

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 584**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7076** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**A61K 39/108** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011 PCT/US2011/034484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11139881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011 E 11778041 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2566484**

54 Título: **Método para producir vacunas que comprende la irradiación de microorganismos en una composición que comprende aminoácidos y ortofosfato de manganeso**

30 Prioridad:

**29.04.2010 US 329381 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.12.2017**

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR  
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,  
INC. (100.0%)  
6720-A Rockledge Drive, Suite 100  
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**DALY, MICHAEL, J. y  
GAIDAMAKOVA, ELENA, K.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 647 584 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

Método para producir vacunas que comprende la irradiación de microorganismos en una composición que comprende aminoácidos y ortofosfato de manganeso

### Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 61/329.381, presentada el 29 de Abril de 2010.

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la invención

- 10 La invención proporciona métodos para producir vacunas dirigidas contra microorganismos, comprendiendo los métodos el cultivo, recogida y/o la suspensión del microorganismo en presencia de una composición protectora contra la radiación y la irradiación del microorganismo con una dosis de radiación suficiente para hacer que el microorganismo se vuelva de replicación deficiente. Las composiciones protectoras contra la radiación utilizadas en los métodos de la presente invención comprenden al menos un deca péptido en una mezcla de tampón de manganeso-fosfato o manganeso-bicarbonato. La invención también proporciona métodos para hacer que una bacteria en cultivo sea resistente a la radiación ionizante (RI), comprendiendo estos métodos el cultivo de la bacteria en presencia de una composición protectora contra la radiación. La invención se define en las reivindicaciones.

### Antecedentes de la invención

- 20 La familia *Deinococcaceae*, extremadamente resistente a la radiación, se compone de más de veinte especies distintas que pueden sobrevivir a exposiciones agudas a radiación ionizante (RI) (10 kGy), luz ultravioleta (UV) (1 kJ/m<sup>2</sup>) y desecación (años); y puede crecer bajo RI crónica (60 Gy/hora). En particular, *Deinococcus radiodurans* es una bacteria extremadamente resistente a la radiación ionizante (RI) que puede sobrevivir a exposiciones a radiación gamma que exceden en un factor de mil las dosis que son citotóxicas y letales para las células de mamíferos.

- 25 Para bacterias extremadamente resistentes, tales como p. ej., *D. radiodurans*, la supervivencia después de altas dosis de RI ha sido atribuida a la protección de las proteínas frente a la oxidación durante la irradiación, con el resultado de que los sistemas de reparación enzimática sobreviven y funcionan con una eficacia mucho mayor durante la recuperación que en bacterias sensibles, donde las proteínas celulares son altamente susceptibles a la carbonilación. En un informe publicado en la revista Science (Daly et al. (2004), Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance, Science 306: 925-1084), el manganeso(II) intracelular estuvo implicado en la facilitación de la resistencia a la radiación al proteger las proteínas, pero no el ADN, durante la exposición a la radiación ionizante; y en un segundo informe publicado en PLoS Biology (Daly et al. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance, PLoS Biology 5 (4) e92), la resistencia a la radiación se correlacionó positivamente con la protección de proteínas durante la irradiación, mediada por un mecanismo no enzimático.

- 35 A diferencia de *D. radiodurans*, la mayoría de las proteínas no son resistentes a la radiación. Del mismo modo, la mayoría de las células, ya sea en eucariotas, procariotas o de mamífero (p. ej. ser humano) tampoco son resistentes a la radiación. Como tal, la exposición a la radiación es bastante perjudicial para la estructura y/o función de la proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que la radiación ionizante induce (causa) cáncer en muchas especies diferentes de animales y en casi todas las partes del cuerpo humano.

- 40 En los seres humanos, la sobreexposición significativa a la radiación puede provocar intoxicación por radiación, también llamada "enfermedad por radiación" o "dosis progresiva". El término se utiliza generalmente para hacer referencia a problemas agudos causados por una gran dosis de radiación en un período corto, aunque esto también ha ocurrido con la exposición a largo plazo a radiación de bajo nivel. El nombre clínico para "enfermedad por radiación" es el síndrome de radiación aguda descrito por CDC. Existe un síndrome crónico de radiación, pero es muy poco común; esto se ha observado entre los trabajadores en los primeros centros de producción de radio y en los primeros días del programa nuclear soviético. Una exposición corta puede provocar un síndrome agudo de radiación; el síndrome crónico de radiación requiere un alto nivel prolongado de exposición.

- 45 Los seres humanos encuentran rutinariamente radiación en la vida diaria, incluyendo la radiación de equipos electrónicos y teléfonos móviles, así como radiación de fondo natural. Los individuos que están muy cerca de elementos radiactivos como p. ej. los empleados en una planta nuclear o los miembros de las fuerzas armadas son particularmente propensos a recibir dosis más altas de radiación. Adicionalmente, la radiación se utiliza en pruebas de diagnóstico tales como radiografías y radioterapia para tratar cánceres.

- 50 Actualmente hay muy pocos radioprotectores adecuados para el tratamiento de seres humanos, y los que existen (p. ej., amifostina) son citotóxicos y tienen efectos secundarios graves (p. ej., pérdida de conciencia, respiración rápida o irregular, picazón, náuseas y vómitos).

Dada la gran exposición a la radiación, existe una necesidad significativa de radioprotectores que no sean tóxicos, conserven la función proteica y, en particular, sean adecuados para el uso en seres humanos.

### Compendio de la invención

5 La invención proporciona métodos para producir vacunas dirigidas contra microorganismos, comprendiendo los métodos el cultivo, recolección y/o suspensión del microorganismo en presencia de una composición protectora contra la radiación e irradiación del microorganismo con una dosis de radiación suficiente para que el microorganismo se vuelva de replicación deficiente. Las composiciones protectoras contra la radiación utilizadas en los métodos de preparación de vacunas de la presente invención comprenden al menos un decapeptido en un tampón que contiene manganeso.

10 La invención también proporciona métodos para hacer que una bacteria en cultivo sea resistente a la radiación ionizante (RI), comprendiendo estos métodos el cultivo de la bacteria en presencia de una composición protectora contra la radiación. Las composiciones protectoras contra la radiación utilizadas en los métodos resistentes a RI de la presente invención comprenden al menos un nucleósido, fosfato, al menos un antioxidante y dimetilsulfóxido (DMSO).

### 15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que los compuestos de productos ultrafiltrados de *D. radiodurans* protegen las proteínas, pero los compuestos de productos ultrafiltrados de *Pseudomonas putida* (PP), *Escherichia coli* (EC), y *Thermus thermophilus* (TT) no. El extracto de células de *D. radiodurans* (DR) ultrafiltrado, libre de proteínas previene la oxidación de proteínas inducida por radiación ionizante (RI) *in vitro*, pero los extractos de las bacterias sensibles a la radiación *Pseudomonas putida* (PP), *Escherichia coli* (EC), y *Thermus thermophilus* (TT) no. Las proteínas de *E coli* purificadas se incubaron en extracto ultrafiltrado de PP, EC, TT o DR durante la irradiación y se sometieron a un análisis de carbonilo de proteína. Gel desnaturizante de poliacrilamida teñido con Coomassie; Transferencia Western de carbonilo, que revela la oxidación y protección de las proteínas (sin señal).

20

La Figura 2 representa la composición de producto filtrado de *Deinococcaceae radiodurans* (DR) en comparación con producto ultrafiltrado de *Pseudomonas putida* (PP), *Escherichia coli* (EC) y *Thermus thermophilus* (TT).

25

La Figura 3 representa las curvas de supervivencia de *E. coli* expuesta a RI aguda y desarrollada en presencia de diversos suplementos: TGY, medio de cultivo rico en péptido convencional; DMSO, dimetilsulfóxido; UMnP, uridina 3 mM/Mn<sup>2+</sup> 1 μM/PiB 13 mM (tampón fosfato).

La Figura 4 representa el papel de los péptidos en la resistencia a la radiación ionizante. (A) Distribución citosólica y concentración de aminoácidos en *D. radiodurans*: "no RI", células de control no irradiadas contenidas en tampón de fosfato de potasio 25 mM, pH 7,4 en hielo, luego lavadas y mantenidas en tampón fosfato 25 mM, pH 7,4 (32°C) durante 0 o 30 min. "+ RI", células irradiadas a 7 kGy en tampón fosfato 25 mM, pH 7,4 en hielo, luego lavadas y mantenidas en tampón fosfato 25 mM, pH 7,4 (32°C) durante 0 o 30 min. Las células se recogieron, se resuspendieron en TCA al 20% y se lisaron. Se analizaron alícuotas de sobrenadante neutralizado para determinar los aminoácidos libres y el contenido de aminoácidos derivados de péptidos. (B) Radioprotección de *BamHI* por el decapeptido (H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH; 1261 Da). (C) Radioprotección de glutamina sintetasa (GS) por Mn<sup>2+</sup> y leucina (Leu), uridina (U), o el decapeptido (DP) en tampón fosfato de potasio (PiB), pH 7,4 o tampón bicarbonato de sodio (HCO)<sub>3</sub>, pH 7,4.

