

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 598**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015 PCT/EP2015/080924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102536**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15817338 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3236988**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de superinfecciones bacterianas post-influenza**

30 Prioridad:

23.12.2014 EP 14307154

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

04.03.2021

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%);

UNIVERSITÉ DE LILLE (25.0%) y

INSTITUT PASTEUR DE LILLE (25.0%)

72 Inventor/es:

SIRARD, JEAN-CLAUDE;

CARNOY, CHRISTOPHE;

TROTTEIN, FRANÇOIS y

PORTE, RÉMI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 809 598 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

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de superinfecciones bacterianas post-influenza

Campo de la invención:

5 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de superinfecciones bacterianas post-influenza.

Antecedentes de la invención:

10 La infección por el virus de la influenza A (IAV) es una de las causas más importantes de enfermedades del tracto respiratorio y es responsable de morbilidad y mortalidad generalizadas. Durante los primeros días después de la infección, el huésped desarrolla una respuesta inmune innata compleja y eficaz que permite contener la replicación del IAV en espera del desarrollo de respuestas inmunes adaptativas. Sin embargo, en momentos posteriores, puede producirse una mayor susceptibilidad a la superinfección bacteriana que conduce a la mortalidad durante las epidemias y pandemias de IAV. Por ejemplo, las neumonías bacterianas representaron la mayoría de las muertes (~50 millones de muertes en todo el mundo) en la pandemia de 1918 (gripe española). Entre las especies de bacterias predominantes que causan la superinfección bacteriana post-IAV se encuentran *Streptococcus pneumoniae* (el neumococo), *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, existe una necesidad de tratamiento de superinfecciones bacterianas post-influenza. Aunque existen evidencias de características específicas de los tipos individuales de bacterias, los mecanismos que conducen a mejorar la susceptibilidad a la infección bacteriana secundaria al parecer tienen una base amplia e incluyen alteraciones de las defensas mecánicas e inmunológicas. De hecho, se ha descrito la alteración de las barreras físicas a la adhesión e invasión bacteriana, incluyendo la alteración de la mucosa, así como la exposición de nuevos sitios de unión para las bacterias. Paralelamente, el deterioro de la respuesta innata del huésped (en lugar de la adaptativa) es una característica cardinal de la exposición post-influenza de la neumonía asociada a bacterias. Actualmente hay fuertes evidencias de que la señalización de TLR5 induce mecanismos protectores contra las infecciones bacterianas. Por ejemplo, también se demostró que la administración mucosa de flagelina en ratones podría proteger contra la infección pulmonar por *Streptococcus pneumoniae*. Las propiedades antiinfecciosas de la flagelina se observaron principalmente cuando el ligando TLR5 se administró conjuntamente con el patógeno o de 2 a 24 h antes de la exposición bacteriana (Muñoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* 2010; 78: 4226-33).

Sumario de la invención:

30 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de superinfecciones bacterianas post-influenza. En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención:

35 Los inventores de la presente investigaron la eficacia de una terapia de combinación que consiste en flagelina + antibiótico en animales infectados con IAV. Para este propósito, los animales infectados con IAV durante 7 días fueron infectados con *S. pneumoniae* y tratados con AMX y flagelina. Estos muestran que la terapia de combinación fue altamente eficaz para aumentar el índice terapéutico de AMX tanto en los pulmones como en el bazo.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de una superinfección bacteriana post-influenza en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico.

40 El sujeto puede ser un ser humano o cualquier otro animal (por ejemplo, aves y mamíferos) susceptible a la infección por influenza (por ejemplo, animales domésticos tal como gatos y perros; ganado y animales de granja tal como caballos, vacas, cerdos, pollos, etc.). Normalmente dicho sujeto es un mamífero que incluye un mamífero no primate (por ejemplo, un camello, burro, cebra, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, gato, perro, rata y ratón) y un mamífero primate (por ejemplo, un mono, chimpancé y un ser humano). En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

45 De acuerdo con la invención, el sujeto sufre o ha sufrido una infección por influenza. Como se usa en la presente memoria, el término "infección por influenza" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la enfermedad causada por una infección con un virus de la influenza. En algunas realizaciones de la invención, la infección por influenza está asociada con el virus de la influenza A o B. En algunas realizaciones de la invención, la infección por influenza está asociada con el virus de la influenza A. En algunas realizaciones específicas de la invención, la infección por influenza es causada por el virus de la influenza A, es decir, H1N1, H2N2, H3N2 o H5N1.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "superinfección bacteriana post-influenza" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una infección bacteriana (por ejemplo, neumonía bacteriana) que ocurre en un sujeto que sufre o ha sufrido una infección por influenza. Normalmente, la superinfección bacteriana ocurre dentro de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 días después de la infección por influenza. El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de una superinfección

bacteriana post-influenza tal como, pero sin limitación, infecciones del tracto respiratorio inferior (por ej., neumonía), infecciones del oído medio (por ej., otitis media) y sinusitis bacteriana. La superinfección bacteriana puede ser causada por numerosos patógenos bacterianos. Por ejemplo, pueden estar mediados por al menos un organismo seleccionado del grupo que consiste en: *Streptococcus pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma species* y *Moraxella catarrhalis*.

Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente con riesgo de contraer la enfermedad o con sospecha de haber contraído la enfermedad, así como a los pacientes que están enfermos o han sido diagnosticados con una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tiene un trastorno médico o que en última instancia puede adquirir el trastorno, para prevenir, curar, retrasar la aparición, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Por "régimen terapéutico" se entiende el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación utilizado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. El término "régimen de inducción" o "período de inducción" se refiere a un régimen terapéutico (o la parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un paciente durante el período inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un "régimen de carga", que puede incluir la administración de una dosis mayor del medicamento que la que un médico emplearía durante un régimen de mantenimiento, la administración de un medicamento con más frecuencia de la que un médico administraría el medicamento durante un régimen de mantenimiento, o ambas. El término "régimen de mantenimiento" o "período de mantenimiento" se refiere a un régimen terapéutico (o la parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante períodos de tiempo extensos (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ej., administrar un fármaco a intervalos regulares, por ej., semanal, mensual, anual, etc.) o terapia intermitente (por ej., tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en caso de recaída o tratamiento tras el logro de un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).

El procedimiento de la presente divulgación es particularmente adecuado para sujetos que se identifican como de alto riesgo de desarrollar una superinfección bacteriana post-influenza, incluidos sujetos que tienen al menos 50 años de edad, sujetos que residen en centros de atención crónica, sujetos que tienen trastornos crónicos del sistema pulmonar o cardiovascular, sujetos que requirieron seguimiento médico regular u hospitalización durante el año anterior debido a enfermedades metabólicas crónicas (incluida la diabetes mellitus), disfunción renal, hemoglobinopatías o inmunosupresión (incluida la inmunosupresión causada por fármacos o por el virus de inmunodeficiencia humana [VIH]); niños menores de 14 años, pacientes entre 6 meses y 18 años que reciben terapia de aspirina a largo plazo y mujeres que estarán en el segundo o tercer trimestre del embarazo durante la temporada de influenza. Más específicamente, se contempla que el procedimiento de la invención es adecuado para el tratamiento de la superinfección bacteriana post-influenza en sujetos mayores de 1 año y menores de 14 años (es decir, niños); sujetos entre las edades de 50 y 65 años, y adultos mayores de 65 años.

