

(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 2018/107688 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/48 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089047

(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

(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。

(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))。

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING AND TREATING FATTY LIVER

(54) 发明名称: 一种预防和治疗脂肪肝的方法

(57) Abstract: A method for preventing and/or treating fatty liver and related diseases thereof of a subject, comprising administering an effective amount of plasminogen to a subject. In addition, the present invention also relates to a medicine, pharmaceutical composition, product, and kit comprising plasminogen and used for preventing and/or treating fatty liver and related diseases thereof of a subject.

(57) 摘要: 一种预防和/或治疗受试者脂肪肝及其相关病症的方法, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原; 另一方面, 还涉及用于预防和/或治疗受试者脂肪肝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 2018/107688 A1

一种预防和治疗脂肪肝的方法

技术领域

本发明涉及一种预防和/或治疗脂肪代谢紊乱及其相关病症的方法，包括给药易患或患有脂肪代谢紊乱及其相关病症的受试者有效量的纤溶酶原，以消减脂肪在身体组织器官的异常沉积，从而实现预防和/或治疗脂肪代谢紊乱及其相关病症、并发症的目的。

背景技术

脂肪代谢紊乱又称为脂肪代谢障碍，是代谢性疾病中的一种，是由原发性或获得性因素造成的血液及其他组织器官中脂质(脂类)及其代谢产物和量的异常。脂质的代谢包括脂类在小肠内消化、吸收，由淋巴系统进入血循环(通过脂蛋白转运)，经肝脏转化，储存于脂肪组织，需要时被组织利用。脂质在体内的主要功用是氧化供能，脂肪组织是机体的能量仓库，脂肪也能协同皮肤、骨骼、肌肉保护内脏，防止体温散发和帮助食物中脂溶性维生素的吸收。磷脂是所有细胞膜的重要结构成分，胆固醇是胆酸和类固醇激素(肾上腺皮质激素和性腺激素)的前体。脂类代谢受遗传、神经体液、激素、酶以及肝脏等组织器官的调节。当这些因素有异常时，可造成脂代谢紊乱和有关器官的病理生理变化，如高脂蛋白血症及其造成的临床综合征、肥胖症、脂肪肝等。

高脂蛋白血症(Hyperlipoproteinemia)由血液中的脂蛋白过高所致。血液中的脂质如甘油三脂(TG)、游离胆固醇(FC)、胆固醇脂(CE)和磷脂等很少溶于水，只有与载脂蛋白(APO)组成巨分子复合物(脂蛋白)，才能在血中溶解、运转和代谢。当血脂高于正常人上限即为高脂血症(Hyperlipemia)。由于血脂在血中以脂蛋白形式运输，故高脂血症也称为高脂蛋白血症。一般以成人空腹血甘油三脂超过 160mg/dl，胆固醇超过 260mg/dl，儿童胆固醇超过 160mg/dl 为标准^[1]。

高脂蛋白血症(高脂血症)是动脉粥样硬化病变的重要原因之一，是体内脂质代谢异常的表现。由于血脂或脂蛋白的种类不同，超出正常范围的血脂或脂蛋白种类也可不同，所以世界卫生组织(WHO)将高脂蛋白血症分为五型：I型，主要是乳糜微粒增加，血清混浊呈乳白色，其中含大量

甘油三酯(TG); II型,又分成IIa型和IIb两亚型,前者主要为低密度脂蛋白(LDL)明显增加,后者极低密度脂蛋白(VLDL)也有增加;III型,血清常混浊 LDL 和 VLDL 皆有增加,电泳上两者融合;IV型,主要为 VLDL 增加,血清或有混浊;V型,乳糜微粒及 VLDL 皆有增加,血清混浊呈乳白色。其中以 II 型和 IV 型最常见^[1]。

5 高脂血症根据病因可分为原发性和继发性两大类。原发性多由于脂质和脂蛋白代谢先天性缺陷(或遗传性缺陷)以及某些环境因素(包括饮食、营养和药物等)通过未知的机理而引起。继发性主要继发于某种疾病,如糖尿病、肝脏疾病、肾脏疾病、甲状腺疾病,以及饮酒、肥胖。饮食与生活方式等环境因素也是该病的病因。

10 糖尿病常合并脂质代谢紊乱因此糖尿病又称为“糖脂病”^[2]。糖尿病的发病机制与 B 细胞功能损伤及胰岛素抵抗相关,表现为慢性高血糖,而糖代谢的紊乱又常合并脂质代谢的紊乱。糖尿病脂代谢紊乱已经成为心血管疾病独立的危险因素,其主要表现为高甘油三脂血症、低水平的 HDL、以及 LDL 浓度增加。

15 糖尿病脂质代谢紊乱的发生机制尚不清楚,但众多证据表明胰岛素抵抗是其发生的中心环节。近年来的研究还发现肠胰岛素抵抗也参与其中。对糖尿病动物模型和人群研究发现与脂代谢相关的某些基因表达异常进一步导致胰岛素抵抗。糖尿病患者动脉粥样硬化的发生与多种因素相关,但血浆脂质水平的异常是最主要的因素。研究表明,糖尿病患者心血管疾病的发病率和死亡率明显高于非糖尿病患者,糖尿病已经成为心血管疾病的独立危险因素^[3]。

20 近年来,肾病与脂代谢紊乱的关系愈来愈引人注目,在慢性进行性肾损伤时常伴随脂代谢异常,而高脂血症又可促进并加重肾脏的损害,除了介导肾小球损伤外,在小管间质损伤中也起作用。1913 年 Munk 首先描述了肾病综合征的血脂异常。有学者报道,70%-10%的肾病综合征患者可出现高脂血症。其主要表现为血总胆固醇(TC)明显增加,且以低密度脂蛋白胆固醇升高为主,甘油三酯(TG)的轻度增加,其中低密度脂蛋白(LDL)的升高与尿蛋白有一定的相关性^[4]。慢性肾功能不全患者以中度甘油三酯血症为主,血浆总胆固醇水平一般正常,VLDLC、中等密度脂蛋白胆固醇(IDLC)中胆固醇增加。高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)减少,各种脂蛋

白中的甘油三酯含量均增加。其根本原因就是尿毒症环境对甘油三酯的合成及分解代谢的不利影响以及对胆固醇逆向转运的抑制作用^[5]。

随着肾移植疗法的普遍推广以及各种新型免疫抑制剂(特别是 CsA、强的松)的广泛应用,慢性肾功能衰竭(CRF)病人的生存期显著延长,然而肾移植后高脂血症的发生率非常高。肾移植术后高脂血症主要表现为血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDLC)水平增高^[6]。

临床研究证实,脂质代谢紊乱与糖尿病肾病之间有一定的相关性。糖尿病患者脂代谢紊乱,升高的脂类沉积在肾小球基底膜,刺激基底膜细胞增殖和细胞外间质生成。早在1936年,Kimmelstiel和Wilson便在糖尿病肾病患者的肾小动脉、肾小球和肾小管内发现有大量的脂质沉积^[7]。脂代谢异常使肾小球和肾小管间质纤维化是导致肾功能进行性损害的重要原因之一^[8]。

脂代谢紊乱也可导致肥胖症(肥胖综合症)的发生。肥胖症分单纯性和继发性两类。单纯性肥胖指无明显内分泌代谢疾病的肥胖。又可分为体质性肥胖及获得性肥胖两种。体质性肥胖有家族遗传史,患者自幼进食丰富,入量过剩,从小肥胖,脂肪细胞呈增生肥大。获得性肥胖大多由于营养过度和/或体力活动减少所致,如人到中年后生活物质条件的改善、疾病恢复和休养充分、产后停止体育锻炼或体力劳动等。脂肪细胞呈肥大变化,没有增生现象,治疗效果较好。继发性肥胖主要为神经内分泌疾病所致。神经内分泌对代谢有重要调节作用:①下丘脑有调节食欲的中枢,中枢神经系统炎症后遗症、创伤、肿瘤等均可引起下丘脑功能异常,使食欲旺盛而造成肥胖。②胰岛素分泌增多,如早期非胰岛素依赖型糖尿病患者注射过多胰岛素,致高胰岛素血症;胰岛B细胞瘤分泌过多的胰岛素,这都使脂肪合成增加,引起肥胖。③垂体功能低减,特别是促性腺激素及促甲状腺激素减少引起性腺及甲状腺功能低下时,可发生肥胖症。④经产妇或口服女性避孕药者易发生肥胖,这提示雌激素有促进脂肪合成的作用。⑤皮质醇增多症常伴有向心性肥胖。⑥甲状腺功能减退,由于代谢率低下,脂肪堆积,且伴粘液水肿。⑦性腺低下也可肥胖,如肥胖性生殖无能症(脑性肥胖症,弗洛利克氏综合征,外伤、脑炎、垂体瘤、颅咽管瘤等损伤下丘脑所致,表现为向心性肥胖,伴尿崩症及性发育迟缓)。

脂代谢紊乱常导致脂肪肝。脂肪肝是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变。肝脏在脂质代谢中起着特别重要的作用，它能合成脂蛋白，有利于脂质运输，也是脂肪酸氧化和酮体形成的主要场所。正常时肝含脂质量不多，约为 4%，其中主要是磷脂。若肝脏不能及时将脂肪运出，脂肪在肝细胞中堆积，即形成脂肪肝。

脂肪肝可以是一个独立的疾病也可以由其它原因所致，例如肥胖性脂肪肝、酒精性脂肪肝、快速减肥性脂肪肝、营养不良性脂肪肝、糖尿病脂肪肝、药物性脂肪肝等。

某些药物或化学毒物通过抑制蛋白质的合成而致脂肪肝，如四环素、肾上腺皮质激素、嘌呤霉素、环己胺、吐根碱以及砷、铅、银、汞等。降脂药也可通过干扰脂蛋白的代谢而形成脂肪肝。

脂肪肝的危害之一是其促进动脉粥样硬化的形成，导致动脉粥样硬化的原因之一是脂肪肝患者常伴有高血脂症，血液粘稠度增加，其中的低密度脂蛋白(LDL)因其分子量极小，很容易穿过动脉血管内膜在血管壁沉着，使动脉弹性降低，管径变窄，柔韧性减弱，最终导致血液循环障碍。脂肪肝的危害之二是诱发或加重高血压、冠心病，容易导致心肌梗塞而猝死。脂肪肝的危害之三是脑病脂肪肝综合征（Reye 综合征）。脂肪肝的危害之四是导致肝硬化、肝功能衰竭、肝癌。

脂肪肝是肝脏脂代谢失调的产物，同时又是加重肝脏损伤的致病因素，这是一种互为因果、恶性循环的发展。肝细胞中脂滴增多，使肝细胞脂肪变性、肿大，细胞核被挤压偏离中心。脂肪的代谢工要在线粒体中进行，脂肪向细胞外运输主要通过光面内质网，脂肪在肝细胞内的堆积进一步加重线粒体和内质网的负担降低其功能，进而影响其他营养素、激素、维生素的代谢。长期的肝细胞变性会导致肝细胞的再生障碍和坏死，进而形成肝纤维化、肝硬化。肝硬化继发肝细胞癌的机率较高。

脂肪肝的危害之五是急性妊娠性脂肪肝，病死率高。此病又称产科急性黄色肝萎缩，是一种较少见、预后凶险的妊娠合并症。多发生在怀孕的最后三个月，临床表现常与急重肝相似，可出现急性肝功能衰竭、胰腺炎、肾功能衰竭、全身凝血异常而导致快速死亡，首次妊娠的孕妇居多。

脂肪肝的危害之六是诱发或加重糖尿病。肥胖性脂肪肝患者若血糖浓度超过正常水平，虽未达到糖尿病的诊断标准，一般认为是糖尿病前期。

脂肪肝与糖尿病常常相伴而生，而且互相影响，这给临床治疗带来了更大的困难。

5 本发明研究发现纤溶酶原可以预防和/或消减脂肪在身体组织器官的异常沉积，例如可以预防和消减脂质在血液、血管壁、内脏器官以及器官间的组织内的异常沉积，改善这些组织器官的功能，从而为脂肪代谢紊乱及其相关病症、以及其伴随的疾病或并发症提供了全新的预防和治疗方案

发明概述

本发明涉及如下各项：

10 在一方面，本发明涉及：项 1. 一种用于预防和/或治疗受试者脂肪肝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、怀疑患有脂肪肝及其相关病症或具有患上脂肪肝及其相关病状的风险。