30

35

La Figura 5 representa el enfoque para la preparación de vacunas irradiadas con el complejo de manganeso. (A) El ADN se preparó a partir del bacteriófago λ tratado irradiado (derecha) o no (izquierda) con el complejo de Mn<sup>2+</sup> (Mn-pep-Pi): (H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH) (SEC ID NO: 1) 3 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, tampón ortofosfato (Pi) 25 mM (pH 7,4). A las dosis de rayos gamma indicadas (0-40 kGy), se purificó ADN (genoma de 48,5 kpb) del bacteriófago λ, se sometió a electroforesis en gel de agarosa convencional, y después a transferencia Southern con una sonda de ADN λ radiomarcada. Conclusión: El complejo de Mn<sup>2+</sup> no protege significativamente el ADN empaquetado en virus. (B) Las mismas preparaciones de bacteriófago λ que se examinaron en el panel A se sometieron a ensayo para determinar la integridad de la proteína separando las proteínas del virus utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida. Conclusión: Las proteínas en virus que fueron irradiados en ausencia del complejo de Mn<sup>2+</sup> (izquierda) fueron destruidas progresivamente. Por el contrario, las proteínas en las muestras de virus que contenían el complejo de Mn<sup>2+</sup> (derecha) no se vieron afectadas por dosis tan altas como 40 kGy. (C) A 40,000 Gy, una dosis que obliteraba el ADN del virus (panel A) y lo convertía en un virus completamente no infeccioso (no mostrado), las proteínas del virus seguían siendo completamente inmunogénicas. Esto se sometió a ensayo mediante análisis Western, en el que las proteínas de λ se sensibilizaron con anticuerpos producidos en conejos contra el fago λ no irradiado. Obsérvese que se obtuvo un resultado positivo idéntico para la inmunogenicidad para transferencias western equivalentes sondeadas con anticuerpos producidos contra el fago λ expuesto a 40.000 Gy en presencia del complejo de Mn<sup>2+</sup>. Por el contrario, el fago λ expuesto a 40,000 Gy en ausencia del complejo de Mn<sup>2+</sup> no produjo anticuerpos en conejos que tenían una especificidad significativa para el bacteriófago λ nativo. (D) y (E): Micrografía electrónica de transmisión (MET) de fago λ preirradiación - tratado (E) o no tratado (D) con complejo de Mn<sup>2+</sup>. (F) y (G): MET de fago λ después de la irradiación (40 kGy) tratado (G) o no (F)

40

45

50

55

con el complejo de  $Mn^{2+}$ . En presencia del complejo de  $Mn^{2+}$ , las partículas de virus del fago  $\lambda$  expuestas a 40 kGy no sufrieron daños.

La Figura 6 representa datos tabulares y gráficos de ratones sometidos a ensayo con *Staphylococcus aureus* (MRSA). Estos datos muestran que la presencia del complejo de manganeso en la composición irradiada confería una mayor respuesta inmunitaria en los ratones tratados.

### Descripción detallada

Los autores de la presente invención han estudiado la radio-resistencia de *D. radiodurans* y han preparado extractos de células libres de proteínas, ultra purificados que exhiben propiedades radioprotectoras. Por lo tanto, la invención se basa en parte en el descubrimiento de componentes radioprotectores de extracto libre de células de *D. radiodurans* y composiciones artificiales que contienen tales componentes.

En particular, los solicitantes han demostrado que los extractos celulares libres de proteínas y ultra purificados de *D. radiodurans* son extremadamente radioprotectores de las proteínas expuestas a la radiación gamma. La adenosina, la uridina y los péptidos se acumulan en producto ultrafiltrado de *D. radiodurans* a concentraciones más altas que en los productos ultrafiltrados de bacterias sensibles a la radiación. Se demostró que *in vitro*, a dosis >10.000 Gy, los nucleósidos son altamente protectores de las proteínas, previniendo la carbonilación de proteínas inducida por radiación ionizante (RI) y preservando las enzimas funcionales en presencia de Mn(II). Se ha desarrollado una composición radioprotectora de adenosina, manganeso, péptidos y fosfato. Asombrosamente, se ha demostrado que los extractos de *D. radiodurans* son potentes radioprotectores para células T humanas cultivadas con mayor potencia que otros compuestos radioprotectores bien establecidos.

La presente invención proporciona composiciones radioprotectoras sintéticas o derivadas de *D. radiodurans* (DR) y métodos de uso de estas composiciones para proteger las proteínas y/o las células del daño por radiación. Estas composiciones son útiles para evitar daños por radiación en composiciones así como en sujetos tales como seres humanos o en cultivos celulares. La composición de la presente invención comprende manganeso y al menos un péptido antioxidante, o comprenden manganeso y una colección de aminoácidos individuales. En realizaciones adicionales, la composición también puede comprender al menos un nucleósido. Según se utiliza en la presente memoria, el término "composición radioprotectora" o "composición protectora frente a la radiación" puede significar un extracto de producto ultrafiltrado de DR preparado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, o puede significar una composición sintética que comprende manganeso y al menos un péptido antioxidante o una colección de aminoácidos individuales. Si se utiliza un extracto de producto ultrafiltrado DR, este extracto se puede complementar con cualquiera de los compuestos descritos y expuestos en la presente memoria. Por ejemplo, el producto ultrafiltrado de DR puede prepararse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, y se pueden agregar al extracto  $Mn^{2+}$  o péptidos adicionales, por ejemplo.

Las composiciones radioprotectoras pueden contener adicionalmente leucina, alanina y/o valina. La leucina está fuertemente implicada en la captación del peróxido de hidrógeno en presencia de Mn(II) y puede ser un componente de complejos intracelulares más grandes que incluyen uridina y adenosina. Una fuerte evidencia *in vitro* indica un efecto sinérgico entre la adenosina y el manganeso y el fosfato. La estequiometría de la adenosina y el manganeso y los tampones de fosfato o bicarbonato se puede optimizar para un análisis de apoptosis.

Los autores de la presente solicitud han demostrado que la adenosina sola y el Mn(II) solo son radioprotectores *in vivo* para una línea celular de mamífero y para un cultivo de células bacterianas.

Aunque no está ligado a ninguna teoría particular, se cree que las composiciones que comprenden nucleósidos de purina (p. ej. adenosina), nucleósidos de pirimidina (p. ej., uridina) y un antioxidante peptídico (p. ej. manganeso-péptido) actúan como radioprotectores al proteger el sitio activo y la superficie de las proteínas. El nucleósido de purina, p. ej. la adenosina (y opcionalmente combinada con el nucleósido de piridina uridina y péptidos) media sus efectos radioprotectores sobre la acumulación dentro de una célula, lo que inhibe la oxidación de proteínas inducida por la radiación, y en presencia de Mn(II) preserva la función enzimática. Se piensa que la adenosina protege las proteínas y, por lo tanto, capta un subconjunto de ROS.

Además, sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que bajo condiciones de irradiación aerobias o anaerobias, el superóxido se puede acumular en las células durante la irradiación porque el superóxido no atraviesa fácilmente las membranas. Aunque el superóxido no reacciona con el ADN, el superóxido dañará e inactivará las enzimas con agrupaciones 2Fe-2S o 4Fe-4S expuestas, liberando Fe(II) y también dañando ciertos aminoácidos expuestos tales como, pero no limitados a, cisteína. El problema con el hierro en una célula, cuando no está unido y está "libre", es que causa reacciones de Fenton en presencia de peróxido de hidrógeno, generando radicales hidroxilo. Por lo tanto, las condiciones que liberan Fe(II) unido son extremadamente peligrosas, no solo debido a la generación de radicales hidroxilo, sino porque la pérdida de Fe de las enzimas dependientes de Fe conduce al fracaso de las rutas bioquímicas dentro de las cuales operan. Los métodos de la presente solicitud protegen de forma óptima contra estas condiciones peligrosas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Según se utiliza en la presente memoria, "un", "uno" o "una" significa al menos uno, a menos que se indique claramente lo contrario. El término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refiere a un valor que no es más de 10% por encima o por debajo del valor modificado por el término. Por ejemplo, el término "aproximadamente 5% (p/p)" significa un intervalo de 4,5% (p/p) a 5,5% (p/p).

Esta invención proporciona métodos para conservar la función de la proteína o la inmunogenicidad de la proteína que comprende poner en contacto una proteína con una composición de la presente invención. Una realización de la invención es un método que preserva la función de la proteína cuando la proteína está expuesta a las condiciones extremas de radiación tales como p. ej. radiación gamma. En otra realización de la invención, el método conserva la función de la proteína durante la desecación.

Los métodos para conservar la función de la proteína proporcionan radioprotección cuando la proteína se expone a altas dosis de radiación tales como dosis que exceden de 10 kGy, p. ej., 17,5 kGy.

En otra realización, la presente descripción proporciona métodos para proteger la función de una proteína o la inmunogenicidad de una proteína en un cultivo celular o preparación de virus que comprende cultivar, cosechar y/o suspender las células con cualquiera de las composiciones radio-protectoras descritas en la presente memoria. La preparación del virus puede ser para genomas de ADN o ARN, de hebra sencilla o de doble hebra. El cultivo celular puede ser procariótico o eucariótico. En una realización, el cultivo celular es bacteriano. En otra realización, el cultivo celular es de mamífero. En otra realización más, el cultivo celular es un cultivo con el propósito de propagar virus.

Se puede utilizar cualquier nucleósido, si está presente, en las composiciones protectoras contra la radiación. Los nucleósidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, adenosina, uridina,  $\beta$ -pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas. Además, también se pueden utilizar análogos de nucleósidos que contienen dos grupos de oxígeno de carbonilo (C=O) separados por un grupo (N3)H. En una realización, el nucleósido es adenosina o uridina. En una realización, la composición contiene adenosina. En otra realización de la invención, la composición contiene uridina. La cantidad de nucleósido en la composición varía según su uso. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada. En algunas realizaciones de la invención, la cantidad de nucleósido varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM. En una realización, la concentración de uno o más nucleósidos comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM de adenosina y/o uridina.

Se puede utilizar una variedad de antioxidantes o puede estar presente en la composición. Los antioxidantes adecuados incluyen manganeso, vitamina E y fosfato manganoso, Mn-péptidos, Mn-aminoácidos (p. ej., Leucina), Mn-TRIS, Mn-melanina, Mn-cafeína, Mn-ribosa, Mn-trehalosa, Mn-ácido dipicolínico, Mn-fosfato y Mn-bicarbonato. En una realización de la invención, el antioxidante es manganeso. En otra realización, el antioxidante es  $MnCl_2$ . En otra realización más, el antioxidante es vitamina E y/o aspirina. La cantidad de antioxidante en la composición varía con su utilización. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada. En una realización, la composición contiene de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM del antioxidante. En otra realización, la composición contiene de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 12,5 mM.

