



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106890324 A

(43)申请公布日 2017.06.27

(21)申请号 201611170646.X

(22)申请日 2016.12.16

(66)本国优先权数据

201510956983.0 2015.12.18 CN

(71)申请人 深圳瑞健生命科学研究院有限公司

地址 518020 广东省深圳市罗湖区田贝三路12号510室

(72)发明人 李季男

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 张红春

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页

序列表19页 附图10页

(54)发明名称

一种预防和治疗糖尿病肾病的方法

(57)摘要

本发明涉及纤溶酶原预防和/或治疗糖尿病肾病方面的作用。与现有其它糖尿病肾病治疗药物相比,本发明纤溶酶原具有显著的改善肾脏微血管损伤,减少肾小球基底膜和肾小球系膜增厚等作用。

1. 纤溶酶原在制备预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的药物中的用途。

2. 权利要求1的用途,其中所述糖尿病肾病包括肾小球病变,包括肾小球硬化、肾小球系膜增生;肾小管间质病变;肾微血管病变,包括肾间质纤维化、肾小管萎缩、出球动脉透明变性、肾微血管硬化。

3. 权利要求1的用途,其中所述糖尿病肾病相关病症包括早期肾体积增大、早期肾小球高滤过率、间歇性蛋白尿、微量白蛋白尿、大量白蛋白尿、持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、肾细胞受损、肾纤维化、肾功能不全、肾衰竭、尿毒症。

4. 根据权利要求1-3任一项的用途,其中所述糖尿病肾病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病变导致。

5. 根据权利要求1-4任一项的用途,其中所述纤溶酶原与序列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,并且仍然具有纤溶酶原活性。

6. 根据权利要求1-5任一项的用途,其中所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

7. 根据权利要求1-6任一项的用途,其中所述纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ (delta)-纤溶酶原或其任意组合。

8. 根据权利要求1-7任一项的用途,其中所述纤溶酶原全身或局部施用,例如,通过静脉内、肌内、皮下、吸入、导管施用、局部注射、或直肠施用。

9. 根据权利要求1-8任一项的用途,其中所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物联合施用。

10. 根据权利要求9的用途,其中所述其它药物包括:抗糖尿病药物、抗血栓药物、降血压药物、降血脂药物、抗心脑血管疾病药物、抗感染药物。

一种预防和治疗糖尿病肾病的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纤溶酶原在预防、治疗和/或消除由糖尿病引起的肾病方面的作用,进而为治疗不同类型的糖尿病肾病及其相关病症提供全新的治疗策略。

[0002] 发明背景

[0003] 糖尿病(diabetes mellitus)是一种体内胰岛素相对或绝对不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低,或胰岛素本身存在结构上的缺陷而引起的碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱的一种慢性疾病^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症之一,约20-40%的糖尿病患者会发展为DN^[2-4]。糖尿病肾病是临床上最常见和多发的糖尿病并发症,表现为高血压、蛋白尿、水肿及肾功能不全等,这主要是由于糖尿病代谢异常引发肾小球硬化,从而导致肾功能障碍和损害^[5,6]。糖尿病肾病表现为肾小球肥大,肾小球基底膜增厚,系膜基质增宽,最后导致肾小球纤维化、硬化^[7]。

[0004] 通常,肾小球过度滤过和肾肥大在糖尿病发病后的第一年发生,表现为肾小球滤过率升高(例如,人类的正常肾小球滤过率为约120毫升/分钟至约150毫升/分钟)。在糖尿病的前5年中能观察到肾小球肥大、肾小球基底膜增厚和肾小球系膜体积扩张等病理变化。肾小球滤过率逐渐恢复正常。糖尿病5-10年后,个体开始在尿液中排出微量白蛋白尿。微量白蛋白尿是进展成明显性糖尿病肾病(部分以大量白蛋白尿为特征)的重要指标。在疾病早期看到的基底膜增厚和肾小球体积扩张可累积在晚期糖尿病肾病中,导致毛细血管腔闭塞,最终导致肾小球硬化。一旦出现明显性糖尿病肾病,肾小球滤过率就会稳定下降,大约一半的患者在7-10年内发展到晚期肾病。

[0005] 糖尿病肾病的发展阶段在临床上已经得到了充分观察。I期糖尿病肾病与肾小球滤过增加(即过度滤过,由于流过肾脏和肾小球的血液增加导致)、肾小球滤过率升高、肾小球肥大和肾肿大有关。II期糖尿病肾病是与继续过度滤过和肾肥大有关的临床沉默阶段。发生肾小球基底膜增厚和肾小球系膜扩张。III期糖尿病肾病(也称为初期糖尿病肾病)与微量白蛋白尿有关。肾脏逐渐丧失过滤废物的能力,同时肌酐和尿素氮的血液水平升高。肾小球基底膜增厚和肾小球系膜扩张随着病情加重继续发生。IV期糖尿病肾病(也称为明显性糖尿病肾病)与大量白蛋白尿(即临床白蛋白尿)和血液中肌酐和血尿素氮水平继续升高有关。V期糖尿病肾病随末期肾病和肾衰竭发生。

[0006] 糖尿病肾病发病机制复杂,目前对糖尿病肾病治疗方法主要是控制饮食、控制血糖、注射胰岛素、透析及肾移植等方法,但这些治疗手段过于昂贵且并发症严重且目前针对糖尿病肾病的药物极少,因此治疗药物亟需开发。

[0007] 纤溶酶是纤溶酶原激活系统(PA系统)的关键组分。它是一种广谱的蛋白酶,能够水解细胞外基质(ECM)的几个组分,包括纤维蛋白、明胶、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖^[8]。此外,纤溶酶能将一些金属蛋白酶前体(pro-MMP)激活形成具有活性的金属蛋白酶(MMP)。因此纤溶酶被认为是胞外蛋白水解作用的一个重要的上游调节物^[9,10]。纤溶酶是由纤溶酶原通过两种生理性的PA:组织型纤溶酶原激活剂(tPA)或尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)蛋白水解形成的。由于纤溶酶原在血浆和其他体液中相对水平较高,传统上认为PA系

统的调节主要通过PA的合成和活性水平实现。PA系统组分的合成受不同因素严格调节,如激素、生长因子和细胞因子。此外,还存在纤溶酶和PA的特定生理抑制剂。纤溶酶的主要抑制剂是 α 2-抗纤溶酶(α 2-antiplasmin)。某些细胞表面具有直接水解活性的uPA特异性细胞表面受体(uPAR)^[11,12]。

[0008] 纤溶酶原(plasminogen,plg)是一个单链糖蛋白,由791个氨基酸组成,分子量约为92kD^[13,14]。纤溶酶原主要在肝脏合成,大量存在于胞外液中。血浆中纤溶酶原含量约为2 μ M。因此纤溶酶原是组织和体液中蛋白质水解活性的一个巨大的潜在来源^[15,16]。纤溶酶原存在两种分子形式:谷氨酸-纤溶酶原(Glu-plasminogen)和赖氨酸-纤溶酶原(Lys-plasminogen)。天然分泌和未裂解形式的纤溶酶原具有一个氨基末端(N-末端)谷氨酸,因此被称为谷氨酸-纤溶酶原。然而,在纤溶酶存在时,谷氨酸-纤溶酶原在Lys76-Lys77处水解成为赖氨酸-纤溶酶原。与谷氨酸-纤溶酶原相比,赖氨酸-纤溶酶原与纤维蛋白具有更高的亲和力,并可以更高的速率被PA激活。这两种形式的纤溶酶原的Arg560-Val561肽键可被uPA或tPA切割,导致二硫键连接的双链蛋白酶纤溶酶的形成^[17]。纤溶酶原的氨基末端部分包含五个同源三环,即所谓的kringle,羧基末端部分包含蛋白酶结构域。一些kringle含有介导纤溶酶原与纤维蛋白及其抑制剂 α 2-AP特异性相互作用的赖氨酸结合位点。最新发现一个为38kD的纤维蛋白溶酶原片段,其中包括kringle1-4,是血管生成的有效抑制剂。这个片段被命名为血管抑素,可通过几个蛋白酶水解纤溶酶原产生。

[0009] 纤溶酶的主要底物是纤维蛋白,纤维蛋白的溶解是预防病理性血栓形成的关键^[18]。纤溶酶还具有对ECM几个组分的底物特异性,包括层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖和明胶,表明纤溶酶在ECM重建中也起着重要作用^[14,19,20]。间接地,纤溶酶还可以通过将某些蛋白酶前体转化为活性蛋白酶来降解ECM的其他组分,包括MMP-1,MMP-2,MMP-3和MMP-9。因此,有人提出,纤溶酶可能是细胞外蛋白水解的一个重要的上游调节器^[21]。此外,纤溶酶具有激活某些潜在形式的生长因子的能力^[22-24]。在体外,纤溶酶还能水解补体系统的组分并释放趋化补体片段。

[0010] 糖尿病肾病是糖尿病常见的并发症,是糖尿病全身性微血管病变的表现之一,临床特征为渐进性肾功能损害、高血压、水肿、蛋白尿晚期出现严重的肾功能衰竭,是糖尿病患者主要的死亡原因之一。近年来随着我国人口人均寿命的延长,生活饮食习惯,结构的改变,糖尿病的患病率呈直线上升趋势,且由于治疗方法的改善,生存时间的增加,肾脏及其它并发症也相应的增加。

[0011] 目前治疗糖尿病肾损伤的方法主要有药物治疗以及透析治疗。药物主要包括降压药物、他汀类药物、抗凝药物以及抗氧化药物等。

[0012] 降压类药物主要有ACEI(血管紧张素转换酶抑制剂)类药物和ARB(血管紧张素II受体阻滞剂)类药物,以及ACER类药物,如依那普利、卡托普利、苯那普利、赖诺普利等。这类药物可能引起味觉紊乱、白细胞减少、皮疹、味觉缺失以及刺激性干咳等并发症。ARB类药物包括,氯沙坦、缬沙坦、坎地沙坦等。ARB类药物并发症较少,但价格昂贵。

[0013] 他汀类药物是羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂,主要包括洛伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀等,这类药物主要通过降脂作用来保护肾脏。他汀类药物使用过程中会出现肌肉疼痛以及肝酶异常等副作用。

[0014] 目前使用的抗凝类药物包括,肝素、华法林以及尿激酶等,这类药可能出现出血、

过敏等并发症状。

[0015] 抗氧化药物包括维生素E以及牛磺酸等。

[0016] 透析治疗包括结肠透析、腹膜透析以及血液透析等。结肠透析利用肠道黏膜半透膜的特性及天然广阔的透析面积来主动排除体内毒素,达到血液净化的作用。腹膜透析可以良好的控制血糖并且不需建立血管瘘,但是容易患腹膜炎,导致感染以及蛋白质丢失。血液透析比较简单,治疗时间短,但是需要建立血管瘘,透析过程中心血管系统负担较重。

[0017] 综上所述,目前的药物主要在于降血压、降血脂、抗凝、抗氧化等。然而,这些药物都难于从根本上改变糖尿病对肾脏本身的损害。

[0018] 经过研究,本发明令人惊奇地发现纤溶酶原具有修复肾脏损伤的作用,可以用于各阶段的糖尿病肾病的治疗。

[0019] 在我们的研究中,糖尿病小鼠静脉注射纤溶酶原31天后,小鼠肾小球系膜基质明显减少;纤维蛋白的沉积明显减少;凋亡抑制蛋白的表达明显升高,这些指标的改变反映了小鼠肾脏的损伤得到显著修复,意味着纤溶酶原对糖尿病肾损伤、糖尿病肾病有显著的治疗作用。

[0020] 同时,纤溶酶原对糖尿病导致的其他组织器官的损伤和病变也有明显的修复和治疗作用,例如对糖尿病所致的神经损伤、心肌损伤、肝脏损伤和视网膜损伤的修复和治疗作用。纤溶酶原为治疗糖尿病并发症开辟了新的篇章。

[0021] 发明概述

[0022] 一方面,本发明涉及预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的方法,包括给药受试者纤溶酶原或纤溶酶。一方面,本发明也涉及纤溶酶原用于预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的用途,包括给药受试者纤溶酶原或纤溶酶。

[0023] 在一个实施方案中,所述糖尿病肾病包括肾小球病变,包括肾小球硬化、肾小球系膜增生;肾小管间质病变;肾微血管病变,包括肾间质纤维化、肾小管萎缩、出球动脉透明变性、肾微血管硬化。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病相关病症包括早期肾体积增大,早期肾小球高滤过率、间歇性蛋白尿、微量白蛋白尿,大量白蛋白尿、持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、肾细胞受损、肾纤维化、肾功能不全、尿毒症。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病变导致。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,所述纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原全身或局部施用,例如,通过静脉内、肌内、皮下、吸入、导管施用、局部注射、或直肠施用。在一个实施方案中,所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物联合施用。在一个实施方案中,所述其它药物包括:抗糖尿病药物、抗血栓药物、降血压药物、降血脂药物、抗心脑血管疾病药物、抗感染药物。

[0024] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物,优选是人。

[0025] 在一个实施方案中,所述受试者纤维蛋白溶酶或者纤溶酶原低下。具体地,所述低

下是先天的、继发的和/或局部的。

[0026] 在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤溶酶原活性。在一个实施方案中,纤溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基础上,添加、删除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1个氨基酸,并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,纤溶酶原是选自如下的保守取代变体:Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或微纤维蛋白溶酶原。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原为人天然纤维蛋白溶酶原,例如序列2所示的纤溶酶原的直向同系物,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。

[0027] 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0.0001-2000mg/kg、0.001-800mg/kg、0.01-600mg/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、0.001-800mg/cm²、0.01-600mg/cm²、0.1-400mg/cm²、1-200mg/cm²、1-100mg/cm²、10-100mg/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。

[0028] 上述纤溶酶原可以单独施用,也可以与其它药物联合施用,所述其它药物包括但不限于抗糖尿病药物,例如胰岛素、阿卡波糖、二甲双胍、瑞格列奈、罗格列酮、阿托伐他汀等。

