



TÍTULO DE PATENTE No. 362302

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Domicilio: Lascurain de Retana No. 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

Denominación: MOLÉCULAS ORGÁNICAS CON NÚCLEO BASE DE CUMARINA CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Clasificación: **CIP:** A61K31/37; A61P31/10; C07D311/12
CPC: A61K31/37; C07D311/12

Inventor(es): MIGUEL ÁNGEL VÁZQUEZ GUEVARA; ALBERTO FLORES MARTÍNEZ; JUVENCIO ROBLES GARCÍA; YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS; SANTIAGO GARCÍA MARES; FABIOLA NOEMÍ DE LA CRUZ DURÁN; TAYDE OSVALDO VILLASEÑOR GRANADOS; JULIO CÉSAR LÓPEZ MARTÍNEZ

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2014/014695	1 de diciembre de 2014	15:59

Vigencia: Veinte años
Fecha de Vencimiento: 1 de diciembre de 2034
Fecha de Expedición: 7 de diciembre de 2018

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012, 01/06/2016 y 13/03/2018); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695|MX/2019/17111|MX/a/2014/014695|Título de patente normal|1488|IAR|Pág(s) 1|zBhGjW/Aq/YOIZHTAWyUs5RMvtE=

Sello Digital:
ePdBPiPHPyP4AL9gZNB0oGhhq4B5z+VX9z+5YpY5OduXPjh9MlljvMARvPDMH7pf+LonT/kuVMq14wCIIIDyr1ar dzfPfceTCWnDw+eqGuGUgUgHlaYqG/hhRdgBSUfflQOcyRLGj5eDirFJxJ+K6ZH/5g9A1eNKvS22h6hICppP+zJRozrNKosShyLFBPTC+LsQskEtCsxqQf4ySN6BipAdG6dSkAgxp2ewOkNoTvFVMS4v750tUC8NRa2t6eBpWb/+3dnbpi pyUqPWolHTARCEdz3IZE1aSjjzLGeOsQWp5NCA/fRtW 15R/bRfZyNKIRSW/2WbqQ3WXFWFW==





ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención, tiene un impacto en el área clínica, por ser una opción viable para el tratamiento de una afección oportunista y que impacta en la salud pública.

OBJETO DE LA INVENCION

- El objeto de la presente invención es la utilización de compuestos orgánicos con núcleo
10 base de cumarina que sean eficaces, en concentraciones bajas, contra el patógeno *Candida albicans*, en comparación con un activo farmacéutico de venta comercial (fluconazol).

ANTECEDENTES

- Las distintas variedades de *Candida spp.*, constituyen un patógeno importante en
15 hospitales. En algunos países hispano hablantes, las especies de *Candida* representan casi el 80% de todos los hongos patógenos causantes de infecciones nosocomiales, oscilando la incidencia de candidemia de 0.2 a 0.46 casos por 10,000 pacientes/día.^[1] Se ha reportado que en algunos países de Sudamérica, la tasa de incidencia de candidemias es de 3 a 5 veces superior a la referida en EUA y algunos países de Europa. La incidencia relativa sigue la
20 tendencia: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. glabrata*.^[2]

La distribución de las especies varía también según la edad del paciente; por ejemplo, pacientes menores a un año generalmente se infectan con *C. albicans*, pero en pacientes mayores a 70 años se observa que *C. glabrata* es bastante común.^[3]

Las opciones terapéuticas para las infecciones fúngicas no han dejado de evolucionar desde mediados del siglo pasado, mejorando no sólo su eficacia y espectro de acción, sino también su tolerabilidad, manejo y tiempo de tratamiento. En la actualidad, es común el uso de combinaciones sinérgicas entre fármacos y agentes coadyuvantes, como inhibidores de la adhesión del patógeno al hospedero, como lo reportado por *Noe, C.; Noe, M. (2013) USA, 8,552,042*. O el sinergismo de fragmentos de triazol y piridina, que aportan una actividad anti fúngica, como lo reportado por *Liu, X.; Zhang, Y.; Weng, J. (2012) A01N43/90; A01P3/00; C07D471/04*, este tipo de compuestos se probó con varios hongos mostrando buenos resultados; sin embargo, tienen un porcentaje de efectividad de inhibición contra *Candida albicans* de un 47.8%, mientras que en esta patente el mínimo de porcentaje de inhibición para el mismo hongo es de 75% teniendo un máximo del 96%.

Los primeros antifúngicos datan de 1900 cuando se empleaba el yoduro de potasio; entre 1940 y 1950 surgieron tratamientos tópicos con acción fundamentalmente exfoliante y queratolítica y un débil poder antifúngico; en años siguientes se desarrollaron los antifúngicos de uso tópico y sistémico (tolnaftato, haloprogina, griseofulvina, imidazoles, inhibidores de la síntesis de pirimidina y polienos). En la década de los 90's se incorporaron los triazoles, siendo el itraconazol el primer antifúngico oral con actividad sobre un espectro amplio de hongos. En pleno siglo XXI, las investigaciones continúan y periódicamente aparecen nuevos agentes como el voriconazol y la caspofungina, entre otros.^[4]

