(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101573134 B
(45)授权公告日 2013.03.06

(21)申请号 200780032405.1
(22)申请日 2007.08.28
(30)优先权数据
60/823,665 2006.08.28 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.03.02
(86)PCT申请的申请数据
PCT/SE2007/050585 2007.08.28
(87)PCT申请的公布数据
WO2008/026999 EN 2008.03.06
(73)专利权人 李季男
地址 100000 北京市朝阳区兴隆庄甲8号(兴隆公园南门)瑞健国际护理
专利权人 王天刚
(72)发明人 托尔·尼 李季男 郭永志
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张平元
(51)Int.Cl.
A61K 38/48(2006.01)
A61K 38/36(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
G01N 33/00(2006.01)
A01K 67/027(2006.01)
(56)对比文件
WO 03020297 A2,2003.03.13, 全文.
WO 03066842 A2,2003.08.14, 全文.
WO 03045466 A2,2003.06.05, 全文.
审查员 吕健

权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 18 页

(54)发明名称

抗感染候选药物

(57)摘要

本发明涉及使用纤维蛋白溶酶原/纤维蛋白溶酶及其衍生物作为增强抵抗感染或其他感染性疾病的宿主防御的药剂的用途。本发明还涉及筛选增强抵抗感染的宿主防御的化合物的方法,该方法通过在动物模型中评价抵抗细菌性关节炎和自发性中耳炎的宿主防御来实现。

CN 101573134 B

1. 选自纤维蛋白溶酶原、Lys- 纤维蛋白溶酶原、Glu- 纤维蛋白溶酶原和小纤维蛋白溶酶原的化合物用于制造预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药物组合物的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述感染性疾病是细菌感染性疾病或病毒感染性疾病。

3. 根据权利要求 2 的用途，其中所述细菌感染性疾病选自中耳炎和细菌性关节炎。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述组合物中包含两种或更多种权利要求 1 所述化合物的组合。

5. 根据权利要求 2 的用途，其中所述组合物中包含两种或更多种权利要求 1 所述化合物的组合。

6. 根据权利要求 3 的用途，其中所述组合物中包含两种或更多种权利要求 1 所述化合物的组合。

7. 根据权利要求 1 的用途，其中所述组合物还包含至少一种抗生素。

8. 根据权利要求 7 的用途，其中所述抗生素选自四环素类、酰胺醇类、β - 内酰胺类、青霉素类、磺胺类、大环内酯类、林可酰胺类、链阳菌素类、链霉素类、喹诺酮类和甲硝唑类。

9. 根据权利要求 1 的用途，其中受试者是哺乳动物。

10. 根据权利要求 9 的用途，其中受试者是人。

11. 根据权利要求 1 的用途，其中受试者缺乏纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原。

12. 根据权利要求 11 的用途，其中所述缺乏是先天的、获得的和 / 或局部的。

13. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物通过以下途径施用 :全身或局部。

14. 根据权利要求 13 的用途，其中所述化合物通过以下途径施用 :表面、静脉内、肌内、皮下、吸入、椎管内、局部注射、关节内注射或通过直肠。

15. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。

16. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物以 0.05 至 10 毫克的剂量施用。

17. 根据权利要求 16 的用途，其中所述化合物以 0.5 至 5 毫克的剂量施用。

18. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化合物的施用至少重复一次。

19. 根据权利要求 18 的用途，其中所述化合物至少每天施用。

20. 根据权利要求 1-19 中任一项的用途，其中施用通过向受感染的区域应用含有根据权利要求 1-19 所述化合物的创伤敷料来进行。

21. 根据权利要求 1-19 中任一项的用途，其中所述预防、避免和 / 或治疗感染性疾病包括诱导针对感染性病原体的免疫应答。

22. 根据权利要求 20 的用途，其中所述预防、避免和 / 或治疗感染性疾病包括诱导针对感染性病原体的免疫应答。

23. 用于预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药物组合物，其包含有效量的化合物，所述化合物选自纤维蛋白溶酶原、Lys- 纤维蛋白溶酶原、Glu- 纤维蛋白溶酶原和小纤维蛋白溶酶原。

24. 用于预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药盒，其包含分装在不同容器中的有效量的化合物以及至少一种抗生素或抗真菌剂，所述化合物选自纤维蛋白溶酶原、Lys- 纤维蛋白溶酶原、Glu- 纤维蛋白溶酶原和小纤维蛋白溶酶原。

抗感染候选药物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防、避免和/或治疗感染性疾病和影响细胞外基质的坏死病症（特别是由于细菌引起的）的化合物和方法。特别是，本发明涉及能够改善感染防御、更好地清除坏死组织以及产生有功能且在美观方面令人满意的组织重建的化合物和方法。本发明还涉及可用于研究细菌感染和组织坏死的动物模型，以及用于鉴定及评价药物和用于增强针对细菌感染和组织坏死的治疗方法的筛选方法。

背景技术

[0002] 感染性疾病是由诸如细菌、病毒和真核细胞生物（从单细胞的真菌和原生动物到大型复杂的多细胞动物，如寄生虫）等病原体造成的。致病菌可能含有介导其与宿主相互作用的毒力因子，它们能够引起宿主细胞中特定的应答，这种应答有助于病原体的复制和传播。病毒通过干扰宿主细胞正常代谢机制来产生其自身蛋白质并复制其基因组。病原体往往通过粘附或侵入与外界环境直接接触的上皮表面而定殖到宿主中。病毒主要依赖于受体介导的胞吞作用进入宿主细胞，而细菌则利用细胞粘附和吞噬途径(1)。病原性真菌、原生动物和其他真核细胞寄生虫在其感染过程中通常经历几种不同的形式，在这些形式之间转换的能力通常是其能够生存于宿主中并引起疾病所必需的。

[0003] 在宿主接触新病原体的最初几小时或几天内，先天免疫系统是抵御入侵病原体的第一道防线。然而，启动特异性的适应性免疫应答也是必需的。先天免疫应答依靠机体自身的能力来识别在未感染宿主中不存在的病原体的保守特征，它们包括微生物表面上多种类型的分子和一些病毒的双链RNA。微生物表面的分子还能够激活补体系统，使这些生物体被巨噬细胞和中性粒细胞吞噬，并产生炎性应答。

[0004] 细菌已经发展出不同的策略来摆脱吞噬细胞。例如，它们能抑制趋化作用和吞噬作用、杀死或定殖吞噬细胞。吞噬细胞使用降解酶、抗微生物肽和活性氧物质的组合来杀死入侵微生物(2)。此外，它们释放能够引发炎性应答和启动适应性免疫系统的信号分子。另一方面，细菌也产生了不同的策略来应对适应性免疫系统，如分子模拟、抑制抗体、藏匿于细胞内部或向血液中释放抗原(3)。

[0005] 细胞内病原体（其中包括所有病毒以及许多细菌和原生动物）在宿主细胞内复制，它们通常通过多种机制中的一种侵入该细胞。病毒主要依赖于受体介导的胞吞作用进入宿主细胞，而细菌利用细胞粘附和吞噬途径。原生动物采用独特的入侵策略，通常需要大量的代谢消耗。一旦进入细胞内，胞内的病原体便寻找有利于其复制的小生境，常常改变宿主细胞的膜运输(membrane traffic)，并利用细胞骨架在细胞内运动。

[0006] 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)是一种常与细菌性关节炎有关的微生物，它能够导致滑膜炎症、软骨和骨骼的破坏，并最终造成关节变形。包括哺乳动物、鸟类和爬行动物在内的多种动物物种中均发现了患有金黄色葡萄球菌自发性关节炎的情况，因此这些动物都是诱导该疾病的潜在模型。

[0007] 纤维蛋白溶酶原激活剂(plasminogen activator，PA)系统是一种通用的蛋白水

解系统，有人提出它在不同类型关节炎的发生中发挥重要作用。纤维蛋白溶酶原可被两种生理性 PA（组织型 PA(tPA) 和尿激酶型 PA(uPA)）中的任何一种活化成广谱蛋白酶 -- 纤维蛋白溶酶。

[0008] 中耳炎是指耳朵的炎性病症。中耳炎是除感冒以外最常见的儿童疾病。与中耳炎相关的最重要致病因素是上呼吸道的细菌或病毒感染。中耳炎一般是良性的，并且是自限性疾病，但尽管如此，抗生素处方率仍然很高。事实上，缺乏抗生素具有治疗中耳炎作用的证据，目前，外科干预是治疗复发性急性中耳炎 (acute otitis media，AOM) 以及慢性中耳炎或渗出性中耳炎 (otitis media with effusion，OME) 的首选疗法。

[0009] 众所周知，受伤后患者的正常皮肤菌群（例如，金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌 (Streptococcus pyogenes)）会立即定殖。特别是在 20 世纪 50 年代初引入青霉素 G 使化脓性链球菌作为造成患者热损伤感染的病因几乎被清除之后，金黄色葡萄球菌成为创伤感染的主要病原体。因此，金黄色葡萄球菌是开放性创伤的感染中最常见的细菌物种。切口和烧伤是临床实践中最常见的创伤类型。

[0010] 自二战以来，抗生素和其他抗微生物药物已广泛应用于治疗感染性疾病。抗微生物剂针对致病微生物的成功是现代医学的伟大成就之一。然而，因为抗药性的产生，许多抗生素都不像过去一样有效。产生抗生素抗药性中的一个关键因素是感染性微生物具有迅速适应新环境条件的能力。随着时间的推移，一些细菌已发展出规避抗生素作用的办法。抗生素的广泛使用被认为促进了的进化适应，这使得细菌能承受这些强力药物。对抗微生物剂的抗性为微生物提供了生存益处，使得更难于从人体中清除感染。最终，微生物越来越难以被击退，这将导致在医院或其他环境中被感染的风险增加。诸如结核病、淋病、疟疾和儿童耳感染的疾病现在比几年前更难以治疗。对于接收不借助抗生素就不太能清除感染的临床患者的医院来说，抗药性是一个特别困难的问题。对这些患者大量使用抗生素选择出了细菌中导致抗药性的变化。遗憾的是，这使问题更为恶化，因为产生了即使在最强抗生素存在下也具有更高存活能力的细菌。这些甚至更强的抗药性细菌继续损害脆弱的住院患者。因此，人们越来越认识到，非常需要新的治疗策略来改善对感染的防御。

[0011] 坏死是对细胞和活组织的非程序性死亡或意外死亡的命名。它不像凋亡那样有序，凋亡是程序性细胞死亡的一部分。与凋亡不同，通过免疫系统的吞噬细胞来清除坏死所产生的细胞碎片往往更加困难，因为无序的死亡一般不会发送“吃我”的细胞信号来告诉附近的吞噬细胞来吞噬濒死细胞。与发生凋亡的细胞相比，这种信号缺乏使免疫系统更难于定位和回收通过坏死方式死亡的死细胞。细胞膜损伤后释放细胞内容物是坏死中引发炎症的原因。

[0012] 造成坏死的原因有许多，包括损伤、感染、癌症、梗死、毒液螫入和炎症。细胞中一个关键系统的严重损伤导致其他系统的继发损伤，即所谓的“级联效应”。坏死是由特殊的酶引发，这些酶从溶酶体中释放出来，它们具有消化细胞组分或整个细胞本身的能力。细胞受到的损伤可能损伤溶酶体膜，或者可能引发无序的连锁反应，导致酶释放。不同于凋亡，通过坏死方式死亡的细胞可能释放损害其他细胞的有害化学物质。活检材料的坏死过程被固定或冷冻终止。

[0013] 目前治疗坏死的方法主要有四种。首先是手术去除，这是最迅速的方法，因此当存在大坏死区域或厚焦痂时推荐使用。第二种是机械去除，其中包括水疗、聚糖酐和创伤冲

洗。第三种是酶促清除，使用的酶主要是胶原酶（例如：Santyl），然而，当存在感染时其作用效果太慢。第四种是通过自溶方法，该方法通过创面渗液中的酶来实现，但其效果极为缓慢。但是，这四种治疗方法均不能提供有功能且在美观方面令人满意的坏死移除和组织重建。因此，非常需要开发一种新的治疗策略，以实现成功的坏死移除。

[0014] 目前治疗感染（如细菌性关节炎、开放性创伤的感染、中耳炎和坏死）的方法有如上文所讨论的缺点。因此，本领域中非常需要一般性治疗感染的改进策略。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及下述意想不到的发现：纤维蛋白溶酶原激活途径的组分以及能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物可用作治疗感染性疾病和组织坏死的新的改进策略。本发明的一个方面涉及纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶原激活途径的其他成员或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物在提供抗感染（例如金黄色葡萄球菌诱发的关节炎和开放性创伤的感染）保护方面的能力，这通过激活炎性细胞、杀死细菌、去除坏死组织和增强细胞因子表达来实现。这种感染病症还包括感染性疾病和其他经常观察到组织感染的疾病，例如组织特异性感染防御、全身感染防御、急性感染、慢性感染、慢性溃疡、开放性创伤感染和糖尿病溃疡。

[0017] 在一些实施方案中，本发明涉及预防、避免和/或治疗感染性疾病的方法，包括施用有效量的化合物，所述化合物是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分，或者是能直接激活或通过纤维蛋白溶酶原激活途径间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物。

[0018] 在一些实施方案中，能直接激活或通过纤维蛋白溶酶原激活途径激活纤维蛋白溶酶原的化合物包括链激酶、沙芦普酶(saruplase)、阿替普酶(alteplase)、瑞替普酶(reteplase)、替奈普酶(tenecteplase)、阿尼普酶(anistreplase)、孟替普酶(monteplase)、拉诺替普酶(lanoteplase)、帕米普酶(pamiteplase)、葡激酶(staphylokinase)以及纤维蛋白溶酶原激活途径组分的重组形式和变体。

[0019] 在一些实施方案中，所述感染性疾病是细菌感染性疾病或病毒感染性疾病。

[0020] 在另一些实施方案中，所述细菌感染性疾病包括中耳炎、细菌性关节炎、牙龈炎、牙周炎、结膜炎、创伤感染、手术创伤感染、坏死、肺炎、由烧伤和/或感染造成的呼吸器官损伤和糖尿病患者中发生感染的慢性腿溃疡、静脉或合并静脉/动脉供血不足或感染性关节炎等、感染造成的关节组织损伤，优选地是中耳炎或细菌性关节炎。

[0021] 在一些实施方案中，所述组合物包含两种或更多种化合物的组合。在一些实施方案中，该组合物还包含至少一种抗生素。

[0022] 在另一些实施方案中，所述抗生素选自四环素类、酰胺醇(amphenicol)类、β-内酰胺类、青霉素类、磺胺类、大环内酯类、林可酰胺类、链阳菌素(streptoganim)类、链霉素类、喹诺酮类和甲硝唑类。

[0023] 在一些实施方案中，受试者是哺乳动物，尤其是人类。在另一些实施方案中，所述受试者中的纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原缺乏。这种缺乏可能是先天的、获得性的和/或局部的。

[0024] 在一些实施方案中，所述组合物通过以下途径施用：全身、局部、表面(topically)、静脉内、肌内、皮下、吸入、椎管内、局部注射、关节内注射或直肠。在一个优选的实施方案中，选用表面施用和/或局部注射。

[0025] 在一些实施方案中，所述组合物与适当的多肽载体和/或一种或多种稳定剂组合

施用。

[0026] 在另一些实施方案中，该组合物的施用剂量为 0.0001 至约 1 克，优选 0.005 毫克至约 100 毫克，更优选约 0.05 到约 50 毫克。以毫克计的剂量与感染面积的平方厘米数相关（即毫克 / 平方厘米感染区域面积）。

[0027] 在另一些实施方案中，将该组合物的施用至少重复一次，优选至少每天重复。

[0028] 在另一些实施方案中，通过向感染区域应用创伤敷料（包含本发明的化合物）来进行施用。

[0029] 在另一些实施方案中，本发明涉及预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的方法，其包括向需要此治疗的患者施用含有有效量适当化合物的药物组合物。

[0030] 在一些实施方案中，本发明涉及用于预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药物组合物，所述药物组合物包含有效量的适当化合物。

[0031] 在一些实施方案中，本发明涉及用于预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药盒，所述药盒中包含分装于不同容器中的有效量的适当化合物和至少一种抗生素或抗霉菌剂。

[0032] 在一些实施方案中，本发明涉及鉴定可用于促进抗感染宿主防御的药剂的方法，该方法包括如下步骤：(a) 对患有细菌性关节炎的动物施用测试药剂；(b) 评价至少一个下述参数：(i) 杀菌程度，(ii) 坏死组织的形成，(iii) 炎性细胞的活化，(iv) 感染（例如细菌性关节炎）的细胞因子表达；(c) 将在步骤 (b) 中所选择的参数与对照值进行比较；(d) 筛选出所选参数优于对照值的任何测试药剂，作为用于促进抗感染宿主防御的药剂。

[0033] 在一些实施方案中，所述动物选自野生型动物和缺乏内源性纤维蛋白溶酶原表达的转基因动物。

[0034] 在一些实施方案中，本发明涉及诊断正在发生的感染的方法，其包括确定纤维蛋白溶酶原的诊断性存在情况。

[0035] 在一些实施方案中，本发明涉及用于测定患者样品中纤维蛋白溶酶原以确定正在发生的感染和 / 或正在进行的治疗的效果的试剂盒，其中所述样品来自体液、血清、排泄物（如尿或粪便、呼出的空气等），该试剂盒包括纤维蛋白溶酶原的测定物和收集、保存和 / 或检验患者样品的手段。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明在耳中的研究结果表明，纤维蛋白溶酶原在针对自发性发生慢性中耳炎的保护中发挥重要作用。本研究结果还提示将纤维蛋白溶酶原用于某些类型中耳炎的临床治疗。因此，这些发现提示，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分作为新的促炎症因子在任何感染性疾病的预防和治疗中发挥作用。具体地，纤维蛋白溶酶原激活途径组分的促炎症作用包括激活炎性细胞、杀死细菌、去除坏死组织以及增强细胞因子的表达和促进正确的组织重建。这一结论的得出是基于对针对所有感染性病原体的宿主整体防御机制的认识、对由金黄色葡萄球菌（我们的研究中使用的主要细菌菌种）引起的广泛且多样的感染性疾病的认识，以及对本专利申请中涉及的各种感染模型（包括感染性关节炎、烧伤诱发的感染、切口诱发的感染和中耳炎）的认识。

[0038] 目前感染性疾病造成的死亡大约占世界人口死亡的三分之一，超过所有癌症形式的总和。许多类型的病原体在人类中引发疾病。最常见的是病毒和细菌。其他感染性病原体还有真核生物（从单细胞的真菌和原生动物到诸如寄生虫等大型复杂的多细胞动物）。

每种病原体以不同方式引发疾病，这使得我们难以认识到感染的基本生物学状况。然而，所有病原体都能够以促进病原体复制和传播的方式与宿主细胞相互作用，但是这些宿主－病原体相互作用是多种多样的。病原体往往通过粘附或侵入上皮表面（例如直接与环境接触的皮肤表面）而定殖于宿主。胞内病原体（包括所有病毒以及许多细菌和原生动物）在宿主细胞内复制，他们通过多种机制中的一种侵入所述细胞。病毒主要依靠受体介导的胞吞作用进入宿主细胞，而细菌利用细胞粘附和吞噬途径。原生动物采用独特的入侵策略，通常需要大量的代谢消耗。一旦进入细胞内，胞内病原体便寻找有利于其复制的小生境，常常改变宿主细胞的膜运输并利用细胞骨架在细胞内移动。除了改变个体宿主细胞的行为以外，病原体经常以有利于传播至新宿主的方式改变宿主生物的行为。病原体进化迅速，因此，新的感染性疾病频繁出现，同时已有的疾病获得新的途径来逃避人类在治疗、预防和消除方面的努力。

[0039] 此外，随着对感染性疾病治疗手段（例如疫苗和抗生素）的巨大进步，病原体也通过以下途径产生了抗药性：1）产生破坏药物的酶；2）改变药物的分子靶标，以使其不再对药物敏感；或 3）防止药物接近靶标。因此，抗药性病原体的问题日益严重。

[0040] 尽管病原体产生了各种入侵人类的方式，但是宿主感染防御机制的模式却很有限。宿主的防御机制包括适应性免疫系统和先天免疫系统。适应性免疫系统能够记住以前遇到的特定病原体，并在其再次攻击时借助于先天免疫系统而摧毁它们，但先天免疫系统并不是像适应性免疫系统那样对特定病原体具有特异性。因此，先天免疫系统是对抗入侵病原体的第一道防线，它也是启动特异性的适应性免疫应答所必需的。

[0041] 先天免疫应答依靠机体自身的能力来识别在未感染宿主中不存在的病原体保守特征。这些特征包括如细菌的细胞壁肽聚糖和鞭毛、革兰氏阴性菌的脂多糖（LPS）和革兰氏阳性菌的磷壁酸、真菌细胞壁中的酵母聚糖、葡聚糖和几丁质，以及大多数病毒的双链 RNA。这些病原体中特异性分子中的许多能够被炎性细胞上的 Toll 样受体蛋白识别。在脊椎动物中，微生物表面分子还能够激活补体，补体是一组血液蛋白质，它们能够共同发挥作用，以破坏微生物的膜结构、将微生物靶向巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬作用，以及产生炎性应答。吞噬细胞使用降解酶、抗微生物肽和活性氧物质的组合来杀死入侵的微生物。炎性细胞还通过分泌的或内在的酶来降解由于感染而形成的坏死组织。此外，他们还释放能够引发炎性应答的信号分子，并开始汇集适应性免疫系统的力量。巨噬细胞通过死亡／濒死细胞、Toll 样受体和防御素来识别被病毒感染的细胞。这些巨噬细胞通过分泌炎性细胞因子、在吞噬溶酶体中水解病毒蛋白而进一步应答，并在附近的淋巴结和脾脏呈递病毒蛋白，以活化更多的炎性细胞。补体系统还可以识别病毒，激活炎性细胞以杀死该病毒，并进一步诱导适应性免疫系统以产生抗体。

[0042] 如上所述，在先天免疫系统中，炎性细胞（中性粒细胞和巨噬细胞）在针对所有感染类型（从病毒和细菌、单细胞的真菌和原生动物到大型复杂的多细胞动物（如寄生虫））的宿主防御中发挥核心作用。炎性细胞直接或通过多种细胞表面受体（例如 Toll 样受体和补体受体）来主动搜寻、吞入和摧毁病原体。如果病原体太大（例如大型寄生虫），则一组巨噬细胞和中性粒细胞会聚集在入侵者周围。活化的巨噬细胞还招募额外的吞噬细胞到感染部位。炎性细胞还分泌多种信号分子来介导和增强炎性应答。在针对感染性病原体的 B 细胞介导的适应性免疫应答中，新产生的抗体通过其 Fab 片段结合到病原体的抗原，并通

过其Fc片段结合炎性细胞（主要是巨噬细胞）上的表面受体(FcR)，因此，炎性细胞通过抗体与病原体连接，并进一步杀死病原体。

[0043] 根据已公开的发现，施用纤维蛋白溶酶原及其衍生物在针对如金黄色葡萄球菌引起的细菌性关节炎、开放性创伤感染和中耳炎的保护中发挥多种作用，这是通过激活炎性细胞、杀死细菌、去除坏死组织、增强细胞因子的表达和促进正常组织重建来实现的。所有这些影响都是炎性细胞针对所有感染类型发挥强大功能的不同方面。我们已通过一个合理的假说来解释我们所有的数据。在该假说中，关键的一点是，纤维蛋白溶酶原加强炎性细胞的活性，从而介导诸如杀死细菌、清除坏死组织、增强细胞因子的表达和促进正常组织重建的过程。如上所述，炎性细胞（中性粒细胞和巨噬细胞）在针对所有感染类型（从病毒和细菌、单细胞真菌和原生动物到大型复杂的多细胞动物（如寄生虫））的宿主防御中发挥核心作用。因此，本发明报道的发现支持如下结论：纤维蛋白溶酶原及其衍生物是针对所有感染性疾病和坏死的宿主防御中的新候选药物。

