

LIPOSOMAS CON BACTERIÓFAGOS ENCAPSULADOS

CAMPO DE LA INVENCION

- [1] La presente invención se relaciona con el campo de las formulaciones cosméticas, específicamente se ubica en el ámbito de las composiciones de liposomas que encapsulan agentes de interés. Más particularmente, la divulgación se relaciona con una formulación de liposomas para uso dérmico que contiene bacteriófagos como agentes encapsulados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [2] El acné es una enfermedad de la piel que causa inflamación crónica de las unidades pilosebáceas, aumento en la cantidad de sebo producido, enrojecimiento en el área afectada y lesiones en la piel. La enfermedad es clasificada en inflamatoria y no-inflamatoria; el acné inflamatorio se caracteriza por la presencia de pápulas y pústulas, ambas elevaciones de piel que se diferencian por la presencia de pus en las pústulas; por su parte, en el acné no inflamatorio únicamente hay presencia de comedones, los cuales se suelen denominar espinillas. Con frecuencia la enfermedad se presenta en frente, mejillas, mentón, espalda y hombros debido a que en estas zonas es donde se acumula mayor cantidad de grasa por la presencia de glándulas sebáceas. Además de las lesiones producidas en la piel, el acné puede causar depresión, ansiedad, estrés emocional y rechazo social en quienes la sufren.
- [3] El acné es una enfermedad multicausal; se ha descrito que la interacción entre un aumento en la producción de sebo, la hipercornificación de ductos, la colonización de la bacteria *Propionibacterium acnes* y la respuesta del sistema inmune son los causantes del acné. La producción de sebo es significativamente mayor en pacientes con acné debido a una hiperestimulación de las glándulas sebáceas, lo que ocasiona taponamiento de los poros y permite la proliferación de bacterias que requieren una alta concentración de lípidos. La hipercornificación ductal se caracteriza por la proliferación de queratinocitos en el canal folicular, el cual conecta las glándulas sebáceas con la superficie de la piel; al ocurrir dicha proliferación, se taponan los poros por la acumulación de sebo y se originan los comedones.

- [4] *Propionibacterium acnes* es una bacteria gram positiva y anaeróbica aerotolerante. *P. acnes* hace parte de la microbiota normal de la cavidad oral, el intestino grueso, la conjuntiva y, sobretudo, la piel. Se ha reportado que dicha bacteria es el microorganismo más abundante en la microbiota de las unidades pilosebáceas de la piel humana, correspondiendo a un 87% del total de clones encontrados. La colonización de *P. acnes* en las glándulas sebáceas se ha relacionado con la producción de acné debido a que ésta bacteria puede inducir la activación de la respuesta inmune del paciente ocasionando inflamación. Existe evidencia de que hay un incremento significativo en la presencia de *P. acnes* en la piel durante la pubertad, lo cual coincide con la etapa en la que comúnmente se desarrolla el acné en una persona; además, se ha reportado que los adolescentes que presentan acné tienen aproximadamente cien veces más carga microbiana de *P. acnes* en su piel que jóvenes sin ésta enfermedad.
- [5] El tratamiento del acné depende de la intensidad y la extensión de la enfermedad en el paciente; en el 60% de los casos los pacientes responden a terapias en las que se combinan diferentes tratamientos durante un lapso corto debido a la multiplicidad de factores involucrados con la enfermedad; en el porcentaje restante, la enfermedad se presenta como crónica prologándose su tratamiento hasta por más de diez años. Los tratamientos para la enfermedad incluyen formulaciones que deben ser prescritas por un médico, por ejemplo, retinoides o antibióticos, y también formulaciones OTC (*over the counter*), los cuales son productos que no necesitan de fórmula médica para su adquisición en el comercio.
- [6] Los antibióticos son un tratamiento convencional prescrito contra el acné. Los antibióticos al disminuir la carga microbiana de *P. acnes* también reducen drásticamente la respuesta inflamatoria; además, se ha reportado que los antibióticos presentan una actividad antiinflamatoria directa debido a que inhiben la fagocitosis y disminuyen la producción de moléculas antiinflamatorias que eliciten la respuesta inmune. Entre los antibióticos más comúnmente recetados hoy en día se encuentran la clindamicina, eritromicina y la tetraciclina por tener efectos bacteriostáticos sobre *P. acnes* evitando su multiplicación. Dentro de los efectos secundarios de dichos antibióticos se encuentran la aparición de eritemas, resequedad y ardor en la zona afectada. El peróxido de benzoilo es otro antimicrobiano empleado en el tratamiento que libera radicales libres dentro de las glándulas sebáceas oxidando las proteínas de la membrana celular y matando a la bacteria; se suelen emplear combinaciones entre éste compuesto y antibióticos debido a que se aumenta la eficacia en el tratamiento y se evita

resistencia bacteriana. El peróxido de benzoilo puede generar dermatitis y causar manchas en la piel.

