

(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



(10) 国际公布号
WO 2018/107705 A1

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

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/48 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

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))。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/089065

(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/CN2016/110171

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)。

(54) Title: METHOD FOR PROMOTING INSULIN SECRETION

(54) 发明名称: 一种促进胰岛素分泌的方法

(57) Abstract: A method and drug for promoting insulin secretion, comprising administering an effective amount of plasminogen to a subject.

(57) 摘要: 一种促进胰岛素分泌的方法和药物, 包括给药受试者有效量的纤溶酶原。



WO 2018/107705 A1

一种促进胰岛素分泌的方法

技术领域

本发明涉及一种促进胰岛素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤维溶酶原，同时本发明涉及用于促进胰岛素分泌的药物。

背景技术

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种常见的具有遗传倾向的葡萄糖代谢异常和内分泌障碍性疾病，是由绝对性或相对性胰岛素分泌不足所引起。2015 年，全世界有 4.15 亿糖尿病患者，预计到 2040 年，糖尿病患者人数将达到 6.42 亿^[1]。糖尿病是严重危害人类健康的重大疾病之一。

糖尿病的主要表现为糖代谢异常以及脂肪、蛋白质等物质的代谢紊乱，而长期的高血糖状态会导致严重的糖尿病并发症，包括微血管并发症、糖尿病肾病、糖尿病心肌病、糖尿病神经系统病变、糖尿病皮肤病变和糖尿病合并感染等。其中糖尿病肾病以及糖尿病神经系统病变对患者生活质量影响巨大，危害严重。

临床上常见的糖尿病可以分为四种类型：1 型糖尿病 (type 1 diabetes, T1DM)、2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM)、妊娠期糖尿病、特殊类型糖尿病。其中，以 T1DM 和 T2DM 患者最为多见，妊娠期糖尿病和特殊类型糖尿病患者相对较少。

T1DM 被认为与遗传因素、环境因素（如病毒感染、致糖尿病化学物质、饮食因素）和自身免疫因素相关。研究表明，T1DM 相关的基因位点至少有 17 个，定位在不同的染色体。环境因素方面，对 T1DM 发病有影响的环境因素包括病毒感染、致糖尿病化学物质及饮食因素，其中病毒因素最为重要。目前已经发现腮腺炎、风疹病毒、巨细胞病毒等与 T1DM 发病有关。其机制在于病毒可以直接破坏胰岛 β 细胞，并在病毒损伤胰岛 β 细胞后激发自身免疫反应进一步损伤胰岛 β 细胞。致糖尿病的化学物质如四氧嘧啶、链脲佐菌素(STZ)、喷他咪等作用于胰岛 β 细胞，导致胰岛 β 细胞的破坏。自身免疫因素包括体液免疫和细胞免疫。体液免疫表现为患者血液循环中存在多种抗胰岛 β 细胞的自身抗体。细胞免疫主要表现为在胰岛炎症浸润细胞和胰岛 β 细胞表面可以观察到 HLA-DA 抗原的异常表达和 IL-2 受体与胰岛细胞表面 HLA-1 类抗原的过度表达，而外周血的 CD4+/CD8+

比例, 以及 IL-1、TNF- α 、INF- γ 水平升高。这些因素导致的病理变化集中于胰岛 β 细胞破坏, 使得体内胰岛素水平绝对降低, 引起 T1DM, 因此 T1DM 被考虑是一种自身免疫性疾病。

T2DM 是一种多基因遗传性疾病, 一般认为它的发生是多源性的, 其中环境因素和遗传因素共同作用导致胰岛素抵抗, 表现为相同水平浓度的胰岛素因为机体的抵抗作用而无法起到正常水平的作用。而机体为了达到正常血糖水平, 将会过量分泌胰岛素以缓解胰岛素使用的“低效”状态, 长此以往对胰岛 β 细胞的要求越来越高, 最终导致胰岛 β 细胞“过度工作”而自身损伤, 进展为胰岛素绝对缺乏。

DM 的发病机制

DM 发病机制复杂, 主要与家族遗传倾向、种族异质性、胰岛素受体缺陷、胰岛素受体底物损伤、蛋白酪氨酸磷酸酶相关基因上调、过度免疫炎症反应、脂毒性、氧化应激、及线粒体损伤等相关^[2-3]。

1. 游离脂肪酸

游离脂肪酸水平升高既是胰岛素抵抗的发病原因之一, 也是胰岛素抵抗状态的重要特征之一。在遗传因素或环境因素的作用下, 血液中的游离脂肪酸水平升高, 当超过脂肪组织的存储能力就会导致胰岛素抵抗的发生。研究显示, 长期的高脂饮食将会导致胰岛 β 细胞发生功能异常, 这是因为高脂饮食除了引发外周胰岛素抵抗还会使腹腔脂肪含量升高和胰岛素抑制脂肪分解能力降低, 从而促使游离脂肪酸含量升高, 继而抑制胰岛素受体及其底物 IRS-1、IRS-2 的酪氨酸位点磷酸化, 抑制 P13K 的活性, 导致胰岛素信号转导通路受阻形成胰岛素抵抗。

2. 炎症反应

1) 炎症与胰岛素抵抗

T2DM 是一种轻度非特异性炎症性疾病。近年来的研究显示, 炎症导致胰岛素抵抗的主要机制是炎症因子与胰岛素受体底物的信号转导出现交叉, 一方面非特异性炎症产生的炎症因子对 IRS/PI3K 信号通路出现了阻碍作用, 而另一方面炎症因子激活的一系列激酶会诱导 IRS 的丝、苏氨酸位点的磷酸化从而对正常的酪氨酸磷酸化产生阻碍, 最终使得胰岛素信号转导能力下降诱发胰岛素抵抗^[2-3]。

在靶细胞中, 胰岛素与其受体结合能激活受体, 之后细胞内的信号转

导通路产生一系列细胞内转导分子与酶促级联反应完成信号在胞内的逐级传递并放大，信号最后传至靶器官而产生一系列的生物学效应。信号传导通路主要有两条，一个是 IRS-1-PI3K-PKB/AKT 途径，另一个是丝裂原活化蛋白激酶 (Shc/Raf/MAPK) 途径。在第一条通路中，首先是在外源性胰岛素和/或葡萄糖刺激下发生胰岛素与其受体结合，从而激活了受体的内源性酪氨酸激酶。激活的酪氨酸激酶在实现自身的磷酸化的同时诱导了胰岛素受体底物 IRS 的酪氨酸位点磷酸化。活化的 IRS 迁移至细胞膜上，通过磷酸酪氨酸结合域 (PTB) 将磷酸酪氨酸锚定在 IRS 酪氨酸激酶上，酪氨酸磷酸化的 IRS 通过其 SH2 结构域招募到 PI3K 的调节亚单位 P85。P85 与磷酸肌醇的 3 磷酸分子结合，将磷脂酰肌醇一磷酸 (PIP) 转化为磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP2) 及磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP3)，它们是胰岛素和其他生长因子的第二信使，是下游信号分子磷酸肌醇依赖的蛋白激酶 -1(PDK1) 和 (或) 蛋白激酶 c(PKC) 的某一亚型的锚定位点。PDK1 可以激活蛋白激酶 B(PKB，也称为 Akt) 和某一非典型 PKC 亚型。激活的 PKB 一边通过丝/苏氨酸磷酸化让糖原合成激酶-3(GSK3)失活，另一方面激活哺乳动物的雷帕霉素靶点 (mTOR) 蛋白激酶，从而诱导其下游 70ku-S6 激酶 (p70S6K) 磷酸化激活。mTOR 蛋白激酶可作为“ATP 感受器”，激活 p70s6K 而不需要通过 Ca_2^+ / cAMP，实现控制蛋白的合成、加强基因的转录、促使胰岛 β 细胞肥大及其他生物效应。PKB 可以直接诱导某些转录因子丝/苏氨酸磷酸化促进细胞有丝分裂的发生^[4-5]。在第二条通路中，Ras 的激活可通过两条通路实现。1) 活化的胰岛素受体激活 IRS-2 蛋白，而 IRS-2 蛋白可将信号传递给适配蛋白生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2)，再与信号蛋白 GDP / GTP 交换因子 (mSOS) 相互作用进而能活化失活的 Ras-GDP 转变成的 Ras-GT 从而实现激活 Ras。胰岛素受体直接作用使信号蛋白 Shc 的酪氨酸磷酸化，然后 Shc 与 Grb2 结合经 mSOS 途径激活 Ras。激活的 Ras-GTP 招募 Raf 丝氨酸激酶，依次使 MAPK 激酶、MAPK 磷酸化。激活的 MAPK 可激活其他蛋白激酶参与诱导基因转录、调控细胞凋亡等过程^[6]。

目前已证实 IRS-1 的丝氨酸残基可被多种炎症激酶磷酸化，如 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、I κ B 激酶 β (I κ K β) 和蛋白激酶 C(PKC)- θ 。放射免疫分析法显示丝氨酸 307 位点是 JNK 磷酸化 IRS-1 的主要位点，它的突变会使 JNK 诱导的 IRS-1 磷酸化和 TNF 对胰岛素引起的 IRS-1 酪氨酸磷酸化的抑

制作用消失。JNK 通过磷酸化 IRS-1 的丝氨酸 307, 减少了胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化, 抑制胰岛素信号的转导^[7]。Hiorsumi 等发现饮食型肥胖鼠和 ob/ob 鼠的肝脏、肌肉、脂肪组织中 JNK 活性显著升高。基因敲除 (JNK1^{-/-}) 能够使饮食诱型肥胖鼠胰岛素抵抗现象减弱, 缓解 ob/ob 鼠的肥胖、高血糖和高胰岛素血症。肥胖鼠肝脏组织 IRS-1 丝氨酸 307 位点的磷酸化水平比瘦鼠高, 可是在基因敲除 (JNK1^{-/-}) 的肥胖鼠中并未见升高, 可见 IRS-1 的丝氨酸 307 位点是 JNK 在体内作用的靶点^[8]。研究显示 TNF α 刺激诱导肝细胞胰岛素抵抗的模型中, JNK 抑制剂可以完全阻断丝氨酸 307 的磷酸化。IkK β 可通过至少两个途径影响胰岛素信号传导, 可以是直接诱导 IRS-1 的 Ser307 位点磷酸化, 也可以通过 IkB 的磷酸化, 进而活化 NF- κ B, 通过刺激多种炎症因子的表达间接引发胰岛素抵抗。

炎症反应是感染、组织损伤和应激反应后人体免疫系统对抗这些损伤的防御性反应, 同时也是糖尿病、心血管疾病和肿瘤的病因或发病机制。

早在 1993 年, Hotmamisligil 等^[9]通过动物实验证明, 胰岛素抵抗的肥胖大鼠其脂肪组织中促炎性细胞因子、TNF- α 水平高。从此, 众多研究者开始探讨炎症与肥胖、胰岛素抵抗之间的关系, 并探究其分子发病机制。2006 年 Hotmamisligil^[10] 第一次提出代谢性炎症 (metabolic inflammation) 这一新的医学定义, 强调这种低度、慢性的全身炎症主要是由多余的营养物质和代谢物质导致的。代谢性炎症可能存在与典型炎症相类似的分子与信号的传导通路, 与既往我们所认识的典型炎症不同的是, 代谢性炎症并不存在红、肿、热、痛和功能障碍的症状。正常情况下, 机体内环境处于稳态水平, 炎症和代谢各自及相互之间均保持一种动态平衡状态。当机体发生代谢紊乱时, 打破了机体这种平衡状态, 引起免疫系统的失衡, 激发炎症信号传导通路, 促使机体释放一系列炎症因子, 某些炎症因子甚至放大自身炎症反应, 形成炎症瀑布效应, 进一步使机体发生胰岛素抵抗, 从而导致代谢综合征的发生。

研究证明 TNF- α 与代谢综合征有密切关系。TNF 又叫恶液质素, 主要由活化的巨噬细胞、自然杀伤 (NK) 细胞及 T 淋巴细胞产生, 把由巨噬细胞产生分泌的 TNF 称为 TNF- α , 把由 T 淋巴细胞产生分泌的淋巴毒素叫做 TNF- β 。TNF- α 的生物学活性占 TNF 总活性的 70%~95%, 因此目前经常涉及的 TNF 大多指的是 TNF- α 。经过多年的研究探讨, 目前已明确 TNF- α

与胰岛素抵抗、自身免疫性疾病、肿瘤、慢性乙型肝炎等多种疾病有关。在胰岛素抵抗的发生发展过程中 TNF- α 起到至关重要的作用。Swaroop 等^[11] 通过检测 50 例 T2DM 患者的血清 TNF- α 水平, 得出 T2DM 患者 TNF- α 水平升高, 并且与 BMI、空腹胰岛素水平以及稳态模型胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 显著相关, 提示 TNF- α 在 T2DM 发病机制中起重要作用。还有研究指出, TNF- α 可以使胰岛素受体的磷酸化受到抑制, 当胰岛素受体的磷酸化受到抑制时可以减少葡萄糖转运蛋白的基因表达, 从而使脂蛋白脂酶的活性降低, 最终可以造成脂肪的分解^[12]。

2) 炎症与胰岛 β 细胞的凋亡

慢性低度炎症反应与胰岛 β 细胞功能障碍密切相关。 β 细胞数量减少导致的胰岛 β 细胞功能障碍是 T2DM 发病的另一重要原因, 而 β 细胞的凋亡又是 β 细胞数量减少最重要的原因。由于遗传或饮食的原因, T2DM 患者易发生胰岛素抵抗, 患者血糖升高, 高血糖状态又能促进 IL-6 产生, IL-6 不仅可以减少 GLUT4 表达, 降低脂肪细胞对葡萄糖的转运, 阻碍糖原合成, 降低胰岛素的敏感性; 同时也可以促进胰岛细胞分泌 IL-6, 造成恶性循环。高血糖诱导 IL-1 β 大量产生, 通过激活 NF- κ B、MAPK、Fas、NO 等通路导致胰岛细胞凋亡, 多种炎症通路相互交叉促进, 加剧了胰岛细胞的凋亡, 最终导致胰岛功能的衰竭^[13]。此外, IL-1 β 还可以介导白细胞间的相互作用, 并与其他细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 等相互影响制约, 在 β 细胞损伤过程中起着重要的作用。T2DM 的血脂异常会引起激素类物质如瘦素和 IL-6 水平增加。瘦素可增加 IL-1 β 的释放来诱导 β 细胞凋亡, 还可负相调控胰岛素的分泌^[14]。ROS 除导致胰岛素抵抗外, 对于胰岛 β 细胞的损伤也有作用, 氧化应激状态下, 胰岛素基因转录因子的表达以及胰岛素结合位点明显减少, 从而影响胰岛素的产生及分泌。其他脂肪细胞因子如 TNF- α 和瘦也能降低 β 细胞的功能^[15]。这些细胞因子的联合作用, 对胰岛 β 细胞功能造成更明显的损伤。此外, 部分炎症因子还可作用于胰岛素受体底物 2 的关键部位, 使其丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 导致胰岛素受体底物 2 的降解加快, 促进胰岛 β 细胞的凋亡。

3. 氧化应激

研究表明, 氧化应激是引起 T2DM 的发生及发展的重要因素。氧化应激是指活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen

species, RNS) 的产生与机体内抗氧化防御系统的清除之间失衡, 导致 ROS 和 RNS 产生过多, 造成机体组织细胞及蛋白和核酸等生物大分子损伤^[13]。

高血糖是产生氧化应激的主要原因, 其通过线粒体电子传递链^[14]、葡萄糖自氧化和多元醇通路等途径^[15]增加机体内的 ROS 与 RNS 含量, 其中线粒体电子传递链是产生 ROS 的主要途径。线粒体电子传递链主要涉及酶复合物 I~IV、细胞色素 c 和辅酶 Q, 在酶复合物 I 和 III 中会持续产生少量的超氧产物, 包括超氧阴离子, 过氧化氢和羟基自由基, 而超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶会将超氧产物催化转化成氧气和水。但在肥胖或高血糖条件下, 超氧产物会大幅增加, 当超氧产物的产生速率超过其移除速率时即会产生氧化应激。

多项研究^[16-18]表明, ROS 可直接损伤 β 细胞, 特别是破坏细胞线粒体结构, 促进 β 细胞凋亡; ROS 还可通过影响胰岛素信号转导通路间接抑制 β 细胞功能, 如激活核转录因子 κB (nuclear transcription factor κB , NF- κB) 信号通路, 引起 β 细胞炎症反应; 抑制胰十二指肠同源盒因子 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX-1) 的核质易位, 抑制线粒体能量代谢, 减少胰岛素合成与分泌等。氧化应激通过 NF- κB 通路引起 β 细胞损伤 NF- κB 为 p50 和 RelA 两个亚基组成的二聚体, 在静息细胞中, 与抑制蛋白 I κB 结合, 以无活性的三聚体形式存在于胞浆中, 主要参与细胞对应激、细胞因子、自由基及细菌病毒等刺激的应答及瞬时调控基因表达等^[19]。研究表明, 高血糖诱导生成的 ROS 会通过扰乱细胞内信号转导激活 NF- κB , 诱导 β 细胞损伤^[20]。Mariappan 等^[21]用吡咯烷二硫代氨基甲酸 (PDTC) 抑制肥胖 db/db 小鼠体内 NF- κB 表达, 发现氧化应激对小鼠 β 细胞线粒体的损伤程度明显减轻; Hofmann 等^[22]利用抗氧化药物 α -硫辛酸对糖尿病患者进行治疗, 发现患者体内 NF- κB 活性显著降低, 患者病情也有改善; Eldor 等^[23]利用转基因技术特异性地抑制小鼠 NF- κB 的表达, 明显降低了 STZ 诱导后小鼠的糖尿病发病率。

NF- κB 作为一种多向核转录因子, 激活后参与细胞增殖、细胞凋亡及炎症和免疫等多种基因的调节^[24]。在糖尿病机体中, NF- κB 通过调控细胞因子和趋化因子的基因表达, 如 IL-1 (interleukin-1) 和 MCP-1 (monocyte/macrophage chemoattractant protein-1) 因子等, 引起胰岛白细胞增多, 导致 β 细胞损伤^[25]。另外 NF- κB 调控的许多基因产物如肿瘤坏死因

子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等又会进一步激活 NF- κ B, 加重 β 细胞损伤^[26]。

Mahadev 等^[27]研究显示, ROS 对胰岛素信号传导有调控作用, 且这种作用有多面性。在胰岛素刺激下, 机体会通过 Nox (NADPH oxidase) 依赖机制快速产生微量的 ROS, 后者作为第二信使, 主要通过氧化作用抑制 PTP1B 的活性促进胰岛素级联反应^[28], 而用 DPI (diphenyleneiodonium) 抑制 Nox 后, 胰岛素刺激的胰岛素受体 (insulin receptor, InsR) 与胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 磷酸化下降 48%^[29]。Loh 等^[30]的研究显示生理性 ROS 可促进机体对胰岛素的敏感性。虽然在生理状态下, 由胰岛素刺激产生的微量 ROS 会促进胰岛素的作用, 但是长期高血糖会使机体通过线粒体途径产生大量 ROS^[31], 引起胰岛素抵抗。