[0029] 一方面,本发明涉及纤溶酶原或纤溶酶在制备预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的药物中的用途。一方面,本发明涉及一种制药方法,包括将纤溶酶原或纤溶酶与药学可接受载体共同制备成预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的药物。

[0030] 在一个实施方案中,所述糖尿病肾病包括肾小球病变,包括肾小球硬化、肾小球系膜增生;肾小管间质病变;肾微血管病变,包括肾间质纤维化、肾小管萎缩、出球动脉透明变性、肾微血管硬化。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病相关病症包括早期肾体积增大,早期肾小球高滤过率、间歇性蛋白尿、微量白蛋白尿,大量白蛋白尿、持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、肾细胞受损、肾纤维化、肾功能不全、尿毒症。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病变导致。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,所述纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原全身或局部施用,例如,通过静脉内、肌内、皮下、吸入、导管施用、局部注射、或直肠施用。在一个实施

方案中,所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物联合施用。在一个实施方案中,所述其它药物包括:抗糖尿病药物、抗血栓药物、降血压药物、降血脂药物、抗心脑血管疾病药物、抗感染药物。

[0031] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物,优选是人。

[0032] 在一个实施方案中,所述受试者纤维蛋白溶酶或者纤溶酶原低下。具体地,所述低下是先天的、继发的和/或局部的。

[0033] 在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原是在序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,纤溶酶原是选自如下的保守取代变体:Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或微纤维蛋白溶酶原。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原为人天然纤维蛋白溶酶原,例如序列2所示的纤溶酶原的直向同系物,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。

[0034] 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0.0001-2000mg/kg、0.001-800mg/kg、0.01-600mg/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、0.001-800mg/cm²、0.01-600mg/cm²、0.1-400mg/cm²、1-200mg/cm²、1-100mg/cm²、10-100mg/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。

[0035] 上述纤溶酶原可以单独施用,也可以与其它药物联合施用,所述其它药物包括但不限于抗糖尿病药物,例如胰岛素、阿卡波糖、二甲双胍、瑞格列奈、罗格列酮、阿托伐他汀等。

[0036] 一方面,本发明涉及用于预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的纤溶酶原或纤溶酶,以及用于预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物。

[0037] 在一个实施方案中,所述糖尿病肾病包括肾小球病变,包括肾小球硬化、肾小球系膜增生;肾小管间质病变;肾微血管病变,包括肾间质纤维化、肾小管萎缩、出球动脉透明变性、肾微血管硬化。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病相关病症包括早期肾体积增大、早期肾小球高滤过率、间歇性蛋白尿、微量白蛋白尿,大量白蛋白尿、持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、肾细胞受损、肾纤维化、肾功能不全、尿毒症。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血管病变导致。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原是

包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,所述纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原全身或局部施用,例如,通过静脉内、肌内、皮下、吸入、导管施用、局部注射、或直肠施用。在一个实施方案中,所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物联合施用。在一个实施方案中,所述其它药物包括:抗糖尿病药物、抗血栓药物、降血压药物、降血脂药物、抗心脑血管疾病药物、抗感染药物。

[0038] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物,优选是人。

[0039] 在一个实施方案中,所述受试者纤维蛋白溶酶或者纤溶酶原低下。具体地,所述低下是先天的、继发的和/或局部的。

[0040] 在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原是在序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,纤溶酶原是选自如下的保守取代变体:Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或微纤维蛋白溶酶原。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原为人天然纤维蛋白溶酶原,例如序列2所示的纤溶酶原的直向同系物,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。

[0041] 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0.0001-2000mg/kg、0.001-800mg/kg、0.01-600mg/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、0.001-800mg/cm²、0.01-600mg/cm²、0.1-400mg/cm²、1-200mg/cm²、1-100mg/cm²、10-100mg/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。

[0042] 上述纤溶酶原可以单独施用,也可以与其它药物联合施用,所述其它药物包括但不限于抗糖尿病药物,例如胰岛素、阿卡波糖、二甲双胍、瑞格列奈、罗格列酮、阿托伐他汀等。

[0043] 一方面,本发明涉及用于预防、治疗和/或消除受试者糖尿病肾病和/或其相关病症的、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物的制品或药盒。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病包括肾小球病变,包括肾小球硬化、肾小球系膜增生;肾小管间质病变;肾微血管病变,包括肾间质纤维化、肾小管萎缩、出球动脉透明变性、肾微血管硬化。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病相关病症包括早期肾体积增大,早期肾小球高滤过率、间歇性蛋白尿、微量白蛋白尿,大量白蛋白尿、持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、肾细胞受损、肾纤维化、肾功能不全、尿毒症。在一个实施方案中,所述糖尿病肾病是由糖尿病引起的大血管、小血管、微血

管病变导致。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,所述纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原全身或局部施用,例如,通过静脉内、肌肉、皮下、吸入、导管施用、局部注射、或直肠施用。在一个实施方案中,所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物联合施用。在一个实施方案中,所述其它药物包括:抗糖尿病药物、抗血栓药物、降血压药物、降血脂药物、抗心脑血管疾病药物、抗感染药物。

[0044] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物,优选是人。

[0045] 在一个实施方案中,所述受试者纤维蛋白溶酶或者纤溶酶原低下。具体地,所述低下是先天的、继发的和/或局部的。

[0046] 在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原是在序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,纤溶酶原是选自如下的保守取代变体:Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或微纤维蛋白溶酶原。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原为人天然纤维蛋白溶酶原,例如序列2所示的纤溶酶原的直向同系物,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。

[0047] 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0.0001-2000mg/kg、0.001-800mg/kg、0.01-600mg/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、0.001-800mg/cm²、0.01-600mg/cm²、0.1-400mg/cm²、1-200mg/cm²、1-100mg/cm²、10-100mg/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。。

[0048] 上述纤溶酶原可以单独施用,也可以与其它药物联合施用,所述其它药物包括但不限于抗糖尿病药物,例如胰岛素、阿卡波糖、二甲双胍、瑞格列奈、罗格列酮、阿托伐他汀等。

[0049] 在一个实施方案中,所述制品或药盒包含含有有效剂量的纤溶酶原/纤溶酶的容器。优选,该制品或药盒还包含含有一种或多种其它药物的容器。该药盒还可包含使用说明书,说明所述纤溶酶原可以用于预防和/或治疗所述由糖尿病引起的肾病及其相关病症,并且可以进一步说明,所述纤溶酶原可以在其它药物或疗法施用之前,同时,和/或之后施用。

[0050] 一方面,本发明涉及纤溶酶原或纤溶酶在制备预防和/或治疗受试者糖尿病导致

的机体组织和内脏器官损伤(损害)的药物、制品、药盒中的用途。在一个实施方案中,所述组织和内脏器官损伤(损害)包括对大脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、神经、视网膜、皮肤、胃肠道的损伤(损害)。一方面,本发明涉及纤溶酶原在制备预防和/或治疗受试者的糖尿病并发症的药物、制品、药盒中的用途。在一个实施方案中,所述糖尿病并发症为糖尿病引发的糖尿病性大脑病变、糖尿病性心脏病变、糖尿病性肝脏病变、糖尿病性肾脏病变、糖尿病性肺脏病变、糖尿病性神经病变,糖尿病性视网膜病变、糖尿病性皮肤病变。

[0051] 一方面,本发明涉及一种制药方法,包括将纤溶酶原或纤溶酶与药学可接受的载体制备成用于预防和/或治疗受试者糖尿病导致的机体组织和内脏器官损伤(损害)的药物、制品、药盒。在一个实施方案中,所述组织和内脏器官损伤(损害)包括对大脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、神经、视网膜、皮肤、胃肠道的损伤(损害)。一方面,本发明涉及一种制药方法,包括将纤溶酶原或纤溶酶与药学可接受载体制备成预防和/或治疗受试者的糖尿病并发症的药物、制品或药盒。在一个实施方案中,所述糖尿病并发症为糖尿病引发的糖尿病性大脑病变、糖尿病性心脏病变、糖尿病性肝脏病变、糖尿病性肾脏病变、糖尿病性肺脏病变、糖尿病性神经病变、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性皮肤病变。

[0052] 一方面,本发明涉及用于预防和/或治疗受试者糖尿病导致的机体组织和内脏器官损伤(损害)的纤溶酶原或纤溶酶、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物、制品、药盒。在一个实施方案中,所述组织和内脏器官损伤(损害)包括对大脑、心脏、肝脏、肾脏、肺脏、神经、视网膜、胃肠道、皮肤的损伤(损害)。一方面,本发明涉及用于预防和/或治疗受试者的糖尿病并发症的纤溶酶原、包含纤溶酶原的药物组合物、制品或药盒。在一个实施方案中,所述糖尿病并发症为糖尿病引发的糖尿病性大脑病变、糖尿病性心脏病变、糖尿病性肝脏病变、糖尿病性肺脏病变、糖尿病性肾脏病变、糖尿病性神经病变,糖尿病性视网膜病变、糖尿病性皮肤病变。

[0053] 一方面,本发明涉及一种预防和/或治疗受试者糖尿病导致的机体组织和内脏器官损伤(损害)的方法,包括给药受试者纤溶酶原或纤溶酶、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物、制品、药盒。本发明还涉及纤溶酶原或纤溶酶、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物、制品、药盒用于预防和/或治疗受试者糖尿病导致的机体组织和内脏器官损伤(损害)的用途。在一个实施方案中,所述组织和内脏器官损伤(损害)包括对大脑、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、神经、视网膜、胃肠道、皮肤的损伤(损害)。一方面,本发明涉及一种预防和/或治疗受试者的糖尿病并发症的方法,包括给药受试者纤溶酶原或纤溶酶、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物、制品或药盒。本发明还包括纤溶酶原或纤溶酶、包含纤溶酶原或纤溶酶的药物组合物、制品或药盒用于预防和/或治疗受试者的糖尿病并发症的用途。在一个实施方案中,所述糖尿病并发症为糖尿病引发的糖尿病性大脑病变、糖尿病性心脏病变、糖尿病性肝脏病变、糖尿病性肺脏病变、糖尿病性肾脏病变、糖尿病性神经病变、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性皮肤病变。

[0054] 在一个实施方案中,所述受试者纤维蛋白溶酶或者纤溶酶原低下。具体地,所述低下是先天的、继发的和/或局部的。

[0055] 在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原与序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原是在序列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,并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤维蛋白溶酶原活性的蛋白质。在一个实施方案中,纤溶酶原选自Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、微纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或其任意组合。在一个实施方案中,纤溶酶原是选自如下的保守取代变体:Glu-纤维蛋白溶酶原、Lys-纤维蛋白溶酶原、小纤维蛋白溶酶原、 δ -纤溶酶原或微纤维蛋白溶酶原。在一个实施方案中,纤维蛋白溶酶原为人天然纤维蛋白溶酶原,例如序列2所示的纤溶酶原的直向同系物,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。

[0056] 本发明明确涵盖了属于本发明实施方案之间的技术特征的所有组合,并且这些组合后的技术方案在本申请中已经明确公开,就像上述技术方案已经单独且明确公开一样。另外,本发明还明确涵盖各个实施方案及其要素的所有亚组合,并且在本文中公开,就像每一个此类亚组合单独且明确在本文中公开一样。

[0057] 发明详述

[0058] 1. 定义

[0059] “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。

[0060] “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,其中的器官包括肝脏、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。而这些糖尿病的并发症主要是由于患者各器官的大血管、小血管、微血管受损所致。

[0061] “糖尿病性微血管病变”指糖尿病患者机体各器官或组织微循环不同程度的异常导致的微血管病变。微血管病变形成的过程大致为:微循环功能性改变,内皮损伤,基膜增厚,血粘度增高,红细胞聚集,血小板粘附和聚集,最后导致微血栓形成和/或微血管闭塞。

[0062] 上述的两种“糖尿病性血管病变”导致组织或器官局部血管损伤、血流不畅、细胞缺氧、形成血凝块、血栓和炎症,并进一步影响周边的组织及器官功能,进而导致“糖尿病并发症”。因此,本发明“糖尿病性血管病变”和“糖尿病并发症”术语涵盖糖尿病引发的血栓和微血栓,以及相应引起的器官、组织病变。

[0063] 糖尿病是全世界发病率和死亡率的主要原因,大约40%的糖尿病患者发展成糖尿病肾病,需要肾透析或肾移植。糖尿病是末期肾病的首要原因,因此,任何糖尿病患者都有发展成糖尿病肾病的风险。

[0064] “糖尿病肾病”或称为“糖尿病性肾病”是糖尿病微血管并发症,主要指糖尿病性肾小球硬化症,一种以血管损害为主的肾小球病变,其特征包括蛋白尿、高血压、水肿、肾小球硬化症、血管结构改变和小管间质性疾病(tubulointerstitial disease)。

[0065] “纤溶酶”是存在于血液中的一种非常重要的酶,能将纤维蛋白凝块水解为纤维蛋白降解产物和D-二聚体。

[0066] “纤溶酶原”是纤溶酶的酶原形式,根据swiss prot中的序列,按含有信号肽的天

然人源纤溶酶原氨基酸序列(序列4) 计算由810个氨基酸组成,分子量约为92kD,主要在肝脏中合成并能够在血液中循环的糖蛋白,编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全长的纤溶酶原包含七个结构域:位于C末端的丝氨酸蛋白酶结构域、N末端的Pan Apple (PAP) 结构域以及5个Kringle结构域(Kringle1-5)。参照swiss prot中的序列,其信号肽包括残基Met1-Gly19,PAP包括残基Glu20-Val98,Kringle1包括残基Cys103-Cys181,Kringle2包括残基Glu184-Cys262,Kringle3包括残基Cys275-Cys352,Kringle4包括残基Cys377-Cys454,Kringle5包括残基Cys481-Cys560。根据NCBI数据,丝氨酸蛋白酶域包括残基Val581-Arg804。

