



(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 I684459 B

(45) 公告日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 11 日

(21) 申請案號：106120464

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 19 日

(51) Int. Cl. :

*A61K38/47 (2006.01)**A61P9/10 (2006.01)*

(30) 優先權：2016/12/15

世界智慧財產權組織

PCT/CN2016/110168

2016/12/15

世界智慧財產權組織

PCT/CN2016/110172

(71) 申請人：大陸商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：侯德銘

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：22 共 78 頁

(54) 名稱

一種治療動脈粥樣硬化及其併發症的方法

(57) 摘要

本發明涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的方法，包括給藥受試者預防和/或治療有效量的纖溶酶原，所述受試者患有或懷疑患有動脈粥樣硬化及其相關病症。本發明還涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

一種治療動脈粥樣硬化及其併發症的方法

【技術領域】

【0001】 本發明涉及纖維溶酶原在預防和/或治療動脈粥樣硬化及其相關病症方面的作用，進而為預防和/或治療動脈粥樣硬化及其相關病症提供全新的治療策略。

【先前技術】

【0002】 動脈粥樣硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病、腦梗死、外周血管病的主要原因。脂質代謝障礙為動脈粥樣硬化的病變基礎，其特點是受累動脈病變從內膜開始，一般先有脂質和複合糖類積聚、出血及血栓形成，進而纖維組織增生及鈣質沉著，並有動脈中層的逐漸蛻變和鈣化，導致動脈壁增厚變硬、血管腔狹窄。病變常累及大中肌性動脈，一旦發展到足以阻塞動脈腔，則該動脈所供應的組織或器官將缺血或壞死。

【0003】 動脈粥樣硬化是眾多心腦血管疾病共同的病理基礎，也是心血管系統疾病中最常見的疾病，嚴重危害人類健康。動脈粥樣硬化的發生發展包括脂質入侵、血小板活化、血栓形成、內膜損傷、炎性反應、氧化應激、血管平滑肌細胞(VSMC)啟動、選擇性基質代謝及血管重建等[1]。雖經歷了近一個世紀的研究，很多學者也提出了關於AS發病機制的不同學說，如脂質滲入學說、巨噬細胞受體缺失學說、致平滑肌突變學說、損傷應答學說、炎性反應學說、血流動力學說及免疫學說等，但任何一種學說均不能單獨全面的解釋AS的發生發展。近年來，大量細胞及分子水準的實驗研究資料擴展了人們對內皮細胞、VSMC、單核巨噬細胞及血小板正常自穩態的認識，從而對其在AS的形成和發病機制方面的作用有了進一步的認識。

1. 血管內皮細胞損傷的作用

【0004】 研究發現，動脈粥樣硬化斑塊出現前很長時間血管內皮功能損傷就早已形成。Esper等[2]報導，內皮細胞能夠產生大量具有雙向功能的分子，能夠使促進和抑制效應達到平衡。當內皮細胞失去維持這一細微平衡的能力時，脂質和白細胞(主要是單核細胞和T淋巴細胞)就會侵入到內皮，從而引起炎症反應的發生和脂紋的形成。內皮細胞的功能障礙、活化及形態學損傷，可引發血液中的單核細胞、血小板及血管壁中膜VSMC的變化而最終形成AS。其具體機制如下：(1)內皮細胞的通透性增加是AS的主要的起始環節，是脂質進入動脈壁內皮下的最早病理變化[3]；(2)使血小板和單核細胞的黏附增加。Ott等[4]報導，一個功能失調的內皮細胞由於其表面的細胞黏附分子表達增加可能會促進單核細胞的黏附，從而促使含有細菌的單核細胞從循環血滲入到AS斑塊中；(3)分泌多種生長因數，如單核細胞趨化蛋白21(MPC21)、成纖維細胞生長因數、轉化生長因數(TGF)和血小板源性生長因數(PDGF)等，從而吸引單核細胞聚集並黏附於內皮，並遷入內皮下的間隙，經其表面的清道夫受體、CD36受體和Fc受體介導，大量攝取進入內膜下被氧化的脂質，形成單核細胞源性的泡沫細胞。Boos等[3]研究指出，內皮損傷程度在某種程度上可作為AS的發病指征及其嚴重程度的新型指標。

2. 血小板的作用

【0005】 動脈內皮細胞損傷後，可促進血小板黏附到受損的內皮細胞上，從而促進PDGF的釋放，導致肌內膜細胞不斷增生，最終導致膠原合成，形成AS斑塊。在AS血栓形成的最終階段，血小板的黏附、活化和聚集可導致動脈閉塞和繼發性缺血[5]。血小板與內皮細胞、結締組織相互作用，對局部管壁AS的發生有重要意義。血小板在AS中的作用主要表現在：(1)任何形式的內皮損傷，均能使血小板大量黏附聚集於內皮局部，啟動凝血系統,引起血栓形成。(2)分泌和釋放多種活性物質，如PDGF、血小板第4因數、 β 血栓球蛋白等對VSMC及單核細胞均具有強烈的化學趨化作用，參與VSMC遊出、增殖及修飾主動脈內膜，吸引單核細胞黏附內皮。有學者指出PDGF具有趨化成纖維作用和促進單核細胞增殖各自的抗原決定簇，在致AS過程中起重要作用。(3)靜脈內皮細胞能產生一氧化氮和前列環素，並不斷在肺內釋放，調節血小板的功能。

3. 脂質在動脈粥樣硬化發生、發展中的作用

第 2 頁，共 43 頁(發明說明書)

【0006】 大量研究證明，AS的病理改變與血脂水準，特別是血漿膽固醇及三醯甘油水準密切相關[6]。有學者提出，脂質和脂肪酸的沉積是內皮細胞功能障礙和AS形成過程中重要的病理機制。研究發現，與正常動脈相比，有AS斑塊的動脈載脂蛋白C1和載脂蛋白E的蛋白和基因表達均明顯升高，這可能是AS形成的原因而不單單是一種結果[7]。現已得到公認的是，高脂血症在AS發病中的作用機制除直接引起內皮細胞損傷外，主要是使內皮細胞的通透性增加，這與低密度脂蛋白(LDL)的氧化修飾成為氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)有關。當ox-LDL穿過未受損的內皮時，血漿LDL被運輸到內皮下間隙進行氧化修飾。LDL引起巨噬細胞的清除反應和中膜VSMC的增生形成粥樣斑塊。以上變化可最終導致動脈內膜脂紋、纖維斑塊和/或粥樣斑塊的形成。

4. 單核巨噬細胞的作用

【0007】 研究表明，AS斑塊中含有包括單核細胞、單核細胞來源的巨噬細胞、ox-LDL負載的巨噬細胞(即泡沫細胞)和T淋巴細胞等炎性反應細胞浸潤[8]。單核-巨噬細胞在AS中的作用可以概括為：(1)吞噬作用:病變早期的泡沫細胞多來源於血中的單核細胞,後者進入內皮下轉變為巨噬細胞，其表面的特異性受體可與ox-LDL結合，從而攝入大量膽固醇，成為泡沫細胞。(2)參與炎性反應和免疫反應：上述吞噬過程能夠通過向細胞外基質釋放炎性反應因數而誘發特有的炎性反應。在AS病灶內可見T淋巴細胞的浸潤，同時與非破裂的斑塊相比，破裂的AS斑塊的纖維帽中含有更多的巨噬細胞。(3)參與增殖反應：巨噬細胞被啟動後可釋放多種細胞因數和生長因數，促進中膜VSMC的遷移和增生。同時，巨噬細胞表達多種金屬蛋白酶和絲氨酸蛋白酶類，使細胞外基質退化，斑塊不穩定甚至有破裂的趨勢[9]。

5. VSMC的作用

【0008】 經過近些年的研究，人們認識到中膜VSMC增殖、遊走進入內膜及基質蛋白的合成，是參與AS進展期病變形成的主要環節，並在AS和再狹窄的內膜增厚中起重要作用[10]。AS斑塊和再狹窄的發病和進展包含血管壁細胞間的複雜的交互效應，細胞因數、炎性反應、趨化因數、生長因數從中發揮了重要作用。遊走的VSMC經其表面的LDL受體介導吞噬脂質，形成VSMC源性泡沫

細胞，參與病變的形成。同時，這些增生的內膜VSMC還能合成膠原蛋白、彈性蛋白和糖蛋白等，以及巨噬細胞吞噬LDL釋放游離脂質，使病變的內膜增厚變硬，促進硬化斑塊的形成。對此，人們做出很多努力來抑制上述細胞的蓄積，並在支架術後再狹窄方面取得了很大成功[11]。

【0009】 糖尿病與動脈粥樣硬化關係密切，表現為糖尿病患者出現動脈粥樣硬化的時間早、程度重和預後差，而動脈粥樣硬化又是糖尿病患者的主要死亡原因。

【0010】 臨床發現糖尿病患者的冠狀動脈血管病理改變的特點主要是病變累及的血管較多、冠狀動脈狹窄嚴重，病變更加彌漫嚴重，其機制多認為是血糖代謝異常引起動脈粥樣硬化，隨著更進一步深入的研究，更多的結果表明，糖尿病引起動脈粥樣硬化並非單一因素所致，而是通過多種途徑以及較為複雜的機制來誘發和促進動脈粥樣硬化的發生及發展，例如巨噬細胞極化、巨噬細胞移動抑制因數途徑、糖基化終產物途徑、清道夫受體上調、胰島素抵抗、泛素-蛋白酶體系統（ubiquitin proteasome system，UPS）啟動、血小板源性生長因數（platelet-derived growth factor，PDGF）啟動途徑等[12]。

【0011】 在2型糖尿病患者體內白色脂肪等組織中，存在巨噬細胞極化失衡，表現為M1型巨噬細胞增多。M1型巨噬細胞主要分泌TNF- α 、IL-6、單核細胞趨化蛋白1等，發揮促炎作用，上述細胞因數不僅誘導胰島素抵抗的發生而且促進動脈粥樣硬化[13]。

【0012】 巨噬細胞移動抑制因數（macrophagemigration inhibitory factor，MIF）是一種重要的參與免疫和炎症反應的因數。在糖尿病患者中，MIF的表達增加，可能與糖尿病合併動脈粥樣硬化有關[14]。其引起動脈粥樣硬化機制如下：（1）MIF使巨噬細胞在炎症部位浸潤、活化，加速脂質的吞噬，誘導泡沫細胞的產生。有研究發現，巨噬細胞攝取氧化低密度脂蛋白使MIF上調，相應的MIF可以增加氧化低密度脂蛋白的攝取，促進泡沫細胞形成。（2）MIF可以活化血管內皮細胞及平滑肌細胞，使其分別表達單核細胞趨化蛋白1和細胞間黏附分子1，使單核巨噬細胞趨化遷移增加，從而加速動脈粥樣硬化。在各種動脈