Como se usa en la presente memoria, el término "flagelina" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la flagelina contenida en una variedad de especies bacterianas Gram-positivas o Gram-negativas. Las fuentes no limitantes de flagelinas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ej., *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Serratia*, por ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de las flagelinas están disponibles públicamente en el NCBI Genbank, véanse, por ejemplo, los números de acceso AAL20871, NP_310689, BAB58984, AAO85383, AAA27090, NP_461698, AAK58560, YP_001217666, YP_002151351, YP_001250079, AAA99807, CAL35450, AAN74969 y BAC44986. Se pretende que las secuencias de flagelina de estas y otras especies estén abarcadas por el término flagelina como se usa en la presente memoria. Por lo tanto, las diferencias de secuencia entre especies se incluyen dentro del significado del término.

El término "polipéptido de flagelina" está destinado a una flagelina o un fragmento del mismo que retiene la capacidad de unirse a, y activar, TLR5. Como se usa en la presente memoria, el término "receptor tipo Toll 5" o "TLR5" tiene su significado general en la técnica y pretende significar un receptor tipo Toll 5 de cualquier especie, pero preferentemente un receptor tipo Toll humano 5. Tras la activación, un TLR5 induce una respuesta celular al transducir una señal intracelular que se propaga a través de una serie de moléculas de señalización desde la superficie celular hasta el núcleo. Normalmente, el dominio intracelular de TLR5 recluta la proteína adaptadora, MyD88, que recluta la serina/treonina quinasas IRAK (IRAK-1 e IRAK-4). Las IRAK forman un complejo con TRAF6, que luego interactúa con diversas moléculas que participan en la transducción de la señal TLR. Estas moléculas y otros componentes de la vía de transducción de señales TLR5 estimulan la actividad de factores de transcripción, tal como fos, jun y NF- κ B, y la inducción correspondiente de productos génicos de genes regulados por fos, jun y NF- κ B, tal como, por ejemplo, IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL2 y CCL20. Normalmente, el polipéptido de flagelina de la presente invención comprende los dominios de flagelina implicados en la señalización de TLR5. El término "dominio de flagelina" incluye el dominio natural de flagelina y sus variantes conservadoras de función. Las "variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima ha sido cambiado sin alterar la conformación y

la función general del polipéptido, que incluye, pero sin limitación, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tal como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, propiedad ácida, básica, hidrófoba, aromática y similares). Los aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de identidad de secuencia de proteínas o aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70% a 99%. Por lo tanto, una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con la secuencia nativa de flagelina o fragmento de la misma. De acuerdo con la invención, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; o 99, o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. De la misma manera, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; o 99, o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. La identidad de la secuencia de aminoácidos se determina preferentemente usando un algoritmo de alineación de secuencia adecuado y parámetros predeterminados, tal como BLAST P (Karlin y Altschul, 1990). Los dominios de flagelina que están implicados en la señalización de TLR5 son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Smith *et al.* (2003) Nat. Immunol 4: 1247-1253 (por ej., aminoácidos 78-129, 135-173 y 394-444 de flagelina *S. typhimurium* u homólogos o formas modificadas de los mismos).

Los ejemplos de polipéptidos de flagelina incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos N.º 6.585.980; 6.130.082; 5.888.810; 5.618.533; y 4.886.748; Publicación de Patente de los Estados Unidos N.º US 2003/0044429 A1; y en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2008097016 y WO 2009156405.

Una flagelina *E. coli* O157:H7 ejemplar es SEQ ID NO: 1. Una flagelina *S. typhimurium* ejemplar es SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 pueden usarse como polipéptidos de flagelina de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 se pueden usar como polipéptidos de flagelina de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 3 pueden usarse como polipéptidos de flagelina de acuerdo con la invención a condición de que los residuos 89-96 (es decir, los residuos que están involucrados en la detección de TLR5) no estén mutados (es decir, no sustituidos o no eliminados). En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos que tienen al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3 pueden usarse como polipéptidos de flagelina de acuerdo con la invención, a condición de que los residuos 89-96 (es decir los residuos que están involucrados en la detección de TLR5) no estén mutados (es decir, no sustituidos o no eliminados).

En algunas realizaciones, la presente divulgación abarca el uso de los polipéptidos recombinantes de flagelina descritos en la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2009156405.

En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina de la presente invención comprende: a) un péptido de extremo N terminal que tiene al menos 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos a partir del residuo de aminoácido ubicado en la posición 1 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácido ubicados en las posiciones 99 a 173 de la SEQ ID NO: 3; y b) un péptido de extremo C terminal que tiene al menos 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácido ubicados en las posiciones 401 a 406 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en el residuo de aminoácido ubicado en la posición 494 de la SEQ ID NO: 3, en la que: dicho péptido de extremo N terminal está directamente unido a dicho péptido de extremo C terminal, o dicho péptido de extremo N terminal y dicho C péptido terminal están indirectamente unidos, uno al otro, a través de una cadena espaciadora. En algunas realizaciones, dicho péptido de extremo N terminal se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, dicho péptido de extremo C terminal se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401-494 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, dichos péptidos de extremo N terminal y extremo C terminal consisten en el secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En algunas realizaciones, dichos péptidos de extremo N terminal y extremo C terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En algunas realizaciones, dichos péptidos de extremo N terminal y extremo C terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En algunas realizaciones, dicho péptido de extremo N terminal y dicho péptido de extremo C terminal están unidos indirectamente, uno al otro, a través de una cadena espaciadora intermedia que consiste en una secuencia peptídica NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido asparagina ubicado en la posición 488 de la SEQ ID NO: 3 se reemplaza por una serina. En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina como se describió anteriormente comprende un resto de metionina adicional en el extremo N terminal.

El polipéptido de flagelina de la presente invención se produce mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina de la presente invención se produce normalmente de

