

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **016250**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2012.03.30

(21) Номер заявки
200970233

(22) Дата подачи заявки
2007.08.28

(51) Int. Cl. *A61K 38/48* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) **60/823,665**

(32) **2006.08.28**

(33) **US**

(43) **2009.08.28**

(86) **PCT/SE2007/050585**

(87) **WO 2008/026999 2008.03.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОМНИО ХИЛЕР АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Ню Тор, Ли Дзинань, Го Юнчжи (SE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ERIKSSON PER-OLOF ET AL.: "Spontaneous development of otitis media in plaminogen-deficient mice", International Journal of Medical Microbiology 2006, vol. 296, p. 501-509, page 508, left column, lines 12-15, abstract
WO-A2-03045466

(57) Настоящее изобретение относится к применению плазминогена/плазмина и их производных в качестве агентов, усиливающих защитную реакцию хозяина против инфекции или других инфекционных заболеваний. Изобретение также относится к способу скрининга соединений, которые усиливают защитную реакцию хозяина против инфекции, путем оценки защитной реакции хозяина против бактериального артрита и спонтанного отита среднего уха на животной модели.

B1

016250

016250
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к соединениям и способам профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционных заболеваний и некротических состояний, влияющих на внеклеточный матрикс, особенно обусловленных бактериями. В частности, изобретение относится к таким соединениям и способам, которые приводят к улучшению защиты против инфекции, к лучшей очистке от некротизированной ткани, а также к созданию функционирующей, удовлетворяющей эстетически перестройки ткани. Изобретение также относится к животным моделям для исследования бактериальной инфекции и некроза тканей и способам скрининга для идентификации и оценки лекарственных средств и для улучшения способов лечения бактериальной инфекции и некроза тканей.

Известный уровень техники

Инфекционные заболевания вызываются патогенами, такими как бактерии и вирусы и эукариотные организмы в диапазоне от одноклеточных грибов и простейших вплоть до очень сложных многоклеточных животных, таких как паразитирующие черви. Патогенные бактерии могут содержать вирулентные факторы, которые опосредуют взаимодействия с хозяином, вызывая конкретные ответы у клеток-хозяев, которые стимулируют репликацию и распространение патогена. Действие вирусов основывается на разрушении механизмов работы клетки-хозяина для продукции их собственных белков и репликации их геномов. Патогены часто образуют колонии у хозяина за счет прилипания к эпителиальным поверхностям, которые находятся в непосредственном контакте с окружающей средой, или инвазии в них. Вхождение вирусов основывается главным образом на опосредованном рецепторами эндоцитозе для входа в клетку-хозяина, в то время как бактерии используют клеточную адгезию и пути фагоцитоза [1]. Патогенные грибы, простейшие и другие эукариотные паразиты проходят через несколько различных форм в процессе развития инфекции; в случае паразитов обычно требуется наличие способности к переключению между этими формами для возможности выживания у хозяина и индукции заболевания.

В течение первых часов и дней экспозиции хозяина с новым патогеном первой линией защиты против внедряющихся патогенов является врожденный иммунитет. Однако требуется также инициация специфических адаптивных иммунных ответов. Ответы врожденного иммунитета основываются на способности организма узнавать консервативные характеристики патогенов, которые не присутствуют у неинфицированного хозяина. Они включают много типов молекул на микробной поверхности и двуспиральные РНК некоторых вирусов. Молекулы поверхности микроорганизмов активируют также систему комплемента для нацеливания на эти организмы для фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами и индукции воспалительного ответа.

Бактерии разработали различные стратегии для избегания фагоцитоза. Например, они могут ингибировать хемотаксис и фагоцитоз, уничтожать или колонизировать фагоциты.

Фагоцитирующие клетки используют сочетание ферментов деградации, антимикробных пептидов и реактивных форм кислорода для уничтожения проникающих микроорганизмов [2]. Кроме того, они высвобождают сигнальные молекулы, которые запускают воспалительный ответ и начинают распределять силы адаптивной иммунной системы. Бактерии, с другой стороны, разработали различные стратегии, направленные против адаптивной иммунной системы, такие как молекулярная мимикрия, подавление антител, укрытие внутри клеток или высвобождение антигена в кровотоки [3].

Внутриклеточные патогены, включая все вирусы и многие бактерии и простейшие, реплицируются внутри клетки-хозяина, в которую они проникли с помощью одного из разнообразных механизмов. Вирусы полагаются главным образом на опосредованный рецепторами эндоцитоз для вхождения в клетку-хозяина, в то время как бактерии используют клеточную адгезию и пути фагоцитоза. Простейшие используют уникальные стратегии инвазии, которые обычно требуют существенных метаболических затрат.

Проникнув в клетку, внутриклеточные патогены разыскивают убежище, которое благоприятно для их репликации, часто изменяя транспорт через клеточную мембрану хозяина и используя цитоскелет для внутриклеточного передвижения.

Staphylococcus aureus представляет собой микроорганизм, часто связанный с бактериальным артритом, что ведет к синовиальному воспалению, деструкции хряща и кости и в конечном счете к деформации сустава. У различных видов животных, включая млекопитающих, птиц и рептилий, как обнаружено, развивается спонтанный артрит *S. aureus*, и, следовательно, они являются потенциальными моделями для индукции заболевания.

Система активатора плазминогена (РА) представляет собой общую протеолитическую систему, которая, как предполагается, играет важную роль в развитии различных типов артрита. Плазминоген может активироваться до плазмина с широким спектром протеолитической активности либо двумя физиологическими РА, РА тканевого типа (tРА) или РА урокиназного типа (uРА).

Отиты среднего уха определяются как воспалительные состояния уха. Отиты среднего уха представляют собой наиболее обычное заболевание детей за исключением обычной простуды. Наиболее важным этиологическим фактором, относящимся к отиту среднего уха, являются бактериальные или вирусные инфекции верхних дыхательных путей. Отит среднего уха обычно представляет собой доброкачественное и самоограничивающееся заболевание, но, несмотря на это, предписываемый уровень антибиотиков

является высоким. Фактически эффекты антибиотиков при лечении отита среднего уха не имеют доказательств, и до настоящего времени хирургическое вмешательство является терапией выбора при лечении повторяющегося острого отита среднего уха (АОМ) и хронического отита среднего уха или отита среднего уха с истечением (ОМЕ).

Хорошо известно, что после повреждения возникает немедленная колонизация нормальной флорой кожи больного (например, *S. aureus* и *Streptococcus pyogenes*). Особенно после введения пенициллина G в начале 1950-х гг., приводившего к фактическому удалению *Streptococcus pyogenes* как причины инфекции у больных с термическими повреждениями, *S. aureus* стал главным этиологическим фактором инфицирования ран.

Следовательно, *S. aureus* является одним из наиболее распространенных видов бактерий при инфицировании открытых ран. Резаные раны и ожоговые раневые повреждения являются наиболее общими типами ран, встречающимися в клинической практике.

Антибиотики и другие противомикробные лекарственные средства широко используются при лечении инфекционных заболеваний со времен второй мировой войны. Успех использования антимикробных агентов против вызывающих заболевания микробов находится среди наивысших достижений современной медицины. Однако многие антимикробные агенты не являются настолько эффективными, насколько они должны быть из-за развития устойчивости к лекарственному средству. Ключевым фактором развития устойчивости к антибиотикам является способность инфицирующих организмов к быстрой адаптации к новым условиям окружающей среды. С течением времени некоторые бактерии вырабатывают пути обхода эффектов антибиотиков. Широко распространенное применение антибиотиков, как считается, вызывает быстрые эволюционные приспособления, которые дают возможность бактериям выживать на фоне этих сильных лекарств. Противомикробная устойчивость создает преимущества для выживания микробов и делает более трудной ликвидацию инфекций в организме. В конечном итоге рост трудностей в борьбе с микробами ведет к повышенному риску приобретенных инфекций в больнице или другом окружении. Заболевания, такие как туберкулез, гонорея, малярия и детские инфекции уха, являются в настоящее время более трудными для лечения, чем они являлись всего несколько лет назад. Устойчивость к лекарственным средствам является особенно трудной проблемой для больниц со скоплением тяжело больных пациентов, которые менее способны бороться с инфекциями без помощи антибиотиков. Усиленное использование антибиотиков у таких больных вызывает отбор бактерий, которые изменены так, что несут устойчивость к лекарственным средствам. К сожалению это усугубляет проблему за счет продукции бактерий с более высокой способностью выживать даже в присутствии сильнейших антибиотиков. Эти даже более сильно устойчивые к лекарственным средствам бактерии продолжают действовать на восприимчивых больных в больницах.

Следовательно, существует растущее осознание того, что крайне необходимыми являются новые терапевтические стратегии, улучшающие защиту против инфекции.

Название некроз дано непрограммируемой или случайной смерти клеток и живой ткани. Он менее упорядочен, чем апоптоз, который является частью запрограммированной смерти клетки. В отличие от апоптоза очистка разрушенных в результате некроза клеток фагоцитами иммунной системы обычно является более трудной, так как неорганизованная смерть обычно не посылает клеточные сигналы "съешь меня", которые сообщают находящимся вблизи фагоцитам о необходимости поглощения умершей клетки. Это отсутствие сигнализации делает более трудным для иммунной системы локализацию и рециклизацию умерших клеток, которые уничтожены в результате некроза, чем если бы эта клетка подверглась апоптозу. Высвобождение внутриклеточного содержимого после повреждения клеточной мембраны является причиной воспаления при некрозе.

Существует много причин некроза, включая повреждение, инфекцию, рак, инфаркт, отравление ядом и воспаление. Сильное повреждение одной важной системы в клетке ведет к вторичному повреждению других систем, к так называемым "каскадным эффектам". Некроз вызывается специальными ферментами, которые высвобождаются лизосомами и которые способны гидролизовать клеточные компоненты или саму клетку в целом. Повреждения, получаемые клеткой, могут нарушать мембрану лизосом или могут отделять спонтанную цепь реакций, которая вызывает высвобождение ферментов. В отличие от апоптоза клетки, которые погибают в результате некроза, могут высвобождать вредные химические агенты, которые повреждают другие клетки. В биопсийном материале некроз приостанавливается фиксацией или замораживанием.

В настоящее время существует четыре главных терапевтических способа лечения некроза. Первым является хирургическое удаление, которое является наиболее быстрым и, следовательно, рекомендуется, когда присутствуют обширные области некроза или мощный ожоговый струп. Вторым способом является механическое удаление, которое включает гидротерапию, декстраномеры и промывание раны. Третьим способом является ферментативное удаление, используемым ферментом является главным образом коллагеназа (например, Santyl), однако эффект является слишком медленным, когда присутствует инфекция; и четвертым является аутолитический способ, который осуществляется с помощью ферментов в раневой жидкости, но эффект является крайне медленным. Однако ни один из этих четырех способов лечения не дает функционально и эстетически удовлетворительного удаления некротизированной ткани

и перестройки ткани. Следовательно, крайне необходима новая терапевтическая стратегия для достижения успешного устранения некроза.

Имеющиеся в настоящее время терапевтические способы лечения инфекций, таких как бактериальный артрит, инфекция открытых ран, отит среднего уха и некроз, имеют недостатки, как обсуждалось выше. Следовательно, в данной области техники существует высокая потребность в улучшенных стратегиях лечения инфекций в целом.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к неожиданному открытию того, что компоненты пути активации плазминогена и соединения, обладающие способностью активировать плазминоген, могут быть использованы для новых и улучшенных стратегий лечения инфекционных заболеваний и некроза тканей. В одном аспекте изобретение относится к способности плазминогена или других членов пути активации плазминогена, или соединений, обладающих способностью активировать плазминоген, играть роль в защите против, например, артрита, индуцированного *S. aureus*, и инфицирования открытых ран путем активации воспалительных клеток, уничтожения бактерий, удаления некротизированной ткани и повышения экспрессии цитокинов. Такие состояния инфицирования дополнительно включают инфекционные заболевания и другие болезни, при которых обычно наблюдается инфицирование тканей, например, в процессе защиты от тканеспецифической инфекции, защиты от инфекции всего организма, при острых инфекциях, хронических инфекциях, хронических язвах, инфицировании открытых ран и диабетических язвах.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, включающему введение эффективного количества соединения, которое является компонентом пути активации плазминогена, или обладает способностью активировать плазминоген непосредственно или через путь активации плазминогена.

В определенных вариантах осуществления соединение, обладающее способностью активировать плазминоген непосредственно или через путь активации плазминогена, включает стрептокиназу, саруплазу, альтеплазу, ретеплазу, тенектеплазу, анистреплазу, монтеплазу, ланотеплазу, памитеплазу, стафилокиназу и рекомбинантные формы и варианты компонентов пути активации плазминогена.

В определенных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой бактериальное инфекционное заболевание или вирусное инфекционное заболевание.

В дополнительных вариантах осуществления бактериальное инфекционное заболевание выбрано из отита среднего уха, бактериального артрита, гингивита, периодонтита, конъюнктивита, инфицирования ран, инфекций хирургических ран, некроза, пневмонии, повреждений дыхательных путей, вызванных ожогами и/или инфекциями, и из инфицированных хронических язв ног у больных, страдающих диабетом, венозной или сочетанной венозно/артериальной недостаточностью, или инфекционного артрита или т.п., повреждений тканей суставов, вызванных инфекциями, предпочтительно отита среднего уха или бактериального артрита.

В определенных вариантах осуществления композиция включает сочетание двух или более соединений. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно включает по меньшей мере один агент - антибиотик.

В дополнительных вариантах осуществления агент-антибиотик выбран из группы, состоящей из тетрациклинов, амфениколов, β -лактамов, пенициллинов, сульфонамидов, макролидов, линкозамидов, стрептогаминов, стрептомицинов, хинолонов и метронидазолов.

В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, и в частности человека. В дополнительных вариантах осуществления у индивидуума есть недостаточность плазмينا или плазминогена. Недостаточность может быть врожденной, приобретенной и/или местной.

В определенных вариантах осуществления соединение вводят системно, местно, локально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, путем ингаляции, внутривенно, путем местной инъекции, путем внутрисуставной инъекции или ректально. В предпочтительном варианте осуществления используют локальное введение и/или местное введение.

В определенных вариантах осуществления соединение вводят в сочетании с подходящим полипептидным носителем и/или одним или несколькими стабилизирующими агентами.

В еще одних дополнительных вариантах осуществления соединение вводят в дозе от 0,0001 до приблизительно 1 г, предпочтительно от 0,005 до приблизительно 100 мг, более предпочтительно от приблизительно 0,05 до приблизительно 50 мг. Доза в мг определяется в отношении к квадратному сантиметру инфицированной области (т.е. мг/см² инфицированной области).

В дополнительных вариантах осуществления введение соединения повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере каждый день.

В дополнительных вариантах осуществления введение осуществляют путем наложения на рану в инфицированной области повязки, включающей соединение настоящего изобретения.

В дополнительных вариантах осуществления изобретение относится к способу профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, который включает введение фармацевтической композиции, включающей эффективное количество подходящего соединения, индивидууму, нуждающе-

муся в таком лечении.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, включающей эффективное количество подходящего соединения.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к набору, используемому для профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, включающему эффективное количество подходящего соединения и по меньшей мере один антибиотик или противогрибковый агент в отдельных флаконах.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу идентификации агента, который пригоден для стимуляции защиты хозяина против инфекции, включающему стадии:

- a) введения тестируемого агента животному с бактериальным артритом;
- b) оценки по меньшей мере одного из параметров:
 - (i) степени уничтожения бактерий;
 - (ii) образования некротизированной ткани;
 - (iii) активации воспалительных клеток;
 - (iv) экспрессии цитокинов при инфекции, например при бактериальном артрите;
- c) сравнения выбранного(ных) параметра(ов) стадии b) с контрольной величиной;
- d) выбора любого тестируемого агента, для которого выбранный(ные) параметр(ы) является(ются) более благоприятным(и) по сравнению с контрольной величиной, в качестве агента, пригодного для стимуляции защиты хозяина против инфекции.

В определенных вариантах осуществления животное выбрано из членов группы, состоящей из животного дикого типа и трансгенного животного с отсутствием эндогенной экспрессии плазминогена.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу диагностики текущей инфекции, включающему определение диагностического присутствия плазминогена.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к набору для использования при определении плазминогена в образце больного, где образец берут из жидкостей организма, сыворотки, экскретируемых продуктов выделения, таких как моча или фекалии, выдыхаемого воздуха или т.п., для того, чтобы определить текущую инфекцию и/или эффект на текущее лечение, включающему средство определения плазминогена и средства для сбора, хранения и/или определения образца больного.

Описание изобретения

Представленные результаты в отношении уха показывают, что плазминоген играет роль в защите от спонтанного развития хронического отита среднего уха. Представленные результаты также предполагают использование плазминогена для клинической терапии определенных типов отита среднего уха. Следовательно, эти данные позволяют предположить, что компоненты пути активации плазминогена играют роль в предотвращении и лечении любого инфекционного заболевания в качестве нового провоспалительного фактора. В частности, провоспалительные эффекты компонентов пути активации плазминогена включают активацию воспалительных клеток, уничтожение бактерий, удаление некротической ткани и повышение экспрессии цитокинов, а также улучшение надлежащей перестройки ткани. Это заключение сделано на основе понимания общего механизма защиты хозяина против всех инфекционных патогенов, многочисленных и многосторонних инфекционных заболеваний, индуцируемых *S. aureus*, которые являются главными видами бактерий, используемыми в исследованиях авторов, и на основе моделей различных инфекций, изученных в этой патентной работе (включая инфекционный артрит, индуцируемую ожогом инфекцию, индуцируемую резаной раной инфекцию и отит среднего уха).

Инфекционные заболевания в настоящее время являются причиной приблизительно одной трети всех смертей человека в мире, больше, чем все взятые вместе формы рака. Многие типы патогенов вызывают заболевание у человека. Наиболее хорошо известными являются вирусы и бактерии. Другие инфекционные патогены представляют собой эукариотные организмы в диапазоне от одноклеточных грибов и простейших вплоть до очень сложных многоклеточных животных, таких как паразитирующие черви. Каждый индивидуальный патоген вызывает заболевание разным способом, что создает проблему для понимания основной биологии их инфицирования. Однако все патогены проявляют способность взаимодействовать с клетками-хозяевами таким способом, чтобы стимулировать репликацию и распространение патогена, но эти взаимодействия хозяин-патоген различаются. Патогены часто образуют колонии у хозяина за счет прилипания к эпителиальным поверхностям, таким как поверхность кожи, которые находятся в непосредственном контакте с окружающей средой, или инвазии в них. Внутриклеточные патогены, включая все вирусы и многие бактерии и простейшие, реплицируются внутри клетки-хозяина, в которую они внедрились с помощью одного из разнообразных механизмов. Вхождение вирусов основывается главным образом на опосредованном рецепторами эндоцитозе для входа в клетку-хозяина, в то время как бактерии используют клеточную адгезию и пути фагоцитоза. Простейшие применяют уникальные стратегии инвазии, которые обычно требуют существенных метаболических затрат. Оказавшись внутри, внутриклеточные патогены находят нишу, которая благоприятна для их репликации, часто изменяя транспорт через клеточную мембрану хозяина и используя цитоскелет для внутриклеточного передвижения. Кроме изменения поведения индивидуальных клеток-хозяев, патогены часто изменяют поведение

организма-хозяина таким образом, который способствует распространению в новом хозяине. Патогены быстро эволюционируют, так что часто возникают новые инфекционные заболевания, и у старых заболеваний возникают новые пути ускользания от попыток человека лечить, предотвращать и ликвидировать заболевание.

Более того, при существенном прогрессе борьбы с инфекционными заболеваниями, таком как с помощью вакцин и антибиотиков, патогены также развивают устойчивость к лекарственным средствам путем 1) продукции фермента, который разрушает лекарство, 2) изменения молекулярной мишени лекарства, так что он становится нечувствительным к лекарственному средству, или 3) предотвращения доступа к мишени. Следовательно, устойчивые к лекарственным средствам патогены представляют растущую проблему.

Несмотря на различные пути, которые разработали патогены для инвазии в человека, существует только несколько ограниченных путей, с помощью которых защитная система хозяина борется против инфекции. Защитная система хозяина включает как адаптивную систему иммунитета, так и систему врожденного иммунитета. В то время как адаптивная система иммунитета помнит предшествующие встречи со специфическими патогенами и разрушает их с помощью врожденной системы иммунитета, когда они атакуют вновь, врожденная система иммунитета не является специфической для конкретного патогена, как это происходит в случае адаптивной системы иммунитета. Таким образом, врожденная система иммунитета является первой линией защиты против внедряющихся патогенов, и она также необходима для инициации специфических адаптивных иммунных ответов.