[0067] 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 -纤溶酶原(δ -plasminogen)是全长纤溶酶原缺失了Kringle2-Kringle5结构的片段,仅含有Kringle1和丝氨酸蛋白酶域^[25,26],有文献报道了 δ -纤溶酶原的氨基酸序列(序列8)^[26],编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列7。小纤溶酶原(Mini-plasminogen)由Kringle5和丝氨酸蛋白酶域组成,有文献报道其包括残基Val443-Asn791(以不含有信号肽的Glu-纤溶酶原序列的Glu残基为起始氨基酸)^[27],其氨基酸序列如序列10所示,编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列9所示。而微纤溶酶原(Micro-plasminogen)仅含有丝氨酸蛋白酶结构域,有文献报道其氨基酸序列包括残基Ala543-Asn791(以不含有信号肽的Glu-纤溶酶原序列的Glu残基为起始氨基酸)^[28],也有专利文献CN102154253A报道其序列包括残基Lys531-Asn791(以不含有信号肽的Glu-纤溶酶原序列的Glu残基为起始氨基酸),本专利序列参考专利文献CN102154253A,其氨基酸序列如序列12所示,编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列11所示。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 在循环过程中,纤溶酶原采用封闭的非活性构象,但当结合至血栓或细胞表面时,在纤溶酶原激活剂(plasminogen activator,PA)的介导下,其转变为呈开放性构象的活性纤溶酶。具有活性的纤溶酶可进一步将纤维蛋白凝块水解为纤维蛋白降解产物和D-二聚体,进而溶解血栓。其中纤溶酶原的PAP结构域包含维持纤溶酶原处于非活性封闭构象的重要决定簇,而KR结构域则能够与存在于受体和底物上的赖氨酸残基结合。已知多种能够作为纤溶酶原激活剂的酶,包括:组织纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)、激肽释放酶和凝血因子XII(哈格曼因子)等。

[0071] “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。

[0072] 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,受检血浆中的纤溶酶原在SK的作用下,转变成纤溶酶,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。

[0073] “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。

[0074] “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。

[0075] “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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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:

[0079] 分数 X/Y 乘100

[0080] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当领会,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等的情况下,A相对于B的%氨基酸序列同一性会不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0081] 如本文中使用的,术语“治疗”和“处理”指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果可以是完全或部分预防疾病或其症状,和/或部分或完全治愈疾病和/或其症状,并且包括:(a)预防疾病在受试者体内发生,所述受试者可以具有疾病的素因,但是尚未诊断为具有疾病;(b)抑制疾病,即阻滞其形成;和(c)减轻疾病和/或其症状,即引起疾病和/或其症状消退。

[0082] 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。

[0083] “治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时足以实现对疾病的所述预防和/或治疗的纤溶酶原的量。“治疗有效量”会根据所使用的纤溶酶原、要治疗的受试者的疾病和/或其症状的严重程度以及年龄、体重等而变化。

[0084] 2. 本发明纤溶酶原的制备

[0085] 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.2006Mini Rev.Med Chem.6:3-10和Camarero JA等2005Protein 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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*)和其它肠杆菌科(*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中,并且具有核糖体结合位点序列等,以启动并完成转录和翻译。

[0089] 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。

[0090] 在微生物外,哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达并生成本发明的纤溶酶原(例如编码主题抗-Tau抗体的多核苷酸)。参见Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、和经转化的B细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列,如复制起点,启动子和增强子(Queen等, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)),以及必需的加工信息位点,诸如核糖体结合位点, RNA剪接位点,多聚腺苷酸化位点,和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

[0091] 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。

[0092] 3. 药物配制剂

[0093] 可以通过将具有所需纯度的纤溶酶原与可选的药用载体、赋形剂,或稳定剂(Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16版, Osol, A. ed. (1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性,并包括缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;氯化苄烷铵(*benzalkonium*

chloride), 苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 间甲酚); 低分子量多肽 (少于约10个残基); 蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖, 二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精; 螯合剂如EDTA; 糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇; 成盐反离子如钠; 金属复合物 (例如锌-蛋白复合物); 和/或非离子表面活性剂, 例如TWEENTM, PLURONICSTM或聚乙二醇 (PEG)。优选冻干的抗-VEGF抗体配制剂在WO 97/04801中描述, 其包含在本文中作为参考。

[0094] 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。

[0095] 本发明的纤溶酶原可包裹在通过诸如凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊中, 例如, 可置入在胶质药物传送系统 (例如, 脂质体, 白蛋白微球, 微乳剂, 纳米颗粒和纳米胶囊) 中或置入粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊中。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A.Ed. (1980)。

[0096] 用于体内给药的本发明的纤溶酶原必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

[0097] 本发明的纤溶酶原可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质, 例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶 (如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯) (Langer等, J.Biomed.Mater.Res., 15:167-277 (1981); Langer, Chem.Tech., 12:98-105 (1982)) 或聚(乙醇醇)、聚交酯 (美国专利3773919, EP58, 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。

[0098] 4. 给药和剂量

[0099] 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。

[0100] 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。可以通过各种肠内和胃肠外施用路径, 包括口服、静脉内等对患有血栓和/或血栓相关疾病的个体施用此类纤溶酶原的组合物。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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为例如每天约0.0001至2000mg/kg,或约0.001至500mg/kg(例如0.02mg/kg, 0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 0.75mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg等等)受试者体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或50mg/kg体重或在1-50mg/kg的范围,或至少1mg/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1-10mg/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。

[0104] 5. 治疗效力

[0105] 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。其中临床上对治疗效力的判断方法包括但不限于检测如下指标,从而评估肾功能:血清肌酸酐水平、肌酸酐清除率、24-小时尿蛋白排出率(UAER)、肾小球滤过率、尿白蛋白/肌酸酐比例、白蛋白分泌率和肾脏活检等。例如,肾小球滤过率可以说明肾小球过度滤过和过度灌注的情况,指示糖尿病肾病早期症状缓解程度。肾小球滤过率是肾脏每分钟产生的滤液的体积,可用各种方法确定,如测量过滤标记物如聚糖、碘酞酸盐或碘海醇的尿清除率。更常用的方法是,可通过确定肌酸酐(一种由肌肉产生并释放到血液中的蛋白质)清除率来估算肾小球滤过率。肌酸酐清除率(通常表示为毫升/分钟)可通过比较给定时间(例如12或24小时)内尿液中收集的肌酸酐水平和血液中的肌酸酐水平来确定。成年男性的典型肌酸酐清除率约为97-137毫升/分钟,成年女性约为88-128毫升/分钟。肌酸酐清除率与尿肌酸酐排泄成正比,与血清肌酸酐浓度成反比。

[0106] 通常将肌酸酐清除率/肾小球滤过率或尿白蛋白排出率作为主要效力评估指标。同时可以增添其他次要指标以评估本发明药物对相关并发症的效力,例如增加甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白等检测来评估血脂变化,增加治疗前后收缩压、舒张压水平检测来评估高血压状况缓解程度等。

[0107] 6. 制品或药盒

[0108] 本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒,其包含可用于治疗糖尿病肾病的本发明纤溶酶原。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糖尿病肾病和糖尿病肾病相关疾病。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器,诸如磷酸盐缓冲的盐水,林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者角度来看所需的其它物质,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤物、针和注射器。此外,所述制品包含带有使用说明书的包装插页,包括例如指示所述组合物的使用者将纤溶酶原组合物以及治疗伴随的疾病的其它药物给药患者。

[0109] 附图简述

[0110] 图1显示14-15周龄的db/db小鼠在给药纤溶酶原后体重变化。

[0111] 图2显示14-15周龄的db/db小鼠在连续11天给予纤溶酶原后肾脏PAS染色观察结果。

[0112] 图3显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给予纤溶酶原后体重变化。

[0113] 图4显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肾脏PAS染色观察结果。

[0114] 图5显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肾脏HE染色观察结果。

[0115] 图6显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肾脏纤维蛋白免疫染色观察结果。

[0116] 图7显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肾脏Bc1-2免疫染色观察结果。

[0117] 图8显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肾脏IgM免疫染色观察结果。

[0118] 图9显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肝脏纤维蛋白免疫染色观察结果。

[0119] 图10显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后肝脏F4/80免疫染色观察结果。

[0120] 图11显示24-25周龄的db/db小鼠在连续31天给药纤溶酶原后视网膜PAS染色观察结果。

[0121] 图12显示24-25周龄的db/db小鼠在连续15天给药纤溶酶原后血清中D-二聚体的含量检测结果。

[0122] 图13显示24-25周龄的db/db小鼠在给药纤溶酶原后第0、4、7、11、16天检测机械诱发痛感应能力的结果。

[0123] 图14显示24-25周龄的db/db小鼠在给药纤溶酶原后第0、4、7、11、16天检测冷刺激感应能力的结果。

[0124] 图15显示24-25周龄的db/db小鼠在给药纤溶酶原31天后血清心肌肌钙蛋白I浓度检测结果。

[0125] 图16显示24-25周糖尿病后期神经损伤小鼠给予纤溶酶原15天后坐骨神经纤维蛋白免疫组化染色观察结果。

[0126] 图17 24-25周糖尿病小鼠纤溶酶原31天后血清谷丙转氨酶ALT检测结果。

实施例

[0127] 实施例1纤溶酶原对糖尿病早期小鼠体重影响

[0128] 14-15周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各5只。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。给纤溶酶原组小鼠按1mg/0.1mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第0、3、6、12天分别称体重。

[0129] 结果显示给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组在第0、3、6、12天体重无显著差异(图1),说明纤溶酶原对动物体重影响不大。

[0130] 实施例2纤溶酶原对糖尿病早期小鼠肾小球系膜基质和基底膜增生的影响

[0131] 14-15周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各5只。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。给纤溶酶原组小鼠按1mg/0.1mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第12天,处死小鼠并取左肾在Carnoy固定液中固定24小时。固定后的肾脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为5 μ m,切片脱蜡复水后用苏木素和Schiff氏液染色(PAS染色),1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,并酒精梯度脱水二甲苯透明后封片,切片在显微镜下400倍下观察。

[0132] 结果显示,与给纤溶酶原组(图2B)相比,给溶媒PBS对照组(图2A)肾小球基底膜明显增厚,系膜基质明显增生,毛细血管腔变窄。定量分析显示,给溶媒PBS对照组肾小球系膜基质显著增多,且统计差异显著(图2C)。说明注射纤溶酶原能够使肾小球系膜基质成分的沉积显著减少,表明纤溶酶原能显著促进糖尿病小鼠肾脏损伤的修复。

[0133] 实施例3纤溶酶原对糖尿病晚期小鼠体重的影响

[0134] 24-25周龄db/db雄鼠20只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各10只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第0、4、7、11、16、21、26、31天分别称体重。

[0135] 结果显示,给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组在第0、4、7、11、16、21、26、31天体重无显著差异(图3),说明纤溶酶原对动物体重影响不大。

[0136] 实施例4纤溶酶原对糖尿病晚期小鼠肾小球系膜基质和基底膜增生的影响

[0137] 24-25周龄db/db雄鼠20只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各10只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取左肾在Carnoy固定液中固定24小时。固定后的肾脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。切片厚度为5 μ m,切片脱蜡复水后用苏木素和Schiff氏液染色(PAS染色),1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,并酒精梯度脱水二甲苯透明后封片,切片在显微镜下400倍下观察。

[0138] 结果显示,与给纤溶酶原组(图4B)相比,给溶媒PBS对照组(图4A)肾小球基底膜明显增厚,系膜基质明显增生,毛细血管腔变窄,说明注射纤溶酶原能够使肾小球系膜基质成分的沉积显著减少,表明纤溶酶原对糖尿病小鼠肾脏损伤有显著的修复功能。

[0139] 实施例5纤溶酶原对糖尿病晚期小鼠肾脏的保护作用

[0140] 24-25周龄db/db雄鼠20只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各10只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取肾脏在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的肾脏经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为5 μ m,切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE染色),1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,并酒精梯度脱水封片,切片在显微镜下200倍下观察。

[0141] HE染色结果显示,给溶媒PBS对照组(图5A)和给纤溶酶原组(图5B)均可观察到少量肾小球萎缩、发育不良、肾小管上皮细胞空泡化的现象以及少量炎性细胞浸润(\uparrow)。但给溶媒PBS对照组小鼠还观察到较大面积的肾间质充血(*),肾小球壁层基底膜增生(\blacktriangle),并且给纤溶酶原组壁层基底膜增生要轻于给溶媒PBS对照组。此外,解剖时观察到1只给溶媒PBS对照组小鼠右肾水肿。这说明给纤溶酶原后肾脏损伤程度改善。

[0142] 实施例6纤溶酶原促进糖尿病晚期小鼠肾脏纤维蛋白水解

[0143] 24-25周龄db/db雄鼠20只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各10只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取肾脏在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的肾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5 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。10%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;时间到后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠纤维蛋白(原)抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBS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,TBS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。

[0144] 纤维蛋白原是纤维蛋白的前体,在组织存在损伤的情况下,作为机体对损伤的一种应激反应,纤维蛋白原水解成纤维蛋白沉积在损伤部位^[29-31]。因此,可将损伤局部纤维蛋白水平作为损伤程度的一个标志。

[0145] 结果显示,给纤溶酶原组(图6B)比给溶媒PBS对照组(图6A)纤维蛋白原阳性着色浅。说明注射纤溶酶原能够显著降低糖尿病小鼠肾脏纤维蛋白沉积,反映出纤溶酶原对糖尿病小鼠肾脏损伤有显著修复作用。

[0146] 实施例7纤溶酶原促进糖尿病晚期小鼠肾脏凋亡抑制蛋白Bcl-2表达

[0147] 24-25周龄db/db雄鼠20只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各10只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取肾脏在10%中性福尔马林固定液中固

定24小时。固定后的肾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5 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。10%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;时间到后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠Bcl-2抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBS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,TBS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。