模型中使用MIF 抗體，可以使內皮下巨噬細胞、泡沫細胞、巨噬細胞活化的標誌物減弱。

【0013】 糖尿病患者中，糖基化終產物（advanced glycation end products，AGEs）與可以促進動脈粥樣硬化病變的發生及進展。AGEs 動脈壁內葡萄糖與蛋白質和脂蛋白的非酶糖基化反應產物，其與相應受體結合後通過如下機制加速動脈粥樣硬化：（1）長期高血糖可使AGEs 產生增加，AGEs 可以修飾蛋白質、核酸和脂質，使活性氧簇產生增加，增強氧化應激，AGEs 在通過增加中性粒細胞氧自由基的產生的同時能夠增加中性粒細胞NADPH 氧化酶活性，促進血管氧化應激，增加糖尿病患者心血管疾病的發生率[15]。（2）AGEs 增加黏附分子表達，髓系與非髓系細胞表面上AGEs 受體可以增加血管黏附分子1 的表達，加速糖尿病相關的動脈粥樣硬化[16]。

【0014】 胰島素抵抗（insulin resistance，IR）是胰島素作用的靶組織對外源性或者內源性胰島素的敏感性以及反應性下降。2 型糖尿病常合併有胰島素抵抗。胰島素抵抗通過如下機制可以加速糖尿病動脈粥樣硬化：（1）胰島素抵抗加速巨噬細胞凋亡：研究發現，糖尿病患者進展期的動脈粥樣硬化斑塊核心較非糖尿病患者明顯增大[17]。糖尿病進展期動脈粥樣硬化病變處，由於巨噬細胞胰島素抵抗，內質網應激所誘導的細胞凋亡明顯增加，促進斑塊核心增大。（2）在胰島素抵抗和代謝綜合征患者中發現CX3CL1/CX3CL1 軸活化明顯增加，與動脈粥樣硬化加速呈正相關。動物模型中發現該軸的活化增加斑塊的不穩定性。胰島素抵抗通過活化CX3CL1/CX3CL1 軸誘導血管平滑肌細胞凋亡加速動脈粥樣硬化[18]。巨噬細胞維生素D3 受體敲除促進胰島素抵抗，加速動脈粥樣硬化[19]。

【0015】 糖尿病患者的內源性氧化應激增強使得巨噬細胞的UPS 被過度啟動[20]。UPS的過度啟動，促進糖尿病炎症因數（如血管細胞黏附因數1 以及細胞間黏附分子1）的表達和分泌，引起血管內皮細胞不可逆性損傷，導致動脈粥樣硬化[21]。

【0016】 此外，糖尿病患者的AGEs、血管緊張素II、內皮素、炎症和高血脂狀態增加PDGF 途徑的活性，而PDGF 途徑活性的增加具有促進炎症反應的

作用。PDGF 具有上調結締組織生長因數表達的作用，促進內皮細胞和成纖維細胞的遷移、黏附和增殖，加劇動脈粥樣硬化的發生[22]。

【0017】 目前為止，對動脈粥樣硬化的藥物治療主要有降血脂藥物、抗血小板藥物、降血壓藥物、擴張血管藥物、降血糖藥物、抗凝血藥物、溶血栓藥物。我們在研究中驚奇地發現纖溶酶原可以消滅動脈管壁的脂質積聚、沉積、降低纖維組織增生，修復動脈粥樣硬化對血管壁的損傷，改善動脈粥樣硬化導致的組織器官缺血損傷和由於組織器官缺血所致的相關病症。

【發明內容】

【0018】 本發明涉及治療受試者冠狀動脈粥樣硬化及其相關病症。

【0019】 一方面，本發明涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的方法，包括給藥受試者預防和/或治療有效量的纖溶酶原，所述受試者患有或懷疑患有動脈粥樣硬化及其相關病症。本發明還涉及纖溶酶原用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的纖溶酶原。本發明還涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0020】 在一些實施方案中，所述動脈粥樣硬化包括主動脈粥樣硬化、冠狀動脈粥樣硬化、腦動脈粥樣硬化、肝動脈粥樣硬化、腎動脈粥樣硬化、腸系膜動脈粥樣硬化、下肢動脈粥樣硬化。在一些實施方案中，所述動脈粥樣硬化相關病症包括由於動脈粥樣硬化導致組織、器官缺血而引發的相關病症，包括冠狀動脈粥樣硬化引發的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常、心衰；腦動脈粥樣硬化引起的腦缺血、腦血栓、腦萎縮、腦出血、腦栓塞；腎動脈粥樣硬化引發的腎功能不全、高血壓、腎小球纖維化、腎衰、尿毒癥；腸系膜動脈粥樣硬化引發的飽餐後腹痛、消化不良、便秘、腸壁壞死、便血；下肢動脈粥樣硬化引發的間歇性跛行、壞疽。在一些實施方案中，所述動脈粥樣硬化選自：冠狀動脈粥樣硬化、腦動脈粥樣硬化和腎動脈粥樣硬化。在一些實施方案中，所述動脈粥樣硬化為與糖尿病併發的動脈粥樣硬化。在一些實施方案中，所述

纖溶酶原通過選自如下的一項或多項預防和/或治療動脈粥樣硬化；降低受試者血清總膽固醇水準、降低受試者血清甘油三酯水準、降低受試者血清低密度脂蛋白水準、升高受試者血清高密度脂蛋白水準。在一些實施方案中，所述纖溶酶原通過降低受試者動脈管壁的脂質沉積預防和/或治療動脈粥樣硬化。在一些實施方案中，所述纖溶酶原通過選自如下的一項或多項預防和/或治療動脈粥樣硬化：促進肝臟的脂肪代謝、促進肝臟的脂肪運輸和降低受試者肝臟的脂肪沉積。

【0021】 在又一方面，本發明涉及預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、器官缺血損傷及其相關病症的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、器官缺血損傷及其相關病症的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、器官缺血損傷及其相關病症的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、器官缺血損傷及其相關病症的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、器官缺血損傷及其相關病症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0022】 在一些實施方案中，所述受試者的組織、器官缺血損傷為冠狀動脈粥樣硬化導致的心肌損傷。在一些實施方案中，所述病症為冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰。在一些實施方案中，所述受試者的組織、器官缺血損傷為腦動脈粥樣硬化導致的腦缺血損傷。在一些實施方案中，所述病症為腦缺血、腦血栓、腦萎縮、腦出血或腦栓塞。在一些實施方案中，所述病症為腎功能不全、高血壓、腎小球纖維化、腎衰或尿毒癥。

【0023】 在又一方面，本發明涉及預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的動脈血栓及其相關病症的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的動脈血栓及其相關病症的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的動脈血栓及其相關病症的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防和/或治療受試者由於

動脈粥樣硬化所致的動脈血栓及其相關病症的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防和/或治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的動脈血栓及其相關病症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。在一些實施方案中，所述病症包括冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常、心衰、腦缺血、腦血栓、腦萎縮、腦出血、腦栓塞、腦梗死、腎功能不全、高血壓、腎小球纖維化、腎衰、尿毒癥、腸壞死、間歇性跛行、壞疽。

【0024】 在又一方面，本發明涉及預防和/或治療受試者糖尿病併發的動脈粥樣硬化的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的動脈粥樣硬化的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的動脈粥樣硬化的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的動脈粥樣硬化的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的動脈粥樣硬化的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。在一些實施方案中，所述動脈粥樣硬化選自如下的一項或多項：主動脈粥樣硬化、冠狀動脈粥樣硬化、腦動脈粥樣硬化、腎動脈粥樣硬化、腸系膜動脈粥樣硬化、下肢動脈粥樣硬化。

【0025】 在又一方面，本發明涉及預防和/或治療受試者糖尿病併發的冠狀動脈粥樣硬化的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的冠狀動脈粥樣硬化的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的冠狀動脈粥樣硬化的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的冠狀動脈粥樣硬化的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防和/或治療受試者糖尿病併發的冠狀動脈粥樣硬化的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0026】 在又一方面，本發明涉及預防和/或治療糖尿病受試者的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防和/或治療糖尿病受試者的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防和/或治療糖尿病受試者的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的

藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防和/或治療糖尿病受試者的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防和/或治療糖尿病受試者的冠心病、心絞痛、心肌梗死、心律失常或心衰的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0027】 在又一方面，本發明涉及治療糖尿病或動脈粥樣硬化受試者高脂血症的方法，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於治療糖尿病或動脈粥樣硬化受試者高脂血症的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於治療糖尿病或動脈粥樣硬化受試者高脂血症的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於治療糖尿病或動脈粥樣硬化受試者高脂血症的纖溶酶原。本發明還涉及用於治療糖尿病或動脈粥樣硬化受試者高脂血症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0028】 在一些實施方案中，所述受試者具有如下的一項或多項：血清總膽固醇水準升高、血清甘油三酯水準升高、血清低密度脂蛋白水準升高、血清高密度脂蛋白水準降低。在一些實施方案中，所述高脂血症通過選自如下的一項或多項得到改善；降低受試者血清總膽固醇水準、降低受試者血清甘油三酯水準、降低受試者血清低密度脂蛋白水準、升高受試者血清高密度脂蛋白水準。

【0029】 在又一方面，本發明涉及預防或消滅受試者動脈管壁脂質沉積的方法，其中所述受試者易患動脈粥樣硬化或已患動脈粥樣硬化，包括給藥受試者有效量的纖溶酶原。本發明還涉及纖溶酶原用於預防或消滅受試者動脈管壁脂質沉積的用途。本發明還涉及纖溶酶原在製備用於預防或消滅受試者動脈管壁脂質沉積的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒中的用途。進一步地，本發明還涉及用於預防或消滅受試者動脈管壁脂質沉積的纖溶酶原。本發明還涉及用於預防或消滅受試者動脈管壁脂質沉積的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【0030】 在一些實施方案中，所述易患動脈粥樣硬化的受試者為患有原發性或繼發性脂肪代謝紊亂的受試者。在一些實施方案中，所述易患動脈粥樣硬化的受試者為患有肝臟疾病、腎臟疾病、肥胖症、高脂血症或糖尿病的受試者。

【0031】 在一些實施方案中，所述纖溶酶原可與受試者需要的一種或多種其他藥物或療法聯合施用。在一些實施方案中，所述其他藥物包括：降血脂藥物、抗血小板藥物、降血壓藥物、擴張血管藥物、降血糖藥物、抗凝血藥物、溶血栓藥物，保肝藥物，抗心律失常藥物，強心藥物，利尿藥物，抗感染藥物、抗病毒藥物、免疫調節藥物、炎症調節類藥物、抗腫瘤藥物、激素類藥物、甲狀腺素。在一些實施方案中，所述藥物包括降血脂藥物：他汀類；貝特類；煙酸；消膽胺；安妥明；不飽和脂肪酸如益壽甯、血脂平及心脈樂；藻酸雙酯鈉；抗血小板藥物：阿司匹林；潘生丁；氯吡格雷；西洛他；擴張血管藥物：胍苯嘧嗪；硝酸甘油和消心痛；硝普鈉； α 受體阻斷劑如呱唑嗪； α 受體阻斷劑如酚妥拉明； β 拉受體興奮劑如舒喘靈；卡托普利、依那普利；心痛定、硫氮卓酮；柳丁氨酸、長壓定、前列腺素、心鈉素；溶血栓藥物：尿激酶和鏈激酶；組織型纖溶酶原啟動劑；單鏈尿激酶型纖溶酶原啟動劑；TNK-組織型纖溶酶原啟動劑；抗凝血藥物：肝素；依諾肝素；那曲肝素；比伐盧定。

