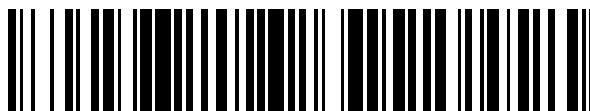


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 760**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2010 PCT/IB2010/001911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11161491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10779841 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2585094**

54 Título: **Polipéptido de flagelina como agonista de TLR5 para su uso en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2018

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIRARD, JEAN-CLAUDE y
CHABALGOITY, JOSE, A.**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 690 760 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

Polipéptido de flagelina como agonista de TLR5 para su uso en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias. Más particularmente, la presente invención se refiere a un agonista de TLR5 para su uso en un método de tratamiento de una infección de las vías respiratorias, en el que dicho agonista de TLR5 es un polipéptido de flagelina.

10

Estado de la técnica

15 Las infecciones de las vías respiratorias son infecciones comunes de las vías respiratorias superiores (p. ej., nariz, orejas, senos nasales y garganta) y de las vías respiratorias inferiores (p. ej., tráquea, bronquios y pulmones). Los síntomas de infección de las vías respiratorias superiores incluyen secreción o congestión nasal, irritabilidad, inquietud, falta de apetito, disminución del nivel de actividad, tos y fiebre.

20 Las infecciones virales de las vías respiratorias causan y/o se asocian con dolor de garganta, resfriados, anginas y gripe. Los ejemplos de virus que causan infecciones de las vías respiratorias superior e inferior incluyen rinovirus y virus de la gripe A y B.

25 Las infecciones bacterianas respiratorias comunes causan y/o se asocian, por ejemplo, a la tos ferina y faringitis estreptocócica. Un ejemplo de una bacteria que causa infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores es *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) causa infecciones de las vías respiratorias en bebés y ancianos en todo el mundo. El polisacárido capsular es el principal factor de virulencia y su composición define 91 serotipos de neumococo. Ciertos serotipos colonizan asintóticamente la nasofaringe humana que representa un reservorio para la transmisión interindividual de la bacteria. En algunos individuos, la colonización puede progresar a neumonía neumocócica y enfermedad invasiva. En cambio, los serotipos como el serotipo 1 muy rara vez se asocian con la colonización, pero causan infecciones invasivas.

30

35 Las terapias actuales para las infecciones de las vías respiratorias implican la administración de agentes antivirales, agentes antibacterianos y antifúngicos para el tratamiento, la prevención o la mejora de infecciones virales, bacterianas y fúngicas de las vías respiratorias, respectivamente. Desafortunadamente, con respecto a ciertas infecciones, no existen terapias disponibles, se ha demostrado que las infecciones son refractarias a las terapias o la ocurrencia de efectos secundarios supera los beneficios de la administración de una terapia a un sujeto. El uso de agentes antibacterianos para el tratamiento de infecciones bacterianas de las vías respiratorias también puede producir efectos secundarios o dar lugar a cepas bacterianas resistentes. La administración de agentes antifúngicos puede causar insuficiencia renal o disfunción de la médula ósea y puede no ser eficaz contra la infección por hongos en sujetos con sistemas inmunodeprimidos. Adicionalmente, el microorganismo que causa infecciones (p. ej., virus, bacterias u hongos) puede ser resistente o desarrollar resistencia al agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos administrados. De hecho, los microorganismos que desarrollan resistencia a los agentes terapéuticos administrados a menudo desarrollan resistencia a los fármacos pleiotrópicos o a múltiples fármacos. Por consiguiente, como resultado de la resistencia a los fármacos, numerosas infecciones resultan refractarias a un amplio intervalo de protocolos de tratamiento convencional.

40

45

50 Por lo tanto, se necesitan nuevas terapias para el tratamiento, la prevención, la gestión y/o la mejora de las infecciones de las vías respiratorias y sus síntomas.

50

La activación de las defensas innatas es esencial para controlar la infección neumocócica. El receptor tipo Toll 2 (TLR2), TLR4 y TLR9, así como el adaptador MyD88 participan en la detección temprana y en la depuración de neumococos en los pulmones. El dominio de oligomerización para la unión a nucleótidos del receptor citosólico (Nod) que contiene Nod1 y Nod2, también ha participado en el reconocimiento de neumococos. La señalización de TLR activa las respuestas innatas de la mucosa que culminan con el reclutamiento de fagocitos como los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos y la producción de agentes microbicidas. Este proceso desencadena la rápida erradicación del patógeno por fagocitosis, así como la muerte extracelular. En animales deficientes en MyD88, *S. pneumoniae* no puede desencadenar intrínsecamente ningún reclutamiento de PMN en las vías respiratorias y los animales tienen mayor susceptibilidad a la neumonía. La contribución de la señalización de TLR en seres humanos ha sido resaltada por un estudio reciente que muestra que determinados polimorfismos de MyD88 se asocian con una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica.

55

60

La inmunidad moduladora por la actividad de receptores innatos es un concepto emergente para provocar las respuestas de protección contra las infecciones. El fundamento es que promueve respuestas innatas que superan considerablemente la magnitud, calidad y dinámica de la respuesta innata desencadenada por el patógeno en sí. La efectividad de los agonistas de TLR para el tratamiento terapéutico de enfermedades infecciosas ha sido

65

demostrada en varios modelos animales, incluidos modelos de infecciones de las vías respiratorias (Brown, K. L., C. Cosseau, J. L. Gardy y R. E. Hancock 2007. *Complexities of targeting innate immunity to treat infection. Trends Immunol* 28:260-266.; Lembo, A., M. Pelletier, R. Iyer, M. Timko, J. C. Dudda, T. E. West, C. B. Wilson, A. M. Hajjar, y S. J. Skerrett. 2008. *Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. J Immunol* 180:7574-7581; Romagne, F. 2007. *Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. Drug Discov Today* 12:80-87). TLR5 detecta flagelinas bacterianas que son el principal constituyente de los flagelos. Varias células de las vías pulmonares, que incluyen células epiteliales, expresan TLR5, pero aún no se ha investigado la modulación de la vía de señalización de TLR5 para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias.

Yu Fu-shin *et al.*: "*Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin related antimicrobial peptide.*" (*JOURNAL OF IMMUNOLOGY* (BALTIMORE, MD: 1950) 15 de julio de 2010, vol. 185, n.º 2, 21 de junio de 2010 (21-06-2010), páginas 1142-1149) se refieren al uso de flagelina aislada de *Pseudomonas aeruginosa* en la prevención de neumonía inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones; el mecanismo de acción es la actividad agonística de TLR5 de la flagelina.

La solicitud de patente internacional n.º WO 2009156405 se refiere a una flagelina aislada para *Salmonella enterica* y variantes que corresponden a la SEQ ID No: 3 y a las variantes de la presente divulgación.

Smith Kd *et al.*: "*Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility*" (*NATURE IMMUNOLOGY*, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 4, n.º 12, 1 de diciembre de 2003 (01-12-2003), páginas 1247-1253) desvelan que TLR5 reconoce un sitio de especie conservado en la flagelina requerido para la formación de protofilamentos y la motilidad bacteriana.

Objeto de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias. Más particularmente, la presente invención se refiere a un agonista de TLR5 para su uso en un método de tratamiento de infección de las vías respiratorias resultante de *Streptococcus pneumoniae*, en el que dicho agonista de TLR5 es un polipéptido de flagelina.