InsR 和 IRS 是胰岛素信号传导通路中重要的信号元件: 前者是胰岛素信号传导的起始元件, 而 IRS 是前者与通路下游元件的连接桥梁。大量研究表明, 氧化应激可通过多个途径干扰 InsR 和 IRS 的磷酸化反应, 阻碍胰岛素信号传导。IKK 是 NF- κ B 的抑制亚基 I κ B 的激活剂, 在 ROS 刺激下 IKK 可作为 InsR 和 IRS 的丝氨酸 / 苏氨酸磷酸化激酶, 促使 InsR 和 IRS 发生丝氨酸磷酸化, 正常的酪氨酸磷酸化受抑制, 阻碍胰岛素信号传导^[32]。Brownlee^[33] 研究显示, IKK 可直接磷酸化 IRS 307 位的丝氨酸残基, 导致 IRS 正常的酪氨酸磷酸化减弱, 阻碍 InsR 与 IRS 的结合, 从而引起胰岛素抵抗。

除 IKK 外, MAPK 家族中的多个成员对 InsR 和 IRS 也有影响。JNK、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 是 MAPK 家族成员, 具有丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶活性, 在受到氧化应激、细胞因子和 G-蛋白偶联受体激动剂等作用下可被激活。多项研究表明, JNK、ERK 和 p38 MAPK 的激活会加重 InsR 和 IRS 的丝氨酸 / 苏氨酸磷酸化程度, 使 InsR 与 IRS 之间的蛋白结合能力及 IRS 活化下游含有 SH-2 结构域的信号分子的能力降低^[34-36]。

糖尿病高糖状态所致的氧化应激是多种慢性并发症形成的关键原因之一, 也是诱发 DNA 损伤的重要因素^[37]。糖尿病发生时, 细胞外液可见持续高糖。在该状态下, 线粒体电子传递链产生的电子明显增多, 产生过多 ROS, 造成细胞内环境和脂质、蛋白质和 DNA 等生物大分子损伤。机体在

有氧代谢途径中产生的活性氧作为一种突变诱导剂, 可将 DNA 链上的鸟嘌呤氧化为 8-羟基鸟嘌呤 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)。在 DNA 复制过程中, 8-OHdG 易与腺嘌呤错配, 导致 G:C 到 T:A 颠换突变, 形成 DNA 损伤。此外, ROS 还会引起其他形式的 DNA 损伤, 包括 DNA 链断裂、DNA 位点突变、DNA 双链畸变和原癌基因与肿瘤抑制基因突变等。同时, DNA 损伤也可能加剧 ROS 及氧化应激过程, 如 DNA 损伤可通过 H2AX-还原型辅酶 II 氧化酶 1(Nox1)/Rac1 通路诱导 ROS 产生。ROS 进一步促使大量 Ca^{2+} 进入线粒体, 引起细胞坏死和凋亡, 或直接损伤线粒体, 引起线粒体功能障碍, 进而损伤胰岛 β 细胞, 加剧糖尿病的病理过程^[38]。

ROS 除导致胰岛素抵抗外, 对于胰岛 β 细胞的损伤也有作用, 氧化应激状态下, 胰岛素基因转录因子的表达以及胰岛素结合位点明显减少, 从而影响胰岛素的产生及分泌。其他脂肪细胞因子如 TNF- α 也能降低 β 细胞的功能^[15]。这些细胞因子的联合作用, 对胰岛 β 细胞功能造成更明显的损伤。此外, 部分炎症因子还可作用于胰岛素受体底物 2 的关键部位, 使其丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 导致胰岛素受体底物 2 的降解加快, 促进胰岛 β 细胞的凋亡。

从以上可见, 氧化应激在糖尿病发生和发展过程中的作用十分复杂。ROS 除直接损伤胰岛 β 细胞外, 还可作为信号分子激活一些应激敏感通路, 调节相关因子的表达, 引起 β 细胞凋亡或坏死, 抑制胰岛素分泌, 诱发胰岛素抵抗, 最终引发或加重糖尿病。

DM 的治疗

糖尿病通常采用药物治疗, 传统的药物治疗包括胰岛素类药物和口服类降糖药物。

胰岛素早期主要是从猪牛等动物的胰脏中提取而来, 在人体应用后会发生明显的过敏反应。20 世纪 90 年越来越成熟, 使得胰岛素类似物逐渐应用起来, 这种胰岛素能明显改变传统类胰岛素的药代动力学, 有着低血糖发生率低、起效快、作用持久等优势。目前, 随着胰岛素制剂探索的不断深入, 一些口服胰岛素制剂已步入试验阶段, 但因为技术上的困难, 至今尚无有效的口服制剂应用在临床。

传统口服类降糖药物较多, 常见的有如下几种: (1) 双胍类如二甲双胍。二甲双胍有良好的心血管保护作用, 降糖效果也不错, 目前已有多个

国家将其作为一线药物治疗 T2DM。(2) 磺脲类：磺脲类属于一种胰岛素促泌剂，刺激胰岛 β 细胞，使其分泌出胰岛素，达到改善血糖水平的效果。目前，我国允许上市的该类胰岛素主要有格列美脲、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列喹酮等，不过从一些研究中显示若长期服用该类药

物可能会造成降糖效果失败，极易发生低血糖与体质量增加等并发症。
(3) 噻唑烷二酮 (thiazolidinedione compounds, TZD) 类：1999 年 FDA 将罗格列酮与吡格列酮批准用在 T2DM 中，前者可能加重心脏病风险，为此之后被限制作为二线治疗药物使用，同时禁用于心衰病症。2013 年 6 月 FDA 对罗格列酮进行重新审核，指出该药物可继续用于临床，甚至放松或完全解除此药及其复方制剂的应用。(4) α - 糖苷酶抑制剂：这类胰岛素会抑制小肠黏膜上皮细胞的糖苷酶，进而缓解碳水化合物的吸收作用，导致餐后血糖水平降低。此类药物常用的有伏格列波糖、阿卡波糖及米格列醇等。

现阶段治疗糖尿病的药物主要为传统抗糖尿病药物，包括磺酰脲类、格列奈类、双胍类、噻唑烷二酮类 (thiazolidinediones, TZD)、 α - 葡萄糖苷酶抑制剂及胰岛素等，这些药物均存在不同程度的不良反应，如引发低血糖、胃肠道不适、肥胖等。随着对糖尿病基础理论研究的深入，为了避免传统降糖药物的副作用、对胰岛 β 细胞带来保护作用，人们也在积极地寻找新的糖尿病治疗靶点。目前发现与糖尿病发病机制相关的靶点主要包括胰高血糖素样肽 - 1 (glucagon - like peptide - 1, GLP - 1)、二肽基肽酶 - 4 (dipeptide peptidase - 4, DPP - 4)、钠 - 葡萄糖共转运蛋白 - 2 (sodium - glucose cotransporter - 2, SGLT - 2)、糖原合酶激酶 - 3 (glycogen synthase kinase - 3, GSK - 3)、蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphates, PTP)、葡萄糖激酶 (glucokinase, GK) 等。其中基于调整胰高血糖素的药物如胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1)类似物、GLP-1 受体激动剂及二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 抑制剂被认为可有效维持血糖稳态、改善 β 细胞功能、延缓糖尿病发展，甚至逆转糖尿病病程。

对于糖尿病目前尚没有一种有效的药物或手段能完全治愈，目前的药物治疗集中在通过控制血糖在一定的范围降低并延缓并发症的发生。随着对糖尿病发病机制更深入、全面的了解，对于糖尿病的治疗药物研究，也

从对传统机制的药物研究过渡到对具有新靶点和新作用机制的药物研究，其中有些已上市，如 GLP - 1 受体激动剂、DPP - 4 抑制剂及 SGLT - 2 抑制剂等，还有一些药物处在临床或临床前研究阶段，如 GPR119 受体激动剂、11 β - HSD1 抑制剂、PTP1B 抑制剂及 GK 激动剂等，其疗效和安全性还有待进一步临床验证。尽管近年来新靶点抗糖尿病药物的出现为 DM 治疗提供了更多的选择，但由于糖尿病的发病机制复杂，涉及的激素、酶和受体众多，新药物研究领域还存在诸如单靶点药物作用范围较窄、降糖作用较弱、作用于全身系统引起不良反应等问题均有待于进一步研究。因此，人们需要寻找可作用于糖尿病发病机制诸多方面的、更加有效的治疗药物。

本发明发现纤溶酶原能够减轻糖尿病实验小鼠胰腺组织的损伤、控制炎症、减少胰岛 β 细胞凋亡、修复胰腺组织、恢复胰岛 β 细胞的分泌功能、降低血糖，是一种有望成为全面针对糖尿病发病机制诸多方面的全新药物。

发明简述

本发明包括下述各项：

1. 一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

2. 项 1 的方法，其中所述纤溶酶原还促进糖尿病受试者胰岛素的表达。

3. 项 1 或 2 的方法，其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

4. 项 1-3 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者进食后的胰岛素分泌。

5. 项 1-3 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者禁食状态下的胰岛素分泌。

6. 项 1-5 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者应答血糖升高刺激的胰岛素分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。

7. 项 1-6 任一项的方法，其中所述纤溶酶原在促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时，降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌。

8. 项 7 的方法，其中所述纤溶酶原通过促进所述胰岛素表达和/或分泌

的同时,降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌,实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。

9. 一种降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

5 10. 项 9 的方法,其中所述纤溶酶原还降低糖尿病受试者胰高血糖素的表达。

11. 项 9 或 10 的方法,其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

12. 项 9-11 任一项的方法,其中所述纤溶酶原降低糖尿病受试者进食后的胰高血糖素分泌。

10 13. 项 9-12 任一项的方法,其中所述纤溶酶原降低糖尿病受试者禁食状态下的胰高血糖素分泌。

14. 项 9-13 任一项的方法,其中所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌,使血糖回复到正常或接近正常水平。

15 15. 项 9-14 任一项的方法,其中所述纤溶酶原在降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时,促进所述胰岛素表达和/或分泌。

16. 项 15 的方法,其中所述纤溶酶原通过降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时,促进所述胰岛素表达和/或分泌,实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。

20 17. 项 1-16 任一项的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2(IRS-2)的表达。

18. 一种降低糖尿病受试者血糖的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

19. 项 18 的方法,其中所述血糖选自如下的一项或多项:血清葡萄糖水平、血清果糖胺水平、血清糖化血红蛋白水平。

25 20. 项 19 的方法,其中所述血糖为血清葡萄糖水平。

21. 项 18-20 任一项的方法,其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

22. 一种提高糖尿病受试者糖耐量的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

23. 项 22 的方法,其中所述糖尿病为 T2DM。

30 24. 一种促进糖尿病受试者餐后血糖下降的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

25. 项 24 的方法，其中所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1.5 小时给予。

26. 项 25 的方法，其中所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1 小时给予。

5 27. 一种促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

28. 一种促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

29. 项 28 的方法，其中所述纤溶酶原促进细胞因子 TNF- α 的表达。

10 30. 项 28 或 29 的方法，其中所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子 NF- κ B 的表达。

31. 项 28-30 任一项的方法，其中所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉积。

32. 项 31 的方法，其中所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。

33. 项 28-32 任一项的方法，其中所述纤溶酶原抑制胰岛细胞凋亡。

15 34. 项 28-33 的方法，其中所述糖尿病患者为 T1DM 或 T2DM。

35. 项 34 的方法，其中所述 T1DM 受试者为 PLG 活性正常或 PLG 活性受损受试者。

36. 项 1-35 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用。

20 37. 项 36 的方法，其中所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联用：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物，抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

25 38. 项 1-37 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性。

39. 项 1-38 任一项的方法，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

30 40. 项 1-39 任一项的方法，所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

41. 项 1-40 任一项的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

5 42. 项 1-41 任一项的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

43. 项 1-41 任一项的方法，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

44. 项 1-43 任一项的方法，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

10 45. 项 1-44 任一项的方法，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

46. 项 1-45 任一项的方法，其中所述受试者是人。

47. 项 1-46 任一项的方法，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

48. 项 1-47 任一项的方法，所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

15 49. 一种用于项 1-48 任一项的方法的纤溶酶原。

50. 一种药物组合物，其包含药学上可接受的载剂和用于项 1-48 中任一项所述方法的纤溶酶原。

51. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：(i)用于项 1-48 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)。

20 52. 根据项 51 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

53. 项 51 或 52 的试剂盒，其还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施项 1-48 中任一项所述方法。

54. 一种制品，其包含：

25 含有标签的容器；和

包含(i)用于项 1-48 中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施项 1-48 中任一项所述方法。

30 55. 项 51-53 中任一项的试剂盒或项 54 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。

56. 项 55 的试剂盒或制品，其中所述其他药物选自下组：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物，抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

一方面，本发明涉及一种预防和治疗糖尿病的方法，包括给药受试者有效量的纤维蛋白溶酶原或纤溶酶。

另一方面，本发明涉及一种降低糖尿病受试者血糖的方法，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糖尿病受试者血糖的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备降低糖尿病受试者血糖的药物的用途。此外，本发明还涉及用于降低糖尿病受试者血糖的纤溶酶原。

10 在一些实施方案中，所述血糖选自如下的一项或多项：血清葡萄糖水平、血清果糖胺水平、血清糖化血红蛋白水平。在另一些实施方案中，所述血糖为血清葡萄糖水平。在上述实施方案中，所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

另一方面，本发明涉及一种提高糖尿病受试者糖耐量的方法，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提高糖尿病受试者糖耐量的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备提高糖尿病受试者糖耐量的药物的用途。此外，本发明还涉及用于提高糖尿病受试者糖耐量的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述糖尿病为 T2DM。

一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者餐后血糖下降的方法，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促进糖尿病受试者餐后血糖下降的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者餐后血糖下降的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进糖尿病受试者餐后血糖下降的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1.5 小时给予。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1 小时给予。

一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的方法，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促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的纤溶酶原。另一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

在一些实施方案中，所述纤溶酶原还促进糖尿病受试者胰岛素的表达。在上述实施方案中，所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进糖尿病受试者进食后的胰岛素分泌。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进糖尿病受试者禁食状态下的胰岛素分泌。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进糖尿病受试者应答血糖升高刺激的胰岛素分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原在促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时，降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌，具体地，所述纤溶酶原通过促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时，降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌，实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。

一方面，本发明涉及一种降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的方法，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糖尿病受试者胰高血糖素分泌的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的药物的用途。此外，本发明还涉及用于降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原还降低糖尿病受试者胰高血糖素的表达。在上述实施方案中，所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。在一些实施方案中，所述纤溶酶原降低糖尿病受试者进食后的胰高血糖素分泌。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原降低糖尿病受试者禁食状态下的胰高血糖素分泌。在一些实施方案中，所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。在一些实施方案中，所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原在降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时，促进所述胰岛素表达和/或分泌，具体地，所述纤溶酶原通过降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时，促进所述胰岛素表达和/或分泌，实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。在上述实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2(IRS-2)的表达。

一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的方法，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促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的药物的用途。此外，本发明还涉及

用于促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2(IRS-2)的表达。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进细胞因子 TNF- α 的表达。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子 NF- κ B 的表达。在一些实施方案中，所述胰岛细胞损伤为选自下述的一种或多种：胰岛 β 细胞合成和分泌胰岛素的功能损伤、胰岛组织结构损伤、胰岛胶原沉积、胰岛的纤维化、胰岛细胞凋亡和胰岛分泌胰高血糖素、胰岛素的平衡紊乱、胰岛分泌胰高血糖素和胰岛素的水平不能与受试者血糖水平相适应。在一些实施方案中，所述纤溶酶原使所述糖尿病受试者胰高血糖素分泌减少，胰岛素分泌增加，具体地，所述胰岛胰高血糖素和胰岛素分泌的正常平衡得到修复。

另一方面，本发明涉及一种保护受试者胰岛的方法，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保护受试者胰岛的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备保护受试者胰岛的药物的用途。此外，本发明还涉及用于保护受试者胰岛的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉积。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原减轻胰岛细胞凋亡。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛胰岛素受体底物 2(IRS-2)的表达。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛炎症的修复。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进细胞因子 TNF- α 的表达。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子 NF- κ B 的表达。在上述实施方案中，所述受试者为糖尿病患者，具体地，所述糖尿病患者为 T1DM 或 T2DM。在一些实施方案中，所述 T1DM 受试者为 PLG 活性正常或 PLG 活性受损受试者。

另一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的方法，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促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的药物的用途。此外，本发明还涉及促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进细胞因子 TNF- α 的表达。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子 NF- κ B 的表达。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉积。在另一些实施方案中，所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。在

另一些实施方案中，所述纤溶酶原抑制胰岛细胞凋亡。在上述实施方案中，所述糖尿病患者为 T1DM 或 T2DM，具体地，所述 T1DM 受试者为 PLG 活性正常或 PLG 活性受损受试者。

5 一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者细胞因子 TNF- α 表达的方法，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促进糖尿病受试者细胞因子 TNF- α 表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者细胞因子 TNF- α 表达的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进糖尿病受试者细胞因子 TNF- α 表达的纤溶酶原。

10 另一方面，本发明涉及促进糖尿病受试者多向核转录因子 NF- κ B 表达的方法，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促进糖尿病受试者多向核转录因子 NF- κ B 表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者多向核转录因子 NF- κ B 表达的药物的用途。

15 另一方面，本发明涉及一种促进胰岛胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达的方法，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促进胰岛胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进胰岛胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达的纤溶酶原。

20 另一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 的表达。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者胰岛素分泌的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛素分泌的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进糖尿病受试者胰岛素分泌的纤溶酶原。

25 另一方面，本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛 β 细胞数量增加的方法，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促进糖尿病受试者胰岛 β 细胞数量增加的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛 β 细胞数量增加的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进糖尿病受试者胰岛 β 细胞数量增加的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达。

30 另一方面，本发明涉及一种减少胰岛 β 细胞凋亡的方法，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减少胰岛 β 细胞凋亡

的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备减少胰岛 β 细胞凋亡的药物的用途。此外，本发明还涉及用于减少胰岛 β 细胞凋亡的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达。

5 另一方面，本发明涉及一种促进胰岛 β 细胞损伤修复的方法，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促进胰岛 β 细胞损伤修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛 β 细胞损伤修复的药物的用途。本发明还涉及用于促进胰岛 β 细胞损伤修复的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达。

10 另一方面，本发明涉及一种促进胰岛 β 细胞功能恢复的方法，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促进胰岛 β 细胞功能恢复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛 β 细胞功能恢复的药物的用途。此外，本发明还涉及用于促进胰岛 β 细胞功能恢复的纤溶酶原。在一些实施方案中，所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2 (IRS-2) 表达。

在上述实施方案中，所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物或治疗方法联用。具体地，所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联用：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物，抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

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

在上述实施方案中，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，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

在上述实施方案中，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。具体地，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。

在上述实施方案中，纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。在一些实施方案中，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。例如，来自灵长类动物或啮齿类动物的纤维蛋白溶酶原直向同系物，例如来自大猩猩，恒河猴、鼠、牛、马，狗的纤维蛋白溶酶原直向同系物。最优选，本发明的纤维蛋白溶酶原的氨基酸序列如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

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

在一个实施方案中，所述纤维蛋白溶酶原通过全身或局部给药，优选通过以下途径施用：表面、静脉内、肌内、皮下、吸入、椎管内、局部注射、关节内注射或通过直肠。在一个实施方案中，所述局部给药为直接向骨质疏松区域给药，例如通过敷料，导管等方式来进行。

在一个实施方案中，所述纤溶酶原与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。在一个实施方案中，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。在局部施用的情况下，上述剂量还可以根据情况进一步调整。一方面，本发明涉及一种药物组合物，其包含药学上可接受的载剂和用于本发明所述方法的纤溶酶原。

另一方面，本发明涉及一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：(i) 用于本发明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)，具体地，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本发明所述的方法。

另一方面，本发明还涉及一种制品，其包含：含有标签的容器；和 (i) 用于本发明所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述

标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施本发明所述方法。

在上述实施方案中，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：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物、抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