[0044] 给出了本发明的实施例，以从不同的角度并在不同的模型中证实纤维蛋白溶酶原激活系统的强抗感染作用。实施例1证明，在诱发细菌性关节炎后，与$plg^{+/+}$小鼠相比，$plg^{-/-}$小鼠具有严重得多的组织损伤和更严重的慢性炎症。这些$plg^{-/-}$小鼠的细菌杀伤也受损（实施例3），并具有低水平的IL-10表达（实施例9），但在$plg^{-/-}$小鼠中巨噬细胞和中性粒细胞向感染关节的浸润并没有明显减弱（实施例4）。抗生素治疗杀死细菌并减轻炎症，但并不减少$plg^{-/-}$小鼠中坏死组织的形成（实施例2）。然而，向$plg^{-/-}$小鼠全身或局部补充人纤维蛋白溶酶原(hPlg)恢复了针对金黄色葡萄球菌所诱发细菌性关节炎的正常宿主防御（实施例5和6），并且使受到感染的膝关节中IL-6蛋白表达增加（实施例8）。向$plg^{+/+}$小鼠局部补充人纤维蛋白溶酶原增强了针对金黄色葡萄球菌感染的宿主防御（实施例7），这强烈提示纤维蛋白溶酶原是优于抗生素的优秀抗感染药剂，并可有效地应用于正常的野生型动物。还使用$uPA^{-/-}$小鼠进一步证实了纤维蛋白溶酶原激活系统在宿主感染防御和组织重建中的重要性（实施例10）。实施例10表明，激活纤维蛋白溶酶原的因子也可作为治疗剂，因为纤维蛋白溶酶原在缺少激活剂的情况下似乎不那么有效。此外，在另一种细菌性关节炎模型（静脉注射细菌，实施例11和12）和另外两个开放性创伤感染模型（切口损伤（实施例13）和烫伤烧伤创面（实施例14））中利用$plg^{-/-}$小鼠进一步证实了纤维蛋白溶酶原在宿主抗感染防御中的重要作用。对自发发生中耳炎的研究结果表明，研究的所有$plg^{-/-}$小鼠都发生了耳朵感染，而所有的$plg^{+/+}$小鼠均未受感染（实施例17）。从耳组织中回收细菌的结果表明，仅在6只$plg^{+/+}$小鼠中的1只中发现携带有一种类型的细菌，而6只$plg^{-/-}$小鼠中的5只中鉴定出4种不同类型的细菌（实施例15和16）。总而言之，这些实施例从多个抗感染方面表征了纤维蛋白溶酶原的多重作用，并强烈地支持下述结论：纤维蛋白溶酶原及其衍生物是针对所有感染性疾病的宿主防御中的候选药物。

[0045] 由于本发明的纤维蛋白溶酶原化合物及方法提供了针对感染或坏死病症的炎性应答，因此本发明的化合物和方法可以提供针对所有感染性疾病（特别是细菌感染性疾病和坏死）的防御。这些感染病症包括感染性疾病和常常观察到组织感染的其他疾病，例如在感染防御、慢性溃疡和糖尿病溃疡期间。这些坏死不仅存在于本文所研究的疾病模型中，还存在于其他可诱发组织坏死的疾病类型中，如无血管股骨头的坏死、乳头坏死、髓骨坏死、肾皮质坏死、急性肾小管坏死、急性视网膜坏死、急性肾小管坏死、心肌梗死、胰腺坏死、

缺血性结肠炎和坏死性筋膜炎。造成坏死的原因有许多，包括损伤、感染、癌症、梗塞形成、毒液螫入、创伤愈合缓慢和不愈合、糖尿病和炎症。此外，已经发现，纤维蛋白溶酶原缺陷型动物中重度炎症、组织破坏、坏死和细菌生长均长期持续，从而提供了新的模型用于研究细菌感染和组织坏死，以及鉴定和评价用于增强细菌感染和组织坏死的药物及治疗方法的筛选方法。

[0046] 因此，在第一个方面中，本发明涉及化合物用于生产预防、避免和 / 或治疗感染性疾病的药物组合物的用途，该化合物是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分，或者是能够直接激活纤维蛋白溶酶原或通过激活纤维蛋白溶酶原激活途径上游组分而间接激活纤维蛋白溶酶原的化合物。

[0047] 在一个优选的实施方案中，所述纤维蛋白溶酶原激活途径的组分选自纤维蛋白溶酶原、重组人纤维蛋白溶酶、Lys- 纤维蛋白溶酶原、Glu- 纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、含有纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶的一个或多个 kringle 结构域和蛋白酶结构域的纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶变体及类似物、小纤维蛋白溶酶原 (mini-plasminogen)、小纤维蛋白溶酶 (mini-plasmin)、纤维蛋白溶酶原激活剂、tPA 和 uPA。

[0048] 在另外一个优选的实施方案中，能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物选自链激酶、沙芦普酶、阿替普酶、瑞替普酶、替奈普酶、阿尼普酶、孟替普酶、拉诺替普酶、帕米普酶、葡激酶以及纤维蛋白溶酶原激活途径组分的重组形式和变体。

[0049] 一般来说，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物可通过下列途径施用 :全身、局部、表面、静脉内、肌内、皮下、吸入、椎管内、局部注射、关节内注射或直肠。在一个优选的实施方案中，选用表面施用和 / 或局部注射。

[0050] 此外，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物可与合适的多肽载体（如白蛋白或明胶等）和 / 或一种或多种稳定剂组合施用，所述稳定剂例如为去污剂、环糊精、糖、二甲亚砜、甘油、乙二醇、丙二醇、抗氧化剂、金属螯合剂、酶抑制剂等。这些添加剂可用于以多种方式提高产品的稳定性，包括尽可能地减少吸附 / 吸收、减少聚集、提高溶解度、减少氧化和减少降解。对给定的蛋白设计合适载体的方法是本领域所公知的。

[0051] 此外，举例来说，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物可以以下剂量施用 :0.0001 至约 1 克，优选地 0.005 毫克至约 100 毫克，更优选约 0.05 到约 50 毫克。以毫克计的剂量与感染面积的平方厘米数相关（即毫克 / 平方厘米感染面积）。

[0052] 此外，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物的施用可以至少重复一次，优选至少每天重复。

[0053] 在本发明和权利要求的范围内，受试者可以是任何哺乳动物，特别是人类。

[0054] 此外，在另一个优选的实施方案中，所述感染性疾病是细菌感染性疾病。

[0055] 特别地，所述细菌性感染疾病选自中耳炎、细菌性关节炎、牙龈炎、牙周炎、结膜炎、角膜炎、创伤感染、手术创伤感染、阴道感染 / 损伤、坏死、诸如肺炎的感染、由烧伤和 / 或感染造成的呼吸器官损伤和糖尿病患者中感染的慢性腿溃疡、全身性感染、由于静脉或合并静脉 / 动脉不足而导致的感染或者感染性关节炎等、感染导致的关节组织损伤后的继发感染。特别地，如所附实施例所示，本发明能有效地治疗中耳炎、细菌性关节炎、烧伤相关

感染和切口相关感染。

[0056] 金黄色葡萄球菌是最常与细菌性关节炎有关的微生物，它能够导致滑液炎症、软骨和骨骼破坏，并最终造成关节变形。

[0057] 细菌性关节炎是人类中一种快速发展的并具高度破坏性的关节疾病。包括炎性疾病（如类风湿关节炎）在内的所有破坏性关节疾病都与细菌性关节炎发病率的提高相关。某些形式的治疗（如关节移植和免疫抑制治疗）已显示导致细菌性关节炎发病频率提高。在非淋菌细菌性关节炎的病例中，金黄色葡萄球菌作为致病病原体的情况约占 60％。在风湿性疾病的患者中，这个数值甚至更高，接近于 75％。细菌性关节炎的实验模型之前已被人们使用。在大多数情况下，将细菌注入到关节内部。尽管使用较新的抗生素，但关节内金黄色葡萄球菌感染的发病率和死亡率仍然很高。金黄色葡萄球菌多抗生素抗性发病率的提高是一个重要的公共健康问题。因此，非常需要一种可显著提高宿主防御的新的强效药剂。

[0058] 中耳炎是除感冒以外最常见的儿童疾病。与中耳炎相关的最重要的致病因素是上呼吸道的细菌或病毒感染。中耳炎一般是良性的，并且是自限性疾病，但尽管如此，抗生素处方率仍然很高。事实上，缺乏抗生素具有治疗中耳炎作用的证据，目前，外科干预是治疗复发性急性中耳炎 (AOM) 以及慢性中耳炎或渗出性中耳炎 (OME) 的首选疗法。

[0059] 众所周知，受伤后患者的正常皮肤菌群（例如，金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌 (Streptococcus pyogenes)）会立即定殖。特别是在 20 世纪 50 年代初引入青霉素 G 使化脓性链球菌（造成患者热损伤感染的病因）得以有效清除之后，金黄色葡萄球菌成为创伤感染的主要病原体。因此，金黄色葡萄球菌是开放性创伤的感染中最常见的细菌物种。切口和烧伤是临床实践中最常见的创伤类型。类似于细菌性关节炎的情况，由于细菌抗药性的问题越来越严重，非常需要一种可显著提高宿主防御能力的新的强效药剂。

[0060] 基本上，本发明对治疗所有感染性疾病（包括细菌、病毒和真菌感染引起的疾病）都是有效的。

[0061] 基本上，因为本发明的纤维蛋白溶酶原化合物和方法提供针对感染、感染性疾病或坏死病症的炎性应答，所以本发明的化合物和方法可对所有感染性疾病（特别是由细菌、病毒和真菌感染引起的感染性疾病）提供有效的治疗。

[0062] 可引起感染性疾病或症状而且可以根据本发明进行治疗的细菌和真菌病原体包括但不限于下列革兰阴性菌和革兰氏阳性菌、细菌科和真菌：放线菌（例如，诺卡氏菌 Norcardia）、不动杆菌、隐球菌、曲霉菌、芽孢杆菌科（例如，苏云金芽孢杆菌 Bacillus anthrasis）、类杆菌（例如，脆弱类杆菌）、芽生菌病、百日咳、包柔氏螺旋体（例如，伯氏疏螺旋体 / 莱姆病螺旋体 Borrelia burgdorferi）、布氏杆菌病、念珠菌 (candidia)、弯曲杆菌，衣原体，梭状芽孢杆菌（例如，肉毒杆菌、难辨梭状芽孢杆菌、产气荚膜梭菌，破伤风梭菌）、Coccidioides（粗球霉菌 (Coccidioides immitis)）、棒状杆菌属（例如，白喉杆菌）、隐球菌、Dermatocycoses（真菌性皮肤病 Dermatomycoses）、大肠杆菌（如肠产毒性大肠杆菌和肠出血性大肠杆菌）、肠杆菌（例如，产气肠杆菌）、肠杆菌科（克雷伯氏菌、沙门氏菌（如伤寒杆菌、肠炎沙门氏菌、伤寒杆菌）、沙雷氏菌、耶尔森氏菌、志贺氏菌）、丹毒丝菌属、嗜血杆菌（例如，B 型流感嗜血杆菌）、螺杆菌、军团菌（例如，嗜肺军团菌）、钩端螺旋体、李斯特氏菌（例如，单核细胞增多性李斯特菌）、支原体、分枝杆菌（例如，麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌）、弧菌（例如，霍乱弧菌）、奈瑟氏菌科（例如，淋病奈瑟氏菌、

脑膜炎奈瑟氏菌）、Pasteurellacea（巴斯德菌科 (Pasteurellaceae)）、变形杆菌、假单孢菌（例如，绿脓杆菌）、立克次氏体科、螺旋体（例如，梅毒螺旋体、钩端螺旋体、包柔氏螺旋体）、志贺氏菌属、葡萄球菌属（例如，金黄色葡萄球菌）、Meningiococcus（脑膜炎球菌 (meningococcus)），肺炎球菌和链球菌（例如，肺炎链球菌和 A、B 和 C 类链球菌属）和解脲支原体 (Ureaplasmas)。

[0063] 这些细菌、寄生虫和真菌科可引起感染性疾病或症状，其包括但不限于：脓毒症（例如，菌血症、出血性败血症和真菌血症）、中枢神经系统细菌性感染（例如，莱姆神经包柔氏螺旋体疾病 (Lyme neuroborreliosis)、细菌性脑膜炎和脑炎、脑弓形虫病和神经梅毒）、细菌性眼部感染（例如，细菌性结膜炎、感染性结膜炎、感染性角膜炎、眼结核和葡萄膜炎）、细菌性耳部感染（例如，中耳炎、外耳炎）、性传播疾病（例如，衣原体感染、淋病和梅毒）、感染性皮肤炎（例如，蜂窝组织炎、皮肤真菌病和细菌性皮肤病（例如，放线菌、血管瘤病、臁疮、丹毒、金黄色葡萄球菌皮肤感染、皮肤梅毒和皮肤结核））、细菌性阴道感染、呼吸道感染（例如，百日咳、肺炎（例如，肺炎球菌肺炎、金黄色葡萄球菌肺炎和肺炎支原体肺炎））、泌尿道感染（例如菌尿）、创伤感染（例如，外科手术创伤感染、慢性皮肤溃疡感染、坏死和开放创伤感染）、细菌性关节炎、感染性骨科疾病（例如，骨炎、骨髓炎、骨膜炎、脊柱炎和关节结核）、心血管疾病（例如，细菌性心内膜炎、心血管梅毒、心血管结核）、牙周病疾病（例如，牙龈炎和牙周炎）、艾滋病相关的机会性感染、盆腔感染、感染性妊娠并发症，以及其他可按照本发明治疗的疾病。关于本发明可能有效治疗的感染性疾病的更详细清单，请参看网页 http://www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/quicklinks.htm，或本领域报道传染性疾病的其他有关综述性杂志（见参考文献列表）。

[0064] 因为纤维蛋白溶酶原激活途径和本发明的化合物以类似于细菌性感染和坏死病症的方式提供针对病毒感染的炎性应答，所以本发明所述组合物和方法提供了针对以下列出的病毒感染和病症的有用防御。

[0065] 可引起感染性疾病或症状而且可以使用本发明治疗的病毒病原体包括但不限于虫媒病毒感染（例如，蓝舌病、登革热、虫媒病毒性脑炎、白蛉热、裂谷热、蜱传播疾病和黄热病）、病毒性细支气管炎、病毒性中枢神经系统疾病（例如，脑炎、病毒性脑膜炎、脊髓炎、小儿麻痹症和伪狂犬病）、DNA 病毒感染（例如，腺病毒科感染、非洲猪瘟病、圆环病毒科感染、嗜肝 DNA 病毒科感染、疱疹病毒科感染（包括但不限于，单纯疱疹、带状疱疹、巨细胞病毒感染、乳头状瘤病毒感染、细小病毒科感染、多瘤病毒感染和痘病毒感染）、病毒性脑炎（例如，虫媒病毒性脑炎、单纯疱疹病毒性脑炎和水痘带状疱疹性脑炎）、病毒性眼部感染（例如，病毒结膜炎、巨细胞病毒性视网膜炎、眼部带状疱疹和疱疹性角膜炎）、病毒性肝炎（例如，甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎和戊型肝炎）、机会性感染（例如艾滋病相关的机会性感染）、病毒性肺炎、RNA 病毒感染（例如，砂粒病毒科感染、星状病毒科感染、双 RNA 病毒科感染、布尼亚病毒科感染（包括但不限于汉坦病毒感染）、杯状病毒科感染、虫媒病毒性脑炎、黄病毒科感染、病毒性出血热、单分子负链 RNA 病毒目 (Mononegavirales) 感染（包括但不限于弹状病毒科感染，如狂犬病）、副粘病毒科感染（例如麻疹病毒感染，包括但不限于麻疹）、肺炎病毒感染（包括但不限于呼吸合胞病毒感染）、腮腺炎病毒属感染（包括但不限于流行性腮腺炎）、套病毒目 (Nidovirales) 感染（包括但不限于冠状病毒感染，例如严重急性呼吸系统综合症）、正粘病毒科感染（例如流感）、小 RNA 病毒科的感

染（如肠病毒感染）、呼肠孤病毒科感染（包括但不限于轮状病毒感染）、逆转录病毒感染（包括但不限于慢病毒感染和披膜病毒科感染）、病毒性传染疾病、病毒性皮肤疾病（例如，感染性红斑、幼儿急疹、单纯疱疹、感染性软疣和疣）、慢病毒疾病（例如，艾滋病、渐进多灶性白质脑病和亚急性硬化性全脑炎）、肿瘤病毒感染（例如，EB 病毒感染、马立克氏病、乳头状瘤病毒感染和病毒血症）。

[0066] 在另一实施方案中，所述组合物包括两种或两种以上化合物的组合，所述化合物是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或是能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物。

[0067] 在另一实施方案中，所述组合物包含至少一种抗生素。

[0068] 所述抗生素为例如四环素类、酰胺醇类、β－内酰胺类、青霉素类、磺胺类、大环内酯类、林可酰胺类、链阳性菌素类、链霉素类、喹诺酮类和甲硝唑类，以及任何适当的抗菌剂、杀霉菌剂或杀真菌剂。

[0069] 此外，在另一实施方案中，所述预防、避免和／或治疗感染性疾病包括诱导针对感染性病原体的免疫应答。

[0070] 在第二个方面中，本发明涉及预防、避免和／或治疗感染性疾病的方法，其包括向需要此治疗的受试者施用包含有效量化合物的药物组合物，所述化合物是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或是能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物。

[0071] 在另一个方面中，本发明涉及预防、避免和／或治疗感染性疾病的药物组合物，该药物组合物包含有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物，以及可药用载体。

[0072] 在另一个方面中，本发明涉及用于预防、避免和／或治疗感染性疾病的药盒，其包括分装在不同容器中的有效量的纤维蛋白溶酶原激活途径组分或能够激活纤维蛋白溶酶原的化合物以及至少一种抗生素、抗病毒剂或抗霉菌剂。

[0073] 在另一个方面中，本发明涉及鉴定可用于促进抗感染宿主防御的药剂的方法，所述方法包括如下步骤：(a) 将测试药剂施用于患有细菌性关节炎的动物；(b) 评价至少一个下述参数：(i) 杀菌程度，(ii) 坏死组织的形成，(iii) 炎性细胞的活化，(iv) 感染（如细菌性关节炎）的细胞因子表达；例如，可通过荧光或放射性同位素标记的生物标记、基于体液或组织匀浆的微生物学空斑实验、FACS 分析、ELISA、组织学检查和／或细胞毒试验来评价细菌性关节炎（对于杀死细菌效果的检测，可以简单地从组织／器官中回收细菌；对于坏死组织形成，可以对组织尸检进行定量；对于炎性细胞的活化，可由免疫组化、ELISA、不同炎性细胞标记的 western 印迹来确定；对于细胞因子的表达，可使用检测细胞因子水平的试剂盒。所有这些方法均包括在可使用的本公开内容的实施例部分中）；(c) 将在步骤 (b) 中所选择的参数与对照进行比较，其中纤维蛋白溶酶原可用作阳性对照，未处理组作为阴性对照；(d) 选择出所选参数优于对照值的任何测试药剂，作为可用于促进针对宿主的感染防御的药剂。

[0074] 在一个优选的实施方案中，测试的模式动物选自多种野生型动物和缺乏内源性纤维蛋白溶酶原表达的转基因动物。

[0075] 在另一个方面中，本发明涉及诊断正在发生的感染的方法，其包括确定纤维蛋白溶酶原的诊断性存在情况。

[0076] 在另一个方面中，本发明涉及用于测定患者样品中纤维蛋白溶酶原以确定正在发

生的感染和/或正在进行治疗的效果的试剂盒，其中所述样品来自体液、血清、排泄物（如尿或粪便、呼出的空气等），该试剂盒包括测定纤维蛋白溶酶原的测定物和收集、保存和/或检验患者样品的手段。

[0077] 因此，本发明涉及改善宿主感染防御的方法，其包括施用包含活性剂的药物组合物，所述活性剂是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分，或是激活纤维蛋白溶酶原的化合物。优选地，所述活性剂选自纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原或者它们的类似物。最优选的活性成分是纤维蛋白溶酶原。该活性成分可以通过本领域已知的任何途径施用。优选但非限制性的施用途径包括表面施用和局部注射。如果可能的话，该活性剂也可存在于施用至感染部位的创伤敷料中，所述活性剂从创伤敷料中转移到感染部位。该活性剂也可加入用于清洁感染部位的冲洗液（如滴眼液和漱口水等）中。

[0078] 本发明还提供在感染宿主的防御发生延迟或受损的情况下启动宿主感染防御的方法，包括施用活性成分（纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原）。在一个特定的实施方案中，本发明所述方法可用于在纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原局部或全身水平低的情况下改善感染防御。上述情况可以是先天的和/或获得性的。

[0079] 纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原全身缺陷的先天性情况的实例包括但不限于导致纤维蛋白溶酶原不足 (dysplasminogenias) 的纤维蛋白溶酶原 (PLG) 基因 (GenBank 参考序列登记号：NM_000301，GeneID：5340；本文的氨基酸残基编号是依据 GenBank accession No：NP_000292 所定义的人类成熟肽）的突变，例如 ALA601THR、VAL355PHE、SER572PRO 及 GLY732ARG，或 I 型纤维蛋白溶酶原缺乏中的突变，例如 ARG216HIS、TRP597TER、GLU460TER、LYS212DEL 和 LYS19GLU。当存在先天性纤维蛋白溶酶原缺乏的情况时，优选施用纤维蛋白溶酶原作为药物。

[0080] 获得性纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原全身和/或局部缺乏的例子可能是由于生理状态的改变，如怀孕、年老、压力、肥胖和温度变化。多种疾病状态、手术、放射与饮食也可触发导致纤维蛋白溶解状态受损的某些机制。一些药物（包括抗癌剂、口服避孕药、细胞因子）以及血液成分也可产生暂时性纤维蛋白溶解状态受损，这使患者易感于血栓并发症。纤维蛋白溶解状态受损患者群体的鉴定是预防血栓并发症的重要步骤，血栓并发症可能导致诸如心肌梗死和血栓性中风等严重事件。目前，功能性方法和免疫学方法均可用于快速诊断纤维蛋白溶解缺陷。因此，对由于纤维蛋白溶解缺陷而有血栓并发症风险的患者进行评估显得十分重要。

[0081] 在另一实施方案中，本发明提供了在人类或非人类受试者中治疗感染和加强宿主抗感染防御的方法，其通过施用化合物或药物来实现，所述化合物或药物是纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原激活剂或增强纤维蛋白溶酶的蛋白裂解活性的化合物。

[0082] 此外，本发明提供了改善针对细菌性关节炎和/或中耳炎的抗感染防御的方法，其包括施用包含活性成分的组合物，所述活性成分是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或是能激活纤维蛋白溶酶原的化合物。在一个优选的实施方案中，活性成分是纤维蛋白溶酶原，并通过局部应用来施用所述组合物。

[0083] 此外，本发明提供了一种通过施用组合物来减少或防止坏死形成的方法，其包括局部或全身施用包含化合物的组合物，所述化合物是纤维蛋白溶酶原激活途径的组分或是能激活纤维蛋白溶酶原的化合物。所述组合物可以是凝胶、洗液、膏剂 (balm)、贴剂、绷带或

创伤敷料的一部分。或者，所述组合物也可全身施用。在一个实施方案中，本发明的方法可与整形外科手术结合，以减少感染、溃疡和坏死的发生和形成。

[0084] 在另一实施方案中，本发明提供了通过施用化合物或药物而在纤维蛋白溶酶－纤维蛋白溶酶原系统活性有缺陷的患者中治疗感染和增强抗感染防御的方法，所述化合物或药物是纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原激活剂或增强纤维蛋白溶酶蛋白裂解活性的化合物。

[0085] 本发明还提供了鉴定可用于在动物模型中改善抗感染防御的化合物的方法。根据本发明的方法，在纤维蛋白溶酶原缺陷型动物中引发感染，并将测试化合物通过预定的途径施用于所述动物。接着将纤维蛋白溶酶原缺陷型动物中的抗感染防御与对照值（例如野生型动物的抗感染防御）进行比较，以评估测试化合物是否提高了抗感染防御水平或减少了坏死形成。用于该方法的一种优选动物模型是缺乏一个或两个纤维蛋白溶酶原等位基因的基因敲除小鼠或转基因小鼠。在一个实施方案中，感染膝关节，在加入或不加入纤维蛋白溶酶原的条件下研究该关节的宿主防御。在另一实施方案中，研究了自发发生的中耳炎。使用耳显微镜对 TM 的总体特征进行了仔细检查和记录，在加入或不加入纤维蛋白溶酶原的条件下研究 TM 的宿主防御。在另外一个实施方案中，感染开放性创伤（例如烫伤和切口），在加入或不加入纤维蛋白溶酶原的条件下研究受伤部位的宿主抗感染防御。

[0086] 此外，本发明提供了一种在体内筛选可用于改善宿主抗感染防御的药物的方法，包括表达纤维蛋白溶酶原的体外或体内模型。所述体内模型包括野生型或纤维蛋白溶酶原缺陷型的动物。在施用一种或多种待筛选药物后，将检测纤维蛋白溶酶原和／或纤维蛋白溶酶的活性或水平。在一个优选的实施方案中，所述动物模型是膝关节的细菌性关节炎模型，可在施用药物之前、同时或之后诱导所述细菌性关节炎。在另一个实施方案中，所述动物模型是开放性创伤感染模型，可在施用治疗之前、同时或之后诱导所述开放创伤感染。

[0087] 本发明还提供一种通过施用药物组合物来改善抗感染性疾病的宿主防御的方法，该药物组合物包含纤维蛋白溶酶原活性的活化剂或者模拟纤维蛋白溶酶原表达的化合物。优选地，将纤维蛋白溶酶原局部施用，以在感染部位获得高浓度。在另一实施方案中，所述组合物包括模拟纤维蛋白溶酶原／纤维蛋白溶酶之活性的化合物以及具有类似活性的分子。在另一实施方案中，所述组合物包含能够上调纤维蛋白溶酶原表达的药物。

[0088] 此外，本发明提供了一种治疗慢性感染和坏死的方案，其通过使用能够上调纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶原激活剂表达的药物来实现。