- [7] La resistencia a los antibióticos por parte de *P. acnes* ha aumentado en los últimos años. En 1979 se realizó el primer reporte de resistencia por parte de la bacteria a la eritromicina y clindamicina en un 20% de las cepas estudiadas. Para el año de 1996 la resistencia aumentó a un 69%, y para el año 2001 se reportó que en España y Grecia la resistencia a la eritromicina y clindamicina fue del 91% y 92.4%, respectivamente (Luk, M., Hui, H., Lee, L., Fu, Z.H., Liu, L.Y., Lam, M. *et al.* (2013) Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 27, 31–36). En Colombia sólo se ha realizado un estudio de la resistencia de *P. acnes* a los antibióticos convencionales en el tratamiento. Se obtuvo que del total de cepas aisladas el 35% fueron resistentes a eritromicina, el 15% a clindamicina y el 9% a doxicilina (Mendoza, N., Hernandez, PO., Tyring, SK., Haitz, KA & Motta, A. (2013) Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *Int J Dermatol*, 52(6), 688-92).
- [8] Dada la resistencia bacteriana, se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas que puedan reemplazar a los antibióticos en el tratamiento integral contra el acné y otras infecciones. La fagoterapia surge como un método alternativo a los antibióticos debido a que ataca y disminuye la carga bacteriana mediante el uso de bacteriófagos (o fagos, ambos términos usados indiscriminadamente en el presente documento), virus que infectan bacterias. Históricamente, la fagoterapia ha demostrado ser una alternativa eficiente para el control y tratamiento de un amplio rango de infecciones bacterianas. Cabe resaltar que los virus empleados en fagoterapia deben tener un mecanismo replicativo lítico; así, los virus con ciclo lítico reconocen receptores específicos de las bacterias, insertan su material genético, se replican dentro del huésped usando su maquinaria celular, generan una nueva progenie y finalmente lisan la célula. Los fagos temperados, los cuales llevan a cabo el ciclo lisogénico, no son deseados en fagoterapia pues a diferencia de los líticos, éstos insertan su material genético en el cromosoma bacteriano, lo cual puede conducir eventos de conversión lisogénica no deseados.
- [9] La fagoterapia presenta diversas ventajas al compararse con la terapia con antibióticos: 1) Al aplicarse en el sitio de la infección el número de fagos crece exponencialmente, permitiendo

que esta terapia tenga mayor efecto. Los antibióticos, en cambio, van perdiendo su efecto a lo largo del tiempo. 2) Debido a que los fagos tienen capacidad de mutar, se puede retardar la resistencia que la bacteria podría desarrollar hacia ellos mediante la elaboración de mezclas o cócteles; en cambio, los antibióticos al tener las mismas moléculas activas siempre, quedan inservibles cuando una bacteria desarrolla resistencia frente a estos. 3) El tratamiento con bacteriófagos no genera efectos secundarios nocivos para humanos, animales ni plantas, mientras que los antibióticos pueden causar alergias, desórdenes intestinales, infecciones secundarias y otros múltiples efectos adversos. 4) Seleccionar y producir un nuevo fago es un procedimiento relativamente rápido y económico; por el contrario, el desarrollo de un antibiótico toma años. 5) Los fagos son altamente específicos; lo anterior resulta en un aspecto ventajoso debido a que se limita el tratamiento a la bacteria problema, causante de la infección, sin afectar la microbiota normal.

[10] A partir de estudios reportados en el estado de la técnica relacionados con bacteriófagos de *Propionibacterium acnes*, se ha descrito que éstos tienen un amplio rango de hospedero dentro de la especie, es decir, que logran infectar diferentes cepas de *P. acnes*, pero un rango de hospedero reducido en género, significando que no logran infectar satisfactoriamente bacterias que no pertenecen a la especie *P. acnes*. Además, a los mencionados fagos no se les han encontrado genes involucrados con la formación de lisógenos estables, tales como integrasas, que permitirían la integración del material genético a la bacteria (no deseado en la fagoterapia). Ambos resultados resultan positivos para el uso de éstos fagos en fagoterapia.

[11] La patente con número de referencia EP1907534 A1, incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad, enseña un bacteriófago capaz de lisar *P. acnes* e incapaz de infectar bacterias diferentes a *P. acnes* y mantener lisogenia en una bacteria huésped.