[0148] Bcl-2为细胞凋亡抑制蛋白,在凋亡刺激因子作用下会下调表达^[32,33]。Bcl-2免疫组化结果显示,给纤溶酶原组(图7B)肾小管上皮细胞阳性表达着色要明显深于给溶媒PBS对照组(图7A),且前者的着色范围更广。定量分析结果与观察结果一致,且具有显著差异(如图7C)。这表明纤溶酶原能促进糖尿病小鼠肾脏细胞凋亡抑制分子Bcl-2的表达,从而抑制糖尿病小鼠肾脏组织细胞的凋亡。

[0149] 实施例8纤溶酶原降低糖尿病晚期小鼠肾脏的损伤

[0150] 24-25周龄db/db雄鼠8只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各4只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天检测生理指标结束,处死小鼠并取肾脏在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的肾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5 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。山羊抗鼠IgM(HRP)抗体(Abcam)室温孵育1小时,TBS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400倍下观察。

[0151] 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^[34-36]。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。

[0152] 结果显示,给纤溶酶原组(图8B)小鼠肾小球IgM的阳性着色浅于给溶媒PBS对照组,并且范围较对照组小(图8A),定量分析结果与观察结果一致,且统计差异显著,这表明注射纤溶酶原后肾小球的损伤得到了明显的改善,反映出纤溶酶原对糖尿病小鼠肾脏损伤有显著修复作用。

[0153] 实施例9纤溶酶原减少糖尿病晚期肝组织纤维蛋白水平

[0154] 24-25周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各5只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取肝脏组织在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的肝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5 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。10%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;时间到后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠纤维蛋白(原)抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBS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,TBS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。

[0155] 纤维蛋白原是纤维蛋白的前体, 在组织存在损伤的情况下, 作为机体对损伤的一种应激反应, 纤维蛋白原水解成纤维蛋白^[29-31]。因此可将组织器官局部纤维蛋白水平作为该组织器官损伤程度的一个标志。

[0156] 研究发现, 与给溶媒PBS对照组 (图9A) 相比, 给纤溶酶原组 (图9B) 的小鼠其肝脏组织纤维蛋白阳性着色浅, 说明注射纤溶酶原能够显著降低糖尿病小鼠肝脏纤维蛋白沉积, 反映出纤溶酶原对糖尿病小鼠肝脏损伤有显著修复功能。

[0157] 实施例10纤溶酶原促进糖尿病晚期小鼠肝脏组织的炎症修复

[0158] 24-25周龄db/db雄鼠10只, 随机分为两组, 给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组, 每组各5只。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, 连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。给纤溶酶原31天后处死小鼠并取肝脏组织在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的肝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5 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。10%正常羊血清 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭1小时, 时间到后甩去血清, 用PAP笔圈出组织。针对F4/80的兔多克隆抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBS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, TBS洗2次。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400倍下观察。

[0159] F4/80为巨噬细胞标志物。巨噬细胞作为炎症阶段的主要吞噬细胞, 负责清除机体损伤处组织和细胞的坏死碎片以及病原体等, 因此, 局部巨噬细胞的量可以表示炎症反应的程度和阶段。

[0160] 实验发现, 给纤溶酶原组 (图10B) 与给溶媒PBS对照组 (图10A) 相比, 给纤溶酶原组小鼠的F4/80阳性表达明显降低, 说明给纤溶酶原后肝脏组织炎症减弱。图10C为F4/80免疫组化阳性表达数定量分析结果A, 给纤溶酶原组F4/80表达量显著减少, 且具有统计学差异, 说明注射纤溶酶原能够显著促进糖尿病小鼠肝脏炎症的修复。

[0161] 实施例11纤溶酶原改善糖尿病晚期小鼠视网膜的损伤

[0162] 24-25周龄db/db雄鼠20只, 随机分为两组, 给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组, 每组各10只。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, 连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原, 给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第32天处死小鼠并取左侧眼球在多聚甲醛固定液中固定24小时。固定后的眼球剥离出视网膜后, 置于1mL 3%胰酶 (Solarbio) 的EP管中, 在摇床中37 $^{\circ}$ C震荡消化2-3h。待视网膜出现软化、脱落的现象后小心的将视网膜移入装有蒸馏水的EP管中, 于摇床中37 $^{\circ}$ C震荡2-3h, 使视网膜上多余的组织脱落。轻柔的吹打视网膜, 使其只剩血管层后在玻片上铺片, 自然风干。视网膜于Schiff氏液染色 (PAS染色), 1%盐酸酒精分化, 氨水返蓝, 并酒精梯度脱水二甲苯透明后封片, 在显微镜下400倍下观察。

[0163] 相关研究显示, 糖尿病会引起视网膜病变, 导致视网膜血管内皮细胞增生, 周细胞丢失以及无细胞血管的形成^[37,38]。

[0164] 从实验结果可以看出,与纤溶酶原组(图11B)相比,给溶媒PBS对照组(图11A) db/db鼠视网膜毛细血管管径粗细不一,血管管壁增厚深染,血管内皮细胞(▲)增生,周细胞(↓)明显减少,而给纤溶酶原组(图11B)病理改变明显减轻;定量分析发现给纤溶酶原组与给溶媒PBS对照组相比无细胞毛细血管长度(图11C)显著减少,并且统计学分析结果显示显著差异。说明纤溶酶原能够显著促进糖尿病后期小鼠视网膜损伤的修复。

[0165] 实施例12纤溶酶原促进糖尿病造成的微血栓的溶解

[0166] 24-25周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各5只。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,连续给药15天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第16天摘眼球取血,全血静置后血清用于检测血液中D-二聚体含量。

[0167] 结果显示,给药15天后,给纤溶酶原组血清中D-二聚体含量显著上升(图12),说明给纤溶酶原后,由于糖尿病造成的微血栓显著溶解。

[0168] 实施例13纤溶酶原促进糖尿病后期神经损伤小鼠对机械触诱发痛感应能力的修复

[0169] 24-25周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组各5只。实验开始当天记为第0天称重分组并开始做生理实验,实验第二天开始给纤溶酶原或PBS并记为第1天,连续给药15天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在给纤溶酶原后第0、4、7、11、16天用Von-Frey纤维丝(Stoelting,USA)检测动物对机械性损伤的敏感程度。以2.0g力为起始力,先检测其左脚。若5次刺激有2次有缩爪反应即为阳性,若为阳性即用小一级的力再对其右脚进行刺激;若为阴性,则用大一级的力对其右脚进行刺激,如此左右脚交替刺激,刺激间隔为5分钟,总共刺激6次,然后根据S.R.Chaplan et al. (1994)^[39]介绍的方法计算其50%缩爪的阈值。

[0170] 研究发现,与给溶媒PBS对照组相比,给纤溶酶原组的糖尿病小鼠机械触诱发痛反应均一性增加,且在第16天检测时发现与给溶媒PBS对照组相比出现了极显著差异(图13),说明纤溶酶原修复了神经损伤晚期的糖尿病小鼠对机械触诱发痛(mechanical allodynia)的感应能力。

[0171] 实施例14纤溶酶原对糖尿病后期神经损伤小鼠冷刺激感应的修复

[0172] 24-25周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组各5只。实验开始当天记为第0天称重分组并开始做生理实验,实验第二天开始给纤溶酶原或PBS并记为第1天,连续给药15天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在给药后第0、4、7、11、16天用去针头注射器挤出一滴丙酮液珠并轻触db/db鼠足底,使其覆盖整个足底。从左脚开始,每隔3分钟轮流刺激其左右脚,共刺激10次,并统计缩爪反应次数。反应百分比=缩爪次数/刺激次数×100%。

[0173] 实验结果显示,在第0和第4天时,给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组对丙酮刺激并无显著差异,而第7天开始观察到显著差异,在第16天则观察到极显著差异,P值<0.0001(图14),说明给药15天后,糖尿病小鼠几乎完全恢复了对冷刺激的反应,表明了纤溶酶原极显著地修复了糖尿病后期的神经对冷刺激感应能力。

[0174] 实施例15纤溶酶原促进糖尿病晚期心肌损伤的修复

[0175] 24-25周龄db/db雄鼠28只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组12只,给纤溶酶原组16只。实验开始当天记为第0天称重分组,实验第二天开始给纤溶酶原或PBS并记为第1天,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。第32天摘除眼球取血,以3500r/min离心15-20分钟,并取心取上清进行心肌钙蛋白I的浓度测定。

[0176] 心肌钙蛋白I(cardiac troponin,CTNI)是心肌损伤的重要标志物,其血清浓度能够反映心肌损伤的程度^[40]。结果显示,给纤溶酶原组心肌钙蛋白I的浓度明显低于给溶媒PBS对照组,且具有极显著的统计学差异(图15)。说明纤溶酶原能够极显著促进糖尿病后期小鼠心肌损伤的修复。

[0177] 实施例16纤溶酶原减少糖尿病后期神经损伤小鼠神经组织纤维蛋白水平

[0178] 24-25周龄db/db雄鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组,每组各5只。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,连续给药15天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。在第16天处死小鼠并取坐骨神经在10%中性福尔马林固定液中固定24小时。固定后的坐骨神经经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为5 μ m,切片脱蜡复水后水洗1次,然后用PAP笔圈出组织。以3%TBS稀释的双氧水孵育15分钟,水洗3次。10%正常羊血清(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭1小时,吸走多余血清。兔抗小鼠纤维蛋白(原)抗体(Abcam)室温孵育1小时或4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBS洗3次。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,TBS洗3次。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400倍下观察。

[0179] 纤维蛋白原是纤维蛋白的前体,在组织存在损伤的情况下,作为机体对损伤的一种应激反应,纤维蛋白原水解成纤维蛋白,因此可将纤维蛋白水平作为损伤程度的一个标志。纤维蛋白也是组织损伤后形成血栓的主要成分,因此,也可将纤维蛋白水平作为血栓的一个标志。

[0180] 研究发现,与给溶媒PBS对照组(图16A)相比,给纤溶酶原组(图16B)的小鼠其坐骨神经纤维蛋白的水平降低,说明纤溶酶原具有降解纤维蛋白水平的功能,损伤得到一定程度的修复,也说明纤溶酶原能够促进神经组织周围血栓的溶解。

[0181] 实施例17纤溶酶原促进糖尿病小鼠肝脏损伤的修复

[0182] 25-28周龄db/db雄鼠9只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组3只,给纤溶酶原组6只。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,连续给药31天。给纤溶酶原组小鼠按2mg/0.2mL/只/天尾静脉注射纤溶酶原,给溶媒PBS对照组给予相同体积的PBS。给纤溶酶原31天后摘眼球采全血,待血清析出后4 $^{\circ}$ C3500r/min离心10分钟,取上清液进行检测。本实验使用谷丙转氨酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号C009-2),运用赖氏比色法(Reitman-Frankel)检测血清中谷丙转氨酶(ALT)的含量。

[0183] 谷丙转氨酶是肝脏健康状态的一个重要指标^[41,42],谷丙转氨酶的正常参考值区间为9~50U/L。检测结果显示,给溶媒PBS对照组血清中ALT的含量显著高于正常生理指标,而给纤溶酶原组已经恢复到体内的正常水平,并且给纤溶酶原组ALT的含量显著低于给溶

媒PBS对照组,且具有统计学差异(图17)。说明在糖尿病晚期模型小鼠中,注射纤溶酶原能有效修复肝损伤。

[0184] 参考文献:

[0185] [1]Md.Shahidul Islam,2013.Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress Since 1960s.Journal of Diabetes Research.

[0186] [2]Seaquist ER,Goetz FC,Rich S,Barbosa J:Familial clustering of diabetic kidney disease.Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy.N Engl J Med 320:1161-1165,1989.

[0187] [3]Krolewski AS:Genetics of diabetic nephropathy:Evidence for major and minor gene effects.Kidney Int 55:1582-1596,1999.

[0188] [4]Iyengar SK,Fox KA,Schachere M,Manzoor F,Slaughter ME,Covic AM,Orloff SM,Hayden PS,Olson JM,Schelling JR,Sedroe JR:Linkage analysis of candidate loci for endstage renal disease due to diabetic nephropathy.J Am Soc Nephrol 14[Suppl 2]:S195-S201,2003.

[0189] [5]Young BA,Maynard C,Boyko EJ:Racial differences in diabetic nephropathy,cardiovascular disease,and mortality in a national population of veterans.Diabetes Care 26:2392-2399,2003.

[0190] [6]Tarnow L,Rossing P,Nielsen FS,Fagerudd JA,Poirier O,Parving HH: Cardiovascular morbidity and early mortality cluster in parents of type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy.Diabetes Care 23:30-33,2000.

[0191] [7]Mauer SM,Lane P,Zhu D,Fioretto P,Steffes MW:Renal structure and function in insulin-dependent diabetes mellitus in man.J Hypertens Suppl 10: S17-S20,1992.

[0192] [8]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.

[0193] [9]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.

[0194] [10]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.

[0195] [11]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.

[0196] [12]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.

[0197] [13] 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.

[0198] [14] Saksela, O. and Rifkin, D. B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.

[0199] [15] 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.

[0200] [16] Wallén P (1980). Biochemistry of plasminogen. In *Fibrinolysis*, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC).

[0201] [17] 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.

[0202] [18] Collen, D. and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.

[0203] [19] Alexander, C. M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.

[0204] [20] Mignatti, P. and Rifkin, D. B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.

[0205] [21] 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.

[0206] [22] 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.

[0207] [23] 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.

[0208] [24] Rifkin, D. B., Mazzieri, R., Munger, J. S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.

[0209] [25] 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.

[0210] [26] 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.

[0211] [27] 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.

[0212] [28] 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.

[0213] [29] 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.

[0214] [30] Dimitrios Davalos, Katerina Akassoglou. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 2012. 34 (1) : 43-62.

[0215] [31] 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.

[0216] [32] Mounjaroen 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.

[0217] [33] 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.

[0218] [34] 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.

[0219] [35] 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.

[0220] [36] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkou 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.

[0221] [37] Cunha-Vaz J, Bernardes R: Nonproliferative retinopathy in diabetes type 2. Initial stages and characterization of phenotypes, *Prog Retin Eye Res* 2005, 24: 355-377.