Minghua, Z. (2014) A61K31/352; A61P31/10, describe algunos derivados de flavonas como un fármaco de amplio espectro y alta efectividad contra *Candida albicans*. E igualmente se ha establecido al fluconazol como el fármaco recomendado para el

tratamiento de las infecciones por *Candida* en el paciente crítico no ne

casos de pacientes hemodinámicamente estables y que no han recibido azoles previamente, y a la anfotericina B o caspofungina en los que han sido tratados con fluconazol. En pacientes hemodinámicamente inestables se recomienda caspofungina (es el antifúngico de
5 elección si existe insuficiencia renal) o una anfotericina lipídica.^[5]

En particular, el fluconazol es apto para el tratamiento de micosis superficiales y profundas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), administrado vía intravenosa u oral 50-1200 mg/día, contra *C. immitis*, *C. neoformans* y *P. brasiliensis*. No obstante, su espectro es reducido y carece de acción sobre *Aspergillus spp*; *Fusarium spp*, *Scedosporium spp* y
10 *Penicillium spp*; además se describe resistencia de *C. glabrata* y *C. krusei*.^[6]

Otro problema importante que está relacionado con las infecciones micóticas, es la resistencia que desarrollan las cepas frente a los medicamentos tradicionales. Por ejemplo, se han aislado de pacientes con VIH, cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol, así como bacterias sumamente persistentes.^[7] He aquí la importancia en la diversificación estructural
15 de los fármacos administrados y la constante búsqueda en el mejoramiento de su actividad fungicida. Con respecto a lo anterior, esta patente mejora los intervalos de efectividad, pues los compuestos son activos en la zona de nanogramos a microgramos.

En cuanto al núcleo de cumarina (presente en los compuestos de interés), diversas actividades farmacológicas le han sido asociadas. Por ejemplo, sus derivados se pueden
20 utilizar como inhibidores de la óxido nítrico sintasa, según lo reportado por Jackson, S.; Nieduzak, T.; Robello, S.; Liam, G.; Chiang, Y.; Merrill, J. (2009) USA, 7,538,233. Asimismo, ha probado su valía como antimicrobiano y antifúngico contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*) y

bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* *dysenteriae*), así como con diferentes hongos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus fumigatus*), como lo reportado por Shi, Y.^[8] Por ello, puede involucrarse en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, por ejemplo, en la agudeza infecciosa de diversos hongos y bacterias.^[9] Finalmente, algunas cumarinas han sido aplicadas como inhibidoras de la metaloenzima anhidrasa carbónica, a saber por lo reportado en el grupo de Vu, H. *et. al.*^[10]

PROBLEMA TÉCNICO A RESOLVER

El incremento de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos tradicionales, debido a la aparición de cepas resistentes de hongos, como en el caso del género *Candida*. Se presenta un nuevo tipo de moléculas orgánicas, eficientes y eficaces contra este microorganismo. Derivado de su alta potencia, se requieren dosis mínimas comparadas con un fármaco de venta libre con el activo fluconazol.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

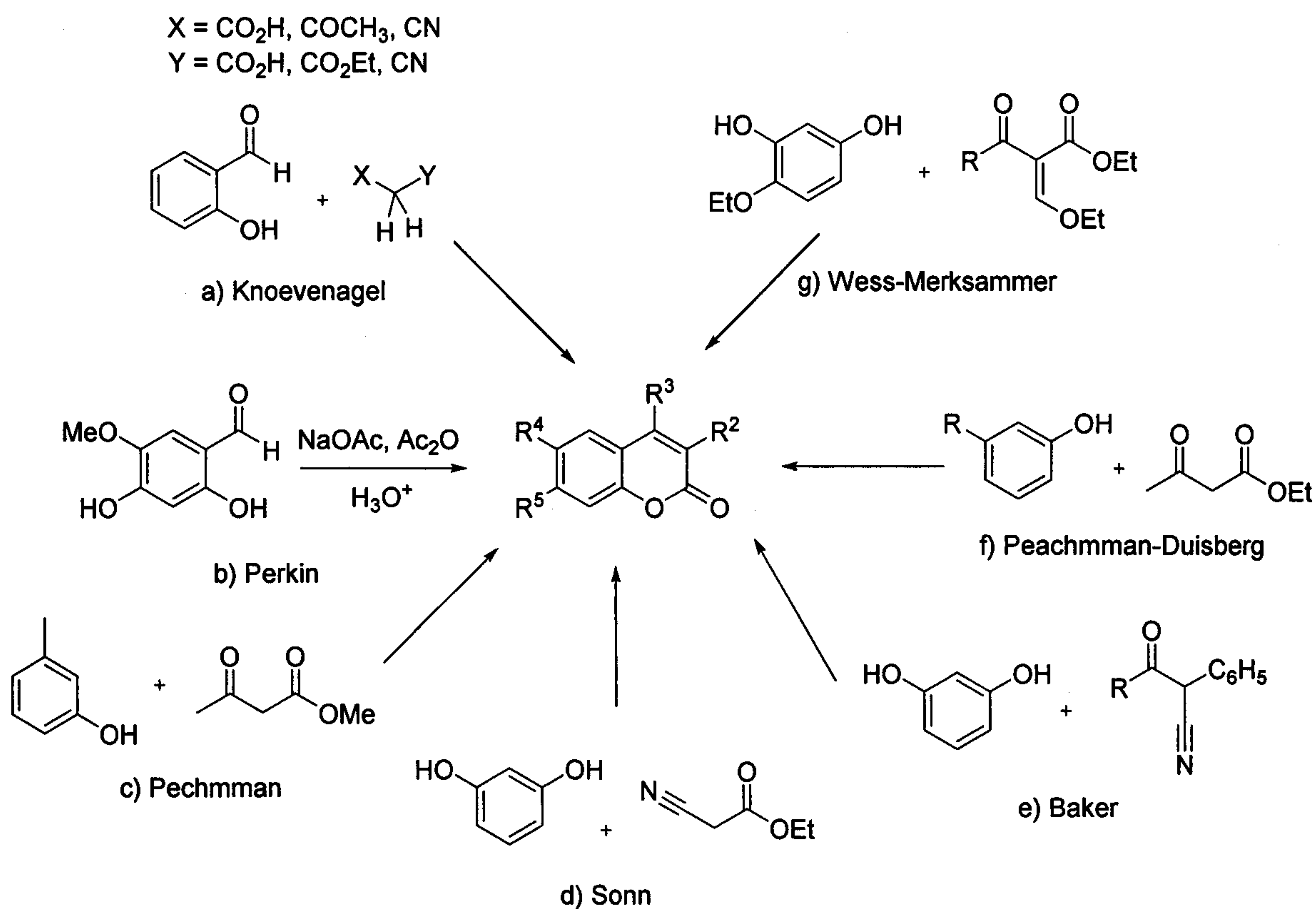
En la Figura 1, se muestra el análisis que se realizó para la actividad biológica. Fue a través de pruebas de inhibición con un antibiograma (el uso de discos a diferentes cantidades del compuesto: control, 1, 5, 10 mg).