[12] El uso de fagos de *P. acnes* en fagoterapia conduce a la necesidad de asegurar que el bacteriófago llegue efectivamente al sitio donde se encuentra la bacteria en la piel. Para las personas con experticia en el tema, es conocido que *P. acnes* se encuentra en un mayor grado en el fondo de los folículos pilosebáceos de la piel, resultando este un ambiente de difícil acceso para los bacteriófagos debido a sus limitaciones de movimiento. Asimismo, al estar compuestos únicamente de proteínas y ácidos nucleicos, los fagos pueden ser fácilmente

degradados en el ambiente, debido a la acción de metabolitos que pueden encontrarse normalmente en la piel. Por consiguiente, para que los fagos logren llegar exitosamente a su célula huésped se hace necesario el uso de un agente transportador o de entrega, como, por ejemplo, los liposomas.

[13] Los liposomas son estructuras formadas por lípidos organizados en una bicapa que rodea un medio acuoso, en el cual se pueden encapsular diferentes tipos de agentes. Para su elaboración se pueden utilizar lípidos sintéticos o naturales, o mezclas de ellos, los cuales forman una capa que rodea el agente. Con el fin de asegurar que el agente sea encapsulado se debe controlar la concentración de lípidos en la solución y su afinidad por el agente. Por un lado, la concentración del lípido debe ser tal que permita la formación de las bicapas lipídicas y que sea suficiente para recubrir el agente en la solución. Por otro lado, para aumentar la probabilidad de formación de las estructuras lamelares alrededor de los agentes a encapsular, se debe incluir un lípido afín a ellos. Asimismo, es conveniente la inclusión de lípidos que estabilicen la membrana liposomal y/o reduzcan su interacción con agentes externos que puedan degradar el liposoma o hacerlos blanco para el sistema inmune del organismo. Durante la preparación de los liposomas se hace una mezcla entre los lípidos, ya sean secos o disueltos en un solvente, con un medio acuoso para la obtención de estructuras multilamelares, con tamaño del orden de micras. Luego, estas estructuras son sometidas a procesos mecánicos, como sonicación o extrusión, con el fin de reducir y homogenizar su tamaño.

[14] Los liposomas han sido ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y de cosméticos con el fin de entregar la sustancia activa al sitio específico de acción, potencializando la efectividad y eficiencia del tratamiento. Los liposomas también son capaces de penetrar la piel, la cual es una barrera natural que limita el acceso de la mayoría de medicamentos. Además, los liposomas son estructuras cuyas propiedades fisicoquímicas pueden ser moduladas con cambios en su composición con el fin de incrementar su afinidad por un tejido en particular y su habilidad para liberar los fagos.

[15] La publicación de patente de Estados Unidos N°. US5834016 A propone la utilización de liposomas encapsulando vitamina D y sus derivados, como calcitrol, para el tratamiento tópico de trastornos de la piel. Por otro lado, la publicación de patente de Estados Unidos N°. US20110081402 A1 divulga una metodología que incluye colágeno sobre la

superficie liposomal para fines cosméticos. Los liposomas producto de tal invención mejoran la afinidad del colágeno a la piel, incrementando el tiempo de permanencia sobre esta, sin que la estructura terciaria de la proteína se pierda, y por lo tanto, manteniéndose activa por más tiempo.

- [16] A partir de lo anterior, existe una necesidad en el arte por nuevas composiciones de aplicación dérmica que contengan como agentes activos bacteriófagos encapsulados en liposomas, ya que estos últimos, además de facilitar la entrega de los fagos, también mantendrían su estabilidad.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

- [17] El objeto de la presente invención es proponer una composición que comprende bacteriófagos encapsulados en liposomas para su aplicación en piel. Lo anterior permite combinar la acción de los bacteriófagos para infectar bacterias patógenas con la capacidad que tienen los liposomas para transportar y entregar su contenido.

- [18] En un aspecto de la presente invención, la composición comprende bacteriófagos específicos contra un huésped particular como por ejemplo, y sin limitarse a, contra *Propionibacterium acnes*.

- [19] En otro aspecto de la presente invención, la composición de los liposomas comprende DC-colesterol (DC-CHO), colesterol (CHO), polietilenglicol (PEG) y fosfatidilcolina (PC).

- [20] En una realización preferente de la presente invención, la proporción de la mezcla de DC-CHO:CHO:PEG:PC es de 40:10:3:47 mol, respectivamente.

