



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020014754-4 A2



(22) Data do Depósito: 20/07/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 01/02/2022

(54) Título: INIBIDOR DE ISOCITRATO LIASE PARA O TRATAMENTO DE MICOSSES

(51) Int. Cl.: C07D 311/86; A61P 31/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

(72) Inventor(es): LUCIANE SUSSUCHI DA SILVA; LÍVIA DO CARMO SILVA; UESSILEY RIBEIRO BARBOSA; MARISTELA PEREIRA; ROOSEVELT ALVES DA SILVA; CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES.

(57) Resumo: INIBIDOR DE ISOCITRATO LIASE PARA O TRATAMENTO DE MICOSSES. A presente invenção refere-se a um antifúngico inibidor da atividade de isocitrato liase e do crescimento de *Paracoccidioides* spp., o qual poderá ser utilizado no tratamento da Paracoccidioidomicose e de outras micoses. O composto apresentado neste invento, preparado a partir da reação de condensação aldólica, propõe mecanismo de atuação diferente dos antifúngicos utilizados atualmente, com alvo a proteína isocitrato liase, a qual está presente em fungos e ausente em humanos, apresenta baixa citotoxicidade e alto índice de seletividade.

Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses

Relatório descritivo

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se a um antifúngico inibidor da atividade de isocitrato liase e do crescimento de *Paracoccidioides* spp. que poderá ser utilizado no tratamento da Paracoccidioidomicose e de outras micoses.

Problemas que a invenção se propõe a resolver

[002] As atuais terapias antifúngicas empregadas no tratamento de Paracoccidioidomicose e de outras várias micoses sistêmicas são relacionadas a alta toxicidade e efeitos colaterais. Além disso, é conhecida a existência de isolados resistentes a estes antifúngicos, os quais são limitados a alvos como membrana plasmática, parede celular, síntese proteica, DNA e ácido fólico. A invenção propõe um composto com propriedade antifúngica, o qual apresenta um novo mecanismo de ação com alvo a isocitrato liase, uma proteína presente em fungos e ausente em humanos, portanto seletivo para células fúngicas.

Estado da técnica

[003] As infecções fúngicas vêm aumentando gradativamente nos últimos anos, tornando um relevante problema de saúde pública (M. Prado et al. 2009). Muitas dessas infecções são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, as quais estão associadas ao atual arsenal antifúngico limitado e à alta toxicidade dos compostos (Nett e Andes 2016). Além disso, a identificação de novos alvos de medicamentos é desafiadora, porque há muitas semelhanças entre células fúngicas e humanas. Os alvos antifúngicos mais comuns incluem síntese de RNA e componentes da parede e membrana celular, embora novos alvos antifúngicos estejam sendo investigados (Parente-Rocha et al. 2017). No entanto, os fungos desenvolveram mecanismos de resistência, como a superexpressão de alvos, formação de biofilmes, incompatibilidade dos alvos, indução

nos transportadores de drogas, alterações metabólicas e na permeabilidade celular (Revie et al. 2018) enfatizando a importância da descoberta de novos compostos que atuam em alvos diferentes dos atuais.

[004] A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose altamente prevalente na América do Sul, particularmente no Brasil, causada por *Paracoccidioides* spp. (Giacomazzi et al. 2016; Martinez 2015). Os tratamentos comuns contra a PCM são baseados em anfotericina B (AmB), sulfonamidas e azóis (Shikanai-Yasuda 2015). Contudo, estes compostos antifúngicos requerem administração a longo prazo e têm apresentada várias desvantagens, como baixa eficiência, desenvolvimento de cepas de fungos resistentes e toxicidade (Hahn et al. 2003; Shikanai-Yasuda et al. 2017). Este cenário tem levado à busca de alvos e inibidores de proteínas mais específicos contra *Paracoccidioides* spp.

