(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2021 年 9 月 30 日 (30.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/190561 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/48 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/082715

(22) 国际申请日: 2021 年 3 月 24 日 (24.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010212922.4 2020年3月24日 (24.03.2020) CN

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

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

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

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

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

WO 2021/190561 A1

(54) **Title:** METHOD AND DRUG FOR TREATING PARKINSON'S DISEASE

(54) 发明名称: 一种治疗帕金森病的方法和药物

(57) **Abstract:** Provided is a method for preventing and treating Parkinson's disease, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of plasminogen activation pathway components. The present invention relates to a drug, a pharmaceutical composition, a product and a kit which comprise the plasminogen activation pathway components for treating the described condition.

(57) 摘要: 提供一种预防和治疗帕金森病的方法，包括给药受试者治疗有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径组分；涉及用于治疗上述病症的包含纤维蛋白溶酶原激活途径组分的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

一种治疗帕金森病的方法和药物

技术领域

本发明涉及一种治疗帕金森病的方法，包括给药受试者有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物，例如纤溶酶原，以改善临床症状和体征。

背景技术

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是一种常见的神经系统变性疾病，老年人多见，平均发病年龄为 60 岁左右，40 岁以下起病的青年帕金森病较少见。大部分帕金森病患者为散发病例，仅有不到 10%的患者有家族史。帕金森病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺（dopamine, DA）能神经元的变性死亡，由此而引起纹状体 DA 含量显著性减少而致病。导致这一病理改变的确切病因目前仍不清楚，遗传因素、环境因素、年龄老化、氧化应激等均可能参与 PD 多巴胺能神经元的变性死亡过程。

帕金森病突出的病理改变是中脑黑质多巴胺（dopamine, DA）能神经元的变性死亡、纹状体 DA 含量显著性减少以及黑质残存神经元胞质内出现嗜酸性包涵体，即路易小体（Lewy body）。除多巴胺能系统外，帕金森病患者的非多巴胺能系统也有明显的受损。如 Meynert 基底核的胆碱能神经元，蓝斑的去甲肾上腺素能神经元，脑干中缝核的 5-羟色胺能神经元，以及大脑皮质、脑干、脊髓、以及外周自主神经系统的神经元。纹状体多巴胺含量显著下降与帕金森病运动症状的出现密切相关。中脑-边缘系统和中脑-皮质系统多巴胺浓度的显著降低与帕金森病患者出现智能减退、情感障碍等密切相关。

帕金森病起病隐袭，进展缓慢。首发症状通常是一侧肢体的震颤或活动笨拙，进而累及对侧肢体。临床上主要表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍。近年来人们越来越多的注意到抑郁、便秘和睡眠

障碍等非运动症状也是帕金森病患者常见的主诉，它们对患者生活质量的影响甚至超过运动症状。

药物治疗是帕金森病最主要的治疗手段，能在一定程度上改善症状，但不能阻止病情的进展，需要寻找其他的治疗方法和药物。

发明概述

本发明研究发现纤溶酶原能够促进帕金森病受试者记忆功能恢复、改善认知能力、促进黑质 DTA 表达、促进纹状体尼氏体恢复、促进黑质 GLP-1R 表达、增加黑质 TH 阳性细胞数量、促进纹状体髓鞘修复、促进脑组织中 α-突触核蛋白降解、促使纹状体 NF 表达、促进轴索损伤修复、减少纹状体 GFAP 表达、减轻纹状体神经元损伤、促进脑组织中 Pro-BDNF 裂解形成 BDNF、改善抑郁或焦虑症状，从而具有开发成为治疗帕金森病药物的潜力。

具体地，本发明涉及如下各项：

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

一方面，本申请涉及选自如下的一种或多种化合物在制备治疗帕金森病的药物中的用途，所述一种或多种化合物选自：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

一方面，本申请涉及用于治疗帕金森病的包含选自如下的一种或多种化合物的药物或药物组合物，所述一种或多种化合物选自：纤维蛋白溶酶

原激活途径的组分、能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物、模拟纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶之活性的化合物、能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的化合物、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、tPA 或 uPA 类似物和纤溶抑制剂的拮抗剂。

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

3. 项 1 的方法、用途、药物或药物组合物，所述纤溶抑制剂的拮抗剂为 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白的抑制剂，例如抗体。

4．项 1-3 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述化合物对帕金森病受试者具有如下一项或多项作用：促进记忆功能恢复、改善认知能力、促进黑质 DTA 表达、促进纹状体尼氏体恢复、促进黑质 GLP-1R 表达、增加黑质 TH 阳性细胞数量、促进纹状体髓鞘修复、促进脑组织中 α-突触核蛋白降解、促使纹状体 NF 表达、促进轴索损伤修复、减少纹状体 GFAP 表达、减轻纹状体神经元损伤、促进脑组织中 Pro-BDNF 裂解形成 BDNF、缓解抑郁或焦虑症状。

5. 项 1-4 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述化合物为纤溶酶原。

6. 项 1-5 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述纤溶酶原为人全长纤溶酶原或其保守取代变体。

7. 项 1-5 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述纤溶酶原与序列 2 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或

99%的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原的赖氨酸结合活性或蛋白水解活性。

8. 项 1-5 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，所述纤溶酶原包含与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列、并且仍然具有纤溶酶原的蛋白水解活性的蛋白质。

9.项 1-5 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原的蛋白水解活性的变体。

10. 项 1-5 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，所述纤溶酶原包含序列 2、6、8、10、12 所示的氨基酸序列或包含序列 2、6、8、10、12 所示氨基酸序列的保守取代变体。

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

12. 项 11 的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述其他治疗方法包括细胞治疗（包括干细胞治疗）和物理治疗。

13. 项 11 的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述其他药物为治疗帕金森病的其它药物。

14. 项 1-13 任一项的方法、用途、药物或药物组合物，其中所述化合物通过鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、静脉内、腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内(例如经由颈动脉)或肌肉内给药。在本发明的上述任一实施方案中，所述纤溶酶原可与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性。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，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的蛋白质。

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，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的蛋白质。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，例如蛋白水解活性的变体。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，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的变体或片段。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，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的变体或片段。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投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投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。

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

200 mg/cm2、1-100 mg/cm2、 10-100 mg/cm2（以每平方厘米体表面积计算）的剂量施用，优选至少重复一次，优选至少每天施用。

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

附图简述

图 1 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验总运动路程统计结果。结果显示，空白对照组小鼠在实验期间会运动一定路程；给药纤溶酶原组小鼠总运动路程明显短于溶媒对照组，统计差异显著（*表示 P<0.05），且给纤溶酶原组小鼠总运动路程接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 2 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验边界区静息时间率统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区静息时间率；给纤溶酶原组小鼠边界区静息时间率明显大于溶媒对照组，统计差异极为显著（**表示 P<0.01），且给纤溶酶原组边界区静息时间率接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 3 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验边界区运动路程统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区运动路程；给纤溶酶原组小鼠边界区运动路程明显小于溶媒对照组，统计差异接近显著（P=0.05），且给药纤溶酶原组边界区运动路程接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 4 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验边界区运动路程百分率统计结果。结果显示，空白对照组具有一定的边界区运动路程百分率；给纤溶酶原组小鼠边界区运动路程百分率明显大于溶媒对照组，统计极为差异显著（**表示 P<0.01），且给纤溶酶原组边界区运动路程百分率接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 5 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验边界区慢速运动时间百分率计算结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区慢速运动时间百分率；给药纤溶酶原组小鼠边界慢速运动时间百分率明显低于溶媒对照组，统计差异极为显著（**表示 P<0.01）；且给纤溶酶原组边界慢速运动时间率接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 6 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验边界区时间百分率统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区时间百分率；给纤溶酶原组小鼠边界区时间百分率高于溶媒对照组，统计差异接近显著（P=0.06），且给药纤溶酶原组边界区时间百分率接近空白对照组。说明纤溶酶原可提高帕金森模型小鼠趋避性行为水平，缓解其焦虑。

图 7 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验进入边界区次数统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定进入边界区次数；给药纤溶酶原组小鼠进入边界区次数明显少于溶媒组，统计差异显著（*表示 P<0.05），且给药纤溶酶原组小鼠进入边界次数接近空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 8 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验中心区运动路程统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区运动路程；给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程明显低于溶媒对照组小鼠，统计差异显著（*表示 P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程接近空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 9 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验中心区运动路程百分率统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区运动路程百分率；给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程百分率明显低于溶媒对照组小鼠，统计差异显著（*表示 P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程百分率接近空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 10 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验中心区最大运动速度统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区最大运动速度；给药纤溶酶原组小鼠中心区最大运动速度明显小于溶媒对照组，统计

差异极为显著（**表示 P<0.01），且给纤溶酶原组中心区最大运动速度接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 11 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验中心区时间百分率统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定地进入中心区时间百分率；给药纤溶酶原组小鼠中心区时间百分率明显小于溶媒对照组，统计差异接近显著（P=0.06）；且给纤溶酶原组小鼠进入中心区时间百分率接近于空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 12 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验进入中心区次数统计结果。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的进入中心区次数；给药纤溶酶原组小鼠进入中心区次数明显少于溶媒对照组，统计差异明显（*表示 P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠进入中心区次数接近空白对照组。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 13 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠旷场实验运动轨迹代表性图片。结果显示，空白对照组小鼠几乎没有中心区活动；给药纤溶酶原组小鼠表现出中心区活动明显减少的趋势相比于溶媒对照组，且接近于空白对照组小鼠。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

图 14A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质 DTA 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，空白对照组小鼠黑质多巴胺神经元表达一定量的 DTA（箭头标识），溶媒组小鼠黑质 DTA 的表达量低于空白对照组，而给药纤溶酶原组小鼠黑质 DTA 的表达量高于溶媒组，且接近空白对照组。该结果表明纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质 DTA 的表达。

图 15A-D 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠纹状体焦油紫染色结果。A 为空白对照组，B 为溶媒对照组，C 为给纤溶酶原组，D 为纹状体尼氏体数量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠纹状体神经元存在一定数量的尼氏体（箭头标识）；溶媒对照组小鼠纹状体神经元尼氏体数量明显多于空白对照组，且统计差异接近显著（P=0.085）；给纤溶酶原组小鼠纹状体神经元尼氏体数量与空白对照组无明显差异，但明显低于溶媒对照

组，且统计差异显著（*表示 P<0.05）。该结果表明纤溶酶原能够影响帕金森模型小鼠纹状体尼氏体数量。

图 16A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质焦油紫染色结果。A 为空白对照组，B 为溶媒对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，空白对照组小鼠黑质中有一定量的尼氏体（箭头标识）；溶媒对照组小鼠黑质中尼氏体数少于空白对照组；给纤溶酶原组小鼠黑质尼氏体数高于溶媒组。该结果表明纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质尼氏体恢复。

图 17A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质 GLP-1R 免疫组化结果。A 为溶媒 PBS 组，B 为给纤溶酶原组，C 为平均光密度定量分析结果。结果显示，给纤溶酶原组小鼠黑质 GLP-1R 的表达量（箭头标识）明显多于溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著（*表示 P<0.05）。该结果表明，纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠黑质 GLP-1R 的表达。

图 18A-D 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质 TH 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒 PBS 组，C 为给纤溶酶原组，D 为定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠黑质中存在一定量的 TH 阳性细胞（箭头标识），溶媒组小鼠黑质中 TH 阳性细胞数减少，给纤溶酶原组小鼠黑质中 TH 阳性细胞数明显高于溶媒组。该结果表明纤溶酶原可恢复帕金森模型小鼠黑质中 TH 阳性细胞。

图 19 A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质 Iba-1 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒 PBS 组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，空白对照组小鼠黑质有一定量的小胶质细胞（箭头标识），溶媒组小鼠黑质中小胶质细胞数高于空白对照组，给纤溶酶原组小鼠黑质中小胶质细胞数明显低于溶媒对照组，且接近于空白对照组。该结果显示纤溶酶原可促使帕金森模型小鼠黑质小胶质细胞恢复。

图 20 A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠纹状体 LFB 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒 PBS 组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，空白对照组小鼠纹状体存在一定量的髓鞘，溶媒组小鼠纹状体髓鞘数少于空白对照组，给纤溶酶原组小鼠纹状体髓鞘数明显高于溶媒组。该结果显示纤溶酶原可使帕金森模型小鼠纹状体髓鞘恢复。

图 21 A-D 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠黑质α-突触核蛋白（α-synuclein）免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给纤溶酶原组，D 为平均光密度定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠黑质仅有少量的α-突触核蛋白；溶媒组小鼠黑质α-突触核蛋白的量明显高于空白对照组（*表示 P<0.05）；给纤溶酶原组小鼠黑质α-突触核蛋白的量明显低于溶媒组，且统计差异显著（*表示 P<0.05）；给纤溶酶原组小鼠黑质α-突触核蛋白的量趋近于空白对照组的。说明纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠黑质α-突触核蛋白的表达，改善神经损伤变性。

图 22 A-D 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠纹状体 NF 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给纤溶酶原组，D 为平均光密度定量分析结果。结果显示，空白对照组小鼠纹状体有一定量的 NF（箭头标识）；溶媒组小鼠纹状体 NF 的量低于空白对照组；给纤溶酶原组小鼠纹状体中 NF 的量明显高于溶媒组，且统计差异极显著（**表示 P<0.01）。说明纤溶酶原可促使帕金森模型小鼠纹状体 NF 表达的恢复，改善帕金森纹状体轴索损伤。

图 23 A-C 给予纤溶酶原 14 天后帕金森模型小鼠纹状体 GFAP 免疫组化结果。A 为空白对照组，B 为溶媒组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，空白对照组小鼠纹状体有少量的 GFAP 表达（箭头标识），溶媒组小鼠纹状体 GFAP 的表达明显高于空白对照组；给纤溶酶原组小鼠纹状体 GFAP 的表达低于溶媒组。说明纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠纹状体 GFAP 表达，减轻纹状体损伤。