- [21] En un aspecto preferente de la invención, los liposomas son unilamelares, tienen un diámetro de entre 0.2 a 2 μm y un potencial Z positivo.

- [22] En un aspecto preferente de la invención, los liposomas son multilamelares, pueden tener un diámetro de entre 0.2 a 2 μm y un potencial Z positivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- [23] En la Figura 1 se proporciona una imagen ilustrativa de la morfología de uno de los bacteriófagos de la presente invención (Fago Pa.1), obtenida mediante microscopía de transmisión electrónica.
- [24] En la Figura 2 se muestra la estabilidad de los bacteriófagos de la presente invención a tres diferentes temperaturas a lo largo de 1 mes, según se detalla en el Ejemplo 3 del presente documento.
- [25] En la Figura 3a se muestra la eficiencia de encapsulación de los bacteriófagos de la presente invención en liposomas catiónicos, según se detalla en el Ejemplo 6 del presente documento.
- [26] En la Figura 3b se proporciona una imagen ilustrativa de la encapsulación de los bacteriófagos de la presente invención en los liposomas, obtenida mediante microscopía de fluorescencia. La línea punteada delimita el liposoma mientras los puntos claros señalados por las flechas indican la posición de los fagos o agregados de los mismos en las vesículas.
- [27] En la Figura 4 se muestra la eficiencia de encapsulación de fagos de *Salmonella* sp. en los liposomas catiónicos de la presente invención, según se detalla en el Ejemplo 7 del presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

(por convención, y a menos que se indique lo contrario, todas las secuencias se presentan en sentido 5'-3')

Identificador de la secuencia	Descripción de la secuencia
SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.1 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 2	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.2 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 3	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.3 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 4	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.4 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 5	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.5 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 6	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.6 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 7	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.7 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 8	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.8 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 9	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa. 9 contra <i>Propionibacterium acnes</i>
SEQ ID NO: 10	Secuencia de nucleótidos del bacteriófago Pa.10 contra <i>Propionibacterium acnes</i>

DEFINICIONES

- [28] A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases tienen los significados que se describen a continuación. Las definiciones no tienen por objeto ser de naturaleza limitativa, y sirven para proporcionar un mejor entendimiento de ciertos aspectos de la presente invención.
- [29] Agente activo: Según su uso en el presente documento, es un compuesto o molécula que cuenta con una actividad o fin específico.
- [30] Bacteriófago o fago: Según su uso en el presente documento el término hace referencia a virus que tienen como blanco cepas o especies de bacterias específicas.
- [31] Ciclo lítico: Según su uso en el presente documento, un virus presenta ciclo lítico cuando finaliza con la lisis de la bacteria infectada, es decir, mata la bacteria infectada.
- [32] Ciclo lisogénico: Según su uso en el presente documento, el ciclo lisogénico es aquél en el que el material genético del fago es insertado en el genoma bacteriano sin que haya lisis inmediata.
- [33] Encapsulación: Según su uso en el presente documento, es el proceso de formación de liposomas en las condiciones adecuadas para que su membrana rodee o ancle uno o más bacteriófagos.
- [34] Fagos encapsulados: Según su uso en el presente documento, los fagos encapsulados corresponden a los bacteriófagos que se encuentran presentes dentro de los liposomas.
- [35] Fagos no encapsulados: Según su uso en el presente documento, los fagos no encapsulados hacen referencia a los bacteriófagos que no son encapsulados y quedan en la solución donde los liposomas se encuentran inmersos.

- [36] Fagos totales: Según su uso en el presente documento, los fagos totales indican el número total de fagos que se encuentran tanto dentro como fuera de los liposomas. Así, los fagos totales son la suma de los fagos encapsulados y los fagos no encapsulados.
- [37] Formulación: Según su uso en el presente documento, es un compuesto químico, composición o mezcla que tiene una aplicación cosmética o terapéutica.
- [38] Liposoma: Según su uso en el presente documento, el término hace referencia a una bicapa lipídica con un núcleo acuoso donde se pueden encapsular agentes terapéuticos activos.
- [39] Porcentaje de encapsulación: Tal y como es usado en el presente documento, el porcentaje de encapsulación se basa en los resultados del recuento de placas de lisis tanto del tratamiento de liposomas con bacteriófagos como del tratamiento de liposomas con bacteriófagos incubados con tritón. Ambos tratamientos permiten establecer, respectivamente, tanto la cantidad de fagos no encapsulados como la cantidad de fagos totales, siendo posible así determinar el porcentaje de fagos que fueron encapsulados.
- [40] Rango de hospedero: Tal y como es usado en el presente documento, dicha medición indica el espectro de infectividad de un bacteriófago contra una colección de bacterias testeadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- [41] La presente invención revela una composición de aplicación dérmica que comprende bacteriófagos encapsulados en liposomas; donde estos últimos brindan una mayor eficiencia de encapsulamiento, facilitan la entrega de los fagos y mantienen su estabilidad.
- [42] Los liposomas de la presente invención se componen de DC-colesterol (DC-CHO), colesterol (CHO), polietilenglicol (PEG) y fosfatidilcolina (PC).
- [43] En cuanto a los componentes de los liposomas aquí divulgados, el DC-colesterol (DC-CHO) es un lípido catiónico monovalente que aumenta la probabilidad de formación de