[0222] [38] Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R: Downregulation of fibronectin

overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes* 2003,52:1229-1234.

[0223] [39] S.R.Chaplan et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1994) 55-63.

[0224] [40] R.Langhorn and J.L.Willesen. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 2016;30:36-50.

[0225] [41] Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS (Jan 1955). Transaminase activity in human blood. *The Journal of Clinical Investigation*. 34 (1):126-31.

[0226] [42] 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.

序列表

<110> 深圳瑞健生命科学研究院有限公司

<120> 一种预防和治疗糖尿病肾病的方法

<130> PCK02772

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2376

<212> DNA

<213> 不含有信号肽的天然纤溶酶原 (Glu-PLG, Glu-纤维蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 1

```

gagcctctgg atgactatgt gaatacccag ggggcttca tgttcagtgt cactaagaag 60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc 120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180
aggaagtect ccataatcat taggatgaga gatgtagttt ttttgaaaa gaaagtgtat 240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaa 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 aggaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacggcaa aatttccaag 540
accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gcccacacgc tcatggatac 600
attccttcca aatttccaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa ccccgatagg 660
gagctgcggc cttggtgttt caccaccgac cccaacaagc gctgggaact ttgtgacatc 720
ccccgctgca caacacctcc accatcttct ggtcccacct accagtgtct gaagggaaca 780
ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctgtt accgtgtccg ggacacctg tcagcactgg 840
agtgcacaga cccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg 900
gatgaaaact actgccgcaa tctgacgga aaaagggccc catggtgcca tacaaccaac 960
agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata cegtctgtg actcctcccc agtatccacg 1020
gaacaattgg ctcccacagc accacctgag ctaaccctg tggccagga ctgctaccat 1080
ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag 1140
tcttggatcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacc cagaaaacta cccaatgct 1200
ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgttttacc 1260
acagacccca gcgtcaggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg 1320
agtgtttag cacctccgcc tgttgcctg ctccagatg tagagactcc ttccgaagaa 1380
gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440
acgccatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcatttt cactccagag 1500
acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaaat tactgccgta accctgatgg tgatgtaggt 1560
ggtccctggt gctacacgac aaatccaaga aaactttacg actactgtga tgtccctcag 1620

```

tgtgcggccc cttcatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgtcctgga 1680
agggtttag gggggtgtgt ggcccacca cattcctggc cctggcaagt cagtcttaga 1740
acaaggtttg gaatgcactt ctgtggaggc accttgatat cccagagtg ggtgttgact 1800
gctgcccact gcttggagaa gtccccaagg cttcctcct acaaggatcat cctgggtgca 1860
caccaagaag tgaatctcga accgcatggt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920
gagcccacac gaaaagatat tgccttgcta aagctaagca gtccctgccgt catcactgac 1980
aaagtaatcc cagcttgtct gccatcccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040
ttcatcactg gctggggaga aaccaaggt acttttggag ctggccttct caaggaagcc 2100
cagctccctg tgattgagaa taaagtgtgc aatcgctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160
caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220
agtggaggtc ctctggtttg cttcgagaag gacaaataca ttttacaagg agtcacttct 2280
tggggtcttg gctgtgcaag cccaataag cctggtgtct atgttcgtgt ttcaaggttt 2340
gttacttggg ttgagggagt gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2

<211> 791

<212> PRT

<213> 不含有信号肽的天然纤溶酶原 (Glu-PLG, Glu-纤维蛋白溶酶原) 氨基酸序列

<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
Gly Asn Gly	Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr	Thr Val Thr Gly			
465		470		475	480

Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile
 485 490 495
 Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys
 500 505 510
 Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn
 515 520 525
 Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro
 530 535 540
 Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly
 545 550 555 560
 Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln
 565 570 575
 Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu
 580 585 590
 Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser
 595 600 605
 Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val
 610 615 620
 Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu
 625 630 635 640
 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
 <210> 3
 <211> 2433
 <212> DNA
 <213> 含有信号肽的天然纤溶酶原(来源于swiss prot)的核酸序列
 <400> 3
 atggaacata aggaagtgg tcttctactt cttttatttc tgaaatcagg tcaaggagag 60
 cctctggatg actatgtgaa taccaggagg gtttactgt tcagtgtcac taagaagcag 120
 ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaaatgtg aggaggacga agaattcacc 180
 tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg 240
 aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc 300
 tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagaggga cgatgtcca aacaaaaaat 360
 ggcacacct gtcaaaaatg gagttccact tctcccaca gacctagatt ctacctgct 420
 acacaccct cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagaca cgatccgcag 480
 gggccctgg tctatactac tgatccagaa aagagatatg actactgca cattcttgag 540
 tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtgga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc 600
 atgtctggac tggaaatgca ggccctgggac tctcagagcc cacacgctca tggatacatt 660
 ccttccaaat ttccaaacaa gaacctgaag aagaattact gtcgtaacce cgataggagg 720
 ctgcggcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgtt gggaactttg tgacatcccc 780
 cgctgcacaa cacctccacc atcttctggg cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt 840
 gaaaactatc gcgggaatgt ggtgtttacc gtgtccgggc acactgtca gcaactggagt 900
 gcacagacce ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgca aaatttggat 960
 gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggcccat ggtgccatac aaccaacagc 1020
 caagtgcggg gggagtactg taagataccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa 1080
 caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt 1140
 gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct 1200
 tggatcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagacccag aaaactacce aatgctggc 1260
 ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctgggtg ttttaccaca 1320
 gaccccgagc tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaaat gctcaggaac agaagcaggt 1380
 gttgtagcac ctccgcctgt tgtctgctt ccagatgtag agactcctc cgaagaagac 1440
 tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg 1500
 ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca 1560
 aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgcgtaacc ctgatggtga tgtaggtggt 1620
 ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt 1680
 gcggcccctt catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcttgggaag 1740
 gttgtagggg ggtgtgtggt ccacccacat tcttggccct ggcaagtcag tcttagaaca 1800
 aggtttggaa tgcaactctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 1860
 gccactgct tggagaagtc cccaagcct tcactctaca aggtcactct gggtgcacac 1920
 caagaagtga atctcgaacc gcattgtcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag 1980

cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgcegtcat cactgacaaa 2040
 gtaatccag cttgtctgcc atcccaaat tatgtggteg ctgaccggac cgaatgtttc 2100
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 2160
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 2220
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 2280
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 2340
 ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttgtt 2400
 acttggattg agggagtgat gagaaataat taa 2433

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> 含有信号肽的天然纤溶酶原(来源于swiss prot)的氨基酸序列

<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
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys

515	520	525
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr		
530	535	540
Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys		
545	550	555
Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys		
565	570	575
Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp		
580	585	590
Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly		
595	600	605
Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu		
610	615	620
Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His		
625	630	635
Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg		
645	650	655
Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser		
660	665	670
Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser		
675	680	685
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
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
Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn		
805	810	

<210> 5

<211> 2145

<212> DNA

<213> LYS77-PLG(Lys-纤溶酶原)核酸序列

<400> 5

```

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc 60
aaaacaaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagttcca cttctcecca cagacctaga 120
ttctcacctg ctacacaccc ctacagaggga ctggaggaga actactgcag gaatccagac 180
aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc 240
gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa 300
atttccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacgct 360
catggataca ttcttccaa atttccaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac 420
cccgataggg agctgcggcc ttggtgtttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt 480
tgtgacatcc cccgctgcac aacacctcca ccattctctg gtcccaccta ccagtgtctg 540
aagggaacag gtgaaaaacta tcgcggggaat gtggctgtta cegtgtccgg gcacacctgt 600
cagcactgga gtgcacagac ccctcacaca cataacagga caccagaaaa cttcccctgc 660
aaaaatttgg atgaaaaacta ctgccgcaat cctgacggaa aaagggeccc atgggtccat 720
acaaccaaca gccaaagtgcg gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctctcecca 780
gtatccacgg aacaattgge tcccacagca ccacctgagc taaccctgtg ggtccaggac 840
tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag 900
aagtgtcagt cttggtcate tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac 960
ccaaatgctg gcctgacaat gaactactgc aggaatccag atgccgataa aggcccctgg 1020
tgttttacca cagaccccag cgtcaggtgg gactactgca acctgaaaaa atgctcagga 1080
acagaagcga gtgtttagc acctccgctt gttgtcctgc ttccagatgt agagactcct 1140
tccgaagaag actgtatggt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 1200
gttactggga cgccatgcca ggactgggct gcccaggagc cccatagaca cagcattttc 1260
actccagaga caaatccacg ggcgggtctg gaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt 1320
gatgtaggtg gtccctgggt ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 1380
gtccctcagt gtgcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtgga gccgaagaaa 1440
tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccaccacc attcctggcc ctggcaagtc 1500
agtcttagaa caaggtttgg aatgcacttc tgtggaggca cttgatatac cccagagtgg 1560
gtgttgactg ctgcccactg cttggagaag tcccgaagc cttatccta caaggtcate 1620
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg 1680
ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgtc 1740
atcactgaca aagtaatccc agettgtctg ccatecccaa attatgtggt cgctgaccgg 1800
accgaatggt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggccttctc 1860
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920
ggaagagtccaatccaccga actctgtget gggeatttgg ccggaggcac tgacagttgc 1980
cagggtgaca gtggaggtec tctggtttgc ttcgagaagg acaatacat tttacaagga 2040
gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttctgtgt 2100
tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 2145

```

<210> 6

<211> 714

<212> PRT

<213> LYS77-PLG(Lys-纤溶酶原)氨基酸序列

<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
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 225 230 235 240
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 245 250 255
 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 260 265 270

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 275 280 285
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 290 295 300
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 305 310 315 320
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 325 330 335
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 340 345 350
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 355 360 365
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 370 375 380
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 385 390 395 400
 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
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-纤溶酶原)核酸序列

<400> 7

```

gagcctctgg atgactatgt gaataccag ggggcttcac tgttcagtgt cactaagaag 60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaaat gtgaggagga cgaagaattc 120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180
aggaagtcct 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 gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480
gagtgtgaag aggcgcccc ttcatattgat tgtgggaagc ctcaagtgga gccgaagaaa 540
tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccceccac attcttgccc ctggcaagtc 600
agtcttagaa caaggtttgg aatgcaette tgtggaggea cttgatata cccagagtgg 660
gtgttgactg ctgcccactg cttggagaag tcccgaagge cttcactcta caaggtcatc 720
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg 780
ctgttcttgg ageccacacg aaaagatatt gcettgctaa agctaagcag tectgcccgc 840
atcactgaca aagtaatccc agettgtctg ccatecccaa attatgtggt cgctgaccgg 900
accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggecttctc 960
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1020

```


ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg cggaggcac tgacagttgc 1080
 cagggtgaca gtggagggtcc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 1140
 gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 1200
 tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 1245

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> delta-plg(delta-纤溶酶原)氨基酸序列

<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(小纤维蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 9

gtcaggtggg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgttgtagca 60
 cctccgcctg ttgtcctgct tccagatgta gagactcett ccgaagaaga ctgtatgttt 120
 gggaatggga aaggataccg aggcaagagg ggcaccactg ttactgggac gccatgccag 180
 gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcattttca ctccagagac aaatccacgg 240
 gcgggtctgg aaaaaaatta ctgccgtaac cctgatggtg atgtaggtgg tccttggtgc 300
 tacacgacaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tcctcagtg tgcggcccct 360
 tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtcttggaag ggttgtaggg 420
 ggggtgtgtg cccacccaca ttcttgccc tggcaagtca gtcttagaac aaggtttgga 480
 atgcacttct gtggaggeac cttgatatcc ccagagtggg tgttgactgc tgeccactgc 540
 ttggagaagt cccaaggec ttcatectac aaggteatcc tgggtgcaca ccaagaagtg 600
 aatctcgaac cgcattgtca ggaaatagaa gtgtctagge tgttcttgga gcccacacga 660
 aaagatattg ccttgctaaa gctaagcagt cctgccgta tcaactgacaa agtaatccca 720

gcttgtctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcactggc 780
 tggggagaaa cccaaggtac ttttgagct ggcttctca aggaagccca gctccctgtg 840
 attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa 900
 ctctgtgctg ggcatTTggc cggaggcact gacagttgcc agggtgacag tggaggtcct 960
 ctggtttTgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcacttcttg gggTcttggc 1020
 tgtgcacgcc ccaataagcc tggTgtctat gttcgtgttt caaggttTgt tacttggatt 1080
 gagggagtga tgagaaataa ttaa 1104

<210> 10

<211> 367

<212> PRT

<213> Mini-plg(小纤维蛋白溶酶原)氨基酸序列

<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			
Gln	Glu	Pro	His	Arg	His	Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg
65				70						75					80
Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly
				85						90					95
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys
			100						105					110	
Asp	Val	Pro	Gln	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln
			115						120				125		
Val	Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala
			130				135					140			
His	Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly
145					150					155					160
Met	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr
				165						170				175	
Ala	Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val
				180					185					190	
Ile	Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu
				195					200					205	
Ile	Glu	Val	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala

210	215	220
Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro		
225	230	235
Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys		240
	245	250
Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu		255
	260	265
Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg		270
	275	280
Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly		285
	290	300
His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro		
305	310	315
Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser		
	325	330
Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg		335
	340	345
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(微纤维蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 11

```

gcccccttcat ttgattgtgg gaagcctcaa gtggagccga agaaatgtcc tggaagggtt 60
gtaggggggt gtgtggccca cccacattcc tggcctggc aagtcagtct tagaacaagg 120
tttggaatgc acttctgtgg aggcaccttg atatccccag agtgggtggt gactgctgcc 180
cactgcttgg agaagtcccc aaggccttca tctacaagg tcctcctggg tgcacaccaa 240
gaagtgaatc tcgaaccgca tggtcaggaa atagaagtgt ctaggctggt cttggagccc 300
acacgaaaag atattgcett gctaaagcta agcagtctg ccgctcacc tgacaaagta 360
atcccagctt gtctgccate cccaaattat gtggtegctg accggaccga atgtttcatc 420
actggctggg gagaaaccca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480
cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtttc tgaatggaag agtccaatcc 540
accgaactct gtgtgggca tttggccgga ggcaactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600
ggtcctctgg tttgcttcca gaaggacaaa tacattttac aaggagtcac ttcttgggggt 660
cttggtctgtg cacgccccaa taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gtttgttact 720
tggattgagg gactgatgag aaataattaa