forma recombinante por células recombinantes que se han transfectado con un ácido nucleico que codifica su
 secuencia de aminoácidos y permite su producción eficaz dentro de las células transfectadas. La secuencia de ácido
 nucleico que codifica el polipéptido de flagelina de la invención puede insertarse en un vector replicable para la
 clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores están disponibles públicamente. El vector
 5 puede, por ejemplo, estar en forma de plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico
 adecuada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en
 un sitio o sitios de endonucleasa de restricción adecuados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes
 del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, una o más de una secuencia señal si la secuencia se va a
 secretar, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una
 10 secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de
 estos componentes emplea técnicas de ligadura estándar que son conocidas por el experto en la técnica. Los vectores
 de expresión y clonación normalmente contendrán un gen de selección, también denominado marcador seleccionable.
 Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por
 ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c)
 15 suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina
 racemasa para bacilos. Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos
 que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico que codifica el polipéptido de
 flagelina de la invención, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped adecuada cuando se emplea DHFR
 de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR. Los vectores de expresión y clonación
 20 generalmente contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido
 de flagelina para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células huésped
 potenciales son bien conocidos. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen los
 sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y
 promotores híbridos tal como el promotor *tac*. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también
 25 contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D) operativamente unida al ADN que codifica el polipéptido de flagelina
 de la invención. Las células huésped se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descritos
 en la presente memoria para la producción de polipéptidos de flagelina y se cultivan en medios nutrientes
 convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los
 genes que codifican las secuencias deseadas. El experto en la técnica puede seleccionar las condiciones de cultivo,
 30 tal como medios, temperatura, pH y similares, sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y
 técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell
 Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991). Las células huésped adecuadas para clonar o
 expresar el ADN en los vectores de la presente invención incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas
 superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tal como organismos Gram-negativos
 35 o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como *E. coli*. Diversas cepas *E. coli* están disponibles
 públicamente, tal como *E. coli* Cepa K12 MM294 (ATCC 31, 446); *E. coli* X1776 (ATCC 31, 537); *E. coli* cepa W3110
 (ATCC 27.325); y K5772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae
 tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo,
 Salmonella typhimurium, *Serratia*, por ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos tal como *B. subtilis* y *B.
 licheniformis* (por ej., *B. licheniformis* 41 P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989),
 40 *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos. La cepa
 SIN41 de *Salmonella typhimurium* (*fliC fljB*), es particularmente interesante para la producción de polipéptidos de
 flagelina de la invención, ya que estas células huésped procariotas no secretan ninguna flagelina (Proc Natl Acad Sci
 USA. 2001; 98:13722-7) Sin embargo, las flagelinas se secretan a través de un sistema de secreción especializado:
 el denominado "sistema de secreción de tipo III". Curiosamente, la cepa SIN41 produce todos los componentes del
 45 sistema de secreción de tipo III necesarios para la secreción óptima de flagelina. La secuencia de clonación que
 codifica nuevos péptidos de flagelina bajo el promotor *fliC* permite la secreción en grandes cantidades de los
 polipéptidos de flagelina de interés en la cepa SIN41. La cepa W3110 también es interesante porque es una cepa
 huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta
 cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una
 50 mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, los ejemplos de tales huéspedes
 incluyen *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo
 completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15
 (argF-lac) 169 degP ompT kan.sup.r*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15
 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación por
 55 eliminación *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrito
 en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.946.783 otorgada el 7 de agosto de 1990. Las cepas de *E. coli* MG1655,
 MG1655 AfimA-H o MKS12, una cepa MG1655 con eliminación de *fliD*- y *-f/m>A-/-* también son candidatas
 interesantes para la producción de flagelinas recombinantes como proteínas secretadas (Nat Biotechnol. 2005; (4):
 60 475-81) Alternativamente, son adecuados los procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras
 reacciones de polimerasa de ácido nucleico. El polipéptido de flagelina de la invención se puede recuperar del medio
 de cultivo o de lisados de células huésped. Si está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando
 una solución de detergente adecuada (por ejemplo, TRITON-XTM 100) o mediante escisión enzimática. En algunas
 realizaciones, el polipéptido de flagelina se purifica del sobrenadante de *S. Typhimurium* SIN41 recombinante (*fliC
 fljB*), como se describe en Nempont *et al.* (Nempont, C. C., D.; Rumbo, M.; Bompard, C.; Villeret, V.; Sirard, J.C. 2008.
 65 La eliminación de la región hipervariable de flagelina anula la neutralización mediada por anticuerpos y la activación

sistémica de la inmunidad dependiente de TLR5. J Immunol 181: 2036-2043.). En particular, se cultivaron Salmonella en caldo Luria-Bertani (LB) durante 6-18 horas a 37 ° C con agitación. El sobrenadante se filtró y se saturó con sulfato de amonio al 60% (Sigma Aldrich, EE.UU.). Los materiales precipitados se recuperaron por centrifugación, solubilización en Tris/HCl 20mM pH 7,5 y luego diálisis. Las proteínas se purificaron adicionalmente mediante rondas sucesivas de hidroxapatita, intercambio aniónico y cromatografía de extracción por tamaño (Bio-Rad Laboratories, EE.UU., GE Healthcare, Suecia). Por último, las proteínas se agotaron de lipopolisacárido (LPS) utilizando una columna de polimixina B (Pierce, EE.UU.). Usando el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (Associates of Cape Cod Inc., EE.UU.), se determinó que la concentración residual de LPS era inferior a 30 pg de LPS por µg de flagelina recombinante. Las construcciones que codifican las flagelinas pueden generarse por PCR y clonarse en el vector de expresión pET22b+. Los plásmidos se pueden introducir en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y la producción de proteínas pueden inducirse mediante la adición de IPTG 1mM. Después de la interrupción en prensa francesa, la fracción soluble se agotó de lipopolisacárido (LPS) usando la extracción Triton X-114. Si se encuentran flagelinas en la fracción insoluble después de la prensa francesa, los cuerpos de inclusión se desnaturalizan en presencia de urea 8M seguido de diálisis y extracción con Triton X-114. Luego, las proteínas se pueden purificar mediante cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel. Finalmente, las proteínas pueden volver a agotarse de LPS utilizando una columna de polimixina B (Pierce, EE.UU.).

En algunas realizaciones, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en aminoglucósidos, betalactámicos, quinolonas o fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, sulfametaxazol, tetraciclinas, estreptograminas, oxazolidinonas (tal como linezolid), rifamicinas, glucopeptidos, polimixinas, antibióticos lipopéptidos.

Las tetraciclinas pertenecen a una clase que comparte una estructura de anillo de cuatro miembros compuesta por cuatro anillos fusionados de 6 miembros (hexacíclicos). Las tetraciclinas exhiben su actividad al inhibir la unión del aminoacil tRNA a la subunidad ribosómica 30S en bacterias susceptibles. Las tetraciclinas para su uso en la invención incluyen clortetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, metaciclina, mecociclina, tigeciclina, limeciclina y tetraciclina. Las tetraciclinas son eficaces contra muchos organismos conocidos, incluyendo estreptococos α-hemolíticos, estreptococos no hemolíticos, bacilos gram-negativos, rickettsias, espiroquetas, Mycoplasma y Clamidia.

Los aminoglucósidos son compuestos derivados de especies de bacterias Streptomyces o Micromonospora y se usan principalmente para tratar infecciones causadas por bacterias gramnegativas. Todos los fármacos que pertenecen a esta clase poseen la misma estructura química básica, es decir, una molécula central de hexosa o diaminohexosa a la que dos o más amino azúcares están unidos por un enlace glucosídico. Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que se unen al ribosoma 30S e inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Son activos principalmente contra bacilos aerobios gram-negativos y estafilococos. Los antibióticos aminoglucósidos para su uso en la invención incluyen amikacina (Amikin®), gentamicina (Garamycin®), kanamicina (Kantrex®), neomicina (Mycifradin®), netilmicina (Netromycin®), paromomicina (Humatin®), estreptomycin y tobramicina (TOBI Solution®, TobraDex®).

Los macrólidos son un grupo de antibióticos policétidos cuya actividad se deriva de la presencia de un anillo de macrólidos (un gran anillo de lactona de 14, 15 o 16 miembros) al que están unidos uno o más azúcares desoxi, generalmente cladinosa y desosamina. Los macrólidos son principalmente bacteriostáticos y se unen a la subunidad 50S del ribosoma, lo que inhibe la síntesis bacteriana. Los macrólidos son activos contra los cocos gram-positivos aerobios y anaerobios (con la excepción de los enterococos) y contra los anaerobios gram-negativos. Los macrólidos para su uso en la invención incluyen azitromicina (Zithromax®), claritromicina (Biaxin®), diritromicina (Dynabac®), eritromicina, clindamicina, josamicina, roxitromicina y lincomicina.

