



## TÍTULO DE PATENTE No. 375158

**Titular(es):** UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

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

**Denominación:** USO DEL MICELIO DE *FLAMMULINA VELUTIPES* Y SUS EXTRACTOS COMO ANTIFÚNGICO.

**Clasificación:** **CIP:** A61K36/07; A01N63/30; A61K36/06; A61P31/10; A61P39/06  
**CPC:** A61K36/07; A01N63/30; A61K36/06; A61P31/10; A61P39/06

**Inventor(es):** SVETLANA KASHINA; MYRNA LORETO SABANERO LÓPEZ; LÉRIDA LISS FLORES VILLAVICENCIO

### SOLICITUD

<b>Número:</b>	<b>Fecha de Presentación:</b>	<b>Hora:</b>
MX/a/2015/015025	28 de Octubre de 2015	11:51

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 28 de octubre de 2035

**Fecha de Expedición:** 28 de agosto de 2020

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 fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, 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.

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.

### SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

#### EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:  
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000405397295|Servicio de Administración  
Tributaria|56||MX/2020/72481|MX/a/2015/015025|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s)  
1|A0VPJzTBMbfkSLzPQl6Zv2jyikK=

Sello Digital:  
KvWCQ6zVcJ7OB1vA0r4U0OuWpvliznyJncSw50cvMQr6J1iFa9xJo4ZkclN35dl456dZ06jSfPdAw8+TyW8A4gzink  
HeWrWY0eBdzoVA53aDzTq7JuqqRtGNO7dXwvdgUB5ktKzNj4atVPfrahWYz9jdFR52B0cbLmAErKr5zt8daFIMQxgN  
+fgwu0Pu6uCtC+TKVoVf75WGRF0twOd0YSmA9/rJD6h1wToP/gvT/tul0IFmVck1yTFYvfrU3tmVXcLTdNqQC6l3n4  
cFiiOOxNizYwvUOU262Uj81owWNJi/3XWQtYeRO7FDylZw1aQFwgvvmzZ0md/A22D9GnzVSRw==



MX/2020/72481



## **Uso del micelio de *Flammulina velutipes* y sus extractos como antifúngico.**

### 5 OBJETO DE LA INVENCION

En la invención se describe el uso de micelio del hongo comestible *Flammulina velutipes* y el extracto del mismo como terapia complementaria en pacientes con diferentes infecciones cutáneas causadas por los hongos patógenos. El uso del agente de origen natural causará  
10 menos efectos adversos y podrá reducir la cantidad de los antifúngicos consumidos por el paciente.

### ANTECEDENTES

15 Actualmente en la medicina, como antifúngicos se usan varias sustancias activas de origen sintético. El tratamiento clásico implica el uso de azoles y polienos, compuestos químicos que frecuentemente producen los efectos adversos como molestias gastrointestinales, cefalea y daño al hígado (Vademecum). Debido a estos efectos adversos, los fármacos de este tipo, se usan de manera superficial cuando es posible. Así, la patente  
20 MX2011013602 (A) describe una formulación oftálmica a base de Ketoconazol que es utilizada en una inflamación corneal y en otra patente CN101040837 (A) se presenta una crema a base de Itraconazol y el método de su preparación.

Los componentes de origen natural que presentan acción antifúngica no se usan con frecuencia en los fármacos, pero presentaran menos efectos adversos. Por ejemplo, en la  
25 patente MX2007013011 (A) se describe el uso del extracto de *Ageratina pichinchenses* como antifúngico. Los aceites (aceite de eucalipto, lima, pino etc.) son los principales componentes del este grupo y actúan como bacteriostáticos, pero en muchos pacientes causan reacciones alérgicas. Existen algunas formulaciones con estos aceites, por ejemplo

el descrito en la patente RU2546001 (C1). Además, otros componentes como el alquitrán, pero no puede usarse de manera frecuente debido a su olor específico.

