



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I624268 B

(45) 公告日：中華民國 107 (2018) 年 05 月 21 日

(21) 申請案號：105141900

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 16 日

(51) Int. Cl. : *A61K38/48 (2006.01)* *A61P9/00 (2006.01)**A61P9/10 (2006.01)* *A61P9/14 (2006.01)*

(30) 優先權：2015/12/18 世界智慧財產權組織 PCT/CN2015/097947

(71) 申請人：深圳瑞健生命科學研究院有限公司 (中國大陸) TALENGEN INSTITUTE OF LIFE SCIENCES, CO. LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：李季男 LI, JINAN (CN)

(74) 代理人：李貞儀；童啓哲

(56) 參考文獻：

Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis 2004, Vol.10, no.1, p. 8-10。

心腦血管病防治 2012 年 2 月第 12 卷第 1 期第 37-39 頁。

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：16 共 94 頁

(54) 名稱

纖溶酶原在製備藥劑上的用途及包括纖溶酶原之藥劑

(57) 摘要

本發明涉及纖溶酶原在治療和/或消除心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病方面的作用，進而為治療不同類型的心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症提供全新的治療策略。

指定代表圖：

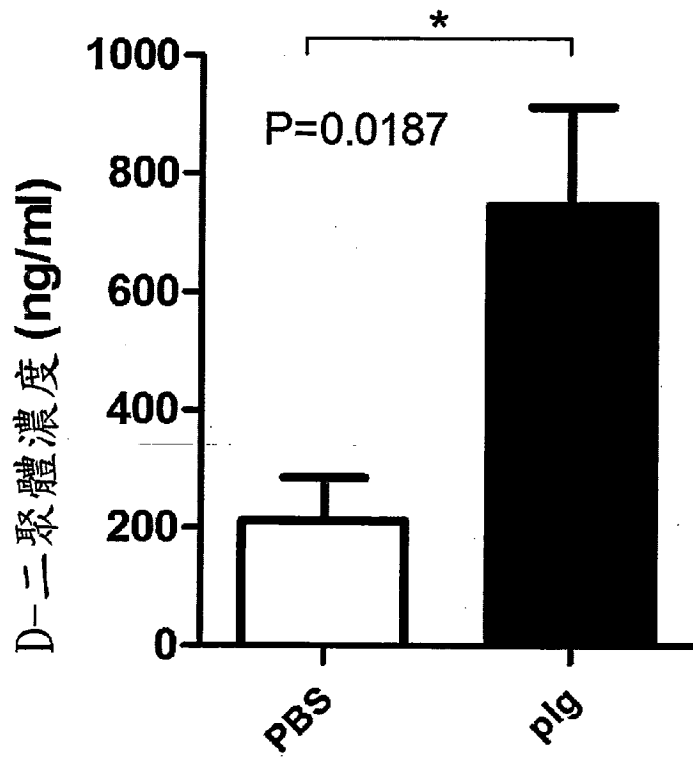


圖 6

然分泌和未裂解形式的纖溶酶原具有一個氨基末端(N-末端)谷氨酸，因此被稱為谷氨酸-纖溶酶原。然而，在纖溶酶存在時，谷氨酸-纖溶酶原在Lys76-Lys77處水解成為賴氨酸-纖溶酶原。與谷氨酸-纖溶酶原相比，賴氨酸-纖溶酶原與纖維蛋白具有更高的親和力，並可以更高的速率被PA啟動。這兩種形式的纖溶酶原的Arg560-Val561肽鍵可被uPA或tPA切割，導致二硫鍵連接的雙鏈蛋白酶纖溶酶的形成^[10]。纖溶酶原的氨基末端部分包含五個同源三環，即所謂的kringle，羧基末端部分包含蛋白酶結構域。一些kringle含有介導纖溶酶原與纖維蛋白及其抑制劑 α 2-AP特異性相互作用的賴氨酸結合位點。最新發現一個為38 kD的纖維蛋白溶酶原片段，其中包括kringle1-4，是血管生成的有效抑制劑。這個片段被命名為血管抑素，可藉由幾個蛋白酶水解纖溶酶原產生。

【0007】纖溶酶的主要底物是纖維蛋白，纖維蛋白的溶解是預防病理性血栓形成的關鍵^[11]。纖溶酶還具有對ECM幾個組分的底物特異性，包括層粘連蛋白、纖連蛋白、蛋白聚糖和明膠，表明纖溶酶在ECM重建中也起著重要作用^[7,12,13]。間接地，纖溶酶還可以藉由將某些蛋白酶前體轉化為活性蛋白酶來降解ECM的其他組分，包括MMP-1，MMP-2，MMP-3和MMP-9。因此，有人提出，纖溶酶可能是細胞外蛋白水解的一個重要的上游調節器^[14]。此外，纖溶酶具有啟動某些潛在形式的生長因數的能力^[15-17]。在體外，纖溶酶還能水解補體系統的組分並釋放趨化補體片段。

【0008】目前，治療糖尿病心血管併發症的方法主要有控制血糖、降低血脂、控制血壓等。

【0009】我們的研究驚奇地發現纖溶酶原對糖尿病造成的心臟、血管壁的損傷有明顯的修復作用，並能促進微血栓的溶解，修復糖尿病導致的內

臟器官，例如腎臟、肝臟、視網膜組織的損傷，恢復損傷神經的感應功能，為糖尿病併發症，例如糖尿病性心血管病開闢了一個全新的治療途徑。

【發明內容】

【0010】一方面，本發明涉及一種預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原或纖溶酶。一方面，本發明涉及纖溶酶原或纖溶酶用於預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的用途，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原或纖溶酶。

【0011】在一個實施例中，所述血管病變是糖尿病性血管病變，尤其是糖尿病性大血管病變、小血管病變和/或糖尿病性微血管病變。在一個實施例中，所述血管病變包括動脈粥樣硬化，包括主動脈及內臟器官的動脈粥樣硬化，尤其是糖尿病導致的動脈粥樣硬化，包括主動脈及內臟器官的動脈粥樣硬化。在一個實施例中，所述糖尿病性微血管病變包括微循環功能改變、血管壁損傷、微血栓形成和/或微血管閉塞。本發明還涉及一種預防和/或治療受試者心血管病，尤其是糖尿病性心血管病的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原或纖溶酶。在一個實施例中，所述心血管病包括糖尿病性心血管病、心臟肥大、心功能不全、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。在一個實施例中，所述糖尿病性心血管病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病變導致。

【0012】在上述實施例中，所述受試者為哺乳動物，較佳為人。

【0013】在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖溶酶原低

下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0014】在一個實施例中，本發明的心血管病包括但不限於糖尿病性心血管病、高脂血症、動脈粥樣硬化、高血壓、冠心病、心絞痛、心肌梗塞、冠狀動脈供血不足、胸悶、心悸不寧、心慌氣短、心律不齊、心力衰竭等。

【0015】在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原與序列2、6、8、10或12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1個胺基酸，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是包含纖維蛋白溶酶原活性片段、並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原選自Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、微纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維蛋白溶酶原或其任意組合。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是選自如下的保守取代變體：Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維蛋白溶酶原或微纖維蛋白溶酶原。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原為天然纖維蛋白溶酶原，例如序列2所示的纖維蛋白溶酶原的直向同系物，例如，來自靈長類動物或齧齒類動物的纖維蛋白溶酶原直向同系物，例如來自大猩猩、恒河猴、鼠、牛、馬、狗的纖維蛋白溶酶原直向同系物。最佳，本發明的纖維蛋白溶酶原的胺基酸序列如序列2、6、8、10或12所示。

【0016】在一個實施例中，所述纖維蛋白溶酶原藉由全身或局部給藥來進行治療，較佳藉由以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下、吸入給予纖維蛋白溶酶原。

【0017】在一個實施例中，所述纖溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在一個實施例中，所述纖溶酶原以每天0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg(以每公斤體重計算)或0.0001-2000mg/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(以每平方釐米體表面積計算)的劑量施用，較佳至少重複一次，較佳至少每天施用。在局部施用的情況下，上述劑量還可以根據情況進一步調整。

【0018】上述纖溶酶原可以單獨施用，也可以與其它藥物聯合使用，所述其它藥物包括但不限於：抗心血管病藥物、抗糖尿病藥物、抗血栓藥物、抗感染藥物、抗心律失常藥物、降血脂藥物等。

【0019】另一方面，本發明涉及纖溶酶原或纖溶酶在製備預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的藥物中的用途。一方面，本發明還涉及一種製藥方法，包括將纖溶酶原或纖溶酶與藥學可接受載體共同製備成預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的藥物。

【0020】在一個實施例中，所述血管病變是糖尿病性血管病變，尤其是糖尿病性大血管病變、小血管病變和/或糖尿病性微血管病變。在一個實施例中，所述血管病變包括動脈粥樣硬化，尤其是糖尿病導致的動脈粥樣硬化，包括主動脈及內臟器官的動脈粥樣硬化。在一個實施例中，所述糖尿病性微血管病變包括微循環功能改變、血管壁損傷、微血栓形成和/或微血管閉塞。

【0021】本發明還涉及纖溶酶原或纖溶酶在預防和/或治療受試者心血管

病，尤其是糖尿病性心血管病的藥物中的用途。在一個實施例中，所述心血管病包括糖尿病性心血管病、心臟肥大、心功能不全、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。在一個實施例中，所述糖尿病性心血管病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病變導致。

【0022】在上述技術方案中，所述受試者為哺乳動物，較佳為人。

【0023】在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖溶酶原低下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0024】在一個實施例中，上述心血管病包括但不限於：糖尿病性心血管病、高脂血症、動脈粥樣硬化、高血壓、冠心病、心絞痛、心肌梗塞、冠狀動脈供血不足胸悶、心悸不寧、心慌氣短、心律不齊、心力衰竭等。

【0025】在一個實施例中，所述纖溶酶原藉由全身或局部給藥，較佳藉由以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下、吸入給予纖溶酶原來進行治療。在一個實施例中，所述纖溶酶原藉由全身或局部給藥來進行治療，較佳藉由以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下、吸入給予纖溶酶原。

【0026】上述纖溶酶原可以單獨施用，也可以與其它藥物聯合使用，所述其它藥物包括但不限於：抗心血管病藥物、抗糖尿病藥物、抗血栓藥物、抗感染藥物、抗心律失常藥物、降血脂藥物等。

【0027】在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖溶酶原低下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0028】另一方面，本發明涉及預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的纖溶酶原或纖溶酶，以及預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的、包含纖溶酶原或纖溶酶的藥物組合物。在一個實施例中，所述血管病變，尤其是糖尿病性血管病變為糖尿病性大

血管病變、小血管病變和/或糖尿病性微血管病變。在一個實施例中，所述血管病變包括動脈粥樣硬化，尤其是糖尿病性動脈粥樣硬化，包括主動脈及內臟器官的動脈粥樣硬化。在一個實施例中，所述糖尿病性微血管病變包括微循環功能改變、血管壁損傷、微血栓形成和/或微血管閉塞。本發明還涉及預防和/或治療受試者心血管病的、尤其是糖尿病性心血管病的纖維溶酶原或纖維溶酶，以及預防和/或治療受試者心血管病的、尤其是糖尿病性心血管病的、包含纖維溶酶原或纖維溶酶的藥物組合物。在一個實施例中，所述心血管病包括糖尿病性心臟病，包括心臟肥大、心功能不全、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。在一個實施例中，所述糖尿病性心血管病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病變導致。

——【0029】在一個實施例中，上述心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病包括但不限於：高脂血症、動脈粥樣硬化、高血壓、冠心病、心絞痛、心肌梗塞、冠狀動脈供血不足胸悶、心悸不寧、心慌氣短、心律不齊、心力衰竭等。

【0030】在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原與序列2、6、8、10或12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1個胺基酸，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維溶酶原是包含纖維溶酶原活性片段、並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維溶酶原選自Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、微纖維蛋白溶酶原、 δ -