图 24 A-D 在小鼠脑匀浆中纤溶酶原对α-突触核蛋白的作用结果。A 为 Tricine-page，B、C、D 分别为α-突触核蛋白、聚合物 a、聚合物 b 条带扫描定量分析结果。结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组（***代表 P＜0.001），且其聚合物 a、b 的量均明显低于溶媒对照组（**代表 P＜0.01，***代表 P＜0.001）；在正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组（***代表 P＜0.001），且其聚合物 a、b 的量均明显低于溶媒对照组（*代表 P＜0.05，**代表 P＜0.01）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原可有效地促进人α-突触核蛋白及其聚合物降解。

图 25 A-C 在小鼠脑匀浆中纤溶酶原对重组人 α-突触核蛋白的作用结果。A 为 Western-blotting 图，B、C 分别为 α-突触核蛋白、聚合物条带扫描定量分析结果。结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组 α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组（**代表 P＜0.01），且其聚合物的量均明显低于溶媒对照组（***代表 P＜0.001）；在正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组 α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组（**代表 P＜0.01），且其聚合物的量均明显低于溶媒对照组（***代表 P＜0.001）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原可有效地促进重组人 α-突触核蛋白及其聚合物降解。

图 26 A-B 在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，纤溶酶原对重组人 Pro-BDNF 的作用，A 为 SDS-PAGE 成像图片，B 为 SDS-PAGE 条带定量分析结果。结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，给药纤溶酶原组 Pro-BDNF 的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（***代表 P＜0.001）。提示纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠脑匀浆中重组人 Pro-BDNF 裂解。

图 27A-C 在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，纤溶酶原对重组人 Pro-BDNF 的作用。A 为 Western blot 成像图片，B 为 Western blot 中 Pro-BDNF 条带光密度(OD)值分析结果，C 为 Western blot 中 BDNF 条带光密度(OD)值分析结果。结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，给药纤溶酶原组 Pro-BDNF 的量明显低于溶媒对照组，差异显著（*代表 P＜0.05，***表示 P＜0.001）；给药纤溶酶原组 BDNF 的量明显高于溶媒对照组，差异极为显著。提示纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠脑匀浆液重组人 Pro-BDNF 裂解和成熟 BDNF 形成。

发明详述

纤维蛋白溶解系统（Fibrinolytic system）也称纤溶系统，为参与纤维蛋白溶解（纤溶）过程的一系列化学物质组成的系统，主要包括纤维蛋白溶解酶原（纤溶酶原）、纤溶酶、纤溶酶原激活物、纤溶抑制剂。纤溶酶原激活物包括组织型纤溶酶原激活物（t-PA）和尿激酶型纤溶酶原激活物（u-PA）。t-PA 是一种丝氨酸蛋白酶，由血管内皮细胞合成。t-PA 激活纤溶酶原，此过程主要在纤维蛋白上进行；尿激酶型纤溶酶原激活物（u-

PA）由肾小管上皮细胞和血管内皮细胞产生，可以直接激活纤溶酶原而不需要纤维蛋白作为辅因子。纤溶酶原（PLG）由肝脏合成，当血液凝固时，PLG 大量吸附在纤维蛋白网上，在 t-PA 或 u-PA 的作用下，被激活为纤溶酶，促使纤维蛋白溶解。纤溶酶（PL）是一种丝氨酸蛋白酶，作用如下：降解纤维蛋白和纤维蛋白原；水解多种凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅹ、Ⅶ、Ⅺ、Ⅱ等；使纤溶酶原转变为纤溶酶；水解补体等。纤溶抑制物：包括纤溶酶原激活物抑制剂（PAI）和 α2 抗纤溶酶（α2-AP）。PAI 主要有 PAI-1 和 PAI-2 两种形式，能特异性与 t-PA 以 1：1 比例结合，从而使其失活，同时激活 PLG。α2-AP 由肝脏合成，与 PL 以 1：1 比例结合形成复合物，抑制 PL 活性；FⅩⅢ使 α2-AP 以共价键与纤维蛋白结合，减弱了纤维蛋白对 PL 作用的敏感性。体内抑制纤溶系统活性的物质：PAI-1，补体 C1 抑制物；α2 抗纤溶酶；α2 巨球蛋白。

本发明的术语“纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”涵盖：

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

2. 纤维蛋白溶酶以及它们的变体或类似物；和

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

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

本发明的“纤溶酶原变体”涵盖与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同一性，并

且仍然具有纤溶酶原活性，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的蛋白质。例如本发明的“纤溶酶原变体”可以是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、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，例如赖氨酸结合活性或蛋白水解活性的蛋白质。具体地，本发明纤溶酶原变体包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式，以及通过保守性氨基酸取代例如 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸获得的这些蛋白质的突变变体。

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

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

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

上述纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的“变体”或“类似物”是否分别具有纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 的活性，或者是否分别提供与纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 或 uPA 基本相似的作用可以通过本领域已知方法进行检测，例如，通过基于酶谱法

(enzymography)、ELISA(酶联免疫吸附测定)和 FACS(荧光激活细胞分选方法)通过激活的纤维蛋白溶酶活性水平来衡量，例如可以参照选自如下文献中记载的方法测量：Ny，A.，Leonardsson，G.，Hagglund，A.C，Hagglof，P.，Ploplis，V.A.，Carmeliet，P. and Ny，T. (1999). Ovulation inplasminogen-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.

在本发明的一些实施方案中，本发明的“纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”为纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为人全长纤溶酶原或其保留纤溶酶原活性（例如其赖氨酸结合活性和蛋白水解活性）的保守取代变体。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（例如其赖氨酸结合活性或蛋白水解活性）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（例如其赖氨酸结合活性或蛋白水解活性）的保守取代变体或其片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的保守取代变体或其片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原包含如序列 2、6、8、10 或 12 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述纤溶酶原包含序列 2、6、8、10 或 12 所示的氨基酸序列的保守取代序列。在一些实施方案中，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，所述纤溶酶原为序列 2、6、8、10 或 12 所示的纤溶酶原的保守取代变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原或其保守突变体。在一些实施方案中，所述纤溶酶原是如序列 2 所示的人天然纤溶酶原或其保守取代变体。

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

本发明“纤溶抑制剂的拮抗剂”为拮抗、减弱、封闭、阻止纤溶抑制剂作用的化合物。所述纤溶抑制剂例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶和 α2 巨球蛋白。所述拮抗剂例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白的抗体，或阻断或下调例如 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白表达的反义 RNA 或小 RNA，或占据 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白的结合位点但无 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白功能的化合物”，或 封闭 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白的结合结构域和/或活性结构域的化合物。

纤溶酶是纤溶酶原激活系统（PA 系统）的关键组分。它是一种广谱的蛋白酶，能够水解细胞外基质（ECM）的几个组分，包括纤维蛋白、明胶、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖。此外，纤溶酶能将一些金属蛋白酶前体(pro-MMPs)激活形成具有活性的金属蛋白酶（MMPs）。因此纤溶酶被认为是胞外蛋白水解作用的一个重要的上游调节物。纤溶酶是由纤溶酶原通过两种生理性的 PAs：组织型纤溶酶原激活剂（tPA ）或尿激酶型纤溶酶原激活剂（uPA）蛋白水解形成的。由于纤溶酶原在血浆和其他体液中相对水平较高，传统上认为 PA 系统的调节主要通过 PAs 的合成和活性水平实现。PA 系统组分的合成受不同因素严格调节，如激素、生长因子和细胞因子。此外，还存在纤溶酶和 PAs 的特定生理抑制剂。纤溶酶的主要抑制剂是 α2-抗纤溶酶（α2-antiplasmin）。PAs 的活性同时被 uPA 和 tPA 的纤溶酶原激活剂抑制剂-1（PAI-1）抑制以及主要抑制 uPA 的溶酶原激活剂抑制剂-2（PAI-2）调节。某些细胞表面具有直接水解活性的 uPA 特异性细胞表面受体(uPAR)。

纤溶酶原是一个单链糖蛋白，由 791 个氨基酸组成，分子量约为 92 kDa。纤溶酶原主要在肝脏合成，大量存在于胞外液中。血浆中纤溶酶原含量约为 2 μM。因此纤溶酶原是组织和体液中蛋白质水解活性的一个巨大的

潜在来源。纤溶酶原存在两种分子形式：谷氨酸-纤溶酶原（Glu-plasminogen）和赖氨酸-纤溶酶原(Lys-plasminogen)。天然分泌和未裂解形式的纤溶酶原具有一个氨基末端（N-末端）谷氨酸，因此被称为谷氨酸-纤溶酶原。然而，在纤溶酶存在时，谷氨酸-纤溶酶原在 Lys76-Lys77 处水解成为赖氨酸-纤溶酶原。与谷氨酸-纤溶酶原相比，赖氨酸-纤溶酶原与纤维蛋白具有更高的亲和力，并可以更高的速率被 PAs 激活。这两种形式的纤溶酶原的 Arg560-Val561 肽键可被 uPA 或 tPA 切割，导致二硫键连接的双链蛋白酶纤溶酶的形成。纤溶酶原的氨基末端部分包含五个同源三环，即所谓的 kringles，羧基末端部分包含蛋白酶结构域。一些 kringles 含有介导纤溶酶原与纤维蛋白及其抑制剂 α2-AP 特异性相互作用的赖氨酸结合位点。最新发现一个纤溶酶原为 38 kDa 的片段，其中包括 kringles1-4，是血管生成的有效抑制剂。这个片段被命名为血管抑素，可通过几个蛋白酶水解纤溶酶原产生。

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

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

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

Cys103-Cys181，Kringle2 包括残基 Glu184-Cys262，Kringle3 包括残基 Cys275-Cys352，Kringle4 包括残基 Cys377-Cys454，Kringle5 包括残基 Cys481-Cys560。根据 NCBI 数据，丝氨酸蛋白酶域包括残基 Val581-Arg804。

Glu-纤溶酶原是人天然全长的纤溶酶原，由 791 个氨基酸组成（不含有 19 个氨基酸的信号肽），编码该序列的 cDNA 序列如序列 1 所示，其氨基酸序列如序列 2 所示。在体内，还存在一种是从 Glu-纤溶酶原的第 76-77 位氨基酸处水解从而形成的 Lys-纤溶酶原，如序列 6 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 5 所示。Delta-纤溶酶原 (δ-plasminogen)是全长纤溶酶原缺失了 Kringle2-Kringle5 结构的片段，仅含有 Kringle1 和丝氨酸蛋白酶域（也称蛋白酶结构域（protease domain，PD）），有文献报道了 delta-纤溶酶原的氨基酸序列（序列 8），编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 7 所示。小纤溶酶原（Mini-plasminogen）由 Kringle5 和丝氨酸蛋白酶域组成，有文献报道其包括残基 Val443-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸），其氨基酸序列如序列 10 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 9 所示。而微纤溶酶原（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），也有专利文献 CN102154253A 报道其序列包括残基 Lys531-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-纤溶酶原序列的 Glu 残基为起始氨基酸），在本专利申请中微纤溶酶原序列参考专利文献 CN102154253A，其氨基酸序列如序列 12 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 11 所示。

全长纤溶酶原的结构也描述在 Aisina 等(Aisina R B , Mukhametova L I . Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6):590-605)的文章中。在该文章中，Aisina 等描述纤溶酶原包括 Kringle1、2、3、4、5 结构域和丝氨酸蛋白酶结构域（也称蛋白酶结构域（protease domain，PD）），其中，Kringles 负责纤溶酶原与低分子量和高分子量的配体结合（即赖氨酸结合活性），导致纤溶酶原转变成一个更加开放的构型，从而更容易被活化；蛋白酶结构域

（PD）为残基 Val562-Asn791，tPA 和 UPA 特异性切割纤溶酶原的 Arg561-Val562 位活化键，从而使纤溶酶原形成纤溶酶，因此，蛋白酶结构域（PD）是赋予纤溶酶原蛋白水解活性的区域。本发明的“纤溶酶”与“纤维蛋白溶酶”、“纤维蛋白溶解酶”可互换使用，含义相同；“纤溶酶原”与“纤维蛋白溶酶原”、“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”的含义或活性为受试者体内纤溶酶原的含量比正常人低，低至足以影响所述受试者的正常生理功能；所述纤溶酶原“缺失”的含义或活性为受试者体内纤溶酶原的含量显著低于正常人，甚至活性或表达极微，只有通过外源提供才能维持正常生理功能。

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

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

的区域或其保守取代变体，或由选自 Kringle 1、Kringle 2、Kringle 3、Kringle 4、Kringle 5 中一个或多个的区域或其保守取代变体组成。在一些实施方案中，本发明所述的纤溶酶原包括含有上述纤溶酶原活性片段的蛋白质。目前，对于血液中纤溶酶原及其活性测定方法包括：对组织纤溶酶原激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤溶酶原激活剂抗原的检测(t-PAAg)、对血浆组织纤溶酶原活性的检测(plgA)、血浆组织纤溶酶原抗原的检测(plgAg) 、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤溶酶原激活剂抑制物抗原的检测、血浆纤维蛋白溶酶-抗纤维蛋白溶酶复合物检测(PAP)。其中最常用的检测方法为发色底物法：向受检血浆中加链激酶(SK)和发色底物，受检血浆中的 PLG 在 SK 的作用下，转变成 PLM，后者作用于发色底物，随后用分光光度计测定，吸光度增加与纤溶酶原活性成正比。此外也可采用免疫化学法、凝胶电泳、免疫比浊法、放射免疫扩散法等对血液中的纤溶酶原活性进行测定。

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

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

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

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用，指任何长度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸，化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸，和具有经修饰的肽主链的多肽。该术语包括融合蛋白，包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白，具有异源和同源前导序列(具有或没有 N 端甲硫氨酸残基)的融合物；等等。

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

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

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

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

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

本发明纤溶酶原的制备

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

将附接的固相游离 N 末端胺与单个受 N 保护的氨基酸单元偶联。然后，将此单元去保护，露出可以与别的氨基酸附接的新的 N 末端胺。肽保持固定在固相上，之后将其切掉。

