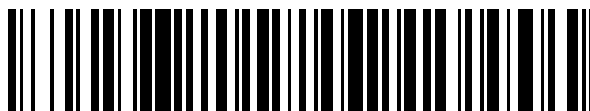


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 193**

51 Int. Cl.:

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011 E 11741302 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2590629**

54 Título: **Copolímeros multibloque segmentados de fases separadas biodegradables y liberación de polipéptidos biológicamente activos**

30 Prioridad:

09.07.2010 US 362710 P

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

21.01.2015

73 Titular/es:

**INNOCORE TECHNOLOGIES B.V. (100.0%)
L.J. Zielstraweg 1
9713 GX Groningen, NL**

72 Inventor/es:

**STEENDAM, ROB;
FLIPSEN, THEODORUS ADRIANUS CORNELIUS;
HIEMSTRA, CHRISTINE y
ZUIDEMA, JOHAN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 193 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

Copolímeros multibloque segmentados de fases separadas biodegradables y liberación de polipéptidos biológicamente activos.

5 La invención está dirigida a copolímeros multibloque segmentados de fases separadas, biodegradables, termoplásticos, y el uso de los mismos como vehículos para suministro, en particular para agentes biológicamente activos tales como proteínas y péptidos. Los copolímeros de la presente invención encuentran uso en varias aplicaciones biomédicas, así como farmacéuticas.

10 En general, los copolímeros termoplásticos de fases separadas consisten en un segmento flexible "suave", amorfo con una baja temperatura de transición vítrea (T_g), y un segmento "duro" (semi) cristalino con alta T_m los cuales son incompatibles o sólo parcialmente compatibles.

15 Los ejemplos de copolímeros de bloque/ segmentados de fases separadas se encuentran por ejemplo en US-A-6 255 408, US-A-5 554 170, US-A-5 066 772, US-A-5 236 444, US-A-5 133 739 y US-A-4 429 080. Estos materiales conocidos son copoliésteres biorreabsorbibles en el que los bloques duros se construyen predominantemente de poli-glicólido cristalino y/o polilactida. Los poliésteres ricos en glicólido son especialmente adecuados para artículos biomédicos rápidamente reabsorbibles tales como suturas mono- o de filamentos múltiples; los poliésteres ricos en L-lactida se utilizan en aplicaciones médicas con resorción más lenta, tales como guías nerviosas, injerto de nervios y muchos otros productos. Sin embargo, el alto punto de fusión de los bloques ricos en poli-glicólido o poli-L-lactida requiere temperaturas de polimerización y procesamiento muy altas (alrededor de 200 °C), lo cual puede resultar en comportamientos de degradación y/o trans-esterificación no deseados. Además, los poliésteres ricos en poli-glicólico no son adecuados para aplicaciones en las que se necesita una reabsorción lenta.

25 El documento EP1555278 A1 describe copolímeros multibloque biodegradables, que comprenden segmentos derivados de pre-polímeros A y B, cuyos segmentos están enlazados mediante un extensor multi-funcional de cadena y se seleccionan a partir de los pre-polímeros A y B, en donde el copolímero multibloque es amorfo y tiene una o más temperaturas de transición vítrea de máximo 37 °C (T_g) en condiciones fisiológicas. Se describe específicamente un copolímero de bloques que comprende un pre-polímero de poli (DL-lactida) y un pre-polímero de poli (glicolida-ε-caprolactona) iniciado con PEG 600 (M_n=1200).

30 Como una alternativa a poliésteres ricos en poliglicólido, los copoliésteres ricos en poli-L-lactida se han sugerido como materiales que tienen un mayor tiempo de resorción y muy buenas propiedades mecánicas, como resultado de los segmentos cristalinos. Sin embargo, el uso de un copolímero aleatorio semi-cristalino de L-lactida y ε-caprolactona (50/50) para puentear defectos de los nervios periféricos y altamente cristalino de poli-L-lactida como placas óseas han causado algunos problemas graves en el pasado. Se observaron reacciones a cuerpos extraños de leve a grave después de 2 a 3 años de implantación, respectivamente, debido a la presencia de fragmentos de biomateriales de larga duración. (Den Dunnen y otros (Microsurgery 14 (1993) 508-515); Rozema y otros In : P.J. Doherty, R.L. Williams, D.F. Williams, eds. "Biomaterial-Tissue interfaces. Advances in biomaterials" 10 Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. (1992) 349-355). Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo copolímero multibloque segmentado de fases separadas, biodegradable, termoplástico, el cual no sufre de las desventajas mencionadas anteriormente y por lo tanto abre nuevas posibilidades para aplicaciones médicas. Un objeto adicional se relaciona con la provisión de un copolímero que se utiliza adecuadamente para encapsular polipéptidos.

45 El copolímero de la invención se compone de al menos dos segmentos diferentes cada uno con diferentes características físicas, incluyendo características de degradación, y se caracteriza por buenas propiedades mecánicas, en particular buena resistencia a la tracción, elongación y propiedades elásticas. Debido a su morfología de fase separada, los materiales de la presente invención son también adecuados para la construcción de matrices de liberación de fármacos y recubrimientos liberadores de fármacos, que pueden ser utilizados para encerrar un agente terapéutico determinado y para liberar este agente en un momento y/o lugar deseado. Como se describe en la presente a continuación, el material es de particular interés para la liberación controlada de un polipéptido, tal como un polipéptido biológicamente activo a un hospedero.

50 Se ha encontrado que estas propiedades se pueden obtener por un copolímero biodegradable, de fase separadas, que comprende segmentos de un prepolímero blando biodegradable (A) que tiene una T_g no superior a 37°C; y segmentos de un prepolímero duro biodegradable (B) que tiene una temperatura de transición de fase de 40-100 °C, y en este copolímero los segmentos están unidos por un extensor multifuncional de cadena.

55 El término "fases separadas", como se usa en la presente, se refiere a un sistema, en particular, un copolímero, construido

de dos o más prepolímeros diferentes, de los cuales al menos dos son incompatibles entre sí a temperaturas de 40°C o inferiores (bajo condiciones fisiológicas, tales como en el cuerpo humano). Así, los prepolímeros no forman una mezcla homogénea cuando se combinan, ni cuando se combinan como una mezcla física de los prepolímeros, ni cuando los prepolímeros se combinan en una sola especie química como "mezcla química", a saber como copolímero.

5

El término "prepolímero" se refiere a las unidades químicas o bloques de construcción que constituyen el copolímero de la presente invención. Cada prepolímero se puede obtener por polimerización de los monómeros adecuados, cuales monómeros por lo tanto son los bloques de construcción de cada prepolímero. Las propiedades deseadas de los prepolímeros y, por consecuencia, del copolímero de la presente invención, pueden ser controladas por la elección de un prepolímero de una composición y peso molecular adecuados (en particular, Mn), de manera que se obtenga la Tm o Tg requeridas.

10

La morfología del polímero (o del dispositivo hecho de este) es dependiente de las condiciones ambientales: las mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se pueden realizar bajo condiciones inerte (secas) y los resultados se pueden utilizar para determinar las propiedades térmicas de los materiales secos". Sin embargo, la morfología y propiedades en condiciones fisiológicas (*es decir*, en el cuerpo) y las condiciones ambientales (temperatura ambiente) pueden ser diferentes. Es de entender que las temperaturas de transición, Tg y Tm como se utiliza en la presente, se refiere a los valores correspondientes de un material cuando se aplica; *in vivo*; *viz.* cuando está en equilibrio con una atmósfera que está saturada de vapor de agua y a la temperatura del cuerpo. Esto se puede simular *in vitro* mediante la realización de la medición DSC después de permitir que el material se equilibre en una atmósfera saturada de agua (por lo general esto puede tomar desde varios minutos hasta una hora). Después de la aplicación *in vivo*, sin embargo, las Tg y/o Tm del material seco caerán como resultado de la absorción de agua y esta Tg final debe ser aproximadamente la temperatura del cuerpo o inferior de acuerdo con la presente invención. La Tm final debe estar presente a temperaturas entre 40-100 °C.

