

FAGO FUNCIONALIZADO PARA TRATAMIENTO DE ACNÉ

CAMPO TÉCNICO

5

La presente divulgación se refiere al campo general de la fagoterapia, particularmente a la fagoterapia aplicada para el tratamiento del acné y más particularmente al uso de un fago funcionalizado con moléculas farmacológicamente activas, con propiedades de interés para el tejido objetivo para el tratamiento del acné. El fago funcionalizado de la presente divulgación tiene la ventaja adicional de dirigir las moléculas activas al tejido específico colonizado por bacterias.

ANTECEDENTES

15 El acné es una afección de la piel en la que se presenta obstrucción de los folículos pilosos, esto ocurre debido a 4 factores fisiopatológicos: infección por *Cutibacterium acnes*, inflamación, sobreproducción de sebo e hiperqueratosis. El tratamiento de la enfermedad involucra emplear antibióticos orales (tetraciclinas, eritromicina), retinoides sistémicos (isotretinoína) o los antiandrógenos (espironolactona) en mujeres con acné de origen hormonal. También puede incluir el uso de medicamentos tópicos como peróxido de benzoilo, ácido salicílico, retinoides tópicos como la tretinoína o el adapaleno, así como antibióticos tópicos como la clindamicina o la eritromicina. En algunos casos, sin embargo, la efectividad del tratamiento puede variar debido a la complejidad propia de la enfermedad y las diferencias individuales en cada persona, teniendo en cuenta que uno de los factores clave en el tratamiento es la adherencia al mismo. Esta última se afecta principalmente por los efectos adversos de los medicamentos empleados.

Existen publicaciones que describen diferentes fagos funcionalizados, por ejemplo, el documento "*Phage-Guided Targeting, Discriminated Imaging and Synergistic Killing of Bacteria by AIE Bioconjugates*" (He X, et al. 2020. Phage-Guided Targeting, Discriminative Imaging, and Synergistic Killing of Bacteria by AIE Bioconjugates. J. Am. Chem. Soc. 2020;142(8):3959-3969 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.9b12936>) divulga fagos funcionalizados con luminógenos con propiedad de emisión inducida por agregación que son activos en la inactivación fotodinámica para generar un tipo de

bioconjugado con capacidad para la obtención de imágenes dirigidas y para la destrucción sinérgica de ciertas especies bacterianas. Los bioconjugados que se divulgan en este documento tienen la capacidad de generar una orientación heredada del bacteriófago que les permite reconocer específicamente a la bacteria objetivo, además se describen como
5 potentes fotosensibilizadores *in situ* que producen especies reactivas de oxígeno de alta eficiencia bajo irradiación de luz blanca, lo cual logra la selección selectiva y eliminación de bacterias sensibles a los antibióticos y multirresistentes.

Adicionalmente, la patente US2014/0030697A1 se refiere a métodos, reactivos y kits para
10 la funcionalización de proteínas presentes en la superficie de partículas virales, por ejemplo, de bacteriófagos, usando reacciones de transpeptidación mediadas por sortasa. También divulga métodos para la conjugación de un agente, por ejemplo, un marcador detectable, un agente de unión, un identificador de química de clic o una molécula pequeña con una proteína de superficie de una partícula viral. Asimismo, esta patente
15 menciona kits que comprenden reactivos útiles para la generación de partículas virales funcionalizadas, al igual que proteínas precursoras que comprenden un fragmento de reconocimiento de sortasa y partículas virales que comprenden tales proteínas precursoras, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas virales que comprenden un fragmento de reconocimiento de sortasa y vectores de expresión que comprenden tales
20 ácidos nucleicos.

Sin embargo, persiste la necesidad de desarrollar una alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas que ofrezca ventajas sobre los tratamientos tradicionales, es decir, que no genere efectos adversos a nivel sistémico los cuales pueden
25 comprometer la calidad de vida de los pacientes y que adicionalmente logre la reducción de la carga bacteriana sin crear resistencia antimicrobiana. Específicamente aún existe la necesidad de generar alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas como el acné, cuyo tratamiento actual está basado en moléculas de tipo retinoides orales, que a pesar de tener una buena actividad en la disminución de la seborrea y limitar la
30 proliferación de sebocitos y queratinocitos, tiene diversos efectos secundarios. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos enfoques para el tratamiento del acné los cuales pueden estar basados en fagos funcionalizados con moléculas farmacológicamente activas, garantizando que los bacteriófagos lleguen a las bacterias objetivo y potencialicen

el efecto de las moléculas activas en el tejido infectado y se disminuyan los riesgos de efectos secundarios.