Descripción detallada de la invención

Streptococcus pneumoniae es una causa importante de neumonía en bebés y ancianos. Las defensas innatas son esenciales para el control de las infecciones neumocócicas y las respuestas deficientes pueden desencadenar la enfermedad en individuos susceptibles. En este caso, los inventores demostraron que la flagelina puede activar a nivel local la inmunidad innata y con ello aumentar la resistencia a la neumonía aguda. El tratamiento de la mucosa con flagelina mejoró la depuración de *S. pneumoniae* en los pulmones y promovió un aumento de la supervivencia a la infección. Además, la arquitectura pulmonar se restauró completamente después del tratamiento de ratones infectados, lo que indica que la flagelina permite el restablecimiento de las condiciones del estado estacionario. Utilizando un mutante de flagelina que es incapaz de señalarse a través de TLR5, se estableció que la señalización de TLR5 es esencial para la protección. En las vías respiratorias, la flagelina indujo la infiltración de neutrófilos en las vías respiratorias y reguló positivamente la expresión de genes que codifican IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL2 y CCL20. Utilizando anticuerpos delecionados, se demostró que los neutrófilos son los principales efectores de protección. Además, se descubrió que ratones SCID (ratones con inmunodeficiencia severa combinada) deficientes en células B y T clarifican la provocación contra *S. pneumoniae* en la misma medida que los animales inmunocompetentes, sugiriendo que estas poblaciones de células no son requeridas para la protección inducida por flagelina. En conclusión, los resultados enfatizan que la estimulación de la inmunidad innata de la mucosa por un TLR no acoplado naturalmente por *S. pneumoniae* puede aumentar la potencia para curar la neumonía neumocócica. Es más, sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los inventores creen que la estimulación de la inmunidad innata de la mucosa por TLR5 también representa una manera relevante para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias. Por ejemplo, los productos microbianos como lisados de *Haemophilus influenzae* no tipables que son conocidos por estimular la inmunidad innata por vía respiratoria son capaces de proteger contra diferentes infecciones respiratorias (Evans SE, Scott BL, Clement CG, Larson DT, Kontoyiannis D, Lewis RE, Lasala PR, Pawlik J, Peterson JW, Chopra AK, Klimpel G, Bowden G, Höök M, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF. *Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi. Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 ;42:40-50), incluyendo infecciones por *S. pneumoniae* (Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, Moghaddam SJ, Scott BL, Melicoff E, Adachi R, Dickey BF, Tuvim MJ. *Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1322-30.). Tales infecciones respiratorias incluyen enfermedades que son inducidas por bacterias, virus y hongos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un agonista de TLR5 para su uso en un método de tratamiento de una infección de las vías respiratorias resultante de *Streptococcus pneumoniae*, en el que dicho agonista de TLR5 es un polipéptido de flagelina.

La expresión "infección de las vías respiratorias" tiene su significado general en la materia y tiene por objeto las infecciones designadas de las vías respiratorias superiores (p. ej., nariz, oídos, senos nasales y garganta) y las vías respiratorias inferiores (p. ej., tráquea, bronquios y pulmones) inducidas por un microorganismo vivo.

5 Los ejemplos de virus que causan infecciones virales incluyen, entre otros, retrovirus (p. ej., virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) tipos I y II y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes (p. ej., virus del herpes simple (HSV) tipos I y II, virus de Epstein-Barr, HHV6-HHV8, y citomegalovirus), arenavirus (p. ej., virus de la fiebre de Lassa), paramixovirus (p. ej., virus morbilivirus, virus sincitial respiratorio humano, paperas, hMPV, y pneumovirus), adenovirus, bunyavirus (p. ej., hantavirus), coronavirus, filovirus (p. ej., virus del Ébola), flavivirus (p. ej., virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre amarilla y virus de la encefalitis japonesa), hepadnavirus (p. ej., virus de la hepatitis B (HBV), ortomiovirus (p. ej., virus de la gripe A, B y C y PIV), papovavirus (p. ej., papilomavirus), picornavirus (p. ej., rinovirus, enterovirus y virus de la hepatitis A), poxvirus, reovirus (p. ej., rotavirus), togavirus (p. ej., virus de la rubéola) y rbdovirus (p. ej., virus de la rabia).

15 Los ejemplos de bacterias que causan infecciones bacterianas de las vías respiratorias incluyen, entre otros, la familia *Aquaspirillum*, familia *Azospirillum*, familia *Azotobacteraceae*, familia *Bacteroidaceae*, especies de *Bartonella*, familia *Bdellovibrio*, especies de *Campylobacter*, especies de *Chlamydia* (p. ej., *Chlamydia pneumoniae*), *Clostridium*, familia *Enterobacteriaceae* (p. ej., especies de *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, especies de *Erwinia*, *Escherichia coli*, especies de *Hafnia*, especies de *Klebsiella*, especies de *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, especies de *Salmonella*, *Serratia marcescens*, y *Shigella flexneri*), familia *Gardinella*, *Haemophilus influenzae*, familia *Halobacteriaceae*, familia *Helicobacter*, familia *Legionellaceae*, especies de *Listeria*, familia *Methylococcaceae*, micobacterias (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*), familia *Neisseriaceae*, familia *Oceanospirillum*, familia *Pasteurellaceae*, especies de *Pneumococcus*, especies de *Pseudomonas*, familia *Rhizobiaceae*, familia *Spirillum*, familia *Spirosomaceae*, *Staphylococcus* (p. ej., *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes* resistentes a meticilina), *Streptococcus* (p. ej., *Streptococcus enteritidis*, *Streptococcus Fasciae* y *Streptococcus pneumoniae*), familia *Vampirovibr Helicobacter* y familia *Vampirovibrio*.

Los ejemplos de hongos que causan infecciones fúngicas incluyen, entre otros, las especies de *Absidia* (p. ej., *Absidia corymbifera* y *Absidia ramosa*), especies de *Aspergillus*, (p. ej., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*), *Blastomyces dermatitidis*, especies de *Candida* (p. ej., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kerr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea* y *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, especies *Conidiobolus*, *Cryptococcus neoforms*, especies de *Cunninghamella*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucorpusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Pneumocystis carinii*, especies de *Rhizopus* (p. ej., *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus microsporas*), especies de *Saccharomyces*, y *Sporothrix schenckii*.

En una realización particular, la infección de las vías respiratorias de acuerdo con la presente divulgación es una infección bacteriana de las vías respiratorias, más particularmente una infección de las vías respiratorias resultante de bacterias que no tienen flagelos. Normalmente, las bacterias no tienen flagelos y causan infección de las vías respiratorias, incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, o *Mycoplasma pneumoniae*. La infección de las vías respiratorias de acuerdo con la invención es causada por *Streptococcus pneumoniae*.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la expresión "receptor tipo Toll 5" o "TLR5" tiene su significado general en la materia y tiene por objeto significar un receptor tipo Toll 5 de cualquier especie, pero preferentemente un receptor tipo Toll 5 humano. Tras la activación, un TLR5 induce una respuesta celular mediante la transducción de una señal intracelular que es propagada a través de una serie de moléculas de señalización de la superficie celular al núcleo. Normalmente, el dominio intracelular de TLR5 recluta la proteína adaptadora, MyD88, que recluta las quinasas serina/treonina IRAK (IRAK-1 e IRAK-4). IRAKs forman un complejo con TRAF6, que luego interactúa con diversas moléculas que participan en la transducción de la señal de TLR. Estas moléculas y otros componentes de la vía de transducción de señal de TLR5 estimulan la actividad de factores de transcripción, tal como fos-, jun y NF- κ B, y la inducción correspondiente de productos génicos de los genes regulados por fos-, jun- y NF- κ B, tal como, por ejemplo, IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL2 y CCL20.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agonista de TLR5" se refiere a un compuesto (natural o no) que activa selectivamente o aumenta la transducción de señales normales a través de TLR5. Un agonista de TLR5 puede activar o aumentar la transducción de señales normales a través de TLR5 indirectamente, por ejemplo, mediante la modificación o alteración de la conformación nativa de TLR5 o un ligando de TLR5. Las actividades de las moléculas de señalización que median la señal de TLR5, así como moléculas producidas como resultado de la activación de TLR5 son actividades de TLR5 que se pueden observar o medir. Por lo tanto, una actividad de TLR5 incluye un reclutamiento de moléculas de señalización intracelular, así como eventos aguas abajo resultantes de la activación de TLR5, tales como la activación del factor de transcripción y la producción de moléculas inmunomoduladoras. Una respuesta celular de TLR5 media en una respuesta del sistema inmunitario innato en un sujeto debido a que las citoquinas liberadas por las células que expresan TLR5 regulan otras células del sistema inmunitario para promover una respuesta inmunitaria en un sujeto. Por lo tanto, como se utiliza en la presente memoria, la expresión "respuesta mediada por TLR5" tiene por objeto significar la capacidad del agonista de TLR5

para inducir una respuesta celular mediada por TLR5. Las respuestas celulares mediadas por TLR5 a modo de ejemplo incluyen la activación de factores de transcripción, tales como fos, jun y NF- κ B, la producción de citoquinas y quimiocinas, tales como IL-6, TNF- α , CXCL1, CXCL2 y CCL20, y la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

5 En una realización, el agonista de TLR5 de acuerdo con la presente divulgación es un agonista de bajo peso molecular, p. ej., una molécula orgánica pequeña. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da, y lo más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

10 Alternativamente, el agonista de TLR5 de acuerdo con la presente divulgación puede consistir en un anticuerpo (el término incluye "fragmento de anticuerpo"). En particular, el agonista de TLR5 puede consistir en un anticuerpo dirigido contra TLR5, de tal manera que dicho anticuerpo activa el receptor.