15

20

25

Por ejemplo, un polímero que contiene PEG en el segmento blando puede ser cristalino bajo condiciones secas a temperatura ambiente, mientras que amorfo bajo condiciones de humedad, dando una Tg mixta o dos Tg separadas del segmento blando formado por el PEG amorfo reblandecido y el poliéster/carbonato. La calidad de las fases separadas de los copolímeros de la presente invención se refleja en el perfil de la temperatura de transición vítrea (Tg) o temperatura de fusión (Tm). Considerando que un prepolímero sencillo se caracteriza generalmente por una transición de fase única (Tg o Tm), los copolímeros de fases separadas se caracterizan por al menos dos transiciones de fase, cada una de las cuales está relacionada con (pero no necesariamente) los correspondientes valores de Tg o Tm de los prepolímeros que están comprendidos en el copolímero. Los prepolímeros que formarían una (ideal) mezcla o combinación resultaría en un copolímero que tiene una única Tg o Tm. La temperatura de transición vítrea, Tg, se determina tomando el punto medio del salto del calor específico, como puede medirse, *por ejemplo*, por DSC. La temperatura de fusión, Tm, es el pico máximo del pico de fusión, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 1, que muestra el flujo endotérmico de calor para un copolímero caracterizado por una Tg y una Tm. Como se define en la presente, los valores de Tg y Tm de un determinado prepolímero reflejan los valores medidos en el copolímero. En caso de inmiscibilidad completa de los prepolímeros, la Tg del copolímero se rige únicamente por la Tg del prepolímero "suave" amorfo. En la mayoría de casos, sin embargo, la composición de los segmentos duros y blandos del copolímero no es exactamente la misma que la composición de los prepolímeros a partir del cual se prepara el copolímero. Parte del segmento duro original que forma el prepolímero se mezclará con el prepolímero blando y por lo tanto formará parte de la fase blanda. El valor Tg del segmento blando es entonces diferente al del prepolímero utilizado. El grado de miscibilidad (y por lo tanto la desviación de Tg y/o Tm a partir de los pre-polímeros correspondientes) depende de la composición del prepolímero, la relación y de la longitud del segmento en el copolímero. En el caso de un prepolímero semicristalino sea utilizado para la construcción del segmento duro, la parte amorfa de este segmento también puede ser inmisible con el otro segmento amorfo del prepolímero, lo que resulta en dos temperaturas de transición vítrea diferentes, siendo ambas más o menos similar a las temperaturas de transición vítrea de sus respectivos prepolímeros. En caso de que el segmento blando sea semi-cristalino (*por ejemplo*, cuando el polietilenglicol, PEG, es parte del pre-polímero), el polímero puede consistir de dos fases cristalinas: una como parte del segmento blando y una en el segmento duro. Las transiciones de baja y alta temperatura de fase que caracterizan las fases separadas de los copolímeros de esta invención se determinan principalmente, por las contribuciones de los respectivos segmentos blandos o duros que forman los pre-polímeros biodegradables. Por un lado las Tg y Tm del copolímero final se pueden determinar en su totalidad por los valores correspondientes de los prepolímeros. Por el otro lado, las desviaciones de estos valores "ideales" pueden ocurrir, como resultado de la mezcla de una fase parcial, lo cual en la práctica se observa con frecuencia.

30

35

40

45

50

55

La Tg de los segmentos del copolímero en general se encuentra entre el valor de la fase mezclada del copolímero y aquellos de los prepolímeros separados.

Los copolímeros de bloques múltiples de esta invención tienen ventajas sobre los copolímeros de bloques conocidos de la técnica anterior, por ejemplo los copolímeros de bloque de estructura ABA como se ha mencionado en los ejemplos de la

introducción. Aunque las propiedades del polímero se pueden mejorar en gran medida mediante el uso de copolímeros de bloque con bloques de diferentes copolímeros en lugar de copolímeros homo- o aleatorios, todavía tienen algunas desventajas.

5 Para obtener un peso molecular mínimo de copolímero, las secuencias A y B deben tener una cierta longitud. Los bloques pueden comportarse de forma independiente como homopolímeros individuales con una composición similar. Las propiedades de los copolímeros de tipo ABA sólo se pueden sintonizar mediante la variación de la composición de los bloques A y B. Otra desventaja es que los copolímeros de bloque se deben preparar a temperaturas relativamente altas (>100°C) bajo condiciones inertes para la conversión completa de todos los monómeros y obtener el peso molecular suficiente. La primera desventaja se puede resolver mediante el uso de copolímeros multibloque en donde los bloques o segmentos son mucho más cortos y enlazados entre sí por una reacción química. Las propiedades tales como el comportamiento de degradación se pueden ajustar en una forma mucho mejor mediante la elección de la combinación adecuada de longitudes de segmento, la proporción y la composición.

15 Además, por el proceso de preparación de copolímeros de bloque ABA (y derivados de los mismos), siempre hay una posibilidad de transesterificación, dando como resultado un cierto grado de mezclado de fases. Los copolímeros multibloque de la presente invención no sufren de esta desventaja, dado que estos se pueden preparar mediante el enlace de los pre-polímeros con una composición de monómero previamente determinada a temperaturas bajas (< 100 °C) evitando así reacciones de transesterificación y otras reacciones secundarias, las cuales pueden causar la generación de la degradación no deseada y otros subproductos. Esto significa que la longitud de la secuencia de monómeros del copolímero se determina por la elección de los componentes de construcción y no tanto por el tiempo de reacción y temperatura, que se aplica por lo general para la síntesis de copolímeros aleatorios. Una ventaja de copolímeros multibloque de esta invención preparados mediante el enlazamiento de los pre-polímeros usando un extensor multifuncional de cadena es que los segmentos de pre-polímeros se pueden distribuir aleatoriamente en el copolímero mediante la elección de todas las posibles proporciones de prepolímero y longitudes de segmento, ofreciendo así muchas más posibilidades de ajuste de las propiedades.

Los copolímeros multibloque conocidos de dos tipos de prepolímeros biodegradables, por otro lado, sólo se pueden producir en una secuencia alternante de pre-polímero, resultando en una gama limitada de posibles variables. (M. Penco, F. Bignotti, L. Sartore, S. D'Antone y A. D'Amore, J. Appl. Pol. Sci. Vol. 78, 1721-1728 (2000)).

30 Se observa, además, que los copolímeros multibloque aleatorios de la presente invención proporcionan muchas ventajas que no pueden obtenerse con copolímeros multibloque alternados.

En primer lugar, los copolímeros multibloque aleatorios obtenidos por extensión de la cadena de bloques A y B tienen una proporción de A con relación a B ilimitada. A:B puede ser, por ejemplo, 10:90, pero puede ser también 90: 10. En contraste, la proporción de los bloques en un copolímero multibloque alternado se limita a la proporción utilizada en el polímero de cadena extendida. Por ejemplo, en el caso de extensión de la cadena de AB la relación A: B en el copolímero multibloque es 50:50. La naturaleza aleatoria de los copolímeros multibloque de la presente invención aumenta en gran medida las posibles composiciones del material y de ese modo el control sobre sus propiedades físicas y químicas. Esto incluye un mejor control de la capacidad de hinchamiento en agua, la morfología (separación de fases, amorfo/cristalinidad) y degradación del polímero.

En segundo lugar, el método de síntesis de los copolímeros multibloque aleatorios de la presente invención es mucho menos laborioso en comparación con la síntesis de copolímeros multibloque alternados. En copolímeros multibloque alternados cualquiera de los segmentos A y B en caso de dibloques AB, o segmento A y C en el caso de tribloques ACA, tienen que estar enlazados antes de la extensión de la cadena (o necesita ser sintetizado un macro extensor de cadena). De acuerdo con la presente invención, los bloques A y B separados extienden la cadena con *por ejemplo* un extensor de cadena comercialmente disponible.

50 Otra ventaja de los copolímeros de la presente invención es que se pueden basar en extensores multifuncionales (alifáticos) de cadena. Al elegir el tipo y la cantidad del extensor de cadena las propiedades de los polímeros pueden ser afectadas (por ejemplo, el extensor de cadena puede actuar como un reblandecedor o este puede afectar el grado de separación de fases). El grado total de libertad para obtener polímeros con las propiedades deseadas, por tanto, se incrementa en comparación con los polímeros de la técnica anterior.