发明详述

10 “糖尿病”是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征，临床上以高血糖为主要特点。

15 “糖尿病并发症”是由糖尿病过程中血糖控制不良导致的身体其他器官或组织的损害或功能障碍，其中包括肝脏、肾脏、心脏、视网膜、神经系统的损害或功能障碍等。据世界卫生组织统计，糖尿病并发症高达 100 多种，是目前已知并发症最多的一种疾病。

20 “胰岛素抵抗”是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降，机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症，以维持血糖的稳定。

“纤溶酶”是存在于血液中的一种非常重要的酶，其能够降解纤维蛋白多聚体。

“纤溶酶原 (plasminogen, plg)”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 plasminogen 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 PLG 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-Val98，25 Kringle1 包括残基 Cys103-Cys181，Kringle2 包括残基 Glu184-Cys262，30 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。 δ -plasminogen (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^[39,40]，有文献报道了 δ -plasminogen 的氨基酸序列（序列 8）^[40]，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 7。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-plg 序列的 Glu 残基为起始氨基酸）^[41]，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 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-plg 序列的 Glu 残基为起始氨基酸）^[42]，也有专利 CN102154253A 报道其序列包括残基 Lys531-Asn791（以不含有信号肽的 Glu-plg 序列的 Glu 残基为起始氨基酸），本专利序列参考专利 CN102154253A，其氨基酸序列如序列 12 所示，编码该氨基酸序列的 cDNA 序列如序列 11 所示。

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

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

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

在本发明的实施方案中，“衰老”和“早衰”可以互换使用，表示同样的含义。

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 PLG 激活剂(plasminogen activator, PA)的介导下，其转变为呈开放性构象的活性 PLM。具有活性的 PLM 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 PLG 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 PLG 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结构域的蛋白质，优选，本发明所述的纤溶酶原活性片段包含序列 14、与序列 14 具有至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列的蛋白质。因此，本发明所述的纤溶酶原包括含有该纤溶酶原活性片段、并且仍然保持该纤溶酶原活性的蛋白。

目前，对于血液中纤维蛋白溶酶原及其活性测定方法包括：对组织纤维蛋白溶酶原激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤维蛋白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)、血浆组织纤维蛋白溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤维蛋白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，吸光度增加与纤维蛋白溶酶原活性成正比。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维蛋白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。

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

$$\text{分数 } X/Y \text{ 乘 } 100$$

- 10 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
- 15 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“预防”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
- 20 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
- 25 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。

2. 本发明纤溶酶原的制备

- 30 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, β -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下，并且具有核糖体结合位点序列等，以启动并完成转录和翻译。

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

在微生物外，哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达本发明的纤溶酶原。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。

3. 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
5 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，
15 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
20 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-
25 105(1982))或聚(乙烯醇)，聚交酯(美国专利3773919, EP 58,481)，L-谷氨酸与 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, Biopolymers 22:547(1983))，不可降解的乙烯-乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 等, 出处同上)，或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如Lupron DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体)，以及聚
30 D-(-)-3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸酯和乳酸-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。

5

4. 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，鼻内，表面或皮内施用或脊髓或脑投递来实现本发明药物组合物的施用。气溶胶制剂如鼻喷雾制剂包含活性剂的纯化的水性或其它溶液及防腐剂和等渗剂。将此类制剂调节至与鼻粘膜相容的pH和等渗状态。

在一些情况中，可以以下方式修饰或配制本发明的纤溶酶原药物组合物，从而提供其穿过血脑屏障的能力。

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。

在一些实施方案中，本发明的纤溶酶原与促进穿过血脑屏障的药剂配制在一起。在一些情况中，本发明的纤溶酶原直接或经接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些实施方案中，本发明的纤溶酶原与结合内源血脑屏障(BBB)受体的多肽融合。连接纤溶酶原与结合内源BBB受体的多肽，促进穿过BBB。结合内源BBB受体的合适的多肽包括抗体，例如单克隆抗体，或其抗原结合片段，其特异性结合内源BBB受体。合适的内源BBB受体包括但不限于胰岛素受。在一些情况中，抗体是囊封于脂质体中的。参见例如美国专利公开文本No. 2009/0156498。

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 mg/kg，0.5 mg/kg，0.75 mg/kg，10 mg/kg，50 mg/kg等等)受试者体重。例如，剂量可以是1 mg/kg体重或50 mg/kg体重或在1-50 mg/kg的范围，或至少1 mg/kg。高于或低于此例示性范围的剂量也涵盖在内，特别是考虑到上述的因素。上述范围中的中间剂量也包含在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类剂量。例示性的剂量日程表包括连续几天1-10 mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估、定期评估血栓和血栓相关疾病的治疗效果和安全性。

10

5. 治疗效力和治疗安全性

本发明的一个实施方案涉及使用纤溶酶原治疗受试者后，对治疗效力和治疗安全性的判断。常用的骨质疏松症治疗效果监测与评估内容包括随访(不良反应、规范服药、基础措施以及骨折风险因子再评估等)，新发骨折评估(临床骨折、身高降低和影像学检查)、骨密度(bone mineral density, BMD)测量和骨转换生化标志物(bone turnover markers, BTM)检测，以及基于这些数据的综合再评估等。其中 BMD 是目前应用最广泛的疗效监测和评估方法。例如，可以通过双能 X 线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometry, DXA)、定量 CT (quantitative computed tomography, QCT)、单光子吸收测定法(SPA)、或超声波测定法来测量 BMD。治疗开始后可每年检测 1 次 BMD，在 BMD 达到稳定后可以适当延长间隔，例如 2 年监测 1 次。针对 BTM，目前在血清学指标中较多使用的骨形成指标是血清 1 型原胶原 N 端前肽(procollagen type 1 n-terminal propeptide, PINP)，骨吸收指标是血清 1 型原胶原 C 末端肽(serum C-terminal telopeptide, S-CTX)。可根据研究进展，适时调整更合理的检测指标。应在开始治疗前检测基线值，应用促形成药物治疗后 3 个月、应用抑制吸收药物治疗后 3~6 个月时进行检测。BTM 能够提供骨骼的动态信息，在作用和功能上独立于 BMD，同时也与 BMD 成为互为补充的监测手段，二者结合起来具有更高的临床价值。一般地，如果治疗后 BMD 上升或稳定，BTM 有预期变化，同时治疗期间无骨折发生，可认为治疗反应良好。此外，本发明还涉及使用纤溶酶原及其变体对受试者进行治疗过程中和治疗后，所述该治疗方案

30

安全性的判断，包括但不限于对药物在受试者体内的血清半衰期、治疗半衰期、半数中毒量（TD50）、半数致死量（LD50）进行统计，或对在治疗过程中或治疗后发生的各种不良事件如致敏反应进行观察。

5 6. 制品或药盒

本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒，其包含本发明纤溶酶原。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衰老或衰老相关病症。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的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

20 **图1** 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血清胰岛素检测结果。结果显示，给纤溶酶原组血清胰岛素水平明显高于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ）。说明纤溶酶原能有效促进胰岛素的分泌。

25 **图2** 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛的胰岛素免疫组化染色观察结果。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，给纤溶酶原组胰岛素的表达（箭头标识）明显高于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ）。说明纤溶酶原能促进胰岛功能修复，促进胰岛素的产生和分泌。

30 **图3** 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛的胰岛素免疫组化染色结果。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，给纤溶酶原组胰岛素的表达（箭头标识）明显高于给溶媒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促进胰岛功能修复，促进胰岛素的产生和分泌。

图4 T1DM模型中PLG活性受损小鼠给予纤溶酶原28天后胰岛胰岛素免疫组化观察结果。A为空白对照组，B为给溶媒PBS对照组，C为给纤溶酶原组。免疫组化结果显示，给纤溶酶原组胰岛素阳性表达（箭头标识）明显多于给溶媒PBS对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能促进在T1DM模型中的PLG活性受损小鼠胰岛胰岛素的合成与分泌。

图5 PLG活性正常小鼠在T1DM模型中给予纤溶酶原28天后胰岛胰岛素免疫组化观察结果。A为空白对照组，B为给溶媒PBS对照组，C为给纤溶酶原组。免疫组化结果显示，给纤溶酶原组胰岛素阳性表达（箭头标识）明显多于给溶媒PBS对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原促进T1DM模型中PLG活性正常小鼠胰岛胰岛素的合成与表达。

图6 显示T1DM模型小鼠给予纤溶酶原20天后血清胰岛素检测结果。结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠血清胰岛素浓度明显低于给纤溶酶原组小鼠，且统计差异接近显著（ $P=0.08$ ）。说明纤溶酶原能促进T1DM小鼠胰岛胰岛素的分泌。

图7 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原10、31天后血糖检测结果。结果显示，给纤溶酶原组小鼠的血糖明显低于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ，**表示 $P<0.01$ ）。此外，随着给药时间的延长，给溶媒PBS对照组小鼠血糖有升高趋势，而给纤溶酶原组血糖逐渐降低。说明纤溶酶原具有降血糖的作用。

图8 给予纤溶酶原对糖尿病鼠血清果糖胺浓度的影响。检测结果显示，给予纤溶酶原后血清果糖胺的浓度明显降低，与给药前相比，统计差异极显著（**表示 $P<0.01$ ）。说明纤溶酶原能显著降低糖尿病小鼠的血糖。

图9 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血清果糖胺检测结果。检测结果显示，给纤溶酶原组血清果糖胺的浓度明显低于给溶媒PBS对照组，统计差异接近显著（ $P=0.06$ ）。说明纤溶酶原能显著降低糖尿病小鼠的血糖水平。

图10 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血浆糖化血红蛋白检测结果。结果显示，给纤溶酶原组小鼠糖化血红蛋白的OD值明显低于给溶媒PBS对照组，且统计差异极显著（**表示 $P<0.01$ ）。说明纤溶酶原具有降低糖尿病小鼠血糖的作用。

5 **图11** 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原10天后IPGTT检测结果。结果显示，腹腔注射葡萄糖后，给纤溶酶原组小鼠血糖水平低于给溶媒PBS对照组，且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠组。说明纤溶酶原能明显改善糖尿病小鼠糖耐受能力。

10 **图12** T1DM模型PLG活性正常小鼠给予纤溶酶原10天后禁食后血糖检测结果。结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组，且统计差异极显著（***表示 $P<0.001$ ）。说明纤溶酶原能显著降低PLG活性正常小鼠在T1DM模型中的血糖水平。

15 **图13** T1DM模型PLG活性正常小鼠给予纤溶酶原28天后IPGTT检测结果。结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠注射葡萄糖后血糖浓度明显高于给纤溶酶原组，且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠。说明纤溶酶原能提高PLG活性正常小鼠在T1DM模型中的糖耐受能力。

20 **图14** 显示T1DM模型小鼠给予纤溶酶原20天后血糖检测结果。结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠，且统计差异显著（ $P=0.04$ ）。说明纤溶酶原能促进T1DM小鼠葡萄糖分解能力，从而降低血糖。

25 **图15** 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰脏的HE染色图片及胰岛面积比。A、B为给溶媒PBS对照组，C、D为给纤溶酶原组，E为胰岛面积定量分析结果。结果显示，给溶媒PBS对照组大部分的胰岛发生萎缩，萎缩的胰岛细胞被腺泡（↓标示）所代替，胰岛边缘的腺泡增生，致胰岛与腺泡之间分界不清；给纤溶酶原组大部分的胰岛较之于对照组面积大，且胰岛内未有腺泡增生，只有少数的胰岛内残存有少量的腺泡，胰岛与腺泡之间边界清晰。比较给纤溶酶原组和对照组的胰岛占胰腺的面积比发现，给药组比对照组大近乎一倍。说明纤溶酶原能促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛损伤的修复，从而通过修复损伤的胰岛治疗糖尿病。

30

图16 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛天狼星红染色观察结果。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，给纤溶酶原组小鼠胰岛胶原沉积（箭头标识）明显少于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ）。说明纤溶酶原能改善糖尿病动物胰岛的纤维化。

图17 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛Caspase-3免疫组化染色观察结果。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Caspase-3的表达（箭头标识）明显低于给溶媒PBS对照组。说明纤溶酶原能减少胰岛细胞的凋亡，保护糖尿病小鼠胰脏组织。

图18 18周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛胰岛素免疫组化染色结果。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，给纤溶酶原组胰岛素的表达（箭头标识）明显高于给溶媒PBS对照组，且统计差异接近显著（ $P=0.15$ ）。说明纤溶酶原能够促进胰岛功能修复，促进胰岛素的产生和分泌。

图19 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰腺组织NF- κ B免疫组化染色观察结果。A为正常对照组，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NF- κ B的表达（箭头标识）明显高于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ）。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- κ B的表达，从而促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

图 20 18 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A 为正常对照组，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，胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 α 细胞区域。与给纤溶酶原组相比，给溶媒 PBS 对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识) 明显增多，胰高血糖素阳性细胞浸润到胰岛的中央区域，且平均光密度定量分析结果统计差异极显著（**表示 $P<0.01$ ）；给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边，给纤溶酶原组与PBS组相比，胰岛形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌，修正胰岛 α 细胞分布紊乱，从而促进胰岛损伤的修复。

图 21 24-25 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A 为正常对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。结果显示, 胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 α 细胞区域。与给纤溶酶原组相比, 给溶媒 PBS 对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识) 明显增多, 阳性细胞浸润到胰岛的中央区域;给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边, 给纤溶酶原组与 PBS 组相比, 胰岛形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌, 修正胰岛 α 细胞分布紊乱, 从而促进胰岛损伤的修复。

图 22 26 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A 为正常对照组, 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, 胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 α 细胞区域。与给纤溶酶原组相比, 给溶媒 PBS 对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识) 明显增多, 阳性细胞浸润到胰岛的中央区域, 且平均光密度定量分析结果具有统计学差异 (*表示 $P<0.05$);给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边, 给纤溶酶原组与 PBS 组相比, 其形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌, 修正胰岛 α 细胞分布紊乱, 从而促进胰岛损伤的修复。

图 23 给予纤溶酶原 28 天后 PLG 活性正常小鼠在 T1DM 模型中胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。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, 给溶媒 PBS 对照组胰高血糖素阳性表达明显多于给溶纤溶酶原组, 且平均光密度定量分析结果统计差异显著 (*表示 $P<0.05$)。说明纤溶酶原能够显著减少糖尿病小鼠胰岛 α 细胞分泌胰高血糖素, 促进胰岛损伤的修复。

图 24 18 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛 IRS-2 免疫组化观察结果。A 为正常对照组, 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, 给溶媒 PBS 对照组小鼠胰岛 IRS-2 阳性表达 (箭头标识) 明显少于给纤溶酶原组, 且统计差异极显著 (**表示 $P<0.01$); 给纤溶酶原组 IRS-2 表达水平较给溶媒 PBS 组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞 IRS-2 的表达, 改善胰岛素信号转导, 减少糖尿病小鼠胰岛 β 细胞损伤。

图 25 24-25 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后胰岛 IRS-2 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，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，给溶媒 PBS 对照组小鼠胰岛 IRS-2 阳性表达（箭头标识）明显少于给纤溶酶原组，且统计差异显著（*表示 $P < 0.05$ ）；给纤溶酶原组 IRS-2 表达水平较给溶媒 PBS 组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞 IRS-2 的表达，改善胰岛素信号转导，减少糖尿病小鼠胰岛 β 细胞损伤。

图 26 26 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛 IRS-2 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，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，给溶媒 PBS 对照组小鼠胰岛 IRS-2 阳性表达（箭头标识）明显少于给纤溶酶原组；给纤溶酶原组 IRS-2 表达水平较给溶媒 PBS 组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞 IRS-2 的表达，改善胰岛素信号转导，减少糖尿病小鼠胰岛 β 细胞损伤。

图 27 给予纤溶酶原 28 天后 PLG 活性正常 T1DM 小鼠胰岛 IRS-2 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，给溶媒 PBS 对照组小鼠胰岛 IRS-2 阳性表达（箭头标识）明显少于给纤溶酶原组；给纤溶酶原组 IRS-2 表达水平较给溶媒 PBS 组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞 IRS-2 的表达，改善胰岛素信号转导，减少 PLG 活性正常 T1DM 小鼠胰岛 β 细胞损伤。

图 28 26 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A 为正常对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，给纤溶酶原组阳性表达细胞（箭头标识）少于给溶媒 PBS 对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组。说明纤溶酶原能减少中性粒细胞的浸润。

图 29 T1DM 模型中 PLG 活性受损小鼠给予纤溶酶原 28 天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，给纤溶酶原组阳性表达细胞（箭头标识）少于给溶媒 PBS 对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能减少 PLG 活性受损小鼠在 T1DM 模型中胰岛中性粒细胞的浸润。

图 30 PLG 活性正常小鼠在 T1DM 模型中给予纤溶酶原 28 天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，给纤溶酶原组阳性表达细胞（箭头标识）少于给溶媒 PBS 对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能促进 PLG 活性正常小鼠在 T1DM 模型中胰岛中性粒细胞的浸润。

图 31 PLG 活性受损小鼠在 T1DM 模型中给予纤溶酶原 28 天后胰岛 NF- κ B 免疫组化观察结果。A 为空白对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。结果显示，给纤溶酶原组 NF- κ B 的表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能促进炎症修复因子 NF- κ B 的表达，从而促进胰岛炎症的修复。

图 32 18 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛 NF- κ B 免疫组化观察结果。A 为给溶媒 PBS 对照组，B 为给纤溶酶原组。实验结果显示，给纤溶酶原组 NF- κ B 的表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子 NF- κ B 的表达，从而促进相对年轻（18 周龄）糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

图 33 26 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 35 天后胰岛 NF- κ B 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。本发明实验结果显示，给纤溶酶原组 NF- κ B 的表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子 NF- κ B 的表达，从而促进相对年老（26 周龄）糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

图 34 24-25 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后胰岛 TNF- α 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。研究结果显示，给纤溶酶原组 TNF- α 的阳性表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组。说明纤溶酶原能促进 TNF- α 的表达，从而促进 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛损伤修复。

图 35 26 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后胰岛 TNF- α 免疫组化观察结果。A 为正常对照组，B 为给溶媒 PBS 对照组，C 为给纤溶酶原组。研究结果显示，给纤溶酶原组 TNF- α 的阳性表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组。

说明纤溶酶原能促进 TNF- α 的表达, 从而促进 26 周龄糖尿病小鼠胰岛损伤修复。

图 36 显示 PLG 活性受损小鼠 T1DM 模型中给予纤溶酶原 28 天后胰岛 TNF- α 免疫组化观察结果。A 为给溶媒 PBS 对照组, B 为给纤溶酶原组。

- 5 研究结果显示, 给纤溶酶原组 TNF- α 的阳性表达(箭头标识)明显高于给溶媒 PBS 对照组。说明纤溶酶原能促进 TNF- α 的表达, 从而促进 PLG 活性受损小鼠 T1DM 模型中胰岛损伤修复。

- 10 图 37 显示 PLG 活性受损 T1DM 模型小鼠给予纤溶酶原 28 天后胰岛 IgM 免疫组化观察结果。A 为空白对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。本实验研究结果显示, 给纤溶酶原组 IgM 的阳性表达(箭头标识)明显低于给溶媒 PBS 对照组, 且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组。说明纤溶酶原能降低 IgM 的表达, 从而减少 PLG 活性受损小鼠在 T1DM 模型中胰岛损伤。

- 15 图 38 24-25 周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原 31 天后胰岛 TUNEL 染色观察结果。A 为正常对照组, B 为给溶媒 PBS 对照组, C 为给纤溶酶原组。本实验结果显示, 给纤溶酶原组的阳性细胞数(箭头标识)明显少于给溶媒 PBS 对照组。正常对照组 TUNEL 阳性染色极低。正常对照组凋亡率约为 8%, 给溶媒 PBS 组凋亡率约为 93%, 给纤溶酶原组凋亡率为约 16%。说明纤溶酶原组能显著减少糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡。