BREVE DESCRIPCIÓN

5

La presente divulgación se refiere a una formulación biológico-farmacológica conformada por fagos funcionalizados que permite dirigir moléculas farmacológicamente activas a un tejido específico colonizado por bacterias. Los fagos funcionalizados de la presente divulgación corresponden a bacteriófagos líticos capaces de infectar bacterias que producen acné, y que se encuentran unidos a una o más moléculas activas contra el acné.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

FIG. 1 Espectros de absorbancia del proceso de formación del complejo bacteriófago-isotretinoína. **A**, Barrido espectral del bacteriófago y de las moléculas de isotretinoína. La línea identificada con triángulo muestra la curva que corresponde a la mezcla de bacteriófago e isotretinoína en una sola muestra sin el proceso de remoción de moléculas libres de isotretinoína. En la línea identificada con punto se presenta la curva del espectro correspondiente una solución de isotretinoína. En la curva identificada con cuadrado se presenta el espectro del bacteriófago solo. **B**, En la curva se presenta el barrido espectral correspondiente a la formación del complejo bacteriófago-isotretinoína, después de ser sometido a los procesos de remoción de moléculas libres de isotretinoína.

20

25

FIG. 2. Resultados de la técnica de RT-qPCR para medir expresión relativa de IL-1 β de los grupos experimentales comparados entre los puntos cero y veinticuatro horas después de la inoculación con cada tratamiento. En donde C corresponde al grupo inoculado con *C. acnes*, CF corresponde al grupo que fue expuesto a *C. acnes* y al fago, CFI corresponde al grupo inoculado con bacteria, fago-isotretinoína, y F al grupo inoculado con bacteriófago. Asimismo, se muestran los valores de significancia estadística para cada grupo experimental, en donde NS corresponde a no significativo, * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se refiere a un fago funcionalizado que comprende un bacteriófago lítico contra bacterias asociadas al acné, y una molécula activa contra el acné
5 que tiene en su estructura un grupo terminal ácido carboxílico; en donde el bacteriófago y la molécula activa se unen mediante un enlace covalente sin un espaciador ni ligando adicional.

Para efectos de la presente divulgación se entiende por fago funcionalizado a un
10 bacteriófago al que se le acoplan moléculas activas/medicamentos y en donde, el bacteriófago actúa como un vehículo de dichos medicamentos para dirigirlos al tejido objetivo y de esta forma generar una alta especificidad contra las bacterias patógenas de cada tejido. Los fagos funcionalizados pueden ser útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas que adicionalmente se benefician del efecto sinérgico de
15 medicamentos, por ejemplo, acné, gastritis secundaria a *Helicobacter pylori*, infecciones de heridas por *Pseudomonas* spp., neumonía de origen bacteriano, entre otras. En una modalidad la presente invención se refiere a fagos funcionalizados para el tratamiento del acné, que comprenden bacteriófagos líticos contra bacterias causantes de acné unidos a moléculas activas contra el acné que tienen en su estructura un grupo terminal ácido
20 carboxílico.

Para efectos de la presente divulgación, un bacteriófago lítico es un bacteriófago capaz de infectar y generar lisis en una bacteria de interés, es decir, que son fagos que luego de infectar la bacteria utilizan la maquinaria de la célula bacteriana para fabricar su progenie
25 viral y posteriormente lisar la célula para la liberación de las nuevas partículas de fago. Los bacteriófagos líticos tienen alta especificidad de hospedero y son inocuos para los tejidos adyacentes, así como para otros microorganismos que hagan parte de la microbiota propia de estos tejidos, por lo tanto, los fagos líticos se consideran una solución alternativa y segura para combatir los patógenos bacterianos, incluso aquellos resistentes a los
30 antibióticos. De acuerdo con la presente divulgación, los bacteriófagos líticos no se insertan en el genoma de la bacteria, y tienen proteínas con residuos hidroxilos y amina expuestos en su superficie; además, dichos bacteriófagos son resistentes a un rango de pH entre 4 y 8, y son estables en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO).