55 Los poliésteres o poliéster-carbonatos biodegradables de fase separada de esta invención son un grupo prometedor de biomateriales y se pueden utilizar en diversas aplicaciones biomédicas, dado que presentan buenas propiedades mecánicas, elásticas y de procesamiento. Además, se pueden usar en aplicaciones farmacéuticas, *por ejemplo*, para suministro de fármacos.

Los copolímeros multibloque biodegradables que contienen un segmento de poliéster hidrolizable y un segmento hidrofílico hidrolíticamente estable han sido estudiados por su capacidad de carga de fármaco y de liberación, *por ejemplo*, copolímeros multibloque poli (E-caprolactona) -polietilenglicol (PEG), son descritos por Lee y otros, J. Control. Release. 73 (2001) 315-27. Los copolímeros multibloque de la presente invención son diferentes de estos copolímeros conocidos por la presencia de al menos dos segmentos biodegradables en lugar de sólo uno, por lo tanto, ofrecen más posibilidades de variar las propiedades de degradación y liberación del fármaco.

Las propiedades mecánicas y de degradación de los copolímeros multibloque pueden ser fácilmente sintonizadas cambiando el tipo de monómeros de segmento blando y duro que forman los pre-polímeros y su longitud de cadena y proporción, y eligiendo el tipo y la cantidad del extensor de cadena. Además, las propiedades térmicas son lo suficientemente bajas para procesamiento del polímero en fundido y lo suficientemente altas como para ser utilizado como un dispositivo biomédico. La proporción de monómeros y la distribución del copolímero se pueden controlar fácilmente variando las condiciones de polimerización.

Un segmento duro cristalino se suele desear para obtener materiales elastoméricos y resistente, no pegajosos. Una baja Tg del segmento blando es generalmente necesaria para obtener una alta elasticidad. El carácter de las fases separadas de los copolímeros de la invención es muy importante para las aplicaciones donde se requieren buenas propiedades mecánicas (tales como matrices porosas), ya que permite que los segmentos duros pueden contribuir a la resistencia mecánica, mientras que los segmentos blandos proporcionan las deseadas propiedades elásticas. Para propósitos de administración de fármacos, las propiedades mecánicas son menos importantes, pero la diferencia en las propiedades físicas de las dos fases son esenciales. Como se mencionó anteriormente, un requisito previo del co-poliéster biomédico segmentado de fase separada es que el punto de fusión (*es decir*, la temperatura de transición de fase) del segmento duro del poliéster sea mayor que 40°C: la morfología de la fase separada también debe estar presente a la temperatura del cuerpo y del medio ambiente con el fin de conservar las propiedades mecánicas iniciales y la estructura del dispositivo después de la implantación. Una clase importante de co-poliésteres segmentados con una buena separación de fase son los basados en segmentos duros cristalinos de poli-ε-caprolactona. Por ejemplo, un enfoque diferente para obtener semi-cristalinidad en un copolímero de lactida-ε-caprolactona que no tiene secuencias largas de L-lactida, es el uso de un copolímero de DL-lactida y E-caprolactona de fase separada con una proporción de monómero que resulta en la cristalización de la parte caprolactona del copolímero. Dado que la tasa de degradación de la poli-ε-caprolactona es baja, especialmente en la fase cristalina, esta es también una buena manera de reducir la velocidad de degradación del copolímero. De esta manera, los artículos biomédicos biocompatibles de copolímeros ricos en ε-caprolactona se pueden aplicar en situaciones en las que se desea una velocidad de reabsorción lenta sin el uso de un mayor contenido de L-lactida. La baja temperatura de fusión de la fase cristalina (50-60°C) hace que este copolímero sea muy fácil de procesar.

Esta fase cristalina tendrá un punto de fusión que es similar o sólo un poco menor que la del homopolímero de alto peso molecular de ε-caprolactona (60-65°C). Para obtener un elastómero termoplástico con un módulo no demasiado alto, el contenido de esta fase dura puede ser bastante baja (ya sea dispersado o en un sistema co-continuo con la fase de caucho).

Generalmente, la morfología deseada de fase separada (reflejada por un punto de fusión y al menos un valor bajo de Tg) se pueden obtener mediante la variación de la composición, por ejemplo, eligiendo el número del peso molecular medio, Mn, de los prepolímeros A y B. También es posible influir en la morfología de fases separadas mediante la variación de la proporción A/B.

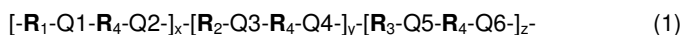
Aunque los copolímeros aleatorios de lactida y ε-caprolactona con un contenido de ε-caprolactona cristizable se han preparado en el pasado, la separación de fases no es tan buena como en los copolímeros segmentados/de bloque de fases separadas de esta invención. Esto se demuestra por la temperatura de fusión mucho más baja del segmento de ε-caprolactona cristalina, entalpías de fusión (ΔH) y los valores más bajos de Tg (más amorfo ε-caprolactona presente en la fase blanda) de los copolímeros aleatorios (ver, *por ejemplo*, Hiljainen-Vainio y otros, Lemmouchi y otros, US-A-4 643 734).

Estructuras generales de polímero

Los copolímeros multibloque segmentados de esta invención de acuerdo con la reivindicación 1, consisten en un segmento blando que preferentemente es completamente amorfo en las condiciones del cuerpo, hidrolizable y con al menos una transición de fase siendo a Tg por debajo de 37°C o preferentemente por debajo de 25°C. (medido en condiciones corporales). Este segmento también se refiere en la presente como fase A. Los copolímeros de la presente invención también contienen un segmento duro, que consiste de un polímero cristalino o semi-cristalino biodegradable con una Tm igual o mayor que 40 °C, pero igual o menor que 100 °C (medido en el cuerpo es decir, condiciones fisiológicas) (fase B).

Los prepolímeros A y B que forman los segmentos "suave" y "duros" están unidos por un extensor multifuncional de cadena. Las fases "duras" y "blandas" son incompatibles o sólo parcialmente compatibles en las condiciones del cuerpo. El extensor multifuncional de cadena es preferentemente una molécula alifática.

- 5 Los copolímeros multibloques resultantes de la presente invención tienen preferentemente una estructura de acuerdo con las fórmulas (1):



- 10 en donde R₁ es parte de la fase (A) y puede ser un poliéster amorfo, poliéster amorfo o policarbonato amorfo; o un prepolímero amorfo que se obtiene a partir de éster combinado, éter y/o grupos carbonato. R₁ contiene un polímero soluble en agua, el cual puede resultar de la utilización de este compuesto como un iniciador de la polimerización, siendo el polímero soluble en agua amorfo o cristalino a temperatura ambiente. Sin embargo, el polímero soluble en agua así introducido en R₁ se convertirá en amorfo en condiciones fisiológicas y por lo tanto pertenece a la fase (A). En una
15 modalidad, R₁ contiene grupos poliéter, los cuales pueden resultar de la utilización de estos compuestos como iniciador de polimerización, siendo el poliéter amorfo o cristalino a temperatura ambiente. Sin embargo, el poliéter así introducido en R₁ se convertirá en amorfo en condiciones fisiológicas y por lo tanto pertenece a la fase (A).

- 20 El iniciador es generalmente una molécula multifuncional, que inicia la polimerización (apertura de anillo). Los iniciadores adecuados son los dioles, como butanodiol o PEG, y diácidos.

- R₂ principalmente o enteramente contribuye a la fase (B) y puede ser un poliéster cristalino o semi-cristalino, poliéster, policarbonato o polianhídrido; o pre-polímeros de éster combinado, éter, anhídrido y/o grupos carbonato. Es posible que
25 parte de la fase R₂ es amorfa, en el que esta parte de R₂ contribuirá a la fase (A).

- R₁ y R₂ no son iguales.

z es cero o un entero positivo.