Врожденные иммунные ответы основываются на способности организма узнавать консервативные черты патогенов, которые не присутствуют у неинфицированного хозяина. Эти черты включают, например, пептидогликаны клеточной стенки и жгутики бактерий, а также липополисахариды (LPS) на грамотрицательных бактериях и тейхоевые кислоты на грамположительных бактериях, зимозан, глюкан и хитин в клеточных стенках грибов и двуспиральную РНК большинства вирусов. Многие из этих патоген-специфических молекул узнаются Toll-подобными рецепторными белками на воспалительных клетках. У позвоночных молекулы микробной поверхности также активируют комплемент, группу белков крови, которые действуют совместно, разрушая мембрану микроорганизма, для направления микроорганизмов в сторону фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами, и индукции воспалительных ответов. Фагоцитирующие клетки используют сочетание ферментов деградации, противомикробных пептидов и реактивных форм кислорода для уничтожения проникших микроорганизмов. Воспалительные клетки также вызывают деградацию некротизированной ткани, образованной в результате инфекции, с помощью секретируемых или внутренних ферментов. Кроме того, они секретируют сигнальные молекулы, которые запускают воспалительный ответ и начинают группировать силы адаптивной системы иммунитета. Клетки, инфицированные вирусами, узнаются макрофагами с помощью погибших/умерших клеток, Toll-подобных рецепторов и дефенсинов. Эти макрофаги дополнительно отвечают секрецией провоспалительных цитокинов, гидролизом вирусных белков в фаголизосомах и презентацией вирусных белков вблизи лимфатических узлов и селезенки для активации большего количества воспалительных клеток. Система комплемента может также узнавать вирусы, активировать воспалительные клетки для уничтожения вируса и дополнительно индуцировать адаптивную систему иммунитета для выработки антител.

Как обсуждалось выше, в системе врожденного иммунитета воспалительные клетки (нейтрофилы и макрофаги) играют центральную роль в защите хозяина против всех видов инфекции, от вирусов и бактерий, одноклеточных грибов и простейших вплоть до очень сложных многоклеточных животных, таких как паразитирующие черви. Воспалительные клетки активно ищут, поглощают и разрушают патогены непосредственно или через различные рецепторы клеточной поверхности, такие как Toll-подобные рецепторы и рецепторы комплемента. Если патоген является слишком большим, таким как большие паразиты, группа макрофагов и нейтрофилов будет собираться вокруг внедрившегося вида. Активированные макрофаги также рекрутируют дополнительные фагоцитирующие клетки к местам инфицирования. Воспалительные клетки также секретируют разнообразные сигнальные молекулы для опосредования и амплификации воспалительного ответа. В опосредованном В-клетками адаптивном иммунном ответе против инфекционных патогенов вновь созданное антитело связывается с антигенами на патогенах через свой Fab-фрагмент и с рецепторами поверхности (FcR) на воспалительных клетках (главным образом макрофагах) через свой Fc-фрагмент и, следовательно, связывает воспалительные клетки с патогенами, и затем они уничтожаются.

На основе раскрытого открытия введение плазминогена и его производных играет плюрипотентную роль в защите против, например, бактериального артрита, индуцированного *S. aureus*, инфицирования открытых ран и отита среднего уха, путем активации воспалительных клеток, уничтожения бактерий, удаления некротизированной ткани, увеличения экспрессии цитокинов и стимуляции нормальной перестройки ткани. Все эти эффекты представляют собой различные аспекты мощных функций, проявляемых воспалительными клетками против всех видов инфекций. Для объяснения всех полученных данных авторы разработали рабочую гипотезу. Ключевым моментом этой гипотезы является то, что плазминоген потенцирует активность воспалительных клеток и, следовательно, опосредует такие процессы, как уничтожение бактерий, удаление некротизированной ткани, увеличение экспрессии цитокинов и стимуляция

нормальной перестройки ткани. Как указывалось выше, воспалительные клетки (нейтрофилы и макрофаги) играют центральную роль в защите хозяина против всех видов инфекции, от вирусов и бактерий, одноклеточных грибов и простейших вплоть до очень сложных многоклеточных животных, таких как паразитирующие черви. Следовательно, раскрытия, представленные в настоящем изобретении, поддерживают заключение о том, что плазминоген и его производные являются новыми кандидатными лекарственными средствами для защиты хозяина от всех инфекционных заболеваний и некроза.

В настоящем изобретении примеры представлены для того, чтобы продемонстрировать сильную противоионную роль системы активации плазминогена под различными углами и с помощью разных моделей. В примере 1 показано, что у мышей $plg^{-/-}$ наблюдается намного более тяжелая деструкция тканей и более тяжелое хроническое воспаление по сравнению с мышами $plg^{+/+}$ после индукции бактериального артрита. Эти мыши $plg^{-/-}$ ослаблены также в плане уничтожения бактерий (пример 3) и в плане более низких уровней экспрессии IL-10 (пример 9), но инфильтрация инфицированных суставов макрофагами и нейтрофилами не нарушена явно у мышей $plg^{-/-}$ (пример 4). Лечение антибиотиками уничтожает бактерии и снижает воспаление, но не снижает образование некротизированной ткани у мышей $plg^{-/-}$ (пример 2). Однако системная или местная добавка плазминогена человека (hPlg) мышам $plg^{-/-}$ восстанавливала нормальную защиту хозяина против бактериального артрита, индуцированного *S. aureus* (примеры 5 и 6), и повышала экспрессию белка IL-6 в инфицированных коленных суставах (пример 8). Местное нанесение плазминогена человека мышам $plg^{+/+}$ повышает защиту хозяина против инфекции *S. aureus* (пример 7), что ясно указывает на то, что плазминоген является отличным противоионным агентом, лучшим, чем антибиотики, и может эффективно использоваться у нормальных животных дикого типа. Важность системы активации плазминогена в защите хозяина против инфекции и перестройке ткани дополнительно продемонстрирована с помощью использования мышей $uPA^{-/-}$ (пример 10). В примере 10 показано, что факторы, которые активируют плазминоген, могут также быть полезными в качестве терапевтических агентов, так как плазминоген, по-видимому, является менее эффективным в отсутствие активатора. Более того, существенная роль плазминогена в защите хозяина против инфекции была дополнительно подтверждена с помощью использования мышей $plg^{-/-}$ в другой модели бактериального артрита (в/в введение бактерий, примеры 11) и 12) и в двух других моделях инфицирования открытых ран, резаной раны (пример 13) и ошпаренной ожоговой раны (пример 14). Исследование спонтанного развития отита среднего уха показывает, что все исследованные мыши $plg^{-/-}$ имели инфекцию уха, в то время как все мыши $plg^{+/+}$ оставались неинфицированными (пример 17). Открытие бактерий в тканях уха показало, что только 1 тип бактерий идентифицирован у 1 из 6 мышей $plg^{+/+}$, в то время как 4 типа бактерий идентифицировано у 5 из 6 мышей $plg^{-/-}$ (примеры 15 и 16). Все эти примеры характеризуют плурипотентную роль плазминогена в различных антиионных аспектах и усиленно поддерживают заключение о том, что плазминоген и его производные являются новыми кандидатными лекарственными средствами для защиты хозяина от всех инфекционных заболеваний.

Так как соединения плазминогена и способы настоящего изобретения вызывают воспалительный ответ, направленный против инфекционных или некротических состояний, соединения и способы настоящего изобретения могут обеспечить защиту против всех инфекционных заболеваний, особенно бактериального инфекционного заболевания и некроза. Такие инфекционные состояния включают инфекционные заболевания и другие заболевания, при которых обычно наблюдается инфицирование тканей, например, в процессе защиты против инфекции, при хронических язвах и диабетических язвах. Такой некроз существует не только в модели заболевания, исследованной в настоящем описании, но также при других типах заболеваний, которые также могут индуцировать некроз тканей, такой как бессосудистый некроз головки бедра, сосочковый некроз, остеонекроз бедра, некроз коры почки, острый некроз трубочек, острый некроз сетчатки, острый некроз трубочек, инфаркт миокарда, некроз поджелудочной железы, ишемический колит, некротизирующий фасцит. Существует много причин некроза, включая повреждение, инфекцию, рак, инфаркт, отравление ядом, незаживающие и медленно заживающие раны, диабет и воспаление. Кроме того, было открыто, что тяжелое воспаление, разрушение ткани, некроз и рост бактерий, все постоянно существует у животного с дефицитом плазминогена, что, следовательно, предоставляет новую модель для исследования бактериальной инфекции и некроза тканей и для способов скрининга с целью идентификации и оценки лекарственных средств и способов лечения усиливающих бактериальной инфекции и некроза ткани.

Соответственно, в первом аспекте в изобретении предлагается использование соединения, которое является компонентом пути активации плазминогена, или соединения, обладающего способностью активировать плазминоген либо непосредственно, либо опосредованно путем активации вышележащего компонента пути активации плазминогена, для получения фармацевтической композиции для профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания.

В предпочтительном варианте осуществления компонент пути активации плазминогена выбран из плазминогена, рекомбинантного плазмина человека, Lys-плазминогена, плазмина, вариантов и аналогов плазминогена и плазмина, включающих один или несколько крингл- и протеазных доменов плазминогена и плазмина, миниплазминоген, миниплазмин, активаторы плазминогена, tPA и uPA.

В другом предпочтительном варианте осуществления соединение, обладающее способностью акти-

вировать плазминоген, выбрано из стрептокиназы, саруплазы, альтеплазы, ретеплазы, тенектеплазы, анистреплазы, монтеплазы, ланотеплазы, памитеплазы, стафилокиназы и рекомбинантных форм и вариантов компонентов пути активации плазминогена.

В целом компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген, можно вводить системно, местно, локально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, путем ингаляции, внутриболоечно, путем местной инъекции, путем внутрисуставной инъекции или ректально. В предпочтительном варианте осуществления используют локальное введение и/или местное введение.

Компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген, также может быть введено в сочетании с подходящим полипептидным носителем, таким как альбумин, желатин и т.п., и/или с одним или более стабилизирующим(ми) агентом(тами), такими как поверхностно-активное вещество, циклодекстрин, сахарид, диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, антиоксидант, хелатор металла, ингибитор ферментов и тому подобное. Такие добавки могут быть использованы для улучшения стабильности продукта многими способами, включая сведение к минимуму адсорбцию/абсорбцию путем снижения агрегации, улучшение растворимости, снижение окисления и снижение деградации. Способы разработки подходящего носителя для данного белка хорошо известны в данной области техники.

Далее, в качестве примера, компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген, можно вводить в дозе от 0,0001 до приблизительно 1 г, предпочтительно от 0,005 до приблизительно 100 мг, более предпочтительно от приблизительно 0,05 до приблизительно 50 мг. Доза в мг определяется в отношении к квадратному сантиметру инфицированной области (т.е. мг/см² инфицированной области).

Более того, введение компонента пути активации плазминогена или соединения, обладающего способностью активировать плазминоген, можно, например, повторять по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере каждый день.

В контексте настоящего изобретения и объема формулы изобретения индивидуумом может быть любое млекопитающее, особенно человек.

Также в другом предпочтительном варианте осуществления инфекционное заболевание представляет собой бактериальное инфекционное заболевание.

Главным образом бактериальное инфекционное заболевание выбрано из отита среднего уха, бактериального артрита, гингивита, периодонтита, конъюнктивита, кератита, инфицирования ран, инфекций хирургических ран, инфекций/повреждения девственной плевы, некроза, инфекций, таких как пневмония, повреждений дыхательных путей, вызванных ожогами и/или инфекциями, и инфицированных хронических язв ног у больных, страдающих диабетом, системных инфекций, инфекций, обусловленных венозной или сочетанной венозно/артериальной недостаточностью или инфекционным артритом или тому подобным, инфекций, вторичных по отношению к повреждениям тканей суставов, вызванных инфекциями. Особенно, как иллюстрируется в прилагаемых примерах, изобретение эффективно для лечения отита среднего уха, бактериального артрита, инфекции, связанной с ожогами, и инфекции, связанной с резаными ранами.

Staphylococcus aureus представляет собой микроорганизм, наиболее часто связанный с бактериальным артритом, который ведет к воспалению сустава, деструкции хряща и кости и в конечном итоге к деформации сустава.

Бактериальный артрит представляет собой быстро прогрессирующее и крайне деструктивное заболевание суставов человека. Все деструктивные заболевания суставов, включая воспалительные нарушения, такие как ревматоидный артрит, связаны с повышенной встречаемостью бактериального артрита. Определенные формы терапии, такие как импланты суставов и иммуносупрессорное лечение, указывают на повышенную частоту бактериального артрита. Причиной бактериального артрита негонококкового происхождения приблизительно в 60% случаев является *S. aureus*. У больных с ревматическими заболеваниями эта величина даже выше, приближаясь к 75%. Ранее использовались лабораторные модели бактериального артрита. В большинстве случаев бактерии вводили внутрь сустава. Заболеваемость и смертность из-за инфекций *S. aureus* в суставах остается высокой, несмотря на использование более новых антибиотиков. Рост преобладания множественной устойчивости к антибиотикам у *S. aureus* является главной проблемой здравоохранения. Следовательно, крайне необходим новый, сильный агент, который может существенно повысить защиту хозяина.

Отит среднего уха представляет собой наиболее обычное детское заболевание за исключением обычной простуды. Наиболее важным этиологическим фактором, относящимся к отиту среднего уха, являются бактериальные или вирусные инфекции верхних дыхательных путей. Отит среднего уха обычно представляет собой доброкачественное и самоограничивающееся заболевание, но, несмотря на это, предписываемый уровень антибиотиков является высоким. Фактически эффекты антибиотиков при лечении отита среднего уха не имеют доказательств, и до настоящего времени хирургическое вмешательство является терапией выбора при лечении повторяющегося острого отита среднего уха (АОМ) и отита среднего уха с истечением (ОМЕ).

Хорошо известно, что после повреждения происходит немедленная колонизация нормальной флорой кожи больного (т.е. *S. aureus* и *Streptococcus pyogenes*). Особенно после введения пенициллина G в начале 1950-х гг., приведшего к фактическому удалению *Streptococcus pyogenes* как причины инфекции у больных с термическими повреждениями, *S. aureus* стал главным этиологическим фактором инфицирования ран. Следовательно, *S. aureus* является одним из наиболее общих видов бактерий при инфицировании открытых ран. Резаные раны и ожоговые раны являются наиболее общими типами ран, встречающимися в клинической практике. Сходно с ситуацией в отношении бактериального артрита из-за устойчивости бактерий к лекарственным средствам крайне необходим новый, сильный агент, который может существенно повысить защиту хозяина.

В основном изобретение эффективно для лечения всех инфекционных заболеваний, включая инфекционные заболевания, вызываемые бактериальными, вирусными и грибковыми инфекциями.

В основном, так как соединения плазминогена и способы настоящего изобретения обеспечивают воспалительный ответ, направленный на инфекцию или инфекционное заболевание, или некротические состояния, соединения и способы настоящего изобретения могут обеспечить эффективное лечение всех инфекционных заболеваний, особенно инфекционных заболеваний, вызываемых бактериальными, вирусными и грибковыми инфекциями.

Бактериальные и грибковые агенты, которые могут вызвать инфекционное заболевание или симптомы, которые можно лечить по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, следующие грамотрицательные и грамположительные бактерии, семейства бактерий и грибы: *Actinomyces* (например, *Nocardia*), *Acinetobacter*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Bacillaceae* (например, *Bacillus anthracis*), *Bacteroides* (например, *Bacteroides fragilis*), *Blastomycosis*, *Bordetella*, *Borrelia* (например, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella*, *Candida*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium* (например, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), *Coccidioides*, *Corynebacterium* (например, *Corynebacterium diphtheriae*), *Cryptococcus*, *Dermatocycoses*, *E.coli* (например, *Enterotoxigenic E.coli* и *Enterohemorrhagic E.coli*), *Enterobacter* (например, *Enterobacter aerogenes*), *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Salmonella* (например, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*), *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*), *Erysipelothrix*, *Haemophilus* (например, *Haemophilus influenzae* тип B), *Helicobacter*, *Legionella* (например, *Legionella pneumophila*), *Leptospira*, *Listeria* (например, *Listeria monocytogenes*), *Mycoplasma*, *Mycobacterium* (например, *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium tuberculosis*), *Vibrio* (например, *Vibrio cholerae*), *Neisseriaceae* (например, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*), *Pasteurellaceae*, *Proteus*, *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsiaceae*, *Spirochetes* (например, *Treponema spp.*, *Leptospira spp.*, *Borrelia spp.*), *Shigella spp.*, *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus aureus*), *Meningococcus*, *Pneumococcus* и *Streptococcus* (например, *Streptococcus pneumoniae* и группы A, B и C *Streptococci*) и *Ureaplasmas*.

Эти семейства бактерий, паразитов и грибов могут вызывать заболевания или симптомы, включая, но не ограничиваясь этим:

- сепсис, такой как бактериемия, геморрагический сепсис; и фунгемиа;
- бактериальные инфекции центральной нервной системы, такие как нейроборрелиоз Лайма, бактериальный менингит и энцефалит, церебральный токсоплазмоз и нейросифилис;
- бактериальные инфекции глаза, такие как бактериальный конъюнктивит, инфекционный кератоконъюнктивит, инфекционный кератит, глазной туберкулез и увеит;
- бактериальные инфекции уха, такие как отит среднего уха, наружный отит;
- заболевания, передающиеся половым путем, такие как хламидийные инфекции, гонорея и сифилис;
- инфекционные заболевания кожи, такие как целлюлит, дерматомироз и бактериальные заболевания кожи, такие как актиномикоз, ангиоматоз, эктима, рожистое воспаление, стафилококковые инфекции кожи, кожный сифилис и кожный туберкулез;
- бактериальный вагиноз;
- инфекции дыхательных путей, такие как коклюш и пневмония, такая как пневмококковая пневмония, стафилококковая пневмония и микоплазменная пневмония;
- инфекции мочевых путей, такие как бактериурия;
- инфекции ран, такие как инфекции хирургических ран, хронические инфицированные язвы кожи, некроз, инфекции открытых ран;
- бактериальный артрит;
- инфекционные заболевания кости, такие как остеоит, остеомиелит, периостит, спондилит и костно-суставный туберкулез;
- инфекции сердечно-сосудистой системы, такие как бактериальный эндокардит, сифилис сердечно-сосудистой системы и туберкулез сердечно-сосудистой системы; периодонтальные заболевания, такие как гингивит и периодонтит;
- связанные со СПИДом оппортунистические инфекции;
- инфекции таза;
- инфекционные осложнения беременности; которые соответственно можно лечить по настоящему изобретению. Для более подробного перечисления инфекционных заболеваний, в отношении которых

изобретение должно быть эффективным, делается ссылка на веб-страницу <http://www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/quicklinks.htm> или на любой другой относящийся к этому обзорный журнал в данной области техники, раскрывающий инфекционные заболевания (см. перечень ссылок).

Так как путь активации плазминогена и соединения настоящего изобретения дают воспалительный ответ на вирусные инфекции сходного типа, что и на бактериальные инфекции и состояния некроза, соединения и способы настоящего изобретения обеспечивают сходную полезную защиту против вирусных инфекций и состояний, включая перечисленные ниже.