可以使用标准重组方法来生产本发明的纤溶酶原。例如，将编码纤溶酶原的核酸插入表达载体中，使其与表达载体中的调控序列可操作连接。表达调控序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达调控可以是载体中的真核启动子系统，所述载体能够转化或转染真核宿主细胞(例如 COS 或 CHO 细胞)。一旦将载体掺入合适的宿主中，在适合于核苷酸序列的高水平表达及纤溶酶原的收集和纯化的条件下维持宿主。

合适的表达载体通常在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体 DNA 的整合部分复制。通常，表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性或新霉素抗性)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具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包含 3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分解酶。诱导型酵母启动子特别包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

在微生物外，哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达并生成本发明的抗-Tau 抗体(例如编码主题抗-Tau 抗体的多核苷酸)。参见 Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、和经转化的 B 细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列，如复制起点，启动子和增强子(Queen 等, Immunol. Rev. 89:49 (1986))，以及必需的加工信息位点，诸如核糖体结合位点，RNA 剪接位点，多聚腺苷酸化位点，和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见 Co 等, J. Immunol. 148:1149 (1992)。

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

药物配制剂

可以通过将具有所需纯度的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）与可选的药用载体，赋形剂，或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性，并包括缓冲剂例如磷酸盐，柠檬酸盐及其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化己烷双胺；氯化苄烷铵(benzalkonium chloride)，苯索氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；间甲酚)；低分子量多肽(少于约 10 个残基)；蛋白质如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸，谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；

螯合剂如 EDTA；糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇；成盐反离子如钠；金属复合物(例如锌-蛋白复合物)；和/或非离子表面活性剂，例如 TWEENTM，PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。优选冻干的抗-VEGF 抗体配制剂在 WO 97/04801 中描述，其包含在本文中作为参考。

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

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

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

本发明的纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质，例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、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－乙烯乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer，等，出处同上)，或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 Lupron DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酰脯氨酸(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，例如通过鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液或滴眼液，静脉内，腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内(例如经由颈动脉)、肌内、直肠给药来实现本发明药物组合物的施用。

用于胃肠外施用的制备物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和可注射有机酯，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为每天约0.0001 至 2000 mg/kg，或约 0.001 至 500 mg/kg (例如 0.02 mg/kg，0.25 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 0.01-100mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估治疗效果和安全性。

制品或药盒

本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒，其包含纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）。所述制品优选包括一个容器，标签或包装插页。适当的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。所述容器含有组合物，所述组合物可有效治疗本发明的疾病或病症并具有无菌入口(例如所述容器可为静脉内溶液包或小瓶，其含有可被皮下注射针穿透的塞子的)。所述组合物中至少一种活性剂为纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶

原）。所述容器上或所附的标签说明所述组合物用于治疗本发明所述病症。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器，诸如磷酸盐缓冲的盐水，林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者角度来看所需的其它物质，包括其它缓冲液，稀释剂，过滤物，针和注射器。此外，所述制品包含带有使用说明的包装插页，包括例如指示所述组合物的使用者将包含纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或其相关化合物（例如纤溶酶原）的组合物以及治疗伴随的疾病的其它药物给药患者。

实施例

以下所有实施例中使用的人纤溶酶原来自捐赠者血浆，基于如下文献描述的方法：KennethC Robbins,Louis Summaria,David Elwyn et al.Further Studies on the Purification and Characterization of Human Plasminogen and Plasmin. Journal of Biological Chemistry , 1965 , 240 (1) :541-550; Summaria L, Spitz F, Arzadon L et al. Isolation and characterization of the affinity chromatography forms of human Glu- and Lys-plasminogens and plasmins. J Biol Chem. 1976 Jun 25;251(12):3693-9 ; HAGAN JJ, ABLONDI FB, DE RENZO EC. Purification and biochemical properties of human plasminogen. J Biol Chem. 1960 Apr;235:1005-10，并进行工艺优化，从人捐赠者血浆中纯化所得。纤溶酶原单体的纯度>98%。

实施例 1 纤溶酶原改善帕金森模型小鼠自发活动及趋避性行为

取 10-12 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 28 只，造模前 1 天所有小鼠称重并根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 20 只。空白对照组小鼠腹腔注射生理盐水溶液 200μl，模型组小鼠按照 35mg/kg/只腹腔注射 1-甲基-4-苯基- 1, 2, 3, 6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[1]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（Sigma，M0896）溶解在 9ml 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/ml。造模完成后即造模第 6 天所有小鼠进行体重测量及旷场行为学检测。模型组小鼠按体重及旷场结果随机分为 2 组，给药组 10 只小鼠和溶媒组 10 只小鼠，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μl /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μl/只溶媒溶液(10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天进行旷场实验。

MPTP 是一种特定的强黑质毒素，其代谢产物 MPP+（1-methyl-4-phenylpyridinium)是线粒体复合体Ⅰ抑制剂，可透过血脑屏障，阻断线粒体氧化呼吸链等途径损伤黑质体和纹状体中多巴胺神经元，模拟人类帕金森症状[2]。

旷场实验

实验时，小鼠放入旷场（40×40×40cm）底面中心，同时进行摄像和计时，持续观察 5 分钟，每只小鼠进行 3 次实验。记录参数包括总移动距离、边界静息时间率、边界区运动路程、边界区运动路程百分率、边界区慢速运动时间百分率、边界区时间百分率、进入边界区次数、中心区运动路程、中心区运动路程百分率、中心区最大运动速度、中心区时间百分率、进入中心区次数、运动轨迹。每次实验后采用 70%酒精擦拭箱体防止嗅觉产生的偏好。

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

总体活动情况

总运动路程

总运动路程是指规定测试时间内运动轨迹的长度。

结果显示，空白对照组在实验期间会运动一定路程；给纤溶酶原组小鼠总运动路程明显短于溶媒对照组，统计差异显著（*表示 P<0.05），且给纤溶酶原组总运动路程接近于空白对照组（图 1）。说明纤溶酶原可使帕金森模型小鼠自发活动行为恢复。

边界区活动情况

边界区静息时间率

边界区为旷野周边区（四个角和四个边）。边界区静息时间率是指：边界区静息时间与总静息时间（包括边界区静息时间和中心区静息时间）的比值。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区静息时间率；给纤

溶酶原组小鼠边界区静息时间率明显大于溶媒对照组，统计差异极为显著（**表示 P<0.01），且给纤溶酶原组边界静息时间率接近于空白对照组（图 2）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性行为，缓解其焦虑。

边界区运动路程

边界区运动路程指规定测试时间内边界区运动轨迹的长度。结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界运动路程；溶媒对照组小鼠边界运动路程长于给纤溶酶原组，统计差异接近显著（P=0.05）；且给纤溶酶原组边界区运动路程接近空白对照组（图 3）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠的趋避性，缓解其焦虑。

边界区运动路程百分率

边界区运动路程百分率指边界区运动路程与总运动路程（包括边界区运动路程和中心区运动路程）的比值。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界运动路程百分率；给药纤溶酶原组小鼠边界区运动路程百分率明显高于溶媒对照组，统计差异极为显著（**表示 P<0.01）；且给药纤溶酶原组小鼠边界运动路程百分率接近空白对照组（图 4）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性行为，缓解其焦虑。

边界区慢速运动时间百分率

边界区慢速运动时间百分率指测试时间内边界区慢速运动的时间与总测试时间的比值。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区慢速运动时间百分率；给纤溶酶原组小鼠边界慢速运动时间百分率明显小于溶媒对照组，统计差异极为显著（**表示 P<0.01）；且给纤溶酶原组边界慢速运动时间百分率接近于空白对照组（图 5）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

边界区时间百分率

边界区时间百分率指边界区时间与总的测试时间的比值。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的边界区时间百分率；给纤溶酶原组小鼠边界区时间百分率明显高于溶媒对照组小鼠，统计差异接近显著

（P=0.06），且给药纤溶酶原组边界区时间百分率接近空白对照组（图6）。说明纤溶酶原可提高帕金森模型小鼠趋避性行为水平，缓解其焦虑。

进入边界区次数

结果显示，空白对照组小鼠具有一定进入边界区次数；给纤溶酶原组小鼠进入边界区次数明显低于溶媒对照组小鼠，统计差异显著（*表示P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠进入边界区的次数接近空白对照组（图7）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

中心区活动情况

中心区运动路程

中心区运动路程指测试时间内中心区运动轨迹的长度。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区运动路程；给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程明显低于溶媒对照组小鼠，统计差异显著（*表示P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程接近空白对照组（图8）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠的趋避性，缓解其焦虑。

中心区运动路程百分率

中心区运动路程百分率指测试时间内中心区运动轨迹的长度与总的运动轨迹长度的比值。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区运动路程百分率；给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程百分率明显低于溶媒对照组小鼠，统计差异显著（*表示 P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠中心区运动路程百分率接近空白对照组（图 9）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

中心区最大运动速度

中心区最大运动速度指测试时间内中心区的最快运动速度。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定的中心区最大运动速度；给药纤溶酶原组小鼠中心区最大运动速度明显小于溶媒对照组，统计差异极为明显（**表示 P<0.01），且给纤溶酶原组中心区最大运动速度接近于空白对照组（图 10）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

中心区时间百分率

中心区时间百分率指中心区的运动时间与总测试时间的比值。

结果显示，空白对照组小鼠具有一定地进入中心区时间百分率；给药纤溶酶原组小鼠中心区时间百分率明显小于溶媒对照组，统计差异接近显著（P=0.06）；且给纤溶酶原组中心区时间百分率接近于空白对照组（图11）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

进入中心区次数

结果显示，空白对照组小鼠很少进入中心区，表现出正常的趋避天性；给药纤溶酶原组小鼠进入中心区次数明显少于溶媒对照组，统计差异明显（*表示 P<0.05）；且给药纤溶酶原组小鼠进入中心区次数接近空白对照组（图 12）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

运动轨迹

结果显示，旷场实验期间空白对照组小鼠具有一定的总运动路程并且几乎没有中心区活动；相比于溶媒对照组，给药纤溶酶原组小鼠表现出总运动路程和中心区活动均有明显减少的趋势，且接近于空白对照组小鼠（图 13）。说明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠趋避性，缓解其焦虑。

实施例 2 纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质 DTA 表达

取 10-12 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只，造模前 1 天所有小鼠称重并根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 32 只。空白对照组小鼠腹腔注射溶媒溶液 200μl，模型组小鼠按照 40mg/kg/只腹腔注射 1-甲基- 4-苯基- 1, 2, 3, 6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[1]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（Sigma，M0896）溶解在 9ml 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/ml。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分为两组，溶媒组和给药组，每组各 16 只，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μl /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μl/只溶媒溶液（10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠黑质于 10%中性甲醛溶液固定 24-48 小时。固定后的黑质组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为 3μm，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，

0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗鼠多巴胺转运蛋白(dopamine transporter，DAT)抗体(ab7260, Abcam) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories, Inc,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

帕金森病（Parkinson disease，PD）是一种神经退行性疾病，其病理特征为黑质纹状体多巴胺能神经元进行性死亡，以及残存的多巴胺能神经元胞浆内路易小体形成，基底节区多巴胺缺乏，进而导致发生 PD 经典运动障碍症状。多巴胺转运蛋白(dopamine transporter，DAT)位于多巴胺神经元突触前膜，能重新摄取释放至突触间隙的多巴胺递质，反映多巴胺神经元突触前功能。DAT 减少与 PD 发展关系密切[3]。

结果显示，空白对照组（图 14A）小鼠黑质多巴胺神经元表达一定量的 DTA（箭头标识），溶媒组（图 14B）小鼠黑质 DTA 的表达量低于空白对照组，给药纤溶酶原组（图 14C）小鼠黑质 DTA 的表达量高于溶媒组。该结果表明纤溶酶原可增强帕金森模型小鼠黑质 DTA 的表达。

实施例 3 纤溶酶原可促使帕金森模型小鼠纹状体尼氏体恢复

取 10-12 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只，造模前 1 天所有小鼠称重并根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 32 只。空白对照组小鼠腹腔注射溶媒溶液 200μl，模型组小鼠按照 40mg/kg/只腹腔注射 1-甲基- 4-苯基- 1, 2, 3, 6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[1]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（Sigma，M0896）溶解在 9ml 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/ml。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分为两组，溶媒组和给药组，每组各 16 只，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μl /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μl/只溶媒溶液(10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠纹状体于 10%中性甲醛溶液固定 24-48 小时。固定后的纹

状体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3μm，脱蜡至水后，用 0.4%焦油紫染液（pH=3）进行染色。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。切片在400倍光学显微镜下观察拍照。

PD 主要的病理变化是黑质纹状体多巴胺能神经元进行性变性坏死，导致纹状体多巴胺递质水平下降，从而引起整个基底神经节环路功能紊乱[3]。尼氏体又称嗜染质，是神经细胞所特有的结构，由许多平行排列的粗面内质网和分布期间的游离核糖体组成，具有合成蛋白的功能，其数量和分布与神经元的功能状态密切相关，被视为神经细胞存活的标志[4]。结果显示，空白对照组（图 15A）小鼠纹状体神经元存在一定数量的尼氏体（箭头标识）；溶媒对照组（图 15B）小鼠纹状体神经元尼氏体数量明显多于空白对照组，且统计差异接近显著（P=0.085）；给纤溶酶原组（图 15C）小鼠纹状体神经元尼氏体数量与空白对照组无明显差异，但明显低于溶媒对照组，且统计差异显著（*表示 P<0.05）（图 15D）。该结果表明纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠纹状体尼氏体恢复。

实施例 4 纤溶酶原可促使帕金森模型小鼠黑质尼氏体数量恢复

取 10~12 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 28 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 20 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μl 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/ml MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9ml 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/ml。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分为两组，溶媒组和给药组，每组各 10 只，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μl /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μl/只溶媒溶液(10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠黑质于 10%中性甲醛溶液固定 24-48 小时。固定后的黑质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 3μm，脱蜡至水后，用 0.4%焦油紫染液（pH=3）进行染色。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。切片在400倍光学显微镜下观察拍照。

结果显示，空白对照组（图 16A）小鼠黑质中有一定量的尼氏体（箭头标识），溶媒组（图 16B）小鼠黑质中尼氏体数减少，给纤溶酶原组

（图 16C）小鼠黑质尼氏体数高于溶媒组。该结果表明纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质尼氏体数量恢复。