- 30 R₃ es un polímero soluble en agua, y puede estar presente (z ≠ 0) o no (z=0). R₃ será parte de la fase blanda A bajo condiciones fisiológicas. Los ejemplos de polímeros soluble en agua son los poliéteres tales como polietilenglicol (PEG), politetrametileno (PTMO) y polipropilenglicol (PPG); alcohol polivinílico (PVA) polivinilpirrolidona (PVP), polivinilcarbolactama, poli(hidroximetilmetacrilato) (poli-(HEMA)), polifosfacenos, poliortoésteres, poliortoésteramidas o copolímeros de los polímeros anteriores,

- 35 R₄ es un grupo alquileo de C₂-C₈ alifático, opcionalmente sustituido por un alquileo de C₁-C₁₀, el grupo alifático es lineal o cíclico. R₄ es preferentemente un butileno, - (CH₂)₄-, grupo. El grupo lateral alquileo de C₁-C₁₀ puede contener porciones S,N,P o O protegidas. x y y son un entero positivo.

- 40 Q1-Q6 son unidades de unión obtenidas por la reacción de los prepolímeros con el extensor multifuncional de cadena. Q1-Q6 pueden ser seleccionados independientemente de amina, uretano, amida, carbonato, éster y anhídrido. El caso en que todos los grupos de enlace Q son diferentes es raro y generalmente no preferido.

- 45 Típicamente, un tipo de extensor de cadena puede ser utilizado con tres pre-polímeros que tienen los mismos grupos terminales resultantes en un copolímero de fórmula (1) con seis grupos de enlace similares.

- En el caso de que los pre-polímeros R₁ y R₂ terminan de forma diferente, dos tipos de grupos Q estarán presentes: *por ejemplo* Q1 y Q2 serán los mismos entre dos segmentos enlazados R₁, pero Q1 y Q2 son diferentes cuando R₁ y R₂ están enlazados. En los copolímeros de fórmula (2) y (3) los grupos Q1 y Q2 son los mismos cuando dos pre-polímeros están presentes y terminan con el mismo grupo terminal (que normalmente es hidroxilo), pero son diferentes cuando los pre-polímeros terminan de manera diferente (*por ejemplo*, PEG el cual es diol terminal y un pre-polímero "tri-bloque" di-ácido terminal). Los ejemplos de fórmula (1), (2) y (3) muestran el resultado de la reacción con un extensor de cadena difuncional y prepolímeros difuncionales.
50

- 55 Con referencia a la fórmula (1) los poliésteres de la presente invención también pueden ser representados como copolímeros multibloque o segmentados que tienen una distribución aleatoria de segmentos (ab)_r, en la que 'a' corresponde al segmento R₁ que forma la fase (A) y 'b' corresponde al segmento R₂ que forma la fase (B) (para z = 0). En (ab)_r, la proporción a / b (correspondiente a x/y en la fórmula (1)) puede ser la unidad o diferente de la unidad. Los pre-polímeros pueden ser mezclados en cualquier cantidad deseada y pueden ser acoplados por un extensor multifuncional de cadena, *viz.* Un compuesto que tiene al menos dos grupos funcionales por los cuales este puede usarse para enlazar químicamente

los prepolímeros. Preferentemente, este es un extensor difuncional de cadena. En el caso $z \neq 0$, entonces la presentación de una distribución aleatoria de todos los segmentos pueden ser dada por $(abc)_r$ eran tres pre-polímeros diferentes (uno de ellos un polímero soluble en agua, por ejemplo, polietilenglicol) están distribuidos aleatoriamente en toda proporción posible.

5 El método para obtener un copolímero con una distribución aleatoria de a y b (y opcionalmente c) es mucho más ventajoso que cuando los segmentos se alternan en el copolímero tal como en $(ab)_n$ con la proporción de prepolímeros A y B siendo 1. La composición del copolímero puede entonces ser determinada mediante el ajuste de las longitudes de los pre-polímero. Las longitudes de los segmentos A y B en copolímeros $(ab)_n$ alternos pueden ser más pequeños que los bloques en los copolímeros en bloques con estructuras ABA o AB.

10 Los pre-polímeros de los cuales los segmentos a y b (y opcionalmente c) se forman en $(ab)_r$ y $(abc)_r$ están enlazados por el extensor difuncional de cadena. Este extensor de cadena es preferentemente un extensor diisocianato de cadena, pero además puede ser un compuesto diácido o diol. En el caso de que todos los pre-polímeros contengan grupos terminales hidroxilo, las unidades enlazantes serán grupos uretano. En el caso de que (uno de) los prepolímeros sean con ácido carboxílico terminales, las unidades enlazantes son grupos amida. Los copolímeros multibloque con estructura $(ab)_r$ y $(abc)_r$ además se pueden preparar por reacción de los pre-polímeros con ácidos di-carboxílicos terminales con un extensor diol de cadena o viceversa (pre-polímero diol terminal con un extensor diácido de cadena) utilizando un agente de acoplamiento tal como DCC (diciclohexil carbodiimida) formando enlaces éster.

20 El término "copolímeros aleatorios segmentados" se refiere a copolímeros que tienen una distribución aleatoria (*es decir* no alterna) de los segmentos A y B: $(ab)_r$ o a, b y c: $(abc)_r$.

Método y condiciones de polimerización:

25 Los copolímeros multibloque segmentados con estructura $(ab)_r$ y $(abc)_r$ pueden ser hechos por extensión de cadena de una mezcla de los pre-polímeros, que contienen el segmento duro y blando que forman los monómeros de los segmentos R_1 y R_2 , y R_3 y opcionalmente, en la proporción deseada con una cantidad equivalente de una molécula di-funcional, preferentemente una molécula alifática, más preferentemente un diisocianato tal como 1,4-butanodiisocianato (BDI). Los copolímeros segmentados de estructuras $(ab)_r$ o $(abc)_r$ se hacen preferentemente en solución. El pre-polímero (s) se disuelve en un disolvente orgánico inerte y el extensor de cadena se añade puro o en solución. La temperatura de polimerización puede ser la misma o incluso inferior a la temperatura de transición de fase más alta de los pre-polímeros. Las reacciones de acoplamiento con DCC se llevan a cabo preferentemente en solución. Dos (o tres) prepolímeros que son todos diol o diácido terminales se mezclan en solución con un extensor de cadena diácido o diol terminal, respectivamente, después de lo cual se añade DCC.

35 La polimerización se lleva a cabo durante un tiempo suficientemente largo para obtener una viscosidad intrínseca del copolímero de preferentemente 0,2 dl/g o superior, tal como 1 dl/g o superior. La post-polimerización en estado sólido a temperatura ambiente puede aumentar el peso molecular a una viscosidad intrínseca de hasta 4 dl/g. El tiempo específico de polimerización y temperaturas para esta polimerización en masa se dan en algunos ejemplos a continuación, pero pueden ser diferentes para otras combinaciones de pre-polímeros. La temperatura baja de polimerización y corto tiempo de polimerización impedirán la trans-esterificación de manera que se obtiene la morfología de fase separada y la distribución de monómeros es la misma que en los pre-polímeros que construyen el copolímero. Por el contrario, los copolímeros aleatorios de alto peso molecular tienen que ser preparados a temperaturas más altas ($> 100^\circ\text{C}$) y durante un tiempo mucho más largo para obtener una incorporación total de todos los monómeros. Durante ese tiempo ocurrirán las reacciones de trans-esterificación y se obtiene una distribución de monómero (que es menos en bloque) más aleatoria.

45 Los copolímeros segmentados de estructuras $(ab)_r$ o $(abc)_r$ además se puede hacer en masa a una temperatura a la cual la mezcla pre-polímero es un fundido y la cual es al menos 20°C superior a la temperatura de transición de fase más alta de uno de los pre-polímeros.

50 Los materiales obtenidos por extensión de la cadena en la masa además se pueden producir *in situ* en un extrusor.

55 Si el extensor de cadena es una molécula alifática difuncional y los pre-polímeros son lineales, se hace un co-polímero lineal; si uno de los reactivos (ya sea el extensor de cadena o por lo menos uno de los pre-polímeros) o ambos tienen más de dos grupos funcionales, se pueden obtener estructuras ramificadas con suficientemente baja conversión. Preferentemente, el extensor de cadena es un di-isocianato alifático tal como 1,4-butanodiisocianato.