【0032】 在一些實施方案中，所述纖溶酶原與序列2、6、8、10或12具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖溶酶原活性。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是在序列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個氨基酸，並且仍然具有纖溶酶原活性的蛋白質。

【0033】 在一些實施方案中，所述纖溶酶原是包含纖溶酶原活性片段、並且仍然具有纖溶酶原活性的蛋白質。在一些實施方案中，所述纖溶酶原選自Glu-纖溶酶原、Lys-纖溶酶原、小纖溶酶原、微纖溶酶原、delta-纖溶酶原或它們的保留纖溶酶原活性的變體。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為天然或合成的人纖溶酶原、或其仍然保留纖溶酶原活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原為來自靈長類動物或齧齒類動物的人纖溶酶原直向同系物或其仍然保留纖溶酶原活性的變體或片段。在一些實施方案中，所述纖溶酶原的氨基酸如序列2、6、8、10或12所示。在一些實施方案中，所述纖溶酶原是人天然纖溶酶原。

【0034】 在一些實施方案中，所述受試者是人。在一些實施方案中，所述受試者缺乏或缺失纖溶酶原。在一些實施方案中，所述缺乏或缺失是先天的、繼發的和/或局部的。

【0035】 在一些實施方案中，所述藥物組合物包含藥學上可接受的載劑和用於前述方法的纖溶酶原。在一些實施方案中，所述試劑盒可以是預防性或治療性試劑盒，其包含：(i)用於前述方法的纖溶酶原和(ii)用於遞送所述纖溶酶原至所述受試者的構件(means)。在一些實施方案中，所述構件為注射器或小瓶。在一些實施方案中，所述試劑盒還包含標籤或使用說明書，該標籤或使用說明書指示將所述纖溶酶原投予所述受試者以實施前述任一方法。

【0036】 在一些實施方案中，所述製品包含：含有標籤的容器；和包含(i)用於前述方法的纖溶酶原或包含纖溶酶原的藥物組合物，其中所述標籤指示將所述纖溶酶原或組合物投予所述受試者以實施前述任一方法。

【0037】 在一些實施方案中，所述試劑盒或製品還包含另外的一個或多個構件或容器，該構件或容器中含有其他藥物。在一些實施方案中，所述其他藥物選自下組：降血脂藥物、抗血小板藥物、降血壓藥物、擴張血管藥物、降血糖藥物、抗凝血藥物、溶血栓藥物，保肝藥物，抗心律失常藥物，強心藥物，利尿藥物，抗感染藥物、抗病毒藥物、免疫調節藥物、炎症調節類藥物、抗腫瘤藥物、激素類藥物、甲狀腺素。

【0038】 在前述方法的一些實施方案中，所述纖溶酶原可通過全身或局部給藥，較佳通過以下途徑施用：靜脈內、肌內、皮下給予纖溶酶原來進行治療。在前述方法的一些實施方案中，所述纖溶酶原與適當的多肽載體或穩定劑組合施用。在前述方法的一些實施方案中，所述纖溶酶原以每天0.0001-2000 mg/kg、0.001-800 mg/kg、0.01-600 mg/kg、0.1-400 mg/kg、1-200 mg/kg、1-100 mg/kg、10-100 mg/kg（以每公斤體重計算）或0.0001-2000 mg/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。

【0039】 本發明明確涵蓋了屬於本發明實施方案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方案及其要素的之間的組合，該組合後的技術方案在本文中明確公開。

【圖式簡單說明】

【0040】

圖1係26周齡糖尿病小鼠給予纖溶酶原35天後血清中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)含量檢測結果。結果顯示，在注射人源纖溶酶源35天後，給纖溶酶原組小鼠血清中HDL-C的含量顯著高於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（*表示 $P<0.05$ ）。說明注射纖溶酶原能促進血清HDL-C含量的升高。

圖2係24-25周齡糖尿病小鼠給予纖溶酶原31天後血清中低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)含量檢測結果。結果顯示，糖尿病模型小鼠連續注射人源纖溶酶源31天後，給纖溶酶原組小鼠血清中的LDL-C含量低於給溶媒PBS對照組。說明纖溶酶原能降低血清中LDL-C的含量。

圖3係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後體重的變化。結果顯示，給予纖溶酶原30天後小鼠體重無明顯改變，說明給藥處理對ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠的體重無明顯影響。

圖4係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後血清總膽固醇的檢測結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠總膽固醇濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（*表示 $P<0.05$ ）。說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠血清中總膽固醇的含量。

圖5係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後血清甘油三酯檢測結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠甘油三酯濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（*表示 $P<0.05$ ）。說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠血清中甘油三酯的含量。

圖6係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後血清低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)的檢測結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠LDL-C濃度明

顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（*表示 $P<0.05$ ）。說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠血清中LDL-C的含量。

圖7係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後心臟臟器係數統計結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠心臟臟器係數明顯低於給溶媒PBS對照組。說明纖溶酶原能改善ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠心臟損傷所致的心臟代償性肥大。

圖8係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原10天後大體主動脈油紅O染色圖片。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠主動脈弓、胸主動脈以及腹主動脈脂質斑塊(箭頭標識)面積明顯小於給溶媒PBS對照組，給溶媒PBS對照組脂質占血管面積比為36.0%，給纖溶酶原組為29.6%。說明纖溶酶原能減少ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠動脈粥樣斑塊沉積，促進動脈粥樣硬化血管壁損傷的修復。

圖9係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予PBS或纖溶酶原20天後大體主動脈油紅O染色圖片。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠主動脈弓、胸主動脈以及腹主動脈脂質斑塊(箭頭標識)面積明顯小於給溶媒PBS對照組。給溶媒PBS對照組脂質占血管面積比為48.1%，給纖溶酶原組為39.4%。說明纖溶酶原能減少ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠動脈粥樣斑塊沉積，促進動脈粥樣硬化血管損傷的修復。

圖10係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後肝臟油紅O染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖溶酶原組，C為定量分析結果。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠肝臟脂肪沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（*表示 $P<0.05$ ）。說明纖溶酶原能改善動脈粥樣硬化模型小鼠肝臟脂肪沉積。

圖11係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後主動脈竇油紅O染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖溶酶原組。結果顯示，給纖溶酶原組小鼠主動脈竇脂肪沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組。說明纖溶酶原能改善脂肪在主動脈竇的沉積。

圖12係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖溶酶原30天後主動脈瓣HE染色代表性圖片。A、C為給溶媒PBS對照組，B、D為給纖溶酶原組。結果顯示，

纖溶酶原組中層彈性膜結構規則，呈波浪形。表明注射纖溶酶原對糖尿病所致的主動脈損傷具有一定的修復作用。

圖19係24-25周齡糖尿病小鼠給予纖溶酶原31天後血清中肌鈣蛋白含量檢測結果。結果顯示，給纖溶酶原組心肌肌鈣蛋白I的濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異極顯著（**表示 $P<0.01$ ）。說明纖溶酶原能顯著促進糖尿病後期小鼠心肌損傷的修復。

圖20係3%膽固醇高脂血症模型小鼠給予纖溶酶原10天和20天後血清高密度脂蛋白膽固醇檢測結果。結果顯示，給予纖溶酶原後給纖溶酶原組小鼠血清HDL-C濃度明顯高於給溶媒PBS對照組，且二者在給藥10天和20天後高密度脂蛋白濃度均統計差異極顯著（**表示 $P<0.01$ ）。說明纖溶酶原能有效提高高脂血症模型小鼠血清中高密度脂蛋白膽固醇的含量，改善高脂血症模型小鼠血脂紊亂。

圖21係顯示3%膽固醇高脂血症模型小鼠給予纖溶酶原20天動脈粥樣硬化指數計算結果。計算結果顯示，給纖溶酶原組小鼠動脈粥樣硬化指數明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著。說明纖溶酶原能降低高脂血症模型小鼠發生動脈粥樣硬化的風險。

圖22係顯示3%膽固醇高脂血症模型小鼠給予纖溶酶原20天心臟風險指數計算結果。結果顯示，給纖溶酶原組CRI明顯小於給溶媒PBS對照組，且統計差異極其顯著。說明纖溶酶原能有效的降低高脂血症模型小鼠發生心臟疾病的風險。

【實施方式】

【0041】 「動脈粥樣硬化」是一種慢性的、漸進性動脈疾病，發病時動脈中沉積的脂肪部分或全部堵塞血流。當原本光滑、堅實的動脈內膜變粗糙、增厚，並被脂肪、纖維蛋白、鈣和細胞碎屑堵塞時，便出現動脈粥樣硬化。動脈粥樣硬化是個漸進的過程。當血液中的脂類濃度大大增加時，便會沿著動脈壁形成脂肪條紋。這些條紋會導致脂肪和膽固醇沉積，這些沉澱依附在原本平滑的動脈內膜上，從而形成小結。這些小結下面繼而長出纖維化的癍痕組織，導致鈣沉積。沉積的鈣逐漸演變為無法除去的白堊狀堅硬薄膜（稱為動脈粥樣

斑)。動脈內部的這層永久薄膜會阻礙動脈的正常擴張和收縮，從而減緩了動脈內的血流速度，從而很容易形成血塊，妨礙或阻止血液流經動脈。

【0042】 僅就動脈粥樣硬化症而言，人們感覺不到任何症狀。僅當與體內的某個重要器官相連的動脈被堵塞後，才會發現此病。因該器官中的動脈受阻而引起的症狀較為明顯。例如，如果心臟供血動脈部分受阻，人們就可能感到心絞痛；但是如果完全被阻塞，就可能導致心臟病（由受阻動脈供血的心臟組織死亡）。如果動脈粥樣硬化影響到腦部動脈，人們會感覺眩暈、視線模糊和暈厥，甚至可能導致中風（由受阻動脈供血的腦組織死亡，從而引起神經損傷，如受死亡腦組織控制的肢體出現癱瘓）。通向腎部的動脈受阻還可能導致腎衰竭。通向眼部的血管受阻可能導致失明。四肢動脈阻塞可能導致各肢體的病變。

【0043】 纖溶酶是纖溶酶原啟動系統（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[23]。此外，纖溶酶能將一些金屬蛋白酶前體(pro-MMPs)啟動形成具有活性的金屬蛋白酶（MMPs）。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[24,25]。纖溶酶是由纖溶酶原通過兩種生理性的PAs：組織型纖溶酶原啟動劑（tPA）或尿激酶型纖溶酶原啟動劑（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系統的調節主要通過PAs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PAs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 纖溶酶抑制劑。纖溶酶的主）。PAs的活性同時被uPA和tPA的纖溶酶原啟動劑抑制劑-1（PAI-1）抑制以及主要抑制uPA的溶酶原啟動劑抑制劑-2（PAI-2）調節。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) [26,27]。