En la Figura 2, se muestra diluciones de la muestra con respecto al control; esto con la finalidad de realizar el cálculo del IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50%), IC₉₀ y CMI (concentración mínima inhibitoria).

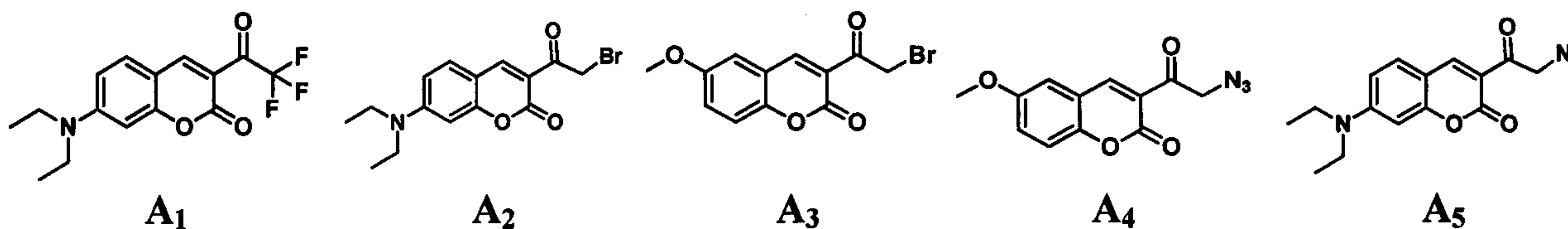
En la Figura 3, se muestra la gráfica de número de colonias formadas a diferentes concentraciones del compuesto, en microgramos; los resultados en cuestión a la actividad biológica, de mayor a menor, son: $A_3, A_4 > A_2 > A_1 > A_5$. Se destaca además, que las concentraciones que se requieren para no generar ninguna colonia de microorganismos están en umbrales similares e incluso menores a los del fármaco control (fluconazol).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

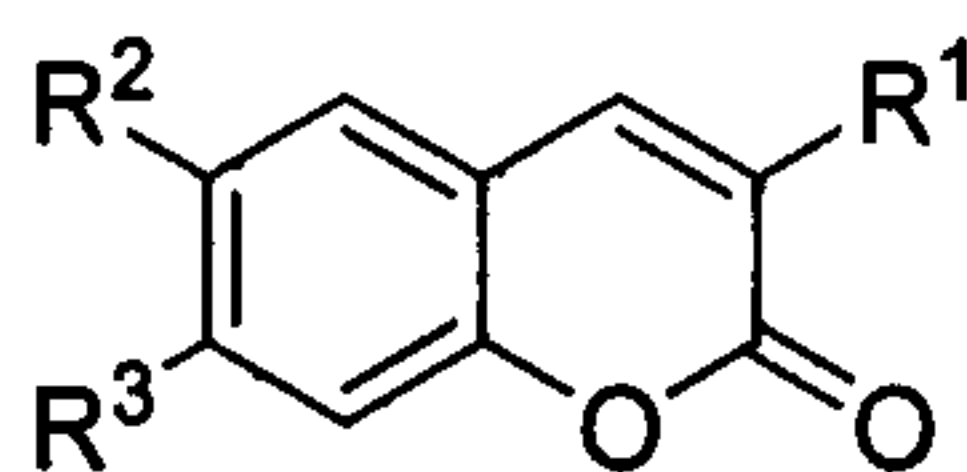
En lo referente a la síntesis química de núcleos de cumarina, es relevante indicar que existen diversas rutas de acceso reportadas a estos núcleos. En el resumen gráfico indicado a continuación, destacan la reacción de Pechmman, la reacción de Perkin y la condensación de Knoevenagel, debido a su versatilidad y alcance sintético.^[11]