纖維溶酶原或其任意組合。在一個實施例中，纖維溶酶原是選自如下的保守取代變體：Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維溶酶原或微纖維蛋白溶酶原。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原為人天然纖維蛋白溶酶原，例如序列2所示的纖維溶酶原的直向同系物，例如，來自靈長類動物或齧齒類動物的纖維蛋白溶酶原直向同系物，例如來自大猩猩、恒河猴、鼠、牛、馬、狗的纖維蛋白溶酶原直向同系物。最佳，本發明的纖維蛋白溶酶原的胺基酸序列如序列2、6、8、10或12所示。

【0031】在一個實施例中，所述纖維溶酶原藉由全身或局部給藥，較佳藉由以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下、吸入給予纖維溶酶原來進行治療。

【0032】在一個實施例中，所述纖維溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在一個實施例中，所述纖維溶酶原以每天0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg(以每公斤體重計算)或0.0001-2000mg/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(以每平方釐米體表面積計算)的劑量施用，較佳至少重複一次，較佳至少每天施用。在局部施用的情況下，上述劑量還可以根據情況進一步調整。

【0033】在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖維溶酶原低下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0034】另一個方面，本發明涉及預防和/或治療受試者血管病變，尤其是糖尿病性血管病變的、包含纖維溶酶原或纖維溶酶的製品或藥盒。在一個實施例中，所述血管病變，尤其是糖尿病性血管病變為糖尿病性大血管病變、小血管病變和/或糖尿病性微血管病變。在一個實施例中，所述血管病

變包括動脈粥樣硬化，尤其是糖尿病導致的動脈粥樣硬化，包括主動脈及內臟器官的動脈粥樣硬化。在一個實施例中，所述糖尿病性微血管病變包括微循環功能改變，血管壁損傷，微血栓形成和/或微血管閉塞。本發明還涉及預防和/或治療受試者心血管病的、尤其是糖尿病性心血管病的、包含纖溶酶原或纖溶酶的製品或藥盒。在一個實施例中，所述心血管病包括糖尿病性心血管病、心臟肥大、心功能不全、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。在一個實施例中，所述糖尿病性心血管病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病變導致。在一個實施例中，所述製品或藥盒包含含有有效劑量的纖溶酶原/纖溶酶的容器。較佳，該製品或藥盒還包含含有一種或多種其它的藥物的容器。該製品或藥盒藥盒還可包含使用說明書，說明所述纖溶酶原可以用於治療所述血管病變，尤其是糖尿病性血管病變或糖尿病性心血管病，並且可以進一步說明，所述纖溶酶原可以在其它藥物施用之前，同時，和/或之後施用。在一個實施例中，所述其它藥物可以包括但不限於：抗心血管病藥物、抗糖尿病藥物、抗血栓藥物、抗感染藥物、抗心律失常藥物、降血脂藥物等。在一個實施例中，上述心血管病包括但不限於：糖尿病性心血管病、高脂血症、動脈粥樣硬化、高血壓、冠心病、心絞痛、心肌梗塞、冠狀動脈供血不足胸悶、心悸不寧、心慌氣短、心律不齊、心力衰竭。

【0035】 在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原與序列2、6、8、10或12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、

1-4、1-3、1-2、1個胺基酸，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維溶酶原是包含纖維溶酶原活性片段、並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維溶酶原選自Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、微纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維溶酶原或其任意組合。在一個實施例中，纖維溶酶原是選自如下的保守取代變體：Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維溶酶原或微纖維蛋白溶酶原。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原為人天然纖維蛋白溶酶原，例如序列2所示的纖維溶酶原的直向同系物，例如，來自靈長類動物或齧齒類動物的纖維蛋白溶酶原直向同系物，例如來自大猩猩，恒河猴、鼠、牛、馬，狗的纖維蛋白溶酶原直向同系物。最佳，本發明的纖維蛋白溶酶原的胺基酸序列如序列2、6、8、10或12所示。

【0036】 在一個實施例中，所述纖維溶酶原藉由全身或局部給藥，較佳藉由以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下、吸入給予纖維溶酶原來進行治療。

【0037】 在一個實施例中，所述纖維溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在一個實施例中，所述纖維溶酶原以每天0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg(以每公斤體重計算)或0.0001-2000mg/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(以每平方釐米體表面積計算)的劑量施用，較佳至少重複一次，較佳至少每天施用。在局部施用的情況下，上述劑量還可以根據情況進一步調整。

【0038】 在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖維溶酶原低下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0039】一方面，本發明涉及纖維溶酶原或纖維溶酶在製備預防和/或治療受試者的血管病變，尤其是血管病變導致的機體組織和內臟器官損傷(損害)的藥物、製品、藥盒中的用途。在一個實施例中，所述組織和內臟器官損傷(損害)包括對大腦、心臟、肝臟、肺臟、腎臟、神經、視網膜、皮膚、胃腸道的損傷(損害)。一方面，本發明涉及纖維溶酶原在製備預防和/或治療受試者的糖尿病併發症的藥物、製品、藥盒中的用途。在一個實施例中，所述糖尿病併發症為糖尿病引發的糖尿病性大腦病變、糖尿病性心臟病變、糖尿病性肝臟病變、糖尿病性腎臟病變、糖尿病性肺臟病變、糖尿病性神經病變，糖尿病性血管病變、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性皮膚病變。

【0040】一方面，本發明涉及一種製藥方法，包括將纖維溶酶原或纖維溶酶與藥學可接受的載體製備成用於預防和/或治療受試者的血管病變，尤其是血管病變導致的機體組織和內臟器官損傷(損害)的藥物、製品、藥盒。在一個實施例中，所述組織和內臟器官損傷(損害)包括對大腦、心臟、肝臟、肺臟、腎臟、神經、視網膜、皮膚、胃腸道的損傷(損害)。一方面，本發明涉及一種製藥方法，包括將纖維溶酶原或纖維溶酶與藥學可接受載體製備成預防和/或治療受試者的糖尿病併發症的藥物、製品或藥盒。在一個實施例中，所述糖尿病併發症為糖尿病引發的糖尿病性大腦病變、糖尿病性心臟病變、糖尿病性肝臟病變、糖尿病性腎臟病變、糖尿病性肺臟病變、糖尿病性神經病變，糖尿病性血管病變、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性皮膚病變。

【0041】一方面，本發明涉及用於預防和/或治療受試者的血管病變，尤其是血管病變導致的機體組織和內臟器官損傷(損害)的纖維溶酶原或纖維溶酶、包含纖維溶酶原或纖維溶酶的藥物組合物、製品、藥盒。在一個實施例中，所

述組織和內臟器官損傷(損害)包括對大腦、心臟、肝臟、腎臟、肺臟、神經、視網膜、胃腸道、皮膚的損傷(損害)。一方面，本發明涉及用於預防和/或治療受試者的糖尿病併發症的纖溶酶原、包含纖溶酶原的藥物組合物、製品或藥盒。在一個實施例中，所述糖尿病併發症為糖尿病引發的糖尿病性大腦病變、糖尿病性心臟病變、糖尿病性肝臟病變、糖尿病性肺臟病變、糖尿病性腎臟病變、糖尿病性神經病變，糖尿病性血管病變、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性皮膚病變。

● **【0042】** 一方面，本發明涉及一種預防和/或治療受試者的血管病變，尤其是血管病變導致的機體組織和內臟器官損傷(損害)的方法，包括給藥受試者纖溶酶原或纖溶酶、包含纖溶酶原或纖溶酶的藥物組合物、製品、藥盒。本發明還涉及纖溶酶原或纖溶酶、包含纖溶酶原或纖溶酶的藥物組合物、製品、藥盒用於預防和/或治療受試者的血管病變，尤其是血管病變導致的機體組織和內臟器官損傷(損害)的用途。在一個實施例中，所述組織和內臟器官損傷(損害)包括對大腦、心臟、肝臟、肺臟、腎臟、神經、視網膜、胃腸道、皮膚的損傷(損害)。一方面，本發明涉及一種預防和/或治療受試者的糖尿病併發症的方法，包括給藥受試者纖溶酶原或纖溶酶、包含纖溶酶原或纖溶酶的藥物組合物、製品或藥盒。本發明還包括纖溶酶原或纖溶酶、包含纖溶酶原或纖溶酶的藥物組合物、製品或藥盒用於預防和/或治療受試者的糖尿病併發症的用途。在一個實施例中，所述糖尿病併發症為糖尿病引發的糖尿病性大腦病變、糖尿病性心臟病變、糖尿病性肝臟病變、糖尿病性肺臟病變、糖尿病性腎臟病變、糖尿病性神經病變，糖尿病性血管病變、糖尿病性視網膜病變、糖尿病性皮膚病變。

● **【0043】** 在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖溶酶原低

下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0044】在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原與序列2、6、8、10、12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基礎上，添加、刪除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1個胺基酸，並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是包含纖維蛋白溶酶原活性片段、並且仍然具有纖維蛋白溶酶原活性的蛋白質。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原選自Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、微纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維蛋白溶酶原或其任意組合。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原是選自如下的保守取代變體：Glu-纖維蛋白溶酶原、Lys-纖維蛋白溶酶原、小纖維蛋白溶酶原、 δ -纖維蛋白溶酶原或微纖維蛋白溶酶原。在一個實施例中，纖維蛋白溶酶原為天然纖維蛋白溶酶原，例如序列2所示的纖維蛋白溶酶原的直向同系物，例如，來自靈長類動物或齧齒類動物的纖維蛋白溶酶原直向同系物，例如來自大猩猩，恒河猴、鼠、牛、馬，狗的纖維蛋白溶酶原直向同系物。最佳，本發明的纖維蛋白溶酶原的胺基酸序列如序列2、6、8、10或12所示。

【0045】在一個實施例中，所述纖維蛋白溶酶原藉由全身或局部給藥，較佳藉由以下途徑施用：表面、靜脈內、肌內、皮下、吸入、椎管內、局部注射、關節內注射或藉由直腸。在一個實施例中，所述局部給藥藉由在血栓區域應用含有纖維蛋白溶酶原的敷料和/或導管來進行。

【0046】在一個實施例中，所述纖維蛋白溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在一個實施例中，所述纖維蛋白溶酶原以每天0.0001-2000 mg/kg、0.001-

800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg(以每公斤體重計算)或0.0001-2000mg/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(以每平方釐米體表面積計算)的劑量施用，較佳至少重複一次，較佳至少每天施用。在局部施用的情況下，上述劑量還可以根據情況進一步調整。

【0047】上述纖維蛋白溶酶原可以單獨施用，也可以與其它藥物聯合使用，所述其它藥物，例如，心血管疾病治療藥物，心律失常治療藥物，糖尿病治療藥物等，以治療與病理性血栓發生相伴的其它疾病。

【0048】在一個實施例中，所述受試者纖維蛋白溶酶或者纖溶酶原低下。具體地，所述低下是先天的、繼發的和/或局部的。

【0049】本發明明確涵蓋了屬於本發明實施例之間的技術特徵的所有組合，並且這些組合後的技術方案在本申請中已經明確公開，就像上述技術方案已經單獨且明確公開一樣。另外，本發明還明確涵蓋各個實施例及其要素的所有亞組合，並且在本文中公開，就像每一個此類亞組合單獨且明確在本文中公開一樣。

發明詳述

【0050】「心血管病」是指心血管系統的組織學和功能變化的病變，常以大血管及微血管病變引起的心臟改變為其主要表現。臨床可見心電圖異常、心臟擴大、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。

【0051】「糖尿病」是由遺傳因素、免疫功能紊亂、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各種致病因數作用於機體導致胰島功能減

退、胰島素抵抗等而引發的糖、蛋白質、脂肪、水和電解質等一系列代謝紊亂症候群，臨床上以高血糖為主要特點。

【0052】「糖尿病併發症」是由糖尿病過程中血糖控制不良導致的身體其他器官或組織的損害或功能障礙，其中包括肝臟、腎臟、心臟、視網膜、神經系統的損害或功能障礙等。據世界衛生組織統計，糖尿病併發症高達100多種，是目前已知併發症最多的一種疾病。而這些糖尿病的併發症主要是由於患者各器官的大血管、小血管、微血管受損所致。

