

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/198992 A1

(43) Fecha de publicación internacional
18 de diciembre de 2014 (18.12.2014) **WIPO | PCT**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
C07J 9/00 (2006.01) *A61K 31/575* (2006.01)
C08G 77/04 (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2014/070490
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
13 de junio de 2014 (13.06.2014)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201330893 14 de junio de 2013 (14.06.2013) ES
- (71) **Solicitantes:** **UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela, La coruña (ES). **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO** [MX/MX]; Ciudad Universitaria- Delegación Coyoacán, Mexico Distrito Federal (MX).
- (72) **Inventores:** **SEGURA, Tania**; Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **BURILLO, Guillermina**; Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **ALVAREZ LORENZO, Carmen**; Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **CONCHEIRO NINE, Angel**; Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES). **PUGA GIMENEZ DE AZCARATE, Ana M**; Edificio Emprendia, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).
- (74) **Mandatario:** **TORRENTE VILASANCHEZ, Susana**; Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (ES).
- (81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) **Title:** BIOINSPIRED ANTIFUNGAL SYSTEMS

(54) **Título :** SISTEMAS ANTIFÚNGICOS BIOINSPIRADOS

(57) **Abstract:** Bioinspired antifungal systems. The invention relates to novel systems based on substrates containing covalently bonded ergosterol molecules that can comprise antifungal compounds imitating the joining of the antifungal agent to the wall of the fungi. When the systems of the invention loaded with antifungal agents are in the presence of fungi, the transfer process is accelerated as a competition is established for the antifungal agent between the ergosterol of the systems of the invention and the ergosterol of the wall of the fungi. The systems according to the invention are useful for the prevention of colonisation by fungi and/or for the treatment of infections by fungi, in applications such as systems for the release of antifungal active substances, and packagings or coverings for work surfaces.

(57) **Resumen:** Sistemas antifúngicos bioinspirados. La presente invención se refiere a nuevos sistemas basados en sustratos que contienen moléculas de ergosterol covalentemente unidas y que son capaces de incorporar compuestos antifúngicos imitando la unión del antifúngico a la pared de los hongos. Cuando los sistemas de la invención cargados con antifúngicos están en presencia de hongos se acelera el proceso de cesión al establecerse una competencia por el antifúngico entre el ergosterol de los sistemas de la invención y el ergosterol de la pared de los hongos. Los sistemas según la invención son útiles para la prevención de la colonización por hongos y/o el tratamiento de infecciones por hongos, en aplicaciones como sistema de liberación de ingredientes activos antifúngicos, y embalajes o recubrimiento de superficies de trabajo.



WO 2014/198992 A1

Sistemas antifúngicos bioinspirados

Sector de la técnica

La presente invención se dirige a sistemas para la prevención de la colonización por hongos y/o al tratamiento antifúngico.

Antecedentes de la invención

Las infecciones por hongos todavía son una importante causa de mortalidad y originan un considerable coste a los sistemas de salud. La mayor incidencia se produce en individuos con el sistema inmune deprimido y en individuos que deben utilizar dispositivos médicos como por ejemplo catéteres, sondas o implantes. Algunos microorganismos pueden adherirse fácilmente a estos dispositivos médicos y crecer sobre su superficie formando biofilms difíciles de eliminar, lo que puede conducir a infecciones locales o incluso sistémicas. En el ámbito de la alimentación, la contaminación por hongos tiene también una gran trascendencia sanitaria y económica.

Una solución del estado de la técnica es dotar a las superficies de los dispositivos médicos, a los plásticos o materiales destinados a entrar en contacto con alimentos, de compuestos antifúngicos. Esto puede realizarse mediante el depósito de sustancias que contienen antifúngicos sobre las superficies antes mencionadas, como por ejemplo mediante impregnación o mediante unión electrostática del antifúngico a una superficie sobre la que se ha adsorbido un surfactante catiónico. Otra opción es funcionalizar dichas superficies y unir el antifúngico de modo que se puedan ceder cantidades más elevadas de antifúngico en fases tempranas para evitar la colonización y que se mantenga liberación durante un tiempo prolongado.

En *Acta Biomaterialia*, **2010**, 6, 1398-1404, se describen materiales basados en polipropileno y polietileno funcionalizados con ciclodextrinas las cuales están cargadas con miconazol para prevenir la formación de biofilm de *Candida albicans*. Sin embargo, en estos sistemas la capacidad de carga del antifúngico está limitada por la afinidad de la ciclodextrina, y por otro lado, cuando el dispositivo médico está en contacto con los fluidos corporales del individuo el antifúngico se libera aunque no exista una infección por hongos, por lo que el individuo recibe una dosis de medicamento que no necesita.

En *Mycopathologia*, **2010**, 169 (3), 167-74, los autores describen la incorporación de nistatina y miconazol a polidimetilsiloxano mediante dos técnicas: a) curado del

polidimetilsiloxano en presencia de una disolución del antifúngico, y b) impregnación del polidimetilsiloxano con una disolución del antifúngico. En ninguno de los dos casos hay una unión covalente del polidimetilsiloxano con el antifúngico, y además en el método b) es necesario añadir un disolvente orgánico para hinchar el polímero y hacer posible así que la impregnación se efectiva. Un disolvente recurrente en este caso es el diclorometano, contaminante y volátil. Por otro lado, estos sistemas liberan el antifúngico aunque el hongo no esté presente y no sea necesario el tratamiento.

Descripción breve de la invención

- 10 Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos sistemas basados en sustratos que contienen moléculas de ergosterol covalentemente unidas y son capaces de incorporar compuestos antifúngicos. Una ventaja de la invención es que los sistemas de la invención son capaces de incorporar compuestos antifúngicos en su superficie en una densidad superior en comparación con otros sistemas del estado de la técnica.
- 15 Más en concreto, y dado que las moléculas de ergosterol tienen cierta afinidad por compuestos antifúngicos, cuando los sistemas de la invención están en presencia de hongos se genera una competencia con el ergosterol de los sistemas de la invención. Y así, una ventaja adicional de los sistemas de la invención es que la liberación del compuesto antifúngico tiene lugar solamente en presencia de hongos, y por el contrario,
- 20 el compuesto antifúngico se mantiene asociado al sistema en ausencia de hongos. Así, en un aspecto la invención se dirige a un sistema que comprende un sustrato, donde dicho sustrato se une a moléculas de ergosterol mediante enlaces covalentes. En otro aspecto la invención se dirige a un implante, un dispositivo médico, catéter, film y a lentes de contacto que comprenden un sistema como se ha descrito anteriormente.
- 25 En otro aspecto la invención se dirige a un envoltorio o recubrimiento de dispositivos médicos, un recubrimiento de sistemas de liberación, un recubrimiento de alimentos, un envase de alimentos o complementos nutricionales, un cosmético o recubrimiento de cosméticos, o un recubrimiento de superficies de trabajo que comprende un sistema como se ha descrito anteriormente.
- 30 En otro aspecto la invención se dirige al uso de un sistema como se ha descrito anteriormente, como sistema de liberación de ingredientes activos antifúngicos.

Un aspecto adicional de la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un sistema como se ha descrito anteriormente, que comprende una reacción entre el ergosterol y un sustrato funcionalizado.

5 Descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes SEM de laminas de goma de silicona no modificada (A), de laminas de goma de silicona TAS206 modificada con glicidilmetacrilato (B) y de goma de silicona TAS206 modificada con glicidilmetacrilato (GMA) y con ergosterol inmovilizado (C), a diferentes ampliaciones.

10 **Figura 2A.** Cantidades de natamicina incorporada a láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (◁TAS156, ◇TAS285) o con ergosterol inmovilizado (TAS188 ▼ 45.2 mg/g; TAS219 ◀ 69.5 mg/g; TAS159 ▲ 110.4 mg/g; TAS253 ► 100.8 mg/g).

15 **Figura 2B.** Cantidades de miconazol incorporado a láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (TAS287 ◁) o con ergosterol inmovilizado (TAS113 ■ 15.2 mg/g; TAS251 □ 53.4 mg/g; TAS203 ◆ 74.7 mg/g; TAS217 ● 100.5 mg/g).

20 **Figura 2C.** Cantidades de nistatina incorporada a láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (TAS277 ◁) o con ergosterol inmovilizado (TAS113 ■ 15.2 mg/g; TAS251 □ 53.4 mg/g; TAS203 ◆ 74.7 mg/g; TAS217 ● 100.5 mg/g).

25 **Figura 3A.** Perfiles de cesión de natamicina en tampón HEPES a partir de láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (◁TAS156, ◇TAS285) o con ergosterol inmovilizado (TAS188 ▼ 45.2 mg/g; TAS219 ◀ 69.5 mg/g; TAS159 ▲ 110.4 mg/g; TAS253 ► 100.8 mg/g).

30 **Figura 3B.** Perfiles de cesión de natamicina en dispersión de liposomas de ergosterol en tampón HEPES a partir de láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (◁TAS156, ◇TAS285) o con ergosterol inmovilizado (TAS188 ▼ 45.2 mg/g; TAS219 ◀ 69.5 mg/g; TAS159 ▲ 110.4 mg/g; TAS253 ► 100.8 mg/g).

Figura 3C. Perfiles de cesión de nistatina en tampón HEPES a partir de láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol

(TAS277◁) o con ergosterol inmovilizado (TAS198■ 14 mg/g; TAS213□ 67.5 mg/g; TAS210◆ 86.3 mg/g; TAS160● 104.3 mg/g).

Figura 3D. Perfiles de cesión de nistatina en dispersión de liposomas de ergosterol en tampón HEPES a partir de láminas de goma de silicona (SR) sin funcionalizar (○), y de láminas de SR-g-GMA sin ergosterol (TAS277◁) o con ergosterol inmovilizado (TAS198■ 14 mg/g; TAS213□ 67.5 mg/g; TAS210◆ 86.3 mg/g; TAS160● 104.3 mg/g).

Figura 4. Resultados de los ensayos microbiológicos llevados a cabo con *Aspergillus fumigatus* (fila superior) y con *Candida albicans* (fila inferior). Los discos de goma de silicona, SR, no dieron lugar a halos de inhibición (fotos A1 y A2). Los discos de SR cargados con 0.37 mg/g de nistatina provocaron pequeños halos de inhibición (fotos B1 y B2). Los discos de SR-g-GMA con 53.4 mg/g de ergosterol inmovilizado (TAS251) incorporaron 0.71 mg/g de nistatina y dieron lugar a halos de inhibición mucho mayores (C1 y C2).

15 Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno sin insaturaciones, de 1 a 12, preferiblemente de uno a ocho, átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, que opcionalmente puede estar sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo heteroalquilo, un grupo alquenilo, un grupo heterocíclico o CF₃, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, ciclopropilo, etc.

“Alquenilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que posee de, salvo que se indique otra cosa, entre 1 y 3 grupos alqueno, de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6 átomos de carbono. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo amino, un grupo heteroalquilo o CF₃, por ejemplo, etenilo, *n*-propenilo, *n*-butenilo, *n*-pentenilo, etc.

"Alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que posee de, salvo que se indique otra cosa, entre 1 y 2 grupos alquino, de 3 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 6 átomos de carbono. Los radicales alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más
5 sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo amino, un grupo heteroalquilo o CF_3 , por ejemplo, propinilo, n-butinilo, n-pentinilo, etc.

"Arilo" se refiere a un hidrocarburo aromático de 6 a 10 átomos de carbono, tal como
10 fenilo o naftilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo alquilo o CF_3 .

"Arilalquilo" se refiere a uno o varios grupos arilo unidos al resto de la molécula
15 mediante un radical alquilo, por ejemplo, bencil, 3-(fenil)-propil, etc.