[005] Há importantes trabalhos desenvolvidos objetivando a identificação de novos alvos antifúngicos contra *Paracoccidioides* spp. tal como 1,3- β -D-glucano sintase (Tomazett et al. 2010), (S) -adenosil-L-metionina: esterol C24 metil transferase (Pereira et al. 2010), malato sintase (Zambuzzi-Carvalho et al. 2009) e isocitrato-liase (R. S. do Prado et al. 2014). No entanto nenhum deles seguiram para os passos seguintes do desenvolvimento de fármacos.

[006] A enzima isocitrato-liase (ICL) catalisa a clivagem do isocitrato em glioxilato e succinato. Sabe-se que todo o ciclo do glioxilato está envolvido na virulência e patogenicidade dos agentes patogênicos bactérias e fungos. A ausência da enzima ICL nos mamíferos e sua posição chave no ciclo do glioxilato a torna um alvo interessante para o desenho de inibidores específicos que são mais seletivos contra esses patógenos e tem menos efeitos colaterais (Dunn, Ramirez-Trujillo, e Hernandez-Lucas 2009).

[007] A triagem virtual baseada na estrutura do alvo a partir de bibliotecas químicas de metabólitos secundários tem sido aplicada com sucesso na identificação de compostos com atividade antifúngica (Costa et al. 2015; Bueno et al. 2019; Lavecchia e Di Giovanni 2013). A associação desta técnica com outras metodologias computacionais, como simulação de dinâmica molecular (MD), é uma ferramenta poderosa para descoberta de novos fármacos (Ferreira et al. 2015).

Descrição da invenção

[008] Este produto apresenta vantagens em relação aos comercializados uma vez que foi projetado para atuar em um novo alvo nas células fúngicas e ausente em humanos, resultando em uma menor toxicidade.

[009] Para a identificação do composto inibidor de isocitrato liase de *Paracoccidioides* spp. (*PbICL*), foi empregado o rastreo virtual, o qual é realizado empregando a modelagem por homologia e simulações de dinâmica molecular, aplicadas para investigar a flexibilidade estrutural, interações da estrutura química do composto e sua ligação na *PbICL*.

[010] Um modelo baseado em homologia para *PbICL* (UNIPROT: Q5YLB6) foi construído com o servidor I-TASSER. O escore C foi aplicado para avaliar a confiança do modelo previsto e o TM-score foi utilizado para medir a semelhança. A qualidade da estrutura prevista foi validada pelo servidor MolProbity.

[011] Simulações de dinâmica do modelo de homologia de *PbICL* foram realizadas na ausência e presença do cofator Mg^{2+} no GROMACS 5.1.2 usando o campo de força Amber99SB-IDLN. Todos os sistemas foram neutralizados com Na^+ ou Clions e cercados por uma caixa retangular de água TIP3P estendida a 10 Å de qualquer átomo de proteína. Procedimentos de minimização sem restrições foram realizados com 5000 degraus mais íngremes ou até uma tolerância de 250 kJ / mol. Os sistemas foram submetidos ao termostato v-rescale a 300K durante 100 ps da simulação NVT e ao acoplamento do barostato Parrinello – Raman a 1 bar durante 100 ps de simulação NPT com restrições de proteínas. Foram realizadas etapas de equilíbrio de 1 ns e etapas de produção de 100 ns para sistemas de proteínas sem restrições. As ligações contendo átomos de hidrogênio foram restringidas pelo algoritmo LINCS, ponto de corte de 10 Å e método Ewald foram aplicados. Os estados de protonação dos modelos foram definidos de acordo com o H^{++} servidor. As análises de trajetória foram realizadas com ferramentas e gráficos GROMACS construídos no Gnuplot.