En una modalidad particular de la presente divulgación, los bacteriófagos líticos son específicos para bacterias involucradas en el desarrollo de acné, específicamente tienen la capacidad de infectar la bacteria *Cutibacterium acnes* y más específicamente cepas de los filotipos IA1, IA2, IB y II de *C. acnes*. Para los efectos de la presente divulgación, 5 dichos fagos, aunque tienen la capacidad de infectar una amplia gama de cepas bacterianas dentro de la especie *C. acnes*, tienen especificidad de especie y son incapaces de lisar cualquier bacteria que no sea *C. acnes*.

En una modalidad, los bacteriófagos de la presente divulgación tienen un genoma con 10 una secuencia de nucleótidos que se selecciona entre las secuencias de SEC ID NOs: 1, 2 y 3.

Para efectos de la presente divulgación, se entiende por *funcionalizar un bacteriófago* al proceso mediante el cual se modifica la superficie del bacteriófago por unión con una o 15 varias moléculas con residuos hidroxilo o amina expuestos. En diversas modalidades de la invención, la unión de las moléculas a la superficie del fago está mediada por enlaces de tipo covalente. En una modalidad, la unión del bacteriófago lítico a la molécula activa se realiza mediante un enlace covalente entre los residuos ácido carboxílico de la molécula de interés y los residuos de aminas o hidroxilos del bacteriófago. En una 20 modalidad particular de la presente invención dicho enlace covalente no requiere un espaciador ni ligando adicional o un catalizador para formarse y es estable a pH 8.

En una modalidad particular de la presente divulgación el enlace covalente es un enlace de tipo éster o amida. 25

Para efectos de la presente divulgación, las moléculas activas contra el acné corresponden a fármacos cuya acción en el tratamiento contra el acné corresponde a regular la producción de sebo, reducir la obstrucción del folículo y disminuir la inflamación. Para efectos de la presente divulgación la molécula activa contra el acné tiene en su estructura 30 grupos terminal ácido carboxílico, y es estable al disolverla en un solvente que tolere el fago lítico.

Para efectos de la presente divulgación, se consideran como moléculas activas contra el acné a fármacos tales como los fármacos retinoides, los cuales son derivados sintéticos

- de la vitamina A que se ligan a receptores específicos y ejercen una acción que regula la proliferación y diferenciación de los queratinocitos a la vez que actúan sobre la glándula sebácea, disminuyendo su tamaño su actividad. Otros fármacos activos contra el acné son los alfa-hidroxiácidos, el ácido glicólico, el ácido salicílico, el ácido láctico, el adapaleno, el ácido azelaico, la niacinamida, y los antibióticos, tales como, amoxicilina y limeciclina. Estos fármacos poseen un grupo terminal ácido carboxílico, lo cual hace que puedan ser considerados como candidatos de moléculas activas para la funcionalización de bacteriófagos en el tratamiento contra el acné.
- 10 En una modalidad de la presente invención se consideran como moléculas activas contra el acné a retinoides tales como, ácido retinoico, acitretina, tetrinoína, isotretinoína y bexaroteno. En una modalidad de la presente invención el retinoide activo contra el acné es isotretinoína.
- 15 En una modalidad de la presente invención el bacteriófago es funcionalizado con isotretinoína. En una modalidad particular, se funcionaliza un fago lítico de *C. acnes* en una concentración de aproximadamente $2,2 \times 10^5$ UFP/mL, con una solución de isotretinoína en DMSO a concentración de 1 mM.
- 20 La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

25

EJEMPLO 1. Funcionalización del fago con isotretinoína.