La combinación de fases dura y blanda que forman los prepolímeros se elige de tal manera para obtener un co-poliéster o poliéster-carbonato de fase separada segmentado o en bloque con la degradación deseable, y propiedades mecánicas,

físicas y térmicas. Dado que las dos fases están enlazadas químicamente, la frontera de las fases esta en parte mezclada y dará lugar a buenas propiedades mecánicas del copolímero, incluso cuando los segmentos duros y blandos sean completamente incompatibles.

Pre-polímeros: composición y método de preparación

5

El segmento hidrolizable R_1 de fórmula (1) que forma la fase blanda A se obtiene por reacción del pre-polímero A.

10 El pre-polímero (A) puede *por ejemplo* ser preparado mediante polimerización por apertura de anillo. Así, un prepolímero (A) puede ser un co-polímero hidrolizable preparado mediante polimerización por apertura de anillo iniciada por un diol o un compuesto di-ácido, que tiene preferentemente una distribución aleatoria de monómeros. El compuesto diol es preferentemente un polímero soluble en agua, por ejemplo un diol alifático o un poliéter de bajo peso molecular. En una modalidad, es polietilenglicol (PEG). El polímero soluble en agua es parte del pre-polímero (A) al usarlo como un iniciador y puede mezclarse además con el pre-polímero A, y formar así un segmento R_3 hidrófilo adicional de la fórmula (1). El Pre-polímero (A) es un poliéster hidrolizable, poliésterester, policarbonato, poliéstercarbonato, polianhídrido o copolímeros de los mismos, derivados de monómeros cíclicos lactida (L,D o L/D), glicólida, ϵ -caprolactona, δ -valerolactona, carbonato de trimetileno, carbonato de tetrametileno, 1,5-dioxepan-2-ona, 1,4-dioxan-2-ona (para-dioxanona) o anhídridos cíclicos (oxepan-2,7-diona). Para cumplir con el requisito de una T_g por debajo de 37 °C. del segmento blando, algunos de los monómeros o combinaciones de monómeros mencionados anteriormente son más preferidos que otros. Por ejemplo, los pre-polímeros (A) que contiene los monómeros de lactida y/o glicolida se combinan preferentemente con cualquiera de los otros co-monómeros mencionados cíclicos (\neq -caprolactona, δ -valerolactona, carbonato de trimetileno, 1,4-dioxano-2-ona y combinaciones de los mismos). Esto puede por sí mismo bajar la T_g . Alternativamente, el pre-polímero se inicia con un polietilenglicol con un peso molecular suficiente para bajar la temperatura de transición vítrea del segmento blando.

25 El segmento R_2 de fórmula 1 que forma la fase dura (B) se obtiene por reacción de prepolímeros (B), que tienen una T_m entre 40 °C y 100 °C. Los pre-polímeros que contienen grupos aromáticos no son adecuados para el pre-polímero formador de la fase dura, debido a que tienen una temperatura de transición que es demasiado alta (> 100 °C). Además, cuando la temperatura de procesamiento es alta, la solubilidad en disolventes orgánicos comunes es generalmente demasiado baja. Por otra parte, los pre-polímeros que contienen grupos aromáticos pueden dar lugar a productos de degradación no deseados. Esto además es válido para los extensores de cadena, debido a los productos de degradación no deseados y la temperatura de transición que es demasiado alta.

30 El prepolímero (B) tiene un M_n de más de 3000, y es poli- ϵ -caprolactona. En general el M_n del prepolímero (B) será inferior a 10.000. El contenido de prepolímero (B) en el copolímero es de preferencia 10-90 % en peso, con mayor preferencia 25-70 % en peso, con la máxima preferencia 30-50 % en peso

35 La proporción L/D de la lactida utilizada en bloques o segmentos amorfos de poli-DL-lactida puede estar lejos de la unidad (otra diferente a 50/50). Por ejemplo, una proporción L/D entre 85/15 y 15/85 da una homo-polímero completamente amorfo. Además, se sabe que el exceso de un isómero (L o D) sobre el otro aumenta la T_g de la poli-DL-lactida. Una cantidad menor de cualquier otro de los monómeros anteriormente mencionados que construyen la fase blanda puede además estar presente en la fase dura que forma el pre-polímero o bloque.

40 Los pre-polímeros serán preferentemente (co) poliésteres lineales y aleatorios, poliéster-carbonatos, poliésterésteres o polianhídridos con grupos terminales reactivos. Estos grupos terminales pueden ser hidroxilo o carboxilo. Se prefiere tener un co-polímero terminado con dihidroxi, pero pueden ser utilizados además polímeros terminados con hidroxil-carboxilo o dicarboxilo. En caso de que el polímero tenga que ser lineal, se puede preparar con un componente di-funcional (diol) como un iniciador, pero en caso de polioles trifuncionales o mayores pueden ser obtenidos poliésteres en forma de estrella. El diol puede ser un diol alifático o un poliéter de bajo peso molecular.

45 La síntesis del pre-polímero mediante una polimerización de apertura de anillo se lleva a cabo preferentemente en presencia de un catalizador. Un catalizador adecuado es $Sn(Oct)_2$ con $M/I = 5000-30000$. Además es posible llevar a cabo la síntesis sin catalizador.

Las condiciones para la preparación de los poliésteres, policarbonatos y polianhídridos son los conocidos en la técnica.

55 Los copolímeros de la presente invención son generalmente lineales. Sin embargo, además es posible preparar los copolímeros en una forma ramificada. Estos copolímeros no lineales de la presente invención se pueden obtener mediante el uso de un extensor tri- (o más) funcional de cadena, tal como tri-isocianato. Los copolímeros ramificados pueden mostrar mejores características de flujo.

Longitud y proporción del pre-polímero de los pre-polímeros A y B en co-poliésteres segmentados.

5 En el caso de un segmento duro cristalizante, la longitud (número de peso molecular medio, Mn) del pre-polímero debe ser lo suficientemente grande como para ser capaz de cristalizar en el copolímero. El segmento duro de poli-ε-caprolactona (PCL) que forma el pre-polímero es preferentemente mayor 3000. Un pre-polímero PCL con longitudes más largas resulta en una morfología de fases separadas con un contenido menor de segmento duro, como se muestra en los resultados. La proporción de pre-polímero en la cual se observa la separación de fases depende por lo tanto de las longitudes del pre-polímero. En general, las longitudes de los pre-polímeros que forman el segmento blando y duro dentro de un copolímero deben tener un valor en el cual se observa la morfología de una fase separada, siendo favorable el grado de separación de fases (incompatibilidad) para las propiedades deseadas del dispositivo biomédico

15 El segmento blando que forma el pre-polímero (A) tiene un Mn mayor que 500, preferentemente mayor que 1000, más preferentemente mayor que 2000. La longitud de los prepolímeros debe ser elegida de tal manera que sean tan grandes como sea necesario para obtener una buena morfología de fase separada y buenas propiedades mecánicas y térmicas del copolímero resultante. La longitud del pre-polímero debe ser suficientemente baja para ser miscible con el extensor de cadena a la temperatura de polimerización, por lo general esto significa que el Mn es inferior a 10000.

20 Generalmente, el contenido del segmento duro está en el intervalo de 10-90 en peso %, preferentemente de 25-60%, resulta en materiales termoplásticos, flexibles, con buenas propiedades mecánicas a la temperatura de aplicación (viz. aproximadamente 37°C para aplicaciones médicas).

Propiedades de polímeros y aplicaciones

25 Los pesos moleculares muy altos de copolímeros multibloque no son necesarios para obtener buenas propiedades mecánicas. Con una viscosidad intrínseca del copolímero de aproximadamente 0,8 dl/g las propiedades mecánicas iniciales serán suficientes para la producción de dispositivos médicos. Para las aplicaciones de administración de fármacos, la viscosidad intrínseca puede ser incluso inferior, preferentemente entre 0.2-2 dl/g. Las viscosidades intrínsecas altas son indeseables, debido a que el polímero será difícil de procesar. Típicamente, la viscosidad intrínseca es mayor que 0.1 dl/g y menor de 10 dl/g. Preferentemente, las viscosidades intrínsecas se encuentran entre 1-4 dl/g para los implantes médicos.

