

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 015**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2007** **E 07794195 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013** **EP 2056864**

54 Título: **Candidatos contra la infección**

30 Prioridad:

28.08.2006 US 823665 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.03.2014

73 Titular/es:

**OMNIO HEALER AB (100.0%)
Villavägen 1
903 36 Umeå, SE**

72 Inventor/es:

**NY, TOR;
LI, JINAN y
GUO, YONGZHI**

ES 2 451 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Candidatos contra la infección

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas y estados necróticos que afectan a la matriz extracelular, debidos a bacterias. En particular, la invención se refiere a tales métodos que dan como resultado una defensa mejorada frente a la infección, una mejor limpieza de tejido necrótico así como la creación de una remodelación tisular funcional y estéticamente satisfactoria.

Antecedentes

Las enfermedades infecciosas están provocadas por patógenos tales como bacterias y virus y organismos eucariotas que oscilan entre protozoos y hongos unicelulares, y metazoos complejos grandes tales como gusanos parásitos. Las bacterias patógenas pueden contener factores de virulencia que median en interacciones con el huésped, provocando respuestas particulares de las células huésped que promueven la replicación y propagación del patógeno. Los virus se basan en subvertir la maquinaria de la célula huésped para producir sus proteínas y replicar sus genomas. Los patógenos colonizan a menudo el huésped adhiriéndose a o invadiendo las superficies epiteliales que están en contacto directo con el entorno. Los virus se basan en gran medida en endocitosis mediada por receptor para su entrada en la célula huésped, mientras que las bacterias aprovechan la adhesión celular y rutas fagocíticas (1). Los hongos, protozoos y otros parásitos eucariotas patógenos normalmente pasan a través de varias formas diferentes durante el transcurso de la infección; se requiere habitualmente la capacidad para cambiar entre estas formas para que los parásitos puedan sobrevivir en un huésped y provocar enfermedad.

Durante las horas y días iniciales de exposición del huésped a un nuevo patógeno, el sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa contra patógenos invasores. Sin embargo, también se requiere el inicio de respuestas inmunitarias adaptativas específicas. Las respuestas inmunitarias innatas se basan en la capacidad del organismo para reconocer rasgos conservados de patógenos que no están presentes en el huésped no infectado. Estos incluyen muchos tipos de moléculas sobre superficies microbianas y el ARN bicatenario de algunos virus. Moléculas de superficie de microorganismos también activan el sistema del complemento seleccionando como diana estos organismos para su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, y produciendo una respuesta inflamatoria.

Las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para escapar de los fagocitos. Por ejemplo, pueden inhibir la quimiotaxis y fagocitosis, destruir o colonizar los fagocitos. Las células fagocíticas usan una combinación de enzimas de degradación, péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno para destruir los microorganismos invasores (2). Además, liberan moléculas de señalización que desencadenan una respuesta inflamatoria y comienzan a reunir las fuerzas del sistema inmunitario adaptativo. Las bacterias, por otro lado, han desarrollado diferentes estrategias dirigidas contra el sistema inmunitario adaptativo tales como mimetismo molecular, supresión de anticuerpos, esconderse dentro de células o liberación del antígeno al torrente sanguíneo (3).

Los patógenos intracelulares, incluyendo todos los virus y muchas bacterias y protozoos, se replican dentro de una célula huésped, que invaden mediante uno de una variedad de mecanismos. Los virus se basan en gran medida en endocitosis mediada por receptor para su entrada en la célula huésped, mientras que las bacterias aprovechan la adhesión celular y rutas fagocíticas. Los protozoos emplean estrategias de invasión únicas que requieren habitualmente un gasto metabólico significativo. Una vez dentro, los patógenos intracelulares buscan un nicho que sea favorable para su replicación, alterando frecuentemente el tráfico por la membrana de la célula huésped y aprovechando el citoesqueleto para el movimiento intracelular.

Staphylococcus aureus es un microorganismo asociado frecuentemente a artritis bacteriana, que da como resultado inflamación sinovial, destrucción de hueso y cartílago y en última instancia deformidad articular. Se ha observado que diversas especies animales incluyendo mamíferos, aves y reptiles desarrollan artritis por *S. aureus* espontánea y por tanto son posibles modelos para la inducción de la enfermedad.

El sistema activador del plasminógeno (PA) es un sistema proteolítico general que se ha sugerido que desempeña un importante papel en el desarrollo de diferentes tipos de artritis. El plasminógeno puede activarse para dar la proteasa de amplio espectro plasmina mediante cualquiera de los dos PA fisiológicos, PA de tipo tisular (tPA) o PA de tipo urocinasa (uPA).

La otitis media se define como estados inflamatorios del oído. La otitis media es la enfermedad infantil más común excepto el resfriado común. El factor etiológico más importante relacionado con la otitis media son infecciones bacterianas o virales del tracto respiratorio superior. La otitis media es generalmente una enfermedad benigna y autolimitante, pero a pesar de esto, la tasa de prescripción de antibióticos es alta. De hecho, los efectos de antibióticos en la curación de la otitis media carecen de pruebas y hasta el momento la intervención quirúrgica es la terapia de elección para el tratamiento de otitis media aguda recurrente (AOM) y otitis media crónica u otitis media con efusión (OME).

Se conoce ampliamente que la colonización inmediata por la flora de la piel normal del paciente (por ejemplo *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*) se produce tras una lesión. Especialmente tras la introducción de la penicilina G a principios de la década de 1950, que dio como resultado la práctica eliminación de *Streptococcus pyogenes* como causa de infección en pacientes con lesiones térmicas, *S. aureus* se convirtió en el principal agente etiológico de la infección de heridas. Por tanto, *S. aureus* es una de las especies de bacterias más comunes en la infección de heridas abiertas. Heridas por incisión y heridas por quemaduras son los tipos de heridas más comunes observados en la práctica clínica.

Los antibióticos y otros fármacos antimicrobianos se han usado ampliamente en tratamiento de enfermedades infecciosas desde la época de la Segunda Guerra Mundial. El éxito de los antimicrobianos contra microbios que provocan enfermedades está entre los grandes logros de la medicina moderna. Sin embargo, muchos antimicrobianos no son tan eficaces como solían serlo debido al desarrollo de farmacorresistencia. Un factor clave en el desarrollo de resistencia a antibióticos es la capacidad de los organismos infecciosos para adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones del entorno. A lo largo del tiempo, algunas bacterias han desarrollado modos de sortear los efectos de los antibióticos. Se cree que el uso generalizado de antibióticos ha estimulado evolutivamente adaptaciones que permiten a las bacterias sobrevivir a estos poderosos fármacos. La resistencia antimicrobiana proporciona un beneficio de supervivencia a los microbios y hace más difícil eliminar infecciones del organismo. En última instancia, la creciente dificultad en la lucha contra los microbios conduce a un aumento del riesgo de adquirir infecciones en un hospital u otro entorno. Enfermedades tales como tuberculosis, gonorrea, malaria e infecciones del oído infantiles son ahora más difíciles de tratar de lo que eran tan sólo hace unos cuantos años. La farmacorresistencia es un problema especialmente difícil para hospitales que albergan pacientes gravemente enfermos que no pueden luchar contra las infecciones sin la ayuda de antibióticos. El uso intenso de antibióticos en estos pacientes selecciona cambios en bacterias que ocasionan farmacorresistencia. Desafortunadamente, esto empeora el problema produciendo bacterias con una mayor capacidad para sobrevivir incluso en presencia de los antibióticos más fuertes. Estas bacterias resistentes a fármacos incluso más fuertes continúan aprovechándose de pacientes hospitalarios vulnerables. Por tanto, hay una conciencia creciente de que son altamente necesarias estrategias terapéuticas novedosas para mejorar la defensa contra la infección.

La necrosis es el nombre dado a la muerte no programada o accidental de células y tejido vivo. Está menos ordenada que la apoptosis, que es parte de la muerte celular programada. En contraposición a la apoptosis, la limpieza de residuos celulares resultantes de la necrosis por fagocitos del sistema inmunitario es generalmente más difícil, ya que la muerte desordenada generalmente no envía señales celulares de "cómeme" que indiquen a los fagocitos cercanos que engullan la célula moribunda. Esta falta de señalización hace más difícil que el sistema inmunitario localice y recicle las células muertas que han muerto a través de necrosis que si la célula hubiese experimentado apoptosis. La liberación del contenido intracelular tras el daño a la membrana celular es la causa de inflamación en la necrosis.

Hay muchas causas de necrosis incluyendo lesión, infección, cáncer, infarto, envenenamiento e inflamación. El daño grave a un sistema esencial en la célula conduce a daño secundario a otros sistemas, una denominada "cascada de efectos". La necrosis está provocada por enzimas especiales que se liberan por lisosomas que pueden digerir componentes celulares o la propia célula completa. Las lesiones recibidas por la célula pueden comprometer la membrana de los lisosomas, o pueden dar lugar a una reacción en cadena desorganizada que provoca la liberación de enzimas. A diferencia de la apoptosis, las células que mueren por necrosis pueden liberar productos químicos perjudiciales que dañan a otras células. La necrosis del material de biopsia se detiene mediante fijación o congelación.

Actualmente hay cuatro métodos terapéuticos principales para curar la necrosis. El primero es eliminación quirúrgica, que es el más rápido, y por tanto se recomienda cuando están presentes áreas necróticas grandes o costras gruesas. El segundo es eliminación mecánica, que incluye hidroterapia, dextranómeros e irrigación de heridas. El tercero es eliminación enzimática I, la enzima usada es principalmente colagenasa (por ejemplo: Santyl), sin embargo, el efecto es demasiado lento cuanto está presente infección; y en cuarto lugar es a través de un método autolítico, que es por medio de enzimas en el fluido de la herida pero el efecto es extremadamente lento. Sin embargo, ninguno de los cuatro métodos de tratamiento proporciona una remodelación tisular y eliminación de la necrosis funcional y estéticamente satisfactoria. Por tanto, hay una gran necesidad de una estrategia terapéutica novedosa para lograr una eliminación exitosa de la necrosis.

Los métodos terapéuticos actuales para tratar infecciones tales como artritis bacteriana, infección de heridas abiertas, otitis media y necrosis tienen inconvenientes tal como se comentó anteriormente. Por tanto, hay una gran necesidad en la técnica de estrategias mejoradas para tratar infecciones en general.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que componentes de la ruta de activación del plasminógeno, y compuestos con la capacidad para activar el plasminógeno, pueden usarse para estrategias nuevas y mejoradas para enfermedades infecciosas y necrosis de tejidos. Un aspecto de la invención se refiere a la

- capacidad del plasminógeno, u otros miembros de la ruta de activación del plasminógeno o compuestos con la capacidad para activar el plasminógeno, para desempeñar un papel en la protección frente a por ejemplo artritis inducida por *S. aureus* e infección de heridas abiertas activando células inflamatorias, destruyendo bacterias, eliminando tejido necrótico y potenciando la expresión de citocinas. Tales estados de infección incluyen además enfermedades infecciosas y otras enfermedades en las que se observa comúnmente infección de tejido, por ejemplo durante la defensa frente a infecciones específicas de tejido, defensa frente a infecciones en todo el cuerpo, infecciones agudas, infecciones crónicas, úlceras crónicas, infección de heridas abiertas y úlceras diabéticas.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un método para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto que es un componente de la ruta de activación del plasminógeno o tiene la capacidad para activar el plasminógeno directamente o mediante la ruta de activación del plasminógeno.
- La enfermedad infecciosa bacteriana se selecciona de artritis bacteriana, neumonía, lesiones en los órganos respiratorios provocadas por lesiones en los tejidos articulares provocadas por infecciones, preferiblemente artritis bacteriana.
- En determinadas realizaciones, la composición comprende una combinación de dos o más compuestos. En determinadas realizaciones, la composición comprende además al menos un agente antibiótico.
- En realizaciones adicionales, el agente antibiótico se selecciona del grupo que consiste en tetraciclinas, anfenicoles, beta-lactamas, penicilinas, sulfonamidas, macrólidos, lincosamidas, estreptogaminas, estreptomycinas, quinolonas y metronidazoles.
- En determinadas realizaciones, el sujeto es mamífero, y en particular un ser humano. En realizaciones adicionales, el sujeto es deficiente en plasmina o plasminógeno. La deficiencia puede ser congénita, adquirida y/o local.
- En determinadas realizaciones, el compuesto se administra por vía sistémica, por vía local, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, mediante inhalación, por vía intratecal, mediante inyección local, mediante inyección intraarticular o por vía rectal. En una realización preferida se usan administración tópica y/o inyección local.
- En determinadas realizaciones, el compuesto se administra en combinación con un portador polipeptídico adecuado y/o uno o más agentes estabilizantes.
- Aún en realizaciones adicionales, el compuesto se administra a una dosis de 0,0001 a aproximadamente 1 g, preferiblemente de 0,005 mg a aproximadamente 100 mg, más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 50 mg. La dosis en mg está en relación con los centímetros cuadrados de área infectada (es decir mg/centímetros cuadrados de área infectada).
- En realizaciones adicionales, la administración del compuesto se repite al menos una vez, preferiblemente al menos cada día.
- En realizaciones adicionales, la administración se realiza aplicando un vendaje para heridas, que comprende el compuesto de la presente invención, a un área infectada.
- En realizaciones adicionales, la invención se refiere a un método para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto adecuado a un sujeto que necesita tal tratamiento.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad eficaz de un compuesto adecuado.
- En determinadas realizaciones, la invención se refiere a un kit para su uso en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad eficaz de un compuesto adecuado y al menos un agente antibiótico o antimicótico, en viales separados.

Descripción de la invención

- Los presentes resultados en el oído mostraron que el plasminógeno desempeña un papel en la protección frente al desarrollo espontáneo de otitis media crónica. Los presentes resultados también sugieren el uso de plasminógeno para la terapia clínica de determinados tipos de otitis media. Por tanto, estos hallazgos sugieren que componentes de la ruta de activación de plasminógeno tienen un papel en la prevención y el tratamiento de cualquier enfermedad infecciosa como factor proinflamatorio novedoso. En particular, los efectos proinflamatorios de componentes de la ruta de activación de plasminógeno incluyen activación de células inflamatorias, destrucción de bacterias,

eliminación de tejido necrótico y aumento de la expresión de citocinas y mejora de la remodelación tisular apropiada. Esta conclusión se extrae basándose en la comprensión del mecanismo de defensa del huésped global frente a todos los patógenos infecciosos, las enfermedades infecciosas extensas y versátiles inducidas por *S. aureus*, que es la especie bacteriana principal usada en los estudios, y diversos modelos de infección estudiados en esta solicitud de patente (incluyendo artritis infecciosa, infección inducida por quemaduras, infección inducida por incisión y otitis media).

Las enfermedades infecciosas provocan actualmente aproximadamente un tercio de todas las muertes de seres humanos en el mundo, más que todas las formas de cáncer combinadas. Muchos tipos de patógenos provocan enfermedad en seres humanos. Los más familiares son virus y bacterias. Otros patógenos infecciosos son organismos eucariotas, que oscilan entre protozoos y hongos unicelulares, hasta metazoos complejos grandes tales como gusanos parásitos. Cada patógeno individual provoca enfermedad de un modo diferente, lo que hace que sea reto comprender la biología básica de la infección. Sin embargo, todos los patógenos comparten la capacidad de interactuar con células huésped en modos que promueven la replicación y propagación del patógeno, pero estas interacciones huésped-patógeno son diversas. Los patógenos colonizan a menudo el huésped adhiriéndose a o invadiendo a través de las superficies epiteliales tales como la superficie de la piel que está en contacto directo con el entorno. Los patógenos intracelulares, incluyendo todos los virus y muchas bacterias y protozoos, se replican dentro de una célula huésped, que invaden por uno de una variedad de mecanismos. Los virus se basan en gran medida en endocitosis mediada por receptor para su entrada en la célula huésped, mientras que las bacterias aprovechan la adhesión celular y rutas fagocíticas. Los protozoos emplean estrategias de invasión únicas que requieren habitualmente un gasto metabólico significativo. Una vez dentro, los patógenos intracelulares buscan un nicho que sea favorable para su replicación, alterando frecuentemente el tráfico por la membrana de la célula huésped y aprovechando el citoesqueleto para el movimiento intracelular. Además de alterar el comportamiento de las células huésped individuales, los patógenos alteran frecuentemente el comportamiento del organismo huésped en modos que favorecen la propagación a un nuevo huésped. Los patógenos evolucionan rápidamente, de manera que emergen nuevas enfermedades infecciosas frecuentemente, y antiguas enfermedades adquieren nuevos modos de evadir los intentos humanos de tratamiento, prevención y erradicación. Además, con el gran progreso contra enfermedades infecciosas tales como vacunas y antibióticos, los patógenos también han desarrollado farmacorresistencia a través de 1) producir una enzima que destruye el fármaco, 2) alterar la diana molecular del fármaco de manera que ya no es sensible al fármaco o 3) impedir el acceso a la diana. Por tanto, los patógenos resistentes a fármacos son un problema creciente.

A pesar de los diversos modos en los que los patógenos se han desarrollado para invadir seres humanos, sólo hay patrones limitados en los que la maquinaria de defensa del huésped reacciona frente a la infección. La maquinaria de defensa del huésped incluye tanto el sistema inmunitario adaptativo como el sistema inmunitario innato. Mientras que el sistema inmunitario adaptativo recuerda encuentros previos con patógenos específicos y los destruye con la ayuda del sistema inmunitario innato cuando vuelven a atacar, el sistema inmunitario innato no es específico para un patógeno particular del modo en el que el sistema inmunitario adaptativo lo es. Por tanto, el sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa frente a patógenos invasores y se requiere también para iniciar respuestas inmunitarias adaptativas específicas.

Las respuestas inmunitarias innatas se basan en la capacidad del cuerpo para reconocer características conservadas de patógenos que no están presentes en el huésped no infectado. Estas características incluyen, por ejemplo, la pared celular de peptidoglucanos y flagelos de bacterias, así como lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas y ácidos teicoicos en bacterias Gram-positivas, zimosano, glucano y quitina en las paredes celulares de hongos y ARN bicatenario de la mayoría de los virus. Muchas de estas moléculas específicas de patógenos se reconocen por proteínas receptoras de tipo Toll en células inflamatorias. En vertebrados, moléculas de superficie microbianas también activan el complemento, un grupo de proteínas sanguíneas que actúan conjuntamente rompiendo la membrana del microorganismo, seleccionando como diana microorganismos para su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos y produciendo una respuesta inflamatoria. Las células fagocíticas usan una combinación de enzimas degradativas, péptidos antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno para destruir los microorganismos invasores. Las células inflamatorias también degradan el tejido necrótico formado a consecuencia de la infección a través de enzimas internas o de secreción. Además, liberan moléculas de señalización que desencadenan una respuesta inflamatoria y comienzan a reunir las fuerzas del sistema inmunitario adaptativo. Células infectadas con virus se reconocen por macrófagos a través de células muertas/moribundas, receptores de tipo Toll y defensinas. Estos macrófagos responden además secretando citocinas inflamatorias, hidrolizando proteínas virales en fagolisosomas y presentan las proteínas virales a las proximidades de ganglios linfáticos y el bazo para activar más células inflamatorias. El sistema del complemento también puede reconocer los virus, activar las células inflamatorias para destruir el virus e inducir además al sistema inmunitario adaptativo para que genere anticuerpos.

Tal como se comentó anteriormente, en el sistema inmunitario innato, las células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) desempeñan el papel central en la defensa del huésped frente a todos los tipos de infección, que oscilan entre virus y bacterias, protozoos y hongos unicelulares, y metazoos complejos grandes tales como gusanos parásitos. Las células inflamatorias buscan activamente, engullen y destruyen patógenos directamente o a través de una variedad de receptores de superficie celular tales como receptores de tipo Toll y receptores del complemento. Si

un patógeno es demasiado grande tal como parásitos grandes, un grupo de macrófagos y neutrófilos se reunirán alrededor del invasor. Macrófagos activados también reclutan células fagocíticas adicionales a los sitios de infección. Células inflamatorias también secretan una variedad de moléculas de señalización para mediar en y amplificar la respuesta inflamatoria. En la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células B contra patógenos infecciosos, el anticuerpo recién generado se une a los antígenos en los patógenos a través de su fragmento Fab y a los receptores de superficie (FcR) en las células inflamatorias (principalmente macrófagos) a través de su fragmento Fc y por tanto unen las células inflamatorias a patógenos y además los destruyen.

Basándose en el descubrimiento dado a conocer, la administración de plasminógeno y sus derivados desempeña un papel pluripotente en la protección frente a por ejemplo artritis bacteriana inducida por *S. aureus*, infección de heridas abiertas y otitis media activando células inflamatorias, destruyendo bacterias, eliminando tejido necrótico, potenciando la expresión de citocinas y promoviendo una remodelación tisular normal. Todos estos efectos son diferentes aspectos de las potentes funciones que ejercen células inflamatorias frente a todo tipo de infecciones. Se ha desarrollado una hipótesis de trabajo para explicar todos los datos que se tienen. En esta hipótesis, el punto clave es que el plasminógeno potencia la actividad de células inflamatorias y por tanto media en los procesos tales como destrucción de bacterias, eliminación de tejido necrótico, potenciación de la expresión de citocinas y promoción de una remodelación tisular normal. Tal como se indicó anteriormente, las células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) desempeñan el papel central en la defensa del huésped frente a todo tipo de infección, que oscilan entre virus y bacterias, protozoos y hongos unicelulares, y metazoos complejos grandes tales como gusanos parásitos. Por tanto, los descubrimientos notificados en la invención actual apoyan la conclusión de que el plasminógeno y sus derivados son candidatos a fármacos novedosos en la defensa del huésped frente a todas las enfermedades infecciosas y necrosis.