20

实施例

实施例1 纤溶酶原促进糖尿病小鼠胰岛素分泌功能

- 25 26周龄db/db雄性小鼠9只, 实验开始当天记为第0天, 称重并根据体重随机分为两组, 给纤溶酶原组4只, 给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS, 给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天, 给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS, 连续给药35天。在第35天小鼠禁食16小时后, 在第36天摘眼球取血, 离心取上清, 运用胰岛素检测试剂盒(Mercodia AB)按照使用说明检测血清胰岛素水平。

- 30 检测结果显示, 给纤溶酶原组血清胰岛素水平明显高于给溶媒PBS对照组, 且统计差异显著(图1)。说明纤溶酶原能显著提高糖尿病小鼠胰岛素的分泌。

实施例2 纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛素的表达和分泌

24-25周龄db/db雄性小鼠8只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组5只和给溶媒PBS对照组3只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第32天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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1小时；之后，弃除羊血清液，用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜，PBS洗2次，每次5分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时，PBS洗2次，每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色，水洗3次后苏木素复染30秒，流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片，切片在显微镜下200倍下观察。

结果显示，给纤溶酶原组胰岛素的表达（箭头标识）明显高于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（ $P=0.02$ ）（图2）。说明纤溶酶原能有效修复胰岛功能，促进胰岛素的表达和分泌。

实施例3 纤溶酶原促进糖尿病小鼠胰岛素合成分泌功能的修复

26周龄db/db雄性小鼠9只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药35天。在第35天小鼠禁食16小时后，在第36天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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1小时；之后，弃除羊血清液，用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜，PBS洗2次，每次5分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时，PBS洗2次，每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色，水洗3次后苏木素复染30秒，流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片，切片在显微镜下200倍下观察。

结果显示，给纤溶酶原组胰岛素的表达（箭头标识）明显高于给溶媒 PBS 对照组，且统计差异极显著（ $P=0.005$ ）（图3）。说明纤溶酶原能有效修复糖尿病鼠胰岛功能，提高胰岛素的表达和分泌。

实施例 4 溶酶原促进在 T1DM 模型中的 PLG 活性受损小鼠胰岛素的

5 合成与分泌

9-10 周龄 PLG 活性受损雄性小鼠 10 只，随机分为三组，空白对照组 3 只，给 PBS 对照组 3 只，给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130) 诱导 I 型糖尿病^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠胰岛素抗体（Abcam）4 $^{\circ}$ C 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。

免疫组化结果显示，给纤溶酶原组（图 4C）胰岛素阳性表达（箭头标识）明显多于给溶媒 PBS 对照组（图 4B，且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组（4A））。说明纤溶酶原能促进在 T1DM 模型中的 PLG 活性受损小鼠胰岛素的合成与分泌。

实施例 5 纤溶酶原促进 T1DM 模型中 PLG 活性正常小鼠胰岛素的合成与表达

9-10 周龄 PLG 活性正常雄性小鼠 11 只，随机分为三组，空白对照组 3 只，给溶媒 PBS 对照组 4 只，给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130) 诱导 I 型糖尿病^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并

定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠胰岛素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

免疫组化结果显示，给纤溶酶原组（图 5C）胰岛素阳性表达（箭头标识）明显多于给溶媒 PBS 对照组（图 5B），且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组（5A）。说明纤溶酶原促进 T1DM 模型中 PLG 活性正常小鼠胰岛素的合成与表达。

实施例6 纤溶酶原改善T1DM模型小鼠胰岛素分泌

9-10周龄C57雄性小鼠6只，随机分为两组，给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组各3只。两组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素 (STZ) (sigma S0130)诱导T1DM^[43]。STZ注射12天后开始给药并定为给药第1天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS。连续给药20天，在第21天小鼠禁食6小时后，眼球静脉丛取血，离心取上清，运用胰岛素检测试剂盒（Mercodia AB），按照使用说明检测血清胰岛素浓度。

结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠胰岛素浓度明显低于给纤溶酶原组小鼠，且统计差异接近显著（P=0.08）（图6）。说明纤溶酶原能促进T1DM小鼠胰岛素的分泌。

实施例7 纤溶酶原降低糖尿病小鼠血糖

24-25周龄db/db雄性小鼠8只，随机分为两组，给纤溶酶原组5只和给溶媒PBS对照组3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，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给

溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第10、31天禁食16小时后，用血糖试纸（Roche，Mannheim，Germany）进行血糖检测。

结果显示，给纤溶酶原组小鼠的血糖明显低于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（*表示 $P<0.05$ ，**表示 $P<0.01$ ）。此外，随着给药时间的延长，给溶媒PBS对照组小鼠血糖有升高趋势，而给纤溶酶原组血糖逐渐降低（图7）。说明纤溶酶原具有降低糖尿病动物血糖的作用。

实施例8 纤溶酶原降低糖尿病小鼠果糖胺水平

24-25周龄db/db雄性小鼠5只，给药前一天每只小鼠眼球静脉丛取血50 μ l用以检测血清果糖胺浓度，并记为第0天，第一天开始给予纤溶酶原，连续给药31天。第32天摘除眼球取血，检测血清果糖胺的浓度。果糖胺浓度使用果糖胺检测试剂盒（南京建成，A037-2）进行检测。

果糖胺浓度反映1~3周内血糖的平均水平。结果显示，给予纤溶酶原后血清果糖胺的浓度明显降低，与给药前相比统计差异极显著（图8）。说明纤溶酶原能有效降低糖尿病动物血糖。

实施例9 纤溶酶原降低26周龄糖尿病小鼠血清果糖胺水平

26周龄db/db雄性小鼠9只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只，给溶媒PBS对照组5只。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2mL/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS。第1天开始给纤溶酶原或PBS，连续给药35天。在第36天处死小鼠，检测血清果糖胺的浓度。果糖胺浓度使用果糖胺检测试剂盒（南京建成，A037-2）进行检测。

检测结果显示，给纤溶酶原组血清果糖胺的浓度明显低于给溶媒PBS对照组，统计差异接近显著（ $P=0.06$ ）（图9）。说明纤溶酶原能降低26周龄糖尿病小鼠的血糖果糖胺。

实施例10 纤溶酶原降低糖尿病小鼠糖化血红蛋白水平

26周龄db/db雄性小鼠9只，实验开始当天记称重后根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只，给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药35天。在第35天小鼠禁食16小时，第36天摘眼球取血，用以检测血浆糖化血红蛋白的浓度。

糖化血红蛋白含量通常可以反映患者近8~12周的血糖控制情况。结果显示，给纤溶酶原组小鼠糖化血红蛋白的浓度明显低于给溶媒PBS对照组，且统计差异显著（图10）。说明纤溶酶原能有效降低糖尿病动物血糖水平。

5 实施例11 纤溶酶原改善糖尿病小鼠糖耐受能力

26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m小鼠3只。实验开始当天，db/db小鼠称重后并根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组5只，db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药10天。第11天小鼠禁食16小时后，每只小鼠按5g/kg体重腹腔注射5%葡萄糖溶液，在0，30，60，90，120，180分钟用血糖试纸（Roche，Mannheim，Germany）检测血糖浓度。

腹腔糖耐受检测（Intraperitoneal glucose tolerance test，IPGTT）可检测机体对葡萄糖的耐受能力。现有技术已知糖尿病患者糖耐量是下降的。

15 实验结果显示，腹腔注射葡萄糖后给纤溶酶原组小鼠血糖水平要低于给溶媒PBS对照组，且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠组（图11）。说明纤溶酶原能明显改善糖尿病小鼠糖耐受能力。

实施例12 纤溶酶原降低PLG活性正常小鼠在T1DM模型中血糖水平

20 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠10只，随机分为两组，给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组，每组各5只。两组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素(STZ) (sigma S0130)诱导T1DM^[43]。STZ注射12天后开始给药并记为给药第1天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药10天。在第25 11天小鼠禁食6小时后，用血糖试纸（Roche，Mannheim，Germany）测定血糖。

结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠，且统计差异极显著（图12）。说明纤溶酶原能显著降低PLG活性正常小鼠T1DM模型的血糖水平。

30 实施例13 纤溶酶原改善T1DM模型小鼠糖耐受水平

9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠15只，随机分为三组，空白对照组、给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组，每组各5只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导T1DM^[43]，空白对照组不做处理。STZ注射12天后开始给药并记为给药第1天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药28天。第28天小鼠禁食6小时后，按照5g/kg体重腹腔注射5%葡萄糖溶液，在注射后0、15、30、60、90分钟用血糖试纸（Roche, Mannheim, Germany）检测血糖浓度。

腹腔糖耐受检测（Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT）可检测机体对葡萄糖的耐受能力。现有技术已知糖尿病患者糖耐量下降。

结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠注射葡萄糖后血糖浓度明显高于给纤溶酶原组，且与给溶媒PBS对照组相比，给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠（图13）。说明纤溶酶原能提高PLG活性正常小鼠T1DM模型的糖耐受能力。

实施例14 纤溶酶原提高T1DM模型小鼠葡萄糖分解能力

9-10周龄C57雄性小鼠8只，随机分为两组，给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组，每组各4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素(STZ) (sigma S0130)诱导T1DM^[43]。STZ注射12天后开始给药并定为给药第1天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS。连续给药19天，在第20天小鼠禁食6小时后，以2g/kg体重灌胃20%的葡萄糖，60分钟后，眼眶静脉丛采血并离心取上清，以葡萄糖测定试剂盒（上海荣盛361500）测定血糖。

结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠血糖，且统计差异显著（ $P=0.04$ ）（图14）。说明纤溶酶原能提高T1DM小鼠葡萄糖分解能力，从而降低血糖。

实施例15 纤溶酶原对糖尿病小鼠胰腺的保护作用

24-25周龄db/db雄性小鼠7只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组3只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/

天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第32天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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，切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE染色)，1%盐酸酒精分化，氨水返蓝，并酒精梯度脱水封片，切片在200和400倍光学显微镜下观察。

结果显示，给溶媒PBS对照组（图15A，15B）大部分的胰岛发生萎缩，萎缩的胰岛细胞被腺泡（箭头标示）所代替，胰岛边缘的腺泡增生，致胰岛与腺泡之间分界不清；给纤溶酶原组（图15C，15D）大部分的胰岛较之于对照组面积大，且胰岛内未有腺泡增生，只有少数的胰岛内残存少量的腺泡，胰岛与腺泡之间边界清晰。比较给药组和对照组的胰岛占胰腺的面积比发现，给药组比对照组大近乎一倍（图15E）。说明纤溶酶原可促进糖尿病小鼠胰岛损伤的修复，提示纤溶酶原有可能通过促进胰岛损伤的修复，从而从根本上治愈糖尿病。

实施例16 纤溶酶原减少糖尿病小鼠胰岛胶原沉积

24-25周龄db/db雄性小鼠16只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组10只，给溶媒PBS对照组6只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第32天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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，切片脱蜡至水后水洗1次，以0.1%天狼星红染色60分钟后，流水冲洗，苏木素染色1分钟，流水冲洗，1%盐酸酒精和氨水分化返蓝，流水冲洗，烘干后封片，切片在200倍光学显微镜下观察。

天狼星红染色可使胶原持久染色，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，给纤溶酶原组小鼠（图16B）胰岛胶原沉积（箭头标识）明显低于给溶媒PBS对照组（图16A），且统计差异显著（图16C）。说明纤溶酶原能降低糖尿病动物胰岛的纤维化。

实施例17 纤溶酶原减少糖尿病小鼠胰岛细胞凋亡

24-25周龄db/db雄性小鼠6只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组2只。第1天开始给

纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第32天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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1小时；之后，弃除羊血清液，用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠Caspase-3 (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜，PBS洗2次，每次5分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时，PBS洗2次，每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色，水洗3次后苏木素复染30秒，流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片，切片在200倍光学显微镜下观察。

Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶，其表达越多表明处于凋亡状态的细胞越多^[44]。

本发明的实验结果显示，给纤溶酶原组（图17B）Caspase-3的表达（箭头标识）明显低于给溶媒PBS对照组（图17A）。说明纤溶酶原能够减少胰岛细胞的凋亡。

实施例18 纤溶酶原促进18周龄进糖尿病小鼠胰岛素的表达和分泌

18周龄db/db雄性小鼠8只，实验开始当天记为第0天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组，每组各4只。第1天开始给纤溶酶原或PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS，连续给药31天。在第36天处死小鼠，取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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1小时；之后，弃除羊血清液，用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜，PBS洗2次，每次5分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时，PBS洗2次，每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色，水洗3次后苏木素复染30秒，流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片，切片在显微镜下200倍下观察。

结果显示,给纤溶酶原组(图18B)胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图18A),且统计差异接近显著($P=0.15$)(图18C)。说明纤溶酶原能够促进胰岛功能修复,促进胰岛素的表达和分泌。

5 实施例19 纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛多向核转录因子NF- κ B的表达

24-25周龄db/db雄性小鼠10只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组6只,另取4只db/m作为正常对照组,正常对照组不做处理。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠NF- κ B (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔 IgG (HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在显微镜下200倍下观察。

20 NF- κ B为转录因子蛋白家族成员,在炎症修复过程中发挥着重要作用[45]。

本发明实验结果显示,给纤溶酶原组NF- κ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(图19)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- κ B的表达。

25 实施例 20 纤溶酶原减少 18 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞的增殖,恢复胰岛 α 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

18 周龄 db/db 雄性小鼠 8 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只,实验开始当天记为第 0 天并称重,db/db 小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组和给溶媒 PBS 对照组,每组各 4 只,db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天,给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS,连续给药 35 天。在第 36 天

处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

胰岛 α 细胞合成分泌胰高血糖素，主要散在分布于胰岛周边区域。

结果显示，与给纤溶酶原组（图 20C）相比，给溶媒 PBS 对照组（图 20B）胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多，阳性细胞浸润到胰岛的中央区域，且平均光密度定量分析结果具有统计学差异（**表示 $P<0.01$ ）（图 20D）；给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边，给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组（20A）。说明纤溶酶原能够显著抑制 18 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌，修正胰岛 α 细胞分布紊乱，提示纤溶酶原促进胰岛损伤的修复。

实施例 21 纤溶酶原减少 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞的增殖，恢复胰岛 α 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 11 只以及 db/m 雄性小鼠 5 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠称重后随机分为两组，给纤溶酶原组 5 只，给溶媒 PBS 对照组 6 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。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 或不注射任何液体，连续给药 31 天。在第 32 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

5 胰岛 α 细胞合成分泌胰高血糖素, 主要散在分布于胰岛周边区域。

结果显示, 与给纤溶酶原组相(图 21C)比给溶媒 PBS 对照组(图 21B)胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多, 阳性细胞浸润到胰岛的中央区域;给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边, 给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组(21A)。说明纤溶酶原能够显著抑制 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌, 修正胰岛 α 细胞分布紊乱, 提示纤溶酶原能促进胰岛损伤的修复。

实施例 22 纤溶酶原抑制 26 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞的增殖, 恢复胰岛 α 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只, 实验开始当天记
15 为第 0 天并称重, db/db 小鼠称重后随机分为两组, 给纤溶酶原组 4 只, 给溶媒 PBS 对照组 5 只, db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠, 取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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
20 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, 滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.01M PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体(Abcam)
25 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。

胰岛 α 细胞合成分泌胰高血糖素, 主要散在分布于胰岛周边区域。

30 结果显示, 与给纤溶酶原组相(图 22C)比给溶媒 PBS 对照组(图 22B)胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多, 阳性细胞浸润到胰岛的中

央区域，且平均光密度定量分析结果具有统计学差异（**表示 $P < 0.01$ ）（图 22D）；给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边，给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组（22A）。说明纤溶酶原能够显著抑制 26 周龄糖尿病小鼠胰岛 α 细胞增殖及胰高血糖素的分泌，修正胰岛 α 细胞分布紊乱，提示纤溶酶原能促进胰岛损伤的修复。

5 实施例 23 纤溶酶原减少 PLG 活性正常小鼠 T1DM 模型中胰高血糖素的分泌

9-10 周龄 PLG 活性正常雄性小鼠 15 只，随机分为三组，空白对照组、给溶媒 PBS 对照组以及给纤溶酶原组，每组各 5 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (Sigma, 货号 S0130) 诱导 T1DM 模型^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4% 多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3% 双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5% 的正常羊血清液（Vector laboratories, Inc., USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体（Abcam）4 $^{\circ}$ C 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。

胰岛 α 细胞合成分泌胰高血糖素，主要分布于胰岛周边区域。

结果显示，给溶媒 PBS 对照组（图 23B）胰高血糖素阳性表达明显多于给纤溶酶原组（图 23C），且平均光密度定量分析结果统计差异显著（图 23D），且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组（23A）。说明纤溶酶原能够显著减少 STZ 诱导的糖尿病小鼠胰岛 α 细胞分泌胰高血糖素。

30 实施例 24 纤溶酶原促进 18 周龄糖尿病小鼠胰岛胰岛素受体底物 2(IRS-2) 的表达

18 周龄 db/db 雄性小鼠 7 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 3 只，给溶媒 PBS 对照组 4 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 IRS-2 抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

胰岛素受体底物2((Insulin Receptor Substrate-2, IRS-2)是一种能够被激活的胰岛素受体酪氨酸激酶作用的底物，是胰岛素信号转导途径中重要分子，且对胰岛 β 细胞的生存非常重要。IRS-2在胰岛 β 细胞表达增加时对其具有保护效应，且对功能性胰岛 β 细胞的维持至关重要^[46,47]。

IRS-2免疫组化结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠(图24B)胰岛IRS-2阳性表达（箭头标识）明显少于给纤溶酶原组(图24C)，且统计差异极显著(图24D)，且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组（24A）。说明纤溶酶原能有效增加18周龄糖尿病小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

实施例 25 纤溶酶原促进 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛 IRS-2 的表达

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 11 只以及 db/m 雄性小鼠 5 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 5 只，给溶媒 PBS 对照组 6 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。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 或不注射任何液体，连续给药 31 天。在第 32 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为

3 μ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织, 以 3%双氧水孵育 15 分钟, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 30 分钟; 时间到后, 弃除羊血清液, 滴加兔抗小鼠 IRS-2 抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.01M PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。

- 5 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。

IRS-2 免疫组化结果显示, 给溶媒 PBS 对照组小鼠 (图 25B) 胰岛 IRS-2 阳性表达 (箭头标识) 明显少于给纤溶酶原组 (图 25C), 且统计差异显著 (图 25D), 且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组 (25A)。说明纤溶酶原能有效增加 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛细胞 IRS-2 的表达。

实施例 26 纤溶酶原促进 26 周龄糖尿病小鼠胰岛 IRS-2 的表达

- 26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只, 实验开始当天记
15 为第 0 天并称重, db/db 小鼠根据体重随机分为两组, 给纤溶酶原组 4 只, 给溶媒 PBS 对照组 5 只, db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠, 取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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
20 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, 滴加兔抗小鼠 IRS-2 抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 0.01M PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗体 (Abcam)
25 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。

IRS-2 免疫组化结果显示, 给溶媒 PBS 对照组小鼠 (图 26B) 胰岛 IRS-2 阳性表达 (箭头标识) 明显少于给纤溶酶原组 (图 26C); 给纤溶酶原组 IRS-2 表达水平接近正常对照组小鼠 (图 26A)。说明纤溶酶原能有效增加 26 周龄糖尿

