血, 脑血栓, 脑萎缩, 脑出血, 脑栓塞, 高血压, 肾衰, 尿毒症, 肠坏死, 脂蛋白, 沉积, 联用, plasminogen, PLG, atheroscler+, arteriosclerosis, arteriosclerosis, thromb+, heart disease

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	尹桂芝等. "人纤溶酶原Kringle5区的基因克隆的表达及纯化" 上海第二医科大学学报, 第25卷, 第02期, 2005年 2月 28日 (2005 - 02 - 28), 第151-154页	1-2, 4-8, 17-18, 26-47
Y	尹桂芝等. "人纤溶酶原Kringle5区的基因克隆的表达及纯化" 上海第二医科大学学报, 第25卷, 第02期, 2005年 2月 28日 (2005 - 02 - 28), 第151-154页	3, 9-14, 16, 19-25
X	姜国辉等. "抗栓与溶栓药物的研究进展" 生化药物杂志, 第01期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第1-4页	15, 26-47
Y	姜国辉等. "抗栓与溶栓药物的研究进展" 生化药物杂志, 第01期, 1991年 12月 31日 (1991 - 12 - 31), 第1-4页	3, 9-14, 16, 19-25
X	CN 102199587 A (广东药学院) 2011年 9月 28日 (2011 - 09 - 28) 权利要求10, 说明书第[0001]段	15, 26-47

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 8月 24日

国际检索报告邮寄日期

2017年 9月 8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

授权官员

陈莹

电话号码 (86-10)62413889

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102482338 A (斯路姆基因公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 权利要求14-16, 说明书第[0109]-[0111]段	20-47
Y	CN 102482338 A (斯路姆基因公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 权利要求14-16, 说明书第[0109]-[0111]段	3, 9-14, 16
A	WO 0048595 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 2000年 8月 24日 (2000 - 08 - 24) 全文	1-47
A	WO 0049871 A1 (HENRY FORD HEALTH SYSTEM) 2000年 8月 31日 (2000 - 08 - 31) 全文	1-47
A	CN 101918548 A (泰勒克里斯生物治疗学公司) 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15) 全文	1-47
A	马端. “血栓形成和动脉粥样硬化的分子学关系” 国外医学. 脑血管疾病分册, 第02卷, 第04期, 1994年 12月 31日 (1994 - 12 - 31), 第195-197页	1-47

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- ☐ 纸件形式
- ☒ 电子形式
- b. (提交时间)
- ☒ 含在申请提交时的国际申请中
- ☐ 以电子形式与国际申请一起提交
- ☐ 为检索之用随后提交本单位
2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 1-39
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1-39涉及疾病的治疗方法，不符合PCT条约39.1(iv)的规定，本报告基于其修改为
制药用途主题而作出的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/089045

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102199587	A	2011年 9月 28日	CN	102199587	B	2013年 6月 19日
CN	102482338	A	2012年 5月 30日	US	2012114630	A1	2012年 5月 10日
				RU	2564131	C2	2015年 9月 27日
				IL	217113	D0	2012年 2月 29日
				US	9226953	B2	2016年 1月 5日
				AU	2010270146	B9	2015年 4月 2日
				MX	2012000475	A	2012年 3月 26日
				WO	2011004011	A1	2011年 1月 13日
				JP	2012532596	A	2012年 12月 20日
				JP	5819293	B2	2015年 11月 24日
				AU	2010270146	A1	2012年 2月 2日
				NZ	597452	A	2013年 10月 25日
				CN	102482338	B	2016年 9月 28日
				KR	20120050442	A	2012年 5月 18日
				ZA	201200191	B	2012年 9月 26日
				CA	2767612	A1	2011年 1月 13日
				EP	2451835	A1	2012年 5月 16日
				RU	2012103949	A	2013年 8月 20日
				AU	2010270146	B2	2015年 2月 5日
WO	0048595	A1	2000年 8月 24日	AU	772186	B2	2004年 4月 8日
				IL	144027	A	2007年 8月 19日
				IL	144027	D0	2002年 4月 21日
				CA	2362330	A1	2000年 8月 24日
				JP	2002537254	A	2002年 11月 5日
				AU	2758500	A	2000年 9月 4日
				EP	1154769	A1	2001年 11月 21日
				US	6465424	B1	2002年 10月 15日
				EP	1154769	A4	2002年 9月 11日
WO	0049871	A1	2000年 8月 31日	WO	0049871	A9	2002年 6月 20日
				AU	3605800	A	2000年 9月 14日
CN	101918548	A	2010年 12月 15日	HK	1146089	A1	2015年 10月 23日
				IL	205936	D0	2010年 11月 30日
				CA	2707266	A1	2009年 6月 11日
				NZ	585715	A	2011年 11月 25日
				ZA	201003730	B	2012年 11月 28日
				US	2011003332	A1	2011年 1月 6日
				KR	20100102135	A	2010年 9月 20日
				AU	2008331545	B2	2014年 1月 16日
				CN	101918548	B	2013年 10月 16日
				JP	5539896	B2	2014年 7月 2日
				ES	2534040	T3	2015年 4月 16日
				EP	2220221	A1	2010年 8月 25日
				NZ	593837	A	2013年 1月 25日
				US	8512980	B2	2013年 8月 20日
				US	8182808	B2	2012年 5月 22日
				PT	2220221	E	2015年 4月 16日
				US	8101394	B2	2012年 1月 24日
				US	2012093799	A1	2012年 4月 19日
				IL	205936	A	2015年 4月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/089045

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 2009073471 A1	2009年 6月 11日
		KR 101529743 B1	2015年 6月 17日
		CA 2707266 C	2013年 12月 31日
		AU 2008331545 A1	2009年 6月 11日
		HU E024916 T2	2016年 2月 29日
		MX 2010005947 A	2010年 9月 10日
		JP 2011505140 A	2011年 2月 24日
		US 2012276611 A1	2012年 11月 1日
		BR PI0819780 A2	2015年 8月 11日
		EP 2220221 B1	2014年 12月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)