"Heterociclo" se refiere a un anillo estable de 3 a 15 miembros formado por átomos de carbono y entre 1 a 5 heteroátomos escogidos entre oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 5 miembros formado por uno o más heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, los grupos heterociclo pueden ser sistemas monocíclicos, bicíclicos o
20 tricíclicos, que pueden incluir anillos fusionados; y el átomo de azufre en el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado; y el radical heterociclo puede estar parcial o totalmente saturado. Los radicales heterociclos pueden ser aromáticos (por ejemplo, pueden tener uno o más anillos aromáticos) en cuyo caso se consideran como "heteroarilos" para los propósitos de la presente invención. El anillo heterociclo puede
25 estar sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo alquilo, un grupo tioalcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro o CF_3 . Ejemplos de tales heterociclos incluyen, por ejemplo, furano, tiofeno, 2-metilfurano, 5-halofurano, pirrol, imidazol, pirazol, 1,3-oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, benzotiofeno, benzofurano, indol,
30 benzimidazol, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno.

"Sililo" se refiere a especies de silicio comúnmente usados en química orgánica como grupos protectores, tales como los que se indican en Greene, T. W.; Wuts, P. G. M.

"Protective Groups in Organic Synthesis", 3^a Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999. En una realización particular, un radical de fórmula $-\text{SiRdReRf}$ donde Rd, Re y Rf se seleccionan independientemente entre un grupo alquilo sustituido o no sustituido o un grupo arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, metil, etil, t-butil, i-propil, fenil, etc.

- 5 "Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula $-\text{O}$ -alquilo, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, etc.

"Arilsulfonilo" se refiere a un radical de fórmula $-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2$ -arilo, por ejemplo, para-toluensulfonilo, besilo, etc.

- 10 "Aquilsulfonilo" se refiere a un radical de fórmula $-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2$ -alquilo, por ejemplo, mesilo, trifluorometilsulfonilo, etc.

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

- 15 "Buen grupo saliente", es un átomo o fragmento molecular que se desprende de una molécula de forma eficiente en una rotura heterolítica de enlace llevando consigo el par electrónico del enlace. Normalmente los grupos salientes se desprenden en forma de aniones y se considera que un buen grupo saliente es una base débil. Ejemplos de buen grupo saliente son generalmente conocidos por el experto medio y la elección del más apropiado en cada situación forma parte de su trabajo diario. Ejemplos no limitativos son OTs (tosilo), OMs (mesilo) o halógeno.

20 Ergosterol

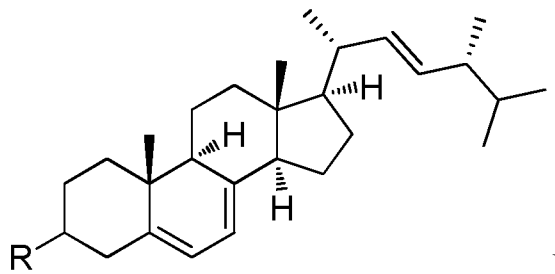
El ergosterol es una provitamina, un precursor de la vitamina D2, y no es tóxico para el hombre ni para el medio ambiente salvo en concentraciones muy elevadas, lo cual es una ventaja frente a otros componentes sintéticos.

- 25 El ergosterol es un componente de las membranas celulares de los hongos, que cumple la misma función que el colesterol desempeña en las células animales. La presencia de ergosterol en las membranas de las células de los hongos, junto con su ausencia en las membranas de las células animales convierte a esta sustancia en una diana útil para los fármacos antifúngicos.

- 30 Para los propósitos de la invención, el término "ergosterol" incluye también derivados de la molécula natural como por ejemplo todos aquellos derivados obtenibles mediante la transformación del grupo hidroxilo según las transformaciones químicas que se recogen

en Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations, 2nd ed., Wiley-VCH, NY, 1999, pp. 689–697 y Smith, M.B., y March, J. Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure. 6th ed., Wiley-Interscience, 2007, pp. 532-538.

En una realización particular, ergosterol es una molécula de fórmula I



donde R se selecciona de entre hidroxilo, alcoxi, sililo-O-, alquenilo-O-, arilsulfonilo, alkilsulfonilo, acrilato y -NR^aR^b, donde R^a y R^b se seleccionan de forma independiente de entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo, alquenilo, arilo, arilalquilo y heteroarilo.

Sistemas

Como se ha descrito anteriormente, los sistemas de la invención comprenden un sustrato, donde dicho sustrato se une a moléculas de ergosterol mediante enlaces covalentes.

Dichos enlaces covalentes están situados en la superficie del sustrato, de modo que el ergosterol no forma parte del propio sustrato, y de modo que en el caso de que el sustrato sea un polímero el ergosterol no forma parte de los eslabones de la cadena polimérica, sino que se encuentra unido a un enlace covalente de una cadena lateral del sustrato. Así, en una realización particular, el sistema anteriormente descrito está caracterizado porque el ergosterol se une al sustrato mediante enlaces covalentes dispuestos en la superficie del sustrato. En una realización particular, el sistema anteriormente descrito está caracterizado porque el ergosterol se une al sustrato mediante enlaces covalentes a través de cadenas laterales.

En una realización particular, el sustrato en un sistema como se ha descrito anteriormente, se selecciona de entre sílice, titanio, zirconio, polímeros de silicio, algodón, lana, nylon, vidrio, poliolefinas, polivinilos, poliestireno, poliamidas, poliuretano, politereftalato de etileno (PET), polietilenimina, polilactona, policaprolactona, poliéster, polisiloxanos, polianhidrido, poliurea, policarbonato, polisulfona, poliacrilonitrilo, polióxido de etileno, policiclooctano, polímeros acrílicos, y sus copolímeros, opcionalmente sustituidos.

En una realización particular, las poliolefinas se seleccionan de entre polietileno, polipropileno, polimetilpenteno, poli-1-butenos, poliisobutileno, tereftalato de polibutileno (PBT) y goma de etilenpropileno.

En una realización particular, los polivinilos se seleccionan de entre polivinilpirrolidona y
5 cloruro de polivinilo (PVC).

En una realización particular, los polímeros acrílicos se seleccionan de entre los constituidos por monómeros seleccionados de entre el siguiente grupo glicidil acrilato, glicidil metacrilato, etilenglicol dimetacrilato, 1,3-butanediol diacrilato, 1,4-butanediol diacrilato, 1,6-hexanediol diacrilato, etilen glicol diacrilato, fluorescein O,O'-diacrilato,
10 glicerol 1,3-diglicerolato diacrilato, pentaeritritol diacrilato monoestearato, 1,6-hexanediol etoxilato diacrilato, 3-hidroxi-2,2-dimetilpropil 3-hidroxi-2,2-dimetilpropionato diacrilato, bisfenol A etoxilato diacrilato, di(etilen glicol) diacrilato, neopentil glicol diacrilato, poli(etilen glicol) diacrilato, poli(propilen glicol) diacrilato, propilen glicol glicerolato diacrilato, tetra(etilen glicol) diacrilato, 1,3-butanediol
15 dimetacrilato, 1,4-butanediol dimetacrilato, 1,6-hexanediol dimetacrilato, bisfenol A dimetacrilato, diuretano dimetacrilato, etilen glicol dimetacrilato, fluorescein O,O'-dimetacrilato, glicerol dimetacrilato, bisfenol A etoxilato dimetacrilato, bisfenol A glicerolato dimetacrilato, di(etilen glicol) dimetacrilato, poli(etilen glicol) dimetacrilato, poli(propilen glicol) dimetacrilato, tetraetilen glycol dimetacrilato, tri(etilen glicol)
20 dimetacrilato, trietilen glicol dimetacrilato, poli(lauril metacrilato-co-etilen glycol dimetacrilato), poli(metil metacrilato-co-etilen glicol dimetacrilato), hidroxietil metacrilato, hidroxipropilacrilato, 1-(tristimetilsiloxisililpropil)-metacrilato, metilmetacrilato, N,N-dimetilacrilamida, N,N-dietilacrilamida, ácido metacrílico, ácido acrílico, aminopropil metacrilato, ciclohexil metacrilato y fluoro-siloxano acrilato, y
25 combinaciones de los mismos.

En una realización particular, los polímeros acrílicos se seleccionan de entre polimetilmetacrilato, poli(n-butil acrilato), polidimetilaminoetilacrilato, ácido poliacrílico, polimetilacrilato, polihidroxietilmetacrilato y poliglicidilmetacrilato.

En una realización particular, los polímeros de silicio se seleccionan de goma de silicona, polisiloxanos, oblea de silicio hidrogeles de silicona. En una realización más particular,
30 los polisiloxanos se seleccionan de poli(metilhidrosiloxano), poli(dimetilsiloxano), dimetilpolisiloxano, o metilfenilpolisiloxano.

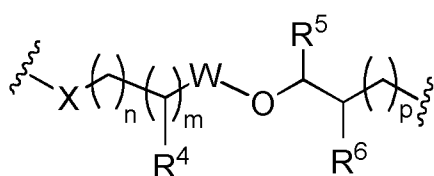
En una realización particular, el sustrato se selecciona de entre goma de silicona, polietileno, polipropileno, hidrogeles de silicona y hidrogeles acrílicos y/o metacrílicos.

En una realización particular, los enlaces covalentes de los sistemas anteriormente descritos se seleccionan de entre éter, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, alquilo opcionalmente sustituido y $-\text{OZ}(=\text{O})-\text{O}-$, donde Z se selecciona entre carbono, $-\text{S}(=\text{O})$ y $-\text{P}-\text{OH}$, y R^a es como se ha definido anteriormente.

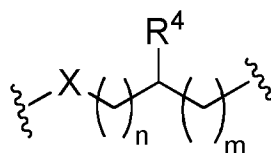
En una realización más particular los enlaces covalentes son éter, $-\text{NR}^a-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, ó $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$.

En una realización particular, las cadenas laterales en un sistema como se ha descrito anteriormente comprenden una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, de entre 2 a 21 átomos de carbono, opcionalmente dicha cadena incorpora uno o más grupos funcionales seleccionados entre éter, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^a-$, alquenilo, y opcionalmente dicha cadena está sustituida por grupos hidroxilo, alcoxi, $-\text{NR}^a\text{R}^b$ y alquenilo, donde R^a y R^b se seleccionan de forma independiente de entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo.

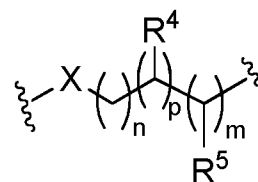
En una realización particular, la cadena lateral (L) se selecciona de entre



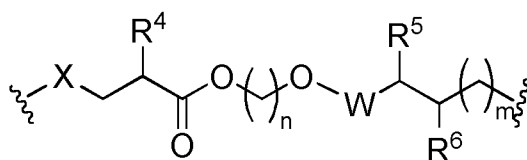
L1



L2



L3



L4

donde R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, hidroxilo, alcoxi, $-\text{NR}^a\text{R}^b$, alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido y alquenilo C2-C4 opcionalmente sustituido,

n, m y p se seleccionan independientemente de entre 0, 1, 2, 3, 4, y 5,

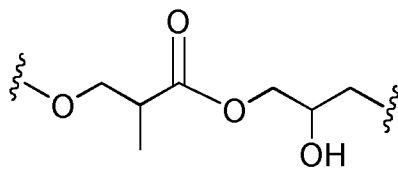
X se selecciona de entre CH_2 , O y S,

W se selecciona de entre $\text{C}(=\text{O})$, alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido, y $\text{CH}_2(\text{OH})$,

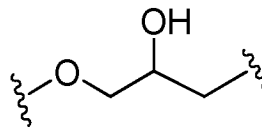
R^a y R^b son como se han definido anteriormente.