病小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

实施例 27 纤溶酶原促进 PLG 活性正常 T1DM 小鼠胰岛 IRS-2 的表达

9-10 周龄 PLG 活性正常雄性小鼠 15 只，随机分为三组，空白对照组、给溶媒 PBS 对照组以及给纤溶酶原组，每组各 5 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (Sigma, 货号 S0130)诱导 I 型糖尿病^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 IRS-2 抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

IRS-2免疫组化结果显示，给溶媒PBS对照组小鼠(图27B)胰岛IRS-2阳性表达（箭头标识）明显少于给纤溶酶原组(图27C)，且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组（27A）。说明纤溶酶原能有效增加9-10周龄 PLG活性正常小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

实施例 28 纤溶酶原减少 24-26 周龄糖尿病小鼠胰岛中性粒细胞的浸润

24-26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只以及 db/m 小鼠 3 只，db/db 小鼠随机分为两组，给纤溶酶原组 4 只，给溶媒 PBS 对照组 5 只，db/m 小鼠作为正常对照组。实验开始当天记为第 0 天称重分组，实验第二天开始给纤溶酶原或 PBS 并记为第 1 天。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，

0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠中性粒细胞抗体(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 200 倍光学显微镜下观察。

中心粒细胞是非特异性细胞免疫系统中重要成员，当炎症发生时，它们被趋化性物质吸引到炎症部位。

中心粒细胞免疫组化结果显示，给纤溶酶原组（图 28C）阳性表达细胞少于给溶媒 PBS 对照组（图 28B），且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组（28A）。

实施例 29 纤溶酶原减少 PLG 活性受损小鼠在 T1DM 模型中胰岛中性粒细胞的浸润

9-10 周龄 PLG 活性受损雄性小鼠 10 只，随机分为三组，空白对照组 3 只，给 PBS 对照组 3 只，给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导 I 型糖尿病^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏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，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，滴加兔抗小鼠中性粒细胞抗体 (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。

中心粒细胞免疫组化结果显示, 给纤溶酶原组(图 29C)阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒 PBS 对照组(图 29B), 且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组(29A)。

实施例 30 纤溶酶原减少 PLG 活性正常小鼠在 T1DM 模型中胰岛中性

5 粒细胞的浸润

9-10 周龄 PLG 活性正常雄性小鼠 11 只, 随机分为三组, 空白对照组 3 只, 给溶媒 PBS 对照组 4 只, 给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导 I 型糖尿病^[43], 空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天, 给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠, 取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织, 以 3%双氧水孵育 15 分钟, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 30 分钟; 时间到后, 弃除羊血清液, 滴加兔抗小鼠中心粒细胞抗体 (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

中心粒细胞免疫组化结果显示, 给纤溶酶原组(图 30C)阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒 PBS 对照组(图 30B), 且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组(30A)。

25 实施例31 纤溶酶原促进PLG活性受损小鼠T1DM模型中胰岛多向核转录因子NF- κ B的表达

9-10 周龄 PLG 活性受损雄性小鼠 10 只, 随机分为三组, 空白对照组 3 只, 给 PBS 对照组 3 只, 给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导 I 型糖尿病^[43], 空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天, 给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒

PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 NF- κ B 抗体 (Cell Signal)4 $^{\circ}$ C 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。

NF- κ B 作为一种多向核转录因子，激活后参与细胞增殖、细胞凋亡及炎症和免疫等多种基因的调节^[24]。

实验结果显示，给纤溶酶原组(图31C)NF- κ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图31B)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- κ B的表达。

实施例32 纤溶酶原促进18周龄糖尿病小鼠胰岛多向核转录因子NF- κ B的表达

18 周龄 db/db 雄性小鼠 7 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 3 只，给溶媒 PBS 对照组 4 只。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 NF- κ B 抗体(Cell Signal)4 $^{\circ}$ C 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。

本发明实验结果显示，给纤溶酶原组(图32B)NF- κ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图32A)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- κ B的表达。

实施例33 纤溶酶原抑制26周龄糖尿病小鼠多向核转录因子NF- κ B的表达

26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 4 只，给溶媒 PBS 对照组 5 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS 并记为第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 2mg/0.2ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 NF- κ B 抗体 (Cell Signal)4 $^{\circ}$ C 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。

实验结果显示，给纤溶酶原组(图33C)NF- κ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图33B)，且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组（33A）。说明纤溶酶原能促进相对年老（26周龄）糖尿病小鼠多向核转录因子NF- κ B的表达。

实施例 34 纤溶酶原促进 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛 TNF- α 的表达

24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 11 只以及 db/m 雄性小鼠 5 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 5 只，给溶媒 PBS 对照组 6 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS，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 或不注射任何液体，连续给药 31 天。在第 32 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 TNF- α 抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

肿瘤坏死因子 α （Tumor Necrosis Factor- α ，TNF- α ）主要由活化的单核/巨噬细胞产生，是一种重要的促炎症因子^[48]。

本实验研究结果显示，给纤溶酶原组（图 34C）TNF- α 的阳性表达明显高于给溶媒 PBS 对照组（图 34B），且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组（34A）。说明纤溶酶原能促进 24-25 周龄糖尿病小鼠 TNF- α 的表达。

实施例 35 纤溶酶原抑制 26 周龄糖尿病小鼠胰岛 TNF- α 的表达

26 周龄 db/db 雄性小鼠 9 只以及 db/m 雄性小鼠 3 只，实验开始当天记为第 0 天并称重，db/db 小鼠根据体重随机分为两组，给纤溶酶原组 4 只，给溶媒 PBS 对照组 5 只，db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS。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 或不注射任何液体，连续给药 35 天。在第 36 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠 TNF- α 抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

研究结果显示，给纤溶酶原组（图 35C）TNF- α 的阳性表达明显高于给溶媒 PBS 对照组（图 35B），且给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近正常对照组（35A）。说明纤溶酶原能 26 周龄糖尿病小鼠促进 TNF- α 的表达。

实施例36 纤溶酶原促进PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛TNF- α 的表达

9-10 周龄 PLG 活性受损雄性小鼠 7 只，随机分为两组，给 PBS 对照组 3 只，给纤溶酶原组 4 只。两组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导 I 型糖尿病^[43]。注射 12 天后开始给药并定为给药第 1 天，给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天，给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS，连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠，取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m，切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织，以 3%双氧水孵育 15 分钟，0.01MPBS 洗 2 次，每次 5 分钟。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封闭 30 分钟；时间到后，弃除羊血清液，滴加兔抗小鼠抗体 TNF- α (Abcam)4 $^{\circ}$ C 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。

本实验研究结果显示，给纤溶酶原组（图 36B）TNF- α 的阳性表达明显高于给溶媒 PBS 对照组（图 36A）。说明纤溶酶原能促进 PLG 活性受损小鼠 T1DM 模型 TNF- α 的表达。

实施例37 纤溶酶原减轻PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛损伤

9-10 周龄 PLG 活性受损雄性小鼠 10 只，随机分为三组，空白对照组 3 只，给 PBS 对照组 3 只，给纤溶酶原组 4 只。给溶媒 PBS 对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食 4 小时后单次腹腔注射 200mg/kg STZ (sigma S0130)诱导 I 型糖尿病^[43]，空白对照组不做处理。注射 12 天后开始给药并定为给药

第 1 天, 给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶 1mg/0.1ml/只/天, 给溶媒 PBS 对照组尾静脉注射同体积的 PBS, 连续给药 28 天。在第 29 天处死小鼠, 取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织, 以 3%双氧水孵育 15 分钟, 0.01MPBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭 30 分钟; 时间到后, 弃除羊血清液, 滴加山羊抗鼠 IgM (HRP) 抗体 (Abcam) 室温孵育 1 小时, 0.01M 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。

IgM 抗体在清除凋亡和坏死细胞过程中发挥着重要作用, 组织器官损伤局部 IgM 抗体的水平与损伤程度呈正相关^[49,50]。因此, 检测组织器官局部 IgM 抗体的水平能够反映该组织器官的损伤情况。

15 研究结果显示, 给纤溶酶原组 (图 37C) IgM 的阳性表达明显低于给溶媒 PBS 对照组 (图 37B) 给纤溶酶原组比给溶媒 PBS 组更接近空白对照组 (37A)。说明纤溶酶原能降低 IgM 的表达, 提示纤溶酶原能减轻 PLG 活性受损小鼠 T1DM 模型中的胰岛损伤。

实施例 38 纤溶酶原减少 24-25 周龄糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡

20 24-25 周龄 db/db 雄性小鼠 11 只以及 db/m 雄性小鼠 5 只, 实验开始当天记为第 0 天并称重, db/db 小鼠根据体重随机分为两组, 给纤溶酶原组 5 只, 给溶媒 PBS 对照组 6 只, db/m 小鼠作为正常对照组。第 1 天开始给纤溶酶原或 PBS, 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 或不注射任何液体, 连续给药 25 31 天。在第 32 天处死小鼠, 取胰脏在 4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 3 μ m, 切片脱蜡复水后水洗 1 次。PAP 笔圈出组织, 滴加蛋白酶 K 工作液覆盖组织, 室温孵育 7min, 0.01M PBS 洗 3 次, 每次 3 分钟。滴加 TUNEL 试剂盒 (罗氏) 试剂 1 和试剂 2 混合液体 (5:45), 于 37°C 恒温孵育 30 40min, 0.01M PBS 洗 3 次, 每次 3 分钟。滴加甲醇配制的 3%双氧水溶液 (过氧化氢: 甲醇=1:9) 室温避光孵育 20 分钟, 0.01M PBS 洗 3 次, 每次

3 分钟。滴加 tunel 试剂盒试剂 3, 37°C 恒温孵育 30min, 0.01M PBS 洗 3 次, 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。

5 TUNEL 染色可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核 DNA 的断裂情况。

本实验结果显示, 给纤溶酶原组 (图 38C) 的阳性细胞数 (箭头标识) 明显少于给溶媒 PBS 对照组 (图 38B)。正常对照组 TUNEL 阳性染色极低 (图 38A)。正常对照组凋亡率约为 8%, 给溶媒 PBS 组凋亡率约为 93%, 给纤溶酶原组凋亡率约为 16%。说明纤溶酶原组能显著减少糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡。

15

参考文献:

- [1]International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas [M]. 7th ed. Brussels: Karakas Print, 2015: 13.
- [2]Lopez AP, de Dios A, Chiesa I, et al. Analysis of mutations in the glucokinase gene in people clinically characterized as MODY2 without a family history of diabetes. Diabetes Res Clin Pract, 2016, 118: 38-43.
- 20 [3]Fan M, Li W, Wang L, et al. Association of SLC30A8 gene polymorphism with type 2 diabetes, evidence from 46 studies: a meta-analysis. Endocrine, 2016, 53: 381-94.
- [4]Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4): 339-451.
- [5]Dhand R, Hiles I, Panayotou G, et al. PI3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity[J]. Embo J, 1994, 13(3): 522-331.
- 25 [6]Perrin AJ, Gunda M, Yu B, Yen K, Ito S, Forster S, Tissenbaum HA, Derry WB. Noncanonical control of C. elegans germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. Cell Death Differ. 2013 Jan; 20(1): 97-107.
- [7]Aguirre V, Uchida T, Yenush L, et al. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance through association with the insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of ser(307)[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 9047-9054.
- 30

- [8] Hirosumi J, Tuneman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* [J]. 2002; 420: 333-336.
- [9] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance [J]. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91.
- 5 [10] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 860-867.
- [11] Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus [J]. *Indian J Med Res*, 2012, 135: 127-130.
- [12] Kentish SJ, O'Donnell TA, Isaacs NJ, et al. Gastric vagal afferent modulation by leptin is influenced by food intake status [J]. *J Physiol*, 2013, 591(7): 1921-1934.
- 10 [13] Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 181643.
- [14] LUOTOLA K, PIETILÄ A, ZELLE R T, et al. Associations between interleukin-1(IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes [J]. *J Intern Med*, 15 2011, 269(3): 322-332.
- [15] DONATH M Y, SHOELSON S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(2): 98-107.
- [16] Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16(4): 763-774.
- 20 [17] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343-353.
- [18] Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 302682.
- 25 [19] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic β -cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 168-176.
- [20] Valko M, Leibfriz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- [21] Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and β -cell dysfunction. *Pflügers Arch* 2010; 30 460(4): 703-718.
- [22] Patel S, Santani D. Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications.

Pharmacol Rep 2009; 61: 595–603.

[23]Hayden MR, Sowers JR. Isletopathy in type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 891–910.

[24]Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenius O, Francis J. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res* 2010; 85(3): 473–483.

[25]Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Khalek A, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-κB. *Diabetologia* 1999; 42(2): 222–232.

[26]Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(13): 5072–5077.

[27]Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 414–429.

[28]Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Noll C, Cornut M, Schmidlin F, Paul JL, Janel N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Donath MY, Ehses JA, Homo-Delarche F. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One* 2009; 4(9): e6963.

[29]Cheng CY, Hsieh HL, Sun CC, Lin CC, Luo SF, Yang CM. IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC alpha, JNK1/2, and NF-kappaB in A549 cells. *J Cell Physiol* 2009; 219(1):183–193.

[30]Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 1844–1854.

[31]Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005; 54(2): 311–321.

[32]Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JTR, Goldstein BJ. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 48662–48669.

[33]Loh K, et al., Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009; 10(4): 260-272.

- [34]Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343–353.
- [35]Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52(1): 1–8.
- 5 [36]Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615–1625.
- [37]Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 993–999.
- [38]Wang J, Ma H, Tong C, Zhang H, Lawlis GB, Li Y, Zang M, Ren J, Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz
10 PW, Li J. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J* 2010; 24(6): 2066–2076.
- [39]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.
- [40]Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional
15 comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- [41]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.
- 20 [42]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.
- [43] Brian L. Furman . Streptozotocin-Induced Diabetic Models UNIT 5.47 in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47.1-5.47.20.
- [44] Parvesh Chaudhry, Mohan Singh, Sophie Parent et al. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel
25 Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Mol Cell Biol.* 2012 Feb; 32(4): 826–839.
- [45] Patrick Viatour, Marie-Paule Merville, Vincent Bours et al. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation.. *TRENDS in Biochemical Sciences* , 2005 , 30 (1) :43-52.
- [46]Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900–904.
- 30 [47]Withers DJ, Burks DJ, Towery HH et al. White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 1999;23:32–40.

[48]Jacob CO1, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO et al. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Feb;87(3):968-72.

5 [49]Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. J Immunol.2006. 177: 4727–4734.

[50] 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.

权利要求书

1. 一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

5 2. 权利要求 1 的方法，其中所述纤溶酶原还促进糖尿病受试者胰岛素的表达。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者进食后的胰岛素分泌。

10 5. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者禁食状态下的胰岛素分泌。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者应答血糖升高刺激的胰岛素分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。

15 7. 权利要求 1-6 任一项的方法，其中所述纤溶酶原在促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时，降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述纤溶酶原通过促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时，降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌，实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。

20 9. 一种降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述纤溶酶原还降低糖尿病受试者胰高血糖素的表达。

11. 权利要求 9 或 10 的方法，其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

25 12. 权利要求 9-11 任一项的方法，其中所述纤溶酶原降低糖尿病受试者进食后的胰高血糖素分泌。

13. 权利要求 9-12 任一项的方法，其中所述纤溶酶原降低糖尿病受试者禁食状态下的胰高血糖素分泌。

30 14. 权利要求 9-13 任一项的方法，其中所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌，使血糖回复到正常或接近正常水平。

15. 权利要求 9-14 任一项的方法，其中所述纤溶酶原在降低受试者胰高

血糖素的表达和/或分泌的同时，促进所述胰岛素表达和/或分泌。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述纤溶酶原通过降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时，促进所述胰岛素表达和/或分泌，实现使受试者血糖回复到正常或接近正常水平。

5 17. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物 2(IRS-2)的表达。

18. 一种降低糖尿病受试者血糖的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

10 19. 权利要求 18 的方法，其中所述血糖选自如下的一项或多项：血清葡萄糖水平、血清果糖胺水平、血清糖化血红蛋白水平。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述血糖为血清葡萄糖水平。

21. 权利要求 18-20 任一项的方法，其中所述糖尿病为 T1DM 或 T2DM。

15 22. 一种提高糖尿病受试者糖耐量的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述糖尿病为 T2DM。

24. 一种促进糖尿病受试者餐后血糖下降的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

20 25. 权利要求 24 的方法，其中所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1.5 小时给予。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述纤溶酶原在受试者餐前 30 分钟至 1 小时给予。

27. 一种促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

25 28. 一种促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的方法，包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述纤溶酶原促进细胞因子 TNF- α 的表达。

30 30. 权利要求 28 或 29 的方法，其中所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子 NF- κ B 的表达。

31. 权利要求 28-30 任一项的方法，其中所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉

积。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。

33. 权利要求 28-32 任一项的方法，其中所述纤溶酶原抑制胰岛细胞凋亡。

5 34. 权利要求 28-33 的方法，其中所述糖尿病患者为 T1DM 或 T2DM。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述 T1DM 受试者为 PLG 活性正常或 PLG 活性受损受试者。

36. 权利要求 1-35 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用。

10 37. 权利要求 36 的方法，其中所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联用：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物，抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

38. 权利要求 1-37 任一项的方法，其中所述纤溶酶原与序列 2、6、8、10 或 12 具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性，并且仍然具有纤溶酶原活性。

15 39. 权利要求 1-38 任一项的方法，所述纤溶酶原是在序列 2、6、8、10 或 12 的基础上，添加、删除和/或取代 1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸，并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

20 40. 权利要求 1-39 任一项的方法，所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

41. 权利要求 1-40 任一项的方法，所述纤溶酶原选自 Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

25 42. 权利要求 1-41 任一项的方法，所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

43. 权利要求 1-41 任一项的方法，所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

30 44. 权利要求 1-43 任一项的方法，所述纤溶酶原的氨基酸如序列 2、6、8、10 或 12 所示。

45. 权利要求 1-44 任一项的方法，其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。

46. 权利要求 1-45 任一项的方法，其中所述受试者是人。

47. 权利要求 1-46 任一项的方法，其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。

48. 权利要求 1-47 任一项的方法，所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

49. 一种用于权利要求 1-48 任一项的方法的纤溶酶原。

50. 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 1-48 中任一项所述方法的纤溶酶原。

51. 一种预防性或治疗性试剂盒，其包含：(i)用于权利要求 1-48 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)。

52. 根据权利要求 51 所述的试剂盒，其中所述构件为注射器或小瓶。

53. 权利要求 51 或 52 的试剂盒，其还包含标签或使用说明书，该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施权利要求 1-48 中任一项所述方法。

54. 一种制品，其包含：

含有标签的容器；和

包含(i)用于权利要求 1-48 中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物，其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施权利要求 1-48 中任一项所述方法。

55. 权利要求 51-53 中任一项的试剂盒或权利要求 54 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。

56. 权利要求 55 的试剂盒或制品，其中所述其他药物选自下组：抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物，抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