[012] Trajetórias das simulações de dinâmica molecular do modelo de homologia *PbICL* foram submetidas à análise de agrupamento com o algoritmo gromos, aplicando um ponto de corte de 0,3 nm. De acordo com essa análise, um modelo *PbICL* estável foi selecionado

para a proteína na ausência (*PbICL* noMg) e na presença (*PbICL* Mg) de Mg^{+2} . Além disso, outra estrutura foi selecionada entre as estruturas de aglomerados da trajetória MD com Mg^{2+} com um ponto de corte de 0,2 nm e considerando o menor escore energético de ligação a isocitrato (*PbICL* MgControl). Parâmetros de grade e hidrogênio polar foram contruídas com ferramentas de AutoDock. A grade foi centrada no bolso do local de ligação Mg^{2+} e construída abrangendo todo a cavidade catalítica e sua superfície circundada. Números e cálculos da área de superfície acessível a solventes dos modelos *PbICL* foram realizados via PyMOL (PyMOLTM Molecular Graphics System, Versão 1.7.2.1 Schrodinger, LLC). O servidor CASTp foi utilizado para medir o volume da superfície acessível a solvente dos modelos *PbICL* submetidos a o protocolo de triagem virtual.

[013] Todos os parâmetros de ligantes para simulações de MD foram obtidos usando o conjunto de antecâmara e parmcheck implementado na AMBER 14. Hidrogênio ausente átomos foram adicionados anteriormente com o software Avogadro, a carga líquida adequada AM1-BCC foram calculadas para cada ligante. As topologias GROMACS desses ligantes foram preparadas com ACPYPE. As simulações de Dinâmica molecular foram realizadas seguindo descrições anteriores da enzima com restrições proteína-ligante em etapas de NVT e NPT. Dinâmica molecular do ligante-proteína foi realizado por 50 ns com isocitrato e os compostos selecionado na triagem virtual. As análises das interações proteína-ligante foram realizadas no Discovery Studio.

[014] Compostos provenientes de um banco de dados público foram selecionados para a triagem virtual baseada em estrutura no AutoDock Vina. Todos os parâmetros de ligantes para simulações de MD foram obtidos usando o conjunto de antecâmara e parmcheck implementado na AMBER 14. Hidrogênio ausente átomos foram adicionados anteriormente com o software Avogadro, a carga líquida adequada AM1-BCC foram calculadas para cada ligante. As topologias GROMACS desses ligantes foram preparadas com ACPYPE. As simulações de Dinâmica molecular foram realizadas seguindo descrições anteriores da enzima com restrições proteína-ligante em etapas de NVT e NPT. Dinâmica molecular do ligante-proteína foi realizado por 50 ns com isocitrato e os compostos selecionados na triagem virtual. As análises das interações proteína-ligante

foram realizadas no Discovery Studio.

[015] O protocolo de triagem virtual baseado em estrutura com eficiência de amostragem aprimorada com 100 simulações independentes adicionais para os 100 melhores ligantes com a menor pontuação energética, classificada por AutoDock Vina.

[016] Dentre os compostos testados nos ensaios biológicos, (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11-one. Estrutura smile: O=c1oc2cccc2c(O)c1[C@@H]1c2cccc2Oc2c1c(=O)oc1cccc21, apresentou melhor resultado. o composto foi preparado a partir da reação de condensação aldólica utilizando-se 2 mmol (0,324 g) de 4-hidroxycumarina e 1 mmol (0,106) de benzaldeído em 6mL de etanol e sob refluxo por 24 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, o sólido foi recristalizado.

[017] A produção da proteína *PbICL* recombinante foi realizada usando o plasmídeo pET-32a e transformadas em células *E. coli* BL21 C43. A expressão da proteína foi induzida a 36°C, por 2 horas com posterior adição de 1 mM de isopropil-tio-p-D-galactósido (IPTG). As células foram colhidas por centrifugação a 10 000× g por 5 min a 4 °C, ressuspensa em tampão PBS. A solubilização foi realizada utilizando 100 µg/mL de lisozima com 30 minutos de incubação. Posteriormente, ciclos de sonicação foram aplicados a lise celular. A proteína *PbICL* recombinante foi purificada após centrifugação a 8000 × g por 15 min a 4 °C usando o Kit de Spin Ni-NTA. A atividade da ICL foi determinada de acordo com Prado et al. (R. S. do Prado et al. 2014) utilizando 2 mM Trereo-D, L-isocitrato, 2 mM MgCl₂, 10 mM fenil-hidrazina HCl, 2 mM de ditioneitol, tampão Tris HCl 50 mM (pH 7,0) e 10 µg de *PbICL* recombinante. A produção do produto glioxilato-fenil-hidrazona foi monitorada utilizando o comprimento de onda de 324 nm, 37 °C após adição de treó-D, L-isocitrato como substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a formação de 1 µmol de glioxilato-fenil-hidrazona por minuto. As atividades específicas foram dadas como U.mg⁻¹ de proteína (Tabela 1).