Se han mostrado ejemplos de esta invención para demostrar los potentes papeles antiinfecciosos del sistema activador de plasminógeno desde diferentes ángulos y en diferentes modelos. El ejemplo 1 demuestra que ratones $plg^{-/-}$ tienen destrucción de tejido mucho más grave e inflamación crónica más grave en comparación con ratones $plg^{+/+}$ tras la inducción de artritis bacteriana. Estos ratones $plg^{-/-}$ tienen también una alteración en la destrucción de bacterias (ejemplo 3) y niveles inferiores de expresión de IL-10 (ejemplo 9), pero la infiltración de las articulaciones infectadas por macrófagos y neutrófilos no está abiertamente alterada en ratones $plg^{-/-}$ (ejemplo 4). El tratamiento con antibiótico destruye las bacterias y reduce la inflamación, pero no disminuye la formación de tejido necrótico en ratones $plg^{-/-}$ (ejemplo 2). Sin embargo, la complementación sistémica o local de ratones $plg^{-/-}$ con plasminógeno humano (Plgh) restauró la defensa normal del huésped frente a artritis bacteriana inducida por *S. aureus* (ejemplos 5 y 6) y aumentó la expresión de proteína IL-6 en las articulaciones de rodilla infectadas (ejemplo 8). La complementación local de ratones $plg^{+/+}$ con plasminógeno humano potencia la defensa del huésped frente a la infección por *S. aureus* (ejemplo 7), lo que indica fuertemente que el plasminógeno es un agente antiinfección excelente superior a los antibióticos y puede usarse eficazmente en animales normales de tipo natural. La importancia del sistema de activación de plasminógeno en la defensa del huésped y remodelación tisular contra la infección se demuestra además por el uso de ratones $uPA^{-/-}$ (ejemplo 10). El ejemplo 10 muestra que factores que activan el plasminógeno también pueden ser útiles como agente terapéutico ya que el plasminógeno parece ser menos eficaz en ausencia de un activador. Además, los papeles esenciales del plasminógeno en la defensa del huésped frente a la infección se confirmaron adicionalmente mediante el uso de ratones $plg^{-/-}$ en otro modelo de artritis bacteriana (inyección i.v. de bacteria, ejemplos 11 y 12) y otros dos modelos de infección de heridas abiertas, herida por incisión (ejemplo 13) y herida por quemaduras por escaldadura (ejemplo 14). La investigación del desarrollo espontáneo de otitis media indica que todos los ratones $plg^{-/-}$ estudiados tienen infección de oído mientras que todos los ratones $plg^{+/+}$ permanecieron no infectados (ejemplo 17). La recuperación de bacterias de los tejidos del oído demuestra que sólo se identificó 1 tipo de bacterias en 1 de 6 ratones $plg^{+/+}$, mientras que se identificaron 4 tipos de bacterias en 5 de 6 ratones $plg^{-/-}$ (ejemplos 15 y 16). Globalmente, estos ejemplos han caracterizado los papeles pluripotentes del plasminógeno a partir de diversos aspectos antiinfecciosos y apoyan fuertemente la conclusión de que el plasminógeno y sus derivados son candidatos a fármacos novedosos en la defensa del huésped frente a todas las enfermedades infecciosas.

Puesto que los compuestos de plasminógeno y métodos de la presente invención proporcionan una respuesta inflamatoria dirigida a infección o estados necróticos, los compuestos y métodos de la presente invención pueden proporcionar una defensa frente a todas las enfermedades infecciosas, especialmente enfermedad infecciosa bacteriana, y necrosis. Tales estados de infección incluyen enfermedades infecciosas y otras enfermedades en las que se observa comúnmente infección de tejido, por ejemplo durante la defensa frente a la infección, úlceras crónicas y úlceras diabéticas. Tales necrosis existen no sólo en el modelo de enfermedad estudiado por el presente documento, sino también otros tipos de enfermedades que también pueden inducir necrosis de tejido, tales como necrosis de la cabeza femoral avascular, necrosis papilar, osteonecrosis de cadera, necrosis cortical renal, necrosis tubular aguda, necrosis retiniana aguda, necrosis tubular aguda, infarto de miocardio, necrosis pancreática, colitis isquémica, fascitis necrotizante. Hay muchas causas de necrosis incluyendo lesión, infección, cáncer, infarto, envenenamiento, heridas de cicatrización lenta y no cicatrizantes, diabetes e inflamación. Además, se descubrió que persisten permanentemente todas de inflamación grave, destrucción de tejido, necrosis y crecimiento bacteriano en animales deficientes en plasminógeno, ofreciendo por tanto un modelo novedoso para estudiar la infección bacteriana y necrosis de tejido, y métodos de selección para identificar y evaluar fármacos y métodos de tratamiento para potenciar la infección bacteriana y necrosis de tejido.

Por consiguiente, en un primer aspecto la invención se refiere al uso de un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto que tiene la capacidad para activar plasminógeno o bien directamente o bien indirectamente mediante la activación de un componente aguas arriba de la ruta de activación de plasminógeno para la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

En una realización preferida el componente de la ruta de activación de plasminógeno se selecciona de plasminógeno, plasmina recombinante humana, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, plasmina, variantes y análogos de plasminógeno y plasmina que comprenden uno o más de los dominios kringle y proteasa de plasminógeno, mini-plasminógeno.

En otra realización preferida el compuesto con la capacidad para activar plasminógeno se selecciona de estreptocinasa, saruplasa, alteplasa, reteplasa, tenecteplasa, anistreplasa, monteplasa, lanoteplasa, pamiteplasa, estafilocinasa y formas recombinantes y variantes de los componentes de la ruta de activación de plasminógeno.

En general, el componente de la ruta de activación de plasminógeno o el compuesto con la capacidad para activar plasminógeno puede administrarse por vía sistémica, por vía local, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, mediante inhalación, por vía intratecal, mediante inyección local, mediante inyección intraarticular o por vía rectal. En una realización preferida, se usan administración tópica y/o inyección local.

Además, el componente de la ruta de activación de plasminógeno o el compuesto con la capacidad para activar plasminógeno puede administrarse en combinación con un portador polipeptídico adecuado tal como albúmina, gelatina y similares y/o uno o más agente(s) estabilizante(s) tal(es) como un detergente, una ciclodextrina, un sacárido, dimetilsulfóxido, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, un antioxidante, un quelante de metal, un inhibidor enzimático y similares. Tales aditivos pueden usarse para mejorar la estabilidad del producto de muchos modos, incluyendo minimizando la adsorción/absorción, reduciendo la agregación, mejorando la solubilidad, reduciendo la oxidación y reduciendo la degradación. Se conocen ampliamente en la técnica métodos para idear un portador adecuado para una proteína dada.

Además, a modo de ejemplo el componente de la ruta de activación de plasminógeno o el compuesto con la capacidad para activar plasminógeno puede administrarse a una dosis de 0,0001 a aproximadamente 1 g, preferiblemente de 0,005 mg a aproximadamente 100 mg, más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 50 mg. La dosis en mg está en relación con los centímetros cuadrados de área infectada (es decir mg/centímetros cuadrados de área infectada)

Además, la administración del componente de la ruta de activación de plasminógeno o el compuesto con la capacidad para activar plasminógeno puede por ejemplo repetirse al menos una vez, preferiblemente al menos cada día.

En el contexto de la presente invención y el alcance de las reivindicaciones, el sujeto puede ser cualquier sujeto mamífero, especialmente un sujeto humano.

Además, en otra realización preferida la enfermedad infecciosa es una enfermedad infecciosa bacteriana.

Especialmente, la enfermedad infecciosa bacteriana se selecciona de artritis bacteriana, infecciones tales como neumonía, lesiones en los órganos respiratorios provocadas por infecciones, infecciones secundarias a las lesiones en los tejidos articulares provocadas por infecciones. Especialmente, tal como se ilustra mediante los ejemplos adjuntos, la invención es eficaz para tratar artritis bacteriana.

Staphylococcus aureus es el microorganismo más frecuentemente asociado con artritis bacteriana, que da como resultado inflamación sinovial, destrucción de cartílago y hueso y finalmente deformidad articular.

La artritis bacteriana es una enfermedad articular rápidamente progresiva y altamente destructiva en seres humanos. Todas las enfermedades articulares destructivas, incluyendo trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, están vinculadas con un aumento de la incidencia de artritis bacteriana. Determinadas formas de terapia tales como implantes articulares y tratamiento inmunosupresor presentan un aumento de la frecuencia de artritis bacteriana. *S. aureus* es el agente causante en aproximadamente el 60% de los casos de artritis bacteriana no gonocócica. En pacientes con enfermedades reumáticas, este valor es incluso superior, aproximándose al 75%. Se han usado previamente modelos de laboratorio de artritis bacteriana. En la mayoría de los casos, se han inyectado bacterias por vía intraarticular. La morbimortalidad debida a infecciones por *S. aureus* en las articulaciones sigue siendo alta a pesar del uso de antibióticos más nuevos. El aumento de prevalencia de la resistencia a múltiples antibióticos en *S. aureus* es un problema de salud pública importante. Por tanto, hay una gran necesidad de un agente potente, novedoso, que pueda aumentar significativamente la defensa del huésped.

Se conoce ampliamente que la colonización inmediata por la flora de la piel normal del paciente (por ejemplo *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*) se produce tras una lesión. Especialmente tras la introducción de la penicilina G a principios de la década de 1950, que dio como resultado la práctica eliminación de *Streptococcus pyogenes* como causa de infección en pacientes con lesiones térmicas, *S. aureus* se convirtió en el principal agente etiológico de la infección de heridas. Por tanto *S. aureus* es una de las especies bacterianas más comunes en la infección de heridas abiertas. Las heridas por incisión y las heridas por quemaduras son los tipos de heridas más comunes observadas en la práctica clínica. Similar a la situación en artritis bacteriana, debido al creciente problema de la farmacorresistencia de bacterias, hay una gran necesidad de un agente potente, novedoso, que pueda aumentar significativamente la defensa del huésped.

Básicamente, puesto que compuestos de plasminógeno y métodos de la presente invención proporcionan una respuesta inflamatoria dirigida a una infección o enfermedad infecciosa o estados necróticos, los compuestos y métodos de la presente invención pueden proporcionar un tratamiento eficaz de todas las enfermedades infecciosas reivindicadas.

Los agentes bacterianos y fúngicos que pueden provocar una enfermedad infecciosa o síntomas y que pueden tratarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, familias bacterianas y hongos: *Actinomyces* (por ejemplo, *Nocardia*), *Acinetobacter*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, Bacillaceae (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides fragilis*), *Blastomycosis*, *Bordetella*, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella*, *Candidia*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), *Coccidioides*, *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *Cryptococcus*, *Dermatocycoses*, *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigenica y *E. coli* enterohemorrágica), *Enterobacter* (por ejemplo *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (*Klebsiella*, *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*), *Serratia*, *Yersinia*, *Shigella*), *Erysipelothrix*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenza* tipo B), *Helicobacter*, *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Leptospira*, *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Mycoplasma*, *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), Neisseriaceae (por ejemplo, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*), Pasteurellaceae, *Proteus*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae, espiroquetas (por ejemplo, *Treponema spp.*, *Leptospira spp.*, *Borrelia spp.*), *Shigella spp.*, *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), *Meningococcus*, *Pneumococcus* y *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos grupos A, B, y C), y *Ureaplasmas*.

Estas familias bacterianas, parásitas, y fúngicas pueden provocar enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: septicemia tal como bacteremia, septicemia hemorrágica; y fungemia; infecciones bacterianas del sistema nervioso central tales como neuroborreliosis de Lyme, meningitis bacteriana y encefalitis, toxoplasmosis cerebral y neurosífilis; infecciones bacterianas del ojo, tales como conjuntivitis bacteriana, queratoconjuntivitis infecciosa, queratitis infecciosa, tuberculosis ocular y uveítis; infecciones del oído bacterianas tales como otitis media, otitis externa; enfermedades de transmisión sexual tales como infecciones por *Chlamydia*, gonorrea y sífilis; enfermedades infecciosas de la piel tales como celulitis, dermatomicosis y enfermedades bacterianas de la piel tales como actinomicosis, angiomatosis, ectima, erisipelas, infecciones de la piel por estafilococos, sífilis cutánea y tuberculosis cutánea; vaginosis bacteriana; infecciones del tracto respiratorio tales como tos ferina y neumonía tal como neumonía pneumocócica, neumonía estafilocócica y neumonía por micoplasmas; infecciones del tracto urinario tales como bacteriuria; infecciones de heridas tales como infecciones de heridas quirúrgicas, úlceras cutáneas infectadas crónicas, necrosis, infecciones de heridas abiertas; artritis bacteriana; enfermedades óseas infecciosas tales como osteítis, osteomielitis, periostitis, espondilitis y tuberculosis osteoarticular; infecciones cardiovasculares tales como endocarditis bacteriana, sífilis cardiovascular y tuberculosis cardiovascular; enfermedades periodontales tales como gingivitis y periodontitis; infecciones oportunistas relacionadas con SIDA; infecciones pélvicas; complicaciones del embarazo infecciosas; que por consiguiente pueden tratarse según la presente invención. Para un listado más extenso de enfermedades infecciosas para las que la invención sería eficaz, se hace referencia a la página web <http://www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/quicklinks.htm>, o a cualquier revista de revisión relevante en la técnica que dé a conocer enfermedades infecciosas (véase la bibliografía).

Ya que la ruta de activación de plasminógeno y los compuestos de la presente invención proporcionan una respuesta inflamatoria a infecciones virales de una manera similar que para infecciones bacterianas y estados necróticos, los compuestos y métodos de la presente invención proporcionan una defensa útil de manera similar contra infecciones virales y estados que incluyen los enumerados a continuación.

Los agentes virales que pueden provocar una enfermedad infecciosa o síntomas y que pueden tratarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, infecciones por arbovirus, tales como lengua azul, dengue, encefalitis por arbovirus, fiebre del flebotomo, fiebre del valle del Rift, enfermedades transmitidas por garrapatas y fiebre amarilla; bronquiolitis viral, enfermedades virales del sistema nervioso central, tales como encefalitis, meningitis viral, mielitis, poliomielitis y pseudorrabia; infección por virus de ADN, tal como infecciones por adenovirus, peste porcina africana, infecciones por circovirus, infecciones por hepadnavirus, infecciones por herpesvirus incluyendo pero sin limitarse a herpes simple, herpes zóster e infecciones por citomegalovirus, infecciones por papilomavirus, infecciones por parvovirus, infecciones por poliomavirus e infecciones por poxvirus;

encefalitis viral, tal como encefalitis por arbovirus, encefalitis por herpes simple y encefalitis por varicela zóster, infecciones virales del ojo, tales como conjuntivitis viral, retinitis por citomegalovirus, herpes zóster oftálmico y queratitis herpética, hepatitis viral tal como hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y hepatitis E; infecciones oportunistas, tales como infecciones oportunistas relacionadas con SIDA; neumonía viral; infecciones por virus de ARN, tales como infecciones por arbovirus, infecciones por astrovirus, infecciones por birnavirus, infecciones por bunyavirus incluyendo pero sin limitarse a infecciones por hantavirus, infecciones por calicivirus, encefalitis por arbovirus, infecciones por flavivirus, fiebres hemorrágicas virales, infecciones mononegavirales incluyendo pero sin limitarse a infecciones por rabdovirus tales como rabia, infecciones por paramixovirus tales como infección por morbillivirus incluyendo pero sin limitarse a sarampión, infecciones por pneumovirus incluyendo pero sin limitarse a infección por virus sincitial respiratorio e infecciones por rubulavirus incluyendo pero sin limitarse a paperas, infecciones nidovirales incluyendo pero sin limitarse a infecciones por coronavirus tales como síndrome respiratorio agudo grave, infecciones por ortomixovirus, tales como gripe, infecciones por picornavirus, tales como infecciones por enterovirus, infecciones por reovirus incluyendo pero sin limitarse a infecciones por rotavirus, infecciones por retrovirus incluyendo pero sin limitarse a infecciones por lentivirus e infecciones por togavirus; enfermedades de transmisión sexual virales, enfermedades de la piel virales, tales como eritema infeccioso, exantema súbito, herpes simple, molusco contagioso y verrugas; infecciones virales lentas, tales como SIDA, leucoencefalopatía multifocal progresiva y panencefalitis esclerosante subaguda; infecciones por virus tumorales, tales como infecciones por virus de Epstein-Barr, enfermedad de Marek e infecciones por papilomavirus y viremia.

En otra realización, la composición comprende una combinación de dos o más compuestos que son componentes de la ruta de activación de plasminógeno o compuestos con la capacidad para activar plasminógeno.

Aún en otra realización, la composición comprende además al menos un agente antibiótico.

El agente antibiótico se selecciona por ejemplo del grupo que consiste en tetraciclinas, anfenicoles, beta-lactamas, penicilinas, sulfonamidas, macrólidos, lincosamidas, estreptogaminas, estreptomycinas, quinolonas y metronidazoles, así como cualquier agente antibacteriano, micocida o fungicida apropiado.

Además, aún en otra realización, la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa comprende inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno infeccioso.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad infecciosa, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno a un sujeto que necesita tal tratamiento.

Todavía en otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un kit de partes para su uso en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno y al menos un agente antibiótico, antiviral o antimicótico, en viales separados

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de mejora de la defensa del huésped frente a la infección, que comprende administrar una composición que comprende un agente activo que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno. Preferiblemente, el agente activo se selecciona de plasmina o plasminógeno o un análogo de plasmina o plasminógeno. Lo más preferiblemente, el principio activo es plasminógeno. El agente activo puede administrarse mediante cualquier vía de administración conocida en la técnica. Las vías preferidas, no limitantes, de administración incluyen aplicación tópica e inyección local. El agente también puede estar presente en un vendaje aplicado sobre el área infectada, si es posible, desde el que se transfiere al sitio infectado. El agente también puede estar presente en una disolución de enjuagado, gotas para los ojos y una disolución de gargarismo o similares, aplicadas para limpiar el área infectada.

La invención también proporciona un método de iniciación de la defensa del huésped frente a la infección en condiciones en las que la defensa del huésped frente a infección está retrasada o alterada, que comprende administrar un principio activo que es plasmina o plasminógeno. En una realización particular, el método de la invención puede usarse para mejorar la defensa frente a la infección en estados de bajos niveles locales o sistémicos de plasmina o plasminógeno. Tales condiciones pueden ser congénitas y/o adquiridas.

Los ejemplos de estados congénitos con deficiencia sistémica de plasmina o plasminógeno incluyen pero no se limitan a mutaciones en el gen de plasminógeno (PLG) (n.º de registro de secuencia de referencia de GenBank: NM_000301, ID de gen: 5340; los números de residuos de aminoácido en el presente documento se refieren al péptido humano maduro tal como se define en el n.º de registro de GenBank: NP_000292) dando como resultado

displasminogénias tales como ALA601THR, VAL355PHE, SER572PRO y GLY732ARG, o en deficiencia de plasminógeno tipo I tal como ARG216HIS, TRP597TER, GLU460TER, LYS212DEL y LYS19GLU. En los casos en que está presente deficiencia de plasminógeno congénita, se prefiere administrar un fármaco que es plasminógeno.

5 Los ejemplos de defectos locales y/o sistémicos adquiridos de plasmina o plasminógeno pueden deberse a cambios en estados fisiológicos tales como embarazo, edad avanzada, estrés, obesidad y alteraciones de temperatura. Diversos estados patológicos, cirugía, radiación y dieta también pueden desencadenar mecanismos que conducen a estados fibrinolíticos alterados. Varios fármacos, incluyendo agentes anticancerígenos, anticonceptivos orales, citocinas y componentes sanguíneos también pueden producir déficit fibrinolítico transitorio que puede predisponer a los pacientes a complicaciones tromboticas. La identificación de las poblaciones de pacientes con un estado fibrinolítico alterado es una etapa importante hacia la prevención de complicaciones tromboticas que pueden conducir a acontecimientos catastróficos tales como infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares tromboticos. Tanto métodos funcionales como inmunológicos están actualmente disponibles para el diagnóstico rápido del déficit fibrinolítico. Por tanto, es importante evaluar pacientes que corren el riesgo de complicaciones tromboticas debido a déficit fibrinolítico.

En otra realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de una infección y la potenciación de la defensa frente a la infección en sujetos humanos o no humanos administrando un compuesto o fármaco que es plasminógeno, plasmina, un activador de plasminógeno o un compuesto que potencia la actividad proteolítica de plasmina.

Además, la invención proporciona un método de mejora de la defensa frente a la infección contra artritis bacteriana, que comprende administrar una composición que comprende un principio activo que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno. En una realización preferida, el principio activo es plasminógeno, y la composición se administra mediante aplicación local.

Además, la invención proporciona un método para reducir o prevenir la formación de necrosis mediante la administración de una composición que comprende la administración local o sistémica de una composición que comprende un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno. La composición puede ser parte de un gel, loción, bálsamo, pasta, apósito para heridas o vendaje de heridas. Alternativamente, la composición puede administrarse por vía sistémica. En una realización, el método de la invención se aplica conjuntamente con cirugía plástica para reducir la aparición y la formación de infección, úlcera y necrosis.

Aún en otra realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de una infección y la potenciación de la defensa frente a la infección en sujetos con defectos en la actividad del sistema de plasmina-plasminógeno administrando un compuesto o fármaco que es plasminógeno, plasmina, un activador de plasminógeno o un compuesto que potencia la actividad proteolítica de plasmina.

La invención también proporciona un método para mejorar la defensa del huésped frente a enfermedades infecciosas, administrando una composición que comprende un activador de la actividad de plasminógeno, o un compuesto que imita la expresión de plasminógeno. Preferiblemente, se administra el plasminógeno por vía local para conseguir una alta concentración en el área infectada. En otra realización, la composición comprende un compuesto que imita la actividad de plasminógeno/plasmina y moléculas con actividad similar. Todavía en otra realización, la composición comprende un fármaco que regula por incremento la expresión de plasminógeno.

Breve descripción de los dibujos

Las características anteriores y muchas otras ventajas de la invención se entenderán mejor mediante la referencia a la siguiente descripción detallada cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Figura 1A-H. Histologías de secciones representativas de articulaciones de rodilla artríticas de ratones $plg^{+/+}$ (izquierda) y $plg^{-/-}$ (derecha). Se les administró a ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ una inyección intraarticular de 1×10^6 UFC de *S. aureus*. (A, C, E): Articulaciones de rodilla artríticas de ratones $plg^{+/+}$ en los días 7, 14 y 28, respectivamente, tras la inducción de artritis. (B, D, F): Articulaciones de rodilla artríticas de ratones $plg^{-/-}$ en los días 7, 14 y 28, respectivamente, tras la inducción de artritis. (G): Articulaciones de rodilla artríticas de ratones $plg^{+/+}$ 7 días tras el tratamiento con antibiótico. (H): Articulaciones de rodilla artríticas de ratones $plg^{-/-}$ 7 días tras el tratamiento con antibiótico. Se observa tejido necrótico en la cavidad articular (flecha). Membrana sinovial (Sm).

Figura 2. Cuantificación de tejido necrótico en las articulaciones infectadas en cada punto de tiempo. Se puntuó histológicamente la cantidad de tejido necrótico en las articulaciones infectadas, tal como se describe en Materiales y métodos. Se compararon ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ en el día 7, el día 14 y el día 28 tras la inyección de 1×10^6 UFC de *S. aureus*. Se expresan los resultados como la media \pm DE. ** = $P < 0,01$, mediante la prueba de la t de Student.

Figura 3. Números de neutrófilos y macrófagos en las articulaciones de rodilla infectadas de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ en las que se administró una inyección intraarticular de 1×10^6 UFC de *S. aureus*. A. Se compararon los números de

neutrófilos infiltrados en el día 1, el día 7 y el día 14 tras la inyección bacteriana. Las barras representan el valor medio de 5 ratones. B. Se compararon los números de macrófagos infiltrados en el día 1, el día 7 y el día 14 tras la inyección bacteriana. Las barras representan el valor medio de 5 ratones. Las barras de error muestran las DE.