En particular, los hongos basidiomicetes producen varios metabolitos con acción antifúngica. Particularmente, *Flammulina velutipes* – un hongo comestible – produce compuestos llamados enokipodinas que poseen actividad antimicrobiana, pero no se usan debido a su baja eficiencia. Por otro lado, se conoce que el micelio de *F. velutipes* y sus extractos acuosos contienen alta cantidad de carbohidratos de diferente composición y estructura. Estos compuestos son responsables de varias actividades medicinales de los hongos – basidiomicetos, tales como estimulación del sistema inmune, efecto anticancerígeno y antioxidante. El efecto antifúngico directo se desconoce para los carbohidratos de *F. velutipes*, pero los antecedentes de otros productos del origen natural demuestran que los poli – y monosacáridos inhiben el primer paso de la interacción célula huésped parasito – la adhesión del parasito. Por ello, estos compuestos pueden ser usados como farmacoterapia para prevenir o disminuir la propagación de la infección. La patente US2015126598 (A1) describe el uso del extracto del arándano como tratamiento de las infecciones de las vías urinarias. Se conoce que este efecto se produce debido a alto contenido de manosa en los extractos. En literatura se describen los efectos de la disminución de adhesión de varios patógenos por los extractos de plantas, por ejemplo, extractos acuosos de *Vernonia kotschyana*, *Cochlospermum tinctorium* y *Rhodomyrtus tomentosa*, que se atribuyen a la interacción entre los carbohidratos de los extractos con los receptores en la pared celular de los patógenos.

Hasta la fecha se desconocía este efecto para el micelio de *F. velutipes* y sus extractos acuosos. Por lo tanto el propósito de la presente innovación farmacológica (invento) revela la acción antifúngica de los componentes de *F. velutipes*.

## PROBLEMA TÉCNICO A RESOLVER

Los antifúngicos que se usan actualmente causan efectos secundarios. Además, los hongos patógenos presentan los mecanismos de resistencia a ellos, que genera el gasto para el

desarrollo de los nuevos medicamentos. Los extractos naturales del hongo *Flammulina velutipes*, son una alternativa que evita el utilizar los compuestos químicos sintéticos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 Figura 1. Efecto del extracto de *F. velutipes* sobre la producción de ROS por las células de la línea celular THP-1 (macrófagos humanos) se presenta de forma gráfica. Las barras representan los resultados del ensayo para determinar la concentración de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Se observa la disminución de ROS en presencia del extracto de *F. velutipes* que indica el efecto antioxidante.

10

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención pertenece al área de medicina, particularmente, se describe un nuevo uso del micelio de *F. velutipes* y/o sus extractos acuosos como antifúngico.

- 15 El proceso de obtención del micelio de *F. velutipes* es el siguiente:
- Se cultiva el micelio de *F. velutipes* en medio líquido con agitación constante durante 10-14 días, 20-24°C
  - El micelio se filtra en el filtro de papel, nylon u otro material parecido
  - El micelio se seca por liofilización
- 20 El extracto se obtiene a partir del micelio seco como se describe a continuación:
- El micelio seco se resuspende en el agua destilada. 20-40 partes de agua destilada : 1 parte del micelio
  - Para llevar a cabo la extracción la mezcla se sónica durante 1 h a 100-500 W o se calienta por 4 h a 100 °C.
- 25
- El micelio restante se separa de la fase acuosa por filtración o centrifugación.
  - La fase acuosa se enfría a 4 °C
  - A la fase acuosa se añade el alcohol etílico 70-90%. 1 parte de fase acuosa : 3-4 partes del alcohol
  - La mezcla se guarda al 4 °C por 24-48 horas
- 30
- El precipitado se separa por la centrifugación y se seca.

El extracto de inhibe la adhesión que es la primera etapa de la interacción célula huésped – parásito, debido a la interacción inespecífica entre los carbohidratos de extracto y la pared celular del hongo. Por lo tanto, se revela la acción antifúngica de los componentes de *F. velutipes* contra unos de los principales causantes de las micosis cutáneas – *Sporotrix schenkii* y *Candida albicans*.

Debido a que el micelio y su extracto provienen del origen natural estos presentan menos efectos adversos. Por lo tanto, puede ser administrado en forma oral como cutánea.

El rendimiento del extracto es de 3-5% después de la extracción del micelio

La composición del extracto de *F. velutipes* es de:

Carbohidratos. 95-96.7%

Proteínas: 2.9-3.1%

El micelio de *F. velutipes* y su extracto obtenido como se describe anteriormente, presentan otras dos actividades: la actividad inmunoestimulante y antioxidante. Respecto a la actividad inmunoestimulante, en presencia del extracto se aumenta la producción de las citocinas pro inflamatorias y se aumenta la capacidad fagocítica de las células de la inmunidad innata que es beneficioso para el tratamiento de las micosis. La actividad antioxidante del micelio de *F. velutipes* y su extracto se manifiesta en la reducción de las ROS que disminuye el daño al tejido cutáneo del paciente con micosis.

De igual manera, se presenta una composición farmacéutica en forma de crema para prevenir y tratar las infecciones superficiales causadas por los hongos patógenos, estimular la inmunidad innata y prevenir el daño a las células epiteliales causado por el estrés oxidativo.