En una realización de la invención, un antioxidante es fosfato manganoso que se puede proporcionar en forma de una mezcla. En una realización, la mezcla se produce mezclando una solución de manganeso y una solución de fosfato. La cantidad de antioxidante en la composición varía de acuerdo con su utilización. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada. En una realización, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM de los iones manganosos ( $Mn(II)$ ). En una realización más específica, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM de los iones manganosos ( $Mn(II)$ ) en un tampón fosfato. En una realización aún más específica, las composiciones comprenden tampón fosfato a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 25 mM. En una realización específica, la mezcla es una solución 1 mM de  $Mn(II)$  y una solución de tampón de fosfato 25 mM (pH 7,4).

Las composiciones contienen uno o más aminoácidos que muestran propiedades citoprotectoras. En una realización de la invención, la composición contiene adicionalmente al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en aspartato, glutamato, serina, histidina, glicina, treonina, arginina, tirosina, metionina, fenilalanina, isoleucina, lisina, ornitina, leucina, valina y alanina. En otra realización, el aminoácido es leucina. En una realización alternativa, el aminoácido es glicina. En otra realización, las composiciones incluyen al menos leucina y alanina. En otra realización, la composición no contiene prolina. En otra realización más, la composición contiene 10% o menos de prolina medida frente a la presencia de otros aminoácidos. Por ejemplo, una mezcla igual de 12 aminoácidos distintos contendría 1 residuo de prolina o menos en esta realización.

Como alternativa, o además de la presencia de aminoácidos individuales, las composiciones y los métodos que utilizan estas composiciones pueden comprender al menos un péptido pequeño tal como, pero no limitado a, un decapeptido. Según se utiliza en la presente memoria, "péptido pequeño" significa una cadena lineal pequeña de

aminoácidos de no más de aproximadamente 25 residuos de longitud. En una realización, los péptidos pequeños utilizados en las composiciones o métodos de la presente invención tienen aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 aminoácidos de longitud. La secuencia real del péptido no es crítica para las composiciones y los métodos de la presente invención, por lo que cualquier cadena peptídica aleatoria será suficiente. Por ejemplo, en una realización, las composiciones y métodos que utilizan estas composiciones pueden comprender al menos un péptido pequeño, en donde el péptido pequeño comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente 80% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO 1: Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys (SEQ ID NO: 1). En una realización, el péptido pequeño no contiene residuos de prolina. En otra realización, el péptido contiene menos de 10% de residuos de prolina en comparación con otros aminoácidos. Por ejemplo, en esta realización específica, un péptido de 12 unidades contendría un residuo de prolina o menos.

En otras realizaciones más, cada uno de los péptidos pequeños comprende independientemente una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1. Los péptidos pequeños que son menos de 100% idénticos a la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1 se consideran variantes de los mismos.

La cantidad de péptido pequeño variará. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada dependiendo de una variedad de factores tales como el sujeto, la duración de la exposición a la radiación, la cantidad de exposición a la radiación, etc. En algunas realizaciones de la invención, la cantidad de péptido pequeño varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM. En una realización, la concentración de uno o más péptidos pequeños comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM del péptido del SEQ ID NO: 1 o variantes de los mismos. En otras realizaciones, la concentración de uno o más péptidos pequeños comprende aproximadamente 15 mM o menos, aproximadamente 14 mM o menos, aproximadamente 13 mM o menos, aproximadamente 12 mM o menos, aproximadamente 11 mM o menos, aproximadamente 10 mM o menos, aproximadamente 9 mM o menos, aproximadamente 8 mM o menos, aproximadamente 7 mM o menos, aproximadamente 6 mM o menos, aproximadamente 5 mM o menos, aproximadamente 4 mM o menos, aproximadamente 3 mM o menos, aproximadamente 2 mM o menos, aproximadamente 1 mM o menos o aproximadamente 0,5 mM o menos del péptido de SEQ ID NO: 1. Por supuesto, la concentración de uno o más péptidos pequeños puede estar entre cualquiera de las concentraciones enumeradas, por ejemplo entre aproximadamente 15 mM y aproximadamente 14 mM, entre aproximadamente 14 mM y aproximadamente 13 mM, entre aproximadamente 13 mM y aproximadamente 12 mM, entre aproximadamente 12 mM y aproximadamente 11 mM, entre aproximadamente 11 mM y aproximadamente 10 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 9 mM, entre aproximadamente 9 mM y aproximadamente 8 mM, entre aproximadamente 8 mM y aproximadamente 7 mM, entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 6 mM, entre aproximadamente 6 mM y aproximadamente 5 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 4 mM, entre aproximadamente 4 mM y aproximadamente 3 mM, entre aproximadamente 3 mM y aproximadamente 2 mM, entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 1 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 0,5 mM, etc. del péptido de SEQ ID NO: 1 o variantes del mismo.

Se entiende que un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos "idéntica" en al menos, por ejemplo, aproximadamente 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, p. ej., SEQ ID NO: 1, significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de aminoácidos puede incluir hasta aproximadamente cinco modificaciones por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un péptido que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos aproximadamente 90% a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta aproximadamente 10% de los residuos de aminoácido de la secuencia de referencia se puede suprimir o sustituir por otro aminoácido o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de aminoácidos de hasta aproximadamente 10% de los aminoácidos totales en la secuencia de referencia. Estas modificaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Según se utiliza en la presente memoria, "identidad" es una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos en comparación con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de referencia. En general, las secuencias están alineadas de modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden. La "identidad" per se tiene un significado reconocido en la técnica y se puede calcular utilizando mecanismos publicados. (Véase, p. ej., Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988)); Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press (1987)); y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York (1991)). Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, el término "identidad" es bien conocido por los expertos en la técnica (Carillo, H. y Lipton, D., Siam J Applied Math 48: 1073 (1988)). Los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994) y Carillo, H. y Lipton, D., Siam J Applied

Math 48: 1073 (1988). Los programas informáticos también pueden contener métodos y algoritmos que calculan la identidad y la similitud. Los ejemplos de los métodos de programas informáticos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(i): 387 (1984)), BLASTP, ExPASy, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215: 403 (1990)) y FASTDB. Se discuten los ejemplos de los métodos para determinar la identidad y la similitud en Michaels, G. y Garian, R., Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

En un aspecto de la presente descripción, el algoritmo utilizado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es BLASTP. En otra realización de la presente invención, el algoritmo utilizado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es FASTDB, que se basa en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencia FASTDB, las secuencias de consulta y de referencia son secuencias amino. El resultado del alineamiento de secuencia está en porcentaje de identidad. Los parámetros que se pueden utilizar en un alineamiento FASTDB de secuencias de aminoácidos para calcular el porcentaje de identidad incluyen, pero no se limitan a: Matriz = PAM, k-tuplo = 2, Penalización de emparejamiento erróneo = 1, Penalización de unión = 20, Longitud de grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización de hueco = 5, Penalización de tamaño de hueco 0.05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia de referencia es más corta o más larga que la secuencia de consulta debido a adiciones o deleciones del extremo N o el extremo C, pero no debido a adiciones o deleciones internas, se puede realizar una corrección manual, porque el programa FASTDB no representa truncamientos o adiciones del extremo N y el extremo C de la secuencia de referencia cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para las secuencias de consulta truncadas en los extremos N o C, en relación con la secuencia de referencia, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia de consulta que son extremos N y C con respecto a la secuencia de referencia que no coinciden/se alinean, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB determinan la coincidencia/alineamiento. El porcentaje de alineamiento se resta a continuación del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje final de identidad. Esta puntuación corregida se puede utilizar para determinar cómo los alineamientos "se corresponden" entre sí, así como el porcentaje de identidad. Los residuos de la secuencia de referencia que se extienden más allá de los extremos N o C de la secuencia de consulta pueden considerarse con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, los residuos que no coinciden/se alinean con los extremos N o C de la secuencia de comparación se pueden contabilizar cuando se ajusta manualmente la puntuación del porcentaje de identidad o la numeración de alineamiento.

Por ejemplo, una secuencia de consulta de 90 residuos de aminoácido se alinea con una secuencia de referencia de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N de la secuencia de consulta y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra una coincidencia/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos no emparejados representan 10% de la secuencia de referencia (número de residuos en los extremos N y C no coincidentes/número total de residuos en la secuencia de referencia), por lo que se resta 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes estuvieran perfectamente emparejados (100% de alineamiento), el porcentaje de identidad final sería del 90% (100% de alineamiento, 10% de saliente no coincidente). En otro ejemplo, una secuencia de consulta de 90 residuos se compara con una secuencia de referencia de 100, excepto que las deleciones son deleciones internas. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente, ya que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia sujeto que no coincidan/se alineen con la consulta. En otro ejemplo más, una secuencia de consulta de 110 aminoácidos se alinea con una secuencia de referencia de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La adición en la consulta se produce en el extremo N de la secuencia de consulta y, por lo tanto, el alineamiento FASTDB puede no mostrar una coincidencia/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Si los 100 residuos de aminoácido restantes de la secuencia de consulta tienen una identidad de 95% con la longitud total de la secuencia de referencia, la adición N-terminal de la consulta se ignoraría y el porcentaje de identidad de la consulta para la secuencia de referencia sería de 95%.

En una realización, las composiciones comprenden adenosina, uridina, leucina, adenina y manganeso. En otra realización, la composición comprende adenosina de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mM y  $MnCl_2$  de aproximadamente 1 a aproximadamente 12,5 mM. En otra realización, la composición comprende un extracto de *D. radiodurans* que contiene uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.

Se puede conservar cualquier función proteica mediante el uso de los métodos de esta invención. En una realización preferida de la invención, la proteína es una enzima. Los métodos de la presente descripción son particularmente útiles para prevenir la oxidación de proteínas asociada con la radiación ultravioleta y el envejecimiento. Además, los métodos también conservan la funcionalidad de la proteína durante la desecación y, por lo tanto, ayudan a aumentar la vida útil de los productos sanguíneos desecados y de los fármacos basados en enzimas, que se almacenan en seco.