5 Figura 4A-F. Análisis histológico de la articulación de rodilla completa de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ tras la complementación con plasminógeno. A, B: Articulaciones de rodilla artríticas control de ratones $plg^{+/+}$ en los días 7 y 14, respectivamente, tras la inyección bacteriana. C, D: Articulaciones de rodilla artríticas control (en la que se inyectó PBS) de ratones $plg^{-/-}$ en los días 7 y 14, respectivamente, tras la inyección bacteriana. E: Articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{-/-}$ complementadas con plasminógeno humano (Plgh) desde el día 0 hasta el día 7 tras la inyección bacteriana. F: Articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{-/-}$ complementadas con plasminógeno humano desde el día 7 hasta el día 14 tras la inyección bacteriana.

15 Figura 5A-C. Niveles de expresión de proteína IL-6 en el sinovio. Inmuntinción de secciones representativas de articulaciones de rodilla de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$. A: Articulaciones de rodilla artríticas control tratadas con PBS de ratones $plg^{+/+}$ en el día 7 tras la inyección bacteriana. B: Articulaciones de rodilla artríticas control tratadas con PBS de ratones $plg^{-/-}$ en el día 7 tras la inyección bacteriana. C: Articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{-/-}$ complementadas con plasminógeno humano (Plgh) desde el día 0 hasta el día 7 tras la inyección bacteriana. El color rosa muestra la IL-6 en el sinovio (flecha).

20 Figura 6A-B. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western del nivel de expresión de proteína IL-10 en articulaciones de rodilla no infectadas e infectadas. A, niveles de IL-10 en los lisados. Carril 1: lisados de articulaciones de rodilla no infectadas de ratones $plg^{-/-}$; carril 2: lisados de articulaciones de rodilla no infectadas de ratones $plg^{+/+}$; carril 3: lisados de articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{-/-}$ en el día 3 tras la inyección bacteriana; carril 4: lisados de articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{+/+}$ en el día 3 tras la inyección bacteriana; carril 5: lisados de articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{-/-}$ en el día 7 tras la inyección bacteriana; carril 6: lisados de articulaciones de rodilla artríticas de $plg^{+/+}$ en el día 7 tras la inyección bacteriana. B, niveles de β -actina en los lisados correspondientes a cada carril en A como control. Se repitieron los experimentos al menos 3 veces y se mostraron resultados representativos.

30 Figura 7A-F. Morfología de secciones del oído medio representativas de ratones de tipo natural y ratones deficientes en plg , teñidas con azul de toluidina (A y B) y tinciones inmunohistoquímicas para fibrina (C y D) y queratina (E y F). A. El oído medio de un ratón de tipo natural. No se detecta material de efusión en la cavidad del oído medio (MEC). B. El oído medio de un ratón deficiente en plg . Está presente otitis media en el MEC. C y D. Los oídos medios de un ratón de tipo natural y un ratón deficiente en plg respectivamente, analizados mediante tinción inmunohistoquímica para fibrin(ógeno). E y F. Los oídos medios de un ratón de tipo natural y un ratón deficiente en plg respectivamente, analizados con tinción inmunohistoquímica para queratina. O, huesecillo. Barra de 50 μ m.

40 Figura 8A-H. Tinciones inmunohistoquímicas para células T, células B, macrófagos y neutrófilos en oídos medios de ratones de tipo natural y deficientes en plg . Se analizaron los oídos medios de un control de tipo natural (A, C, E, G) y un ratón deficiente en plg representativo (B, D, F, H) mediante tinciones inmunohistoquímicas de células T (A y B), células B (C y D), macrófagos (E y F) y neutrófilos (G y H). O, huesecillo. Barra de 50 μ m.

45 Figura 9. Números de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones $plg^{-/-}$ y $plg^{+/+}$ con tratamientos local y sistémico diferente tras la inoculación de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en las articulaciones de rodilla.

50 Figura 10. Números de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones $plg^{+/+}$ tras inyección local con Plg (recuadro negro) o PBS (recuadro blanco) 3 días tras la inoculación de *S. aureus* en las articulaciones de rodilla. Obsérvese que en ratones de tipo natural en los que se inyectó por vía local Plg el número de bacterias disminuye significativamente 5 veces en comparación con los de tipo natural en los que se inyectó por vía local PBS.

55 Figura 11. Números de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones deficientes en uPA y de tipo natural. Obsérvese que en ratones de tipo natural el número de bacterias disminuyó rápidamente tras la inoculación de *S. aureus* en el día 0, mientras que en ratones deficientes en uPA el número de bacterias estaba de manera constante por encima de $2,0 \times 10^5$ UFC a lo largo de todo el periodo experimental.

60 Figura 12A-F. Histologías de secciones representativas de articulaciones de rodilla artríticas de ratones deficientes en uPA ($uPA^{-/-}$, izquierda) y de tipo natural ($uPA^{+/+}$, derecha) en los días 7 (A, D), 14 (B, E) y 28 (C, F) tras una inyección intraarticular de 1×10^6 UFC de *S. aureus*. Obsérvese que en ratones $uPA^{-/-}$ hay mucho más edema, destrucción de tejido y formación de tejido necrótico a lo largo de todo el experimento, mientras que en ratones $uPA^{+/+}$ la inflamación estaba tan sólo presente de manera transitoria en el día 7 tras la inducción de artritis y disminuyó después de eso.

65 Figura 13: Comparación de cambios de peso corporal entre ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$. Transcurso de tiempo de cambios de peso corporal tras 1×10^6 UFC de inyección bacteriana. Se comprobó el peso corporal de los ratones cada 24 h, desde el día 1 hasta el día 21.

Figura 14: Gravedad de la artritis septicémica. Resultados de la evaluación de la gravedad en artritis septicémica usando el índice artrítico tal como se describe en materiales y métodos. Se indujo artritis mediante 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips inyectadas por vía intravenosa. Ratones $plg^{+/+}$ (n = 15) y ratones $plg^{-/-}$ (n= 16). Para cada punto de tiempo, se muestran la media \pm EEM. Se realizó una prueba de significación estadística usando la prueba de la u de Mann-Whitney (ratones deficientes frente a ratones control). * P < 0,05 se consideró significativo.

Figura 15A-H: La deficiencia de plasminógeno agrava las características histológicas de la artritis septicémica. Histologías de secciones de articulaciones de garra teñidas con safranina-O. Morfología de las secciones representativas de articulaciones de garra artríticas tras la inyección intravenosa de 1×10^6 UFC de *S. aureus* en ratones $plg^{+/+}$ (izquierda) y $plg^{-/-}$ (derecha). Articulaciones de garra artríticas de ratones de tipo natural en los días 1 (A), 3 (B), 7 (C) y 14 (D) tras el comienzo de la artritis. Articulaciones de garra artríticas de ratones $plg^{-/-}$ en los días 1 (E), 3 (F), 7 (G) y 14 (H) tras el comienzo de la artritis.

Figura 16A-B: Tejido necrótico en articulaciones de tobillo infectadas. Se basó la necrosis en la observación histológica. Algunas muestras que se identificaron como necrosis se confirmaron adicionalmente mediante tinción TUNEL.

Figura 17A-B: Deposición de fibrina en las articulaciones de tobillo infectadas. Detección inmunohistoquímica de fibrina en articulaciones de rodilla artríticas. Se tiñeron secciones de tejido incrustadas en parafina con un anticuerpo de conejo anti-fibrin(ógeno) murino. El color marrón indica positividad. Articulación de rodilla artrítica en el día 14 en ratones $plg^{+/+}$ (izquierda) y $plg^{-/-}$ (derecha) tras el comienzo de la artritis. Deposición de fibrina similar en las articulaciones infectadas de $plg^{-/-}$ y $plg^{+/+}$.

Figura 18. Números de bacterias en tejido de heridas de ratones $plg^{-/-}$ con tratamientos locales de plg o PBS tras la inducción de una herida por incisión en la que se inocularon por vía local 1×10^7 UFC de *S. aureus* Phillips en la piel dorsal.

Figura 19A-B. Aspecto representativo de ratones $plg^{-/-}$ con tratamientos locales de plg o PBS tras la inducción de una herida por incisión en la que se inocularon por vía local 1×10^7 UFC de *S. aureus* Phillips en la piel dorsal.

Figura 20. Números de bacterias en tejido de heridas de ratones $plg^{-/-}$ con tratamientos locales de plg o PBS tras la inducción de una herida por quemaduras en las que se inocularon por vía local 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en la piel de la escaldadura.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Se comentan a continuación determinados términos, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y cómo preparar y usar las mismas.

“Un compuesto del grupo que comprende: plasminógeno, plasmina, un componente de la ruta de activación de plasminógeno, un análogo de plasminógeno, tal como mini-plasmina, un análogo de plasmina, un análogo de un componente de la ruta de activación de plasminógeno, un activador de plasminógeno” se refiere a un compuesto que proporciona directa o indirectamente el efecto de plasminógeno o plasmina, respectivamente.

“Un componente de la ruta de activación de plasminógeno” se refiere a plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, variantes y análogos de plasminógeno que comprenden uno o más dominios de plasminógeno tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico mostrados a modo de ejemplo por mini-plasminógeno; plasmina y variantes y análogos de plasmina que comprenden al menos uno o más dominios de plasmina tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, mostrados a modo de ejemplo por mini-plasmina y delta-plasmina; un activador de plasminógeno que tiene el efecto final de activar plasminógeno, por ejemplo mediante una cascada de acontecimientos que dan como resultado la formación o activación de plasminógeno mostrado a modo de ejemplo por uPA y tPA y variantes y análogos de tPA y uPA que comprenden uno o más dominios de tPA o uPA tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico. Las variantes de plasminógeno, plasmina, tPA y uPA incluyen todas las variantes genéticas que se producen de manera natural de ser humano así como otras formas de mamífero de estas proteínas, así como variantes mutantes de estas proteínas obtenidas mediante reemplazos de aminoácidos conservativos. Un “análogo” de plasminógeno o plasmina es un compuesto que proporciona esencialmente un efecto análogo al plasminógeno o plasmina, respectivamente, tal como se mide mediante enzimografía, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) y FACS (clasificador celular activado por fluorescencia). Existe también un ensayo para medir los niveles de actividad de plasmina convertida tal como se describió previamente: Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C., Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P., y Ny, T. (1999). Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* 140, 5030-5035.). Un “análogo” de un componente de la ruta de activación de plasminógeno es un compuesto que proporciona esencialmente un efecto análogo a un componente de la ruta de activación de plasminógeno tal como se mide

mediante los niveles de actividad de plasmina que activa este análogo.

“Necrosis” se refiere a muerte de tejido en el cuerpo. Esto sucede cuando no se suministra suficiente sangre al tejido, ya sea por lesión, radiación o productos químicos. La necrosis no es reversible. Hay muchas causas de necrosis incluyendo lesión, infección, cáncer, infarto, envenenamiento, heridas crónicas, úlceras e inflamación.

“Tópica” y “aplicación tópica” se refieren a administración no sistémica, local de un principio activo. Por tanto, aplicación tópica puede referirse a la aplicación de un principio activo a la superficie externa del área de interés.

“Inyección local” se refiere a administración no sistémica, local de un principio activo al tejido de/cercano al área de interés.

“Inyección intraarticular” se refiere a administración local de un principio activo al espacio articular entre dos huesos en conexión.

“Enfermedades infecciosas” e “infección” se refieren a la colonización perjudicial de un organismo huésped por una especie foránea. En una infección, el organismo infectante busca utilizar los recursos del huésped para multiplicarse (habitualmente a expensas del huésped). El organismo infectante, o patógeno, interfiere con el funcionamiento normal del huésped y puede conducir a heridas crónicas, gangrena, pérdida de una extremidad infectada e incluso muerte. La respuesta del huésped a la infección es la inflamación. Coloquialmente, se considera habitualmente que un patógeno es un organismo microscópico, los más familiares son virus y bacterias. Otros patógenos infecciosos son viroides y organismos eucariotas, que oscilan entre protozoos y hongos unicelulares, y metazoos complejos grandes tales como gusanos parásitos.

La “actividad” de una proteína o compuesto se refiere al efecto que tiene la proteína o el compuesto sobre una reacción específica, y es una medida de su capacidad para afectar, modular, participar en o promover la reacción. Generalmente, puede medirse la actividad de una proteína u otro compuesto. Por ejemplo, en el caso de enzimas tales como plasmina, PA y MMP y moduladores de la actividad enzimática puede expresarse como la velocidad a la que se produce el producto de la reacción, representada, por ejemplo, como la cantidad de producto producida por unidad de tiempo y de enzima (por ejemplo, concentración o peso). En el caso de moduladores tales como PAI-1 o uPA, la actividad puede referirse a la capacidad del modulador para inhibir o promover, aumentar o disminuir, regular por incremento o disminución la velocidad de una reacción o la cantidad de producto formado a partir de la reacción.

Una “herida” es una rotura en la estructura de un órgano o tejido, incluyendo epitelio, tejido conjuntivo y tejido muscular, provocada por un agente externo. Los ejemplos de heridas incluyen pero no se limitan a, magulladuras, rasguños, desgarros, cortes, pinchazos y quemaduras. Un tipo particular de heridas son las que son una consecuencia de procedimientos de cirugía plástica.

“Otitis media” se define como estados inflamatorios del oído. La otitis media, incluyendo otitis media aguda (OMA) y otitis media con efusión (OME), es la enfermedad infantil más común excepto el resfriado común (5). El factor etiológico más importante relacionado con la otitis media son infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio superior. La composición bioquímica de las efusiones del oído medio en otitis media refleja cambios inflamatorios en la mucosa del oído medio. El fluido es una mezcla de transudados y productos secretores de glándulas así como productos de bacterias y células inflamatorias.

“Tratamiento” de un sujeto, o “tratar” a un sujeto de una enfermedad o estado en el presente documento significa reducir o aliviar los síntomas clínicos de la enfermedad o estado tal como cicatrización de heridas lenta o alterada.

“Potenciar” la cicatrización de heridas significa aumentar la velocidad mediante la cual la herida se cicatriza. Alternativamente, “potenciar” la cicatrización de heridas significa reducir las formaciones de tejido cicatricial durante o tras la cicatrización.

Un “sujeto” en el presente documento incluye animales tanto humanos como no humanos. Los animales no humanos incluyen, sin limitación, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, hámsteres, cobayas, etc.; animales domésticos tales como perros y gatos; y animales de granja tales como ovejas, cabras, cerdos, caballos y vacas. Un animal no humano de la presente invención puede ser un animal mamífero o no mamífero; un vertebrado o un invertebrado.

Un “control”, “valor de control” o “valor de referencia” en un ensayo es un valor usado para detectar una alteración en, por ejemplo, la cicatrización de una herida cutánea, o la cicatrización de una membrana timpánica perforada, o cualquier otro ensayo descrito en el presente documento. Por ejemplo, cuando se estudia la cicatrización de una perforación de la membrana timpánica, el efecto inhibitor/estimulador de un agente puede evaluarse comparando la cicatrización de una herida o perforación con la de un control. El control o referencia puede ser, por ejemplo, un valor de referencia predeterminado, o puede determinarse experimentalmente. En un ensayo de este tipo, por ejemplo, un control o referencia puede ser la cicatrización de una perforación o herida similar en un animal no expuesto al fármaco o agente activo.

Un sujeto "en riesgo de", "predispuesto a" o "susceptible a" una enfermedad o estado significa que el riesgo de que el individuo contraiga o desarrolle la enfermedad o estado es superior a la población promedio.

5 Una "deficiencia" de un compuesto significa que la cantidad, el nivel o la concentración del compuesto es significativamente inferior que un valor control. Por ejemplo, en un animal deficiente en plasminógeno, los niveles tisulares y en fluidos corporales de plasminógeno son significativamente inferiores que en un animal de tipo natural.

10 Tal como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "de manera aproximada" significará dentro del 50 por ciento, preferiblemente dentro del 20 por ciento, más preferiblemente dentro del 5 por ciento, de un valor o intervalo dado.

15 Un valor que es "sustancialmente diferente" de otro valor puede significar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los dos valores. Puede usarse cualquier método estadístico adecuado conocido en la técnica para evaluar si las diferencias son significativas o no. Una diferencia "estadísticamente significativa" significa que se determina una significación a un intervalo de confianza de al menos el 90%, más preferiblemente a un intervalo de confianza del 95%.

20 Definiciones de biología molecular

Según la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985); Hames y Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames y Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

30 Si apareciesen en el presente documento, los siguientes términos tendrán las definiciones expuestas a continuación.

Una "proteína" o "polipéptido", términos que se usan de manera intercambiable en el presente documento, comprende una o más cadenas de elementos estructurales químicos denominados aminoácidos que están unidos entre sí por enlaces químicos denominados enlaces peptídicos.

35 Una "enzima" significa cualquier sustancia, preferiblemente compuesta completamente o en gran medida por proteína, que cataliza o promueve, más o menos específicamente, una o más reacciones químicas o bioquímicas. El término "enzima" puede referirse también a un polinucleótido catalítico (por ejemplo ARN o ADN). Una enzima de "prueba" es una sustancia que se somete a prueba para determinar si tiene propiedades de una enzima.

40 Una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula "nativa" o "de tipo natural" significa una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula que se produce en la naturaleza.

45 Una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula "mutante", "alterada", "variante" o "modificada" significa una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula que se ha alterado o derivado, o es de algún modo diferente o está cambiada, de una proteína, enzima, polinucleótido, gen o célula original. Una alteración en un gen incluye, pero no se limita a, alteración de la región promotora, u otras regiones que afectan a la transcripción, que pueden dar como resultado niveles de expresión alterados de una proteína. Una proteína o enzima mutante o modificada se expresa habitualmente, aunque no necesariamente, a partir de un gen o polinucleótido mutante.

50 Una "mutación" o "alteración" significa cualquier proceso o mecanismo que dé como resultado una proteína, polinucleótido, gen o célula mutante. Esto incluye cualquier mutación en la que una secuencia de proteína, polinucleótido o gen está alterada, cualquier secuencia de proteína, polinucleótido o gen que surge de una mutación, cualquier producto de expresión (por ejemplo proteína) expresado a partir de una secuencia de polinucleótido o gen mutada, y cualquier cambio detectable en una célula que surge de una mutación de este tipo.

55 "Variantes de función conservativas" son proteínas o enzimas en las que un residuo de aminoácido dado se ha cambiado sin alterar la conformación y función globales de la proteína o enzima, incluyendo, pero sin limitarse a, reemplazo de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (tal como, por ejemplo, ácidas, básicas, hidrófobas, y similares), "reemplazos de aminoácidos conservativos". Se conocen ampliamente en la técnica aminoácidos con propiedades similares. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos hidrófilos-básicos y pueden ser intercambiables. De manera similar, isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede reemplazarse por leucina, metionina o valina. Aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima de modo que el porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos o proteína entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99% tal como se determina según un esquema de alineación tal como el método de Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante de función conservativa" también incluye un polipéptido o enzima que tiene al menos el 60% de

identidad de aminoácidos tal como se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos el 75%, lo más preferiblemente al menos el 85% e incluso más preferiblemente al menos el 90%, y que tiene propiedades o funciones iguales o sustancialmente similares a la enzima o proteína nativa u original con la que se compara.

5

El sistema de activación del plasminógeno

La plasmina es el componente clave del sistema de PA. Es una proteasa de amplio espectro que tiene la capacidad para degradar varios componentes de la ECM incluyendo fibrina, gelatina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (6). Además, la plasmina puede convertir algunas pro-metaloproteinasas de la matriz (pro-MMP) en MMP activas. Por tanto, se ha sugerido que la plasmina puede ser un importante regulador anterior de la proteólisis extracelular. La plasmina se forma a partir del zimógeno plasminógeno a través de escisión proteolítica mediante cualquiera de dos PA fisiológicos, tPA o uPA. Ya que el plasminógeno está presente en el plasma y otros fluidos corporales a niveles relativamente altos, la regulación del sistema de PA se produce principalmente al nivel de la síntesis y actividad de los PA. La síntesis de los componentes del sistema de PA está altamente regulada por diferentes factores tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Además, existen inhibidores fisiológicos específicos de plasmina y PA. El principal inhibidor de plasmina es α_2 -antiplasmina (7). La actividad de PA está regulada por PAI-1, que inhibe tanto uPA como tPA, y PAI-2, que inhibe principalmente uPA. Determinadas células tienen también un receptor de superficie celular específico para uPA (uPAR) que puede dirigir la actividad proteolítica a la superficie celular.

20

El plasminógeno es una glicoproteína de cadena sencilla que consiste en 791 aminoácidos (péptido humano maduro, n.º de registro de GenBank: NP_000292) con una masa molecular de aproximadamente 92 kDa (8;9). El plasminógeno se sintetiza principalmente en el hígado y es abundante en la mayoría de los fluidos extracelulares. En plasma, la concentración de plasminógeno es de aproximadamente 2 μ M. Por tanto, el plasminógeno constituye una gran fuente potencial de actividad proteolítica en tejidos y fluidos corporales. El plasminógeno existe en dos formas moleculares: Glu-plasminógeno y Lys-plasminógeno. La forma secretada y no escindida nativa tiene un ácido glutámico amino-terminal (N-terminal) y se designa por tanto como Glu-plasminógeno. Sin embargo, en presencia de plasmina, Glu-plasminógeno se escinde en Lys⁷⁶-Lys⁷⁷ convirtiéndose en Lys-plasminógeno. En comparación con Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno tiene una afinidad superior por fibrina y se activa por PA a una tasa superior. Estas dos formas de plasminógeno pueden escindirse en el enlace peptídico Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ por uPA o tPA, dando como resultado la formación de la proteasa bicatenaria unida por disulfuros plasmina. La parte amino-terminal del plasminógeno contiene cinco bucles triples homólogos, denominados kringles, y la parte carboxilo-terminal contiene el dominio proteasa. Algunos de los kringles contienen sitios de unión de lisina que median en la interacción específica de plasminógeno con fibrina y su inhibidor α_2 -AP. Un hallazgo novedoso e interesante es que un fragmento de plasminógeno de 38 kDa, que consiste en los kringles 1-4, es un potente inhibidor de la angiogénesis. Este fragmento se denomina angiostatina y puede generarse a partir de plasminógeno a través de escisión proteolítica mediante varias MMP.

25

30

35

40

45

El principal sustrato de la plasmina es la fibrina, y la disolución de la fibrina es fundamental para la prevención de la formación de coágulos sanguíneos patológica (10). La plasmina también tiene especificidades de sustrato para otros varios componentes de la ECM, incluyendo laminina, fibronectina, proteoglicanos y gelatina, lo que indica que la plasmina también desempeña un importante papel en la remodelación de la ECM. Indirectamente, la plasmina puede degradar también componentes adicionales de la ECM a través de su capacidad para convertir algunas pro-MMP en MMP activas, incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Por tanto, se ha sugerido que la plasmina puede ser un importante regulador anterior de la proteólisis extracelular.