Вирусные агенты, которые могут вызывать инфекционное заболевание или симптомы и которые можно лечить по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, арбовирусные инфекции, такие как лихорадка блютонга, лихорадка денге, арбовирусный энцефалит, флеботомная лихорадка, лихорадка долины Рифт, передаваемые клещами заболевания и желтая лихорадка; вирусный бронхиолит; вирусные заболевания центральной нервной системы, такие как энцефалит, вирусный менингит, миелит, полиомиелит и инфекционный бульбарный паралич; инфекцию, вызываемую ДНК-содержащими вирусами, такую как аденовирусные инфекции, африканская лихорадка свиней, цирковиральные инфекции, гепаднавирусные инфекции, инфекции, вызываемые вирусом герпеса, включая, но не ограничиваясь этим, простой герпес, опоясывающий герпес и цитомегаловирусные инфекции, папилломавирусные инфекции, парвовирусные инфекции, полиомавирусные инфекции и поксвирусные инфекции; вирусный энцефалит, такой как арбовирусный энцефалит, энцефалит, вызываемый вирусом простого герпеса, и вторичный энцефалит после ветряной оспы, вирусные инфекции глаза, такие как вирусный конъюнктивит, цитомегаловирусный ретинит, офтальмит, вызываемый опоясывающим герпесом, и герпетический кератит; вирусный гепатит, такой как гепатит А, гепатит В, гепатит С, гепатит D и гепатит E; оппортунистические инфекции, такие как связанные со СПИДом оппортунистические инфекции; вирусную пневмонию; инфекции, вызываемые РНК-содержащими вирусами, такие как аренавирусные инфекции, астровирусные инфекции, бирнавирусные инфекции, бунявирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, хантавирусные инфекции, каликивирусные инфекции, арбовирусный энцефалит, флавивирусные инфекции, вирусные геморрагические лихорадки, инфекции Mononegavirales, включая, но не ограничиваясь этим, рабдовирусные инфекции, такие как бешенство, парамиксовирусные инфекции, такие как морбилливирусная инфекция, включая, но не ограничиваясь этим, корь, пневмовирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, инфекцию, вызываемую респираторным синцитиальным вирусом, и рубулавирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, свинку, нидовирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, коронавирусные инфекции, такие как тяжелый острый респираторный синдром, ортомиксовирусные инфекции, такие как грипп, пикорнавирусные инфекции, такие как энтеровирусные инфекции, реовирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, ротавирусные инфекции, ретровирусные инфекции, включая, но не ограничиваясь этим, лентивирусные инфекции и тогавирусные инфекции; вирусные заболевания, передающиеся половым путем; вирусные заболевания кожи, такие как инфекционная эритема, внезапная экзантема, простой герпес, заразительный моллюск и бородавки; медленные вирусные заболевания, такие как СПИД, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, и подострый склерозирующий панэнцефалит; вирусные опухолевые инфекции, такие как инфекции, вызываемые вирусом Эпштейна-Барра, болезнь Марекка и папилломавирусные инфекции и вiremия.

В другом варианте осуществления композиция включает сочетание двух или более соединений, которые представляют собой компоненты пути активации плазминогена или соединения, обладающие способностью активировать плазминоген.

В еще одном варианте осуществления композиция дополнительно включает по меньшей мере один агент-антибиотик.

Агент-антибиотик выбран, например, из группы, состоящей из тетрациклинов, амфениколов, бета-лактамов, пенициллинов, сульфонамидов, макролидов, линкозамидов, стрептогаминов, стрептомицинов, хинолонов и метронидазолов, а также любого подходящего антибактериального агента, микоцида или фунгицида.

Далее, еще в одном варианте осуществления профилактика, предотвращение и/или лечение инфекционного заболевания включает индукцию иммунного ответа против инфекционного патогена.

Во втором аспекте изобретение относится к способу профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, который включает введение фармацевтической композиции, включающей эффективное количество соединения, которое представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединения, обладающее способностью активировать плазминоген, индивидууму, нуждающемуся в таком лечении.

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, включающей эффективное количество соединения, которое представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединения, обладающее способностью активировать плазминоген, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте изобретение относится к набору для использования в профилактике, предот-

вращении и/или лечении инфекционного заболевания, включающему эффективное количество соединения, которое представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген, и по меньшей мере один антибиотик, противовирусный или противогрибковый агент в отдельных флаконах.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу идентификации агента, который пригоден для стимуляции защиты хозяина против инфекции, включающему стадии:

a) введения тестируемого агента животному с бактериальным артритом;

b) оценки по меньшей мере одного из следующих параметров:

(i) степени уничтожения бактерий;

(ii) образования некротизированной ткани;

(iii) активации воспалительных клеток;

(iv) экспрессии цитокинов при инфекции, например при бактериальном артрите, с помощью применения флуоресцентной или радиоизотопной биомаркерных меток, микробиологического анализа бляшкообразования образцов из жидкостей организма или гомогенатов тканей, анализа FACS, ELISA, гистологических исследований и/или оценки цитотоксичности (в отношении уничтожения бактерий можно просто выделять бактерии из одной ткани/органа, в отношении образования некротизированной ткани можно определять ее количество при аутопсии тканей, в отношении активации воспалительных клеток их можно определять гистохимически, с помощью ELISA, иммуноблоттинга или различных маркеров воспалительных клеток, и в отношении продукции цитокинов, существуют наборы для определения уровней цитокинов. Все эти способы, которые могут быть использованы, включены в раздел примеров этого описания);

c) сравнения выбранного(ных) параметра(ов) стадии b) с контрольной величиной, где плазминоген может быть использован в качестве положительного контроля, а необработанная группа в качестве отрицательного контроля);

d) выбора любого тестируемого агента, для которого выбранный(ые) параметр(ы) является(ются) более благоприятными по сравнению с контрольной величиной, в качестве агента, пригодного для стимуляции защиты хозяина против инфекции.

В предпочтительном варианте осуществления тестируемая животная модель выбрана из членов группы, состоящей из животного дикого типа и трансгенного животного с отсутствием эндогенной экспрессии плазминогена.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу диагностики текущей инфекции, включающему диагностическое определение присутствия плазминогена.

В еще одном аспекте изобретение относится к набору для использования при определении плазминогена в образце больного, где образец берут из жидкостей организма, сыворотки, экскретируемых продуктов выделения, таких как моча или фекалии, выдыхаемого воздуха или т.п., для того, чтобы определить текущую инфекцию и/или эффект на текущее лечение, включающему средство определения плазминогена и средства для сбора, хранения и/или определения образца больного.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагается способ улучшения защиты хозяина против инфекции, включающий введение композиции, включающей активный агент, который представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген. Предпочтительно активный агент выбран из плазмина или плазминогена, или аналога плазмина или плазминогена. Наиболее предпочтительно, чтобы активный агент представлял собой плазминоген. Активный агент может быть введен любым путем введения, известным в данной области техники. Предпочтительные неограничивающие пути введения включают местное введение и локальное введение. Агент может также присутствовать в повязке для ран, наложенной на область инфекции, если возможно, из которой он (агент) переносится на инфицированное место. Агент может также присутствовать в промывающем растворе, глазных каплях и растворе для полоскания или тому подобном, применяемых для очистки инфицированной области.

В изобретении также предлагается способ инициации защиты хозяина против инфекции в условиях, когда защита инфицированного хозяина задерживается или ухудшается, включающий введение активного ингредиента, который представляет собой плазмин или плазминоген. В определенном варианте осуществления способ изобретения может быть использован для улучшения защиты против инфекций в условиях местного или системного низкого уровня плазмина или плазминогена. Такие условия могут быть наследуемыми и/или приобретенными.

Примеры наследуемых условий системной недостаточности плазмина или плазминогена включают, но не ограничиваются этим, мутации гена плазминогена (PLG) (реперная последовательность GenBank, No поступления: NM_000301, GeneID:5340; номера аминокислотных остатков в настоящем описании относятся к зрелому пептиду человека, как определяется в No поступления GenBank: NP_000292), приводящие к дисплазминогениям, таким как ALA601THR, VAL355PHE, SER572PRO и GLY732ARG, или к недостаточности плазминогена типа I, такому как ARG216HIS, TRP597TER, GLU460TER, LYS212DEL и LYS19GLU. В тех случаях, когда присутствует наследственная недостаточность плазминогена, предпочтительно введение лекарства, которое представляет собой плазминоген.

Примеры приобретенных системных или местных дефектов плазмينا или плазминогена могут быть обусловлены изменениями физиологических состояний, такими как беременность, пожилой возраст, стресс, ожирение и изменения температуры. Различные патологические состояния, хирургическое вмешательство, облучение и диета также могут запустить механизмы, ведущие к нарушению состояний фибринолиза. Некоторые лекарственные средства, включая противораковые агенты, пероральные контрацептивы, цитокины и компоненты крови, также могут индуцировать временную недостаточность фибринолиза, что может вести к предрасположенности больных к тромботическим осложнениям. Идентификация популяций больных с нарушенным состоянием фибринолиза является важной стадией предотвращения тромботических осложнений, которые могут вести к таким катастрофическим последствиям, как инфаркт миокарда и тромботические удары. В настоящее время становятся доступными как функциональные, так и иммунологические способы для быстрой диагностики недостаточности фибринолиза. Таким образом, важно установить больных с риском тромботических осложнений, обусловленных недостаточностью фибринолиза.

В другом варианте осуществления в изобретении предлагается способ лечения инфекции и усиления противoinфекционной защиты индивидуумов, являющихся или не являющихся человеком, с помощью введения соединения или лекарственного средства, которое представляет собой плазминоген, плазмин, активатор плазминогена или соединение, усиливающее протеолитическую активность плазмينا.

Дополнительно в изобретении предлагается способ улучшения защиты против инфекционного бактериального артрита и/или отита среднего уха, включающий введение композиции, включающей активный ингредиент, который представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген. В предпочтительном варианте осуществления активный ингредиент представляет собой плазминоген, и композицию вводят путем местного нанесения.

Более того, в изобретении предлагается способ снижения или предотвращения образования некроза путем введения композиции, включающий местное или системное введение композиции, включающей соединение, которое представляет собой компонент пути активации плазминогена или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген. Композиция может представлять собой часть геля, лосьона, бальзама, пасты, бинта для перевязки ран, повязки на рану. Альтернативно композицию можно вводить системно. В одном варианте осуществления способ изобретения применяют в сочетании с пластической хирургией для снижения случаев возникновения инфекции, язвы и некроза.

В еще одном варианте осуществления в изобретении предлагается способ лечения инфекции и усиления защиты против инфекции у индивидуумов с недостаточностью активности системы плазмينا-плазминогена с помощью введения соединения или лекарственного средства, которое представляет собой плазминоген, плазмин, активатор плазминогена или соединение, увеличивающее протеолитическую активность плазмينا.

В изобретении дополнительно предлагается способ идентификации соединения, пригодного для улучшения защиты против инфекции в животной модели. По способу изобретения инфекция вызывается у животного с недостаточностью плазминогена, и тестируемое соединение вводят животному с помощью предварительно определенного пути. Защиту против инфекции у животного с недостаточностью плазминогена затем сравнивают с контрольной величиной, такой как, например, защита против инфекции у животного дикого типа, для оценки того, будет ли тестируемое соединение улучшать степень защиты против инфекции или снижать формирование некроза. Одной предпочтительной животной моделью для этого способа являются нокаутные мыши с отсутствием одного или обоих аллелей плазминогена или трансгенные мыши. В одном варианте осуществления коленные суставы инфицируют, и защиту суставов хозяев исследуют в присутствии и в отсутствие добавленного плазминогена. В другом варианте осуществления прослеживают спонтанное развитие отита среднего уха. Макроскопический вид ТМ внимательно изучают и документируют под отомикроскопом, и защиту ТМ хозяина исследуют в присутствии и в отсутствие добавленного плазминогена. В еще одном варианте осуществления открытую рану, например ожоговые или резаные раны, инфицируют, и защиту хозяина против инфекции в области раны исследуют в присутствии и в отсутствие добавленного плазминогена.

Кроме того, в изобретении предлагается способ скрининга *in vivo* лекарственных средств, которые могут быть использованы для улучшения защиты хозяина против инфекции, включающий *in vitro* и *in vivo* модель, в которой экспрессируется плазминоген. Модель *in vivo* включает животное, которое представляет собой животное дикого типа или животное с недостаточностью плазминогена. После введения одного или нескольких лекарственных средств, подвергаемых скринингу, должны быть измерены активность или уровни плазминогена и/или плазмينا. В предпочтительном варианте осуществления животная модель представляет собой модель бактериального артрита в коленных суставах, и бактериальный артрит индуцируется перед, в сочетании с или после введения лекарственного средства. В другом варианте осуществления животная модель представляет собой модель инфицирования открытой раны, и инфицирование открытой раны индуцируется перед, в сочетании с или после введения лекарственного средства.

В изобретении также предлагается способ улучшения защиты хозяина против инфекционных заболеваний путем введения композиции, включающей активатор активности плазминогена или соединение, имитирующее экспрессию плазминогена.

Предпочтительно плазминоген вводят местно для достижения высокой концентрации в инфицированной области. В другом варианте осуществления композиция включает соединение, которое имитирует активность плазминогена/плазмина, и молекулы со сходной активностью. В еще одном варианте осуществления композиция включает лекарственное средство, которое положительно регулирует экспрессию плазминогена.

Дополнительно в изобретении предлагается способ лечения хронической инфекции и некроза путем введения лекарственного средства, которое положительно регулирует экспрессию плазминогена или активаторов плазминогена.

Еще дополнительно изобретение относится к применению соединения группы, включающей плазминоген, плазмин, фрагмент плазминогена или плазмина, компонент пути активации плазминогена, аналог плазминогена, аналог плазмина или аналог компонента пути активации плазминогена, или соединение, обладающее способностью активировать плазминоген, для получения лекарства для стимуляции защиты хозяина против бактериального артрита и отита среднего уха, и инфицирования открытых ран и/или удаления некротизированной ткани, и/или улучшения защиты хозяина против инфекции, и/или снижения образования некротизированной ткани в излечиваемой ране.

Краткое описание фигур

Указанные выше характеристики и многие другие преимущества изобретения должны быть лучше поняты при ссылке на последующее подробное описание, взятое в сочетании с сопровождаемыми фигурами.

Фиг. 1А-Н. Гистологические примеры срезов коленных суставов с артритом от мышей $plg^{+/+}$ (слева) и $plg^{-/-}$ (справа). Мыши $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ получали внутрисуставную инъекцию 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. (А, С, Е): коленные суставы с артритом от мышей $plg^{+/+}$ на 7, 14 и 28 дни соответственно после индукции артрита; (В, D, F): коленные суставы с артритом от мышей $plg^{-/-}$ на 7, 14 и 28 дни соответственно после индукции артрита; (G): коленные суставы с артритом от мышей $plg^{+/+}$ через 7 дней после лечения антибиотиками; (H): коленные суставы с артритом от мышей $plg^{-/-}$ через 7 дней после лечения антибиотиками. В полости суставов наблюдается некротизированная ткань (стрелка). Синовиальная мембрана (Sm).

Фиг. 2. Количественная оценка некротизированной ткани в инфицированных суставах в каждую временную точку. Количество некротизированной ткани в инфицированных суставах подсчитывали гистологически, как описано в материалах и способах. Мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ сравнивали на 7 день, 14 день и 28 день после введения 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. Результаты выражены как среднее \pm ст. откл. $**P < 0,01$ по t-тесту Стьюдента.

Фиг. 3. Количество нейтрофилов и макрофагов в инфицированных коленных суставах мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$, которые получали внутрисуставную инъекцию 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. А. Количество инфильтрирующих нейтрофилов сравнивали на 1 день, 7 день и 14 день после инфицирования бактериями. Столбиками представлено среднее значение от 5 мышей. В. Количество инфильтрирующих макрофагов сравнивали на 1 день, 7 день и 14 день после инфицирования бактериями. Столбиками представлено среднее значение от 5 мышей. Ошибка столбиков показывает ст. откл.

Фиг. 4А-F. Гистологический анализ целого коленного сустава мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ после добавки плазминогена. А, В: контрольные коленные суставы с артритом от мышей $plg^{+/+}$ на 7 и 14 дни после инфицирования бактериями соответственно. С, D: контрольные коленные суставы с артритом (введение ЗФР) от мышей $plg^{-/-}$ на 7 и 14 дни после инфицирования бактериями соответственно. Е: коленные суставы с артритом $plg^{-/-}$ с добавкой плазминогена человека (hPlg) с 0 дня до 7 дня после инфицирования бактериями. F: коленные суставы с артритом $plg^{-/-}$ с добавкой плазминогена человека с 7 дня до 14 дня после инфицирования бактериями.

Фиг. 5А-С. Уровни экспрессии белка IL-6 в синовиальной мембране. Иммуоокрашивание репрезентативных срезов коленных суставов мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$. А: контрольные артритные коленные суставы, обработанные ЗФР, мышей $plg^{+/+}$ на 7 день после инфицирования бактериями. В: контрольные артритные коленные суставы, обработанные ЗФР, мышей $plg^{-/-}$ на 7 день после инфицирования бактериями. С: коленные суставы с артритом $plg^{-/-}$ с добавкой плазминогена человека (hPlg) с 0 дня до 7 дня после инфицирования бактериями. Розовым цветом показан IL-6 в синовиальной мембране (стрелка).

Фиг. 6А, В. Анализ иммуноблоттингом уровня экспрессии белка IL-10 в неинфицированных и в инфицированных коленных суставах. А, уровни IL-10 в лизатах. Дорожка 1: лизаты неинфицированных коленных суставов мышей $plg^{-/-}$; дорожка 2: лизаты неинфицированных коленных суставов мышей $plg^{+/+}$; дорожка 3: лизаты артритных коленных суставов $plg^{-/-}$ на 3 день после инфицирования бактериями; дорожка 4: лизаты артритных коленных суставов $plg^{+/+}$ на 3 день после инфицирования бактериями; дорожка 5: лизаты артритных коленных суставов $plg^{-/-}$ на 7 день после инфицирования бактериями; дорожка 6: лизаты артритных коленных суставов $plg^{+/+}$ на 7 день после инфицирования бактериями. В, уровни β -актина в лизатах, соответствующие каждой дорожке в А в качестве контроля. Эксперименты повторяли по меньшей мере 3 раза и представлены типичные результаты.

Фиг. 7А-F. Морфология типичных срезов среднего уха мышей дикого типа и мышей с недостаточностью plg , окрашенных толуидиновым синим (А и В), и иммуногистохимическое окрашивание на фиб-

рин (С и D) и кератин (Е и F). А. Среднее ухо мыши дикого типа. В полости среднего уха (МЕС) не обнаруживается выпотное вещество. В. Среднее ухо мыши с недостаточностью plg. Отит среднего уха наблюдают в МЕС. С и D. Образцы среднего уха мыши дикого типа и мыши с недостаточностью plg соответственно анализировали путем иммуногистохимического окрашивания на фибрин (оген). Е и F. Образцы среднего уха мыши дикого типа и мыши с недостаточностью plg соответственно анализировали путем иммуногистохимического окрашивания на кератин. О, косточка. Линейка - 50 мкм.

Фиг. 8А-Н. Иммуногистохимическое окрашивание Т-клеток, В-клеток, макрофагов и нейтрофилов в образцах среднего уха мышей дикого типа и мышей с недостаточностью plg. Образцы среднего уха контроля дикого типа (А, С, Е, G) и типичной мыши с недостаточностью plg (В, D, F, H) анализировали путем иммуногистохимического окрашивания Т-клеток (А и В), В-клеток (С и D), макрофагов (Е и F) и нейтрофилов (G и H). О, косточка. Линейка - 50 мкм.

Фиг. 9. Количество бактерий в коленных суставах мышей plg^{-/-} и plg^{+/+} с различным местным и системным лечением после инокуляции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в коленные суставы.

Фиг. 10. Количество бактерий в коленных суставах мышей plg^{+/+} после местного введения Plg (закрашенный столбик) или ЗФР (незакрашенный столбик) через 3 дня после инокуляции *S. aureus* в коленные суставы. Отмечается, что у мышей дикого типа с местным введением Plg количество бактерий значимо в 5 раз ниже, чем у мышей дикого типа с местным введением ЗФР.

Фиг. 11. Количество бактерий в коленных суставах мышей с недостаточностью uPA и мышей дикого типа. Отмечается, что у мышей дикого типа количество бактерий быстро падает после инокуляции *S. aureus* в день 0, в то время как у мышей с недостаточностью uPA количество бактерий постоянно составляет выше $2,0 \times 10^5$ КОЕ в течение всего экспериментального периода.

Фиг. 12А-Е. Гистология типичных срезов артритных коленных суставов мышей с недостаточностью uPA (uPA, слева) и дикого типа (uPA^{+/+}, справа) на 7 (А, D), 14 (В, E) и 28 (С, F) дни после внутрисуставного введения 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. Отмечается, что у мышей uPA^{-/-} намного сильнее отек, деструкция ткани и образование некротизированной ткани в процессе эксперимента, в то время как у мышей uPA^{+/+} воспаление присутствует только временно на 7 день после индукции артрита и потом утихает.