Los métodos de la invención conservan óptimamente la función proteica (tal como p. ej., la actividad enzimática) durante la exposición a la radiación. Una realización de la invención es un método de conservación que comprende

poner en contacto una proteína (tal como p. ej., una enzima) con una composición que comprende uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.

5 Otra realización de la invención es un método para aumentar la durabilidad y longevidad de células energéticas microbianas y accionadas por enzimas que comprende poner en contacto los componentes de la célula energética con una composición que comprende uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.

10 Este método puede ser adecuado para preservar la función de muchas proteínas, incluyendo pero no limitadas a proteínas con complejos de Fe-S (tales como enzimas metabólicas) y funciones de reparación enzimática que dependen de agrupamientos redox-activos (4Fe-4S). Las proteínas ilustrativas incluyen grupos proteicos asociados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), precursores de proteínas transportadoras que podrían reducir las demandas biosintéticas y suprimir la producción de ROS, proteínas que defienden contra ROS, proteínas que participan en la reparación de moléculas dañadas (no ADN) y la regulación redox, así como los sistemas dependientes de Mn y Fe. Otras proteínas ilustrativas son enumeradas por Ghosal et al. (2005), en FEMS Microbiology Reviews 29: 361-375.

15 La invención también proporciona métodos para producir vacunas dirigidas contra microorganismos, comprendiendo los métodos cultivar, cosechar y/o suspender el microorganismo en presencia de una composición protectora contra la radiación de la presente invención e irradiar las bacterias con una dosis de radiación suficiente para hacer que el microorganismo sea de replicación deficiente. En una realización, la composición protectora contra la radiación es sintética; en otra realización, la composición protectora contra la radiación es extracto de producto ultrafiltrado de DR.

20 Los métodos de preparación de vacunas son bien conocidos en la técnica. Los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden aplicar a estos métodos de preparación de vacunas bien conocidos, o se pueden utilizar por separado y aparte de los métodos de preparación de vacunas tradicionales. Por ejemplo, una realización de la presente invención proporciona métodos de preparación de vacunas sin modificar genéticamente el microorganismo contra el que se prepara la vacuna. Los métodos descritos en la presente memoria permiten cultivar, recolectar y/o suspender microorganismos normales de tipo salvaje en presencia de las composiciones protectoras contra la radiación, de modo que la estructura tridimensional de las proteínas dentro y de los marcadores de superficie celular sobre los microorganismos se conserva durante una dosis extrema de radiación. La dosis de radiación está diseñada para destruir el genoma del microorganismo de tal manera que el microorganismo sea incapaz de replicarse. Después de dosificar con radiación, las células de replicación deficiente se pueden recolectar y se puede llevar a cabo la preparación de la vacuna utilizando técnicas de preparación de vacunas normales. Las composiciones protectoras de la presente invención conservan al menos una fracción de las proteínas inmunogénicas del microorganismo, de manera que la administración de una vacuna que comprende el microorganismo irradiado a un animal producirá una respuesta inmunogénica. Por lo tanto, los métodos actuales de preparación de vacunas se pueden poner en práctica utilizando técnicas de cultivo celular rutinarias. Los microorganismos contra los que se puede preparar una vacuna utilizando los métodos de la presente invención incluyen bacterias y virus. Los mecanismos de cultivo celular convencionales para bacterias y virus son bien conocidos en la técnica.

40 Por supuesto, los métodos de preparación de vacunas de la presente invención no están limitados a un tipo particular de radiación, con la condición de que el tipo y la dosis utilizados sean capaces de volver el microorganismo de replicación deficiente. Los ejemplos de radiación incluyen, pero no se limitan a, luz UV, radiación alfa, radiación beta, radiación gamma, radiación de rayos X y radiación de neutrones. En una realización, la dosis de radiación es de al menos aproximadamente 20 kGy. La dosis de radiación puede ser superior a 25.000 Gy (25kGy) para mezclas bacterianas y la dosis de radiación puede ser superior a 40.000 Gy (40 kGy) para mezclas virales.

45 La presente descripción también proporciona métodos para hacer que las bacterias en el cultivo sean resistentes a la radiación ionizante (RI), comprendiendo estos métodos cultivar las bacterias en presencia de una composición protectora contra la radiación de la presente invención. Las composiciones protectoras contra la radiación utilizadas en los métodos resistentes a RI de la presente invención comprenden al menos un nucleósido, fosfato, al menos un antioxidante y cualquier captador de radicales de hidroxilo no metabolizables, tales como, pero no limitados a, dimetilsulfóxido (DMSO).

50 La presente descripción también proporciona métodos para tratar o prevenir los efectos de la exposición a la radiación. Los métodos comprenden el tratamiento o la prevención de los efectos de la exposición a la radiación con un agente terapéutico que comprende uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.

55 En una realización de la invención, la exposición a la radiación se debe a la exposición a los rayos UV. En otra realización de la invención, la exposición a la radiación se debe a la radiación ionizante. En otra realización de la invención, la exposición a la radiación es crónica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "agente terapéutico" abarcará composiciones que comprenden uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes, así como formulaciones que contienen otros componentes farmacéuticamente aceptables tales como p. ej. portadores farmacéuticamente aceptables.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "exposición a la radiación" significará la exposición a cualquier radiación en una dosis y durante un período suficiente para causar daño. La exposición a la radiación incluye, pero no se limita a la exposición a la luz UV, la radiación alfa, la radiación beta, la radiación gamma, la radiación de rayos X y la radiación de neutrones.

- 5 En una realización, la descripción proporciona métodos para tratar o prevenir los efectos secundarios de la radioterapia. Según se utiliza en la presente memoria, el término "radioterapia" se referirá al uso de ciertos tipos de energía (tal como *p. ej.*, radiación ionizante) para destruir células cancerosas y reducir tumores. El término "radioterapia" incluye todos los tipos de radioterapia que incluyen, pero no se limitan a, radioterapia externa (tal como *p. ej.*, radioterapia intraoperatoria e irradiación craneal profiláctica (PC)), radioterapia interna (tal como *p. ej.*, radioterapia intersticial, radioterapia intracavitaria o intraluminal), radioterapia sistémica, radiocirugía estereotáctica (o estereotáctica), radioterapia conformada tridimensional (3-D), radioterapia de intensidad modulada (IMRT). Además, el término "radioterapia" también abarca la radioterapia que utiliza una variedad de fuentes de radiación que incluyen, pero no se limitan a, rayos X, rayos gamma, haces de partículas, terapia con haces de protones y radiación de fotones de alta energía. La radioterapia se utiliza para tratar una variedad de cánceres, incluidos los tumores sólidos (tales como *p. ej.*, cánceres de cerebro, mama, cuello uterino, laringe, pulmón, páncreas, próstata, piel, columna vertebral, estómago, útero o sarcomas de tejidos blandos). La radioterapia también se utiliza para tratar la leucemia y el linfoma (es decir, cánceres de las células hematopoyéticas y del sistema linfático, respectivamente), así como los cánceres de la piel, el cuello uterino y tiroideos.

- 20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "efectos secundarios de la radioterapia" se referirá a cualquier efecto secundario experimentado por un sujeto sometido a radioterapia. Tales efectos secundarios incluyen, pero no se limitan a, cansancio y reacciones en la piel, anemia, aumento del riesgo de hematomas o sangrado, disminución de la fertilidad, sequedad de boca, pérdida de apetito y peso, pérdida de cabello, etc.

- 25 Un "sujeto que necesita tratamiento" es un animal con una infección bacteriana que puede ser potencialmente mortal o que deteriora la salud o acorta la vida del animal. El animal puede ser un pez, un ave o un mamífero. Los mamíferos ilustrativos incluyen seres humanos, animales domesticados (*p. ej.*, vacas, caballos, ovejas, cerdos, perros y gatos) y animales de exhibición, *p. ej.*, en un zoológico. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" utilizados en la presente memoria se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

- 30 Según se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se pretende que el término composición abarque, y no se limite a, composiciones farmacéuticas y composiciones nutraceuticas que contienen uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes. La composición también puede contener uno o más "excipientes" que son "ingredientes inactivos" o "compuestos" desprovistos de actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad o para afectar a la estructura o cualquier función del cuerpo humano.

Un componente "farmacéuticamente aceptable" es aquel que es adecuado para su uso en seres humanos, animales y/o plantas sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como *p. ej.*, toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una razón beneficio/riesgo razonable.

- 40 El agente terapéutico puede contener cualquier nucleósido. Los nucleósidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, adenosina, uridina,  $\beta$ -pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas. En una realización, el nucleósido es adenosina y/o uridina. En una realización, el agente terapéutico contiene adenosina. En otra realización de la invención, el agente terapéutico contiene uridina.

- 45 El agente terapéutico puede contener una variedad de antioxidantes adecuados, que se han descrito en la presente memoria. Por ejemplo, los antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, manganeso, vitamina E, y fosfato manganoso, Mn-péptidos, Mn-aminoácidos (*p. ej.*, Leucina), Mn-TRIS, Mn-melanina, Mn-cafeína, Mn-ribosa, Mn-trehalosa, Mn-ácido dipicolínico, Mn-fosfato y Mn-bicarbonato. En una realización de la invención, el antioxidante del agente terapéutico es manganeso. En otra realización, el antioxidante es  $MnCl_2$ . En otra realización más, el antioxidante consiste en uno o más péptidos.

- 50 En una realización de la invención, un antioxidante crítico es el fosfato manganoso, que se puede proporcionar a concentraciones casi milimolares. En otra realización, el antioxidante es  $MnCl_2$ , con fosfato agregado por separado. El fosfato puede o no ser ortofosfato. La cantidad de antioxidante en la composición varía según su uso. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada. En una realización, la composición contiene de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM de los iones manganosos (Mn(II)) y también fosfato de 1 mM a aproximadamente 25 mM.