```

<210> 12

<211> 249

<212> PRT

<213> Micro-plg(微纤维蛋白溶酶原)氨基酸序列

<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
 Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln
 65 70 75 80
 Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu
 85 90 95
 Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110
 Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro
 115 120 125
 Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly
 130 135 140
 Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu
 145 150 155 160
 Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly
 165 170 175
 Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr
 180 185 190
 Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys
 195 200 205
 Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala
 210 215 220
 Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr
 225 230 235 240
 Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 245

<210> 13

<211> 684

<212> DNA

<213> 丝氨酸蛋白酶(结构)域的核酸序列

<400> 13

gtttagggg ggtgtgtggc ccaccacat tcttggeect ggcaagtcag tcttagaaca 60
 aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatecc cagagtgggt gttgactgct 120
 gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatectaca aggtcatect gggcgcacac 180
 caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttgag 240
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300
 gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggtcg ctgaccggac cgaatgtttc 360
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420
 ctccccgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 480
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttgccc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 540
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 600
 ggtcttggct gtgcacgecc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttgtt 660
 acttggattg agggagtgat gaga 684

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

<213> 丝氨酸蛋白酶(结构)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														

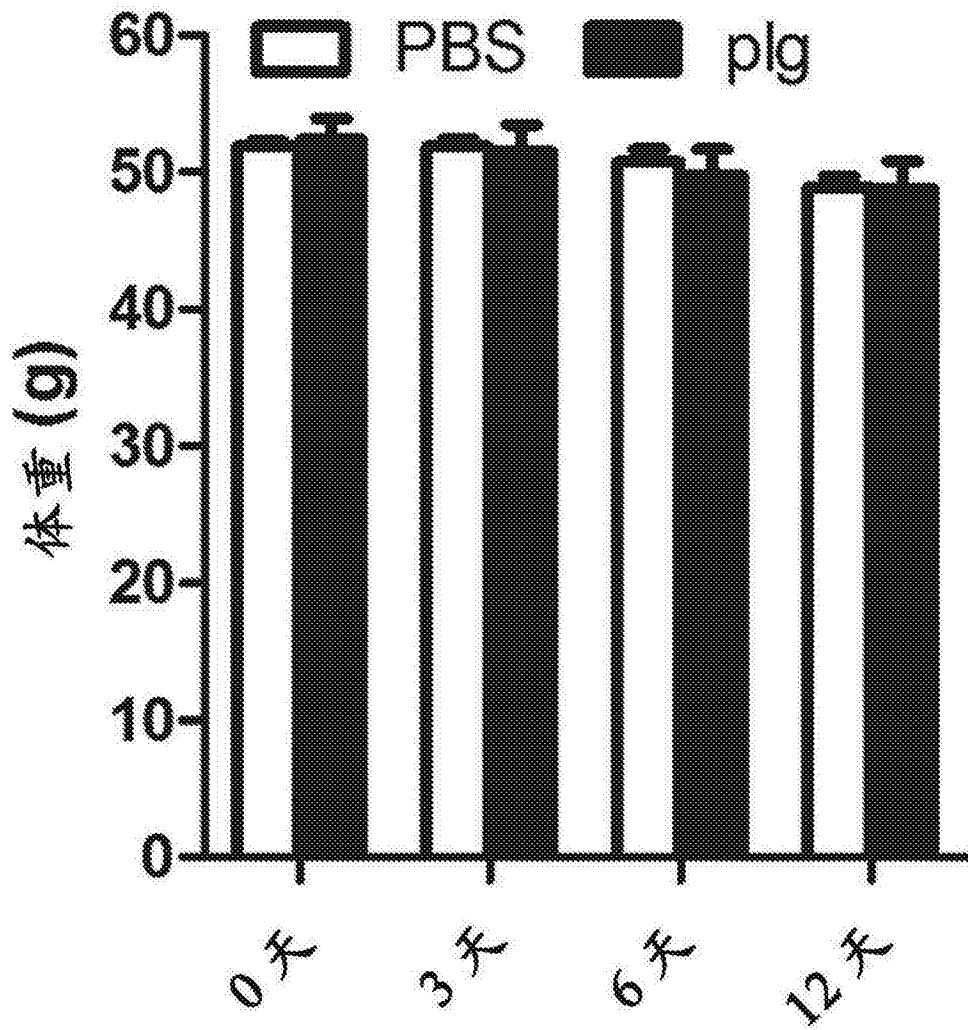


图1

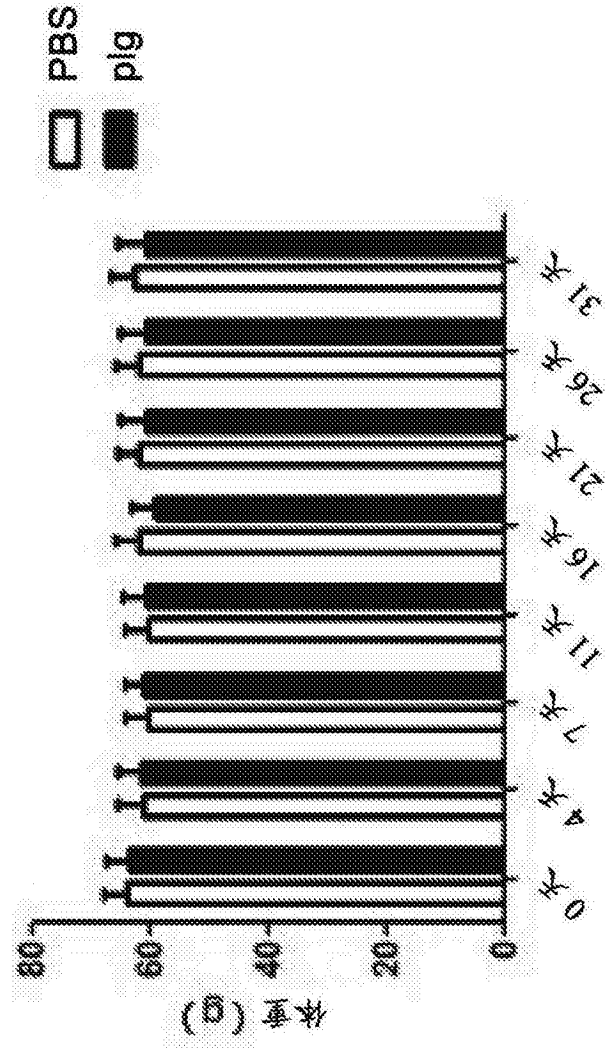
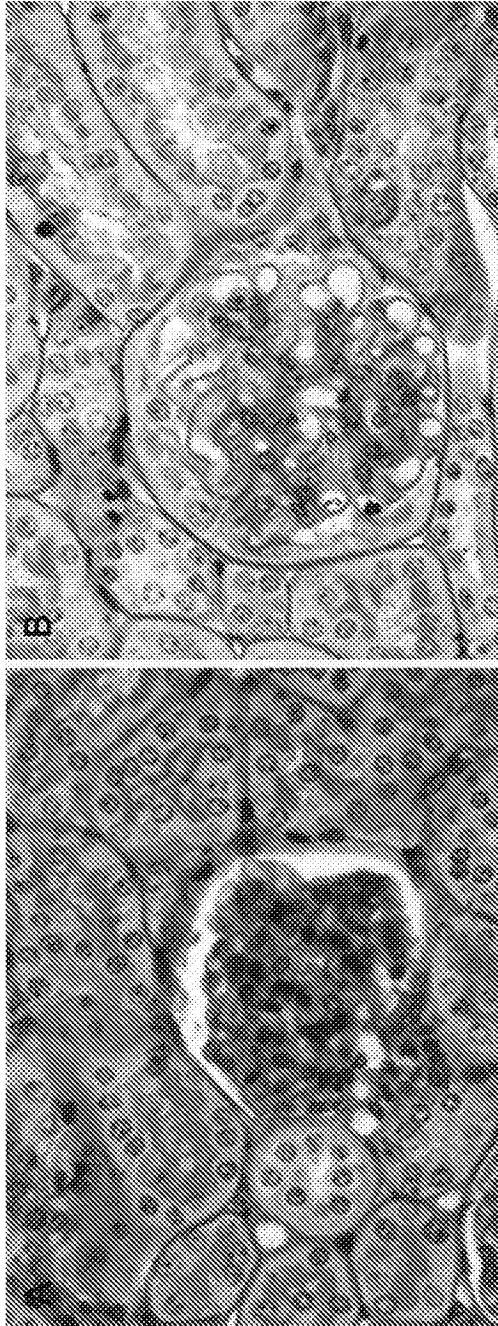
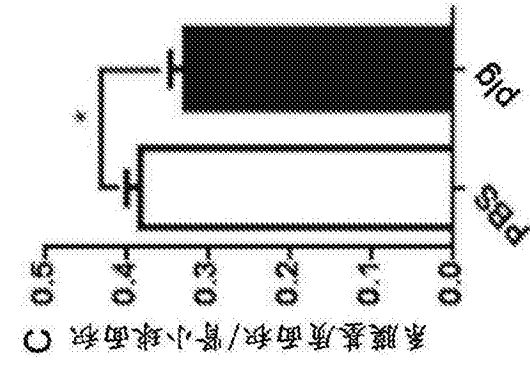