30 Los copolímeros multibloque segmentados se pueden conformar en artículos quirúrgicos usando cualquier técnica conocida tal como, por ejemplo, extrusión, moldeo, fundido con disolvente y liofilización. Esta última técnica se utiliza para formar materiales porosos. La porosidad se puede ajustar mediante la adición de co-disolventes, no disolventes y/o sustancias lixiviables. Los copolímeros pueden ser procesados (ya sea sólidos o porosos) para películas, láminas, tubos, membranas, mallas, fibras, tapones, recubrimientos, microesferas y otros artículos. Los productos pueden ser sólidos, huecos o (micro) porosos. Una amplia gama de artículos quirúrgicos puede ser fabricada para aplicaciones en, por ejemplo, cuidado de heridas, recuperación de la piel, regeneración de nervios, prótesis vasculares, administración de fármacos, reconstrucción del menisco, ingeniería de tejidos, recubrimiento de dispositivos quirúrgicos, regeneración de ligamento y tendón, reparación dental y ortopédica. Los copolímeros se pueden usar solos o se pueden mezclar y/o co-extrudir con otros polímeros absorbibles o no absorbibles.

Además, se pueden usar en aplicaciones farmacéuticas, *por ejemplo* para la administración de fármacos, *por ejemplo*, en forma de microesferas o membranas.

45 Como se ilustra en los ejemplos siguientes, los materiales de la presente invención tienen propiedades mejoradas, incluyendo térmicas, mecánicas, de procesamiento en comparación con los copolímeros descritos en la técnica anterior.

Liberación del polipéptido

50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a la encapsulación de al menos un polipéptido biológicamente activo (por ejemplo, una proteína o péptido biológicamente activo) en la matriz de un copolímero termoplástico multibloque de fases separadas. Se encontró que un copolímero biodegradable de la invención es particularmente adecuado como vehículo de administración para un polipéptido, lo que permite la liberación controlada del polipéptido desde la matriz en su entorno, por ejemplo, en el cuerpo de un sujeto.

55 Se proporciona como ejemplo una composición para la liberación controlada de al menos un polipéptido biológicamente

activo a un hospedero, que comprende al menos un polipéptido biológicamente activo encapsulado en una matriz que comprende al menos un copolímero termoplástico multibloque de fase separada, y el copolímero se caracteriza en que:

- 5 (i) este comprende al menos dos segmentos hidrolizables elegidos de un prepolímero (A) y un prepolímero (B), el prepolímero (A) tiene una Tg inferior a 37°C, y el prepolímero (B) tiene una Tm de 40 °C - 100 °C bajo condiciones fisiológicas;
- (ii) los segmentos están unidos por un extensor multifuncional de cadena;
- (iii) los segmentos están distribuidos aleatoriamente sobre la cadena de polímero;
- 10 (iv) el prepolímero (A) contiene un segmento que se deriva de un polímero soluble en agua.

El extensor de cadena puede ser un diisocianato tal como 1,4-butanodiisocianato.

Tal como se utiliza en la presente, el término "multibloque" se refiere a la presencia de varios segmentos distintos en una cadena de polímero.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término "termoplástico" se refiere a la naturaleza no reticulada del copolímero multibloque. Cuando se calienta, un polímero termoplástico se hace fluido y se solidifica al (re-) enfriar.

20 Tal como se utiliza en la presente, el término "hidrolizable" se refiere a la capacidad de reaccionar con agua en la que se escinde la molécula. Los grupos hidrolizables incluyen grupos éster, carbonato, fosfaceno, amida y uretano. En condiciones fisiológicas, sólo los grupos éster, carbonato y de fosfaceno reaccionan con agua en una escala de tiempo razonable.

25 Tal como se utiliza en la presente, el término "extensor multifuncional de cadena" se refiere a la presencia de al menos dos grupos reactivos en el extensor de cadena que permiten la extensión de la cadena, es decir, el incremento del peso molecular de los prepolímeros.

Tal como se utiliza en la presente, el término "aleatorio" se refiere a un copolímero multibloque en donde los distintos segmentos se distribuyen aleatoriamente en la cadena polimérica.

30 Tal como se utiliza en la presente, el término "polímero soluble en agua" se entiende que se refiere a un polímero que tiene una buena solubilidad en un medio acuoso, preferentemente agua, en condiciones fisiológicas. Este polímero, cuando se copolimeriza con restos más hidrófobos, hace que el copolímero resultante sea hinchable en agua. El polímero soluble en agua puede ser derivado de un diol, una diamina o un diácido. El diol o diácido se usa adecuadamente para iniciar la polimerización de apertura de anillo de monómeros cíclicos. En un aspecto, la composición comprende un copolímero como se define anteriormente en donde el polímero soluble en agua está presente como un prepolímero adicional.

35 preferentemente, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en poliéteres tales como polietilenglicol (PEG), politetrametileno (PTMO) y polipropilenglicol (PPG); alcohol polivinílico (PVA) polivinilpirrolidona (PVP), polivinilcarprolactama, poli(hidroximetilmetacrilato) (poli-(HEMA)), polifosfacenos, poliortoésteres, poliortoésteramidas o copolímeros de los polímeros anteriores. Por ejemplo, dicho segmento polimérico soluble en agua se deriva del PEG que

40 tiene un peso molecular de 150-5000 g/mol.

El copolímero en una composición de la invención puede tener una viscosidad intrínseca de al menos 0.1 dl/g, y preferentemente entre 0.2 y 2 dl/g.

45 Un polipéptido es un polímero de aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. Los polipéptidos cortos se conocen además como péptidos, mientras que los polipéptidos más largos se refieren típicamente como proteínas. Una convención es que las cadenas de polipéptidos que son lo suficientemente cortas para ser hechas sintéticamente a partir de los aminoácidos constituyentes se denominan péptidos en lugar de proteínas. Sin embargo, con el advenimiento de mejores técnicas sintéticas, los polipéptidos de cientos de aminoácidos se pueden hacer, incluyendo proteínas completas como ubiquitina.

50

Otra convención coloca una línea divisoria informal en aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Esta definición es un tanto arbitraria. Polipéptidos largos, como el péptido beta amiloide relacionado con la enfermedad de Alzheimer, se pueden considerar proteínas; y pequeñas proteínas, como la insulina, se puede considerar péptidos. En cualquier caso, un experto apreciará que esencialmente cualquier tipo de polipéptido se puede encapsular y posteriormente liberar a partir de una matriz de copolímero. En una modalidad, una composición de la invención comprende un péptido biológicamente activo o una proteína biológicamente activa. Los polipéptidos encapsulados contienen preferentemente sólo aminoácidos naturales, aunque aminoácidos no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza pero que se pueden incorporar en una cadena polipeptídica) y/o análogos de aminoácidos como se conocen en la técnica pueden ser,

alternativamente, empleados. Además, uno o más de los aminoácidos en un polipéptido se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química tal como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo isofarnesilo, un grupo ácido graso, un enlazador para la conjugación, funcionalización, u otra modificación (por ejemplo, amidación alfa), etc. En una modalidad preferida, las modificaciones del péptido conducen a un péptido más estable (por ejemplo, una mayor vida media in vivo). Estas modificaciones pueden incluir la ciclación del péptido, la incorporación de D-aminoácidos, etc. Ninguna de las modificaciones debe interferir sustancialmente con la actividad biológica deseada del péptido. En ciertas modalidades, las modificaciones del péptido conducen a un péptido biológicamente más activo.

Como se usa en la presente, se entiende que un "polipéptido biológicamente activo" se interpreta ampliamente como cualquier péptido o proteína capaz de provocar una respuesta en un sistema biológico tal como, por ejemplo, célula (s) viva, tejido (s), órgano (s), y sujeto (s). Los polipéptidos biológicamente activos pueden incluir polipéptidos naturales y/o sintéticos. Se entiende, por lo tanto, que un polipéptido biológicamente activo incluya cualquier sustancia destinada para su uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades o en la mejora del desarrollo físico o mental deseable y condiciones en un sujeto.