En una realización particular L es

10



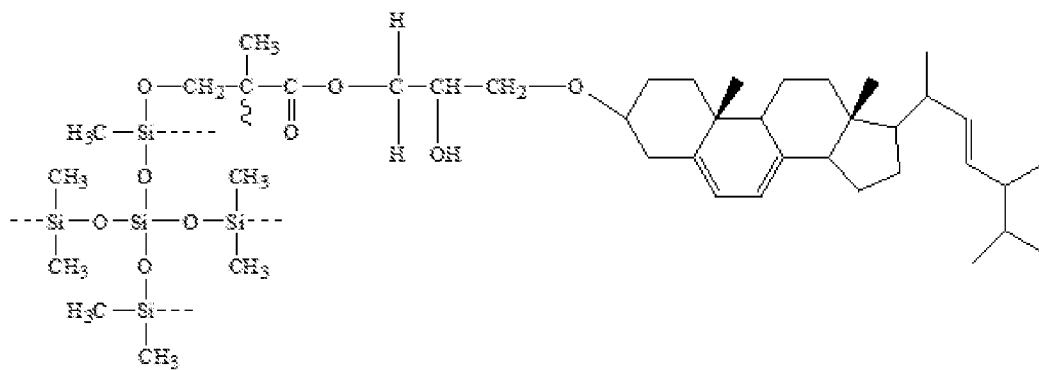
L5



L6

En una realización particular, el sistema anteriormente descrito comprende goma de
silicona unida a moléculas de ergosterol mediante enlaces éter a través de cadenas
laterales de estructura L5.

En una realización particular el sistema es



En una realización particular, el ergosterol en un sistema de la invención asocia
ingredientes activos antifúngicos seleccionados entre polienos, azoles y alilaminas, y sus
combinaciones.

Dichos ingredientes activos antifúngicos no se liberan con el tiempo en condiciones de
almacenamiento o de uso, excepto cuando está en presencia de hongos, o no se liberan en
cantidades significativas y en general la cantidad liberada en un medio acuoso en
ausencia de hongos será inferior al 40%, y con los sistemas más optimizados será inferior
al 20%.

Solamente cuando los sistemas de la invención están en presencia de hongos se inicia la
cesión del antifúngico por un mecanismo de desplazamiento competitivo, separándose el
fármaco del ergosterol inmovilizado en la superficie del dispositivo para unirse a la pared
del hongo. Debido a este mecanismo de cesión por afinidad al hongo, el compuesto
antifúngico se libera de manera controlada en función de la necesidad, concentración y/o
tiempo de presencia de hongos, y actúa como antifúngico al interactuar con el hongo.
Incluso en presencia de ergosterol en el medio, la cesión transcurre de forma sostenida
durante varios días, lo que puede proporcionar un doble beneficio: proteger la superficie

del sistema de la invención de la colonización por hongos y evitar la formación de biofilm, y proteger al ser humano, al alimento, al ser vivo o al entorno del sistema de la invención frente a infecciones fúngicas.

En una realización particular, los polienos se seleccionan entre nistatina, natamicina y anfotericina, y sus combinaciones. En otra realización particular, los azoles se seleccionan entre miconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, y sus combinaciones. En otra realización particular, las alilaminas se seleccionan entre terbinafina y naftifina, y sus combinaciones.

En una realización particular, el sistema anteriormente descrito asocia nistatina o natamicina.

Los sistemas de la invención son capaces de asociar ingredientes activos antifúngicos en una cantidad y/o densidad más elevada que otros sistemas conocidos en el estado de la técnica.

En una realización particular, los ingredientes activos antifúngicos se incorporan en una cantidad de entre 0.1 y 30 mg/g para films de 1 mm de espesor y densidad 1 Kg/L. En una realización más particular los ingredientes activos antifúngicos se incorporan en una cantidad de entre 0.3 y 10 mg/g para films de 1 mm de espesor y densidad 1 Kg/L.

En una realización particular, los ingredientes activos antifúngicos se incorporan en una cantidad de entre 0.1 y 30 mg/cm². En una realización más particular, los ingredientes activos antifúngicos se incorporan en una cantidad de entre 0.3 y 10 mg/cm².

En una realización particular, la cantidad o densidad de ergosterol en los sistemas de la invención está entre 1 y 200 mg/g para films de 1 mm de espesor y densidad 1 Kg/L. En una realización más particular, la cantidad o densidad de ergosterol en los sistemas de la invención está entre 2 y 100 mg/g para films de 1 mm de espesor y densidad 1 Kg/L.

En una realización particular, la cantidad o densidad de ergosterol en los sistemas de la invención está entre 1 y 200 mg/cm². En una realización más particular, la cantidad o densidad de ergosterol en los sistemas de la invención está entre 2 y 100 mg/cm² para films de 1 mm de espesor y densidad 1 Kg/L.

Preparación de los sistemas de la invención

Los sistemas de la presente invención se pueden preparar siguiendo una secuencia especial de reacciones empleando condiciones conocidas en el estado de la técnica.

Así por ejemplo, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de los sistemas anteriormente descritos que comprende la reacción entre ergosterol, como se ha descrito anteriormente, y un sustrato funcionalizado.

Las condiciones experimentales de dicha reacción dependerán del grupo R del ergosterol y del grupo funcional reactivo sobre el sustrato funcionalizado según se ha descrito anteriormente. En general son reacciones comúnmente empleadas por el experto en la materia y ampliamente aplicadas en el estado de la técnica.

Para los propósitos de la invención, se entiende por “sustrato funcionalizado” aquel sustrato que contiene en su estructura grupos funcionales reactivos, por ejemplo electrófilos o nucleófilos. En una realización particular, los grupos funcionales reactivos presentes en el sustrato funcionalizado se seleccionan de entre $-OR^1$, $-NR^aR^b$, $-\text{alqueno}$, $-\text{acrilato}$, $-\text{halógeno}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{halógeno}$, $-\text{epóxido}$, $-\text{CN}$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}^2$ y $-\text{Z}(=\text{O})-\text{OR}^2$, donde Z se selecciona entre carbono, $-\text{S}(=\text{O})$ y $-\text{P}-\text{OH}$, donde R^1 , se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alquilsulfonilo arilsulfonilo, sililo, arilalquilo,

R^2 se selecciona de entre hidrógeno, alquilo, alqueno, arilalquilo, arilo, y donde R^a y R^b son como se han definido anteriormente.

En una realización particular, los grupos funcionales del sustrato funcionalizado están unidos al sustrato mediante una cadena lateral, como se ha definido anteriormente. En una realización particular, las cadenas laterales unidas a los grupos funcionales están en la superficie del sustrato.

Cuando el grupo R del ergosterol de fórmula I es un grupo hidroxilo, éste puede reaccionar con un grupo electrófilo presente en el sustrato funcionalizado. El experto en la materia conoce ampliamente las condiciones de reacción, que pueden ser llevadas a cabo en medio ácido, básico o neutro, preferiblemente en medio ácido o básico. Así, en una realización particular, el procedimiento comprende la reacción entre el ergosterol de fórmula I, como se ha definido anteriormente, donde R es un grupo hidroxilo, y un grupo electrófilo presente en el sustrato funcionalizado. En una realización particular, el grupo electrófilo presente en el sustrato funcionalizado se selecciona de entre epóxido, $-\text{C}(=\text{O})-\text{halógeno}$, $-\text{Z}(=\text{O})-\text{OR}^2$, donde Z y R^2 son como se han definido anteriormente. En otra realización particular, el procedimiento comprende la reacción entre el ergosterol de fórmula I, como se ha definido anteriormente, donde R es un grupo hidroxilo, y un buen grupo saliente presente en el sustrato funcionalizado.

En una realización particular, el grupo electrófilo y el buen grupo saliente se unen al sustrato mediante una cadena lateral. En una realización más particular, la cadena lateral se selecciona de entre las cadenas laterales de fórmula L1, L2, L3, L4 o L5. En una realización particular, el sustrato se selecciona de entre goma de silicona, polietileno, polipropileno, hidrogeles de silicona y hidrogeles acrílicos y/o metacrílicos. En una
5 realización particular, la reacción se lleva a cabo en medio ácido.

Alternativamente, el grupo R del ergosterol de fórmula I puede ser un buen grupo saliente, por ejemplo el grupo hidroxilo puede haberse transformado en un buen grupo saliente como se describe en Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. "Protective Groups in
10 Organic Synthesis", 3^a Ed., Wiley-Interscience, New York, 1999, y serán grupos nucleófilos presentes en el sustrato los que desplacen el grupo saliente del ergosterol. En una realización particular, el procedimiento comprende la reacción entre el ergosterol de fórmula I, como se ha definido anteriormente, donde R es un buen grupo saliente, y un grupo nucleófilo presente en el sustrato funcionalizado. En una realización particular, el
15 grupo saliente se selecciona entre sililo-O-, arilsulfonilo y alquilsulfonilo. En una realización particular, el grupo nucleófilo del sustrato se selecciona de entre -OH, -NR^aR^b, donde R^a y R^b son como se han definido anteriormente.

Alternativamente, el grupo R del ergosterol de fórmula I puede ser grupo alqueno-O- o acrilato y pueden reaccionar con grupos alqueno presentes en el sustrato funcionalizado mediante una reacción de acoplamiento. La reacción de acoplamiento puede ser tipo
20 Heck, Suzuki o Stille, ampliamente conocidas por el experto en la materia (ver por ejemplo F. A. Carey, R.J. Sundberg, Advanced Organic Chemistry, 3^a ed., pp. 461-466; Palladium-Catalyzed Coupling Reactions, Wiley-VCH, 2013, pp. 4-10).

En una realización particular, el procedimiento comprende una etapa previa de transformación del grupo hidroxilo del ergosterol en otro derivado de fórmula I. Dicha transformación del grupo hidroxilo se puede llevar a cabo mediante reacciones conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo las transformaciones químicas que se
25 reconocen en Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations, 2nd ed., Wiley-VCH, NY, 1999, pp. 689-697 y Smith, M.B., y March, J. Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure. 6th ed., Wiley-Interscience, 2007, pp. 532-538.
30

Cuando el sustrato no contiene grupos funcionales reactivos es posible funcionalizarlo y así obtener un sustrato funcionalizado como los descritos anteriormente. Así, en una

realización particular, el procedimiento comprende una etapa previa de funcionalización de un sustrato en presencia de una molécula con grupos funcionales.

Los sustratos funcionalizados son conocidos por el experto en la materia ya que hay una amplia bibliografía que los describe, así como también se pueden funcionalizar mediante
5 métodos conocidos por el experto en la materia en presencia de moléculas que poseen grupos funcionales.