实施例 5 纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质 GLP-1R 的表达

取 9 周龄 C57 雄性小鼠 12 只，造模前 1 天称重，小鼠按照 30mg/kg 体重每天腹腔注射 5mg/ml MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[6-7]。MPTP 溶液配制：用注射器吸取 10ml 去离子水，加入到 100mg MPTP 粉末（sigma，M0896）中，配制成 10mg/ml 的母液，然后吸取 1ml 母液于安瓶中，再加入 1ml 去离子水，最终浓度为 5mg/ml。造模完成后小鼠随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 6 只小鼠，并开始给药，记为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml /只/天尾静脉注射纤溶酶原溶液，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积 PBS，持续给药 14 天。于给药第 15 天处死小鼠，快速取材大脑于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的脑组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 4μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 GLP-1R 抗体(NOVUS,NBP1-97308) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 200 倍光学显微镜下观察。

胰高血糖素样肽 1 受体（glucagon-like peptide 1 receptor，GLP-1R）是胰高血糖素受体家族成员之一，是一种 G 蛋白偶联受体，能通过促进胰岛素的分泌调节血糖水平[8-9]。帕金森氏病的特点是黑质纹状体神经元多巴胺能信号缺失，而黑质纹状体也表达 GLP-1R[10]。

结果显示，给纤溶酶原组（图 17B）小鼠黑质 GLP-1R 的表达量（箭头标识）明显多于溶媒 PBS 对照组(图 17A)，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$）（图 17C）。该结果表明，纤溶酶原能够增强帕金森模型小鼠黑质 GLP-1R 的表达。

实施例 6 纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠黑质 TH 的表达

取 9 周龄 C57 雄性小鼠 12 只，造模前 1 天称重，小鼠按照 30mg/kg 体重每天腹腔注射 5mg/ml MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[6-7]。MPTP 溶液配制：用注射器吸取 10ml 去离子水，加入到 100mg MPTP 粉末（sigma，M0896）中，配制成 10mg/ml 的母液，然后吸取 1ml 母液于安瓶中，再加入 1ml 去离子水，最终浓度为 5mg/ml。造模完成后小鼠随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 6 只小鼠，并开始给药，记为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml /只/天尾静脉注射纤溶酶原溶液，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积 PBS，持续给药 14 天。于给药第 15 天处死小鼠，取材小鼠黑质于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的脑组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 3μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 TH 抗体(Proteintech, 25859-1-AP) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase,TH）是酪氨酸合成左旋多巴（L-dopa）的限速酶，仅在胞浆中表达，多巴胺神经元中含量丰富。黑质中 TH 阳性神经元大多是多巴胺能的，因此 TH 可作为黑质中多巴胺能神经元的标志物，黑质中 TH 表达量成为检测 PD 的指标[11]。

结果显示，空白对照组（图 18A）小鼠黑质中有一定量的 TH 阳性细胞（箭头标识），溶媒组（图 18B）小鼠黑质中 TH 阳性细胞数减少，给纤溶酶原组（图 18C）小鼠黑质中 TH 阳性细胞数明显高于溶媒组。该结果表明纤溶酶原可增加帕金森模型小鼠黑质中 TH 阳性细胞数量。

实施例 7 纤溶酶原影响帕金森模型小鼠黑质小胶质细胞数量

取 9 周龄 C57 雄性小鼠 12 只，造模前 1 天称重，小鼠按照 30mg/kg 体重每天腹腔注射 5mg/ml MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[6-7]。MPTP 溶液配制：用注射器吸取 10ml 去离子水，加入到 100mg MPTP 粉末（sigma，M0896）中，配制成 10mg/ml 的母液，然后吸取 1ml 母液于安瓶中，再加入 1ml 去离子水，最终浓度为 5mg/ml。造模完成后小鼠随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 6 只小鼠，并开始给药，记为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml /只/天尾静脉注射纤溶酶原溶液，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积 PBS，持续给药 14 天。于给药第 15 天处死小鼠，取材小鼠中脑黑质于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的黑质经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 3μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 Iba-1 抗体(Abcam, ab178847) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

小胶质细胞是中枢神经系统固有免疫细胞，在脑病变或损伤时被活化。活化的小胶质细胞迁移到损伤部位，发挥多种功能，例如吞噬死细胞、增加促炎性细胞因子等，参与各种中枢神经系统疾病[12-14]。Iba-1（Ionized calcium binding adapter molecule 1）是一约 17kDa 的钙结合蛋白，在中枢神经系统小胶质细胞中特异性表达，已被广泛用作小胶质细胞标记物[15-17]。

结果显示，空白对照组（图 19A）小鼠黑质有一定数量的小胶质细胞（箭头标识），溶媒对照组（图 19B）小鼠黑质中小胶质细胞数高于空白对照组，给纤溶酶原组（图 19C）小鼠黑质中小胶质细胞数明显低于溶媒对照组，且接近于空白对照组。该结果显示纤溶酶原影响帕金森模型小鼠黑质小胶质细胞数量。

实施例 8 纤溶酶原可促进帕金森模型小鼠纹状体髓鞘恢复

取 9 周龄 C57 雄性小鼠 12 只，造模前 1 天称重，小鼠按照 30mg/kg 体重每天腹腔注射 5mg/ml MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[6-7]。MPTP 溶液配制：用注射器吸取 10ml 去离子水，加入到 100mg MPTP 粉末（sigma，M0896）中，配制成 10mg/ml 的母液，然后吸取 1ml 母液于安瓶中，再加入 1ml 去离子水，最终浓度为 5mg/ml。造模完成后小鼠随机分为两组，给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 6 只，并开始给药，记为第 1 天，给纤溶酶原组小鼠按照 1mg/0.1ml /只/天尾静脉注射纤溶酶原溶液，给溶媒 PBS 对照组尾静脉给予相同体积 PBS，持续给药 14 天。于给药第 15 天处死小鼠，取材小鼠纹状体于 10%中性甲醛溶液固定 24-48 小时。固定后的纹状体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 3μm，脱蜡至水后，用 0.1%LFB 染液进行染色密封浸染 8-16h。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。切片在 400 倍光学显微镜下观察拍照。

神经退行性疾病是指由大脑和脊髓的神经元或其髓鞘的丧失所导致的疾病。LFB（Luxol fast blue）是一种髓鞘特异性染色方法，可反映髓鞘受损情况[18-19]。

结果显示，空白对照组（图 20A）小鼠纹状体存在一定量的髓鞘，溶媒组（图 20B）小鼠纹状体髓鞘染色少于空白对照组，给纤溶酶原组（图 20C）小鼠纹状体髓鞘染色明显多于溶媒组，且接近空白对照组。该结果显示纤溶酶原可使帕金森模型小鼠纹状体髓鞘一定程度地恢复。

实施例 9 纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠黑质α-突触核蛋白表达

取 10~12 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 28 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 20 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分为两组，溶媒组和给药组，每组各 10 只，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μL /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μL/只溶媒

溶液（10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠黑质于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的脑组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 3μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠α-synuclein 抗体(Proteintech, 10842-1-AP) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

目前认为帕金森病是由于中脑黑质多巴胺能神经元缺失及出现路易小体所导致。α-突触核蛋白(α-synuclein)是一个由 140 个氨基酸残基组成的神经元蛋白，可导致神经元损伤，而且参与中枢神经系统神经变性的过程，研究表明神经细胞路易小体和神经突触内聚合的α-synuclein 是帕金森病中大脑病变的标志[20]。

结果显示，空白对照组（图 21A）小鼠黑质仅有少量的 α-突触核蛋白(α-synuclein)，溶媒组（图 21B）小鼠黑质 α-突触核蛋白的量明显高于空白对照组（*表示 P<0.05），给纤溶酶原组（图 21C）小鼠黑质 α-突触核蛋白的量明显低于溶媒组，且趋近于空白对照组，统计差异显著（*表示 P<0.05）（图 21D）。说明纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠黑质 α-突触核蛋白表达，改善神经元损伤变性。

实施例 10 纤溶酶原可改善帕金森模型小鼠纹状体轴索损伤

取 10~12 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 28 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 20 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分

为两组，溶媒组和给药组，每组各 10 只，并开始给药，记为第 1 天，给药组小鼠尾静脉注射 1mg/100μL /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μL/只溶媒溶液（10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠黑质于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的脑组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 3μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液， 滴加兔抗小鼠 NF 抗体(Abcam, ab207176) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam，ab6721)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories, Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

帕金森患者疾病过程中存在轴索损伤，且轴索损伤严重程度可能随病程延长持续加重。神经丝蛋白（Neurofilaments，NF）是神经轴索的主要骨架蛋白，对维持神经元正常形态和轴索运输具有至关重要的作用，可作为轴索损伤的相关生物标记物[21]。

结果显示，空白对照组（图 22A）小鼠纹状体有一定量的 NF（箭头标识），溶媒组（图 22B）小鼠纹状体 NF 的量低于空白对照组，给纤溶酶原组（图 22C）小鼠纹状体中 NF 的量明显高于溶媒组，且统计差异极显著（**表示 P<0.01）（图 22D）。说明纤溶酶原可促使帕金森模型小鼠纹状体 NF 恢复，修复帕金森轴索损伤。

实施例 11 纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠纹状体 GFAP 表达

取 10~12 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠 28 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 8 只，模型组 20 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，模型组小鼠按体重随机分为两组，溶媒组和给药组，每组各 10 只，并开始给药，记为第 1 天，给药

组小鼠尾静脉注射 1mg/100μL /只纤溶酶原溶液，溶媒组注射 100μL/只溶媒溶液（10mM 柠檬酸-柠檬酸钠溶液，pH7.4），持续给药 14 天，于给药第 15 天处死，取材小鼠黑质于 4%多聚甲醛固定 24-48 小时。固定后的脑组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。定位切片黑质，切片厚度为 3μm，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，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液， 滴加兔抗小鼠 GFAP 抗体(Abcam, ab7260) 4℃孵育过夜，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam，ab6721)二抗室温孵育 1 小时，0.01M PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒(Vector laboratories, Inc.,USA)显色，水洗 3 次后苏木素复染 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明并中性树胶封片，切片在 400 倍光学显微镜下观察。

胶质细胞纤维酸性蛋白 (gilaI fibrillary acidic protein, GFAP)是构成星形胶质细胞胞体胶原蛋白的重要成分，且其仅存在于星形胶质细胞胶质原纤维中间丝中，是星形胶质细胞活化的特征性标记物[22]，对神经元具有炎性损坏作用，使神经元变性[23]，从而引起帕金森的发生。

结果显示，空白对照组（图 23A）小鼠纹状体表达少量的 GFAP（箭头标识），溶媒组（图 23B）小鼠纹状体 GFAP 的表达量明显高于空白对照组，给纤溶酶原组小鼠（图 23C）纹状体 GFAP 的表达量低于溶媒组。说明纤溶酶原可减少帕金森模型小鼠纹状体 GFAP 表达，减轻纹状体神经元损伤。

实施例 12 纤溶酶原促进α-突触核蛋白在帕金森模型小鼠脑匀浆中降解

取 11~12 周龄、18-25g 的 C57BL/6J 雄性小鼠 8 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 4 只，模型组 4 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，所有小鼠进行旷场实验，鉴定造模成功。所有小鼠处死后取整个脑部并称重，按 150mg 组织/mLPBS 分别加入 1×PBS（Thermo Fisher，pH7.4；10010-

031，4℃下匀浆（1min，3-4 次），匀浆后于 4℃离心（12000rpm，20min），取上清液置于新的 EP 管中。

取 Eppendorf (EP) 管分别设为①空白对照组、②溶媒对照组、③纤溶酶原组，各组设置 5 个平行。空白对照组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆；溶媒对照组加入 21.5μL α-突触核蛋白溶液（上海强耀生物科技有限公司，定制表达人α-突触核蛋白，UniProtKB - P37840，1.0mg/mL）、4.6μL 溶媒溶液（10mM 柠檬酸钠，2%盐酸精氨酸，3%甘露醇，PH7.4）、23.9μL 小鼠脑匀浆；纤溶酶原组加入 21.5mL α-突触核蛋白溶液（1.0mg/mL）、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆。各组样品加好后，37℃温育 6h 后分别加入 50μL 0.1%三氟乙酸溶液终止反应。

根据 Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（Solarbio，P1320）配胶说明制备 12%凝胶。各组样品分别与 4×上样缓冲液（TaKaRa，e2139）以体积比为 3:1 混匀后，100℃加热 5 min，冷却后离心 2 min，然后取 20μL 上样。电泳条件为 30V 跑 1.5h，然后 100V 电泳至胶底。电泳结束后剥凝胶置于 1‰考马斯亮蓝染色液（1g 考马斯亮蓝 R250 溶于 1000ml 乙醇：冰醋酸：纯化水体积比为 5:2:13 的混合液中）中染色 30min，再用脱色液（纯化水：冰醋酸：无水乙醇=17:2:1 体积比混合）脱色至干净。凝胶在生物分子成像仪下拍照并定量扫描分析。

结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（***代表 P＜0.001），且其聚合物 a、b 的量均明显低于溶媒对照组，差异极显著（**代表 P＜0.01，***代表 P＜0.001）；在正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（***代表 P＜0.001），且其聚合物 a、b 的量均明显低于溶媒对照组，差异显著（*代表 P＜0.05，**代表 P＜0.01）（图 24）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原可有效地降解人α-突触核蛋白及其聚合物。

实施例 13 纤溶酶原促进α-突触核蛋白在帕金森模型小鼠脑匀浆中降解

取 11~12 周龄、18-25g 的 C57BL/6J 雄性小鼠 8 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 4 只，模型组 4 只。造模时间定在每

日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，所有小鼠进行旷场实验，鉴定造模成功。所有小鼠处死后取整个脑部并称重，按 150mg 组织/mLPBS 分别加入 1×PBS（Thermo Fisher，pH7.4；10010-031，4℃下匀浆（1min，3-4 次），匀浆后于 4℃离心（12000rpm，20min），取上清液置于新的 EP 管中。