【0053】「糖尿病性血管病變」主要指糖尿病引發的主動脈及各內臟器官的動脈，包括大腦、肺臟、心臟、肝臟、脾臟、腎臟的大、小動脈的動脈粥樣硬化、以及相應引起的器官、組織病變。其發病機理包括以下方面：1)持續性高血糖使血液粘滯度和凝固性升高，進而引起動脈血管彈性減弱乃至喪失；2)脂類代謝異常，其促使膽固醇和膽固醇脂在細胞內堆積，導致動脈粥樣硬化發生與發展；3)動脈壁內皮細胞損傷，血流動力學改變使血液機械性地長期衝擊血管內皮，引起內皮損傷，進而導致血小板、纖維蛋白等在損傷部位粘附聚集形成血栓，並可進一步導致炎症；4)參與凝血機制的糖蛋白因數增多，促進血小板和纖維蛋白聚集粘附於損傷的內皮下層而溶解能力下降，進而形成血栓。因此，本發明權利要求技術方案中提到「糖尿病性血管病變」術語時，都涵蓋了糖尿病引發的動脈粥樣硬化和血栓、以及相應引起的器官、組織病變。

【0054】「糖尿病性微血管病變」指糖尿病患者機體各器官或組織微循環不同程度的異常導致的微血管病變。微血管病變形成的過程大致為：微循環功能改變；血管壁損傷，例如內皮損傷，基膜增厚；血粘度增高，紅細胞聚集，血小板粘附和聚集，最後導致微血栓形成和/或微血管閉塞。

【0055】上述的兩種「糖尿病性血管病變」導致組織或器官局部血管損傷、血流不暢、細胞缺氧、形成血凝塊、血栓和炎症，並進一步影響周邊的組織及器官功能，進而導致糖尿病併發症。

【0056】「糖尿病性心血管病」指由糖尿病引起的心血管系統的組織學和功能變化的病變，其為最常見的糖尿病併發症之一，主要由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病變導致。其中，患者臨床可表現為心電圖異常、心臟擴大、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。據統計，大約70%-80%的糖尿病患者最後死于心血管併發症。糖尿病患者中動脈粥樣硬化、高血壓、急性心肌梗塞、慢性心力衰竭和猝死的發生率明顯升高。目前，糖尿病已是心血管病發生的高危因素和預測指標，且糖尿病合併心血管病的病人短期或長期預後均明顯差於無糖尿病的病人。

【0057】「纖維溶酶」是存在於血液中的一種非常重要的酶，能將纖維蛋白凝塊水解為纖維蛋白降解產物和D-二聚體。

【0058】「纖維溶酶原」是纖維溶酶的酶原形式，根據swiss prot中的序列，按含有信號肽的天然人源纖維溶酶原胺基酸序列(序列4)計算由810個胺基酸組成，分子量約為92 kD，主要在肝臟中合成並能夠在血液中迴圈的糖蛋白，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全長的纖維溶酶原包含七個結構域：位於C末端的絲氨酸蛋白酶結構域、N末端的Pan Apple(PAp)結構域以及5個Kringle結構域(Kringle1-5)。參照swiss prot中的序列，其信號肽包括殘基Met1-Gly19，PAp包括殘基Glu20-Val98，Kringle1包括殘基Cys103-Cys181，Kringle2包括殘基Glu184-Cys262，Kringle3包括殘基Cys275-Cys352，Kringle4包括殘基Cys377-Cys454，Kringle5包括殘基Cys481-Cys560。根據NCBI資料，絲氨酸蛋白酶域包括殘基Val581-Arg804。

【0059】Glu-纖維溶酶原是天然全長的纖維溶酶原，由791個胺基酸組成(不含有19個胺基酸的信號肽)，編碼該序列的cDNA序列如序列1所示，其胺基酸序列如序列2所示。在體內，還存在一種是從Glu-纖維溶酶原的第76-77位胺基酸處水解從而形成的Lys-纖維溶酶原，如序列6所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列5所示。 δ -纖維溶酶原(δ -plasminogen)是全長纖維溶酶原缺失了Kringle2-Kringle5結構的片段，僅含有Kringle1和絲氨酸蛋白酶域^[18,19]，有文獻報導了 δ -纖維溶酶原的胺基酸序列(序列8)^[19]，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列7。小纖維溶酶原(Mini-plasminogen)由Kringle5和絲氨酸蛋白酶域組成，有文獻報導其包括殘基Val443-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸)^[20]，其胺基酸序列如序列10所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列9所示。而微纖維溶酶原(Micro-plasminogen)僅含有絲氨酸蛋白酶結構域，有文獻報導其胺基酸序列包括殘基Ala543-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸)^[21]，也有專利文獻CN102154253A報導其序列包括殘基Lys531-Asn791(以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始胺基酸)，本專利序列參考專利文獻CN102154253A，其胺基酸序列如序列12所示，編碼該胺基酸序列的cDNA序列如序列11所示。

【0060】「血栓」是凝血過程中形成的產物。凝血過程是機體保持封閉高壓循環系統完整性的防禦機制。在正常情況下，該過程應保持非活化狀態，但當組織受到損傷時，需要立即啟動該機制以減少血液外滲。當血管受損時，在凝血酶的作用下溶於血漿中的纖維蛋白原(fibrinogen)將最終轉變為不溶于水的纖維蛋白(fibrin)多聚體，並彼此交織成網，將血細胞網羅在內，形成血凝塊，完成凝血過程。在該過程中，血凝塊與傷處的大小比

例至關重要。因此初始血凝塊形成的分子(纖維蛋白，凝血酶)和溶解血凝塊的分子(纖溶酶、纖溶酶原啓動劑等)間應存在平衡。但在病理過程中，該平衡的破壞將導致過量的血凝塊形成分子，進而形成血栓(thrombus)，該血栓為「病理性血栓」。

【0061】在人體中，血栓可在具有血流的任何位置發生，目前主要將其分為兩大類：靜脈血栓和動脈血栓。靜脈血栓由在靜脈中產生的血凝塊導致。最常見的靜脈血栓類型為：深靜脈血栓(DVT)，其通常影響肢體靜脈如股靜脈，導致受影響部位的疼痛和紅腫；門靜脈血栓，其可影響肝門靜脈，進而導致胰腺炎、肝硬化、憩室炎或膽管癌；腎靜脈血栓，導致腎栓塞；頸內靜脈血栓，其可引起全身性敗血症、肺栓塞等多種併發症；腦靜脈血栓，導致患者呈現頭痛、視覺異常中風等症狀。動脈血栓則可能導致在體內幾乎任何器官的梗塞，其引發的病症包括但不限於：腦梗塞、心肌梗塞、血栓性中風、動脈粥樣硬化疾病、不穩定性心絞痛、頑固性心絞痛、短暫性腦缺血發作、肺栓塞等。

【0062】在糖尿病情況下，動脈壁內皮細胞損傷，血流動力學改變使血液機械性地長期衝擊血管內皮，引起內皮損傷，進而導致血小板、纖維蛋白等在損傷部位粘附聚集形成血栓。本發明實驗發現，纖溶酶原能夠使糖尿病小鼠血清中的D-二聚體明顯升高，心臟、肝臟、腎臟、神經組織局部的纖維蛋白相對於對照組明顯減少，說明纖溶酶原能夠促進糖尿病小鼠微血栓的溶解。本發明涵蓋纖溶酶原對糖尿病微血栓的治療。

【0063】本發明的「纖溶酶」與「纖維蛋白溶酶」、「纖維蛋白溶解酶」可互換使用，含義相同；「纖溶酶原」與「纖維蛋白溶酶原」、「纖維蛋白溶解酶原」可互換使用，含義相同。

【0064】本領域技術人員可以理解，本發明纖溶酶原的所有技術方案適用於纖溶酶，因此，本發明描述的技術方案涵蓋了纖溶酶原和纖溶酶。

【0065】本發明所述的血栓包括新鮮血栓和陳舊血栓。本發明的「新鮮血栓」和「急性血栓」可以互換使用；「陳舊血栓」和「慢性血栓」可以互換使用。

【0066】在迴圈過程中，纖溶酶原採用封閉的非活性構象，但當結合至血栓或細胞表面時，在纖溶酶原啟動劑(plasminogen activator, PA)的介導下，其轉變為呈開放性構象的活性纖溶酶。具有活性的纖溶酶可進一步將纖維蛋白凝塊水解為纖維蛋白降解產物和D-二聚體，進而溶解血栓。其中纖溶酶原的PAp結構域包含維持纖溶酶原處於非活性封閉構象的重要決定簇，而KR結構域則能夠與存在於受體和底物上的賴氨酸殘基結合。已知多種能夠作為纖溶酶原啟動劑的酶，包括：組織纖溶酶原啟動劑(tPA)、尿激酶纖溶酶原啟動劑(uPA)、激肽釋放酶和凝血因數XII(哈格曼因數)等。

【0067】「纖溶酶原活性片段」是指在纖溶酶原蛋白中，能夠與底物中的靶序列結合並發揮蛋白水解功能的活性片段。本發明涉及纖溶酶原的技術方案涵蓋了用纖溶酶原活性片段代替纖溶酶原的技術方案。本發明所述的纖溶酶原活性片段為包含纖溶酶原的絲氨酸蛋白酶域的蛋白質，較佳，本發明所述的纖溶酶原活性片段包含序列14、與序列14具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的胺基酸序列的蛋白質。因此，本發明所述的纖溶酶原包括含有該纖溶酶原活性片段、並且仍然保持該纖溶酶原活性的蛋白。

【0068】目前，對於血液中纖維蛋白溶酶原及其活性測定方法包括：對組織纖維蛋白溶酶原啟動劑活性的檢測(t-PAA)、血漿組織纖維蛋白溶酶原

啓動劑抗原的檢測(t-PAAg)、對血漿組織纖維溶酶原活性的檢測(plgA)、血漿組織纖維溶酶原抗原的檢測(plgAg)、血漿組織纖維蛋白溶酶原啓動劑抑制物活性的檢測、血漿組織纖維蛋白溶酶原啓動劑抑制物抗原的檢測、血漿纖維蛋白溶酶-抗纖維蛋白溶酶複合物檢測(PAP)。其中最常用的檢測方法爲發色底物法：向受檢血漿中加鏈激酶(SK)和發色底物，受檢血漿中的PLG在SK的作用下，轉變成PLM，後者作用於發色底物，隨後用分光光度計測定，吸光度增加與纖維蛋白溶酶原活性成正比。此外也可採用免疫化學法、凝膠電泳、免疫比濁法、放射免疫擴散法等對血液中的纖維蛋白溶酶原活性進行測定。

【0069】「直系同源物或直系同系物(ortholog)」指不同物種之間的同源物，既包括蛋白同源物也包括DNA同源物，也稱爲直向同源物、垂直同源物。其具體指不同物種中由同一祖先基因進化而來的蛋白或基因。本發明的纖維溶酶原包括人的天然纖維溶酶原，還包括來源於不同物種的、具有纖維溶酶原活性的纖維溶酶原直系同源物或直系同系物。

【0070】「保守取代變體」是指其中一個給定的胺基酸殘基改變但不改變蛋白質或酶的整體構象和功能，這包括但不限於以相似特性(如酸性，鹼性，疏水性，等)的胺基酸取代親本蛋白質中胺基酸序列中的胺基酸。具有類似性質的胺基酸是眾所周知的。例如，精氨酸、組氨酸和賴氨酸是親水性的鹼性胺基酸並可以互換。同樣，異亮氨酸是疏水胺基酸，則可被亮氨酸，蛋氨酸或纈氨酸替換。因此，相似功能的兩個蛋白或胺基酸序列的相似性可能會不同。例如，基於MEGALIGN演算法的70%至99%的相似度(同一性)。「保守取代變體」還包括藉由BLAST或FASTA演算法確定具有60%以上的胺基酸同一性的多肽或酶，若能達75%以上更好，最好能達85%以

上，甚至達90%以上為最佳，並且與天然或親本蛋白質或酶相比具有相同或基本相似的性質或功能。

【0071】「分離的」纖維溶酶原是指從其天然環境分離和/或回收的纖維溶酶原蛋白。在一些實施例中，所述纖維溶酶原會純化(1)至大於90%、大於95%、或大於98%的純度(按重量計)，如藉由Lowry法所確定的，例如超過99% (按重量計)，(2)至足以藉由使用旋轉杯序列分析儀獲得N端或內部胺基酸序列的至少15個殘基的程度，或(3)至同質性，該同質性是藉由使用考馬斯藍或銀染在還原性或非還原性條件下的十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)確定的。分離的纖維溶酶原也包括藉由生物工程技術從重組細胞製備，並藉由至少一個純化步驟分離的纖維溶酶原。