Modelos de artritis bacteriana para estudiar la infección

Staphylococcus aureus es el microorganismo más frecuentemente asociado con artritis bacteriana, que da como resultado inflamación sinovial, destrucción de cartílago y hueso, y eventualmente deformidad articular (11). Se ha observado que diversas especies animales incluyendo mamíferos, aves y reptiles desarrollan artritis por *S. aureus* espontánea y por tanto son posibles modelos para la inducción de la enfermedad. Considerando la vía de cómo los estafilococos se propagan a través del cuerpo para alcanzar las articulaciones, que es un rasgo importante, se ha mostrado claramente que la gran mayoría de las infecciones articulares bacterianas en seres humanos se propagan de manera hematogena. Por tanto, el modo óptimo para suministrar bacterias vivas para proporcionar un modelo de infección es mediante inyección intravenosa (i.v.). Por otro lado, la vía intraarticular de inoculación bacteriana evita los estadios tempranos de patogénesis y por tanto proporciona un modelo más definido de artritis bacteriana. Por tanto, en los presentes estudios, se ha usado principalmente como modelo la vía intraarticular para suministrar bacterias con el fin de estudiar mejor el crecimiento bacteriano local, la destrucción de tejido, la formación de tejido necrótico y la inflamación. Sin embargo, también se realizaron una serie de estudios de artritis bacteriana usando *S. aureus* por medio de inyección i.v. Los datos obtenidos de ambos modelos han mostrado resultados comparables y ambos apoyaron la conclusión de que el plasminógeno/la plasmina es esencial en la defensa del huésped frente a la artritis bacteriana inducida por *S. aureus*.

55

60

65

Se conoce ampliamente que la colonización inmediata por la flora de la piel normal del paciente (por ejemplo *S.*

aureus y *Streptococcus pyogenes*) se produce tras una lesión. Especialmente tras la introducción de la penicilina G al principio de la década de 1950, que dio como resultado la práctica eliminación de *Streptococcus pyogenes* como causa de infección en pacientes con lesiones térmicas, *S. aureus* se convirtió en el principal agente etiológico de la infección de heridas. Por tanto, *S. aureus* es una de las especies bacterianas más comunes en la infección de heridas abiertas. Las heridas por incisión y las heridas por quemaduras son los tipos de heridas más comunes observadas en la práctica clínica. Por tanto, en la solicitud de patente actual, los modelos de infección de heridas abiertas que se han usado son infecciones por *S. aureus*, el principal agente etiológico de la infección de heridas, en heridas por incisión y quemaduras, los tipos de heridas más comunes en la práctica. Por tanto, se considera que los datos obtenidos de estos dos modelos de infección de heridas abiertas proporcionan una indicación muy importante de la viabilidad de aplicar el conocimiento a la situación clínica.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo ilustrativos de la invención, y de ningún modo limitan el alcance y significado de la invención. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta memoria descriptiva, y pueden hacerse sin apartarse de su espíritu y alcance.

EJEMPLO 1

Destrucción de tejido e inflamación persistente en ratones $plg^{-/-}$ durante la artritis bacteriana inducida por *S. aureus*

Este ejemplo muestra que ratones deficientes en plasminógeno tenían destrucción de tejido e inflamación persistente en comparación con hermanos control de tipo natural. Hay cambios histopatológicos significativamente más graves en ratones $plg^{-/-}$ que en ratones $plg^{+/+}$ durante la artritis bacteriana inducida por *S. aureus*.

Métodos

Ratones. Se cruzaron ratones heterocigotos para plasminógeno ($plg^{+/-}$) de antecedentes genéticos mixtos (129 x C57BL/6) para generar ratones $plg^{+/+}$, $plg^{+/-}$ y $plg^{-/-}$. Se usaron ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ macho a 8-12 semanas de edad para los experimentos (Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van Vlaenderen I, Moons L, Plow EF, Collen D: Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 1995, 92:2585-2593).

Inducción de artritis bacteriana. La cepa bacteriana usada en el estudio fue *S. aureus* Phillips (cortesía del Dr. Höök, Departamento de reumatología e inmunología clínica, Universidad de Gotemburgo, Suecia). Se indujo artritis mediante inyección local de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* Phillips en 10 μ l de PBS estéril en las articulaciones de la rodilla derecha de los ratones. Como controles, se inyectaron en las articulaciones de la rodilla izquierda 10 μ l de PBS estéril solo. Se sacrificaron los ratones en diferentes puntos de tiempo tras la inoculación y se tomaron muestras para evaluar la gravedad de la enfermedad. El Comité de Ética Regional de la Universidad de Umeå aprobó todos los protocolos experimentales.

Análisis histológico. En los días 7, 14 y 28 tras la inyección bacteriana, se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de articulaciones de rodilla completas para el análisis histológico. En resumen, en primer lugar se fijaron las articulaciones de rodilla en paraformaldehído al 4%, se incrustaron en parafina y después de eso se prepararon secciones de 8 μ m. Se tiñeron portaobjetos que contenían secciones de tejido con safranina-O para el análisis histológico. Se incluyeron al menos 10 articulaciones de rodilla en cada grupo experimental.

Cuantificación de tejido necrótico en las articulaciones infectadas. Se tomaron las imágenes de las secciones histológicas de articulaciones de rodilla con una cámara digital Leica DC300F acoplada a un microscopio Leica DM LB (Leica, Wetzlar, Alemania). Para la determinación de la cantidad de tejido necrótico en las articulaciones infectadas, se dividieron las imágenes de secciones histológicas de articulaciones de rodilla completas en 50 x 40 cuadrículas a 50 aumentos. Se contó cada cuadrado dentro de la cuadrícula que contenía el tejido necrótico como un "acierto". Se contaron tres secciones independientes, seleccionadas al azar de cada articulación y se usaron 5 articulaciones de ratones separados del mismo genotipo en cada punto de tiempo. Se calcularon los valores medios del "acierto" y se mostraron.

Resultados

Para estudiar los efectos de la plasmina sobre el desenlace clínico de la artritis bacteriana, se les inyectó a los ratones 1×10^6 UFC de *S. aureus* Philips en las articulaciones de rodilla. Después de eso, se sacrificaron los ratones en diferentes puntos de tiempo y se disecaron las articulaciones de rodilla. Los exámenes macroscópicos de muestras de articulaciones de rodilla de los días 7, 14 y 28 tras la inyección intraarticular revelaron que los ratones $plg^{+/+}$ tenían niveles similares de hinchazón ligera en las articulaciones de rodilla. Sin embargo, en ratones $plg^{-/-}$, los tamaños de las articulaciones de rodilla en las que se inyectaron bacterias aumentaron durante todo el periodo experimental. En el día 28, las articulaciones de rodilla en las que se inyectaron bacterias estaban significativamente

agrandadas, las cavidades articulares estaban llenas de material purulento y las superficies sinoviales sobresalían fuertemente.

Se prepararon las articulaciones de rodilla en las que se inyectaron bacterias de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ en los días 7, 14 y 28 para el análisis histológico. Tal como se muestra en la figura 1, se observó una artritis considerablemente más grave en ratones $plg^{-/-}$ que en ratones $plg^{+/+}$ en todos los puntos de tiempo de observación. En el día 7 en ratones $plg^{+/+}$, se habían infiltrado células inflamatorias en la cavidad articular, la membrana sinovial era más gruesa de lo normal y la superficie del cartílago se había degradado (figura 1A, Sm). En el día 14, se observaban células inflamatorias adyacentes al hueso erosionado (figura 1C, flecha). Sin embargo, en el día 28, el número de células inflamatorias había disminuido y había comenzado la reparación tisular del hueso y el cartílago dañados (figura 1E). El patrón de desarrollo de la enfermedad era completamente diferente en ratones $plg^{-/-}$. En el día 7 en ratones $plg^{-/-}$, se habían infiltrado una gran cantidad de células inflamatorias en la cavidad articular, varias partes del hueso estaban erosionadas y se observaba tejido necrótico (figura 1B). En el día 14, la membrana sinovial se había vuelto más gruesa que en el día 7 y el área necrótica había aumentado. La degradación del cartílago y la erosión del hueso eran mucho más graves que en el día 7 (figura 1D). En el día 28, la articulación de rodilla completa se había degradado casi completamente, quedando sólo tejido necrótico y pequeñas partes del cartílago (figura 1F). Estudios semicuantitativos de las secciones de muestras indicaron que los ratones $plg^{-/-}$ tenían niveles significativamente superiores de la necrosis de tejido que en ratones $plg^{+/+}$ durante todo el desarrollo de la enfermedad (figura 2). Estos datos indican que hay cambios histopatológicos significativamente más graves en ratones $plg^{-/-}$ que en ratones $plg^{+/+}$ durante la artritis bacteriana inducida por *S. aureus*.

EJEMPLO 2

El tratamiento con antibiótico destruye las bacterias y reduce la inflamación, pero no disminuye la formación de tejido necrótico en ratones $plg^{-/-}$

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por la administración de antibióticos a algunos de los animales.

Tratamiento con antibiótico. Se disolvió el antibiótico cloxacilina (AstraZeneca, Södertälje, Suecia) en PBS estéril y se inyectó por vía intraperitoneal en ratones a una dosificación de 0,5 mg/g de peso corporal cada 12 horas, comenzando en el día 7 tras la inyección bacteriana. Se sacrificaron los ratones en el día 14 tras la inyección bacteriana.

Resultados

También se investigaron los efectos del tratamiento con antibiótico sobre el desarrollo de la enfermedad en ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$. Se les inyectaron a los ratones bacterias en el día 0 y se trataron con cloxacilina dos veces al día desde el día 7 hasta el día 14 tras la inyección bacteriana. La recuperación de bacterias a partir de las articulaciones infectadas en el día 14 indicó que las bacterias se destruyeron completamente en ratones $plg^{-/-}$ tras el tratamiento con cloxacilina (datos no mostrados). El análisis histopatológico reveló que la inflamación había disminuido en ratones $plg^{+/+}$ tras el tratamiento con antibiótico (figura 1G) en comparación con ratones que no se habían tratado con cloxacilina (figura 1C). En ratones $plg^{-/-}$ tratados con cloxacilina, los niveles de inflamación eran todavía más altos que en ratones $plg^{+/+}$ con el mismo tratamiento. El cartílago y el hueso se habían reparado en gran medida (figura 1H). De manera perceptible, quedaban pequeñas áreas de tejido necrótico en el sinovio (flecha, figura 1H). Estos datos revelan que la administración intraperitoneal de cloxacilina eliminó exitosamente las bacterias de las articulaciones de rodilla, redujo la destrucción de tejido y restauró los procesos de reparación tisular en ratones $plg^{-/-}$. Sin embargo, quedaba una gran área de tejido necrótico en las articulaciones de rodilla de ratones $plg^{-/-}$ tras el tratamiento con antibiótico.

EJEMPLO 3

La deficiencia de plasminógeno altera el aclaramiento bacteriano

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por los recuentos bacterianos.

Recuentos bacterianos. En los días 2, 3, 4, 5, 7, 14 y 28 tras la inyección bacteriana, se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados en placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias en cada homogeneizado.

Resultados

Se investigó entonces el crecimiento bacteriano en las articulaciones de rodilla de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ tras la inducción de artritis bacteriana. Tal como se muestra en la tabla 1, en ratones $plg^{+/+}$, la cantidad de *S. aureus* en las articulaciones de rodilla infectadas disminuyó inmediatamente a partir del día 2 tras la inyección bacteriana. En el día 7, no podía detectarse *S. aureus* en el 50% (7/14) de los ratones $plg^{+/+}$. En el día 14, no podía detectarse *S. aureus* en el 80% (8/10) de los ratones $plg^{+/+}$, y se encontraron menos de 1×10^3 UFC en los otros 2 ratones. En el día 28, se eliminaron completamente las bacterias en todos los ratones $plg^{+/+}$. En agudo contraste, todos los ratones $plg^{-/-}$ tenían *S. aureus* en las articulaciones de rodilla inyectadas a lo largo de todo el periodo experimental (tabla 1). En el día 28, la cantidad de *S. aureus* en las articulaciones inoculadas de ratones $plg^{-/-}$ era 27 veces superior a la cantidad inyectada en el día 0. Estos datos muestran que el aclaramiento de bacterias en las articulaciones de rodilla de ratones $plg^{-/-}$ estaba alterado, lo que sugiere que la plasmina está implicada en el proceso de destrucción de bacterias durante la defensa del huésped frente a la infección.

Tabla 1. Recuperación de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ tras la inyección intraarticular de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Philips

Días tras la inyección bacteriana	Número medio de bacterias*		Incidencia**	
	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$	$Plg^{+/+}$	$Plg^{-/-}$
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	indetectable	$(2,7 \pm 0,6) \times 10^7$	0/10	10/10

*Recuentos bacterianos promedio en articulaciones de rodilla que tenían niveles detectables de bacterias vivas.

**Los datos representan el número de articulaciones de rodilla con niveles detectables de bacterias vivas dividido entre el número total de articulaciones de rodilla examinadas en cada grupo.

EJEMPLO 4

La infiltración de las articulaciones infectadas por macrófagos y neutrófilos no está abiertamente alterada en ratones $plg^{-/-}$

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por el análisis inmunohistoquímico y el recuento de células inflamatorias.

Análisis inmunohistoquímico. Se desparafinaron secciones incrustadas en parafina (8 μ m), se rehidrataron y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0,3% durante 10 min. Tras la incubación con suero de conejo al 5% a temperatura ambiente durante 20 minutos, se incubaron los portaobjetos a 4°C durante la noche con anticuerpos primarios de rata anti-ratón contra macrófagos (clon F4/80, MCAP497, Serotec, RU) o contra neutrófilos (MCA771G, Serotec, RU), respectivamente. Después de eso, para las inmunotinciones de macrófagos y neutrófilos, se enjuagaron los portaobjetos y se incubaron adicionalmente con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata (SC-2019, Santa Cruz, California) a temperatura ambiente durante 1 hora.

Recuento de células inflamatorias. El número total de células por sección derivado de un área de 5 campos a x400 aumentos. Se realizó el procedimiento de recuento completo por duplicado para cada sección y se calculó un valor medio por sección. Se contaron tres secciones independientes de cada articulación y se usaron cinco articulaciones de ratones separados del mismo genotipo en cada punto de tiempo.

Resultados

Se realizó el análisis inmunohistoquímico para investigar la infiltración de macrófagos y neutrófilos en las articulaciones de rodilla infectadas en ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$. Se cuantificó la infiltración de células inflamatorias contando el número de células teñidas positivamente presentes en las secciones. Se contaron tres secciones independientes de cada articulación y se incluyeron 5 muestras de articulaciones de cada genotipo en cada punto de tiempo en el estudio (figura 3A y 3B). En ratones tanto $plg^{+/+}$ como $plg^{-/-}$, se habían infiltrado números similares de neutrófilos y macrófagos en el sinovio de las articulaciones de rodilla infectadas en el plazo de 24 horas de la inyección bacteriana. Después de eso, en los días 7 y 14, los números de neutrófilos y macrófagos acumulados en ratones tanto $plg^{+/+}$ como $plg^{-/-}$ habían aumentado significativamente en comparación con el día 1. Estos datos

indican que, desde el plazo de 24 horas hasta el día 14 tras la inyección bacteriana, ni la infiltración de neutrófilos ni la de macrófagos en las articulaciones infectadas estaba alterada en ratones $plg^{-/-}$ en comparación con ratones $plg^{+/+}$. Sin embargo, aunque la infiltración de neutrófilos y macrófagos estaba abiertamente alterada en ratones $plg^{-/-}$, la función normal de estas células, especialmente la capacidad para destruir bacterias, estaba gravemente comprometida

EJEMPLO 5

La complementación sistémica de ratones $plg^{-/-}$ con plasminógeno humano (Plgh) restauró la defensa normal del huésped frente a la infección por *S. aureus*

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por la administración de plasminógeno humano a algunos de los ratones y el análisis de tipo Western.

Complementación de ratones $plg^{-/-}$ con plasminógeno humano.

Para el protocolo experimental 1, se indujo artritis mediante inoculación local de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en 10 μ l de PBS estéril en ambas articulaciones de rodilla de los ratones. 6 horas antes de la inoculación bacteriana, se complementó cada uno de 6 ratones $plg^{-/-}$ con 1 mg de plasminógeno humano (Plgh) (Biopool, Umeå, Suecia) en 100 μ l de PBS estéril mediante inyección intravenosa (i.v.) a intervalos de 24 horas durante 7 días. Como controles, se les inyectó a 6 ratones $plg^{+/+}$ y 6 $plg^{-/-}$ PBS estéril solo a intervalos de 24 horas durante 7 días de periodo experimental. Se sacrificaron los ratones en el día 7 tras la inyección bacteriana y se disecaron muestras de articulaciones de rodilla, se descalcificaron y se procesaron para el análisis histológico e inmunohistoquímico.

Para el protocolo experimental 2, se indujo artritis como en el protocolo experimental 1. A partir del día 7 tras la inoculación bacteriana, se complementó cada uno de 6 ratones $plg^{-/-}$ con 1 mg de Plgh en 100 μ l de PBS estéril mediante inyección i.v. Se inyectó la misma cantidad de plasminógeno después de eso a intervalos de 24 horas durante 7 días. Como controles, se les inyectó a 6 ratones $plg^{+/+}$ y 6 $plg^{-/-}$ PBS estéril solo a intervalos de 24 horas durante 7 días. Se sacrificaron los ratones en el día 14 tras la inyección y se disecaron muestras de articulaciones de rodilla, se descalcificaron y se procesaron para el análisis histológico.

Resultados

Para confirmar que la plasmina desempeña un papel en la defensa del huésped frente a la artritis bacteriana inducida por *S. aureus*, se investigó el desarrollo de artritis bacteriana en ratones $plg^{-/-}$ complementados con Plgh. Se realizó en primer lugar un experimento en el que se complementaron 6 ratones $plg^{-/-}$ con Plgh desde el día 0 hasta el día 7 tras la inyección bacteriana. Entonces se investigaron los efectos de la complementación de Plgh sobre 6 ratones $plg^{-/-}$ que ya habían desarrollado artritis bacteriana durante 7 días. Tal como se muestra en las figuras 4A y 4B, cuando ratones $plg^{+/+}$ recibieron PBS estéril, se observaron niveles de inflamación moderados en el sinovio y la estructura ósea estaba relativamente intacta. Tal como se muestra en las figuras 4C y 4D, cuando ratones $plg^{-/-}$ recibieron sólo PBS estéril, se observó tejido necrótico en partes de los tejidos sinoviales, la inflamación y destrucción de tejido eran mucho más graves que en el grupo de $plg^{+/+}$. Cuando se complementaron ratones $plg^{-/-}$ con Plgh desde el día 0 hasta el día 7 (figura 4E), las características histopatológicas se asemejaban a las de ratones $plg^{+/+}$ que recibieron PBS. Tal como se muestra en la figura 4F, cuando se les administró a ratones $plg^{-/-}$ Plgh desde el día 7 hasta día 14, la morfología de las articulaciones estaba sustancialmente más intacta que la de ratones $plg^{-/-}$ que recibieron PBS, y los niveles de inflamación eran comparables a los del grupo control de $plg^{+/+}$. Además, había un área muy pequeña de tejido necrótico en el sinovio en el grupo que recibió Plgh. Tal como se muestra en la tabla 2, también se restauró la capacidad para destruir bacterias cuando se complementaron ratones $plg^{-/-}$ con Plgh durante 7 días tras la inyección bacteriana. Estos datos muestran claramente que se requiere esencialmente plasmin(ógeno) para el aclaramiento de *S. aureus* en articulaciones de rodilla artríticas y para la integridad de la defensa del huésped frente a la infección.

Tabla 2. Recuperación de bacterias en las articulaciones de rodilla infectadas tras la complementación de ratones $plg^{-/-}$ con plasminógeno

	Recuentos bacterianos medios en las articulaciones* (UFC)		
	Ratones $Plg^{+/+}$ a los que se les administró PBS	Ratones $Plg^{-/-}$ a los que se les administró PBS	Ratones $Plg^{-/-}$ a los que se les administró plasminógeno humano
Días 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
Días 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

*Recuentos bacterianos promedio en articulaciones de rodilla que tenían cantidades detectables de bacterias vivas.

**P < 0,01. Se comparó el grupo de ratones plg^{-/-} a los que se les administró plasminógeno humano con el grupo de ratones plg^{-/-} a los que se les administró PBS.

EJEMPLO 6

La complementación local de ratones plg^{-/-} con plasminógeno humano (Plgh) restauró la defensa normal del huésped frente a la infección por *S. aureus*

Métodos

Se indujo artritis bacteriana mediante inoculación local de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips en 10 µl de PBS estéril en ambas articulaciones de rodilla de ratones. 15 minutos tras la inoculación bacteriana, se complementó un lado de las articulaciones de rodilla de 6 ratones plg^{-/-} con 40 µl de plasminógeno humano (10 µg/µl en PBS, Biopool, Umeå, Suecia) mediante inyecciones locales alrededor del tejido de la articulación de la rodilla. Después de eso, se complementó plasminógeno humano a intervalos de 24 horas durante 7 días. Como controles para las inyecciones locales, se les inyectó a 6 ratones plg^{-/-} por vía local alrededor del tejido de la articulación de la rodilla 40 µl de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso a intervalos de 24 horas durante 7 días de periodo experimental. Como controles para los ratones de tipo natural, se les administró a 2 ratones plg^{+/+} 40 µl de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso cada 24 horas durante 7 días. Como controles para los ratones plg^{-/-} con inyecciones sistémicas, se les administró a 2 ratones plg^{-/-} 100 µl de plasminógeno humano (10 µg/µl) por vía intravenosa 1 hora antes de la inoculación bacteriana y después de eso cada 24 horas durante 7 días.

Se sacrificaron los ratones en el día 7 tras la inoculación bacteriana y se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados en placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

Resultados

7 días de inyección local de plasminógeno en ratones plg^{-/-} a los que se les inoculó *S. aureus* disminuyeron exitosa y significativamente las cantidades de bacterias hasta 100 veces en comparación con el tratamiento local con PBS en estos ratones (tabla 3 y figura 9). Tanto ratones plg^{-/-} con inyección sistémica de plasminógeno humano o ratones plg^{+/+} con inyección local de PBS también han destruido exitosamente *S. aureus* en sus articulaciones de rodilla. Estos datos demuestran claramente que la inyección local de plasminógeno humano puede restaurar la capacidad de destrucción de bacterias normal en los ratones plg^{-/-}.

Tabla 3. Número de bacterias en ratones plg^{-/-} y plg^{+/+} con diferentes tratamientos locales y sistémicos en el día 3 tras la inoculación de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias (media±DE, x 10 ⁶ UFC)
Plg ^{-/-} con inyección local de Plgh	6	0,019±0,044*
Plg ^{-/-} con inyección local de PBS	6	1,09±0,55
Plg ^{-/-} con inyección sistémica de Plgh	2	0,00075±0,0011*
Plg ^{+/+} con inyección local de PBS	2	0,00065±0,00092*

*, P<0,05, en comparación con el grupo de ratones plg^{-/-} con inyección local de PBS.