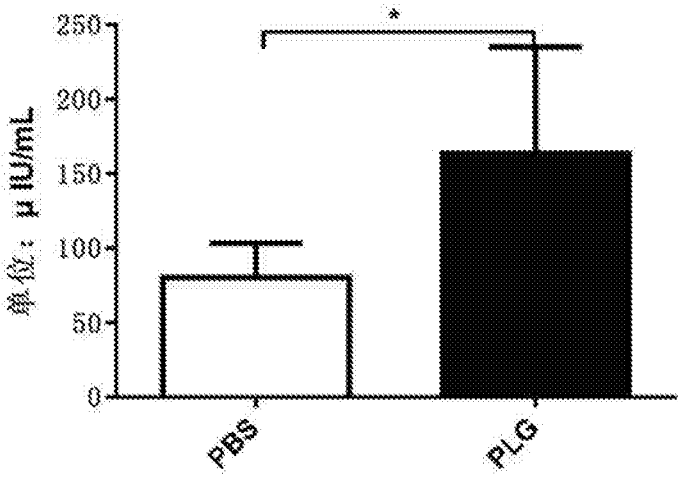


图1

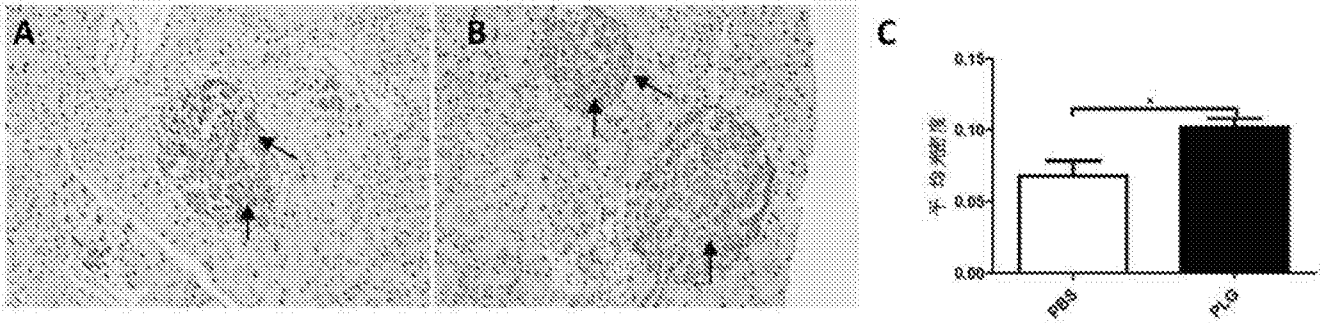


图2

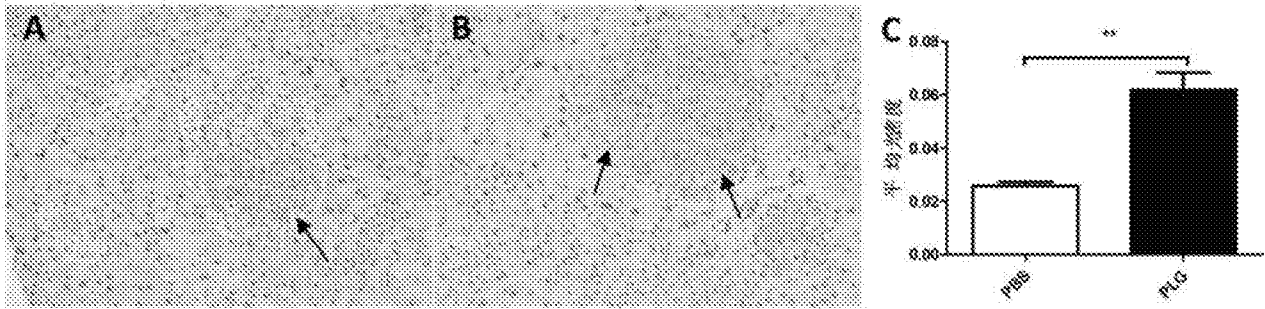


图3

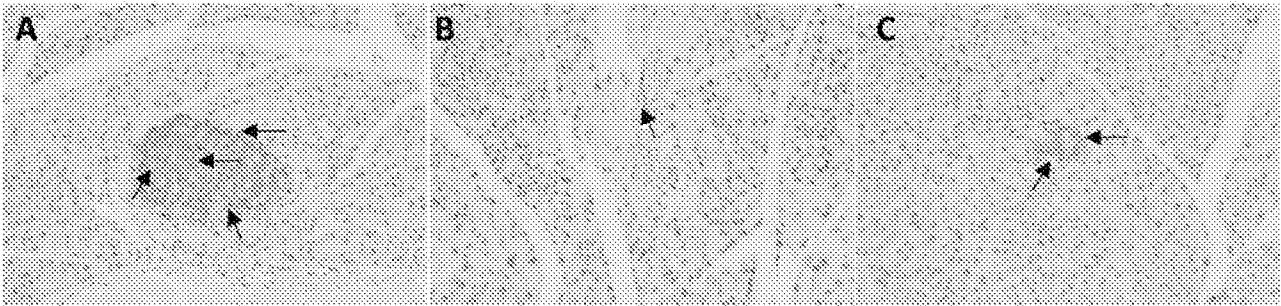


图4

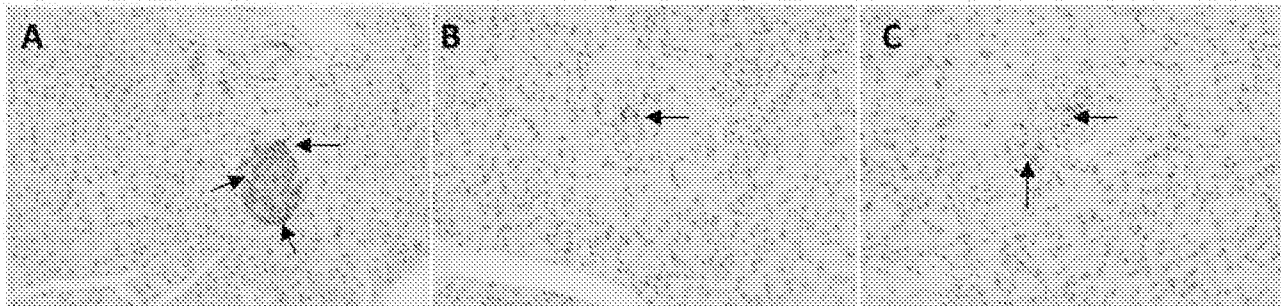


图5

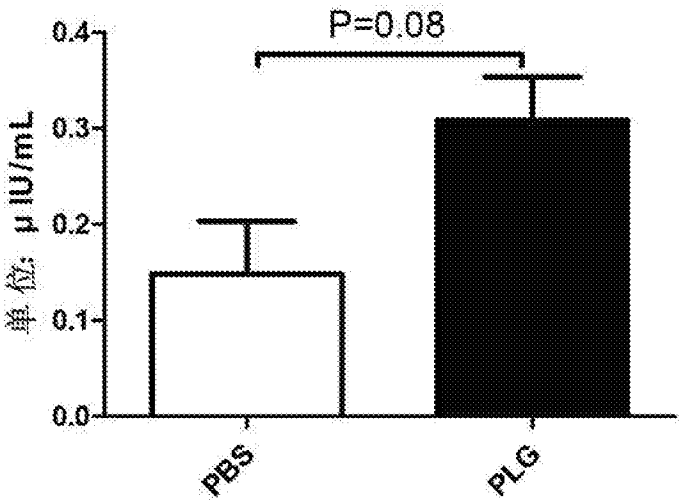


图6

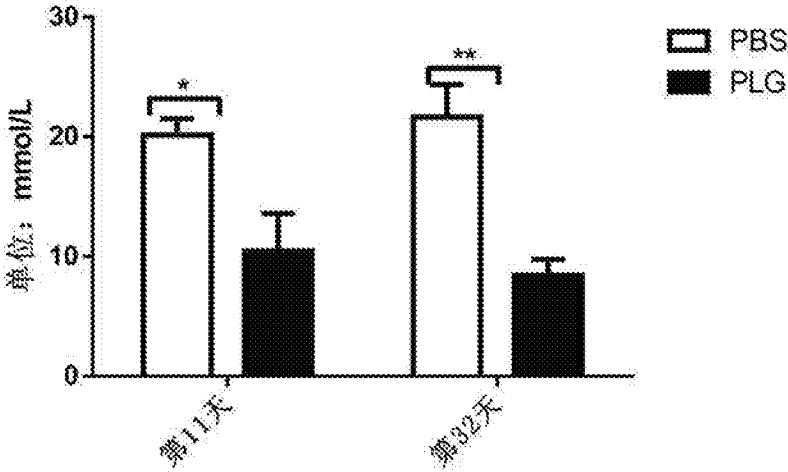


图7

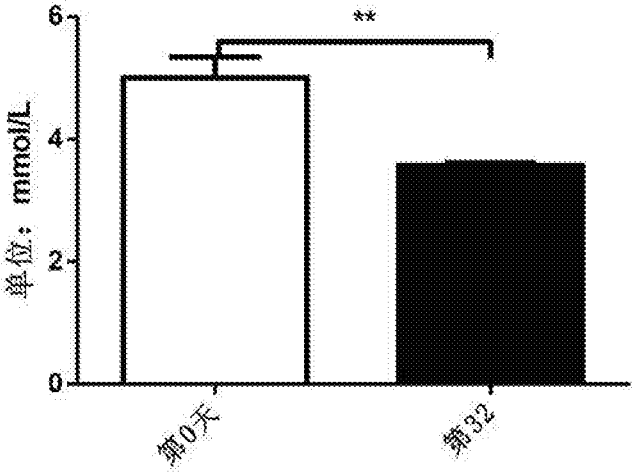


图8

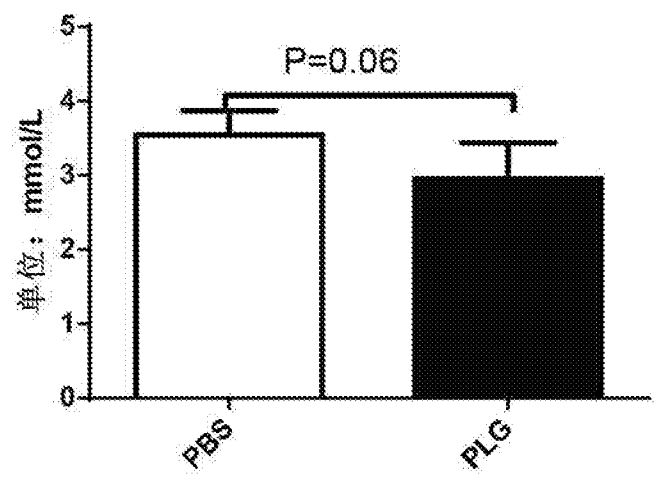


图9

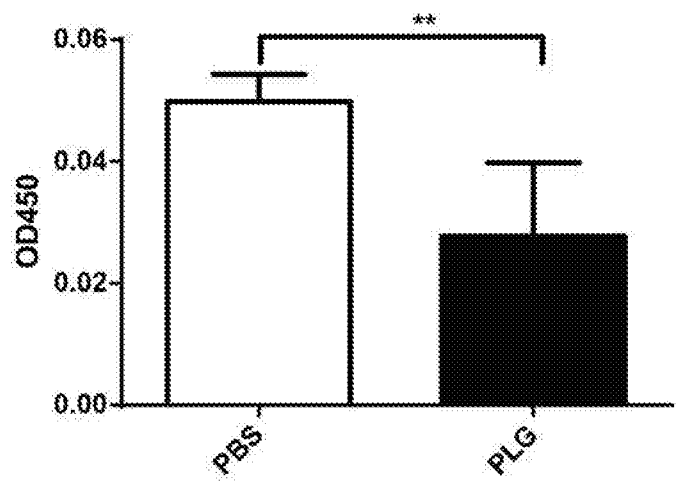


图10

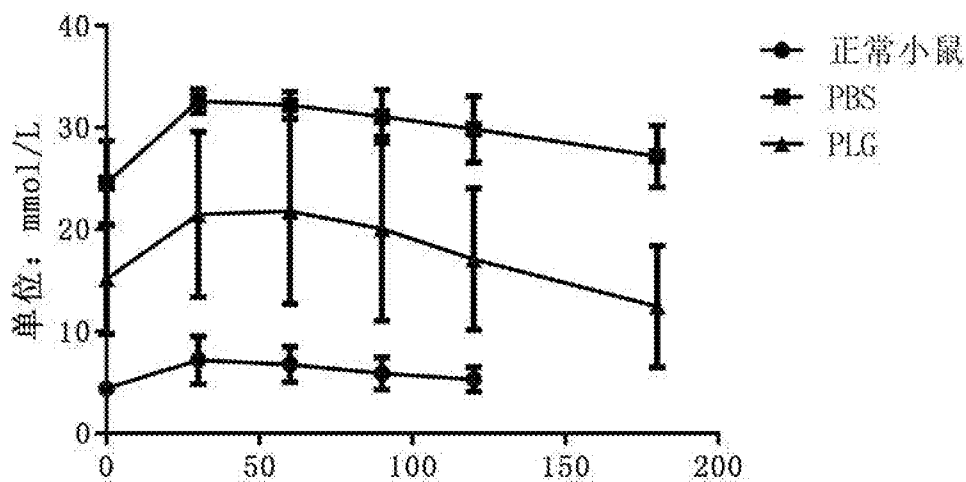


图 11

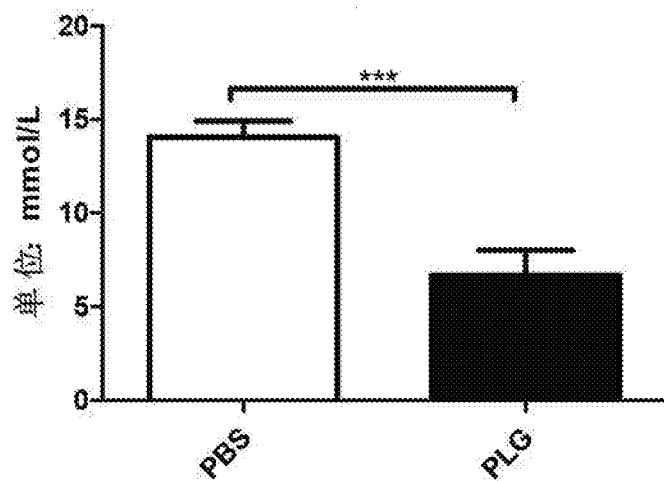


图 12

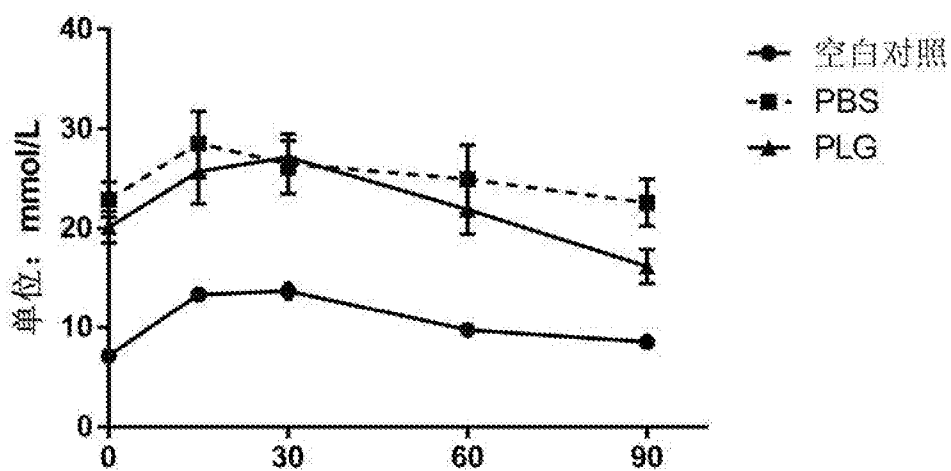


图 13

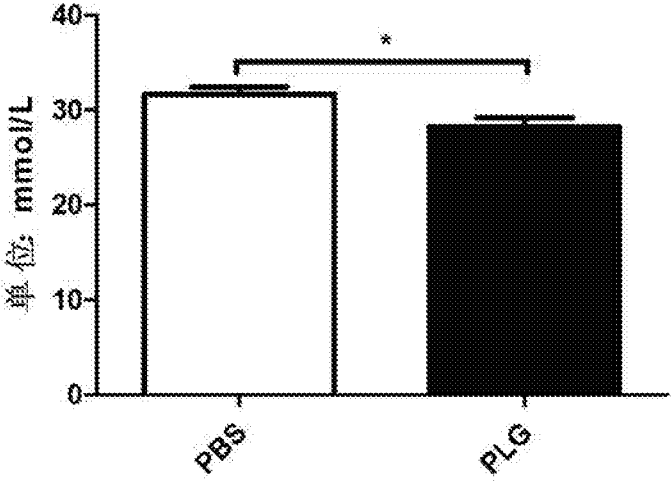


图14

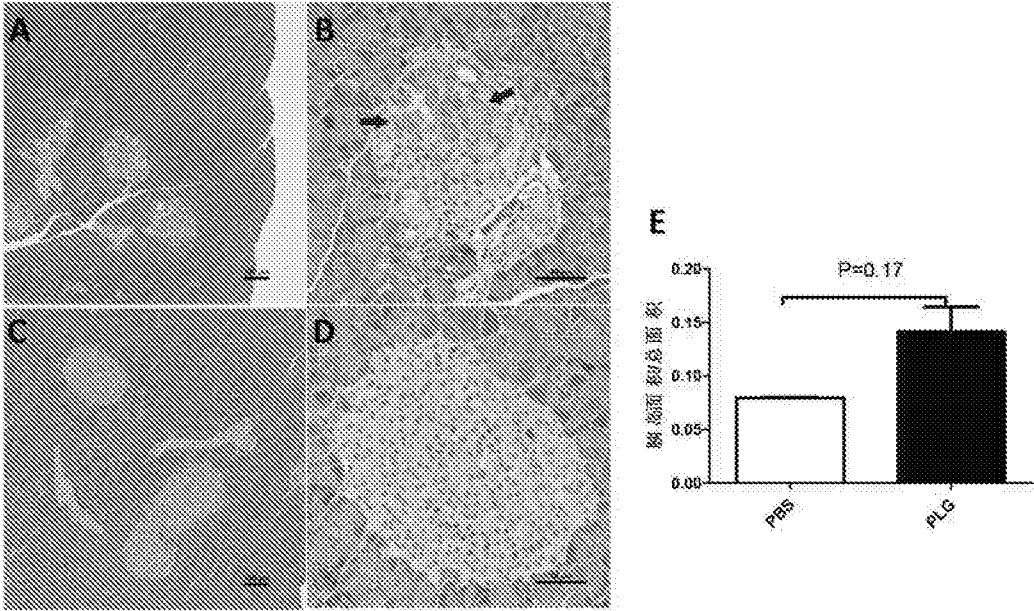


图15

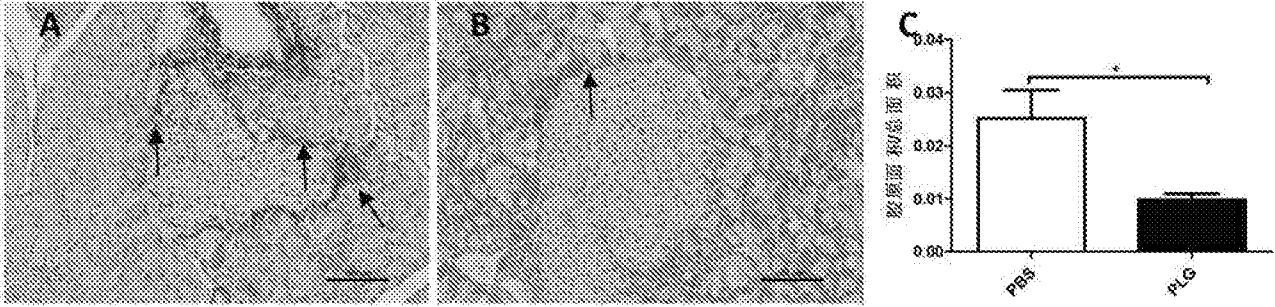


图16

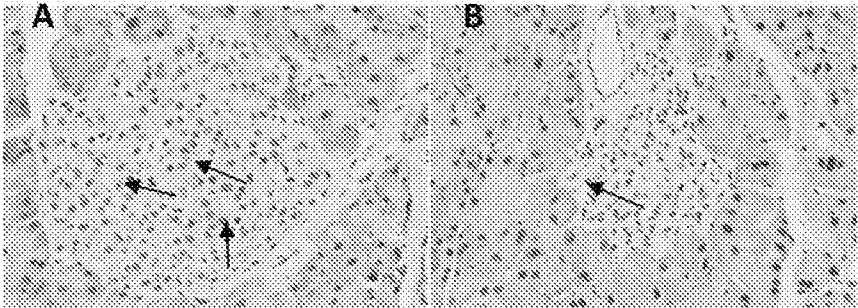


图17

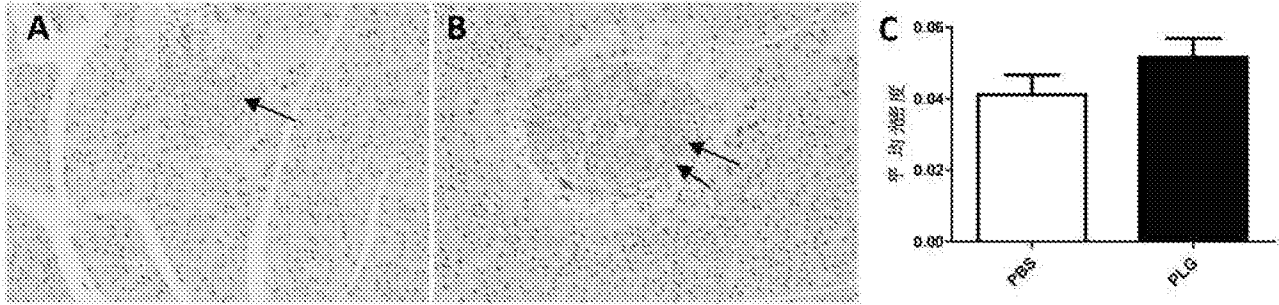


图18

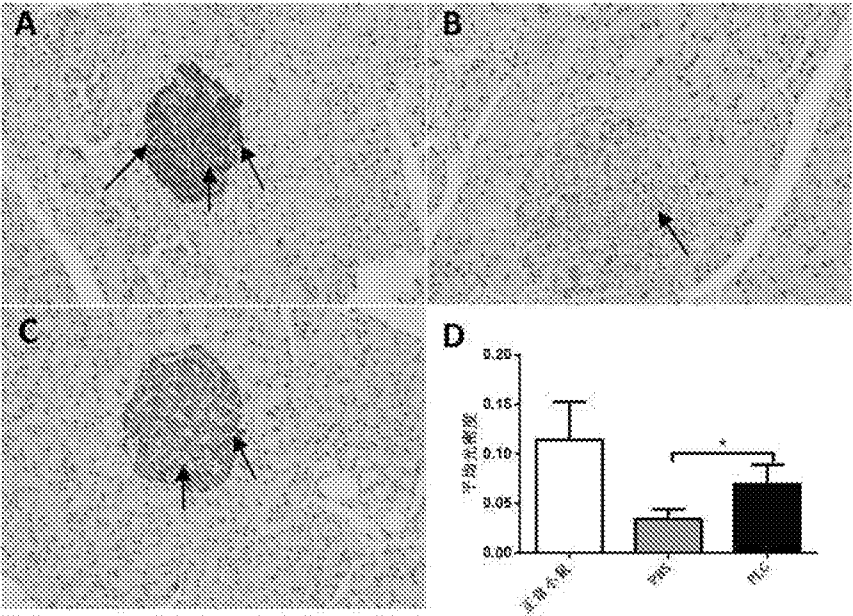


图19

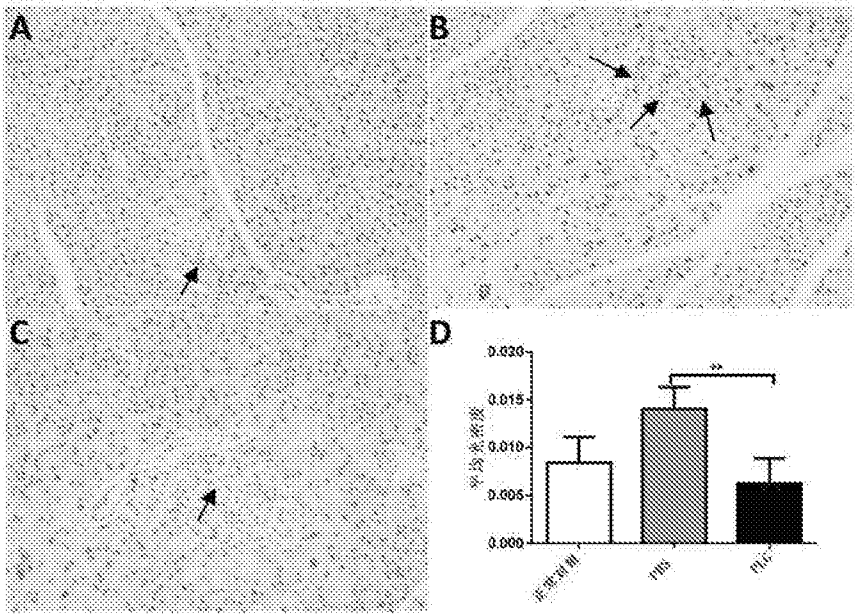


图20

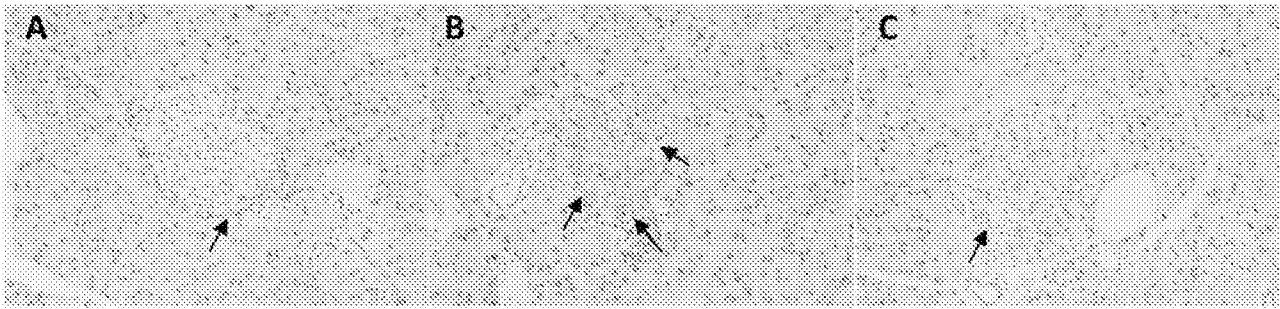


图21

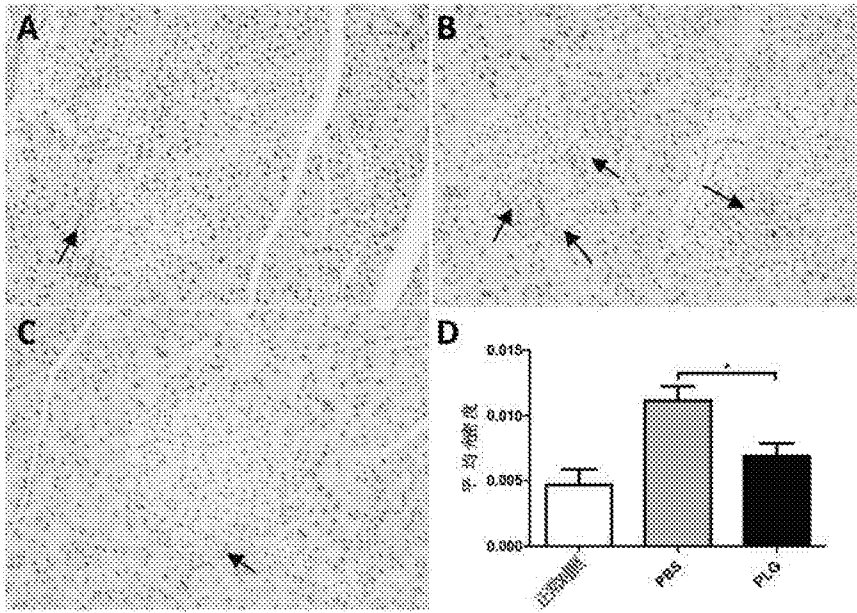


图22

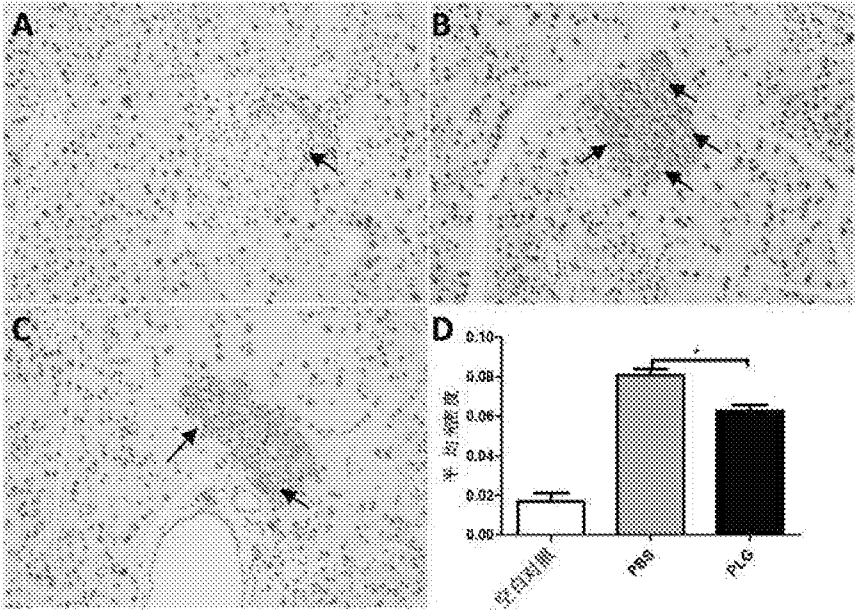


图23

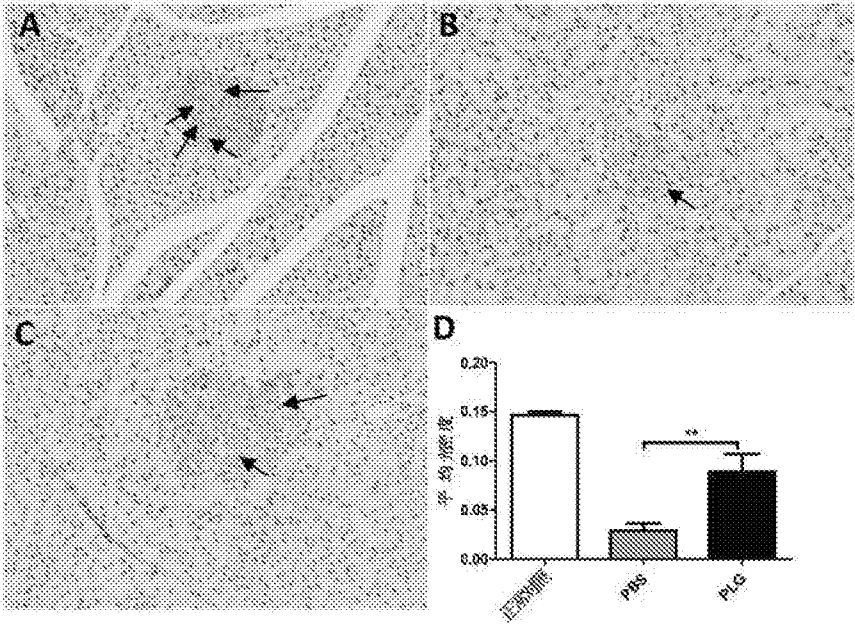


图24

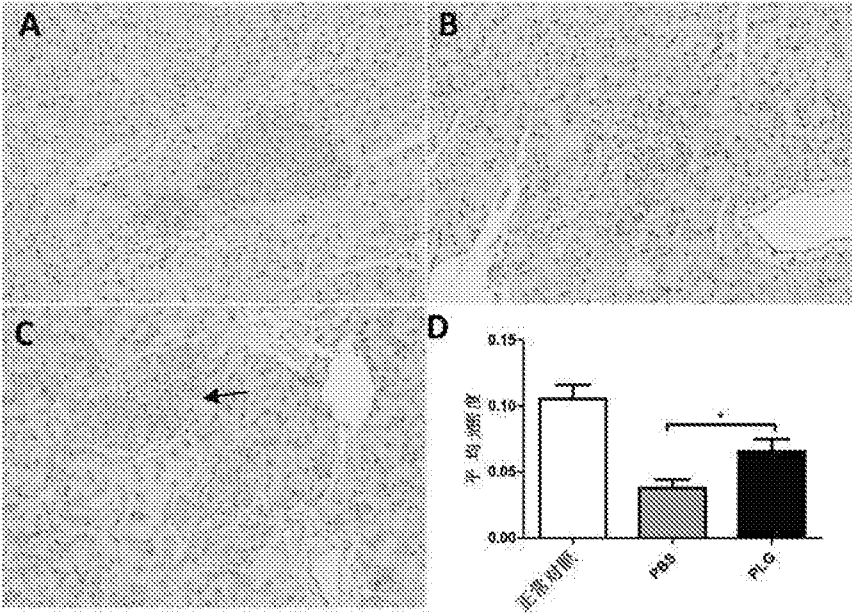


图25

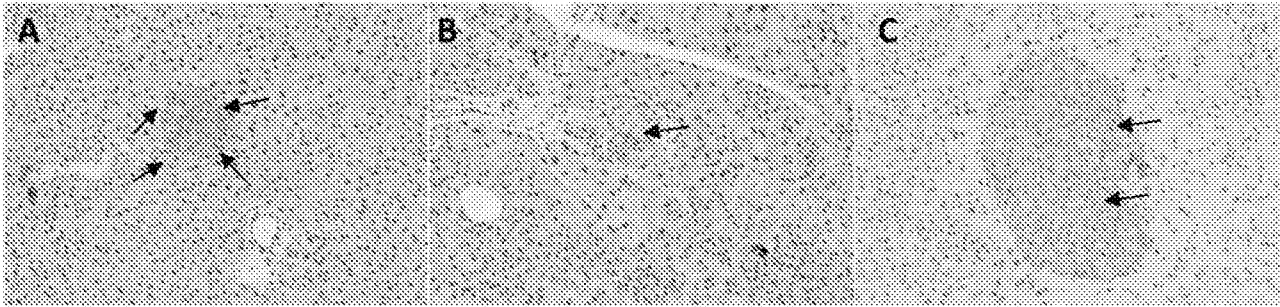


图26

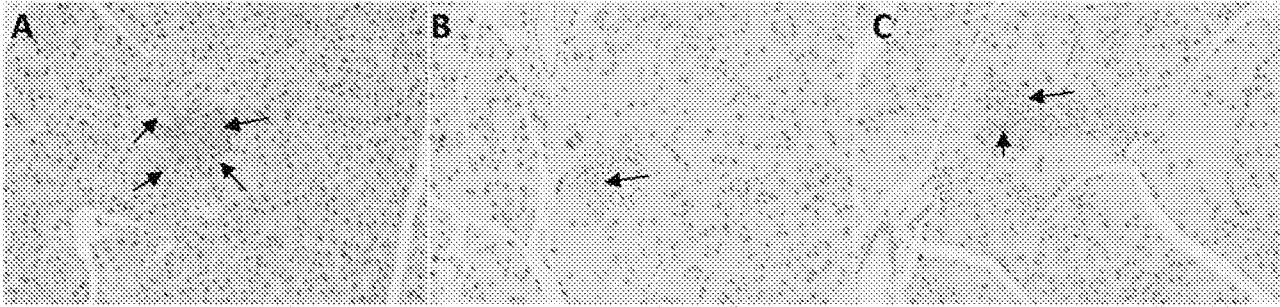


图27

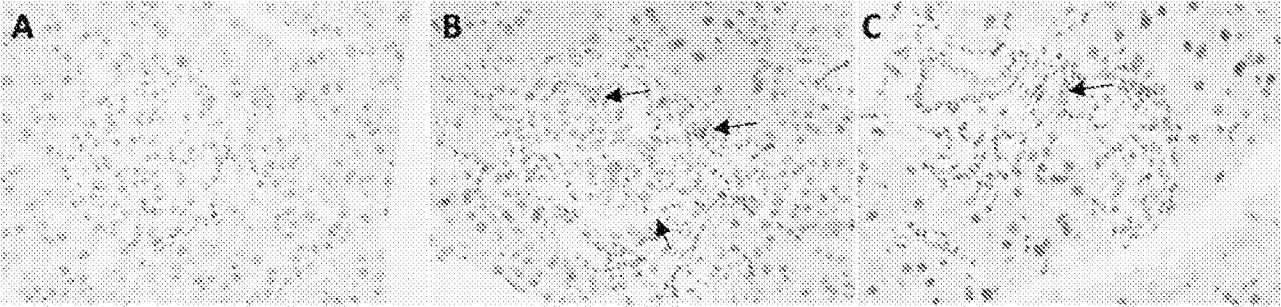


图28

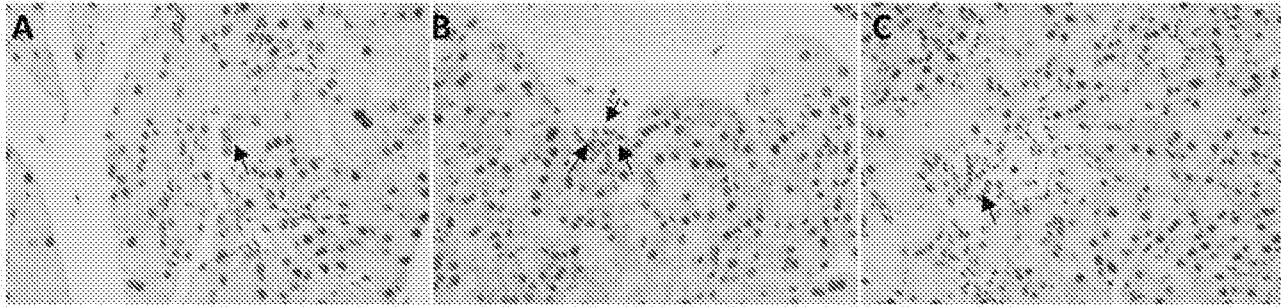


图29

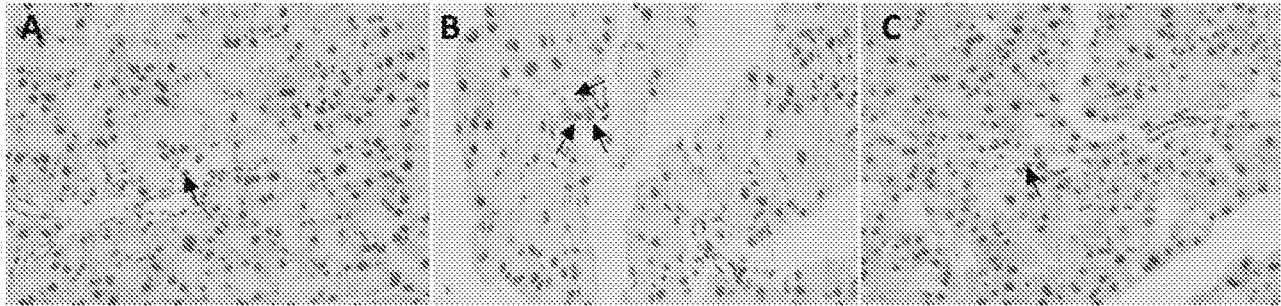


图30

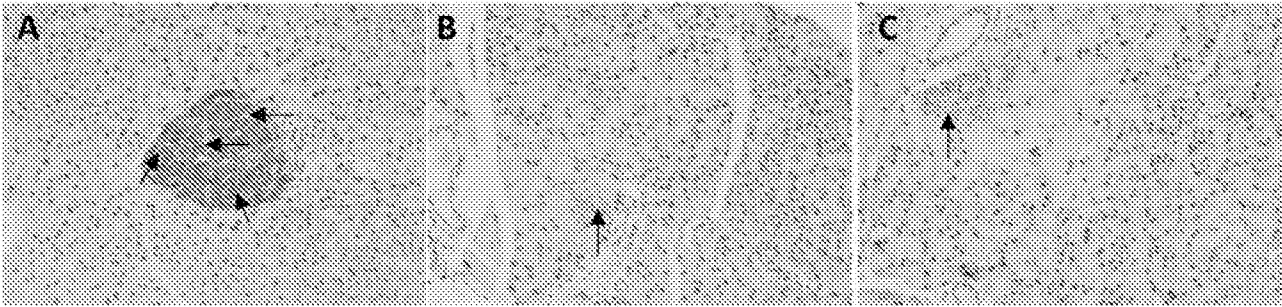


图31

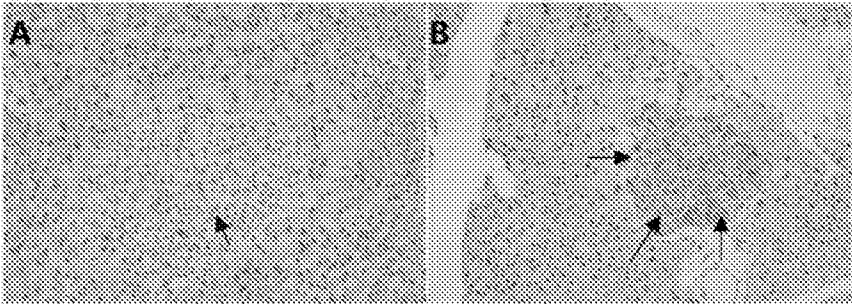


图32

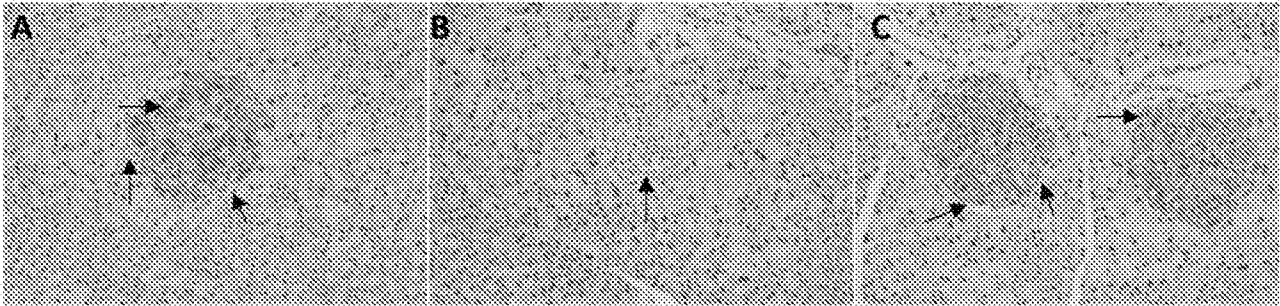


图33

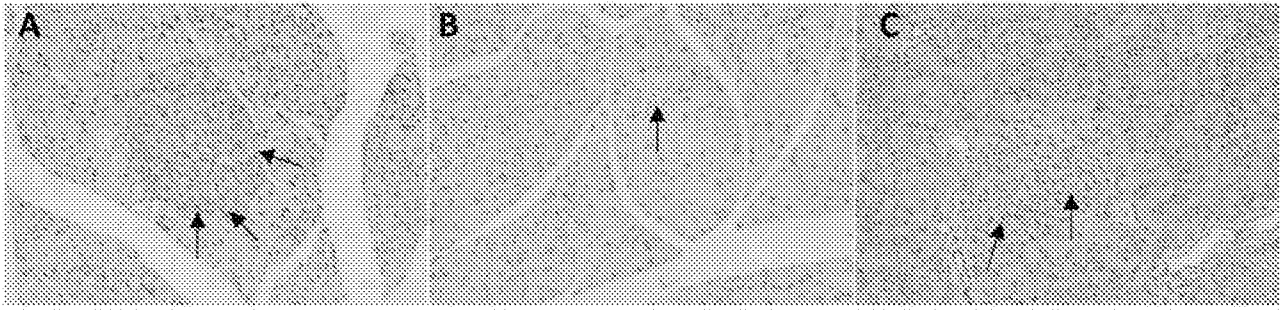


图34

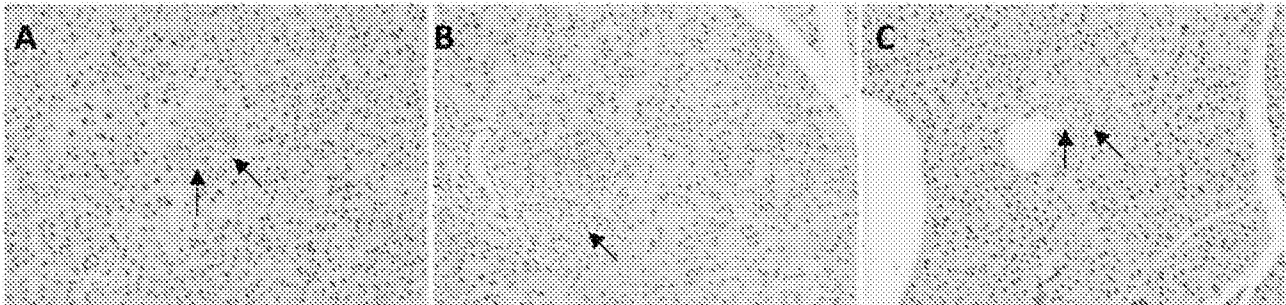


图35

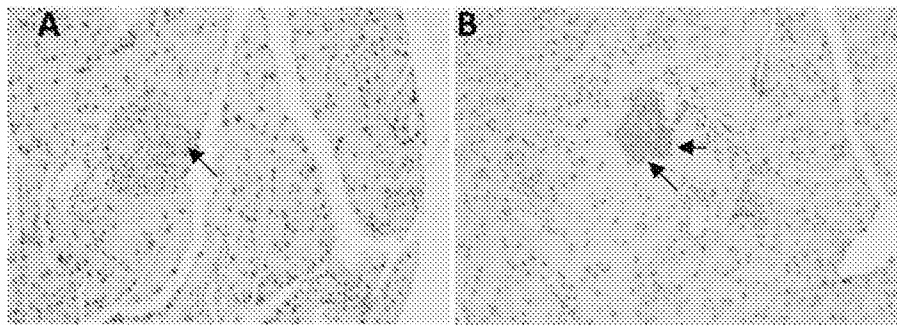


图36

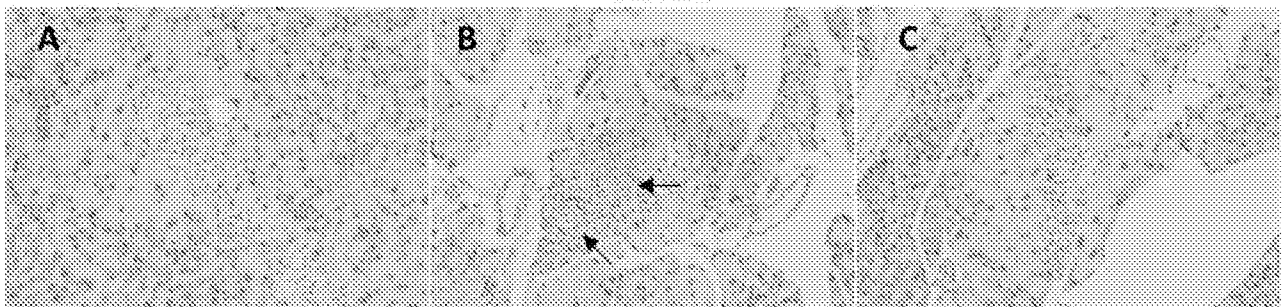


图37

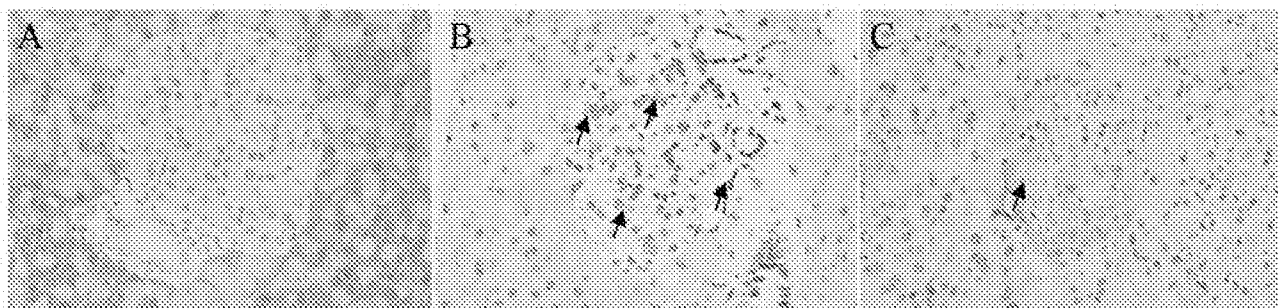


图38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/48 (2006.01) i; A61K 45/06 (2006.01) i; A61P 3/10 (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 38; A61K 45; A61P 3

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)

DWPI; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; Genbank; EBI-EMBL: 申请人/发明人, 序列, 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, 胰岛素, 胰高血糖素, 胰岛, 糖, 糖尿病, plasminogen, plasmin, microplasmin, miniplasmin, insulin, glucagon, pancreas islet, glucose, dextrose, diabetes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101002888 A (CHEN, Weisen et al.), 25 July 2007 (25.07.2007), claim 6, and description, page 2, paragraphs 2 and 4	1-56
X	BUTERA, D. et al., "plasminogen isoform 1 precursor", GenBank: NP_000292.1, 15 March 2015 (15.03.2015), entire document	49
X	WO 9900420 A1 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB), 07 January 1999 (07.01.1999), claims 1-9, description, page 1, paragraph 1, and sequence 1	1-56
X	CN 1643140 A (CARRINGTON LABORATORIES, INC.), 20 July 2005 (20.07.2005), claim 7	49
X	CN 105705520 A (SANOFI), 22 June 2016 (22.06.2016), description, paragraph [0004]	49
A	CN 102872020 A (INSTITUTE OF MEDICAL MOLECULAR DESIGN INC.), 16 January 2013 (16.01.2013), entire document	1-56
A	CN 105008323 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN et al.), 28 October 2015 (28.10.2015), entire document	1-56

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

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search 01 September 2017	Date of mailing of the international search report 11 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Hao Telephone No. (86-10) 52871050

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/089065

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/CN2017/089065