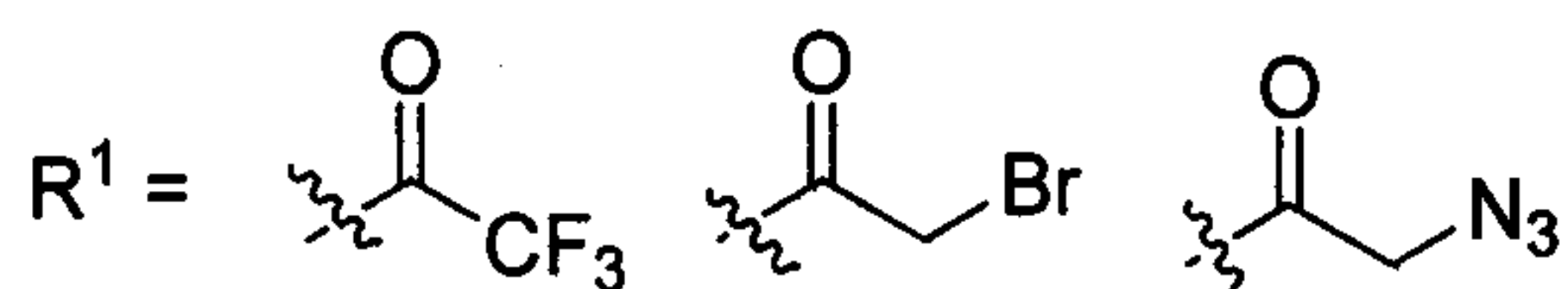
A través de ellas, es posible obtener una gama completa de patrones de sustitución en la posición 7 de la cumarina, lo cual es relevante desde el punto de vista farmacéutico puesto que ello permite evaluar más fácilmente la relación estructura-actividad en torno a una aplicación específica. La relación anterior, referida en este caso a la potencia antifúngica, fue evaluada mediante un análisis *in silico*. Como primera etapa de la invención, a un conjunto de moléculas con probable actividad biológica visualizadas por el trabajo previo del grupo de investigación, se le realizó un diseño computacional de estructuras químicas y se evaluó el tipo de interacción que éstas podían presentar con la enzima MTCYP51 (aislada de *Mycobacterium tuberculosis*, usada como diana terapéutica), en la cual, se encuentra co-cristalizado el fluconazol (fármaco). Esta interacción del fármaco con el sitio activo de la enzima, inactiva y provoca una ruptura metabólica en la síntesis de ergosterol, compuesto necesario para el microorganismo en su ciclo de vida (por ejemplo, es vital como nutriente y constituyente de la membrana). Al estar bloqueada la enzima se provoca la muerte del microorganismo, lo que se traduce en actividad antifúngica. Para ello, se siguió una metodología de docking o acoplamiento molecular, que predice las poses de unión preferencial de los compuestos y sus energías de enlace, comparados contra el fluconazol, usando el programa Molegro Virtual Docker. De esta manera, en base a los cálculos teóricos, se seleccionaron 5 moléculas para su síntesis (A₁-A₅).



Cabe resaltar que la invención, propiamente, radica en la modificación de la base de cumarina, como se muestra en la molécula genérica A, es decir, se persigue aumentar la capacidad antimicótica contra *Candida albicans* al variar el patrón de sustitución en el compuesto.



A



5

En la etapa de análisis computacional destaca la estructura A₅, quien presentó una energía de enlazamiento de -138.6 Kcal/mol y una eficiencia de ligando de -6.3Kcal/mol·átomo, valores bastante cercanos al estándar de fluconazol (-160.6 Kcal/mol y -7.3 Kcal/mol·átomo, respectivamente).

10 Por su parte, la etapa experimental de evaluación de la actividad biológica de las moléculas de esta invención, resulta en una mejora de la actividad inhibitoria contra *Candida albicans* en comparativa al producto comercial, fluconazol.

Se calcula la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el porcentaje de inhibición. Éste se obtiene acorde al número de unidades formadoras de colonias (UFC) que sobreviven al