EJEMPLO 7

La complementación local de ratones plg^{+/+} con plasminógeno humano potencia la defensa del huésped frente a la infección por *S. aureus*

Métodos

Se indujo artritis bacteriana mediante inoculación local de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips en 10 µl de PBS estéril en articulaciones de rodilla de ratones. 15 minutos tras la inoculación bacteriana, se complementó un lado de las articulaciones de rodilla de 7 ratones plg^{+/+} con 50 µl de plasminógeno humano (Plgh, 10 µg/µl en PBS, Biopool, Umeå, Suecia) mediante inyecciones locales bajo la piel de la rodilla y alrededor del tejido de la articulación de la rodilla. Después de eso, se complementó plasminógeno humano en el mismo patrón a intervalos de 24 horas desde el día 0 hasta día 2. Como controles para las inyecciones locales, se les inyectó a 7 ratones plg^{+/+} por vía local bajo la piel de la rodilla y alrededor del tejido de la articulación de la rodilla 50 µl de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso se realizaron las mismas inyecciones locales a intervalos de 24 horas desde el día 0 hasta el día 2 del periodo experimental.

Se sacrificaron los ratones en el día 3 tras la inoculación bacteriana y se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados sobre placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

Resultados

La inyección local en las articulaciones de rodilla de plasminógeno humano durante 3 días en ratones $plg^{+/+}$ redujo exitosa y significativamente el número de *S. aureus* vivas 5 veces en comparación con el grupo de $plg^{+/+}$ control tratado con PBS. Estos datos demuestran claramente que el plasminógeno humano es un potente factor proinflamatorio que potencia la defensa del huésped frente a la infección bacteriana incluso en un animal de tipo natural. Estos datos (tabla 4, figura 10) indican además que el plasminógeno es un candidato a fármaco antiinfeccioso novedoso para uso clínico.

Tabla 4. Número de bacterias en ratones de tipo natural ($plg^{+/+}$) a los que se les inyectó por vía local plasminógeno humano o PBS en el día 3 tras la inoculación de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias (media±DE, x 10^6 UFC)
$Plg^{+/+}$ con inyección local de Plgh	7	0,031±0,011*
$Plg^{+/+}$ con inyección local de PBS	7	0,14±0,047

*, $P < 0,05$, en comparación con el grupo de ratones $plg^{+/+}$ con inyección local de PBS.

EJEMPLO 8

La complementación de ratones $plg^{-/-}$ con plasminógeno aumentó la expresión de proteína IL-6 en las articulaciones de rodilla infectadas

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 5, excepto por la tinción inmunohistoquímica de IL-6.

Para la inmunotinción de IL-6, se enjuagaron los portaobjetos y se incubaron con anticuerpo de conejo anti-IgG de conejo (P0217, DAKO, Dinamarca) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se reveló la reacción cromogénica mediante el kit de sustrato de DAKO (K3464, sustrato AEC de DakoCytomation, EE.UU.) y se contratiñeron los portaobjetos con hematoxilina. Portaobjetos incubados con suero de conejo en lugar del anticuerpo primario sirvieron como control negativo, se mostró que eran todos negativos.

Resultados

Se ha notificado que IL-6 está implicada en la activación, el crecimiento y la diferenciación de linfocitos y la falta de IL-6 potencia la susceptibilidad a la infección. Por tanto, se investigó si la plasmina tiene algún efecto sobre la expresión de IL-6 durante la artritis bacteriana. Se tomaron muestras para la sección de tejido durante la complementación de ratones $plg^{-/-}$ con Plgh y se procesaron mediante tinciones inmunohistoquímicas. Cuando ratones $plg^{-/-}$ recibieron PBS estéril durante 7 días tras la inyección bacteriana, los niveles de proteína IL-6 eran significativamente inferiores en comparación con ratones $plg^{+/+}$ (figura 5A y 5B). Tal como se muestra en la figura 5C, cuando ratones $plg^{-/-}$ recibieron Plgh durante 7 días tras la inyección bacteriana, la expresión de proteína IL-6 aumentó hasta un nivel similar que en los ratones $plg^{+/+}$. Estos datos muestran que la plasmina está implicada en la regulación de la expresión de IL-6 en articulaciones de rodilla durante la artritis bacteriana.

EJEMPLO 9

Niveles superiores de expresión de IL-10 en articulaciones de $plg^{+/+}$ en comparación con articulaciones de $plg^{-/-}$

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por el análisis de inmunotransferencias de tipo Western.

Análisis de inmunotransferencias de tipo Western

En los días 3 y 7 tras la inyección bacteriana, se sacrificaron los ratones y se recogieron articulaciones de rodilla completas. Se homogeneizaron las articulaciones y se lisaron en tampón NP-40 (Nonidet P-40 al 0,5%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NaF 1 mM, EDTA 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, PMSF 0,25 mM, aprotinina 5 μ g/ml,

leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y glicerol al 15%) durante 30 min. sobre hielo. Se ajustaron los lisados para obtener una concentración de proteína igual. Se realizaron los análisis de inmunotransferencias de tipo Western tal como se describió (12), usando un anticuerpo de cabra anti-IL-10 de ratón (AF-417-NA, R & D systems, RU) y anticuerpo monoclonal de ratón contra β-actina (Sigma-Aldrich Sweden AB, Estocolmo, Suecia). Los anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-ratón conjugados con peroxidasa del rábano (HRP) eran de Biorad (Hecules, CA, EE.UU.).

Resultados

Estudios previos han demostrado que la interleucina-10 (IL-10) tiene efectos antiinflamatorios en un modelo animal de artritis septicémica (13). Para estudiar si la plasmina tiene algún efecto sobre la expresión de IL-10 durante la artritis bacteriana, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para comparar los niveles de IL-10 entre ratones *plg^{+/+}* y *plg^{-/-}*. En los días 3 y 7 tras la inyección bacteriana, se lisaron homogeneizados de articulaciones y se procesaron con inmunotransferencia de tipo Western para detectar IL-10. Los ratones *plg^{-/-}* tienen niveles de IL-10 drásticamente inferiores en comparación con ratones *plg^{+/+}* en articulaciones de rodilla no infectadas (figura 6A, carriles 1 y 2, respectivamente). En el día 3, los niveles de IL-10 en ratones de ambos genotipos eran elevados, aunque *plg^{-/-}* tienen todavía niveles notablemente inferiores de IL-10 en comparación con ratones *plg^{+/+}* (figura 6A, carriles 3 y 4). En el día 7, los ratones *plg^{-/-}* tienen todavía los mismos niveles de IL-10 en comparación con el día 3, mientras que los niveles de IL-10 disminuyeron en ratones *plg^{+/+}* (figura 6A, carril 5, carril 6). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que IL-10 en concierto con IL-6 puede regular el proceso inflamatorio durante la artritis bacteriana y que la plasmina está implicada en la regulación de la expresión de IL-6 e IL-10.

EJEMPLO 10

uPA es importante para la defensa del huésped y la remodelación tisular frente a la infección de la rodilla inducida por *S. aureus*

Métodos

En el día 0, se indujo artritis bacteriana mediante inoculación intraarticular local de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en 10 µl de PBS estéril en articulaciones de rodilla de ratones de tipo natural y deficientes en uPA (*uPA^{-/-}*) (14). Se sacrificaron los ratones en los días 7, 14, 21 y 28, y se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados sobre placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

En otro experimento, se indujo en ratones deficientes en uPA y de tipo natural artritis bacteriana mediante inoculación intraarticular local de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en 10 µl de PBS estéril en articulaciones de rodilla. En los días 7, 14 y 28 tras la inyección bacteriana, se sacrificaron los ratones y se recogieron muestras de articulaciones de rodilla completa para el análisis histológico. En resumen, en primer lugar se fijaron las articulaciones de rodilla en paraformaldehído al 4%, se incrustaron en parafina, y después de eso se prepararon secciones de 8 µm. Se tiñeron portaobjetos que contenían secciones de tejido con safranina-O para el análisis histológico. Se incluyeron al menos 10 articulaciones de rodilla en cada grupo experimental.

Resultados

Tras la inducción de artritis bacteriana inducida por *S. aureus* en ratones de tipo natural y deficientes en uPA, en el grupo de tipo natural, el número medio de bacterias disminuye continuamente desde el día 7 hasta el día 28. En el día 14, 4 de 7 ratones han eliminado las bacterias completamente. Sin embargo, en el grupo deficiente en uPA, el número medio de bacterias es básicamente constante desde el día 0 hasta el día 28 (figura 11). Aunque el número de bacterias disminuyó tras el día 14, no era significativamente diferente entre el día 14 y el día 28. Aunque se terminó el experimento en el día 28 tras la inoculación bacteriana, es altamente improbable que los ratones deficientes en uPA puedan destruir las bacterias en puntos de tiempo posteriores porque la articulación de la rodilla se ha deshecho totalmente tras el día 14. Desde el día 14 en adelante se acumulan niveles extensos de tejido necrótico en las articulaciones de rodilla deficientes en uPA. Para los exámenes histológicos, mientras que los ratones de tipo natural mostraban inflamación transitoria en el día 7 y los niveles de inflamación disminuyeron rápidamente después de eso, los ratones deficientes en uPA mostraban edema e inflamación de tejido persistente, destrucción de tejido extensa y formación de tejido necrótico a lo largo de todo el periodo experimental (figura 12). Estos datos (tabla 5, figura 11 y 12) demuestran claramente que uPA es importante en la destrucción de bacterias durante la defensa del huésped frente a artritis inducida por *S. aureus*, e implican además que los componentes de la ruta de activador de plasminógeno desempeñan papeles críticos durante la defensa del huésped frente a la infección.

Tabla 5. Incidencia y número de bacterias en ratones deficientes en uPA y de tipo natural tras la inducción de artritis bacteriana inducida por *S. aureus*

Días	Deficiente en uPA		De tipo natural		Valor de P**
	Número de bacterias (UFC)	Incidencia*	Número de bacterias (UFC)	Incidencia*	
Día 0	$1,0 \times 10^6$	2/3	$1,0 \times 10^6$	2/3	
Día 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
Día 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
Día 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
Día 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

*, la incidencia se define como la proporción del número de articulaciones de rodilla infectadas con respecto al número de articulaciones de rodilla totales examinadas en ese punto de tiempo.

** el valor de P se calcula mediante la comparación de los números de bacterias de todas las articulaciones entre ratones deficientes en uPA y ratones de tipo natural en el punto de tiempo respectivo.

EJEMPLO 11

Niveles superiores de pérdida de peso corporal y gravedad de artritis en artritis bacteriana de ratones $plg^{-/-}$ tras la inyección intravenosa de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en 200 μ l de PBS estéril

Métodos

Se indujo artritis bacteriana en ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ mediante inyección intravenosa (i.v.) de 1×10^6 UFC de *S. aureus* Phillips en 200 μ l de PBS estéril. Se siguieron los ratones individualmente cada día tras la inoculación. Se inspeccionaron las garras cada 24 horas y se sacrificaron todos los ratones en el día 21 tras la inoculación. Se definió la artritis como hinchazón visible de la articulación y/o eritema de la palma, la muñeca y el tobillo. Para evaluar la intensidad de la artritis, se llevó a cabo una puntuación clínica (índice artrítico), usando un sistema en el que la inspección macroscópica produjo una puntuación de 0-5 puntos para cada garra. (0 = normal, 1 = eritema o hinchazón marginal; 2 = eritema e hinchazón leves; 3 = eritema e hinchazón moderados; 4 = eritema e hinchazón marcados; 5 = deformidad e hinchazón marcados). Se calculó la puntuación total añadiendo las puntuaciones de las 4 garras para cada animal sometido a prueba, dando como resultado una puntuación artrítica que oscilaba entre 0 y 20 para cada ratón individual. Se determinó el peso de los ratones cada día desde el día 0 hasta el día 21.

Resultados

Para evaluar si la deficiencia en plasminógeno afecta a la invasión bacteriana en las articulaciones en el modelo de artritis bacteriana inducida por inyección intravenosa, se siguieron el día de aparición y la incidencia de artritis, definida como eritema e hinchazón marginales (tabla 6) cada 24 horas tras la inoculación bacteriana. El día de comienzo en ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ fue $5,0 \pm 2,2$ y $4,4 \pm 2,0$ respectivamente ($P = 0,5021$). Además, la incidencia de artritis entre ratones $plg^{+/+}$ y ratones $plg^{-/-}$ era idéntica. Estos resultados indican que ratones tanto $plg^{+/+}$ como $plg^{-/-}$ son susceptibles a la artritis inducida por *S. aureus* mediante inoculación intravenosa. Sin embargo, se percibió una observación sorprendente en este estudio, el 38% (12/32) de los ratones $plg^{-/-}$ estaban paralizados en la parte trasera, mientras que sólo el 3,3% (1/30) de los ratones $plg^{+/+}$ mostró parálisis.

Con el fin de seguir la situación de salud general tras la inoculación intravenosa de *S. aureus*, se midió el peso de cada ratón cada día durante el periodo experimental. Tal como se muestra en la figura 13, durante la primera semana de infección, los ratones tanto $plg^{+/+}$ como $plg^{-/-}$ mostraron una pérdida de peso sustancial, que alcanzó el máximo del 24% y el 26% del peso corporal en el día 7, respectivamente. 7 días tras la infección, el peso corporal de los ratones $plg^{+/+}$ había aumentado gradualmente. En contraposición, se observó de manera continua una pérdida de peso significativa en ratones $plg^{-/-}$ a lo largo de todo el experimento ($p < 0,05$).

Se siguió también el desarrollo clínico de artritis bacteriana durante 3 semanas en ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$ tras inocularse por vía i.v. con 1×10^6 *S. aureus*. Tal como se muestra en la figura 14, los ratones tanto $plg^{+/+}$ como $plg^{-/-}$ desarrollaron artritis bacteriana. No había ninguna diferencia en la gravedad de la inflamación durante los primeros 3 días entre ratones $plg^{+/+}$ y $plg^{-/-}$. Sin embargo, desde el día 7 en adelante, los ratones $plg^{-/-}$ tenían una inflamación más grave que los ratones $plg^{+/+}$, y la diferencia era significativa ($p < 0,05$). En ratones $plg^{+/+}$, la gravedad alcanzó un máximo en el día 14 y disminuyó gradualmente después de eso. Al final del experimento, 8 de 28 ratones $plg^{+/+}$ se recuperaron de la artritis. En ratones $plg^{-/-}$, la gravedad de la artritis aumentó durante todo el experimento, y ninguno de los ratones $plg^{-/-}$ se recuperaron de la artritis al final del experimento. Tomados conjuntamente, estos datos indican claramente que el plasminógeno no es esencial en la invasión de bacterias de la circulación sanguínea, pero

es esencial en la defensa del huésped contra la infección bacteriana en las articulaciones de rodilla y en el mantenimiento de la situación de salud durante la artritis bacteriana.

5 Tabla 6. Comparación de los principales rasgos de la artritis bacteriana en ratones plg^{+/+} y plg^{-/-} tras la inyección intravenosa de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips en 200 µl de PBS estéril

	Plg ^{+/+}	Plg ^{-/-}
Día de comienzo (media ± EEM)	5,0 ± 2,2	4,4 ± 2,0
Incidencia de artritis bacteriana	93% (28/30)	93% (30/32)
Incidencia de parálisis	3,3%	37,5%
Incidencia de necrosis en articulación infectada	0	100%
Peso corporal en el día 21	22,8 g	16,7 g

EJEMPLO 12

10 Desarrollo más grave de destrucción de tejido y formación de tejido necrótico en artritis bacteriana de ratones plg^{-/-} tras la inyección intravenosa de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips en PBS estéril

Métodos

15 Se indujo artritis bacteriana en ratones plg^{+/+} y plg^{-/-} mediante inyección intravenosa (i.v.) de 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips en 200 µl de PBS estéril. Se siguieron los ratones individualmente cada día tras la inoculación.

20 Para realizar exámenes histopatológicos de los tobillos y las garras, se disecaron los tobillos y las garras y se fijaron en formalina tamponada al 4% durante 24 horas. Se descalcificaron los tejidos fijados durante 3 semanas en EDTA al 15%, se deshidrataron y se incrustaron en parafina. Se tiñeron secciones de 8 µm de las articulaciones de muñecas con safranina-O y se contratiñeron con verde rápido/hematoxilina de hierro.

25 Para el análisis inmunohistoquímico, se desparafinizaron secciones incrustadas en parafina (8 µm) y se rehidrataron en etanol y agua destilada. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 minutos. Entonces se incubaron durante 20 min. a temperatura ambiente con suero de conejo al 5% para la detección de fibrina. Entonces se cubrieron los portaobjetos con anticuerpo de cabra anti-fbn/fbg de ratón a temperatura ambiente durante 30 min. Tras lavar, se cubrieron con IgG de conejo anti-IgG de cabra durante 20 min a TA. Tras lavar, se cubrieron con PAP durante 20 min. a TA. Se reveló el color mediante el kit (sistema de cromógeno de sustrato AEC de DAKO), y tras lavar se contratiñó con hematoxilina de Mayer.

30 Resultados

35 Para determinar si la persistencia observada de inflamación articular estaba asociada con cambios histológicos, se realizaron análisis histológicos con articulaciones de garras de ratones plg^{+/+} y plg^{-/-} infectados. Se tiñeron las articulaciones con safranina-O, y se contratiñeron con verde rápido/hierro y hematoxilina. Tal como se muestra en la figura 15, en ratones plg^{+/+}, un día tras el día de comienzo, la inflamación era muy ligera (figura 15A). 3 días tras el día de comienzo, la membrana sinovial se vuelve hiperplásica pero el cartílago estaba intacto (figura 15B). 7 días tras el día de comienzo, se habían infiltrado células inflamatorias en la cavidad articular (figura 15C). 14 días tras el día de comienzo, la membrana sinovial era mucho más gruesa que en el día 7 (figura 15D). En ratones plg^{-/-}, tal como se muestra en la figura 15E, un día tras el día de comienzo, el nivel de inflamación era también ligero. Sin embargo, 3 días tras el día de comienzo, la membrana sinovial era mucho más gruesa que en el día 1, y las células inflamatorias comenzaron a invadir el hueso (figura 15F). 7 días tras el día de comienzo, las células inflamatorias llenaban toda la articulación de la garra, y algunas partes del hueso se habían degradado (figura 15G). 14 días tras el día de comienzo, la mayor parte del hueso y el cartílago se degradó completamente (figura 15H). Además, 14 días tras el día de comienzo, en ratones plg^{+/+}, aunque la inflamación era grave, la gravedad era muy ligera en comparación con ratones plg^{-/-}. Se verificaron los hallazgos clínicos mediante el examen histopatológico que mostró claramente que los ratones plg^{-/-} presentaban un nivel significativamente superior de destrucción de tanto cartílago como hueso. Conjuntamente, los ratones plg^{+/+} presentaban una artritis significativamente menos grave que los ratones plg^{-/-}. La plasmina tiene un efecto beneficioso sobre la remodelación tisular.

50 Para examinar el desarrollo y la resolución de la artritis al nivel celular, se realizaron análisis microscópicos para tejido necrótico en ratones plg^{-/-} y plg^{+/+}. Se encontró tejido necrótico en la articulación pronto como el día 3 tras la inoculación bacteriana en ratones plg^{-/-}. Tal como se muestra en la figura 16 y la figura 15G, H, se encontró una gran área de tejido necrótico en ratones plg^{-/-}. En contraposición, se encontró poca necrosis en ratones plg^{+/+}, aunque tuviesen inflamación grave. Estos datos indican que ratones deficientes en plg no podrían eliminar el tejido necrótico y se provocaba destrucción de tejido.

Basándose en el papel establecido de la activación del plasminógeno en la fibrinólisis, la pérdida de plasminógeno

da como resultado un aumento de la deposición de fibrina. Se analizó el contenido en fibrina en articulaciones de rodilla mediante inmunohistoquímica de fibrina (figura 17). Sin embargo, se encontraron niveles similares de deposición de fibrina en todas las articulaciones hinchadas de los ratones control $plg^{+/+}$ que en ratones $plg^{-/-}$. Estos datos indican claramente que la deposición de fibrina probablemente no es el motivo de la artritis bacteriana más grave observada en ratones $plg^{-/-}$.

EJEMPLO 13 DE REFERENCIA

El plasminógeno es importante durante la defensa del huésped frente a la infección inducida por *S. aureus* durante la cicatrización de heridas por incisión en ratones $plg^{-/-}$

Métodos

Para inducir una herida por incisión, en primer lugar se afeitaron cuidadosamente los lados dorsales de ratones $plg^{-/-}$ usando una maquinilla de afeitar y se limpiaron usando etanol al 70%. Después de eso, se indujo una incisión de 15 mm de largo a lo largo de la línea media en el lado dorsal del ratón. 15 min. después, se aplicaron por vía tópica 1×10^7 UFC de *S. aureus* en 10 ul de PBS y se distribuyeron sobre las heridas abiertas. Además, se inyectaron 50 ul de plasminógeno por vía subcutánea en dos sitios de los dos lados de las aberturas de la herida, separados 5 mm de la abertura de la herida. Para ratones $plg^{-/-}$ control, sólo se inyectaron 50 ul de PBS por vía local en la herida abierta en la que se inoculaban bacterias. Después de eso, se inyectaron 50 ul de plasminógeno (10 ug/ul) o PBS cada 24 horas de un modo similar al realizado en el día 0 hasta el día 10. En el día 11, se sacrificaron los ratones y se diseccionaron cuidadosamente muestras de la herida, alrededor de los bordes de la herida y el tejido por debajo, y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados sobre placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

Resultados

Con el fin de investigar si el plasminógeno desempeña funciones de destrucción de bacterias similares en un modelo de infección de heridas abiertas que en el modelo de artritis bacteriana, se indujeron en ratones $plg^{-/-}$ heridas por incisión y se les inoculó adicionalmente por vía local 10^7 UFC de *S. aureus* Phillips. Después de eso, se les inyectó a estos ratones por vía local o bien plasminógeno humano o bien PBS control durante 10 días. La recuperación de bacterias a partir de las muestras de tejido de estos ratones muestra que el tratamiento local de plasminógeno humano disminuyó exitosamente el número de bacterias 10 veces en comparación con los ratones $plg^{-/-}$ tratados con PBS control (tabla 7, figura 18). Estos datos muestran claramente que el plasminógeno desempeña un papel crítico en la defensa del huésped (por ejemplo destrucción de bacterias) frente a infecciones acompañadas de una herida abierta. Además, la inyección local de plasminógeno también mejoró enormemente la cicatrización de las heridas infectadas (figura 19). Conjuntamente, estos resultados indican que el plasminógeno es esencial en la defensa del huésped frente a diferentes tipos de traumatismo, tal como se evaluó mediante la defensa del huésped frente a dos tipos de artritis bacteriana, cicatrización de heridas abiertas y defensa del huésped frente a la infección de heridas abiertas.