- 55 La cantidad de nucleósido y antioxidante en el agente terapéutico varía. Los expertos en la técnica podrán determinar la cantidad adecuada dependiendo de una variedad de factores tales como el sujeto, la duración de la exposición a la radiación, la cantidad de exposición a la radiación, etc. En algunas realizaciones de la invención, la cantidad de nucleósido varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 0,1

- 5 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM. En una realización, la concentración de uno o más nucleósidos comprende de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM de adenosina y/o uridina. En otra realización, la cantidad de antioxidante varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 15 mM. En otra realización, el agente terapéutico contiene de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 12,5 mM.
- El agente terapéutico puede contener adicionalmente uno o más aminoácidos que exhiben propiedades citoprotectoras. En una realización de la invención, el agente terapéutico contiene adicionalmente al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en leucina, valina y alanina. En otra realización, el aminoácido es leucina. En otra realización, el aminoácido es glicina.
- 10 En una realización, el agente terapéutico comprende adenosina, uridina, leucina, adenina y manganeso. En una realización alternativa, el agente terapéutico comprende adenosina de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM y MnCl<sub>2</sub> de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 12,5 mM. En otra realización, el agente terapéutico comprende un extracto de *D. radiodurans* que contiene uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.
- En otra realización más, el agente terapéutico es una composición adecuada para su uso en seres humanos que comprende uno o más nucleósidos (tales como p. ej., adenosina, uridina, β-pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas), uno o más antioxidantes (tales como p. ej., manganeso, péptidos y vitamina E) y opcionalmente uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en leucina, valina y alanina. En una realización, la composición adecuada para su uso en seres humanos comprende adenosina y manganeso.
- 15 En una realización alternativa, el agente terapéutico es un extracto de *D. radiodurans* que contiene uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes.
- Los métodos para tratar o prevenir los efectos de la exposición a la radiación comprenden la administración de un agente terapéutico que comprende uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes a un sujeto que lo necesite.
- Una realización es un método para prevenir un efecto secundario de la radioterapia, que comprende la administración de un extracto de *D. radiodurans* que comprende uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes a un sujeto que lo necesite.
- 25 Otra realización es un método para prevenir un efecto secundario de la radioterapia que comprende la administración de una composición que comprende uno o más nucleósidos, un antioxidante y opcionalmente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, valina y leucina a un sujeto que lo necesite. Preferiblemente, los uno o más nucleósidos son adenosina y/o uridina, que pueden estar presentes en cantidades de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM de adenosina y/o uridina. Los uno o más nucleósidos también se pueden seleccionar del grupo que consiste en adenosina, uridina, β-pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas. El antioxidante puede ser manganeso (p. ej. de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 12,5 mM). En una realización, el antioxidante es MnCl<sub>2</sub>. En otra realización, el antioxidante consiste en uno o más péptidos. En otra realización, la composición comprende adenosina, uridina, leucina, adenina y manganeso.
- 30 Los métodos de la presente solicitud son particularmente ventajosos. Comparadas con los radioprotectores bien establecidos (tales como p. ej. amifostina), las composiciones que comprenden uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes (p. ej., adenosina, uridina, péptidos y Mn) son relativamente no tóxicas.
- Los métodos son particularmente adecuados para tratamientos previos y posteriores a la exposición de personal militar y civiles expuestos accidental o deliberadamente a la radiación ionizante.
- 40 Los métodos también se pueden utilizar profilácticamente para personas expuestas a niveles crónicos significativos de radiación, tal como en plantas de energía nuclear, durante un vuelo espacial de larga duración o en la estación espacial internacional.
- Una "cantidad segura y eficaz" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir la respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) acorde con una razón beneficio/riesgo razonable cuando se utiliza en la forma de esta invención. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un componente eficaz para producir una respuesta terapéutica deseada, p. ej., una cantidad eficaz para ralentizar la tasa de división celular bacteriana, o para causar el cese de la división celular bacteriana, o para causar la muerte o disminuir la tasa de crecimiento de la población de la bacteria. La cantidad segura y eficaz específica o la cantidad terapéuticamente eficaz variará con factores tales como la afección particular que se trata, la condición física del sujeto, el tipo de sujeto que se trata, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si existiera), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.
- 50 Los medios de aplicación incluyen, pero no se limitan a, medios directos, indirectos, de transporte y especiales o cualquier combinación de medios. La aplicación directa del fago puede ser mediante pulverizaciones nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, empaquetamientos nasales, pulverizaciones e inhaladores bronquiales, o indirectamente a través del uso de grageas para la garganta, o mediante el uso de
- 55

enjuagues bucales o gárgaras, o mediante el uso de ungüentos aplicados a las fosas nasales, el puente de la nariz o la cara o cualquier combinación de estos y métodos de aplicación similares. Las formas en las que se puede administrar el fago incluyen, pero no se limitan a, grageas, trociscos, caramelos, inyectables, gomas de mascar, comprimidos, polvos, pulverizaciones, líquidos, ungüentos y aerosoles.

- 5 El agente terapéutico también se puede colocar en una pulverización nasal, en donde la pulverización nasal es el portador. La pulverización nasal puede ser una pulverización de liberación prolongada o controlada, y se puede fabricar por medios bien conocidos en la técnica. También se puede utilizar un inhalante, de modo que el agente terapéutico pueda llegar más abajo en el tracto bronquial, incluso a los pulmones.

- 10 El agente terapéutico se puede agregar a estas sustancias en una forma líquida o en un estado liofilizado, después de lo cual se solubilizará cuando se encuentre con los fluidos corporales tales como la saliva. La enzima también puede estar en una micela o liposoma.

Si bien estos métodos se pueden utilizar en cualquier especie de mamífero, tal como los animales de granja, que incluyen, pero no se limitan a, caballos, ovejas, cerdos, pollos y vacas, el uso preferido de las composiciones es para un ser humano.

- 15 Las tasas o cantidades de dosificación eficaces de las composiciones dependerán en parte de si la composición se utilizará terapéutica o profilácticamente, de la duración de la exposición del receptor a la radiación, del tipo de radiación, del tamaño y el peso del individuo, etc. La duración del uso de la composición también depende de si el uso es para fines profilácticos, en donde el uso puede ser por hora, por día o por semana, durante un corto período de tiempo, o de si el uso es para fines terapéuticos en donde puede ser necesario un régimen más intensivo de uso
- 20 de la composición, de modo que el uso puede durar horas, días o semanas, y/o diariamente, o en intervalo de tiempo durante el día. Cualquier forma de dosificación empleada debe proporcionar un número mínimo de unidades durante un tiempo mínimo. La concentración de las unidades activas del fago que se cree que proporciona una cantidad o dosificación eficaz de fagos puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 100.000 unidades/ml de fluido en el entorno húmedo o mojado de los conductos nasales y orales,
- 25 y posiblemente en el intervalo de aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 10.000 unidades/ml. Más específicamente, la exposición temporal a la radiación puede influir en la concentración deseada de unidades de composición radioprotectora activa por ml. Se debe señalar que los portadores que se clasifican como portadores de liberación "larga" o "lenta" (tales como, por ejemplo, ciertas pulverizaciones nasales o grageas) podrían poseer o proporcionar una menor concentración de la composición por ml, pero durante un período de tiempo más
- 30 prolongado, mientras que un portador de liberación "corta" o "rápida" (tal como, por ejemplo, una gárgara) podría poseer o proporcionar una alta concentración de composición por ml, pero durante un período de tiempo más corto. Se apreciará además que los expertos en la técnica pueden determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición particular con la debida consideración de los factores pertinentes para el sujeto.

- 35 Un experto en la técnica puede determinar la selección de la dosis eficaz preferida (p. ej., a través de pruebas clínicas) basándose en la consideración de varios factores que serán conocidos por los expertos en la técnica. Tales factores incluyen la enfermedad a tratar o prevenir, los síntomas implicados, la masa corporal del paciente, el estado inmunológico del paciente y otros factores conocidos por el experto en la técnica para reflejar la precisión de las composiciones farmacéuticas administradas.

- 40 La dosis precisa que se vaya a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración y se debe decidir de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

- 45 Para el tratamiento profiláctico y terapéutico y/o la prevención de los efectos de la exposición a la radiación, las composiciones que comprenden nucleósidos y antioxidantes también se pueden aplicar por medios directos, indirectos, portadores y medios especiales o cualquier combinación de medios. La aplicación directa del fago puede ser mediante pulverizaciones nasales, gotas nasales, ungüentos nasales, lavados nasales, inyecciones nasales, empaquetamientos nasales, pulverizaciones e inhaladores bronquiales, o indirectamente a través del uso de grageas en la garganta, o mediante el uso de enjuagues bucales o gárgaras, o mediante el uso de ungüentos aplicados a las fosas nasales, el puente de la nariz o la cara o cualquier combinación de estos y métodos de aplicación similares.
- 50 Las formas en las que se puede administrar el fago incluyen, pero no se limitan a, grageas, trociscos, caramelos, inyectables, gomas de mascar, comprimidos, polvos, pulverizaciones, líquidos, ungüentos y aerosoles. Para el tratamiento terapéutico del ántrax, las pulverizaciones y los aerosoles bronquiales son los más beneficiosos, ya que estos portadores, o los medios de distribución de la composición, permiten que el fago llegue a los tubos bronquiales y los pulmones.

- 55 Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica o bucal. Por ejemplo, un agente se puede administrar localmente a un sitio de lesión mediante microinfusión. Alternativamente, o al mismo tiempo, la administración puede ser por vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si existiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

En una realización, el método comprende la administración del agente terapéutico en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 2005, Mack Publishing Co. Típicamente, se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable incluyen líquidos tales como solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. La formulación también puede comprender un polvo liofilizado. Otros portadores incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas, liposomas o micropartículas. Resultará evidente para los expertos en la técnica que ciertos portadores pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la ruta de administración y de la concentración del inhibidor de citoquina proinflamatoria que se administre.

Los métodos proporcionan de forma óptima agentes terapéuticos contra numerosas formas de lesión celular relacionadas con redox, mediadas por daño de proteínas, y facilitan la cicatrización de heridas.