15 Los anticuerpos pueden generarse de acuerdo con métodos conocidos al administrar el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, p. ej., entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden utilizar diversos adyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante estirpes celulares continuas en cultivo. Las técnicas de producción y aislamiento incluyen, entre otros, la técnica de hibridoma; la técnica del hibridoma de células B humanas; y la técnica de hibridoma-EBV. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778) se pueden utilizar para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-TLR5.

20 El agonista de TLR5 es útil en la práctica de la presente divulgación que también incluye fragmentos de anticuerpos anti-TLR5 que incluyen, entre otros, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv pueden construirse para permitir una rápida identificación de los fragmentos con la especificidad deseada para TLR5.

25 Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de anticuerpos de los mismos pueden prepararse asimismo de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Por lo general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable (CDRs) del receptor son reemplazados con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los cuales todos o esencialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o esencialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos de fabricación de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en Winter (patente de Estados Unidos n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, patente de Estados Unidos n.º 4.816.397).

30 Acto seguido, después de generar los anticuerpos descritos anteriormente, el experto en la materia puede seleccionar con facilidad aquellos que son agonistas de TLR5.

35 En otra realización, el agonista de TLR5 desvelado en la presente memoria es un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con una alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar a través de la Evolución Sistemática de los Ligandos por Enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros de péptido consisten en una variable de anticuerpo conformacionalmente limitada mostrada por una plataforma de proteínas, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se selecciona de las bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos.

65

Acto seguido, después de generar aptámeros dirigidos contra TLR5 como se describe anteriormente, el experto en la materia puede seleccionar fácilmente aquellos que son agonistas de TLR5.

El agonista de TLR5 de acuerdo con la invención es un polipéptido de flagelina.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "flagelina" tiene por objeto significar la flagelina contenida en una variedad de especies bacterianas Gram-positivas o Gram-negativas. Las fuentes no limitantes de flagelinas incluyen, entre otros, *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitativos. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de las flagelinas están disponibles públicamente en Genbank de NCBI, véase 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 tiene por objeto que las secuencias de flagelina de estas y otras especies estén abarcadas por el término flagelina, como se utiliza en la presente memoria. Por lo tanto, las diferencias de secuencia entre las especies se incluyen en el significado del término.

La expresión "polipéptido de flagelina" tiene por objeto ser una flagelina o un fragmento de la misma que retiene la capacidad de unirse y activar TLR5. Normalmente, el polipéptido de flagelina de acuerdo con la invención comprende los dominios de flagelina implicados en la señalización de TLR5. La expresión "dominio de flagelina" incluye el dominio de origen natural de la flagelina y sus variantes conservadoras de la función. "Variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que un residuo de aminoácidos dado en una proteína o enzima ha sido cambiado sin alterar la conformación general y la función del polipéptido, incluyendo, entre otros, el reemplazo de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de proteínas o de aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % como se determina de acuerdo en el esquema de alineamiento, tal como por el método Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos 75 %, lo más preferentemente al menos 85 %, e incluso más preferentemente al menos 90 %, y que tiene las mismas proteínas o funciones o proteínas o funciones esencialmente similares como la proteína nativa o parental con la que se compara. Los dominios de flagelina que están implicados en la señalización de TLR5 son bien conocidos en la materia, véase, por ejemplo, Smith *et al.* (2003) *Nat. Immunol.* 4: 1247-1253 (p. ej., aminoácidos 78-129, 135-173 y 394-444 de la flagelina de *S. typhimurium* u homólogos o sus formas modificadas).

Los ejemplos de polipéptidos de flagelina incluyen, entre otros, los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 6.585.980; 6.130.082; 5.888.810; 5.618.533; y 4.886.748; publicación de patente de Estados Unidos n.º US 2003/0044429 A1; y las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2008097016 y WO 2009156405.

Un ejemplo de *E. coli* O157:flagelina H7 es la SEQ ID NO: 1. Una flagelina de *S. typhimurium* a modo de ejemplo es la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de aminoácidos de al menos una identidad de aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % a SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 pueden utilizarse como polipéptidos de flagelina de acuerdo con la invención.

En otra realización particular, la presente invención abarca el uso de las proteínas recombinantes de flagelina descritas en la solicitud de patente internacional n.º WO 2009156405. Por consiguiente, un polipéptido de flagelina de la invención puede comprender: a) un péptido N-terminal que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 90 % con la secuencia de aminoácidos que comienza a partir del residuo de aminoácidos ubicado en la posición 1 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en un residuo de aminoácidos seleccionado entre el grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos ubicado en las posiciones 99 a 173 de la SEQ ID NO: 3; y b) un péptido C-terminal que tiene una identidad de aminoácidos al menos un 90 % con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácidos seleccionado entre el grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos 401 a 406 de la SEQ ID NO:3 y que termina en el residuo de aminoácidos ubicado en la posición 494 de la SEQ ID NO:3, en el que dicho péptido N-terminal está directamente vinculado a dicho péptido C-terminal, o dicho péptido N-terminal y dicho péptido C-terminal están vinculados indirectamente, uno a otro, por una cadena espaciadora. En otra realización particular, dicho péptido N-terminal se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de la SEQ ID NO: 3. En otra realización, dicho péptido C-terminal se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401-494 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3. En otra realización, dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En otra realización, dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En otra realización, dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En otra realización, dicho péptido N-terminal y dicho péptido C-terminal están

vinculados indirectamente, uno a otro, por una cadena espaciadora intermedia que consiste en una secuencia peptídica NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (SEQ ID NO: 4). En otra realización, el residuo de aminoácido asparagina ubicado en la posición 488 de la SEQ ID NO: 3 se reemplaza con una serina. En otra realización, el polipéptido de flagelina, como se ha descrito anteriormente, comprende un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal.

5 El polipéptido de flagelina desvelado en la presente memoria puede producirse 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 en las células transfectadas.

10 La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de flagelina de la presente divulgación, puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios apropiado(s) de endonucleasas de restricción utilizando técnicas conocidas en la materia.

15 Los componentes del vector incluyen generalmente, entre otros, una o más de una secuencia de señales si la secuencia se va a secretar, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas por los expertos en la materia.

20 El polipéptido de flagelina desvelado en la presente memoria puede producirse de forma recombinante no solo directamente sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o péptido maduro. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido de interés que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procarionota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de las fosfatasa alcalinas, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxinas I1 termoestables. Para la secreción de levaduras, la secuencia de señal puede ser, p. ej., el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.010.182), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias de señales de mamíferos pueden utilizarse para una secreción directa de la proteína, tal como secuencias de señales a partir de polipéptidos secretados de las mismas especies o especies relacionadas, así como líderes secretores virales.

35 Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2.µ. es adecuado para levaduras, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos.

40 Los vectores de expresión y clonación contendrán normalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

45 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos es aquel que permite que la identificación de células competentes tome el ácido nucleico que codifica el polipéptido de flagelina de la presente divulgación, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la estirpe celular CHO deficiente de actividad de DHFR, preparada y propagada de acuerdo con lo descrito por Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en una levadura es el gen *trp 1* presente en el plásmido de levadura YRp7. Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7: 141 (1979); Chemper *et al.*, *Gene*, 10: 157 (1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977).

50 Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente 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 procarionotas incluyen los sistemas promotores de betalactamasa y lactosa (Chang *et al.*, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281: 544 (1979)), fosfatasa alcalina, sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); documento EP 36.776), y promotores híbridos tales como el promotor *tac* (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 80: 21-25 (1983)). Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S. D.) operativamente unida al ADN que codifica el

polipéptido de flagelina de la presente divulgación.