取 Eppendorf (EP) 管分别设为①空白组、②空白对照组、③溶媒对照组、④纤溶酶原组，各组设置 5 个平行。空白组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 溶媒溶液（10 mM 柠檬酸钠，2%盐酸精氨酸，3%甘露醇，pH 7.4）、23.9μL 小鼠脑匀浆；空白对照组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆；溶媒对照组加入 21.5μL α-突触核蛋白溶液（上海强耀生物科技有限公司，定制表达人α-突触核蛋白，UniProtKB - P37840，1.0mg/mL）、4.6μL 溶媒溶液、23.9μL 小鼠脑匀浆；纤溶酶原组加入 21.5mL α-突触核蛋白溶液（1.0mg/mL）（1.0mg/mL）、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆。各组样品加好后，37℃温育 6h 后分别加入 50μL 0.1%三氟乙酸溶液终止反应。

根据 Tris-Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（Solarbio，P1320）配胶说明制备 12%凝胶。各组样品分别与 4×上样缓冲液（TaKaRa，e2139）以体积比为 3:1 混匀后，100℃加热 5 min，冷却后离心 2 min，然后取 20μL 上样。电泳条件为 30V 跑 1.5h，然后 100V 电泳至胶底。电泳结束后剥取凝胶转移到 PVDF 膜（GE，A29433753）上，电泳条件为 15V，2h。转移后的 PVDF 膜浸泡在封闭液（5%脱脂乳液）中于 4℃冰箱中封闭过夜，TBST（0.01M Tris-NaCl，pH7.6 缓冲液）洗 4 次后，加入兔抗人 α-突触核蛋白抗体（Proteintech，10842-1-AP）室温孵育 3h，TBST 洗 4 次后，加入山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam，ab6721)二抗室温孵育 1h，TBST 洗 4 次后，将 PVDF 膜放于干净成像板上，加入 Immobilon Western HRP Substrate（MILLIPORE，WBKLS0100）显色，在生物分子成像仪下拍照并用 Image J 定量分析。

结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（**代表 P＜0.01），且其聚合物的量均明显低于溶媒对照组，差异极显著（***代表 P＜0.001）；在正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原组α-突触核蛋白的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（**代表 P＜0.01），且其聚合物的量均明显低于溶媒对照组，差异显著（***代表 P＜0.001）（图 25）。表明在帕金森模型小鼠和正常小鼠脑匀浆中，纤溶酶原可有效地降解人α-突触核蛋白及其聚合物。

实施例 14 纤溶酶原促进 Pro-BDNF 在帕金森模型小鼠脑匀浆中裂解

取 11~12 周龄、18-25g 的 C57BL/6J 雄性小鼠 4 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，所有小鼠进行旷场实验，鉴定造模成功。所有小鼠处死后取整个脑部并称重，按 150mg 组织/mLPBS 分别加入 1×PBS（Thermo Fisher，pH7.4；10010-031，4℃下匀浆（1min，3-4 次），匀浆后于 4℃离心（12000rpm，20min），取上清液即脑匀浆液置于新的 EP 管中。

取 Eppendorf (EP) 管分别设为①空白组、②空白对照组、③溶媒对照组、④纤溶酶原组，各组设置 5 个平行。空白组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 溶媒溶液（10 mM 柠檬酸钠，2%盐酸精氨酸，3%甘露醇，pH 7.4）、23.9μL 小鼠脑匀浆；空白对照组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆；溶媒对照组加入 21.5μL Pro-BDNF（南京金斯瑞，定制表达人 Pro-BDNF，UniProtKB - P23560，1.0mg/mL）、4.6μL 溶媒溶液、23.9μL 小鼠脑匀浆；纤溶酶原组加入 21.μL Pro-BDNF（1.0mg/mL）、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆。各组样品加好后，37℃温育 6h 后分别加入 50μL 0.1%三氟乙酸溶液终止反应。

根据 SDS-PAGE 配胶说明制备 12%凝胶。各组样品分别与 4×上样缓冲液（TaKaRa，e2139）以体积比为 3:1 混匀后，100℃加热 5 min，冷却后离心 2 min，然后取 20μL 上样。电泳条件为 30V 跑 45min，然后 100V 电泳

至胶底。电泳结束后剥凝胶于 1‰考马斯亮蓝染色液（1g 考马斯亮蓝 R250 溶于 1000ml 乙醇：冰醋酸：纯化水体积比为 5:2:13 的混合液中）染色 30min，再用脱色液（纯化水：冰醋酸：无水乙醇=17:2:1 体积比混合）脱色至干净。凝胶在生物分子成像仪下拍照并定量扫描分析。

脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）是一类分子量为 12.3 kD 的碱性蛋白质，由 119 个氨基酸残基构成，并含有 3 对二硫键，在体内以二聚体的形式存在，以 BDNF 前体的形式合成，BDNF 前体（Pro-BDNF）可经酶解作用裂解形成成熟的 BDNF。文献报道 Pro-BDNF 与其裂解形成的成熟的 BDNF 具有相反的作用。Pro-BDNF 促进神经细胞凋亡，降低神经突触可塑性。成熟的 BDNF 及其受体广泛分布于中枢神经系统内，在中枢神经系统发育过程中，对神经元存活、分化、生长发育起重要作用，并能防止神经元受损伤死亡，改善神经元的病理状态，促进受损伤神经元再生及分化等生物效应，而且也是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需的[24]。

结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，纤溶酶原组 Pro-BDNF 的量明显低于溶媒对照组，差异极显著（***代表 P＜0.001）（图 26）。提示纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠脑匀浆中 Pro-BDNF 裂解。

实施例 15 纤溶酶原促进 Pro-BDNF 在帕金森模型小鼠脑匀浆中裂解形成成熟的 BDNF

取 11~12 周龄、18-25g 的 C57BL/6J 雄性小鼠 8 只，造模前 1 天称重，根据体重随机分为 2 组，空白对照组 4 只，模型组 4 只。造模时间定在每日早上 9 点，空白对照组腹腔注射 200μL 生理盐水；模型组腹腔注射 35mg/kg/只 5mg/mL MPTP 溶液，连续注射 5 天，建立帕金森模型[5]。MPTP 溶液配制：取 45mg MPTP（sigma，M0896）溶解在 9mL 生理盐水溶液中，配制最终浓度为 5mg/mL。造模完成后即造模第 6 天，所有小鼠进行旷场实验，鉴定造模成功。所有小鼠处死后取整个脑部并称重，按 150mg 组织/mLPBS 分别加入 1×PBS（Thermo Fisher，pH7.4；10010-031，4℃下匀浆（1min，3-4 次），匀浆后于 4℃离心（12000rpm，20min），取上清液即脑匀浆液置于新的 EP 管中。

取 Eppendorf (EP) 管分别设为①空白组、②空白对照组、③溶媒对照组、④纤溶酶原组，各组设置 5 个平行。空白对照组加入 21.5μL 生理盐水、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆；溶媒对照组加入 21.5μL Pro-BDNF（南京金斯瑞，定制表达人 Pro-BDNF，UniProtKB - P23560，1.0mg/mL）、4.6μL 溶媒溶液（柠檬酸-柠檬酸钠溶液）、23.9μL 小鼠脑匀浆；纤溶酶原组加入 21.μL Pro-BDNF（1.0mg/mL）、4.6μL 纤溶酶原溶液（2mg/mL）、23.9μL 小鼠脑匀浆。各组样品加好后，37℃温育 6h 后分别加入 50μL 0.1%三氟乙酸溶液终止反应。

根据 SDS-PAGE 配胶说明制备 12%凝胶。各组样品分别与 4×上样缓冲液（TaKaRa，e2139）以体积比为 3:1 混匀后，100℃加热 5 min，冷却后离心 2 min，然后取 20μL 上样。电泳条件为 30V 跑 45min，然后 100V 电泳至胶底。电泳结束后剥取凝胶转移到活化的 PVDF 膜（GE，A29433753）上，电泳条件为 15V，2.5h。转移后的 PVDF 膜浸泡在封闭液（5%脱脂乳液）中于 4℃冰箱中封闭过夜，TBST（0.01M Tris-NaCl，pH7.6 缓冲液）洗 4 次后，加入兔抗人 BDNF 抗体（Boster Biological Technology, PB9075）室温孵育 3h，TBST 洗 4 次后，加入山羊抗兔 IgG (HRP)抗体 (Abcam，ab6721)二抗室温孵育 1h，TBST 洗 4 次后，将 PVDF 膜放于干净成像板上，加入 Immobilon Western HRP Substrate（MILLIPORE，WBKLS0100）显色，在生物分子成像仪下拍照并用 Image J 定量分析。

结果显示，在帕金森模型小鼠脑匀浆液中，纤溶酶原组 Pro-BDNF 的量明显低于溶媒对照组，差异显著（*代表 P＜0.05，***表示 P＜0.001）；纤溶酶原组 BDNF 的量明显高于溶媒对照组，差异极为显著（图 27）。提示纤溶酶原能够促进帕金森模型小鼠脑匀浆液 Pro-BDNF 裂解和成熟 BDNF 形成。

参考文献

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

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

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

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

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

[6]Vernice Jackson-Lewis1 & Serge Przedborski. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's Disease [J]. Nature protocols VOL.2 NO.1, 2007(141).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[18]Khodanovich M Y, Sorokina I V, GIazacheva V Y, et a1. Histological validation of fast macromolecular proton fraction mapping as a quantitative myelin imaging method in the cuprizone demyelination mode[J]. Sci Rep, 2017, 7:46686.

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

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

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

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

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

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

权 利 要 求 书

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

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

3. 权利要求 1 的方法，所述纤溶抑制剂的拮抗剂为 PAI-1、补体 C1 抑制物、α2 抗纤溶酶或 α2 巨球蛋白的抑制剂，例如抗体。

4．权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述化合物对帕金森病受试者具有如下一项或多项作用：促进记忆功能恢复、改善认知能力、促进黑质 DTA 表达、促进纹状体尼氏体恢复、促进黑质 GLP-1R 表达、增加黑质 TH 阳性细胞数量、促进纹状体髓鞘修复、促进脑组织中 α-突触核蛋白降解、促使纹状体 NF 表达、促进轴索损伤修复、减少纹状体 GFAP 表达、减轻纹状体神经元损伤、促进脑组织中 Pro-BDNF 裂解形成 BDNF、缓解抑郁或焦虑症状。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述化合物为纤溶酶原。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述纤溶酶原为人全长纤溶酶原或其保守取代变体。

7. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2 具有至少 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的赖氨酸结合活性或蛋白水解活性。

8. 权利要求 1-5 任一项的方法，所述纤溶酶原包含与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列、并且仍然具有纤溶酶原的蛋白水解活性的蛋白质。

9. 权利要求 1-5 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的蛋白水解活性的变体。

10. 权利要求 1-5 任一项的方法，所述纤溶酶原包含序列 2、6、8、10、12 所示的氨基酸序列或包含序列 2、6、8、10、12 所示氨基酸序列的保守取代变体。

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

12. 权利要求 11 的方法，其中所述其他治疗方法包括细胞治疗（包括干细胞治疗）和物理治疗。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述其他药物为治疗帕金森病的其它药物。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法，其中所述化合物通过鼻腔吸入、雾化吸入、滴鼻液、滴眼液、滴耳液、静脉内、腹膜内、皮下、颅内、鞘内、动脉内(例如经由颈动脉)或肌肉内给药。