las bicapas alrededor del agente a encapsular, en este caso fagos. El colesterol (CHO) es un lípido neutro que estabiliza la membrana del liposoma y que permite manipular su fluidez. El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrófilo no iónico que (1) evita la agregación de liposomas durante su almacenaje, (2) protege de cambios químicos que ocurren en el ambiente cuando se suministran en la piel, (3) evita la respuesta del sistema inmune evadiendo los macrófagos ya que disminuye la interacción de los liposomas con las opsoninas. Finalmente, la fosfatidilcolina (PC) es un lípido zwitteriónico que mantiene la integridad de la membrana reduciendo la interacción entre lípidos cargados.

[44] En una realización preferente de la presente invención, la proporción de la mezcla de DC-CHO: CHO:PEG:PC es de 40:10:3:47 mol, respectivamente.

[45] En un aspecto preferente de la invención, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares y pueden poseer un diámetro de entre 0.2 a 2 μm con un potencial Z positivo.

[46] La composición de la presente invención se caracteriza por producir liposomas con carga catiónica, los cuales brindan una mayor eficiencia de encapsulamiento a partículas con carga negativa; tales como el ADN o los bacteriófagos. Por consiguiente, en la presente invención se emplea una formulación de liposomas catiónicos que permite, preferencialmente, la encapsulación de partículas negativas, tales como los bacteriófagos.

[47] Los bacteriófagos que comprende la presente invención se caracterizan por ser específicos hacia cepas de una especie bacteriana determinada. Particularmente, los bacteriófagos de la presente invención se caracterizan por infectar bacterias relacionadas con patologías de la piel, por ejemplo, y sin carácter limitante, *Propionibacterium acnes*.

[48] En un aspecto de la invención, se divulga una composición de liposomas catiónicos que encapsula bacteriófagos, los cuales son capaces de lisar una variedad de cepas para las cuales son específicos.

[49] En un aspecto preferente de la presente invención, los bacteriófagos encapsulados en los liposomas corresponden a bacteriófagos contra *Propionibacterium acnes*.

- [50] Un objeto de la invención es reducir o prevenir la colonización de posibles bacterias causantes de infecciones en la piel como, por ejemplo, y sin limitarse a, *Propionibacterium acnes*.
- [51] Otro objeto de la invención es prevenir o mejorar los síntomas asociados con enfermedades de la piel que involucran bacterias, como por ejemplo, y sin limitarse a, el acné.
- [52] Otro objeto de la invención es el suministro tópico de los bacteriófagos encapsulados en liposomas catiónicos.
- [53] En otro aspecto de la invención, la composición que comprende los bacteriófagos encapsulados en liposomas catiónicos puede formularse y suministrarse en formas farmacéuticas tópicas tales como, y sin limitarse a, cremas, aguas micelares, geles, ungüentos, spray, lociones o pastas.
- [54] En otro aspecto de la invención, la composición puede comprender uno o más bacteriófagos diferentes dentro de los liposomas.
- [55] En una realización de la invención, la composición comprende uno o más bacteriófagos contra diferentes hospederos, donde dichos hospederos se relacionan con enfermedades bacterianas de la piel.
- [56] En otra modalidad de la invención, la composición puede comprender al menos un bacteriófago en una cantidad efectiva para reducir o prevenir la colonización de posibles bacterias causantes de infecciones en la piel como, por ejemplo, y sin limitarse a, *Propionibacterium acnes*.
- [57] En otro aspecto, los liposomas de la presente invención pueden además encapsular uno o más moléculas como se prefieran, como por ejemplo, antibióticos, vitaminas, antioxidantes, humectantes, protectores UV, fragancias entre otros productos farmacéuticos y/o cosméticos.

EQUIVALENCIAS Y ALCANCE

[58] Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de confirmar tan solo por medios de experimentos de rutina, muchos equivalentes de las formas de realización específicas de conformidad con la invención que se describe en el presente documento.