La funcionalización del bacteriófago se realizó mediante las siguientes etapas:

30 Obtención de los fagos

Los fagos se obtuvieron a partir de una colección del Museo de Historia Natural C. J. Marinkelle de la Universidad de los Andes, y se cultivaron mediante la técnica de doble capa de agar, así: se tomaron 200 μ L de un inóculo de la bacteria hospedera (*C. acnes*), en una concentración de entre 10^8 - 10^9 UFC/mL; y se mezcló por vórtex con 100 μ L del

stock inicial de bacteriófagos. Esta mezcla bacteria-fago se depositó en un tubo de ensayo con 2mL de agar Soft Nuevo, nuevamente se mezcló por vórtex y se vertió sobre una caja de Petri con Agar Nuevo, hasta que se distribuyó la mezcla homogéneamente, y se dejó solidificar por unos minutos. Posteriormente, se incubó la caja de Petri por 24 horas a 36°C y con una atmosfera de entre 10 y 15% de CO₂. Seguido a esto se raspó la superficie del agar con una lámina de vidrio, para recolectar únicamente la capa superficial de agar Soft Nuevo que contiene la mezcla de la bacteria y el bacteriófago. A continuación, se mezcló el agar Soft Nuevo con 2 mL de buffer SM por cada caja de Petri que se raspó en un tubo cónico de centrifuga y se dejó reposar por 24 horas. Finalmente, se centrifugó la mezcla para separar el agar de la solución que contiene los bacteriófagos y se filtró mediante el uso de un filtro de 0,22 µm para obtener un nuevo stock del bacteriófago deseado.

Funcionalización

A partir del paso anterior, se obtuvieron bacteriófagos en un título de entre $1,0 \times 10^{11}$ y $1,0 \times 10^{13}$ UFP/mL y se mezclaron con la molécula activa en solución de DMSO, a una concentración entre 1,0 y 10 mM. La mezcla se realizó en una solución en buffer SM sin gelatina con un pH entre 7,8 y 8.

Activación del fago funcionalizado (Incubación)

La solución anterior se incubó por un período entre 24 y 48 horas a una temperatura entre 4 y 20°C.

Ultracentrifugación o diálisis para la obtención del fago funcionalizado

Las moléculas activas que no se unieron a las proteínas del bacteriófago se removieron por medio de ultracentrifugación, resuspendiendo el bacteriófago funcionalizado y descartando el sobrenadante con las moléculas activas libres. Alternativamente, la remoción se hizo por medio de diálisis, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 14 k Da para retener el bacteriófago funcionalizado al interior de la membrana, mientras la molécula activa se diluyó en una solución de lavado. Este proceso se realizó a una temperatura de 37°C.

Caracterización del fago funcionalizado

Se determinó que la molécula se unió al bacteriófago por medio de espectrofotometría UV-VIS, en donde se analizaron los espectros de cada elemento por separado y del proceso de unión antes y después de la remoción de moléculas libres. El barrido espectral de la isotretinoína obtenido experimentalmente muestra una única banda de absorbancia en 344 nm, lo cual concuerda con el espectro que ha sido anteriormente reportado en otros estudios experimentales. Asimismo, el espectro de la mezcla bacteriófago y fármaco indica la presencia de tres bandas de mayor absorbancia en 220, 260 y 344 nm, las cuales coinciden con las bandas de absorbancia identificadas en los espectros individuales de ambos compuestos (Figura 1A). Por otra parte, al realizar el barrido espectral de la solución que posee el complejo bacteriófago-isotretinoína después del proceso de remoción de moléculas libres del medicamento, se observa la presencia de un único pico en 214 nm (Figura 1B).

EJEMPLO 2. Ensayos de inhibición con el fago funcionalizado

Se evaluó la actividad lítica del bacteriófago después de la funcionalización mediante ensayos de plaqueo del bacteriófago por método spot. Se obtuvo el título viral del bacteriófago con moléculas de isotretinoína unidas de $2,2 \times 10^5$ UFP/mL, con lo cual se evidencia que el bacteriófago conserva su actividad lítica después del proceso de funcionalización.