Los ejemplos de secuencias promotoras preferidas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles con la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. La transcripción del ácido nucleico de interés de los vectores de células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de genomas de virus, tal como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40); por promotores heterólogos de mamíferos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina; y por los promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido de flagelina de la presente divulgación por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína alfa e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado del origen de replicación tardía (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado del origen de replicación tardía y potenciadores del adenovirus. El potenciador puede ser escindido en el vector en la posición 5' o 3' en la secuencia de codificación de polipéptidos de interés, pero se ubica preferentemente en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, células nucleadas o humanas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias suelen estar disponibles habitualmente en las regiones 5' y, en ocasiones 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariótico o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el polipéptido de flagelina de la presente divulgación.

Otros métodos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de los polipéptidos de flagelina de la presente descripción en cultivos de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething *et al.*, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281: 40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

La selección y transformación de células huésped se transfectan o se 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 nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las condiciones de cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, pueden seleccionarse por el experto en la materia sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para la maximización de la productividad de cultivos celulares pueden hallarse en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Los métodos de transfección son conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, el tratamiento con CaPO₄ y la electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza mediante técnicas convencionales apropiadas, tales como células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o electroporación, se utiliza generalmente para células procariontas u otras células que contienen barreras sustanciales de la pared celular. Para células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamíferos se han descrito en la patente de Estados Unidos 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en las células, como por ejemplo por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policonaciones, p. ej., polibreno o poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamíferos, véase, Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-

352 (1988).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores.

5 Las procariotas adecuadas incluyen, entre otros, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* también están disponibles públicamente, tal como cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31, 446); *E. coli* X1776 (ATCC 31, 537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325); y K5772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procarióticas adecuadas incluyen

10 *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis*. Y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41 P desvelado en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitativos.

15 La cepa SIN41 de *Salmonella typhimurium* (fliC fljB), es particularmente interesante para la producción de polipéptidos de flagelina de la presente divulgación, 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 llamado "sistema de secreción tipo III". Curiosamente, la cepa SIN41 produce todos los componentes del sistema de secreción tipo III requerido para una secreción óptima de flagelina. La

20 secuencia de clonación que codifica nuevos péptidos de flagelina bajo el promotor fliC permite la secreción en grandes cantidades de polipéptidos de flagelina de interés en la cepa SIN41.

La cepa W3110 es también interesante puesto que es una cepa huésped común para las fermentaciones de

25 productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, con ejemplos de dichos huéspedes que incluyen la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo tonA; cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; cepa de *E. coli* W31 10 27C7 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan.sup.r; cepa de *E. coli* W31 10 37D6, que tiene el genotipo completo tona ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan.sup.r; cepa de *E. coli* W31 10 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación por

30 delección degP no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de Estados Unidos 4.946.783 emitida el 7 de agosto de 1990. Las cepas de *E. coli* MG1655, MG1655 AfimA-H o MKS12, una cepa MG1655 fliD- y -f/m>A-/-delecionada también son candidatos interesantes para la producción de flagelinas recombinantes como proteínas secretadas (*Nat Biotechnol.* 2005; (4): 475-81).

35 Alternativamente, son adecuados los métodos de clonación *in vitro*, p. ej., PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes

40 de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican el polipéptido de flagelina de acuerdo con la presente divulgación. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior de uso común.

Otros incluyen huéspedes de *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); *Kluyveromyces* (patente de Estados Unidos n.º 4.943.529, Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)), tal como, p. ej., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574, Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234), *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc Natl Acad Sci.*, USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tal como

50 *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, p. ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem Biophys Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci.*, USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el

55 presente documento e incluyen, entre otros, levaduras capaces del crecimiento en metanol seleccionadas entre el género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos de flagelina que codifican ácido nucleico de la presente divulgación se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de

60 estirpes celulares huésped de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se

65

considera que está dentro de los conocimientos de la materia.

El polipéptido de flagelina de la presente divulgación puede recuperarse del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (p. ej., TRITON-XTM 100) o por escisión enzimática.

Las células empleadas en la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido de flagelina de la presente divulgación pueden alterarse por diversos agentes físicos o químicos, tales como los ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes de lisado celular. Puede desearse purificar el polipéptido de interés a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son procedimientos de purificación adecuados a modo de ejemplo: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metal para unir formas etiquetadas con epítopos del polipéptido de flagelina de la presente divulgación.

Varios métodos de purificación de proteínas pueden emplearse y tales métodos se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag: New York, 1982). La etapa o etapas de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del polipéptido de flagelina particular producido.

En una realización preferida, el polipéptido de flagelina se purifica del sobrenadante de *S. Typhimurium* SIN41 recombinante (fliC fljB), como se desvela en Nempont *et al.* (Nempont, C. C., D.; Rumbo, M., Bompard, C.; Villeret, V.; Sirard, J.C. 2008. *Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. J Immunol* 181:2036-2043.). En particular, se cultivó 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 20 mM, pH 7,5 y luego diálisis. Las proteínas se purificaron adicionalmente mediante rondas sucesivas de hidroxipatita, intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaños (Bio-Rad Laboratories, EE. UU., GE Healthcare, Suecia). Por último, las proteínas se delectaron del lipopolisacárido (LPS) utilizando una columna de polimixina B (Pierce, EE. UU.). Utilizando el ensayo 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.

En realizaciones adicionales, un polipéptido de flagelina de acuerdo con la presente divulgación puede purificarse por separación en un sustrato de cromatografía de inmovilización de inmunoadfinidad.

Dicho sustrato de cromatografía de inmovilización comprende anticuerpos anti-flagelina que se han inmovilizado sobre ellos. Por anticuerpos "anti-flagelina", se tiene por objeto en la presente memoria anticuerpos que se unen a una flagelina nativa o una flagelina con deleción de la región hipervariable, incluyendo los abarcados en la presente divulgación.

Preferentemente, los anticuerpos anti-flagelina consisten en anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos anti-flagelina de ratón.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de la presente divulgación puede sintetizarse mediante técnicas convencionales de síntesis química de péptidos.

Por ejemplo, la secuencia de polipéptido de flagelina de la presente divulgación puede producirse mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas en fase sólida.

La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar mediante técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede obtener, por ejemplo, con un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, California) utilizando las instrucciones del fabricante.

Varias porciones del polipéptido de interés pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir el péptido de interés de longitud completa.

La presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento de una infección de las vías respiratorias que comprende un agonista de TLR5 de acuerdo con la invención.

Normalmente, los agonistas de TLR5 de acuerdo con la presente divulgación pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen ninguna reacción adversa, alérgica u otra

reacción perjudicial cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable es un material de relleno no sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo.

5 La composición farmacéutica de la presente divulgación está formulada para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen, entre otros, administración p. ej., parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (p. ej., inhalación), transdérmica (p. ej., tópica), transmucosa y rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea,
10 intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección.

La composición farmacéutica de la invención se administra tópicamente (es decir, en las vías respiratorias del sujeto). Por lo tanto, las composiciones pueden formularse en forma de ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, pulverizador, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por los expertos en la materia. Para formas de dosificación tópica no pulverizables, se emplean normalmente formas viscosas a semisólidas o sólidas comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y con una viscosidad dinámica preferentemente superior al agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones,
20 suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con otros agentes (p. ej., conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, tampones o sales) para influir en varias propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en el que el principio activo, preferentemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (p. ej., un propelente gaseoso, como freón) o en una botella exprimible. Los hidratantes o humectantes se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas y a formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de ingredientes adicionales son bien conocidos en la materia.

Si el método de la invención comprende administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de aerosol, pulverizador, nebulización o en forma de gotas. En particular, agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden entregarse de forma conveniente en forma de una presentación en aerosol y pulverización de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (p. ej., 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 entregar una cantidad dosificada. Las cápsulas y los cartuchos (compuestos, p. ej., de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo como lactosa o almidón.

El método de la invención puede incluir la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente de aerosolización. Véase, p. ej., patentes de Estados Unidos 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones PCT n.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una realización específica, la composición farmacéutica de la presente divulgación se administra utilizando la tecnología de administración de fármacos pulmonares Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

45 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de prevención, tratamiento, gestión o mejora de una infección de las vías respiratorias o uno o más síntomas de las mismas que comprende la administración a un sujeto del mismo con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de TLR5.

50 De acuerdo con la presente divulgación, el término "sujeto" o "individuo" que se pretende tratar es un mamífero humano o no humano (tal como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino o un primate) afectado o probablemente afectado por el cáncer. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de polipéptido o ácido nucleico con el fin de tratar el cáncer, en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable en cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total del polipéptido y composiciones farmacéuticas 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 particular dependerá de varios factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno, la actividad del polipéptido empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración, la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares conocidos en las técnicas médicas.