[59] Debe comprenderse que las palabras que se han utilizado son palabras descriptivas más que limitativas, y que se pueden realizar cambios dentro del ámbito de las reivindicaciones anexadas sin que por ello se aparte el verdadero alcance de la invención en su aspecto más amplio.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Rango de hospedero de bacteriófagos de *P. acnes*

[60] Para determinar la especificidad de los diez bacteriófagos de *P. acnes* aislados, se les estableció su rango de hospedero. En el estudio fueron empleadas 11 cepas de *Propionibacterium acnes* y seis cepas de bacterias comensales de la piel, de diferentes géneros. Se realizaron cultivos overnight (ON) a 37°C de las bacterias en Caldo Nuevo (Tryptona 1.5%, Extracto de levadura 0.5%, Brain-Heart Infusion 0.5%, Glicerol 1%, NaCl 0.2%, K₂HPO₄ 0.2% L-Cisteína HCl 0.03%, Tween 80 0.025% y Purpura de Bromocresol 0.002%) y se plaquearon mediante la técnica de doble agar con agar soft Nuevo (0.25%) en medio Agar Nuevo al 1.5%. Los fagos fueron diluidos en buffer SM y 5 µL (spot) de cada dilución fueron agregados sobre las placas. Finalmente, se dejaron secar los spots y se incubaron un día a 37°C en cámara de CO₂ al 5%. Para determinar la especificidad se tuvo en cuenta si el fago fue capaz de infectar la cepa.

[61] La Tabla 1 permite evidenciar los resultados obtenidos para el rango de hospedero de los fagos de *P. acnes*. Los 10 fagos aislados tienen un amplio rango de hospedero dentro del género y especie *Propionibacterium acnes* debido a que son capaces de infectar la totalidad de cepas de *P. acnes* muestreadas. A su vez, los fagos no fueron capaces de infectar otras cepas comensales de la piel, diferentes a *P. acnes*. Dicha característica resulta positiva en el marco de la fagoterapia, debido a que gracias a la alta especificidad de los fagos de *P. acnes*,

otras bacterias que hacen parte de la microbiota normal de la piel no resultarían afectadas tras la aplicación de la terapia.

Tabla 1. Rango de hospedero fagos de *P. acnes*

Bacteria	Bacteriófago									
	Pa.1	Pa.2	Pa.3	Pa.4	Pa.5	Pa.6	Pa.7	Pa.8	Pa.9	Pa.10
<i>P. acnes</i> 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. acnes</i> ATCC 11827	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. koseri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dermacoccus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) El bacteriófago infectó la cepa

(-) El bacteriófago no infectó la cepa

Ejemplo 2. Microscopia TEM

[62] Para caracterizar los bacteriófagos de *P. acnes* que fueron previamente aislados y a los cuales se les determinó su rango de hospedero (Ejemplo 1), se procedió a visualizarlos mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el fin de establecer su morfología y la familia a la cual pertenecen. 50 uL de fagos en una concentración de 10E09 PFU/mL fueron posicionados en una rejilla Formvar cubierta con carbono, las muestras fueron dejadas secar durante 3 minutos y posteriormente fueron cubiertas en una solución de ácido fosfotúngstico durante 2 minutos con el fin de teñir negativamente las muestras. La rejilla fue observada mediante un microscopio de transmisión electrónica modelo JEOL 1400 plus.

[63] En la Figura 1, a modo ejemplarizante, es posible evidenciar la morfología del Fago Pa.1 mediante el uso del microscopio de transmisión electrónica, el cual fue previamente caracterizado por rango de hospedero en el Ejemplo 1. A partir de la figura, es posible establecer que dicho fago pertenece a la familia Siphoviridae, cuenta con una cápside y una cola no contráctil. El tamaño aproximado de la cola de dicho fago es de 140 nm en longitud y el tamaño de las cabezas es de 50 nm en diámetro. Cabe notar que los diez fagos aislados, tras ser analizados mediante la misma técnica, demostraron pertenecer a la misma familia.