【0044】 纖溶酶原是一個單鏈糖蛋白，由791個氨基酸組成，分子量約為92 kDa[28,29]。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[30,31]。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PAs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[32]。纖溶酶原的氨基末端部分包含五個同源三環，即所謂的kringles，羧基末端部分包含蛋白酶結構域。一些kringles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。最新發現一個纖溶酶原為38 kDa的片段，其中包括kringles1-4，是血管生成的有效抑制劑。這個片段被命名為血管抑素，可通過幾個蛋白酶水解纖溶酶原產生。

【0045】 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[33]。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[29,34,35]。間接地，纖溶酶還可以通過轉化某些蛋白酶前體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[36]。此外，纖溶酶具有啟動某些潛在形式的生長因數的能力[37-39]。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。

【0046】 「纖溶酶」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。

【0047】 「纖溶酶原」是纖溶酶的酶原形式，根據swiss prot中的序列，按含有信號肽的天然人源纖溶酶原氨基酸序列（序列4）計算由810個氨基酸組成，分子量約為90kD，主要在肝臟中合成並能夠在血液中循環的糖蛋白，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全長的纖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。

【0048】 Glu-纖維溶酶原是天然全長的纖維溶酶原，由791個氨基酸組成（不含有19個氨基酸的信號肽），編碼該序列的cDNA序列如序列1所示，其氨基酸序列如序列2所示。在體內，還存在一種是從Glu-纖維溶酶原的第76-77位氨基酸處水解從而形成的Lys-纖維溶酶原，如序列6所示，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列5所示。Delta-纖維溶酶原(酶原a-氨基aminogen)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[40,41]，有文獻報導了delta-纖維溶酶原的氨基酸序列（序列8）[41]，編碼該氨基酸序列的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殘基為起始氨基酸）[42]，其氨基酸序列如序列10所示，編碼該氨基酸序列的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，有文獻報導其氨基酸序列包括殘基Ala543-Asn791（以不含有信號肽的Glu-纖維溶酶原序列的Glu殘基為起始氨基酸）[43]，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殘基為起始氨基酸)，本專利序列參考專利文獻CN102154253A，其氨基酸序列如序列12所示，編碼該氨基酸序列的cDNA序列如序列11所示。

【0049】 本發明的「纖維溶酶」與「纖維蛋白溶酶」、「纖維蛋白溶解酶」可互換使用，含義相同；「纖維溶酶原」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。

【0050】 在本申請中，所述纖維溶酶原「缺乏」的含義為受試者體內纖維溶酶原的含量或活性比正常人低，低至足以影響所述受試者的正常生理功能；所述纖維溶酶原「缺失」的含義為受試者體內纖維溶酶原的含量或活性顯著低於正常人，甚至活性或表達極微，只有通過外源提供才能維持正常生理功能。

【0051】 本領域技術人員可以理解，本發明纖維溶酶原的所有技術方案適用於纖維溶酶，因此，本發明描述的技術方案涵蓋了纖維溶酶原和纖維溶酶。

【0052】 在循環過程中，纖維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，在纖維溶酶原啟動劑(plasminogen activator, PA)的介導下，其轉變為呈開放性構象的活性纖維溶酶。具有活性的纖維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。

【0053】 「纖溶酶原活性片段」溶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%同源性的氨基酸序列的蛋白質。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。

【0054】 目前，對於血液中纖溶酶原及其活性測定方法包括：對組織纖溶酶原啟動劑活性的檢測(t-PAA)、血漿組織纖溶酶原啟動劑抗原的檢測(t-PAAg)、對血漿組織纖溶酶原活性的檢測(plgA)、血漿組織纖溶酶原抗原的檢測(plgAg)、血漿組織纖溶酶原啟動劑抑制物活性的檢測、血漿組織纖溶酶原啟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為發色底物法：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溶酶原活性進行測定。

【0055】 「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，也稱為直向同源物、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。本發明的纖溶酶原包括人的天然纖溶酶原，還包括來源於不同物種的、具有纖溶酶原活性的纖溶酶原直系同源物或直系同系物。

【0056】 「保守取代變體」是指其中一個給定的氨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）的氨基酸取代親本蛋白質中氨基酸序列中的氨基酸。具有類似性質的氨基酸是眾所周知的。例如，精氨酸、組氨酸和賴氨酸是親水性的鹼性氨基酸並可以互換。同樣，異亮氨酸是疏水氨基酸，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氨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」還包括通過BLAST或FASTA演算法確定具有60%以上的氨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。

【0057】 「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。在一些實施方案中，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)，如通過Lowry法所確定的，例如超過99% (按重量計)，(2)至足以通過使用旋轉杯序列分析儀獲得N端或內部氨基酸序列的至少15個殘基的程度，或(3)至同質性，該同質性是通過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通過生物工程技術從重組細胞製備，並通過至少一個純化步驟分離的纖維溶酶原。

【0058】 術語「多肽」、「肽」和「蛋白質」在本文中可互換使用，指任何長度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遺傳編碼的和非遺傳編碼的氨基酸，化學或生物化學修飾的或衍生化的氨基酸，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氨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。

【0059】 關於參照多肽序列的「氨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氨基酸殘基相同的氨基酸殘基的百分率。為測定百分比氨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，為了本發明的目的，氨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。

【0060】 在採用ALIGN-2來比較氨基酸序列的情況中，給定氨基酸序列A相對於給定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性（或者可表述為具有或包含相對於、與、或針對給定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的給定氨基酸序列A）如下計算：

$$\text{分數X/Y 乘 100}$$

【0061】 其中X是由序列比對程式ALIGN-2在該程式的A和B比對中評分為相同匹配的氨基酸殘基的數目，且其中Y是B中的氨基酸殘基的總數。應當領會，在氨基酸序列A的長度與氨基酸序列B的長度不相等的情况下，A相對於B的%氨基酸序列同一性會不等於B相對於A的%氨基酸序列同一性。除非另有明確說明，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電腦程式獲得的。

【0062】 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，但是尚未診斷為具有疾病；(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。

【0063】 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。

【0064】 「治療有效量」或「有效量」指在對哺乳動物或其他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

【0065】 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，也可以通過標準的化學肽合成技術來合成。當通過化學合成多肽時，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末端氨基酸附接於不溶性支援物，接著序貫添加序列中剩餘的氨基酸)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可用於合成纖維溶酶原。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/去保護的重複循環後，將附接的固相游離N末端胺與單個受N保護的氨基酸單元偶聯。然後，將此單元去保護，露出可以與別的氨基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上，之後將其切掉。

【0066】 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啟動子系統，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。

【0067】 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。

【0068】 大腸桿菌(*Escherichia coli*)是可以用於克隆主題抗體編碼多核苷酸的原核宿主細胞的例子。適合於使用的其他微生物宿主包括桿菌，諸如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)和其他腸桿菌科(*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，會存在許多公知的啟動子，諸如乳糖啟動子系統，色氨酸(trp)啟動子系統，beta-內醯胺酶啟動子系統，或來自噬菌體λ的啟動子系統。啟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，以啟動並完成轉錄和翻譯。

【0069】 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(例如啟動子)、複製起點、終止序列等。典型的啟動子包含3-磷酸甘油酸激酶和其他糖分解酶。誘導型酵母啟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啟動子。

【0070】 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抗-Tau抗體(例如編碼主題抗-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，啟動子和增強子(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啟動子。參見Co等, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

【0071】 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維溶酶原。該纖維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，除主題抗體以外的大分子，等等。

藥物配製劑

【0072】 可以通過將具有所需純度的纖維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；氨基酸如甘氨酸，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。

【0073】 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。

【0074】 本發明的纖維溶酶原可包裹在通過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，納米顆粒和納米膠囊)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)。

【0075】 用於體內給藥的本發明的纖維溶酶原必需是無菌的。這可以通過在冷凍乾燥和重新配製之前或之後通過除菌濾膜過濾而輕易實現。

【0076】 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 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通過硫代二硫鍵互換而形成分子間S-S鍵, 則可通過修飾巰基殘基、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

【0077】 可以通過不同方式, 例如通過靜脈內, 腹膜內, 皮下, 顱內, 鞘內, 動脈內(例如經由頸動脈), 肌內來實現本發明藥物組合物的施用。

【0078】 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。

【0079】 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、和同時施用的其他藥物。本發明包含纖維溶酶原的藥物組合物的劑量範圍可以為例如每天約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、每週或根據通過經驗分析

確定的任何其他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治療效果和安全性。

製品或藥盒

【0080】 本發明的一個實施方案涉及一種製品或藥盒，其包含可用於治療由糖尿病引起的心血管病及其相關病症的本發明纖維溶酶原或纖維溶酶。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維溶酶原/纖維溶酶。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角度來看所需的其他物質，包括其他緩衝液，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維溶酶原組合物以及治療伴隨的疾病的其他藥物給藥患者。

實施例：

實施例1 纖維溶酶原升高糖尿病小鼠血清中的高密度脂蛋白膽固醇

【0081】 26周齡db/db雄性小鼠20隻隨機分組，給纖維溶酶原組11隻，給溶媒PBS對照組9隻。給纖維溶酶原組尾靜脈注射人源纖維溶酶原 2mg/0.2ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。連續注射35天後摘眼球採全血，4°C，3500r/min離心10分鐘，取上清液進行高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）檢測。高密度脂蛋白膽固醇的檢測採用試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A112-1），並按照該試劑盒所述方法進行。

【0082】 檢測結果顯示，db/db鼠連續注射人源纖維溶酶原35天後，給纖維溶酶原組小鼠血清中HDL-C的含量高於給溶媒PBS對照組（圖1），且統計差異顯著。

【0083】 糖尿病通常伴有心血管動脈粥樣硬化[45,46]，而高密度脂蛋白是一種抗動脈粥樣硬化的血漿脂蛋白，是冠心病的保護因數，俗稱「血管清道夫」。該檢測結果證明纖溶酶原能提高血清HDL-C的水準，從而有助於改善糖尿病小鼠的動脈粥樣硬化。

實施例2 纖溶酶原降低糖尿病小鼠血清中低密度脂蛋白膽固醇

【0084】 24-25周齡db/db雄性小鼠10隻隨機分組，給纖溶酶原組和給溶媒PBS對照組各5隻，並取3隻db/m作為正常對照組。給纖溶酶原組尾靜脈注射人源纖溶酶原 2mg/0.2ml/隻/天，PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS，正常對照組小鼠不作任何處理。開始給藥定為第0天，連續注射31天後小鼠摘眼球採全血，4°C，3500r/min離心10分鐘，取上清液進行低密度脂蛋白膽固醇（LDL-C）檢測。低密度脂蛋白膽固醇的檢測採用試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A113-1），並按照該檢測試劑盒所述方法進行。