Los cetólidos pertenecen a una clase de macrólidos semisintéticos de anillo de 14 miembros en los que la estructura del anillo de eritromicina macrolactona y el azúcar D-desosamina unidos en la posición 5 se retienen, sin embargo, en reemplazo del resto L-cladinosa5 y el grupo hidroxilo en la posición 3 hay un grupo funcional 3-ceto. Los cetólidos se unen a ARNr 23S, y su mecanismo de acción es similar al de los macrólidos (Zhanell, G. G., *et al.*, Drugs, 2001; 61 (4): 443-98). Los cetólidos exhiben buena actividad contra aerobios gram-positivos y algunos aerobios gram-negativos, y poseen excelente actividad contra *Streptococcus spp.* incluyendo *Streptococcus pneumoniae* que produce mefA y ermB, y *Haemophilus influenzae*. Los cetólidos representativos para su uso en la invención incluyen telitromicina (anteriormente denominada HMR-3647), HMR 3004, HMR 3647, cetromicina, EDP-420 y ABT-773.

Estructuralmente, las quinolonas poseen un resto 1,4 dihidro-4-oxo-quinolinilo que lleva un grupo carboxilo esencial en la posición 3. Funcionalmente, las quinolonas inhiben las topoisomerasas procarióticas tipo II, es decir, ADN girasa y, en algunos casos, topoisomerasa IV, a través de unión directa al cromosoma bacteriano. Las quinolonas para su uso en la invención abarcan quinolonas de primera, segunda, tercera y cuarta generación, incluyendo fluoroquinolonas. Tales compuestos incluyen ácido nalidixico, cinoxacina, ácido oxolínico, flumequina, ácido pipemídico, rosoxacina, norfloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, enoxacin, amifloxacin, fleroxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, clinafloxacin, sitafloxacin, pefloxacin, rufloxacin, esparfloxacin, temafloxacin, tosufloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, y trovafloxacin. Las quinolonas adicionales adecuadas para su uso en la invención incluyen las descritas en Hooper, D. y Rubinstein, E., "Quinolone Antimicrobial Agents, VD Edition", American Society of Microbiology Press, Washington D.C. (2004).

Todos los fármacos que pertenecen a la clase de sulfonamida poseen un resto sulfonamida, SO_2NH_2 , o un resto sulfonamida sustituido, en el que uno de los 15 hidrógenos en el nitrógeno se reemplaza por un sustituyente orgánico. Los N-sustituyentes ilustrativos incluyen tiazol sustituido o no sustituido, pirimidina, isoxazol y otros grupos funcionales. Todos los antibióticos de sulfonamida comparten una característica estructural común, es decir, son todos bencenosulfonamidas, lo que significa que la funcionalidad de sulfonamida está directamente unida a un anillo de benceno. La estructura de los antibióticos de sulfonamida es similar al ácido p-aminobenzoico (PABA), un compuesto requerido en las bacterias como sustrato para la enzima, dihidropteroato sintetasa, para la síntesis del ácido tetrahidrofólico. Las sulfonamidas funcionan como antibióticos al interferir con los procesos metabólicos en las bacterias que requieren PABA, lo que inhibe el crecimiento y la actividad bacteriana. Los antibióticos de sulfonamida para su uso en la invención incluyen los siguientes: mafenida, ftalilsulfatiazol, succinilsulfatiazol, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfamazona, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfametopirazina, sulfametoxipiridazina, sulfametrol, sulfamonometoxina, sulfamylon, sulfanilamida, sulfaquinoxalina, sulfasalazina, sulfatiazol, sulfisoxazol, sulfisoxazol diolamina, y sulfaguanidina.

Todos los miembros de betalactámicos poseen un anillo betalactámico y un grupo carboxilo, lo que resulta en similitudes tanto en su farmacocinética como en su mecanismo de acción. La mayoría de los betalactámicos clínicamente útiles pertenecen al grupo de penicilina o al grupo de cefalosporinas, incluidas las cefamicinas y oxacephem. Los betalactámicos también incluyen los carbapenems y monobactams. En términos generales, los betalactámicos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Más específicamente, estos antibióticos causan "muecas" en la red de peptidoglucano de la pared celular que permiten que el protoplasma bacteriano fluya desde su red protectora hacia el medio hipotónico circundante. Luego, el líquido se acumula en el protoplasto desnudo (una célula desprovista de su pared), y finalmente explota, lo que lleva a la muerte del organismo. Mecánicamente, los betalactámicos actúan inhibiendo la actividad de la transpeptidasa D-alanil-D-alanina formando ésteres estables con el carboxilo del anillo abierto de lactama unido al grupo hidroxilo del sitio diana de la enzima. Los betalactámicos son extremadamente eficaces y normalmente son de baja toxicidad. Como grupo, estos fármacos son activos contra numerosos organismos gram-positivos, gram-negativos y anaerobios. Los fármacos que entran en esta categoría incluyen 2-(3-alanil)clavam, 2-hidroximetilclavam, 7-metoxicefalosporina, epi-tienamicina, acetil-tienamicina, amoxicilina, apalcilina, aspoxicilina, azidocilina, azlocilina, aztreonam, bacampicilina, blapenem, carbenicilina, carfecilina, carindacilina, carpetimicina A y B, cefacetril, cefaclor, cefadroxil, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalotina, cefamandol, cefapirina, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefbuperazona, cefcapeno, cefdinir, cefditoren, cefepime, cefetamet, cefixima, cefinenoxima, cefinetazol, cefminox, cefmolexina, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforamida, cefoselis, cefotaxima, cefotetan, cefotiam, cefoxitina, ceftazopran, cefpiramida, cefpiroma, cefpodoxima, cefprozil, cefquinoma, cefradina, cefroxadina, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram, ceftazolidin, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefalosporina C, cefamicina A, cefamicina C, cefalotina, quitinovorina A, quitinovorina B, quitinovorina C, ciclacilina, clometocilina, cloxacilina, cicloserina, desoxi pluracidomicina B y C, dicloxacilina, dihidro pluracidomicina C, epicilina, epitiamicina D, E, y F, ertapenem, faropenem, flomoxef, flucloxacilina, hetacilina, imipenem, lenampicilina, loracarbef, mecilina, meropenem, metampicilina, meticilina (también denominada meticilina), mezlocilina, moxalactama, nafcilina, nortienamicina, oxacilina, panipenem, penamecilina, penicilina G, N y V, feneticilina, piperacilina, pivampicilina, pivcefalexina, pivmecilina, pivmecilina, pluracidomicina B, C, y D, propicilina, sarmoxicilina, sulbactam, sultamicilina, talampicilina, temocilina, terconazol, tienamicina y ticarcilina.