Фиг. 13. Сравнение изменений массы тела мышей plg^{+/+} и plg^{-/-}. Изменения массы тела в зависимости от времени после инфицирования 1×10^6 КОЕ. Массу тела мышей измеряли каждые 24 ч с 1 дня до 21 дня.

Фиг. 14. Тяжесть септического артрита. Результаты оценки тяжести септического артрита с использованием артритного индекса, как описано в материалах и способах. Артрит индуцировали 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips, вводимыми внутривенно. Мыши plg^{+/+} (n=15) и мыши plg^{-/-} (n=16). Для каждой временной точки представлено среднее ± ст.ош.ср. Тест на статистическую значимость выполняли, используя u-тест Манна-Уитни (мышы с недостаточностью в сравнении с контрольными мышами). *P<0,05 рассматривали как значимые различия.

Фиг. 15А-Н. Недостаточность плазминогена усиливает гистологические характеристики септического артрита. Гистология срезов суставов лап, окрашенных сафранином-О. Морфология типичных срезов артритных суставов лап после внутривенного введения 1×10^6 КОЕ *S. aureus* мышам plg^{+/+} (слева) и plg^{-/-} (справа). Артритные суставы лап мышей дикого типа на 1 (А), 3 (В), 7 (С) и 14 (D) день после наступления артрита. Артритные суставы лап мышей plg^{-/-} на 1 (Е), 3 (F), 7 (G) и 14 (H) день после наступления артрита.

Фиг. 16А, В. Некротическая ткань в инфицированных суставах лодыжки. Некроз основывался на гистологическом наблюдении. В некоторых образцах, в которых был идентифицирован некроз, он был дополнительно подтвержден окрашиванием TUNEL.

Фиг. 17А, В. Отложение фибрина в инфицированных суставах лодыжки. Иммуногистохимическое определение фибрина в артритных коленных суставах. Заключенные в парафин срезы ткани окрашивали кроличьим антителом против фибрина(огена) мышы. Позитивным является коричневое окрашивание. Артритный коленный сустав на 14 день после наступления артрита у мышей plg^{+/+} (слева) и plg^{-/-} (справа). Сходное отложение фибрина в инфицированных суставах plg^{-/-} и plg^{+/+}.

Фиг. 18. Количество бактерий в ткани раны мышей plg^{-/-} при местном лечении plg или ЗФР после индукции резаной раны с местной инокуляцией 1×10^7 КОЕ *S. aureus* Phillips в дорзальную кожу.

Фиг. 19А, В. Типичный вид мышей plg^{-/-} с местным лечением plg или ЗФР после индукции резаной раны с местной инокуляцией 1×10^7 КОЕ *S. aureus* Phillips в дорзальную кожу.

Фиг. 20. Количество бактерий в ткани раны мышей plg^{-/-} при местном лечении plg или ЗФР после индукции ожоговой раны с местной инокуляцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в обожженную кожу.

Определения

Термины, используемые в настоящем описании, обычно имеют их традиционное значение в данной области техники в контексте этого изобретения и в конкретном контексте, где употребляется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в другом месте описания для обеспечения профессионала дополнительным руководством при описании композиций, способов изобретения и способов их получения и использования.

"Соединение группы, включающей плазминоген, плазмин, компонент пути активации плазминогена, аналог плазминогена, такой как миниплазмин, аналог плазмина, аналог компонента пути активации плазминогена, активатор плазминогена" относится к соединению, которое непосредственно или опосредованно вызывает эффект плазминогена или плазмина соответственно.

"Компонент пути активации плазминогена" относится к плазминогену, Lys-плазминогену, Glu-плазминогену, вариантам и аналогам плазминогена, включающим один или несколько доменов плазминогена, таких как один или несколько крингл-доменов и протеолитический домен, примером которых является миниплазминоген; плазмину и вариантам и аналогам плазмина, включающим по меньшей мере один или несколько доменов плазмина, таких как один или несколько крингл-доменов и протеолитический домен, примерами которых является миниплазмин и дельта-плазмин; активатору плазминогена, обладающему конечным эффектом активации плазминогена, например, с помощью каскада событий, ведущих к образованию или активации плазминогена, примерами которого являются uPA и tPA и варианты и аналоги tPA и uPA, включающие один или несколько доменов tPA или uPA, такие как один или несколько крингл-доменов и протеолитический домен. Варианты плазминогена, плазмина, tPA и uPA включают все природные генетические варианты человека, а также формы этих белков других млекопитающих, а также мутантные варианты этих белков, полученные заменами консервативных аминокислот. "Аналог" плазминогена или плазмина представляет собой соединение, обеспечивающее эффект, по существу, аналогичный плазминогену или плазмину соответственно, при измерении энзимографией, ELISA (твердофазным иммуноферментным анализом) и FACS (активируемым флуоресценцией сортером клеток). Существует также способ измерения уровней преобразованной активности плазмина, как описано ранее: Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C., Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P., and Ny, T. (1999). Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology*, 140, 5030-5035. "Аналог" компонента пути активации плазминогена представляет собой соединение, обеспечивающее эффект, по существу, аналогичный компоненту пути активации плазминогена, при измерении по уровням активности плазмина, который этот аналог активирует.

"Некроз" относится к гибели ткани в организме. Это случается, когда ткань недостаточно снабжается кровью из-за повреждения, облучения или химических агентов. Некроз необратим. Существует много причин некроза, включая повреждение, инфекцию, рак, инфаркт, отравление ядом, хронические раны, язвы и воспаление.

"Местный" и "местное применение" относится к несистемному, локальному введению активного ингредиента. Таким образом, местное применение может относиться к нанесению активного ингредиента на внешнюю поверхность интересующей области.

"Локальное введение" относится к несистемному, локальному введению активного ингредиента в ткань интересующей области или около нее.

"Внутриуставное введение" относится к локальному введению активного ингредиента в суставную щель между двумя соединяющимися костями.

"Инфекционные заболевания" и "инфекция" относятся к вредной колонизации организма-хозяина чужеродными видами. При инфекции инфицирующий организм стремится использовать ресурсы хозяина для размножения (обычно за счет расходов хозяина). Инфицирующий организм или патоген вмешивается в нормальное функционирование хозяина, что может приводить к хроническим язвам, гангрене, потере инфицированной конечности и даже к смерти. Воспаление является ответом хозяина на инфекцию. В разговорной форме патоген обычно рассматривается как микроскопический организм, наиболее обычными из которых являются вирусы и бактерии. Другие инфекционные патогены представляют собой вириды и эукариотные организмы в диапазоне от одноклеточных грибов и простейших вплоть до очень сложных многоклеточных животных, таких как паразитирующие черви.

"Активность" белка или соединения относится к эффекту, который оказывает белок или соединение на конкретную реакцию, и является мерой его способности влиять, модулировать, участвовать в реакции или стимулировать ее. Обычно активность белка или другого соединения может быть измерена. Например, в случае ферментов, таких как плазмин, PA и MMP, модуляция активности фермента может быть выражена как скорость, при которой продуцируется продукт реакции, представленная, например, как количество продукта, продуцируемого в единицу времени на единицу фермента (например, концентрацию или массу). В случае модуляторов, таких как PAI-1 или uPA, активность может относиться к способности модулятора ингибировать или стимулировать, повышать или понижать, позитивно или негативно регулировать скорость реакции или количество продукта, образуемого в результате реакции.

"Рана" представляет собой разрыв структуры органа или ткани, включая эпителий, соединительную ткань и мышечную ткань, вызываемый внешним агентом. Примеры ран включают, но не ограничиваются

этим, ушибленные раны, царапины, рваные раны, резаные раны, колотые раны и ожоги. Особым типом ран являются раны, которые представляют собой последствие процедур пластической хирургии.

"Отит среднего уха" определяется как воспалительные состояния среднего уха. Отит среднего уха, включая острый отит среднего уха (АОМ) и отит среднего уха с истечением (ОМЕ), является наиболее обычным детским заболеванием за исключением обычной простуды [5]. Наиболее важными этиологическими факторами, относящимися к отиту среднего уха, являются бактериальные или вирусные инфекции верхних дыхательных путей. Биохимический состав истечений из среднего уха при отите среднего уха отражает воспалительные изменения в слизистой оболочке среднего уха. Жидкость представляет собой смесь транссудатов и секретируемых продуктов из желез, а также продуктов воспалительных клеток и бактерий.

"Лечение" индивидуума или "подвергание лечению" индивидуума при описанной в настоящем документе болезни или состоянии означает снижение или ослабление клинических симптомов заболевания или состояния, такого как нарушенное или медленное заживление ран.

"Улучшение" заживления ран означает увеличение скорости, с которой рана заживает. Альтернативно "улучшение" заживления ран означает снижение образования рубцовой ткани в процессе или после заживления.

"Индивидуум" в настоящем описании включает как человека, так и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают без ограничения лабораторных животных, таких как мыши, крысы, кролики, хомячки, морские свинки и т.д.; домашних животных, таких как собаки и кошки; и сельскохозяйственных животных, таких как овцы, козы, свиньи, лошади и коровы. Животное настоящего изобретения, не являющееся человеком, может представлять собой млекопитающее или не млекопитающее; позвоночное или беспозвоночное животное.

"Контроль", "контрольная величина" или "реперная величина" в способе представляет собой величину, используемую для определения изменений, например, в заживлении раны кожи или заживлении перфорированной барабанной перепонки или в любых других, описанных в настоящем документе тестах. Например, когда исследуется заживление перфорации барабанной перепонки, ингибирующий/стимулирующий эффект агента может быть оценен с помощью сравнения заживления раны или перфорации по отношению к контролю. Контрольной или реперной величиной может быть, например, предварительно определенная реперная величина, или ее можно определить экспериментально. В таком тесте, например, контрольная или реперная величина может представлять собой заживление сходной раны или перфорации у животного, не экспонированного с лекарством или активным агентом.

Индивидуум "с риском развития", "предрасположенный к" или "восприимчивый к" заболеванию или состоянию, означает, что риск приобретения или развития заболевания или состояния у индивидуума выше, чем у популяции в среднем.

"Недостаток" соединения означает, что количество, уровень или концентрация соединения существенно ниже, чем контрольная величина. Например, у животного с недостатком плазминогена уровни плазминогена в жидкостях организма и тканях существенно ниже, чем у животного дикого типа.

Как используется в настоящем описании, "около" или "приблизительно" должно означать в пределах 50%, предпочтительно в пределах 20%, более предпочтительно в пределах 5% данной величины или диапазона.

Величина, которая "существенно отличается" от другой величины, может означать, что существует статистически достоверное различие между двумя величинами. Любой подходящий статистический способ, известный в данной области техники, может быть использован для оценки того, являются ли различия значимыми или нет. "Статистически значимое" различие означает, что значимость определяется в доверительном интервале по меньшей мере 90%, более предпочтительно при 95% доверительном интервале.

Молекулярно-биологические определения.

По настоящему изобретению могут использоваться традиционные способы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные специалисту в данной области техники. Такие способы подробно объясняются в литературе. См., например, Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, 1985); Hames and Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames and Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); и Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

При появлении в настоящем описании следующие термины должны иметь значения, установленные ниже.

"Белок" или "полипептид", термины, которые используются в настоящем описании взаимозаменяемо, включает одну или несколько цепей химических строительных блоков, называемых аминокислотами, которые соединены друг с другом химическими связями, называемыми пептидными связями.

"Фермент" обозначает любое вещество, состоящее предпочтительно полностью или частично из белка, которое катализирует или стимулирует более или менее специфично одну или несколько химических или биохимических реакций. Термин "фермент" может также относиться к каталитическому поли-

нуклеотиду (например, РНК или ДНК). "Тестируемый" фермент представляет собой вещество, которое тестируется для определения того, обладает ли оно свойствами фермента.

"Природный" или "дикого типа" белок, фермент, полинуклеотид, ген или клетка обозначает белок, фермент, полинуклеотид, ген или клетку, которые существуют в природе.

"Мутантный", "измененный", "вариантный" или "модифицированный" белок, фермент, полинуклеотид, ген или клетка обозначают белок, фермент, полинуклеотид, ген или клетку, которые изменены или дериватизированы, или каким-то образом отличны или изменены по сравнению с родительским белком, ферментом, полинуклеотидом, геном или клеткой. Изменение в гене включает, но не ограничивается этим, изменение промоторной области или других областей, которые влияют на транскрипцию, что может приводить к измененным уровням экспрессии белка. Мутантный или модифицированный белок или фермент обычно, хотя и необязательно, является результатом экспрессии мутантного полинуклеотида или гена.

"Мутация" или "изменение" обозначает процесс или механизм, приводящий к мутантному белку, полинуклеотиду, гену или клетке. Это включает любую мутацию, при которой изменяется последовательность белка, полинуклеотида или гена, любую последовательность белка, полинуклеотида или гена, возникающую в результате мутации, любой продукт экспрессии (например, белок), экспрессируемый с мутантной последовательности полинуклеотида или гена и любое определяемое изменение в клетке, происходящее из-за такой мутации.

"Функционально консервативные варианты" представляют собой белки или ферменты, в которых данный аминокислотный остаток заменен без изменения общей конформации и функции белка или фермента, включая, но не ограничиваясь этим, замену аминокислоты аминокислотой со сходными свойствами (такими как, например, кислыми, основными, гидрофобными и тому подобное) "консервативными аминокислотными заменами". Аминокислоты со сходными свойствами хорошо известны в данной области техники. Например, аргинин, гистидин и лизин представляют собой гидрофильно-основные аминокислоты и могут быть взаимозаменяемыми. Сходно изолейцин, гидрофобная аминокислота может быть замещена лейцином, метионином или валином. Аминокислоты, отличные от тех, которые указаны как консервативные, в белке или ферменте могут отличаться, так что процент сходства белка или аминокислотной последовательности между любыми двумя белками со сходной функцией может варьироваться и составлять, например, от 70 до 99% при определении в соответствии со схемой выравнивания, такой как способ кластеров, где сходство основывается на алгоритме MEGALIGN. "Функционально консервативный вариант" также включает полипептид или фермент, который обладает по меньшей мере 60% идентичностью аминокислот при определении с помощью алгоритмов BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере 75%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 85% и даже более предпочтительно по меньшей мере 90%, и который имеет те же самые или, по существу, сходные свойства или функции, что и природный или родительский белок или фермент, с которым он сравнивается.

Активирующая плазминоген система.

Плазмин представляет собой ключевой компонент РА системы. Он является протеазой широкого спектра, которая способна вызывать разрушение нескольких компонентов ECM, включая фибрин, желатин, фибронектин, ламинин и протеогликаны [6]. Кроме того, плазмин может превращать про-матрикс металлопротеиназы (pro-MMP) в активные MMP. Поэтому высказывалось предположение, что плазмин может быть важным вышерасположенным регулятором внеклеточного протеолиза. Плазмин образуется из зимогена плазминогена посредством протеолитического расщепления любым из двух физиологических РА, tРА или uРА. Поскольку плазминоген находится в плазме и других жидкостях организма на относительно высоком уровне, регуляция системы РА происходит главным образом на уровне синтеза и активности Ра. Синтез компонентов системы РА активно регулируется различными факторами, такими как гормоны, факторы роста и цитокины. Кроме того, существуют физиологические ингибиторы плазмينا и Ра. Основным ингибитором плазмينا является α_2 -антиплазмин [7]. Активность РА регулируется PAI-1, который ингибирует uРА, и tРА, и PAI-2, который ингибирует преимущественно uРА. В некоторых клетках также имеется специфический рецептор клеточной поверхности для uРА (uPAR), который может направлять протеолитическую активность на поверхность клетки.

Плазминоген представляет собой одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 791 аминокислот (зрелый пептид человека, GenBank Accession No: NP_000292) с молекулярной массой приблизительно 92 кДа [8; 9]. Плазминоген синтезируется преимущественно в печени и находится в большом количестве в большинстве внеклеточных жидкостей. В плазме концентрация плазминогена составляет приблизительно 2 мкМ. Таким образом, плазминоген является крупным потенциальным источником протеолитической активности в тканях и жидкостях организма. Плазминоген находится в двух молекулярных формах: Glu-плазминогена и Lys-плазминогена. Нативная секретируемая и нерасщепленная форма содержит аминоконцевую (N-концевую) глутаминовую кислоту, и поэтому называется Glu-плазминогеном. Однако в присутствии плазмينا Glu-плазминоген расщепляется в положении Lys⁷⁶-Lys⁷⁷ с образованием Lys-плазминогена. По сравнению с Glu-плазминогеном, Lys-плазминоген обладает более высоким сродством к фибрину и активируется РА с большей скоростью. Эти две формы плазминогена могут расщепляться по пептидной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ uРА или tРА, что ведет к образованию связанной дисульфидной связью

двухцепочечной протеазы плазмينا. Аминоконцевая часть плазминогена содержит пять гомологичных тройных петель, так называемых кринглов, а часть карбоксильного конца содержит протеазный домен. Некоторые из кринглов содержат лизинсвязывающие сайты, которые опосредуют специфическое взаимодействие плазминогена с фибрином и своим ингибитором α_2 -AP. Новым и интересным наблюдением является то, что 38-кДа фрагмент плазминогена, состоящий из кринглов 1-4, является мощным ингибитором ангиогенеза. Этот фрагмент называют ангиостатином, и он может образовываться из плазминогена посредством протеолитического расщепления несколькими MMP.

Основным субстратом плазмينا является фибрин, и разложение фибрина занимает центральное место в предотвращении патологического свертывания крови [10]. Плазмин также обладает субстратной специфичностью в отношении нескольких других компонентов ЕСМ, включая ламинин, фибронектин, протеогликаны и желатин, что указывает на то, что плазмин также играет важную роль в перестройке ЕСМ. Опосредованно плазмин может также разрушать дополнительные компоненты ЕСМ благодаря его способности превращать некоторые про-MMP в активные MMP, включая MMP-1, MMP-2, MMP-3 и MMP-9. Поэтому было высказано предположение, что плазмин может служить важным вышележащим регулятором внеклеточного протеолиза.

Модели бактериального артрита для исследования инфекции.

Staphylococcus aureus является микроорганизмом, который чаще всего связан с бактериальным артритом, вызывающим синовиальное воспаление, разрушение хряща и кости и в конечном счете деформацию суставов [11]. У разных видов животных, включая млекопитающих, птиц и рептилий, наблюдалось развитие спонтанного вызванного *S. aureus* артрита, и поэтому эти виды являются потенциальными моделями для индукции заболевания. Что касается пути, посредством которого стафилококки, распространяясь в организме, достигают суставов, что является их важной особенностью, то было четко показано, что подавляющая часть бактериальных инфекций суставов у человека распространяется гематогенным путем. Таким образом, оптимальным путем доставки живых бактерий для получения модели инфекции является внутривенная (в/в) инъекция. С другой стороны, внутрисуставный путь инокуляции бактерий обходит ранние стадии патогенеза и поэтому обеспечивает более определенную модель бактериального артрита. Поэтому в настоящих исследованиях в качестве модели использовали главным образом внутрисуставный путь доставки бактерий для лучшего изучения местного бактериального роста, разрушения ткани, образования некротической ткани и воспаления. Однако авторы провели также ряд исследований бактериального артрита с использованием *S. aureus* посредством в/в инъекции. Данные, полученные при использовании двух моделей, дали сопоставимые результаты, и оба ряда данных подтвердили заключение о том, что плазминоген/плазмин важен для защиты хозяина от вызываемого *S. aureus* бактериального артрита.

Хорошо известно, что после повреждения происходит немедленная колонизация кожи больного нормальной флорой (например, *S. aureus* и *Streptococcus pyogenes*). В частности, после введения в практику пенициллина G в начале 1950-х годов, вызвавшего практически полное исключение *Streptococcus pyogenes* в качестве причины инфекции у больных с ожоговыми повреждениями, *S. aureus* стал главным этиологическим агентом раневой инфекции. Таким образом, *S. aureus* представляет собой один из наиболее распространенных видов бактерий при инфекции открытой раны. Операционные раны и ожоговые раны являются наиболее распространенными типами ран, наблюдаемых в клинической практике. Поэтому в настоящей патентной заявке в качестве моделей инфекции открытой раны заявители использовали инфекции *S. aureus*, главного этиологического агента раневой инфекции, на ожоговых и операционных ранах, являющихся наиболее распространенными типами ран в практической медицине. В связи с этим авторы рассматривают данные, полученные на этих двух моделях инфекции открытой раны, как дающие очень важное указание на осуществимость применения полученных знаний к клинической ситуации.