【0085】 檢測結果顯示，db/db小鼠連續注射人源纖溶酶原31天後，給纖溶酶原組小鼠血清中的LDL-C含量低於給溶媒PBS對照組（圖2）。

【0086】 低密度脂蛋白是一種運載膽固醇進入外周組織細胞的脂蛋白顆粒，可被氧化成氧化低密度脂蛋白，當低密度脂蛋白，尤其是氧化修飾的低密度脂蛋白（OX-LDL）過量時，它攜帶的膽固醇便積存在動脈壁上，引發動脈硬化。因此低密度脂蛋白膽固醇被稱為「壞的膽固醇」[52]。該實驗結果證明纖溶酶原能降低血清中低密度脂蛋白膽固醇的含量，從而有利於控制動脈粥樣硬化。

實施例3 纖溶酶原對ApoE動脈粥樣硬化小鼠體重的影響

【0087】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50μl以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS，給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於給藥的第1、31天稱量小鼠體重。

【0088】 結果顯示，給予纖溶酶原30天後小鼠體重無明顯改變（圖3），說明給藥處理對ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠的體重無明顯影響。

實施例4 纖溶酶原降低ApoE動脈粥樣硬化小鼠血脂含量

【0089】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。在第30天小鼠禁食16小時，第31天摘除眼球取血，離心獲得上清，用以檢測血清總膽固醇（T-CHO）、血清甘油三酯(TG)和血清低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)含量。

1. 血清總膽固醇含量

【0090】 使用檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A111-1）、並按照該檢測試劑盒所述方法檢測血清總膽固醇含量。

【0091】 檢測結果顯示，給纖溶酶原組小鼠總膽固醇濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（圖4）。說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠血清中總膽固醇的含量。

2. 血清甘油三酯含量

【0092】 使用TG檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A110-1）、並按照該試劑盒的說明採用COD-PAP法檢測血清TG含量。檢測結果顯示，給纖溶酶原組小鼠TG濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（圖5）。

3. 血清低密度脂蛋白膽固醇含量

【0093】 使用低密度脂蛋白膽固醇（LDL-C）按照檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A113-1）、並按照該試劑盒所述方法檢測血清低密度脂蛋白含量。

【0094】 檢測結果顯示，給纖溶酶原組小鼠LDL-C濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（圖6）。說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠血清中LDL-C的含量，改善動脈粥樣硬化。

【0095】 上述結果證明纖溶酶原能顯著降低動脈粥樣硬化模型小鼠的血清總膽固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白膽固醇含量，改善動脈粥樣硬化。同時，通過降低血清總膽固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白膽固醇的含量，降低動脈粥樣硬化併發症，例如動脈粥樣硬化性心血管疾病的風險。

實施例5 纖溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠心臟代償性肥大

【0096】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於給藥的第31天稱重後處死小鼠，取心臟稱重，並計算心臟係數。心臟係數（%）=心臟重量/體重 \times 100。

【0097】 結果顯示，給纖溶酶原組小鼠心臟係數明顯低於給溶媒PBS對照組（圖7）。說明纖溶酶原能減輕ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠由於心臟損傷所致的心臟代償性肥大。

實施例6 纖溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈脂質斑塊沉積

【0098】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥10天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料，第11天兩組小鼠各隨機取一隻處死，取主動脈於4%多聚甲醛固定24-48小時，剖開後進行油紅O大體染色，主動脈在體式顯微鏡7倍鏡下觀察拍照。

第 29 頁，共 43 頁(發明說明書)

【0099】 油紅O染色可顯示脂質沉積，反映損傷的嚴重程度[49]。染色結果（圖8）顯示，給纖維溶酶原組小鼠主動脈弓、胸主動脈以及腹主動脈脂質斑塊（箭頭標識）面積明顯小於給溶媒PBS對照組，給溶媒PBS對照組脂質占血管面積比為36.0%，給纖維溶酶原組為29.6%。實驗證明纖維溶酶原能減少ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠動脈粥樣斑塊沉積，促進動脈粥樣硬化的修復。

實施例7 纖維溶酶原減少ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈脂質斑塊沉積

【0100】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖維溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥20天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料，第21天兩組小鼠各隨機取一隻處死，取主動脈於4%多聚甲醛固定24-48小時，剖開後進行油紅O大體染色，主動脈在體式顯微鏡7倍鏡下觀察拍照。

【0101】 主動脈弓、胸主動脈以及腹主動脈脂質斑塊（箭頭標識）面積明顯小於給溶媒PBS對照組，給溶媒PBS對照組脂質占血管面積比為48.1%，給纖維溶酶原組為39.4%（圖9）。說明纖維溶酶原能減少ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠動脈粥樣斑塊，促進動脈粥樣硬化的修復。

實施例8 纖維溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠肝臟脂質沉積

【0102】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖維溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於第31天處死小鼠，取肝臟於4%多聚甲醛固定24-48小時，分別於15%、30%蔗糖中4 $^{\circ}$ C過夜沉底，OCT包埋，冰凍切片厚度8 μ m，油紅O染色15min，75%酒精分化5秒，蘇木素染核30秒，甘油明膠封片。切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

【0103】 染色結果顯示，給纖溶酶原組（圖10B）小鼠肝臟脂肪沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組（圖10A），且定量分析統計差異顯著（圖10C）。說明纖溶酶原可改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠肝臟脂肪沉積。

實施例9 纖溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈竇脂質沉積

【0104】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，並於第31天處死小鼠，取心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時，分別於15%、30%蔗糖中4 $^{\circ}$ C過夜沉底，OCT包埋，冰凍切片厚度8 μ m，油紅O染色15min，75%酒精分化5秒，蘇木素染核30秒，甘油明膠封片。切片在200倍光學顯微鏡下觀察。

【0105】 結果顯示，給纖溶酶原組（圖11B）小鼠主動脈竇脂肪沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組（圖11A）。說明纖溶酶原可改善動脈粥樣硬化中主動脈竇脂肪沉積。

實施例10 纖溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈竇損傷

【0106】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於第31天處死小鼠，取心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的組織樣本經酒精梯度脫水和二甲苯透明後進行石蠟包埋。主動脈竇組織切片厚度為3 μ m，切片脫蠟複水並用蘇木素和伊紅染色(HE染色)，1%鹽酸酒精分化後氨水返藍並酒精梯度脫水封片，切片分別在在40倍（圖12A和12B）和200倍（圖12C和12D）光學顯微鏡下觀察。

【0107】 染色結果顯示，給纖溶酶原組（圖12B、12D）小鼠主動脈脂質斑塊沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組（圖12A、12C），且主動脈瓣膜融合程度前者小於後者。說明纖溶酶原能改善動脈粥樣硬化中主動脈瓣膜損傷。

實施例11 纖溶酶原降低ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈脂質沉積

【0108】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於第31天處死小鼠，取主動脈於4%多聚甲醛固定24-48小時，分別於15%、30%蔗糖中4 $^{\circ}$ C過夜沉底，OCT包埋，冰凍切片厚度8 μ m，油紅O染色15min，75%酒精分化5秒，蘇木素染核30秒，甘油明膠封片。切片在200倍光學顯微鏡下觀察。

【0109】 染色結果顯示，給纖溶酶原組(圖13B)主動脈油紅O染色沉積(箭頭標識)面積明顯小於給溶媒PBS對照組（圖13A）。說明纖溶酶原能夠明顯降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠主動脈脂質在血管內壁的沉積，改善主動脈的損傷。

實施例12 纖溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠心臟損傷

【0110】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於第31天處死小鼠，取心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的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3 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次。PAP筆圈出組織，以3%雙氧水孵育15分鐘，0.01MPBS洗2次，每次5分鐘。5%的正常羊血清液（Vector laboratories,Inc.,USA）封閉30分鐘；時間到後，棄除羊血清

液，滴加山羊抗鼠 IgM (HRP) 抗體 (Abcam)，室溫孵育1小時，0.01MPBS洗2次，每次5分鐘。按DAB試劑盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 顯色，水洗後蘇木素複染30秒，流水沖洗5分鐘。梯度酒精脫水、二甲苯透明並中性樹膠封片，切片在200倍光學顯微鏡下觀察。IgM抗體在清除凋亡和壞死細胞過程中發揮著重要作用，組織器官損傷局部IgM抗體的水準與損傷程度呈正相關[50,51]。因此，檢測組織器官局部IgM抗體的水準能夠反映該組織器官的損傷情況。實驗發現，給纖溶酶原組小鼠(圖14B)心臟IgM的陽性表達明顯少於給溶媒PBS對照組(圖14A)。說明纖溶酶原能夠明顯改善ApoE小鼠心肌損傷。

實施例13 纖溶酶原降低ApoE動脈粥樣硬化小鼠心臟纖維化水準

【0111】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料(南通特洛菲, TP2031) 16周以誘導動脈粥樣硬化模型[47,48]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇(T-CHO)含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，給藥期間繼續飼餵高脂高膽固醇飼料。於第31天處死小鼠，取材心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時。固定後的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3 μ m，切片脫蠟複水後水洗1次，以0.1%天狼星紅飽和苦味酸染色30分鐘後，流水沖洗2min，蘇木素染色1分鐘，流水沖洗，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，流水沖洗，烘乾後中性樹膠封片，在200倍光學顯微鏡下觀察。

【0112】 天狼星紅染色可使膠原持久染色，是對病理切片中膠原組織的特殊染色方法，以特異顯示膠原組織。

【0113】 染色結果顯示，給纖溶酶原組(圖15B)膠原的沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組(圖15A)，說明纖溶酶原能降低ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠心臟組織中膠原的沉積，降低心臟纖維化。

實施例14 纖溶酶原降低糖尿病小鼠心室脂質沉積

【0114】 糖尿病通常伴有心血管動脈粥樣硬化[45,46]。心血管動脈粥樣硬化可導致心肌細胞的缺血損傷。油紅O染色可顯示脂質沉積，反映損傷的嚴重程度[49]。

【0115】 26周齡db/db雄性小鼠9隻，隨機分為兩組，給纖維溶酶原組4隻，給溶媒PBS對照組5隻。給纖維溶酶原組尾靜脈注射人源纖維溶酶原 2mg/0.2ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS，給藥35天。於第36天處死小鼠，取心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時，分別於15%、30%蔗糖中4℃過夜沉底，OCT包埋，冰凍切片厚度8 μ m，油紅O染色15min，75%酒精分化5秒，蘇木素染核30秒，甘油明膠封片。切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

【0116】 結果顯示，給纖維溶酶原組小鼠（圖16B）心室脂質沉積（箭頭標識）明顯少於給溶媒PBS對照組（圖16A）。說明纖維溶酶原能夠減少糖尿病小鼠心室脂質沉積，促進心室損傷的修復。