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

Descripción de las figuras

FIGURA 1: La flagelina protege a los ratones BALB/c contra un ataque respiratorio letal por *S. pneumoniae*: Se infectaron ratones BALB/c ($n = 8$) i.n. con 4×10^5 UFC de serotipo 1 de *S. pneumoniae* (Sp) en solución salina solo (cuadrado negro), o suplementada con $1 \mu\text{g}$ de flagelina (FliC, círculo negro) o suplementada con $1 \mu\text{g}$ de flagelina digerida con tripsina (FliC/T, círculo abierto). (A) La supervivencia de los ratones se monitorizó diariamente. La supervivencia para el grupo tratado con FliC fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo de solución salina o el grupo tratado con FliC/T. Los resultados son representativos de 1 de cada 3 experimentos. (B) Los ratones se sacrificaron 24 h después de la provocación y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones. Las diferencias significativas entre los grupos están marcadas con un asterisco; $P < 0,05$ (*). Los resultados son representativos de 1 de cada 3 experimentos. Las barras de error representan la media \pm error estándar de la media (EEM).

FIGURA 2: La señalización de TLR5 es necesaria para la protección mediada por flagelina contra una infección por *S. pneumoniae*: Se infectaron ratones BALB/c ($n = 8$) i.n. con 4×10^5 UFC de serotipo 1 de *S. pneumoniae* (Sp) en solución salina solo (cuadrado negro), o suplementada con $1 \mu\text{g}$ de FliC $\Delta 174-400$ (círculo negro) o con $1 \mu\text{g}$ de FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ que carece del motivo de señalización de TLR5 (círculo abierto). La supervivencia de los ratones se registró diariamente. La supervivencia para el grupo tratado con FliC $\Delta 174-400$ fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo no tratado o el grupo tratado con FliC $_{\Delta 174-400/89-96^*}$ ($P < 0,05$). Los resultados son representativos de 1 de cada 2 experimentos.

Ejemplo

Material y métodos

Preparación bacteriana: Se obtuvo un serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* (aislado clínico E1586) del Laboratorio Nacional de Referencia - Ministerio de Salud, Uruguay (39). Los materiales de explotación se prepararon de la siguiente manera. Se inoculó caldo de levadura Todd Hewitt (THYB) (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EE. UU.) con colonias recientes de *S. pneumoniae* cultivado en placas de agar sangre e incubado a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,7 - 0,9 unidades. Los cultivos se almacenaron a -80°C en THYB + glicerol al 12 % (v/v) hasta 3 meses. Para la infección en ratones, los materiales de explotación se descongelaron y se lavaron con solución salina fisiológica estéril (solución salina) y se diluyeron a la concentración apropiada. El número de bacterias en los materiales se confirmó por cultivo en placas de diluciones en serie en placas de agar sangre.

Proteínas: Se preparó flagelina nativa (FliC) a partir de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SIN22, o flagelinas recombinantes (FliC $_{\Delta 174-400}$ y FliC $_{\Delta 174400/89-96^*}$) como se ha descrito anteriormente (27). FliC $_{\Delta 174400/89-96^*}$ transporta la sustitución de aminoácidos (89-96) que evita la señalización de TLR5. Todas las proteínas se contenían una cantidad de LPS baja (menos de 30 pg de LPS por μg , determinada con el ensayo de Limulus). En algunos experimentos, se utilizó FliC hidrolizada con tripsina (FliC/T) como control. La FliC nativa se calentó durante 5 minutos a 65°C antes de su uso para asegurar que las proteínas eran en su mayoría monómeros. A menos que se especifique, se co-administró $1 \mu\text{g}$ de FliC, FliC/T, FliC $_{\Delta 174-400}$ o FliC $_{\Delta 174-400/89-96}$ i.n. con la suspensión de *S. pneumoniae*. Para excluir cualquier efecto directo de la flagelina sobre la viabilidad bacteriana, se determinaron los recuentos viables antes y después de la incubación de *P. pneumoniae* con la misma concentración de flagelina utilizada para el ensayo *in vivo*. No hubo diferencias significativas en el número de bacterias recuperadas después de la incubación con flagelina en comparación con la condición de control.

Infecciones en animales: Se obtuvieron hembras de BALB/c, C57BL/6J y una cepa de NMRI no consanguínea (6-8 semanas) de la División Nacional de Laboratorios Veterinarios (Uruguay) o los laboratorios Janvier (Francia). Se obtuvieron ratones hembra SCID (SCID C.B-17) del Instituto Pasteur de Lille para instalaciones de cría en cautividad. Estos ratones se caracterizan por la falta de linfocitos B y T y la agammaglobulinemia. Los animales se mantuvieron en jaulas con ventilación individual y se manipularon en una cabina de flujo laminar vertical (clase II A2, ESCO, Pensilvania, EE. UU.) para la infección. Todos los experimentos con las regulaciones nacionales e institucionales y pautas éticas (CHEA - Universidad de la República, Uruguay y n.º A59107 - Instituto Pasteur de Lille). Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de 2,2 mg de ketamina (Richmond-Vet Pharma, Bs. As. - Argentina) más 0,11 mg de xilazina (Portinco, Montevideo - Uruguay) en un volumen total de 200 μl o por inhalación de isoflurano (Belamont, SAS, Francia) utilizando un sistema de anestesia sin inhalación (DRE-Compact 150, DRE Veterinary, Louisville - EE. UU.). Las bacterias y las flagelinas se administraron en las fosas nasales de ratones en 20 a 50 μl de solución salina. La supervivencia de los ratones se registró diariamente.

Para la depleción de los granulocitos, se administraron 100 μg de anti-Gr-1 (RB6-8C5) o control de isotipo (HB152) i.p. 24 horas antes de la provocación por i.n. con *S. pneumoniae* (24). Se descubrió que la inyección anti-Gr1 delecionaba $96,8 \pm 1,2$ % de PMNs en lavados broncoalveolares (BAL) después del tratamiento intranasal con flagelina.

Determinación de la carga bacteriana en pulmones y bazo: Los pulmones y el bazo se recogieron en puntos temporales seleccionados después de la provocación intranasal y se homogeneizaron con un homogeneizador

UltraTurrax (IKA-Werke, Staufen-Alemania). Se determinaron los recuentos viables cultivando en placa diluciones en serie en placas de agar sangre.

5 **RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR):** Los pulmones se homogeneizaron en el reactivo Trizol (Invitrogen, California - EE. UU) con un homogeneizador UltraTurrax y se almacenaron a -80 °C. La extracción de ARN se realizó de acuerdo con instrucciones del fabricante. Antes de la síntesis de ADNc, se trató 1 µg de ARN total con ADNs-I (Invitrogen) y se realizó la síntesis de ADN complementario de primera hebra (ADNc) utilizando cebadores aleatorios (Invitrogen) y transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó con el kit Green PCR QuantiTect® SYBR® (Qiagen, Hilden-Germany) en un Rotor-Gene 6000 (Corbett, Sydney-Australia) de acuerdo con el siguiente protocolo: 15 min a 95 °C seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min. Los cebadores se utilizaron en una concentración final de 0,9 µM. La expresión del gen de interés se normalizó utilizando β-actina como gen constitutivo. Los resultados se presentan como un aumento de veces en los niveles de ARNm en comparación con el grupo tratado con solución salina.