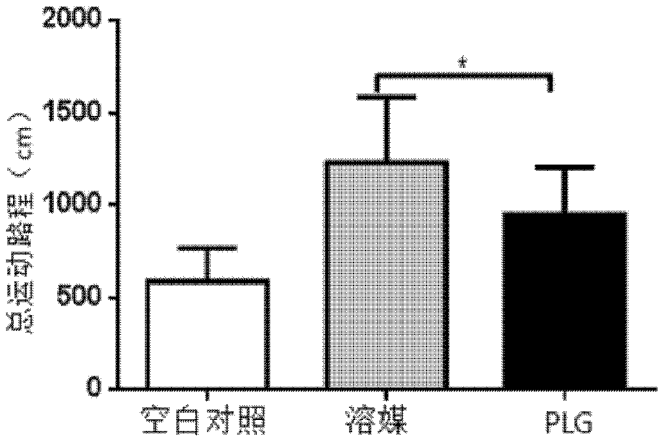

2000
1500
1000
500
0
总运动路程（cm）
*
空白对照
溶媒
PLG

图 1

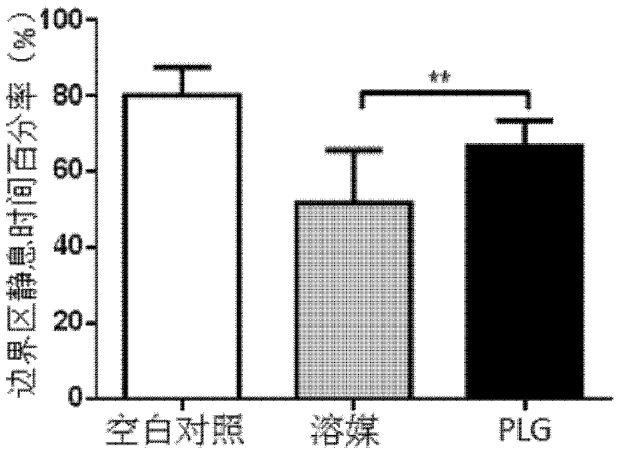

100
80
60
40
20
0
边界区静息时间百分率（%）
**
空白对照
溶媒
PLG

图 2

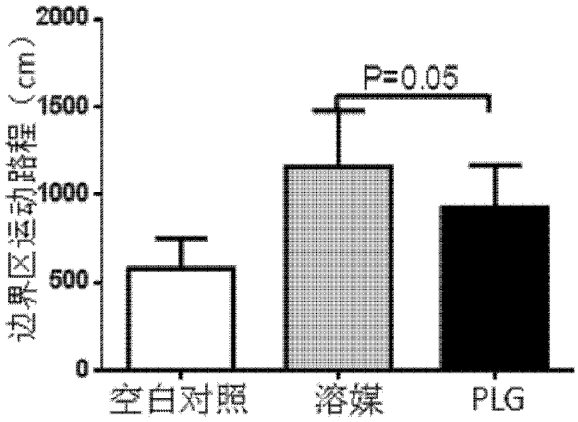

2000
1500
1000
500
0
边界区运动路程（cm）
P=0.05
空白对照
溶媒
PLG

图 3

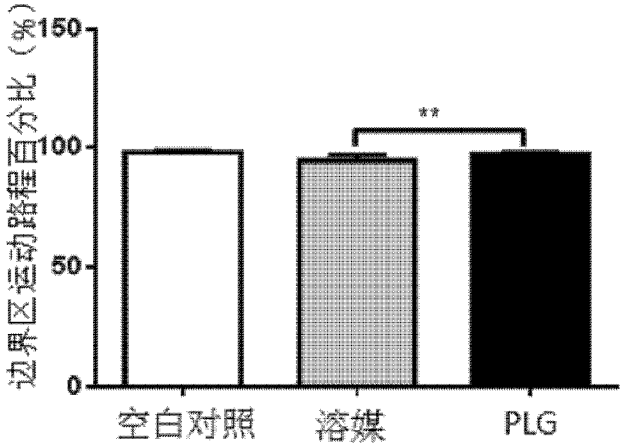

边界区运动路程百分比（%）
150
100
50
0
**
空白对照
溶媒
PLG

图 4

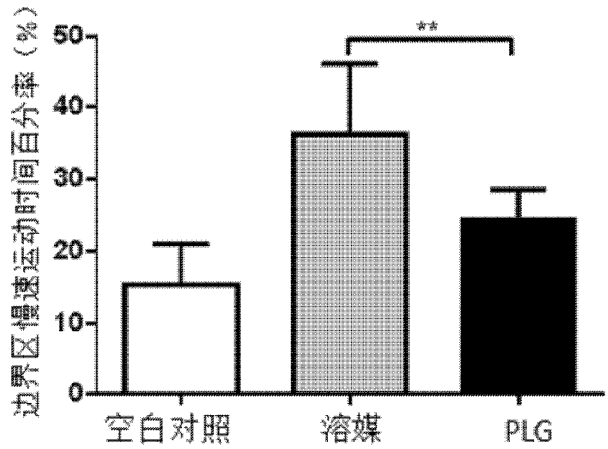

边界区慢速运动时间百分率（%）
50
40
30
20
10
0
**
空白对照
溶媒
PLG

图 5

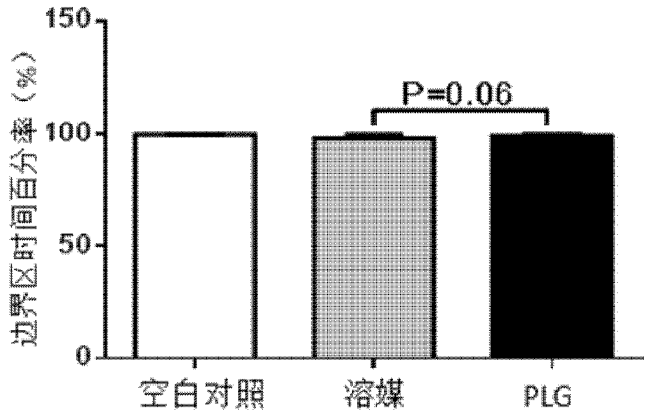

边界区时间百分率（%）
150
100
50
0
P=0.06
空白对照
溶媒
PLG

图 6

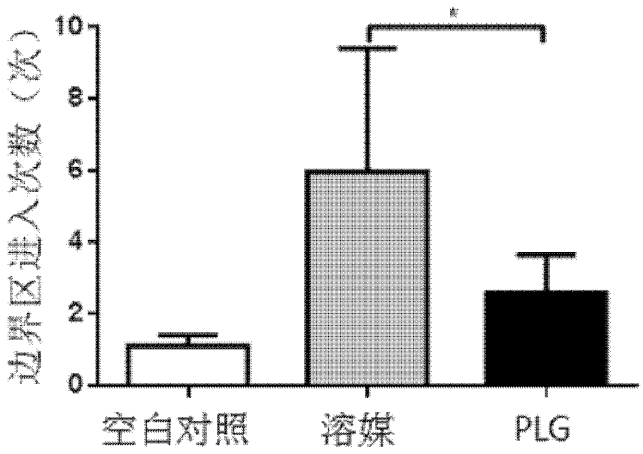

边界区进入次数（次）
10
8
6
4
2
0
*
空白对照
溶媒
PLG

图 7

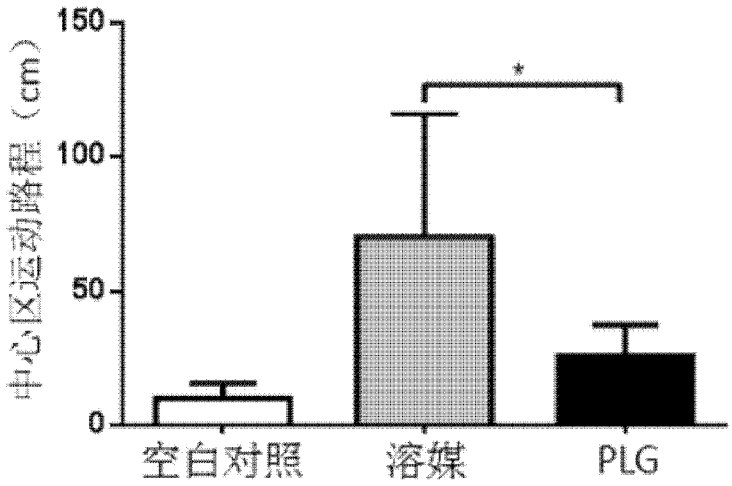

中心区运动路程（cm）
150
100
50
0
*
空白对照
溶媒
PLG

图 8

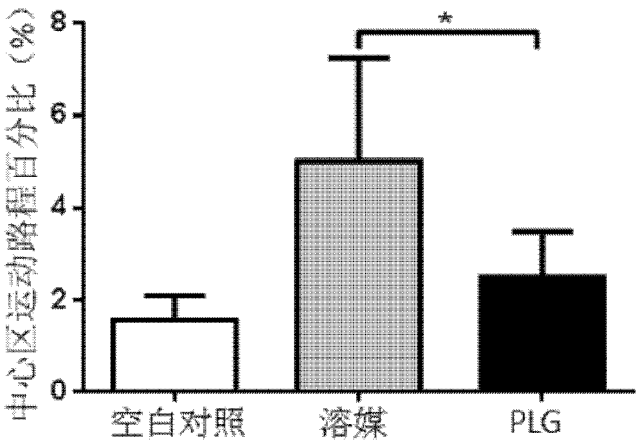

中心区运动路程百分比（%）
8
6
4
2
0
*
空白对照
溶媒
PLG

图 9

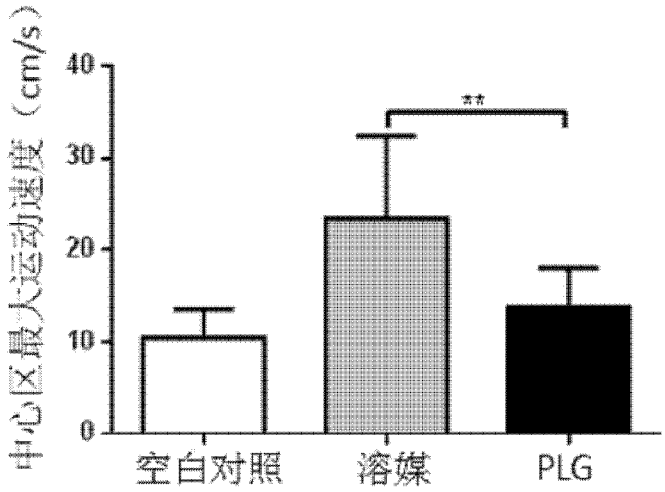

中心区最大运动速度（cm/s）
40
30
20
10
0
**
空白对照
溶媒
PLG

图 10

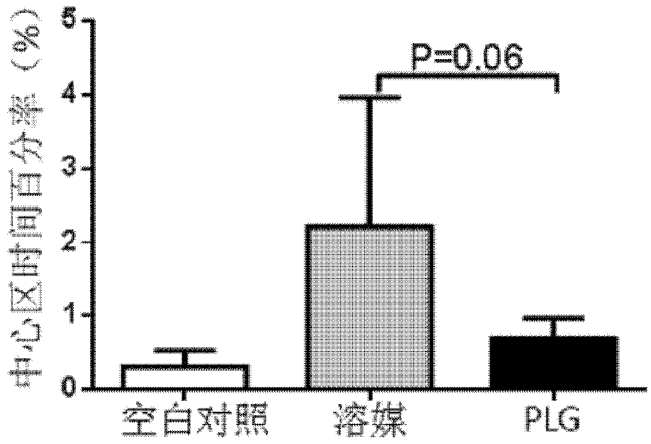

中心区时间百分率（%）
5
4
3
2
1
0
P=0.06
空白对照
溶媒
PLG

图 11

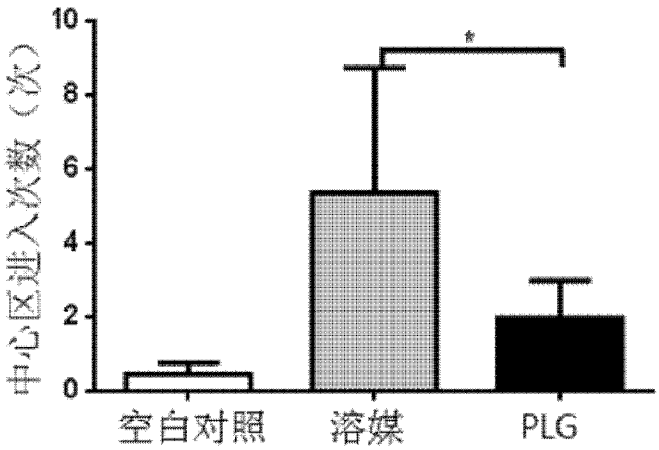

中心区进入次数（次）
10
8
6
4
2
0
*
空白对照
溶媒
PLG

图 12

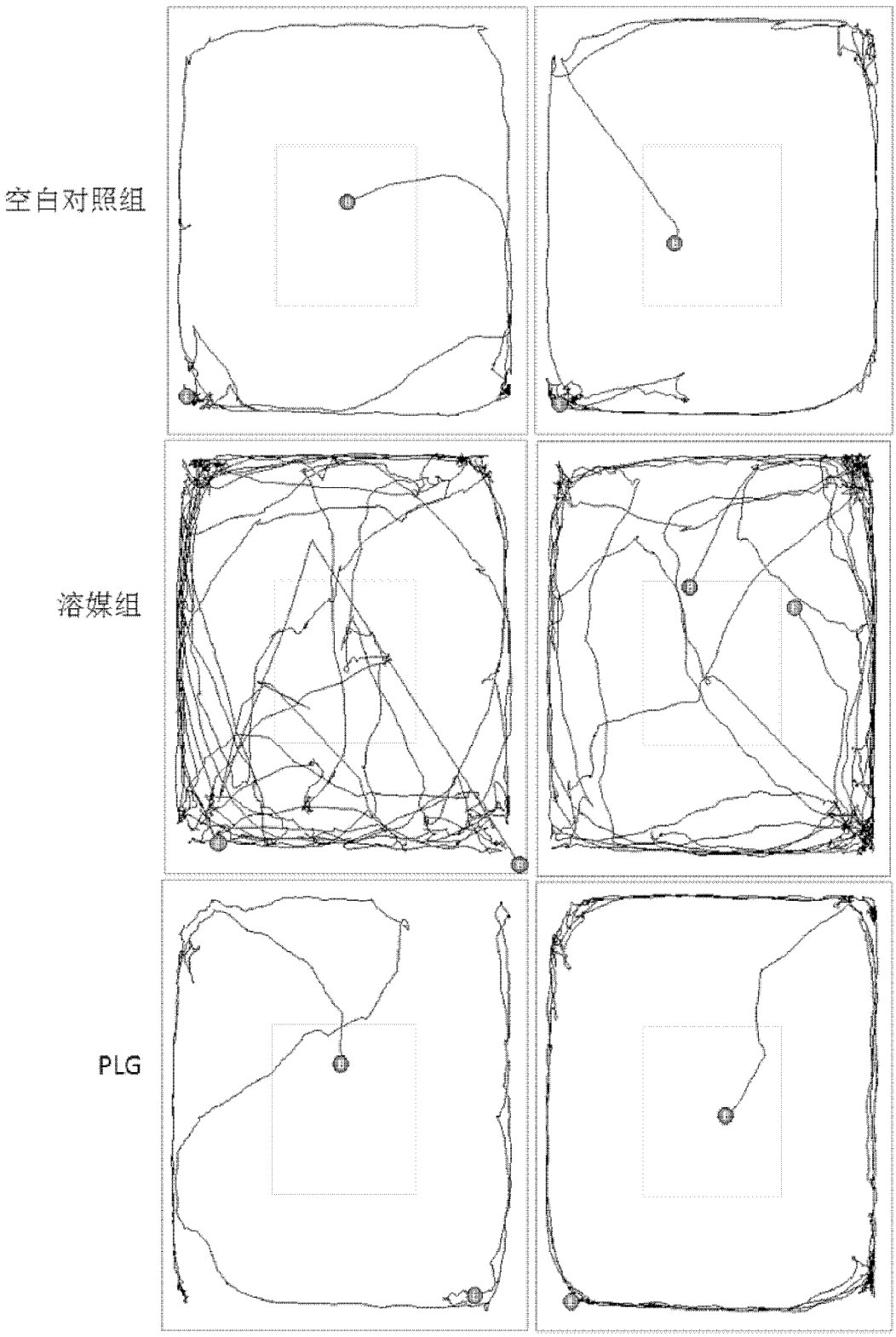


图 13

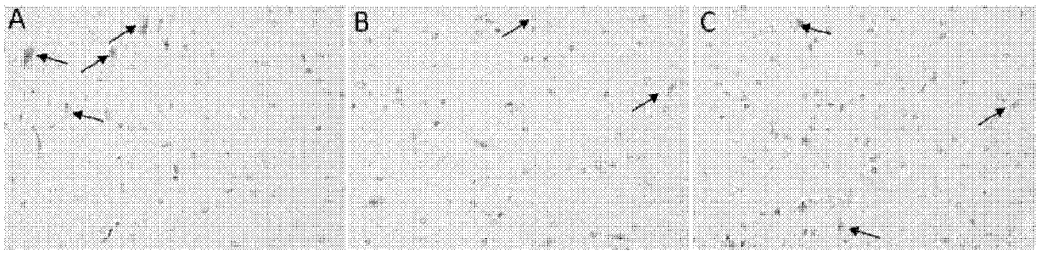


图 14

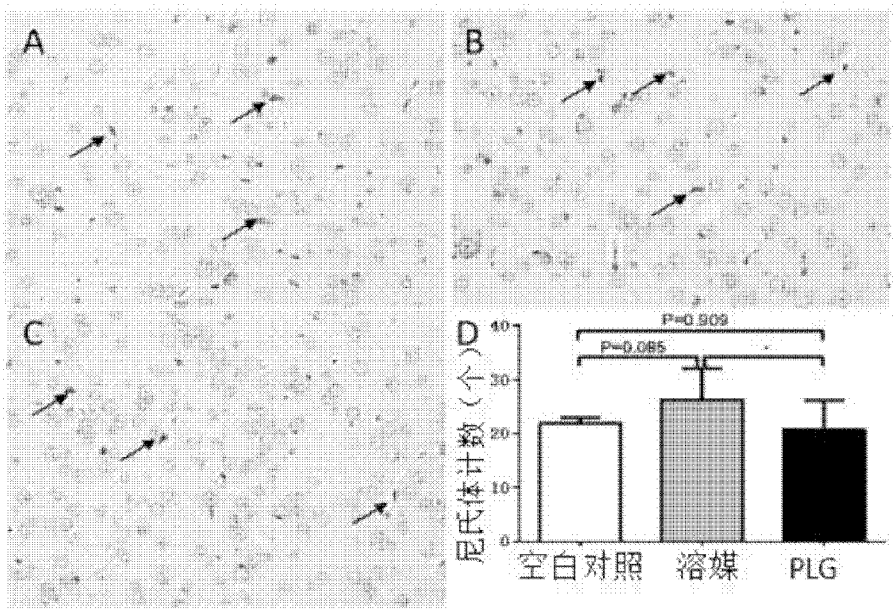


图 15

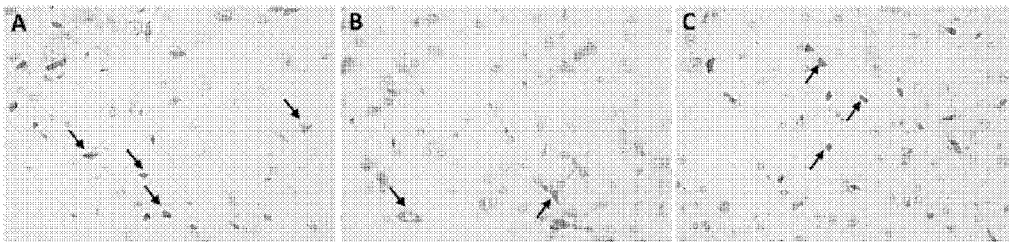


图 16

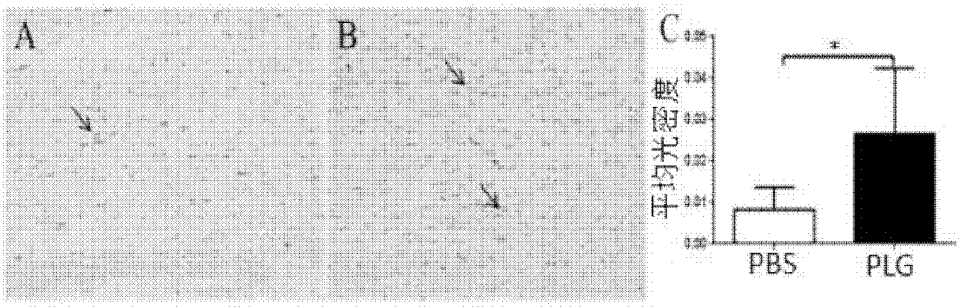


图 17

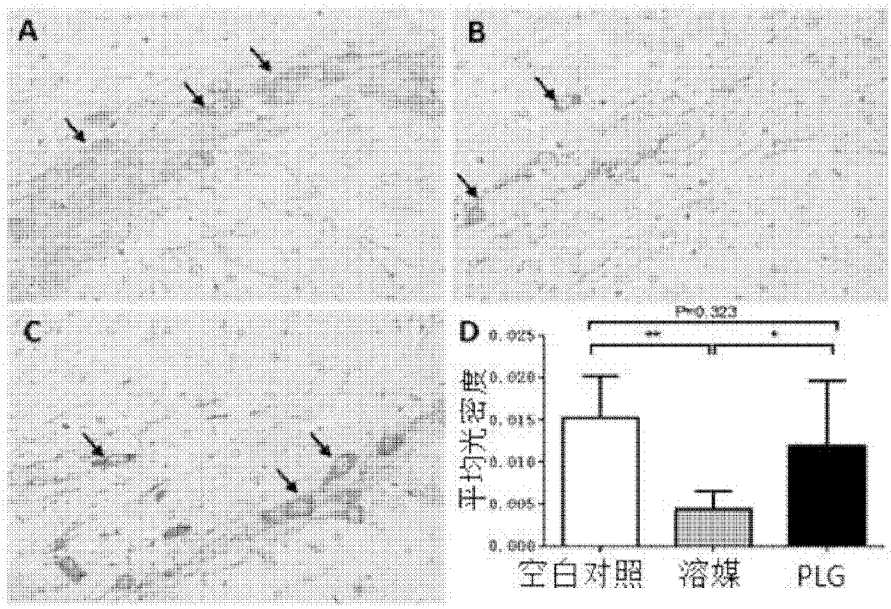


图 18

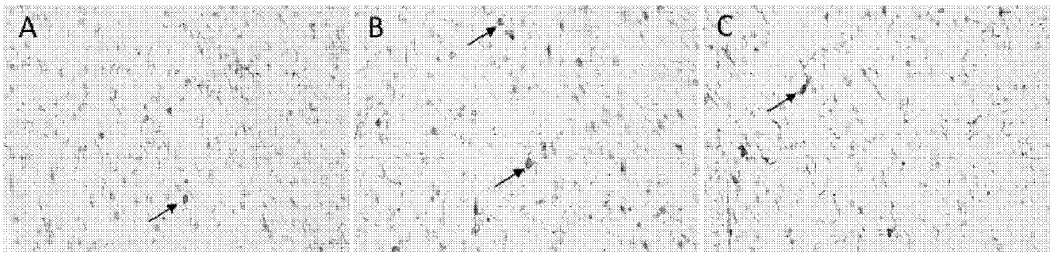


图 19

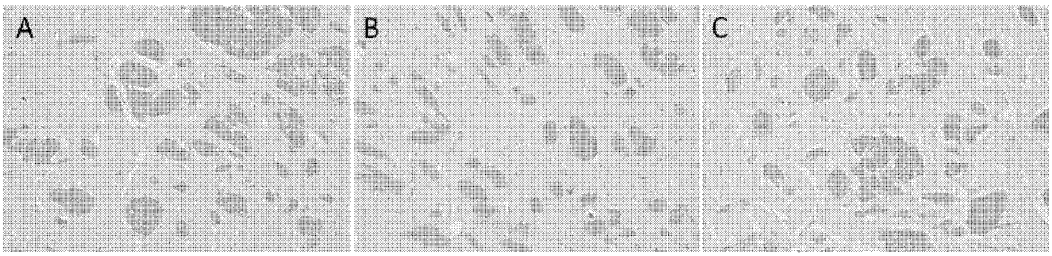


图 20

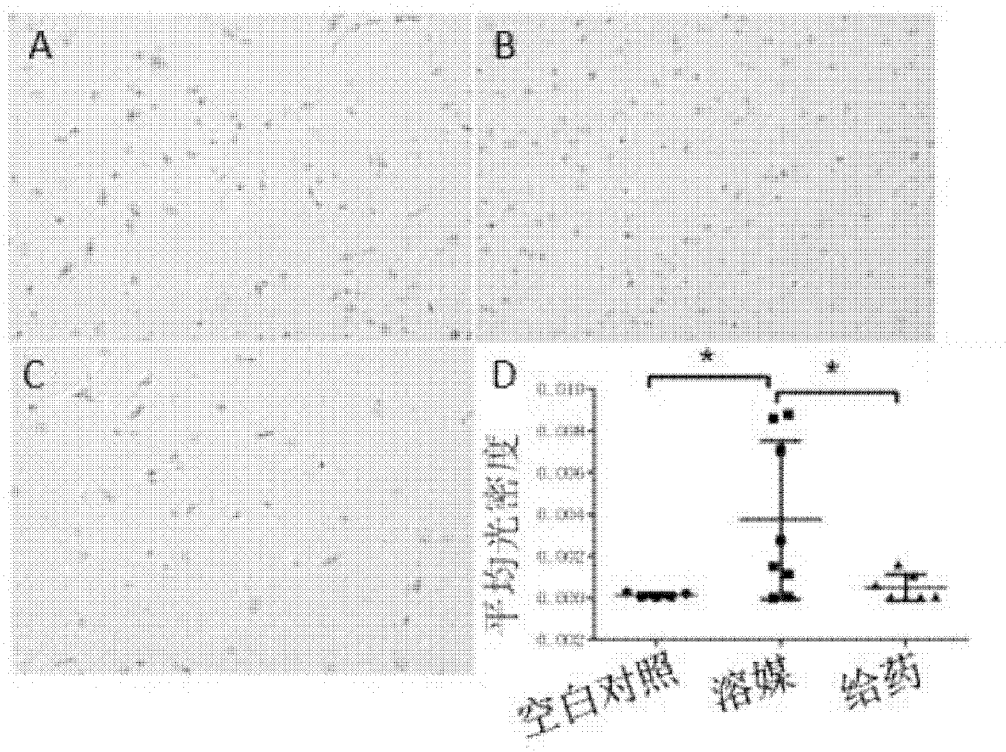


图 21

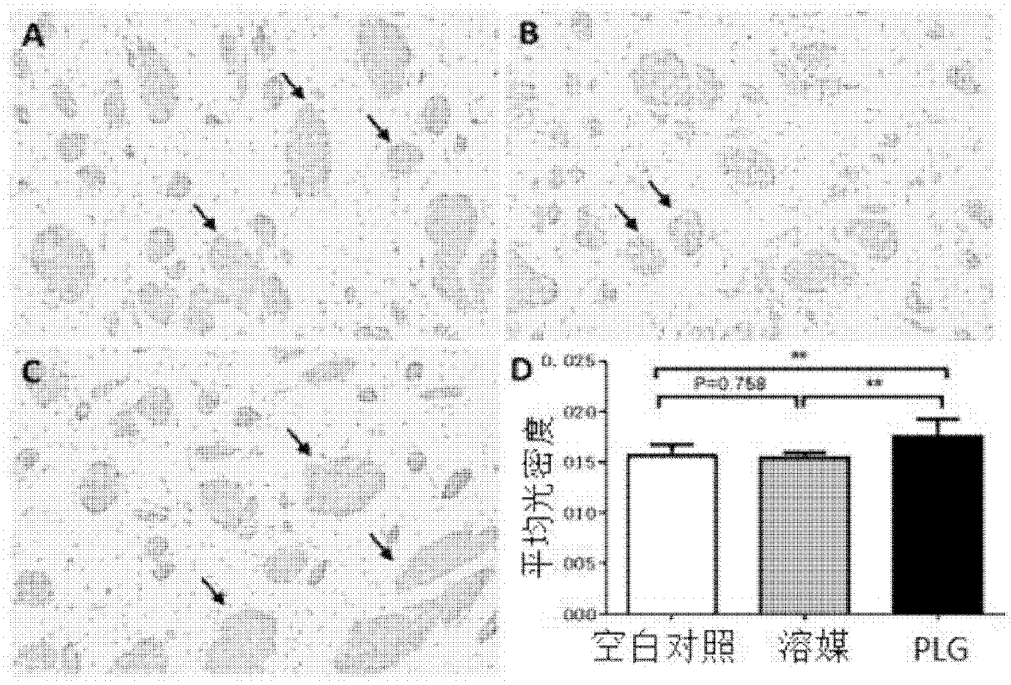

A
B
C
D
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
平均光密度
P=0.758
**
**
空白对照
溶媒
PLG

图 22

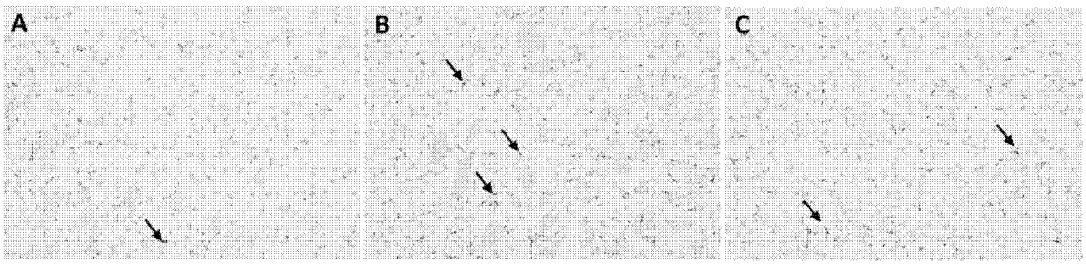

A
B
C

图 23

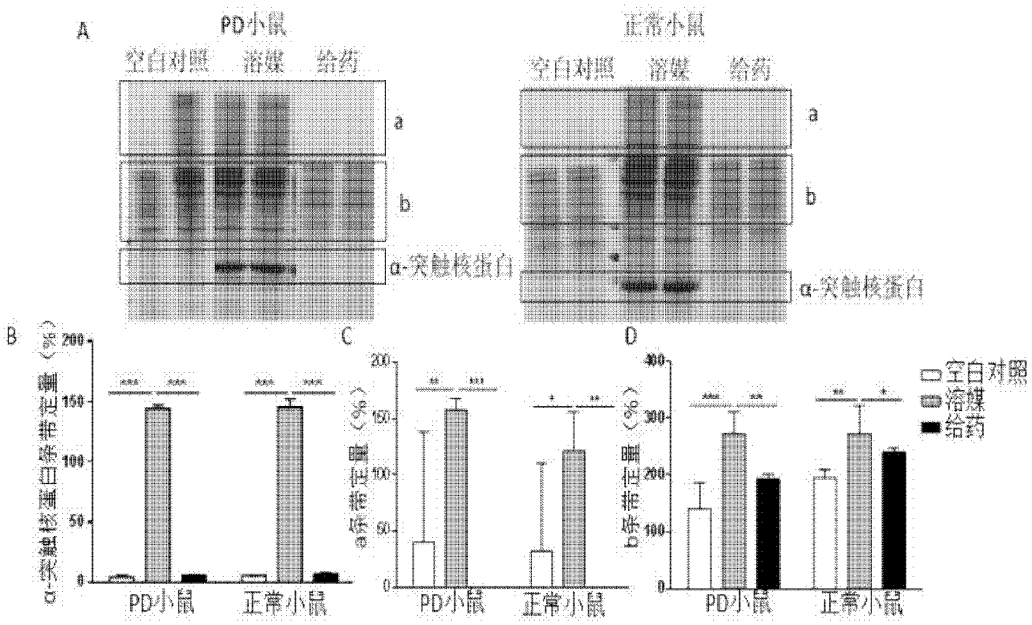

A
PD小鼠
空白对照
溶媒
给药
正常小鼠
空白对照
溶媒
给药
a
b
α-突触核蛋白
α-突触核蛋白
B
α-突触核蛋白条带定量（%）
PD小鼠
正常小鼠
C
PD小鼠
正常小鼠
D
PD小鼠
正常小鼠
空白对照
溶媒
给药

图 24

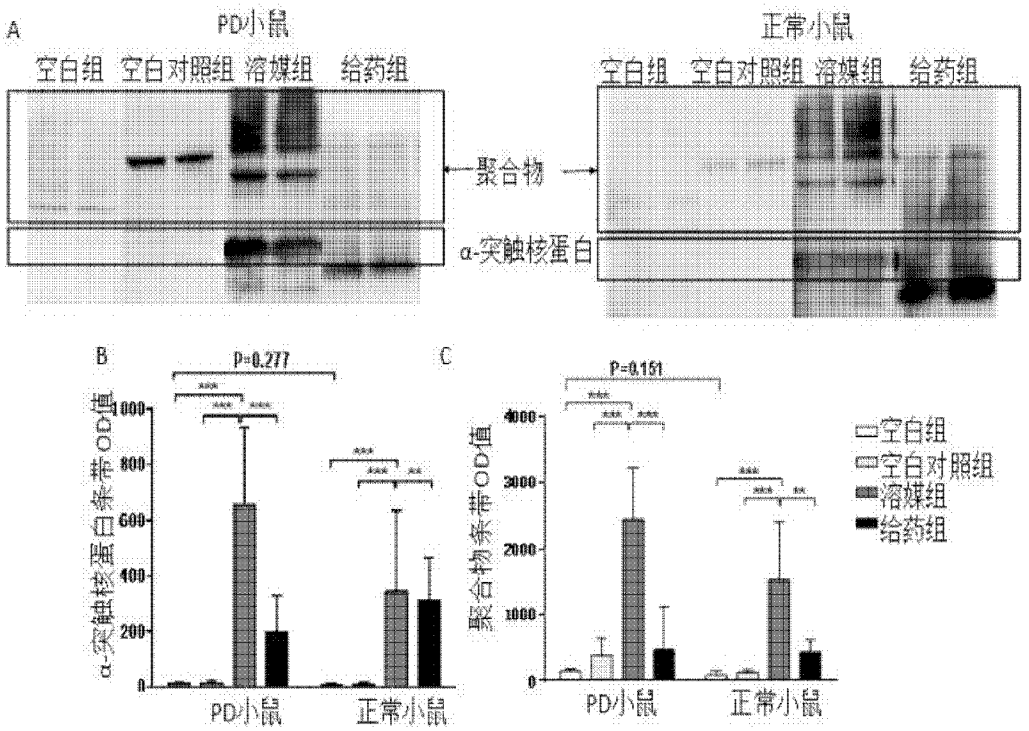

A
PD小鼠
空白组
空白对照组
溶媒组
给药组
正常小鼠
空白组
空白对照组
溶媒组
给药组
聚合物
α-突触核蛋白
B
P=0.277
α-突触核蛋白条带OD值
PD小鼠
正常小鼠
C
P=0.151
聚合物条带OD值
PD小鼠
正常小鼠
空白组
空白对照组
溶媒组
给药组

图 25

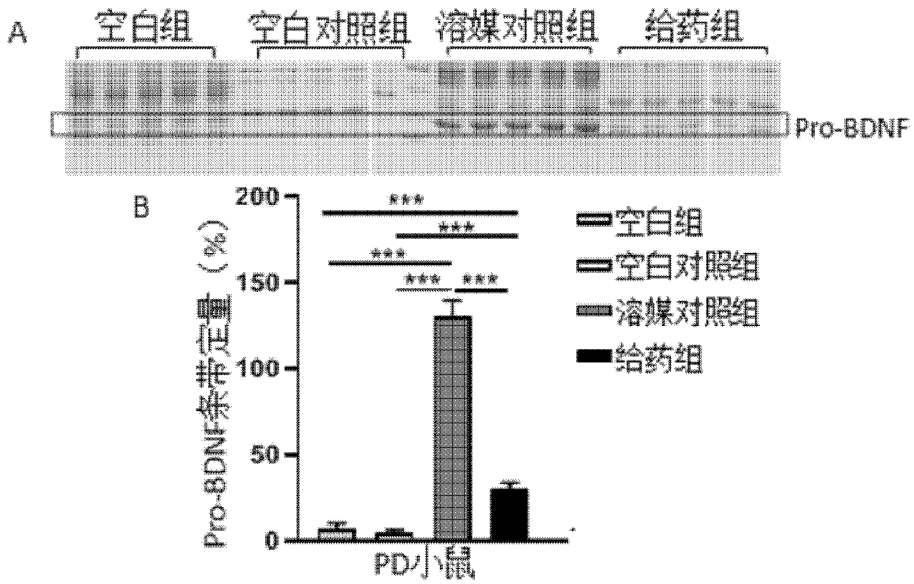

A
空白组
空白对照组
溶媒对照组
给药组
Pro-BDNF
B
Pro-BDNF条带定量（%）
200
150
100
50
0
***
PD小鼠
空白组
空白对照组
溶媒对照组
给药组

图 26

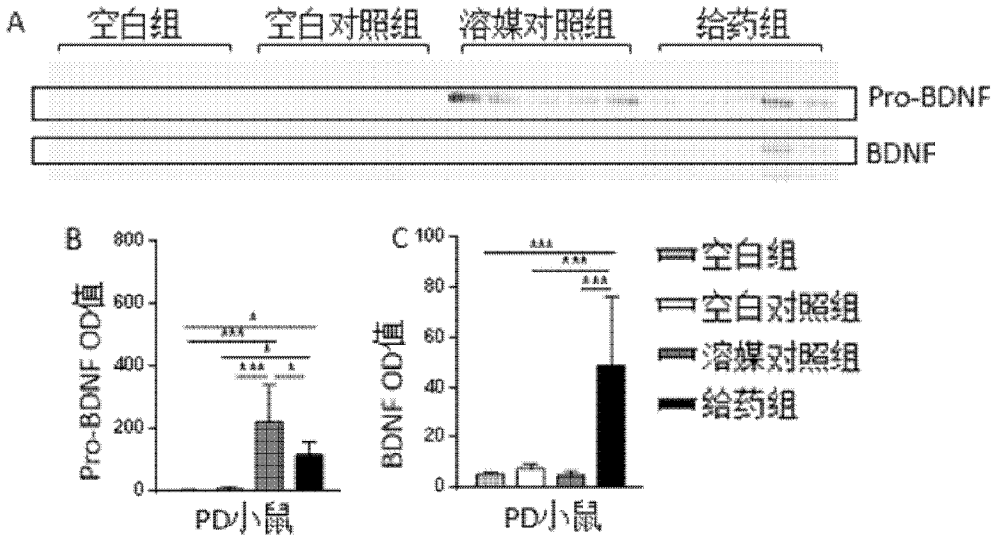

A
空白组
空白对照组
溶媒对照组
给药组
Pro-BDNF
BDNF
B
Pro-BDNF OD值
800
600
400
200
0
PD小鼠
C
BDNF OD值
100
80
60
40
20
0
PD小鼠
空白组
空白对照组
溶媒对照组
给药组

图 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/082715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/48(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; C07K 14/435(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; C07K

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)

VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Science, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU XUESHU, 读秀, DUXIU, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM: parkinson, plasminogen, SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 纤溶酶原, 帕金森

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109125715 A (SHENZHEN RUIJIAN LIFE SCIENCE RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) 04 January 2019 (2019-01-04) claims 1-17, and sequence listing	1-14
X	PAN, H. et al. "Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Diagnosis and Prognosis of Patients with Parkinson's Disease" *Experimental and Therapeutic Medicine,* Vol. 15, 31 December 2018 (2018-12-31), the abstract	1-14
X	JEON, H. et al. "Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Regulates Microglial Motility and Phagocytic Activity" *Journal of Neuroinflammation,* Vol. 9, 31 December 2012 (2012-12-31), the abstract	1-14
A	WO 2011147999 A1 (FARMALIDER, S.A.) 01 December 2011 (2011-12-01) entire document	1-14
A	WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12 April 2001 (2001-04-12) entire document	1-14

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 June 2021	**23 June 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/082715

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	陈武 等 (CHEN, Wu et al.). "纤溶酶原受体与相关疾病的分子机制 (Molecular Mechanisms of Plasminogen Receptors and Associated Diseases)" *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics),* Vol. 42, No. 12, 31 December 2015 (2015-12-31), 1094-1102	1-14
A	曾克军 等 (ZENG, Kejun et al.). "α-synuclein和帕金森病的关系研究进展 (Non-official translation: Advances in the Relationship between α-synuclein and Parkinson's Disease)" *国际神经病学神经外科学杂志 (Journal of International Neurology and Neurosurgery),* Vol. 39, No. 5, 31 December 2012 (2012-12-31), 468-471	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/082715

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/082715

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **1-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 1-14 relate to methods for the prevention and treatment of Parkinson's disease and are methods of treating the disease as defined in PCT Rule 39.1(iv); therefore a search is made on the basis of a hypothetical technical solution for pharmaceutical use of components of the fibrinogen activation pathway.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/082715

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109125715	A	04 January 2019	None			
WO	2011147999	A1	01 December 2011	EP	2578212	A4	06 November 2013
				EP	2578212	A1	10 April 2013
				US	9000047	B2	07 April 2015
				US	2013065966	A1	14 March 2013
				EP	2578212	B1	06 July 2016
				PL	2578212	T3	31 January 2017
WO	0124784	A2	12 April 2001	WO	0124784	A3	10 May 2002
				JP	2003510351	A	18 March 2003
				EP	1223969	A2	24 July 2002

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/082715

A. 主题的分类

A61K 38/48(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; C07K 14/435(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; C07K

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））

VEN,CNABS,PubMed,ISI Web of Science,CNTXT,WOTXT,EPTXT,USTXT,CNKI,万方,百度学术，读秀,STN,GenBank,中国专利生物序列检索系统:parkinson，plasminogen，SEQ ID NO:2，4，6，8，纤溶酶原，帕金森

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 109125715 A (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2019年 1月 4日 (2019-01-04) 权利要求1-17，序列表	1-14
X	PAN, H. 等. "Role of plasminogen activator inhibitor-1 in the diagnosis and prognosis of patients with Parkinson's disease" EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE, 第15卷，2018年 12月 31日 (2018-12-31), 摘要	1-14
X	JEON, H.等. "Plasminogen activator inhibitor type 1 regulates microglial motility and phagocytic activity" Journal of Neuroinflammation, 第9卷，2012年 12月 31日 (2012-12-31), 摘要	1-14
A	WO 2011147999 A1 (FARMALIDER, S.A.) 2011年 12月 1日 (2011-12-01) 全文	1-14
A	WO 0124784 A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2001年 4月 12日 (2001-04-12) 全文	1-14

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2021年 6月 3日	2021年 6月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李有朝
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53961930

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	陈武 等. "纤溶酶原受体与相关疾病的分子机制" 生物化学与生物物理进展, 第42卷，第12期，2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31)，1094-1102	1-14
A	曾克军 等. "α-synuclein和帕金森病的关系研究进展" 国际神经病学神经外科学杂志, 第39卷，第5期，2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31)，468-471	1-14

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/082715

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核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/082715

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 1-14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求1-14涉及预防和治疗帕金森病的方法，属于PCT细则39.1（iv）规定的疾病治疗方法；因此基于纤溶酶原激活途径的组分的制药用途的假设技术方案做出检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/082715

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	109125715	A	2019年 1月 4日	无			
WO	2011147999	A1	2011年 12月 1日	EP	2578212	A4	2013年 11月 6日
				EP	2578212	A1	2013年 4月 10日
				US	9000047	B2	2015年 4月 7日
				US	2013065966	A1	2013年 3月 14日
				EP	2578212	B1	2016年 7月 6日
				PL	2578212	T3	2017年 1月 31日
WO	0124784	A2	2001年 4月 12日	WO	0124784	A3	2002年 5月 10日
				JP	2003510351	A	2003年 3月 18日
				EP	1223969	A2	2002年 7月 24日