Ejemplo 3. Secuenciación

[64] El ADN de los 10 bacteriófagos purificados y concentrados fue extraído mediante el método de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1). Los genomas fueron secuenciados mediante las tecnologías Ion Torrent™ e Illumina MiSeq (250 pb paired-end). A las lecturas obtenidas por cualquiera de las dos plataformas de secuenciación se les realizó un control de calidad FastQC y una limpieza mediante Trimmomatic v.0.32. Los genomas de los fagos Pa.1, Pa.5, Pa.6, Pa.7 y Pa.8 fueron ensamblados de novo mediante el Software Spades v.3.5.0. En cuanto a los fagos restantes, Pa.2, Pa.3, Pa.4, Pa.9 y Pa.10, se realizó un proceso de mapeo de los contigs obtenidos tras el ensamblaje de novo contra el genoma del bacteriófago Pa.1 mediante el software Geneious 11.1.4. En la sección ‘BREVE DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS’ se relaciona la secuencia del genoma de cada bacteriófago con su respectivo identificador.

Ejemplo 4. Estabilidad de fagos de *P. acnes* en Buffer Hepes

- [65] De acuerdo con la guía de la FDA “Expiration Dating and Stability Testing for Human Drug Products” es necesario determinar si un producto puede mantenerse a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones sin perder sus características intrínsecas. En el caso particular, se evaluó si los bacteriófagos permanecían estables en el buffer Hepes (NaCl 145 mM, HEPES 20 mM, pH 7,40) a largo del tiempo y en diferentes condiciones de temperatura. Para este fin, se hace referencia al documento: “Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products”, S. Marx (editor), Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) y The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), Bruselas, 2004.
- [66] A 1 mL de buffer Hepes se incorporaron fagos de *P. acnes* en una concentración de 10E08 UFP/mL en una relación de 1% v/v. La mezcla se agitó a 200 rpm durante 60 min para permitir una homogenización completa. Los experimentos fueron realizados por duplicado y como control se emplearon muestras del buffer Hepes sin bacteriófago. Las diferentes mezclas de buffer Hepes-Fago fueron puestas en temperaturas de 4, 25 y 37 °C durante un período de un mes. Se determinó el título viral a los 0, 8, 15 y 30 días.
- [67] En el día 0 la medición fue realizada una hora después de haber sido incorporado el fago. Para estimar el título viral se tomó cada vial que estuvo almacenado en alguna temperatura de las previamente mencionadas, se homogeneizó y se le realizaron diluciones seriadas. Posteriormente, se procedió a plaquear un cultivo de 16 horas de *P. acnes* mediante la técnica de doble agar con agar soft Nuevo (0.25%) en el medio Agar Nuevo al 1.5%. Pasados 30 min, se agregaron 5 µL de cada dilución sobre las placas. Finalmente, se dejaron secar los *spots* y se incubaron un día a 37°C en cámara de CO₂ al 5%. A las 48 horas, se determinó el título viral de la muestra.
- [68] En la Figura 2 se evidencia la estabilidad de los fagos de *P. acnes* a tres diferentes temperaturas a lo largo de 1 mes. Puede ser notado que en las temperaturas de 4 y 25°C, y al mes de ser incorporado en el buffer, el bacteriófago no presenta cambios significativos en su título viral. Este resultado permite establecer que el buffer Hepes resulta ser un buen candidato para el almacenamiento de fagos de *P. acnes*.

Ejemplo 5. Preparación de liposomas catiónicos encapsulando fagos de *P. acnes*

[69] La mezcla de lípidos DC-CHO/CHO/PEG/PC (40:10:3:47 mol) se prepara en presencia de solventes orgánicos, los cuales son evaporados para obtener una capa de lípido seco. Los lípidos son hidratados utilizando una solución de fagos suspendida en buffer, agua o un solvente adecuado, en el caso del presente ejemplo se empleó buffer Hepes; posteriormente, la mezcla es agitada para separar el lípido del recipiente que lo contiene y permitir la formación de las vesículas multilamelares.

Ejemplo 6. Visualización de liposomas catiónicos encapsulando fagos de *P. acnes*

[70] Con el fin de visualizar la encapsulación de los fagos en los liposomas se utilizó microscopía de fluorescencia. Para ello, durante el proceso de elaboración de los liposomas se incluyó DiI para teñir los liposomas (1% mol), una sonda fluorescente lipofílica que se inserta en la membrana liposomal, y DAPI (27 uM), una sonda fluorescente que se intercala en las cadenas de ADN, para teñir los fagos (10E08 UFP /ml) previo a la elaboración de los liposomas. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti, usando dos canales de fluorescencia (uno para detectar DAPI y otro para detectar DiI) con una magnificación de 40X, y procesadas usando el software NIS Elements.

[71] En la Figura 3b se observa la imagen de fluorescencia obtenida para los bacteriófagos encapsulados en vesículas multilaminares. La línea punteada delimita el liposoma mientras los puntos claros señalados por las flechas indican la posición de los fagos o agregados de los mismos en las vesículas.