[0089] 此外，本发明涉及选自纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶的片段、纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、纤维蛋白溶酶原类似物、纤维蛋白溶酶类似物、纤维蛋白溶酶原激活途径组分的类似物或者能激活纤维蛋白溶酶原的化合物用于生产药物的用途，所述药物用于促进针对细菌性关节炎和中耳炎和开放性创伤感染的宿主防御，和／或清除坏死组织，和／或提高感染防御，和／或减少在创伤愈合过程中坏死组织形成。

附图说明

[0090] 本发明的上述特征和许多其他优势在参考附图与下文详细描述后将更加容易理解。

[0091] 图 1A-H. 取自 $plg^{+/+}$ 小鼠（左）和 $plg^{-/-}$ 小鼠（右）中关节炎膝关节的代表性切片的组织学情况。向 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠关节内注射 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌。(A、C、E)：分别为来自关节炎诱导后第 7 天、第 14 天和第 28 天的 $plg^{+/+}$ 小鼠的关节炎膝关节。(B、D、F)：分别为来自关节炎诱导后第 7 天、第 14 天和第 28 天的 $plg^{-/-}$ 小鼠的关节炎膝关节。(G)：来自抗生素治疗后 7 天的 $plg^{+/+}$ 小鼠的关节炎膝关节。(H)：来自抗生素治疗后 7 天的 $plg^{-/-}$ 小鼠的关节炎膝关节。在关节腔中可观察到坏死组织（箭头）。滑膜 (Sm)。

[0092] 图 2. 每个时间点上感染关节中坏死组织的定量。根据“材料和方法”中描述的方法，在组织学方面对感染关节中坏死组织的量进行评分。在注射 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌之后的第 7 天、第 14 天及第 28 天，对 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠进行比较。结果表示为平均值 ± 标准差。$^{**}=p<0.01$，student t 检验。

[0093] 图 3. 关节内注射 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌的 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠的感染膝关节中中性粒细胞和巨噬细胞的数目。A、在注射细菌后的第 1 天、第 7 天及第 14 天，对浸润中性粒细胞的数目进行比较。柱形图代表 5 只小鼠的平均值。B、在注射细菌后的第 1 天、第 7 天及第 14 天，对浸润巨噬细胞数目进行比较。柱形图代表 5 只小鼠的平均值。以误差线显示标准差。

[0094] 图 4A-F. 补充纤维蛋白溶酶原后 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠整个膝关节的组织学分析。A、B：分别为细菌注射后第 7 天和 14 天来自 $plg^{+/+}$ 小鼠的对照关节炎膝关节。C、D：分别为细菌注射后的第 7 天和 14 天来自 $plg^{-/-}$ 小鼠的对照关节炎膝关节（注射 PBS）。E：在注射细菌后从第 0 天到第 7 天补充人纤维蛋白溶酶原 (hPlg) 的 $plg^{-/-}$ 关节炎膝关节。F：在注射细菌后从第 7 天到第 14 天补充人纤维蛋白溶酶原的 $plg^{-/-}$ 患关节膝关节。

[0095] 图 5A-C. 滑膜中 IL-6 的蛋白表达水平。来自 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠的膝关节代表性切片的免疫染色。A：在细菌注射后第 7 天用 PBS 处理的 $plg^{+/+}$ 小鼠对照关节炎膝关节。B：在细菌注射后第 7 天用 PBS 处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠的对照关节炎膝关节。C：在细菌注射后从第 0 天到第 7 天补充人纤维蛋白溶酶原 (hPlg) 的 $plg^{-/-}$ 关节炎膝关节。粉红色显示的是滑膜中的 IL-6（箭头）。

[0096] 图 6A-B. 感染及未感染的膝关节中 IL-10 蛋白表达水平的 Western 印迹分析。A、裂解物中 IL-10 的水平。泳道 1：$plg^{-/-}$ 小鼠未感染膝关节的裂解物；泳道 2：$plg^{+/+}$ 小鼠未感染膝关节的裂解物；泳道 3：细菌注射后第 3 天的 $plg^{-/-}$ 关节炎膝关节的裂解物；泳道 4：细菌注射后第 3 天的 $plg^{+/+}$ 关节炎膝关节裂解物；泳道 5：细菌注射后第 7 天的 $plg^{-/-}$ 关节炎膝关节裂解物；泳道 6：细菌注射后第 7 天的 $plg^{+/+}$ 关节炎膝关节裂解物；B、A 中每个泳道相应裂解物中的 β-肌动蛋白水平，作为对照。实验至少重复 3 次，在此显示的是代表性结果。

[0097] 图 7A-F. 来自野生型小鼠和 plg 缺陷型小鼠的用甲苯胺蓝染色 (A 和 B) 的代表性中耳切片的形态学情况，以及纤维蛋白 (C 和 D) 及角蛋白 (E 和 F) 的免疫组织化学染色。A、野生型小鼠的中耳。未检测到中耳腔 (middler ear cavity，MEC) 渗出物。B、plg 缺陷型小鼠的中耳。MEC 中存在中耳炎。C 和 D、分别为野生型小鼠和 plg 缺陷型小鼠的中耳，通过免疫组织化学染色对纤维蛋白（原）进行分析。E 和 F、分别为野生型小鼠和 plg 缺陷型小鼠的中耳，通过免疫组织化学染色对角蛋白进行分析。O、听小骨。线段长度代表 50 微米。

[0098] 图 8A-H. 野生型和 plg 缺陷型小鼠中耳中 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞

的免疫组织化学染色。通过 T 细胞 (A 和 B)、B 细胞 (C 和 D)、巨噬细胞 (E 和 F) 和中性粒细胞 (G 和 H) 的免疫组织化学染色来分析野生型对照 (A，C，E，G) 和代表性 plg 缺陷型小鼠 (B，D，F，H) 的中耳。O、听小骨。线段长度代表 50 微米。

[0099] 图 9. 在膝关节接种 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 后经过不同的局部和全身治疗的 $plg^{-/-}$ 和 $plg^{+/+}$ 小鼠膝关节中的细菌数。

[0100] 图 10. 在膝关节接种金黄色葡萄球菌 3 天后局部注射了 plg（实心方块）或 PBS（空心方块）的 $plg^{+/+}$ 小鼠膝关节中的细菌数。注：局部注射 plg 的野生型小鼠中的细菌数与局部注射 PBS 的野生型小鼠相比显著降低了 5 倍。

[0101] 图 11. uPA 缺陷型和野生型小鼠膝关节中的细菌数。注：在第 0 天接种金黄色葡萄球菌后，野生型小鼠体内的细菌数迅速衰减，而在 uPA 缺陷型小鼠中，细菌数在整个试验期间始终维持在 2.0×10^5CFU 以上。

[0102] 图 12A-F. 在关节内注射 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌后第 7 天 (A，D)、第 14 天 (B，E) 和第 28 天 (C，F) 时 uPA 缺陷型 ($uPA^{-/-}$，左）与野生型 ($uPA^{+/+}$，右）小鼠的关节炎膝关节代表性切片的组织学情况。注：在整个实验期间，$uPA^{-/-}$ 小鼠存在多得多的水肿、组织破损和坏死组织形成，而 $uPA^{+/+}$ 小鼠的炎症只是在关节炎诱导后的第 7 天暂时性地出现，并在其后减少。

[0103] 图 13. 比较 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠的体重变化。注射 1×10^6CFU 的细菌后体重变化的时间过程。从第 1 天至第 21 天每 24 小时检查一次小鼠的体重。

[0104] 图 14. 脓毒性关节炎的严重程度。使用“材料和方法”中所述关节炎指标评价脓毒性关节炎严重程度的结果。通过静脉注射 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 诱导关节炎。$Plg^{+/+}$ 小鼠 (n = 15) 和 $plg^{-/-}$ 小鼠 (n = 16)。对于每一个时间点，显示平均值 ± 标准差。统计学显著性检验使用 Mann-whitney u- 检验（缺陷型小鼠与对照组小鼠）来进行。$^*P < 0.05$ 认为是显著的。

[0105] 图 15A-H. 纤维蛋白溶酶原缺陷加重了脓毒性关节炎的组织学特征。掌关节切片使用番红 -O 染色。$plg^{+/+}$（左）和 $plg^{-/-}$（右）小鼠中静脉注射 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌后关节炎掌关节代表性切片的形态学情况。关节炎发病后第 1 天 (A)、第 3 天 (B)、第 7 天 (C) 和第 14 天 (D) 的野生型小鼠关节炎掌关节。关节炎发病后第 1 天 (E)、第 3 天 (F)、第 7 天 (G) 和第 14 天 (H) 的 $plg^{-/-}$ 小鼠关节炎掌关节。

[0106] 图 16A-B. 受到感染的踝关节中的坏死组织。坏死是基于组织学观察。一些鉴定为坏死的样品通过 TUNEL 染色进一步验证。

[0107] 图 17A-B 感染的踝关节中纤维蛋白的沉积。关节炎膝关节中纤维蛋白的免疫组化检测。使用兔抗小鼠纤维蛋白（原）抗体染色石蜡包埋组织切片。褐色表示阳性。关节炎发病后第 14 天时 $plg^{+/+}$ 小鼠（左）和 $plg^{-/-}$ 小鼠（右）的关节炎膝关节。$plg^{-/-}$ 和 $plg^{+/+}$ 小鼠感染关节中相似的纤维蛋白沉积。

[0108] 图 18 在背部皮肤切口局部接种 1×10^7CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 诱导创伤后用 plg 或 PBS 局部处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠创伤组织的细菌数。

[0109] 图 19A-B 在背部皮肤切口局部接种 1×10^7CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 诱导创伤后用 plg 或 PBS 局部处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠的代表性外观。

[0110] 图 20 在烫伤皮肤局部接种 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 诱导烧伤后用

plg 或 PBS 局部处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠创伤组织的细菌数量。

[0111] 定义

[0112] 本说明书中使用的术语一般具有其在本领域中、在本发明的上下文中以及在每个术语所使用的特定语境中的一般含义。某些术语在下文讨论或在说明书的其他部分讨论，以便在描述本发明所述组合物和方法以及如何制造和使用它们时为从业人员提供更多的指导。

[0113] “包括以下的化合物：纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原激活途径的组分、纤维蛋白溶酶原类似物（例如，微纤维蛋白溶酶）、纤维蛋白溶酶类似物、纤维蛋白溶酶原激活途径组分的类似物、纤维蛋白溶酶原激活剂 (PA)”是指能够分别直接或间接提供纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶的作用的化合物。

[0114] “纤维蛋白溶酶原激活途径的组分”是指纤维蛋白溶酶原、Lys- 纤维蛋白溶酶原、Glu- 纤维蛋白溶酶原；包含一个或多个纤维蛋白溶酶原结构域（例如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域）的纤维蛋白溶酶原的变体和类似物，例如小纤维蛋白溶酶原 (mini-plasminogen)；纤维蛋白溶酶以及含有至少一个或多个纤维蛋白溶酶结构域（例如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域）的纤维蛋白溶酶变体和类似物，例如小纤维蛋白溶酶 (mini-plasmin) 和 δ- 纤维蛋白溶酶 (delta-plasmin)；能够最终激活（例如通过导致纤维蛋白溶酶原形成或活化的级联事件来激活）纤维蛋白溶酶原的纤维蛋白溶酶原激活剂，例如 tPA 和 uPA 以及包含一个或多个 tPA 或 uPA 的结构域（如一个或多个 kringle 结构域和蛋白水解结构域）的 tPA 或 uPA 变体和类似物。纤维蛋白溶酶原、纤维蛋白溶酶、tPA 和 uPA 的变体包括所有天然存在的人类遗传变体以及这些蛋白质的其他哺乳动物形式，以及通过保守性氨基酸替换获得的这些蛋白质的突变变体。纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶的“类似物”是分别提供与纤维蛋白溶酶原或纤维蛋白溶酶基本相似的作用的化合物，这通过基于酶谱法 (enzymography)、ELISA（酶联免疫吸附测定）和 FACS（荧光激活细胞分选，FACS) 来衡量。还有一种衡量转换的纤维蛋白溶酶活性水平的方法，如下述文献之前所述：Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C, Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P. 和 Ny, T.(1999).Ovulation inplasminogen-deficient mice.Endocrinology 140,5030-5035)。纤维蛋白溶酶原激活途径组分的“类似物”是提供与纤维蛋白溶酶原激活途径组分基本相似的作用的化合物，这通过该类似物激活的纤维蛋白溶酶活性水平来衡量。

[0115] “坏死”是指机体中的组织死亡。当没有足够的血液供应到组织时就会发生这种情况，无论是由损伤、辐射还是化学物质引起。坏死是不可逆的。造成坏死的原因有许多，包括损伤、感染、癌症、梗死形成、毒液螫入、长期创伤、溃疡和炎症。

[0116] “表面的”和“表面施用”是指非全身性地局部施用活性成分。因此，表面施用可以指将活性成分施用于目的部位的外表面。

[0117] “局部注射”是指非全身性地将活性成分局部施用至目的部位的组织 / 附近区域中。

[0118] “关节腔内注射”是指将活性成分局部施用至两块相连骨之间的关节间隙。

[0119] “感染性疾病”和“感染”是指外来物种对宿主生物体的有害定殖。在感染中，造成感染的生物设法利用宿主的资源进行繁殖（通常是在损害宿主的情况下）。造成感染的生

物或病原体干扰宿主的正常功能，并可能导致长期创伤、坏疽、失去感染的肢体，甚至死亡。宿主对感染的应答是炎症。通俗地说，病原体通常被认为是微观生物，其中最常见的是病毒和细菌。其他感染性病原体有类病毒和真核生物，从单细胞的真菌和原生动物到大型复杂的多细胞生物，如寄生虫。

[0120] 蛋白质或化合物的“活性”是指该蛋白质或化合物对特定反应的影响，可通过测量其影响、调节、参与或促进该反应的能力来确定。一般来说，蛋白质或其他化合物的活性是可以测量的。例如，对于酶（例如纤维蛋白溶酶、PA 和 MMP）和调节因子的情况，酶活性可表示为该反应的产物产生速率，例如表示为每单位时间和酶所产生的产物量（如浓度或重量）。对于调节因子 (PAI-1 或 uPA) 的情况，活性可以指该调节因子抑制或促进、提高或降低、上调或下调反应速度或该反应中产物形成量的能力。

[0121] “创伤”是由外界因素所造成的器官或组织（包括上皮组织、结缔组织和肌肉组织）的断裂。创伤的例子包括但不限于淤伤、擦伤、剪伤、割伤、刺伤和烧伤。一种特殊的创伤类型是由整形手术过程造成的创伤。

[0122] “中耳炎”是指耳朵的炎症状态。中耳炎（包括急性中耳炎 (AOM) 和渗出性中耳炎 (OME)）是除了感冒以外最常见的儿童疾病 (5)。与中耳炎相关的最重要的病因是由细菌或病毒引发的上呼吸道感染。中耳炎的中耳渗出液的生化组成反映了中耳粘膜上的炎性改变。该液体是一种渗出液、腺体的分泌产物以及炎性细胞和细菌的产物的混合物。

[0123] 受试者的“治疗”或“治疗”受试者的疾病或病症在本文中意为减少或减轻该疾病或病症的临床症状，例如创伤愈合受损或减缓。

[0124] “增强”创伤愈合是指加快该创伤愈合的速度。此外，“增强”创伤愈合还指减少在愈合期间或之后疤痕组织的形成。

[0125] “受试者”在本文中包括人和非人动物。非人动物包括但不限于实验动物（如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠等）、家养动物（如狗和猫）和农场动物（如绵羊、山羊、猪、马和牛）。本发明的非人动物可以是哺乳动物或非哺乳动物、脊椎动物或无脊椎动物。

[0126] 测定中的“对照”、“对照值”、“参考值”是用于检测例如以下改变的值：皮肤创伤的愈合，或鼓膜穿孔的愈合，或本文描述的任何其他测定。例如，当研究鼓膜穿孔的愈合时，药剂的抑制 / 促进作用可以通过将创伤或穿孔愈合与对照相比来进行评价。对照或参考可以是例如预定的参考值，或者可通过实验来测定。例如，在这样的测定中，对照或参考可以是在未接触药物或活性剂治疗的动物中相似创伤或穿孔的愈合。

[0127] “有疾病或病症的风险”、“易患”或“易感于”疾病或病症的受试者是指该个体感染或发生所述疾病或病症的风险高于群体的平均水平。

[0128] 化合物的“缺乏”是指该化合物的量、水平或浓度显著低于对照值。例如，在纤维蛋白溶酶原缺陷型动物中，纤维蛋白溶酶原的体液及组织水平显著低于野生型动物中的水平。

[0129] 本文所用的“约”或“大致”是指给定值或范围的百分之五十以内，优选地在百分之二十以内，更优选百分之五以内。

[0130] 与另一数值相比有“显著差异”的值可以指这两个值之间存在统计学显著差异。任何本领域熟知的适当统计学方法皆可用于评估差异是否显著。“统计学显著”的差异是指以至少 90％的置信区间、更优选 95％的置信区间来确定显著性。

[0131] 分子生物学定义

[0132] 根据本发明，可以利用本领域常规的分子生物学、微生物学以及DNA重组技术。这些技术在文献中已有充分的解释。参阅如Sambrook等(Molecular Cloning-A Laboratory Manual,Cold Spring HarborLaboratory Press,1989)；Glover(DNA Cloning:A Practical Approach，Volumes I and II,1985)；Hames和Higgins(Nucleic AcidHybridization，1985)；Hames和Higgins(Transcription And Translation,1984)；Freshney(Animal Cell Culture,1986)；Perbal(A PracticalGuide To Molecular Cloning,1984)；以及Ausubel等(Current Protocolsin Molecular Biology，John Wiley & Sons，Inc.,1994)。

[0133] 如果在本文出现，则以下术语具有如下的定义。

[0134] “蛋白质”或“多肽”（这两个术语在本文可互换使用）包含一条或多条化学构建单元链，所述化学构建单元被称为氨基酸，它们通过被称为肽键的化学键连接在一起。

[0135] “酶”指能够以或多或少地特异性催化或促进一个或多个化学或生化反应的任何物质，其优选地全部或大部分由蛋白质组成。术语“酶”也可以指催化性多核苷酸（例如，RNA或DNA)。“测试”酶是对其进行测试以确定它是否有酶特性的物质。

[0136] “天然”或“野生型”的蛋白质、酶、多核苷酸、基因或细胞是指天然存在的蛋白质、酶、多核苷酸、基因或细胞。

[0137] “突变”、“改变”、“变体”或“修饰”的蛋白质、酶、多核苷酸、基因或细胞是指这样的蛋白质、酶、多核苷酸、基因或细胞：它们已被改变或衍生，或以某种方式与其母体蛋白质、酶、多核苷酸、基因或细胞相比存在不同或发生改变。基因中的改变包括但不限于启动子区或影响转录的其他区域的改变，所述改变可导致蛋白质表达水平的改变。突变或修饰的蛋白或酶通常（但不一定）由突变的多核苷酸或基因表达。

[0138] “突变”或“改变”是指产生突变的蛋白质、多核苷酸、基因或细胞的任何过程或机制。这包括蛋白质、多核苷酸或基因序列发生改变所引起的任何突变；任何由突变产生的蛋白质、多核苷酸或基因序列；由突变多核苷酸或基因序列表达的任何表达产物（如蛋白质)，以及细胞中由这样的突变引起的任何可检测的改变。

[0139] “功能保守性变体”是这样的蛋白质或酶，其中给定的氨基酸残基发生了改变，而不改变该蛋白质或酶的整体结构和功能，包括但不限于具有相似特性（例如，酸性，碱性，疏水性等）氨基酸的替换，即“保守氨基酸替换”。具有相似特性的氨基酸是本领域所公知的。举例来说，精氨酸、组氨酸和赖氨酸是亲水的碱性氨基酸，并可以互换。同样，异亮氨酸（一种疏水性氨基酸）可被亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸替换。除了指明是保守氨基酸以外的其他氨基酸在不同的蛋白质或酶中可以不同，使两种功能类似的蛋白之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可以不同，并可以是例如70％至99％，该百分比是由比对程序（如由聚类方法(Cluster Method)，其中的相似性是基于MEGALIGN算法）确定的。“功能保守性变体”还包括通过BLAST或FASTA算法测定具有至少60％、优选至少75％、更优选至少在85％、甚至更优选至少90％氨基酸同一性的多肽或酶，它们与相比较的天然或母体蛋白质或酶具有相同或高度相似的特性或功能。

[0140] 纤维蛋白溶酶原激活系统(Plasminogen-Activation System,PA系统)

[0141] 纤维蛋白溶酶是PA系统的关键组分。它是一种广谱蛋白酶，能够降解多种ECM组分，包括纤维蛋白、明胶、纤连蛋白、层粘连蛋白和蛋白聚糖(6)。此外，纤维蛋白溶酶能将

一些前基质金属蛋白酶 (pro-MMP) 转换为活化的 MMP。因此，已经提出，纤维蛋白溶酶可能是胞外蛋白质水解的重要上游调节因子。纤维蛋白溶酶由纤维蛋白溶酶原通过两种生理 PA(tPA 和 uPA) 中任何一种的蛋白质水解切割而生成。由于纤维蛋白溶酶原以相对较高的水平存在于血浆和其他体液中，因此 PA 系统的调控主要在 PA 的合成及活性水平上进行。PA 系统组分的合成受到不同因素的严密调控，如激素、生长因子和细胞因子。此外，还存在纤维蛋白溶酶和 PA 的特异性生理抑制因子。主要的纤维蛋白溶酶抑制因子是 α_2- 抗纤维蛋白溶酶 (α_2-antiplasmin)(7)。PA 的活性受 PAI-1 和 PAI-2 的调节，PAI-1 抑制 uPA 和 tPA，而 PAI-2 主要抑制 uPA。某些细胞也有 uPA 的特异性细胞表面受体 (uPAR)，其可将蛋白水解活性引导至细胞表面。

[0142] 纤维蛋白溶酶原是一种单链糖蛋白，由 791 个氨基酸组成 (人成熟肽，GenBank 登记号 :NP 000292)，分子量约为 92kDa(8 ;9)。纤维蛋白溶酶原主要在肝中合成，在多数细胞外液中都很丰富。在血浆中，纤维蛋白溶酶原的浓度约为 2μM。因此，纤维蛋白溶酶原在组织和体液中构成了蛋白质水解活性的巨大潜在来源。

[0143] 纤维蛋白溶酶原以两种分子形式存在 :Glu- 纤维蛋白溶酶原和 Lys- 纤维蛋白溶酶原。天然的分泌和未切割形式在氨基端 (N 端) 有一个谷氨酸，因此命名为 Glu- 纤维蛋白溶酶原。然而，在纤维蛋白溶酶存在下，Glu- 纤维蛋白溶酶原在 Lys^{76}-Lys^{77} 之间被切割，成为 Lys- 纤维蛋白溶酶原。与 Glu- 纤维蛋白溶酶原相比，Lys- 纤维蛋白溶酶原具有更高的纤维蛋白亲和力，并且以更高的速率被 PA 激活。这两种形式的纤维蛋白溶酶原可被 uPA 或 tPA 切开 Arg^{560}-Val^{561} 的肽键，从而形成由二硫键相连的双链蛋白酶 -- 纤维蛋白溶酶。纤维蛋白溶酶原的氨基端部分包含五个同源的三环结构，称为 kringles，其羧基端部分包含蛋白酶结构域。一些 kringles 结构域含有赖氨酸结合位点，其介导纤维蛋白溶酶原与纤维蛋白及其抑制因子 α_2-AP 之间的特异性相互作用。一个新的有趣的发现是，一种 38kDa 的纤维蛋白溶酶原片段 (由 kringles 1-4 组成) 是一种强力的血管生成抑制剂。这个片段被称为制管张素，可通过多种 MMP 的蛋白水解切割从纤维蛋白溶酶原蛋白中产生。

[0144] 纤维蛋白溶酶的主要底物是纤维蛋白，纤维蛋白的溶解是防止病理性血凝块形成的关键 (10)。纤维蛋白溶酶对几种其他 ECM 组分 (包括层粘连蛋白、纤连蛋白和明胶) 也具有底物特异性，表明纤维蛋白溶酶在 ECM 重建中也发挥重要作用。通过其将前基质金属蛋白酶 (pro-MMP) 转化成活化基质金属蛋白酶 (MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9) 的能力，纤维蛋白溶酶也可间接降解其他 ECM 组分。因此，已经提出，纤维蛋白溶酶可能是细胞外蛋白质水解的一种重要的上游调节因子。

[0145] 用于研究感染的细菌性关节炎模型

[0146] 金黄色葡萄球菌是最经常与细菌性关节炎相关的微生物，细菌性关节炎导致滑液炎症、软骨和骨的破坏，并最终造成关节变形 (11)。多种动物物种 (包括哺乳动物、鸟类和爬行动物) 中已观察到发生了自发性金黄色葡萄球菌关节炎，因此它们都是诱导该疾病的潜在模型。考虑到葡萄球菌通过身体传播到关节的途径 (这一个重要的性状)，已经清楚地表明，人类中多数细菌关节感染是通过血液传播的。因此，递送活细菌以构建感染动物模型的最佳方式是通过静脉注射 (i.v.)。另一方面，关节内接种细菌的途径绕过了发病的早期阶段，因此提供了一个更明确的细菌性关节炎模型。因此，在本研究中，主要以关节内注射细菌的方式来制作模型，以便更好地研究局部的细菌生长、组织破坏、坏死组织形成和炎