Примеры

Изобретение дополнительно описывается с помощью следующих примеров. Однако эти примеры являются лишь иллюстрацией изобретения и никоим образом не ограничивают объем и смысл изобретения. Действительно, специалистам в данной области техники после прочтения настоящего описания должны быть очевидны многие модификации и варианты изобретения, которые могут быть осуществлены без выхода за пределы его духа и объема.

Пример 1.

Стойкое воспаление и разрушение ткани у мышей $plg^{-/-}$ при индуцированном *S. aureus* бактериальном артрите.

Этот пример показывает, что у мышей с недостаточностью плазминогена имеется стойкое воспаление и разрушение ткани по сравнению с контрольными сублиниями дикого типа. У мышей $plg^{-/-}$ имеют место значительно более тяжелые изменения по сравнению с мышами $plg^{+/+}$ при индуцированном *S. aureus* бактериальном артрите.

Способы.

Мыши. Гетерозиготных по плазминогену ($plg^{+/-}$) мышей со смешанным генетическим фоном (129×C57BL/6) скрещивали между собой с получением $plg^{+/+}$, $plg^{+/-}$ и $plg^{-/-}$ мышей. Для экспериментов

использовали самцов мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ в возрасте 8-12 недель (Ploplis V.A., Carmeliet P., Vazirzadeh S., Van Vlaenderen I., Moons L., Plow E.F., Collen D.: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 1995, 92:2585-2593).

Индукция бактериального артрита.

В исследовании использовали бактериальный штамм *S. aureus* Phillips (любезно предоставленный Dr. Hook, Department of rheumatology and Clinical immunology, Gothenburg University, Швеция). Артрит вызывали местным введением 1×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в суставы правых колен мышей. В качестве контроля в суставы левых колен вводили лишь 10 мкл стерильного ЗФР. Мышей умерщвляли через разные промежутки времени после инокуляции, и брали образцы для оценки тяжести заболевания. Все протоколы экспериментов были одобрены Regional Ethical Committee of Umea University.

Гистологический анализ.

На 7, 14 и 28 дни после бактериальной инфекции мышей умерщвляли, и собирали образцы коленных суставов целиком для гистологического анализа. Вкратце, коленные суставы сначала фиксировали в 4% параформальдегиде, заключали в парафин, и затем готовили 8-мкм срезы. Предметные стекла, содержащие срезы ткани, окрашивали Сафранином-О для гистологического анализа. В каждую экспериментальную группу было включено по меньшей мере 10 коленных суставов.

Количественное определение некротизированной ткани в инфицированных суставах.

Изображения гистологических срезов коленных суставов получали с помощью цифрового фотоаппарата Leica DC300F, присоединенного к микроскопу Leica DM LB (Leica, Wetzlar, Германия). Для определения количества некротизированной ткани в инфицированных суставах изображения полных гистологических срезов коленных суставов разделяли сеткой 50×40 при 50-кратном увеличении. Каждый квадрат сетки, содержащий некротизированную ткань, учитывали как позитивный. Определяли показатели для трех независимых, случайно выбранных срезов каждого сустава, и для каждой временной точки использовали 5 суставов разных мышей одного и того же генотипа. Рассчитывали и представляли средние величины "позитивных" сигналов.

Результаты.

Для изучения действия плазмина на клинический исход бактериального артрита мышам вводили 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в коленные суставы. После этого мышей умерщвляли через разные промежутки времени и вырезали коленные суставы. Макроскопическое обследование образцов коленных суставов через 7, 14 и 28 дней после внутрисуставного введения показало, что у мышей $plg^{+/-}$ имеется сходный уровень небольшого опухания коленных суставов. Однако у мышей $plg^{-/-}$ размер коленных суставов с бактериальной инфекцией был увеличен на протяжении всего периода эксперимента. На 28 день коленные суставы с бактериальной инфекцией были значительно увеличены, полости сустава были заполнены гнойным веществом, а синовиальные поверхности были значительно раздуты.

Коленные суставы мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ с бактериальной инфекцией на 7, 14 и 28 дни готовили для гистологического анализа. Как показано на фиг. 1, у мышей $plg^{-/-}$ наблюдался значительно более тяжелый артрит по сравнению с мышами $plg^{+/+}$ во все моменты наблюдения. На 7 день у мышей $plg^{+/+}$ происходила инфильтрация воспалительных клеток в полость сустава, синовиальная мембрана была толще нормальной, а поверхность хряща была разрушена (фиг. 1A, Sm). На 14 день воспалительные клетки наблюдались по соседству с разрушенной костью (фиг. 1C, стрелка). Однако на 28 день количество воспалительных клеток снижалось, и начинался процесс восстановления поврежденных хряща и кости (фиг. 1E). У мышей $plg^{-/-}$ характер развития заболевания был совершенно иным. На 7 день у мышей $plg^{-/-}$ происходила инфильтрация большого количества воспалительных клеток в полость сустава, несколько частей кости были разрушены, и наблюдалась некротизированная ткань (фиг. 1B). На 14 день синовиальная мембрана была утолщена по сравнению с 7 днем, и некротизированная область увеличивалась. Разрушение хряща и эрозия кости были значительно более тяжелыми по сравнению с 7 днем (фиг. 1D). На 28 день весь коленный сустав был почти полностью разрушен, оставалась лишь некротизированная ткань и небольшие фрагменты хряща (фиг. 1F). Полуколичественные исследования срезов образцов показали, что у мышей $plg^{-/-}$ имелся значительно более высокий уровень некроза ткани, чем у мышей $plg^{+/+}$ на протяжении всего развития заболевания (фиг. 2). Эти данные указывают на то, что у мышей $plg^{-/-}$ имеются значительно более тяжелые гистопатологические изменения по сравнению с мышами $plg^{+/+}$ во время вызванного *S. aureus* бактериального артрита.

Пример 2.

Лечение антибиотиком уничтожает бактерии и снижает воспаление, но не снижает образование некротизированной ткани у мышей $plg^{-/-}$.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 1, за исключением введения некоторым животным антибиотиков.

Лечение антибиотиком.

Антибиотик клоксациллин (AstraZeneca, Södertälje, Швеция) растворяли в стерильном ЗФР и инъецировали внутривенно мышам в дозе 0,5 мг/г массы тела каждые 12 ч, начиная с 7 дня после введения бактерий. Мышей умерщвляли на 14 день после введения бактерий.

Результаты.

Исследовали также влияние лечения антибиотиком на развитие заболевания у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$. Мышам инъецировали бактерии на 0 день и лечили их клоксациллином дважды в день с 7 по 14 день после инъекции бактерий. Выделение бактерий из инфицированных суставов на 14 день показало, что бактерии были полностью уничтожены у мышей $plg^{-/-}$ после лечения клоксациллином (данные не показаны). Гистопатологический анализ показал, что у мышей $plg^{+/+}$ после лечения антибиотиком воспаление было снижено (фиг. 1G) по сравнению с мышами, которых не лечили клоксациллином (фиг. 1C). У мышей $plg^{-/-}$, которых лечили клоксациллином, уровень воспаления был все еще выше, чем у мышей $plg^{+/+}$ при таком же лечении. Хрящ и кость были по большей части восстановлены (фиг. 1H). Примечательно, что в синовиальной мембране оставались небольшие области некротизированной ткани (стрелка, фиг. 1H). Эти данные показывают, что внутривенное введение клоксациллина успешно удаляло бактерии из коленных суставов, снижало разрушение ткани и восстанавливало процессы репарации ткани у мышей $plg^{-/-}$. Однако после лечения антибиотиком большая область некротизированной ткани оставалась в коленных суставах мышей $plg^{-/-}$.

Пример 3.

Недостаточность плазминогена ухудшает удаление бактерий.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 1, за исключением подсчета бактерий.

Подсчет бактерий.

На 2, 3, 4, 5, 7, 14 и 28 дни после инъекции бактерий брали коленные суставы и гомогенизировали в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий в каждом гомогенате.

Результаты.

Заявители затем исследовали рост бактерий в коленных суставах мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ после индукции бактериального артрита. Как показано в табл. 1, у мышей $plg^{+/+}$ количество *S. aureus* в инфицированных коленных суставах немедленно снижались со 2 дня после инъекции бактерий. На 7 день *S. aureus* не обнаруживался у 50% (7/14) мышей $plg^{+/+}$. На 14 день *S. aureus* не обнаруживался у 80% (8/10) мышей $plg^{+/+}$, и менее 1×10^3 КОЕ было выявлено у других 2 мышей. Напротив, у всех мышей $plg^{-/-}$ в инфицированных коленных суставах имелся *S. aureus* на протяжении всего периода эксперимента (табл. 1). На 28 день количество *S. aureus* в инокулированных суставах мышей $plg^{-/-}$ в 27 раз превышало количество, введенное в 0 день. Эти данные показывают, что удаление бактерий из коленных суставов мышей $plg^{-/-}$ было нарушено, что позволяет предполагать, что плазмин участвует в процессе уничтожения бактерий при защитной реакции хозяина против инфекции.

Таблица 1

Выделение бактерий из коленных суставов мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ после внутрисуставной инъекции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips

Дни после инъекции бактерий	Среднее количество бактерий*		Доля**	
	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
2	$(7,6 \pm 3,7) \times 10^5$	$(2,9 \pm 1,5) \times 10^6$	5/5	3/3
3	$(3,7 \pm 0,9) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^6$	5/5	5/5
4	$(3,0 \pm 0,6) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^6$	5/5	5/5
5	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^6$	5/5	5/5
7	$(8,6 \pm 1,3) \times 10^3$	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^6$	7/14	11/11
14	$(4,0 \pm 2,0) \times 10^2$	$(3,7 \pm 0,6) \times 10^6$	2/10	10/10
28	Не обнаружены	$(2,7 \pm 0,6) \times 10^7$	0/10	10/10

* Среднее количество бактерии в коленных суставах с выявляемым уровнем живых бактерий.

** Данные представляют собой количество коленных суставов с выявляемым уровнем живых бактерий, деленное на суммарное количество исследованных коленных суставов в каждой группе.

Пример 4.

Инфильтрация инъекцированных суставов макрофагами и нейтрофилами не является явно нарушенной у мышей $plg^{-/-}$.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 1, за исключением иммуногистохимического анализа и подсчета воспалительных клеток.

Иммуногистохимический анализ.

Заключенные в парафин срезы (8 мкм) депарафинизировали, повторно гидратировали, и эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью 0,3% H_2O_2 в течение 10 мин. После инкубации с 5% сывороткой кролика при комнатной температуре в течение 20 мин стекла инкубировали при 4°C в течение ночи с первичными антителами крысы против макрофагов (клон F4/80, MСАР497, Serotec, UK) или против нейтрофилов (MCA771G, Serotec, UK) мыши соответственно. После этого для иммуноокрашивания макрофагов и нейтрофилов стекла промывали и дополнительно инкубировали с антителом козы против IgG крысы (SC-2019, Santa Cruz, California) при комнатной температуре в течение 1 ч.

Подсчет воспалительных клеток.

Определяли суммарное количество клеток на срез, полученное по площади из 5 полей при увеличении $\times 400$. Всю процедуру подсчета проводили дважды для каждого среза и рассчитывали среднюю величину на срез. Анализировали по три независимых среза из каждого сустава, и для каждой временной точки использовали по пять суставов разных мышей одного и того же генотипа.

Результаты.

Иммуногистохимический анализ проводили для исследования инфильтрации макрофагов и нейтрофилов в инфицированные коленные суставы мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$. Инфильтрацию воспалительных клеток количественно оценивали подсчетом количества положительно окрашиваемых клеток, имеющих в срезах. Производили подсчет на трех независимых срезах каждого сустава, и в исследование включали по 5 образцов суставов каждого генотипа для каждой временной точки (фиг. 3А и В). В пределах 24 ч после инъекции бактерий у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ в синовиальную оболочку инфицированных коленных суставов происходила инфильтрация сходного количества нейтрофилов и макрофагов. Затем на 7 и 14 дни количество накопившихся нейтрофилов и макрофагов у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ значительно увеличивалось по сравнению с 1 днем. Эти данные указывают на то, что между 24 ч и 14 днями после инъекции бактерий инфильтрация ни нейтрофилов, ни макрофагов в инфицированные суставы не была нарушена у мышей $plg^{-/-}$ по сравнению с мышами $plg^{+/+}$. Однако хотя инфильтрация нейтрофилов и макрофагов не была явно нарушена у мышей $plg^{-/-}$, нормальное функционирование этих клеток, особенно способность вызывать гибель бактерий, было серьезно нарушено.

Пример 5.

Системное введение мышам $plg^{-/-}$ плазминогена человека (hPlg) восстанавливало нормальную защитную реакцию хозяина против инфекции *S. aureus*.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 1, за исключением введения плазминогена человека некоторым мышам и анализа иммуноблоттингом.

Введение мышам $plg^{-/-}$ плазминогена человека.

Для экспериментального протокола 1 артрит индуцировали местной инокуляцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в суставы обоих колен мышей. За 6 ч до инокуляции бактерий каждой из 6 мышей $plg^{-/-}$ вводили 1 мг плазминогена человека (hPlg) (Biopool, Umea, Швеция) в 100 мкл стерильного ЗФР путем внутривенной (в/в) инъекции с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней. В качестве контролей 6 мышам $plg^{+/+}$ и 6 мышам $plg^{-/-}$ инъекцировали только стерильный ЗФР с 24-часовыми интервалами на протяжении 7 дней экспериментального периода. Мышей умерщвляли на 7 день после инъекции бактерий, вырезали образцы коленных суставов, декальцифицировали их и обрабатывали для гистологического и иммуногистохимического анализа.

Для экспериментального протокола 2 артрит вызывали, как в экспериментальном протоколе 1. С 7 дня после инокуляции бактерий каждой из 6 мышей $plg^{-/-}$ вводили 1 мг hPlg в 100 мкл стерильного ЗФР посредством в/в инъекции. То же самое количество плазминогена инъекцировали затем с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней. В качестве контролей 6 мышам $plg^{+/+}$ и 6 мышам $plg^{-/-}$ инъекцировали только стерильный ЗФР с 24-часовыми интервалами на протяжении 7 дней. Мышей умерщвляли на 14 день после инъекции, вырезали образцы коленных суставов, декальцифицировали их и обрабатывали для гистологического анализа.

Результаты.

Для подтверждения того, что плазмин играет роль в защитной реакции хозяина против вызванного *S. aureus* бактериального артрита, авторы исследовали развитие бактериального артрита у мышей $plg^{-/-}$, получавших hPlg. Авторы сначала провели эксперимент, в котором 6 мышам $plg^{-/-}$ вводили hPlg с 0 по 7 день после инъекции бактерий. Затем авторы исследовали влияние введения hPlg 6 мышам $plg^{-/-}$, у которых уже развился бактериальный артрит в течение 7 дней. Как показано на фиг. 4А и В, при получении

мышами $plg^{+/+}$ стерильного ЗФР в синовиальной мембране наблюдался умеренный уровень воспаления, а структура кости была относительно интактной. Как показано на фиг. 4С и D, при получении мышами $plg^{-/-}$ только стерильного ЗФР в частях синовиальных тканей наблюдалась некротизированная ткань, воспаление и разрушение ткани были значительно более тяжелыми, чем в группе $plg^{+/+}$. Когда мышам $plg^{-/-}$ вводили hPlg с 0 по 7 день (фиг. 4Е), гистопатологические особенности напоминали таковые у мышей $plg^{+/+}$, получавших ЗФР. Как показано на фиг. 4F, у мышей $plg^{-/-}$, получавших hPlg с 7 по 14 день, морфология сустава была в значительной мере более интактной, чем у мышей $plg^{-/-}$, получавших ЗФР, и уровни воспаления были сопоставимы с контрольной группой $plg^{+/+}$. Кроме того, в группе, получавшей hPlg, имелась лишь очень небольшая область некротизированной ткани в синовиальной мембране. Как показано в табл. 2, также восстанавливалась способность к уничтожению бактерий, когда мышам $plg^{-/-}$ вводили hPlg в течение 7 дней после инъекции бактерий. Эти данные ясно показывают, что плазмин(оген) в высшей мере необходим для удаления *S. aureus* из артритных коленных суставов и для целостности защитной реакции хозяина против инфекции.

Таблица 2

Выделение бактерий из инфицированных коленных суставов после введения мышам $plg^{-/-}$ плазминогена

	Среднее количество бактерий в суставах * (КОЕ)		
	мыши $plg^{+/+}$, получавшие ЗФР	мыши $plg^{-/-}$, получавшие ЗФР	мыши $plg^{-/-}$, получавшие плазминоген человека
Дни 0-7	$(3, 2 \pm 2, 0) \times 10^3$, n=6	$(1, 3 \pm 0, 12) \times 10^6$, n=6	$(1, 3 \pm 0, 43) \times 10^{3**}$, n=6
Дни 7- 14	$(7, 2 \pm 4, 3) \times 10^2$, n=6	$(2, 2 \pm 0, 59) \times 10^6$, n=6	$(1, 8 \pm 0, 56) \times 10^{3**}$, n=6

* Среднее количество бактерий в коленных суставах, содержащих измеримое количество живых бактерий.

** $P < 0,01$. Группу мышей $plg^{-/-}$, получавших плазминоген человека, сравнивали с группой мышей $plg^{-/-}$, получавших ЗФР.

Пример 6.

Местное введение мышам $plg^{-/-}$ плазминогена человека (hPlg) восстанавливало нормальную защитную реакцию хозяина против инфекции *S. aureus*.

Способы.

Бактериальный артрит вызывали местной инокуляцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в оба коленных сустава мышей. Через 15 мин после инокуляции бактерий в одну сторону коленных суставов 6 мышей $plg^{-/-}$ вводили 40 мкл плазминогена человека (10 мкг/мкл в ЗФР, Вiорool, Умеа, Швеция) путем локальных инъекций вокруг ткани коленного сустава. После этого плазминоген вводили с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней. В качестве контроля локальных инъекций 6 мышам $plg^{-/-}$ локально инъецировали вокруг ткани коленного сустава 40 мкл только стерильного ЗФР через 15 мин после инокуляции бактерий и затем с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней периода эксперимента. В качестве контролей для мышей дикого типа 2 мышам $plg^{+/+}$ вводили 40 мкл только стерильного ЗФР через 15 мин после инокуляции бактерий и затем каждые 24 ч в течение 7 дней. В качестве контролей для мышей $plg^{-/-}$ с системными инъекциями 2 мышам $plg^{-/-}$ вводили 100 мкл плазминогена человека (10 мкг/мкл) внутривенно за 1 час до инокуляции бактерий и затем каждые 24 ч в течение 7 дней.

Мышей умерщвляли на 7 день после инокуляции бактерий, брали коленные суставы и гомогенизировали в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий *S. aureus* в каждом гомогенате.

Результаты.

Локальная инъекция плазминогена в течение 7 дней мышам $plg^{-/-}$, инокулированным *S. aureus*, вызвала успешное и значительное до 100-кратного снижение количества бактерий по сравнению с локальной обработкой ЗФР этих мышей (табл. 3 и фиг. 9). И у мышей $plg^{-/-}$, получавших системную инъекцию плазминогена, и у мышей $plg^{+/+}$ с местной инъекцией ЗФР также наблюдалось успешное уничтожение *S. aureus* в коленных суставах. Эти данные четко показывают, что местная инъекция плазминогена человека может восстанавливать нормальную способность к уничтожению бактерий у мышей $plg^{-/-}$.

Таблица 3

Количество бактерий у мышей $plg^{-/-}$ и $plg^{+/+}$ при разном локальном и системном лечении на 3 день после инокуляции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips

Группы	Количество образцов	Среднее количество бактерий (Среднее \pm ст.откл., $\times 10^6$ КОЕ)
$plg^{-/-}$ с местной инъекцией hPlg	6	0,019 \pm 0,044*
$plg^{-/-}$ с местной инъекцией ЗФР	6	1,09 \pm 0,55
$plg^{-/-}$ с системной инъекцией hPlg	2	0,00075 \pm 0,0011*
$plg^{+/+}$ с местной инъекцией ЗФР	2	0,00065 \pm 0,00092*

* $P < 0,05$, по сравнению с группой мышей $plg^{-/-}$ с местной инъекцией ЗФР.

Пример 7.

Местное введение мышам $plg^{+/+}$ плазминогена человека повышает защитную реакцию хозяина против инфекции *S. aureus*.