Ejemplo 7. Eficiencia de encapsulación de fagos de *P. acnes* en liposomas catiónicos.

[72] Con el fin de medir el porcentaje de encapsulación de fagos de *P. acnes* en liposomas se determinó la concentración de fagos totales en la mezcla y de fagos no encapsulados, de tal forma que a partir de la ecuación E.1 es posible conocer el porcentaje de encapsulación tal como se describe en el documento: Colom, J., Cano-Sarabia, Otero, J., et al.. (2015). Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp. Applied and Environmental Microbiology 81 (14): 4841-49.

$$\%Encapsulacion = \frac{(Fagos\ totales - Fagos\ no\ encapsulados) * 100\%}{Fagos\ totales}$$

E.1

[73] Los fagos fueron encapsulados utilizando el método de hidratación. Una mezcla de lípidos DC-CHO, CHO, PEG, y PC (40:10:3:47 mol) fue obtenida a partir de stocks de cada lípido disuelto en cloroformo para obtener un total de 3 umoles de lípido. El cloroformo fue evaporado utilizando nitrógeno gaseoso hasta obtener una capa de lípido seco, el cual fue liofilizado por 6 horas. El lípido seco fue hidratado con 1 ml de fagos de *P. acnes* en buffer Hepes (10E07 UFP/ml). El lípido con los fagos fue sometido a agitación por un minuto y luego fue incubado bajo agitación a 37 °C y 200 rpm durante 24 a 27 horas. En estas condiciones el lípido se desprende totalmente del recipiente que lo contiene y se auto-ensambla formando los liposomas. Todo el proceso fue realizado en condiciones de esterilidad.

[74] Una vez preparados los lípidos, se realizaron los siguientes tratamientos para evaluar el porcentaje de encapsulación: (1) Los lípidos con 40% de lípido catiónico fueron hidratados con 1mL de fago de *P. acnes* e incubados por 20-24 h a 37°C y 200rpm. (2) Los lípidos con 40% de lípido catiónico fueron hidratados con 1mL de fago de *P. acnes* e incubados por 20-24 h a 37°C y 200rpm; transcurrido éste tiempo se agregó tritón al 2% a la mezcla de fagos con lípidos para determinar la cantidad de fagos totales encapsulados en los liposomas. (3) Como control, los lípidos con 40% de lípido catiónico fueron hidratados con 1mL de buffer Hepes e incubados por 20-24 h a 37°C y 200rpm. Todos los tratamientos mencionados anteriormente fueron realizados por triplicado.

[75] La forma para determinar el porcentaje de fago encapsulado fue a partir del método de plaqueo por *spot* en doble capa de agar de la siguiente manera: en agar *soft* (caldo nuevo: 15g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/L BHI, 10 ml glicerol, 2g/L NaCl, 2g/L K₂HPO₄, 0,39 g/L L-Cisteina HCl, 0,25ml/L Tween 80) y 0.25% de agarosa M8, se agregan 100 ul de un cultivo de 16 h de *P. acnes*. Éste se agrega sobre una caja de agar nuevo al 1.5% de agar bacteriológico. Una vez se ha solidificado el agar *soft*, se agregan 5ul de diluciones seriadas de cada tratamiento. Estas cajas fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C por 48 h.

Posterior, se realiza el conteo de Unidades Formadoras de placa (UFP) por mililitro (Figura 3).

[76] En la Figura 3 la barra negra indica el título viral, en UFP/mL, de los fagos totales en la solución, es decir, los fagos encapsulados más los no encapsulados que se encuentran en la solución. La barra gris indica el título viral, en UFP/mL, de los fagos de *P. acnes* que fueron encapsulados por los liposomas. A partir de la mencionada Figura 3 se puede evidenciar que más del 80% de los fagos de *P. acnes* fueron encapsulados en la composición de liposomas que contenía lípido catiónico al 40%.

Ejemplo 7. Eficiencia de encapsulación de fagos de *Salmonella* sp. en liposomas catiónicos.

[77] Siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 6, se evaluó la eficiencia de encapsulación de fagos de *Salmonella* sp. usando la composición de liposomas descrita previamente. En la Figura 4 es posible evidenciar que el porcentaje de encapsulación para fagos de *Salmonella* sp., usando una composición catiónica al 40%, fue de aproximadamente 50%. Dado este resultado, y teniendo en cuenta que *Salmonella* sp. es una bacteria gram negativa mientras que *Propionibacterium acnes* es gram positiva, es posible evidenciar que la composición de la presente invención permite la encapsulación de fagos contra una diversidad de huéspedes.