Extracto de *F. velutipes* 150 – 300 µg

ó Micelio de *F. velutipes* 3.75 – 7.5 mg

Excipientes cbp 1 g

El micelio y extracto de *F. velutipes* se usa en el tratamiento de micosis, dentro de las cuales se encuentran: esporotricosis (*S. schenkii*) y candidiasis (*C. albicans*) cutáneas, así como otros tipos de micosis causados por los hongos patógenos y similares

## 5 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Para evaluar los efectos del extracto de *F. velutipes* sobre la adhesión de *Sporotrix schenkii* a las células epiteliales fue efectuado el siguiente experimento in vitro. La monocapa de las células de la línea celular L929 (fibroblastos) fue cultivada con *S. schenkii* en presencia (50, 100 o 150 µg/mL) o ausencia del extracto de *F. velutipes*.

- 10 Después de 1 h de la interacción (corresponde a la etapa inicial de la interacción – adhesión). La levadura no adherida fue cuantificada y la cantidad de las levaduras adheridas fue calculada como sigue:

*Cantidad de la levadura adherida = Cantidad inicial – Cantidad de levadura no adherida*

- 15 El porcentaje de adhesión comparando con control fue calculado como sigue:

*Porcentaje de adhesión = (Cantidad de la levadura adherida / Cantidad de la levadura adherida en control)\*100*

El porcentaje de la inhibición de adhesión comparando con control fue calculado como sigue:

- 20 *Porcentaje de la inhibición de adhesión = 100 – Porcentaje de adhesión*

Los resultados demostraron que cuando las células epiteliales (fibroblastos) fueron incubadas con la levadura de *S. schenckii* en presencia de los extractos de *F. velutipes* se observó disminución de la adhesión de forma dosis-dependiente (95.1, 92.5 y 87.3% para las concentraciones del extracto 50, 100 y 150 µg/mL respectivamente). Por lo tanto, la  
25 disminución de adhesión fue 4.9, 7.5 y 12.7% para el extracto de *F. velutipes*. La

disminución de la adhesión dependía de la concentración del extracto y fue mayor cuando se usó 150  $\mu\text{g}$  (equivale a 3.75 mg del micelio). La disminución de la adhesión del patógeno a las células epiteliales indica que el extracto y/o micelio de *F. velutipes* disminuye la adhesión del *S. schenckii* a las células epiteliales y el dicho efecto es útil para prevenir o tratar la micosis cutánea causada por *S. schenckii* en forma de crema, pomada o gel.

Ejemplo 2. Para evaluar los efectos del extracto de *F. velutipes* sobre la adhesión de *Candida albicans* a las células epiteliales fue efectuado el siguiente experimento *in vitro*.

10 La monocapa de las células de la línea celular L929 (fibroblastos) fue cultivada con *C. albicans* en presencia (50, 100 o 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o ausencia del extracto de *F. velutipes*. Después de 1 h de la interacción (corresponde a la etapa inicial de la interacción – adhesión). La levadura no adherida fue cuantificada y la cantidad de las levaduras adheridas, porcentaje de adhesión y porcentaje de la disminución de la adhesión fueron calculados como de describe en el ejemplo 1. Los resultados demostraron que cuando las  
15 células epiteliales fueron incubadas con *C. albicans* en presencia de los extractos de *F. velutipes*, la adhesión se disminuyó de manera significativa 94.8%. Por lo tanto, la disminución de adhesión fue 5.2%. La disminución de la adhesión no dependía de la concentración del extracto cuando se usó 100-150  $\mu\text{g}$  (equivale a 5-7.5 mg del micelio).  
20 Tomando en cuenta que los micosis causadas por *C. albicans* mayoritariamente son superficiales, el efecto de la disminución de la adhesión del patógeno a la células epiteliales por los extractos de *F. velutipes* es útil para elaborar una formulación para prevención o tratamiento del dicho padecimiento.

25 Ejemplo 3. Tomando en cuenta los resultados de los ejemplos 1 y 2, aquí presentamos un ejemplo de la composición farmacéutica en forma de crema para prevenir y tratar las infecciones superficiales causadas por los hongos patógenos.

Extracto de <i>F. velutipes</i>	150 – 300 µg
ó Micelio de <i>F. velutipes</i>	3.75 – 7.5 mg
Excipientes cbp	1 g

5 Ejemplo 4 Antioxidante. Uso del extracto de *F. velutipes* como antioxidante. Las células de la línea celular de macrófagos humanos (THP-1) fueron incubadas con el extracto de *F. velutipes* en presencia de 50µM de peróxido de hidrogeno. Inmediatamente después, en los pozos de la placa se formó espuma y los niveles de la producción de ROS disminuyeron hasta alcanzar los niveles sin el peróxido (Fig. 1). Este efecto observado fue,  
10 probablemente, por la reacción química entre los componentes del extracto con el peróxido. Por lo tanto el extracto de *F. velutipes* puede ser utilizado como antioxidante.