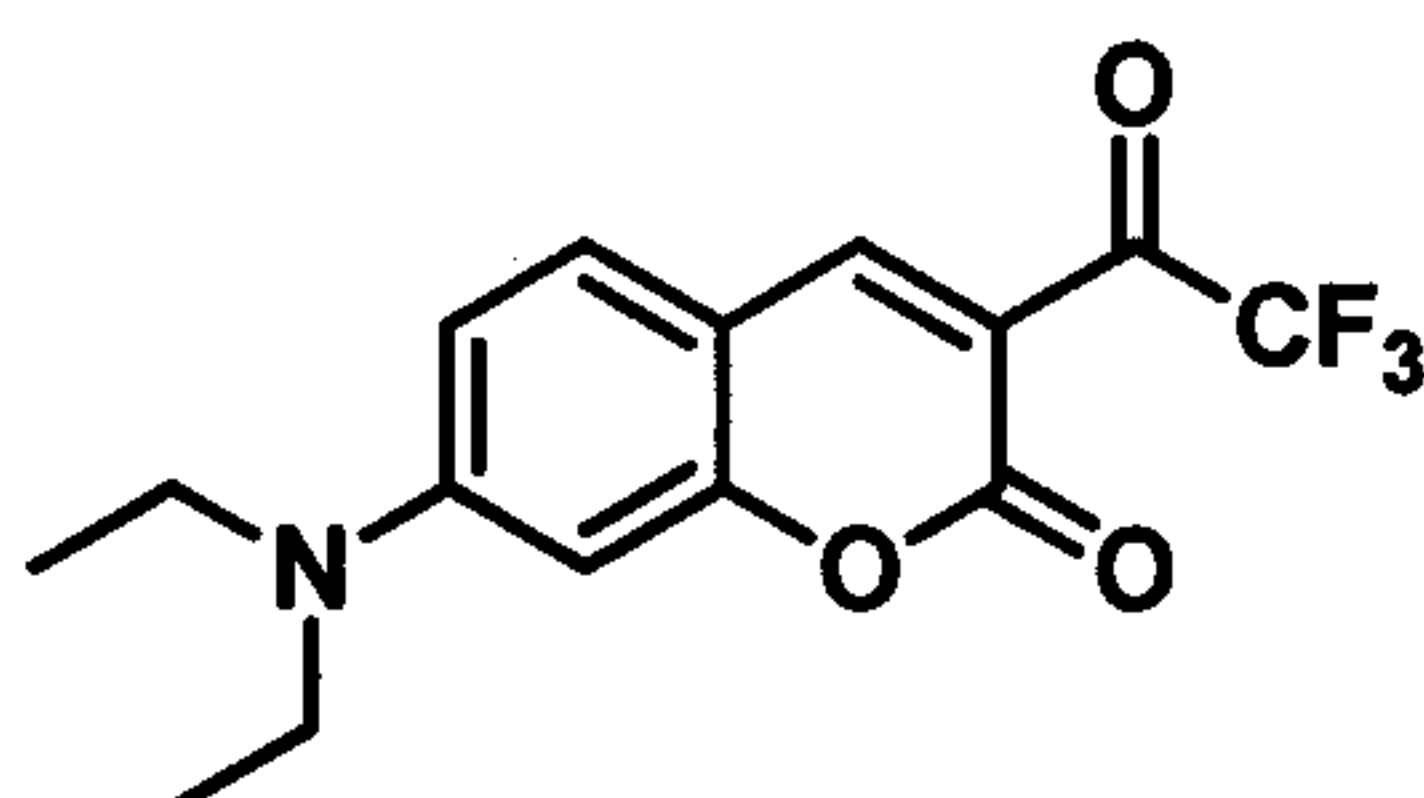
15 aplicar las diferentes concentraciones de los compuestos, teniendo un blanco como referencia (un fármaco usado como antifúngico y que sea control positivo con la cepa creciente). En este caso, el blanco usado fue la formulación de fluconazol comercial.

Los resultados son excelentes, al tener una concentración mínima compuestos en el intervalo de 900 ng a 2 mg (para el fluconazol comercial, este valor es de 3 mg); las unidades formadoras de colonias variaron desde 3 hasta 30 (el blanco tuvo 16); y finalmente, el porcentaje de inhibición resultó de 75% a 96 %, mientras el blanco fue de 85%.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1

Preparación de 7-(dietilamino)-3-(2,2,2-trifluoroacetil)-2H-cromen-2-ona (A₁), con la siguiente fórmula estructural:



15 Una mezcla de 4-(dietilamino)-2-hidroxibenzaldehído (1mmol), 4,4,4-trifluoro-3-oxobutanoato de etilo (1.0-1.5mmol), morfolina (5-20% mol) y etanol (5-10 mL) fue colocada en un tubo reactor para microondas de 10 mL y fue irradiada durante 20-50 minutos en un intervalo de temperatura de 140-160° C y una potencia de 145-160 W. El punto final de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina. El crudo de la reacción fue adsorbido sobre sílica 230-400 mesh y purificado mediante cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla 7:3 (Hex:AcOEt). El producto fue recuperado como un sólido anaranjado, en un 50% de rendimiento.

Ejemplo 2

Se probó el comportamiento de las muestras frente a diferentes disolventes, analizando su solubilidad. Se realizó un sondeo atendiendo las características de polaridad y constante dieléctrica de los disolventes. Finalmente, la elección fue la utilización de dimetilsulfóxido (DMSO), generando concentraciones de las muestras entre 0.1 a 0.01mg/ μ L.

Ejemplo 3

Determinación de la actividad biológica como antifúngicos.

- 10 a) Varias cajas conteniendo medio de cultivo YPD-agar bacteriológico se prepararon y posteriormente inocularon con las cepas de *Candida albicans*. Al mismo tiempo, una tanda de medio de cultivo YPD líquido fue conjuntamente preparado (donde eventualmente se hicieron crecer las cepas).
- 15 b) Se prepararon diluciones de los compuestos A_1 - A_5 en concentraciones lo más aproximadas a 500 mg/mL.
- c) Se inocularon 5 mL de medio de cultivo YPD con la cepa de *Candida albicans* y éste se dejó crecer durante un periodo de 12-18 h hasta tener una lectura de densidad óptica en el intervalo de 0.4-0.8 a 660 nm.
- 20 d) Se transfirió una alícuota de 50 μ L de cultivo a cada placa de YPD-agar, expandiendo con varilla de vidrio procurando distribuir uniformemente.
- e) Se colocaron discos de papel filtro que contienen al compuesto, repartidos sobre la superficie de la caja y se dejó incubando a 28° C durante 24 h (Figura 1).

- f) Se determinó la capacidad antifúngica en base a la aparición de la inhibición.

5 Ejemplo 4

Cálculos de la IC₅₀, IC₉₀ y CMI.