實施例15 纖維溶酶原改善ApoE動脈粥樣硬化小鼠主動脈竇纖維化

【0117】 6周齡雄性ApoE小鼠13隻飼餵高脂高膽固醇飼料（南通特洛菲，TP2031）16周以誘導動脈粥樣硬化模型[31,32]。成模後的小鼠在給藥前三天每隻取血50 μ l以檢測總膽固醇（T-CHO）含量，並根據T-CHO含量隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組7隻，給纖維溶酶原組6隻。開始給藥定為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1mL/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。給藥30天，並於第31天處死小鼠，取心臟於4%多聚甲醛固定24-48小時，分別於15%、30%蔗糖中4℃過夜沉底，OCT包埋，冰凍切片厚度8 μ m，以0.1%天狼星紅飽和苦味酸染色30分鐘後，流水沖洗2min，蘇木素染色1分鐘，流水沖洗，1%鹽酸酒精分化，氨水返藍，流水沖洗，烘乾後中性樹膠封片，在40光學顯微鏡下觀察，圖17C、17D分別為圖17A、17B黑框區域放大圖片。

【0118】 結果顯示給纖維溶酶原組（圖17B、17D）膠原蛋白沉積（箭頭標識）的面積明顯小於給溶媒PBS對照組（圖17A、17C），說明纖維溶酶原能夠消滅動脈粥樣硬化模型小鼠主動脈竇纖維化水準。

實施例16 纖維溶酶原對糖尿病小鼠主動脈內壁損傷的保護作用

實施例18 纖維溶酶原提高3%膽固醇高脂血症模型小鼠血清高密度脂蛋白膽固醇濃度

【0124】 9周齡雄性C57小鼠16隻飼餵3%膽固醇高脂飼料(南通特洛菲)4周，誘導高脂血症[52,53]，此模型定為3%膽固醇高脂血症模型。成模後的小鼠繼續飼餵3%膽固醇高脂飼料。在給藥前三天每隻小鼠取血50 μ L，檢測總膽固醇，並根據總膽固醇濃度和體重隨機分為兩組，每組各8隻。開始給藥記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS，給藥20天。在第10、20天小鼠禁食16小時，第11、21天紮眼眶靜脈叢取血50 μ l，離心獲得上清，用以檢測血清高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）。本文中高密度脂蛋白膽固醇含量通過檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A112-1）所述方法檢測。

【0125】 檢測結果顯示，給纖維溶酶原組小鼠血清HDL-C濃度明顯高於給溶媒PBS對照組，且二者在給藥10、20天後HDL-C濃度均有統計學差異（圖20）。說明纖維溶酶原能提高高脂血症模型小鼠血清中高密度脂蛋白膽固醇的含量，改善高脂血症小鼠血脂紊亂。

實施例19 纖維溶酶原降低3%膽固醇高脂血症模型小鼠動脈粥樣硬化形成的風險

【0126】 9周齡雄性C57小鼠16隻飼餵3%膽固醇高脂飼料(南通特洛菲)4周，誘導高脂血症[52,53]，此模型定為3%膽固醇高脂血症模型。成模後的小鼠繼續飼餵3%膽固醇高脂飼料。在給藥前三天每隻小鼠取血50 μ l，檢測總膽固醇（T-CHO），並根據總膽固醇濃度和體重隨機分為兩組，每組各8隻。開始給藥記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。在第20天給藥後小鼠開始禁食，禁食16小時，第21天紮眼眶靜脈叢取血50 μ L，離心獲得上清，總膽固醇含量採用總膽固醇檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A111-1）進行檢測；高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）含量採用高密度脂蛋白膽固醇檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A112-1）進行檢測。

【0127】 動脈粥樣硬化指數，是臨床上預測動脈粥樣硬化的綜合指標，認為它在用作對冠心病風險程度的估計方面臨床意義比單項的總膽固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白更大[54]。

$$\text{動脈粥樣硬化指數} = (\text{T-CHO} - \text{HDL-C}) / \text{HDL-C}。$$

【0128】 計算結果顯示，給纖維溶酶原組小鼠動脈粥樣硬化指數明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異顯著（圖21）。說明纖維溶酶原能降低高脂血症模型小鼠發生動脈粥樣硬化的風險。

實施例20 纖維溶酶原降低3%膽固醇高脂血症模型小鼠心臟發病風險

【0129】 9周齡雄性C57小鼠16隻飼餵3%膽固醇高脂飼料(南通特洛菲)4周，誘導高脂血症[52,53]，此模型定為3%膽固醇高脂血症模型。成模後的小鼠繼續飼餵3%膽固醇高脂飼料。在給藥前三天每隻小鼠取血50 μ l，檢測總膽固醇（T-CHO），並根據總膽固醇濃度隨機分為兩組，每組各8隻。開始給藥記為第1天，給纖維溶酶原組小鼠尾靜脈注射人源纖維溶酶原 1mg/0.1ml/隻/天，給溶媒PBS對照組尾靜脈注射同體積的PBS。在第20天給藥後小鼠開始禁食，禁食16小時，第21天紮眼眶靜脈叢取血50 μ L，離心獲得上清，總膽固醇含量採用總膽固醇檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A111-1）進行檢測；高密度脂蛋白膽固醇（HDL-C）含量採用高密度脂蛋白膽固醇檢測試劑盒（南京建成生物工程研究所，貨號A112-1）進行檢測。心臟危險指數=T-CHO/HDL。

【0130】 心臟危險指數(cardiac risk index，CRI)用以評估血脂紊亂誘發心臟疾病的風險[54]。

【0131】 結果顯示，給纖維溶酶原組CRI明顯小於給溶媒PBS對照組，且統計差異極其顯著（圖22）。說明纖維溶酶原能有效的降低高脂血症模型小鼠發生心臟疾病的風險。

【0132】 參考文獻

[1] Libby, Ridker PM, Maseri A. Inflammation in atherosclerosis [J]. Circulation, 2002, 105(9):1135-1143.

- [2] Esper RJ, Vilarino JO, Machado RA, et al. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucosemetabolism [J]. *Adv Cardiol*, 2008, 45:17-43.
- [3] Boos CJ, Blann AD, Lip GY. Assessment of endothelial damage/dysfunction: A focus on circulating endothelial cells [J]. *Methods Mol Med*, 2007,139:211-224.
- [4] Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease [J]. *Circulation*,2006,113(7):929-937.
- [5] Ellahham S. Role of antiplatelet agents in the primary and secondary prevention of atherothrombotic events in high risk-patients [J]. *South Med J*,2008,101(3):273-283.
- [6] Kanani PM, Sperling MA. Hyperlipidemia in adolescents[J]. *Adolesc Med*, 2002,13(1):37-52.
- [7] Eo HS, Kim D I. Apolipoprotein C1 and apolipoprotein E are differentially expressed in atheroma of the carotid and femoral artery [J]. *J Surg Res*, 2008,144(1):132-137.
- [8] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2002,91(4):281-291.
- [9] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: Pathogenesis and pharmacology of plaque rupture [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005,3(1):63-68.
- [10] Jia G, Cheng G, Grawal DK. Differential effects of insulin-like growth factor-1 and atheroma-associated cytokines on cell proliferation and apoptosis in plaque smooth muscle cells of symptomatic and asymptomatic patients with carotidstenosis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2006,84(5):422-429.
- [11] Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaques stability [J]. *Am J Nephrol*, 2006, 26(6):531-535.
- [12] Wen ting et al., Study on the mechanism of diabetes mellitus combined with atherosclerosis. *Chin J Clinicians(Electronic Edition)*,April 1,2016,Vol.10,No.7.
- [13] Lopez-Pedra C, Aguirre MA. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 6070-6084.

- [14] Gong Z, Xing S, Zheng F, et al. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor in aorta of patients with coronary atherosclerosis[J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2015, 56(4): 631-637.
- [15] Kim J, Kim KM, Kim CS, et al. Puerarin inhibits the retinal pericyte apoptosis induced by advanced glycation end products in vitro and in vivo by inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(2): 357-365.
- [16] Koulis C, Kanellakis P. Role of bone-marrow and non-bonemarrow-driven receptor for advanced glycation end-products(RAGE) in a mouse model of diabetes-associated atherosclerosis[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2014, 127(7): 485-497.
- [17] Tsukano H, Gotoh T, Endo M, et al. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(10): 1925-1932.
- [18] Martínez-Hervás S, Vinué A, Núñez L, et al. Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(2): 324-336.
- [19] Oh J, Riek AE, Darwech I, et al. Deletion of macrophage Vitamin D receptor promotes insulin resistance and monocyte cholesterol transport to accelerate atherosclerosis in mice[J]. *Cell Rep*, 2015,10(11): 187218-187286.
- [20] Marfella R, D' Amico M, Di Filippo C, et al. The possible role of the ubiquitin proteasome system in the development of atherosclerosis in diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2007, 6: 35.
- [21] Lassila M, Allen TJ, Cao Z, et al. Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(5): 935-942.
- [22] He C, Medley SC, Hu T, et al. PDGFR β signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7770.

- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.
- [30] 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.
- [31] Wallén P (1980). Biochemistry of plasminogen. In *Fibrinolysis*, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC).
- [32] 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.

- [33] Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.
- [34] Alexander, C.M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.
- [35] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.

- [43] 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.
- [44] R. Langhorn and J.L. Willesen. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 2016;30:36–50.
- [45] Sun Mi Hwang, ‡Jin Sook Kim, Yun Jung Lee et al. Anti-Diabetic Atherosclerosis Effect of *Prunella vulgaris* in db/db Mice with Type 2 Diabetes. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 40, No. 5, 937–951.
- [46] Hardy, D.S., D.M. Hoelscher, C. Aragaki et al. Association of glycemic index and glycemic load with risk of incident coronary heart disease among Whites and African Americans with and without type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Ann. Epidemiol.* 20: 610–616, 2010.
- [47] Yutaka Nakashima, Andrew S. Plump, Elaine W. Raines et al. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jan;14(1):133-40.
- [48] Yvonne Nitschke , Gabriele Weissen-Plenz , Robert Terkeltaub et al. Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 15, No 11, 2011 pp. 2273-2283.
- [49] Siobhan M. Craige, PhD, Shashi Kant et al. Endothelial NADPH oxidase 4 protects ApoE^{-/-} mice from atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med.* 2015 December ; 89: 1–7.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] Dominika Nackiewicz, Paromita Dey, Barbara Szczerba et al. Inhibitor of differentiation 3, a transcription factor regulates hyperlipidemia associated kidney disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2014 ; 126(3): 141–147.

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

[54] Sungwon Lee, Youngjoo Lee, Jiyeon Kim et al. Atorvastatin and rosuvastatin improve physiological parameters and alleviate immune dysfunction in metabolic disorders. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 23;478(3):1242-7.