Tabla 7. Número de bacterias en ratones $plg^{-/-}$ con tratamientos locales de Plgh o PBS en el día 11 tras la formación de herida por incisión en la que se inoculaban 1×10^7 UFC de *S. aureus* Phillips

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias por gramo de tejido (media \pm EE, $\times 10^5$ UFC/g)
$Plg^{-/-}$ con inyección local de Plgh	4	2,6 \pm 2,5*
$Plg^{-/-}$ con inyección local de PBS	2	26,8 \pm 25,2

*, $P < 0,05$, en comparación con el grupo de ratones $plg^{-/-}$ con inyección local de PBS.

EJEMPLO 14 DE REFERENCIA

El plasminógeno es importante en la defensa del huésped frente a la infección inducida por *S. aureus* durante la cicatrización de heridas por quemaduras en ratones $plg^{-/-}$

Métodos

Para inducir el modelo de quemadura por escaldadura, en primer lugar se duermen los ratones mediante anestesia. Después de eso, se afeita cuidadosamente el área en el que va a producirse la quemadura y se coloca de manera vertical y libre una barra de metal caliente a 100°C de 25 g con la ayuda de pinzas durante 6 segundos. Se calienta previamente la barra de metal en agua caliente a la temperatura de ebullición. Seis segundos de quemadura inducen una lesión térmica grave en el área. Una vez que se produce la quemadura por escaldadura en el área, se seca cuidadosamente la superficie de la espalda del ratón para eliminar el agua excesiva. Aproximadamente 15 min. después, se inyectan 30 ul de 1×10^6 UFC de *S. aureus* justo por vía subcutánea en el centro del área de la

quemadura. Otros 15 min. después, se inyectan 50 ul de plasminógeno (10 ug/ul) por vía subcutánea en dos sitios alrededor del borde del área de la quemadura por escaldadura, 25 ul por sitio. Para el grupo de PBS de plg^{-/-} control, se inyectaron 50 ul de PBS del mismo modo que el plasminógeno. Después de eso, desde el día 0 hasta el día 9, se realiza una inyección diaria o bien de arriba abajo o bien de izquierda a derecha en el área de la quemadura, cambiando cada día. Para el grupo de plg^{+/+}, se realiza sólo la quemadura en los ratones pero se dejan sin ningún tratamiento local. Al final del experimento, se documenta el aspecto de la herida de las quemaduras mediante una cámara y se disecan cuidadosamente muestras de tejido (el área de la quemadura y la capa de tejido poco profunda por debajo) y se homogeneizan en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados sobre placas de agar LB y se incuban a 37°C durante la noche. Se contaron entonces las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

Resultados

Con el fin de investigar si el plasminógeno desempeña funciones de destrucción de bacterias similares en un modelo de infección de heridas por quemaduras que en el modelo de artritis bacteriana, se indujeron en ratones plg^{-/-} heridas por quemaduras y se les inoculó adicionalmente por vía local 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips. Después de eso, se les inyectó a estos ratones por vía local o bien plasminógeno humano o bien PBS control durante 9 días. La recuperación de bacterias a partir de las muestras de tejido de estos ratones tomadas en el día 10 tras la quemadura muestran que el tratamiento local de plasminógeno humano disminuyó exitosamente el número de bacterias 10 veces en los ratones plg^{-/-} en comparación con los ratones plg^{-/-} tratados con PBS control (tabla 8, figura 20), que es incluso inferior que el número de bacterias en ratones plg^{+/+} sin inyección local. Estos datos muestran claramente que el plasminógeno desempeña un papel crítico en la defensa del huésped (por ejemplo destrucción de bacterias) frente a infecciones acompañadas de una herida por quemadura abierta. Conjuntamente, estos resultados indican que el plasminógeno es esencial en la defensa del huésped frente a diferentes tipos de traumatismos, tal como se evaluó mediante la defensa del huésped frente a dos tipos de artritis bacteriana, cicatrización de heridas abiertas (quemadura, incisión) y defensa del huésped frente una infección de heridas abiertas.

Tabla 8. Número de bacterias en ratones plg^{-/-} con tratamientos locales de Plgh o PBS en el día 10 tras heridas por quemaduras en las que se inocularon 1 x 10⁶ UFC de *S. aureus* Phillips

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias por gramo de tejido (media±EE, x 10 ⁶ UFC/g)
Plg ^{-/-} con inyección local de Plgh	5	0,43±0,13*
Plg ^{-/-} con inyección local de PBS	5	4,6±1,4
Plg ^{+/+} sin inyección local	4	3,6±2,1

*, P<0,05, en comparación con el grupo de ratones plg^{-/-} con inyección local de PBS.

EJEMPLO 15 DE REFERENCIA

Incidencia de otitis media crónica espontánea en ratones de tipo natural y deficientes en plg

Métodos

Procedimiento experimental. Durante un periodo de 18 semanas, se anestesiaron los ratones a diferentes intervalos de tiempo mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de 100 µl de 25 µl de Dormicum® (Roche AB, Estocolmo, Suecia), 25 µl de Hypnorm™ (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica) y 50 µl de agua estéril. Se examinó cuidadosamente el aspecto macroscópico de la membrana timpánica (TM) [DELETREAR] y se documentó bajo un otomicroscopio. Al final del periodo de 18 semanas, se sacrificaron todos los animales y a partir de 18 animales (de tipo natural, n = 7; deficientes en plg, n = 11) se dividieron los oídos en tres grupos, dirigidos a la identificación bacteriológica (de tipo natural, n = 6; deficientes en plg, n = 6), incrustación en plástico (de tipo natural, n = 4; deficientes en plg, n = 6) e incrustación en parafina (de tipo natural, n = 4; deficientes en plg, n = 10), respectivamente.

Incrustaciones en plástico y parafina. Se recogieron los cráneos para la incrustación en plástico y parafina tal como se describió previamente (15). Para muestras incrustadas en plástico de morfología, se realizaron secciones transversales (1 µm) a través de todo el MEC y se tiñeron con azul de toluidina. Se realizaron secciones transversales de las muestras incrustadas en parafina (5 µm) a través de todo el MEC para la inmunohistoquímica.

Resultados

Para estudiar el desarrollo de otitis media crónica, se seleccionaron ratones de tipo natural y deficientes en plg de 6 semanas de edad. Se examinó el estado de las TM y los MEC en los ratones experimentales al inicio del experimento y a las edades de 9 semanas, 13 semanas, 18 semanas y 24 semanas. De manera otomicroscópica, se definió la otitis media crónica espontánea como una TM opaca, blanquecina y engrosada, con o sin material de

efusión en el MEC. Tal como se muestra en la tabla 9, ninguno de los ratones de tipo natural (tanto machos como hembras) desarrolló ninguna efusión en el oído medio o drenaje del canal del oído externo (EEC) durante el periodo experimental de 18 semanas. Tal como se reveló mediante otomicroscopio, sus TM eran delgadas, transparentes y estaban colocadas de manera normal (datos no mostrados). En contraposición, en los ratones deficientes en plg, el número de oídos con otitis media espontánea aumentó gradualmente durante el periodo experimental en un grado similar en tanto machos como hembras. Al final del experimento, se había desarrollado otitis media espontánea con diversos grados de cambios inflamatorios en todos los oídos de los ratones deficientes en plg restantes (tabla 9).

Tabla 9. Incidencia de desarrollo espontáneo de otitis media crónica en ratones de tipo natural y deficientes en plg a diferentes edades

Grupo de ratones	Incidencia de desarrollo espontáneo de otitis media crónica ^a a las edades de:				
	6 semanas	9 semanas	13 semanas	18 semanas	24 semanas
De tipo natural, macho	0/18	0/18	0/16	0/16	0/16
De tipo natural, hembra	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Deficientes en plg, macho	0/20	3/20	5/18	8/18	6/10 ^b
Deficientes en plg, hembra	0/24	1/24	3/24	8/22	11/16 ^b

^aSe muestran los datos como el número de oídos infectados/inflamados dividido entre el número total de oídos en cada grupo.

^bCuando se analizan morfológicamente, se encontró que los oídos medios en ratones deficientes en plg que se mostró que eran normales bajo el otomicroscopio tenían cambios inflamatorios pero no demasiado pronunciados, con sólo una capa delgada de una masa tisular amorfa en el MEC que se adhiere a la TM.

EJEMPLO 16 DE REFERENCIA

Identificación de bacterias aisladas de los MEC de ratones de tipo natural y deficientes en plg

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 8, excepto por la identificación bacteriológica.

Identificación bacteriológica. Se disecaron las bullas timpánicas de grupos de tipo natural y deficientes en plg liberándolas de tejido blando y se retiró un pequeño trozo del suelo óseo de la bulla con un cuchillo. Se metió un hisopo estéril en la cavidad del oído medio (MEC) y mediante el uso del hisopo se distribuyó el material adicionalmente sobre placas de caldo Luria (LB) y se incubaron inmediatamente a 37°C durante 48 horas. Se identificaron las colonias obtenidas según Cowan & Steel (16).

Resultados

Al final del experimento, se recogieron al azar bullas timpánicas de oídos de 6 ratones de tipo natural y 6 deficientes en plg para la identificación bacteriana. Tal como se muestra en la tabla 10, sólo se encontraron bacterias en 1 de 6 de las muestras de tipo natural. Las bacterias se identificaron como *Streptococcus sanguinis*. Sin embargo, en 5 de 6 muestras de MEC obtenidas de los ratones deficientes en plg se aislaron bacterias. Las especies identificadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans*. Todas las bacterias identificadas eran Gram-positivas.

Tabla 10. Recuperación de bacterias de los MEC en ratones de tipo natural y ratones deficientes en plg a la edad de 24 semanas.

^aND, no detectable.

Número de oídos de ratones	Hallazgos de bacterias en	
	De tipo natural	Deficientes en 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> y <i>Streptococcus mutans</i>
5	ND	<i>Streptococcus mutans</i>

6

ND

ND

EJEMPLO 17 DE REFERENCIA

Estudios con microscopio óptico en ratones de tipo natural y deficientes en plg

5

Métodos

Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 8, excepto por las tinciones inmunohistoquímicas.

10 Tinciones inmunohistoquímicas. Se rehidrataron las secciones incrustadas en parafina en una serie de concentraciones de etanol decrecientes y se enjuagaron en agua destilada. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min. y se lavaron adicionalmente los portaobjetos en PBS. Entonces se trataron las secciones consecutivas con los anticuerpos indicados a continuación. En todas las tinciones inmunohistoquímicas, se usaron como controles negativos portaobjetos adyacentes incubados con sueros de animales no inmunizados en lugar del anticuerpo primario.

20 Para la detección de células inflamatorias, se usaron anticuerpos primarios monoclonales de rata anti-ratón contra células T (clon 53-7.3, dilución 1:50; BD Biosciences Pharmingen, Estocolmo, Suecia), células B (clon RA3-6B2, dilución 1:250; BD Biosciences Pharmingen), macrófagos (MCAP497, dilución 1:500; Serotec, Oxford, R.U.) y neutrófilos (CL8993AP, dilución 1:200; Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canadá). Para realizar las tinciones inmunohistoquímicas, en primer lugar se recuperaron los portaobjetos y se incubaron con suero de conejo normal (Dako Patts, Copenhague, Dinamarca) antes de incubarse con diferentes anticuerpos primarios a las concentraciones apropiadas. Después de eso se incubaron los portaobjetos con anticuerpo de conejo biotinilado anti-IgG de rata (Dako Patts) y se trataron adicionalmente usando el método del complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

30 Se detectó citoqueratina inmunohistoquímicamente mediante el método de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-ser humano (10550, ICN Pharmaceuticals, Aurora, Ohio) como anticuerpo primario. En resumen, se recuperaron en primer lugar los portaobjetos que contenían secciones de tejido con tripsina al 0,1% (pH 7,8) a 37°C durante 8 min., se bloquearon con suero de cerdo no inmunizado al 5% (Dako Patts) y se incubaron con el anticuerpo primario diluido 1:100 en PBS. Después de esto, se aplicó un anticuerpo de unión de cerdo anti-conejo (Dako Patts), seguido por un complejo de PAP de conejo (Dako Patts).

35 Se detectó fibrin(ógeno) inmunohistoquímicamente mediante el método de PAP usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos) como anticuerpo primario. Tras la incubación inicial con suero de conejo (Dako Patts) y luego con el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 en PBS, se incubaron los portaobjetos con un anticuerpo de unión de conejo anti-cabra (Dako Patts). Después de eso, se incubaron los portaobjetos con complejo de PAP de cabra (Dako Patts).

40 Se visualizaron todos los portaobjetos ya que el color marrón precipita mediante una reacción de diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories) y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Se examinaron los portaobjetos mediante microscopio óptico bajo un microscopio DMLB de Leica y se registraron imágenes digitalmente usando una cámara DC 300F de Leica conectada a un ordenador personal. Se realizó el ajuste del contraste y el brillo en imágenes individuales usando el software Adobe Photoshop 7.0.

45

Resultados

50 Al final del experimento, se realizó la tinción morfológica en muestras incrustadas en plástico de ratones de tipo natural y deficientes en plg. Tal como se muestra en la figura 7A, las TM y los oídos medios de ratones de tipo natural presentaban una estructura normal. La TM reveló una estructura de tres capas delgada típica: una capa epidérmica queratinizada externa, una lámina propia media y un revestimiento epitelial interno contiguo al del MEC. No se detectaron efusiones del oído medio en el MEC. Sin embargo, en los ratones deficientes en plg, se observaron cambios inflamatorios en todos los oídos medios examinados. La TM estaba engrosada y tenía adherida una masa tisular amorfa que algunas veces llenaba casi todo el MEC (figura 7B). En muchas de las muestras el EEC también estaba lleno de un tejido amorfo (figura 7D).

60 Al final del periodo experimental, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para estudiar la distribución de fibrina y queratina en el oído medio (figura 7C, 7D, 7E, 7F). En ratones de tipo natural, sólo se observó inmunorreactividad débil contra fibrin(ógeno) y queratina en la superficie epitelial de la TM (figura 7C y 7E). Sin embargo, en los ratones deficientes en plg, tal como se muestra en la figura 7D, se observó que un tejido amorfo que cubría la mucosa de la TM y el MEC tenía inmunorreactividad contra fibrina. La estructura del tejido amorfo variaba en diferentes áreas y en diferentes muestras, desde un tipo de red suelta hasta un tipo de extensión, o incluso densamente empaquetada (datos no mostrados). También se observó inmunorreactividad de fibrina en el tejido amorfo en el EEC. En la mayoría de los ratones deficientes en plg, la capa de tinción de queratina en la TM y la capa epidérmica circundante del EEC estaba considerablemente engrosada (figura 7F).

65

5 Para estudiar la infiltración de células inflamatorias, se tiñeron secciones de parafina de ratones de tipo natural y deficientes en plg para detectar células T, células B, macrófagos y neutrófilos. Tal como se muestra en la figura 8A, 8C, 8E y 8G, apenas podían detectarse células inflamatorias en la TM y en la mucosa del oído medio de los ratones de tipo natural. Sin embargo, en ratones deficientes en plg, se encontraron células T, células B, macrófagos y neutrófilos en la TM y el tejido amorfo que llena el oído medio y el EEC (figura 8B; 2D, 8F y 8H). Las células T y células B eran relativamente menos y estaban distribuidas de manera poco densa en la TM y la mucosa del oído medio (figura 8B y 8D). En la mucosa del oído medio, los macrófagos eran el tipo de célula inflamatoria más abundante (figura 8F) y los neutrófilos eran el tipo de célula dominante en el tejido amorfo que se extiende en el EEC (figura 8H). Globalmente, estos resultados sugieren que el plasminógeno desempeña un papel esencial en la protección frente al desarrollo espontáneo de otitis media crónica.

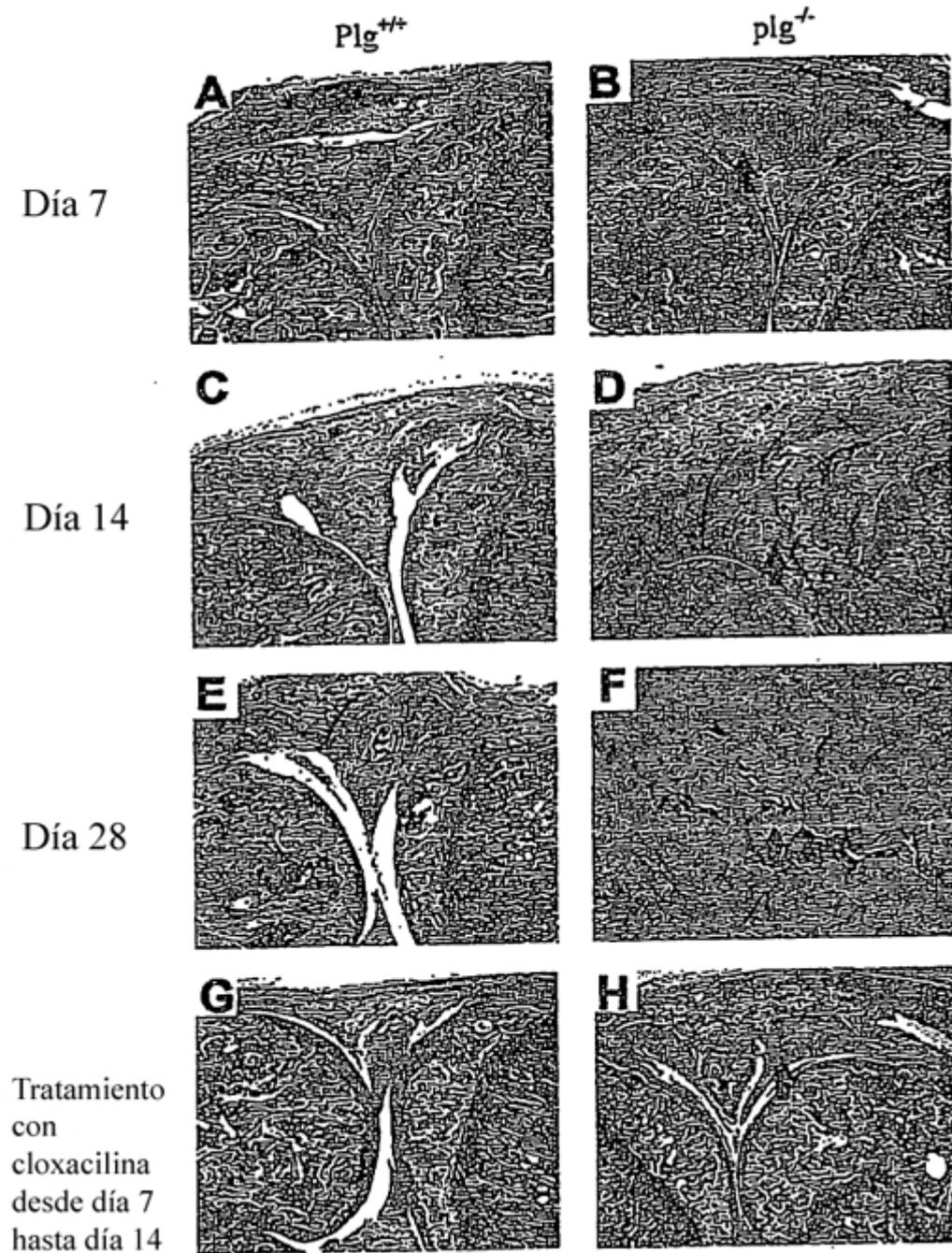
Bibliografía

- 15 1. Aderem, A. 2003. Phagocytosis and the inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 187 supl. 2:S340-S345.
2. Hauschildt, S., y Kleine, B. 1995. Bacterial stimulators of macrophages. *Int. Rev. Cytol.* 161:263-331.
- 20 3. Chertov, O., Yang, D., Howard, O.M., y 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., Camecliet, P., y Ny, T. 1999. Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* 140:5030-5035.
- 25 5. Teele, D.W., Klein, J.O., y 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 CM, y Werb, Z. 1991. Extracellular matrix degradation. En *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED, editor. Plenum Press. Nueva York. 255-302.
- 30 7. Travis, J., y Salvesen, G. 1983. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst. Mitt.* 56-65.
8. Wiman, B., y 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.
- 35 9. Saksela, O., y Rifkin, D.B. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:93-126.
- 40 10. Collen, D., y 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., y Tarkowski, A. 2001. Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res.* 3:375-380.
- 45 12. Qasimi, P., Ming-Lum, A., Ghanipour, A., Ong, C.J., Cox, M.E., Ihle, J., Cacalano, N., Yoshimura, A., y 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.
- 50 13. Gjerdtsson, I., Hultgren, O.H., y 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., y Mulligan, R.C. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.
- 55 15. Eriksson, P.O., Mattsson, C., y Hellstrom, S. 2003. First forty-eight hours of developing otitis media: an experimental study. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 112:558-566.
- 60 16. COWAN, S.T., y STEEL, K.J. 1961. Diagnostic tables for the common medical bacteria. *J. Hyg. (Lond)* 59: 357-372.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, para la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa bacteriana, en el que la enfermedad infecciosa bacteriana se selecciona de artritis bacteriana, neumonía, lesiones en los órganos respiratorios provocadas por infecciones y lesiones en los tejidos articulares provocadas por infecciones.
- 10 2. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende una combinación de dos o más compuestos según la reivindicación 1.
- 15 3. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición comprende además al menos un agente antibiótico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en tetraciclinas, anfenicoles, beta-lactamas, penicilinas, sulfonamidas, macrólidos, lincosamidas, estreptogaminas, estreptomycinas, quinolonas y metronidazoles.
- 20 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es mamífero, especialmente un ser humano.
- 25 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es deficiente en plasmina o plasminógeno en el que la deficiencia es preferiblemente congénita, adquirida y/o local.
- 30 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se administra por vía sistémica, por vía local, por vía tópica, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, mediante inhalación, por vía intratecal, mediante inyección local, mediante inyección intraarticular o por vía rectal.
- 35 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se administra en combinación con un agente estabilizante o portador polipeptídico adecuado.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se administra a una dosis de 0,05 mg a 10 mg, preferiblemente de desde 0,5 hasta 5 mg.
- 40 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración del compuesto se repite al menos una vez, preferiblemente al menos cada día.
- 45 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración se realiza aplicando un vendaje para heridas, que comprende el compuesto según la reivindicación 1, a un área infectada.
- 50 11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa comprende inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno infeccioso.
- 55 12. Composición farmacéutica para su uso en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa bacteriana que comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, en la que la enfermedad infecciosa bacteriana se selecciona de artritis bacteriana, neumonía, lesiones en los órganos respiratorios provocadas por infecciones y lesiones en los tejidos articulares provocadas por infecciones.
- 60 13. Kit de partes para su uso en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa bacteriana seleccionada de artritis bacteriana, neumonía, lesiones en los órganos respiratorios provocadas por infecciones y lesiones en los tejidos articulares provocadas por infecciones que comprende una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, y al menos un agente antibiótico o antimicótico, en envases separados.