[018] A determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi realizada pela técnica de microdiluição, seguindo o protocolo de (Silva et al. 2018) e recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As células foram centrifugadas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; Na₂HPO₄ 0,09%, 0,02%

KH₂PO₄, 0,8% NaCl, 0,02% KCl, pH 7,2) e subcultivadas em meio quimicamente definido RPMI 1640 por 16 h a 37 °C sob agitação para adaptação das células fúngicas ao novo meio. A suspensão fúngica na concentração final de 1×10^5 células /mL foram incubadas com diferentes diluições dos compostos. O controle positivo (crescimento de fungos) foi realizado na presença apenas do meio RPMI 1640 e o controle negativo na presença de itraconazol. As placas foram mantidas a 36 °C sob agitação por 48 h. Posteriormente, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina a 0,02% e as amostras foram incubadas por mais 24 horas a 36°C sob agitação. Os resultados foram determinados visualmente no ponto em que não houve alteração na cor azul original do reagente. Para determinar a concentração fungicida mínima, uma subcultura foi realizada transferindo 20 µL do MIC correspondente a uma placa de Petri contendo meio Fava-Netto sólido. O controle positivo também foi cultivado. As placas foram incubadas a 37 °C por 7 dias, com leitura visual subsequente. A menor concentração em que o crescimento de fungos não foi visualizado foi utilizado para definir a concentração fungicida mínima (Tabela 2).

[019] A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada em células BALB/c 3T3. As células BALB/c 3T3 foram distribuídas em microplacas de 96 poços, em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico. As células foram expostas às concentrações seriadas das chalconas, por 48 horas, mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂, a 37 °C. Em cada micropoço será adicionada solução de resazurina 0,02% procedendo a incubação por 24 horas nas mesmas condições do ensaio, sendo realizada a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 640 nm e 530 nm (Tabela 2).

[020] Tabela 1. Ensaio biológico do composto (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11-one.

Ensaio biológico	Amostra	Resultado
CIM	<i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pb01)	7,3
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)	15,6
CFM	<i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pb01)	7,3
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)	15,6
CC	BalbC/3T3	125
IS	<i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pb01)	17,6

	<i>Paracoccidioidebrasiliensis</i> (Pb18)	10,1
PbICL (% inibição)	<i>Isocitrato liase recombinante</i>	Inibição de 100%

[021] CIM-concentração inibitória mínima, CFM – Concentração fungicida mínima, CC -Concentração inibitória, IS- Índice de seletividade. % de inibição referente a concentração de 62,5 µg/mL.

[022] Tabela 2. Análise de similaridade sequencial de isocitrato liase de *Paracoccidioides brasiliensis* com outros fungos.

Isocitrato liase	Cobertura	E valor	% identidade	Acesso
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	100%	0.0	100.00	AAQ75802.3
<i>Paracoccidioides lutzii</i> Pb01	100%	0.0	99.81	XP_002791040.1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	100%	0.0	98.70	EEH20734.1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	100%	0.0	98.51	XP_010757468.1
<i>Histoplasma capsulatum</i> H143	100%	0.0	91.06	EER45265.1
<i>Coccidioides immitis</i> RS	99%	0.0	88.04	XP_001248217.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	100%	0.0	84.92	CAA44572.1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	100%	0.0	85.10	XP_751480.1
<i>Candida albicans</i> P94015	99%	0.0	68.16	KGQ91714.1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	99%	0.0	60.67	OWZ49347.1

[023] Referências

[024] Bueno, Paulo Sérgio Alves, Franciele Abigail Vilugron Rodrigues, Jessyka Lima Santos, Fernanda Canduri, Débora Carina Biavatti, Arethusa Lobo Pimentel, Mariane Cristóvão Bagatin, Érika Seki Kioshima, Gisele de Freitas Gauze, e Flavio Augusto Vicente Seixas. 2019. “New Inhibitors of Homoserine Dehydrogenase from *Paracoccidioides Brasiliensis* Presenting Antifungal Activity”. *Journal of Molecular Modeling* 25 (11): 325. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4221-2>.