图3

图2

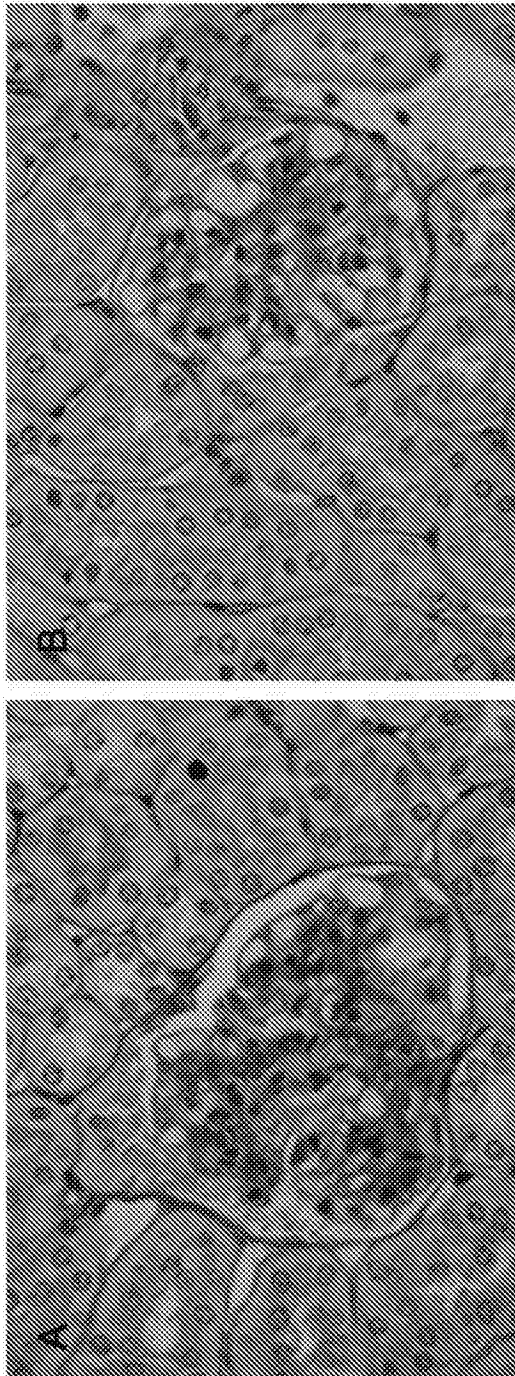


图4

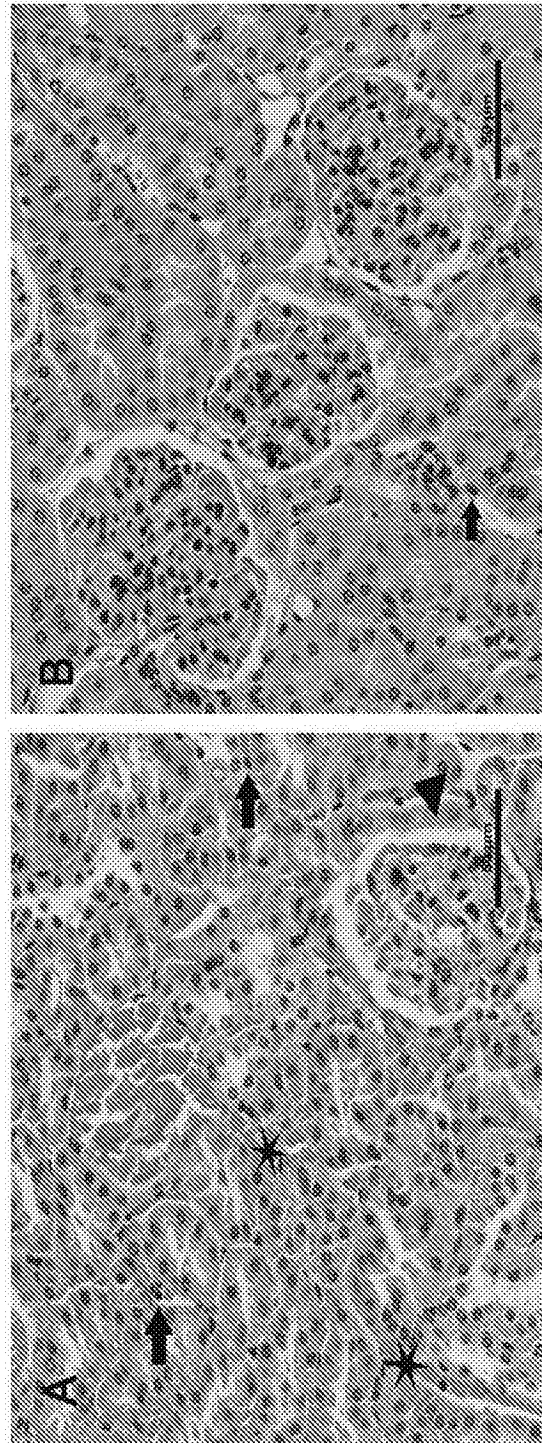


图5

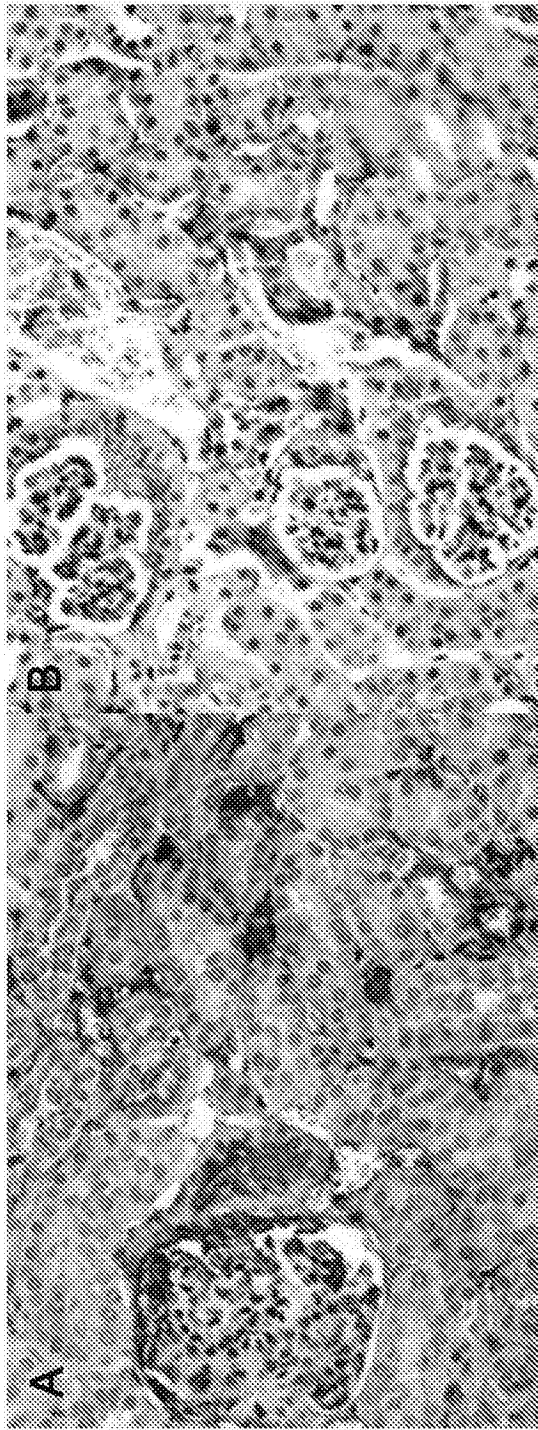


图6

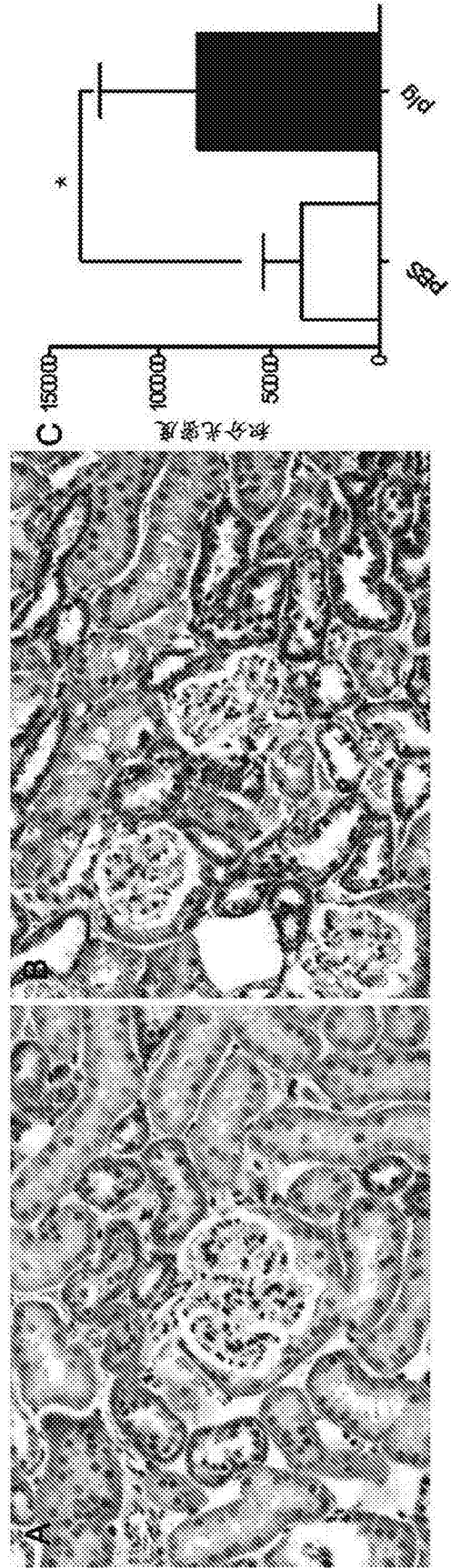


图7

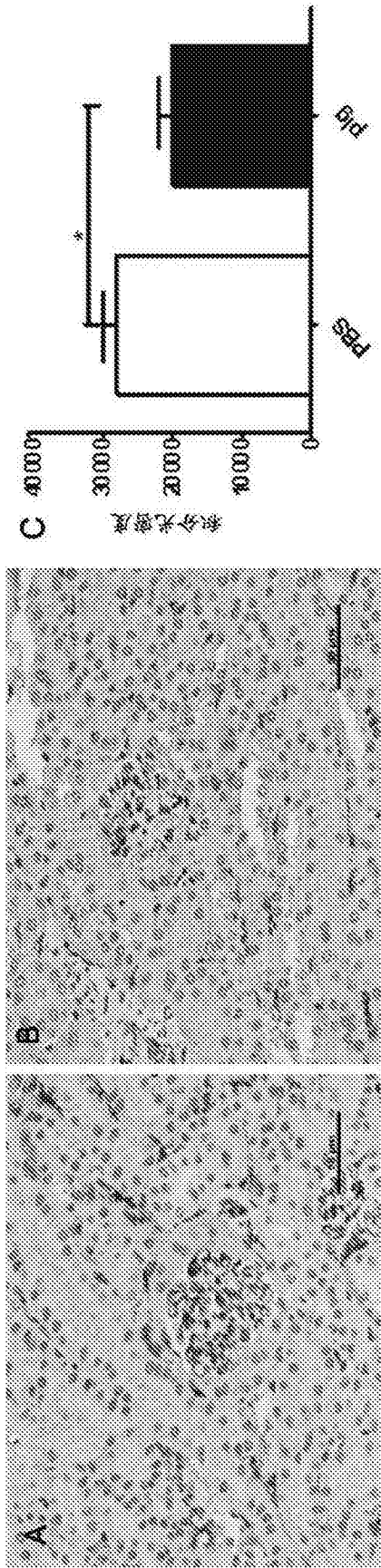


图8

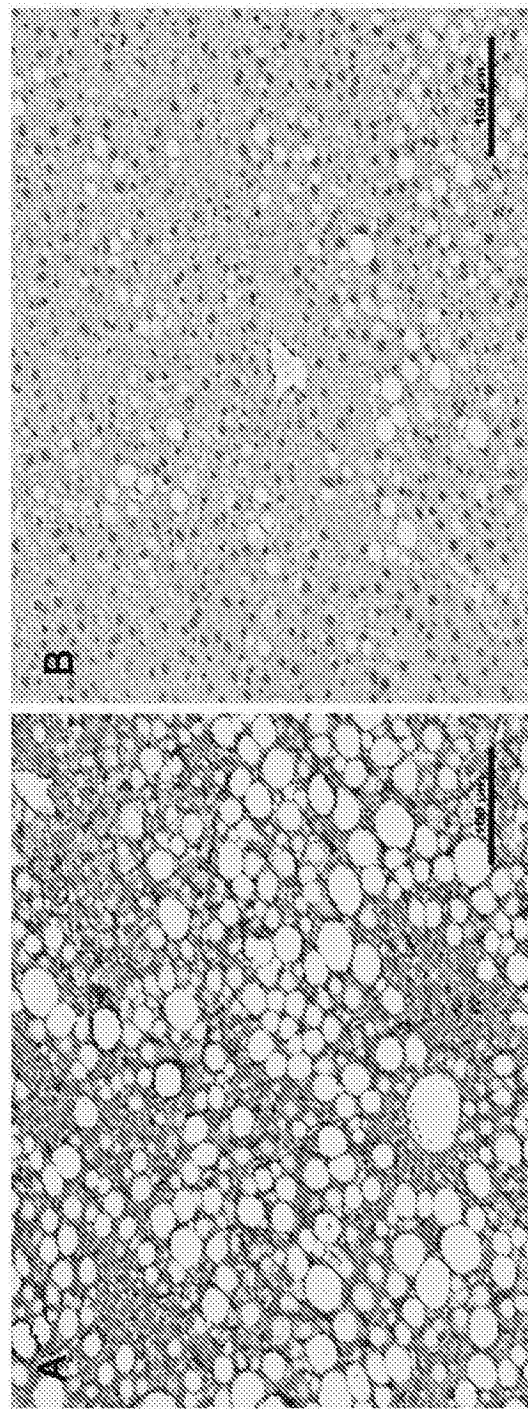


图9

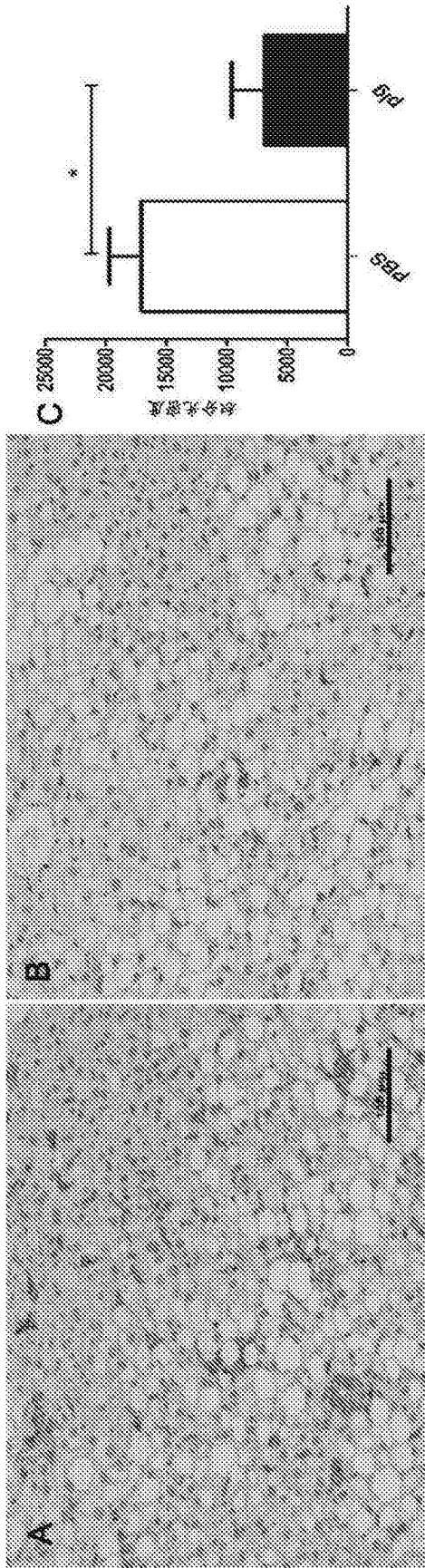


图10