El péptido biológicamente activo o una proteína biológicamente activa se selecciona preferentemente del grupo que consiste en fármacos de proteínas/péptidos, enzimas, ligandos de receptores, neurotransmisores, péptidos inhibidores, péptidos reguladores, péptidos activadores, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales, péptidos anti-tumorales, antibióticos, antígenos, vacunas y hormonas. Los ejemplos de polipéptidos a encapsular se mencionan en la patente US 5,980,948 y D.J.A. Crommelin y otros, Int. J. Pharm 266 (2003) 3-16. Por supuesto, se prevé también encapsular dos o más polipéptidos (biológicamente activos) distintos.

En una modalidad, el polipéptido tiene un peso molecular de menos de 10,000 o más. Estos polipéptidos más grandes se encapsulan preferentemente en la matriz de un copolímero que contiene PEG, como un segmento de prepolímero (A) y/o como un prepolímero adicional, y en donde dicho PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 5000 y/o en donde dicho PEG está presente en una cantidad de aproximadamente 5% p/p hasta aproximadamente 70% p/p, más preferentemente de aproximadamente 10% p/p hasta aproximadamente 50% p/p. Los PEG preferidos para su uso en combinación con polipéptidos mayores de 10,000 o más son los que tienen un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 3000, como 1000 a aproximadamente 3000.

Una composición de la invención puede tener cualquier apariencia o forma deseable. En una modalidad, la matriz se procesa en la forma de una microesfera, micropartícula, implante, recubrimiento, gel, láminas, hojas, hoja, varilla o membrana. El tratamiento puede implicar la extrusión o moldeo por inyección. En vista de la susceptibilidad térmica del polipéptido (s) encapsulado, se prefiere evitar las altas temperaturas de procesamiento (por ejemplo superiores a 100 °). Se encontró sorprendentemente que un copolímero de la invención permite el procesamiento a una temperatura relativamente baja. En consecuencia, el procesamiento, por ejemplo, por extrusión o moldeo por inyección se realiza ventajosamente a una temperatura desde aproximadamente 20°C hasta 80°C, preferentemente entre aproximadamente 30°C a 60°C.

Un aspecto específico se refiere a una composición en forma de un recubrimiento. El recubrimiento puede ser aplicado como un recubrimiento por ejemplo liberador de fármacos en un implante médico, tal como una endoprótesis vascular o urinaria, una prótesis ortopédica o un implante ocular. Otro aspecto específico se refiere a una composición en forma de microesferas, preferentemente microesferas monodispersas. Los métodos para preparar microesferas (monodispersas) son conocidos en la técnica. Por ejemplo WO 2005/115599 describe un dispositivo para la generación de microesferas a partir de un fluido, método de inyección al menos de un primer fluido en un segundo fluido, y una placa de inyección. Aun un aspecto adicional se refiere a una composición en forma de un implante, preferentemente un implante inyectable.

Además se proporciona un método para la entrega de un polipéptido biológicamente activo de interés a un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar una dosis eficaz de una composición según la invención a dicho sujeto. El sujeto es típicamente un mamífero, preferentemente un ser humano. Sin embargo, además se considera el uso veterinario de la presente invención. El método puede tener un propósito terapéutico, profiláctico y/o cosmético. Cualquier modo de administración adecuada puede ser seleccionado, dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la administración puede comprender la administración parenteral, intra-arterial, intra-articular, intra-venal, intra-ocular, epidural, intratecal, intramuscular o subcutánea de una composición. En una modalidad, la invención proporciona un método para la entrega de un polipéptido biológicamente activo de interés a un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar una dosis efectiva de una composición según la invención a dicho sujeto, en el que la composición está en forma de microesferas, un implante inyectable o un formador de gel *in situ* y en el que la composición se administra intra-ocular, por vía intramuscular o subcutánea.

Breve descripción de los dibujos:

La Figura 1 muestra las endotermas de flujo de calor de copolímeros de fases separadas, que se caracteriza por una Tg y una Tm de un copolímero.

La Figura 2 muestra la relación entre la temperatura de transición vítrea (Tg1 de la primera corrida DSC, Tg2 de la segunda corrida DSC) y el contenido de ϵ -caprolactona de los copolímeros con longitudes diferentes de prepolímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): la Tg1 del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \diamond (diamante abierto): la Tg2 del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrado cerrado): la Tg1 del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; D (cuadrado abierto): la Tg2 del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \bullet (Círculo cerrado): la Tg1 del co-poliéster con pre-polímero PCL4000; \circ (círculo abierto): la Tg2 del co-poliéster con pre-polímero PCL4000; \blacktriangle (triángulo cerrado): la Tg1 de co-poliéster aleatorio; \triangle (triángulo abierto): la Tg2 del co-poliéster aleatorio; *: la Tg2 de co-poliéster con pre-polímero lactida- ϵ -caprolactona con Mn = 2000.

La Figura 3 muestra la relación entre la temperatura de fusión (pico máximo, Tm) de la primera corrida de DSC y el contenido de ϵ -caprolactona de copolímeros con longitudes diferentes del prepolímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): Tm1 del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrado cerrado): Tm1 del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \blacktriangle (triángulo cerrado): Tm1 del co-poliéster aleatorio; \bullet (Círculo cerrado): Tm1 del co-poliéster con pre-polímero PCL4000.

La Figura 4 muestra la relación entre la entalpía de fusión (ΔH) de la primera corrida de DSC y el contenido de ϵ -caprolactona de copolímeros con longitudes diferentes de prepolímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrado cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \blacktriangle (triángulo cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster aleatorio; \bullet (Círculo cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL4000.

La Figura 5 muestra la relación entre la entalpía de fusión (ΔH) de la primera corrida de DSC y la longitud media de la secuencia de caprolactona, L_{Cap} , de co-poliésteres con diferentes longitudes de pre-polímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrado cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \blacktriangle (triángulo cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster aleatorio; \bullet (Círculo cerrado): $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero PCL4000; *: $\Delta H1$ del co-poliéster con pre-polímero de lactida- ϵ -caprolactona con Mn = 2000.

La Figura 6 muestra la relación entre la longitud media de la secuencia de caprolactona, L_{Cap} y el contenido de ϵ -caprolactona de co-poliésteres con diferentes longitudes del pre-polímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): L_{Cap} del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrado cerrado): L_{Cap} del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \bullet (Círculo cerrado): L_{Cap} del co-poliéster con pre-polímero PCL4000; \blacktriangle (triángulo cerrado): L_{Cap} del co-poliéster aleatorio. (círculo cerrado): *: L_{Cap} del co-poliéster con pre-polímero de lactida- ϵ -caprolactona con Mn=2000

La Figura 7 muestra el comportamiento tensión-deformación de los co-poliésteres segmentados con el prepolímero PCL3000 con diferentes contenidos de PCL3000.

La Figura 8 muestra la relación entre el módulo elástico (E) y el contenido ϵ -caprolactona de copolímeros con longitudes diferentes del prepolímero PCL y de copolímeros aleatorios de DL-lactida y ϵ -caprolactona: \blacklozenge (diamantes cerrados): E del co-poliéster con pre-polímero PCL2000; \blacksquare (cuadrados cerrados): E del co-poliéster con pre-polímero PCL3000; \blacktriangle (triángulos cerrados): E del co-poliéster aleatorio.

La Figura 9 muestra las señales típicas de flujo inverso de calor de los termogramas de DSC obtenidos para 50CLPEGCL15CL20-b-CL40 (Figura 9A) y 50CLPEGCL15CL20-b-CL40 (Figura 9B).

La Figura 10 muestra la liberación de lisosima a partir de copolímeros multibloques 30CLPEGCL15CL20-b-CL40 (\blacktriangle triángulos cerrados), 50CLPEGCL15CL20-b-CL40 (\blacklozenge diamantes cerrados) y 70CLPEGCL15CL20-b-CL40 (\blacksquare cuadrados cerrados).