症。然而，我们还通过静脉注射金黄色葡萄球菌的方式进行了一系列细菌性关节炎的研究。两种模型中所得数据都显示了相当的结果，而且都支持如下结论：在针对金黄色葡萄球菌所诱发细菌性关节炎的宿主防御中，纤维蛋白溶酶原/纤维蛋白溶酶是必不可少的。

[0147] 众所周知，受伤后患者的正常皮肤菌群（例如，金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌）会立即定殖。特别是在20世纪50年代初引入青霉素G而使化脓性链球菌（造成热损伤患者感染的病因）得以有效清除后，金黄色葡萄球菌成为创伤感染的主要致病因素。因此，金黄色葡萄球菌是开放性创伤感染中最常见的细菌物种之一。切口和烧伤是临床实践中最常见的创伤类型。因此，在本专利申请中，我们所使用的开放性创伤感染模型是烧伤和切口（实践中最常见的创伤类型）上的金黄色葡萄球菌感染（创伤感染的主要致病因素）。因此，我们认为，从这两个开放性创伤感染模型获得的数据对将相关知识应用于临床情况的可行性给出了非常重要的参考。

[0148] 实施例

[0149] 本发明将通过以下的实施例进一步说明。然而，这些实施例只是为了对本发明进行说明，而不是限制本发明的范围和含义。事实上，在阅读本说明书后，本发明的许多修改和变更对本领域技术人员来说是很明显的，并且并不偏离本发明的构思和范围。

[0150] 实施例1

[0151] 在金黄色葡萄球菌诱发的细菌性关节炎期间$plg^{-/-}$小鼠中持续性的炎症和组织破坏

[0152] 本实施例表明，与野生型对照同系鼠相比，纤维蛋白溶酶原缺陷型小鼠发生持续的炎症和组织破坏。在金黄色葡萄球菌所诱发的细菌性关节炎中，$plg^{-/-}$小鼠与$plg^{+/+}$小鼠相比明显存在更严重的组织病理变化。

[0153] 方法

[0154] 小鼠。将混合遗传背景(129×C57BL/6)的纤维蛋白溶酶原杂合($plg^{+/-}$)小鼠杂交，产生$plg^{+/+}$、$plg^{+/-}$和$plg^{-/-}$小鼠。将8-12周龄的雄性$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠用于本实验(Ploplis VA,Carmeliet P,Vazirzadeh S,Van Vlaenderen I,Moons L,Plow EF,Collen D:Effects of disruption ofthe plasminogen gene on thrombosis,growth,and health in mice.Circulation 1995,92:2585-2593)。

[0155] 诱发细菌性关节炎。本研究中使用的菌株是金黄色葡萄球菌Phillips(S.aureus Phillips)(由**Höök**博士惠赠，Department ofrheumatology and Clinical immunology,Gothenburg University,Sweden)。通过在小鼠右膝关节局部注射含有1×10^6集落形成单位(CFU)金黄色葡萄球菌Phillips株的10微升无菌PBS来诱发关节炎。作为对照，左膝关节仅注射10微升无菌PBS。将小鼠在接种细菌后的不同时间点处死，并收集样品以评估疾病的严重程度。乌默奥大学地区伦理委员会批准了所有的实验方案。

[0156] 组织学分析。在细菌注射后的第7天、第14天和第28天，将小鼠处死并收集整个膝关节的样品用于组织学分析。简言之，先用4%甲醛固定膝关节，石蜡包埋，其后制备8微米切片。将含有组织切片的载玻片用番红-O(Safranin-O)染色以进行组织学分析。每个实验组包括至少10个膝关节。

[0157] 感染关节中坏死组织的定量。用安装在Leica DM LB显微镜(Leica,Wetzlar,Germany)上的Leica DC300F数码相机拍摄膝关节组织切片的照片。为了确定感染关节中

坏死组织的量，在 50 倍放大下，将整幅膝关节组织切片照片分为 50×40 的网格。将网格中每个含有坏死组织的方块计数为一次“命中 (hit)”。选取每个关节计数三个独立随机选择的切片，每个时间点使用来自相同基因型的不同小鼠的 5 个关节。计算出“命中”的平均值并在此显示。

[0158] 结果

[0159] 为了研究纤维蛋白溶酶对细菌性关节炎的临床结局的影响，在膝关节对小鼠注射 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌 Philips 株。此后，在不同时间点处死小鼠，并解剖膝关节。对关节内注射后第 7 天、第 14 天和第 28 天的膝关节样本进行的显微镜检查表明，$plg^{+/+}$ 小鼠也有类似水平的膝关节轻微肿胀。然而，在 $plg^{-/-}$ 小鼠中，注射细菌的膝关节显著变大。在第 28 天，注射细菌的膝关节的体积在整个试验期间增大关节腔充满了化脓性物质，而且滑膜表面强烈凸起。

[0160] 在第 7 天、第 14 天和第 28 天制备注射细菌的 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠膝关节，以用于组织学分析。如图 1 所示，在所有观察时间点，$plg^{-/-}$ 小鼠的关节炎都比 $plg^{+/+}$ 小鼠明显更严重。第 7 天，在 $plg^{+/+}$ 小鼠中，炎性细胞浸润了关节腔，滑膜比正常情况更厚，软骨表面已经退化（图 1A，Sm）。在第 14 天，在被侵蚀骨骼的附近观察到炎性细胞（图 1C，箭头）。然而，在第 28 天，炎性细胞数目下降，受损的软骨和骨骼的组织修复已经开始（图 1E）。这种疾病发展模式与 $plg^{-/-}$ 小鼠完全不同。第 7 天，在 $plg^{-/-}$ 小鼠中，大量的炎性细胞已浸润关节腔，骨的一些部位发生侵蚀，并观察到坏死组织（图 1B）。在第 14 天，滑膜变得比第 7 天更厚，而且坏死面积增加。软骨退化和骨质侵蚀比第 7 天更为严重（图 1D）。在第 28 天，整个膝关节几乎完全退化，只留下坏死组织和一小部分软骨（图 1F）。对切片样品的半定量研究表明，$plg^{-/-}$ 小鼠在整个疾病发展过程中的组织坏死水平都比 $plg^{+/+}$ 小鼠明显更高（图 2）。这些数据表明，在金黄色葡萄球菌诱发细菌性关节炎的过程中，与 $plg^{+/+}$ 小鼠相比，$plg^{-/-}$ 小鼠中有更严重的组织病理变化。

[0161] 实施例 2

[0162] $plg^{-/-}$ 小鼠中的抗生素处理杀死细菌并减少炎症，但并不减少坏死组织的形成

[0163] 方法

[0164] 以与实施例 1 相似的方式进行本实验，只是对其中部分动物施用抗生素。

[0165] 抗生素处理。将抗生素邻氯青霉素 (AstraZeneca, **Södertälje,** Sweden) 溶于无菌 PBS 中，从注射细菌后第 7 天开始，以每 12 小时 0.5 毫克 / 克体重的剂量注射到小鼠腹膜内。在注射细菌后第 14 天处死小鼠。

[0166] 结果

[0167] 还研究了抗生素处理对 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠中疾病发展的影响。在第 0 天对小鼠注射细菌，然后在细菌注射后第 7 天到第 14 天每天两次用邻氯青霉素进行处理。在第 14 天感染关节的细菌回收表明，邻氯青霉素处理后 $plg^{-/-}$ 小鼠体内的细菌被完全杀死（数据未显示）。病理组织学分析表明，抗生素处理后 $plg^{+/+}$ 小鼠的炎症与未经邻氯青霉素处理的小鼠相比（图 1C）已经消退（图 1G）。邻氯青霉素处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠的炎症水平仍然高于接受同样处理的 $plg^{+/+}$ 小鼠。软骨和骨骼已大部分被修复（图 1H）。值得注意的是，在滑膜上仍有小面积的坏死组织存在（箭头，图 1H）。这些数据表明，在 $plg^{-/-}$ 小鼠腹膜内注射邻氯青霉素能够成功地清除膝关节内的细菌，减少组织破坏并恢复组织修复过程。然而，在抗

生素治疗后，$plg^{-/-}$ 小鼠的膝关节中仍存在大面积的坏死组织。

[0168] 实施例 3

[0169] 纤维蛋白溶酶原缺陷妨碍细菌清除

[0170] 方法

[0171] 除了细菌计数以外，以与实施例 1 相似的方式进行本实验。

[0172] 细菌计数。在细菌注射后的第 2、3、4、5、7、14 和 28 天，取出膝关节并在 1 毫升无菌 PBS 中匀浆。连续稀释后，将匀浆溶液涂在 LB 琼脂平板上，并在 37℃孵育过夜。对存活的菌落进行计数，以评估每份匀浆中的细菌数。

[0173] 结果

[0174] 我们接着研究了在诱导细菌性关节炎后 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠膝关节中的细菌生长。如表 1 所示，在 $plg^{+/+}$ 小鼠中，感染膝关节中金黄色葡萄球菌的数量在细菌注射的第 2 天之后立即下降。在第 7 天，有 50％的 $plg^{+/+}$ 小鼠 (7/14) 中检测不到金黄色葡萄球菌。在第 14 天，有 80％的 $plg^{+/+}$ 小鼠 (8/10) 中检测不到金黄色葡萄球菌，并且在另外两只小鼠中测得的金黄色葡萄球菌数量小于 1×10^{3}CFU。在第 28 天，所有 $plg^{+/+}$ 小鼠中细菌都被完全清除。与此截然相反的是，所有的 $plg^{-/-}$ 小鼠都在整个实验期间在注射的膝关节中含有金黄色葡萄球菌（表 1）。在第 28 天，$plg^{-/-}$ 小鼠中已接种膝关节中金黄色葡萄球菌的数量是第 0 天的 27 倍。这些数据显示，$plg^{-/-}$ 小鼠膝关节的细菌清除受损，这表明纤维蛋白溶酶在宿主抗感染防御中参与了杀菌过程。

[0175] 表 1、关节内注射 1×10^{6}CFU 的金黄色葡萄球菌 Philips 株后 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠膝关节的细菌回收

[0176]

细菌注射后天数	平均细菌数 *		发病率**	
	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
2	$(7.6\pm3.7)\times10^{5}$	$(2.9\pm1.5)\times10^{6}$	5/5	3/3
3	$(3.7\pm0.9)\times10^{5}$	$(2.3\pm0.5)\times10^{6}$	5/5	5/5
4	$(3.0\pm0.6)\times10^{5}$	$(1.7\pm0.3)\times10^{6}$	5/5	5/5
5	$(2.2\pm0.5)\times10^{5}$	$(1.2\pm0.2)\times10^{6}$	5/5	5/5
7	$(8.6\pm1.3)\times10^{3}$	$(1.9\pm0.3)\times10^{6}$	7/14	11/11
14	$(4.0\pm2.0)\times10^{2}$	$(3.7\pm0.6)\times10^{6}$	2/10	10/10
28	检测不到	$(2.7\pm0.6)\times10^{7}$	0/10	10/10

[0177] *具有可检测水平活细菌的膝关节中的平均细菌计数。

[0178] **数据代表具有可检测水平活细菌的膝关节数除以每组中检测的膝关节总数。

[0179] 实施例 4

[0180] 巨噬细胞和中性粒细胞向感染关节的浸润在 $plg^{-/-}$ 小鼠中没有明显受损。

[0181] 方法

[0182] 除了免疫组织化学分析和炎性细胞计数以外，以与实施例 1 相似的方式进行本实验。

[0183] 免疫组织化学分析。将石蜡包埋切片(8微米)脱蜡,再水化,使用0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性10分钟。与5%兔血清在室温下孵育20分钟后,将切片分别与抗巨噬细胞(克隆F4/80,MCAP497,Serotec,英国)或中性粒细胞(MCA771G,Serotec,英国)的大鼠抗小鼠一抗在4℃孵育过夜。此后,为了对巨噬细胞和中性粒细胞进行免疫染色,洗涤切片,再用羊抗大鼠IgG(SC-2019,SantaCruz,加利福尼亚州)抗体在室温下孵育1个小时。

[0184] 炎性细胞计数。从400倍放大下5个视野的区域中产生每个切片的总细胞数。对每张切片一式二份地进行整个计数程序,然后计算出每张切片的平均值。每个时间点的样品使用来自相同基因型不同小鼠的5个关节,每个关节对三个独立的切片进行计数。

[0185] 结果

[0186] 进行免疫组织化学分析,以研究 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠中中性粒细胞和巨噬细胞向感染膝关节的浸润。炎性细胞浸润通过存在于切片上的阳性染色细胞数来量化。本研究中在每个时间点包括每个基因型的5个关节样品,对每个关节的三个独立切片进行计数(图3A和3B)。在 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠中,在细菌注射的24小时内,都有相似数量的中性粒细胞和巨噬细胞已经浸润到感染膝关节的滑膜内。此后在第7天和第14天,在 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠中聚集的中性粒细胞和巨噬细胞的数量与第1天相比都显著增加。这些数据表明,从注射细菌后的24小时内到第14天,与 $plg^{+/+}$ 小鼠相比,$plg^{-/-}$ 小鼠中中性粒细胞和巨噬细胞对感染关节的浸润都没有受损。然而,虽然 $plg^{-/-}$ 小鼠中性粒细胞和巨噬细胞的浸润没有明显受损,但是这些细胞的正常功能(尤其是杀死细菌的能力)则严重受损。

[0187] 实施例5

[0188] 对 $plg^{-/-}$ 小鼠全身补充人纤维蛋白溶酶原(hPlg)恢复了其对金黄色葡萄球菌感染的正常宿主防御

[0189] 方法

[0190] 除了对其中一些小鼠使用纤维蛋白溶酶原以及western分析以外,与实施例1相似地进行本实验。

[0191] 对 $plg^{-/-}$ 小鼠补充人纤维蛋白溶酶原。

[0192] 对于实验方案1,通过在小鼠的两个膝关节局部接种10微升含有 1×10^{6}CFU金黄色葡萄球菌Phillips株的无菌PBS来诱发关节炎。在细菌接种6小时前,在7天中以24小时间隔向6只 $plg^{-/-}$ 小鼠中的每一只静脉注射100微升含有1毫克人纤维蛋白溶酶原(hPlg)(Biopool,乌默奥,瑞典)的无菌PBS。做为对照,在7天中以24小时间隔向6只 $plg^{+/+}$ 小鼠和6只 $plg^{-/-}$ 小鼠仅分别注射无菌PBS。在注射细菌后的第7天将小鼠处死,解剖膝关节样品,脱钙和加工以便用于组织学及免疫组织化学分析。

[0193] 对于实验方案2,关节炎诱导同实验方案1。从接种细菌后的第7天,给6只 $plg^{-/-}$ 小鼠静脉注射100微升含有1毫克hPlg的无菌PBS。其后7天中以24小时间隔注射相同量的纤维蛋白溶酶原。做为对照,在7天中以24小时的间隔向分别6只 $plg^{+/+}$ 小鼠和6只 $plg^{-/-}$ 小鼠仅注射无菌PBS。在注射细菌后的第14天将小鼠处死,解剖膝关节样品,脱钙和加工以便用于组织学分析。

[0194] 结果

[0195] 为了证实纤维蛋白溶酶在宿主抵御金黄色葡萄球菌引起的细菌性关节炎过程中

发挥作用，我们研究补充了 hPlg 的 $plg^{-/-}$ 小鼠中细菌性关节炎的发生。我们首先对注射细菌后从第 0 天至第 7 天补充 hPlg 的 6 只 $plg^{-/-}$ 小鼠进行了实验。我们接着研究了 hPlg 补充对 6 只已经发生细菌性关节炎 7 天的 $plg^{-/-}$ 小鼠的影响。如图 4A 和 4B 所示，当 $plg^{+/+}$ 小鼠接受无菌 PBS 时，在滑膜中观察到中等水平的炎症，而且骨结构相对完好。如图 4C 和 4D 所示，当对 $plg^{-/-}$ 小鼠仅注射无菌 PBS 时，在部分滑膜组织观察到了坏死组织，炎症和组织的损伤比 $plg^{+/+}$ 组小鼠严重得多。当 $plg^{-/-}$ 小鼠从第 0 天至第 7 天补充了 hPlg 以后（图 4E），组织病理学特征与仅注射 PBS 的 $plg^{+/+}$ 小鼠类似。如图 4F 所示，当 $plg^{-/-}$ 小鼠在第 7 天到第 14 天接受 hPlg 时，关节形态与仅施用 PBS 的 $plg^{-/-}$ 小鼠的相比明显更为完整，炎症水平与 $plg^{+/+}$ 对照组小鼠相当。此外，在接受 hPlg 的组中，滑膜中的坏死组织面积极小。如表 2 所示，当 $plg^{-/-}$ 小鼠在注射细菌后第 7 天开始补充 hPlg 时，杀菌能力也得以恢复。这些数据清楚地表明，纤维蛋白溶酶（原）对于关节炎膝关节中金黄色葡萄球菌的清除以及宿主抗感染防御的完整性来说是非常必要的。

[0196] 表 2、对 $plg^{-/-}$ 小鼠补充纤维蛋白溶酶原后感染膝关节中的细菌回收

[0197]

	关节中的平均细菌计数 * (CFU)		
	给予PBS的$Plg^{+/+}$小鼠	给予PBS的$Plg^{-/-}$小鼠	给予人纤维蛋白溶酶原的$Plg^{-/-}$小鼠
第0–7天	$(3.2 \pm 2.0) \times 10^3$, n = 6	$(1.3 \pm 0.12) \times 10^6$, n = 6	$(1.3 \pm 0.43) \times 10^{3}$**, n = 6
第7–14天	$(7.2 \pm 4.3) \times 10^2$, n = 6	$(2.2 \pm 0.59) \times 10^6$, n = 6	$(1.8 \pm 0.56) \times 10^{3}$**, n = 6

[0198] *含有可检测水平活细菌的膝关节中的平均细菌计数。

[0199] **$P < 0.01$。将注射人纤维蛋白溶酶原的 $plg^{-/-}$ 小鼠组与注射 PBS 的 $plg^{-/-}$ 小鼠组进行比较。

[0200] 实施例 6

[0201] 对 $plg^{-/-}$ 小鼠局部补充人纤维蛋白溶酶原 (hPlg) 恢复了其对金黄色葡萄球菌感染的正常宿主防御

[0202] 方法

[0203] 通过在小鼠的两个膝关节局部接种 10 微升含有 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBS 来诱发关节炎。在细菌接种 15 分钟后，通过在膝关节组织周围局部注射而对 6 只 $plg^{-/-}$ 小鼠的一侧膝关节补充 40 微升人纤维蛋白溶酶原（以 10 微克 / 微升溶于 PBS，Biopool，乌默奥，瑞典）。而后在 7 天中每隔 24 小时注射一次。作为局部注射的对照，6 只 $plg^{-/-}$ 小鼠在细菌接种 15 分钟后，向其膝关节周围组织局部注射 40 微升无菌 PBS，而后在 7 天中每隔 24 小时注射一次。作为野生型小鼠的对照，两只 $plg^{+/+}$ 小鼠在细菌接种 15 分钟后给予 40 微升无菌 PBS，在之后的 7 天内每隔 24 小时注射一次。作为全身注射 $plg^{-/-}$ 小鼠的对照，两只 $plg^{-/-}$ 小鼠分别在细菌接种前 1 小时静脉注射 100 微升人纤维蛋白溶酶原 (10 微克 / 微升），在之后的 7 天内每隔 24 小时注射一次。

[0204] 在细菌接种后的第 7 天处死小鼠，将膝关节取出，并在 1 毫升无菌 PBS 中匀浆。连续稀释后，将上述匀浆液涂在 LB 琼脂平板上，并在 37℃孵育过夜。对活菌落进行计数，以评

估每份匀浆中的细菌数。

[0205] 结果

[0206] 与局部注射 PBS 的小鼠相比，对接种金黄色葡萄球菌的 $plg^{-/-}$ 小鼠进行 7 天的纤维蛋白溶酶原局部注射成功而且显著地使细菌数量减少了 100 倍（表 3 和图 9）。全身注射人纤维蛋白溶酶原的 $plg^{-/-}$ 小鼠和局部注射 PBS 的 $plg^{+/+}$ 小鼠都能够成功地杀灭膝关节中的金黄色葡萄球菌。这些数据清楚地表明，局部注射人纤维蛋白溶酶能够恢复 $plg^{-/-}$ 小鼠的正常杀菌能力。

[0207] 表 3、在接种 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 株后第 3 天接受不同的局部和全身处理的 $plg^{-/-}$ 和 $plg^{+/+}$ 小鼠中的细菌数

[0208]

组别	样本数	平均细菌数（平均值 ±SD，$\times10^6$CFU）
局部注射 hPlg 的 $Plg^{-/-}$ 小鼠	6	$0.019\pm0.044^*$
局部注射 PBS 的 $Plg^{-/-}$ 小鼠	6	1.09 ± 0.55
全身注射 hPlg 的 $Plg^{-/-}$ 小鼠	2	$0.00075\pm0.0011^*$
局部注射 PBS 的 $Plg^{+/+}$ 小鼠	2	$0.00065\pm0.00092^*$

[0209] *，$P < 0.05$，与局部注射 PBS 组的 $plg^{-/-}$ 小鼠相比。

[0210] 实施例 7

[0211] 对 $plg^{+/+}$ 小鼠局部补充人纤维蛋白溶酶原增强了宿主针对金黄色葡萄球菌感染的防御

[0212] 方法

[0213] 通过在小鼠的膝关节局部接种 10 微升含有 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBS（磷酸盐缓冲液）来诱发关节炎。在细菌接种 15 分钟后，通过在膝盖皮肤下和膝关节组织周围局部注射而对 7 只 $plg^{+/+}$ 小鼠的膝关节一侧补充 50 微升人纤维蛋白溶酶原 (hPlg，以 10 微克 / 微升溶于 PBS，Biopool，乌默奥，瑞典）。而后以相同的方式从第 0 天到第 2 天每隔 24 小时补充人纤维蛋白溶酶原。作为局部注射的对照，7 只 $plg^{+/+}$ 小鼠在细菌接种 15 分钟后在膝盖皮肤下和膝关节组织周围局部仅注射 50 微升无菌 PBS，而后以相同的方式从实验期内的第 0 天到第 2 天每隔 24 小时进行同样的局部注射。

[0214] 在细菌接种后的第 3 天将小鼠处死，将膝关节取出，并在 1 毫升无菌 PBS 中匀浆。连续稀释后，将匀浆液涂在 LB 琼脂平板上，并在 37℃防御过夜。对活菌落进行计数，以评估每份匀浆中的细菌数。

[0215] 结果

[0216] 与局部注射 PBS 的对照组 $plg^{+/+}$ 小鼠相比，对 $plg^{+/+}$ 小鼠进行 3 天的人纤维蛋白溶

酶原膝关节局部注射成功而且显著地使活金黄色葡萄球菌数量减少了5倍。这些数据清楚地表明，人纤维蛋白溶酶原是有效的促炎症因子，其甚至在野生型动物中也能增强对细菌感染的宿主防御。这些数据（表4，图10）进一步表明，纤维蛋白溶酶原是可临床使用的新的候选抗感染药物。

[0217] 表4、在接种1×10^6CFU金黄色葡萄球菌Phillips株后第3天接受人纤维蛋白溶酶原局部治疗的野生型（$plg^{+/+}$）小鼠的细菌数

[0218]

组别	样本数	平均细菌数（平均值±标准差，$\times10^6$CFU）
局部注射hPlg的$plg^{+/+}$小鼠	7	0.031±0.011 *
局部注射PBS的$plg^{+/+}$小鼠	7	0.14±0.047

[0219] *，$P<0.05$，与局部注射PBS组的$plg^{+/+}$小鼠比较。

[0220] 实施例8

[0221] 向$plg^{-/-}$小鼠补充纤维蛋白溶酶原提高了感染膝关节中IL-6蛋白的表达

[0222] 方法

[0223] 除了IL-6的免疫组织化学染色以外，以与实施例5相似的方式进行本实验。

[0224] 对于IL-6免疫染色，洗涤切片并使用猪抗兔IgG抗体（P0217，DAKO，丹麦）于室温下孵育1小时。显色反应通过DAKO底物试剂盒（K3464，DakoCytomationAEC底物，美国）进行，苏木素复染切片。使用以兔血清代替一抗进行孵育的切片作为阴性对照，它们都显示为阴性。

[0225] 结果

[0226] 据报道，IL-6参与淋巴细胞的活化、生长和分化，IL-6的缺乏提高对感染的易感性。因此，我们研究了在细菌性关节炎中纤维蛋白溶酶对IL-6表达是否有任何影响。我们在对$plg^{-/-}$小鼠补充hPlg期间制备了组织切片样品，并进行免疫组织化学染色。当$plg^{-/-}$小鼠在注射细菌接受7天的无菌PBS时，其IL-6蛋白表达水平显著低于$plg^{+/+}$小鼠（图5A和5B）。如图5C所示，当$plg^{-/-}$小鼠在注射细菌后接受7天hPlg时，IL-6蛋白表达提高到与$plg^{+/+}$小鼠相似的水平。这些数据表明，在细菌性关节炎过程中，纤维蛋白溶酶参与了膝关节IL-6的表达调节。