Fig. 1



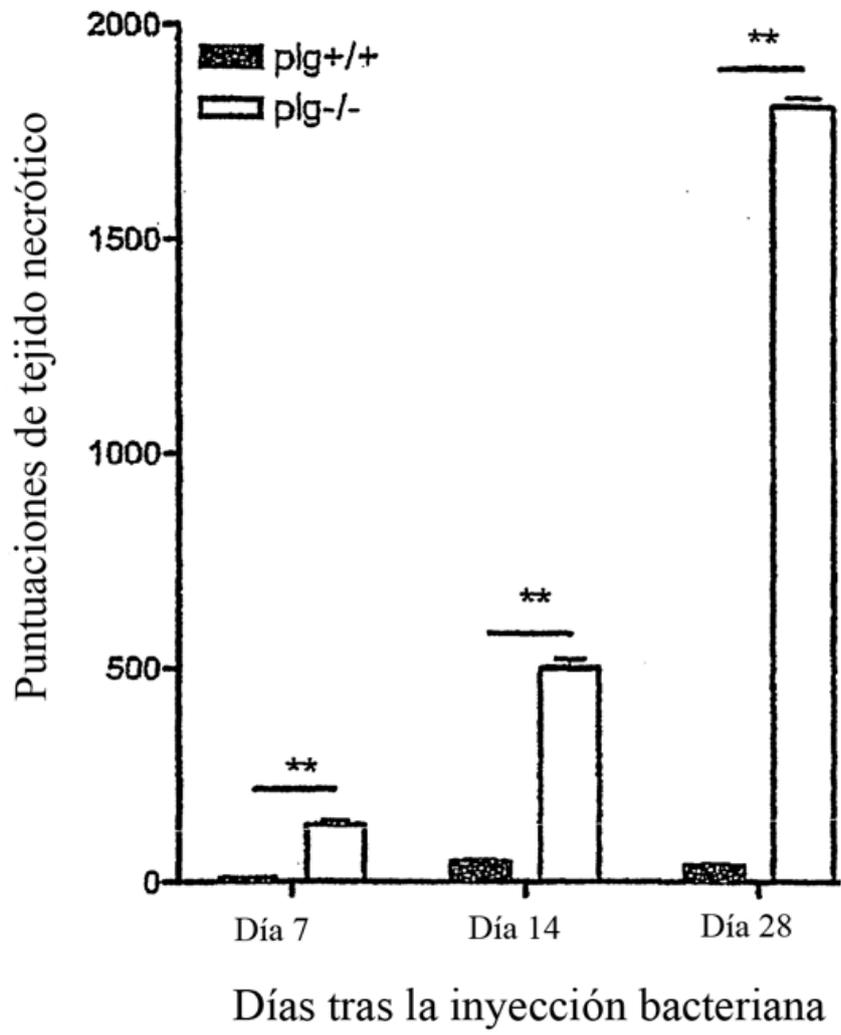


Fig. 2

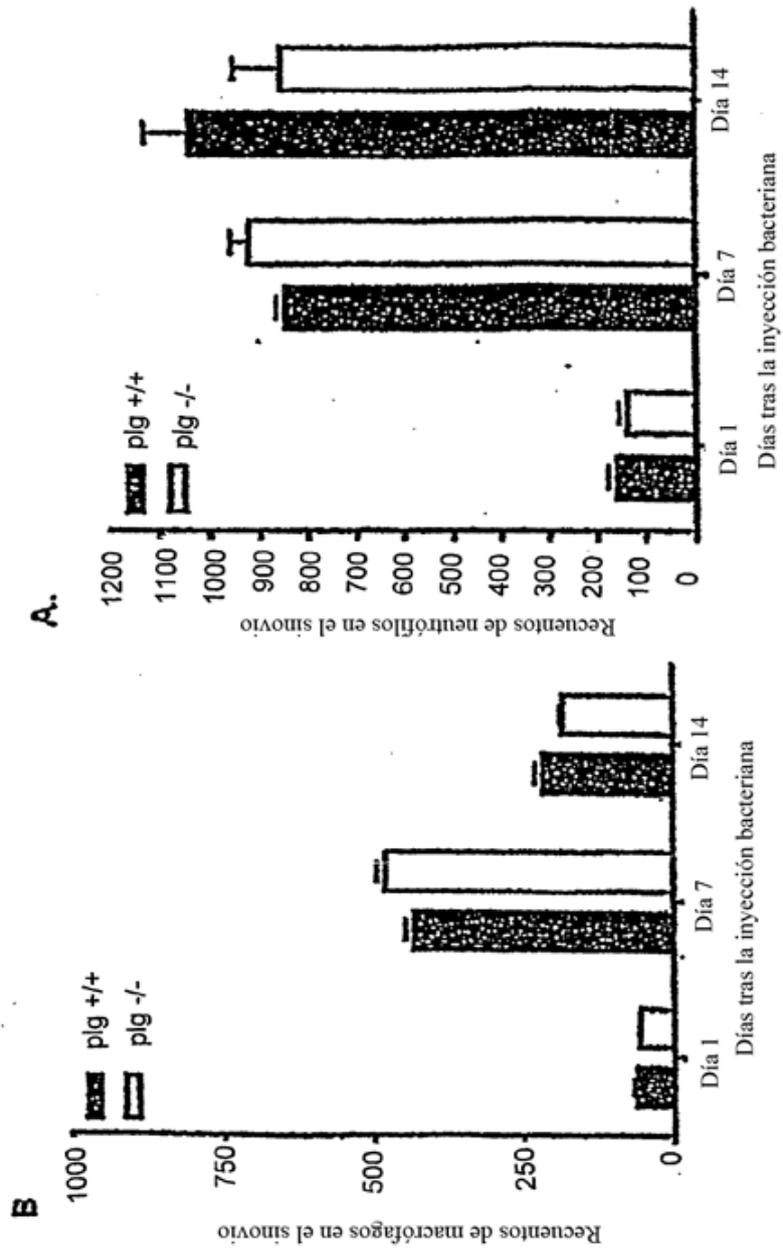


Fig.3

Fig. 5

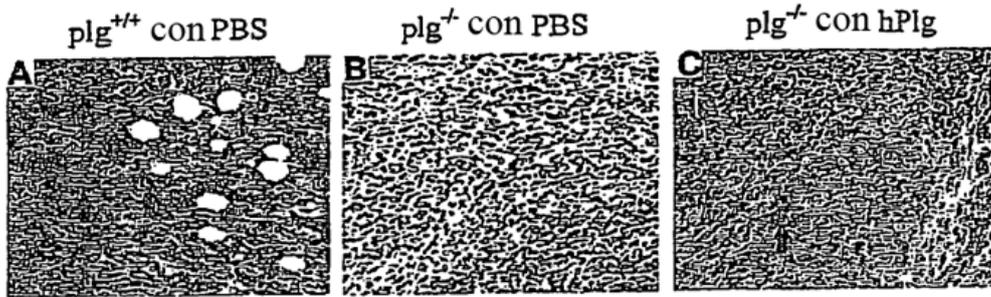


Fig. 6

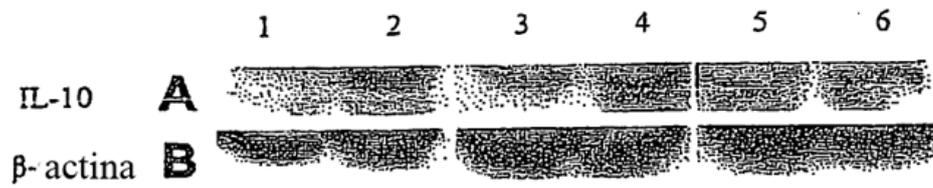


Fig. 7

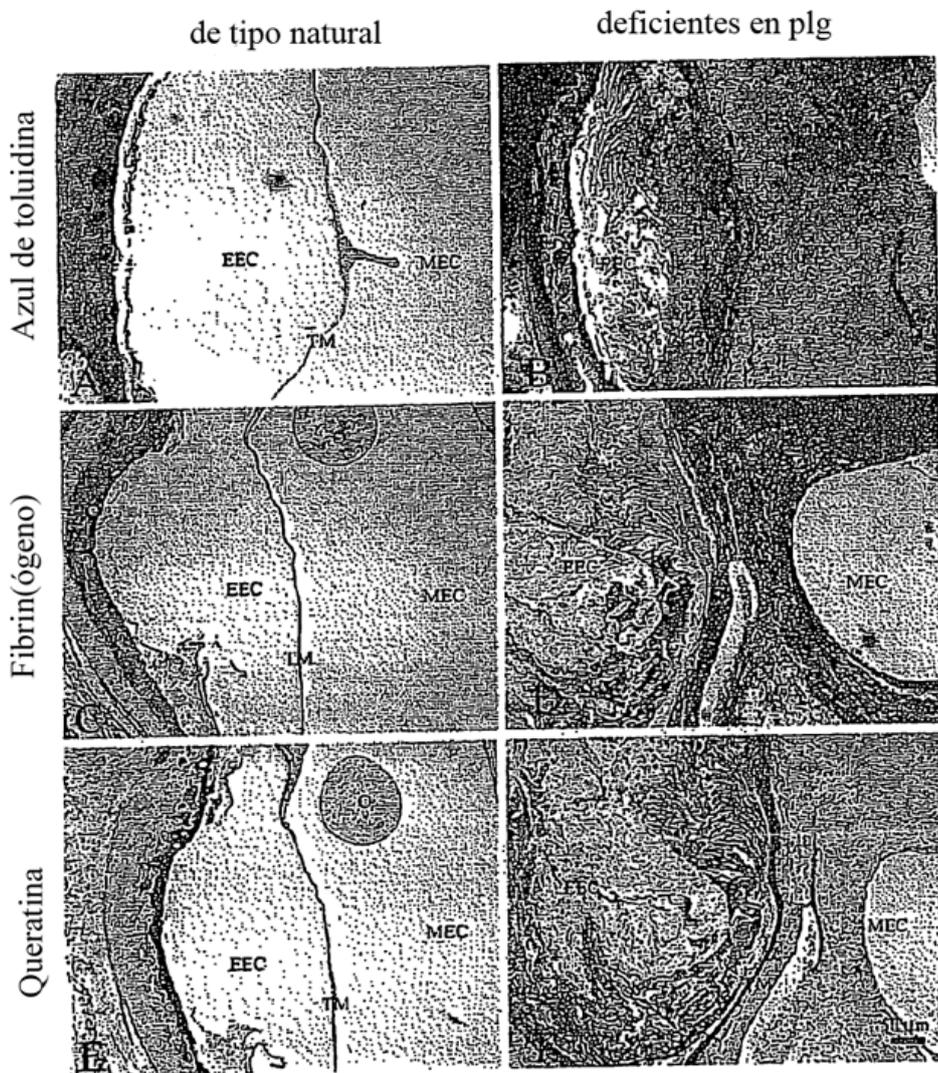
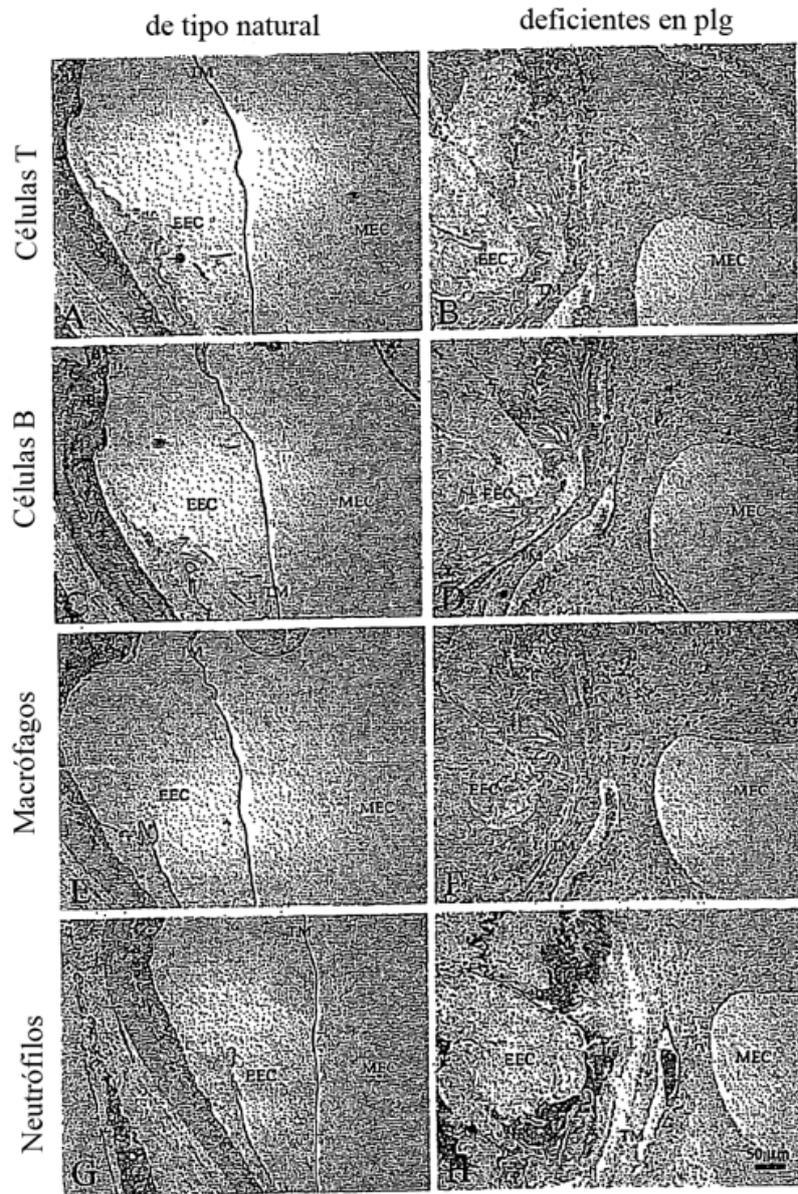