Finalmente, se evaluó la capacidad antiinflamatoria de la molécula activa después de la unión al bacteriófago mediante la adición de este complejo a un cultivo celular de queratinocitos y se midieron los niveles de expresión de un marcador de inflamación, interleucina 1β (IL- 1β), a las 0 y 24 horas de exposición. Los resultados de este ensayo arrojaron que el grupo de queratinocitos que fue expuesto al tratamiento fago-isotretinoína muestra diferencias significativas entre los dos puntos de tiempo, ya que a las 24 horas de inoculación disminuye significativamente la expresión de la IL- 1β , en comparación con los niveles de expresión a las cero horas de inoculación (FIG. 2), lo que indica que la isotretinoína unida al fago preserva su actividad farmacológica.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los bacteriófagos funcionalizados demostraron tener un efecto sinérgico dado que tanto el bacteriófago como la molécula activa conservaron su actividad posteriormente a la funcionalización, lo que indica que los

resultados obtenidos son mayores a los que se obtienen con el uso de cada uno de los elementos por separado.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Un fago funcionalizado que comprende:
 - 5 (a) un bacteriófago lítico contra bacterias asociadas al acné, y
 - (b) una molécula activa contra el acné que tiene en su estructura un grupo terminal ácido carboxílico;en donde el bacteriófago y la molécula activa se unen mediante un enlace covalente sin un espaciador adicional.
- 10 2. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el enlace covalente es un enlace de tipo éster o amida.
3. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el
- 15 bacteriófago es de la Clase Caudoviricetes e infecta *Cutibacterium acnes*.
4. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el bacteriófago infecta cepas de los filotipos IA1, IA2, IB y II de *Cutibacterium acnes*.
- 20 5. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 2, en donde el enlace tipo éster o amida se forma entre residuos de ácido carboxílico de la molécula activa y residuos de hidroxilos o aminas del bacteriófago, respectivamente.
6. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la molécula
- 25 activa se selecciona del grupo que consiste en retinoides, tales como, ácido retinoico, acitretina, tetrinoína, isotretinoína y bexaroteno; alfa-hidroxiácidos, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido láctico, adapaleno, ácido azelaico, niacinamida, y antibióticos, tales como, amoxicilina y limeciclina.
- 30 7. El fago funcionalizado de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la molécula activa es isotretinoína.

RESUMEN

La presente divulgación se refiere a fagos funcionalizados con moléculas
5 farmacológicamente activas para el tratamiento del acné. Dichos fagos son útiles en el
tratamiento de enfermedades infecciosas, ya que dirigen las sustancias farmacológicas al
tejido colonizado por bacterias. En una modalidad el desarrollo, los fagos funcionalizados
de la presente invención corresponden a fagos líticos de la clase de los Caudoviricetes
que tienen actividad frente a *Cutibacterium acnes* con moléculas farmacológicamente
10 activas, específicamente con isotretinoína, que tiene propiedades de interés para el
tratamiento del acné producido por *Cutibacterium acnes*, porque actúa a nivel de la
glándula sebácea, reduciendo la inflamación, hiperproducción de sebo y la queratosis.