Una realización es un método de preparación de extractos de productos ultrafiltrados de *D. radiodurans* libres de células que exhiben propiedades radioprotectoras. En una realización, los métodos comprenden cosechar *D. radiodurans*, p. ej., por medio de centrifugación, lisar el cultivo de *D. radiodurans* para crear un producto lisado, lavar el producto lisado de *D. radiodurans* seguido por centrifugación del producto lisado durante un tiempo y en condiciones suficientes para crear un sobrenadante. Después de la centrifugación, el sobrenadante se hace pasar a través de un microfiltro, preferiblemente un microfiltro de 3 kiloDalton, y se hierve durante un período de tiempo adecuado. En una realización, el sobrenadante se hierve durante aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos después de la filtración. El extracto de *D. radiodurans* resultante contiene uno o más nucleósidos y uno o más antioxidantes, es soluble en butanol, resistente a la ebullición y está libre de células.

En una realización, el extracto contiene adenosina y manganeso. En otra realización, el extracto contiene adenosina y/o uridina manganeso. Los extractos celulares también pueden contener leucina, alanina y/o valina. En una realización, el extracto de *D. radiodurans* contiene al menos adenosina, uridina, leucina, adenina y manganeso.

Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, elaborar y utilizar la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no se deben interpretar como limitantes de ninguna manera del resto de la descripción.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - Preparación de extracto de *D. radiodurans* libre de proteínas

Se hizo crecer *D. radiodurans* (ATCC BAA-816) hasta una DO 600 de 0,9 en TGY, se cosechó por centrifugación y se lisó mediante tratamiento con una prensa French. Las células se lavaron y a continuación se lisaron en agua estéril desionizada y de doble destilación (dH<sub>2</sub>O). Antes de la lisis, la densidad celular se ajustó con dH<sub>2</sub>O para producir productos lisados que representaban aproximadamente 50% de la concentración intracelular. Los extractos celulares brutos se centrifugaron durante 20 horas a 175.000 x g. El sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro centrífugo Microcon <3 kiloDalton (Millipore, USA) y se hirvió durante 30 minutos. Se utilizó el análisis de proteínas de Coomassie (Bradford) para confirmar la ausencia virtual de proteínas en los extractos ultra purificados, que se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C.

#### Ejemplo 2-Análisis de extracto de *D. radiodurans* libre de proteína

Los extractos celulares ultrafiltrados se prepararon a partir de *D. radiodurans* (ATCC BAA-816), *P. putida* (ATCC 47054), *E. coli* (MG1655), y *T. thermophilus* (ATCC BAA-163). M. E. Maguire proporcionó *E. coli* (MM1925, cepa K12) de tipo salvaje y su mutante *mntH* isogénico (MM2115). *D. radiodurans recA-* (rec30) y *E. coli recA-* (DH10B) son conocidos en la técnica. La línea de células T Jurkat fue ATCC TIB-152. Los productos ultrafiltrados de DR, PP, EC y TT se prepararon a partir de bacterias desarrolladas como cultivos discontinuos en medio TGY a la misma densidad óptica a 600 nm (0,9; fase logarítmica). Para la producción a gran escala del producto filtrado de DR utilizado en los estudios de radioprotección de *E. coli* y células T Jurkat, el crecimiento de alta densidad celular de *D. radiodurans* estaba en un fermentador de 20 L. Las células se abrieron mediante un pase a través de una prensa French. En el siguiente orden, se centrifugaron los productos lisados bacterianos a 12.000 x g (1 h, 4°C); los sobrenadantes se normalizaron para determinar la concentración sobre una base de proteína y se ultracentrifugaron a 190.000 x g (48 h, 4°C); y los sobrenadantes ultracentrifugados se sometieron a filtración a través de filtros de 3 kDa. Los productos ultrafiltrados se hirvieron durante 40 min, se concentraron 5 veces y se almacenaron a -80°C. La composición química de los productos ultrafiltrados de DR, PP, EC y TT se determinó como sigue: Mn y Fe en un espectrómetro de absorción atómica modelo 4100ZL de Perkin Elmer; fosfato inorgánico mediante análisis con verde malaquita; bases, nucleósidos y nucleótidos mediante HPLC; actividad proteasa con azocaseína como sustrato; y aminoácidos mediante derivatización previa a la columna implementada por Agilent Technologies.

#### Ejemplo 3 - Efectos radioprotectores en *E. coli*

Se determinaron, individualmente y combinadas, las propiedades radioprotectoras de  $Mn^{2+}$ , fosfato, uridina y DMSO utilizando *E. coli* desarrollada en medio TGY; TGY es un medio rico en péptidos basado en extracto de levadura, y contiene Mn aproximadamente 200 nM. En 3 kGy, la complementación de TGY con  $Mn^{2+}$  1  $\mu$ M no aumentó la resistencia de *E. coli*; la complementación de TGY con fosfato 13 mM aumentó la resistencia de *E. coli* 800 veces; y la complementación de TGY con uridina 3 mM o DMSO 384 mM (3%) aumentó la resistencia de *E. coli* 50 veces. Cuando estos agentes se combinaron a concentraciones aplicadas individualmente, la supervivencia de *E. coli* expuesta a 3 kGy se incrementó 10.000 veces.

Ejemplo 4 Complejo de péptido  $Mn^{2+}$  reconstituido:

El complejo de  $Mn^{2+}$ -decapéptido-fosfato extremadamente radioprotector se basa en una secuencia de aminoácidos consenso (H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH) (SEQ ID NO: 1) de cientos de péptidos purificados de *D. radiodurans*. La composición de la mezcla que forma espontáneamente el complejo con  $Mn^{2+}$  comprende (H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH) (SEC ID NO: 1) 3 mM,  $MnCl_2$  1 mM, tampón ortofosfato (Pi) 25 mM (pH 7,4). Cuando se reconstituyeron *in vitro*, los complejos de  $Mn^{2+}$  preservaron la actividad de las enzimas expuestas a 50.000 Gy. Los estudios con los decapeptidos han demostrado que es la composición de aminoácidos del decapeptido, no la secuencia específica de aminoácidos, la que es crítica para sus propiedades radioprotectoras cuando se combina con  $Mn^{2+}$  y tampón ortofosfato. No es necesario limitar los péptidos a 10 aminoácidos, sino que estén compuestos por los aminoácidos específicos presentes en el decapeptido anterior.

Ejemplo 5 - Aplicación de complejos de *D. radiodurans*  $Mn^{2+}$  reconstituidos para la producción de vacunas irradiadas.

Se sometió a ensayo la irradiación de bacterias utilizando los métodos descritos en la presente memoria y se validó a 40.000 Gy utilizando el modelo del virus bacteriófago Lambda (Figura 5). El ADN se preparó a partir de bacteriófago  $\lambda$  irradiado tratado o no con el complejo de  $Mn^{2+}$  (Mn-pep-Pi): (H-Asp-Glu-His-Gly-Thr-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH) (SEC ID NO: 1) 3 mM,  $MnCl_2$  1 mM, tampón ortofosfato (Pi) 25 mM (pH 7,4). A las dosis de rayos gamma indicadas (0-40 kGy), se purificó ADN (genoma de 48,5 kpb) del bacteriófago  $\lambda$ , se sometió a electroforesis en gel de agarosa convencional, y a continuación a transferencia Southern con una sonda de ADN de  $\lambda$  radiomarcada. Como se muestra en la Figura 5A, el complejo de  $Mn^{2+}$  no protege significativamente el ADN empaquetado en virus.

Las mismas preparaciones de bacteriófago  $\lambda$  que se examinaron en la Figura 5A se sometieron a ensayo para determinar la integridad de la proteína separando las proteínas del virus utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida. Como se muestra en la Figura 5B, las proteínas en los virus que fueron irradiados en ausencia del complejo de  $Mn^{2+}$  fueron progresivamente destruidas. Por el contrario, las proteínas en las muestras de virus que contenían el complejo de  $Mn^{2+}$  no se vieron afectadas por dosis tan altas como 40 kGy.

A 40.000 Gy, una dosis que anulaba el ADN del virus (véase la Figura 5A) y volvía el virus completamente no infeccioso, las proteínas del virus permanecían siendo completamente inmunogénicas. Esto se sometió a ensayo mediante análisis Western, por medio del cual las proteínas de  $\lambda$  se sensibilizaron con anticuerpos producidos en conejos contra el fago  $\lambda$  no irradiado. Se obtuvo un resultado positivo idéntico para la inmunogenicidad para transferencias Western equivalentes sondeadas con anticuerpos producidos contra el fago  $\lambda$  expuesto a 40.000 Gy en presencia del complejo de  $Mn^{2+}$ . Por el contrario, el fago  $\lambda$  expuesto a 40.000 Gy en ausencia del complejo de  $Mn^{2+}$  no produjo anticuerpos en conejos que tenían una especificidad significativa para el bacteriófago  $\lambda$  nativo.