Se han aislado y caracterizado más de 400 péptidos antimicrobianos naturales. En base a la estructura química, estos péptidos se pueden clasificar en dos grupos principales: lineal y cíclico (RE. Hancock *et al.*, Adv. Microb. Physiol., 1995, 37: 135-137; H. Kleinkauf *et al.*, Crit. Rev. Biotechnol., 198, 8: 1-32; D. Perlman y M. Bodansky, Annu. Rev. Biochem., 1971, 40: 449-464) Se cree que el modo de acción para la mayoría de estos péptidos (tanto lineales como cíclicos) implica la interrupción de la membrana, lo que lleva a la fuga celular (A. Mor, Drug Develop. Res., 2000, 50: 440-447). Los péptidos lineales, tal como magaininas y melitina, existen principalmente como estructuras anfipáticas α -helicoidales (que contienen restos hidrófobos e hidrófilos segregados), o como β -hélices como se encuentran en la gramicidina A (GA). Los péptidos cíclicos, que adoptan principalmente una estructura de lámina β -anfipática, se pueden dividir en dos subgrupos: los que contienen enlaces disulfuro, tal como taquiplesina, y los que no, tal como gramicidina S (D. Audreu y L. Rivas, Biopolymers, 1998, 47: 415-433). Los antibióticos peptídicos también se dividen en dos clases: péptidos sintetizados no ribosomales, tal como gramicinas, polimixinas, bacitracinas, glucopéptidos, etc., y péptidos sintetizados ribosomales (naturales). Los primeros a menudo se modifican drásticamente y son producidos en gran medida por bacterias, mientras que los segundos son producidos por todas las especies de vida (incluidas las bacterias) como un componente principal de las moléculas de defensa del huésped natural de estas especies. En ciertas realizaciones, el antibiótico peptídico es un antibiótico lipopéptido tal como colistina, daptomicina, surfactina, friulimicina, aculeacina A, iturina A y tsushimicina. La colistina (también denominada colimicina) es un antibiótico polimixina descubierto hace más de 50 años. Es un antibiótico lipopéptido cíclico que penetra en la pared celular de las bacterias gram-negativas mediante un mecanismo autoinducido al quelar los iones divalentes. La colistina desestabiliza la pared y puede insinuarla. La colistina básicamente perfora la pared celular, causando distorsión de esta estructura y la liberación de componentes intracelulares. El aumento de la resistencia a múltiples fármacos en bacterias Gram-negativas, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*, presenta un problema crítico. Las opciones terapéuticas limitadas han obligado a los médicos y microbiólogos de enfermedades infecciosas a reevaluar la aplicación clínica de colistina. La colistina se asocia con neurotoxicidad y nefrotoxicidad. El régimen de dosificación y la formulación novedosa pueden ser una respuesta para abordar el problema de la toxicidad.

En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina se usa en combinación con amoxicilina.

En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina se usa en combinación con Bactrim® que contiene tanto sulfametoxazol como trimetoprima.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido de flagelina y el antibiótico deben usarse simultánea o secuencialmente dentro de un tiempo dado. El antibiótico se puede aplicar en cualquier orden, por ej., en primer lugar se puede aplicar el antibiótico y luego se puede aplicar el polipéptido de flagelina o viceversa. Es evidente que cuando se usa una composición que comprende tanto el antibiótico como el polipéptido de flagelina, ambos componentes se aplicarán al mismo tiempo por las mismas vías o por diferentes vías de administración. Por ejemplo, el antibiótico puede administrarse al sujeto por vía oral y el polipéptido de flagelina se administra al sujeto por vía intravenosa o por vía intranasal.

10 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del polipéptido y/o antibiótico de flagelina para el tratamiento de una superinfección bacteriana post-influenza en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto; tiempo de administración, vía de administración y tasa de excreción del compuesto específico empleado; duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidencia con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, es bien conocido por los expertos en la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento normalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del medicamento a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

30 Normalmente, el principio activo de la presente invención (es decir, el polipéptido y/o antibiótico de flagelina) se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un agente de carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico auxiliar de cualquier tipo. El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, los principios activos de la invención pueden administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con portadores farmacéuticos convencionales. Las formas de administración de unidades adecuadas comprenden formas de vía oral tal como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectales. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención se administra tópicamente (es decir, en el tracto respiratorio del sujeto). Por lo tanto, las composiciones pueden formularse en forma de spray, aerosol, solución, emulsión u otra forma conocida por un experto en la técnica. Si el procedimiento de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de un aerosol, spray, neblina o en forma de gotas. En particular, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse convenientemente en forma de presentación en spray en aerosol a partir de recipientes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propolente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: Flagelina estimula la expresión de genes proinflamatorios durante la infección por virus de la Influenza A. Ratones C57BL/6 fueron infectados por vía intranasal con el virus de la Influenza A (30 UFP). Siete o 14 días después de la infección viral, los ratones se trataron intranasalmente con 2,5 µg de flagelina FliC_{Δ174-400}. Dos horas después de la estimulación con flagelina, se recogieron los pulmones para el análisis de los niveles de transcripción por PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como medias ± errores estándar de la media (n = 4). (A-C) Los niveles de ARN mensajero se expresan con relación a los del grupo simulado (no infectado y no tratado), establecido arbitrariamente en 1. (D) El ARN del virus se expresa en comparación con una expresión génica de mantenimiento (βactina) y el límite de detección se estableció arbitrariamente en 1 con un ratón C57BL/6 no infectado. La significación estadística se determinó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (*: p < 0,05).

Figura 2: El tratamiento con AMX/FliC_{Δ174-400} protege a los ratones coinfectados por *S. pneumoniae* del virus de la Influenza A. (A) Ratones C57BL/6 fueron infectados con el virus de la Influenza A H3N2 (30 UFP). Siete días después, los ratones fueron infectados con *S. pneumoniae* (10³ UFC). Doce horas y 42 h después, los animales fueron tratados intragástricamente con 5 µg de AMX e intranasalmente con 2,5 µg de flagelina FliC_{Δ174-400}. A las 60 h, se determinaron los recuentos bacterianos en pulmón (B) y bazo (C) midiendo UFC por tejido. Cada punto representa UFC para un ratón individual. La línea continua representa el umbral de detección. La significación estadística se determinó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (*: p < 0,05 y **: p < 0,01).

Ejemplo:Materiales y procedimientos

Preparación bacteriana

El serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* (aislado clínico E1586) se obtuvo del Laboratorio Nacional de Referencia - Ministerio de Salud, Uruguay. Las soluciones de trabajo se prepararon de la siguiente manera: se inoculó caldo de levadura Todd Hewitt (THYB) (Sigma-Aldrich - Saint-Louis, MO) con colonias frescas cultivadas en placas de agar sangre, y se incubó a 37 ° C hasta OD_{600nm} de 0,7 – 0,9 unidades. Los cultivos se almacenaron a -80 ° C en THYB + glicerol al 12% (vol/vol) hasta 3 meses. Para la infección del ratón, las soluciones de trabajo se descongelaron y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; Gibco - Grand Island, NY) y se diluyeron a la concentración adecuada. El número de bacterias en las soluciones se confirmó colocando diluciones en serie en placas de agar sangre.

Modelo de infección de ratón

Se obtuvieron ratones hembra BALB/c (6-8 semanas de edad) de los laboratorios Janvier (St. Berthevin, Francia). Los animales se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente y se manipularon en una cabina de flujo laminar vertical (clase II A2, ESCO - Hatboro, PA). Todos los experimentos cumplieron con las regulaciones nacionales e institucionales actuales y las pautas éticas (B59-350009 - Institut Pasteur de Lille). Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de 1,25 mg de ketamina (Imalgène, Merial - Lyon, France) más 0,25 mg de xilacina (Rompun, Bayer HealthCare - Loos, France) en 250 µl de DPBS. Los ratones fueron infectados i.n. con 50 µl de DPBS que contenía 30 UFP de la cepa del virus de la Influenza A H3N2 altamente patógeno adaptado a murinos Scotland/20/74. Siete o 14 días después de la exposición viral, los ratones fueron infectados i.n. con 30 µl de DPBS que contenía 10³ UFC de *S. pneumoniae*.