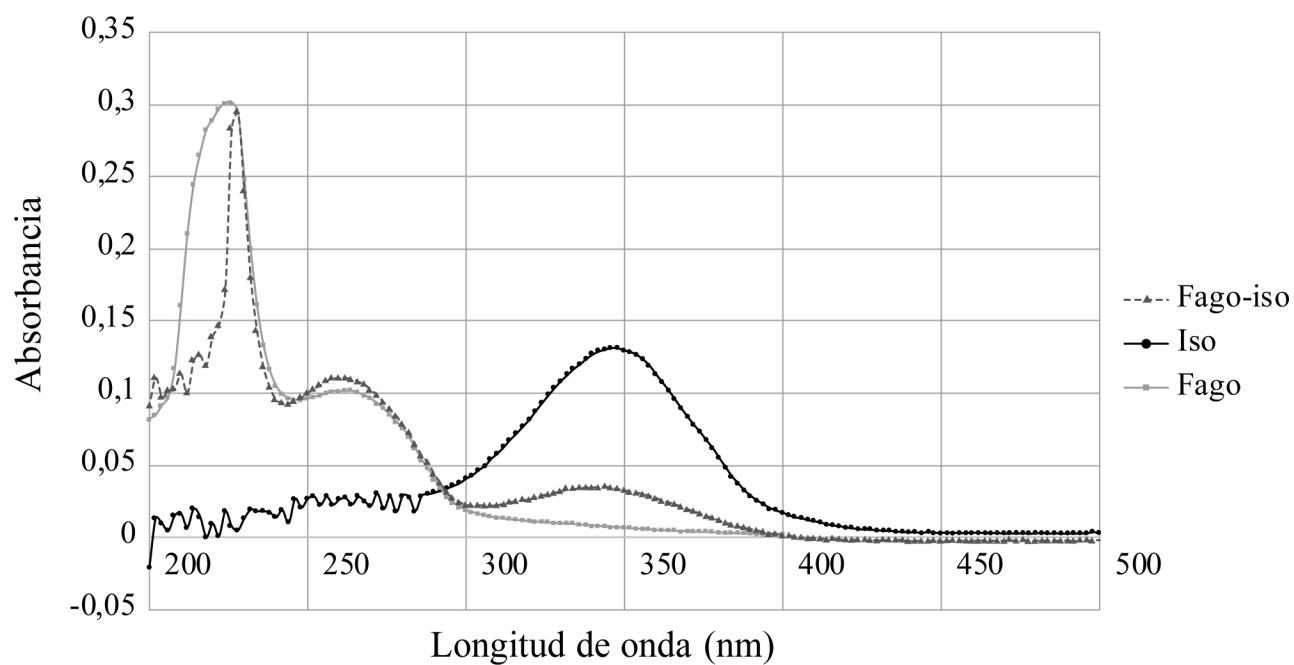


FIG. 1A

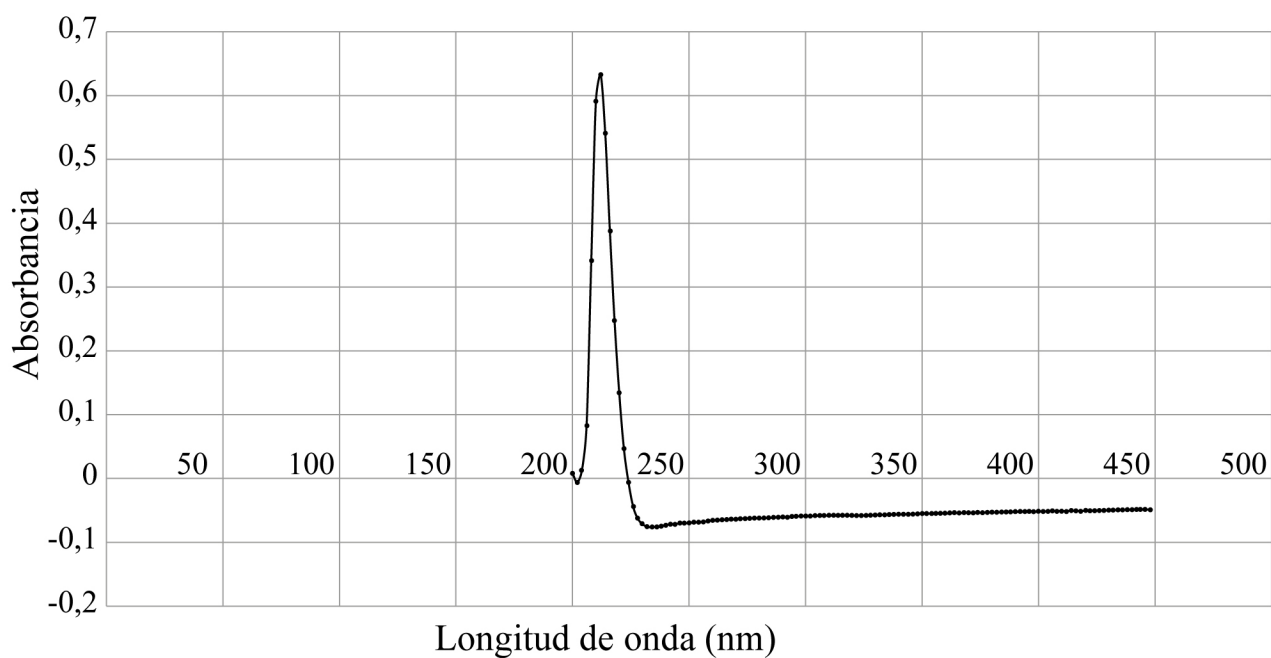