Fig. 8



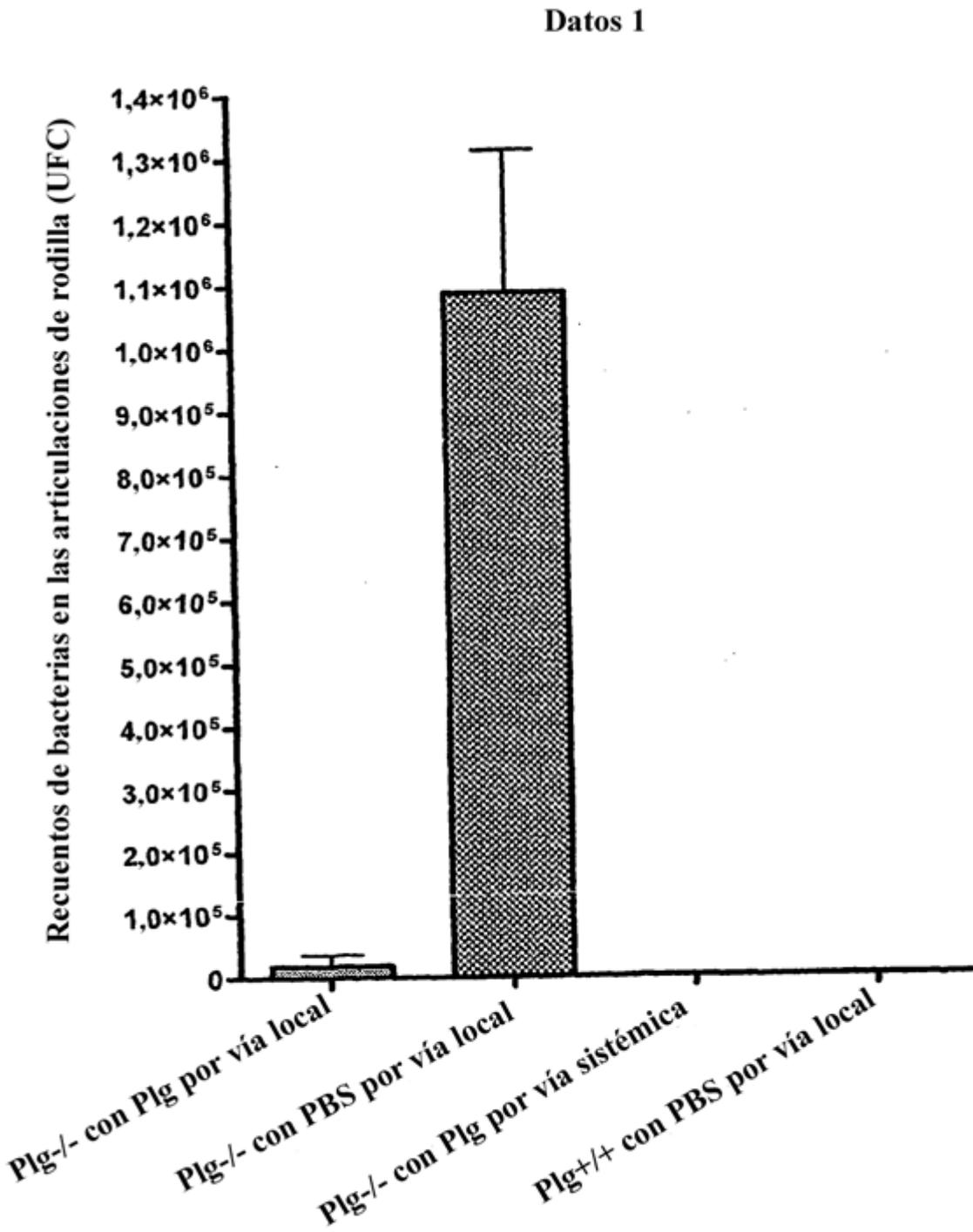


Fig. 9

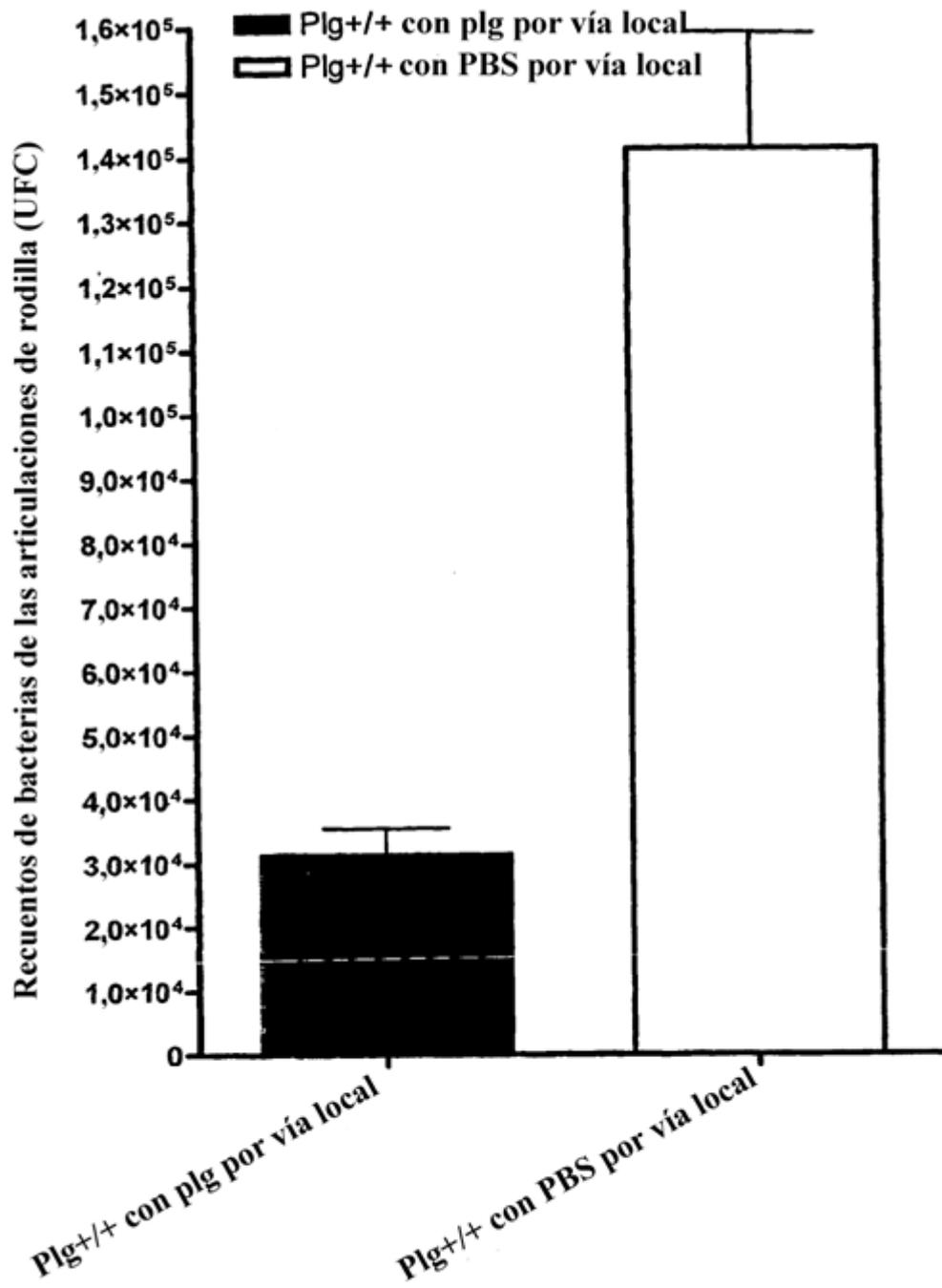


Fig. 10

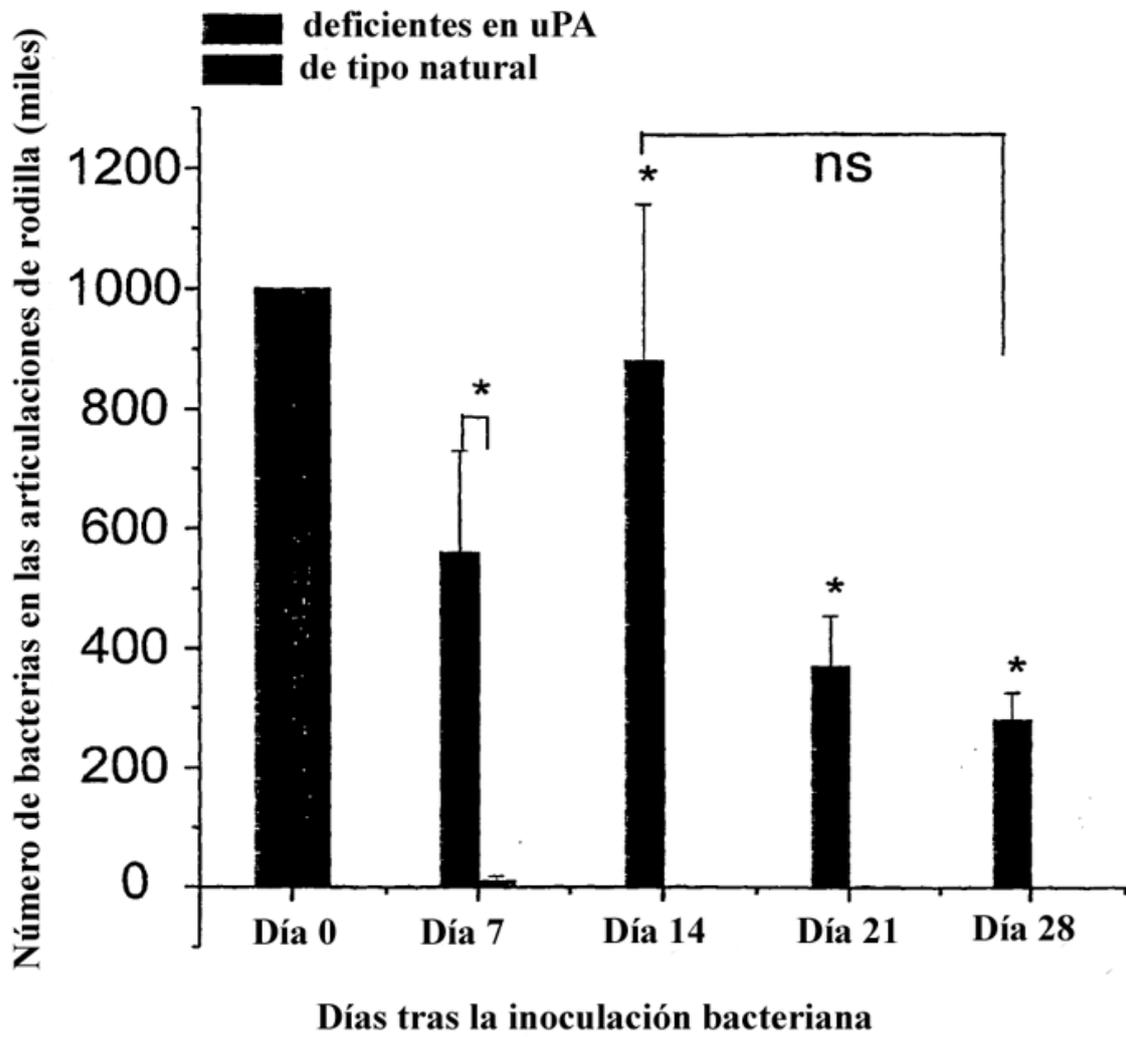


Fig. 11

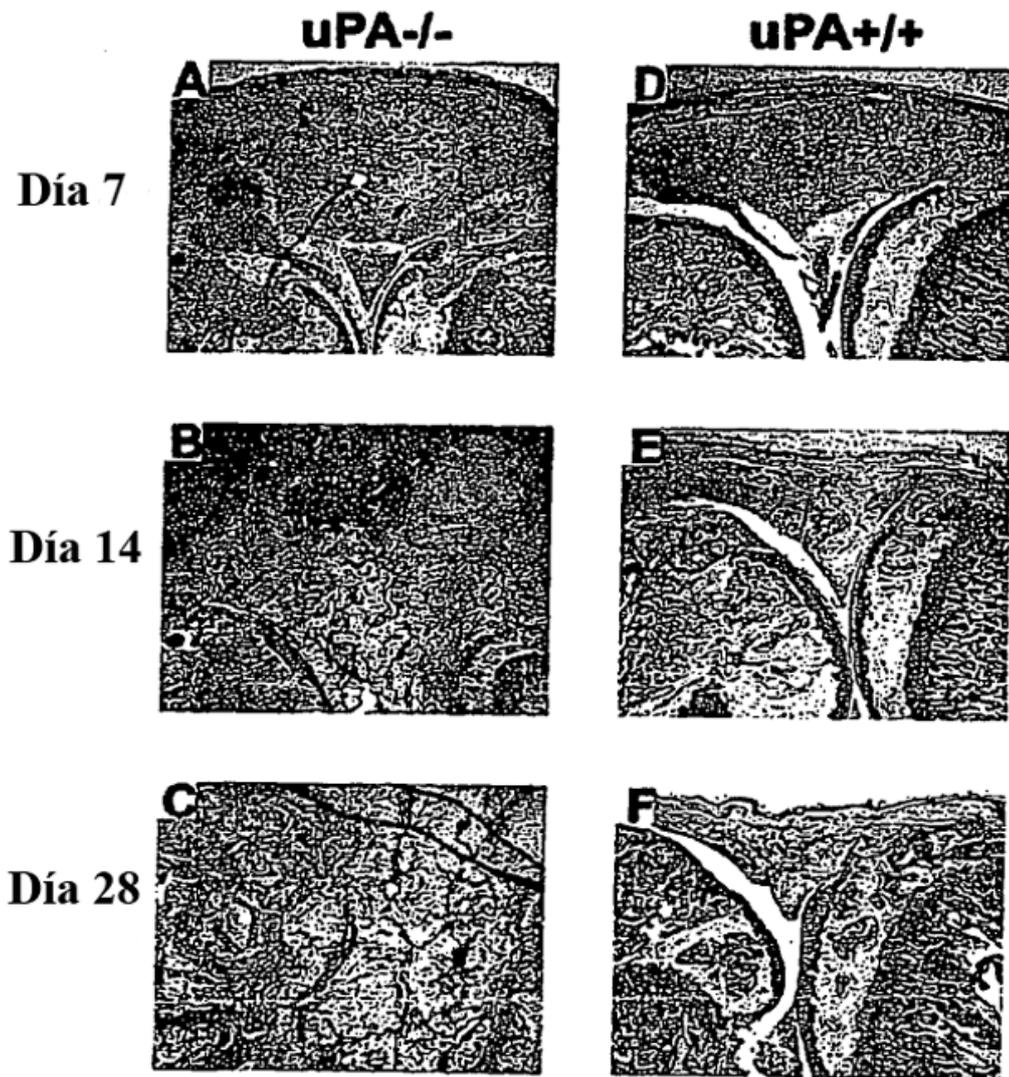


Fig. 12

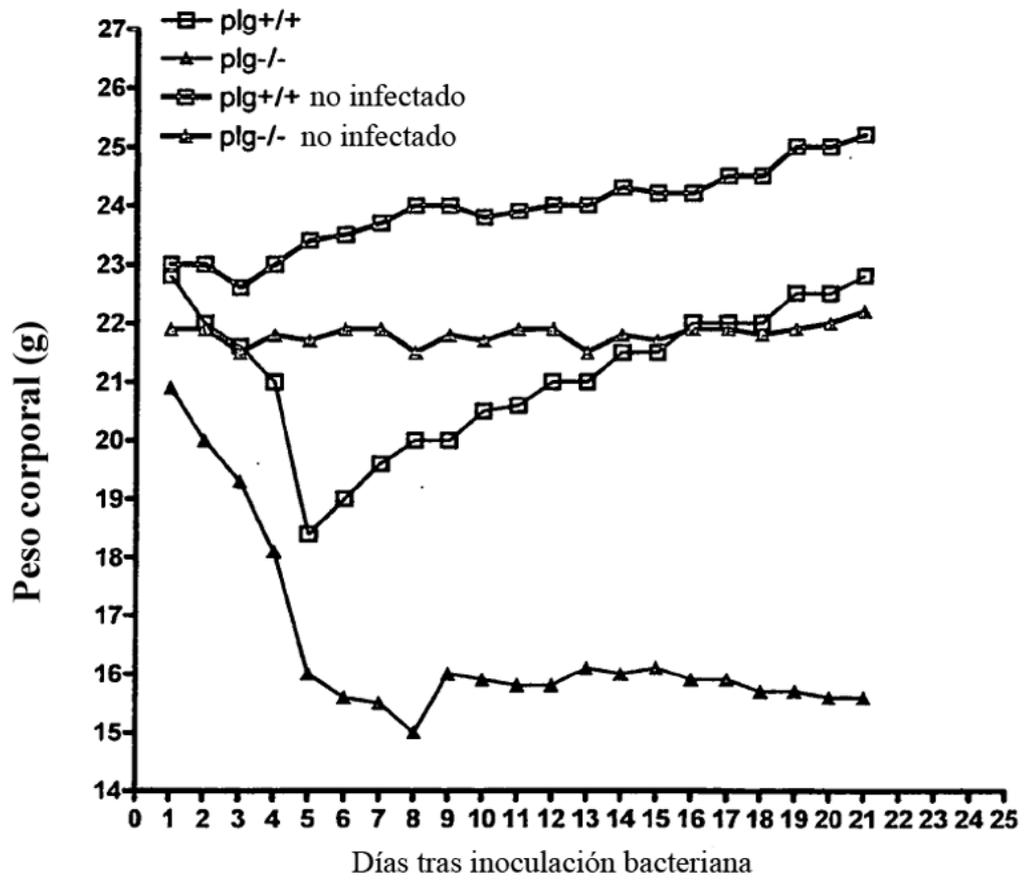


Fig. 13

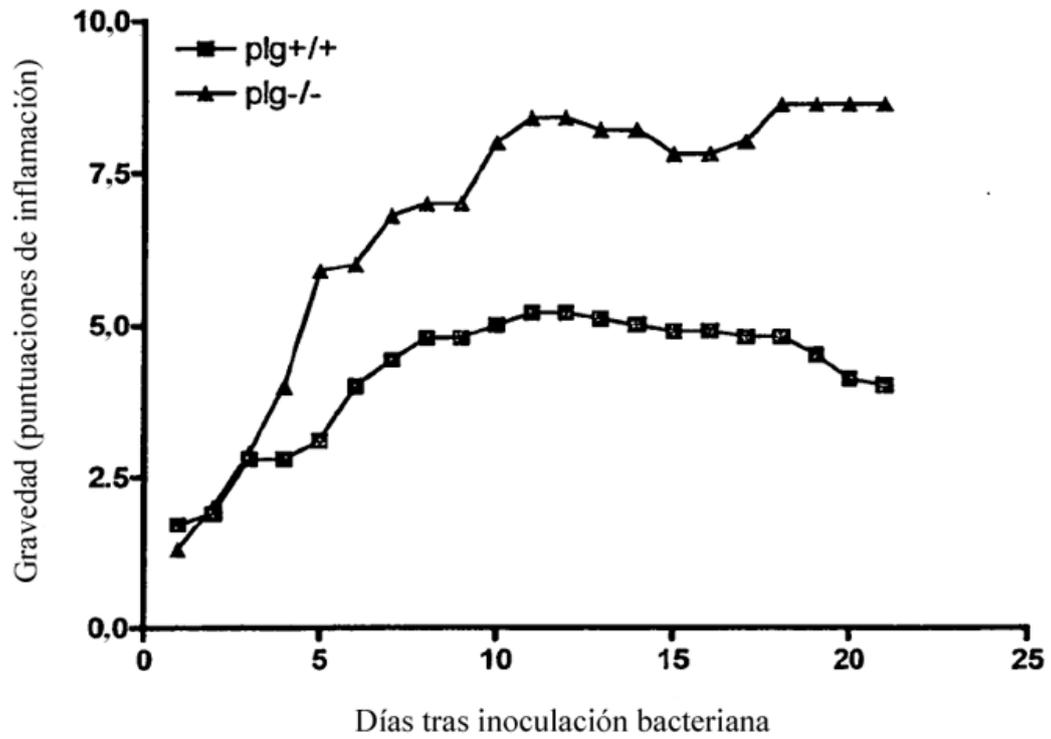


Fig. 14

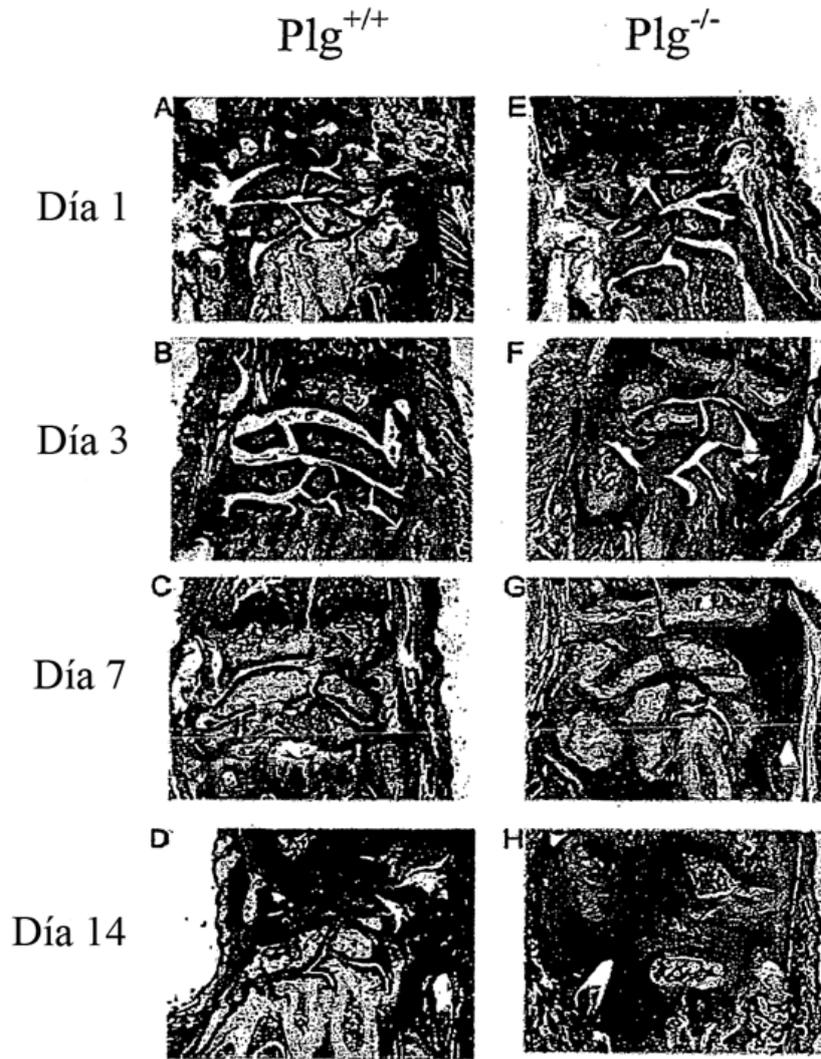


Fig 15.



Fig. 16

Pig^{+/+}



Pig^{-/-}



Fig. 17.

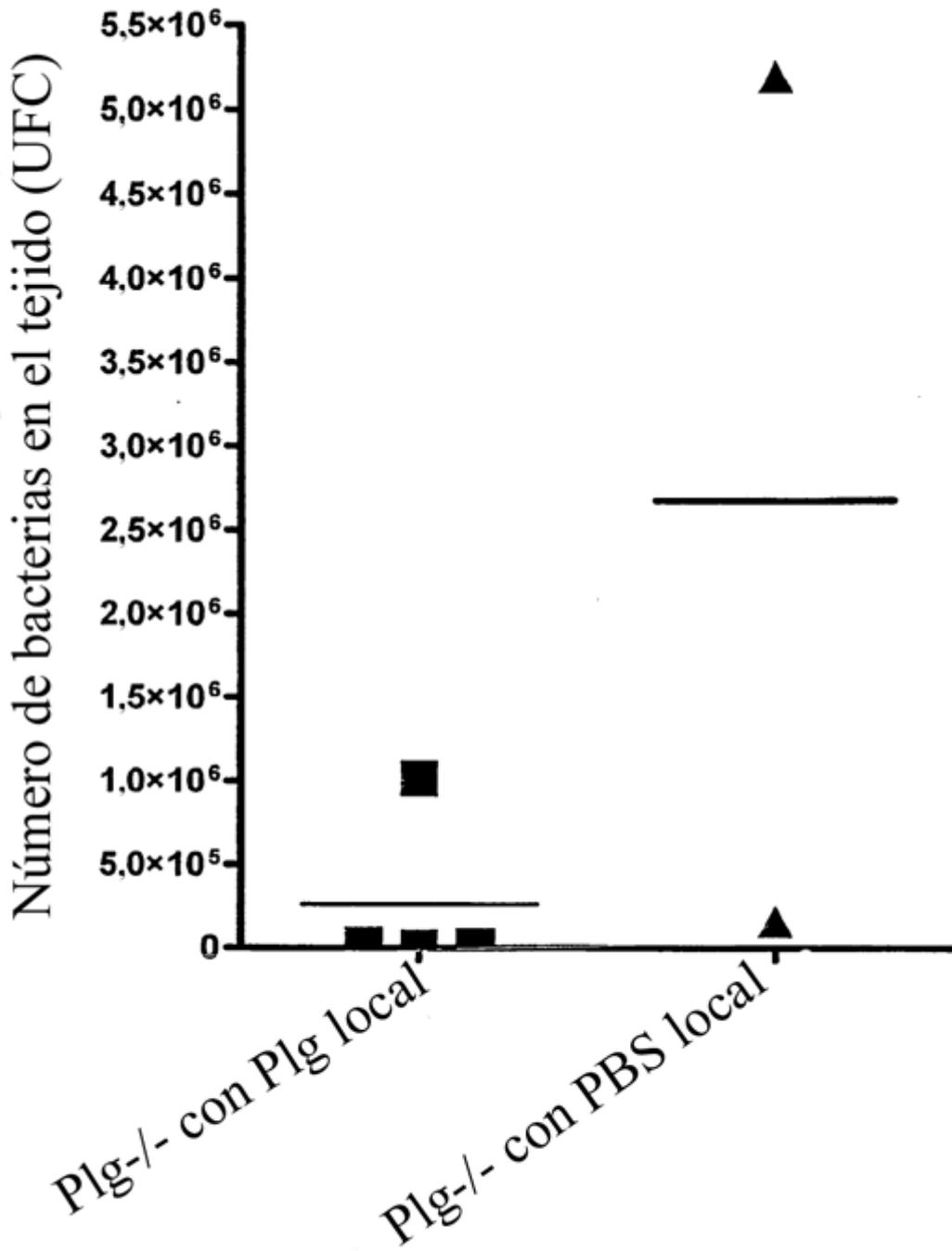


Fig. 18

Plg-/- con inyección local de Plg

Plg-/- con inyección local de PBS

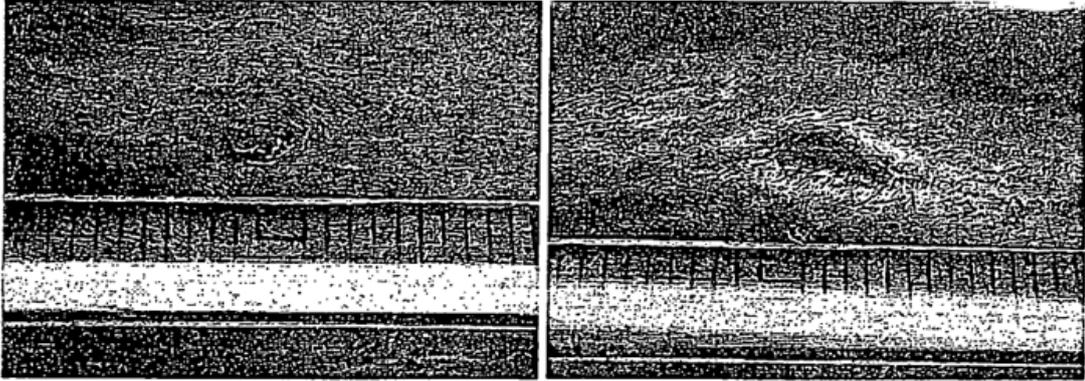


Fig. 19

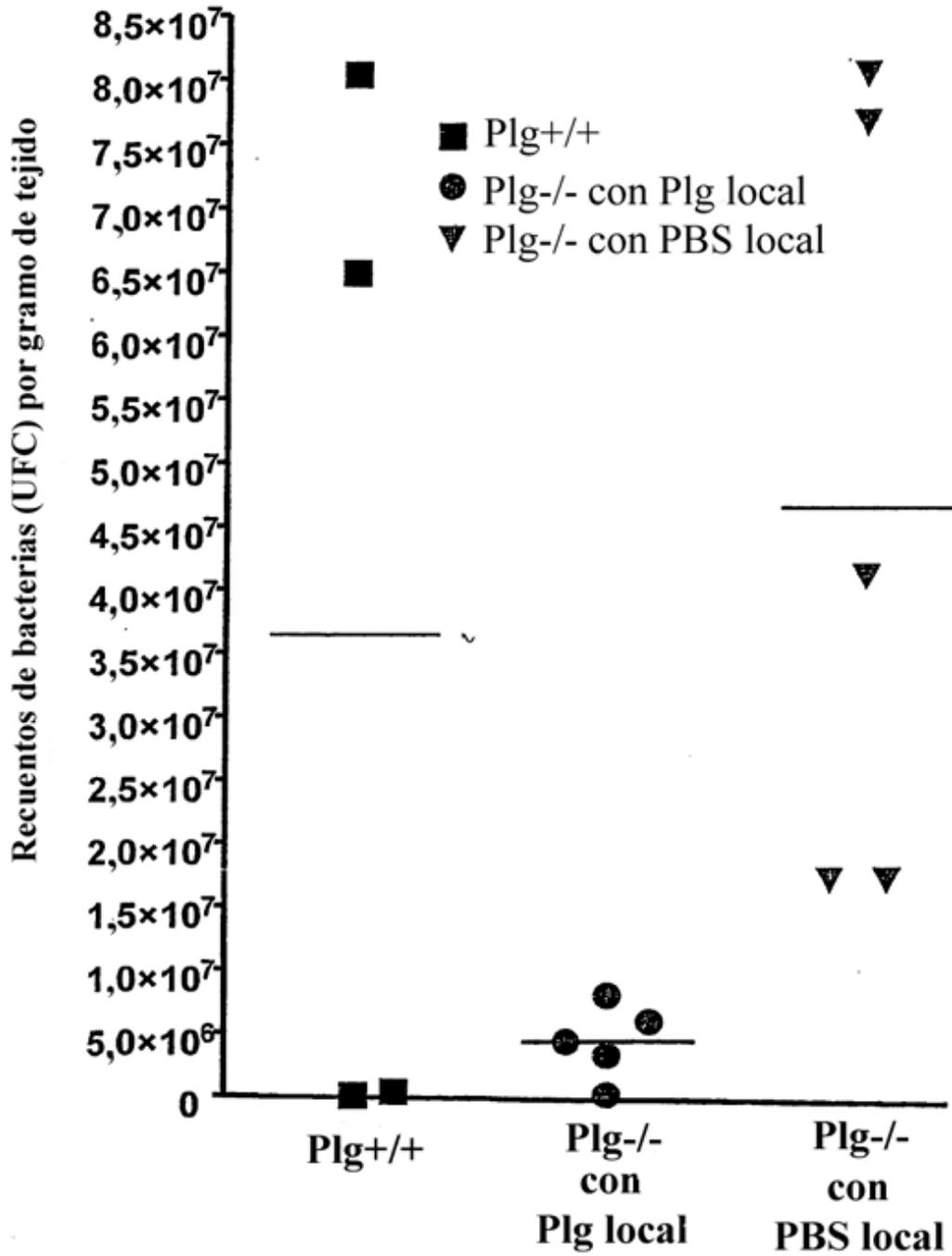


Fig 20.