[025] Costa, Fausto Guimaraes, Benedito Rodrigues da Silva Neto, Ricardo Lemes Gonçalves, Roosevelt Alves da Silva, Cecília Maria Alves de Oliveira, Lucília Kato,

Carla dos Santos Freitas, et al. 2015. “Alkaloids as Inhibitors of Malate Synthase from *Paracoccidioides* Spp.: Receptor-Ligand Interaction-Based Virtual Screening and Molecular Docking Studies, Antifungal Activity, and the Adhesion Process”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (9): 5581–94. <https://doi.org/10.1128/AAC.04711-14>.

[026] Dunn, M. F., J. A. Ramirez-Trujillo, e I. Hernandez-Lucas. 2009. “Major Roles of Isocitrate Lyase and Malate Synthase in Bacterial and Fungal Pathogenesis”. *Microbiology* 155 (10): 3166–75. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030858-0>.

[027] Ferreira, Leonardo, Ricardo dos Santos, Glaucius Oliva, e Adriano Andricopulo. 2015. “Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies”. *Molecules* 20 (7): 13384–421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.

[028] Giacomazzi, Juliana, Ludmila Baethgen, Lilian C. Carneiro, Maria Adelaide Millington, David W. Denning, Arnaldo L. Colombo, Alessandro C. Pasqualotto, e in association with the LIFE program. 2016. “The Burden of Serious Human Fungal Infections in Brazil”. *Mycoses* 59 (3): 145–50. <https://doi.org/10.1111/myc.12427>.

[029] Hahn, Rosane Christine, Yvelise Teresinha Morato Conceição, Niriana Lara Santos, Jussara Fialho Ferreira, e Júnia Soares Hamdan. 2003. “Disseminated *Paracoccidioidomycosis*: Correlation between Clinical and in Vitro Resistance to Ketoconazole and Trimethoprim Sulphamethoxazole”. *Mycoses* 46 (8): 342–47.

[030] Lavecchia, A., e C. Di Giovanni. 2013. “Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review”. *Current Medicinal Chemistry* 20 (23): 2839–60.

[031] Martinez, Roberto. 2015. “Epidemiology of *Paracoccidioidomycosis*”. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57 (suppl 19): 11–20. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>.

[032] Nett, Jeniel E., e David R. Andes. 2016. “Antifungal Agents”. *Infectious Disease Clinics of North America* 30 (1): 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>.

[033] Parente-Rocha, Juliana Alves, Alexandre Melo Bailão, André Correa Amaral, Carlos Pelleschi Taborda, Juliano Domiraci Pაცეზ, Clayton Luiz Borges, e Maristela

Pereira. 2017. “Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi”. *Mediators of Inflammation* 2017: 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/9870679>.

[034] Pereira, Maristela, Zhihong Song, Ludier Kesser Santos-Silva, Mathew H. Richards, Thi Thuy Minh Nguyen, JiaLin Liu, Celia Maria de Almeida Soares, Aline Helena da Silva Cruz, Kulothungan Ganapathy, e W. David Nes. 2010. “Cloning, Mechanistic and Functional Analysis of a Fungal Sterol C24-Methyltransferase Implicated in Brassicasterol Biosynthesis”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (10): 1163–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.06.007>.

[035] Prado, Marli, Marcelo Barbosa da Silva, Ruy Laurenti, Luiz R Travassos, e Carlos P Taborda. 2009. “Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (3): 513–21. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300019>.