【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> 一種治療動脈粥樣硬化及其併發症的方法
 <130> F17W0373TW
 <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 tgttcagtg cactaagaag      60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc      120
accigcaggg cattccaata lcacaglaaa gagcaacaal gtgtgalaat ggctgaaaac      180
aggaagtcct 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 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 ggtcccact accagtgtct gaagggaaca      780
ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctgtt accgtgtccg ggcaacctg tcagcactgg      840
agtgcacaga cccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg      900
gatgaaaact actgccgcaa tctgacgga aaaagggcc catggtgcca tacaaccaac      960
agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata cegtctgtg actcctcccc agtatccacg     1020
gaacaattgg tccccacagc accacctgag ctaaccctg tggtecagga ctgctaccat     1080
ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag     1140
tcttggtcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacce cagaaaacta cccaatgct     1200
ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgttttacc     1260
acagacccca gegtccagtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg     1320
agtgtttagt cacctccgcc tgtgtcctg 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
tgtgcggccc ctctatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgtcctgga     1680
agggtttagt ggggtgtgt ggcccaccca cattcttggc cctggaagt cagtcttaga     1740
acaaggtttg gaatgcactt ctgtggagc accttgatat cccagagtg ggtgttgact     1800
gctgccact gcttgagaa gtcccaagg cttcatcct acaaggtcat cctgggtgca     1860

```

caccaagaag tgaatctcga accgcatggt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920
 gagccacac gaaaagatat tgccttgcta aagclaagca gtcctgccgt catcactgac 1980
 aaagtaatcc cagcttgtct gccatcccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040
 ttcatcactg getggggaga aacccaaggt acttttggag ctggcettct caaggaagcc 2100
 cagctccctg tgattgagaa taaagtgtgc aategctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160
 caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220
 agtggaggtc ctctggtttg ctctgagaag gacaaataca ttttacaagg agtcacttct 2280
 tggggctctg gctgtgcacg ccccaataag cctgggtgtct atgttcgtgt ttcaaggttt 2340
 gttacttgga ttgagggagt 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)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
785 790

<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 aggaagtgggt tcttctactt cttttatttc tgaatcagg tcaaggagag 60
cctctgatg actatgtgaa taccagggg gcttactgt tcagtgtcac taagaagcag 120

ctgggagcag	gaagtataga	agaatgtgca	gcaaaatgtg	aggaggacga	agaattcacc	180
lgcagggcal	lccaatalca	caglaaagag	caacaalgig	lgataalggc	lgaaaacagg	240
aagtectcca	taatcattag	gatgagagat	gtagttttat	ttgaaaagaa	agtgtatctc	300
tcagagtgca	agactgggaa	tggaaagaac	tacagagggga	cgatgtccaa	aacaaaaaat	360
ggcatcacct	gtcaaaaatg	gagttccact	tctcccaca	gacctagatt	ctcacctgct	420
acacaccctt	cagagggact	ggaggagaac	tactgcagga	atccagacaa	cgatccgcag	480
gggccctggt	gtatactac	tgatccagaa	aagagatatg	actactgcga	cattcttgag	540
tgtgaagagg	aatgtatgca	ttgcagtgga	gaaaactatg	acggcaaaat	ttccaagacc	600
atgtctggac	tggaatgcca	ggcctgggac	tctcagagcc	cacacgtca	tggatacatt	660
ccttccaaat	ttccaacaaa	gaacctgaag	aagaattact	gtcgtaaccc	cgatagggag	720
ctgeggctt	ggtgtttcac	caccgacccc	aacaagcgt	gggaactttg	tgacateccc	780
cgtgcacaa	cacctccacc	atcttctggt	cccacctacc	agtgtctgaa	gggaacaggt	840
gaaaactatc	gcgggaatgt	ggctgttacc	gtgtccgggc	acacctgtca	gcactggagt	900
gcacagaccc	ctcacacaca	taacaggaca	ccagaaaact	tcccctgcaa	aaatttggat	960
gaaaactacl	gccgcaatcc	lgacgaaaaa	agggccccc	gglgccatac	aaccaacagc	1020
caagtgcggt	gggagtactg	taagataccg	tctgtgact	cctccccagt	atccacggaa	1080
caattggctc	ccacagcacc	acctgagcta	accctgtgg	tccaggactg	ctaccatggt	1140
gatggacaga	gtaccgagg	cacatctcc	accaccacca	caggaaagaa	gtgtcagtct	1200
tggtcatcta	tgacaccaca	ccggcaccag	aagaccccag	aaaactacce	aatgctggtc	1260
ctgacaatga	actactgcag	gaatccagat	gccgataaag	gcccctggtg	ttttaccaca	1320
gaccccagcg	tcaggtggga	gtactgcaac	ctgaaaaaat	gctcaggaac	agaagcgagt	1380
gttgtagcac	ctccgcctgt	tgtcctgctt	ccagatgtag	agactccttc	cgaagaagac	1440
tgtatgtttg	ggaatgggaa	aggataccga	ggcaagaggg	cgaccactgt	tactgggacg	1500
ccatgccagg	actgggctgc	ccaggagccc	catagacaca	gcattttcac	tccagagaca	1560
aatccacggg	cgggtctgga	aaaaaattac	tgccgtaac	ctgatggtga	tgtaggtggt	1620
ccctggtgct	acacgacaaa	tccaagaaaa	ctttacgact	actgtgatgt	ccctcagtgt	1680
gcggccccct	catttgattg	tgggaagcct	caagtggagc	cgaagaaatg	tcctggaagg	1740
gttgtagggg	ggtgtgtggc	ccaccacat	tcctggccct	ggcaagtcag	tcttagaaca	1800
aggtttgaa	tgcacttctg	tggaggcacc	ttgatatccc	cagagtgggt	gttgactgct	1860
gcccactgct	tggagaagtc	cccaaggcct	tcactctaca	aggteatcct	gggtgcacac	1920
caagaagtga	atctcgaacc	gcattgtcag	gaaatagaag	tgtctaggct	gttcttggag	1980
cccacacgaa	aagatattgc	cttgctaaag	ctaagcagtc	ctgccgtcat	cactgacaaa	2040
gtaatccag	cttgtctgcc	atccccaaat	tatgtggtcg	ctgaccggac	cgaatgtttc	2100
atcaactggt	ggggagaaac	ccaaggtact	tttgagctg	gccttctcaa	ggaagcccag	2160
ctccctgtga	ttgagaataa	agltgtcaat	cgctatgagt	ttctgaatgg	aagagtccaa	2220
tccaccgaac	tctgtgctgg	gcatttggcc	ggaggcactg	acagttgcca	gggtgacagt	2280
ggaggtctct	tgttttgctt	cgagaaggac	aaatacattt	tacaaggagt	cacttcttgg	2340
ggtcttggct	gtgcacgccc	caataagcct	ggtgtctatg	ttcgtgtttc	aaggtttggt	2400
acttggattg	agggagtgat	gagaaataat	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

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
 545 550 555 560

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
 625 630 635 640

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
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-纖維溶酶原) 核酸序列

<400> 5

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc	60
aaaacaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagttcca cttctcecca cagacctaga	120
ttctcacctg ctacacaccc ctcagaggga ctggaggaga actactgcag gaatccagac	180
aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc	240
gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa	300
atttccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacget	360
catggataca ttccttccaa atttccaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac	420
cccgataggg agctgcggcc ttggtgtttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt	480
tgtgacatcc cccgctgcac aacacctcca ccatctctg gtcccaccta ccagtgtctg	540
aagggaacag gtgaaaacta tgcggggaat gtggetgtta cegtgtccgg gcacacctgt	600
cagcaactgga gtgcacagac cctcacaca cataacagga caccagaaaa cttcccctgc	660
aaaaatttgg atgaaaacta ctgccgcaat cctgacggaa aaaggcccc atggtgcca	720

```

acaaccaaca gccaaagtgcg gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctccctccca 780
glatccacgg aacaatlggc lcccacagca ccaccigagc laacccctgt ggtccaggac 840
tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag 900
aagtgtcagt cttggtcate tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac 960
ccaaatgctg gcctgacaat gaactactgc aggaatccag atgcccataa aggcccctgg 1020
tgttttacca cagaccccag cgtcagggtg gagtactgca acctgaaaaa atgctcagga 1080
acagaagcga gtgttgtage acctccgct gttgtcctgc ttccagatgt agagactcct 1140
tccgaagaag actgtatggt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 1200
gttactggga cgccatgccg ggactgggct gccaggagc cccatagaca cagcattttc 1260
actccagaga caaatccacg ggcgggtctg gaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt 1320
gatgtaggtg gtccctggtg ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 1380
gtccctcagt gtgcggcccc ttcatgtgat tgtgggaagc ctcaagtgga gccgaagaaa 1440
tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccaccac attcctggcc ctggcaagtc 1500
agtcttagaa caaggtttg aatgcacttc tgtggaggca cttgatata cccagagtgg 1560
gtgttagact ctgccactg ctgggagaag tccccaggc ctccatccta caaggctcct 1620
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatttc aggaaataga agtgtctagg 1680
ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tectgcccgc 1740
atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccatcccaa attatgtggt cgctgaccgg 1800
accgaatggt tcatcactgg ctggggagaa acccaaggta cttttggagc tggccttctc 1860
aaggaagccc agtccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920
ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccggaggcac tgacagttgc 1980
cagggtgaca gtggaggctc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat tttacaagga 2040
gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttctgtgt 2100
tcaaggttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 2145

```

<210> 6

<211> 714

<212> PRT

<213> LYS77-PLG (Lys-纖維溶酶原) 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