15 **Determinación de la infiltración de PMN en las vías respiratorias y los pulmones:** Para los lavados broncoalveolares (BAL), se canuló la tráquea de muestreo y 1 ml de PBS + EDTA 1 mM se instiló seis veces y se recuperó por aspiración suave; este proceso se repitió dos veces. Las células se suspendieron en tampón FACS-EDTA (PBS, azida al 0,1 %, albúmina de suero bovino al 1 % de Sigma-Aldrich más EDTA 5 mM). Las células pulmonares se aislaron tras el tratamiento con colagenasa/ADNasa como se ha descrito anteriormente (34) y se filtraron a través de un tamiz celular de 40 µm. Las células inmunes se separaron en un gradiente de Percoll de dos capas (Sigma-Aldrich). Brevemente, las células se suspendieron en una solución de Percoll isotónica al 35 %, se colocaron cuidadosamente sobre una solución de Percoll isotónica al 70 % y se centrifugaron durante 30 minutos a 2.600 g y TA sin freno. El anillo superior de células correspondientes en su mayoría a las células epiteliales se descartó y las células inmunes se recuperaron del anillo de células más cercano a la capa de Percoll del 70 %. Las células se filtraron utilizando un tamiz celular de 100 µm, se lavaron y se tiñeron para el análisis por FACS. Los neutrófilos se identificaron mediante FSC-SSC y tinción positiva para PE o anti-Ly-6G conjugado con Alexa Fluor 647 (clon 1A8), anti-Ly-6C conjugado con PerCP-Cy5.5 (clon HK1.4) o anti-CD11b conjugado con PE (clon M1/70) de BD Biosciences o BioLegend, California - EE. UU. Después de la fijación con PFA al 4 %, la adquisición de datos por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACS Calibur con software CellQuest 3.3 (BD Biosciences).

30 **Análisis histológico:** Los pulmones se fijaron en formalina al 4 % (Sigma-Aldrich) durante 24 horas y luego se embebieron en parafina. Los bloques pulmonares se seccionaron a 5 µm utilizando un microtomo Leica (Leica Microsystems, Wetzlar-Alemania) y se adherieron a portaobjetos silanizados. Las secciones teñidas con hematoxilina/eosina se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i y una cámara digital Nikon DS-Ri1 y se procesaron con el software NIS-Elements BR 3.0 de Laboratory Imaging.

35 **Análisis estadístico:** Se realizó el ensayo del rango logarítmico (Mantel-Cox) para el análisis de las curvas de supervivencia. Para comparación entre dos grupos se realizó el ensayo de Mann-Whitney. Los valores $P < 0,05$ se consideraron significativos en todos los casos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego California, EE. UU.).

Resultados

45 **La administración intranasal de flagelina protege a los ratones contra una provocación letal con *S. pneumoniae*:** Se determinó en primer lugar la dosis mínima de *S. pneumoniae* que causa una mortalidad del 100 % en ratones BALB/c tras la administración intranasal (i.n.). Los animales fueron infectados con dosis crecientes de un aislado clínico del serotipo 1 de *S. pneumoniae* y se evaluó diariamente la supervivencia. Se definió 4×10^5 UFC como la dosis letal mínima (DLM) que mata a todos los animales en un plazo de 72 a 120 h.

50 La capacidad de la flagelina para controlar la neumonía neumocócica se evaluó comparando la supervivencia de los ratones provocados por vía intranasal con *S. pneumoniae* con ratones instilados con flagelina (FliC) y *S. pneumoniae*. Como control, los ratones fueron provocados con *S. pneumoniae* y flagelina previamente hidrolizada con tripsina (FliC/T). Como se muestra en la Figura 1A, los ratones tratados con FliC tuvieron una tasa de supervivencia del 75 %, mientras que los animales no tratados o tratados con FliC/T murieron en un plazo de 3 a 4 días después de la provocación. La protección inducida por flagelina osciló entre el 75 y el 100 % entre diferentes experimentos independientes. La co-administración de flagelina con *S. pneumoniae* se produjo dentro de las 24 h en una reducción de 80 veces de los recuentos bacterianos en el pulmón en comparación con los animales que recibieron *S. pneumoniae* (Figura 1B). Asimismo se evaluó si la flagelina podría ejercer una respuesta protectora contra la infección neumocócica cuando se administra antes y después de la infección. Todos los animales que recibían flagelina por vía intranasal 12 a 24 h antes de la provocación neumocócica sobrevivieron, mientras que todos los ratones de control murieron en el día 4. Además, se logró una protección del 100 % cuando se administró la flagelina 24 h después de la provocación. Por lo tanto, la flagelina muestra efectos profilácticos y terapéuticos en la neumonía neumocócica.

65 La capacidad de la flagelina para inducir protección se evaluó en C57BL/6 y en la cepa NMRI no consanguínea. Se descubrió que la DML del serotipo 1 de *S. pneumoniae* era 2×10^6 UFC para ambas cepas, y la protección mediada

por flagelina se evaluó con 5xDML. La administración de flagelina 12 h antes de la provocación bacteriana indujo una protección del 80 % en ratones C57BL/6; de manera similar, se logró una protección del 100 % en animales NMRI cuando se administró flagelina 32 horas a 6 horas antes de la provocación. La flagelina tuvo un efecto protector cuando se co-administra con *S. pneumoniae* en las cepas C57BL/6 y NMRI, aunque en menor medida (40 %). En conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento con flagelina protege diferentes cepas de ratones.

Se abordó si la señalización de TLR5 es necesaria para la protección provocada por el tratamiento con flagelina. Para esto, se utilizaron las flagelinas recombinantes FliC Δ 174-400 y FliC Δ 174-400/89-96* (27). FliC Δ 174-400 tiene la misma capacidad para promover la señalización de TLR5 en la mucosa que la flagelina nativa, mientras que FliC Δ 174-400/89-96* transporta mutaciones que evitan la señalización de TLR5. Todos los ratones que recibieron FliC Δ 174-400 y *S. pneumoniae* sobrevivieron a la provocación, ninguno de los cuales recibió el mutante FliC Δ 174-400/89-96* (Figura 2). Estos resultados sugieren que la señalización de TLR5 es necesaria para la protección.

El tratamiento con flagelina promueve la expresión de genes pro-inflamatorios y exacerba la infiltración celular transitoria en los pulmones durante la neumonía neumocócica: Se analizó si el tratamiento con flagelina modifica la respuesta transcripcional del pulmón a la infección neumocócica. Los ratones fueron provocados con *S. pneumoniae* o con *S. pneumoniae* más flagelina como antes. Otro grupo recibió solo la flagelina como control. Veinticuatro horas después del tratamiento y la infección, los pulmones se recogieron para analizar la expresión de genes seleccionados mediante qRT-PCR. La administración de una flagelina solo o en combinación con *S. pneumoniae* provocó un aumento dramático en los niveles de ARNm de *Cxcl1*, *Cxcl2* y *Ccl20* en comparación con la provocación neumocócica. El tratamiento con flagelina también incrementó la expresión de *Tnf*, aunque la diferencia es consistente, no fue estadísticamente significativa. La expresión de *Il6* aumentó en animales que se provocaron y trataron con flagelina pero no en los que recibieron flagelina o solo *S. pneumoniae*, lo que sugiere un efecto sinérgico entre la flagelina y la infección neumocócica en la expresión de *Il6*. Los niveles de ARNm de *Tgfb1*, *Il17a*, *Il17f*, *Il23* e *Il4* se han mantenido sin cambios entre todos los grupos en comparación con los animales simulados.

Para evaluar si la expresión de genes pro-inflamatorios se correlacionó con la inflamación e infiltración celular en las vías respiratorias, se realizó el análisis histológico del pulmón obtenido 24 horas después del tratamiento con flagelina e infección. *S. pneumoniae* indujo una infiltración celular moderada para ciertos bronquiolos y algunas áreas perivasculares cercanas a los bronquiolos. Por el contrario, el tratamiento con flagelina, solo o junto con los neumococos, indujo edema e infiltración masiva de células que afectan no solo a las regiones perivasculares y peribronqueales, sino también a algunas áreas del parénquima circundante del pulmón. Cabe destacar que en el día 7, los pulmones de los ratones que recibieron flagelina y neumococos mostraron una resolución completa de la inflamación, sin aparente infiltración celular o edema. Estos resultados sugieren que la flagelina induce una respuesta inflamatoria fuerte pero transitoria que promueve la depuración de bacterias, sin causar alteración permanente de la morfología o función pulmonar.