- a) Los compuestos a evaluación (A₁-A₅) se pusieron en contacto directo con el microorganismo *Candida albicans*, formando disoluciones de concentración determinada, según la expresión siguiente:
- 100 μ L de cultivo inoculado + x μ g de compuesto + H₂O cbp 1 mL de disolución.
- b) Se colocaron las mezclas sobre un vórtex para homegeneizarlas y posteriormente se incubaron durante 1 h a 28° C.
- c) Se diluyó cada mezcla a razón de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:2000; posteriormente se colocaron en una caja de Petri con agar YPD y se incubaron a 28° C durante 12 a 24 h (Figura 2).
- d) Se realizó un conteo de las colonias que logran crecer y se determinó el límite de concentración en el cual ya no se registró ninguna proliferación (Figura 3).

REFERENCIAS

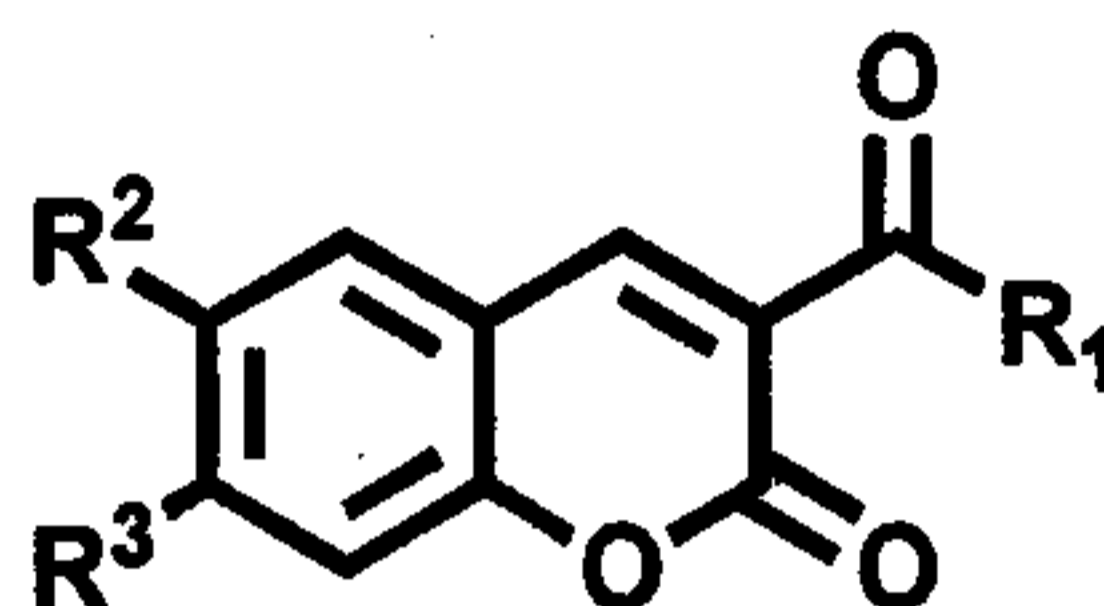
- [1] Zaragoza R.; Pemán, J.; Salavert, M.; Viudes, A.; Solé, A.; Jarque, I.; Monte, E.; Román, E.; Cantón, E. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2008**, 4 (6), 1261-1280.
- [2] Colombo, A.; Janini, M.; Salomao R.; Medeiros, E.; Wey, S.; Pignatari, A. *An Acad. Bras. Cienc.* **2009**, 81 (3), 571-587.
- [3] Sandven, P.; Bevanger, L.; Digranes, A.; Haukland, H.; Manssaker, T.; Gaustand, P. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, 44 (6), 1977-1981.
- [4] Allevato, M.; Negroni, R.; Galimberti, R. *Act. Terap. Dermatol.* **2007**, 30, 8-19.
- [5] León, C.; Ruiz-Santana, S.; Saavedra, P.; Almirante, B.; Nolla-Salas, J.; Álvarez-Lerma, F.; Garnacho-Montero, J.; León, M. *Crit. Care Med.* **2006**, 34, 730-737.
- [6] Mestre, J.; Alou, L. *Revista Española de Quimioterapia*, **2001**, 14(3), 45-51.
- [7] Lortholary, O.; Fontanet, A.; Mémain, N.; Martin, A.; Sitbon, K.; Dromer, F. *AIDS*, **2005**, 19 (10), 1043-1049.
- [8] Shi, Y.; Zhou, C. *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (3), 956-960.
- [9] Supuran, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (2), 168-181.
- [10] Vu, H.; Pham, N.; Quinn, R. *J. Biomol. Screen* **2008**, 13 (4), 265-275.
- [11] M. Shetana, S.; M. Shah, N. *Chem. Rev.* **1945**, 36, 1-62.