[0227] 实施例9

[0228] $plg^{+/+}$小鼠关节中IL-10的表达水平高于$plg^{-/-}$小鼠关节

[0229] 方法

[0230] 除了western印迹分析以外，以与实施例1相似的方法进行本实验。

[0231] 免疫印迹分析

[0232] 在细菌注射后的第3天和第7天，将小鼠处死并收集整个膝关节。将关节匀浆并在NP-40缓冲液（0.5％Nonidet P-40、50mM Tris-盐酸（pH值7.4）、150mM NaCl、1mM NaF、1mM EDTA、1mM Na_3VO_4、0.25mM PMSF、5微克/毫升抑肽素（aprotinin）、1微克/毫升亮肽素（Leupeptin）、1微克/毫升胃酶抑素（pepstatin）和15％甘油）中在冰上裂解30分钟。

将裂解物调整至蛋白浓度相等，根据参考文献 (12) 所描述的方法，使用山羊抗小鼠 IL-10 抗体 (AF-417-NA，R&D systems，英国）和小鼠抗 β-肌动蛋白单克隆抗体 (Sigma-Aldrich Sweden AB，斯德哥尔摩，瑞典）进行 western 印迹分析。缀合了辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗山羊和抗小鼠二抗来自于 Biorad(Hecules，CA，美国）。

[0233] 结果

[0234] 先前的研究已证明，白细胞介素 10(IL-10) 在脓毒性关节炎动物模型中具有抗炎作用 (13)。为了研究在细菌性关节炎中纤维蛋白溶酶对 IL-10 的表达是否有任何影响，进行了蛋白质免疫印迹分析以比较 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠的 IL-10 水平。在细菌注射后第 3 天和第 7 天，裂解关节匀浆并对 IL-10 进行 western 印迹。在未感染的膝关节中，$plg^{-/-}$ 小鼠的 IL-10 的水平显著低于 $plg^{+/+}$。（图 6A，分别为泳道 1 和 2)。在第 3 天，两种基因型小鼠的 IL-10 水平都有所升高，但 $plg^{-/-}$ 小鼠的 IL-10 水平仍然明显低于 $plg^{+/+}$ 小鼠。（图 6A，泳道 3 和 4)。在第 7 天，$plg^{-/-}$ 小鼠的 IL-10 水平仍然同第 3 天的水平相同，而 $plg^{+/+}$ 小鼠的 IL-10 水平降低了（图 6A，泳道 5，泳道 6)。总的来看，这些数据表明，IL-10 与 IL-6 可能协同调节细菌性关节炎中的炎性过程，纤维蛋白溶酶参与 IL-6 和 IL-10 的表达调节。

[0235] 实施例 10

[0236] uPA 在针对金黄色葡萄球菌所诱发膝关节感染的宿主防御和组织重建中非常重要

[0237] 方法

[0238] 在第 0 天，通过向野生型和 uPA 缺陷型 ($uPA^{-/-}$) 小鼠的膝关节中局部关节腔内接种 10 微升含有 1×10^6CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBS 来诱导细菌性关节炎 (14)。在第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天处死小鼠，将膝关节取出，并在 1 毫升无菌 PBS 中匀浆。连续稀释后，将匀浆液涂在 LB 琼脂平板上，并在 37℃孵育过夜。对活菌落进行计数，以评估每份匀浆中的细菌数。

[0239] 在另一个实验中，通过向关节内局部接种 10 微升含有 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBSuPA 而对缺陷型和野生型小鼠诱导细菌性关节炎。在细菌注射后的第 7 天、第 14 天和第 28 天处死小鼠，并收集整个膝关节样品以用于组织学分析。简言之，首先将膝关节用 4％的多聚甲醛固定，石蜡包埋，然后将其制备成 8 微米切片。将载有组织切片的玻片用番红 -O 染色以用于组织学分析。在每个实验组中至少包括 10 个膝关节。

[0240] 结果

[0241] 在使用金黄色葡萄球菌对野生型和 uPA 缺陷型小鼠诱导细菌性关节炎之后，在野生型组中，平均细菌数从第 7 天到第 28 天持续减少。在第 14 天，7 只小鼠中有 4 只已将细菌彻底清除。然而，在 uPA 缺陷型组中，平均细菌数从第 0 天至第 28 天基本恒定（图 11)。虽然细菌数量在第 14 天后有所下降，但第 14 天与第 28 天相比并无显著差异。虽然实验在细菌接种后的第 28 天终止，但 uPA 缺陷型小鼠几乎没有可能在稍后的时间点杀死细菌，因为在第 14 天后膝关节就已经完全损坏。从第 14 天开始，uPA 型缺陷小鼠的膝关节积累了广泛的坏死组织。组织学检查显示，野生型小鼠在第 7 天出现了短暂的炎症并且之后炎症的水平迅速消退，然而在整个实验期间 uPA 缺陷型小鼠表现为持续的组织炎症和水肿、广泛的组织损伤和坏死组织形成（图 12)。这些数据（表 5，图 11 和 12) 清楚地表明，uPA 在针对金黄色葡萄球菌所诱发关节炎的宿主防御中十分重要，并进一步暗示，纤维蛋白溶酶原激活途径的组分在宿主抗感染防御中起着关键作用。

[0242] 表 5、在诱导金黄色葡萄球菌诱发的细菌性关节炎之后 uPA 缺陷型和野生型小鼠中的发病率和细菌数。

[0243]

	uPA-缺陷型		野生型		
天数	细菌数 (CFU)	发病率*	细菌数 (CFU)	发病率*	P值**
第 0 天	1.0×10^6	2/3	1.0×10^6	2/3	
第 7 天	$5.6 \times 10^5 \pm 1.7 \times 10^5$	6/6	$1.1 \times 10^4 \pm 7.9 \times 10^3$	6/6	0.0103
第14天	$8.8 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^5$	7/7	$7.5 \times 10^2 \pm 4.2 \times 10^2$	3/7	0.006
第21天	$3.7 \times 10^5 \pm 8.4 \times 10^4$	5/5	$6.0 \times 10^2 \pm 6.0 \times 10^2$	1/5	0.0023
第28天	$2.8 \times 10^5 \pm 4.5 \times 10^4$	5/5	$6.0 \times 10^2 \pm 6.0 \times 10^2$	1/5	0.0003

[0244] *，发病率定义为各个时间点处感染膝关节数占所有检查膝关节总数的比例。

[0245] **，P 值通过比较各个时间点 uPA 缺陷型和野生型小鼠之间所有膝关节的细菌数来计算。

[0246] 实施例 11

[0247] 在静脉注射 200 微升含有 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBS 后，$plg^{-/-}$ 小鼠中细菌性关节炎的高水平体重减轻和关节炎的严重程度

[0248] 方法

[0249] 通过静脉注射 200 微升含有 1×10^6CFU 金黄色葡萄球菌 Phillips 株的无菌 PBS 在 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠中诱发细菌性关节炎。接种后每天逐只观察小鼠。每 24 小时检查小鼠的爪，在接种后第 21 天将所有小鼠处死。将关节炎定义为存在可见的关节肿胀和 / 或掌、腕和踝的红斑。为了评价关节炎的强度，使用宏观检查方式得出每个爪子的分数 (0-5 分)，来进行临床评分（关节炎指数）。(0 ＝正常 ;1 ＝轻微肿胀或红斑 ;2 ＝轻度肿胀和红斑 ;3 ＝中度肿胀和红斑 ;4 ＝明显肿胀和红斑 ;5 ＝明显肿胀和变形）。通过每只测试动物所有 4 只爪分数之和来算出总分，所以每个小鼠个体的关节炎评分在 0 到 20 之间。从第 0 天至第 21 天每天测定小鼠的体重。

[0250] 结果

[0251] 为了评价在静脉注射诱发的细菌性关节炎模型中纤维蛋白溶酶原缺陷是否影响细菌向关节的入侵，在细菌接种后每隔 24 小时跟踪记录关节炎的发病日期和发病率（定义为轻微肿胀和红斑）(表 6)。$plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠关节炎的发病日分别是 5.0±2.2 和 4.4±2.0(P ＝ 0.5021)。此外，$plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠二者关节炎的发病率是相同的。这些结果表明，$plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠都易感于静脉注射金黄色葡萄球菌所诱发的关节炎。然而，在本项研究中我们发现了一个惊人的结果，即 38% (12/32) 的 $plg^{-/-}$ 小鼠后半身瘫痪，而只有 3.3% (1/30) 的 $plg^{+/+}$ 小鼠发生瘫痪。

[0252] 为了追踪静脉内接种金黄色葡萄球菌后小鼠的总体健康状况，在实验期内每天测量每只小鼠的体重。如图 13 所示，在感染的第一周，$plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠都表现出了明显的

体重减轻，在第7天达到最高值，分别为体重的24％和26％。在感染7天后，$plg^{+/+}$小鼠的体重已逐渐增加。与此相反，$plg^{-/-}$小鼠在整个实验期间的体重明显地持续减轻（$p < 0.05$）。

[0253] 还在静脉内接种1×10^6的金黄色葡萄球菌后对$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠中细菌性关节炎的临床发展进行3周的监测。如图14所示，$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠均发生了细菌性关节炎。在前3天，$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠之间炎症的严重程度没有差异。然而，从第7天开始，$plg^{-/-}$小鼠的炎症比$plg^{+/+}$小鼠更加严重，差异是显著的（$p < 0.05$）。在$plg^{+/+}$小鼠中，严重程度在第14天达到高峰，并随后逐步减弱。在实验结束时，28只$plg^{+/+}$小鼠中有8只从关节炎中康复。在$plg^{-/-}$小鼠中，关节炎严重程度在整个实验过程中不断提高，到实验结束时没有$plg^{-/-}$小鼠从关节炎中恢复过来。总之，这些数据清楚地表明，纤维蛋白溶酶原对细菌从血液循环系统入侵关节不是必需的，但在针对膝关节细菌感染的宿主防御以及在细菌性关节炎过程中保持健康状况是至关重要的。

[0254] 表6、在静脉注射200微升含有1×10^6CFU金黄色葡萄球菌Phillips株的无菌PBS后$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠中细菌性关节炎的主要特征比较

[0255]

	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
发病日（平均值 ±SEM）	5.0±2.2	4.4±2.0
细菌性关节炎的发病率	93％ (28/30)	93％ (30/32)
瘫痪的发病率	3.3％	37.5％
感染关节中坏死的发病率	0	100％
第21天时的体重	22.8g	16.7g

[0256] 实施例12

[0257] 在静脉注射含有1×10^6CFU金黄色葡萄球菌Phillips株的无菌PBS后，$plg^{-/-}$小鼠细菌性关节炎中更为严重的组织损伤发生和坏死组织形成

[0258] 方法

[0259] 通过静脉注射200微升含有1×10^6CFU金黄色葡萄球菌Phillips株的无菌PBS在$plg^{+/+}$和$plg^{-/-}$小鼠诱发细菌性关节炎。接种后每天逐只追踪观察。

[0260] 为了进行踝和掌的组织病理学检查，解剖踝和掌并在含有缓冲剂的4％甲醛中固定24小时。固定的组织在15％ EDTA中脱钙3周，脱水，接着包埋至石蜡中。腕关节的8微米厚切片使用番红-O染色并使用固绿／铁苏木素（iron hematoxylin）复染。

[0261] 为了进行免疫组织化学分析，将石蜡包埋切片（8微米）在乙醇和蒸馏水中脱蜡和水化。使用3％过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性10分钟。然后使用5％兔血清在室温下孵育20分钟以便用于纤维蛋白检测。然后将载片放入山羊抗小鼠fbn/fbg抗体中，室温孵育30分钟。洗涤后，覆盖兔IgG抗羊IgG抗体20分钟室温。清洗后，放入PAP，在室温孵育20分钟。使用（DAKO Substrate chromogen system AEC）试剂盒显色，洗涤后使用Mayer′ s苏木精复染。

[0262] 结果

[0263] 为了确定观察到的持续关节炎症是否与组织学变化有关，对感染的 $plg^{+/+}$ 和 $plg^{-/-}$ 小鼠的掌关节进行了病理分析。将关节用番红 -O 染色并使用固绿 / 铁苏木素复染。如图 15 所示，在 $plg^{+/+}$ 小鼠中，发病一天后，炎性应答非常轻微（图 15A）。发病 3 天后，滑膜开始增生，但软骨仍完整（图 15B）。发病 7 天后，炎性细胞已渗入关节腔（图 15C）。发病 14 天后，滑膜比第 7 天厚得多（图 15D）。在 $plg^{-/-}$ 小鼠中，如图 15E 所示，发病一天后，炎症水平也很轻微。然而，发病 3 天后，滑膜比第 1 天厚得多，并且炎性细胞开始侵入骨骼（图 15F）。发病 7 天后，炎性细胞充满了整个掌关节，一些部位的骨骼已经退化（图 15G）。发病 14 天后，大部分骨骼和软骨已完全退化（图 15H）。此外，发病 14 天后，在 $plg^{+/+}$ 小鼠中，尽管炎症的反应严重，但其严重程度较 $plg^{-/-}$ 小鼠要轻很多。组织病理学检查结果表明，$plg^{-/-}$ 小鼠显示明显更高的软骨和骨骼损伤水平，这验证了临床研究结果。总之，$plg^{+/+}$ 小鼠的关节炎的严重程度明显低于 $plg^{-/-}$ 小鼠。纤维蛋白溶酶对组织重建具有有益影响。

[0264] 为了在细胞水平研究关节炎的发生和消退，对 $plg^{-/-}$ 和 $plg^{+/+}$ 小鼠进行了坏死组织的微观分析。早在细菌接种之后的第 3 天，就在 $plg^{-/-}$ 小鼠关节中发现了坏死组织。如图 16 和图 15G、H 所示，在 $plg^{-/-}$ 小鼠中发现大面积的坏死组织。相反，在 $plg^{+/+}$ 小鼠中几乎没有发现坏死组织，即便它们患有严重的炎症。这些数据表明，plg 缺陷型小鼠不能去除坏死组织，导致组织损伤。

[0265] 根据已经确定的纤维蛋白溶酶原激活在纤维蛋白溶解中的作用，缺少纤维蛋白溶酶原导致纤维蛋白沉积的增加。我们通过纤维蛋白免疫组化分析了膝关节的纤维蛋白含量（图 17）。然而，我们发现 $plg^{+/+}$ 对照组小鼠同 $plg^{-/-}$ 小鼠相比在其肿胀的关节中存在相似程度的纤维蛋白沉积。这些数据清楚地表明，纤维蛋白沉积可能不是在 $plg^{-/-}$ 小鼠观察到更严重的细菌性关节炎的原因。

[0266] 实施例 13

[0267] 在 $plg^{-/-}$ 小鼠创伤愈合的过程中，纤维蛋白溶酶原对宿主抵御金黄色葡萄球菌诱导的感染是很重要的

[0268] 方法

[0269] 为了引起切口损伤，先用剪毛刀小心地将 $plg^{-/-}$ 小鼠背侧的毛剃除，并使用 70％乙醇洗涤。此后，沿小鼠的背侧中线切开 15 毫米长的切口。15 分钟后，将含有 1×10^{7}CFU 金黄色葡萄球菌的 10 微升 PBS 局部施加并涂布到开放性创伤上。此外，在创伤开口的两侧距离创伤开口 5 毫米处分别皮下注射 50 微升纤维蛋白溶酶原。作为对照 $plg^{-/-}$ 小鼠，向接种细菌的创伤开口处仅局部注射 50 微升 PBS。此后，从第 0 天至第 10 天每 24 小时以类似的方式注射 50 微升的纤维蛋白溶酶原（10 微克 / 微升）或 PBS。在第 11 天处死小鼠，仔细取出创伤边缘周围和组织下方的创伤样品，并在 1 毫升无菌 PBS 中匀浆。连续稀释后，将匀浆液涂在 LB 琼脂平板上，并在 37℃孵育过夜。对活菌落进行计数，以评估每份匀浆中的细菌数。

[0270] 结果

[0271] 为了研究纤维蛋白溶酶原是否能像在细菌性关节炎模型中一样在开放性创伤感染模型中发挥杀菌功能，在 $plg^{-/-}$ 小鼠产生切口损伤，并进一步局部接种 10^{7}CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 株。此后，对这些小鼠局部注射 10 天人纤维蛋白溶酶原或作为对照的

PBS。这些小鼠组织样本的细菌回收实验结果表明，与对照的PBS处理 $plg^{-/-}$ 小鼠相比，对这些小鼠进行人纤维蛋白溶酶原局部处理能够成功地使细菌的数量降低10倍（表7，图18）。这些数据清楚地表明，纤维蛋白溶酶原在针对开放性创伤所伴随感染的宿主防御（例如杀死细菌）中发挥重要作用。此外，局部注射纤维蛋白溶酶原还大大提高了感染创伤的愈合（图19）。总之，这些结果表明，纤维蛋白溶酶原在宿主对不同类型创伤的防御中是必要的，如通过针对两种类型的细菌性关节炎的宿主防御、创伤愈合和针对开放性创伤感染的宿主防御所评价的。

[0272] 表7、在切口损伤处接种 1×10^{7}CFU 金黄色葡萄球菌Phillips株后接受11天hPlg或PBS处理的 $plg^{-/-}$ 小鼠中的细菌数

[0273]

组别	样本数	每克组织中的平均细菌数（平均值 ± 标准差，$\times10^{5}$CFU/克）
局部注射hPlg的 $plg^{-/-}$ 小鼠	4	2.6±2.5*
局部注射PBS的 $plg^{-/-}$ 小鼠	2	26.8±25.2

[0274] *，$P<0.05$，与局部注射PBS的 $plg^{-/-}$ 小鼠组相比。

[0275] 实施例14

[0276] 在 $plg^{-/-}$ 小鼠的烫伤愈合过程中，纤维蛋白溶酶原对于宿主针对金黄色葡萄球菌所诱导感染的防御是很重要的

[0277] 方法

[0278] 为了诱导烫伤模型，首先通过麻醉使小鼠昏睡。此后，将要烫伤区域的毛仔细地剃光，用镊子将25克100度热金属棒垂直地自由置于要烫伤区域6秒。金属棒在沸水中预热。6秒的加热诱导了目标区域严重的热损伤。一旦目标区域被烫伤后，对小鼠背部表面进行认真擦拭以去除过多的水份。大约15分钟后，在烫伤区域的中心皮下注射30微升的 1×10^{6}CFU 的金黄色葡萄球菌。再经过15分钟后，将50微升纤维蛋白溶酶（10微克/微升）皮下注射到烫伤区域边缘的两个部位，每个部位25微升。对于对照的 $plg^{-/-}$PBS组，以与注射纤维蛋白溶酶原同样的方式注射50微升的PBS。此后从第0天至第9天，每天在烫伤区域的上下或左右注射一次，注射部位每天变换。对于 $plg^{+/+}$ 组小鼠，只将其烫伤，但不进行任何局部治疗。在实验结束时，烫伤创伤外观使用相机记录，仔细取出组织样品（烫伤区域和下方薄层组织），并在1毫升无菌PBS中匀浆。连续稀释后，将上述匀浆液涂在LB琼脂平板上，并在37℃孵育过夜。对活菌落进行计数，以评估每份匀浆液中的细菌数。

[0279] 结果

[0280] 为了研究纤维蛋白溶酶原是否在烫伤创面感染模型中发挥与在细菌性关节炎模型中相似的杀菌功能，对 $plg^{-/-}$ 小鼠诱导烫伤，并进一步在局部接种 1×10^{6}CFU 的金黄色葡萄球菌Phillips。在此后9天，对这些小鼠局部注射人纤维蛋白溶酶原或作为对照的PBS。这些小鼠烫伤后第10天的组织样本的细菌回收表明，与对照的PBS处理 $plg^{-/-}$ 小鼠相比，人纤维蛋白溶酶原局部处理能够成功地使 $plg^{-/-}$ 小鼠中的细菌数降低10倍（表8，图20），

这甚至低于未局部注射治疗的 $plg^{+/+}$ 小鼠中的细菌数。这些数据清楚地表明，纤维蛋白溶酶原在针对开放性创伤伴随感染的宿主防御（例如杀死细菌）中发挥至关重要的作用。总之，这些结果表明，纤维蛋白溶酶原在宿主对不同类型创伤的防御中是必要的，如通过针对两种类型细菌性关节炎的宿主防御、开放性创伤（烫伤、切口）愈合和针对开放性创伤感染的宿主防御所评价的。

[0281] 表 8、在烫伤创伤处接种 1×10^7CFU 的金黄色葡萄球菌 Phillips 株后接受 10 天 hPlg 或 PBS 治疗的 $plg^{-/-}$ 小鼠中的细菌数

[0282]

组别	样本数	每克组织中的平均细菌数（平均值 ± 标准差，$\times10^6$ CFU/ 克）
局部注射 hPlg 的 $plg^{-/-}$ 小鼠	5	0.43±0.13 *
局部注射 PBS 的 $plg^{-/-}$ 小鼠	5	4.6±1.4
未经局部注射的 $plg^{+/+}$ 小鼠	4	3.6±2.1

[0283] *，$P < 0.05$，与局部注射 PBS 的 $plg^{-/-}$ 组小鼠相比。

[0284] 实施例 15

[0285] 野生型和 plg 缺陷型小鼠中的自发性慢性中耳炎的发病率

[0286] 方法

[0287] 实验步骤。在 18 周的时间中，以不同的时间间隔通过向腹膜内注射 100 微升混合物 (25 微升多美康 (Dormicum®)（罗氏公司，瑞典斯德哥尔摩）、25 微升 Hypnorm™(Janssen Pharmaceutica,Beerse，比利时）和 50 微升无菌水）来麻醉小鼠。在耳显微镜下仔细检查鼓膜 (TM) 的总体外观并记录。18 周后，将所有动物处死，将 18 只动物（野生型，n = 7 ;plg 缺陷型，n = 11) 的耳随机分成三组，以便分别用于细菌学鉴定（野生型，n = 6 ;plg 缺陷型，n = 6)，塑料包埋（野生型，n = 4 ;plg 缺陷型，n = 6) 和石蜡包埋（野生型，n = 4 ;plg 缺陷型，n = 10)。

[0288] 塑料和石蜡包埋。收集头骨，如前述进行塑料和石蜡包埋 (15)。对于形态学实验，将塑料包埋样品沿着完整的 MEC 横切 (1 微米），并使用甲苯胺蓝染色。将石蜡包埋样品炎症完整的 MEC 横切 (5 微米）用于免疫组织化学分析。

[0289] 结果

[0290] 为了研究慢性中耳炎的发生，选取 6 周龄的野生型和 plg 缺陷型小鼠。在实验开始时、9 周龄、13 周龄、18 周龄和 24 周龄时检查实验小鼠 TM 和 MEC 的状态。在耳显微镜下，自发性慢性中耳炎被定义为不透明的白色增厚 TM，MEC 中有或没有渗出物质。如表 9 所示，在为期 18 周的实验期间，野生型小鼠（雄性和雌性）均无任何中耳渗出液或外耳道 (external ear canal,EEC) 排出物。耳显微镜显示，它们的 TM 是薄的、透明的并处于正常位置（数据未显示）。相反，在 plg 缺陷型小鼠中，患有自发性中耳炎的数量在实验期间逐渐增加，雄性和雌性的程度相似。在实验结束时，其余 plg 缺陷小鼠的耳朵也都发生不同炎性改变程度的自发性中耳炎（表 9)。

[0291] 表 9、不同年龄的野生型和 plg 缺陷型小鼠中自发性慢性化脓性中耳炎的发病率

[0292]

小鼠组别	在下列年龄中，自发性发生慢性中耳炎的发病率[a]				
	6 周龄	9 周龄	13 周龄	18 周龄	24 周龄
野生型，雄性	0/18	0/18	0/16	0/16	0/16
野生型，雌性	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Plg-缺陷型，雄性	0/20	3/20	5/18	8/18	6/10[b]
Plg-缺陷型，雌性	0/24	1/24	3/24	8/22	11/16[b]

[0293] [a] 数据显示为是每组中感染 / 发炎的耳朵数除以耳朵总数。

[0294] [b] 进行形态学分析时，发现在耳显微镜下表现为正常的 plg 缺陷型小鼠中耳有炎性改变，但不那么明显，接近 TM 的 MEC 中只有薄薄一层无定形的组织块。

[0295] 实施例 16

[0296] 鉴定从野生型和 plg 缺陷型小鼠中耳腔内分离的细菌

[0297] 方法

[0298] 除了细菌学鉴定以外，以与实施例 8 相似的方式进行本实验。

[0299] 细菌学鉴定。将野生型和 plg 缺陷型组的鼓泡从软组织中解剖出来，并用刀取下鼓泡上的小块骨片。将无菌拭子插入中耳腔 (MEC)，使用拭子将材料再涂到 LB(Luria-broth) 平板上，并立即在 37℃孵育 48 小时。根据 Cowan&Steel 的方法鉴定获得的菌落克隆 (16)。