La protección inducida por flagelina requiere células que expresan Gr-1 pero es independiente de linfocitos B y T: El reclutamiento de neutrófilos en las vías respiratorias es un punto de referencia tanto de la infección neumocócica como del tratamiento con flagelina nasal y en este caso se mostró que el tratamiento con flagelina y la infección activaron la expresión de genes implicados en el reclutamiento de neutrófilos. Por lo tanto, el objetivo fue comparar la cinética de la infiltración de neutrófilos en animales provocados con *S. pneumoniae* y tratados o no con flagelina. Se recogieron BAL y pulmones en diferentes puntos temporales tras la provocación y se tiñeron con un anticuerpo anti-Ly6G. La provocación neumocócica indujo el reclutamiento de PMN en todos los animales. Sin embargo, los ratones tratados con flagelina en el momento de la provocación mostraron una infiltración más rápida y pronunciada de PMN en las vías respiratorias en comparación con los ratones provocados con solo *S. pneumoniae*. A las 24 h, la infiltración de PMN alcanzó su punto máximo independientemente de los grupos, y la diferencia entre grupos fue máxima. Sin embargo, a las 48 horas, los números de PMN ya no eran significativamente diferentes entre los grupos. Por lo tanto, la co-administración de flagelina con neumococo promueve un reclutamiento rápido y transitorio de un gran número de neutrófilos en las vías respiratorias.

Posteriormente, se determinó si los neutrófilos eran críticos para la protección mediada por flagelina. Para este fin, los animales fueron inyectados i.p. con un anticuerpo monoclonal específico para el receptor 1 de granulocitos (Gr-1 o Ly6G/Ly6C) o el anticuerpo de control de isotipo 24 h antes de la provocación. Los animales que recibieron el control de isotipo y fueron tratados con FliC sobrevivieron a la provocación. En cambio, el tratamiento anti-Gr-1 deplecionó >95 % de los neutrófilos de las vías respiratorias y anuló la protección mediada por la flagelina contra *S. pneumoniae*. Estos resultados mostraron que las células que expresan Gr-1, muy probablemente PMN, son efectores críticos de la protección inducida por flagelina en la infección neumocócica.

Como los linfocitos B y T se han implicado en la fase temprana de la infección neumocócica, se evaluó su papel en la protección inducida por flagelina. Los ratones SCID (deficientes de anticuerpos, células B y T), así como los ratones BALB/c inmunocompetentes, se provocaron con 2×10^7 UFC de *S. pneumoniae* o *S. pneumoniae* con flagelina. Los pulmones y el bazo se recogieron 36 h después de la infección para determinar los recuentos de bacterias. La co-administración de flagelina promueve la depuración de bacterias en el pulmón de ratones SCID en un grado similar a ratones BALB/c. Tanto los ratones SCID como BALB/c mostraron asimismo recuentos bacterianos más bajos en el bazo tras el tratamiento con flagelina, lo que significa que no se fue capaz de controlar no solo la

infección local, sino también la sistémica. Los ratones SCID reclutaron números similares de PMN en el pulmón y en los espacios alveolares 16 h después de la instilación de flagelina en comparación con los ratones BALB/c. En resumen, estos resultados muestran que las células que expresan Gr-1 no requieren que las células B ni los linfocitos T activen la protección inducida por flagelina.

5

Discusión:

La inmunidad innata es esencial para controlar la infección neumocócica de acuerdo con lo mostrado por TLR, así como el requisito de MyD88 para prevenir la colonización temprana de las vías respiratorias por *S. pneumoniae* (Albiger, B., Sandgren A., Katsuragi H., Meyer-Hoffert U., Beiter K., Wartha F., Hornef M., Normark S. y Normark B. H. 2005. *Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. Cell Microbiol* 7:1603-1615.; Khan, A. Q., Q. Chen, Z.-Q. Wu, J. C. Paton, y C. M. Snapper. 2005. *Both innate immunity and type 1 humoral immunity to Streptococcus pneumoniae are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on Toll-Like Receptor 2. Infect. Immun.* 73:298-307). La respuesta inmunitaria a la infección neumocócica de las vías respiratorias se caracteriza por un gran y rápido reclutamiento de neutrófilos en el pulmón, y la muerte fagocítica del neumococo por PMN se considera un mecanismo de defensa importante. Sin embargo, *S. pneumoniae* puede evadir las defensas innatas del huésped al inhibir o retrasar la deposición del complemento y el estallido respiratorio de los fagocitos. Por ende, el influjo de neutrófilos a menudo es ineficaz en la depuración de la infección hasta que se producen anticuerpos específicos de serotipo e inhibición de la deposición del complemento de derivación que potencia la opsono-fagocitosis. En este estudio, se evaluó si la administración exógena de un agonista de un TLR está naturalmente comprometida por *S. pneumoniae*, es decir, flagelina como agonista de TLR5, podría reforzar la inmunidad innata para controlar la infección neumocócica respiratoria aguda. Se descubrió que la administración local de flagelina promovió la supervivencia de los ratones provocados con una dosis letal de serotipo 1 de *S. pneumoniae* al potenciar la depuración bacteriana local y sistémica. El tratamiento con flagelina fue eficaz antes, durante y después del establecimiento de la infección en ratones BALB/c, C57BL/6 y NMRI.

Se ha demostrado que la administración *in vivo* de flagelina regula positivamente la expresión de citoquinas proinflamatorias. En este caso, se muestra que la co-administración de flagelina en el momento de la provocación de *S. pneumoniae* también regula positivamente la expresión de los genes de quimiocina/activador específicos de PMN, *Cxcl1* y *Cxcl2* y, también, *Tnf* y *Ccl20* en los pulmones mientras que *S. pneumoniae* solo indujo pobremente estos genes. De acuerdo con el perfil de expresión de quimiocinas y citoquinas, el análisis de las secciones de tejido pulmonar mostró una marcada infiltración de células en las regiones peribronqueal y perivascular que fue más pronunciada en los pulmones de los animales tratados con flagelina que en los animales infectados no tratados. Cabe destacar que, a pesar de la pronunciada respuesta inflamatoria inducida por la flagelina, el tejido pulmonar se recuperó por completo el día 7, mientras que los animales no tratados murieron de infección. El análisis de las muestras de BAL sugirió que la administración del agonista de TLR5 en el momento de la provocación neumocócica indujo un reclutamiento de PMN acelerado y más pronunciado. La infiltración de PMN fue transitoria, alcanzó su punto máximo a las 24 h y regresó a niveles de estado estacionario a las 40 h. La depleción de las células que expresan Gr-1, muy probablemente PMN, abolió la protección demostrando que estas células son necesarias para controlar la infección pulmonar neumocócica. La naturaleza autolimitada de la respuesta inflamatoria mediada por flagelina es un hallazgo muy relevante, ya que podría asociarse una inflamación exacerbada al fallo de la barrera y función pulmonar. Los mecanismos moleculares que controlan la respuesta de TLR5 no solo regulan positivamente los genes proinflamatorios sino que también activan la terminación de la respuesta. Por lo tanto, el tratamiento con flagelina en la mucosa podría considerarse como un agente terapéutico contra la neumonía neumocócica que potencia la infiltración de neutrófilos y la limitación concurrente de la inflamación que continúa evaluándose en ensayos clínicos.

Además de PMN, diversos estudios han notificado que los linfocitos T y B, así como los anticuerpos naturales, pueden desempeñar un papel importante en el control temprano de la neumonía neumocócica. Se ha demostrado que los linfocitos T se acumulan en zonas de inflamación peribronqueal en etapas tempranas de la respuesta inmunitaria y están involucrados en la defensa contra el neumococo, ya que los ratones deficientes de MHC de clase II que carecen de las células T CD4⁺ son más susceptibles a la infección en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre. Se ha demostrado que los ratones deficientes en CD19, que tienen un desarrollo alterado de las células B1a y la producción de anticuerpos naturales, tienen una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica. Sin embargo, los resultados presentados en este caso muestran que las células T y B se requieren para la depuración local y sistémica de bacterias inducida por flagelina. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren fuertemente que cambiar la dinámica de PMN da como resultado la destrucción efectiva de los neumococos, incluso en ausencia de linfocitos B y T.

60

Nuestros resultados mostraron que la señalización de TLR5 es necesaria para la protección inducida por flagelina. En las vías respiratorias, TLR5 se expresa por macrófagos alveolares y células epiteliales, lo que sugiere que las células residentes pueden ser actores clave en la inducción de las defensas innatas protectoras contra *S. pneumoniae* tras el tratamiento con flagelina. Para acompañar este desarrollo, estudios recientes sugirieron que el epitelio de las vías respiratorias es el tejido activado por TLR5 implicado en la producción de quimiocinas y el reclutamiento de PMN en respuesta a bacterias flageladas. Por otra parte, los neutrófilos murinos expresan TLR5,

65

por consiguiente, la señalización de TLR5 puede activar directamente PMN y potenciar su capacidad de destrucción de *S. pneumoniae*. En particular, se estableció previamente que *Haemophilus influenzae* destruida por calor puede aumentar específicamente la capacidad de PMN para destruir al neumococo de una manera dependiente de Nod1.