【0072】術語「多肽」、「肽」和「蛋白質」在本文中可互換使用，指任何長度的胺基酸的聚合形式，其可以包括遺傳編碼的和非遺傳編碼的胺基酸，化學或生物化學修飾的或衍生化的胺基酸，和具有經修飾的肽主鏈的多肽。該術語包括融合蛋白，包括但不限於具有異源胺基酸序列的融合蛋白，具有異源和同源前導序列(具有或沒有N端甲硫氨酸殘基)的融合物；等等。

【0073】關於參照多肽序列的「胺基酸序列同一性百分數(%)」定義為在必要時引入缺口以實現最大百分比序列同一性後，且不將任何保守替代視為序列同一性的一部分時，候選序列中與參照多肽序列中的胺基酸殘基相同的胺基酸殘基的百分率。為測定百分比胺基酸序列同一性目的的對比可以以本領域技術範圍內的多種方式實現，例如使用公眾可得到的電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。本領域技術人員能決定用於比對序列的適宜參數，包括對所比較序列全長實現最

大對比需要的任何演算法。然而，爲了本發明的目的，胺基酸序列同一性百分數值是使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生的。

【0074】在採用ALIGN-2來比較胺基酸序列的情況中，給定胺基酸序列A相對於給定胺基酸序列B的%胺基酸序列同一性(或者可表述爲具有或包含相對於、與、或針對給定胺基酸序列B的某一%胺基酸序列同一性的給定胺基酸序列A)如下計算：

$$\text{分數 } X/Y \text{ 乘 } 100$$

【0075】其中X是由序列比對程式ALIGN-2在該程式的A和B比對中評分爲相同匹配的胺基酸殘基的數目，且其中Y是B中的胺基酸殘基的總數。應當領會，在胺基酸序列A的長度與胺基酸序列B的長度不相等的情况下，A相對於B的%胺基酸序列同一性會不等於B相對於A的%胺基酸序列同一性。除非另有明確說明，本文中使用的所有%胺基酸序列同一性值都是依照上一段所述，使用ALIGN-2電腦程式獲得的。

【0076】如本文中使用的，術語「治療」和「處理」指獲得期望的藥理和/或生理效果。所述效果可以是完全或部分預防疾病或其症狀，和/或部分或完全治癒疾病和/或其症狀，並且包括：(a)預防疾病在受試者體內發生，所述受試者可以具有疾病的素因，但是尙未診斷爲具有疾病；(b)抑制疾病，即阻滯其形成；和(c)減輕疾病和/或其症狀，即引起疾病和/或其症狀消退。

【0077】術語「個體」、「受試者」和「患者」在本文中可互換使用，指哺乳動物，包括但不限於鼠(大鼠、小鼠)、非人靈長類、人、犬、貓、有蹄動物(例如馬、牛、綿羊、豬、山羊)等。

【0078】「治療有效量」或「有效量」指在對哺乳動物或其它受試者施

用以治療疾病時足以實現對疾病的所述預防和/或治療的纖維溶酶原的量。

「治療有效量」會根據所使用的纖維溶酶原、要治療的受試者的疾病和/或其症狀的嚴重程度以及年齡、體重等而變化。

本發明纖維溶酶原的製備

【0079】纖維溶酶原可以從自然界分離並純化用於進一步的治療用途，也可以藉由標準的化學肽合成技術來合成。當藉由化學合成多肽時，可以經液相或固相進行合成。固相多肽合成(SPPS) (其中將序列的C末端胺基酸附接於不溶性支援物，接著序貫添加序列中剩餘的胺基酸)是適合纖維溶酶原化學合成的方法。各種形式的SPPS，諸如Fmoc和Boc可用于合成纖維溶酶原。用於固相合成的技術描述於Barany和Solid-Phase Peptide Synthesis; 第3-284頁於The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 第2卷：Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield,等 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart等, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984);和Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10和Camarero JA等 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8中。簡言之，用其上構建有肽鏈的功能性單元處理小的不溶性多孔珠。在偶聯/去保護的重複迴圈後，將附接的固相游離N末端胺與單個受N保護的胺基酸單元偶聯。然後，將此單元去保護，露出可以與別的胺基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上，之後將其切掉。

【0080】可以使用標準重組方法來生產本發明的纖維溶酶原。例如，將編碼纖維溶酶原的核酸插入表達載體中，使其與表達載體中的調控序列可操作連接。表達調控序列包括但不限於啟動子(例如天然關聯的或異源的啟動

子)、信號序列、增強子元件、和轉錄終止序列。表達調控可以是載體中的真核啓動子系統，所述載體能夠轉化或轉染真核宿主細胞(例如COS或CHO細胞)。一旦將載體摻入合適的宿主中，在適合於核苷酸序列的高水準表達及纖維溶酶原的收集和純化的條件下維持宿主。

【0081】合適的表達載體通常在宿主生物體中作為附加體或作為宿主染色體DNA的整合部分複製。通常，表達載體含有選擇標誌物(例如氨苄青黴素抗性、潮黴素抗性、四環素抗性、卡那黴素抗性 or 新黴素抗性)以有助於對外源用期望的DNA序列轉化的那些細胞進行檢測。

【0082】大腸桿菌(*Escherichia coli*)是可以用於複製標的抗體編碼多核苷酸的原核宿主細胞的例子。適合於使用的其它微生物宿主包括桿菌，諸如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)和其它腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，諸如沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*)、和各種假單胞菌屬(*Pseudomonas*)物種。在這些原核宿主中，也可以生成表達載體，其通常會含有與宿主細胞相容的表達控制序列(例如複製起點)。另外，會存在許多公知的啓動子，諸如乳糖啓動子系統，色氨酸(*trp*)啓動子系統， β -內醯胺酶啓動子系統，或來自噬菌體 λ 的啓動子系統。啓動子通常會控制表達，任選在操縱基因序列的情況中，並且具有核糖體結合位點序列等，以啓動並完成轉錄和翻譯。

【0083】其他微生物，諸如酵母也可用於表達。酵母(例如釀酒酵母(*S. cerevisiae*))和畢赤酵母(*Pichia*)是合適的酵母宿主細胞的例子，其中合適的載體根據需要具有表達控制序列(例如啓動子)、複製起點、終止序列等。典型的啓動子包含3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分解酶。誘導型酵母啓動於特別包括來自醇脫氫酶、異細胞色素C、和負責麥芽糖和半乳糖利用的酶的啓

動子。

【0084】在微生物外，哺乳動物細胞(例如在體外細胞培養物中培養的哺乳動物細胞)也可以用於表達並生成本發明的纖溶酶原(例如編碼標的抗-Tau 抗體的多核苷酸)。參見Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合適的哺乳動物宿主細胞包括CHO細胞系、各種Cos細胞系、HeLa細胞、骨髓瘤細胞系，和經轉化的B細胞或雜交瘤。用於這些細胞的表達載體可以包含表達控制序列，如複製起點、啓動子和增強子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986))，以及必需的加工資訊位元點，諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、多聚腺苷酸化位點，和轉錄終止子序列。合適的表達控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳頭瘤病毒、巨細胞病毒等衍生的啓動子。參見Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

【0085】一旦合成(化學或重組方式)，可以依照本領域的標準規程，包括硫酸銨沉澱、親和柱、柱層析、高效液相層析(HPLC)、凝膠電泳等來純化本發明所述的纖溶酶原。該纖溶酶原是基本上純的，例如至少約80%至85%純的，至少約85%至90%純的，至少約90%至95%純的，或98%至99%純的或更純的，例如不含污染物，所述污染物如細胞碎片，除標的抗體以外的大分子，等等。

藥物配製劑

【0086】可以藉由將具有所需純度的纖溶酶原與可選的藥用載體，賦形劑，或穩定劑(Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16版，Osol, A. ed.(1980))混合形成凍乾製劑或水溶液製備治療配製劑。可接受的載體、賦

形劑、穩定劑在所用劑量及濃度下對受者無毒性，並包括緩衝劑例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其它有機酸；抗氧化劑包括抗壞血酸和蛋氨酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化己烷雙胺；氯化苄烷銨(benzalkonium chloride)、苯索氯銨；酚、丁醇或苯甲醇；烷基對羥基苯甲酸酯如甲基或丙基對羥基苯甲酸酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；間甲酚)；低分子量多肽(少於約10個殘基)；蛋白質如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸如甘氨酸、穀氨醯胺、天冬醯胺、組氨酸、精氨酸或賴氨酸；單糖，二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合劑如EDTA；糖類如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇；成鹽反離子如鈉；金屬複合物(例如鋅-蛋白複合物)；和/或非離子表面活性劑，例如 TWEENTM，PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。較佳凍乾的抗-VEGF抗體配製劑在WO 97/04801中描述，其包含在本文中作為參考。

【0087】 本發明的配製劑也可含有需治療的具體病症所需的一種以上的活性化合物，較佳活性互補並且相互之間沒有副作用的那些。例如，抗高血壓的藥物、抗心律失常的藥物、治療糖尿病的藥物等。

【0088】 本發明的纖維溶酶原可包裹在藉由諸如凝聚技術或介面聚合而製備的微膠囊中，例如，可置入在膠質藥物傳送系統(例如，脂質體，白蛋白微球，微乳劑，奈米顆粒和奈米膠囊)中或置入粗滴乳狀液中的羥甲基纖維素或凝膠-微膠囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊中。這些技術公開於 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

【0089】 用於體內給藥的本發明的纖維溶酶原必需是無菌的。這可以藉由在冷凍乾燥和重新配製之前或之後藉由除菌濾膜過濾而輕易實現。

【0090】 本發明的纖維溶酶原可製備緩釋製劑。緩釋製劑的適當實例包括

具有一定形狀且含有糖蛋白的固體疏水聚合物半通透基質，例如膜或微膠囊。緩釋基質實例包括聚酯、水凝膠(如聚(2-羥基乙基-異丁烯酸酯)(Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277(1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇)、聚交酯(美國專利3773919, EP 58,481), L-谷氨酸與 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, Biopolymers 22:547(1983)), 不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 等, 出處同上), 或可降解的乳酸-羥基乙酸共聚物如Lupron Depot™(由乳酸-羥基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯組成的可注射的微球體), 以及聚D-(-)-3-羥丁酸。聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羥基乙酸能持續釋放分子100天以上, 而一些水凝膠釋放蛋白的時間卻較短。可以根據相關機理來設計使蛋白穩定的合理策略。例如, 如果發現凝聚的機理是藉由硫代三硫鍵互換而形成分子間S-S鍵, 則可藉由修飾巰基殘基、從酸性溶液中凍乾、控制濕度、採用合適的添加劑、和開發特定的聚合物基質組合物來實現穩定。

給藥和劑量

【0091】可以藉由不同方式, 例如藉由靜脈內、腹膜內、皮下、顱內、鞘內、動脈內(例如經由頸動脈)、肌內、鼻內、表面或皮內施用或脊髓或腦投遞來實現本發明藥物組合物的施用。氣溶膠製劑如鼻噴霧製劑包含活性劑的純化的水性或其它溶液及防腐劑和等滲劑。將此類製劑調節至與鼻粘膜相容的pH和等滲狀態。

【0092】用於胃腸外施用的製備物包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液和乳劑。非水性溶劑的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄欖油, 和可注射有機酯, 如油酸乙酯。水性載體包括水、醇性/水性溶液、乳劑或懸浮

液，包括鹽水和緩衝介質。胃腸外媒介物包含氯化鈉溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化鈉、或固定油。靜脈內媒介物包含液體和營養補充物、電解質補充物，等等。也可以存在防腐劑和其他添加劑，諸如例如，抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑、和惰性氣體，等等。