[0300] 结果

[0301] 在实验结束时，随机收集 6 只野生型和 6 只 plg 缺陷型小鼠耳朵的鼓泡进行细菌鉴定。如表 10 所示，仅在 6 只野生型样品中的 1 个中发现细菌。该细菌被鉴定为血链球菌 (Streptococcus sanguinis)。然而，在 6 只 plg 缺陷型小鼠的 MEC 样品中有 5 个分离出了细菌。鉴定到的菌种为金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)、藤黄微球菌 (Micrococcus luteus)、远缘链球菌 (Streptococcus sobrinus) 和变形链球菌 (Streptococcus mutans)。所有鉴定出的细菌均为革兰氏阳性菌。

[0302] 表 10、从 24 周龄野生型和 plg 缺陷型小鼠的 MEC 中回收细菌

[0303] [a]ND，未检出。

[0304]

小鼠耳朵的编号	在下列小鼠中发现的细菌	
	野生型	Plg 缺陷型
1	血链球菌	金黄色葡萄球菌
2	ND[a]	藤黄微球菌
3	ND	远缘链球菌
4	ND	远缘链球菌和变形链球菌
5	ND	变形链球菌
6	ND	ND

[0305] 实施例 17

[0306] 野生型和 plg 缺陷型小鼠中耳的光学显微镜研究

[0307] 方法

[0308] 除了免疫组织化学染色以外，以与实施例 8 相似的方式进行本实验。

[0309] 免疫组织化学染色。将石蜡包埋切片在一系列乙醇浓度递减的溶液中再水化，并在蒸馏水中冲洗。使用 3％过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性 10 分钟，再将玻片用 PBS 清洗。然后将连续的切片用下述抗体处理。在所有的免疫组织化学染色中，将相邻的切片与来自非免疫动物的血清（代替一抗）孵育，作为阴性对照。

[0310] 对于炎性细胞的检测，使用了针对 T 细胞 (Clone 53-7.3 ;1 ： 50 稀释 ;BD Biosciences Pharmingen，斯德哥尔摩，瑞典）、B 细胞 (CloneRA3-6B2 ;1 ： 250 稀释 ;BD Biosciences Pharmingen)、巨噬细胞 (MCAP497 ;1 ： 500 稀释 ;Serotec，牛津，英国）和中性粒细胞 (CL8993AP，1 ： 200 稀释 ;Cedarlane Laboratories，Hornby，Ontario，加拿大）的大鼠抗小鼠单克隆一抗。为了进行免疫组织化学染色，先回收载玻片并与正常兔血清 (Dako Patts，哥本哈根，丹麦）孵育，而后与不同的一抗在适当的浓度下孵育。此后，载玻片与生物素化的兔抗大鼠 IgG 抗体 (Dako Patts) 孵育，再使用抗生物素蛋白－生物素－过氧化物酶复合物 (avidin-biotin-peroxidase complex，ABC) 法 (VectorLaboratories，Burlingame，CA) 显色。

[0311] 使用兔抗人多克隆抗体 (10550，ICN Pharmaceuticals，Aurora，俄亥俄州）作为一抗，通过过氧化物酶抗过氧化物酶 (peroxidaseanti-peroxidase，PAP) 法对细胞角蛋白进行免疫组化检测。简言之，将载有组织切片的载玻片先用 0.1％胰蛋白酶 (pH 7.8) 在 37℃处理 8 分钟，再用 5％的未免疫猪血清 (Dako Patts) 封闭，并与 PBS 中 1 ： 100 稀释的一抗孵育。在这之后，应用猪抗兔连接抗体 (Dako Patts)，接着应用兔 PAP 复合物 (Dako

Patts)。

[0312] 使用山羊抗小鼠多克隆抗体 (Nordic ImmunologicalLaboratories, Tilburg,荷兰）作为一抗,通过过氧化物酶抗过氧化物酶法对纤维蛋白（原）进行免疫组化检测。载玻片在先与兔血清 (DakoPatts) 孵育以后,再与 PBS 中 1 ： 500 稀释的一抗孵育,再与兔抗山羊连接抗体 (Dako Patts) 孵育。此后,将载玻片与山羊 PAP 复合物 (DakoPatts) 孵育。

[0313] 所有的载玻片经过二氨基联苯 (diaminobenzidine, DAB) 反应 (Vector Laboratories) 显示为棕色沉淀,再用 Mayer′ s 苏木素复染。使用 Leica DMLB 光学显微镜观察载玻片,通过连接到个人电脑上的 Leica DC 300F 相机记录图像。使用 Adobe Photoshop 7.0 软件调整每张图片的对比度和亮度。

[0314] 结果

[0315] 在实验结束时,对来自野生型和 plg 型缺陷小鼠的塑料包埋样品进行形态学染色。如图 7A 所示,野生型小鼠的 TM 和中耳显示正常的结构。TM 显示出了典型的三薄层结构 :外层角质化的表皮层、中间的固有层和与 MEC 连续排列的内上皮层。在中耳腔内没有发现中耳渗出液的存在。然而,在 plg 缺陷型小鼠中,在所有检查的中耳中都观察到了炎性变化。TM 增厚而且粘附着无定形组织块,这些组织块有时填满了几乎整个 MEC(图 7B)。在许多样品中外耳道也充满了无定形的组织 (图 7D)。

[0316] 在实验期结束时,进行了免疫组织化学染色分析以研究中耳的纤维蛋白和角蛋白的分布 (图 7C、7D、7E、7F)。在野生型小鼠中,在鼓膜的上皮表面仅观察到对纤维蛋白 (原) 和角蛋白的弱免疫活性 (图 7C 和 7E)。然而,在 plg 缺陷型小鼠中,如图 7D 所示,观察到覆盖 TM 和 MEC 粘膜的无定形组织对纤维蛋白有免疫活性。所述无定形组织的结构在不同部分和不同样品之间存在着差异,从松散的网状到弥散状,甚至是紧密堆集状 (数据未显示)。还在 EEC 中的无定形组织中观察到了对纤维蛋白的免疫活性。在大多数的 plg 缺陷型小鼠中, TM 中的角蛋白染色层以及 EEC 的周围表皮层显著增厚 (图 7F)。

[0317] 为了研究炎性细胞的浸润,将来自野生型和 plg 缺陷型小鼠样品的石蜡切片对 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞进行染色。如图 8A、8C、8E 和 8G 所示,在野生型小鼠的 TM 和中耳粘膜中几乎检测不到任何炎性细胞。但是在 plg 缺陷型小鼠中, T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞都存在于 TM 以及填充在中耳和外耳道中的无定形组织中 (图 8B, 2D,8F 和 8H)。T 细胞和 B 细胞相对较少,它们在 TM 和中耳粘膜中分布稀少 (图 8B 和 8D)。在中耳粘膜中,巨噬细胞是最丰富的炎性细胞类型 (图 8F),中性粒细胞是延伸至 EEC 的无定形组织中主要的细胞类型 (图 8H)。总之,这些结果表明,纤维蛋白溶酶原在针对自发性发生慢性中耳炎的保护中发挥不可或缺的作用。

[0318] 上述实施例是以说明的方式呈现,并不是以任何方式限制所附权利要求中所述的本发明范围。本说明书中提及的所有参考文献都以参考方式并入本文。

[0319] 参考文献

[0320] 1.Aderem, A.2003.Phagocytosis and the inflammatory response.J.Infect. Dis.187 Suppl2 :S340-S345.

[0321] 2.Hauschildt, S., and Kleinc, B.1995.Bacterial stimulators of macrophages.Int.Rev.Cytol.161 :263-331.

[0322] 3.Chcrtov, O., Yang, D., Howard, O.M., and Oppenhcim, J.J.2000.Leukocyte

granule proteinsmobilize innatc host defenses and adaptivc immunc responses. Immunol. Rev. 177 :68-78.

[0323] 4. Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A. C., Hagglof, P., Ploplis, V. A., Carmelict, P., and Ny, T. 1999. Ovulation in plasminogen-deficient mice. Endocrinology 140 :5030-5035.

[0324] 5. Teele, D. W., Klein, J. O., and Rosner, B. 1989. Epidcmiology of otitis media during the firstseven years of life in children in grcater Boston :a prospcctive, cohort study. J. Infect. Dis. 160 :83-94.

[0325] 6. Alexander CM, and Werb, Z. 1991. Extracellular matrix degradation. In Cell Biologv ofExtracellular Matrix. Hay ED, editor. Plcnum Press. New York. 255-302.

[0326] 7. Travis, J.. and Salvesen, G. 1983. Control of coagulation and fibrinolysis by plasmaproteinase inhibitors. Behring Inst. Mitt. 56-65.

[0327] 8. Wiman, B., and Wallen, P. 1975. Structural relationship between" glutamic acid" and" lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH2-terminalactivation peptide as studicd by affinity chromatography. Eur. J. Biochem. 50 :489-494.

[0328] 9. Saksela, O., and Rifkin, D. B. 1988. Cell-associated plasminogen activation :regulation andphysiological functions. Annu. Rev. Cell Biol. 4 :93-126.

[0329] 10. Collen, D., and Lijnen, H. R. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis andthrombolysis. Blood 78 :3114-3124.

[0330] 11. Liu, Z. Q., Deng, G. M., Foster, S., and Tarkowski, A. 2001. Staphylococcal peptidoglycansinduce arthritis. Arthritis Res. 3 :375-380.

[0331] 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. Divcrgent mechanisms utilized by SOCS3 to mediateinterleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production bymacrophages. J. Biol. Chem. 281 :6316-6324.

[0332] 13. Gjertsson, I., Hultgren, O. H., and Tarkowski, A. 2002. Interleukin-10 ameliorates theoutcome of Staphylococcus aureus arthirtis by promoting bacterial clearance. Clin. Exp. Immunol. 130 :409-414.

[0333] 14. Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De, V. R., vanden Oord, J. J., Collen, D., and Mulligan, R. C. 1994. Physiological consequences of loss ofplasminogen activator gene function in mice. Nature 368 : 419-424.

[0334] 15. Eriksson, P. O., Mattsson, C., and Hellstrom, S. 2003. First forty-eight hours of developingotitis media :an experimental study. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 112 :558-566.

[0335] 16. COWAN, S. T., and STEEL, K. J. 1961. Diagnostic tables for the common medical bacteria. J. Hyg. (Lond) 59 :357-372.

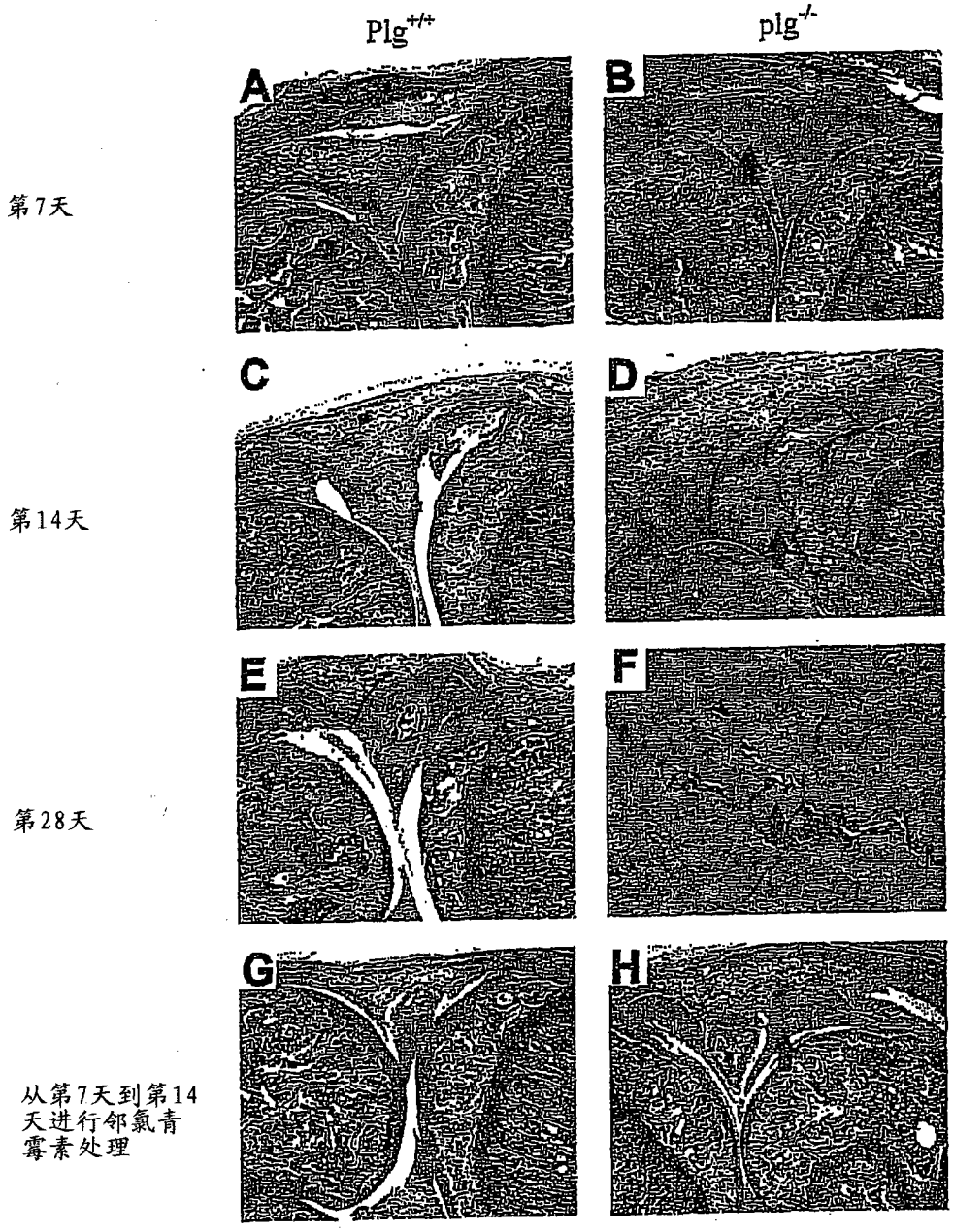


图 1

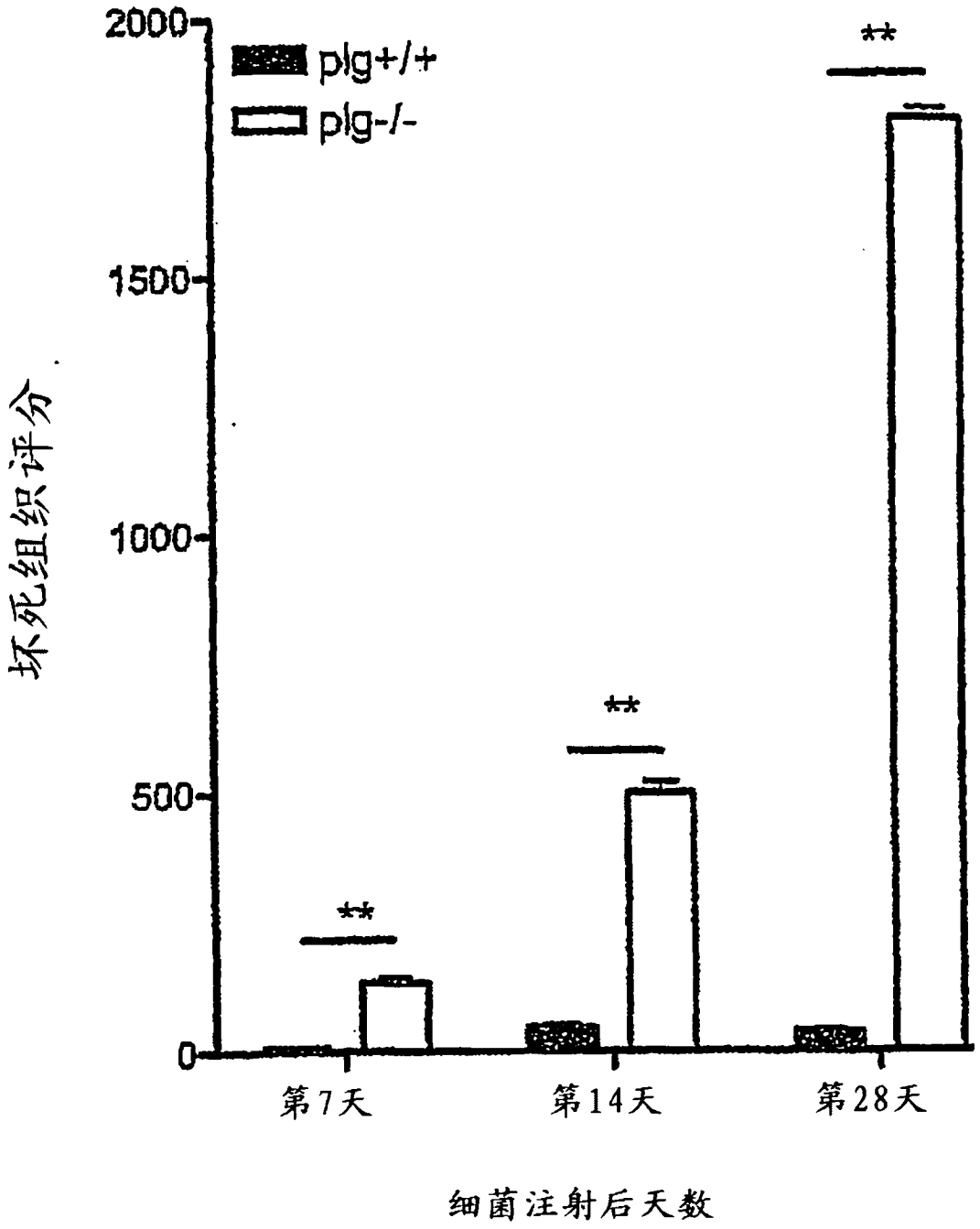


图 2

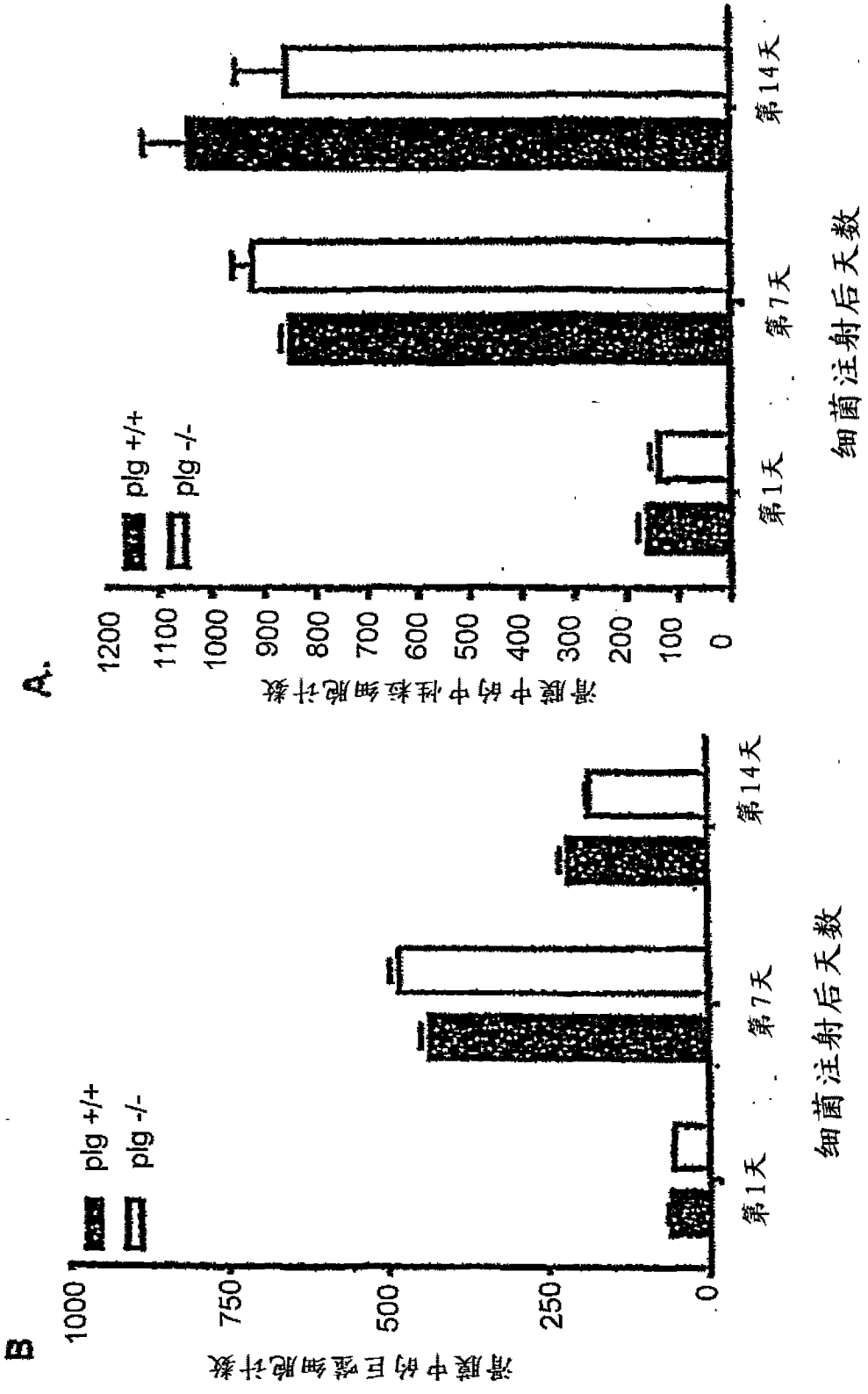

A.
滑膜中的中性粒细胞计数
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
plg +/+
plg -/-
第1天
第7天
第14天
细菌注射后天数
B
滑膜中的巨噬细胞计数
1000
750
500
250
0
plg +/+
plg -/-
第1天
第7天
第14天
细菌注射后天数