[036] Prado, Renata Silva do, Ricardo Justino Alves, Cecília Maria Alves de Oliveira, Lucília Kato, Roosevelt Alves da Silva, Guilherme Oliveira Quintino, Silvio do Desterro Cunha, Célia Maria de Almeida Soares, e Maristela Pereira. 2014. “Inhibition of *Paracoccidioides Lutzii* Pb01 Isocitrate Lyase by the Natural Compound Argentilactone and Its Semi-Synthetic Derivatives”. Organizado por Yanchang Wang. *PLoS ONE* 9 (4): e94832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094832>.

[037] Revie, Nicole M, Kali R Iyer, Nicole Robbins, e Leah E Cowen. 2018. “Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact”. *Current Opinion in Microbiology* 45 (outubro): 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>.

[038] Shikanai-Yasuda, Maria Aparecida. 2015. “Paracoccidioidomycosis treatment”. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57 (suppl 19): 31–37. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700007>.

[039] Shikanai-Yasuda, Maria Aparecida, Rinaldo Pôncio Mendes, Arnaldo Lopes Colombo, Flávio de Queiroz-Telles, Adriana Satie Gonçalves Kono, Anamaria M. M

Paniago, André Nathan, et al. 2017. “Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50 (5): 715–40. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>.

[040] Silva, Livia C, Bruno J Neves, Marcelo N Gomes, Cleber C Melo-Filho, Célia MA Soares, Carolina H Andrade, e Maristela Pereira. 2018. “Computer-Aided Identification of Novel Anti-Paracoccidioidomycosis Compounds”. *Future Microbiology* 13 (13): 1523–35. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0175>.

[041] Tomazett, Patrícia Kott, Carlos Roberto Félix, Henrique Leonel Lenzi, Fabrícia de Paula Faria, Célia Maria de Almeida Soares, e Maristela Pereira. 2010. “1,3-β-d-Glucan Synthase of Paracoccidioides Brasiliensis: Recombinant Protein, Expression and Cytolocalization in the Yeast and Mycelium Phases”. *Fungal Biology* 114 (10): 809–16. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.07.007>.

[042] Zambuzzi-Carvalho, Patrícia Fernanda, Aline Helena Da Silva Cruz, Ludier Kesser Santos-Silva, Alfredo Miranda Goes, Célia Maria De Almeida Soares, e Maristela Pereira. 2009. “The Malate Synthase of *Paracoccidioides Brasiliensis* Pb 01 Is Required in the Glyoxylate Cycle and in the Allantoin Degradation Pathway”. *Medical Mycology* 47 (7): 734–44. <https://doi.org/10.3109/13693780802609620>.

Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses

Reivindicações

1. Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses **caracterizada por** (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11 apresentar efeito inibitório sobre a isocitrato liase de *Paracoccidioides* spp.
2. Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses **caracterizada por** (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11-one apresentar atividade antifúngica contra *Paracoccidioides* spp, apresentando efeito fungicida e baixa toxicidade em células de mamíferos.
3. Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses **caracterizada por** (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11-one atuar em isocitrato liase, com base na alta similaridade com isocitrato liase de outros fungos.
4. Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses **caracterizada por** (12S)-12-(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-11,12-dihydro-5,10-dioxatetraphen-11-one atuar em proteínas alvos diferentes podendo assim ser empregado em terapias combinatórias com antifúngicos azólicos e poliênicos no tratamento de micoses.

Inibidor de isocitrato liase para o tratamento de micoses**Resumo**

A presente invenção refere-se a um antifúngico inibidor da atividade de isocitrato liase e do crescimento de *Paracoccidioides* spp., o qual poderá ser utilizado no tratamento da Paracoccidioidomicose e de outras micoses. O composto apresentado neste invento, preparado a partir da reação de condensação aldólica, propõe mecanismo de atuação diferente dos antifúngicos utilizados atualmente, com alvo a proteína isocitrato liase, a qual está presente em fungos e ausente em humanos, apresenta baixa citotoxicidade e alto índice de seletividade.