REIVINDICACIONES

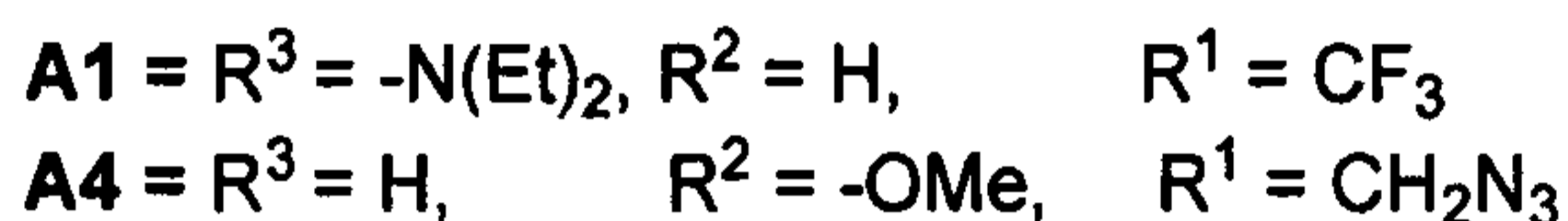
Habiendo descrito lo suficiente mi invención, declaro como de mi propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Las moléculas con núcleo base de cumarina de fórmula A que se caracterizan por la

5 siguiente estructura:



A



2. Las moléculas con núcleo base de cumarina de fórmula A de acuerdo a la reivindicación 1 para usarse como antifúngicos contra *Candida albicans*.

3. El uso de moléculas con núcleo base de cumarina de fórmula A de acuerdo a la
10 reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de *Candida albicans*.

4. Las moléculas con núcleo base cumarina de fórmula A de acuerdo a la reivindicación 2 para usarse como antifúngicos contra *Candida albicans* en donde las moléculas inhiben la síntesis del ergosterol en *Candida albicans* y en todo
15 microorganismo capaz de sintetizar este esterol.

5. Las moléculas con núcleo base cumarina de fórmula A de acuerdo a la reivindicación 2 para usarse como antifúngicos contra *Candida albicans* en donde

las moléculas tienen una concentración mínima inhibitoria en el intervalo de 900 ng
a 2 mg.

6. Las moléculas con núcleo base cumarina de fórmula A de acuerdo a la
reivindicación 2 para usarse como antifúngicos contra *Candida albicans* en donde
5 en las moléculas el porcentaje de inhibición de *Candida albicans* es de 75% a 96%.