图 3

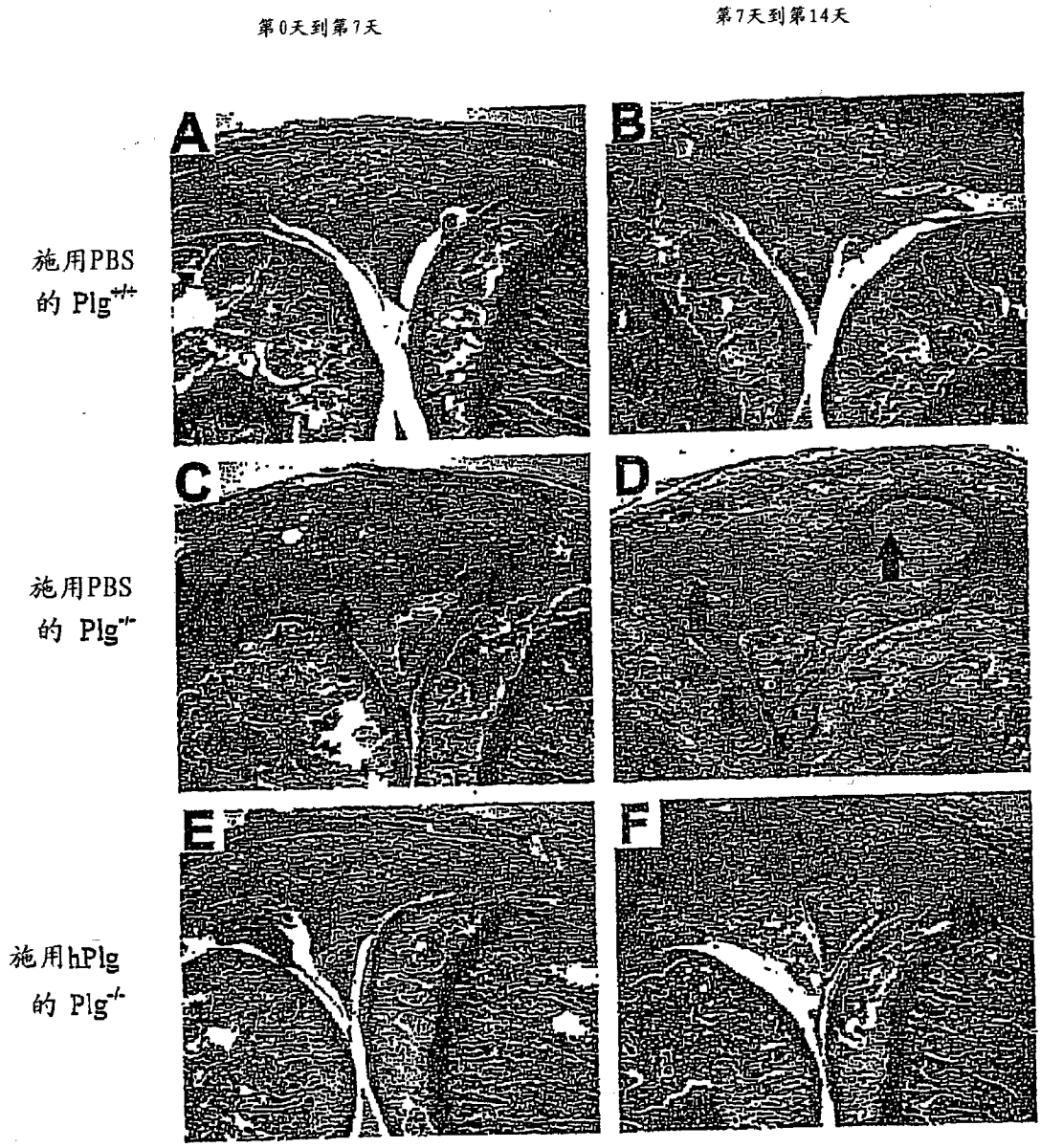


图 4

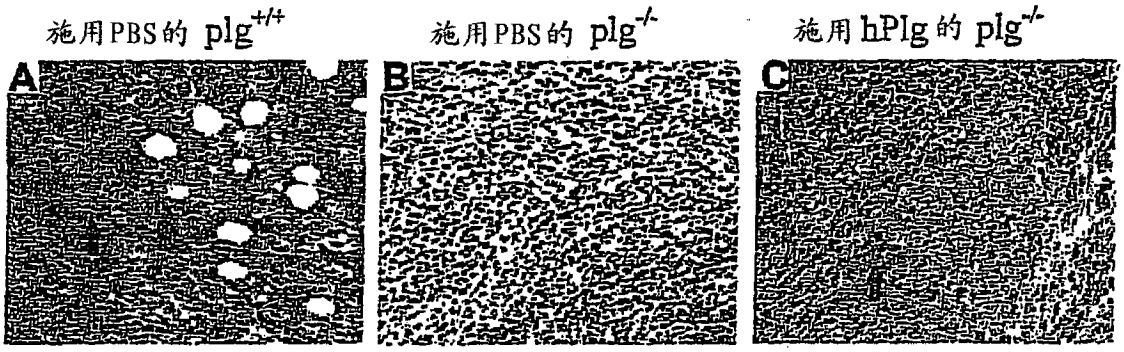


图 5

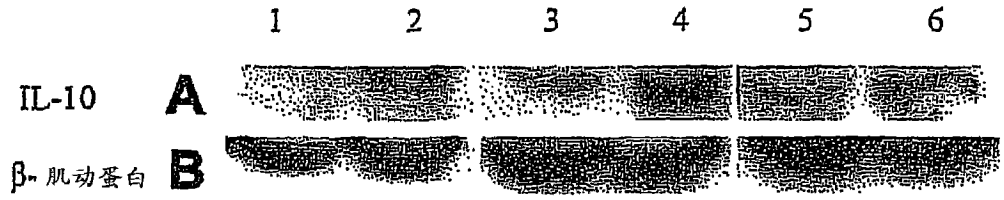


图 6

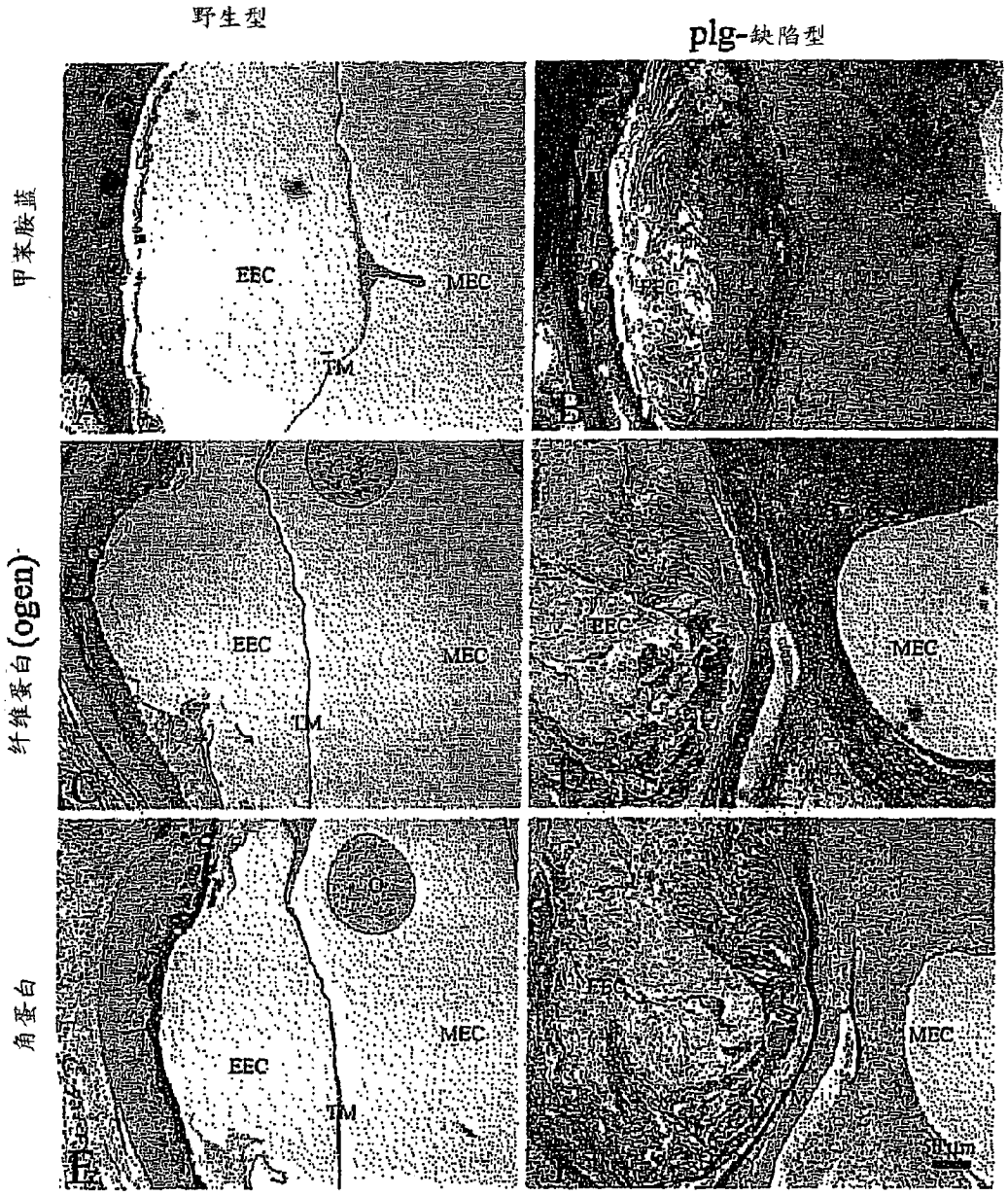


图 7

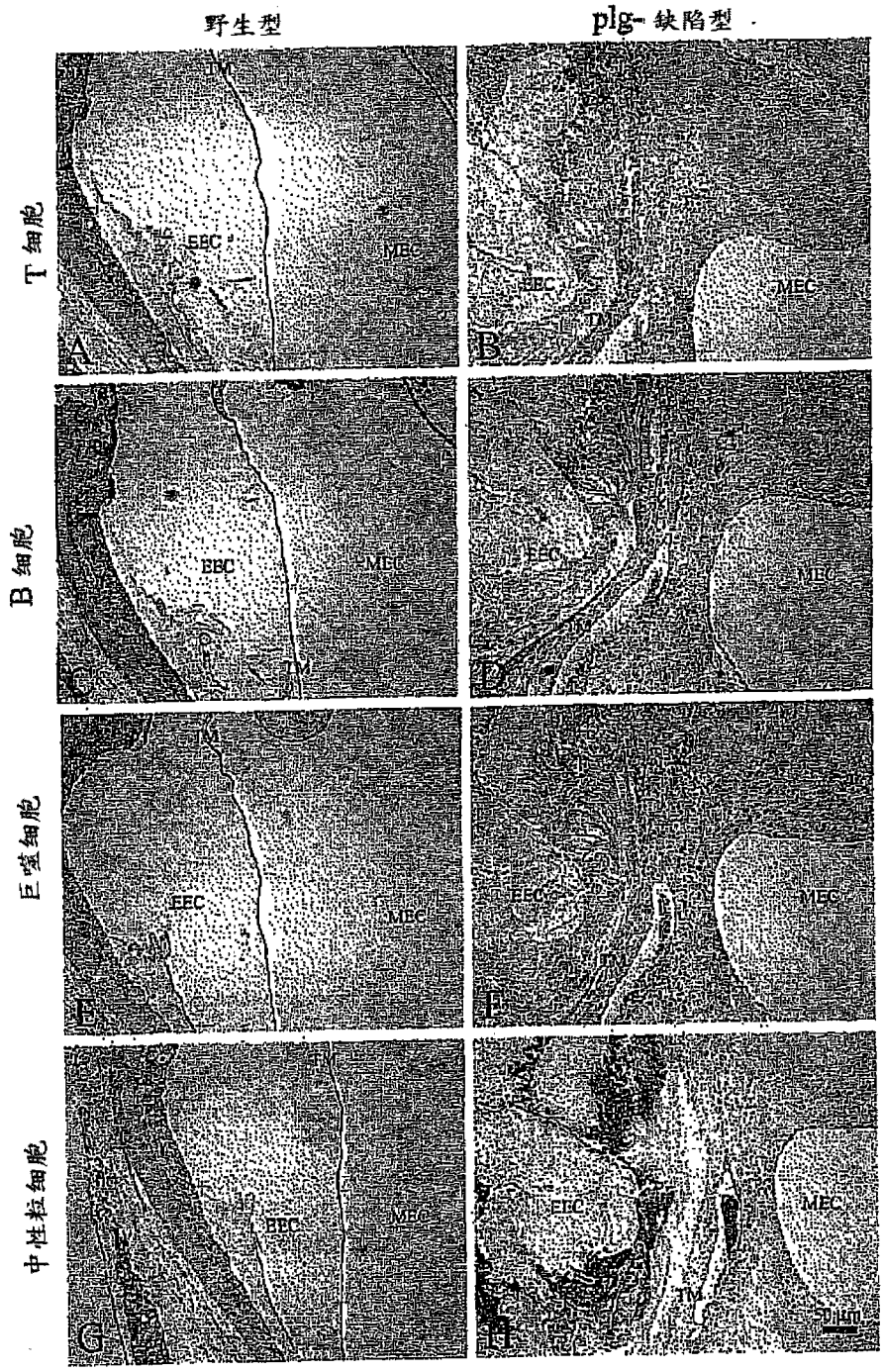


图 8

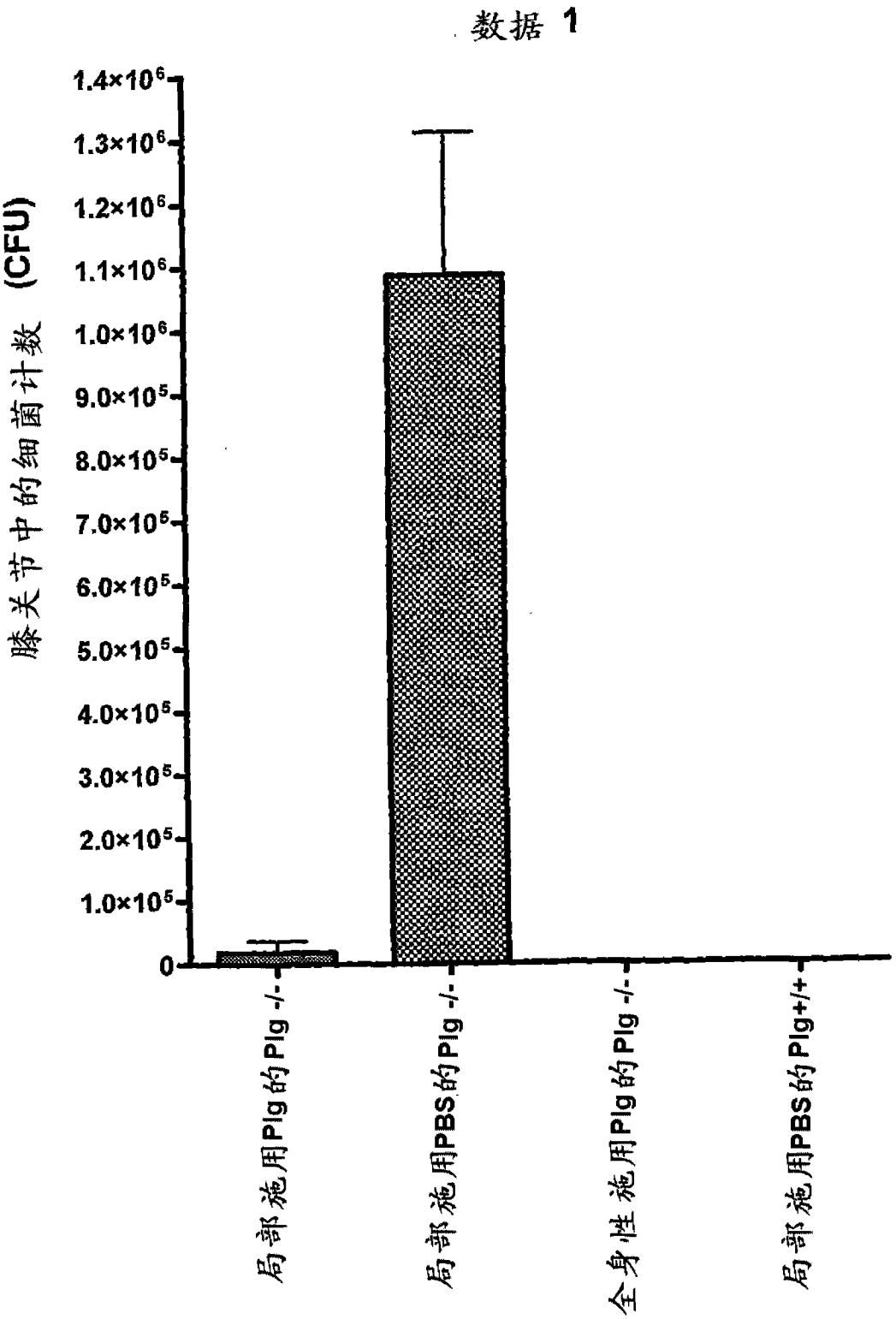

数据 1
膝关节中的细菌计数 (CFU)
1.4×10⁶
1.3×10⁶
1.2×10⁶
1.1×10⁶
1.0×10⁶
9.0×10⁵
8.0×10⁵
7.0×10⁵
6.0×10⁵
5.0×10⁵
4.0×10⁵
3.0×10⁵
2.0×10⁵
1.0×10⁵
0
局部施用Plg的Plg -/-
局部施用PBS的Plg -/-
全身性施用Plg的Plg -/-
局部施用PBS的Plg+/+

图 9

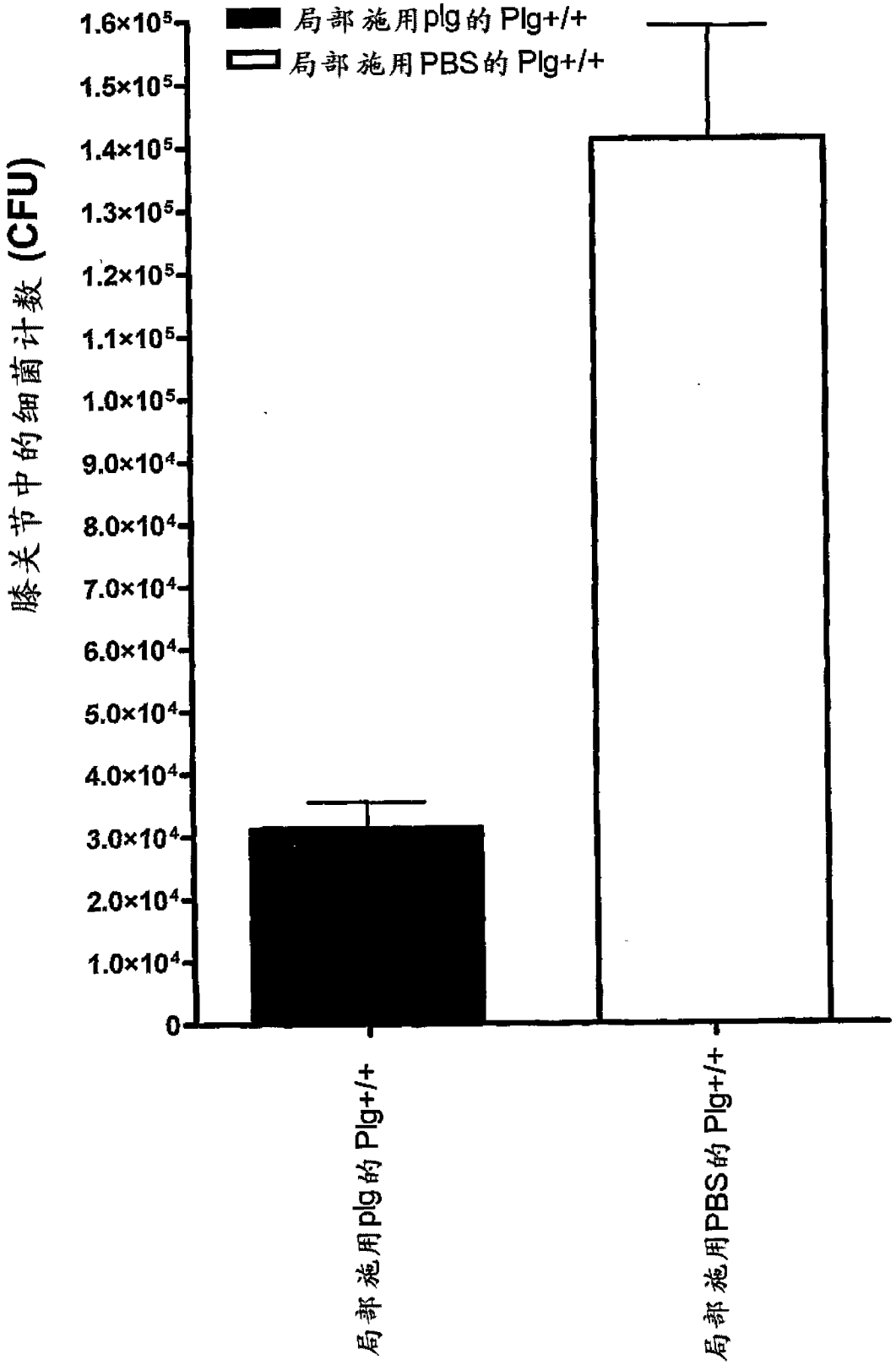

局部施用plg的Plg+/+
局部施用PBS的Plg+/+
膝关节中的细菌计数 (CFU)
1.6×10⁵
1.5×10⁵
1.4×10⁵
1.3×10⁵
1.2×10⁵
1.1×10⁵
1.0×10⁵
9.0×10⁴
8.0×10⁴
7.0×10⁴
6.0×10⁴
5.0×10⁴
4.0×10⁴
3.0×10⁴
2.0×10⁴
1.0×10⁴
0
局部施用plg的Plg+/+
局部施用PBS的Plg+/+

图 10

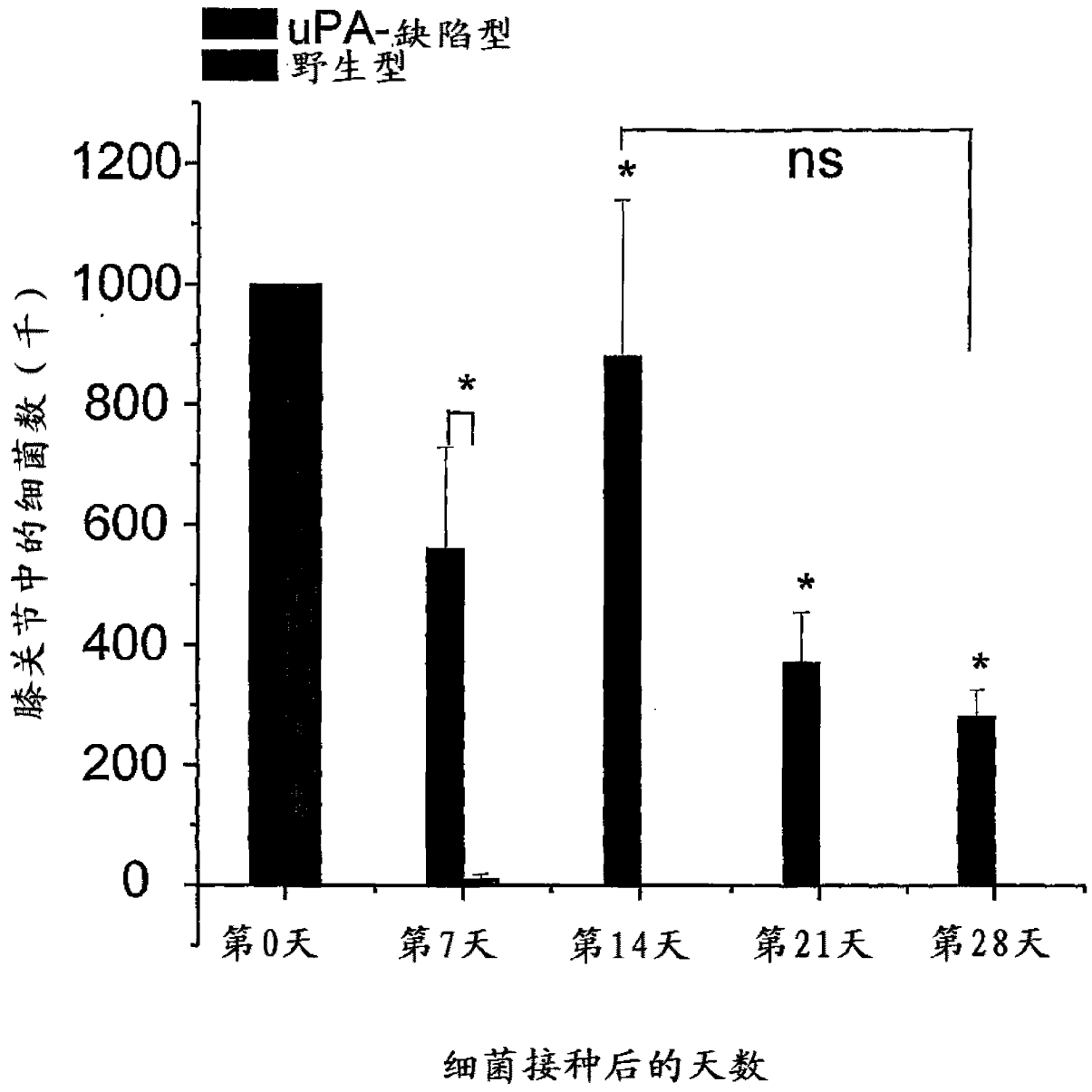

uPA-缺陷型
野生型
膝关节中的细菌数（千）
1200
1000
800
600
400
200
0
*
ns
*
*
*
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
细菌接种后的天数