La Figura 11 muestra la liberación de albúmina de suero bovino a partir de copolímeros multibloques 50CLPEGCL15CL20-b-CL40 (\blacklozenge diamantes cerrados) y 70CLPEGCL15CL20-b-CL40 (\blacksquare cuadrados cerrados).

La Figura 12 muestra la liberación *in vitro* de lisosima de los extruidos 30CLP10CL20-b-CL40 a 10% en peso de carga de lisozima en PBS, pH 7,4, a 37 °C.

Ejemplos

Métodos de análisis:

Los siguientes métodos de análisis se utilizaron en todos los ejemplos, a menos que se indique lo contrario.

La viscosidad intrínseca se mide en cloroformo a 25 °C utilizando un viscosímetro Ubbelohde (según la norma ISO 1628-1)..

Los pesos moleculares se determinaron por cromatografía de permeación en gel a 30 °C usando un instrumento Spectra Physics equipado con 2 columnas PL-Mixed-C (Polymer Labs), que opera con tetrahidrofurano como eluyente y con un

refractómetro Shodex RI-71. Las muestras se disolvieron en THF (1 mg ml^{-1}), el volumen de inyección fue de 1,000 y la velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} . Las curvas de calibración se obtuvieron mediante patrones de poliestireno.

5 La composición del pre-polímero y copolímero, y la distribución del monómero (longitud media de la secuencia, L_{Lac} y L_{Cap}) fueron determinadas usando $^1\text{H-NMR}$ a 300 MHz en solución en cloroformo deuterado.

10 Las propiedades térmicas se determinaron en atmósfera de nitrógeno usando un Perkin-Elmer DSC-7, 5-10 mg muestras se calientan a una velocidad de $10 \text{ }^\circ\text{C por minuto}$, se enfriaron a una velocidad de $10 \text{ }^\circ\text{C por minuto}$, manteniéndose durante 1 minuto a $-90 \text{ }^\circ\text{C}$ y se calientan de nuevo a una velocidad de $10 \text{ }^\circ\text{C por minuto}$. Las T_g y T_m se determinaron a partir de las curvas resultantes de DSC.

15 El comportamiento tensión-deformación se determinó en un medidor de tracción Instron 4301. Las películas delgadas (0.25 mm) se midieron a temperatura ambiente a una velocidad de ensayo de 10 mm / minuto . La mejor resistencia a la tracción, la tensión a 250% de deformación, la elongación a la fractura y el módulo inicial se determinaron a partir de estas mediciones.

20 Las películas se prepararon por evaporación de una solución del co-poliéster en cloroformo en un disco Petri durante 7 días a temperatura ambiente. Las propiedades del polímero se dan en las Tablas 1-5.

25 La siguiente notación se utiliza para indicar la composición de los copolímeros: por ejemplo, las columnas cap2000 y dl-lac / cap2000 en la Tabla 1 dan la proporción de los dos pre-polímeros (% p / p) (cap2000 es el pre-polímero PCL con $M_n = 2000$; dl-lac / cap2000 es el pre-polímero DL-lactida- ϵ caprolactona con $M_n = 2.000$). La primera columna indica la composición molar del co-monómero del copolímero resultante: por ejemplo, P (CL-DLLA) 80-20 contiene 80% en moles de ϵ -caprolactona (la cantidad total de ϵ -caprolactona en los dos pre-polímeros) y 20% en moles de DL-lactida.

Ejemplos de pre-polímeros:

Ejemplo de referencia 1: Prepolimero DL-lactida- ϵ -caprolactona ($M_n = 2000$)

30 32,82 gramos (0,231 moles) de DL-lactida (Purac, Países Bajos) se introdujeron en un frasco de tres bocas, en atmósfera de nitrógeno y se secó al vacío a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 8 horas. La ϵ -caprolactona (Acros, Bélgica) se secó sobre CaH_2 y se destiló a presión reducida en una atmósfera de nitrógeno. 26,32 gramos (0,231 mol) de ϵ -caprolactona se añadió bajo un flujo de nitrógeno. Se añadieron 2,68 gramos (29,7 mmol) de 1,4-butanodiol (Acros, destilado a partir de 4 tamices moleculares A después de secado durante 8 horas). Se añadió 24,8 mg de octoato de estaño (Sigma Corp) ($M/I = 8,000$). La mezcla se agitó magnéticamente y se hizo reaccionar a $130 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 162 horas. $^1\text{H-RMN}$ mostró la conversión completa del monómero. La proporción lactida: ϵ -caprolactona en el pre-polímero fue de 48,4: 51,6 (calculado según $^1\text{H-RMN}$). El peso molecular calculado (M_n) fue 2.080 y fue confirmado por análisis de grupos terminales con $^1\text{H-RMN}$.

Ejemplo de referencia 2: Pre-polímero de ϵ -caprolactona ($M_n=2000$)

40 193,98 gramos (1,70 mol) de ϵ -caprolactona (véase el ejemplo 1 para la purificación) se introdujeron en un frasco de tres bocas, en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 8,74 gramos (97,0 mmoles) de 1,4-butanodiol (véase el ejemplo 1 para la purificación). Se adicionaron 78.7 mg de octoato de estaño (Sigma Corp) ($M/I=9130$). La mezcla se agitó magnéticamente y se hizo reaccionar a $130 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 162 horas. $^1\text{H-RMN}$ mostró la conversión completa del monómero. El peso molecular calculado (M_n) fue 2090 y fue confirmado por análisis de grupos terminales con $^1\text{H-RMN}$.

Ejemplo de referencia 3: Pre-polímero de ϵ -caprolactona ($M_n=3000$)

45 Un pre-polímero con $M_n = 3000$ se preparó de la misma manera como se describe en el ejemplo 2. El peso molecular calculado (M_n) fue 3160 y fue confirmado por análisis de grupos terminales con $^1\text{H-RMN}$.

Ejemplo de referencia 4: Método General de polimerización de co-poliésteres segmentados con segmentos aleatoriamente distribuidos: P (CL-DLLA)

50 Los pre-polímeros de PCL (2000, 3000 o 4000) y pre-polímero DL-lactida- ϵ -caprolactona son pre-calentados hasta $70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se vuelvan más líquidos. Las cantidades apropiadas de los dos pre-polímeros se pesan en una ampolla de vidrio

suministrada con entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. Se añade 1 equivalente de 1,4-butanodisocianato (Bayer, destilado a presión reducida). Los contenidos de la ampolla se calientan rápidamente a 65 °C y luego se agitan mecánicamente durante 15 minutos. A medida que la mezcla se vuelve viscosa, la temperatura se aumentó a 80 °C. La agitación se detiene cuando la mezcla se vuelve demasiado viscosa (entre ½ -1½ horas) y el calentamiento se continúa durante un máximo de 24 horas..

La ampolla se enfría hasta temperatura ambiente y la post- polimerización continúa durante 48 hrs. Después, los contenidos se aislaron por disolución del polímero en cloroformo. La solución se filtra y se vierte en un disco- petri. El disolvente se evapora y después de esto la película de polímero se seca en un horno de vacío a 40 °C..

El polímero se almacena en un envase sellado a temperatura ambiente durante al menos 1 semana antes de que se lleve a cabo la caracterización (propiedades térmicas y mecánicas, y la viscosidad intrínseca). La composición del polímero (longitud media de la secuencia, y LLac LCAP) se determina por, L_{Lac} and L_{Cap} 1H -RMN.

Ejemplo de referencia 5: Síntesis de co-poliésteres aleatorios:

Los copolímeros aleatorios fueron sintetizados mediante una polimerización en masa de apertura de anillo iniciado por octoato de estaño La DL-lactida (Purac, Países Bajos) y E-caprolactona (Acros, Bélgica; secados sobre CaH₂ y destilado bajo presión reducida en una atmósfera de nitrógeno) se cargaron en una ampolla de vidrio limpio y seco, con entrada de nitrógeno Se adiciona octoato de estaño (ver la Tabla 3) y la ampolleta se coloca en un baño de aceite a 120 °C. Los contenidos se mantienen en atmósfera de nitrógeno. