

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 732**

51 Int. Cl.:

**C08G 63/16** (2006.01)

**C08G 63/676** (2006.01)

**C08G 65/332** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2005 E 05771162 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1773908**

54 Título: **Composición polimérica multi-bloque biodegradable susceptible de transición sol-gel**

30 Prioridad:

**02.08.2004 KR 2004060757**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.02.2013**

73 Titular/es:

**SAMYANG CORPORATION (100.0%)  
263, YEONJI-DONG  
JONGRO-GU, SEOUL 110-470, KR**

72 Inventor/es:

**SEO, MIN-HYO;  
KIM, BONG-OH;  
SHIM, MYUNG-SEOB y  
LEE, SANG-JUN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 395 732 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición polimérica multi-bloque biodegradable susceptible de transición sol-gel.

**Referencia cruzada a la solicitud relacionada**

5 Esta solicitud reivindica prioridad para y el beneficio de la Solicitud de Patente de Corea N° 2004-0060757 presentada el 2 de agosto de 2004, que se incorpora por la presente por referencia para todo propósito como se expone en su totalidad en el presente documento.

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un copolímero multi-bloque biodegradable que tiene un perfil de liberación mejorado y al control de la velocidad de liberación para diversos fármacos. En particular, la presente invención proporciona un copolímero multi-bloque que comprende copolímeros tri-bloque tipo ABA en los que el bloque A es óxido de polietileno y el bloque B es un bloque de óxido de polipropileno u óxido de polibutileno, y en el que los bloques PEO-PPO (o PBO)-PEO resultantes están conectados a través de uniones dicarboxílicas que pueden hidrolizarse en el cuerpo vivo.

**15 Descripción de la técnica relacionada**

Los hidrogeles tienen propiedades biocompatibles y, por lo tanto, se han usado ampliamente como vehículos para fármacos. Un agente terapéutico queda atrapado dentro de la matriz de hidrogel reticulado y, tras la liberación, pasa a través de los intersticios en la matriz.

20 Los primeros sistemas de administración de fármaco usaban geles que tenían propiedades termoplásticas. El sistema termoplástico implicaba la formación de una disolución polimérica en disolventes. Antes de la inyección en el cuerpo, se añadía un fármaco a la disolución polimérica. Después de la inyección de la disolución polimérica se formaba rápidamente un gel por exposición a los fluidos corporales. Sin embargo, los primeros sistemas de administración de fármaco tenían problemas en tanto que podían ser tóxicos e irritantes para el cuerpo debido a la presencia del disolvente orgánico.

25 Recientemente, se ha desarrollado un sistema de administración de fármaco en gel usando disoluciones acuosas. El sistema usa un copolímero de bloques que está compuesto de óxido de polietileno y óxido de polipropileno. Los copolímeros de óxido de polietileno y óxido de polipropileno, cuando están a una concentración y temperatura suficientes, absorben agua para formar un gel (Patentes de Estados Unidos N° 4.188.373, 4.478.822 y 4.474.751). Un ejemplo de la disolución polimérica se conoce como poloxámero y está disponible en el mercado. El poloxámero es un copolímero tri-bloque de PEO-PPO-PEO en el que PEO es un bloque de óxido de polietileno y PPO es un bloque de óxido de polipropileno (PPO). El poloxámero tiene un peso molecular que varía de 9.840 a 14.600 Dalton. Sin embargo, el gel basado en poloxámero no es biodegradable. Para experimentar transición de fase en condiciones fisiológicas, es necesaria una disolución polimérica de poloxámero que tenga una concentración de más del 18 al 20%. Sin embargo, tal disolución concentrada tiene una viscosidad muy alta en la fase líquida y, por lo tanto, puede inducir reacciones desfavorables en el cuerpo vivo. Aunque cuando se inyecta en un cuerpo vivo, se transforma rápidamente en un gel, el estado de gel solo puede mantenerse durante unas horas y, por lo tanto, tiene aplicación limitada como un sistema de administración de fármaco.

40 Para resolver estos problemas, Sosnik et al. sintetizaron el compuesto de fórmula 1, en el que los bloques de poloxámero 407 se conectan mediante una unión uretano haciendo reaccionar poloxámero 407 y diisocianato de hexametileno (Winter Symposium & 11th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2003 Controlled Release Society, N° 117)).

Fórmula química 1



en la que p es 4,

45 Se describe en Sosnik que el compuesto con la fórmula química 1 tiene una viscosidad varias veces mayor que la del poloxámero 407 en el caso de una disolución acuosa al 17% y un tiempo significativamente mayor para mantener su estado de gel a altas temperaturas. Sin embargo, hay problemas con el polímero en que no es biodegradable y tiene un peso molecular de más de 50.000 Dalton y, por lo tanto, es difícil su excreción del cuerpo.

50 X. Zhao et al. describen una composición polimérica biodegradable que incluye el poloxámero 407 de fórmula química 2 (30<sup>th</sup> annual meeting and exhibition of the controlled release society, Glasgow, Escocia, 19-23 de julio de 2003). Durante la preparación del polímero, se hace reaccionar un poloxámero 407 con carbonato de disuccinimidilo (DSC), de manera que los bloques de poloxámero 407 se conectan mediante a través de uniones carbonato como se muestra en la Fórmula Química 2.

Fórmula química 2



en la que el número promedio de  $n$  es 3.

5 La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0187148 se refiere a composiciones poliméricas  $An(BCB)An$  basadas en multi-bloques de poliéster/poliéter, y describe composiciones en las que los bloques ácido poli(hidroxil carboxílico) se introducen en ambos extremos terminales del poloxámero 407 y la cadena de los penta-bloques resultantes se prolonga a través de un engarce de HDI (diisocianato de hexametileno). Las composiciones presentan propiedades de gelificación térmica inversa inesperadamente excepcionales y, en ciertos casos, viscosidades relativamente bajas a aproximadamente temperatura ambiente y viscosidades extremadamente altas a temperaturas aproximadamente fisiológicas o a la temperatura corporal (es decir, dentro del intervalo de aproximadamente 32-40°C). Sin embargo, los polímeros no son biodegradables porque las uniones uretano no son biodegradables.

10 La Patente de Estados Unidos N° 6.348.558 describe un polímero biodegradable en el que al menos dos oligómeros de óxido de polialquileño están conectados a través de engarces de carbonato hidrolíticos.

15 El documento US-A-6083524 muestra macrómeros solubles en agua que incluyen, al menos, una unión hidrolizable formada a partir de grupos carbonato o dioxanona, al menos un bloque polimérico soluble en agua, y al menos un grupo polimerizable, junto con métodos de preparación y uso de los mismos. Los macrómeros se polimerizan preferiblemente usando iniciadores de radicales libres bajo la influencia de excitación con luz ultravioleta de longitud de onda larga o con luz visible. La biodegradación ocurre en las uniones dentro de los oligómeros de extensión y da como resultado fragmentos que no son tóxicos y se eliminan fácilmente del cuerpo. Pueden usarse macrómeros, por ejemplo, para encapsular células o suministrar agentes profilácticos, terapéuticos o de diagnóstico de una manera controlada.

20 El documento EP-A-1382628 se refiere a copolímeros segmentados/de bloques que son biodegradables, termoplásticos y de fases separadas, que encuentran uso en diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Los copolímeros comprenden bloques o segmentos de un prepolímero (A) blando que tiene una  $T_g$  menor de 37°C, y bloques o segmentos de un prepolímero de poliéster (B) duro que tiene una temperatura de transición de fase de 40-100°C.

25 El documento US-A-5364908 se refiere a composiciones de resina cuyas propiedades de dispersabilidad y mecánicas mejoradas se obtienen polimerizando un compuesto (A) polimerizable, *in situ* en una resina (B) termoplástica fundida, en presencia de un dispersante (C) reactivo o compatible con al menos uno de la resina (B) y el polimerizado de (A).

30 Sin embargo, los polímeros descritos anteriormente solo tienen grupos hidroxilo en los extremos terminales y la velocidad de liberación de un fármaco a partir del gel depende solo de la velocidad de difusión, que se determina mediante la viscosidad del gel. Por lo tanto, es imposible controlar la velocidad de liberación del fármaco.

Por lo tanto, hay una necesidad de una composición polimérica biodegradable que tenga baja toxicidad y un perfil de liberación mejorado, y que pueda controlar la velocidad de liberación de diversos fármacos.

### Compendio de la invención

35 La presente invención proporciona un copolímero multi-bloque que comprende al menos dos copolímeros tri-bloque tipo ABA que están conectados covalentemente a través de una unión dicarboxílica biodegradable, en el que A es un bloque de óxido de polietileno, B es un bloque de óxido de polipropileno, un bloque de óxido de polibutileno o una combinación de los mismos, y en el que dicho copolímero multi-bloque tiene un grupo iónico seleccionado del grupo que consiste en sal de metal monovalente y divalente de  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3^{2-}$ , y  $-C(=O)-R-C(=O)-O-$  en ambos extremos terminales.

40 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye el copolímero multi-bloque de la presente invención.

La presente invención también proporciona métodos de fabricación y uso del copolímero multi-bloque de la presente invención.

45 La composición de copolímero multi-bloque de la presente invención puede mejorar el mantenimiento del gel en una disolución acuosa aumentando el peso molecular del copolímero a través de la formación de múltiples bloques de unidades PEO-PPO (o PBO)-PEO. El copolímero multi-bloque puede aplicarse para su uso como un sistema de administración de fármaco, de liberación sostenida, para diversos fármacos.

50 Las características y ventajas adicionales de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue que, cuando se toma junto con los dibujos adjuntos, ilustran conjuntamente, a modo de ejemplo, las características de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un espectro de RMN de  $^1H$  de un poloxámero multi-bloque de acuerdo con el Ejemplo 1.

La Figura 2 es un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de poloxámero disuccinato (Ejemplo 1 Experimental).

La Figura 3 es un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de poloxámero + (TMS-Cl/piridina) (Ejemplo 1 Experimental).

La Figura 4 es un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de poloxámero disuccinato + (TMS-Cl/piridina) (Ejemplo 1 Experimental).

5 La Figura 5 es un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un poloxámero multi-bloque + (TMS-Cl/piridina) (Ejemplo 1 Experimental).

La Figura 6 es un gráfico que muestra un perfil de transición de fase sol-gel de un poloxámero multi-bloque (Ejemplo 13).

La Figura 7 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de interferón- $\alpha$  del hidrogel de la presente invención (Ejemplos 14 y 15).

10 La Figura 8 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de la hormona del crecimiento humana a partir del hidrogel de la presente invención (Ejemplo 16).

La Figura 9 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de G-CSF a partir del hidrogel de la presente invención (Ejemplo 17).

15 La Figura 10 es un gráfico que muestra el perfil de liberación de G-CSF pegilado a partir del hidrogel de la presente invención (Ejemplo 18).

#### Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

20 Antes de describir y desvelar las presentes composiciones poliméricas y métodos de uso y fabricación de las mismas, debe entenderse que esta invención no está limitada a las configuraciones, etapas de proceso, y materiales particulares descritos en este documento, puesto que tales configuraciones, etapas de proceso, y materiales pueden variar algo. Debe entenderse también que la terminología empleada en este documento se usa con el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas y los equivalentes de las mismas.

25 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un polímero que contiene "un grupo terminal" incluye la referencia a dos o más de tales grupos, y la referencia a "un fármaco hidrófobo" incluye la referencia a dos o más de tales fármacos.

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas más adelante.

30 Como se usa en este documento, el término "agente bioactivo" o "fármaco" o cualquier otro término similar significa cualquier material o compuesto químico o biológico adecuado para administración por métodos conocidos previamente en la materia y/o por los métodos enseñados en la presente invención y que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado. Tales efectos pueden incluir, sin que ello pretenda ser limitante, (1) tener un efecto profiláctico sobre el organismo y evitar un efecto biológico indeseado tal como prevenir una infección, (2) aliviar un estado provocado por una enfermedad, por ejemplo, aliviar el dolor o inflamación provocados como resultado de una enfermedad, y/o (3) aliviar, reducir o eliminar completamente una enfermedad del organismo. El efecto puede ser local, tal como proporcionar un efecto anestésico local, o puede ser sistémico.

Como se usa en este documento, el término "biodegradable" o "biodegradación" se define como la conversión de materiales en intermedios menos complejos o productos finales por hidrólisis por solubilización, o mediante la acción de entidades formadas biológicamente que pueden ser enzimas u otros productos del organismo.

40 Como se usa en este documento, el término "biocompatible" significa materiales o los intermedios o productos finales de los materiales formados por hidrólisis por solubilización, o mediante la acción de entidades formadas biológicamente que pueden ser enzimas u otros productos del organismo y que no provocan efectos adversos sobre el cuerpo.

45 Como se usa en este documento, "cantidad eficaz" significa la cantidad de un agente bioactivo que es suficiente para proporcionar el efecto local o sistémico deseado y que se comporta a una proporción riesgo/beneficio razonable al ser utilizada en cualquier tratamiento médico.

50 Como se usa en este documento, "administrar" y términos similares significan suministrar la composición al individuo que se está tratando, de manera que la composición pueda circular sistémicamente. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención se administran por vía subcutánea, intramuscular, transdérmica, oral, transmucosa, intravenosa, o intra-peritoneal. Los productos inyectables para tal uso pueden prepararse en formas convencionales, como una disolución o suspensión líquida, o en una forma sólida que es adecuada para su preparación como una disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como una emulsión. Los

excipientes adecuados que pueden usarse para la administración incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, y similares; y, si se desea, pueden usarse cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, tampones, y similares. Para administración oral, puede formularse de diversas formas, tales como disoluciones, comprimidos, cápsulas, etc.

5 Se hará referencia ahora a las realizaciones ejemplares y en, este documento, se usará un lenguaje específico para describirlas. No obstante, se entenderá que con ello no se pretende limitar el alcance de la invención. Las alteraciones y modificaciones adicionales de las características inventivas ilustradas en este documento, y las aplicaciones adicionales de los principios de la invención como se ilustra en este documento, que se le pueden ocurrir a un experto en la materia pertinente y que tiene posesión de esta divulgación, deben considerarse dentro del  
10 alcance de la invención.

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición de copolímero multi-bloque que, cuando se pone en un medio acuoso, forma una disolución a bajas temperaturas y gelifica a altas temperaturas. Más particularmente, la presente invención proporciona un copolímero multi-bloque biodegradable que tiene un perfil de liberación y control de la velocidad de liberación de diversos fármacos mejorados. En particular, la presente invención  
15 proporciona un copolímero multi-bloque que comprende al menos dos copolímeros tri-bloque tipo ABA que están conectados covalentemente a través de una unión dicarboxílica biodegradable, en la que A es un bloque de óxido de polietileno, B es un bloque de óxido de polipropileno, un bloque de óxido de polibutileno o una combinación de los mismos, y en la que dicho copolímero multi-bloque tiene un grupo iónico seleccionado del grupo que consiste en sal de metal monovalente y divalente de  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ , y  $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  en ambos extremos terminales.

20 El copolímero multi-bloque de la presente invención forma un hidrogel cuando alcanza una concentración suficiente y/o por encima de una temperatura crítica y, de esta manera, muestra una transición de fase sol-gel y es biodegradable. En el copolímero multi-bloque de la presente invención, los bloques PEO-PPO (o PBO)-PEO están conectados a través de uniones dicarboxílicas biodegradables, y tienen un alto peso molecular que proporciona propiedades de mantenimiento de gel mejoradas. Adicionalmente, el extremo terminal iónico proporciona una  
25 liberación sostenida de fármaco a partir del gel.

Una realización de la presente invención es un copolímero multi-bloque que puede representarse mediante la siguiente fórmula química 3:



30 En la que PEO es un bloque de óxido de polietileno, Y es PPO o PBO o combinaciones de PPO y PBO, siendo PPO un bloque de óxido de polipropileno y PBO un bloque de óxido de polibutileno,

X es un grupo anión seleccionado del grupo que consiste en  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ , y  $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$ ,

n es un número entero que varía de 1 a 100,

R es  $-(\text{CH}_2)_m-$  o un arilo que tiene  $\text{C}_m$ ,

donde m es un número entero que varía de 0 a 20, m' es un número entero que varía de 6 a 12, y

35 M es H o un grupo catión.

Preferiblemente, M es un catión seleccionado del grupo que consiste en Li, Na, K, Ag, Au, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Co, y Ni.

40 El bloque de óxido de polietileno en el copolímero multi-bloque consiste en unidades óxido de etileno que tienen un número de unidades que varía de aproximadamente 2 a 2000, preferiblemente de aproximadamente 5 a 500, más preferiblemente de aproximadamente 80 a 120. En la fórmula 3 anterior, el número de unidades de cada óxido de etileno de los dos bloques de PEO puede ser igual o diferente. El número de unidades de óxidos de propileno u óxidos de butileno en los bloques de óxido de polipropileno u óxido de polibutileno está dentro del intervalo de 2 a 2000, preferiblemente de aproximadamente 20 a 500, y más preferiblemente es de aproximadamente 30 a 250.

45 El copolímero multi-bloque de la presente invención tiene un peso molecular promedio ponderal que varía de 40.000 Dalton a 1.000.000 Dalton, preferiblemente de 40.000 Dalton a 500.000 Dalton, y más preferiblemente es de 80.000 Dalton a 130.000 Dalton.

50 La proporción de unidades de óxido de etileno a unidades de óxido de propileno u óxido de butileno en un bloque PEO-PPO (o PBO)-PEO puede ajustarse para variar las propiedades del polímero. Por ejemplo, cuando se requiere que el copolímero multi-bloque mantenga su solubilidad en agua, la proporción de unidades entre PEO y PPO o PBO en el copolímero multi-bloque varía de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 40:1, preferiblemente de 1:1 a 7,5:1, y más preferiblemente de 1:1 a 5:1. El bloque de PEO se incluye en una cantidad del 10 al 85% en peso, preferiblemente del 40% al 85% en peso de las unidades PEO-PPO (o PBO)-PEO.

El término copolímero "multi-bloque" en la presente invención se refiere a un copolímero en el que un bloque de óxido de polietileno está unido a un bloque de óxido de polipropileno u óxido de polibutileno que, a su vez, está unido a un bloque de óxido de polietileno y los bloques de PEO-PPO (o PBO)-PEO resultantes están conectados a través de uniones dicarboxílicas biodegradables.

- 5 El término "unión dicarboxílica" en la presente invención se refiere a una unión éster formada por la reacción de un compuesto de alquilo o arilo que tiene dos grupos carboxílicos en una molécula, tales como ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido adípico y similares con un grupo OH terminal de un bloque de PEO-PPO o PBO-PEO. La unión dicarboxílica puede proporcionarse mediante un ácido alquil dicarboxílico seleccionado del grupo que  
10 consiste en ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido sebacoílico, ácido subérico, y ácido dodecanoico. La unión dicarboxílica puede proporcionarse también mediante un ácido dicarboxílico insaturado tal como ácido fumárico o ácido maleico, o mediante un ácido aril dicarboxílico tal como ácido ftálico, y ácido tereftálico.

Como se ha indicado previamente, la unión dicarboxílica puede estar unida mediante éster al grupo hidroxilo que está presente en ambos extremos terminales de los bloques de PEO-PPO (o PBO)-PEO. La unión éster puede  
15 degradarse en un ácido carboxílico y las unidades PEO-PPO (o PBO)-PEO por hidrólisis o enzimáticamente en un cuerpo vivo.

Ambos extremos terminales del copolímero multi-bloque de la presente invención son grupos aniónicos seleccionados de  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$  y  $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$ . Una sal correspondiente al grupo aniónico se forma con un catión de metal monovalente tal como Li, Na, K, Ag, o Au o un catión de metal divalente tal como Ca, Mg, Zn, Fe,  
20 Cu, Co o Ni.

En particular, el uno o más copolímeros multi-bloque de la presente invención que tienen grupos aniónicos en ambos extremos terminales pueden formar un gel más estable con un metal catiónico divalente porque el copolímero multi-bloque anterior y el metal forman un complejo y, de esta manera, puede ser útil como un vehículo para la liberación  
25 sostenida de fármaco. Cuando el copolímero multi-bloque de la presente invención, que tiene un grupo aniónico, se mezcla con un fármaco catiónico en una disolución acuosa, forma una sal iónica. La sal iónica reduce la velocidad de liberación inicial del fármaco a partir del gel de copolímero multi-bloque y, de esta manera, mejora la liberación sostenida de fármaco. Cuando se añade una sal de metal catiónico divalente, tal como cloruro de calcio, cloruro de cinc, o cloruro de magnesio, a una disolución mixta del copolímero multi-bloque de la presente invención que tiene grupos aniónicos en sus extremos terminales y un fármaco que tiene un grupo aniónico, el catión de metal divalente  
30 forma un complejo con el fármaco y el copolímero multi-bloque, lo que permite la liberación sostenida de fármacos a partir del gel. Por lo tanto, el copolímero multi-bloque de la presente invención puede aplicarse como un sistema de administración de fármaco no iónico y iónico para liberación controlada de fármaco.

La composición de copolímero multi-bloque de la presente invención puede prepararse usando bloques de PEO-PPO (o PBO)-PEO, que están disponibles en el mercado y se denominan poloxámeros. Un poloxámero es un  
35 copolímero de bloques en el que un bloque hidrófilo de óxido de polietileno (PEO) y un bloque hidrófobo de óxido de polipropileno (PPO) están unidos en forma de un tri-bloque PEO-PPO-PEO mediante un enlace éter, y que tiene un peso molecular promedio ponderal de 1.000 Dalton a 20.000 Dalton y tiene un grupo hidroxilo terminal. En la presente invención, pueden usarse poloxámero 188 (Pluronic® F-68), y poloxámero 407 (Pluronic® F-127). El copolímero multi-bloque de la presente invención se prepara usando un poloxámero purificado o no purificado. El poloxámero purificado es más preferible para su uso en la preparación de copolímeros multi-bloque de gran peso molecular de la presente invención. La purificación del poloxámero se realiza mediante uno de los siguientes procesos: se disuelve en cloruro de metileno y se hace precipitar en hexano, o se separa en un disolvente de n-propanol/H<sub>2</sub>O por separación de las capas, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.800.711, que se  
40 incorpora en este documento por referencia.

45 La presente invención también proporciona un método para preparar una composición polimérica multi-bloque en la que un copolímero tribloque de bloques de óxido de polipropileno u óxido de polibutileno se sitúa entre dos bloques de óxido de polietileno, estando conectados dichos copolímeros tribloque por uniones dicarboxílicas biodegradables.

La presente invención proporciona un método para preparar un polímero multi-bloque, que incluye extremos terminales carboxílicos, que incluye los siguientes procesos:

- 50 1) preparar una disolución de reacción que contiene una cantidad predeterminada de PEO-Y-PEO, añadir lentamente de 0,5 a 1,0 equivalentes de dihaluro de ácido dicarboxílico basado en 1 equivalente de los grupos hidroxilo de extremo terminal del PEO-Y-PEO a la disolución de reacción y permitir que la reacción transcurra durante un número de horas predeterminado;
- 55 2) añadir más de 1 equivalente de dihaluro de ácido dicarboxílico adicional basado en un equivalente de grupos hidroxilo del extremo terminal de PEO-Y-PEO a la disolución de reacción para que reaccione hasta que se completa la reacción;
- 3) hacer precipitar el copolímero multi-bloque producido en un disolvente de éter o hexano y después disolver el precipitado en alcohol; y

4) añadir lentamente éter o hexano, de manera que una proporción en volumen de alcohol/éter o hexano es 1/1 a 1/20, para hacer precipitar el copolímero multi-bloque.

La presente invención también proporciona un método para preparar un copolímero multi-bloque que tiene sales de carboxilato metálico en ambos extremos terminales del copolímero multi-bloque, que comprende:

- 5        1) disolver un polímero que tiene grupos carboxílicos en ambos extremos terminales en un disolvente que puede mezclarse con agua, tal como acetona, acetonitrilo, o dioxano, y
- 2) neutralizar la disolución multi-bloque con carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro de calcio, cloruro de cinc, cloruro de magnesio, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio seguido de diálisis.

10       Como alternativa, un copolímero multi-bloque que tiene sales de carboxilato metálico, excepto la sal carboxilato sódico, en ambos extremos terminales del copolímero multi-bloque puede prepararse como en el siguiente método, que comprende:

          tratar un polímero que tiene carboxilato sódico en ambos extremos terminales con una disolución acuosa que contiene cloruro de calcio, cloruro de cinc, cloruro de magnesio, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio.

15

La presente invención también proporciona un método para preparar un copolímero multi-bloque que tiene un ácido sulfúrico, ácido fosfórico, o una sal metálica de los mismos en su extremo terminal del polímero, que comprende:

La presente invención proporciona un método para preparar un polímero multi-bloque que incluye extremos terminales hidroxilo que comprende:

20       1) preparar una disolución de reacción que contiene una cantidad predeterminada de PEO-Y-PEO, añadir lentamente de 0,5 a 1,0 equivalentes de dihaluro de ácido dicarboxílico basado en 1 equivalente de grupos hidroxilo de extremo terminal del PEO-Y-PEO a la disolución de reacción y permitir que la reacción transcurra durante un número de horas predeterminado;

25       2) añadir 0,1 equivalentes adicionales de PEO-Y-PEO a la disolución de reacción anterior para que reaccionen hasta que se complete la reacción;

          3) hacer precipitar el copolímero multi-bloque producido en un disolvente de éter o hexano y después disolver el precipitado en alcohol;

          4) añadir lentamente éter o hexano, de manera que la proporción en volumen de alcohol/éter o hexano sea de 1/1 a 1/20, para hacer precipitar el copolímero multi-bloque;

30       5) disolver el polímero multi-bloque obtenido mediante la etapa 4) en un disolvente y hacerlo reaccionar con un complejo de trióxido de sulfato y piridina ( $C_5H_5NSO_3$ ) u oxicluro de fósforo ( $POCl_3$ ); y

          2) neutralizar opcionalmente la mezcla de reacción con carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro de calcio, cloruro de cinc, cloruro de magnesio, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio para preparar un copolímero multi-bloque que tiene una sal metálica en su extremo terminal del polímero.

35       En el caso en el que los extremos terminales del polímero multi-bloque son otro grupo anión, éste puede prepararse usando un método convencional bien conocido.

En las reacciones anteriores, el dihaluro de ácido dicarboxílico puede hacerse reaccionar directamente como un engarce dicarboxílico. También, cuando el propio ácido dicarboxílico es un material de partida, el ácido dicarboxílico puede activarse con haluro de oxalilo para convertirlo en un dihaluro de ácido dicarboxílico que puede usarse después. La reacción puede realizarse con disolvente o sin disolvente. Los disolventes de reacción utilizables incluyen diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, acetona, tolueno, dioxano y similares.

40

La velocidad de la reacción de polimerización y el grado de polimerización, que determinan el peso molecular promedio del polímero, pueden controlarse ajustando la temperatura de reacción y el tiempo de reacción. La temperatura de reacción puede cambiarse dependiendo del punto de ebullición de los disolventes de reacción, aunque preferiblemente varía de 60 a 120°C. El tiempo de reacción preferiblemente varía de aproximadamente 12 horas a 72 horas.

45

Para aumentar la velocidad de reacción, puede usarse un catalizador tal como octoato de estaño, cloruro de cinc y similares, o puede usarse una amina tal como piridina, dimetilaminopiridina, imidazol, trietilamina y similares en una cantidad dos veces el número de equivalentes basado en un equivalente del ácido dicarboxílico. Sin embargo, para obtener una alta pureza del polímero, es preferible que no se use un catalizador o una amina.

50

El polímero polimerizado puede purificarse por métodos bien conocidos y, preferiblemente, haciéndolo precipitar en un disolvente en el que el material de reacción se disuelve mientras que un polímero polimerizado no se disuelve.

Un método para preparar el copolímero multi-bloque de la presente invención se ejemplifica como sigue.

5 En primer lugar, un dicloruro de ácido dicarboxílico, que se diluye en un disolvente de reacción en la cantidad de 0,5 a 1,0 equivalentes basado en un equivalente del grupo hidroxilo del extremo terminal del poloxámero, se añade lentamente a un recipiente de reacción que contiene un poloxámero durante más de 6 horas. La reacción se realiza durante más de 12 horas. La temperatura de reacción puede cambiarse dependiendo de la clase de disolvente usado. En el caso de realizar la reacción sin un disolvente, es preferible que se realice a una temperatura que varía de 40 a 120°C y en 24 horas.

10 Después de la reacción, se añaden de nuevo 0,1 equivalentes de poloxámero disueltos en un disolvente de reacción a la disolución de reacción, y después se hacen reaccionar durante más de 2 horas y después se hacen precipitar en un disolvente de éter para obtener un polímero multi-bloque que tiene extremos terminales hidroxilo. El precipitado obtenido se disuelve en metanol, y después se añade lentamente éter dietílico de manera que la proporción en volumen mixta de metanol/éter puede variar de 1/1 a 1/20, y preferiblemente de 1/5 a 1/10, para hacer precipitar el  
15 polímero de nuevo y purificarlo. El precipitado se disuelve en una disolución acuosa de acetona, después se trata con una resina de intercambio de aniones, recuperando un polímero que tiene extremos terminales carboxilo, que después se dializa usando un tubo de diálisis con un corte de peso molecular de 40.000 Dalton. El dializado se liofiliza después obteniéndose un poloxámero multi-bloque que tiene extremos terminales hidroxilo.

20 Un copolímero multi-bloque que tiene un extremo terminal carboxílico se obtiene como sigue: un exceso de más de 1 equivalente de dicloruro de ácido dicarboxílico, basado en el número de equivalentes del grupo hidroxilo del extremo terminal del poloxámero, se añade después de la reacción de polimerización, que después se hace reaccionar durante más de 2 horas y después se añade éter para hacer precipitar un polímero. El precipitado obtenido se disuelve en metanol, y después se añade lentamente éter, de manera que la proporción en volumen mixta de metanol/éter varía de 1/1 a 1/20, preferiblemente de 1/5 a 1/10, para hacer precipitar el polímero de nuevo,  
25 y purificarlo. Se obtiene así un poloxámero multi-bloque que tiene extremos terminales carboxílicos. El copolímero se disuelve en una disolución acuosa de acetona y se neutraliza con carbonato sódico o bicarbonato sódico para obtener un copolímero en el que las sales carboxilato sódico están presentes en ambos extremos terminales del poloxámero multi-bloque.

30 El copolímero multi-bloque que tiene sales carboxilato sódico presentes en ambos extremos terminales se mezcla con un exceso de una disolución acuosa de cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cinc, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio y similares, y después se dializa para preparar un copoloxámero multi-bloque que tiene una sal de metal monovalente o divalente en su extremo terminal.

35 Para obtener un copolímero multi-bloque que tenga un grupo sulfato o un grupo fosfato en su extremo terminal, se disuelve un copoloxámero multi-bloque que tenga ambos extremos terminales hidroxilo en dimetilformamida, después se hace reaccionar con un complejo de trióxido de sulfato y piridina ( $C_5H_5NSO_3$ ) u oxiclorigenato de fósforo ( $POCl_3$ ) a 60°C durante 10 horas, el producto obtenido se diluye después con agua destilada y se dializa. Posteriormente, se añade una disolución acuosa de sal metálica tal como bicarbonato sódico para neutralizar la disolución anterior, seguido de liofilización.

40 Ambos extremos terminales del copolímero multi-bloque sintetizado de la presente invención pueden identificarse usando resonancia magnética nuclear (RMN). El copolímero multi-bloque sintetizado se hace reaccionar con cloruro de trimetilsililo (TMS-Cl) en presencia de trietilamina y después su espectro se mide usando resonancia magnética nuclear. Cuando su grupo terminal es un grupo terminal carboxilo, el pico de la señal se muestra a 0,3 ppm. Usando estos resultados, puede determinarse el grupo terminal del copolímero multi-bloque sintetizado.

45 El copolímero multi-bloque de la presente invención forma un hidrogel cuando se pone en un medio acuoso a una concentración suficiente y por encima de una temperatura crítica. El término "transición de fase sol-gel" en la presente invención significa que está presente como un líquido que puede fluir por debajo de una temperatura crítica y se convierte en un gel por encima de una temperatura crítica, y si la temperatura se baja por debajo de un punto crítico, cambia de modo reversible a un líquido que puede fluir. La temperatura de gelificación depende del tipo y peso molecular del polímero, la concentración de la disolución acuosa de copolímero, la ausencia o presencia de  
50 una sal, la concentración de protones y similares. La temperatura crítica varía de 5 a 37°C. El copolímero multi-bloque de la presente invención puede disolverse en agua a una concentración del 2 al 40% en peso y su temperatura de gelificación varía de 10 a 50°C.

55 El copolímero multi-bloque de la presente invención puede formar un gel a una concentración relativamente baja del 10% en comparación con un poloxámero y, por lo tanto, tiene una menor toxicidad en el cuerpo vivo. También tiene una mayor temperatura de gelificación que un poloxámero y, por lo tanto, se inyecta fácilmente. El copolímero multi-bloque de la presente invención también aumenta de peso molecular al añadirle multi-bloques con unidades PEO-PPO (o PBO)-PEO y, por lo tanto, un copolímero multi-bloque con un alto peso molecular puede mantenerse como un gel en un cuerpo vivo o como una disolución acuosa durante un largo tiempo. Por lo tanto, en el caso en el que el

copolímero multi-bloque de la presente invención se usa como un vehículo para fármaco, puede liberar el fármaco continuamente durante más de 24 horas, incluso con una inyección cada vez. Por lo tanto, la presente invención puede superar el problema de usar un poloxámero 407 convencional como un sistema de administración porque el poloxámero tiene una corta duración de la liberación sostenida de fármaco.

- 5 El copolímero multi-bloque de la presente invención tiene propiedades hidrolíticas debido al enlace éster de su unión dicarboxílica y se degrada en bloques de bajo peso molecular de PEO-PPO (o PBO)-PEO y ácidos dicarboxílicos que son solubles en agua y se excretan fácilmente del cuerpo vivo. Por lo tanto, pueden evitarse los efectos adversos provocados por la presencia de un polímero grande en el cuerpo. La velocidad de degradación del copolímero multi-bloque depende del número de uniones dicarboxílicas y, por lo tanto, el tamaño y número de cada bloque puede ajustarse para controlar la velocidad de hidrólisis y el tamaño del producto hidrolizado.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el presente copolímero multi-bloque biodegradable. El polímero multi-bloque de la presente invención puede ser un vehículo para el suministro de fármacos. El hidrogel del copolímero multi-bloque de la presente invención puede suministrar fármacos y puede implantarse o inyectarse en un cuerpo y suministrar fármacos. El hidrogel formado por el copolímero multi-bloque de la presente invención se usa preferiblemente para la liberación sostenida de un fármaco en el cuerpo.

Después de que un fármaco se añada a una disolución o suspensión que incluye el copolímero multi-bloque de la presente invención, ésta puede inyectarse como una disolución acuosa en un cuerpo vivo a una baja temperatura, formando la disolución copolimérica multi-bloque que contiene el fármaco un depósito que contiene fármaco en un estado de gel a la temperatura corporal y libera lentamente el fármaco a partir del gel cuando las uniones dicarboxílicas del copolímero multi-bloque se degradan por hidrólisis. El copolímero multi-bloque de la presente invención puede mezclarse también con un fármaco en una disolución acuosa o un disolvente orgánico y, después, puede usarse como un vehículo para fármaco en forma de una micro-esfera, nano-partícula, tira, película y similares para inyectarlo en un cuerpo vivo.

Los fármacos que pueden usarse en el sistema de administración de fármaco usando los copolímeros multi-bloque de la presente invención pueden ser cualquier fármaco, por ejemplo fármacos no iónicos e iónicos. El fármaco puede incluir, sin que ello pretenda ser limitante, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, polisacáridos, nucleótidos y similares. El fármaco, preferiblemente, puede ser un fármaco iónico y particularmente un péptido o proteína que tiene un gran número de grupos carboxílicos y grupos amino iónicos en su molécula. Los péptidos o proteínas ejemplares incluyen hormona del crecimiento (GH), interferón (IFN), factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de la colonia de macrófagos granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina (IL), factor de crecimiento de fibroblastos, hormona estimulante del folículo (FSH), factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF), octreotida, insulina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), calcitonina, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína morfogenética ósea (BMP), activador de plasminógeno tisular (TPA), trombotopoyetina (TPO), factor de crecimiento tisular, factor de necrosis tumoral (TNF) y similares. El péptido y la proteína pueden ser naturales, sintéticos, nativos, glicosilados, modificados con un polímero tal como PEG, y fragmentos y análogos biológicamente activos de los mismos.

Por lo tanto, otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el copolímero multi-bloque de la presente invención y una cantidad eficaz de un agente bioactivo. El agente bioactivo puede incluirse dentro de un intervalo del 0,01% al 50%. La disolución acuosa de copolímero multi-bloque puede usarse como un vehículo para fármaco si muestra una transición de fase y puede usarse preferiblemente en una concentración del 0,5 al 50%.

Para usarlo como un vehículo para fármaco para péptidos o proteínas, es necesario llevar al copolímero multi-bloque de la presente invención al estado de una disolución acuosa. El copolímero multi-bloque de la presente invención no se disuelve a temperaturas ambiente, tales como aproximadamente 25°C, pero tiene una alta solubilidad a baja temperatura, tal como aproximadamente 4°C. Por lo tanto, el copolímero multi-bloque se disuelve preferiblemente a baja temperatura. La cantidad de polímero multi-bloque que puede disolverse está limitada dependiendo de su peso molecular. Un copolímero multi-bloque que tiene un peso molecular de 100.000 puede disolverse en agua a un máximo del 30%, preferiblemente del 4 al 20%. Por lo tanto, cuando el péptido, proteína o fármacos solubles en agua se mezclan con la disolución acuosa de copolímero multi-bloque a una baja temperatura y se administran por vía subcutánea u oral, la disolución acuosa se convierte en un hidrogel a la temperatura corporal, liberando el péptido, proteína o fármaco soluble en agua lentamente.

El copolímero multi-bloque de la presente invención puede prepararse en forma de micro-esferas o nano-partículas por métodos generalmente bien conocidos. Por ejemplo, el polímero puede disolverse en cloruro de metileno y hacerse precipitar en agua a 37°C, solución salina normal, disolución de PBS o una disolución acuosa con un 0,1% a 2% del polímero de la presente invención. Como alternativa, puede prepararse una tira o barrita del copolímero multi-bloque de la presente invención con polímero liofilizado por moldeado por extrusión, compresión, o adherencia. También, pueden prepararse películas del copolímero multi-bloque de la presente invención por calentamiento a una temperatura predeterminada (de 60°C a 120°C).

Puede añadirse PEG, ácido hialurónico, dextrano, gelatina, colágeno, quitosano, poloxámero 407, poloxámero 188, metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), metilhidroxietilcelulosa (MHEC), hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa y similares al copolímero multi-bloque de la presente invención en una cantidad del 0,1 al 50%, que se usa como administración de fármaco de liberación sostenida preparándolo en forma de un vehículo para fármaco tipo depósito sol-gel mixto, microesfera, nanoesfera, tira, barrita, o película. Cuando se prepara en forma del vehículo para fármaco mixto, la temperatura de gelificación o resistencia de gel de un polímero de la presente invención puede cambiarse.

Un método de suministro y la cantidad de administración del fármaco descrito anteriormente pueden variarse dependiendo de la actividad fisiológica del fármaco, su sitio de acción en un cuerpo vivo, sus propiedades fisicoquímicas y similares. Las propiedades fisicoquímicas del polímero de la presente invención y la hidrofilia/hidrofobia del fármaco pueden controlarse.

Los siguientes ejemplos permitirán a los expertos en la materia entender más claramente cómo realizar de forma práctica la presente invención. Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones específicas preferidas de la misma, se pretende que lo que sigue ilustre y no limite al alcance de la invención. Otros aspectos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

### **Ejemplo 1. Síntesis de polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de succinilo**

Se añadieron 10 g de Pluronic® F127 (BASF; poloxámero 407) con una varilla magnética en un matraz de 100 ml, el matraz se calentó a 120°C en una caldera doble de aceite mientras se reducía la presión a 1 torr durante 2 horas para retirar cualquier humedad contenida en el polímero. La reducción de presión se liberó y la temperatura de reacción se ajustó a 100°C en atmósfera de nitrógeno fluido y se añadieron 100 ml de acetonitrilo al matraz. El matraz de reacción se montó con una trampa de Dean Stark y refrigerador para permitir que pasaran 20 ml del acetonitrilo destilado a través de la trampa de Dean Stark y, de esta manera, retirar cualquier humedad contenida en el material de reacción. Después, se añadieron 96 µl (correspondiente a 1 equivalente basado en el polímero) de dicloruro de succinilo al depósito de la trampa de Dean Stark y se hicieron reaccionar durante 24 horas. Para sustituir los grupos terminales del poloxámero-407 multi-bloque sintetizado con un grupo carboxilo después de 24 horas de reacción, se añadieron 96 µl de cloruro de succinilo de nuevo al depósito de la trampa de Dean Stark y se hicieron reaccionar durante 24 horas más. El poloxámero multi-bloque sintetizado se hizo precipitar en 1 l de éter dietílico y después se filtró para producir un producto (8,2 g).

El producto obtenido de esta manera se disolvió en 16 ml de metanol, y se purificó dos veces por precipitación en éter dietílico y filtración. Después, se secó al vacío para obtener un poloxámero multi-bloque (5,7 g) con una estrecha distribución del peso molecular.

Se determinó por GPC que el peso molecular promedio ponderal del poloxámero multi-bloque era de 90.700 Dalton y su síntesis se confirmó usando RMN de <sup>1</sup>H (Figura 1).

### **Ejemplo 1 Experimental. Análisis de los extremos terminales del polímero multi-bloque**

Para confirmar que el grupo terminal del poloxámero multi-bloque sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1 se había convertido en un grupo carboxilo, se midió la RMN de <sup>1</sup>H después de hacer reaccionar el grupo terminal del poloxámero multi-bloque sintetizado con cloruro de trimetilsililo (TMS-Cl).

#### (1) Síntesis de poloxámero-407 disuccinato

Se añadieron 10 g de Pluronic® F127 (BASF; poloxámero 407) con una varilla magnética en un matraz de 100 ml, de fondo redondo y 1 boca, y se calentó mientras se reducía la presión por debajo de 1 torr en una caldera doble de aceite calentada a 120°C durante 2 horas para retirar la humedad incluida en el polímero. La reducción de presión se liberó y la temperatura de reacción se ajustó a 50°C en atmósfera de nitrógeno fluido y después se añadieron 100 ml de acetonitrilo al matraz. Se añadieron 5 ml de dicloruro de succinilo en el recipiente de reacción y se hicieron reaccionar durante 24 horas. El producto se purificó dos veces haciéndolo precipitar en un exceso de hexano y se filtró. Después se secó al vacío. El poloxámero disuccinato se confirmó midiendo la RMN de <sup>1</sup>H (Figura 2).

#### (2) Análisis del grupo terminal del polímero multi-bloque

Se hicieron reaccionar 20 mg de poloxámero-407 y 20 mg de poloxámero-407 disuccinato sintetizado en el ejemplo (1) anterior con TMS-Cl (10 µl), y se realizó el análisis por RMN de <sup>1</sup>H. En el análisis, se añadieron 10 µl de piridina como un catalizador. Puesto que todos los grupos terminales del poloxámero-407 eran grupos hidroxilo, la presencia del pico (0,12 ppm) del trimetilo de TMS-Cl confirmó que se había completado la reacción de todos los grupos -OH (Figura 3). Puesto que todos los grupos terminales del poloxámero-407 disuccinato eran grupos carboxilo, la presencia del pico (0,29 ppm) del trimetilo de TMS-Cl confirmó que se había completado la reacción de todos los grupos -COOH (Figura 4).

En base a los datos, el poloxámero multi-bloque sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1 se analizó por el mismo método usando RMN de <sup>1</sup>H (Figura 5). Haciendo referencia al espectro de RMN de <sup>1</sup>H, se muestra justo el pico de la

reacción de TMCS y -COOH, pero el pico de la reacción de TMCS y -OH no se muestra. A partir de los resultados anteriores, todos los grupos terminales del poloxámero-407 multi-bloque sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1 se sustituyeron con grupos carboxilo.

**Ejemplo 2. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de oxalilo**

- 5 Un poloxámero multi-bloque conectado a través de un grupo oxalilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de oxalilo como un engarce de ácido dicarboxílico.

El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 91.300 Dalton.

**Ejemplo 3. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de adipoilo**

- 10 Un poloxámero multi-bloque conectado a través de un grupo adipoilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de adipoilo como un engarce de ácido dicarboxílico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 96.300 Dalton.

**Ejemplo 4. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de suberoilo**

- 15 Un poloxámero multi-bloque conectado mediante un grupo suberoilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de suberoilo como un engarce de ácido dicarboxílico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 97.800 Dalton.

**Ejemplo 5. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de sebacoilo**

Un poloxámero multi-bloque conectado mediante un grupo sebacoilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de sebacoilo como un engarce de ácido dicarboxílico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 124.000 Dalton.

- 20 **Ejemplo 6. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de dodecanoilo**

Un poloxámero multi-bloque conectado mediante un grupo dodecanoilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de dodecanoilo como un engarce de ácido dicarboxílico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 104.000 Dalton.

**Ejemplo 7. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de dicloruro de tereftaloilo**

- 25 Un poloxámero multi-bloque conectado mediante un grupo tereftaloilo se sintetizó por el mismo método que en el Ejemplo 1, excepto que se usó dicloruro de tereftaloilo como un engarce de ácido dicarboxílico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 87.000 Dalton.

**Ejemplo 8. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de ácido fumárico**

- 30 Se hicieron reaccionar 10 g de ácido fumárico y 22 g de cloruro de oxalilo (dos veces los equivalentes de ácido fumárico) en 50 ml de acetonitrilo a 50°C durante 6 horas. Después de la reacción, el exceso de cloruro de oxalilo se retiró por reacción con dicloruro de fumarilo al vacío. Se sintetizó un poloxámero multi-bloque conectado mediante grupos ácido fumárico usando el cloruro de fumarilo sintetizado anteriormente como un engarce por el mismo método que en el Ejemplo 1. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 85.400 Dalton.

**Ejemplo 9. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de ácido maleico**

- 35 Se preparó un polímero realizando el mismo método que en el Ejemplo 8, excepto que se usó ácido maleico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 82.700 Dalton.

**Ejemplo 10. Síntesis de un polímero multi-bloque usando una unión de ácido málico**

Se preparó un polímero realizando el mismo método que en el Ejemplo 8, excepto que se usó ácido málico. El copolímero multi-bloque obtenido tiene un peso molecular de 84.000 Dalton.

- 40 **Ejemplo 11. Síntesis de un polímero multi-bloque que tiene un grupo carboxilato sódico en su extremo terminal**

- 45 Se disolvieron 10 g del poloxámero multi-bloque que tiene grupos carboxilo en ambos extremos terminales, que se había sintetizado en el Ejemplo 1, en 50 ml de una disolución de acetonitrilo. A la disolución obtenida, se le añadió lentamente una disolución acuosa de hidrogenocarbonato sódico en una concentración de 1 g/ml para neutralizar la disolución obtenida hasta que su pH alcanzó pH 8. El disolvente se retiró de la disolución obtenida usando un evaporador rotatorio. Después, el polímero restante se disolvió en 50 ml de disolución de cloruro de metileno.

El hidrogenocarbonato sódico no reaccionado se hizo precipitar, y el precipitado se retiró por filtración. La disolución de cloruro de metileno filtrada que contiene polímero se hizo precipitar con 500 ml de éter dietílico y se filtró para obtener el polímero multi-bloque que tiene sales carboxilato sódico en su extremo terminal.

**Ejemplo 12. Síntesis de un polímero multi-bloque que tiene un grupo SO<sub>3</sub>Na en su extremo terminal**

- 5 Se pusieron 10 g del polímero multi-bloque que tiene extremos terminales hidroxilo, que se había obtenido como un intermedio en el Ejemplo 1, en un matraz de 1 boca, y se secó al vacío a 120°C durante 2 horas para retirar la humedad. La temperatura de reacción se bajó a 60°C, y el producto obtenido se disolvió después en 50 ml de una disolución de acetonitrilo. Se disolvieron 0,16 g de un complejo de trióxido de sulfato y piridina en la disolución obtenida. La disolución resultante se hizo reaccionar por agitación con un agitador magnético durante 10 horas. El disolvente se retiró de la disolución obtenida polimérica usando un evaporador rotatorio, y el polímero se disolvió después en 50 ml de disolución de cloruro de metileno.

El complejo de trióxido de sulfato y piridina no reaccionado se hizo precipitar, y el precipitado se retiró por filtración. La disolución de cloruro de metileno filtrada se hizo precipitar con 500 ml de éter dietílico y se filtró para obtener el polímero multi-bloque que tiene un grupo SO<sub>3</sub>Na en su extremo terminal.

15 **Ejemplo 13. Medición de la temperatura de transición de fase de un polímero multi-bloque**

- Para preparar 3 ml de disoluciones acuosas al 10% p/p, 15% p/p y 20% p/p de copolímero multi-bloque, se añadieron 176 mg, 353 mg y 529 mg de polímeros de acuerdo con el Ejemplo 1 a 3 ml de agua destilada y se agitó a 4°C durante 2 horas para disolver el copolímero minuciosamente. La viscosidad de la disolución acuosa polimérica multi-bloque se midió usando un viscosímetro Brookfield (modelo: RVDV II+) y, de esta manera, se determinó una temperatura de transición de fase (Figura 6). La disolución acuosa al 15% de poloxámero 407 no gelificaba por encima de 37°C, la temperatura corporal, y la disolución acuosa al 25% de poloxámero 407 gelificaba a 17°C. Por el contrario, la disolución acuosa al 10% de polímero multi-bloque (que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 Dalton) gelificaba a 25,9°C, y la disolución acuosa al 15% gelificaba a 20,5°C.

- 25 Por consiguiente, el polímero de la presente invención puede gelificar a una concentración relativamente menor en comparación con la disolución de poloxámero 407. Esta temperatura de gelificación relativamente mayor del polímero multi-bloque hace que sea más fácil inyectarlo en un cuerpo usando una jeringa en comparación con la disolución de poloxámero 407.

**Ejemplo 14. Liberación *in vivo* de interferón- $\alpha$  a partir del gel de una disolución al 15%p/p de copolímero multi-bloque**

- 30 Se añadieron 0,106 ml de una disolución en acetato de cinc de 1 mg/ml a 1,2 ml de una disolución interferón- $\alpha$  de 15 MIU/ml y el pH de la disolución se mantuvo de 5,0 a 8,0 para formar un complejo de interferón- $\alpha$ -cinc. Se añadieron 212 mg (15%p/p) del copolímero multi-bloque (peso molecular 90.700 Dalton) de acuerdo con el Ejemplo 1 a la disolución del complejo de interferón-cinc y se pusieron a 4°C durante más de 3 horas preparando una disolución de interferón y copolímero multi-bloque.

- 35 Cuando la disolución se dejó a temperatura ambiente, solidificó a 21°C cambiando a una forma inyectable.

La disolución polimérica de interferón-multi-bloque preparada anteriormente se puso en jeringas a 4°C, cada una con 0,4 ml (30 MIU/rata) y se administró por vía subcutánea a ratas (rata SD de 7 semanas, 200 g-220 g). Para reducir la temperatura de la piel de las ratas a 25°C, se puso una bolsa de hielo en el sitio de administración, que se puso en contacto con la bolsa de hielo durante aproximadamente 5-8 segundos.

- 40 Después de la administración, se recogieron 400  $\mu$ l de sangre entera de la vena de la cola después de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, y 6 días y se separó el plasma sanguíneo. Después, se analizó la concentración de interferón- $\alpha$  en la sangre usando un kit de ELISA. Como resultado, el gel al 15%p/p del copolímero multi-bloque liberó lentamente el interferón- $\alpha$  durante más de 5 días después de la administración (Figura 7).

45 **Ejemplo 15. Liberación *in vivo* de interferón- $\alpha$  a partir de un gel de una disolución al 20%p/p de copolímero multi-bloque**

- Se añadieron 0,106 ml disolución en acetato de cinc de 1 mg/ml a 1,2 ml de disolución de interferón de 15 MIU/ml y el pH se mantuvo de 5,0 a 8,0 para formar un complejo de interferón-cinc. Se añadieron 300 mg de un copolímero multi-bloque (peso molecular 90.700 Dalton) de acuerdo con el Ejemplo 1 a la disolución de complejo de interferón-cinc y se pusieron a 4°C durante más de 4 horas para preparar una disolución polimérica de interferón multi-bloque. La disolución solidificó a 18°C cambiando a una forma no inyectable. La disolución se administró a ratas por el mismo método que en el Ejemplo 13. Como resultado, se confirmó que se liberó también interferón durante más de 5 días (Figura 7).

**Ejemplo 16. Liberación *in vivo* de hormona del crecimiento humana a partir de un gel de una disolución al 15%p/p de copolímero multi-bloque**

5 Se disolvieron 2,07 mg de hormona del crecimiento humana en forma de polvo liofilizado en 1,66 ml de agua para inyección para preparar 1,25 mg/ml de una disolución de hormona del crecimiento humana. Se pusieron 293 mg del copolímero multi-bloque (peso molecular 90.700 Dalton) de acuerdo con el Ejemplo 1 a 4°C durante 3 horas para preparar una disolución copolimérica al 15%p/p que incluía hormona del crecimiento humana. La disolución se extrajo en jeringas a 4°C con 0,4 ml (6 IU/kg) en cada una y se administró por vía subcutánea a ratas (7 semanas, 200 g-220 g) por el mismo método que en el Ejemplo 13. Como resultado, se confirmó que la hormona del crecimiento humana se liberaba durante más de 6 días (Figura 8).

**10 Ejemplo 17. Liberación *in vivo* de G-CSF a partir del gel de una disolución al 15%p/p de copolímero multi-bloque**

15 Se diluyó una disolución de G-CSF con una concentración de 100 µg/ml con solución salina normal o agua para inyección. Se pusieron 176 mg del copolímero multi-bloque (peso molecular 90.700 Dalton) del Ejemplo 1 a 4°C durante 3 horas para preparar una disolución copolimérica al 15%p/p que incluía G-CSF. La disolución se extrajo en jeringas a 4°C, cada una con 0,4 ml y se administró a ratas por el mismo método que en el Ejemplo 13. Como resultado, se confirmó que G-CSF se liberaba durante aproximadamente 6 días (Figura 9).

**Ejemplo 18. Liberación *in vivo* de G-CSF peegilado a partir del gel de una disolución al 15%p/p de copolímero multi-bloque**

20 Se diluyeron 9 mg/ml de PEG-G-CSF a 125 µg/ml. Esta disolución y 317 mg del copolímero multi-bloque (peso molecular 90.700 Dalton) del Ejemplo 1 se mezclaron a 4°C durante 3 horas para preparar una disolución polimérica de G-CSF peegilado que muestra transición de gel dependiendo de la temperatura. La disolución se extrajo en jeringas a 4°C, cada con 0,4 ml y se administró a ratas por el mismo método que en el Ejemplo 13. Como resultado, se confirmó que G-CSF se liberaba durante aproximadamente 8 días (Figura 10).

25 Debe apreciarse que las realizaciones descritas anteriormente solo son ilustrativas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Pueden obtenerse numerosas modificaciones y realizaciones alternativas sin alejarse el espíritu y alcance de la presente invención y las reivindicaciones adjuntas pretenden cubrir tales modificaciones y disposiciones. Por lo tanto, aunque la presente invención se ha mostrado en los dibujos y se ha descrito completamente anteriormente con particularidad y detalle en relación con lo que actualmente se considera que es la realización o realizaciones más prácticas y preferidas de la invención, resultará evidente para los expertos en la materia que pueden realizar numerosas modificaciones sin alejarse de los principios y conceptos de la invención como se expone en las reivindicaciones.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un copolímero multi-bloque que comprende al menos dos copolímeros tri-bloque tipo ABA que están conectados covalentemente a través de una unión dicarboxílica biodegradable, en el que A es un bloque de óxido de polietileno, B es un bloque de óxido de polipropileno, un bloque de óxido de polibutileno o una combinación de los mismos, y en el que dicho copolímero multi-bloque tiene un grupo iónico seleccionado del grupo que consiste en sal de metal monovalente y divalente de  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ , y  $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$  en ambos extremos terminales.
2. La composición de copolímero multi-bloque de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el número de unidades de óxido de etileno, y óxido de propileno u óxido de butileno está dentro del intervalo de 2 a 2000, respectivamente.
3. La composición de copolímero multi-bloque de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proporción de unidades entre intervalos de los bloques A y B varía de 0,2:1 a 40:1.
4. El copolímero multi-bloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un peso molecular promedio ponderal que varía de 40.000 a 1.000.000 Dalton.
5. La composición de copolímero multi-bloque de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la unión dicarboxílica biodegradable se deriva de un miembro seleccionado del grupo que consiste en ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido sebacóico, ácido subérico, y ácido dodecanoico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido ftálico y ácido tereftálico.
6. El copolímero multi-bloque de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que está representado por la siguiente fórmula:
- $$\text{M-X-O-[PEO-Y-PEO-C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}]_n\text{-PEO-Y-PEO-O-X-M}$$
- en la que PEO es un bloque de óxido de polietileno,
- Y es PPO o PBO o combinaciones de PPO y PBO, siendo PPO un bloque de óxido de polipropileno y PBO un bloque de óxido de polibutileno,
- X es un grupo anión seleccionado del grupo que consiste en  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ , y  $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$ ,
- n es un número entero que varía de 1 a 100,
- R es  $-(\text{CH}_2)_m-$  o un arilo que tiene  $\text{Cm}'$ , donde m es un número entero que varía de 0 a 20, m' es un número entero que varía de 6 a 12, y M es H o un grupo catión.
7. El copolímero multi-bloque de acuerdo con la reivindicación 6, en el que M es un catión seleccionado del grupo que consiste en Li, Na, K, Ag, Au, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Co y Ni.
8. El copolímero multi-bloque de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que Y tiene un peso molecular promedio ponderal que varía de 1.000 a 20.000 Dalton.
9. El copolímero multi-bloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que Y es un poloxámero.
10. Una composición que comprende un copolímero multi-bloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la reivindicación 10 y una cantidad eficaz de un agente bioactivo.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el agente bioactivo está dentro del intervalo del 0,01% al 50%.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en la que el agente bioactivo es una proteína o un péptido.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la proteína o péptido está en su forma natural o está modificado por un polímero.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste en hormona del crecimiento (GH), interferón (IFN), factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de la colonia de macrófagos granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina (IL), factor de crecimiento de fibroblastos, hormona estimulante del folículo (FSH), factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF), octreotida, insulina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), calcitonina, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína

morfogenética ósea (BMP), activador de plasminógeno tisular (TPA), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento tisular y factor de necrosis tumoral (TNF).

16. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende del 0,5 al 50% de dicha composición en un medio acuoso.

5 17. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en PEG, ácido hialurónico, dextrano, gelatina, colágeno, quitosano, poloxámero 407, poloxámero 188, metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), metilhidroxietilcelulosa (MHEC), hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) e hidroxipropilcelulosa.

10 18. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en la que la composición está en una forma seleccionada entre el grupo que consiste en geles, microesferas, nanopartículas, tiras, barritas y películas.

19. Un método para preparar el copolímero multi-bloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 que tiene extremos terminales carboxílicos que comprende:

15 1) preparar una disolución de reacción que contiene una cantidad predeterminada de PEO-Y-PEO, añadir lentamente de 0,5 a 1,0 equivalentes de dihaluro de ácido dicarboxílico basado en 1 equivalente de los grupos hidroxilo de extremo terminal del PEO-Y-PEO a la disolución de reacción y permitir que la reacción transcurra durante un número de horas predeterminado;

20 2) añadir más de 1 equivalente de dihaluro de ácido dicarboxílico adicional basado en un equivalente de grupos hidroxilo del extremo terminal de PEO-Y-PEO a la disolución de reacción para que reaccione hasta que se completa la reacción;

3) hacer precipitar el copolímero multi-bloque producido en un disolvente de éter o hexano y disolver después el precipitado en alcohol; y

25 4) añadir lentamente éter o hexano de manera que una proporción en volumen de alcohol/éter o hexano es de 1/1 a 1/20 para hacer precipitar el copolímero multi-bloque.

20. Un método para preparar un copolímero multi-bloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 que tiene sales carboxilato metálico en ambos extremos terminales del copolímero multi-bloque que comprende:

1) disolver el copolímero multi-bloque producido de la reivindicación 21 en un disolvente que puede mezclarse con agua, y

30 2) neutralizar la disolución multi-bloque con carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro de calcio, cloruro de cinc, cloruro de magnesio, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio.

21. Un método para preparar el copolímero multibloque de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 que tiene un ácido sulfúrico, ácido fosfórico, o una sal metálica de los mismos en su extremo terminal del polímero, que comprende:

35 1) preparar una disolución de reacción que contiene una cantidad predeterminada de PEO-Y-PEO, añadir lentamente de 0,5 a 1,0 equivalentes de dihaluro de ácido dicarboxílico basado en 1 equivalente de grupos hidroxilo de extremo terminal del PEO-Y-PEO a la disolución de reacción y permitir que la reacción transcurra durante un número de horas predeterminado;

40 2) añadir 0,1 equivalentes adicionales de PEO-Y-PEO a la disolución de reacción anterior para que reaccione hasta que se complete la reacción;

3) hacer precipitar el copolímero multi-bloque producido en un disolvente de éter o hexano y después disolver el precipitado en alcohol; y

4) añadir lentamente éter o hexano de manera que la proporción en volumen de alcohol/éter o hexano es de 1/1 a 1/20 para hacer precipitar el copolímero multi-bloque;

45 5) disolver el copolímero multi-bloque obtenido en la etapa 4) en un disolvente y hacer reaccionar la disolución con un complejo de trióxido de sulfato y piridina,  $C_5H_5NSO_3$ , u oxiclورو de fósforo,  $POCl_3$ ; y

50 6) neutralizar opcionalmente la mezcla de reacción con carbonato sódico, bicarbonato sódico, cloruro de calcio, cloruro de cinc, cloruro de magnesio, cloruro de hierro, cloruro de cobre, nitrato de plata, cloruro potásico, o cloruro de litio para preparar un copolímero multi-bloque que tiene una sal metálica en su extremo terminal del polímero.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que PEO-Y-PEO es un poloxámero.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 19 o 22 en el que PEO-Y-PEO se purifica disolviéndolo en cloruro de metileno seguido de precipitación en hexano, o separándolo por separación de las capas en un disolvente de n-propanol/H<sub>2</sub>O.

FIG. 1

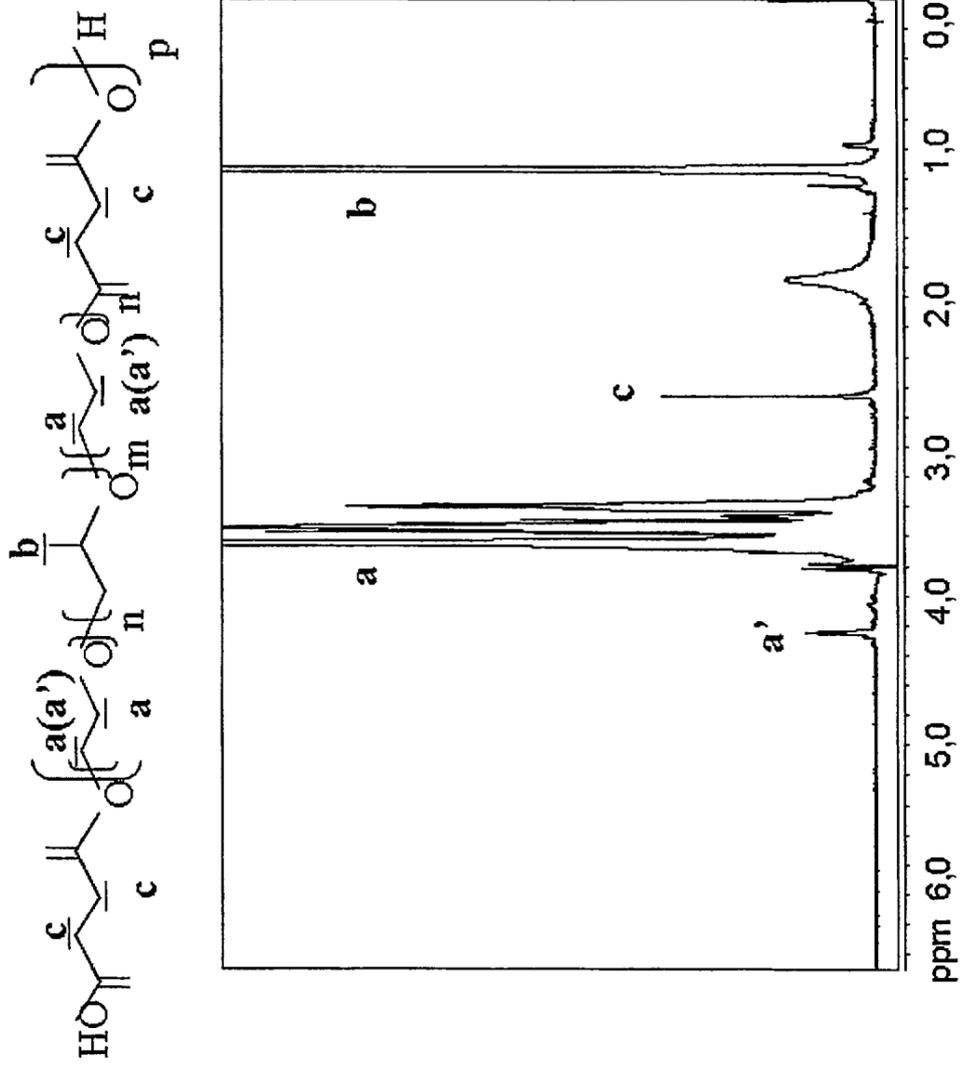


FIG. 2

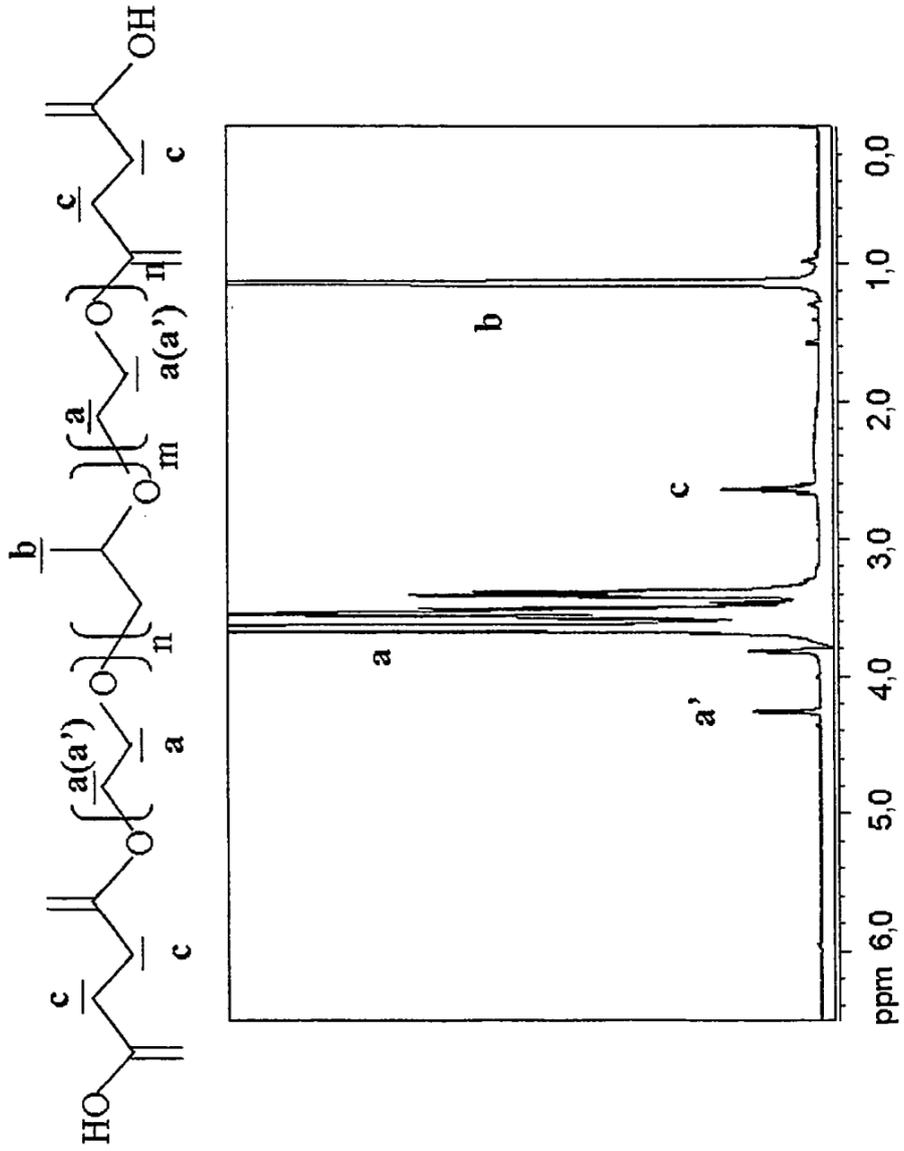


FIG. 3

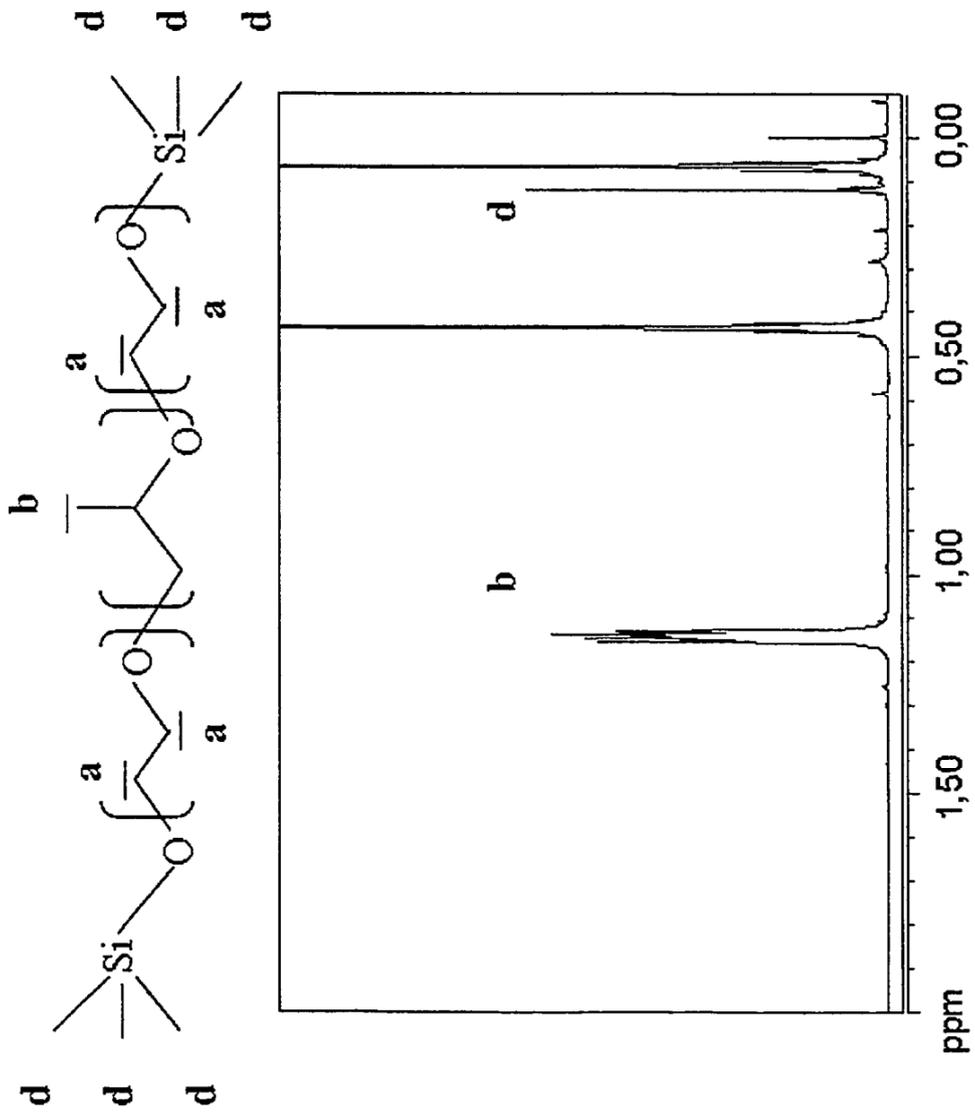


FIG. 4

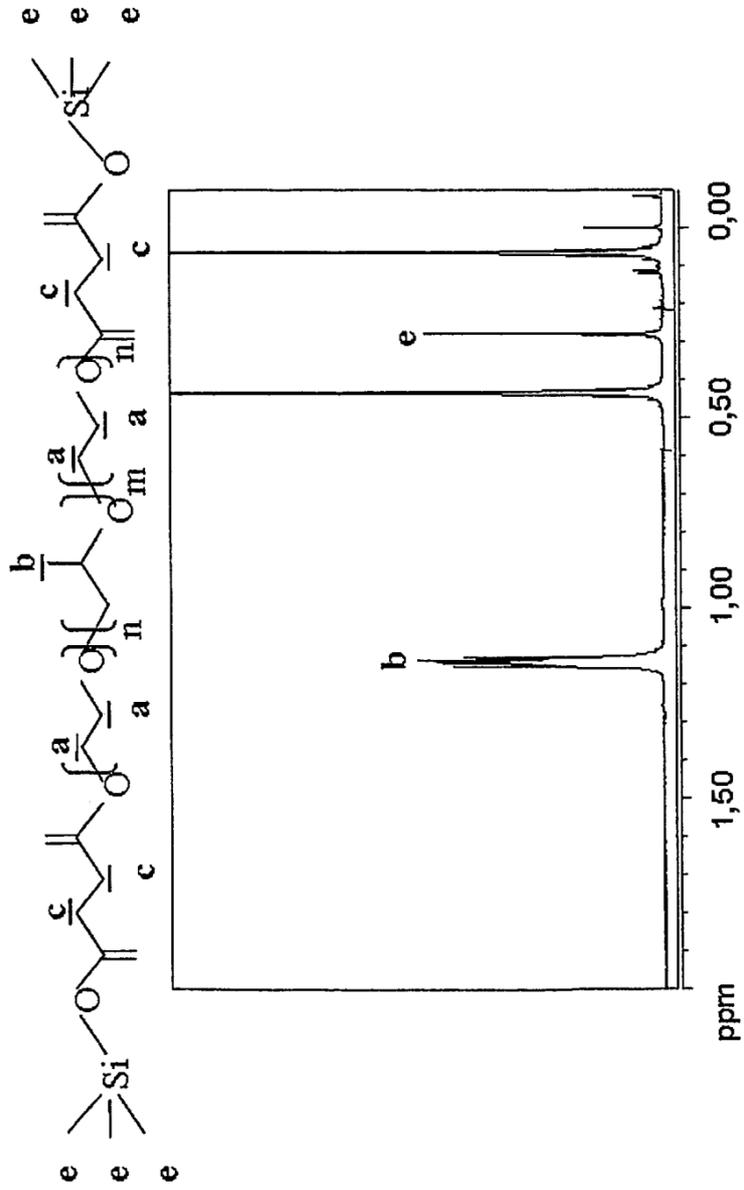


FIG. 5

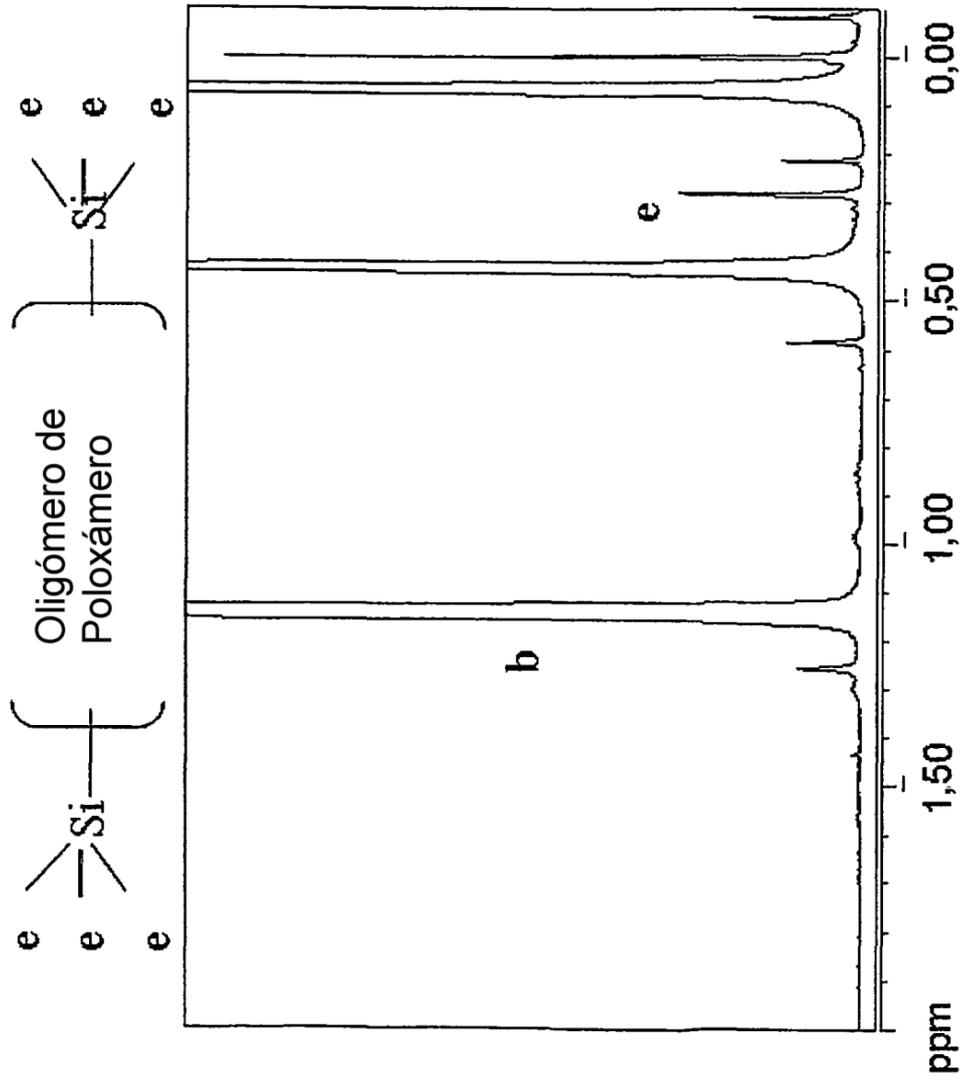
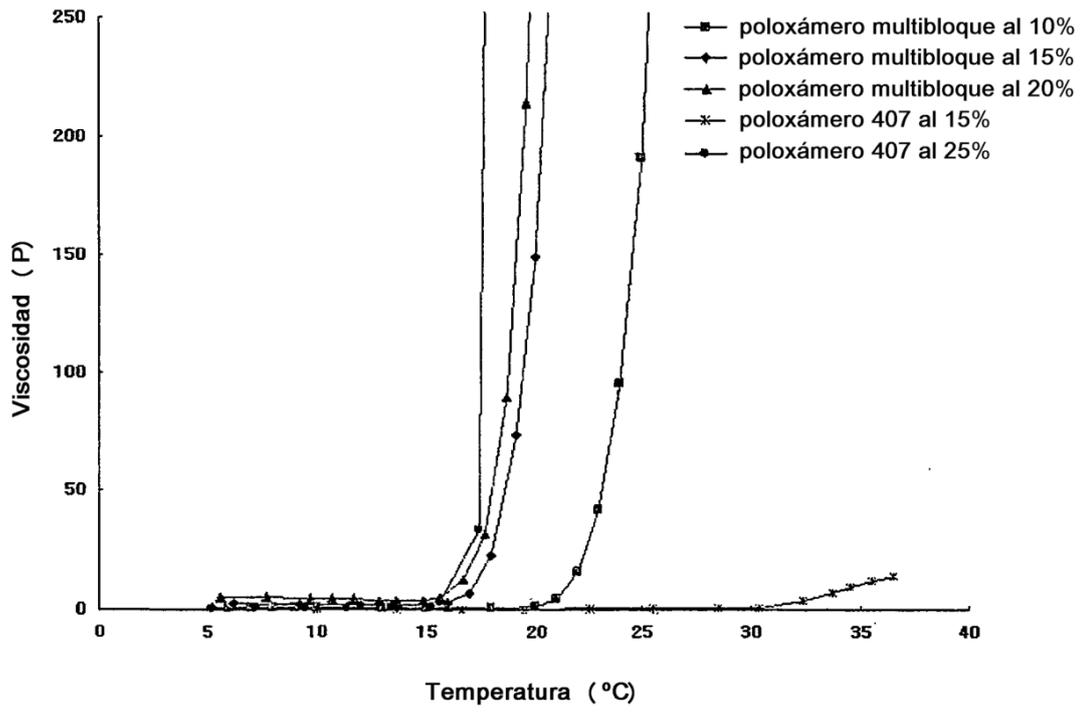


FIG. 6



**FIG. 7**

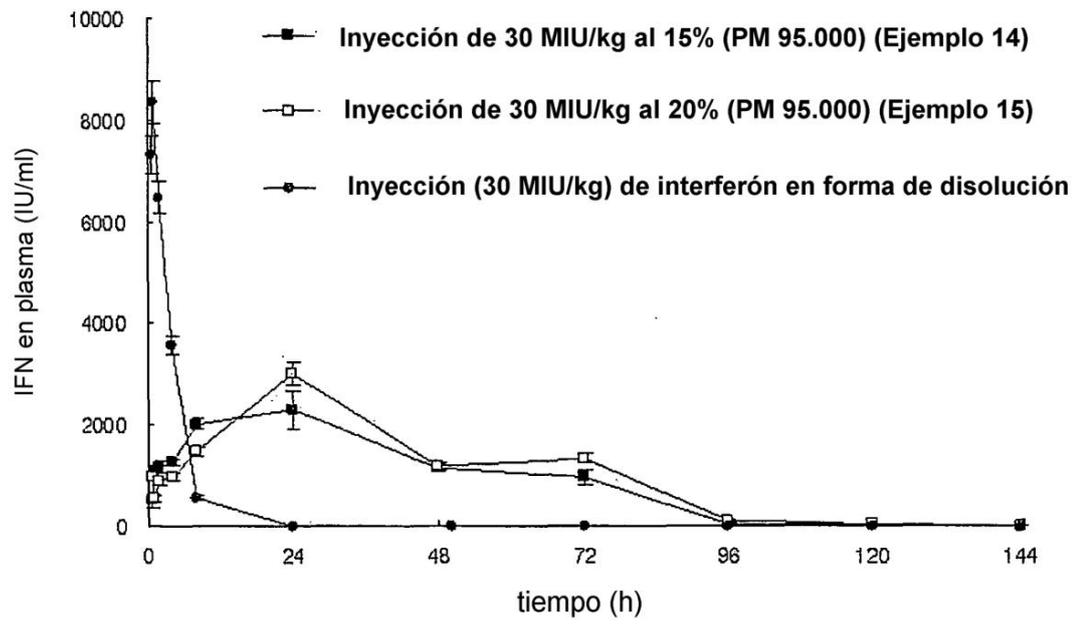
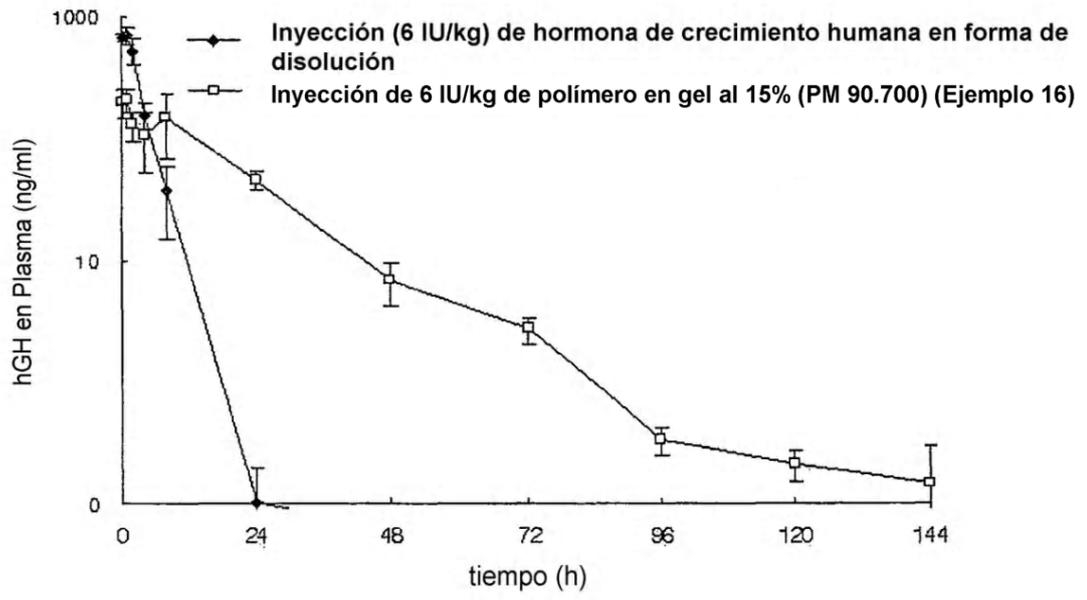
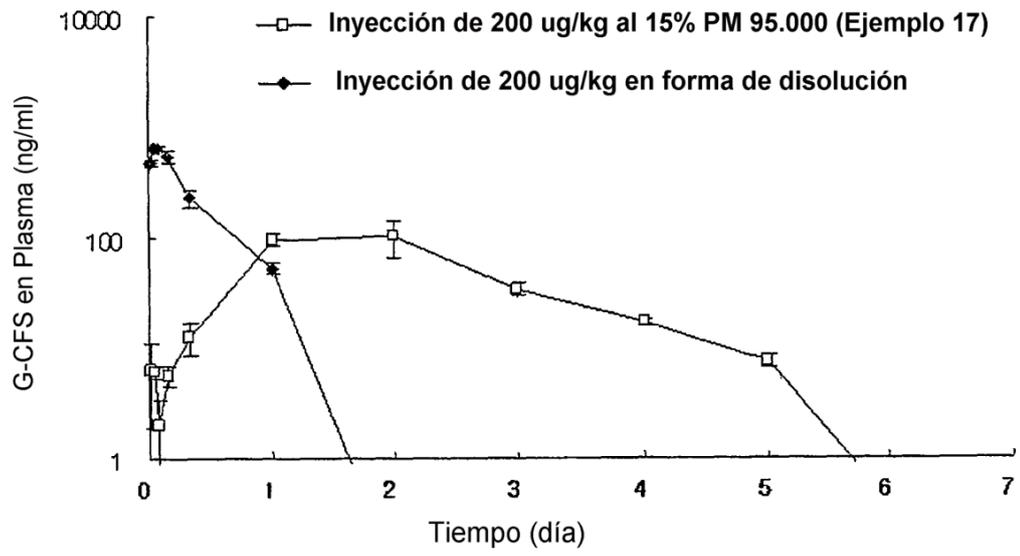


FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**