【0093】醫務人員會基於各種臨床因素確定劑量方案。如醫學領域中公知的，任一患者的劑量取決於多種因素，包括患者的體型、體表面積、年齡、要施用的具體化合物、性別、施用次數和路徑、總體健康和同時施用的其它藥物。本發明包含纖溶酶原的藥物組合物的劑量範圍可以例如為例如每天約0.0001至2000 mg/kg，或約0.001至500 mg/kg (例如0.02 mg/kg，0.25 mg/kg，0.5 mg/kg，0.75 mg/kg，10 mg/kg，50 mg/kg等等)受試者體重。例如，劑量可以是1 mg/kg體重或50 mg/kg體重或在1-50 mg/kg的範圍，或至少1 mg/kg。高於或低於此例示性範圍的劑量也涵蓋在內，特別是考慮到上述的因素。上述範圍中的中間劑量也包含在本發明的範圍內。受試者可以每天、隔天、每週或根據藉由經驗分析確定的任何其它日程表施用此類劑量。例示性的劑量日程表包括連續幾天1-10 mg/kg。在本發明的藥物施用過程中需要即時評估、定期評估糖尿病心血管病及其相關病症的治療效果和安全性。

治療效力和治療安全性

【0094】本發明的一個實施例涉及使用纖溶酶原治療受試者後，對治療效力和治療安全性的判斷。其中對所述治療效力的判斷方法包括但不限於對受試者的血壓、心電圖、血常規、尿常規、血脂、血糖、血流動力學進行測定。具體地，包括對受試者實施下列檢查：1)心血管超聲，以全面的診斷、檢測心臟各房室大小、室壁運動、血流速度和心臟功能方面；2)心

肌標誌物檢測，如C反應蛋白(CRP)、肌紅蛋白(Mb)、肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB)、B 型尿鈉肽(BNP)、等濃度進行檢測，這些標誌物為急性心肌梗塞的重要診斷標誌，預期受試者在接受本發明的纖溶酶原治療後上述檢測恢復至正常值範圍或得到改善，如Mb在男性受試者中恢復至 $19\sim 92\mu\text{g}/\text{L}$ ，女性為 $12\sim 76\mu\text{g}/\text{L}$ ；3)動態心電圖監測。此外，本發明還涉及使用纖溶酶原對受試者進行治療過程中和治療後，對所述該治療方案安全性的判斷，監測各種不良事件。

製品或藥盒

【0095】本發明的一個實施例涉及一種製品或藥盒，其包含可用於治療心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症的本發明纖溶酶原或纖溶酶。所述製品較佳包括一個容器，標籤或包裝插頁。適當的容器有瓶子，小瓶，注射器等。容器可由各種材料如玻璃或塑膠製成。所述容器含有組合物，所述組合物可有效治療本發明的疾病或病症並具有無菌入口(例如所述容器可為靜脈內溶液包或小瓶，其含有可被皮下注射針穿透的塞子的)。所述組合物中至少一種活性劑為纖溶酶原/纖溶酶。所述容器上或所附的標籤說明所述組合物用於治療本發明所述心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症。所述製品可進一步包含含有可藥用緩衝液的第二容器，諸如磷酸鹽緩衝的鹽水，林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可進一步包含從商業和使用者的角度來看所需的其它物質，包括其它緩衝液，稀釋劑，過濾物，針和注射器。此外，所述製品包含帶有使用說明的包裝插頁，包括例如指示所述組合物的使用者將纖溶酶原組合物以及治療伴隨的疾病的其它藥物給藥患者。

【圖式簡單說明】

【0096】圖1 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後體重變化。給纖溶酶原組和給溶媒PBS對照組在第0、4、7、11、16、21、26、31天體重無顯著差異。

【0097】圖2 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後心臟HE染色結果。

【0098】圖3 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後心臟纖維蛋白原染色結果。

【0099】圖4 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後主動脈弓HE染色結果。

【0100】圖5 顯示24-25周小鼠給予PBS或纖溶酶原31天血清心肌肌鈣蛋白濃度測定結果。

【0101】圖6 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續15天給藥纖溶酶原後血清中D-二聚體的含量檢測結果。

【0102】圖7 顯示24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後視網膜PAS染色觀察結果。

【0103】圖8 24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後腎臟纖維蛋白免疫染色觀察結果。

【0104】圖9 24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後腎臟Bcl2免疫染色觀察結果。

【0105】圖10 24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後肝臟纖維蛋白免疫染色觀察結果。

【0106】圖11 24-25周齡的db/db小鼠在連續31天給藥纖溶酶原後肝F4/80免疫染色觀察結果。

【0107】圖12 顯示24-25周齡的db/db 小鼠在給藥纖溶酶原後第0、4、7、11、16天檢測機械觸誘發痛感應能力的結果。在第16天檢測時發現纖溶酶原組50%痛覺閾值與給溶媒PBS對照組相比出現了極顯著差異。

【0108】圖13 顯示24-25周齡的db/db 小鼠在給藥纖溶酶原後第0、4、7、11、16天檢測冷刺激感應能力的結果。

【0109】圖14 24-25周神經損傷小鼠纖溶酶原15天后坐骨神經纖維蛋白免疫組化染色觀察結果。

【0110】圖15 24-25周小鼠給予纖溶酶原31天腎臟IgM免疫染色觀察結果。

【0111】圖16 24-25周小鼠給予纖溶酶原31天后血清谷丙轉氨酶(ALT)檢測結果。

【實施方式】

實施例 1 纖溶酶原對小鼠體重的影響

【0112】24-25周齡db/db雄鼠20隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖溶酶原組各10隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第0，4，7，11，16，21，26，31天分別稱體重。

【0113】結果顯示，給纖溶酶原組和給溶媒PBS對照組在第0、4、7、11、16、21、26、31天體重無顯著差異(圖1)。說明纖溶酶原對動物體重影響不大，給藥處理對動物體重沒有顯著的影響。

實施例 2 纖溶酶原對小鼠心肌的損傷修復作用

【0114】24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和

給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取心臟在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的心臟經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水並用蘇木素和伊紅染色(HE染色)，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，並酒精梯度脫水封片，切片在顯微鏡下400倍下觀察。

【0115】結果顯示，給溶媒PBS對照組心肌細胞肥大，偶可見長梭形肥大的細胞核，輕度脂肪變性，呈空泡狀，在血管邊緣或是肌細胞間隙可見輕度炎細胞浸潤，肌纖維間隙增寬(圖2A)；給纖維溶酶原組心肌細胞圓形或梭形，肥大的細胞較對照組少，肌纖維間隙較對照組緻密，炎細胞浸潤及脂肪變性與給溶媒PBS對照組比均明顯減輕(圖2B)。說明注射纖維溶酶原使小鼠心肌的損傷得到顯著修復。

實施例3 纖維溶酶原促進小鼠心臟纖維蛋白水解

【0116】24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取心臟在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的心臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次，以3%雙氧水培養15分鐘，水洗2次，每次5分鐘。10%的正常羊血清液(Vector Laboratories, Inc., USA)封閉1小時；之後棄除羊血清液，用PAP筆圈出組織。兔抗小鼠纖維蛋白(原)抗體

(Abcam)4°C培養過夜，TBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體 (Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒 (Vector laboratories,Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下400倍下觀察。

【0117】纖維蛋白原是纖維蛋白的前體，在組織存在損傷的情況下，作為機體對損傷的一種應激反應，纖維蛋白原水解成纖維蛋白^[22-24]，因此可將纖維蛋白水準作為損傷程度的一個標誌。纖維蛋白也是組織損傷後形成血栓的主要成分，因此，也可將纖維蛋白水準作為血栓的一個標誌。

【0118】結果顯示，與給溶媒PBS對照組(圖3A)相比，給纖維溶酶原組(圖3B)的小鼠心臟組織纖維蛋白陽性著色較淺，說明給纖維溶酶原組心臟組織沉積的纖維蛋白減少，反映纖維溶酶原能夠促進心臟組織損傷修復，也說明纖維溶酶原能夠促進心臟組織血栓的溶解。

實施例 4 纖維溶酶原對小鼠動脈壁損傷的修復作用

【0119】24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取主動脈弓在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的心臟經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水並用蘇木素和伊紅染色(HE染色)，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，並酒精梯度脫水封片，切片在顯微鏡下400倍下觀察。

【0120】結果顯示，給溶媒PBS對照組血管管壁有泡沫細胞沉積，中層彈性膜排列紊亂，血管壁增厚，管壁凸凹不均(圖4A)；給纖維溶酶原組中層彈

性膜結構規則，呈波浪形，血管管壁厚度均勻(圖4B)。表明注射纖維溶酶原對主動脈管壁損傷具有修復作用。

實施例 5 纖維溶酶原顯著減輕心肌的損傷

【0121】 24-25周齡db/db雄鼠28隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組12隻，給纖維溶酶原組16隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。第32天摘除眼球取血，以3500 r/min離心15-20分鐘，並取上清，檢測血清中心肌肌鈣蛋白I的濃度。

【0122】 心肌肌鈣蛋白I(cardiac troponin,CTNI)是心肌損傷的重要標誌物，其血清濃度能夠反映心肌損傷的程度^[25]。結果顯示，給纖維溶酶原組心肌肌鈣蛋白I的濃度顯著低於給溶媒PBS對照組，且具有極顯著統計學差異(圖5)。說明纖維溶酶原能夠顯著減輕心肌的損傷。

實施例 6 纖維溶酶原糖促進微血栓的溶解

【0123】 24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥15天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。最後一次給藥24小時後摘眼球取血，全血靜置後血清用於檢測血液中D-二聚體(D-dimer)含量。

【0124】 結果顯示，給藥纖維溶酶原15天后，血清中D-二聚體的含量顯著上升(圖6)，說明纖維溶酶原能顯著促進微血栓溶解。

實施例 7 纖維溶酶原促進小鼠視網膜毛細血管損傷的修復

【0125】 24-25周齡db/db雄鼠20隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和

給纖維溶酶原組各10隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取左側眼球在多聚甲醛固定液中固定24小時。固定後的眼球剝離出視網膜後，置於1mL 3%胰酶(Solarbio)的EP管中，在搖床中37°C震盪消化2-3h。待視網膜出現軟化、脫落的現象後小心的將視網膜移入裝有蒸餾水的EP管中，於搖床中37°C震盪2-3h，使視網膜上多餘的組織脫落。輕柔的吹打視網膜，使其只剩血管層後在玻片上鋪片，自然風乾。視網膜於Schiff氏液染色(PAS染色)，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，並酒精梯度脫水二甲苯透明後封片，在顯微鏡下400倍下觀察。

【0126】從實驗結果可以看出，與纖維溶酶原組(圖7B)相比，給溶媒PBS對照組(圖7A)db/db鼠毛細血管管徑粗細不一，血管管壁增厚深染，血管內皮細胞(Δ)增生，周細胞(\downarrow)明顯減少；定量分析發現給纖維溶酶原組與給溶媒PBS對照組相比無細胞血管長度(圖7C)顯著減少，並且統計學分析結果顯示顯著差異。說明纖維溶酶原能夠顯著促進小鼠視網膜毛細血管損傷的修復，從而促進視網膜損傷的修復。

實施例 8 纖維溶酶原減少小鼠腎臟纖維蛋白沉積

【0127】24-25周齡db/db雄鼠20隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各10隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取腎臟在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的腎臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切

片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。以3%雙氧水培養15分鐘，水洗2次，每次5分鐘。10%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封閉1小時；時間到後，棄除羊血清液，用PAP筆圈出組織。兔抗小鼠纖維蛋白(原)抗體(Abcam)4°C培養過夜，TBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories,Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下200倍下觀察。

● **【0128】** 纖維蛋白原是纖維蛋白的前體，在組織存在損傷的情況下，作為機體對損傷的一種應激反應，纖維蛋白原水解成纖維蛋白^[22-24]，因此可將纖維蛋白水準作為損傷程度的一個標誌。纖維蛋白也是組織損傷後形成血栓的主要成分，因此，也可將纖維蛋白水準作為血栓的一個標誌。

【0129】 結果顯示，給纖維溶酶原組(圖8B)比給溶媒PBS對照組(圖8A)纖維蛋白原陽性著色淺。說明注射纖維溶酶原能夠顯著降低小鼠腎臟纖維蛋白沉積，反映出纖維溶酶原對小鼠腎臟損傷有顯著的修復作用，也說明纖維溶酶原能夠促進腎臟組織血栓的溶解。