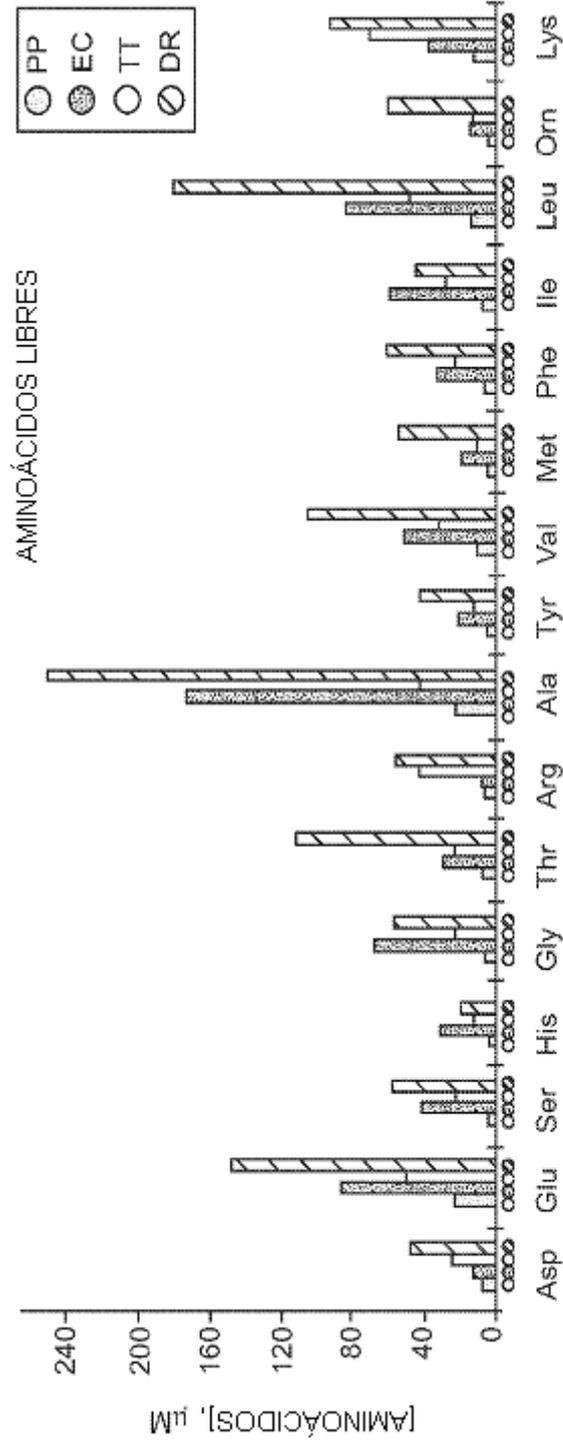
El enfoque también se sometió a ensayo con éxito sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* patógena (Figura 6). Por el contrario, los virus y bacterias expuestos a dosis supraletales de RI sin los complejos de  $Mn^{2+}$  dieron como resultado una pérdida sustancial de la integridad del epítipo viral y la pérdida de inmunogenicidad.



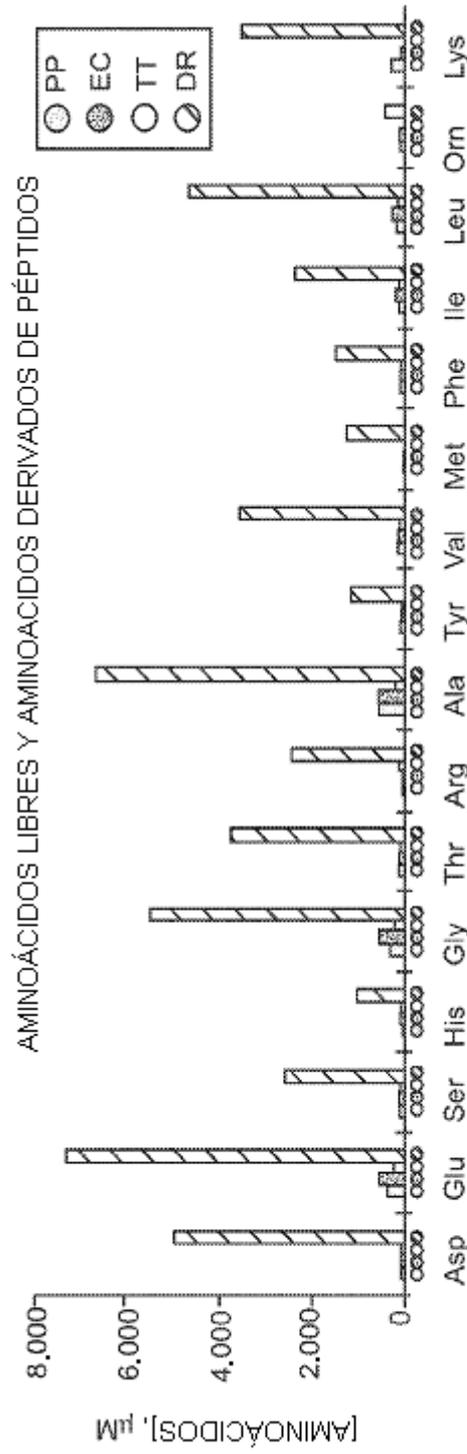
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una vacuna dirigida contra un microorganismo, comprendiendo el método
  - a) cultivar, cosechar, y/o suspender el microorganismo en presencia de una composición protectora contra la radiación, comprendiendo la composición ortofosfato de manganeso divalente y aminoácidos que comprenden Aspartato, Glutamato, Histidina, Glicina, Treonina, Alanina, Valina, Metionina, Leucina, Lisina o un deca péptido de los mismos, y opcionalmente al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en adenosina, uridina,  $\beta$ -pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas,
  - b) irradiar el microorganismo en presencia de la composición protectora contra la radiación con una dosis de radiación ionizante suficiente para hacer que el microorganismo se vuelva de replicación deficiente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la radiación se selecciona del grupo que consiste en luz UV, radiación alfa, radiación beta, radiación gamma, radiación de rayos X y radiación de neutrones.
3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la composición comprende un deca péptido.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la dosis de radiación ionizante es al menos aproximadamente 20 kGy.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el microorganismo es una bacteria.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el microorganismo es un virus.
7. Un método para producir un microorganismo de replicación deficiente, comprendiendo el método (i) cultivar, cosechar y/o suspender el microorganismo en un entorno acuoso en presencia de una composición protectora contra la radiación, comprendiendo la composición ortofosfato de manganeso divalente, al menos un nucleósido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en adenosina, uridina,  $\beta$ -pseudouridina, inosina y mezclas de las mismas, y un deca péptido que comprende los aminoácidos aspartato, glutamato, histidina, glicina, treonina, alanina, valina, metionina, leucina, lisina y (ii) irradiar el microorganismo con una dosis de radiación ionizante en presencia de la composición en el entorno acuoso, siendo la dosis de radiación ionizante suficiente para hacer que el microorganismo se vuelva de replicación deficiente.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el microorganismo es una bacteria o un virus.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el al menos un nucleósido es adenosina y uridina.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la concentración del al menos un nucleósido es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 15 mM.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en donde el deca péptido tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 1.
12. El método de la reivindicación 7, en donde la concentración de manganeso divalente es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 12,5 mM.
13. El método de las reivindicaciones 11 ó 12, en donde el manganeso divalente está en una forma seleccionada del grupo que consiste en  $MnCl_2$  y fosfato manganoso.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en donde el microorganismo es *Staphylococcus*.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la composición comprende adicionalmente un producto ultrafiltrado de *D. radiodurans*.