Son métodos de funcionalización conocidos, por ejemplo, el método de pre-irradiación oxidativa con rayos-gamma, conocido por el experto en la materia ya que existe una amplia bibliografía sobre este método y fue aplicado a diferentes superficies con éxito,
10 como por ejemplo, a polipropileno y polietileno en presencia de glicidilmetacrilato para obtener los polímeros de polietileno y polipropileno funcionalizados con grupos glicidilo en *Acta Biomaterialia*, **2010**, 6, 1398-1404; a algodón en presencia de glicidilmetacrilato para algodón funcionalizado con grupos glicidilo (Takács, E., Wojnárovits, L., Horváth E-K., Fekete T., Borsa J. Improvement of pesticide adsorption capacity of cellulose fibre by high-energy irradiation-initiated grafting of glycidyl methacrylate. *Radiat. Phys. Chem.* **2012**, 81, 1389-1392; *Cellulose*, **2012**, 19, 2165-2177; *Radiation Physics and Chemistry*, **2011**, 80, 1358-1362); el método de polimerización por plasma, conocido por el experto en la materia ya que existe una amplia bibliografía sobre este método, como por ejemplo se aplicó en *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 17161-17166, donde se describe la
20 funcionalización de superficies de polidimetilsiloxano en presencia de glicidilmetacrilato para obtener una silicona funcionalizada con grupos glicidilo; y también aplicado en Volcker, N., Klee, D., Hocker, H., Langefeld S., Functionalization of silicone rubber for the covalent immobilization of fibronectin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2001**, 12, 111-119; el método de reacción radicalaria, conocido por el experto en la materia ya que existe una
25 amplia bibliografía sobre este método, como por ejemplo, en *J. Appl. Polym. Sci.*, **2006**, 102, 2254-2263, donde se describe la funcionalización de polivinilpirrolidona, polietileno y polipropileno mediante una reacción radicalaria iniciada por benzofenona y en presencia de ácido acrílico de manera que se obtienen esos polímeros funcionalizados con un grupo carboxílico. Una revisión de funcionalización de sustratos se puede consultar en
30 *Topics in Current Chemistry*, **1999**, 200, 95-112 y en *Material Science and Engineering*, **2010**, 70, 275-302. Hidrogeles de silicona funcionalizados se describen en WO2012016096. Hidrogeles funcionalizados constituidos por monómeros acrílicos se

describen en la solicitud de patente WO2010018293 A1 (página 4, líneas 22-29; página 6, líneas 23-27; y ejemplo 1).

Mediante estas referencias bibliográficas se incorporan a esta solicitud de patente los métodos descritos, las moléculas empleadas para funcionalizar los sustratos y también los
5 polímeros funcionalizados obtenidos en dichos documentos.

Las moléculas con grupos funcionales que se emplean para funcionalizar los sustratos son de diferente naturaleza, y para los propósitos de la invención comprenden los siguientes grupos funcionales $-OR^1$, $-NR^aR^b$, -alquenilo, -acrilato, -halógeno, $-C(=O)$ -halógeno, -epóxido, $-CN$, $-O-C(=O)-OR^2$ y $-Z(=O)-OR^2$, donde Z se selecciona entre carbono, -
10 $S(=O)$ y $-P-OH$, y donde R^1 , R^a , R^b , R^2 y Z son como se han definido anteriormente.

En una realización particular, las moléculas con grupos funcionales se seleccionan de entre $G-L-OR^1$, $G-L-NR^aR^b$, $G-L$ -alquenilo, $G-L$ -acrilato, $G-L$ -halógeno, $G-L-C(=O)$ -halógeno, $G-L$ -epóxido, $G-L-CN$ y $G-L-Z(=O)-OR^2$, donde G se selecciona de entre epóxido, OR^1 , alquinilo, $-Z(=O)-OR^2$, aldehído, anhídrido, acrilóilo, acrilamida, uretano,
15 $-CN$, halógeno, NR^aR^b , carboxamida y sulfhidrido, y donde R^1 , R^2 , R^a , R^b , Z y L son como se han definido anteriormente.

En una realización particular, las moléculas con grupos funcionales que se emplean en el procedimiento de funcionalización de sustratos se seleccionan de entre 1-(acrilóiloxi)-3-(metacrilóiloxi)-2-Propanol, 2-(N,N-dietilamino)etil metacrilato, 2-(N,N-dimetilamino)etil
20 acrilato, 2-(N,N-dimetilamino)etil metacrilato, 2-(tert-butilamino)etil metacrilato, hidrocloreto de 2-aminoetil metacrilato, 2-diisopropilaminoetil metacrilato, dialilamina, cloruro de dialildimetilamonio, metacrilóilo-L-Lisina, hidrocloreto de N-(2-aminoetil) metacrilamida, hidrocloreto de N-(3-aminopropil)metacrilamida, N-(t-BOC-aminopropil)metacrilamida, N-[2-(N,N-dimetilamino)etil]metacrilamida, N-[3-(N,N-dimetilamino)propil]acrilamida, N-[3-(N,N-dimetilamino)propil]metacrilamida.
25

En una realización particular, las moléculas con grupos funcionales que se emplean en el procedimiento de funcionalización de sustratos se seleccionan de entre acrilato sódico y metacrilato sódico.

En una realización particular, las moléculas con grupos funcionales que se emplean en el
30 procedimiento de funcionalización de sustratos se seleccionan de entre alilglicidil eter, 1,4-butanediol diglicidil eter, butil glicidil eter, 4-tert-butilfenil glicidil eter, 1,4-ciclohexanedimetanol diglicidil eter, 1,2,7,8-diepoxioctano, diglicidil 1,2-

ciclohexanodicarboxilato, N,N-diglicidil-4-glicidiloxianilina, 3,4-epoxi-1-butenol, furfural glicidil eter, glicidil 4-metoxifenil eter, 4,4'-metilen-bis(N,N-diglicidil-anilina), neopentil glicol diglicidil eter, resorcinol diglicidil eter, tris(2,3-epoxipropil) isocianurato, tris(4-hidroxifenil)metano triglicidil eter, glicidil metacrilato, glicidil cinnamato, y glicidil acrilato.

En una realización particular, el procedimiento como se ha descrito anteriormente comprende además una etapa previa de funcionalización del sustrato mediante el método de pre-irradiación oxidativa empleando radiación gamma.

En una realización particular, el procedimiento como se ha descrito anteriormente comprende además una etapa en la que se pone en contacto el sistema según se ha descrito anteriormente y una disolución que comprende un ingrediente activo antifúngico.

Dicha etapa de puesta en contacto puede llevarse a cabo en diferentes condiciones adaptadas al ingrediente que se pretenda incorporar al sistema. En una realización particular, la puesta en contacto se lleva a cabo entre 10 y 40°C, preferiblemente entre 25 y 30°C. En una realización particular, la puesta en contacto se lleva a cabo entre 5 horas y 20 días, preferiblemente entre 1 día y 15 días.

En una realización particular el procedimiento para la preparación de los sistemas como se han descrito anteriormente comprende

- a) funcionalizar un sustrato con una molécula con grupos funcionales reactivos,
- b) hacer reaccionar los grupos funcionales de dicho sustrato con ergosterol,
- c) opcionalmente poner en contacto el sistema obtenido en la etapa b) con una disolución de un ingrediente activo antifúngico.

En una realización particular, el sustrato es una goma de silicona. En una realización particular el sustrato se funcionaliza mediante el método de pre-irradiación oxidativa empleando radiación gamma. En una realización particular, la molécula con grupos funcionales reactivos es glicidil metacrilato. En una realización particular el grupo R del ergosterol es un hidroxilo. En una realización particular la reacción de la etapa b) tiene lugar en condiciones ácidas.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a los sistemas obtenibles mediante un procedimiento como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto la invención se dirige al uso de un sistema como se ha descrito anteriormente, como sistema de liberación de ingredientes activos antifúngicos.

Los sistemas de la invención pueden constituir materiales útiles en medicina. Así, en otro
5 aspecto la invención se dirige a un dispositivo médico que comprende un sistema como se ha descrito anteriormente. En una realización particular el dispositivo médico se selecciona entre catéteres, films, sondas, stents, implantes, injertos vasculares, apósitos, vendas, lentes de contacto y lentes intraoculares.

En una realización particular, la invención se refiere al uso de un film como se ha descrito
10 anteriormente como recubrimiento de superficies.

En una realización particular, la invención se refiere al uso de un sistema como se ha descrito anteriormente, como superficie de trabajo.

Los sistemas de la invención también son adecuados como embalajes o envoltorios. Así en una realización particular, la invención se refiere al uso de un sistema como se ha
15 descrito anteriormente como embalaje de dispositivos médicos, envoltorio o recubrimiento de dispositivos médicos, y como material de acondicionamiento de sistemas de liberación.

También estos sistemas son útiles en la industria alimentaria y nutricional, para prevenir la colonización por hongos de los alimentos. En una realización particular, la invención se
20 refiere al uso de un sistema como se ha descrito anteriormente, como recubrimiento de alimentos, envases de alimentos o complementos nutricionales.

En otra realización particular, la invención se refiere al uso de un sistema como se ha descrito anteriormente, como cosmético o recubrimiento de cosméticos.

25 A continuación se ilustra la invención con algunos ejemplos, aunque éstos no deben de interpretarse como una limitación de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1. Modificación de la goma de silicona

Injerto de glicidil metacrilato GMA. Láminas de goma de silicona (SR) (1x5cm) se
30 irradiaron con radiación gamma de una fuente de ⁶⁰Co (GammaBeam 651 PT from Nordion Co., Canada) en presencia de aire, a una dosis de 20 kGy y a una velocidad de dosis de 13.5 kGy h⁻¹. Las láminas preirradiadas de SR se colocaron en ampollas de

vidrio conteniendo disolución de GMA en metanol (8 mL) a distintas concentraciones. Las ampollas se desoxigenaron en una línea de vacío aplicando ciclos de congelación-descongelación durante una hora, se sellaron y se llevaron a un baño a 60°C donde se mantuvieron durante distintos periodos de tiempo. Las láminas injertadas se lavaron con diclorometano (8 h) a temperatura ambiente y se mantuvieron a reflujo durante 24 h para eliminar el homopolímero no injertado y el monómero residual. Finalmente, las láminas injertadas (SR-g-GMA) se secaron a vacío y se mantuvieron a 60°C hasta peso constante. El rendimiento de injerto se calculó aplicando la ecuación:

$$\% \text{ grafting} = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

en la que W_0 y W representan los pesos inicial y final de la lámina de SR, respectivamente.

Inmovilización de ergosterol. Las láminas de SR-g-GMA (10-20 % de injerto) se sumergieron en dioxano o THF durante dos horas y a continuación se incorporó una cantidad de ergosterol equimolar con el contenido en GMA injertado en la lámina. El balón de reacción se desoxigenó con argón y, a continuación, se incorporó $\text{BF}_3 \cdot \text{EtO}_2$ (5% mol). La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura de reflujo cuando el disolvente fue THF y a 70°C cuando se utilizó dioxano. Inmediatamente después, las láminas se extrajeron del medio de reacción y se lavaron con tolueno para retirar el ergosterol no reaccionante. Las láminas se secaron a vacío y a continuación en un horno a 60°C hasta peso constante. La cantidad de ergosterol unido covalentemente a la lámina de SR-g-GMA se calculó como sigue:

$$\text{YE} = \frac{W_g - W_e}{W_e \times M_e} \cdot 10^6 \quad \text{Eq. (2)}$$

En esta expresión, W_g y W_e representan la masa de la lámina antes y después de unir covalentemente el ergosterol y M_e el peso molecular del ergosterol.

El método implica dos pasos clave: primero el sustrato (SR) se irradia en presencia de aire para generar alquilperóxidos e hidroxiperóxidos sobre la superficie y/o en la matriz del sustrato. A continuación, el polímero pre-irradiado se pone en contacto con el monómero en ausencia de oxígeno y se calienta a 60°C para provocar la descomposición de los alquilperóxidos e hidroxiperóxidos y generar radicales libres que reaccionan con el GMA provocando el crecimiento de las cadenas de GMA sobre la superficie del sustrato. Una vez que se ha obtenido SR-g-GMA, los grupos epóxido del GMA reaccionan con el

ergosterol a través de una reacción de sustitución nucleófila. La reacción se cataliza con $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ que se coordina con el oxígeno del grupo epóxido y permite la apertura del anillo epóxido por el ergosterol. En esta reacción, el disolvente juega un papel importante en el hinchamiento de la lámina de SR-g-GMA y en la difusión del ergosterol en su interior. De los dos disolventes ensayados, dioxano y THF, el mayor rendimiento de

5 inmovilización de ergosterol se alcanzó con THF.

Los contenidos de GMA y ergosterol en las láminas se recogen en la Tabla 1.

Código	Rendimiento de injerto de GMA (%)	Cantidad de ergosterol inmovilizada (mg/g)	Cantidad de ergosterol inmovilizada (mg/cm ²)
Silicona	0	0	0
TAS 113	18.44	15.2	8.5
TAS 146	20.76	3.9	2.2
TAS 135	15.05	92.2	51.8
TAS 156	20.96	0	0
TAS 158	15.93	116.8	65.6
TAS 159	14.91	110.4	62.0
TAS 160	16.7	104.3	58.6
TAS 177	17.33	85.4	48.0
TAS 187	17.58	20.4	11.5
TAS 188	10.23	45.2	25.4
TAS 197	10.47	44.4	24.9
TAS 198	10.28	14	7.9
TAS 202	9.28	11.2	6.3
TAS 203	14.94	74.7	42.0
TAS 206	14.02%	73.5	41.3
TAS 209	13.53	70.3	39.5
TAS 210	17.8	86.3	48.5
TAS 213	13.44	67.5	37.9

TAS 217	16.39	100.5	56.5
TAS 219	13.63	69.5	39.0
TAS 251	9.73	53.4	30.0
TAS 252	11.5	15.75	8.8
TAS 253	16.52	100.8	56.6
TAS 277	15.22	0	0
TAS 285	9.54	0	0
TAS 287	16.7	0	0
TAS 288	14.25	0	0

Tabla 1. Códigos de las láminas de goma de silicona (SR) y su contenido en GMA y ergosterol. La cantidad de ergosterol inmovilizado se refiere al peso total de la lámina o a su superficie.

- 5 El injerto de GMA y la inmovilización de ergosterol se confirmaron por análisis de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Las bandas típicas de SR aparecieron a 3000 cm^{-1} (Si-OH), 1259 cm^{-1} (-Si-CH₃) y 994 cm^{-1} (Si-O). El espectro de SR-g-GMA mostró señales a 1727 cm^{-1} (C=O) y a 1123 cm^{-1} (-C-O-O) debido al grupo éster y a 907 cm^{-1} correspondiente al anillo epóxido. Tras la inmovilización del ergosterol aparecieron nuevas señales a 2961 cm^{-1} y 2864 cm^{-1} debido a las vibraciones simétrica y asimétrica del enlace -C-H del grupo CH₃. Estas dos señales, características del ergosterol, confirman su anclaje a las láminas.

- Los análisis de termogravimetría (TGA Q50, TA Instruments, New Castle, DE) llevados a cabo a una velocidad de calentamiento de $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde 25°C a 800°C , bajo atmósfera de nitrógeno, mostraron una única caída en el peso de las láminas de SR a una temperatura superior de 500°C por la degradación de la matriz. Los termogramas de SR-g-GMA mostraron dos pérdidas de peso: una a 322°C por descomposición térmica de las cadenas de poliGMA injertadas, y otra a 546°C por descomposición de SR. Las láminas con ergosterol inmovilizado mostraron tres pérdidas de peso: a 277°C por degradación de ergosterol, a 389°C por descomposición de poliGMA y a 570°C por descomposición de SR.

En cuanto a la textura y al aspecto de las láminas, el injerto de GMA dio lugar a la aparición de pequeños puntos blanquecinos. La inmovilización de ergosterol se visualizó por el progresivo incremento de la fluorescencia de las láminas que se observó bajo exposición a radiación ultravioleta de 366 nm (Coutinho A, Silva L, Fedorov A, Prieto M. Colesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys J.* **2004** Nov; 87(5):3264-76). La fluorescencia homogénea de las láminas de SR indica que el ergosterol se encuentra homogéneamente distribuido. Las imágenes de SEM (EVO LS15 microscope, Zeiss, Oberkochen, Germany) de SR-g-GMA con y sin ergosterol inmovilizado confirmó el recubrimiento homogéneo de la superficie de las láminas de SR (Figura 1).

Ejemplo 2. Incorporación de natamicina, nistatina y miconazol. Láminas de SR-g-GMA (1x1.25x0.1 cm, 0.13-0.17 g) con ergosterol inmovilizado en distintas proporciones se sumergieron en disoluciones de natamicina (25 mg/l, 10 ml), nistatina (20 mg/l, 10 ml) o miconazol (7 mg/l, 10 ml). Como control se utilizaron laminas de SR y SR-g-GMA. A tiempos preestablecidos, se cuantificó la cantidad de natamicina, nistatina o miconazol remanente en el medio a partir de medidas de absorbancia a 319 nm, 321 nm o 230 nm, respectivamente (Agilent 8453, Germany). La cantidad de fármaco cargado se estimó a partir de la diferencia de concentraciones inicial y final en las disoluciones de carga (Figura 2A, 2B y 2C). Las cantidades medias de antifúngico incorporado se recogen en las Tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Cantidades medias (mg/g) de natamicina incorporadas.

Tiempo Días	silicona	TAS 156	TAS 159	TAS 188	TAS 219	TAS 253	TAS 285
0.041	0.0027	0.0008	0.0166	0.0079	0.0141	0.0188	0.0014
0.083	0.0031	0.0021	0.0128	0.0077	0.0158	0.0214	0.0009
0.167	0.0042	0.0020	0.0186	0.0179	0.0179	0.0223	0.0022
0.208	0.0042	0.0019	0.0240	0.0227	0.0231	0.0235	0.0020
0.250	0.0044	0.0021	0.0219	0.0209	0.0195	0.0197	0.0045
0.041	0.0027	0.0008	0.0166	0.0079	0.0141	0.0188	0.0014
0.083	0.0031	0.0021	0.0128	0.0077	0.0158	0.0214	0.0009
0.167	0.0042	0.0020	0.0186	0.0179	0.0179	0.0223	0.0022
0.208	0.0042	0.0019	0.0240	0.0227	0.0231	0.0235	0.0020

0.250	0.0044	0.0021	0.0219	0.0209	0.0195	0.0197	0.0045
0.292	0.0044	0.0030	0.0233	0.0254	0.0260	0.0255	0.0048
1.000	0.0043	0.0064	0.0386	0.0326	0.0331	0.0381	0.0071
1.330	0.0044	0.0076	0.0410	0.0351	0.0439	0.0408	0.0072
2.000	0.0048	0.0099	0.0457	0.0366	0.0459	0.0555	0.0112
2.330	0.0042	0.0100	0.0459	0.0372	0.0449	0.0564	0.0101
5.000	0.0946	0.1081	0.1588	0.1335	0.1430	0.1885	0.0988
7.000	0.0966	0.1068	0.1746	0.1403	0.1576	0.2238	0.0995
8.000	0.0995	0.1072	0.1792	0.1438	0.1601	0.2302	0.1000
10.000	0.1040	0.1081	0.2005	0.1581	0.1802	0.2751	0.1101
12.000	0.1042	0.1138	0.2140	0.1631	0.1841	0.2913	0.1148
14.000	0.1263	0.1227	0.2203	0.1641	0.1942	0.3473	0.1180
15.000	0.1248	0.1264	0.2226	0.1637	0.1928	0.3596	0.1184
19.000	0.1316	0.1252	0.2745	0.1707	0.1986	0.3604	0.1228
21.000	0.1405	0.1380	0.2956	0.1990	0.2225	0.4236	0.1405
23.000	0.1568	0.1464	0.3273	0.2124	0.2231	0.4381	0.1353
28.000	0.1669	0.1567	0.3649	0.2326	0.2473	0.4968	0.1698

Tabla 3. Cantidades medias (mg/g) de miconazol incorporadas.

Tiempo	Silicona	TAS 113	TAS 203	TAS 217	TAS 251	TAS 287
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.0410	0.0573	0.0381	0.0660	0.0551	0.1008	0.0401
0.0830	0.0838	0.0707	0.1073	0.0922	0.1633	0.0867
0.1670	0.1294	0.1164	0.1625	0.1425	0.2173	0.1416
0.2080	0.1524	0.1318	0.1812	0.1528	0.2233	0.1614
0.2500	0.1614	0.1456	0.1967	0.1683	0.2418	0.1848
0.2920	0.1595	0.1438	0.1968	0.1669	0.2338	0.1820
1.0000	0.2615	0.2632	0.3039	0.2879	0.3239	0.2793
1.3300	0.2752	0.2864	0.3190	0.3022	0.3287	0.2895
2.0000	0.3475	0.3634	0.4107	0.3870	0.4157	0.3817
3.0000	0.3736	0.3933	0.4296	0.4126	0.4021	0.4007
4.0000	0.3936	0.4177	0.4495	0.4345	0.4260	0.4230
7.0000	0.4168	0.4389	0.4722	0.4561	0.4354	0.4345
8.0000	0.4123	0.4343	0.4724	0.4525	0.4381	0.4405
9.0000	0.4253	0.4404	0.4734	0.4582	0.4239	0.4481
10.0000	0.4068	0.4348	0.4739	0.4597	0.4384	0.4541
11.0000	0.4170	0.4389	0.4694	0.4620	0.4340	0.4668
14.0000	0.4250	0.4446	0.4701	0.4639	0.4398	0.4700
15.0000	0.4460	0.4465	0.4656	0.4681	0.4357	0.4679

Tabla 4. Cantidades medias (mg/g) de nistatina incorporadas.

Tiempo (días)	Silicona	TAS 113	TAS 203	TAS 217	TAS 251	TAS 287
0.0410	0.0319	0	0	0	0	0
0.0830	0.0528	0.0013	0.0192	0.0190	0.0121	0.0052
0.1670	0.0727	0.0241	0.0570	0.0655	0.0508	0.0434
0.2080	0.0820	0.0285	0.0728	0.0896	0.0653	0.0489
0.2500	0.0994	0.0488	0.0962	0.1110	0.0838	0.0647
0.2920	0.1163	0.0462	0.1146	0.1311	0.1085	0.0817
1.0000	0.1289	0.0879	0.2058	0.2502	0.1897	0.1635
1.3300	0.1940	0.1426	0.2904	0.3370	0.2541	0.2067
2.0000	0.2137	0.1981	0.4021	0.4522	0.3921	0.2324
3.0000	0.2535	0.2740	0.5382	0.5784	0.4843	0.2694
4.0000	0.2547	0.3307	0.6175	0.6715	0.5176	0.2771
7.0000	0.2716	0.4332	0.7197	0.7752	0.5573	0.2752
8.0000	0.2767	0.4316	0.7722	0.7654	0.5647	0.3090
9.0000	0.2717	0.4504	0.8045	0.7978	0.5640	0.3092
10.0000	0.2754	0.4540	0.8210	0.8099	0.6199	0.3062
11.0000	0.2859	0.4558	0.8501	0.8272	0.6507	0.3156
14.0000	0.3237	0.4853	0.8680	0.8551	0.6916	0.3292
15.0000	0.3235	0.4903	0.8718	0.8624	0.7067	0.3288

Las laminas de SR sin modificar y de SR-g-GMA presentaron una capacidad muy limitada para incorporar cualquiera de los tres fármacos. En cambio, la inmovilización de ergosterol sobre SR-g-GMA incrementó notablemente la carga de natamicina y de nistatina. La incorporación de estos dos fármacos resultó ser dependiente de la cantidad de ergosterol previamente inmovilizado. Por el contrario, el miconazol se incorporó de manera similar a las láminas preparadas sin y con ergosterol. La diana principal de los azoles, tales como miconazol o ketoconazol, es la heme proteína que co-cataliza la demetilación del lanosterol durante la síntesis del ergosterol (*M. A. Gannoum, L. B. Rice. Antifungal agents: Mode of action, Mechanism of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 501-516). Por lo

tanto, a diferencia de los polienos (por ejemplo, natamicina, nistatina, y amfotericina B), la interacción de los azoles con ergosterol es sólo de tipo inespecífico a través de interacciones hidrofóbicas que se pueden establecer en medio acuoso. En consecuencia, la carga de miconazol fue baja e independiente de la cantidad de ergosterol inmovilizado en las láminas.

Ejemplo 3. Cesión de natamicina, nistatina y miconazol. Láminas cargadas con fármaco se extrajeron de las disoluciones de carga, se lavaron con agua, se secaron y se transfirieron individualmente a viales con 5 ml de medio de cesión. Se usaron tres medios diferentes: agua, tampón HEPES 10 mM-NaCl 100 mM pH 7, y una dispersión coloidal de liposomas (1,2-dioleil-sn-glicerol-3-fosfocolina 0.5 mM, ergosterol 0.125 mM) en el tampón HEPES. A tiempos predeterminados, se midió la absorbancia de la disolución a 319 nm, 321 nm o 230 nm para natamicina, nistatina y miconazol, respectivamente (Agilent 8453, Germany) y se estimó el porcentaje de fármaco cedido.

Los liposomas se prepararon a partir de una disolución de 1,2-dioleil-sn-glicerol-3-fosfocolina (63 mg) y ergosterol (7.9 mg) en cloroformo (3 ml) aplicando un procedimiento similar al descrito por *te Welscher YM, ten Napel HH, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, de Kruijff B, Breukink E. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. The Journal of Biological Chemistry. 2008, 293, 6393-6401.* El disolvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno y el residuo se desecó a vacío. El film lipídico formado se hidrató con HEPES 10 mM-NaCl 100 mM pH 7 (10 mL, 50°C) y se agitó en vortex hasta la total disolución de los lípidos. La dispersión de liposomas (8 mM 1,2-dioleil-sn-glicerol-3-fosfocolina y 2 mM ergosterol) se sometió a 8 ciclos de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (50°C) y finalmente se pasó a través de filtros membrana de policarbonato (0.2 µm, Whatman International). La dispersión coloidal de liposomas se mantuvo a 4°C hasta su uso. Su radio hidrodinámico determinado por DLS fue de 160.3 nm.

Por lo tanto, la cesión se llevó a cabo en tampón HEPES y en dispersión coloidal de liposomas que imitan la membrana de los hongos, lo que permite simular un ambiente contaminado por hongos (Coutinho A, Silva L, Fedorov A, Prieto M. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys J.* 2004, 87(5), 3264-76). El medio de cesión se reemplazó diariamente para evitar cambios en la cinética de cesión e interferencias en la cuantificación UV del fármaco cedido causadas por la desestabilización/agregación de los liposomas que se produce cuando

interaccionan con el fármaco (Coutinho A, Silva L, Fedorov A, Prieto M. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys J.* **2004**, 87(5), 3264-76).

En medio tampón HEPES sin liposomas, las laminas de SR y SR-g-GMA cedieron
5 lentamente el fármaco previamente incorporado (ca. 30% cedido a día 7), mientras que las láminas con ergosterol inmovilizado retuvieron eficazmente el fármaco (<10% cedido a día 14). En cambio, en medio HEPES con liposomas que imitan la contaminación por hongos, la velocidad de cesión se incrementó notablemente (ca. 100% cedido a día 14), lo
10 que indica un desplazamiento competitivo del fármaco desde el ergosterol inmovilizado en la lámina hacia los liposomas conteniendo ergosterol (Figura 3A, 3B, 3C y 3D).

Tabla 5. Porcentajes de natamicina cedida en tampón HEPES pH 7.4 sin liposomas de ergosterol (valores medios, n=3).

Tiempo (días)	Silicona	TAS 156	TAS 159	TAS 188	TAS 219	TAS 253	TAS 285
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.04	0.00	2.70	0.00	0.67	0.18	0.00	0.39
0.08	0.97	5.54	0.00	1.26	0.11	0.00	0.18
0.13	1.50	6.97	0.16	0.75	0.93	0.09	0.99
0.21	1.50	6.97	0.16	0.84	0.93	0.01	0.99
0.25	1.73	6.45	0.39	0.28	1.35	0.06	1.36
0.29	1.84	6.51	1.02	0.82	1.44	0.08	0.28
1.00	10.24	11.93	2.88	5.68	4.35	1.63	4.58
1.33	9.29	15.95	3.22	6.23	4.65	2.00	4.92
2.00	13.27	23.25	4.79	8.85	6.41	2.96	8.36
2.33	20.26	28.38	5.68	9.31	6.71	3.30	9.47
3.00	19.76	28.75	6.94	11.62	7.39	3.56	10.53
3.33	20.89	30.75	6.95	12.16	8.11	3.59	12.83
4.00	24.44	35.22	8.99	13.58	10.01	4.67	14.84
4.30	27.17	34.34	9.15	13.71	10.28	4.78	16.79
5.00	30.42	42.81	9.75	14.12	10.39	5.14	19.74

6.00	31.77	44.88	10.48	14.82	10.49	5.29	22.22
7.00	35.10	46.59	10.58	15.30	10.67	5.49	25.18
8.00	37.47	48.05	10.95	15.50	10.91	5.95	28.47
9.00	38.15	48.66	11.14	15.91	11.76	6.21	30.66
10.00	41.99	49.43	11.40	16.96	12.32	6.34	32.57
11.00	44.56	51.30	11.80	17.95	12.51	6.39	33.42
12.00	45.21	51.48	11.88	18.13	13.37	6.44	33.76
13.00	46.08	53.70	12.40	18.42	14.21	6.67	35.14
14.00	48.28	55.82	13.92	19.19	15.62	6.87	35.66

Tabla 6. Porcentajes de natamicina cedida en tampón HEPES pH 7.4 con liposomas de ergosterol (valores medios, n=3)

Tiempo (días)	Silicona	TAS 156	TAS 159	TAS 188	TAS 219	TAS 253	TAS 285
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.04	4.09	20.00	3.48	3.52	4.51	1.76	15.81
0.08	9.72	20.71	4.91	4.74	7.17	2.41	14.24
0.13	11.80	19.74	5.09	7.64	7.50	3.84	14.41
0.21	17.93	21.42	5.65	7.90	9.02	3.61	13.01
0.25	18.71	19.07	5.80	8.36	8.96	4.06	12.56
0.29	21.63	21.96	5.80	8.46	10.24	4.10	12.57
1.00	24.73	32.96	7.63	9.52	14.50	5.06	18.84
1.33	25.83	38.03	9.37	11.77	18.50	6.32	22.95
2.00	28.40	39.14	10.91	14.27	20.97	7.06	26.49
2.33	39.10	41.33	11.14	14.78	22.35	7.89	30.53
3.00	43.37	44.45	13.00	17.23	24.74	8.49	31.64
3.33	58.02	50.97	17.52	24.43	29.80	11.47	38.56
4.00	60.50	59.19	19.61	30.27	45.78	18.39	49.99
4.33	65.98	66.31	20.23	38.77	50.19	23.67	63.06
5.00	73.94	71.04	32.60	51.00	60.25	29.27	80.17
6.00	78.87	75.67	38.17	62.44	68.03	35.98	84.94

7.00	82.27	81.37	42.75	74.22	72.74	43.04	90.18
8.00	85.62	88.33	50.60	81.07	79.57	52.61	91.47
9.00	86.52	94.54	58.63	85.77	84.99	57.86	92.77
10.00	88.01	94.94	64.83	86.72	87.75	62.71	94.38
11.00	88.05	95.47	69.40	88.36	89.17	69.20	95.35
12.00	94.69	96.57	74.31	91.58	91.04	75.72	96.70
13.00	97.49	97.05	80.05	94.89	94.63	84.96	96.01
14.00	97.73	98.80	86.58	97.63	98.62	95.15	99.70

Tabla 7. Porcentajes de nistatina cedida en tampón HEPES pH 7.4 sin liposomas de ergosterol (valores medios, n=3).

Tiempo (días)	Silicona	TAS 160	TAS 198	TAS 210	TAS 213	TAS 277
0.04	0	0	0	0	0.00	0
0.08	0	0	0	0	0.24	0
0.17	0.03	0	0.25	0	0.22	0.39
0.21	0	0.00	0.27	0	0.61	0.22
0.25	0.08	0	0.42	0	0.43	0.84
0.29	1.86	0.97	1.40	1.00	0.95	2.51
1.00	1.98	0.95	1.44	1.07	1.04	2.46
1.33	2.26	1.20	1.68	1.11	1.20	3.03
2.00	3.47	1.70	1.87	1.52	1.36	4.90
2.33	4.19	2.08	2.52	1.87	1.94	5.74
3.00	5.33	2.37	2.97	2.91	2.74	8.85
3.33	7.83	2.56	4.30	3.87	3.61	10.83
4.00	8.02	2.74	4.52	4.42	3.92	11.77
5.00	9.36	2.88	4.66	4.90	4.28	17.88
6.00	12.05	3.32	5.07	5.25	4.58	19.02
7.00	13.36	3.55	5.33	5.52	4.74	25.62
8.00	19.95	3.62	5.54	5.70	4.95	32.44
9.00	22.70	3.76	5.70	6.27	5.28	40.64

10.00	24.63	4.04	6.01	6.52	5.78	42.99
11.00	26.49	4.23	6.61	6.90	5.96	45.30
12.00	28.33	4.64	7.09	7.19	6.50	46.96
13.00	31.87	4.84	7.53	7.34	6.78	48.23
14.00	36.27	5.14	7.64	7.48	7.19	50.21

Tabla 8. Porcentajes de nistatina cedida en tampón HEPES pH 7.4 con liposomas de ergosterol (valores medios, n=3).

5

Tiempo (días)	Silicona	TAS 160	TAS 198	TAS 210	TAS 213	TAS 277
0.04	11.77	4.36	4.99	2.82	6.83	8.38
0.08	9.47	3.83	4.34	2.20	5.93	6.42
0.17	10.18	4.37	4.55	2.52	6.80	8.68
0.21	9.75	3.76	4.81	2.25	5.98	6.93
0.25	9.04	4.15	4.63	2.83	6.35	7.95
0.29	11.11	4.65	5.39	4.21	7.64	9.52
1.00	14.75	6.54	6.90	5.97	11.07	13.56
1.33	18.27	7.77	8.50	7.85	14.61	16.88
2.00	18.74	13.86	14.22	11.32	18.84	24.09
2.33	23.68	16.85	16.39	13.93	22.79	30.54
3.00	25.44	22.70	21.02	16.36	28.93	43.68
3.33	34.21	27.30	26.98	23.27	36.52	51.45
4.00	36.66	33.55	33.53	25.25	41.03	55.49
5.00	38.53	38.53	38.15	32.93	46.28	59.87
6.00	44.67	42.38	43.26	42.16	54.14	61.27
7.00	63.51	46.49	51.90	48.02	61.38	67.79
8.00	70.89	49.33	58.64	53.03	65.74	74.74
9.00	74.31	53.83	61.03	56.20	68.83	79.90
10.00	84.04	57.56	64.21	61.12	76.13	87.70
11.00	87.68	59.56	69.39	67.23	80.05	91.13

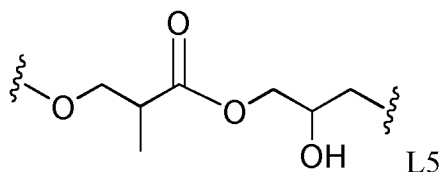
12.00	95.47	67.42	76.54	72.02	88.25	93.32
13.00	99.70	70.87	82.11	80.12	93.29	95.81
14.00	102.32	78.51	90.16	87.77	100.94	99.47

Ejemplo 4. Ensayos microbiológicos. Los ensayos se llevaron a cabo con *Candida albicans* (ATCC 90028) y *Aspergillus fumigatus* (ATCC KM 8001) sembrados en agar Mueller Hinton (BBL™, Beckton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France).

- 5 Las láminas cargadas con nistatina como se indica en el Ejemplo 2 se cortaron en discos de 5 mm de diámetro y se colocaron en contacto directo con los hongos sembrados en las placas. Se incubó durante 48 h a 35°C y se midieron los halos de inhibición del crecimiento de los hongos. Como controles se utilizaron discos de SR, SR-g-GMA, y SR-g-GMA con ergosterol inmovilizado no cargados con fármaco.
- 10 Los controles no mostraron actividad antifúngica y los discos resultaron colonizados por los hongos (Figura 4). Por el contrario, los discos cargados con nistatina dieron lugar a halos de inhibición. Los discos de SR y SR-g-GMA sin ergosterol inmovilizado generaron pequeños halos de inhibición (de mayor diámetro en el caso de *Aspergillus fumigatus*) atribuibles a una rápida cesión de la nistatina adsorbida inespecíficamente. Las
- 15 láminas de SR-g-GMA con ergosterol inmovilizado y cargadas con nistatina presentaron una capacidad mayor para inhibir el crecimiento tanto de *Candida albicans* como de *Aspergillus fumigatus*. Las láminas más eficaces a este respecto fueron las que presentan niveles intermedios de ergosterol, ya que proporcionan una carga suficientemente alta de nistatina sin que la afinidad sea suficientemente elevada para dificultar en exceso la
- 20 transferencia a los hongos.

Reivindicaciones

1. Sistema que comprende un sustrato, donde dicho sustrato se une a moléculas de ergosterol mediante enlaces covalentes.
2. Sistema, según la reivindicación 1, caracterizado porque el ergosterol se une al sustrato mediante enlaces covalentes dispuestos en la superficie del sustrato.
3. Sistema, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el ergosterol se une al sustrato mediante un enlace covalente a través de una cadena lateral.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sustrato se selecciona de entre sílice, titanio, zirconio, polímeros de silicio, algodón, lana, nylon, vidrio, poliolefinas, polivinilos, poliestireno, poliamidas, poliuretano, politereftalato de etileno (PET), polietilenimina, polilactona, policaprolactona, poliéster, polisiloxanos, polianhidrido, poliurea, policarbonato, polisulfona, poliacrilonitrilo, polióxido de etileno, policiclooctano, polímeros acrílicos, y sus copolímeros, opcionalmente sustituidos.
5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las cadenas laterales comprenden una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, de entre 2 a 21 átomos de carbono, opcionalmente dicha cadena incorpora uno o más grupos funcionales seleccionados entre éter, $-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-C(=O)-NR^a-$, alquenilo, y opcionalmente dicha cadena está sustituida por grupos hidroxilo, alcoxi, $-NR^aR^b$ y alquenilo, donde R^a y R^b se seleccionan de forma independiente de entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo.
6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende goma de silicona unida a moléculas de ergosterol mediante enlaces éter a través de cadenas laterales de estructura L5



7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde además el ergosterol asocia ingredientes activos antifúngicos seleccionados entre polienos, azoles y alilaminas, y sus combinaciones.
8. Sistema según la reivindicación 7, donde los polienos se seleccionan entre nistatina, natamicina y anfotericina, y sus combinaciones.

9. Sistema según la reivindicación 7, donde los azoles se seleccionan entre miconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, y sus combinaciones.
10. Sistema según la reivindicación 7, donde las alilaminas se seleccionan entre terbinafina y naftifina, y sus combinaciones.
11. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ingrediente activo antifúngico es nistatina o natamicina.
12. Dispositivo médico que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
- 10 13. Implante que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
14. Catéter que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
15. Film que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
16. Lentes de contacto que comprenden un sistema según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
- 15 17. Uso de un sistema, como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, como sistema de liberación de ingredientes activos antifúngicos.
18. Uso de un sistema, como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, como superficie de trabajo.
- 20 19. Uso del film según la reivindicación 15, como recubrimiento de superficies.
20. Uso de un sistema, como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, como embalaje de dispositivos médicos, envoltorio o recubrimiento de dispositivos médicos, recubrimiento de sistemas de liberación, material de acondicionamiento de sistemas de liberación.
- 25 21. Uso de un sistema como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, como recubrimiento de alimentos, envases de alimentos o complementos nutricionales.
22. Uso de un sistema como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, como cosmético o recubrimiento de cosméticos.
- 30 23. Procedimiento para la preparación de un sistema como se ha descrito en la reivindicación 1, que comprende la reacción entre ergosterol y un sustrato funcionalizado.

33

24. Procedimiento según la reivindicación 23, que comprende además una etapa en la que se pone en contacto el sistema según se ha descrito en la reivindicación 1 y una disolución que comprende un ingrediente activo antifúngico.

25. Sistema obtenible mediante el procedimiento descrito en la reivindicación 23.

1 / 5

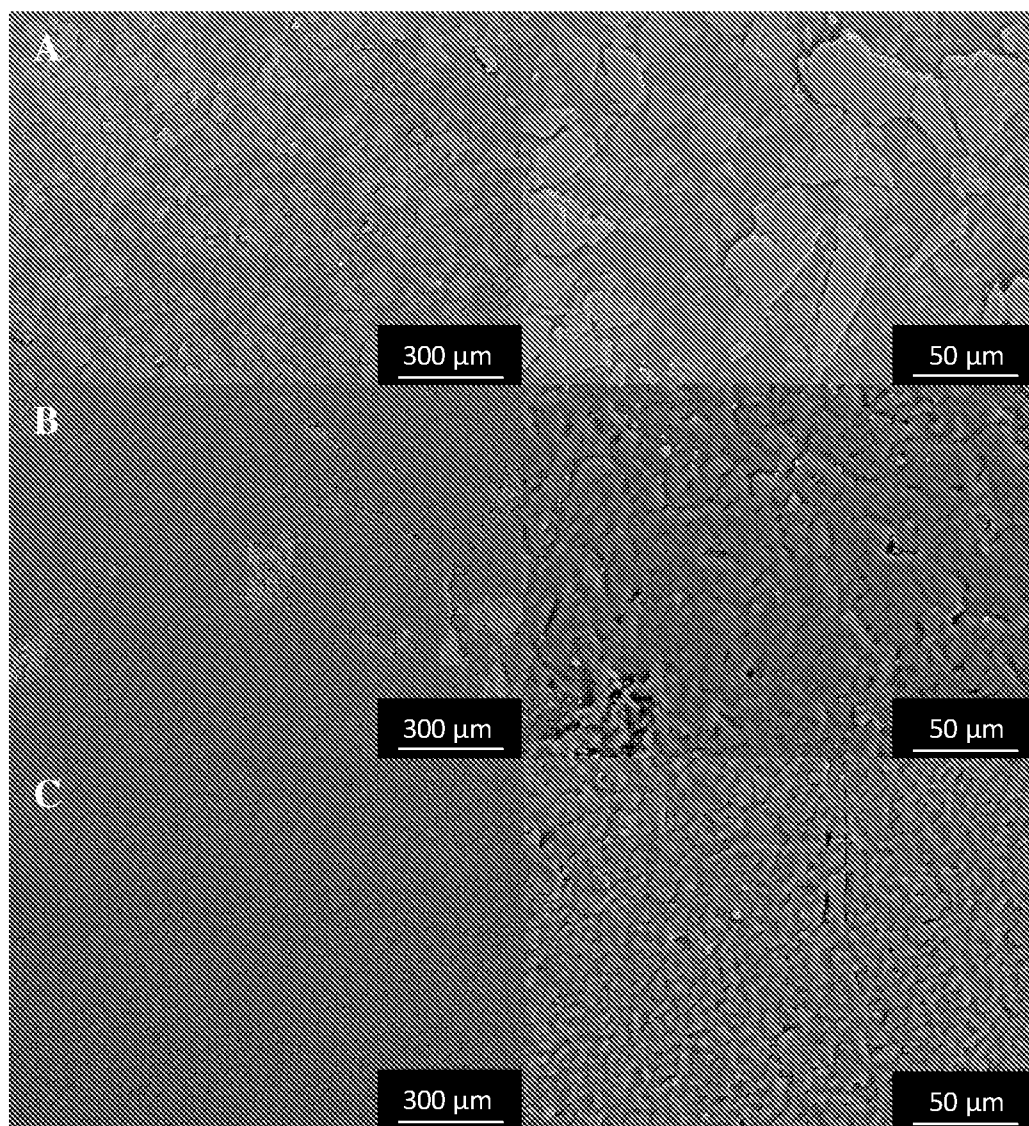


Figura 1

2 / 5

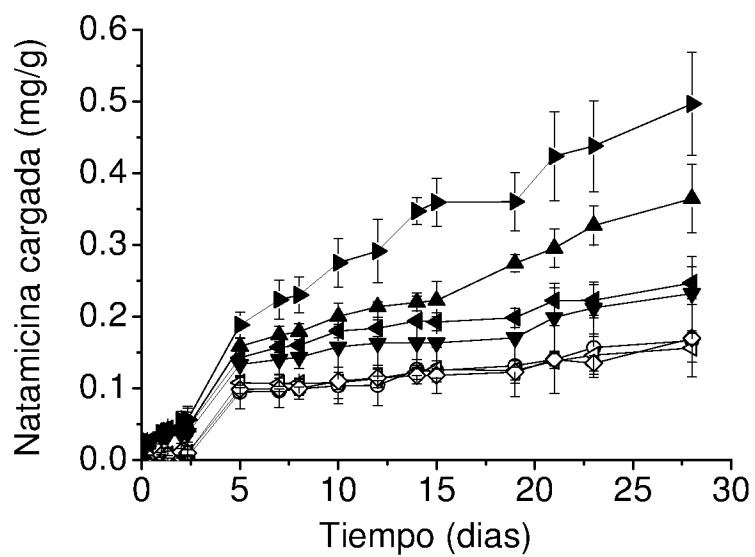


Figura 2A

5

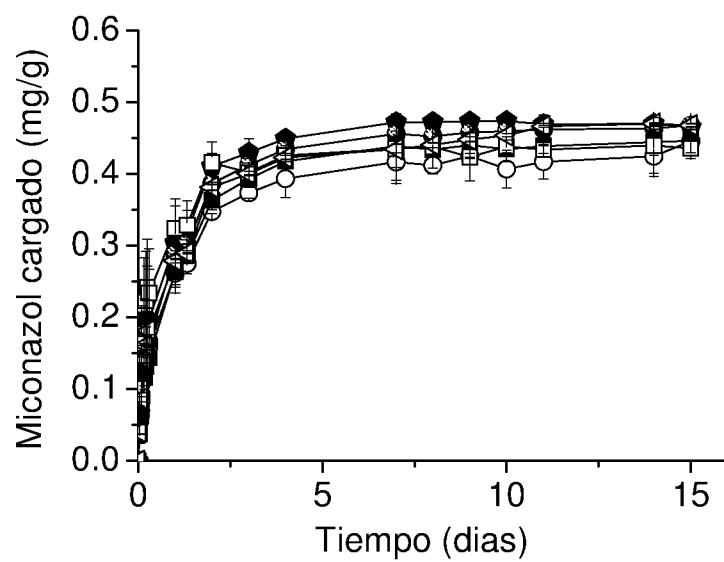


Figura 2B

3 / 5

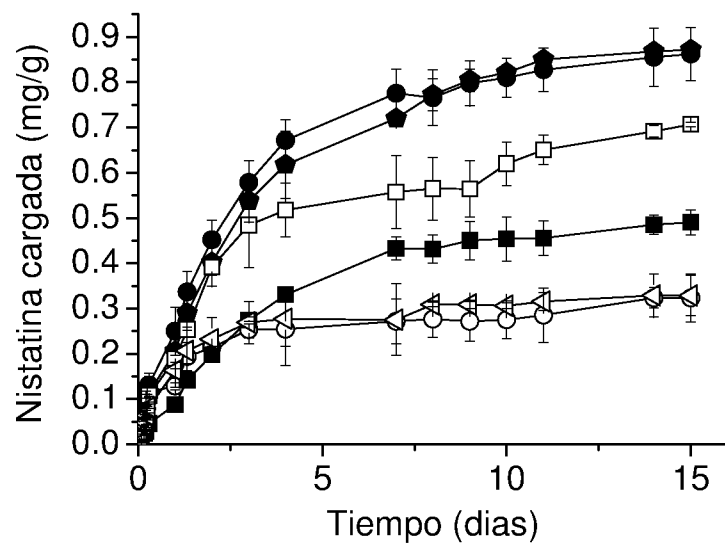


Figura 2C

5

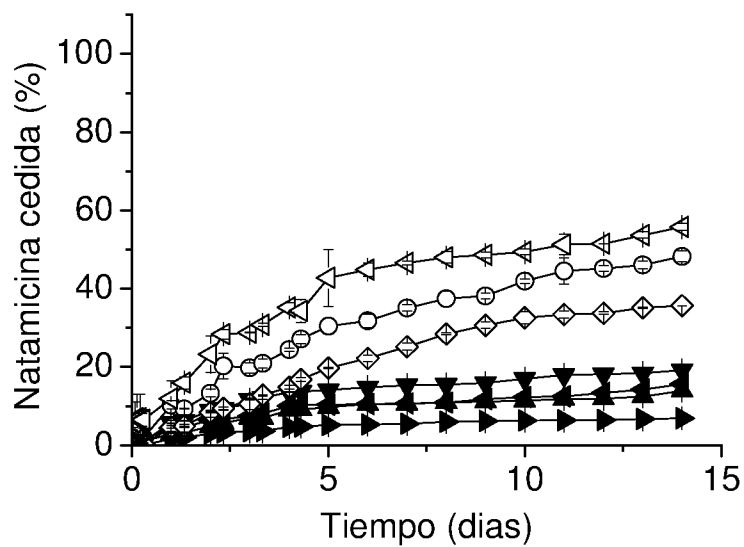


Figura 3A

4 / 5

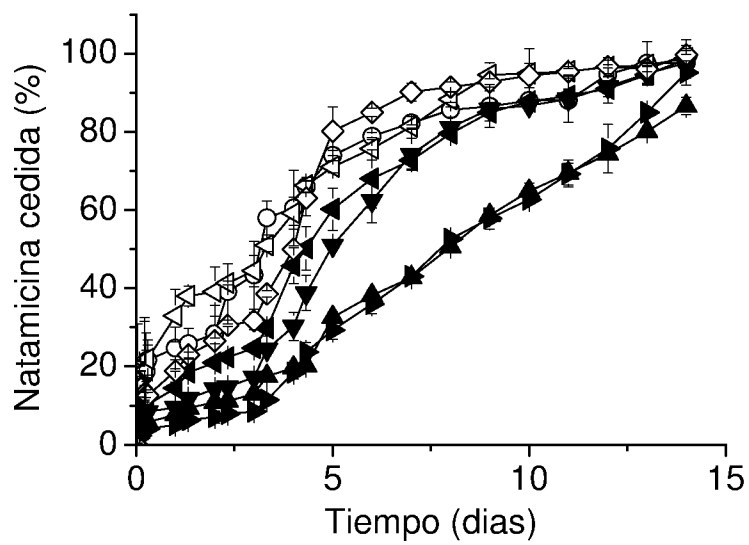


Figura 3B

5

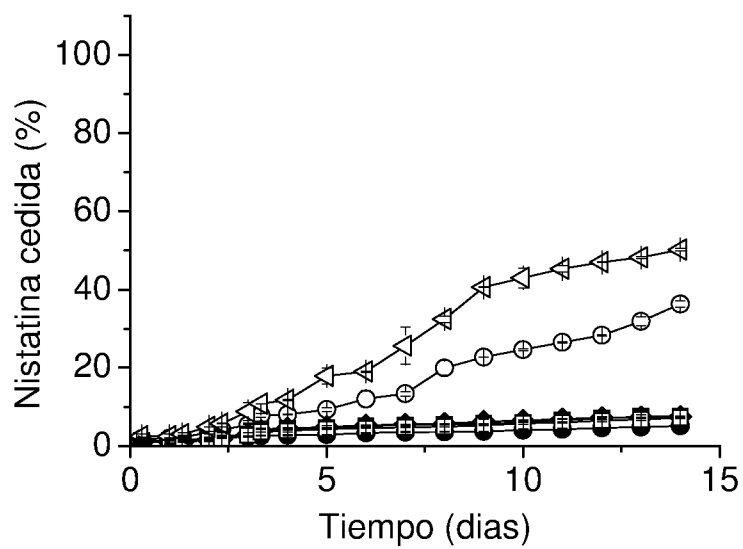


Figura 3C

10

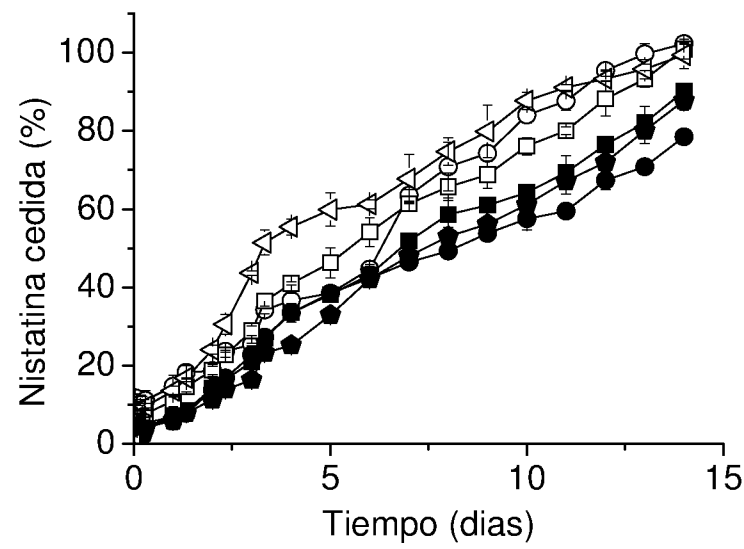


Figura 3D

5

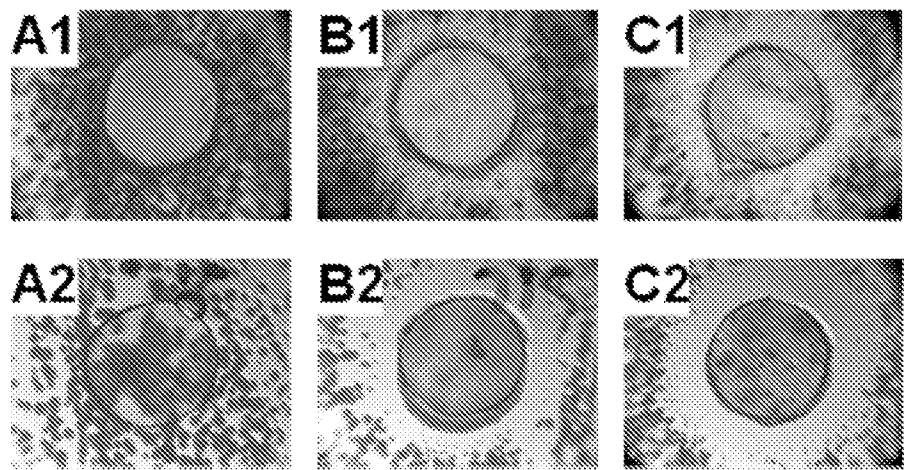


Figura 4

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07J, C08G, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BD-TXT, XPESP, NPL, BIOSIS, CAS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SEGURA, T. et al. "Materials with fungi-bioinspired surface for efficient binding and fungi-sensitive release of antifungal agents". Biomacromolecules, 2014, Vol. 15, N.5, pages 1860-1870. See Abstract; pages 1863-1868.	1-25
A	US 4759923 A (BUNTIN GEORGE A ET AL.) 26/07/1988, claims 1 and 18.	1-25
A	MATSUMORI, N. et al. "An Amphotericin B-Ergosterol Covalent Conjugate with Powerful Membrane Permeabilizing Activity". Chemistry and Biology, 2004, Vol. 11, pages 673-679. See Abstract; figure 2.	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17/09/2014

Date of mailing of the international search report
(22/09/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
N. Martín Laso

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493278

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070490

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAVA-ORTIZ, C. A. et al. "Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent Candida albicans biofilm formation in vitro". Acta Biomaterialia 2010, Vol. 6, pages 1398-1404. see Abstract; Apartado 4. See Abstract; Apartado 4.	1-25
A	ALVAREZ-LORENZO, C. et al. "Medical devices modified at the surface by gamma-ray grafting for drug loading and delivery". Expert Opinion and drug delivery, 2010, Vol. 7, N. 2. See Abstract; figure 8.	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/070490

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US4759923 A	26.07.1988	JPS6422924 A	25.01.1989
		EP0296622 A2	28.12.1988
		EP0296622 A3	28.03.1990
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070490

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07J9/00 (2006.01)

C08G77/04 (2006.01)

A61K31/575 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2014/070490

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07J, C08G, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BD-TXT, XPESP, NPL, BIOSIS, CAS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	SEGURA, T. et al. "Materials with fungi-bioinspired surface for efficient binding and fungi-sensitive release of antifungal agents". Biomacromolecules, 2014, Vol. 15, N.5, páginas 1860-1870. Ver Resumen; páginas 1863-1868.	1-25
A	US 4759923 A (BUNTIN GEORGE A ET AL.) 26/07/1988, reivindicaciones 1 y 18.	1-25
A	MATSUMORI, N. et al. "An Amphotericin B-Ergosterol Covalent Conjugate with Powerful Membrane Permeabilizing Activity". Chemistry and Biology, 2004, Vol. 11, páginas 673-679. Ver Resumen; Figura 2.	1-25

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/09/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
22 de septiembre de 2014 (22/09/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
N. Martín Laso
Nº de teléfono 91 3493278

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070490

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	NAVA-ORTIZ, C. A. et al. "Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent Candida albicans biofilm formation in vitro". Acta Biomaterialia 2010, Vol. 6, páginas 1398-1404. Ver Resumen; Apartado 4. Ver Resumen; Apartado 4.	1-25
A	ALVAREZ-LORENZO, C. et al. "Medical devices modified at the surface by gamma-ray grafting for drug loading and delivery". Expert Opinion and Drug Delivery, 2010, Vol. 7, N. 2. Ver Resumen; Figura 8.	1-25

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070490

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US4759923 A	26.07.1988	JPS6422924 A	25.01.1989
		EP0296622 A2	28.12.1988
		EP0296622 A3	28.03.1990
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07J9/00 (2006.01)

C08G77/04 (2006.01)

A61K31/575 (2006.01)