● **實施例 9 纖維溶酶原促進小鼠腎臟凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表達**

【0130】 24-25周齡db/db雄鼠20隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各10隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取腎臟在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的腎臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。以3%雙氧水培養15分鐘，水洗2

次，每次5分鐘。10%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封閉1小時；時間到後，棄除羊血清液，用PAP筆圈出組織。兔抗小鼠Bcl2抗體(Abcam) 4°C培養過夜，TBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories,Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下200倍下觀察。

【0131】 Bcl-2為細胞凋亡抑制蛋白，在凋亡刺激因數作用下會下調表達^[26, 27]。Bcl-2免疫組化結果顯示，給纖維溶酶原組(圖9B)腎小管上皮細胞陽性表達著色要明顯深於給溶媒PBS對照組(圖9A)，且前者的著色範圍更廣。定量分析結果與觀察結果一致，且具有顯著差異(圖9C)。這表明纖維溶酶原能促進小鼠腎臟細胞凋亡抑制分子Bcl-2的表達，從而抑制小鼠腎臟組織細胞的凋亡。

實施例 10 纖維溶酶原減少肝組織纖維蛋白水準

【0132】 24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天犧牲小鼠並取肝臟組織在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的肝臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。以3%雙氧水培養15分鐘，水洗2次，每次5分鐘。10%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封閉1小時；時間到後，棄除羊血清液，用PAP筆圈出組織。兔抗小鼠纖維蛋白(原)抗體(Abcam)4°C培養過夜，TBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG

(HRP)抗體(Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories,Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下200倍下觀察。

【0133】纖維蛋白原是纖維蛋白的前體，在組織存在損傷的情況下，作為機體對損傷的一種應激反應，纖維蛋白原水解成纖維蛋白^[22-24]，因此可將纖維蛋白水準作為損傷程度的一個標誌。纖維蛋白也是組織損傷後形成血栓的主要成分，因此，也可將纖維蛋白水準作為血栓的一個標誌。

【0134】研究發現，與給溶媒PBS對照組(圖10A)相比，給纖溶酶原組(圖10B)的小鼠其肝臟組織纖維蛋白陽性著色淺，說明注射纖溶酶原能夠顯著降低小鼠肝臟纖維蛋白沉積，反映出纖溶酶原對小鼠肝臟損傷有顯著修復作用，也說明纖溶酶原能夠促進肝臟組織血栓的溶解。

實施例 11 纖溶酶原促進肝臟組織的炎症修復

【0135】24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。給纖溶酶原31天后犧牲小鼠並取肝臟組織在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的肝臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。以3%雙氧水培養15分鐘，水洗2次，每次5分鐘。10%正常羊血清(Vector laboratories,Inc.,USA)封閉1小時，時間到後甩去血清，用PAP筆圈出組織。針對F4/80的兔多株抗體(Abcam)4 $^{\circ}$ C培養過夜，TBS洗2次，每次5分鐘。山羊抗兔 IgG (HRP)抗體(Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗2次。按DAB試劑盒(Vector

laboratories, Inc., USA) 顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下200倍下觀察。

【0136】 F4/80為巨噬細胞標誌物。巨噬細胞作為炎症階段的主要吞噬細胞，負責清除機體損傷處組織和細胞的壞死碎片以及病原體等，因此，局部巨噬細胞的量可以表示炎症反應的程度和階段。實驗結果顯示，給纖維溶酶原組(圖11B)與給溶媒PBS對照組(圖11A)相比，給纖維溶酶原組小鼠的F4/80陽性水準明顯降低，說明給纖維溶酶原能夠減輕肝臟組織炎症。圖11C為F4/80免疫組化陽性表達數定量分析結果，給纖維溶酶原組F4/80表達量顯著減少，且具有統計學差異，說明注射纖維溶酶原能夠顯著促進小鼠肝臟炎症的修復。

實施例 12 纖維溶酶原促進神經損傷小鼠對機械觸誘發痛感應能力的修復

【0137】 24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組並開始做生理實驗，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥15天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在給纖維溶酶原後第0，4，7，11，16天用Von-Frey纖維絲(Stoelting，USA)檢測動物對機械性損傷的敏感程度。以2.0g力為起始力，先檢測其左腳。若5次刺激有2次有縮爪反應即為陽性，若為陽性即用小一級的力再對其右腳進行刺激；若為陰性，則用大一級的力對其右腳進行刺激，如此左右腳交替刺激，刺激間隔為5分鐘，總共刺激6次，然後根據S.R. Chaplan et al.(1994)^[28]介紹的方法計算其50%縮爪的閾值。

【0138】 研究發現，與給溶媒PBS對照組相比，給纖維溶酶原組的小鼠機械觸誘發痛反應均一性增加，且在第16天檢測時發現與給溶媒PBS對照組相比

出現了極顯著差異(圖12)，說明纖維溶酶原能夠修復神經損傷小鼠對機械觸誘發痛(mechanical allodynia)的感應能力。

實施例 13 纖維溶酶原對神經損傷小鼠冷刺激感應的修復

【0139】 24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組並開始做生理實驗，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥15天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在給藥後第0，4，7，11，16天用去針頭注射器擠出一滴丙酮液珠並輕觸db/db鼠足底，使其覆蓋整個足底。從左腳開始，每隔3分鐘輪流刺激其左右腳，共刺激10次，並統計縮爪反應次數。反應百分比=縮爪次數/刺激次數計100%。

【0140】 實驗結果顯示，在第0和第4天時，給纖維溶酶原組和給溶媒PBS對照組對丙酮刺激並無顯著差異，而第7天開始觀察到顯著差異，在第16天則觀察到極顯著差異，P值<0.0001(圖13)，說明給藥15天后，小鼠幾乎完全恢復了對冷刺激的反應，表明了纖維溶酶原能夠修復神經損傷小鼠對冷刺激的感應能力。

實施例 14 纖維溶酶原減少神經損傷小鼠神經組織纖維蛋白水準

【0141】 24-25周齡db/db雄鼠10隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖維溶酶原組，每組各5隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥15天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第16天犧牲小鼠並取坐骨神經在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的坐骨神經經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。

組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次，然後用PAP筆圈出組織。以3%TBS稀釋的雙氧水培養15分鐘，水洗3次。10%正常羊血清(Vector laboratories, Inc., USA)封閉1小時，吸走多餘血清。兔抗小鼠纖維蛋白(原)抗體(Abcam)室溫培養1小時或4°C培養過夜，TBS洗3次。山羊抗兔 IgG (HRP) 抗體(Abcam)二抗室溫培養1小時，TBS洗3次。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc., USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下400倍下觀察。

【0142】纖維蛋白原是纖維蛋白的前體，在組織存在損傷的情況下，作為機體對損傷的一種應激反應，纖維蛋白原水解成纖維蛋白^[22-24]，因此可將纖維蛋白水準作為損傷程度的一個標誌。纖維蛋白也是組織損傷後形成血栓的主要成分，因此，也可將纖維蛋白水準作為血栓的一個標誌。

【0143】研究發現，與給溶媒PBS對照組(圖14A)相比，給纖溶酶原組(圖14B)的小鼠其坐骨神經纖維蛋白的水準降低，說明纖溶酶原具有降解纖維蛋白水準的功能，損傷得到一定程度的修復，也說明纖溶酶原能夠促進神經組織周圍血栓的溶解。

實施例 15 纖溶酶原減輕小鼠腎臟的損傷

【0144】24-25周齡db/db雄鼠8隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖溶酶原組，每組各4隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。在第32天檢測生理指標結束，犧牲小鼠並取腎臟在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的腎臟組織經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。組織切片厚度為5 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。以3%雙氧

水培養15分鐘，水洗2次，每次5分鐘。山羊抗鼠 IgM (HRP)抗體(Abcam)室溫培養1小時，TBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒(Vector laboratories, Inc.,USA)顯色，水洗3次後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度脫水透明並封片，切片在顯微鏡下400倍下觀察。

【0145】IgM抗體在清除凋亡和壞死細胞過程中發揮著重要作用，細胞的凋亡和壞死細胞越多，局部IgM抗體水準越高^[29-31]。因此，局部 IgM抗體水準能夠反映組織器官的損傷情況。

【0146】結果顯示，給纖維溶酶原組 (圖15B)小鼠腎小球IgM的陽性著色淺於給溶媒PBS對照組(圖15A)，並且範圍也較對照組小，統計分析結果與觀察結果一致(圖15C)，這表明注射纖維溶酶原後腎小球的損傷明顯改善，反映出纖維溶酶原對小鼠的機體損傷有顯著保護和修復作用。

實施例 16 纖維溶酶原促進小鼠肝臟損傷的修復

【0147】25-28周齡db/db雄鼠9隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組3隻，給纖維溶酶原組6隻。實驗開始當天記為第0天稱重分組，實驗第二天開始給纖維溶酶原或PBS並記為第1天，連續給藥31天。給纖維溶酶原組小鼠按2mg/0.2mL/隻/天尾靜脈注射纖維溶酶原，給溶媒PBS對照組給予相同體積的PBS。給纖維溶酶原31天后摘眼球采全血，待血清析出後4°C 3500r/min離心10分鐘，取上清液進行檢測。本實驗使用谷丙轉氨酶檢測試劑盒(南京建成生物工程研究所，貨號C009-2)，運用賴氏比色法(Reitman-Frankel)檢測血清中谷丙轉氨酶(ALT)的含量。

【0148】谷丙轉氨酶是肝臟健康狀態的一個重要指標^[32,33]，谷丙轉氨酶的正常參考值區間為9~50U/L。檢測結果顯示，給溶媒PBS對照組血清中ALT的含量顯著高於正常生理指標，而給纖維溶酶原組則已經恢復到體內的

正常水準，並且給纖維溶酶原組ALT的含量顯著低於給溶媒PBS對照組，且具有統計學差異(圖16)。說明在模型小鼠中，注射纖維溶酶原能明顯修復肝損傷。

參考文獻

- [1] Alexander CM and Werb, Z. (1991). Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Hay ED, ed. (New York: Plenum Press), pp. 255-302
- [2] Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., and Harris, E.D., Jr. (1977). Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N. Engl. J. Med.* 296, 1017-1023.
- [3] He, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., and Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2632-2636
- [4] Stoppelli, M.P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F., and Assoian, R.K. (1985). Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4939-4943.
- [5] Vassalli, J.D., Baccino, D., and Belin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 100, 86-92.
- [6] Wiman, B. and Wallen, P. (1975). Structural relationship between "glutamic acid" and "lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH₂-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 50, 489-494.
- [7] Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126
- [8] Raum, D., Marcus, D., Alper, C.A., Levey, R., Taylor, P.D., and Starzl, T.E. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208, 1036-1037
- [9] Wallén P (1980). Biochemistry of plasminogen. In *Fibrinolysis*, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC
- [10] Sottrup-Jensen, L., Zajdel, M., Claeys, H., Petersen, T.E., and Magnusson, S. (1975). Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen:

- homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72, 2577-2581.
- [11] Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.
- [12] Alexander, C.M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.
- [13] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.
- [14] Collen, D. (2001). Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 1-9.
- [15] Rifkin, D.B., Moscatelli, D., Bizik, J., Quarto, N., Blei, F., Dennis, P., Flaumenhaft, R., and Mignatti, P. (1990). Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ. Dev.* 32, 313-318.
- [16] Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72, 1-22.
- [17] Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.
- [18] 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.
- [19] Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- [20] 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.
- [21] 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.

[22]Jae Kyu Ryu, Mark A. Petersen, Sara G. Murray et al. Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *NATURE COMMUNICATIONS*,2015, 6:8164.

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

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

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

[26]Moungjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y (2006). Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 downregulation. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1062–1069.

[27]Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, Rojanasakul Y (2008). Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 73, 119–127.

[28]S.R. Chaplan et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1994) 55-63.

[29]Zwart B, Ciurana C, Rensink I, Manoe R, Hack CE, et al. (2004) Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells. *Autoimmunity* 37: 95–102.

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

[31] 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.