Способы.

Бактериальный артрит вызывали местной инокуляцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в оба коленных сустава мышей. Через 15 мин после инокуляции бактерий в одну сторону коленных суставов 7 мышам $plg^{+/+}$ вводили 50 мкл плазминогена человека (hPlg, 10 мг/мл в ЗФР, Biopool, Umea, Швеция) путем локальных инъекций под кожу колена и вокруг ткани коленного сустава. После этого плазминоген человека вводили таким же образом с 24-часовыми интервалами с 0 дня по 2 день. В качестве контроля локальных инъекций 7 мышам $plg^{+/+}$ локально инъецировали под кожу колена и вокруг ткани коленного сустава 50 мкл только стерильного ЗФР через 15 мин после инокуляции бактерий и затем такие же местные инъекции производили с 24-часовыми интервалами с 0 дня по 2 день эксперимента.

Мышей умерщвляли на 3 день после инокуляции бактерий, брали коленные суставы и гомогенизировали в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий *S. aureus* в каждом гомогенате.

Результаты.

Локальная инъекция в коленные суставы плазминогена человека в течение 3 дней мышам $plg^{+/+}$ вызвала успешное и значительное 5-кратное снижение количества живых *S. aureus* по сравнению с контрольной группой $plg^{+/+}$, обработанной ЗФР. Эти данные ясно показывают, что плазминоген человека является сильным провоспалительным фактором, который повышает защитную реакцию хозяина против бактериальной инфекции даже у животных дикого типа. Эти данные (табл. 4, фиг. 10) дополнительно указывают на то, что плазминоген является новым кандидатом на роль противоинфекционного лекарства для клинического использования.

Таблица 4

Количество бактерий у мышей дикого типа ($plg^{+/+}$), получавших местную инъекцию плазминогена человека или ЗФР, на 3 день после инокуляции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips

Группы	Количество образцов	Среднее количество бактерий (Среднее \pm ст.откл., $\times 10^6$ КОЕ)
$plg^{+/+}$ с местной инъекцией hPlg	7	0,031 \pm 0,011*
$plg^{+/+}$ с местной инъекцией ЗФР	7	0,14 \pm 0,047

* $P < 0,05$, по сравнению с группой мышей $plg^{+/+}$ с местной инъекцией ЗФР.

Пример 8.

Введение мышам $plg^{-/-}$ плазминогена повышает экспрессию белка IL-6 в инфицированных коленных суставах.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 5, за исключением иммуногистохимического окрашивания IL-6.

Для иммунологического окрашивания IL-6 стекла промывали и инкубировали с антителом свиньи против IgG кролика (P0217, DAKO, Дания) при комнатной температуре в течение 1 ч. Хромогенную реакцию проявляли с помощью субстратного набора DAKO (K3464, DakoCytomation AEC substrate, США), и стекла подкрашивали гематоксилином. Все стекла, инкубированные с кроличьей сывороткой вместо первичного антитела, служившие отрицательным контролем, показали отрицательную реакцию.

Результаты.

Сообщалось, что IL-6 участвует в активации, росте и дифференцировке лимфоцитов, и отсутствие IL-6 повышает восприимчивость к инфекции. Поэтому авторы исследовали, оказывает ли плазмин какое-

либо действие на экспрессию IL-6 при бактериальном артрите. Отбирали образцы для тканевых срезов во время введения hPlg мышам $plg^{-/-}$ и производили иммуногистохимическое окрашивание. При получении мышами $plg^{-/-}$ стерильного ЗФР в течение 7 дней после инъекции бактерий уровни белка IL-6 были значительно ниже по сравнению с уровнями у мышей $plg^{+/+}$ (фиг. 5А и В). Как показано на фиг. 5С, когда мыши $plg^{-/-}$ получали hPlg в течение 7 дней после инъекции бактерий, экспрессия белка IL-6 увеличивалась до уровня, сходного с уровнем у мышей $plg^{+/+}$. Эти данные показывают, что плазмин участвует в регуляции экспрессии IL-6 в коленных суставах во время бактериального артрита.

Пример 9.

Более высокий уровень экспрессии IL-10 в суставах $plg^{+/+}$ по сравнению с суставами $plg^{-/-}$.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 1, за исключением анализа иммуноблоттингом.

Анализ иммуноблоттингом.

На 3 и 7 дни после инъекции бактерий мышей умерщвляли, и собирали целиком коленные суставы. Суставы гомогенизировали и лизировали в буфере NP-40 (0,5% нонидет Р-40, 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 150 мМ NaCl, 1 мМ NaF, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na_3VO_4 , 0,25 мМ PMSF, 5 мкг/мл апротинин, 1 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин и 15% глицерин) в течение 30 мин на льду. Лизаты доводили до равной концентрации белка. Анализ иммуноблоттингом проводили, как описано [12], с использованием антитела козы против антитела мыши против IL-10 (AF-417-NA, R & D systems, UK) и мышиного моноклонального антитела против (3-актина (Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Швеция). Использовали вторичные антитела против козы и против мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) от Biorad (Hecules, CA, USA).

Результаты.

Предшествующие исследования показали, что интерлейкин-10 (IL-10) оказывает противовоспалительное действие на животной модели септического артрита [13]. Для исследования того, оказывает ли плазмин какое-либо действие на экспрессию IL-10 при бактериальном артрите, проводили анализ иммуноблоттингом для сравнения уровней IL-10 у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$. На 3 и 7 дни после инъекции бактерий гомогенаты суставов лизировали и производили иммуноблоттинг на IL-10. У мышей $plg^{-/-}$ имелся значительно меньший уровень IL-10 по сравнению с мышами $plg^{+/+}$ в неинфицированных коленных суставах (фиг. 6А, дорожки 1 и 2 соответственно). На 3 день уровни IL-10 у мышей обоих генотипов увеличивались, хотя у $plg^{-/-}$ уровень IL-10 был все еще значительно ниже, чем у мышей $plg^{+/+}$ (фиг. 6А, дорожки 3 и 4). На 7 день у мышей $plg^{-/-}$ уровень IL-10 был еще таким же, как и на 3 день, тогда как у мышей $plg^{+/+}$ уровень IL-10 снижался (фиг. 6А, дорожка 5, дорожка 6). Совместно эти данные позволяют предполагать, что IL-10 вместе с IL-6 может регулировать процесс воспаления во время бактериального артрита, и что плазмин участвует в регуляции экспрессии IL-6 и IL-10.

Пример 10.

uPA важен для защитной реакции хозяина против вызванной *S. aureus* инфекции колена и перестройки ткани.

Способы.

В день 0 бактериальный артрит вызывали местной инокуляцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в коленные суставы мышей дикого типа и мышей с недостаточностью uPA ($uPA^{-/-}$) [14]. Мышей умерщвляли на 7, 14, 21 и 28 дни, брали коленные суставы и гомогенизировали в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий *S. aureus* в каждом гомогенате.

В другом эксперименте у мышей с недостаточностью uPA и мышей дикого типа вызывали бактериальный артрит посредством местной внутрисуставной инокуляции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 10 мкл стерильного ЗФР в коленные суставы. На 7, 14 и 28 дни после инъекции бактерий мышей умерщвляли, и брали образцы коленных суставов целиком для гистологического анализа. Вкратце, коленные суставы сначала фиксировали в 4% параформальдегиде, заключали в парафин, после чего готовили 8-мкм срезы. Стекла, содержащие срезы ткани, окрашивали сафранином-О для гистологического анализа. В каждую экспериментальную группу включали по меньшей мере 10 коленных суставов.

Результаты.

После индукции вызванного *S. aureus* бактериального артрита у мышей дикого типа и с недостаточностью uPA в группе дикого типа среднее количество бактерий постепенно снижается с 7 по 28 день. На 14 день у 4 из 7 мышей бактерии были удалены полностью. Однако в группе с недостаточностью uPA среднее количество бактерий было в основном постоянным с 0 по 28 день (фиг. 11). Хотя количество бактерий снижалось после 14 дня, значимой разницы между 14 и 28 днями не было. Хотя эксперимент был прекращен на 28 день после инокуляции бактерий, очень маловероятно, чтобы мыши с недостаточностью uPA были способны уничтожить бактерии в более поздние сроки, поскольку коленные суставы были полностью разрушены после 14 дня. В коленных суставах при недостаточности uPA с 14 дня нака-

плывалось большое количество некротизированной ткани. При гистологической оценке у мышей дикого типа наблюдалось преходящее воспаление на 7 день, после чего степень воспаления быстро снижалась, в то время как у мышей с недостаточностью uPA наблюдались постоянное воспаление и опухание, обширное разрушение ткани и образование некротизированной ткани на протяжении периода эксперимента (фиг. 12). Эти данные (табл. 5, фиг. 11 и 12) ясно показывают, что uPA важен для уничтожения бактерий при защитной реакции хозяина против вызванного *S. aureus* артрита, и дополнительно подразумевают, что компоненты пути активатора плазминогена играют решающую роль при защитной реакции хозяина против инфекции.

Таблица 5

Доля и количество бактерий у мышей с недостаточностью uPA и дикого типа после индукции вызванного *S. aureus* бактериального артрита

Дни	Недостаточность uPA		Дикий тип		Величина P**
	Количество бактерий (КОЕ)	Доля*	Количество бактерий (КОЕ)	Доля*	
День 0	$1,0 \times 10^6$	2/3	$1,0 \times 10^6$	2/3	
День 7	$5,6 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	6/6	$1,1 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^3$	6/6	0,0103
День 14	$8,8 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^5$	7/7	$7,5 \times 10^2 \pm 4,2 \times 10^2$	3/7	0,006
День 21	$3,7 \times 10^5 \pm 8,4 \times 10^4$	5/5	$6,0 \times 10^2 \pm 6,0 \times 10^2$	1/5	0,0023
День 28	$2,8 \times 10^5 \pm 4,5 \times 10^4$	5/5	$6,0 \times 10^2 \pm 6,0 \times 10^2$	1/5	0,0003

* Доля представляет собой отношение количества инфицированных коленных суставов к общему количеству коленных суставов, исследованных в тот же момент времени.

** Величина p рассчитана путем сравнения количества бактерий во всех коленных суставах у мышей с недостаточностью uPA и дикого типа в соответствующий момент времени.

Пример 11.

Большой уровень потери массы тела и тяжести артрита при бактериальном артрите у мышей *plg*^{-/-} после внутривенной инъекции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 200 мкл стерильного ЗФР.

Способы.

Бактериальный артрит вызывали у мышей *plg*^{+/+} и *plg*^{-/-} внутривенной (в/в) инъекцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 200 мкл стерильного ЗФР. После инокуляции за мышами следили индивидуально ежедневно. Лапки обследовали каждые 24 ч и всех мышей умерщвляли на 21 день после инокуляции. Артрит определяли по видимому набуханию сустава и/или эритеме ладони, запястья и лодыжки. Для оценки интенсивности артрита проводили клиническую оценку (показатель артрита) с использованием системы, в которой макроскопическое обследование каждой лапы давало показатель в баллах по 0-5-балльной шкале (0 = норма, 1 = незначительное набухание или покраснение, 2 = слабое набухание и покраснение, 3 = умеренное набухание и покраснение, 4 = значительное набухание и покраснение, 5 = значительное набухание и деформация). Общий показатель рассчитывали сложением показателей для всех 4 лап у каждого тестируемого животного, что давало показатель артрита, варьирующий от 0 до 20 для каждой отдельной мыши. Массу мышей измеряли ежедневно с 0 по 21 день.

Результаты.

Для оценки того, влияет ли недостаточность плазминогена на инвазию бактерий в суставы в модели бактериального артрита, вызываемого внутривенной инъекцией, отслеживали день появления симптомов и долю артрита, определяемого как незначительное набухание и покраснение (табл. 6), каждые 24 ч после инокуляции бактерий. День появления симптомов у мышей *plg*^{+/+} и *plg*^{-/-} составлял $5,0 \pm 2,2$ и $4,4 \pm 2,0$ соответственно (P=0,5021). Более того, доля артрита у мышей *plg*^{+/+} и *plg*^{-/-} была одинаковой. Эти результаты показывают, что мыши и *plg*^{+/+}, и *plg*^{-/-} восприимчивы к вызываемому *S. aureus* артриту при внутривенной инокуляции. Однако в этом исследовании было сделано поразительное наблюдение: 38% (12/32) мышей *plg*^{-/-} имели паралич задней части, в то время как у мышей *plg*^{+/+} паралич был обнаружен лишь у 3,3% (1/30).

Для отслеживания общего состояния здоровья после внутривенной инокуляции *S. aureus* измеряли массу каждой мыши ежедневно на протяжении периода эксперимента. Как показано на фиг. 13, в течение первой недели после инфекции у мышей и *plg*^{+/+}, и *plg*^{-/-} отмечалось значительное снижение массы с максимумом 24% и 26% от массы тела на 7 день соответственно. После 7 дня после инфекции масса тела мышей *plg*^{+/+} постепенно увеличивалась. Напротив, у мышей *plg*^{-/-} постоянно наблюдалось значительное снижение массы на протяжении эксперимента (p<0,05).

Отслеживали также развитие бактериального артрита на протяжении 3 недель у мышей *plg*^{+/+} и *plg*^{-/-} после в/в инокуляции 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. Как показано на фиг. 14, бактериальный артрит развивался и у мышей *plg*^{+/+}, и у мышей *plg*^{-/-}. Между мышами *plg*^{+/+} и *plg*^{-/-} не было разницы в тяжести воспаления на

протяжении первых 3 дней. Однако с 7 дня и далее у мышей $plg^{-/-}$ воспаление было более тяжелым, чем у мышей $plg^{+/+}$, и разница была значимой ($p < 0,05$). У мышей $plg^{+/+}$ степень тяжести достигала максимума на 14 день и затем постепенно снижалась. В конце эксперимента 8 из 28 мышей $plg^{+/+}$ излечились от артрита. У мышей $plg^{-/-}$ тяжесть артрита нарастала на протяжении всего эксперимента, и ни одна мышь $plg^{-/-}$ не излечилась от артрита к концу эксперимента. Взятые вместе, эти данные четко показывают, что плазминоген не играет существенной роли в инвазии бактерий из кровеносного русла, но важен для защитной реакции хозяина против бактериальной инфекции в коленных суставах и поддержания уровня здоровья во время бактериального артрита.

Таблица 6
Сравнение главных особенностей бактериального артрита у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ после внутривенной инъекции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 200 мкл стерильного ЗФР

	$plg^{+/+}$	$plg^{-/-}$
День появления симптомов (Среднее \pm ст.ош.)	5,0 \pm 2,2	4,4 \pm 2,0
Доля бактериального артрита	93% (28/30)	93% (30/32)
Доля паралича	3,3%	37,5%
Доля некроза в инфицированном суставе	0	100%
Масса тела на 21 день	22,8 г	16,7 г

Пример 12.

Более тяжелое развитие разрушения ткани и образования некротизированной ткани при бактериальном артрите у мышей $plg^{-/-}$ после внутривенной инъекции 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в стерильном ЗФР.

Способы.

Бактериальный артрит вызывали у мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$ внутривенной (в/в) инъекцией 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips в 200 мкл стерильного ЗФР. После инокуляции за мышами следили индивидуально ежедневно.

Для осуществления гистопатологического обследования лодыжек и лап лодыжки и лапы извлекали и фиксировали в 4% забуференном формалине в течение 24 ч. Фиксированные ткани декальцифицировали в течение 3 недель в 15% ЭДТА, дегидратировали и заключали в парафин. 8-мкм срезы суставов лодыжек окрашивали сафранином-О и подкрашивали быстрым зеленым/железным гематоксилином.

Для иммуногистохимического анализа заключенные в сарафтин срезы (8 мкм) депарафинизировали и регидратировали в этаноле и дистиллированной воде. Активность эндогенной пероксидазы блокировали 3% H_2O_2 в течение 10 мин. Затем инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре с 5% сывороткой кролика для выявления фибрина. Стекла затем покрывали антителом козы против *fbn/fbg* мыши в течение 20 мин при комнатной температуре. После промывки наслаивали PAP на 20 мин при комнатной температуре. Окраску проявляли с помощью набора (DAKO Substrate chromogen system AEC), и после промывки подкрашивали гематоксилином Мейера.

Результаты.

Для выяснения того, связано ли наблюдаемое сохранение воспаления сустава с гистологическими изменениями, производили гистологический анализ суставов лап инфицированных мышей $plg^{+/+}$ и $plg^{-/-}$. Суставы окрашивали сафранином-О и подкрашивали быстрым зеленым/железным и гематоксилином. Как показано на фиг. 15, у мышей $plg^{+/+}$ через день после появления симптомов воспаление было очень слабым (фиг. 15A). Через 3 дня после появления симптомов синовиальная мембрана становилась гиперплазированной, но хрящ оставался интактным (фиг. 15B). Через 7 дней после появления симптомов происходила инфильтрация воспалительных клеток в полость сустава (фиг. 15C). Через 14 дней после появления симптомов синовиальная мембрана была значительно толще, чем через 7 дней (фиг. 15D). У мышей $plg^{-/-}$, как показано на фиг. 15E, через один день после появления симптомов уровень воспаления был также низким. Однако через 3 дня после появления симптомов синовиальная мембрана была значительно толще, чем через 1 день, и воспалительные клетки начинали проникать в кость (фиг. 15F). Через 7 дней после появления симптомов воспалительные клетки заполняли весь сустав лапы, и некоторые части кости были разрушены (фиг. 15G). Через 14 дней после появления симптомов большая часть костей и хряща была полностью разрушена (фиг. 15H). Кроме того, через 14 дней после появления симптомов у мышей $plg^{+/+}$ воспаление хотя и было значительным, но его тяжесть была очень небольшой по сравнению с воспалением, наблюдаемым у мышей $plg^{-/-}$. Клинические данные были подтверждены гистопатологическим обследованием, которое четко показало, что у мышей $plg^{-/-}$ разрушение хряща и кости происходит на значительно более высоком уровне. В совокупности у мышей $plg^{+/+}$ артрит был значительно менее тяжелым, чем у мышей $plg^{-/-}$. Плазмин оказывал благоприятное действие на перестройку ткани.

Для исследования развития и прекращения артрита на клеточном уровне был произведен микроскопический анализ некротизированной ткани у мышей $plg^{-/-}$ и $plg^{+/+}$. Некротизированная ткань в суставе обнаруживалась у мышей $plg^{-/-}$ уже на 3 день после инокуляции бактерий. Как показано на фиг. 16 и 15C, H, у мышей $plg^{-/-}$ выявлялась большая область некротизированной ткани. Напротив, у мышей $plg^{+/+}$ некроз был небольшим, даже при тяжелом воспалении. Эти данные указывают на то, что недостаточность

plg у мышей сопровождается неспособностью к удалению некротизированной ткани, что ведет к разрушению ткани.

В соответствии с установленной ролью активации плазминогена в фибринолизе утрата плазминогена ведет к повышенному отложению фибрина. Содержание фибрина в коленных суставах анализировали с помощью иммуногистохимии фибрина (фиг. 17). Однако авторы обнаружили сходные уровни отложения фибрина во всех набухших суставах контрольных мышей plg^{+/+} и мышей plg^{-/-}. Эти данные ясно указывают на то, что отложение фибрина, видимо, не является причиной более тяжелого бактериального артрита, наблюдаемого у мышей plg^{-/-}.

Пример 13.

Плазминоген важен при защитной реакции хозяина против вызванной *S. aureus* инфекции во время заживления операционных ран у мышей plg^{-/-}.

Способы.

Для нанесения операционной раны сначала тщательно выбривали спинную часть мышей plg^{-/-} с помощью машинки для стрижки волос и очищали 70% этанолом. После этого производили 15-мм надрез вдоль средней линии спинной части мыши. Через 15 мин 1×10^7 КОЕ *S. aureus* в 10 мкл ЗФР местно наносили и размазывали на открытую рану. Более того, подкожно инъецировали 50 мкл плазминогена в двух местах по обе стороны открытой раны на расстоянии 5 мм от открытой раны. В качестве контроля мышам plg^{-/-} местно инъецировали лишь 50 мкл ЗФР в область открытой раны, инокулированной бактериями. После этого 50 мкл плазминогена (10 мкг/мл) или ЗФР инъецировали до 10 дня каждые 24 ч подобно тому, как это производилось в 0 день. На 11 день мышей умерщвляли, осторожно извлекали образцы ран, границ ран и нижележащей ткани и гомогенизировали в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий *S. aureus* в каждом гомогенате.