FIG. 1B

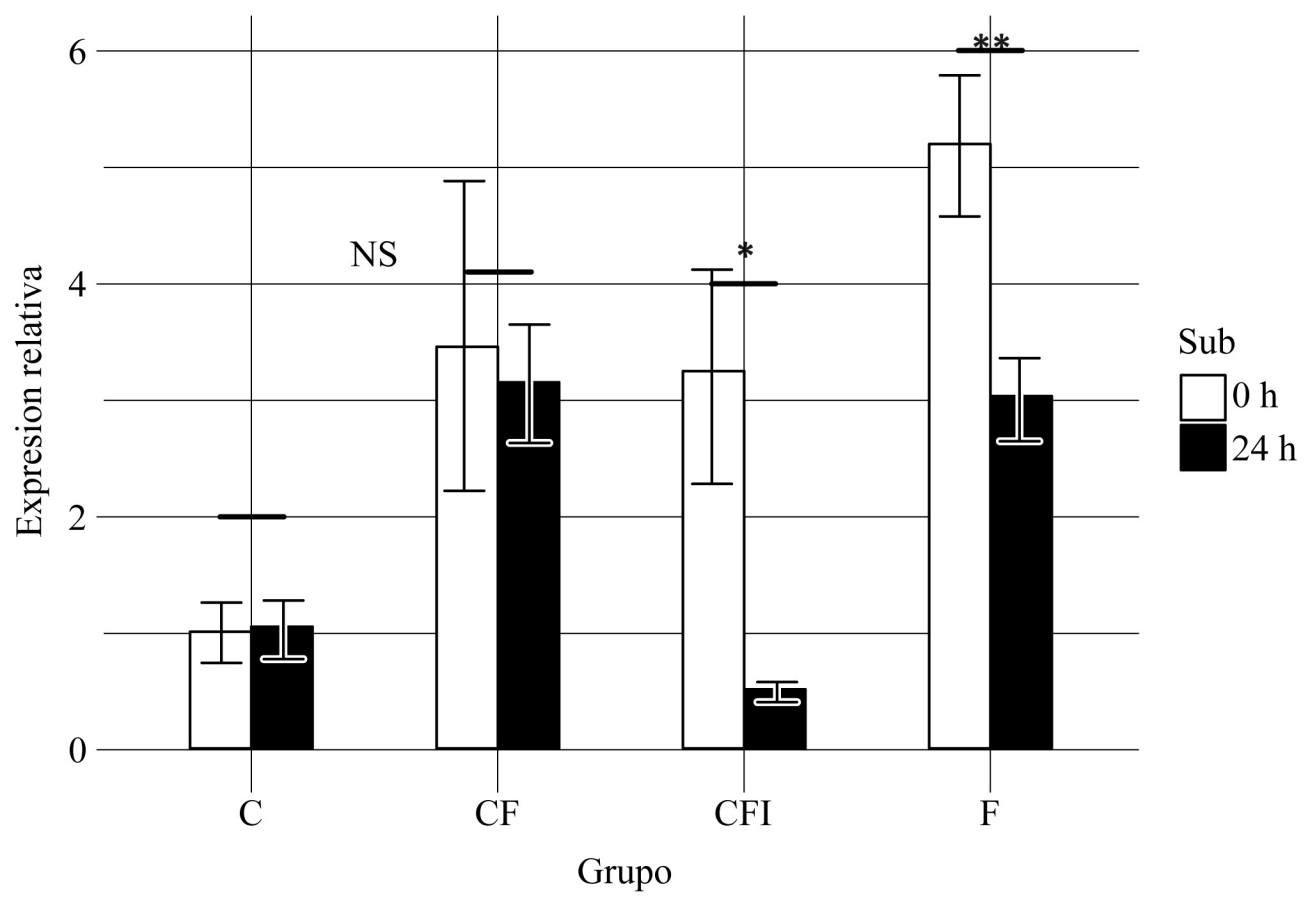


FIG. 2