[32] Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS (Jan 1955). Transaminase activity in human blood. *The Journal of Clinical Investigation*. 34 (1): 126–31.

[33] Wang CS, Chang TT, Yao WJ, Wang ST, Chou P (Apr 2012). Impact of increasing alanine aminotransferase levels within normal range on incident diabetes. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*. 111 (4): 201–8.

【符號說明】

無

序列表

<110> 深圳瑞健生命科學研究院有限公司

<120> 一種預防和治療心血管病的新方法

<130> FCW0293TW

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2376

<212> DNA

<213> 不含有信號肽的天然纖維溶酶原 (Glu-PLG, Glu-纖維蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 1

gagcctctgg atgactatgt gaataccag ggggcttcac tggtcagtgt cactaagaag	60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc	120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggtgaaaac	180
aggaagtctt ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat	240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa	300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctccc acagacctag attctcacct	360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg	420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaagagat atgactactg cgacattctt	480
gagtgtgaag agaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacgcaa aatttccaag	540
accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gcccacacgc tcatggatac	600
attccttcca aatttcaaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa ccccgatagg	660
gagctgcggc cttgggtgtt caccaccgac cccaacaagc gctgggaact ttgtgacatc	720
ccccgctgca caacacctcc accatcttct ggtcccacct accagtgtct gaaggaaca	780

ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctgtt accgtgtccg ggcacacctg tcagcactgg 840
agtgcacaga cccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg 900
gatgaaaact actgccgcaa tcctgacgga aaaagggccc catggtgccca tacaaccaac 960
agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata ccgtcctgtg actcctcccc agtatccacg 1020
gaacaattgg ctcccacagc accacctgag ctaaccctg tggccagga ctgctaccat 1080
ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag 1140
tcttggatcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacce cagaaaacta cccaatgct 1200
ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgttttacc 1260
acagacccca gcgtcaggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg 1320
agtgtttagtag cacctccgcc tgttgcctg cttccagatg tagagactcc ttccgaagaa 1380
gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440
acgccatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcatttt cactccagag 1500
acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaat tactgccgta accctgatgg tgatgtaggt 1560
ggtccctggt gctacacgac aaatccaaga aaactttacg actactgtga tgtccctcag 1620
tgtcgggccc cttcatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgtcctgga 1680
agggtttagtag ggggtgtgt ggcccacca cattcctggc cctggcaagt cagtcttaga 1740
acaaggttg gaatgcactt ctgtggaggc acctgatat cccagagtg ggtgttgact 1800
gctgccact gcttgagaa gtcccgaagg cttcatcct acaaggtcat cctgggtgca 1860
caccaagaag tgaatctcga accgcatgtt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920
gagcccacac gaaaagatat tgccttgcta aagetaagca gtcctgccg catcactgac 1980
aaagtaatcc cagcttgtct gccatccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040
ttcatcactg gctggggaga aacccaaggt acttttgag ctggccttct caaggaagcc 2100

cagctccctg tgattgagaa taaagtgtgc aatcgctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160
 caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220
 agtggaggtc cctctggttg cttcgagaag gacaaataca tttacaagg agtcacttct 2280
 tgggtcttg gctgtgcacg cccaataag cctggtgtct atgttcgtgt ttcaaggttt 2340
 gttacttgga ttgaggagt gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2

<211> 791

<212> PRT

<213> 不含有信號肽的天然纖維溶酶原(Glu-PLG, Glu-纖維蛋白溶酶原)胺基酸序列

<400> 2

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser
 1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
 20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
 35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
 50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met
 85 90 95

Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100 105 110

Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115 120 125

Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130 135 140

Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu
 145 150 155 160

Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly
 165 170 175

Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser
 180 185 190

Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys
 195 200 205

Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro
 210 215 220

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile
 225 230 235 240

Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys
 245 250 255

Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val
 260 265 270

Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His
 275 280 285

Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr
 290 295 300

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn
 305 310 315 320

Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser
 325 330 335

Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr
 340 345 350

Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly
 355 360 365

Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser
 370 375 380

Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala
 385 390 395 400

Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro
 405 410 415

Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu
 420 425 430

Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val
 435 440 445

Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe
 450 455 460

Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala
 645 650 655

Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr
 660 665 670

Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr
 675 680 685

Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val
 690 695 700

Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val
 705 710 715 720

Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser
 725 730 735

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys
 740 745 750

Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro
 755 760 765

Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile
 770 775 780

Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 785 790

<210> 3

<211> 2433

<212> DNA

<213> 含有信號肽的天然纖維溶酶原（來源於 swiss prot）的核酸序列

<400> 3

atggaacata aggaagtggg tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag	60
cctctggatg actatgtgaa taccagggg gcttctactgt tcagtgtcac taagaagcag	120
ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaatgtg aggaggacga agaattcacc	180
tgcaggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg	240
aagtctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc	300
tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtcca acaaaaaat	360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccact tctcccaca gacctagatt ctcacctgct	420
acacaccct cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagaca cgatccgag	480
gggcctggt gctatactac tgatccagaa aagagatag actactgca cattcttgag	540
tgtaagagg aatgtatgca ttgcagtga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc	600
atgtctggac tggaatgcca ggccctgggac tctcagagcc cacacgctca tggatacatt	660
ccttccaaat ttccaaaca gaacctgaag aagaattact gtcgtaccc cgatagggag	720
ctgcgcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgt gggaactttg tgacatcccc	780
cgctgcaca cacctccacc atcttctggt ccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt	840
gaaaactatc gcgggaatgt ggcgttacc gtgtccggc acacctgtca gcaactggagt	900
gcacagacc ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttgat	960
gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc	1020
caagtgcggt gggagtactg taagataccg tcctgtgact cctccccagt atccacggaa	1080
caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt	1140
gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct	1200

tggtcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagaccccag aaaactaccc aatgctggc	1260
ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gcccttggtg tttaccaca	1320
gaccccagcg tcagggtgga gtactgcaac ctgaaaaaat gtcaggaac agaagcagat	1380
gtttagcac ctccgcctgt tgtcctgctt ccagatgtag agactccttc cgaagaagac	1440
tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagagg cgaccactgt tactgggacg	1500
ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca	1560
aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga tgtagtggt	1620
ccctggtget acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt	1680
gcggcccctt catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcctggaagg	1740
gtttagggg ggtgtgtggc ccaccacat tcctggcct ggcaagtcag tcttagaaca	1800
aggttggaa tgcacttctg tggagcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct	1860
gcccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcctctaca aggtcatcct ggtgcacac	1920
caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttgag	1980
cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa	2040
gtaatcccag cttgtctgcc atccc aaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgttc	2100
atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctca ggaagcccag	2160
ctccctgga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtcaa	2220
tccaccgaac tctgtctgg gcatttgcc ggaggcactg acagttgcca ggtgacagt	2280
ggaggtctc tggtttgct cgagaaggac aaatacatt tacaaggagt cacttcttg	2340
ggtcttgct gtgcacgcc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggtttgt	2400
acttgattg agggagtgat gagaataat taa	2433

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> 含有信號肽的天然纖維溶酶原（來源於 swiss prot）的胺基酸序列

<400> 4

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 225 230 235 240

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 325 330 335

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400

Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 405 410 415

Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 420 425 430

Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445

Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 450 455 460

Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480

Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 485 490 495

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700

Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 725 730 735

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 755 760 765

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 770 775 780

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 785 790 795 800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 5

<211> 2145

<212> DNA

<213> LYS77-PLG (Lys-纖維酶原) 核酸序列

<400> 5

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc 60

aaaacaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagttcca cttctcccca cagacctaga 120

ttctcacctg ctacacaccc ctacagagga ctggaggaga actactgcag gaatccagac	180
aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc	240
gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa	300
attccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacgct	360
catggataca ttccttcaa attccaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac	420
cccgatagg agctgcggcc ttggtgttc accaccgacc ccaacaagc ctgggaactt	480
tgtgacatcc cccgtgcac aacacctcca ccatctctg gtcccaccta ccagtgtctg	540
aaggaacag gtgaaaacta tcgcgggaat gtggctgta cctgtgccg gcacacctgt	600
cagcactgga gtgcacagac ccctcacaca cataacagga caccagaaaa cttcccctgc	660
aaaaatttg atgaaaacta ctgccgaat cctgacggaa aaaggcccc atggtgccat	720
acaaccaaca gccaaagtgc gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctctcccaca	780
gstatccagg aacaattggc tcccacagca ccacctgagc taaccctgt ggtccaggac	840
tgtaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag	900
aagtgtcagt cttggtcctc tatgacacca caccggcacc agaagcccc agaaaactac	960
ccaatgctg gcctgacaat gaactactgc agaatccag atgccgataa aggcccttg	1020
tgtttacca cagacccag cgtcaggtgg gactactgca acctgaaaa atgctcagga	1080
acagaagcga gtgtttagc acctccgct gttgtcctgc ttccagatg agagactcct	1140
tccgaagaag actgtatgtt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact	1200
gttactggga cgccatgcca ggactgggt gccaggagc cccatagaca cagcattttc	1260
actccagaga caaatccag gccgggtctg gaaaaaatt actgccgtaa ccctgatgt	1320
gatgtagggt gtcctgtgtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat	1380
gtccctcagt gtgcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa	1440

tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gcccaccac attcctggcc ctggcaagtc 1500
 agtccttagaa caaggtttgg aatgcacttc tggaggca ccttgatata ccagagtgg 1560
 gtgttgactg ctgccactg ctggagaag tcccaaggc cttcatccta caaggtcatc 1620
 ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgatgttc aggaaataga agtgtctagg 1680
 ctgttcttgg agcccacag aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tcctgccgtc 1740
 atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccaccccaa attatgtggt cgctgaccgg 1800
 accgaatggt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggccttctc 1860
 aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgetatga gtttctgaat 1920
 ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccggaggcac tgacagtgc 1980
 caggtgaca gtggagtcc tctggttgc ttcgagaagg acaatacat ttacaagga 2040
 gtcaattctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 2100
 tcaaggtttg ttacttgat tgaggagtg atgagaaata attaa 2145

<210> 6

<211> 714

<212> PRT

<213> LYS77-PLG (Lys-纖維酶原) 胺基酸序列

<400> 6

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

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

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 35 40 45

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 50 55 60

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 65 70 75 80

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 85 90 95

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 100 105 110

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 115 120 125

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 130 135 140

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 145 150 155 160

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 165 170 175

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 180 185 190

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 195 200 205

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 210 215 220

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 405 410 415

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 420 425 430

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 450 455 460

Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 465 470 475 480

Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 485 490 495

Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 500 505 510

Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 515 520 525

Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 530 535 540

Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 545 550 555 560

Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 565 570 575

Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 580 585 590

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 595 600 605

Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 610 615 620

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 625 630 635 640

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 645 650 655

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 660 665 670

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 675 680 685

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 690 695 700

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 705 710

<210> 7

<211> 1245

<212> DNA

<213> delta-plg (delta-纖維溶酶原) 核酸序列

<400> 7

gagcctctgg atgactatgt gaataccag ggggcttcac tgttcagtgt cactaagaag

60

cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc	120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac	180
aggaagtccct ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat	240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa	300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctcccc acagacctag attctcacct	360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg	420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt	480
gagtgtgaag aggcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtga gccgaagaaa	540
tgtcctggaa gggtttagg ggggtgtgtg gccaccac attcctggcc ctggcaagtc	600
agtcttagaa caaggttgg aatgcacttc tgtggaggca ccttgatata cccagagtgg	660
gtgttgactg ctgccactg cttggagaag tcccaaggc cttcatccta caagtcatac	720
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa cgcgatgttc aggaaataga agtgtctagg	780
ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgtc	840
atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccaccccaa attatgtgtt cgtgaccgg	900
accgaatggt tcatcactgg ctggggagaa acccaaggta cttttggagc tggccttctc	960
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat	1020
ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg cgggaggcac tgacagttgc	1080
cagggtgaca gtggaggctc tctggttgc ttcgagaag acaatacat tttacaagga	1140
gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctgggtgcta tgttcgtgtt	1200
tcaaggtttg ttacttggat tgagggagt atgagaaata attaa	1245

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> delta-plg (delta-纖維酶原) 胺基酸序列