```


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
 625 630 635 640

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
aggaagtcct ccataalcat laggatgaga gatglaglll lalllgaaaa gaaagtglat      240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaaag 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 ctcaagtgga gccgaagaaa      540
tgtcttgaa gggtttagg ggggtgtgtg gccaccac attctggcc ctggcaagtc      600
agtcttagaa caaggtttgg aatgcacttc tgtggaggca ccttgatata ccagagtggt      660
gtgttgactg ctgccactg cttggagaag tccccaggc cttcactca caagtcactc      720
ctgggtgca accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg      780
ctgttcttgg agccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgc      840
atcactgaca aagtaatccc agcttgtctg ccatcccaa attatgtggt cgctgaccgg      900
accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa accaaggta cttttggagc tggccttctc      960
aaggaagccc agtccccgtl gallgagaat aaagtlgca atcgctatga gtttctgaat     1020
ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccggaggcac tgacagttgc     1080
cagggtgaca gtggaggtcc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat tttacaagga     1140
gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttctgttt     1200
tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa                       1245

```

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> delta-plg (delta-纖維溶酶原) 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 (小纖維蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 9

gtcaggtggg agtactgcaa cctgaaaaaa tgctcaggaa cagaagcgag tgtttagca	60
cctccgcctg ttgtctgct tccagatgta gagactcctt ccgaagaaga ctgtatgttt	120
gggaatggga aaggataccg aggcaagagg gcgaccactg ttactgggac gccatgccag	180
gactgggctg cccaggagcc ccatagacac agcattttca ctccagagac aaatccacgg	240
gcgggtcttg aaaaaatta ctgccgtaac cctgatggtg atgtaggtgg tccctggtgc	300
tacacgacaa atccaagaaa actttacgac tactgtgatg tccctcagtg tgcggcccct	360
tcatttgatt gtgggaagcc tcaagtggag ccgaagaaat gtctggaag ggtttaggg	420
gggtgtgtgg cccaccaca ttcttgccc tggcaagtca gtcttagaac aaggtttggg	480
atgcacttct gtggaggcac cttgatatcc ccagagtggg tgttgactgc tgcccactgc	540
ttggagaagt cccaaggcc ttcactctac aaggtcatcc tgggtgcaca ccaagaagt	600
aatctegaac cgcattgtca ggaatagaa gtgtctaggc tgttcttggg gccacacga	660
aaagatattg cettgctaaa gctaagcagt cctgccgta tcaactgacaa agtaatcca	720
gcttgtctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcactggc	780
tggggagaaa cccaaggtac ttttgagct ggccttctca aggaagccca gctccctgtg	840
attgagaata aagtgtgcaa tegetatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa	900
ctctgtgctg ggcatttggc cggaggcact gacagttgcc agggtgacag tggaggtcct	960
ctggtttgct tcgagaagga caaacatt ttacaaggag tcaattcttg gggctttggc	1020
tgtgcacgcc ccaataagcc tgggtctctat 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) 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
 225 230 235 240

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

gcccccttcat ttgattgtgg gaagcctcaa gtggagccga agaaatgtcc tggaagggtt 60
 gtagggggggt gtgtggccca cccacattcc tggcctggc aagtcagtct tagaacaagg 120
 tttggaatgc acttctgtgg aggcacctg atatccccag agtgggtgtt gactgctgcc 180
 cactgcttgg agaagtcccc aaggccttca tctacaagg tcatcctggg tgcacaccaa 240
 gaagtgaatc tcgaaccgca tggtcaggaa atagaagtgt ctaggctgtt cttggagccc 300
 acacgaaaag atattgcctt gctaaageta agcagtcctg ccgteatcac tgacaaagta 360
 atcccagctt gtctgccatc cccaaattat gtggtcgtg accggaccga atgttttcate 420
 actggctggg gagaaaccca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga agcccagctc 480

cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtttc tgaatggaag agtccaatcc 540
accgaactct glgctgggca tllggccgga ggcacigaca gtlgccaggg tgacagtgga 600
ggtcctctgg ttgcttcga gaaggacaaa tacattttac aaggagtac ttcttggggt 660
cttggetgtg cacgcccac taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gtttgttact 720
tggattgagg gaggatgag aaataattaa 750

<210> 12

<211> 249

<212> PRT

<213> Micro-plg (微纖維蛋白溶酶原) 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> 絲氨酸蛋白酶（結構）域的核酸序列

<400> 13

gttgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tctggccct ggcaagtcag tcttagaaca 60
 aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 120
 gcccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcatectaca aggtcatcct gggtgcacac 180
 caagaagtga atctcgaacc gcattgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag 240
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300
 gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggctg ctgaccggac cgaatgtttc 360
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420
 ctcccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 480
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 540
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 600
 ggtcttggct 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



I684459

【發明摘要】

【中文發明名稱】

一種治療動脈粥樣硬化及其併發症的方法

【中文】

本發明涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的方法，包括給藥受試者預防和/或治療有效量的纖溶酶原，所述受試者患有或懷疑患有動脈粥樣硬化及其相關病症。本發明還涉及用於治療受試者動脈粥樣硬化及其相關病症的包含纖溶酶原的藥物、藥物組合物、製品、試劑盒。

【英文】

無

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

給纖維溶酶原組（圖12B、12D）小鼠主動脈瓣斑塊沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組（圖12A、12C），且主動脈瓣膜融合程度前者小於後者。說明纖維溶酶原能改善動脈粥樣硬化模型小鼠主動脈瓣膜損傷。

圖13係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖維溶酶原30天後主動脈油紅O染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖維溶酶原組。結果顯示給纖維溶酶原組主動脈油紅O著色面積(箭頭標識)明顯小於給溶媒PBS對照組。說明纖維溶酶原能明顯減少動脈粥樣硬化模型小鼠主動脈脂質的沉積，改善主動脈內壁的損傷。

圖14係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖維溶酶原30天後心臟IgM免疫染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖維溶酶原組。結果顯示，給纖維溶酶原組小鼠心臟IgM的陽性表達(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組，說明纖維溶酶原能促進動脈粥樣硬化所致心臟損傷的修復。

圖15係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖維溶酶原30天後心臟天狼星紅染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖維溶酶原組。結果顯示，給纖維溶酶原組膠原的沉積(箭頭標識)明顯少於給溶媒PBS對照組，說明纖維溶酶原能減輕ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠心臟纖維化。

圖16係26周齡糖尿病小鼠給予纖維溶酶原35天後心室油紅O染色代表性圖片。A為給溶媒PBS對照組，B為給纖維溶酶原組。結果顯示，給纖維溶酶原組小鼠心室脂質沉積（箭頭標識）明顯少於給溶媒PBS對照組。說明纖維溶酶原能夠減少糖尿病小鼠心室脂質沉積，促進心室損傷的修復。

圖17係ApoE動脈粥樣硬化模型小鼠給予纖維溶酶原30天後主動脈竇天狼星紅染色代表性圖片。A、C為給溶媒PBS對照組，B、D為給纖維溶酶原組。結果顯示給纖維溶酶原組主動脈竇血管內壁膠原蛋白沉積（箭頭標識）的面積明顯小於給溶媒PBS對照組，說明纖維溶酶原能夠消滅動脈粥樣硬化模型小鼠主動脈竇纖維化水準。

圖18係24-25周齡糖尿病小鼠給予纖維溶酶原31天後主動脈HE染色圖片。A、C為給溶媒PBS對照組，B、D為給纖維溶酶原組。結果顯示，給溶媒PBS對照組血管管壁有泡沫細胞沉積（箭頭標識），中層彈性膜排列紊亂，管壁凹凸

【0119】 24-25周齡db/db雄性小鼠10隻，實驗開始當天記為第0天並稱重，根據體重隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組和給纖溶酶原組各5隻。第1天開始給纖溶酶原或PBS (PBS為磷酸緩衝鹽溶液(Phosphate Buffer Saline)，本文中為纖溶酶原的溶媒)，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對照組以相同方式給予相同體積的PBS。在第32天處死小鼠並取主動脈在10%中性福馬林固定液中固定24小時。固定後的組織樣本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%鹽酸酒精分化後氨水返藍並酒精梯度脫水封片，切片在400倍光學顯微鏡下觀察。

【0120】 HE染色結果顯示，給溶媒PBS對照組血管管壁有泡沫細胞沉積（箭頭標識），中層彈性膜排列紊亂，管壁凹凸不均（圖18A、18C）；給纖溶酶原組中層彈性膜結構規則，呈波浪形（圖18B、18D）。表明注射纖溶酶原對糖尿病所致的主動脈管內壁的損傷具有一定的修復作用。

實施例17纖溶酶原對糖尿病小鼠心肌損傷的保護作用

【0121】 糖尿病通常伴有心血管動脈粥樣硬化[45,46]。心血管動脈粥樣硬化可導致心肌細胞的缺血損傷。心肌肌鈣蛋白I (cardiac troponin I, 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[44]。本實驗通過檢測心肌肌鈣蛋白I觀察纖溶酶原對心肌損傷的修復作用。

【0122】 24-25周齡db/db雄性小鼠28隻，隨機分為兩組，給溶媒PBS對照組12隻，給纖溶酶原組16隻。實驗開始當天記為第0天並稱重分組，第1天開始給纖溶酶原或PBS，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對照組尾靜脈注射給予相同體積的PBS。第32天摘除眼球取血，以3500 r/min離心15-20分鐘，並取上清檢測進行心肌肌鈣蛋白I的濃度測定。結果顯示，給纖溶酶原組心肌肌鈣蛋白I的濃度明顯低於給溶媒PBS對照組，且統計差異極為顯著（圖19）。說明纖溶酶原能顯著促進糖尿病小鼠心血管動脈粥樣硬化所致的心肌損傷的修復。

【0123】

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種纖維溶酶原用於製備治療受試者動脈粥樣硬化之藥物的用途，其中，該受試者患有或懷疑患有動脈粥樣硬化。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該動脈粥樣硬化包括主動脈粥樣硬化、冠狀動脈粥樣硬化、腦動脈粥樣硬化、肝動脈粥樣硬化、腎動脈粥樣硬化、腸系膜動脈粥樣硬化、下肢動脈粥樣硬化或頸動脈粥樣硬化。

【第3項】如申請專利範圍第2項所述之用途，其中，該動脈粥樣硬化選自：冠狀動脈粥樣硬化、主動脈粥樣硬化、腦動脈粥樣硬化和腎動脈粥樣硬化。

【第4項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該動脈粥樣硬化為與糖尿病併發的動脈粥樣硬化。

【第5項】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中，該纖維溶酶原係通過降低該受試者動脈管壁的脂質沉積治療動脈粥樣硬化。

【第6項】一種纖維溶酶原用於製備以下的一項或多項之藥物的用途：降低受試者血清總膽固醇水準、降低受試者血清甘油三酯水準、降低受試者血清低密度脂蛋白水準、升高受試者血清高密度脂蛋白水準。

【第7項】一種纖維溶酶原用於製備以下的一項或多項之藥物的用途：促進肝臟的脂肪代謝、促進肝臟的脂肪運輸和降低受試者肝臟的脂肪沉積。

【第8項】一種纖維溶酶原用於製備治療受試者由於動脈粥樣硬化所致的組織、及器官缺血損傷之藥物的用途。

【第9項】如申請專利範圍第8項所述之用途，其中，該受試者的組織、器官缺血損傷為冠狀動脈粥樣硬化導致的心肌損傷、腦缺血損傷和/或腎臟缺血損傷。

【第10項】一種纖維溶酶原用於製備消滅受試者動脈管壁脂質沉積之藥物的用途，其中，該受試者易患動脈粥樣硬化或已患動脈粥樣硬化。

【第11項】如申請專利範圍第10項所述之用途，其中，該易患動脈粥樣硬化的受試者為患有肝臟疾病、腎臟疾病、肥胖症、高脂血症或糖尿病的受試者。

【第12項】如申請專利範圍第1項至第11項中任一項所述之用途，其中，該纖維溶酶原與序列2具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，並且仍然具有纖維溶酶原活性。

【第13項】如申請專利範圍第1項至第11項中任一項所述之用途，其中，該纖維溶酶原是包含纖維溶酶原活性片段，並且仍然具有纖維溶酶原活性的蛋白質。

【第14項】如申請專利範圍第1項至第11項中任一項所述之用途，其中，該纖維溶酶原選自Glu-纖維溶酶原、Lys-纖維溶酶原、小纖維溶酶原、微纖維溶酶原、delta-纖維溶酶原或它們的保留纖維溶酶原活性的變體。

【第15項】如申請專利範圍第1項至第11項中任一項所述之用途，其中，該纖維溶酶原為天然或合成的人纖維溶酶原、或其仍然保留纖維溶酶原活性的變體或片段。