Administración de flagelina y antibióticos

Las construcciones que codifican las flagelinas recombinantes FliC_{Δ174-400} (que albergan una etiqueta de histidina de extremo-carboxi terminal) y rFliC (que alberga una etiqueta de histidina de extremo-amino terminal) se generaron por PCR y se clonaron en el vector de expresión pET22b+. Las flagelinas recombinantes se produjeron de la siguiente manera. Los plásmidos se introdujeron en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y la producción de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM. Después de la interrupción en la prensa francesa, la fracción soluble se agotó de lipopolisacárido (LPS) usando la extracción Triton X-114 como se describió anteriormente. Las proteínas se purificaron sucesivamente en cromatografía de afinidad de níquel, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel por cromatografía líquida de proteína rápida (GE Healthcare). Finalmente, las proteínas se agotaron nuevamente de LPS usando una columna de polimixina B (Pierce, EE.UU.). Utilizando el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (Associates of Cape Cod Inc., EE.UU.), se determinó que la concentración residual de LPS era inferior a 20 pg de LPS por µg de flagelina recombinante. Las flagelinas se calentaron durante 10 minutos a 65 ° C antes de su uso para garantizar que las proteínas sean principalmente monómeros. Las flagelinas en 30 µl de DPBS se administraron i.n. bajo anestesia ligera por inhalación de isoflurano (Axience - Pantin, France) utilizando un sistema de anestesia sin reinhalación (DRE-Compact 150, DRE Veterinary - Louisville, KY). Los ratones infectados se trataron con una dosis subóptima de amoxicilina (AMX) (5 µg en 200 µl de agua; amoxicilina VERTANAL™, Sigma-Aldrich - Saint-Louis, MO) por vía intragástrica (i.g.) utilizando un tubo de alimentación de plástico (V0104030, ECIMED - Boissy -St-Léger, France). Esto representa una dosis de AMX de 250 µg/kg para ratones de 6 a 8 semanas de edad.

Determinación de la carga bacteriana en pulmones y bazo

5 Los ratones fueron sacrificados en diferentes momentos después de la infección por inyección i.p. de 5,47 mg de pentobarbital sódico (CEVA Santé animale, Libourne, France) en 100 µl de DPBS. Los pulmones y el bazo se recolectaron en puntos de tiempo seleccionados después de la infección y se homogeneizaron con un homogeneizador UltraTurrax (IKA-Werke, Staufen, Germany). Los recuentos viables se determinaron colocando diluciones en serie en placas de agar sangre.

Quantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real

10 El ARN pulmonar total se extrajo con el kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel - Hoerd, France) y se transcribió inversamente con el kit de archivo de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems - Foster City, Canada). El ADNc resultante se amplificó usando PCR en tiempo real basada en SYBR Green en un sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems). Los cebadores específicos para el gen de referencia *Actb*, y genes que codifican quimioquinas *Ccl20* y *Cxcl1* fueron descritos anteriormente [20]. Niveles relativos de ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) se determinaron comparando en primer lugar, los umbrales del ciclo de PCR (Ct) para el gen de interés y *Actb* (ΔCt) y en segundo lugar, los valores de ΔCt para el grupo tratado y de referencia ($\Delta\Delta Ct$), como se describió anteriormente [20].

15 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como mediana \pm rango. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney (GraphPad Prism 5.0) y se consideraron significativas para valores $p < 0,05$.

Resultados:

20 Se ha investigado la eficacia de una terapia de combinación que consiste en flagelina + antibiótico en animales infectados con IAV. En primer lugar, se ha definido si la flagelina puede promover la señalización en animales infectados con IAV. Se ha descubierto que el tratamiento intranasal con *FliC Δ 174-400* es capaz de aumentar en forma adicional la transcripción de mediadores inmunes en el contexto de la infección por IAV tanto en la fase aguda como en las fases de resolución, por ej., 7 y 14 días después de la infección (Figura 1). Se ha seleccionado evaluar la terapia de combinación en animales con infección aguda. Para este propósito, los animales infectados con IAV durante 7 días
25 fueron infectados con *S. pneumoniae* y tratados con AMX y flagelina (Figura 2). Los datos de la presente han demostrado que la terapia de combinación es altamente eficaz para aumentar el índice terapéutico de AMX tanto en los pulmones como en el bazo.

Referencias

30 A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM Inserm

5 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE SUPERINFECCIONES BACTERIANAS POST-INFLUENZA

<130> BIO 14457 SIRADR / MC

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

20 <400> 1

```

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Ile Thr Gln Asn
1          5          10          15

Asn Ile Asn Lys Asn Gln Ser Ala Leu Ser Ser Ser Ile Glu Arg Leu
          20          25          30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln
          35          40          45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ser Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala
50          55          60

Ala Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Val Ala Gln Thr Thr Glu Gly
65          70          75          80

Ala Leu Ser Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Ile Arg Glu Leu Thr
          85          90          95

Val Gln Ala Thr Thr Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Asp Ser Ile
100          105          110

Gln Asp Glu Ile Lys Ser Arg Leu Asp Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly
115          120          125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Asn Val Leu Ala Lys Asp Gly Ser Met
130          135          140

Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu
145          150          155          160

Lys Lys Ile Asp Ser Asp Thr Leu Gly Leu Asn Gly Phe Asn Val Asn
165          170          175
    
```

ES 2 809 598 T3

Gly Lys Gly Thr Ile Thr Asn Lys Ala Ala Thr Val Ser Asp Leu Thr
 180 185 190

Ser Ala Gly Ala Lys Leu Asn Thr Thr Thr Gly Leu Tyr Asp Leu Lys
 195 200 205

Thr Glu Asn Thr Leu Leu Thr Thr Asp Ala Ala Phe Asp Lys Leu Gly
 210 215 220

Asn Gly Asp Lys Val Thr Val Gly Gly Val Asp Tyr Thr Tyr Asn Ala
 225 230 235 240

Lys Ser Gly Asp Phe Thr Thr Thr Lys Ser Thr Ala Gly Thr Gly Val
 245 250 255

Asp Ala Ala Ala Gln Ala Ala Asp Ser Ala Ser Lys Arg Asp Ala Leu
 260 265 270

Ala Ala Thr Leu His Ala Asp Val Gly Lys Ser Val Asn Gly Ser Tyr
 275 280 285

Thr Thr Lys Asp Gly Thr Val Ser Phe Glu Thr Asp Ser Ala Gly Asn
 290 295 300

Ile Thr Ile Gly Gly Ser Gln Ala Tyr Val Asp Asp Ala Gly Asn Leu
 305 310 315 320

Thr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala Ala Lys Ala Asp Met Lys Ala Leu
 325 330 335

Leu Lys Ala Ala Ser Glu Gly Ser Asp Gly Ala Ser Leu Thr Phe Asn
 340 345 350

Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Ala Lys Ala Thr Pro Ala Thr Thr Thr Pro
 355 360 365

Val Ala Pro Leu Ile Pro Gly Gly Ile Thr Tyr Gln Ala Thr Val Ser
 370 375 380

Lys Asp Val Val Leu Ser Glu Thr Lys Ala Ala Ala Thr Ser Ser
 385 390 395 400

Ile Thr Phe Asn Ser Gly Val Leu Ser Lys Thr Ile Gly Phe Thr Ala
 405 410 415

Gly Glu Ser Ser Asp Ala Ala Lys Ser Tyr Val Asp Asp Lys Gly Gly

ES 2 809 598 T3

420

425

430

Ile Thr Asn Val Ala Asp Tyr Thr Val Ser Tyr Ser Val Asn Lys Asp
435 440 445

Asn Gly Ser Val Thr Val Ala Gly Tyr Ala Ser Ala Thr Asp Thr Asn
450 455 460

Lys Asp Tyr Ala Pro Ala Ile Gly Thr Ala Val Asn Val Asn Ser Ala
465 470 475 480

Gly Lys Ile Thr Thr Glu Thr Thr Ser Ala Gly Ser Ala Thr Thr Asn
485 490 495

Pro Leu Ala Ala Leu Asp Asp Ala Ile Ser Ser Ile Asp Lys Phe Arg
500 505 510

Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Leu Asp Ser Ala Val Thr Asn
515 520 525