Результаты.

Для исследования того, играет ли плазминоген роль в уничтожении бактерий в модели инфекции открытой раны, сходную с его ролью в модели бактериального артрита, мышам plg^{-/-} наносили операционную рану и дополнительно инокулировали местно 10^7 КОЕ *S. aureus* Phillips. После этого мышам местно инъецировали либо плазминоген человека, либо контрольный ЗФР в течение 10 дней. Выделение бактерий из образцов ткани этих мышей показало, что местное лечение плазминогеном человека успешно снижает количество бактерий в 10 раз по сравнению с контрольными мышами plg^{-/-}, получавшими ЗФР (табл. 7, фиг. 18). Эти данные ясно показывают, что плазминоген играет важную роль в защитной реакции хозяина (например, уничтожении бактерий) против инфекций, сопровождающих открытую рану. Более того, местная инъекция плазминогена также значительно улучшала заживление инфицированных ран (фиг. 19). Совместно эти результаты указывают на то, что плазминоген важен для защитной реакции хозяина против травм разного типа, как это было определено по защитной реакции хозяина против двух типов бактериального артрита, заживлению открытых ран и защитной реакции хозяина против инфекции открытой раны.

Таблица 7

Количество бактерий у мышей plg^{-/-} при местном лечении hPlg или ЗФР на 11 день после нанесения операционной раны, инокулированной 1×10^7 КОЕ *S. aureus* Phillips

Группы	Количество образцов	Среднее количество бактерий на грамм ткани (Среднее±ст.ош., $\times 10^5$ КОЕ/г)
plg ^{-/-} с местной инъекцией hPlg	4	2,6±2,5*
plg ^{-/-} с местной инъекцией ЗФР	2	26,8±25,2

* P<0,05 по сравнению с группой мышей plg^{-/-} с местной инъекцией ЗФР.

Пример 14.

Плазминоген важен для защитной реакции хозяина против вызванной *S. aureus* инфекции при заживлении ожоговых ран у мышей plg^{-/-}.

Способы.

Для получения модели ожога обжигом мышей сначала усыпляли анестезией. После этого область будущего ожога тщательно обривали, располагали вертикально и вводили в соприкосновение с 25-г металлическим прутом с температурой 100°C в течение 6 с с помощью пинцета. Металлический прут предельно нагревали в горячей воде при температуре кипения. 6 с ожога вызывают тяжелую местную термическую травму. После нанесения ожога обжигом поверхность спины мыши тщательно вытирают для удаления избытка воды. Приблизительно через 15 мин в центр области ожога точно подкожно инъецировали 30 мкл 1×10^6 КОЕ *S. aureus*. Еще через 15 мин подкожно инъецировали 50 мкл плазминогена (10 мкг/мл) в двух местах вокруг границы области ожога обжигом, по 25 мкл в одно место. В контроль-

ной $plg^{-/-}$ ЗФР группе инъецировали 50 мкл ЗФР подобно инъекции плазминогена. После этого с 0 по 9 день производили ежедневную инъекцию либо сверху вниз, либо слева направо в область ожога с ежедневной сменой. В группе $plg^{+/+}$ мышей лишь подвергали ожогу, но оставляли без местного лечения. В конце эксперимента внешний вид ожоговых ран регистрируют с помощью фотоаппарата, образцы ткани (область ожога и нижерасположенный плоский слой ткани) тщательно вырезают и гомогенизируют в 1 мл стерильного ЗФР. После последовательных разведений растворы гомогенатов наносили на чашки LB агара и инкубировали при 37°C в течение ночи. Затем подсчитывали количество жизнеспособных колоний бактерий для оценки количества бактерий *S. aureus* в каждом гомогенате.

Результаты.

Для исследования того, играет ли плазминоген роль в уничтожении бактерий в модели инфекции ожоговой раны, сходную с его ролью в модели бактериального артрита, мышам $plg^{-/-}$ наносили ожоговые раны и дополнительно инокулировали местно 1×10^6 КОЕ *S. aureus* Phillips. После этого мышам местно инъецировали либо плазминоген человека, либо контрольный ЗФР в течение 9 дней. Выделение бактерий из образцов ткани этих мышей, взятых через 10 дней после ожога, показало, что местное лечение плазминогеном человека успешно снижает количество бактерий в 10 раз у мышей $plg^{-/-}$ по сравнению с контрольными мышами $plg^{-/-}$, получавшими ЗФР (табл. 8, фиг. 20), что даже ниже, чем количество бактерий у мышей $plg^{+/+}$ без местной инъекции. Эти данные ясно показывают, что плазминоген играет важную роль в защитной реакции хозяина (например, уничтожении бактерий) против инфекций, сопровождающих открытую ожоговую рану. Совместно эти результаты указывают на то, что плазминоген важен для защитной реакции хозяина против травм разного типа, как это было определено по защитной реакции хозяина против двух типов бактериального артрита, заживлению открытых ран (ожог, надрез) и защитной реакции хозяина против инфекции открытой раны.

Таблица 8

Количество бактерий у мышей $plg^{-/-}$ при местном лечении hPlg или ЗФР на 10 день после нанесения ожоговых ран, инокулированных 1×10^7 КОЕ *S. aureus* Phillips

Группы	Количество образцов	Среднее количество бактерий на грамм ткани (Среднее \pm ст.ош., $\times 10^6$ КОЕ/г)
$plg^{-/-}$ с местной инъекцией hPlg	5	0,43 \pm 0,13*
$plg^{-/-}$ с местной инъекцией ЗФР	5	4,6 \pm 1,4
$plg^{+/+}$ без местной инъекции	4	3,6 \pm 2,1

* $P < 0,05$ по сравнению с группой мышей $plg^{-/-}$ с местной инъекцией ЗФР.

Пример 15.

Доля спонтанного хронического отита среднего уха у мышей дикого типа и с недостаточностью plg .
Способы.

Экспериментальная процедура. На протяжении 18-недельного периода мышам анестезировали через разные промежутки времени путем внутрибрюшинного введения 100 мкл смеси 25 мкл Dormicum® (Roche AB, Stockholm, Швеция), 25 мкл Нурнорм™ (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Бельгия) и 50 мкл стерильной воды. Макроскопический вид барабанной перепонки (ТМ) [глухота] тщательно обследовали и документировали с помощью отомикроскопа. В конце 18-недельного периода всех животных умерщвляли, и структуры от 18 животных (дикий тип, $n=7$; недостаточность plg , $n=11$) случайным образом делили на три группы, предназначенные для бактериологической идентификации (дикий тип, $n=6$; недостаточность plg , $n=6$), заключения в пластик (дикий тип, $n=4$; недостаточность plg , $n=6$) и заключения в парафин (дикий тип, $n=4$; недостаточность plg , $n=10$) соответственно.

Заключение в пластик и парафин. Черепа собирали для заключения в пластик и парафин, как описано ранее [15]. Для морфологии из заключенных в пластик образцов готовили поперечные срезы (1 мкм) вдоль всего МЕС и окрашивали толуидиновым синим. Для иммуногистохимии из заключенных в парафин образцов готовили поперечные срезы (5 мкм) вдоль всего МЕС.

Результаты.

Для изучения развития хронического отита среднего уха отбирали 6-недельных мышам дикого типа и мышам с недостаточностью plg . Состояние ТМ и МЕС у экспериментальных мышам оценивали в начале эксперимента и в возрасте 9 недель, 13 недель, 18 недель и 24 недель. Отомикроскопически спонтанный хронический отит среднего уха определяли как мутную, беловатую и утолщенную ТМ при наличии выпотного вещества или без него в МЕС. Как показано в табл. 9, ни у одной из мышам (самцов и самок) дикого типа не возникали какие-либо выпоты среднего уха или дренирование из канала внешнего уха (ЕЕС) на протяжении 18-недельного экспериментального периода. Как показано с помощью отомикроскопа, их ТМ были тонкими, прозрачными и нормально расположенными (данные не показаны). Напро-

тив, у мышей с недостаточностью plg количество ушей со спонтанным отитом среднего уха постепенно увеличивалось на протяжении экспериментального периода до сходного уровня у самцов и самок. В конце эксперимента спонтанный отит среднего уха с воспалительными изменениями разной степени развивался во всех ушах остальных мышей с недостаточностью plg (табл. 9).

Таблица 9

Доля спонтанного развития хронического отита среднего уха у мышей разного возраста дикого типа и мышей с недостаточностью plg

Группа мышей	Доля спонтанного развития хронического отита среднего уха ^a в возрасте:				
	6 недель	9 недель	13 недель	18 недель	24 недели
Дикий тип, самцы	0/18	0/18	0/16	0/16	0/16
Дикий тип, самки	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Недостаточность plg, самцы	0/20	3/20	5/18	8/18	6/10 ^b
Недостаточность plg, самки	0/24	1/24	3/24	8/22	11/16 ^b

^a Данные представлены в виде количества инфицированных/воспаленных ушей, деленного на общее количество ушей в каждой группе.

^b При морфологическом анализе было обнаружено, что среднее ухо у мышей с недостаточностью plg, которое выглядело нормальным под отомикроскопом, содержит воспалительные изменения, но не слишком выраженные, при наличии лишь тонкого слоя аморфной тканевой массы в МЕС, прилегающей к ТМ.

Пример 16.

Идентификация бактерий, выделенных из МЕС мышей дикого типа и мышей с недостаточностью plg.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 8, за исключением идентификации бактерий.

Идентификация бактерий.

Барабанные вздутия групп дикого типа и с недостаточностью plg отделяли от мягкой ткани, и с помощью скальпеля выделяли небольшой кусочек костного основания вздутия. Стерильный тампон погружали в полость среднего уха (МЕС), и с помощью тампона вещество затем наносили на чашки с бульоном Лурия (LB) и сразу инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Полученные колонии идентифицировали по Cowan & Steel [16].

Результаты.

В конце эксперимента барабанные вздутия от 6 мышей дикого типа и 6 мышей с недостаточностью plg случайным образом собирали для идентификации бактерий. Как указано в табл. 10, бактерии были найдены только в 1 из 6 образцов дикого типа. Бактерии были идентифицированы как *Streptococcus sanguinis*. Однако в 5 из 6 образцов МЕС, полученных от мышей с недостаточностью plg, бактерии были выделены. Были идентифицированы виды *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus sobrinus* и *Streptococcus mutans*. Все идентифицированные бактерии были грамположительными.

Таблица 10

Выделение бактерий из МЕС мышей в возрасте 24 недель дикого типа и мышей с недостаточностью plg

Номера ушей мышей	Выявленные бактерии в	
	Дикий тип	Недостаточность plg
1	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	ND ^a	<i>Micrococcus luteus</i>
3	ND	<i>Streptococcus sobrinus</i>
4	ND	<i>Streptococcus sobrinus</i> и <i>Streptococcus mutans</i>
5	ND	<i>Streptococcus mutans</i>
6	ND	ND

^aND, не выявляется.

Пример 17.

Исследования среднего уха у мышей дикого типа и мышей с недостаточностью pIg с помощью световой микроскопии.

Способы.

Этот эксперимент проводили подобно эксперименту примера 8, за исключением иммуногистохимического окрашивания.

Иммуногистохимическое окрашивание.

Заключенные в парафин срезы регидратировали в серии растворов этанола с понижающейся концентрацией и промывали дистиллированной водой. Эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью 0,3% H_2O_2 в течение 10 мин и стекла дополнительно промывали ЗФР. Последовательные срезы затем обрабатывали антителами, указанными ниже. При всех иммуногистохимических окрашиваниях соседние стекла, инкубированные с сывороткой от неиммунизированных животных вместо первичного антитела, использовали в качестве отрицательных контролей.

Для выявления воспалительных клеток использовали моноклональные первичные антимышьи антитела против Т-клеток (клон 53-7.3, разведение 1:50; BD Biosciences Pharmingen, Stockholm, Швеция), В-клеток (клон RA3-6B2, разведение 1:250; BD Biosciences Pharmingen), макрофагов (MCAP497, разведение 1:500; Serotec, Oxford, U.K.) и нейтрофилов (CL8993AP, разведение 1:200; Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Канада). Для проведения иммуногистохимического окрашивания стекла сначала восстанавливали и инкубировали с нормальной сывороткой кролика (Dako Patts, Copenhagen, Дания) перед инкубацией с разными первичными антителами в подходящих концентрациях. После этого стекла инкубировали с биотинилированным IgG кролика против крысы (Dako Patts) и дополнительно обрабатывали с помощью способа авидин-биотин-пероксидазного комплекса (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Цитокератин выявляли иммуногистохимически с помощью пероксидазного-антипероксидазного (PAP) способа с использованием поликлонального антитела кролика против человека (10550, ICN Pharmaceuticals, Aurora, Ohio) в качестве первичного антитела. Вкратце, стекла, содержащие срезы ткани, сначала восстанавливали с помощью 0,1% трипсина (pH 7,8) при 37°C в течение 8 мин, блокировали 5% сывороткой неиммунизированной свиньи (Dako Patts) и инкубировали с первичным антителом, разбавленным 1:100 ЗФР. После этого наносили свиное антитело-мостик против кролика (Dako Patts) и затем кроличий PAP комплекс (Dako Patts).

Фибрин(оген) выявляли иммуногистохимически с помощью PAP способа с использованием поликлонального антитела козы против мыши (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Нидерланды) в качестве первичного антитела. После исходной инкубации с сывороткой кролика (Dako Patts) и затем с первичным антителом при разведении 1:500 в ЗФР стекла инкубировали с кроличьим антитело-мостиком против козы (Dako Patts). После этого инкубировали с козым PAP комплексом (Dako Patts).

Все стекла визуализировали в виде коричневых преципитатов с помощью диаминобензидиновой (DAB) реакции (Vector Laboratories) и подкрашивали гематоксилином Мейера. Стекла оценивали с помощью световой микроскопии на микроскопе Leica DMLB, и изображения записывали в цифровом формате с использованием фотоаппарата Leica DC 300F, соединенного с персональным компьютером. Установление контраста и яркости индивидуальных изображений производили с помощью программы Adobe Photoshop 7.0.

Результаты.

В конце эксперимента производили морфологическое окрашивание заключенных в пластик образцов от мышей дикого типа и мышей с недостаточностью pIg. Как показано на фиг. 7А, ТМ и среднее ухо мышей дикого типа имели нормальную структуру. ТМ имела обычную трехслойную структуру: наружный кератинизированный эпидермальный слой, среднюю lamina propria и внутреннюю эпителиальную выстилку, прилегающую к выстилке МЕС. В МЕС не обнаруживались выпоты среднего уха. Однако у мышей с недостаточностью pIg во всех обследованных образцах среднего уха наблюдались воспалительные изменения. ТМ была утолщена и склеена с аморфной тканевой массой, которая иногда заполняла почти весь МЕС (фиг. 7В). Во многих образцах ЕЕС также был заполнен аморфной тканью (фиг. 7D).

В конце экспериментального периода производили иммуногистохимическое окрашивание для изучения распределения фибрина и кератина в среднем ухе (фиг. 7С, D, E, F). У мышей дикого типа лишь слабая иммунореактивность против фибрин(оген)а и кератина наблюдалась на эпителиальной поверхности ТМ (фиг. 7С и E). Однако у мышей с недостаточностью pIg, как показано на фиг. 7В, наблюдалась иммунореактивность против фибрина в аморфной ткани, покрывающей слизистую ТМ и МЕС. Структура аморфной ткани варьировала в разных областях и разных образцах от свободной сетеподобной до подобной густку или даже плотно упакованной (данные не показаны). Фибриновая иммунореактивность также наблюдалась в аморфной ткани в ЕЕС. У большинства мышей с недостаточностью pIg окрашиваемый на кератин слой в ТМ и окружающий эпидермальный слой ЕЕС был значительно утолщен (фиг. 7F).

Для исследования инфильтрации воспалительных клеток парафиновые срезы от мышей дикого типа и мышей с недостаточностью pIg окрашивали на Т-клетки, В-клетки, макрофаги и нейтрофилы. Как показано на фиг. 8А, С, E и G, в ТМ и слизистой среднего уха мышей дикого типа любые воспалительные

клетки практически не обнаруживались. У мышей с недостаточностью pIg, однако, в ТМ и аморфной ткани, заполняющей среднее ухо и ЕЕС, были найдены и Т-клетки, и В-клетки, и макрофаги, и нейтрофилы (фиг. 8В, D, F и Н). Т-клетки и В-клетки были относительно немногочисленны, и они были скудно распределены в ТМ и слизистой среднего уха (фиг. 8В и D). В слизистой среднего уха наиболее представленным типом воспалительных клеток были макрофаги (фиг. 8F), а нейтрофилы были доминирующим типом клеток в аморфной ткани, выступающей с ЕЕС (фиг. 8Н). В целом, эти результаты позволяют предполагать, что плазминоген играет существенную роль в защите от спонтанного развития хронического отита среднего уха.

Приведенные выше примеры представлены с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема настоящего изобретения, как изложено в прилагаемой формуле изобретения. Все ссылки, изложенные в описании, включены в качестве ссылки.

Список ссылок

1. Aderem, A. 2003. Phagocytosis and the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 187 Suppl. 2:S340-S345.
2. Hauschildt, S., and Kleine, B. 1995. Bacterial stimulators of macrophages. *Int. Rev. Cytol.* 161:263-331.
3. Chertov, O., Yang, D., Howard, O.M. and Oppenheim, J.J. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.* 177:68-78.
4. Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C., Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P., and Ny, T. 1999. Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology*, 140:5030-5035.
5. Teele, D.W., Klein, J.O., and Rosner, B. 1989. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J. Infect. Dis.* 160:83-94.
6. Alexander C.M., and Werb, Z. 1991. Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED, editor. Plenum Press. New York, 255-302.
7. Travis, J., and Salvesen, G. 1983. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst. Mitt.* 56-65.
8. 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.
9. Saksela, O., and Rifkin, D.B. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:93-126.
10. Collen, D., and Lijnen, H.R. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 78:3114-3124.
11. Liu, Z.Q., Deng, G.M., Foster, S., and Tarkowski, A. 2001. Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res.* 3:375-380.
12. Qasimi, P., Ming-Lum, A., Ghanipour, A., Ong, C.J., Cox, M.E., Ihle, J., Cacalano, N., Yoshimura, A., and Mui, A.L. 2006. Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. *J. Biol. Chem.* 281:6316-6324.
13. Gjertsson, J., Hultgren, O.H., and Tarkowski, A. 2002. Interleukin-10 ameliorates the outcome of *Staphylococcus aureus* arthritis by promoting bacterial clearance. *Clin. Exp. Immunol.* 130:409-414.
14. Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De, V.R., van den Oord, J.J., Collen, D., and Mulligan, R.C. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.
15. Eriksson, P.O., Mattsson, C., and Hellstrom, S. 2003. First forty-eight hours of developing otitis media: an experimental study. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 112:558-566.
16. COWAN, S.T., and STEEL, K.J. 1961. Diagnostic tables for the common medical bacteria. *J. Hyg. (Lond)*, 59:357-372.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, выбранного из плазминогена, Lys-плазминогена, Glu-плазминогена, вариантов плазминогена, включающих один или несколько крингл-доменов и протеолитический домен, крингл-доменов плазминогена и миниплазминогена, для получения фармацевтической композиции для профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания.

2. Применение по п.1, где инфекционное заболевание представляет собой бактериальное инфекционное заболевание или вирусное инфекционное заболевание.

3. Применение по п.2, где бактериальное инфекционное заболевание выбрано из отита среднего уха и бактериального артрита.

4. Применение по п.2, где бактериальное инфекционное заболевание выбрано из пневмонии, повреждений органов дыхания, вызванных инфекциями, и повреждений тканей суставов, вызванных инфекциями.

5. Применение по п.2, где бактериальное инфекционное заболевание выбрано из гингивита, периодонтита и конъюнктивита.

6. Применение по любому из предшествующих пунктов, где композиция включает сочетание двух

или более соединений по п.1.

7. Применение по любому из предшествующих пунктов, где композиция дополнительно включает по меньшей мере один антибиотик.

8. Применение по п.7, где антибиотик выбран из группы, состоящей из тетрациклинов, амфениколов, бета-лактамов, пенициллинов, сульфонамидов, макролидов, линкозамидов, стрептогаминов, стрептомицинов, хинолонов и метронидазолов.