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.: 1-48
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 1-48 relate to a method for treating a disease as set out in PCT Rule 39.1(iv). This report is provided on the basis that said claims are amended to be 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/CN2017/089065

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101002888 A	25 July 2007	None	
WO 9900420 A1	07 January 1999	CA 2295925 A1	07 January 1999
		AU 7951798 A	19 January 1999
		JP 2002510209 A	02 April 2002
		EP 1001985 A1	24 May 2000
CN 1643140 A	20 July 2005	AU 2003267017 A1	11 November 2003
		US 2003147876 A1	07 August 2003
		WO 03095637 A1	20 November 2003
		TW 200302280 A	01 August 2003
		EP 1478741 A4	04 July 2007
		CA 2474947 A1	20 November 2003
		US 2008026446 A1	31 January 2008
		EP 1478741 A1	24 November 2004
		WO 03095637 B1	27 May 2004
		KR 20040081158 A	20 September 2004
		US 7202066 B2	10 April 2007
CN 105705520 A	22 June 2016	JP 2005519992 A	07 July 2005
		MX 2016001851 A	16 May 2016
		US 2016200831 A1	14 July 2016
		PE 02442016 A1	10 May 2016
		EA 201690377 A1	30 June 2016
		JP 2016529255 A	23 September 2016
		PH 12016500239 A1	16 May 2016
		CR 20160117 A	20 May 2016
		HK 1221725 A1	09 June 2017
		KR 20160035077 A	30 March 2016
CN 102872020 A	16 January 2013	EP 2201946 A1	30 June 2010
		JP WO2009054439 A1	03 March 2011
		RU 2010120675 A	27 November 2011
		KR 20100097113 A	02 September 2010
		JP 5470046 B2	16 April 2014
		CN 101842093 B	22 August 2012
		WO 2009054439 A1	30 April 2009
		CN 101842093 A	22 September 2010
		AU 2008314979 A1	30 April 2009
		CA 2703494 A1	30 April 2009
		BR PI0816560 A2	01 September 2015
		EP 2201946 A4	25 January 2012
CN 105008323 A	28 October 2015	WO 2014070983 A1	08 May 2014
		EP 2914575 A1	09 September 2015
		EP 2914575 A4	09 November 2016
		US 9718760 B2	01 August 2017
		CA 2888996 A1	08 May 2014
		US 2015315178 A1	05 November 2015
		HK 1216248 A1	28 October 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/089065

A. 主题的分类 A61K 38/48(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 3/10(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) A61K38; A61K45; A61P3 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)) DWPI; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; Genbank; EBI-EMBL; 申请人/发明人, 序列, 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, 胰岛素, 胰高血糖素, 胰岛, 糖, 糖尿病, plasminogen, plasmin, microplasmin, miniplasmin, insulin, glucagon, pancreas islet, glucose, dextrose, diabetes																										
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 101002888 A (陈维森等) 2007年 7月 25日 (2007 - 07 - 25) 权利要求6, 说明书第2页第2、4段</td> <td>1-56</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>BUTERA, D. 等. "plasminogen isoform 1 precursor." GenBank: NP_000292.1., 2015年 3月 15日 (2015 - 03 - 15), 全文</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 9900420 A1 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB) 1999年 1月 7日 (1999 - 01 - 07) 权利要求1-9, 说明书第1页第1段, 序列1</td> <td>1-56</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1643140 A (卡灵顿实验公司) 2005年 7月 20日 (2005 - 07 - 20) 权利要求7</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105705520 A (赛诺菲) 2016年 6月 22日 (2016 - 06 - 22) 说明书第[0004]段</td> <td>49</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102872020 A (株式会社医药分子设计研究所) 2013年 1月 16日 (2013 - 01 - 16) 全文</td> <td>1-56</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105008323 A (密执安大学评议会等) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文</td> <td>1-56</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 101002888 A (陈维森等) 2007年 7月 25日 (2007 - 07 - 25) 权利要求6, 说明书第2页第2、4段	1-56	X	BUTERA, D. 