<400> 8

Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser Leu Phe Ser
1 5 10 15

Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu Cys Ala Ala
 20 25 30

Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe Gln Tyr His
 35 40 45

Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg Lys Ser Ser
 50 55 60

Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr
65 70 75 80

Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met
 85 90 95

Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser
 100 105 110

Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu
 115 120 125

Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp
 130 135 140

Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu
145 150 155 160

Glu Cys Glu Glu Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val
 165 170 175

Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His
 180 185 190

Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met
 195 200 205

His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala
 210 215 220

Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile
 225 230 235 240

Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile
 245 250 255

Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu
 260 265 270

Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala
 275 280 285

Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe
 290 295 300

Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu
 305 310 315 320

Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr
 325 330 335

Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His
 340 345 350

Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 355 360 365

Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp
 370 375 380

Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val
 385 390 395 400

Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 405 410

<210> 9

<211> 1104

<212> DNA

<213> Mini-plg (小纖維蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 9

gtcaggtggg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgtttagca 60
 cctccgctg ttgtcctgct tccagatgta gagactcctt ccgaagaaga ctgtatgttt 120
 gggaatggga aaggataccg aggcaagagg gcgaccactg ttactgggac gccatgccag 180
 gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcattttca ctccagagac aaatccacgg 240
 gcgggtctgg aaaaaaatta ctgccgtaac cctgatggtg atgtaggtgg tccctggtgc 300
 tacacgacaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tcctcagtg tgcggcccct 360
 tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtcctggaag ggtttaggg 420
 ggtgtgtgg cccaccaca ttctggccc tgcaagtca gtcttagaac aaggtttgga 480
 atgcacttct gtggaggcac cttgatatcc ccagagtggg tgttgactgc tgcccactgc 540

ttggagaagt cccaaggcc ttcacacctac aaggtcatcc tgggtgcaca ccaagaagtg 600
 aatctcgaac cgcatgttca ggaaatagaa gtgtctaggc tgttcttga gccacacga 660
 aaagatattg ccttgctaaa gctaagcagt cctgccgtca tcaactgaaa agtaatccca 720
 gcttgctctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcaactggc 780
 tggggagaaa ccaaggtac ttttgagct ggccttctca aggaagccca gtcctctgtg 840
 attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa 900
 ctctgtgctg ggcatttggc cggaggcact gacagttgcc agggtgacag tggaggtcct 960
 ctggtttgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcacttcttg ggtcttggc 1020
 tgtgcacgcc ccaataagcc tgggtctat gttcgtgttt caaggtttgt tacttggatt 1080
 gagggagtga tgagaaataa ttaa 1104

<210> 10

<211> 367

<212> PRT

<213> Mini-plg (小纖維蛋白溶酶原) 胺基酸序列

<400> 10

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

Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr
 20 25 30

Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly
 35 40 45

Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala
 50 55 60

Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys
 245 250 255

Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu
 260 265 270

Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg
 275 280 285

Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly
 290 295 300

His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
 305 310 315 320

Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser
 325 330 335

Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg
 340 345 350

Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 355 360 365

<210> 11

<211> 750

<212> DNA

<213> Micro-plg (微纖維蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 11

gccccctcat ttgattgtgg gaagcctcaa gttgagccga agaaatgtcc tggaagggtt 60

gtaggggggt gtgtggccca cccacattcc tggccctggc aagtcagtct tagaacaagg 120

tttgaatgc acttctgtgg aggcaccttg atatcccag agtgggtgtt gactgtgtcc 180

cactgcttgg agaagtcccc aaggccttca tcctacaagg tcatcctggg tgcacaccaa 240
 gaagtgaatc tcgaaccgca tgttcaggaa atagaagtgt ctaggctggt cttggagccc 300
 acacgaaaag atattgcctt gctaaagcta agcagtcctg ccgtcatcac tgacaaagta 360
 atcccagctt gtctgccatc cccaaattat gtggtcgctg accggaccga atgtttcacc 420
 actggctggg gagaaaccca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480
 cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtttc tgaatggaag agtccaatcc 540
 accgaactct gtgctgggca tttggccgga ggcactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600
 ggtcctctgg ttgcttcga gaaggacaaa tacattttac aaggagtcac ttcttggggt 660
 cttggctgtg cagcccccaa taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gtttgttact 720
 tggattgagg gagtgatgag aaataattaa 750

<210> 12

<211> 249

<212> PRT

<213> Micro-plg (微纖維蛋白溶酶原) 胺基酸序列

<400> 12

Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys
 1 5 10 15

Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro
 20 25 30

Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly
 35 40 45

Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu
 50 55 60

5

Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

245

<210> 13

<211> 684

<212> DNA

<213> 絲氨酸蛋白酶（結構）域的核酸序列

<400> 13

```

gtttagggg ggtgtgtggc ccaccacat tcctggcct ggcaagttag tcttagaaca      60
aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct      120
gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcactctaca aggtatcct gggtgacac      180
caagaagtga atctgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttgag      240
cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa      300
gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtgtcgc ctgaccggac cgaatgttc      360
atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag      420
ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa      480
tccaccgaac tctgtgctgg gcatttgccc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt      540
ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg      600
ggctttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgttc aaggtttgtt      660
acttgattg agggagtgat gaga      684

```

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

<213> 絲氨酸蛋白酶（結構）域的氨基酸序列

<400> 14

Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln Val

1

5

10

15

Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile
 20 25 30

Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser Pro
 35 40 45

Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val Asn
 50 55 60

Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val
 85 90 95

Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val
 100 105 110

Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln
 115 120 125

Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile
 130 135 140

Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln
 145 150 155 160

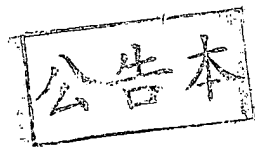
Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys
 165 170 175

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr
 180 185 190

Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn
195 200 205

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

Gly Val Met Arg
225



發明專利說明書

106年12月26日修正本頁

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

纖溶酶原在製備藥劑上的用途及包括纖溶酶原之藥劑

【技術領域】

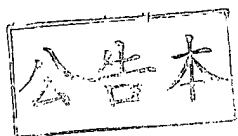
【0001】本發明涉及纖溶酶原在治療和/或消除心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病方面的作用，進而為治療心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症提供全新的治療策略。

【先前技術】

【0002】「心血管病」是指心血管系統的組織學和功能變化的病變，常以大血管及微血管病變引起的心臟改變為其主要表現。臨床可見心電圖異常、心臟擴大、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。目前，糖尿病已是心血管病發生的高危因素和預測指標，且糖尿病合併心血管病的病人短期或長期預後均明顯差於無糖尿病的病人。

【0003】「糖尿病」是一組由多種遺傳和環境因素共同作用導致胰島素分泌減少或胰島素作用缺陷而引起體內糖、蛋白質、脂肪、水及電解質代謝紊亂的內分泌、代謝症候群。其以慢性血糖水準升高為特徵，久病可引起多個系統器官的慢性併發症，其中心血管病為糖尿病的主要併發症。

【0004】「糖尿病性心血管病」指由糖尿病引起的心血管系統的組織學和功能變化的病變，為最常見的糖尿病併發症之一。糖尿病性心血管病這一糖尿病併發症危害大，常以大血管及微血管病變引起的心臟改變為其主



106年12月26日修正頁

(106年12月26日專利修正無劃線版本)

要表現。臨床可見心電圖異常、心臟擴大、心律失常、心絞痛、無痛性心肌梗塞、心力衰竭。據統計，大約70%-80%的糖尿病患者最後死于心血管併發症。糖尿病患者中動脈粥樣硬化、高血壓、急性心肌梗塞、慢性心力衰竭和猝死的發生率明顯升高。目前，糖尿病已是心血管病發生的高危因素和預測指標，且糖尿病合併心血管病的病人短期或長期預後均明顯差於無糖尿病的病人。

【0005】 纖溶酶是纖溶酶原啓動系統(PA系統)的關鍵組分。它是一種廣譜的蛋白酶，能夠水解細胞外基質(ECM)的幾個組分，包括纖維蛋白、明膠、纖連蛋白、層粘連蛋白和蛋白聚糖^[1]。此外，纖溶酶能將一些金屬蛋白酶前體(pro-MMP)啓動形成具有活性的金屬蛋白酶(MMP)。因此纖溶酶被認為是胞外蛋白水解作用的一個重要的上游調節物^[2,3]。纖溶酶是由纖溶酶原藉由兩種生理性的PA：組織型纖溶酶原啓動劑(tPA)或尿激酶型纖溶酶原啓動劑(uPA)蛋白水解形成的。由於纖溶酶原在血漿和其他體液中相對水準較高，傳統上認為PA系統的調節主要藉由PA的合成和活性水準實現。PA系統組分的合成受不同因素嚴格調節，如激素、生長因數和細胞因數。此外，還存在纖溶酶和PA的特定生理抑制劑。纖溶酶的主要抑制劑是 α 2-抗纖溶酶(α 2-antiplasmin)。某些細胞表面具有直接水解活性的uPA特異性細胞表面受體(uPAR)^[4,5]。

【0006】 纖溶酶原(plasminogen, plg)是一個單鏈糖蛋白，由791個胺基酸組成，分子量約為92 kD^[6,7]。纖溶酶原主要在肝臟合成，大量存在於胞外液中。血漿中纖溶酶原含量約為2 μ M。因此纖溶酶原是組織和體液中蛋白質水解活性的一個巨大的潛在來源^[8,9]。纖溶酶原存在兩種分子形式：谷氨酸-纖溶酶原(Glu-plasminogen)和賴氨酸-纖溶酶原(Lys-plasminogen)。天

發明摘要

※ 申請案號：105141900

A61k 38/48 (2006.01)

※ 申請日：105.12.16. ※IPC分類：

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

A61P 9/14 (2006.01)

纖溶酶原在製備藥劑上的用途及包括纖溶酶原之藥劑

【中文】

本發明涉及纖溶酶原在治療和/或消除心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病方面的作用，進而為治療不同類型的心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症提供全新的治療策略。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(6)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



106年12月26日修正本

106年12月26日專利修正無劃線版本)

申請專利範圍

1. 一種纖溶酶原在製備預防或治療受試者心臟或血管病變之藥劑的用途，其中該纖溶酶原係為與序列2、6、8、10或12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的蛋白質。
2. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該纖溶酶原係為序列2、6、8、10或12所示之蛋白質。
3. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該藥劑係藉由將該纖溶酶原與可選的藥用載體、賦形劑、或穩定劑混合形成。
4. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該藥劑係配製為一靜脈施用形式。
5. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該心臟或血管病變包含動脈粥樣硬化、微血栓、血栓及糖尿病性心臟或血管病變。
6. 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該心臟或血管病變包括心肌損傷、心臟肥大、心臟組織損傷、血管壁損傷、毛細血管損傷、視網膜損傷。
7. 一種包含纖溶酶原用於預防或治療受試者心臟或血管病變之藥劑，其中該纖溶酶原係為與序列2、6、8、10或12具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的蛋白質。
8. 如申請專利範圍第7項所述之藥劑，更包含可選的藥用載體、賦形劑、或穩定劑。
9. 如申請專利範圍第7項所述之藥劑，其中該藥劑為一靜脈施用形式。
10. 如申請專利範圍第7項所述之藥劑，其中該心臟或血管病變包括動脈粥樣硬化、微血栓、血栓、糖尿病性心臟或血管病變。

11. 如申請專利範圍第7項所述之藥劑，其中該心臟或血管病變包含心肌損傷、心臟肥大、心臟組織損傷、血管壁損傷、毛細血管損傷、視網膜損傷。
12. 如申請專利範圍第7項所述之藥劑，其中該纖溶酶原為序列2、6、8、10或12所示的蛋白質。

發明摘要

※ 申請案號：105141900

A61k 38/48 (2006.01)

※ 申請日：105.12.16. ※IPC分類：

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

A61P 9/14 (2006.01)

纖溶酶原在製備藥劑上的用途及包括纖溶酶原之藥劑

【中文】

本發明涉及纖溶酶原在治療和/或消除心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病方面的作用，進而為治療不同類型的心血管病，尤其是由糖尿病引起的心血管病及其相關病症提供全新的治療策略。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(6)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：