Leu Asn Asn Thr Thr Thr Asn Leu Ser Glu Ala Gln Ser Arg Ile Gln
530 535 540

Asp Ala Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Lys Ala Gln Ile
545 550 555 560

Ile Gln Gln Ala Gly Asn Ser Val Leu Ala Lys Ala Asn Gln Val Pro
565 570 575

Gln Gln Val Leu Ser Leu Leu Gln Gly
580 585

<210> 2

<211> 495

5 <212> PRT

<213> *Salmonella typhimurium*

<400> 2

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn
1 5 10 15

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu
20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln
35 40 45

10 Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala

ES 2 809 598 T3

Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile
305 310 315 320

Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr
325 330 335

Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala
340 345 350

Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp
355 360 365

Gly Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser
370 375 380

Lys Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala
385 390 395 400

Ala Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu
405 410 415

Ala Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg
420 425 430

Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr
435 440 445

Ser Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser
450 455 460

Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu
465 470 475 480

Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
485 490 495

<210> 3

<211> 494

5 <212> PRT

<213> *Salmonella typhimurium*

<400> 3

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn
1 5 10 15

10 Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser
20 25 30

ES 2 809 598 T3

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala
 35 40 45

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln
 115 120 125

Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr
 130 135 140

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln
 165 170 175

Lys Tyr Lys Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp
 180 185 190

Thr Thr Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp
 210 215 220

Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly Glu Val
 245 250 255

Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly Leu Pro Ala
 260 265 270

Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala Asn Ala Asp Leu
 275 280 285

ES 2 809 598 T3

Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Val Thr Gly Thr Ala
 290 295 300

Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn Asn Gly Lys Thr Ile Asp
 305 310 315 320

Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln
 325 330 335

Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp
 340 345 350

Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly
 355 360 365

Lys Thr Glu Val Val Ser Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys
 370 375 380

Ala Glu Gly His Asn Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala
 385 390 395 400

Ala Thr Thr Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala
 405 410 415

Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe
 420 425 430

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser
 435 440 445

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn
 450 455 460

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala
 465 470 475 480

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg
 485 490

<210> 4
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> ligador

10 <400> 4

Gly Ala Ala Gly
 1

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso en el tratamiento de una superinfección bacteriana post-influenza en un sujeto que lo necesita.
- 5 2. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la superinfección bacteriana está mediada por al menos un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; *Haemophilus influenza*, *Myoplasma species* y *Moraxella catarrhalis*.
- 10 3. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto se selecciona del grupo que consiste en sujetos que tienen al menos 50 años, sujetos que residen en centros de atención crónica, sujetos que tienen trastornos crónicos del sistema pulmonar o cardiovascular, sujetos que requirieron seguimiento médico regular u hospitalización durante el año anterior debido a enfermedades metabólicas crónicas, disfunción renal, hemoglobinopatías o inmunosupresión, niños menores de 14 años, pacientes de entre 6 meses y 18 años de edad quienes reciben terapia de aspirina a largo plazo, y mujeres que estarán en el segundo o tercer trimestre del embarazo durante la temporada de influenza.
- 15 4. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido de flagelina tiene al menos el 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 20 5. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido de flagelina comprende: a) un péptido de extremo N-terminal que tiene al menos el 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos a partir del residuo de aminoácido ubicado en la posición 1 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácido ubicados en las posiciones 99 a 173 de la SEQ ID NO: 3; y b) un péptido de extremo C-terminal que tiene al menos el 90% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácido ubicados en las posiciones 401 a 406 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en el residuo de aminoácido ubicado en la posición 494 de la SEQ ID NO: 3, en el que: dicho péptido de extremo N-terminal está directamente unido a dicho péptido de extremo C-terminal, o dicho péptido de extremo N terminal y dicho péptido C-terminal están indirectamente unidos, uno al otro, a través de una cadena espaciadora.
- 25 6. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho péptido de extremo N-terminal se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de la SEQ ID NO: 3.
- 30 7. El polipéptido de flagelina opcionalmente en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho péptido de extremo C-terminal se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401-494 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3.
- 35 8. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos péptidos de extremo N-terminal y extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 40 9. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos péptidos de extremo N-terminal y extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 45 10. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos péptidos de extremo N-terminal y extremo C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 50 11. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho péptido de extremo N-terminal y dicho péptido de extremo C-terminal están unidos indirectamente, uno al otro, a través de una cadena espaciadora intermedia que consiste en una secuencia peptídica NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (SEQ ID NO: 4).
- 55 12. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el residuo de aminoácido asparagina ubicado en la posición 488 de la SEQ ID NO: 3 se reemplaza por una serina.
13. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en aminoglucósidos, betalactamas, quinolonas o fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, sulfamethaxozoles, tetraciclinas, estreptograminas y oxazolidinonas, rifamicinas, glucopéptidos, polimixinas, antibióticos lipo-péptidos.

14. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico es amoxicilina.
15. El polipéptido de flagelina en combinación con al menos un antibiótico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico contiene tanto sulfametoxazol como trimetoprima.