等. "plasminogen isoform 1 precursor." GenBank: NP_000292.1., 2015年 3月 15日 (2015 - 03 - 15), 全文	49	X	WO 9900420 A1 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB) 1999年 1月 7日 (1999 - 01 - 07) 权利要求1-9, 说明书第1页第1段, 序列1	1-56	X	CN 1643140 A (卡灵顿实验公司) 2005年 7月 20日 (2005 - 07 - 20) 权利要求7	49	X	CN 105705520 A (赛诺菲) 2016年 6月 22日 (2016 - 06 - 22) 说明书第[0004]段	49	A	CN 102872020 A (株式会社医药分子设计研究所) 2013年 1月 16日 (2013 - 01 - 16) 全文	1-56	A	CN 105008323 A (密执安大学评议会等) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-56
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
X	CN 101002888 A (陈维森等) 2007年 7月 25日 (2007 - 07 - 25) 权利要求6, 说明书第2页第2、4段	1-56																								
X	BUTERA, D. 等. "plasminogen isoform 1 precursor." GenBank: NP_000292.1., 2015年 3月 15日 (2015 - 03 - 15), 全文	49																								
X	WO 9900420 A1 (KAROLINSKA INNOVATIONS AB) 1999年 1月 7日 (1999 - 01 - 07) 权利要求1-9, 说明书第1页第1段, 序列1	1-56																								
X	CN 1643140 A (卡灵顿实验公司) 2005年 7月 20日 (2005 - 07 - 20) 权利要求7	49																								
X	CN 105705520 A (赛诺菲) 2016年 6月 22日 (2016 - 06 - 22) 说明书第[0004]段	49																								
A	CN 102872020 A (株式会社医药分子设计研究所) 2013年 1月 16日 (2013 - 01 - 16) 全文	1-56																								
A	CN 105008323 A (密执安大学评议会等) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 全文	1-56																								
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																										
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																										
国际检索实际完成的日期 2017年 9月 1日		国际检索报告邮寄日期 2017年 9月 11日																								
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 潘浩 电话号码 (86-10)52871050																								

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： 1-48
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1-48属于PCT细则第39.1(iv)疾病治疗方法。本报告基于修改为纤溶酶原的制药用途做出。
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/CN2017/089065

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	101002888	A	2007年 7月 25日	无			
WO	9900420	A1	1999年 1月 7日	CA	2295925	A1	1999年 1月 7日
				AU	7951798	A	1999年 1月 19日
				JP	2002510209	A	2002年 4月 2日
				EP	1001985	A1	2000年 5月 24日
CN	1643140	A	2005年 7月 20日	AU	2003267017	A1	2003年 11月 11日
				US	2003147876	A1	2003年 8月 7日
				WO	03095637	A1	2003年 11月 20日
				TW	200302280	A	2003年 8月 1日
				EP	1478741	A4	2007年 7月 4日
				CA	2474947	A1	2003年 11月 20日
				US	2008026446	A1	2008年 1月 31日
				EP	1478741	A1	2004年 11月 24日
				WO	03095637	B1	2004年 5月 27日
				KR	20040081158	A	2004年 9月 20日
				US	7202066	B2	2007年 4月 10日
				JP	2005519992	A	2005年 7月 7日
CN	105705520	A	2016年 6月 22日	MX	2016001851	A	2016年 5月 16日
				US	2016200831	A1	2016年 7月 14日
				PE	02442016	A1	2016年 5月 10日
				EA	201690377	A1	2016年 6月 30日
				JP	2016529255	A	2016年 9月 23日
				PH	12016500239	A1	2016年 5月 16日
				CR	20160117	A	2016年 5月 20日
				HK	1221725	A1	2017年 6月 9日
				KR	20160035077	A	2016年 3月 30日
CN	102872020	A	2013年 1月 16日	EP	2201946	A1	2010年 6月 30日
				JP	WO2009054439	A1	2011年 3月 3日
				RU	2010120675	A	2011年 11月 27日
				KR	20100097113	A	2010年 9月 2日
				JP	5470046	B2	2014年 4月 16日
				CN	101842093	B	2012年 8月 22日
				WO	2009054439	A1	2009年 4月 30日
				CN	101842093	A	2010年 9月 22日
				AU	2008314979	A1	2009年 4月 30日
				CA	2703494	A1	2009年 4月 30日
				BR	PI0816560	A2	2015年 9月 1日
				EP	2201946	A4	2012年 1月 25日
CN	105008323	A	2015年 10月 28日	WO	2014070983	A1	2014年 5月 8日
				EP	2914575	A1	2015年 9月 9日
				EP	2914575	A4	2016年 11月 9日
				US	9718760	B2	2017年 8月 1日
				CA	2888996	A1	2014年 5月 8日
				US	2015315178	A1	2015年 11月 5日
				HK	1216248	A1	2016年 10月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)