15 项 2. 项 1 的方法，其中所述脂肪肝包括肥胖性脂肪肝、酒精性脂肪肝、快速减肥性脂肪肝、营养不良性脂肪肝、糖尿病脂肪肝、药物性脂肪肝。

20 在另一方面，本发明涉及：项 3. 一种用于预防和/或治疗受试者脂肪肝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，其中所述脂肪肝为内分泌紊乱疾病、糖代谢疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、心血管疾病、肠道疾病、甲状腺疾病、胆囊或胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗引发或伴随的。

项 4. 项 3 的方法，其中所述脂肪肝为高血压、糖尿病、慢性肝炎、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎、阻塞性胆管炎、雌激素治疗引发或伴随的。

25 在另一方面，本发明涉及：项 5. 一种用于预防和/或治疗受试者肝脏脂质沉积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、怀疑患有肝脏脂质沉积及其相关病症或具有患上脂肪肝及其相关病状的风险。

30 项 6. 项 5 的方法，其中所述肝脏脂质沉积为内分泌紊乱疾病、糖代谢疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、心血管疾病、肠道疾病、甲状腺疾病、胆囊或胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗引发或伴随的。

项 7. 项 6 的方法, 其中所述肝脏脂质沉积为高血压、糖尿病、慢性肝炎、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎、阻塞性胆管炎、药物治疗引发或伴随的。

5 在又一方面, 本发明涉及: 项 8. 一种消减动脉粥样硬化受试者肝脏脂质沉积的方法, 包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

在又一方面, 本发明涉及: 项 9. 一种消减糖尿病受试者肝脏脂质沉积的方法, 包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

10 在又一方面, 本发明涉及: 项 10. 一种消减高脂血症受试者肝脏脂质沉积的方法, 包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

项 11. 项 10 的方法, 其中所述高脂血症为选自如下的一项或多项: 血清甘油三酯(TG)升高、血清低密度脂蛋白(LDL)升高、极低密度脂蛋白(VLDL)升高。

15 项 12. 项 10 或 11 的方法, 其中所述高脂血症包括高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症。

项 13. 根据项 1-12 任一项的方法, 其中所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物或治疗方法联合施用。

20 项 14. 项 13 的方法, 其中所述一种或多种其它药物包括糖尿病治疗用药物、动脉粥样硬化治疗用药物、肾病综合征治疗用药物、肾功能不全治疗用药物、尿毒症治疗用药物、肾移植治疗用药物、脂肪肝治疗用药物、肝硬化治疗用药物、肥胖症治疗用药物。

25 项 15. 根据项 14 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。

项 16. 一种用于项 1-15 任一项的方法的纤溶酶原。

在又一方面, 本发明涉及: 项 17. 一种药物组合物, 其包含药学上可接受的载剂和用于项 1-15 中任一项所述方法的纤溶酶原。

在又一方面，本发明涉及：项 18. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：
(i)用于项 1-15 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)。

项 19. 根据项 18 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

5 项 20. 项 18 或 19 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所述纤溶酶原被投予至所述受试者以实施项 1-15 中任一项所述方法。

在又一方面，本发明涉及：项 21. 一种制品，其包含：

包含标签的容器；和

10 包含(i)用于项 1-15 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，其中所述标签指示所述纤溶酶原或组合物被投予至所述受试者以实施项 1-15 中任一项所述方法。

项 22. 项 20 的试剂盒或项 21 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。

15 项 23. 项 22 的试剂盒或制品，其中所述其他药物选自如下一项或多项：糖尿病治疗用药物、动脉粥样硬化治疗用药物、肾病综合征治疗用药物、肾功能不全治疗用药物、尿毒症治疗用药物、肾移植治疗用药物、脂肪肝治疗用药物、肝硬化治疗用药物、肥胖症治疗用药物。

20 项 24. 项 23 的试剂盒或制品，其中所述其他药物选自如下一项或多项：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。

25 项 25. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，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 项 26. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其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。

5 项 27. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其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。

10 项 28. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其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。

项 29. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其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。

15 项 30. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其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。

20 项 31. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其中所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

项 32. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

25 项 33. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其中所述受试者是人。

30 项 34. 根据项 1-15 任一项的方法或项 16 的纤溶酶原、项 17 的药物组合物、项 19-20、22-24 任一项的试剂盒或项 21-24 任一项的制品，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

项 35. 根据项 34 的方法、纤溶酶原、药物组合物、试剂盒或制品，所

述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

本发明还涉及纤溶酶原用于实施项 1-15 任一项的方法的用途。

本发明还涉及纤溶酶原在制备用于项 1-15 任一项的方法的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。

5

本发明还涉及预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱及其相关病症。

一方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱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，其中所述受试者易患脂肪代谢紊乱、患有脂肪代谢紊乱或罹患其它疾病并伴有脂肪代谢紊乱。本发明还涉及纤溶酶原用于预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱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/或治疗受试者脂肪代谢紊乱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/或治疗受试者脂肪代谢紊乱及其相关病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱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。

10

15

在一些实施方案中，所述脂肪代谢紊乱为内分泌紊乱疾病、糖代谢疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、心血管疾病、肠道疾病、甲状腺疾病、胆囊或胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗引发或伴随的脂肪代谢紊乱。在一些实施方案中，所述脂肪代谢紊乱为高血压、糖尿病、慢性肝炎、肝硬化、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎、阻塞性胆管炎、药物或激素治疗引发或伴随的脂肪代谢紊乱。在一些实施方案中，所述脂肪代谢紊乱为高脂血症、高脂蛋白血症、脂肪肝、动脉粥样硬化、肥胖症、脏器脂肪沉积。在又一些实施方案中，所述动脉粥样硬化包括包括主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、脑动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化、肝动脉粥样硬化、肠系膜动脉粥样硬化、下肢动脉粥样硬化。

20

25

在又一个方面，本发明涉及预防和/或消减受试者脂肪在身体组织器官异常沉积的方法，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/或消减受试者脂肪在身体组织器官异常沉积的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或消减受试者脂肪在身体组织器官异常沉积的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明

30

还涉及用于预防和/或消减受试者脂肪在身体组织器官异常沉积的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或消减受试者脂肪在身体组织器官异常沉积的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

在又一个方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者脂肪在身体组织器官异常沉积导致的病症的方法，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/或治疗受试者脂肪在身体组织器官异常沉积导致的病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者脂肪在身体组织器官异常沉积导致的病症的药物、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/或治疗受试者脂肪在身体组织器官异常沉积导致的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，所述脂肪在身体组织器官异常沉积是指脂肪在血液，皮下组织、血管壁、内脏器官的异常沉积。在一些实施方案中，所述脂肪在身体组织器官异常沉积导致的病症包括肥胖症，高脂血症、高脂蛋白血症、脂肪肝、动脉粥样硬化、脂质性心脏损害、脂质性肾损害，脂质性胰岛损害。

在又一个方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱所致病症的方法，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/或治疗受试者脂肪代谢紊乱所致病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱所致病症的药物、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/或治疗受试者脂肪代谢紊乱所致病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者脂肪代谢紊乱所致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，所述病症包括肥胖症，高脂血症、高脂蛋白血症、脂肪肝、动脉粥样硬化、脂质性心脏组织损伤，脂质性肾损伤。

在又一个方面，本发明涉及通过减少脂肪异常沉积治疗受试者疾病的方法，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通过减少脂肪异常沉积治疗受试者疾病的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于通过减少脂肪异常沉积治疗受试者疾病的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于通过减少脂肪异常沉积治

疗受试者疾病的纤溶酶原。本发明还涉及通过减少脂肪异常沉积治疗受试者疾病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，所述疾病包括动脉粥样硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、脂肪肝、肝硬化，脑缺血、脑梗死、肾功能不全、肾病综合征、肾功能不全、肥胖症。

10 在又一个方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者组织器官脂质性损伤的方法，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/或治疗受试者组织器官脂质性损伤的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者组织器官脂质性损伤的药物、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/或治疗受试者组织器官脂质性损伤的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者组织器官脂质性损伤的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

15 在一些实施方案中，所述组织器官包括动脉管壁、心脏、肝脏、肾脏、胰腺。

20 在又一个方面，本发明涉及改善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改善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改善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，本发明还涉及用于改善受试者高脂血症的纤溶酶原。本发明还涉及用于改善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，所述高脂血症选自如下的一项或多项：高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症。

25 在又一个方面，本发明涉及降低受试者动脉粥样硬化风险的方法，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降低受试者动脉粥样硬化风险的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于降低受试者动脉粥样硬化风险的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于降低受试者动脉粥样硬化风险的纤溶酶原。本发明还涉及用于降低受试者动脉粥样硬化风险的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

30

5 在一些实施方案中，所述受试者患有高血压、肥胖症、糖尿病、慢性肝炎、肝硬化、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎或阻塞性胆管炎，或所述受试者服用影响脂肪代谢的药物或激素。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项降低受试者动脉粥样硬化风险：降低血中总胆固醇水平、甘油三酯水平、低密度脂蛋白水平、提高血中高密度脂蛋白水平。

10 在又一个方面，本发明涉及通过改善受试者高脂血症治疗疾病的方法，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通过改善受试者高脂血症治疗疾病的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于通过改善受试者高脂血症治疗疾病的药物、药物组合物、制品、试剂盒中的用途。进一步地，本发明还涉及用于通过改善受试者高脂血症治疗疾病的纤溶酶原。本发明还涉及用于通过改善受试者高脂血症治疗疾病的包含纤溶酶原的药物、药物组合物、制品、试剂盒。

15 在一些实施方案中，所述病症包括糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、慢性肝炎、脂肪肝、肝硬化，脑供血不足、脑缺血、脑梗死、慢性肾炎、慢性肾盂肾炎、肾功能不全、肾病综合征、尿毒症、肥胖症。

20 在又一个方面，本发明涉及预防和/或治疗受试者高血脂相关病症的方法，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/或治疗受试者高血脂相关病症的用途。本发明还涉及纤溶酶原在制备用于预防和/或治疗受试者高血脂相关病症的药物、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/或治疗受试者高血脂相关病症的纤溶酶原。本发明还涉及用于预防和/或治疗受试者高血脂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，所述病症包括糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、慢性肝炎、脂肪肝、肝硬化，脑供血不足、脑缺血、脑梗死、慢性肾炎、慢性肾盂肾炎、肾功能不全、肾病综合征、尿毒症、肥胖症。

30 在本发明的上述任一实施方案中，所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物或治疗方法联合施用。在一些实施方案中，所述一种或多种其它药物

包括高血压治疗药物、糖尿病治疗用药物、动脉粥样硬化治疗用药物、慢性肾小球肾炎治疗药物、慢性肾盂肾炎治疗药物、肾病综合征治疗用药物、肾功能不全治疗用药物、尿毒症治疗用药物、肾移植治疗用药物、脂肪肝治疗用药物、肝硬化治疗用药物、肥胖症治疗用药物。在一些实施方案中，

5 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。在一些进一步的实施方案中，所述药物包括降血脂药物：他汀类；贝特类；烟酸；消胆胺；

10 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 硝受体阻断剂如哌唑嗪； α 受体阻断剂如酚妥拉明； β 拉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

15 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

20 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。

25 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

30 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。

5 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。

10 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。

15 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。

20 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 0.0001-25 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。

30

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。

5

定义

本发明所述的“脂肪代谢紊乱”又称“脂肪代谢异常”、“脂肪代谢障碍”，为脂肪代谢发生异常、紊乱或障碍所引发的临床或病理表现的总称。在本文中，“脂肪代谢紊乱”、“脂肪代谢异常”、“脂肪代谢障碍”可互换使用。本
10 发明中“脂肪代谢”、“脂代谢”、“脂质代谢”可互换使用。

“脂肪代谢紊乱相关病症”是与脂肪代谢紊乱相关的病症的总称。所述的相关，可以是病因相关、发病机理相关、病理表现相关、临床症状相关和/或治疗原则相关。

“血脂”是甘油三酯、胆固醇和磷脂等的总称，脂蛋白是由载脂蛋白
15 和血脂组成的球型大分子复合体，由于脂蛋白包含胆固醇、甘油三酯的成分不同及密度大小不同被分为 5 大类：乳糜微粒（CM）极低密度脂蛋白（VLDL）中密度脂蛋白（IDL）低密度脂蛋白（LDL）高密度脂蛋白（HDL）。依据血脂危险水平，临床最常见的异常脂蛋白血症类型：高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症。继
20 发性血脂异常见于糖尿病、甲状腺功能低下、肾病综合症、肾移植、严重肝病、阻塞性胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗，例如雌激素治疗等，如能排除继发性血脂异常可考虑原发性血脂异常。

“高血脂”是指血浆中的胆固醇、甘油三酯、磷脂和未脂化的脂酸等血脂成分增高的病理状况。

25 “高血脂相关病症”是指病因、发病机理、病理表现、临床症状和/或治疗原则与高血脂相关的病症。优选所述病症包括但不限于糖尿病、高血压、动脉粥样硬化、冠心病、心绞痛、心肌梗死、心律失常、慢性肝炎、脂肪肝、肝硬化，脑供血不足、脑缺血、脑梗死、慢性肾炎、慢性肾盂肾炎、肾功能不全、肾病综合征、尿毒症、肥胖症。

30 由于脂肪代谢或运转异常使血浆中一种或几种脂质异常称为“高脂血症”、“高血脂症”或“血脂异常”（dyslipidemia）。

由于脂质不溶或微溶于水，必须与蛋白质结合成脂蛋白才能在血液循环中运转，因此高脂血症常为“高脂蛋白血症”的反映。

本发明的“高脂血症相关病症”也可称为“高脂血症相关病症”、“高脂蛋白血症相关病症”。

5 “脂肪肝”是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变，其可以是一个独立的疾病也可以由其它原因所致，例如肥胖性脂肪肝、酒精性脂肪肝、快速减肥性脂肪肝、营养不良性脂肪肝、糖尿病脂肪肝、药物性脂肪肝等。

10 在脂肪肝情况下，肝细胞中脂滴增多，使肝细胞脂肪变性、肿大，细胞核被挤压偏离中心。脂肪的代谢工要在线粒体中进行，脂肪向细胞外运输主要通过光面内质网，脂肪在肝细胞内的堆积进一步加重线粒体和内质网的负担降低其功能，进而影响其他营养素、激素、维生素的代谢。长期的肝细胞变性会导致肝细胞的再生障碍和坏死，进而形成肝纤维化、肝硬化。

15 “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
20 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，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。

25 人们尚未确定动脉粥样硬化的确切原因，但是人们已经发现了重要的致病因素：高脂血症、高血压、有吸烟史、有动脉粥样硬化家族史（60岁以前患上该病）或糖尿病。高脂血症能促进脂肪条纹的形成。因高血压对动脉施加一定的恒力，加速了动脉阻塞和硬化过程，因此能增加动脉粥样硬化的患病率。抽烟可以引致动脉收缩，限制血液流动，因而为动脉阻塞
30 创造了条件。糖尿病也能促使动脉粥样硬化的发生，特别是对于很小的动脉。

5 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

10 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。

15 动脉粥样硬化是冠心病、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，则该动脉所

20 供应的组织或器官将缺血或坏死。

动脉粥样硬化是一种全身性疾病，一个器官血管发生动脉粥样硬化病变，意味着其他地方的血管也可能已经存在同样的病变；同样，一个器官发生血管事件，意味着其他地方发生血管事件的危险性增加。

20 发明详述

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^[9]。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^[10,11]。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

25 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 α 2-抗纤溶酶（ α 2-antiplasmin）。PAs 的活性同时被 uPA 和 tPA 的纤

30

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)^[12,13]。

5 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^[14,15]。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^[16,17]。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^[18]。纤溶酶原的氨基末端部分包含五个同源三环, 15 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 α 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。

20 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^[19]。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^[15,20,21]。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, 25 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^[22]。此外, 纤溶酶具有激活某些潜在形式的生长因子的能力^[23-25]。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。

30 “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。

- 10 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 (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^[26,27]，有文献报道了 delta-纤溶酶原的氨基酸序列（序列 8）^[27]，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）^[28]，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）^[29]，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），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。

- 30 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。

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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。

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 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，除主题抗体以外的大分子，等等。

30 药物配制剂

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、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。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，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。

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 Depot™(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 5 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。

10 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 15 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。

20 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 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 30 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。

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
5 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
10 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的包装插页，包括例如指示所述组合物的使用
15 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。

附图简述

图 1 24-25 周糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后肝脏油红 O 染色图片。结果显示，给纤溶酶原组小鼠肝脏的脂质沉积面积要显著小于给溶媒 PBS
20 对照组，且统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能减少脂肪在糖尿病小鼠肝脏中的沉积。

图 2 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明显少于给溶媒 PBS
25 对照组，且定量分析统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能减少脂肪在动脉粥样硬化模型小鼠肝脏中的沉积。

图 3 16 周高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后肝脏油红 O 染色观察结果。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明显少于给溶媒 PBS 对照组，
30 且定量分析统计差异显著(*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能改善脂肪在高脂血症模型小鼠肝脏中的沉积。

图 4 16 周高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉窦油红 O 染色观察结果。A、C 为给溶媒 PBS 对照组，B、D 为给纤溶酶原组，E 为定量分析结果。结果显示，给纤溶酶原组小鼠主动脉窦脂肪沉积明显少于给溶媒 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脂肪在高脂血症模型小鼠主动脉窦中的沉积。

图 5 16 周高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后主动脉窦 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，给溶媒 PBS 对照组主动脉管壁可见泡沫细胞沉积（箭头所指），斑块沉积严重；给纤溶酶原组主动脉管壁仅可见轻度的泡沫细胞沉积，且内膜下未见明显的粥样斑块沉积，给纤溶酶原组主动脉损伤较轻。说明纤溶酶原能改善高脂血症模型小鼠主动脉窦内壁由于脂质沉积所导致的损伤。

图 6 16 周高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后心脏纤维蛋白免疫组化染色图片。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，给纤溶酶原组小鼠心脏纤维蛋白的阳性表达明显少于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异显著（*表示 $P < 0.05$ ）。说明纤溶酶原能减少高血脂所致的心脏损伤。

图 7 16 周高脂血症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 的阳性表达明显少于给溶媒 PBS 对照组，说明纤溶酶原能减轻高血脂所致心脏损伤。

图 8 16 周高脂血症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明显少于给溶媒 PBS 对照组，说明纤溶酶原能减轻高脂血症模型小鼠心脏纤维化。

图 9 16 周高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后血清肌钙蛋白检测结果。结果显示，给溶媒 PBS 对照组血清心肌肌钙蛋白浓度明显高于给纤溶酶原组，且统计差异显著（*表示 $P < 0.05$ ）。说明纤溶酶原能显著修复高脂血症心脏的损伤。

图 10 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 11 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天后血清总胆固醇检测结果。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高脂血症模型小鼠血清中总胆固醇的含量,具有降低血脂的功能。

图 12 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天后血清低密度脂蛋白胆固醇检测结果。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高脂血症模型小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇的含量,具有改善高血脂的功能。

图 13 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天后血清动脉粥样硬化指数检测结果。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,且统计差异极显著 (**表示 $P<0.01$)。说明纤溶酶原能有效降低高脂血症模型小鼠发生动脉粥样硬化的风险。

图 14 3%胆固醇高脂血症模型小鼠给予纤溶酶原 20 天后血清心脏风险指数结果。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 (**表示 $P<0.01$)。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。

图 15 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、C 为给溶媒 PBS 对照组, B、D 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,血管壁增厚,管壁凸凹不均;给纤溶酶原组中层弹性膜结构规则,呈波浪形,血管管壁厚度均匀。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 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。说明纤溶酶原能减少糖尿病小鼠心室脂质沉积,促进心室损伤的修复。

5 **图 17** 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的含量检测结果。结果显示，在对糖尿病小鼠连续注射人源纤溶酶原 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，且统计差异显著。说明注射纤溶酶原能促进血清高密度脂蛋白胆固醇的含量升高，改善糖尿病小鼠血脂紊乱。

10 **图 18** 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) 的含量检测结果。结果显示，糖尿病模型小鼠连续注射人源纤溶酶原 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，统计差异接近显著 ($P=0.1$)。说明纤溶酶原能降低糖尿病小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇的含量。

15 **图 19** 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，改善动脉粥样硬化模型小鼠血脂紊乱。

20 **图 20** 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 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能够降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中甘油三酯的含量，改善动脉粥样硬化模型小鼠血脂紊乱。

25 **图 21** 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低密度脂蛋白胆固醇的含量，改善动脉粥样硬化模型小鼠血脂紊乱。

图 22 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明显少于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能改善脂肪在动脉粥样硬化模型小鼠主动脉窦中的沉积。

30 **图 23** 16 周龄高脂血症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, 说明纤溶酶原能消减高脂血症模型小鼠主动脉窦纤维化水平。

5 **图 24** ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠给予纤溶酶原 30 天后心脏系数统计结果。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。

10 **图 25** 给予纤溶酶原 30 天后 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏天狼星红染色观察结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组肾脏胶原蛋白沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 且统计差异显著; 给纤溶酶原组纤维化基本恢复到正常水平。说明纤溶酶原能有效减少 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化。

15 **图 26** 给予纤溶酶原 30 天后 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏油红 O 观察结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组, D 为定量分析结果。结果显示, 给纤溶酶原组小鼠肾脏脂肪沉积(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组, 且定量分析统计差异显著; 此外, 给纤溶酶原组脂质沉积水平与空白对照组小鼠相似。说明纤溶酶原能消减脂肪在高脂血症模型小鼠肾脏中的沉积, 从而减少脂肪沉积所致的肾脏损伤。

20

实施例

实施例 1 纤溶酶原改善糖尿病小鼠肝脏脂质沉积

24-25 周龄雄性 db/db 小鼠 10 只, 随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组
25 和给纤溶酶原组各 5 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。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, 连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠取肝脏组织 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
30 染色 15min, 75%酒精分化 5 秒, 苏木素染核 30s, 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 1B）小鼠肝脏的脂质沉积面积显著小于给溶媒 PBS 对照组（图 1A），且统计差异显著（ $P=0.02$ ）（图 1C）。说明纤溶酶原能减少脂肪在糖尿病小鼠肝脏中的沉积。

实施例 2 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠肝脏脂质沉积

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^[30,31]。成模后的小鼠继续饲喂高脂高胆固醇饲料。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 10 30 天。于第 31 天处死小鼠，取材肝脏组织于 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 30s，甘油明胶封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

15 染色结果显示，给纤溶酶原组（图 2B）小鼠肝脏脂肪沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 2A），且定量分析统计差异显著（ $P=0.02$ ）（图 2C）。说明纤溶酶原能减少脂肪在动脉粥样硬化模型小鼠肝脏中的沉积。

实施例 3 纤溶酶原消减脂肪在 16 周高脂血症模型小鼠肝脏中的沉积

20 6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组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 25 体积的 PBS。给药 30 天，并于第 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 30s，甘油明胶封片。切片在 200 倍光学显微镜下观察。

30 油红 O 染色可显示脂质沉积，反映脂质沉积的程度^[34]。结果显示，给纤溶酶原组（图 3B）小鼠肝脏脂肪沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组（图

3A)，且定量分析统计差异显著（图 1C）。说明纤溶酶原能消减脂肪在高脂血症模型小鼠肝脏中的沉积。

实施例 4 纤溶酶原减少脂质在 16 周高脂血症模型小鼠主动脉窦中的沉积

5 6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组尾
10 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，取心脏组织于 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，主动脉窦冰冻切片厚度 8 μ m，油红 O 染色 15min，75%酒精分化 5 秒，苏木素染核 30s，甘油明胶封片。切片在 40（图 4A、4B）、200 倍（图 4C、
15 4D）倍光学显微镜下观察。

结果显示，给纤溶酶原组（图 4B、4D）小鼠主动脉窦脂肪沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 4A、4C），且统计差异显著（图 2E）。说明纤溶酶原能减少脂质在高脂血症模型小鼠主动脉窦中的沉积。

实施例 5 纤溶酶原改善 16 周高脂血症模型小鼠主动脉窦损伤

20 6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组尾
25 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，取心脏组织于 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。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。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
30 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 40（图 5A、B）、200 倍(图 5C、D)光学显微镜下观察。

结果显示, 给溶媒 PBS 对照组 (图 3A、C) 主动脉窦内壁泡沫细胞沉积 (箭头所指), 斑块沉积重; 给纤溶酶原组 (图 3B、D) 主动脉窦内壁仅可见轻度的泡沫细胞沉积, 且内膜下未见明显的粥样斑块沉积, 给纤溶酶原组主动脉窦内壁损伤较轻。说明纤溶酶原能改善高脂血症模型小鼠动脉窦内壁损伤。

5 实施例 6 纤溶酶原降低 16 周高脂血症模型小鼠心脏纤维蛋白的表达

6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料 (南通特洛菲, 货号 TP2031) 16 周以诱导高脂血症模型^[32,33], 此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 6 只, 给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天, 给纤溶酶原组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, 取心脏组织于 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 3%双氧水孵育 15 分钟, 水洗 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, 用 PAP 笔圈出组织。以 3%双氧水孵育 15 分钟, 水洗 2 次, 每次 5 分钟。兔抗小鼠纤维蛋白抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育 1 小时, PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色, 水洗 3 次后苏木素复染 30 秒, 流水冲洗 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。

纤维蛋白原是纤维蛋白的前体, 在组织存在损伤的情况下, 作为机体对损伤的一种应激反应, 纤维蛋白原水解成纤维蛋白沉积在损伤部位^[35,36]。因此, 可将损伤局部纤维蛋白水平作为损伤程度的一个标志。

免疫组化染色结果显示, 给纤溶酶原组小鼠 (图 6B) 心脏纤维蛋白的阳性表达明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 6A), 且统计差异显著 (图 6C), 说明纤溶酶原能减少高血脂所致的心肌损伤。

30 实施例 7 纤溶酶原有效保护 16 周高脂血症模型小鼠心肌损伤

6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 5 对照组 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组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，取心脏组织于 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 3%双氧水孵育 10 15 分钟，水洗 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，用 PAP 笔圈出组织。以 3%双氧水孵育 15 分钟，水洗 2 次，每次 5 分钟。山羊抗鼠 IgM (HRP)抗体（Abcam）室温孵育 1 小时，PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。按 DAB 试剂盒（Vector laboratories, Inc., USA）显色，水洗 3 次后苏木素染核 15 30 秒，流水冲洗 5 分钟。梯度酒精脱水，二甲苯透明，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，损伤的组织器官局部 IgM 抗体的水平与损伤程度呈正相关^[37,38]。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程度。

20 免疫染色结果显示，给纤溶酶原组小鼠(图 7B)心脏 IgM 的阳性表达明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 7A），说明纤溶酶原能减少高脂血症模型动物心脏的损伤。

实施例 8 纤溶酶原减轻 16 周高脂血症模型小鼠心脏纤维化

6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 25 对照组 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组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，取心脏组织于 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 30

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。

- 5 天狼星红染色可使胶原持久染色，作为病理切片特殊染色方法，天狼星红染色可以特异显示胶原组织。

染色结果显示，给纤溶酶原组（图 8B）胶原的沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 8A），说明纤溶酶原能减轻高脂血症模型小鼠心脏组织胶原蛋白的沉积，减轻心肌纤维化。

10 实施例 9 纤溶酶原修复 16 周高脂血症模型小鼠心肌损伤

6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。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 15 对照组 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组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，第 30 天给药后小鼠开始禁食，禁食 16 小时，第 31 天摘眼球取血，离心获得上清，采用心肌肌钙蛋白（Cardiac troponin I, CTNI）检测试剂盒（南京建成）检测血清中肌钙蛋白的浓度。

- 20 心肌肌钙蛋白 I 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^[39]。

检测结果显示，给溶媒 PBS 对照组血清心肌肌钙蛋白浓度明显高于给纤溶酶原组，且统计差异显著（图 9）。说明纤溶酶原能显著改善高脂血症模型小鼠心脏损伤。

25 实施例 10 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^[32,33]，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 30 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。

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”。

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 10)。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 11 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠血清总胆固醇水平

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^[32,33]，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 20 天小鼠禁食 16 小时，第 21 天扎眼眶静脉丛取血 50 μ L，离心获得上清，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) 进行总胆固醇检测。

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 11)。说明纤溶酶原能降低高脂血症模型小鼠血清中总胆固醇的含量。

实施例 12 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平

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^[32,33]，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 20 天小鼠禁食 16 小时，第 21 天扎眼眶静脉丛取血 50 μ L，离心获得上清，采用低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 A113-1）进行低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）检测。

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”。

10 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 12）。说明纤溶酶原能降低高脂血症模型小鼠血清中低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 13 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

15 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^[32,33]，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
20 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
25 A112-1）进行检测。

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^[40]。动脉粥样硬化指数=（T-CHO-HDL-C）/HDL-C。

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 13)。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 14 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠心脏发病风险

5 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^[32,33], 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/10 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。15 心脏风险指数=T-CHO/HDL-C。

心脏风险指数(cardiac risk index, CRI)用以评估血脂紊乱诱发心脏疾病的风险^[40]。

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 14)。说明纤溶酶原能有效的降低高脂血症模型小鼠发生20 心脏疾病的风险。

实施例 15 纤溶酶原减轻糖尿病小鼠主动脉管壁的损伤

24-25 周龄雄性 db/db 小鼠 10 只, 随机分为两组, 给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组各 5 只。实验开始当天记为第 0 天称重分组, 第 1 天开始给 PBS 或纤溶酶原, 连续给药 31 天。给纤溶酶原组小鼠按 2mg/0.2ml/只/25 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。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。固定后的主动脉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(图 15A、B)30 光学显微镜以及 1000 倍(图 15C、D)油镜下观察。

糖尿病合并高血脂是糖尿病较为常见的并发症，是糖尿病大血管病变的重要危险因子^[41]。

染色结果显示，给溶媒 PBS 对照组(图 15A、C)血管管壁有泡沫细胞沉积（箭头标识），中层弹性膜排列紊乱，血管壁增厚，管壁凸凹不均；给
5 纤溶酶原组(图 15B、D)中层弹性膜结构规则，呈波浪形，血管管壁厚度均匀。表明注射纤溶酶原可减轻糖尿病小鼠主动脉管壁的脂质沉积，对动脉管壁脂质沉积导致的损伤具有一定的保护作用。

实施例 16 纤溶酶原降低糖尿病小鼠心室脂质沉积

26 周龄雄性 db/db 小鼠 9 只随机分组，给纤溶酶原组 4 只，给溶媒
10 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 30s，甘油明胶封片。切片在 200 倍光学显微镜下观
15 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）。说明纤溶酶原能减少脂肪在糖尿病小鼠心室沉积，促进心室损伤的修复。

20 实施例 17 纤溶酶原提高糖尿病小鼠血清中的高密度脂蛋白胆固醇水平

26 周龄雄性 db/db 小鼠 20 只随机分组，给纤溶酶原组 11 只，给溶媒
PBS 对照组各 9 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 35 天。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原
2mg/0.2ml/只/天，对照组尾静脉注射同体积的 PBS。第 36 天小鼠摘眼球采
25 全血，4℃ 3500r/min 离心 10 分钟，取上清液并采用高密度脂蛋白检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A112-1）检测血清中高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）浓度。

检测结果显示，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，统计差异显著（图 17）。说明注射纤溶酶原能促进血清高密
30 度脂蛋白胆固醇的含量升高，改善糖尿病血脂紊乱。

实施例 18 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 周龄雄性 db/db 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。实验开始当天记为第 0 天称重分组，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。第 32 天小鼠摘眼球采全血，4℃ 3500r/min 离心 10 分钟，取上清液并采用低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 A113-1）检测血清中低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）浓度。

结果显示，糖尿病模型小鼠连续注射人源纤溶酶原 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，且统计差异接近显著（ $P=0.1$ ）（图 18）。说明纤溶酶原能降低血清中 LDL-C 的含量。

实施例 19 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠血清总胆固醇的含量

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^[30,31]。成模后的小鼠继续饲喂高脂高胆固醇饲料。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。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）进行总胆固醇检测。

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（ $P=0.014$ ）（图 19）。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，改善动脉粥样硬化的血脂紊乱。

实施例 20 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠血清甘油三酯的含量

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^[30,31]。成模后的小鼠继续饲喂高脂高胆固醇饲料。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 30 天。在第 30 天小鼠禁食 16 小时，第 31 天摘眼球取血，离心获得上清采用甘油三酯检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A110-1）进行甘油三酯检测。

- 5 检测结果显示，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（ $P=0.013$ ）（图 20）。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，改善动脉粥样硬化血脂紊乱。

10 实施例 21 纤溶酶原降低 ApoE 动脉粥样硬化小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇的含量

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^[30,31]。成模后的小鼠继续饲喂高脂高胆固醇饲料。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 15 30 天。第 30 天小鼠禁食 16 小时，第 31 天摘眼球取血，离心获得上清采用低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所，货号 A113-1）进行 LDL-C 检测。

- 20 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（ $P=0.017$ ）（图 21）。说明纤溶酶原能降低 ApoE 动脉粥样硬化模型小鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇含量，改善动脉粥样硬化模型小鼠血脂紊乱。

25 实施例 22 纤溶酶原改善脂质在 ApoE 动脉粥样硬化小鼠主动脉壁中的沉积

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^[30,31]。成模后的小鼠继续饲喂高脂高胆固醇饲料。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 30

30 天。于第 31 天处死小鼠，取心脏组织于 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 30s，甘油明胶封片。切片在 40 倍光学显微镜下观察。

- 5 染色结果显示，给纤溶酶原组（图 22B）小鼠主动脉窦脂肪沉积明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 22A）。说明纤溶酶原能减少脂质在动脉粥样硬化模型小鼠主动脉窦中的沉积。

实施例 23 纤溶酶原降低 16 周高脂血症模型小鼠主动脉窦纤维化

- 6 周龄雄性 C57 小鼠 11 只饲喂高脂高胆固醇饲料（南通特洛菲，货号 TP2031）16 周以诱导高脂血症模型^[32,33]，此模型定为 16 周高脂血症模型。成模后的小鼠继续饲喂高胆固醇饲料。在给药前三天每只取血 50μl 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 6 只，给纤溶酶原组 5 只。开始给药记为第 1 天，给纤溶酶原组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，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。主动脉窦切片厚度为 3μm，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 40（图 23A、23B）、200 倍（图 23C、23D）光学显微镜下观察。

结果显示，给纤溶酶原组（图 23B,23D）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（图 23A、23C），说明纤溶酶原能够消减高脂血症模型小鼠主动脉窦纤维化水平。

实施例 24 纤溶酶原改善 ApoE 动脉粥样硬化小鼠心脏代偿性肥大

- 25 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 50μl 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 × 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 24)。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。

5 实施例 25 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化

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^[32,33]，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。另取相同周龄的雄性 C57 小鼠 5 只作为空白对照

10 组，实验期间饲喂普通维持饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ L，检测总胆固醇，模型小鼠根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，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，给药周期 30 天，于第 31 天处死小鼠，取肾脏于 4%

15 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。肾脏组织切片厚度为 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，烘干后中性树脂封片，在 200 倍光学显微镜下观察。

20 结果显示，给纤溶酶原组 (图 25C) 肾脏胶原蛋白沉积 (箭头标识) 明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 25B)，且统计差异显著 (图 25D)；给纤溶酶原组纤维化基本恢复到正常水平 (图 25A)。说明纤溶酶原能有效的减少 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏纤维化。

25 实施例 26 纤溶酶原降低 3%胆固醇高脂血症模型小鼠肾脏脂肪沉积

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^[32,33]，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。另取相同周龄的雄性 C57 小鼠 5 只作为空白对照

30 组，实验期间饲喂普通维持饲料。在给药前三天每只小鼠取血 50 μ L，检测总胆固醇，模型小鼠根据总胆固醇浓度和体重随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组，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 30 天。第 31 天处死小鼠，取肾脏于 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。

- 5 结果显示，给纤溶酶原组（图 26C）小鼠肾脏脂肪沉积（箭头标识）明显少于给溶媒 PBS 对照组（图 26B），且定量分析统计差异显著（图 26D）；此外，给纤溶酶原组脂质沉积水平与空白对照组小鼠（图 26A）相似。说明纤溶酶原能消减脂肪在高脂血症模型小鼠肾脏中的沉积，从而减少脂肪沉积所致肾的脏损伤。

10

参考文献

- [1] 赵克健 主编.现代药理学名词手册.北京: 中国医药科技出版社.2004.第 533 页
- 15 [2] Shafir E., Raz. I. Diabetes: Mellitus or Lipidus [J]. Diabetologia, 2003, 46:433-440.
- [3] Mooradian AD. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: Current management guidelines [J]. Arch Intern Med. 2003, 163:33-40.
- [4] Appel G. Lipid abnormalities in renal disease [J]. Kidney Int, 1991, 39:169.
- [5] J Zah, Kov, H Varerkov, et al., Dislipoproteinemia and Chronic Kidney Failure [J].
- 20 Vnitr Lek. 2000, 46(9):539-46.
- [6] Effat Razeghi, Mohammadreza Shafipour et al.Lipid Disturbances Before and After Renal Transplant. Effat Razeghi et al /Experimental and Clinical Transplantation (2011) 4: 230-235
- [7] Grone HJ. Glomerular lipids in non-hereditary forms of glomerulopathy/glomerulonephritis [J]. Nephrol. Dial Transplant. 1999, 14:1595-1598.
- 25 [8] Larking RC. Dunlop ME, The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy [J] Athrosclerosis, 2001, 156(2):25-33.
- [9] 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.
- 30 [10] 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 plasminogen activator. N. Engl. J. Med. 296. 1017-1023.

[11] 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.

[12] Stoppelli, M.P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F., and Assoian, R.K. (1985). 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.

[16] 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.

[17] Wallén P (1980). Biochemistry of plasminogen. In *Fibrinolysis*, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC)

[18] 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.

[19] Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.

[20] Alexander, C.M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.

[21] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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.

[25] Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.

[26] 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.

[27] 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.

[28] 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.

[29] 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.

[30] Yutaka Nakashima, Andrew S. Plump, Elaine W. Raines et al. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jan;14(1):133-40.

[31] 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.

[32] 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.

[33] Ming Gu1, Yu Zhang., Shengjie Fan et al. Extracts of *Rhizoma Polygonati Odorati* Prevent High-Fat Diet-Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 8(11): e81724.

[34] 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.

[35]Dimitrios Davalos , Katerina Akassoglou. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*,2012. 34(1):43-62.

5 [36]Valvi D, Mannino DM, Mullerova H, et al. Fibrinogen, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and outcomes in two United States cohorts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:173–82.

[37]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.

[38] 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 Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655–665.

15 [39] R. Langhorn and J.L. Willesen. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 2016;30:36–50.

[40]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.

20 [41]Ametov AS, Kulidzhanian NK. Diabetes mellitus is an independent risk factor for cardiovascular disease. *Ter Arkh.* 2012;84(8):91-4.

权利要求书

1. 一种用于预防和/或治疗受试者脂肪肝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、怀疑患有脂肪肝及其相关病症或具有患上脂肪肝及其相关病状的风险。

5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述脂肪肝包括肥胖性脂肪肝、酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝、快速减肥性脂肪肝、营养不良性脂肪肝、糖尿病脂肪肝、药物性脂肪肝。

10 3. 一种用于预防和/或治疗受试者脂肪肝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，其中所述脂肪肝为内分泌紊乱疾病、糖代谢疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、心血管疾病、肠道疾病、甲状腺疾病、胆囊或胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗引发或伴随的。

15 4. 权利要求 3 的方法，其中所述脂肪肝为高血压、糖尿病、慢性肝炎、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎、阻塞性胆管炎、雌激素治疗引发或伴随的。

5. 一种用于预防和/或治疗受试者肝脏脂质沉积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、怀疑患有肝脏脂质沉积及其相关病症或具有患上脂肪肝及其相关病状的风险。

20 6. 权利要求 5 的方法，其中所述肝脏脂质沉积为内分泌紊乱疾病、糖代谢疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、心血管疾病、肠道疾病、甲状腺疾病、胆囊或胆道疾病、肥胖症、饮酒、药物治疗引发或伴随的。

25 7. 权利要求 6 的方法，其中所述肝脏脂质沉积为高血压、糖尿病、慢性肝炎、肾损伤、慢性肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、肾病综合征、肾功能不全、肾移植、尿毒症、甲状腺功能低下、阻塞性胆囊炎、阻塞性胆管炎、药物治疗引发或伴随的。

8. 一种消减动脉粥样硬化受试者肝脏脂质沉积的方法，包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

9. 一种消减糖尿病受试者肝脏脂质沉积的方法，包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

10. 一种消减高脂血症受试者肝脏脂质沉积的方法，包括给药所述受试者有效量的纤溶酶原。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述高脂血症为选自如下的一项或多项：血清甘油三酯(TG)升高、血清低密度脂蛋白(LDL)升高、极低密度脂蛋白(VLDL)升高。

12. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述高脂血症包括高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症。

13. 根据权利要求 1-12 任一项的方法，其中所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物或治疗方法联合施用。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述一种或多种其它药物包括糖尿病治疗用药物、动脉粥样硬化治疗用药物、肾病综合征治疗用药物、肾功能不全治疗用药物、尿毒症治疗用药物、肾移植治疗用药物、脂肪肝治疗用药物、肝硬化治疗用药物、肥胖症治疗用药物。

15. 根据权利要求 14 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。

16. 一种用于权利要求 1-15 任一项的方法的纤溶酶原。

17. 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 1-15 中任一项所述方法的纤溶酶原。

18. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：(i)用于权利要求 1-15 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)。

19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

20. 权利要求 18 或 19 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所述纤溶酶原被授予至所述受试者以实施权利要求 1-15 中任一项所述方法。

21. 一种制品，其包含：

包含标签的容器；和

包含(i)用于权利要求 1-15 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, 其中所述标签指示所述纤溶酶原或组合物被授予至所述受试者以实施权利要求 1-15 中任一项所述方法。

5 22. 权利要求 20 的试剂盒或权利要求 21 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。

23. 权利要求 22 的试剂盒或制品, 其中所述其他药物选自如下一项或多项: 糖尿病治疗用药物、动脉粥样硬化治疗用药物、肾病综合征治疗用药物、肾功能不全治疗用药物、尿毒症治疗用药物、肾移植治疗用药物、脂肪肝治疗用药物、肝硬化治疗用药物、肥胖症治疗用药物。

10 24. 权利要求 23 的试剂盒或制品, 其中所述其他药物选自如下一项或多项: 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。

15 25. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品, 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。

20 26. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品, 其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。

25 27. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品, 其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。

30 28. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求

21-24 任一项的制品，其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。

5 29. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其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。

10 30. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其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。

15 31. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其中所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

32. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

20 33. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其中所述受试者是人。

34. 根据权利要求 1-15 任一项的方法或权利要求 16 的纤溶酶原、权利要求 17 的药物组合物、权利要求 19-20、22-24 任一项的试剂盒或权利要求 21-24 任一项的制品，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

25 35. 根据权利要求 34 的方法、纤溶酶原、药物组合物、试剂盒或制品，所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

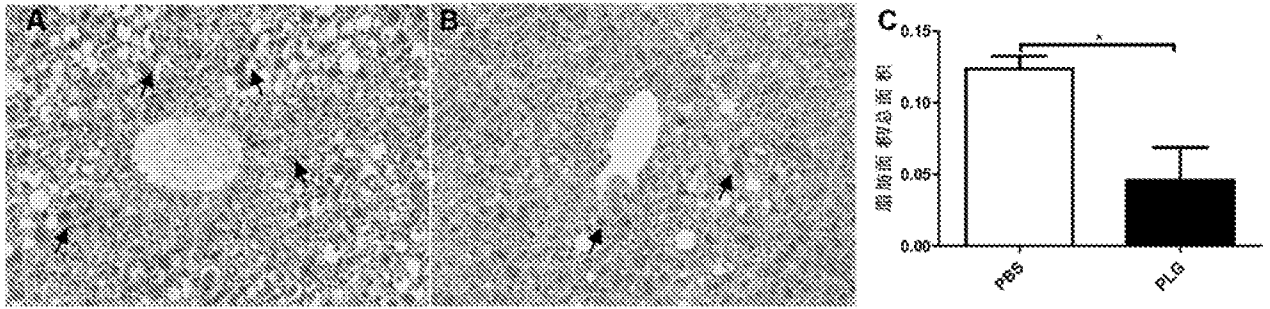


图1

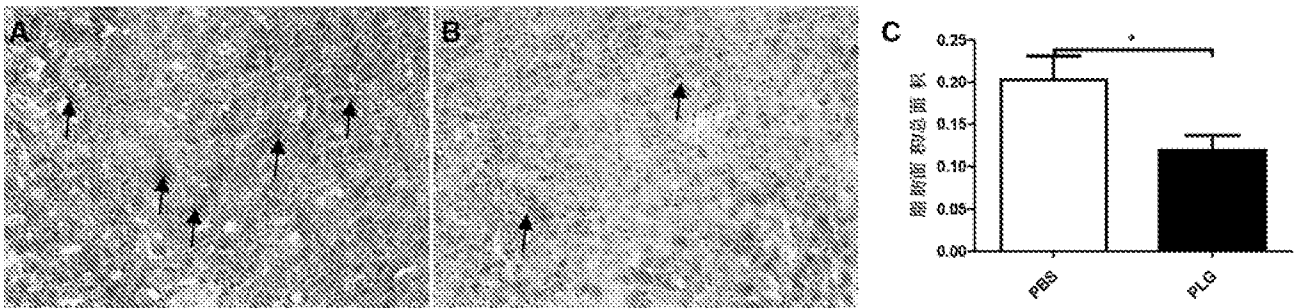


图2

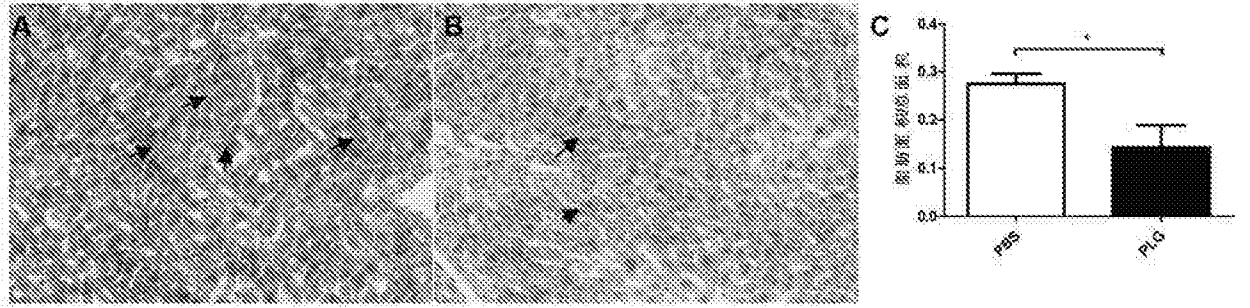


图3

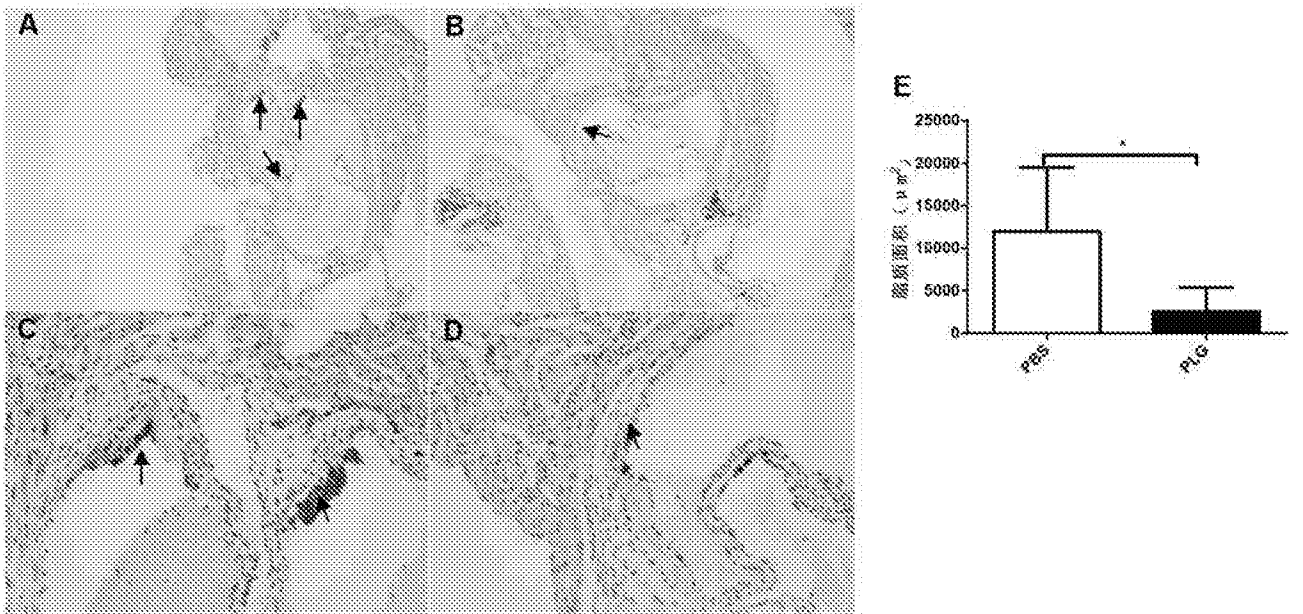


图4

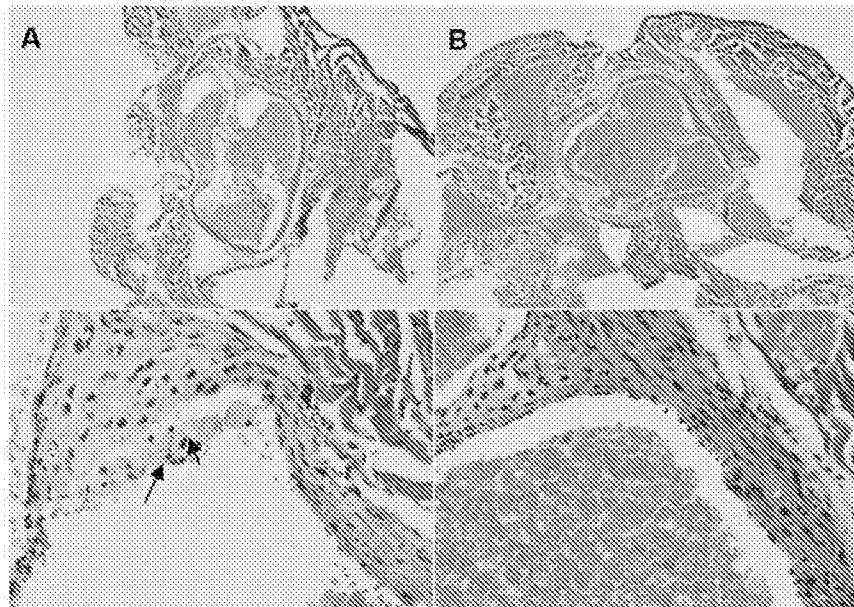


图5

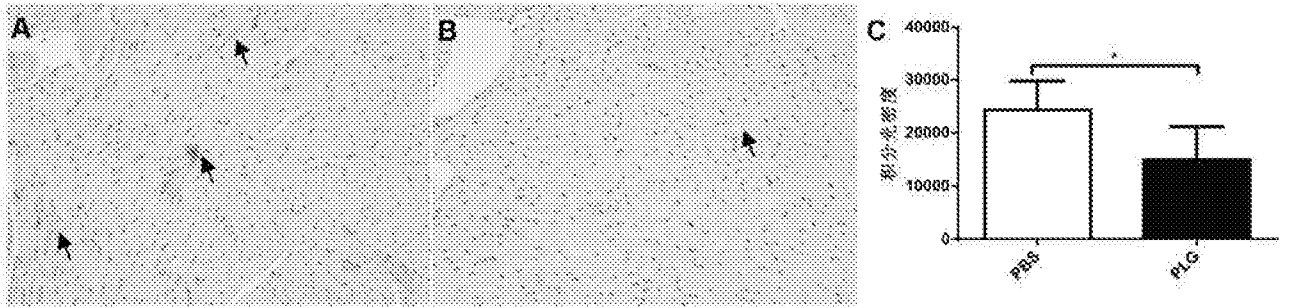


图6

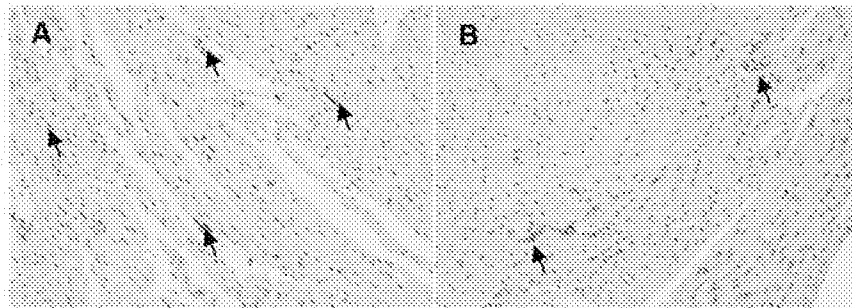


图7

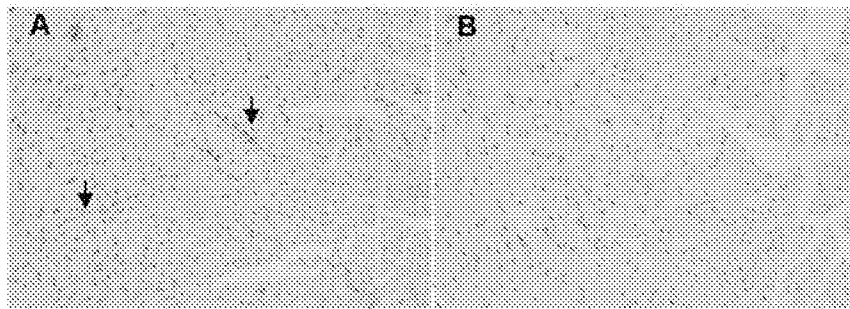


图8

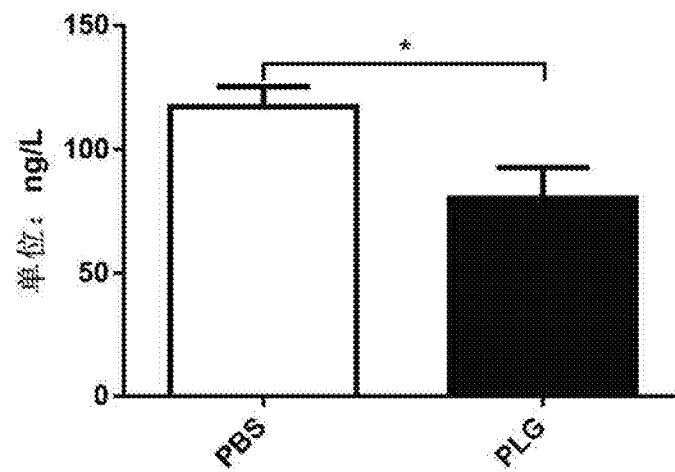


图9

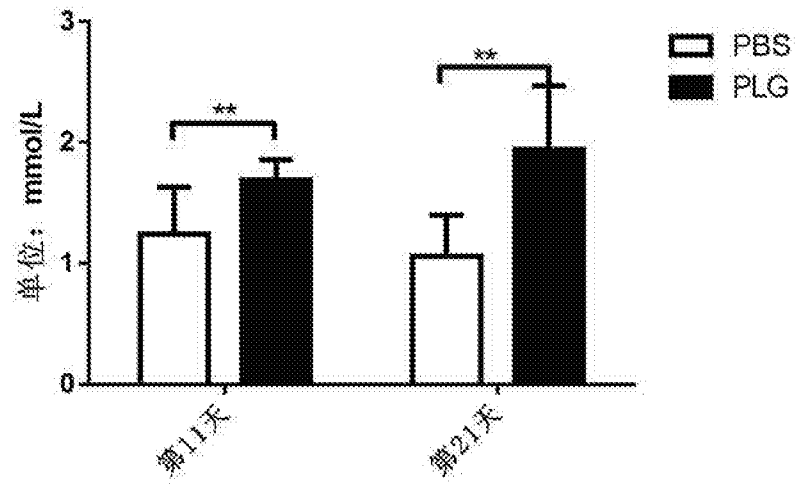


图10

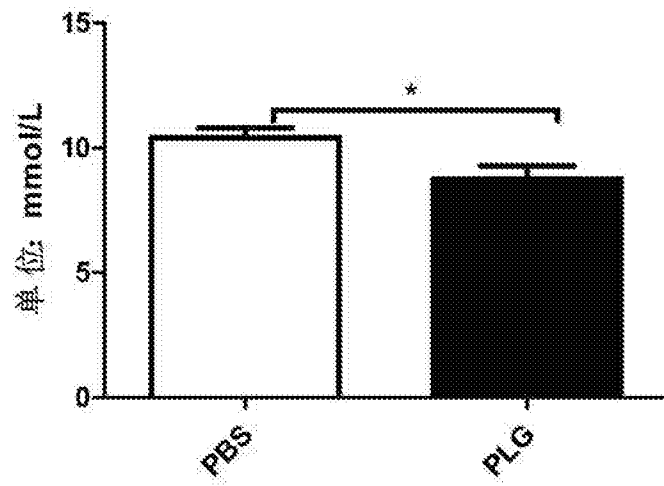


图11

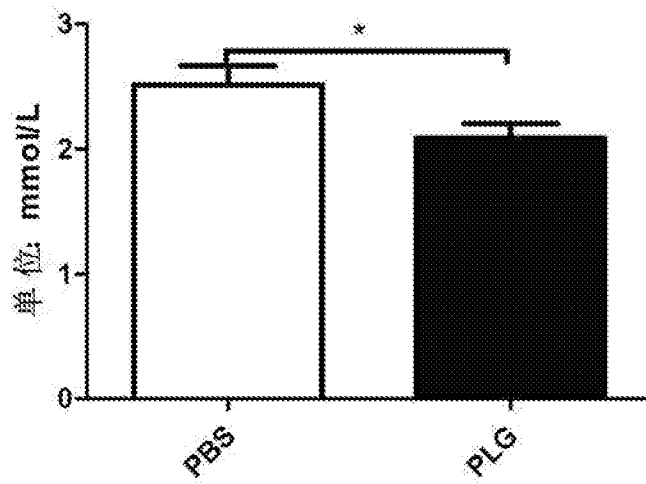


图12

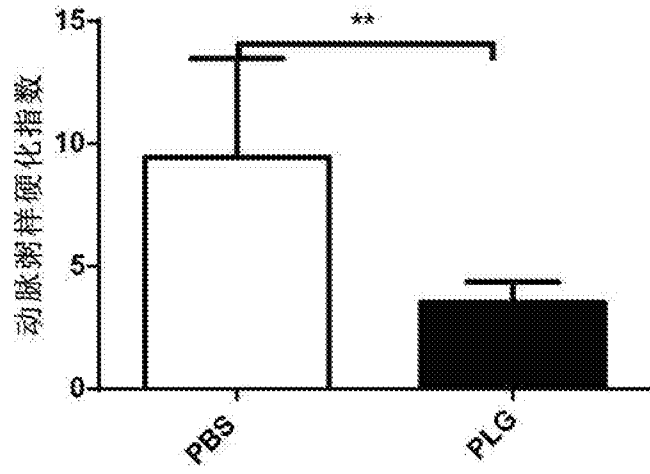


图13

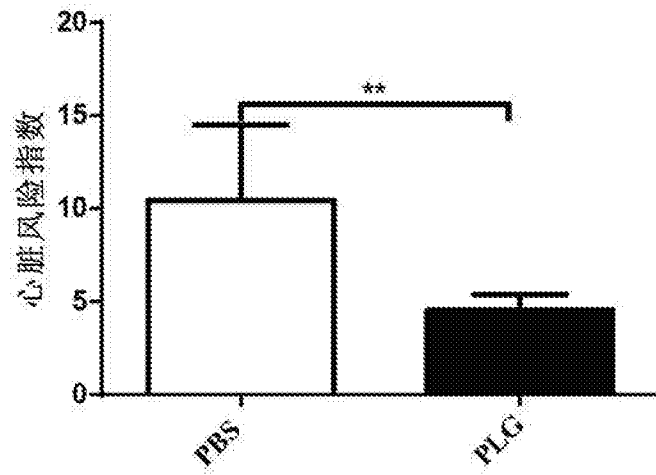


图14

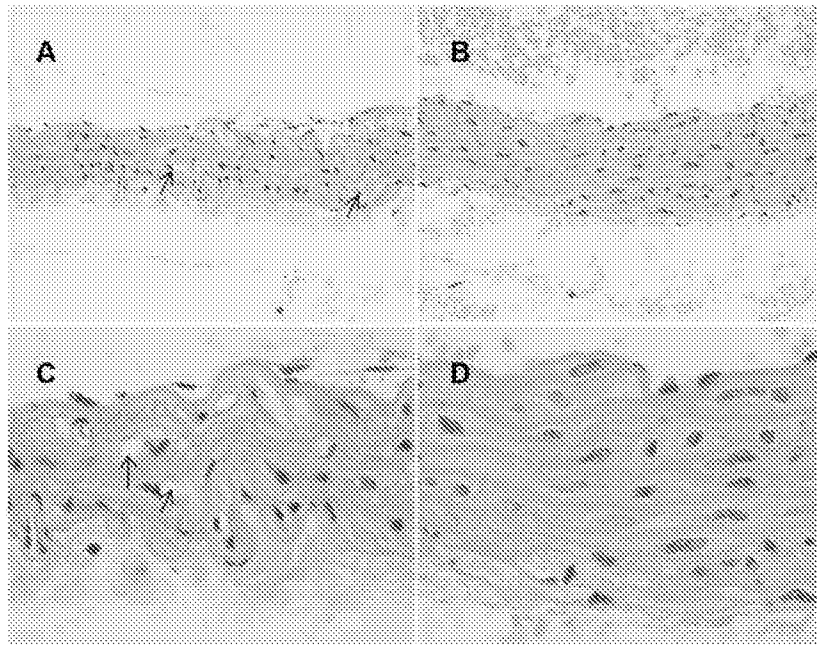


图15

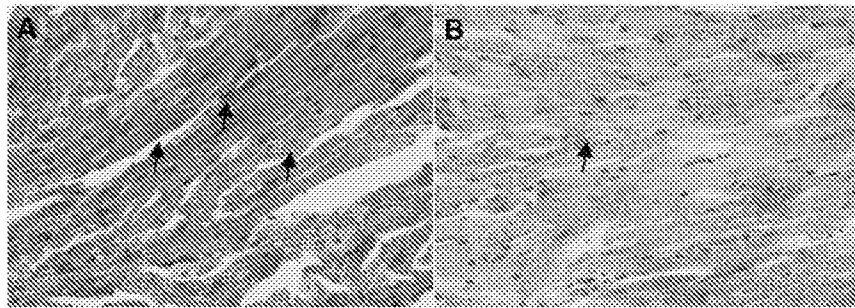


图16

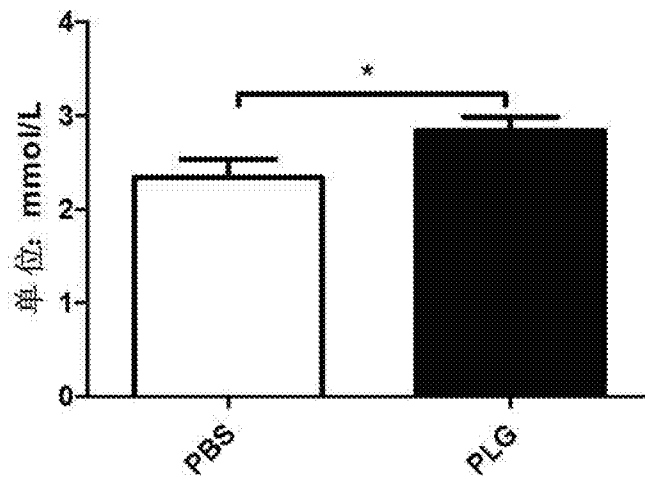


图17

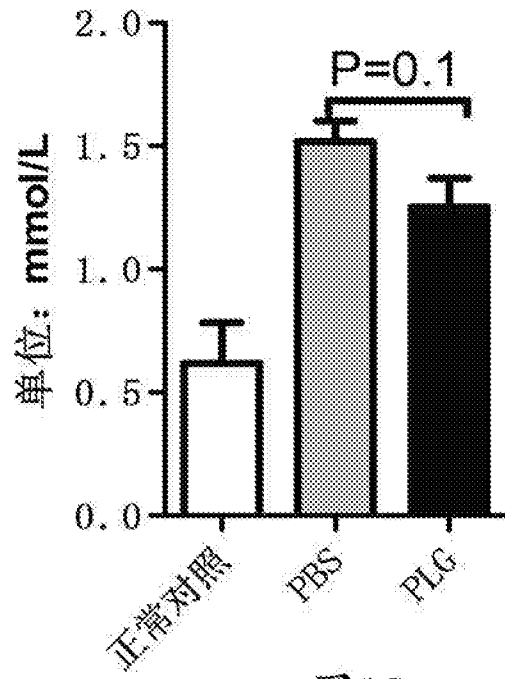


图18

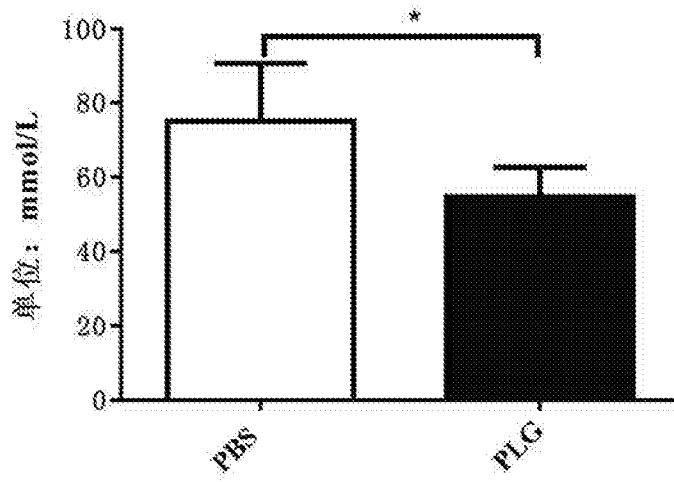


图19

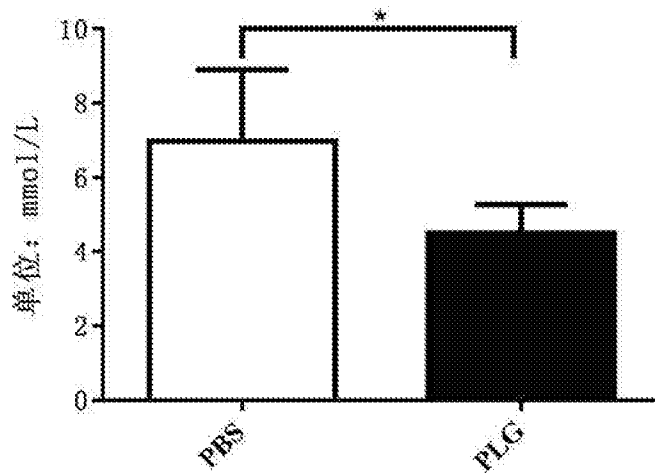


图20

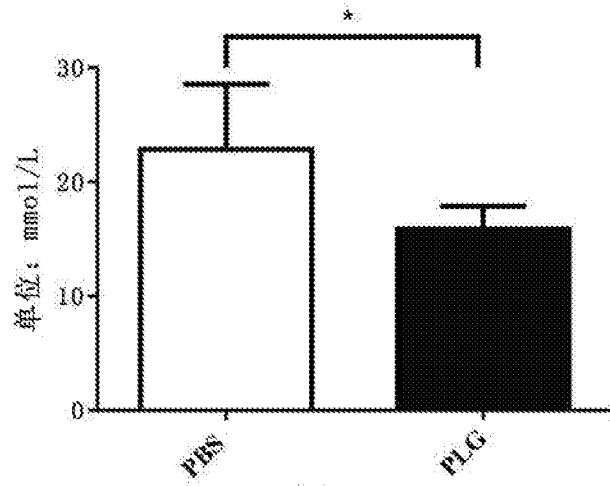


图21

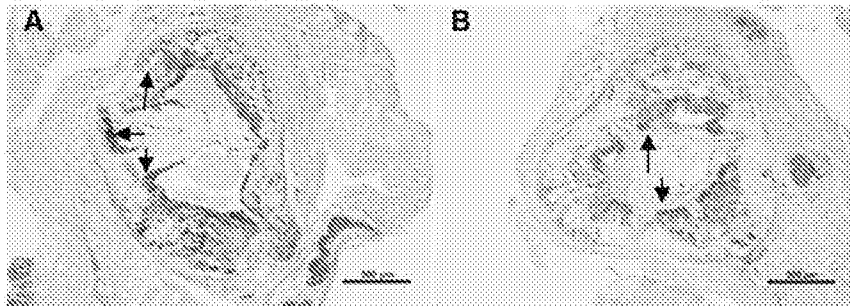


图22

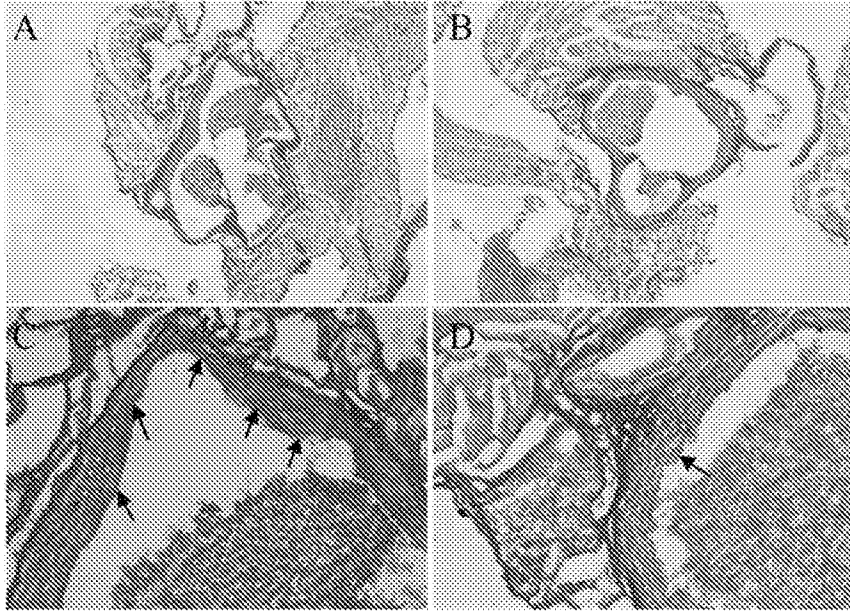


图23

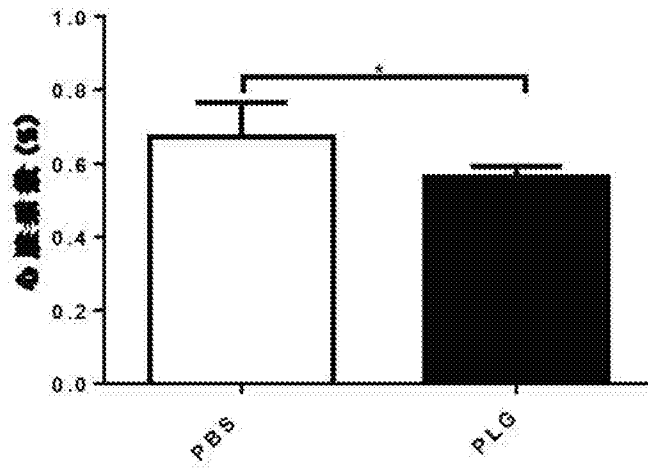


图24

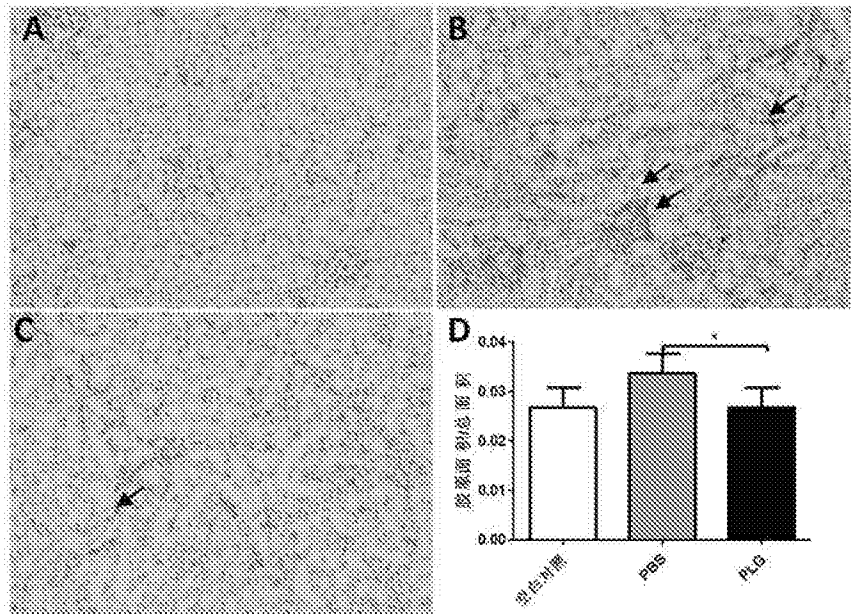


图25

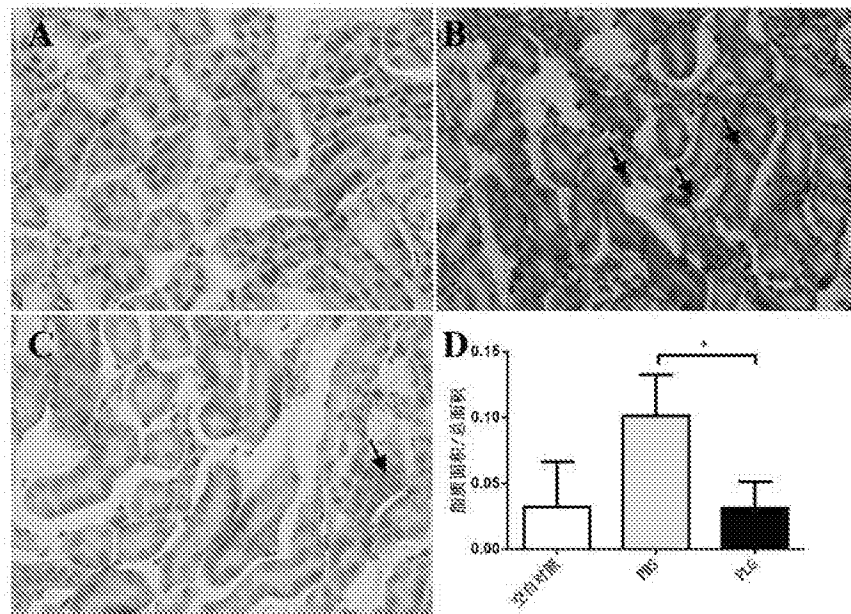


图26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/48 (2006.01) i; A61P 1/16 (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)

CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank: 深圳瑞健生命科学研究院有限公司, 李季男, 纤溶酶原, 纤维蛋白溶酶原, 小纤维蛋白溶酶原, 小纤溶酶原, 微纤维蛋白溶酶原, 微纤溶酶原, 脂肪肝, Kringle, plasminogen, plasmin, pig, microplasmin, miniplasmin, fatty liver, hepatic adipose infiltration, SEQ ID NOs: 2, 6, 8, 10, 12

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2017101869 A1 (TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES CO., LTD.), 22 June 2017 (22.06.2017), claims 1-13, and description, page 19, the last paragraph	1, 13, 21-22, 25-29, 31-35
X	BEIER, J.I. et al., "Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism", Exp. Biol. Med., 237(1), 31 January 2012 (31.01.2012), pages 1-9	1-35
X	KAJI, H., "Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation", Comprehensive Physiology, vol. 6, 31 October 2016 (31.10.2016), pages 1873-1896	1-35
X	LIU, J.Y., "Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver", World J. Gastroenterol, 20(40), 28 October 2014 (28.10.2014), pages 14672-14685	1-35

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
03 August 2017

Date of mailing of the international search report
16 August 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
LI, Zidong
Telephone No. (86-10) 62414280

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089047

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102482338 A (THROMBOGENICS NV), 30 May 2012 (30.05.2012), claims 1-33	16-35
A	CN 102482338 A (THROMBOGENICS NV), 30 May 2012 (30.05.2012), entire document	1-15
X	CN 103384722 A (THROMBOGENICS NV), 06 November 2013 (06.11.2013), claims 1-26	16-35
A	CN 103384722 A (THROMBOGENICS NV), 06 November 2013 (06.11.2013), entire document	1-15
A	沈红等, “脂肪细胞因子在非酒精性脂肪性肝病中的作用”, 世界华人消化杂志, 17(12), 28 April 2009 (28.04.2009), pages 1212-1217, (SHEN, Hong et al., Roles of Adipocytokines in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease, World Chinese Journal of Digestology)	1-35
A	邓银泉等, “非酒精性脂肪肝痰瘀证与纤溶状态的关系”, 中国中西医结合杂志, 25(1), 31 January 2005 (31.01.2005), pages 22-24, (DENG, Yinquan et al., Relationship between Phlegm-stasis Syndrome and Fibrinolytic Status in Patients with Non-alcoholic Fatty Liver, Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine)	1-35
A	JOSHI-BARVE, S. et al., “Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences”, CMGH, vol. 1, 31 July 2015(31.07.2015), pages 356-367	1-35
A	CHANG, M.L. et al., “Plasminogen activator inhibitor-1 is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease whereas leptin and adipo-nectin vary between genders”, Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 30, 31 December 2015 (31.12.2015), pages 329-336	1-35
A	THUY, S. et al., “Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Concentrations and with Fructose Intake”, The Journal of Nutrition., vol. 138, 31 December 2008 (31.12.2008), pages 1452-1455	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/089047

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 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/CN2017/089047

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.: 1-15, 25-35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 1-15 relate to a method for preventing and/or treating fatty liver and its related diseases of a subject, which is a method for treating a disease under PCT Rule 39.1(iv). For the same reasoning, when the subject matter of claims 25-35 is the method mentioned above, it also falls within a method for treating a disease under PCT Rule 39.1(iv). This report is provided based on a pharmaceutical use of plasminogen.
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/CN2017/089047

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017101869 A1	22 June 2017	None	
CN 102482338 A	30 May 2012	RU 2564131 C2	27 September 2015
		MX 335408 B	04 December 2015
		JP 2012532596 A	20 December 2012
		AU 2010270146 B2	05 February 2015
		AU 2010270146 B9	02 April 2015
		US 2012114630 A1	10 May 2012
		IN 201201144 P4	02 November 2012
		RU 2012103949 A	20 August 2013
		NZ 597452 A	25 October 2013
		EP 2451835 A1	16 May 2012
		IL 217113 A	28 February 2013
		KR 20120050442 A	18 May 2012
		HK 1167265 A0	23 November 2012
		MX 2012000475 A	31 March 2012
		JP 5819293 B2	24 November 2015
		US 9226953 B2	05 January 2016
		ZA 201200191 A	26 September 2012
		CN 102482338 B	28 September 2016
		WO 2011004011 A1	13 January 2011
		AU 2010270146 A1	02 February 2012
		CA 2767612 A1	13 January 2011
CN 103384722 A	06 November 2013	HK 1191054 A0	18 July 2014
		AU 2012204874 A1	02 May 2013
		EP 2661493 A1	13 November 2013
		US 2013273028 A1	17 October 2013
		ZA 201304937 A	26 March 2014
		JP 2014504867 A	27 February 2014
		AU 2012204874 B9	30 October 2014
		ES 2583082 T3	19 September 2016
		CA 2823491 A1	12 July 2012
		MX 2013007791 A	30 August 2013
		IN 201305139 P4	10 June 2016
		CN 103384722 B	16 November 2016
		JP 6085568 B2	22 February 2017
		IL 227007 A	30 June 2016
		AU 2012204874 B2	21 August 2014
		RU 2013132746 A	27 January 2015
		EP 2661493 B1	30 March 2016
		WO 2012093132 A1	12 July 2012
		NZ 612836 A	24 December 2014
		RU 2604807 C2	10 December 2016
		BR 112013017172 A2	11 October 2016
		US 9121014 B2	01 September 2015
		KR 20140015289 A	06 February 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089047

<p>A. 主题的分类 A61K 38/48(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, GenBank: 深圳瑞健生命科学研究院有限公司, 李季男, 纤溶酶原, 纤维蛋白溶酶原, 小纤维蛋白溶酶原, 小纤溶酶原, 微纤维蛋白溶酶原, 微纤溶酶原, 脂肪肝, Kringle, plasminogen, plasmin, plg, microplasmin, mini-plasmin, fatty liver, hepatic adipose infiltration, SEQ ID NOs: 2, 6, 8, 10, 12</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E</td> <td>WO 2017101869 A1 (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22) 权利要求1-13, 说明书第19页倒数第1段</td> <td>1, 13, 21-22, 25-29, 31-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>BELER, J.L. et al. "Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism." Exp. Biol. Med., 第237卷, 第1期, 2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31), 第1-9页</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KAJI, H. "Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation." Comprehensive Physiology., 第6卷, 2016年 10月 31日 (2016 - 10 - 31), 第1873-1896页</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LIU, J.Y. "Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver." World J. Gastroenterol., 第20卷, 第40期, 2014年 10月 28日 (2014 - 10 - 28), 第14672-14685页</td> <td>1-35</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	E	WO 2017101869 A1 (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22) 权利要求1-13, 说明书第19页倒数第1段	1, 13, 21-22, 25-29, 31-35	X	BELER, J.L. et al. "Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism." Exp. Biol. Med., 第237卷, 第1期, 2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31), 第1-9页	1-35	X	KAJI, H. "Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation." Comprehensive Physiology., 第6卷, 2016年 10月 31日 (2016 - 10 - 31), 第1873-1896页	1-35	X	LIU, J.Y. "Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver." World J. Gastroenterol., 第20卷, 第40期, 2014年 10月 28日 (2014 - 10 - 28), 第14672-14685页	1-35
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
E	WO 2017101869 A1 (深圳瑞健生命科学研究院有限公司) 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22) 权利要求1-13, 说明书第19页倒数第1段	1, 13, 21-22, 25-29, 31-35															
X	BELER, J.L. et al. "Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism." Exp. Biol. Med., 第237卷, 第1期, 2012年 1月 31日 (2012 - 01 - 31), 第1-9页	1-35															
X	KAJI, H. "Adipose Tissue-Derived Plasminogen Activator Inhibitor-1 Function and Regulation." Comprehensive Physiology., 第6卷, 2016年 10月 31日 (2016 - 10 - 31), 第1873-1896页	1-35															
X	LIU, J.Y. "Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver." World J. Gastroenterol., 第20卷, 第40期, 2014年 10月 28日 (2014 - 10 - 28), 第14672-14685页	1-35															
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型: "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</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 8月 3日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 8月 16日</p>																
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>李子东</p> <p>电话号码 (86-10)62414280</p>																

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102482338 A (斯路姆基因公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 权利要求1-33	16-35
A	CN 102482338 A (斯路姆基因公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 全文	1-15
X	CN 103384722 A (斯路姆基因公司) 2013年 11月 6日 (2013 - 11 - 06) 权利要求1-26	16-35
A	CN 103384722 A (斯路姆基因公司) 2013年 11月 6日 (2013 - 11 - 06) 全文	1-15
A	沈红等. "脂肪细胞因子在非酒精性脂肪性肝病中的作用." 世界华人消化杂志., 第17卷, 第12期, 2009年 4月 28日 (2009 - 04 - 28), 第1212-1217页	1-35
A	邓银泉等. "非酒精性脂肪肝痰瘀证与纤溶状态的关系." 中国中西医结合杂志., 第25卷, 第1期, 2005年 1月 31日 (2005 - 01 - 31), 第22-24页	1-35
A	JOSHI-BARVE, S. et al. "Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences." CMGH., 第1卷, 2015年 7月 31日 (2015 - 07 - 31), 第356-367页	1-35
A	CHANG, M.L. et al. "Plasminogen activator inhibitor-1 is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease whereas leptin and adipo- nectin vary between genders." Journal of Gastroenterology and Hepatology., 第30卷, 2015年 12月 31日 (2015 - 12 - 31), 第329-336页	1-35
A	THUY, S. et al. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Con- centrations and with Fructose Intake." The Journal of Nutrition., 第138卷, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第1452-1455页	1-35

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： 1-15, 25-35
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1-15涉及用于预防和/或治疗受试者脂肪肝及其相关病症的方法，属于PCT细则39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法，同理，当权利要求25-35的主题为所述方法时也属于PCT细则39.1 (iv) 规定的疾病的治疗方法，本报告基于纤溶酶原的制药用途作出。
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/CN2017/089047

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	2017101869	A1	2017年 6月 22日	无			
CN	102482338	A	2012年 5月 30日	RU	2564131	C2	2015年 9月 27日
				MX	335408	B	2015年 12月 4日
				JP	2012532596	A	2012年 12月 20日
				AU	2010270146	B2	2015年 2月 5日
				AU	2010270146	B9	2015年 4月 2日
				US	2012114630	A1	2012年 5月 10日
				IN	201201144	P4	2012年 11月 2日
				RU	2012103949	A	2013年 8月 20日
				NZ	597452	A	2013年 10月 25日
				EP	2451835	A1	2012年 5月 16日
				IL	217113	A	2013年 2月 28日
				KR	20120050442	A	2012年 5月 18日
				HK	1167265	A0	2012年 11月 23日
				MX	2012000475	A	2012年 3月 31日
				JP	5819293	B2	2015年 11月 24日
				US	9226953	B2	2016年 1月 5日
				ZA	201200191	A	2012年 9月 26日
				CN	102482338	B	2016年 9月 28日
				WO	2011004011	A1	2011年 1月 13日
				AU	2010270146	A1	2012年 2月 2日
				CA	2767612	A1	2011年 1月 13日
CN	103384722	A	2013年 11月 6日	HK	1191054	A0	2014年 7月 18日
				AU	2012204874	A1	2013年 5月 2日
				EP	2661493	A1	2013年 11月 13日
				US	2013273028	A1	2013年 10月 17日
				ZA	201304937	A	2014年 3月 26日
				JP	2014504867	A	2014年 2月 27日
				AU	2012204874	B9	2014年 10月 30日
				ES	2583082	T3	2016年 9月 19日
				CA	2823491	A1	2012年 7月 12日
				MX	2013007791	A	2013年 8月 30日
				IN	201305139	P4	2016年 6月 10日
				CN	103384722	B	2016年 11月 16日
				JP	6085568	B2	2017年 2月 22日
				IL	227007	A	2016年 6月 30日
				AU	2012204874	B2	2014年 8月 21日
				RU	2013132746	A	2015年 1月 27日
				EP	2661493	B1	2016年 3月 30日
				WO	2012093132	A1	2012年 7月 12日
				NZ	612836	A	2014年 12月 24日
				RU	2604807	C2	2016年 12月 10日
				BR	112013017172	A2	2016年 10月 11日
				US	9121014	B2	2015年 9月 1日
				KR	20140015289	A	2014年 2月 6日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)