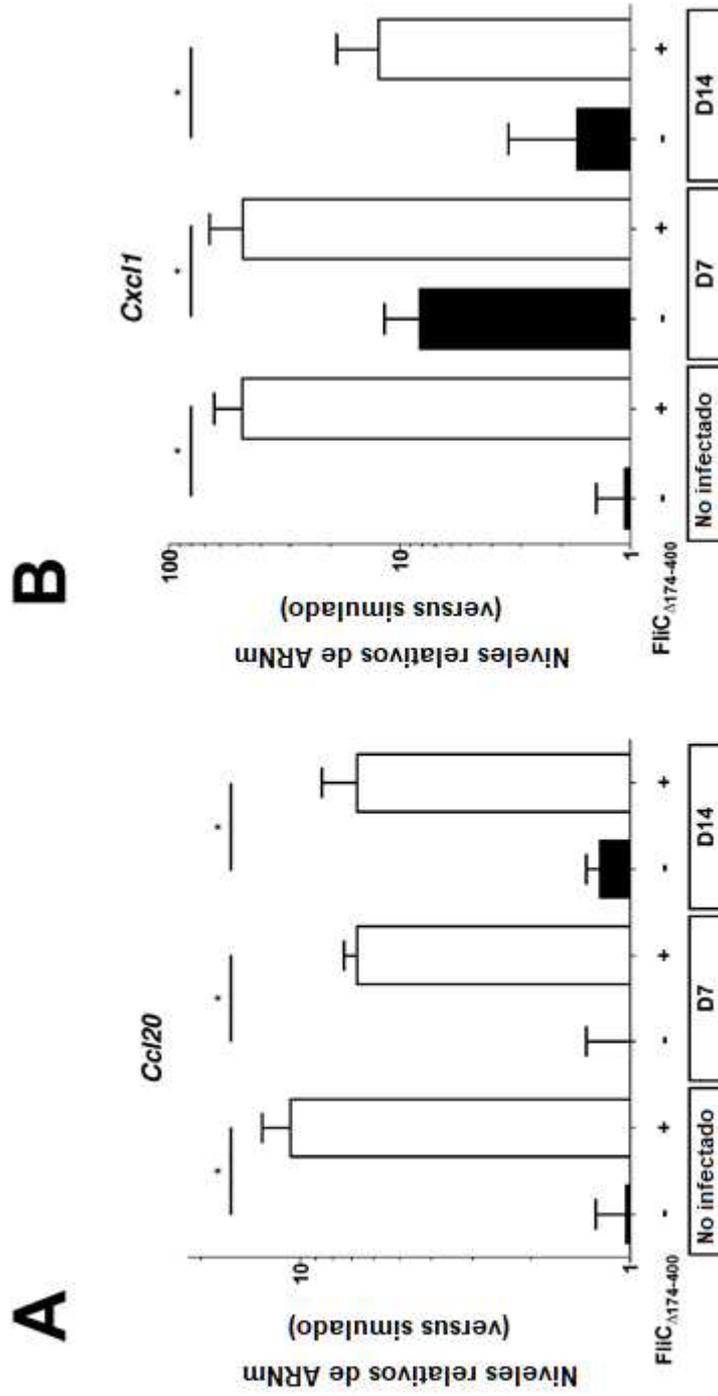


Figura 1 A&B

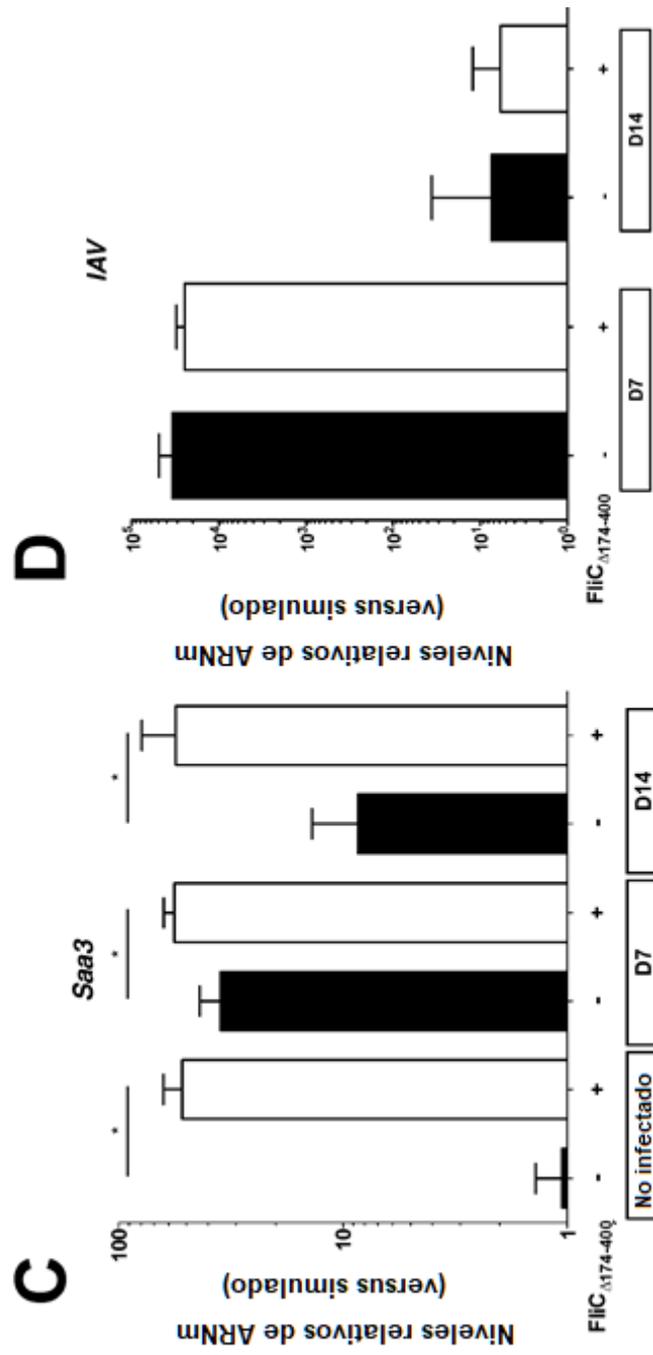


Figura 1 C&D

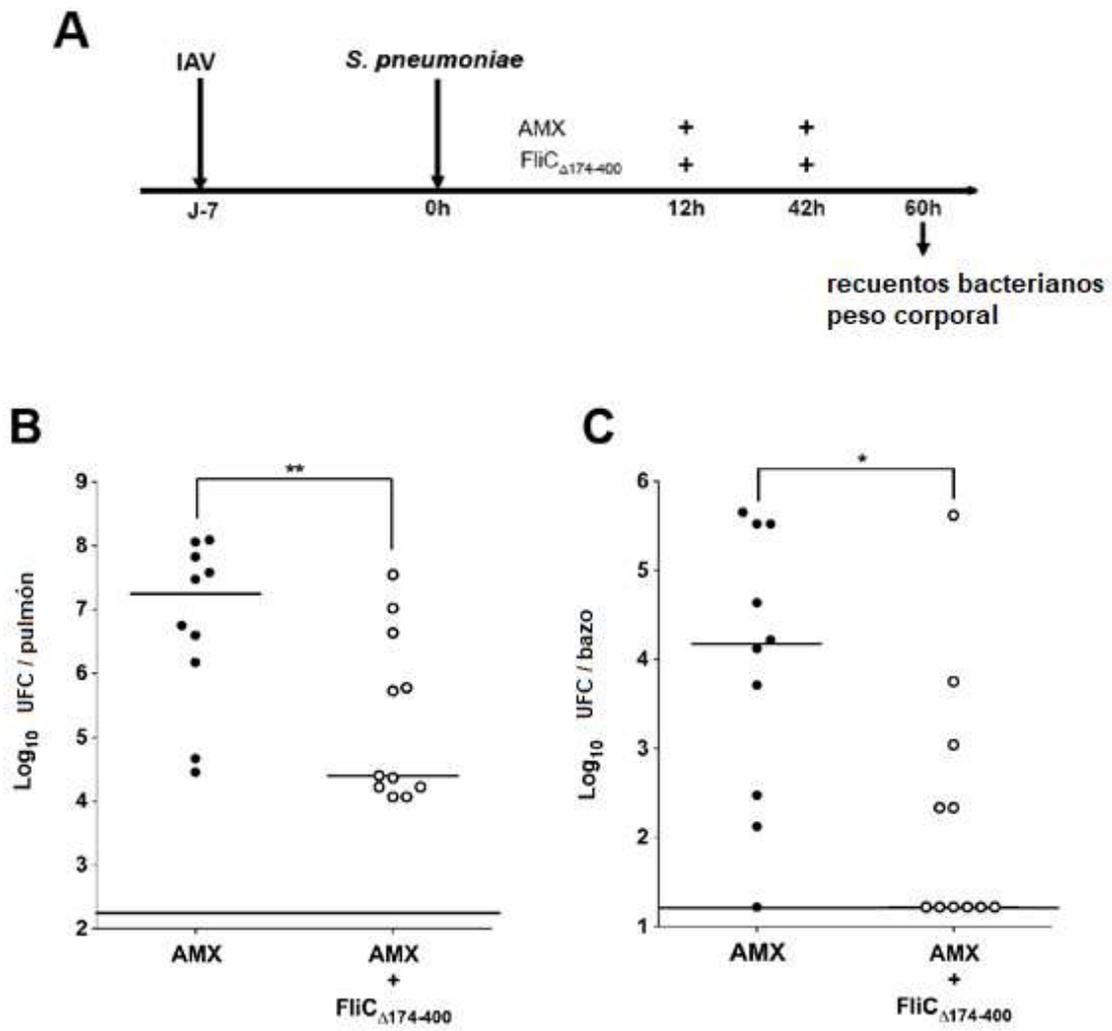


Figura 2