5 Las terapias actuales para la profilaxis y tratamiento de la infección por *S. pneumoniae* tienen limitaciones en la prevención o curación de enfermedad neumocócica, por consiguiente, aún se requieren nuevas estrategias de intervención inmunológica. Varios informes han demostrado que la administración de lisados bacterianos y bacterias eliminadas por calor estimula reacciones protectoras contra la infección. Sin embargo, la naturaleza indefinida de estas preparaciones suele ser un problema cuando se diseñan fármacos para uso humano. Nuestros resultados
10 mostraron que la estimulación local con una única y bien caracterizada molécula, específicamente flagelina, es suficiente para aumentar las defensas inmunitarias innatas de los pulmones y controlar la neumonía neumocócica, destacando los beneficios de utilizar patrones moleculares asociados a microbios como base para desarrollar terapias antimicrobianas.

15 Referencias

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

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

25 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS

<130> BI010412 SIRARD / MC

30 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 585

35 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

ES 2 690 760 T3

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

Gly Lys Gly Thr Ile Thr Asn Lys Ala Ala Thr Val Ser Asp Leu Thr

ES 2 690 760 T3

				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	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			
			420					425					430					
Ile	Thr	Asn	Val	Ala	Asp	Tyr	Thr	Val	Ser	Tyr	Ser	Val	Asn	Lys	Asp			
		435					440					445						

ES 2 690 760 T3

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
 <212> PRT
 <213> *Salmonella typhimurium*
 <400> 2

5

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

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

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

10

ES 2 690 760 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 690 760 T3

			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
 <212> PRT
 <213> *Salmonella typhimurium*
 <400> 3

5

ES 2 690 760 T3

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

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

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

ES 2 690 760 T3

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
 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

ES 2 690 760 T3

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
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> enlazador

10

<400> 4

Gly Ala Ala Gly
 1

REIVINDICACIONES

1. Un agonista de TLR5 para su uso en un método de tratamiento de una infección de las vías respiratorias resultante de *Streptococcus pneumoniae*, en el que dicho agonista de TLR5 es un polipéptido de flagelina.
- 5 2. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido de flagelina se aísla de una bacteria seleccionada entre el grupo que consiste en *Escherichia*, tal como, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, tal como *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Serratia*, tal como *Serratia marcescans*, *Shigella*, *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*.
- 10 3. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de flagelina se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 15 4. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido de flagelina comprende: a) un péptido N-terminal que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza a partir del residuo de aminoácido ubicado en la posición 1 de la SEQ ID NO: 3 y que termina en un residuo de aminoácidos seleccionado entre el grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos ubicado en las posiciones 99 a 173 de la SEQ ID NO: 3; y b) un péptido C-terminal que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comienza en un residuo de aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en uno cualquiera de los residuos de aminoácidos ubicado en las posiciones 401 a 406 de la SEQ ID NO:3 y que termina en el residuo de aminoácidos ubicado en la posición 494 de la SEQ ID NO:3, en el que, dicho péptido N-terminal está directamente vinculado a dicho péptido C-terminal, o dicho péptido N-terminal y dicho péptido C-terminal están vinculados indirectamente, uno a otro, por una cadena espaciadora.
- 20 5. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho péptido N-terminal se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 1-99, 1-137, 1-160 y 1-173 de la SEQ ID NO: 3.
- 25 6. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicho péptido C-terminal se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 401-494 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3.
- 30 7. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-173 y 401-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 35 8. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-160 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 40 9. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que dichos péptidos N-terminal y C-terminal consisten en las secuencias de aminoácidos 1-137 y 406-494 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente.
- 45 10. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que dicho péptido N-terminal y dicho péptido C-terminal están vinculados indirectamente, uno a otro, por una cadena espaciadora intermedia que consiste en una secuencia peptídica NH₂-Gly-Ala-Ala-Gly-COOH (SEQ ID NO: 4).
- 50 11. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que el residuo de aminoácido asparagina ubicado en la posición 488 de la SEQ ID NO: 3 se reemplaza con una serina.
- 55 12. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que dicho polipéptido de flagelina comprende un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal.
- 60 13. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es formulado para ser compatible con una administración tópica.
- 65 14. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, que es formulado en forma de aerosol, pulverizador, nebulización o en forma de gotas.
15. El agonista de TLR5 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho agonista de TLR5 se administra por medio de administración intranasal o administración pulmonar.

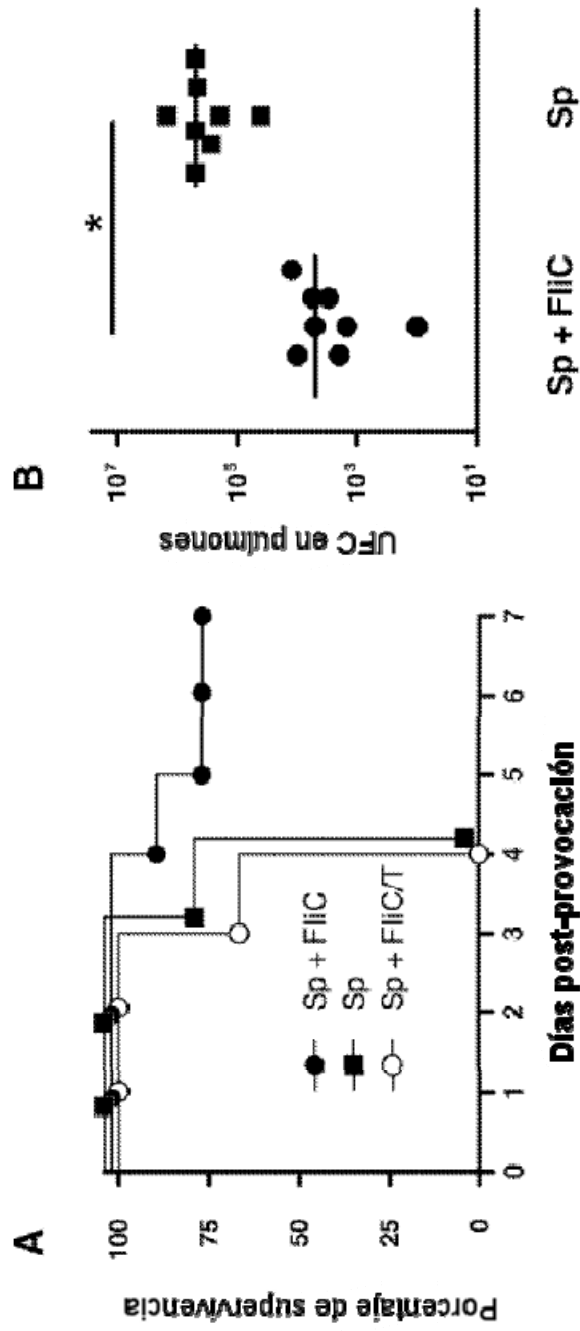


Figura 1

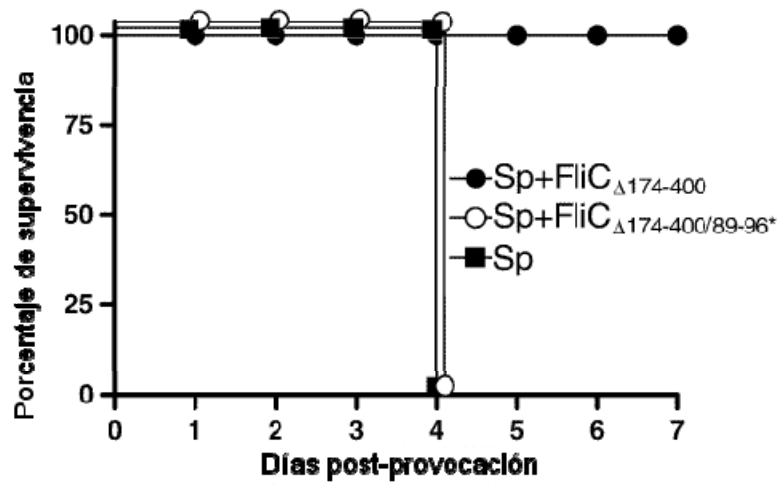


Figura 2