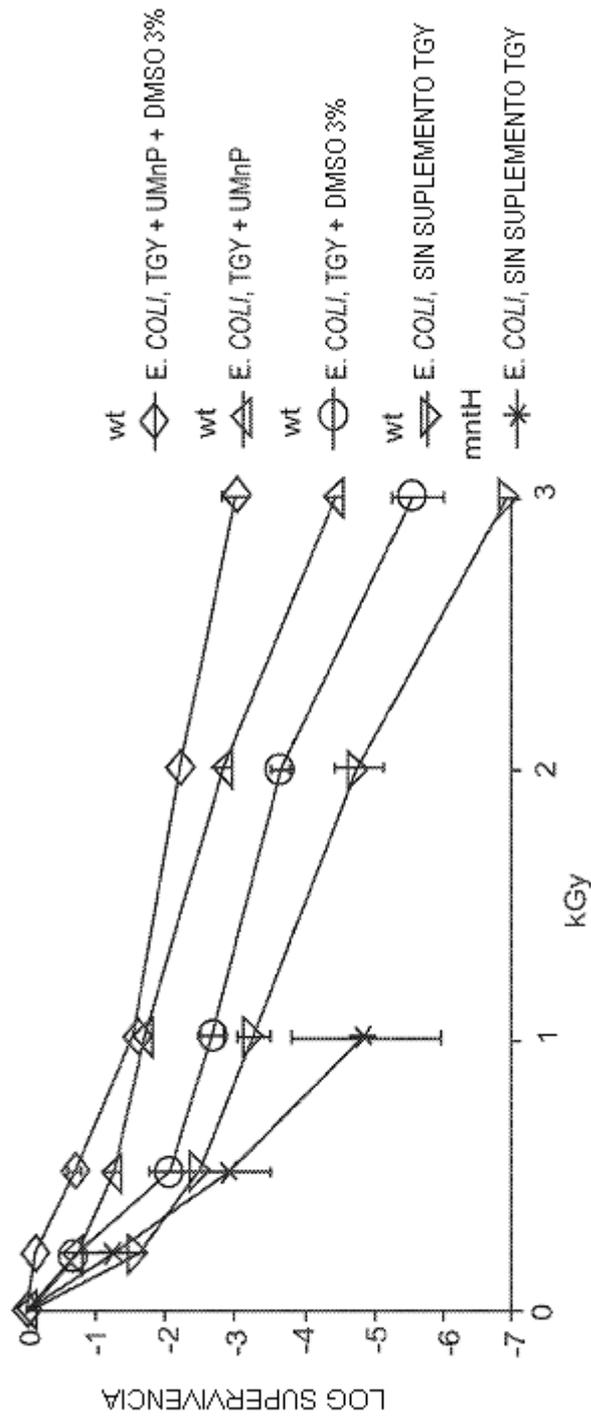




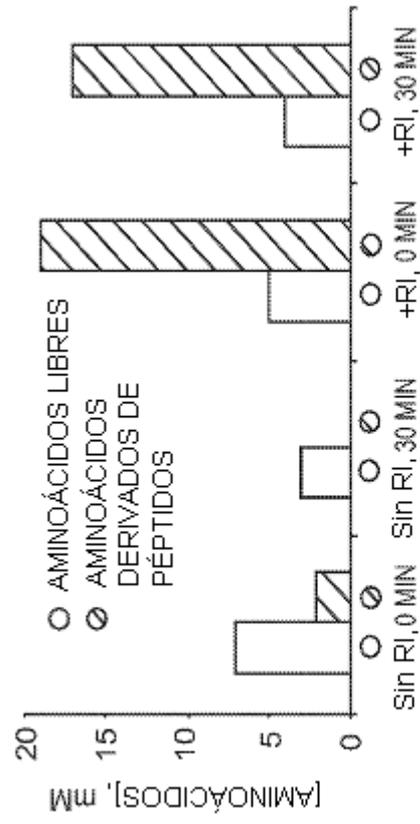
**FIG. 2a**



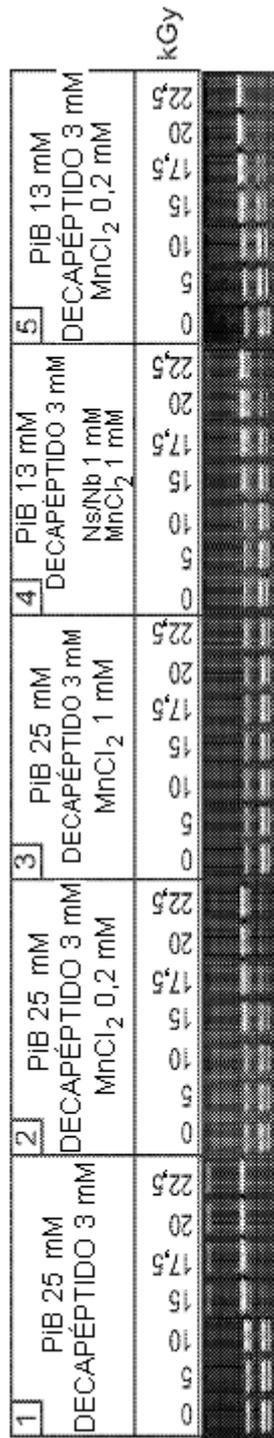
**FIG. 2b**



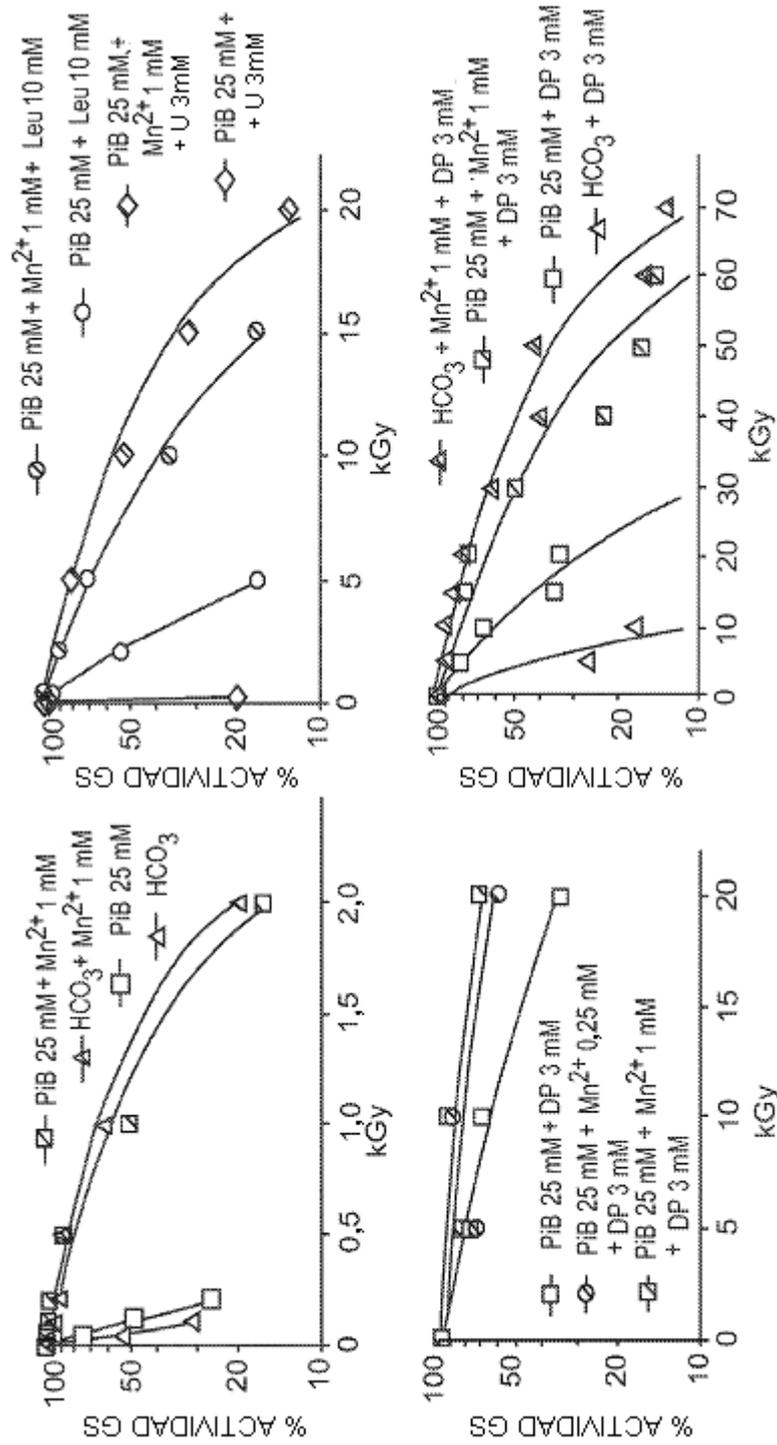
**FIG. 3**



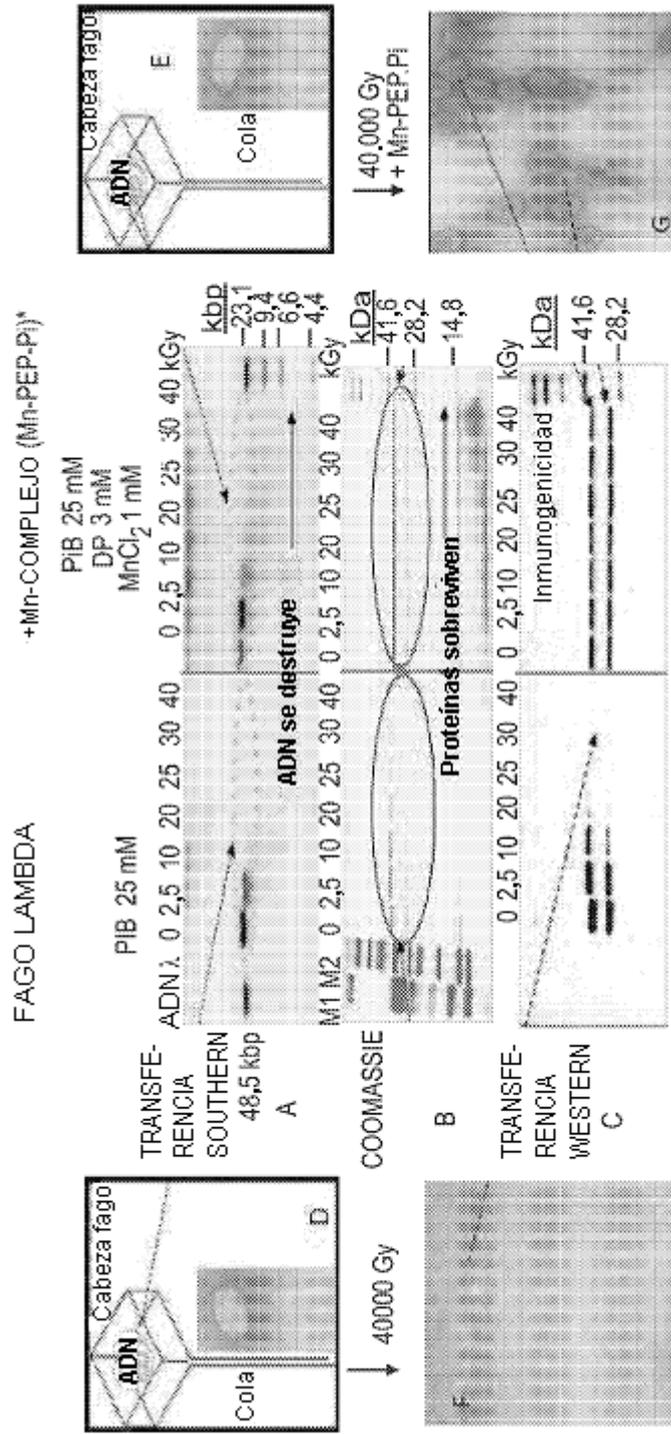
**FIG. 4a**



**FIG. 4b**



**FIG. 4C**



\*PEPTIDO (PEP)= (H-Asp-Glu-His-Gly-Trp-Ala-Val-Met-Leu-Lys-OH); Pi = ORTOFOSFATO

GRUPO	DÍA 1	DÍA 13	DÍA 28
IRS + PBS	MRSA NO PROTEGIDO, IRRADIADO ( $10^8$ UFC) EN PBS	MRSA NO PROTEGIDO, IRRADIADO ( $10^8$ UFC) EN PBS	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
IRS_CFA	MRSA NO PROTEGIDO, IRRADIADO ( $10^9$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA NO PROTEGIDO, IRRADIADO ( $10^9$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
HK + PBS	MRSA DESTRUIDO CALOR ( $10^8$ UFC) EN PBS	MRSA DESTRUIDO CALOR ( $10^8$ UFC) EN PBS	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
LIVE	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
HK + CFA	MRSA DESTRUIDO CALOR ( $10^8$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA DESTRUIDO CALOR ( $10^8$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
DPM IRS + PBS	MRSA IRRADIADO PROTEGIDO PEPTIDO ( $10^9$ UFC) EN PBS	MRSA IRRADIADO PROTEGIDO PEPTIDO ( $10^9$ UFC) EN PBS	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
DPM IRS + CFA	MRSA IRRADIADO PROTEGIDO PEPTIDO ( $10^8$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA IRRADIADO PROTEGIDO PEPTIDO ( $10^8$ UFC) EN 1 mg/mL CFA	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX
NO SOMETIDO A TRATAMIENTO PREVIO	NADA	NADA	MRSA VIVO ( $10^7$ UFC) EN PBS + ESFERAS CYTODEX

**FIG. 6**