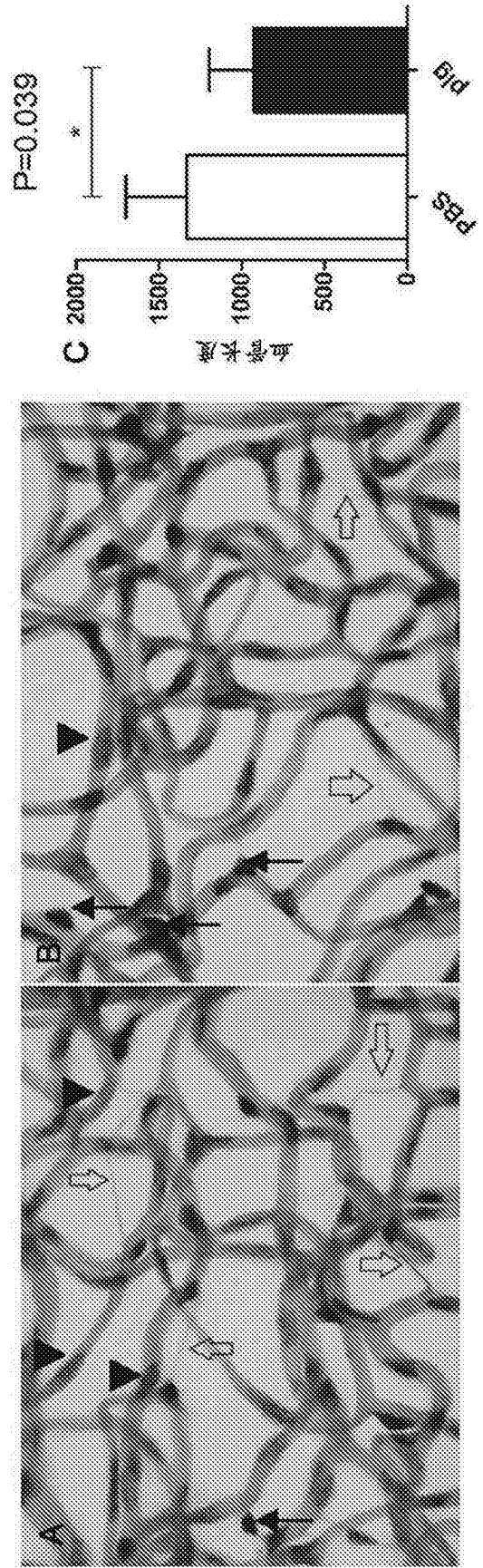


图11

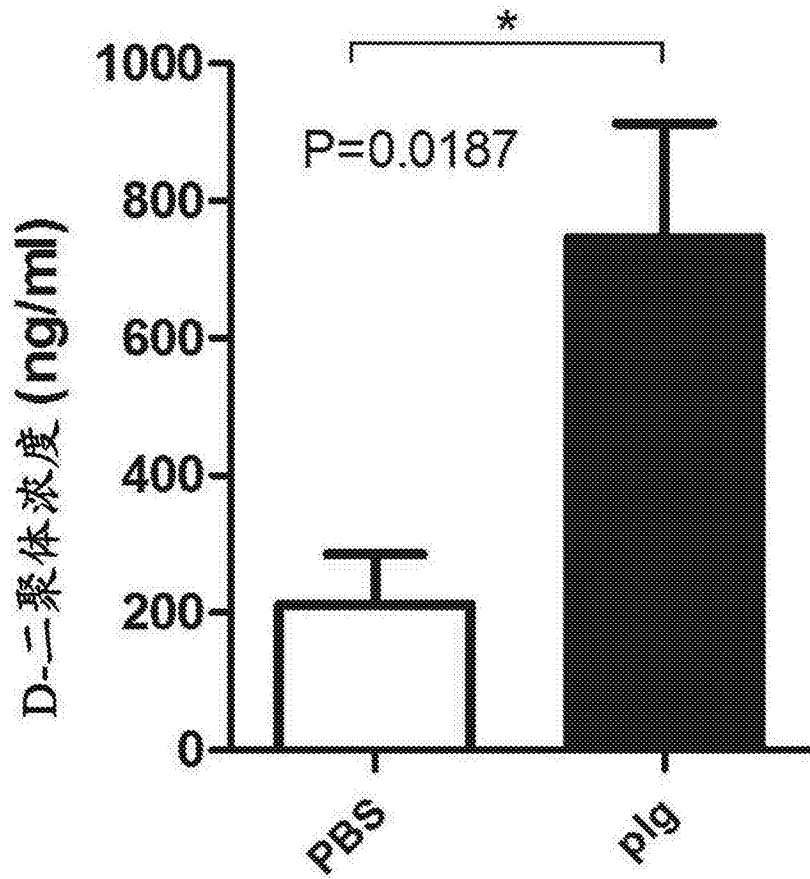


图12

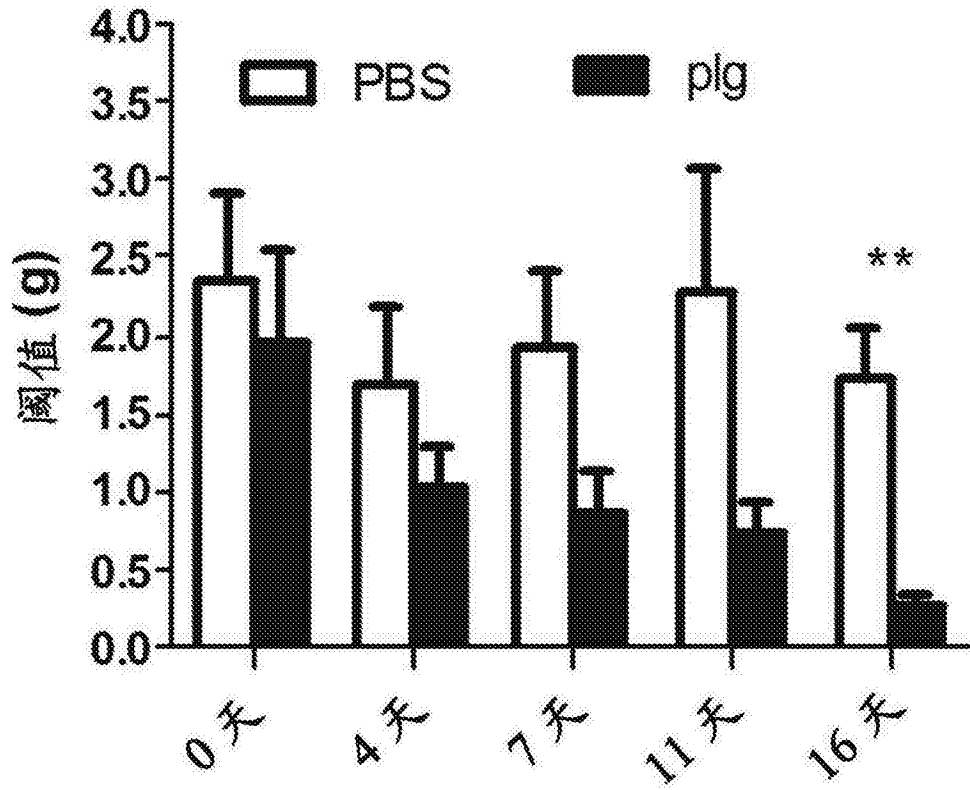


图13

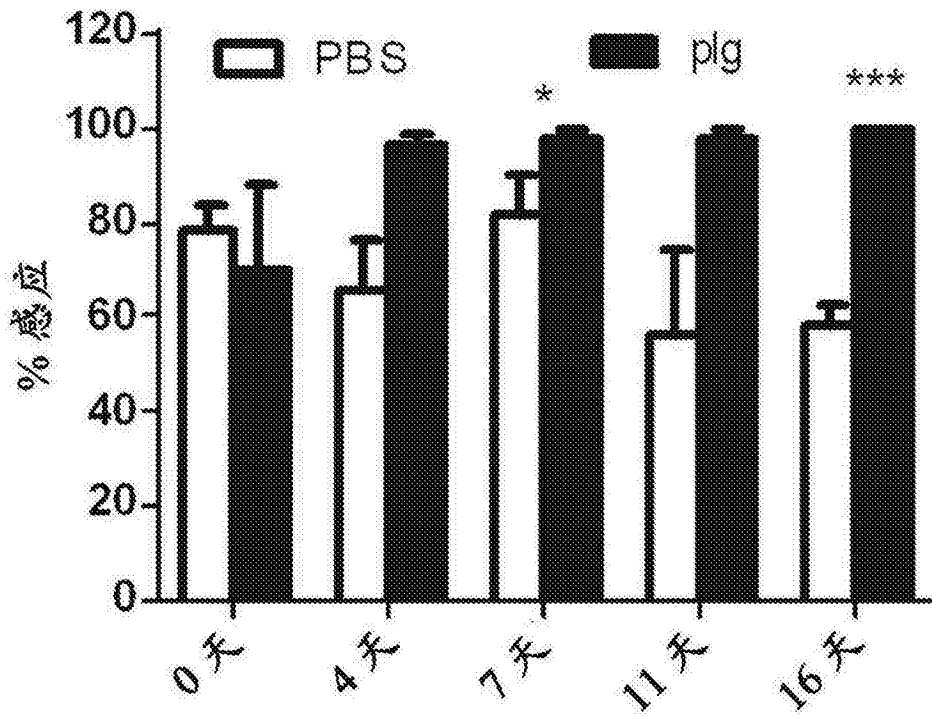


图14

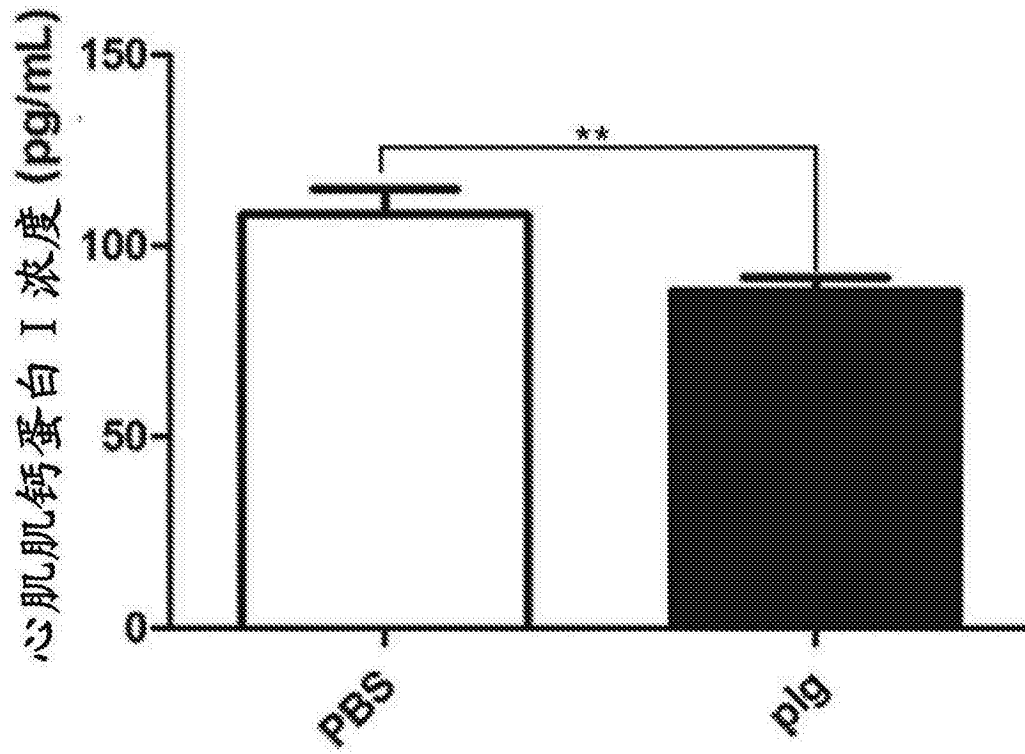


图15

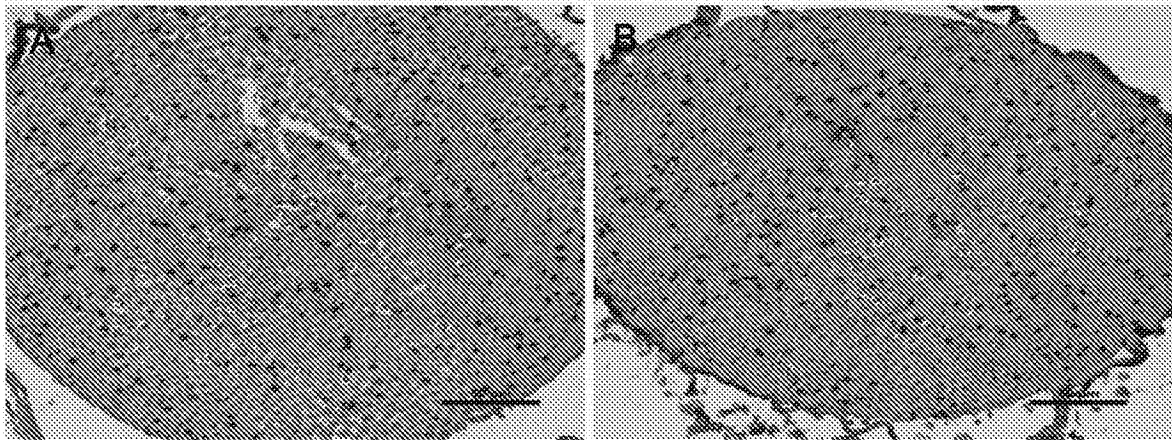


图16

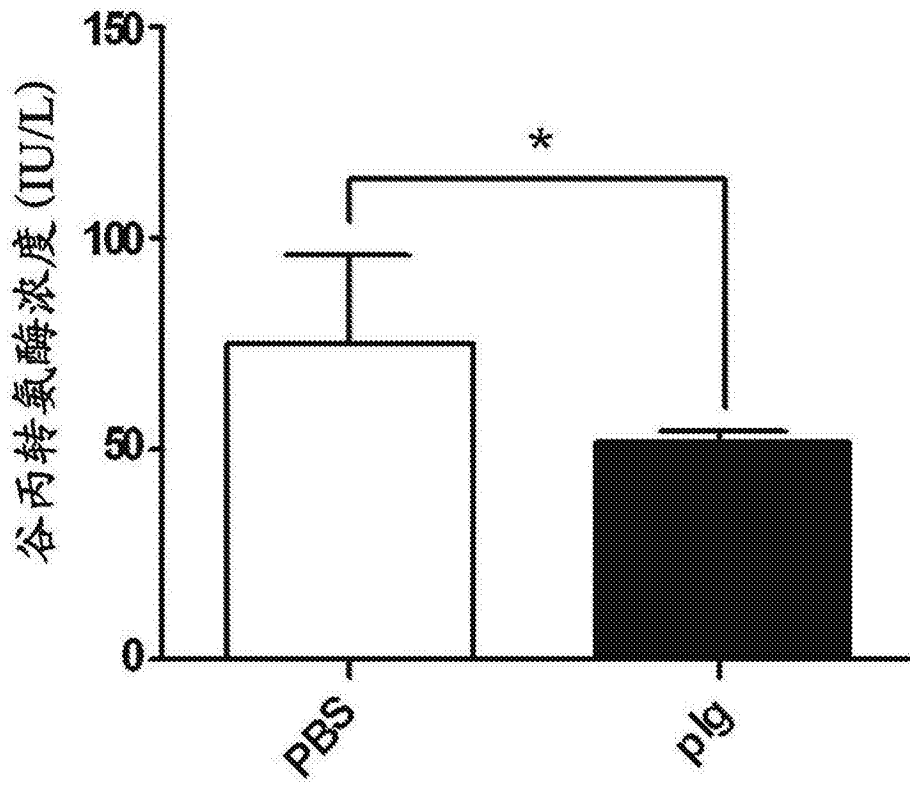


图17