10

15

20

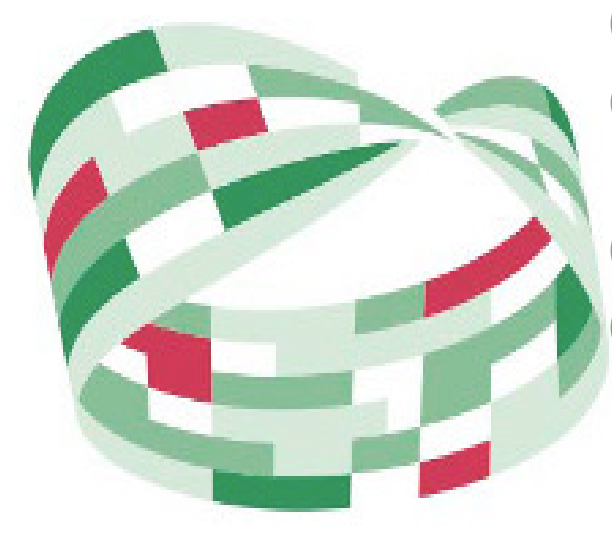


Figura 1

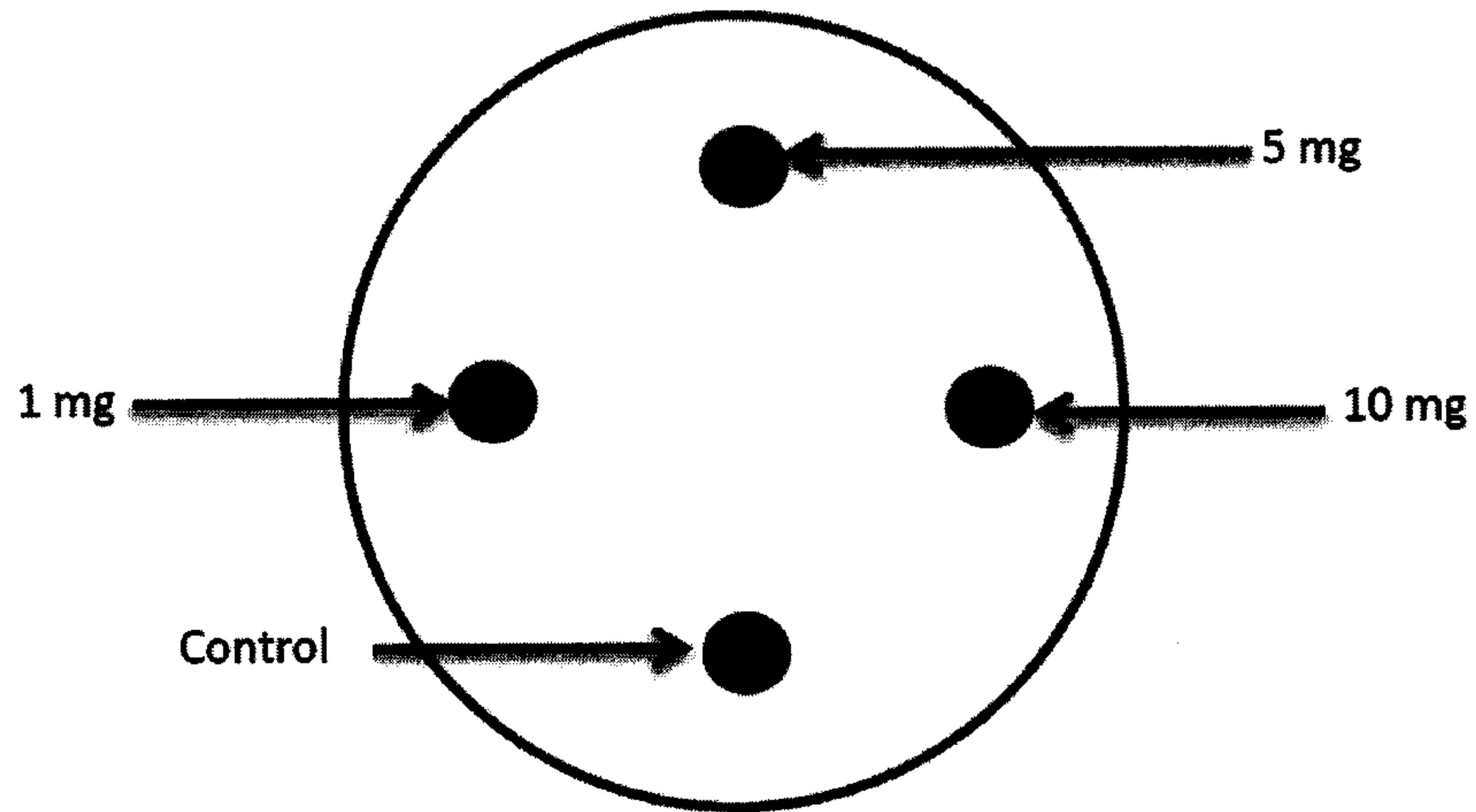


Figura 2

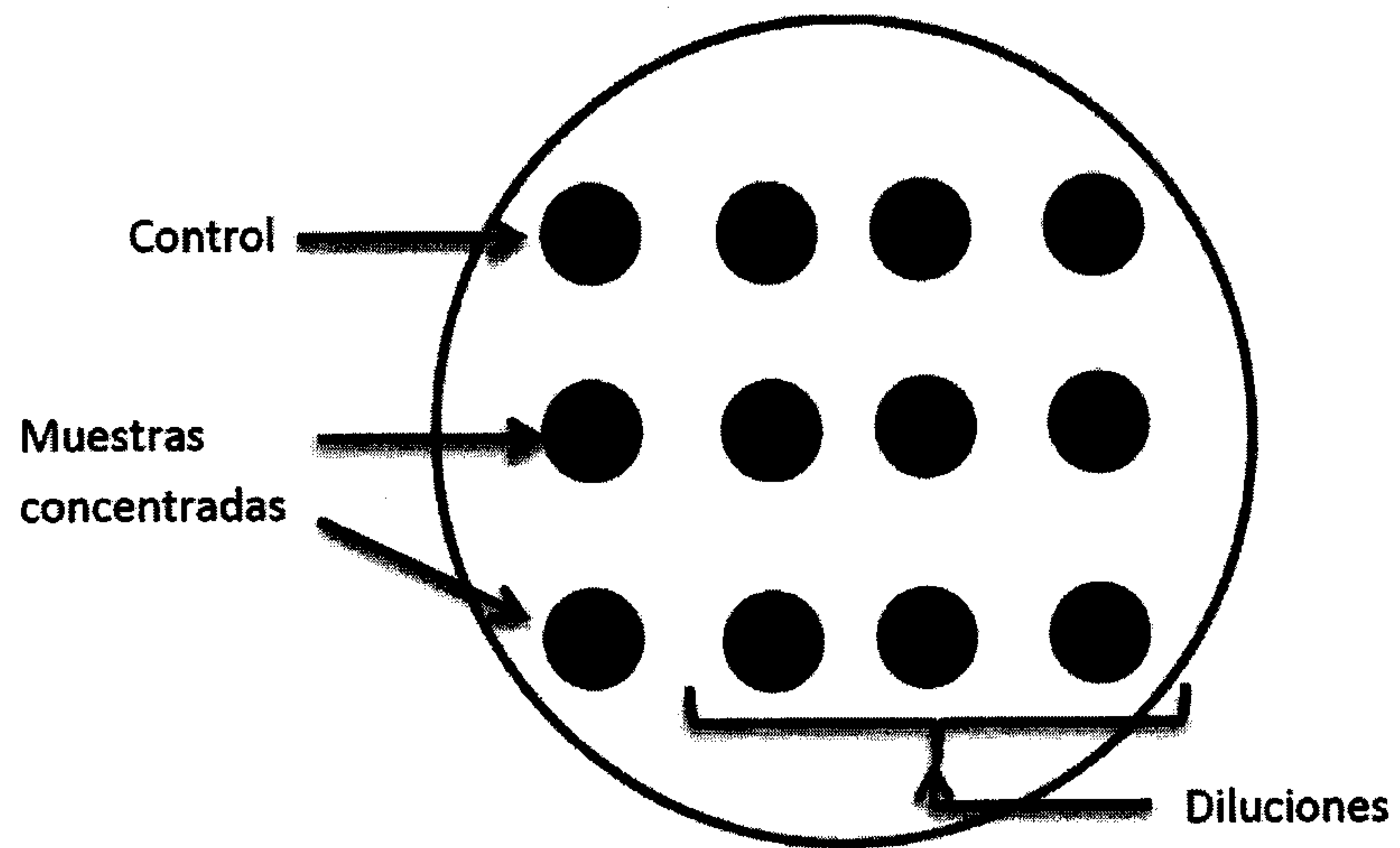


Figura 3