图 11

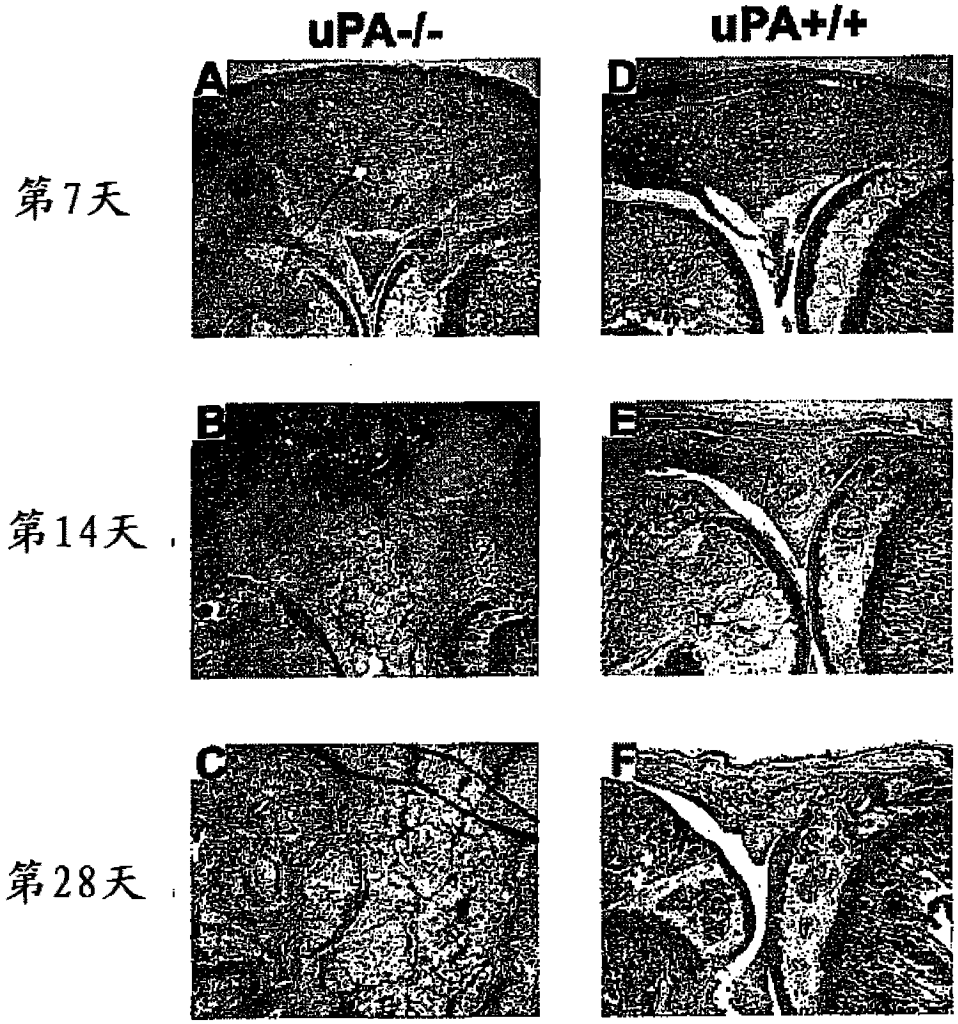


图 12

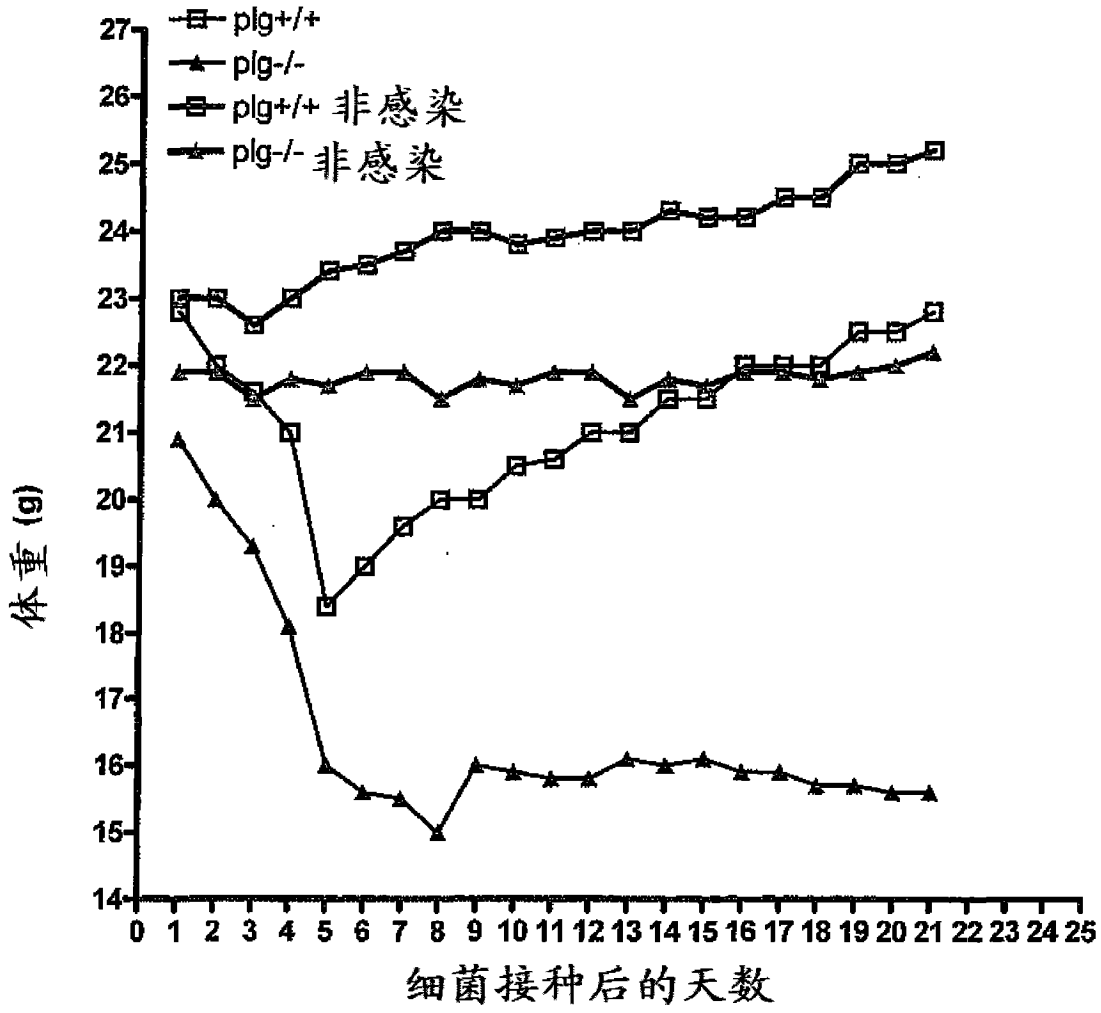

plg+/+
plg-/-
plg+/+ 非感染
plg-/- 非感染
体重 (g)
细菌接种后的天数
27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

图 13

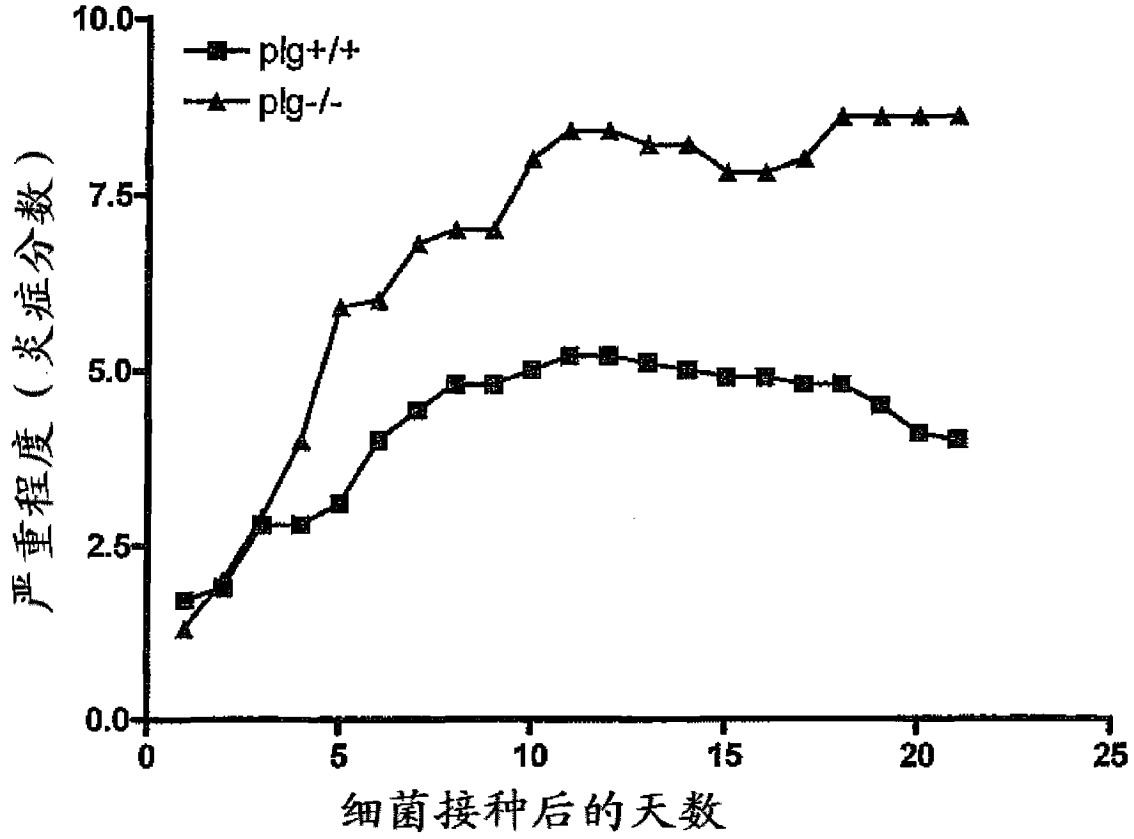


图 14

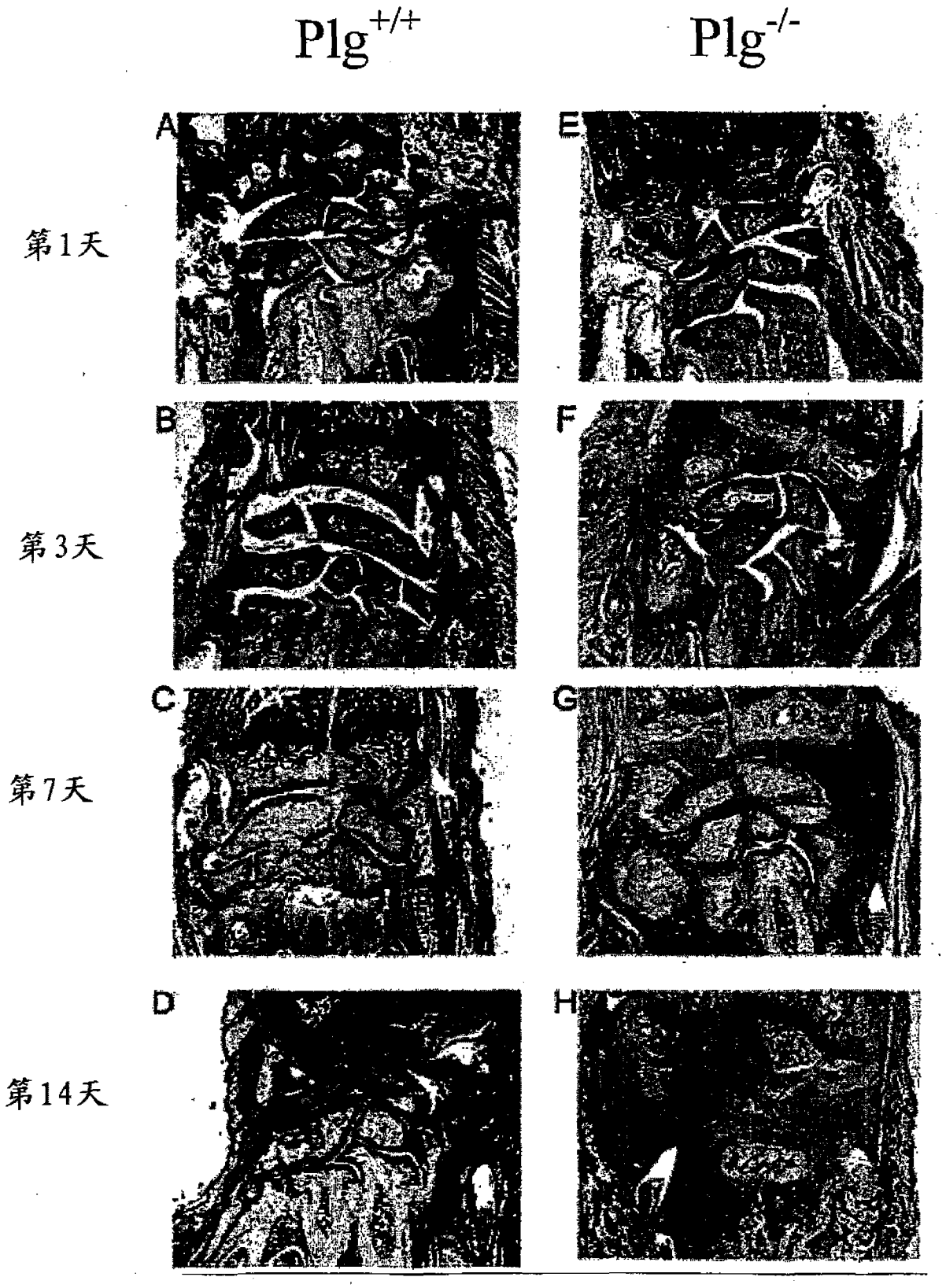


图 15

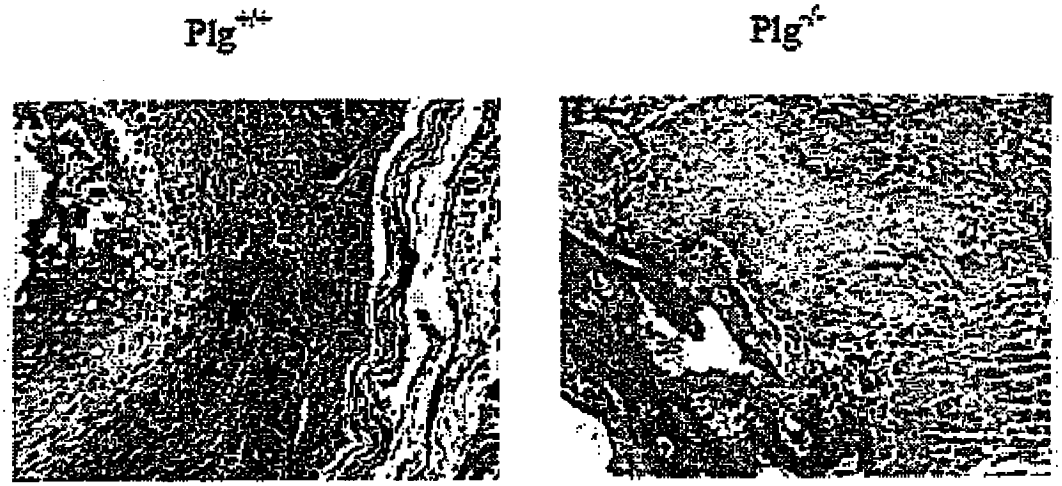


图 16

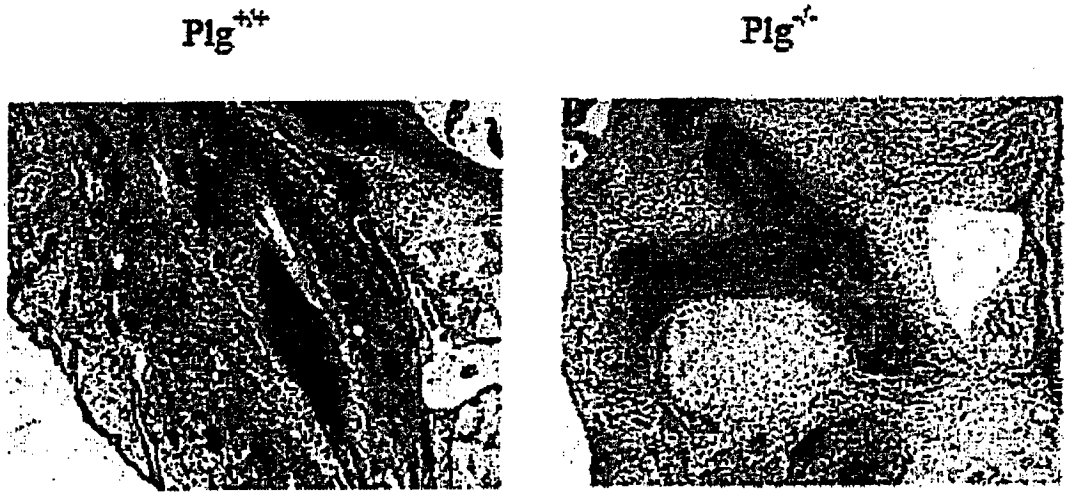


图 17

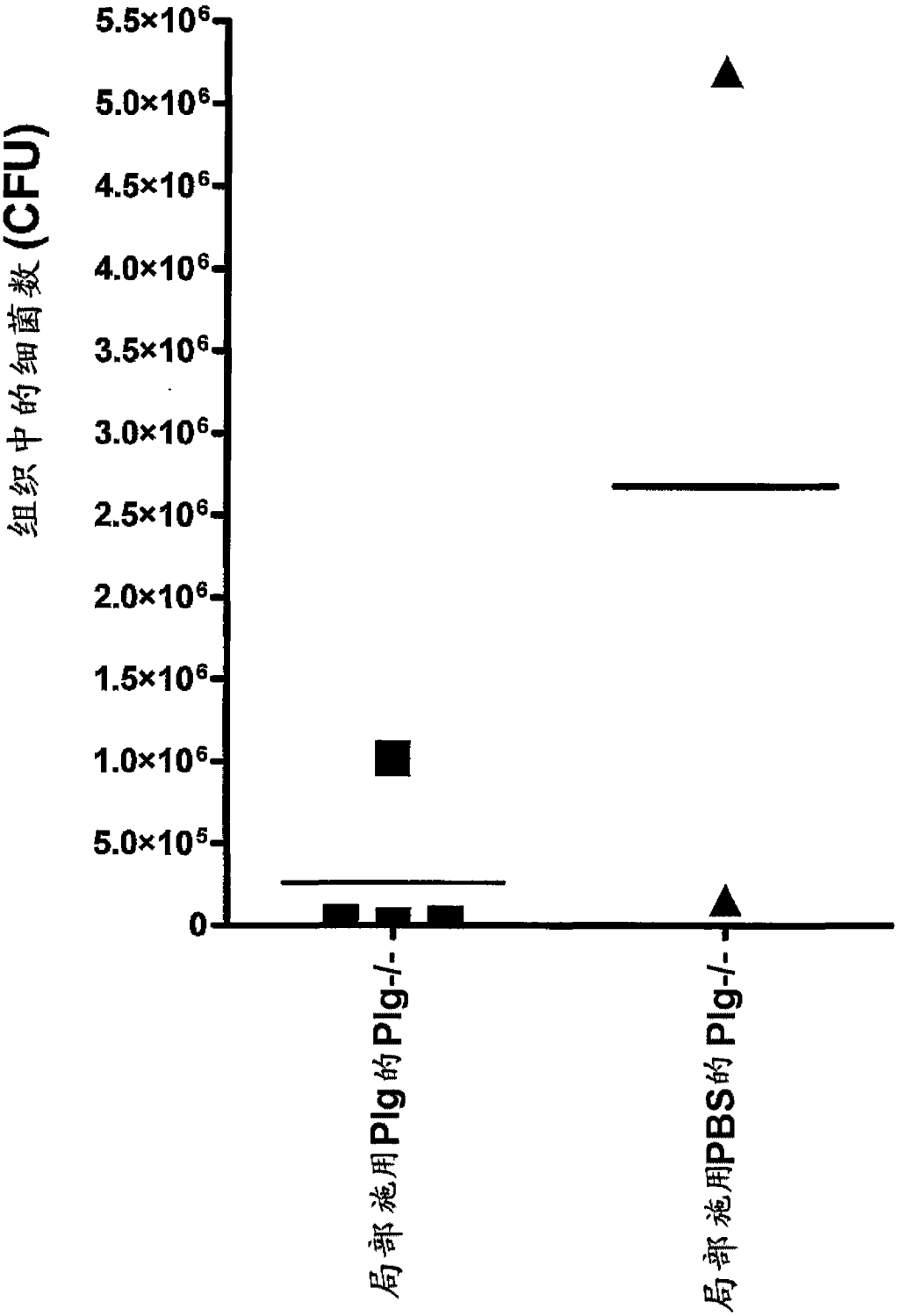

组织中的细菌数(CFU)
5.5×10⁶
5.0×10⁶
4.5×10⁶
4.0×10⁶
3.5×10⁶
3.0×10⁶
2.5×10⁶
2.0×10⁶
1.5×10⁶
1.0×10⁶
5.0×10⁵
0
局部施用Plg的Plg-/-
局部施用PBS的Plg-/-

图 18

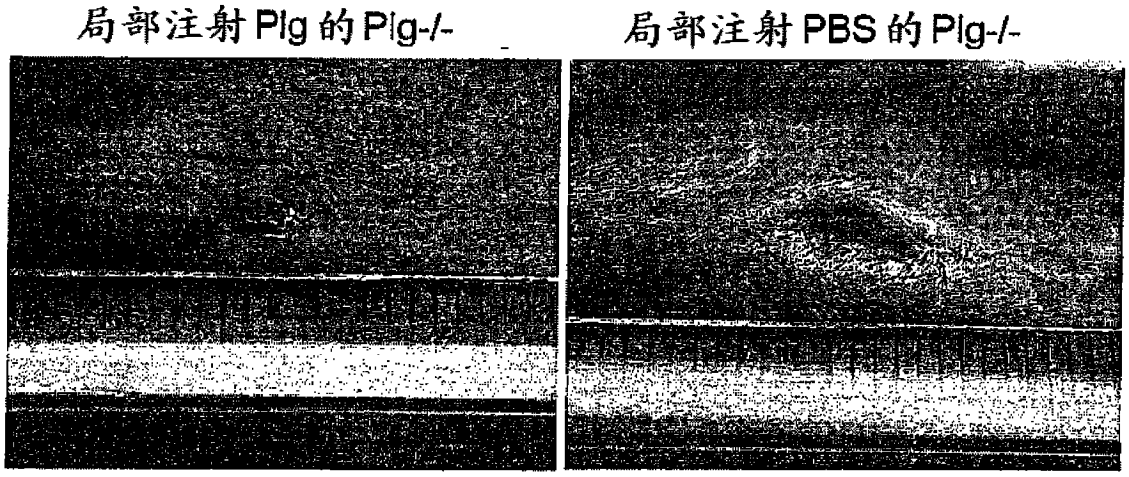


图 19

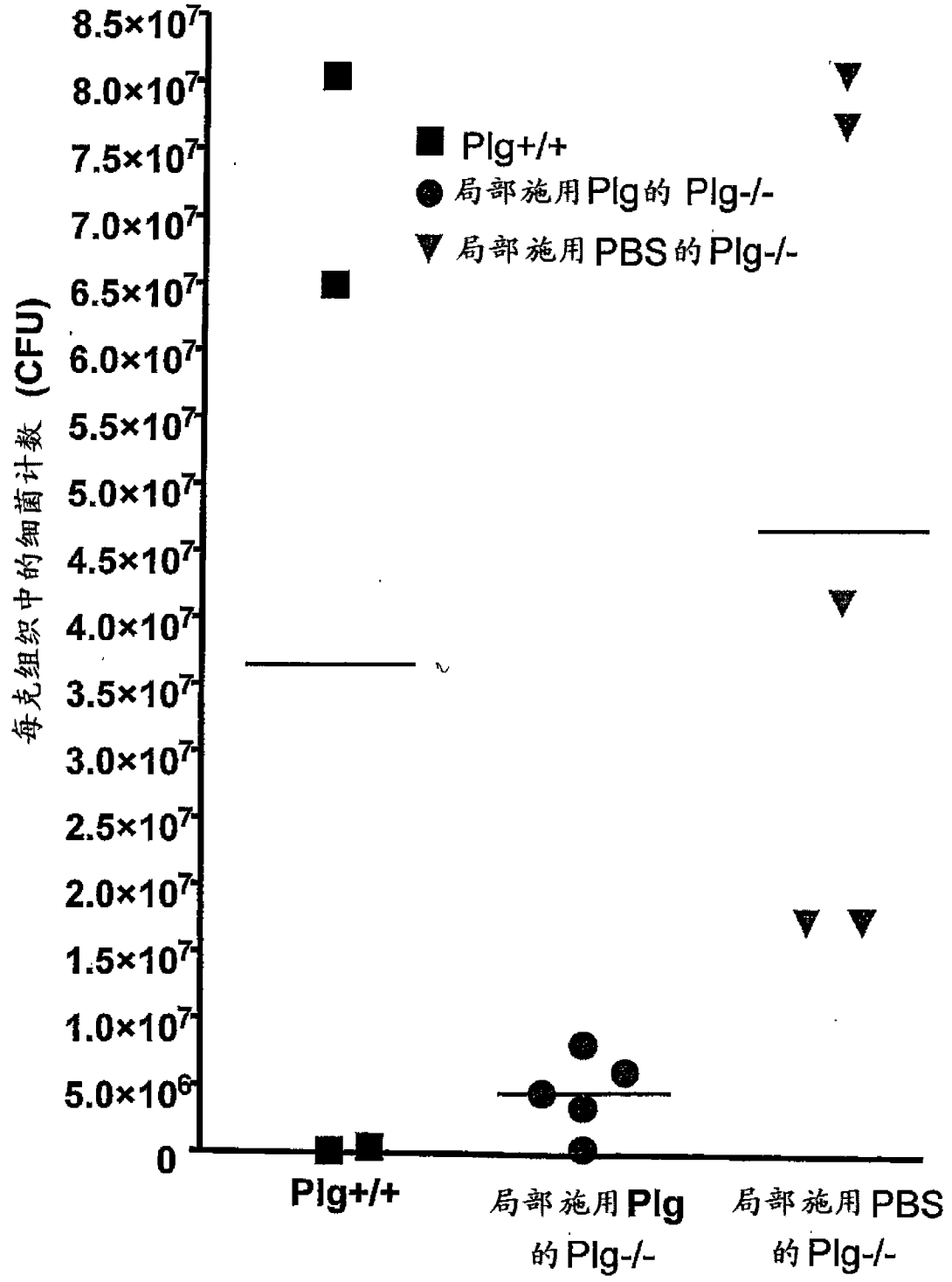

8.5×10^7
8.0×10^7
7.5×10^7
7.0×10^7
6.5×10^7
6.0×10^7
5.5×10^7
5.0×10^7
4.5×10^7
4.0×10^7
3.5×10^7
3.0×10^7
2.5×10^7
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
每克组织中的细菌计数 (CFU)
Plg+/+
局部施用Plg的 Plg-/-
局部施用 PBS的Plg-/-
Plg+/+
局部施用Plg 的Plg-/-
局部施用PBS 的Plg-/-

图 20