Ejemplo 5 Inmunoestimulante. Con fin de determinar los cambios de la activación de las células de la línea celular THP-1 (monocitos/macrófagos del humano) por los extractos de *F. velutipes* se realizó la determinación de la producción de las citocinas proinflamatorias  
15 Il-1β y Il-6. Las células THP-1 fueron incubadas en presencia de los extractos de *F. velutipes* (50, 100 y 150 µg/mL) durante 24 h. La producción de Il-1β y Il-6 fue evaluada mediante la técnica de ELISA directo. La producción de IL-1β por los monocitos se aumentó en presencia de los extractos fúngicos. El aumento fue 50, 57 y 64 % para las concentraciones 50, 100 y 150 µg/mL, respectivamente, comparando con el control sin  
20 extracto. La producción de Il-6 también aumentó y fue dosis independiente: 21% para todas las concentraciones usadas. Los resultados indican que los extractos de *F. velutipes* desencadenan la respuesta inflamatoria mediada por las células de la inmunidad innata.

Ejemplo 6 Inmunoestimulante. Con fin de detectar los cambios en otra actividad importante de los macrófagos – actividad fagocítica – en presencia de los extractos fúngicos se usó el  
25 método de la cuantificación de la levadura internalizada marcada previamente con un colorante fluorescente. Este método consiste en la medición de la fluorescencia que emitan las células de *C. albicans* marcadas con FITC después de ser fagocitadas por los macrófagos. La presencia del extracto de *F. velutipes* en el medio del cultivo provocó un aumento significativo de la actividad fagocítica de los macrófagos. El cambio de la

8

actividad en presencia del extracto fue 29.6, 36 y 48.5% para las concentraciones 50, 100 y 150  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Los resultados indican que los extractos de *F. velutipes* aumentan la capacidad fagocítica de los macrófagos que es beneficioso para el tratamiento de las micosis superficiales.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un extracto de *Flammulina velutipes* para usarse en el tratamiento de micosis cutánea del tipo esporotricosis (*S. schenckii*).
- 5 2. El extracto de *Flammulina velutipes* para usarse de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el extracto inhibe la adhesión que es la primera etapa de la interacción célula huésped-parásito, debido a la interacción inespecífica entre los carbohidratos de extracto y la pared celular del hongo.
- 10 3. El extracto de *Flammulina velutipes* para usarse de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el extracto se compone de 95-96.7% de carbohidratos y 2.9-3.1% de proteínas.
- 15 4. Uso de un extracto de *Flammulina velutipes* para preparar una composición farmacéutica útil en el tratamiento de la micosis cutánea causada por los hongos patógenos *Sporotrix schenckii*, en donde dicha composición farmacéutica contiene 150-300 µg de extracto de *F. velutipes* y 1 g de excipientes cbp.

**RESUMEN**

La presente invención se trata del uso del micelio de *Flammulina velutipes* y sus extractos acuosos como antifúngicos. El micelio y sus extractos no presentan efectos secundarios comparados con los fármacos químicos sintéticos. La capacidad de *F. velutipes* para inhibir la adhesión de patógenos al huésped, puede ser utilizado para elaborar formulaciones farmacéuticas que serán usados como farmacoterapia complementaria en las diversas infecciones causadas por hongos patógenos que se presentan con una alta incidencia en nuestro país.

FIGURAS

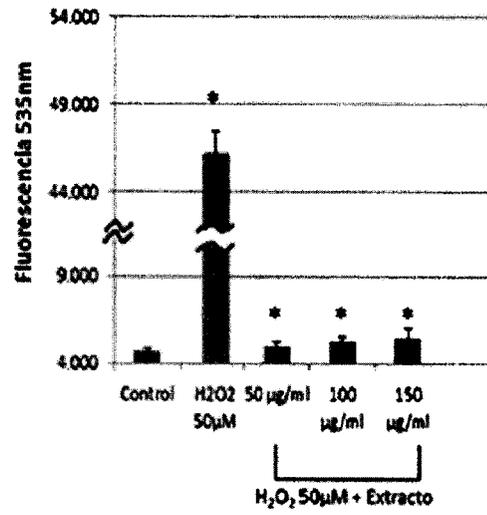


Figura 1