9. Применение по любому из предшествующих пунктов, где индивидуумом является млекопитающее, особенно человек.

10. Применение по любому из предшествующих пунктов, где у индивидуума имеется недостаточность плазима или плазминогена.

11. Применение по п.10, где недостаточность является врожденной, приобретенной и/или местной.

12. Применение по любому из предшествующих пунктов, где соединение вводят системно, местно, локально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, путем ингаляции, внутритекально, посредством местной инъекции, посредством инъекции в сустав или ректально.

13. Применение по любому из предшествующих пунктов, где соединение вводят в сочетании с подходящим полипептидным носителем или стабилизатором.

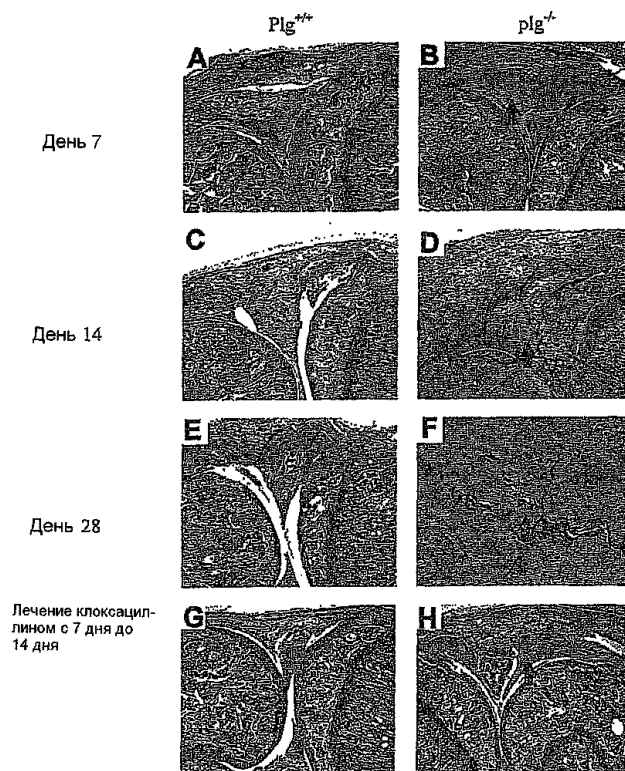
14. Применение по любому из предшествующих пунктов, где соединение вводят в дозе от 0,05 до приблизительно 10 мг, предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг.

15. Применение по любому из предшествующих пунктов, где введение соединения повторяют по меньшей мере один раз, предпочтительно по меньшей мере ежедневно.

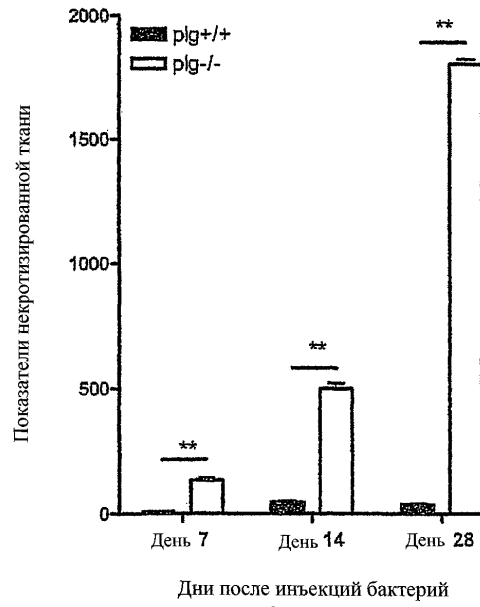
16. Применение по любому из предшествующих пунктов, где введение производят наложением на инфицированную область раневой повязки, включающей соединение по пп.1-15.

17. Применение по любому из предшествующих пунктов, где профилактика, предотвращение и/или лечение инфекционного заболевания включает индукцию иммунного ответа против инфекционного патогена.

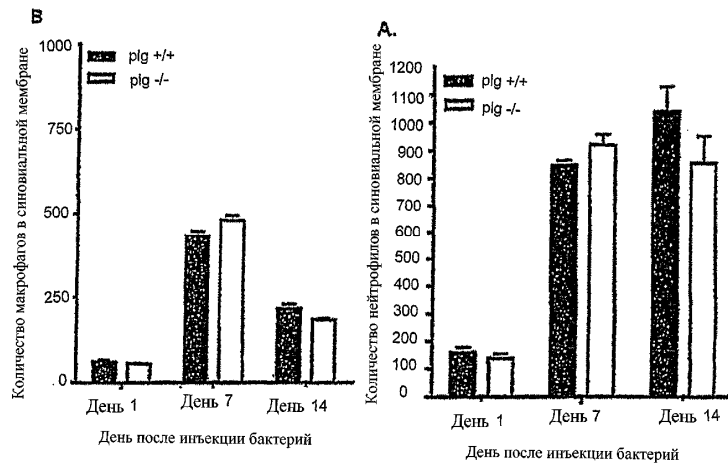
18. Способ профилактики, предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания, который включает введение фармацевтической композиции, включающей эффективное количество соединения, выбранного из плазминогена, Lys-плазминогена, Glu-плазминогена, вариантов плазминогена, включающих один или несколько крингл-доменов и протеолитический домен, миниплазминогена и крингл-доменов плазминогена, индивидууму, нуждающемуся в таком лечении.



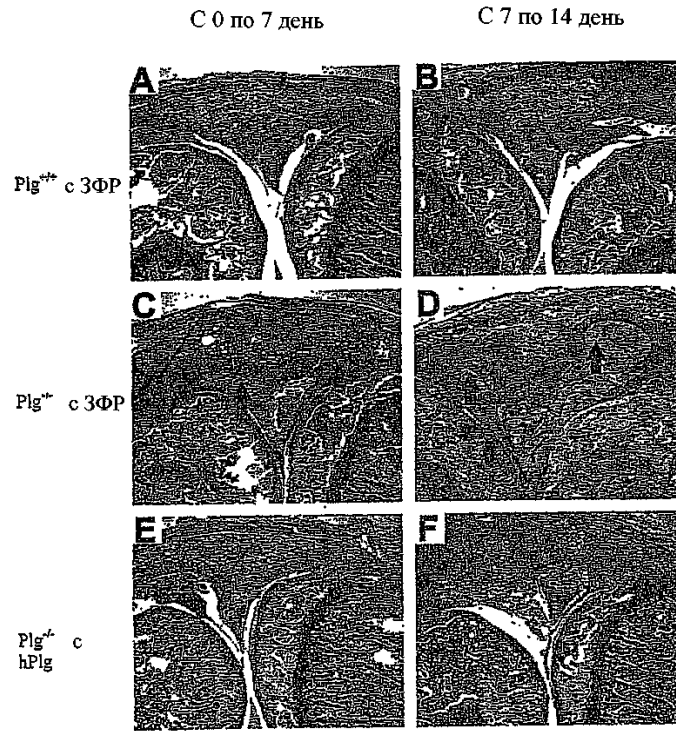
Фиг. 1



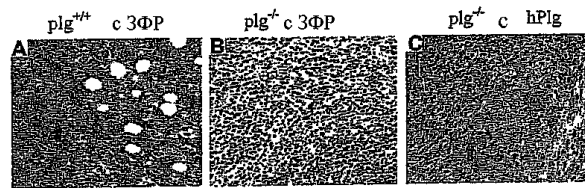
Фиг. 2



Фиг. 3



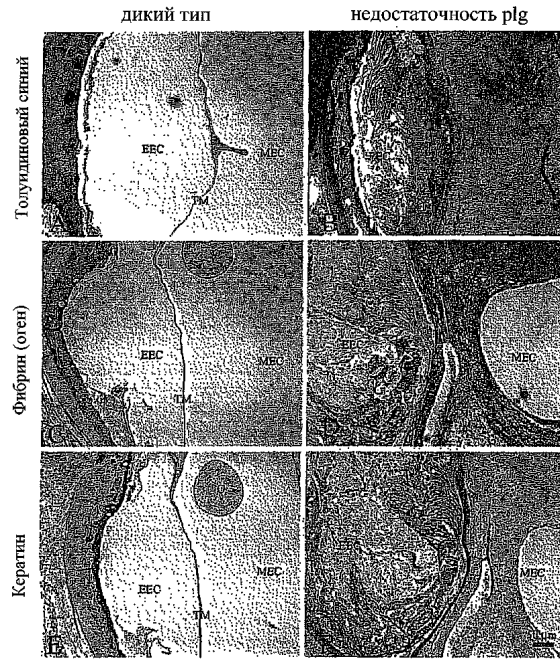
Фиг. 4



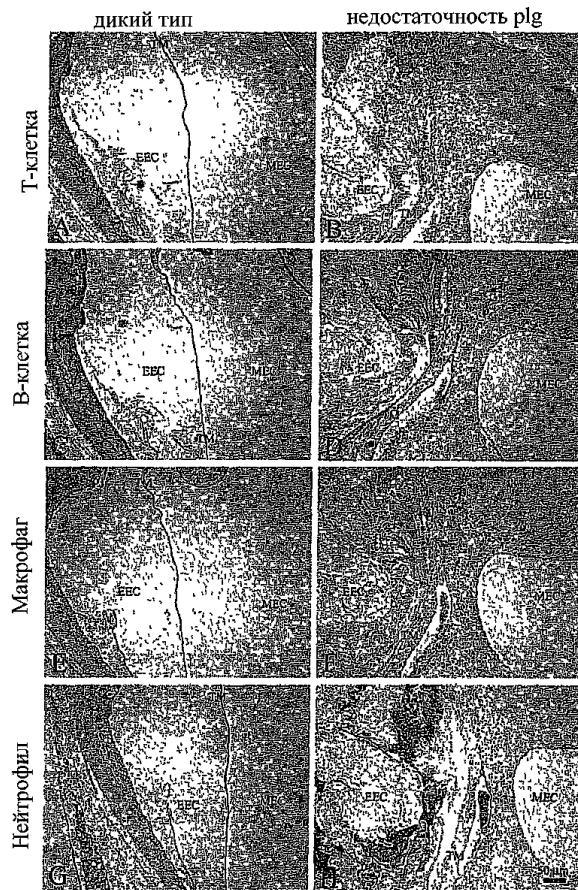
Фиг. 5



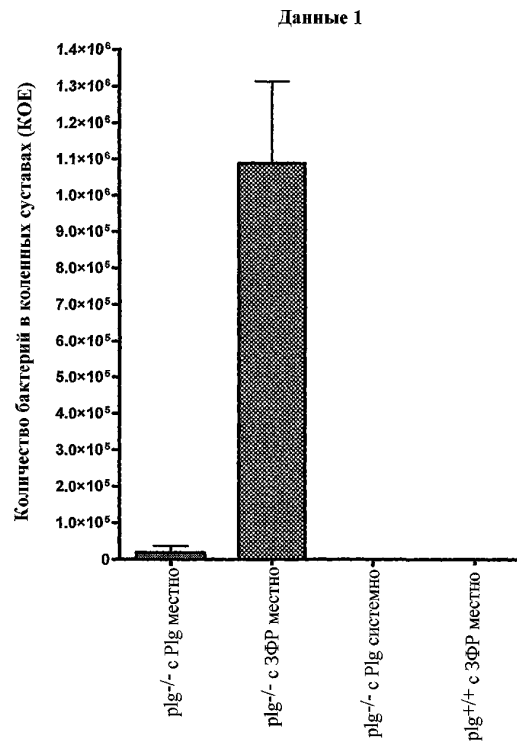
Фиг. 6



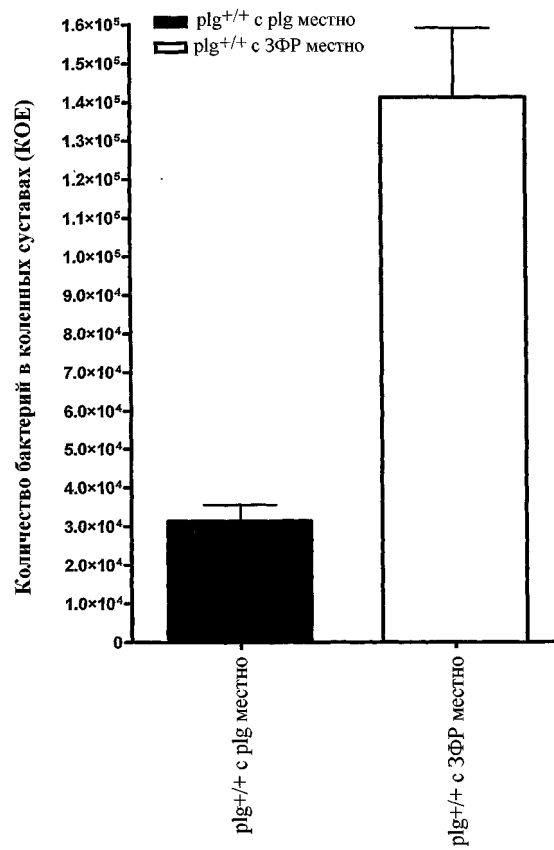
Фиг. 7



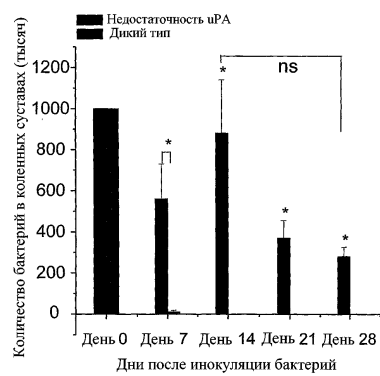
Фиг. 8



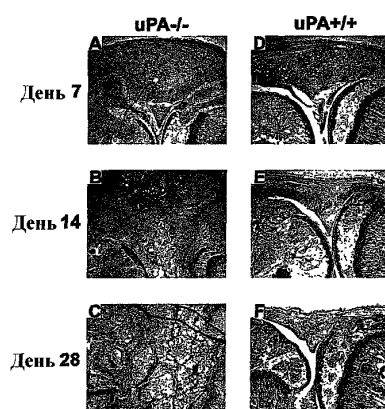
Фиг. 9



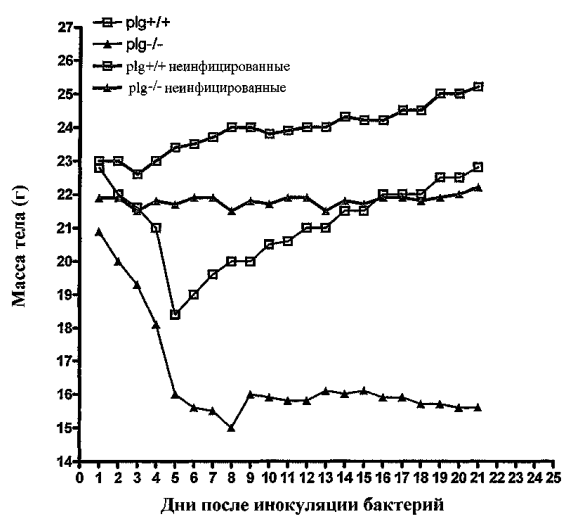
Фиг. 10



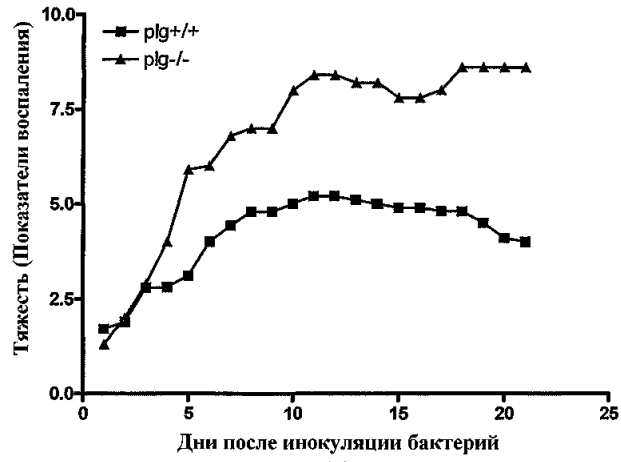
Фиг. 11



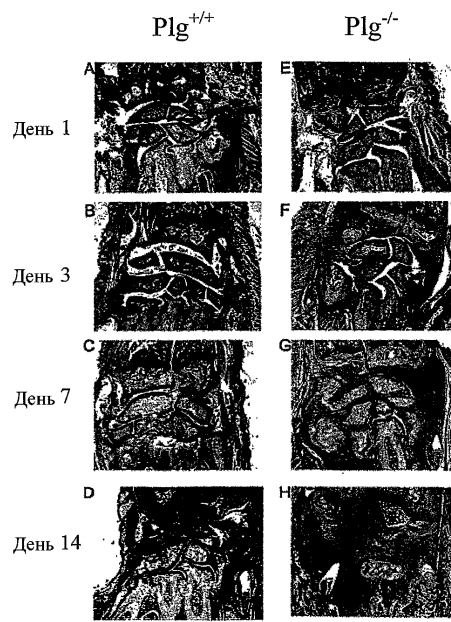
Фиг. 12



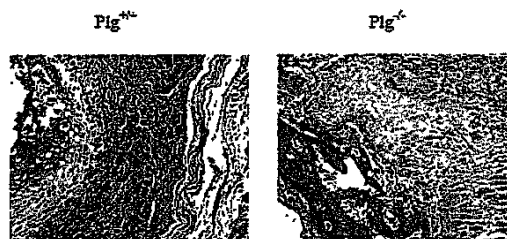
Фиг. 13



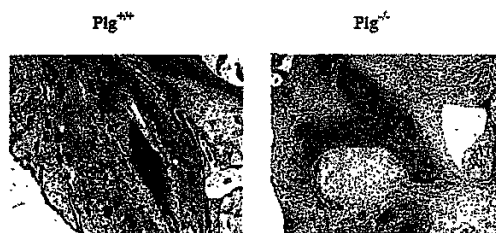
Фиг. 14



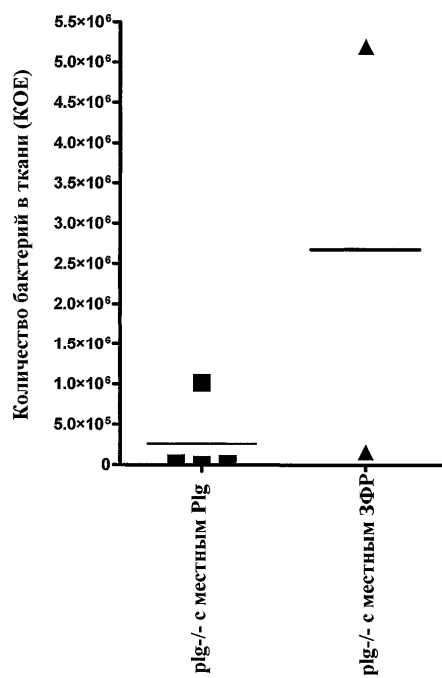
Фиг. 15



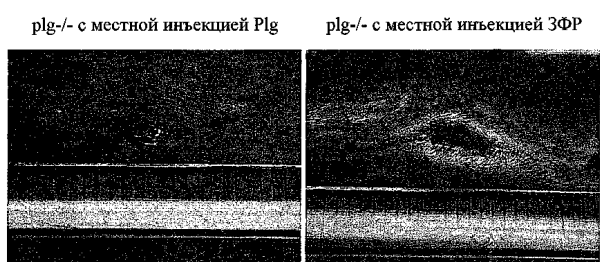
Фиг. 16



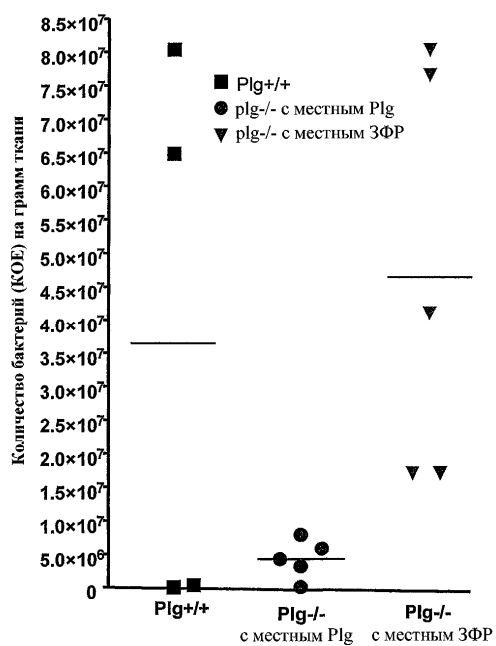
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

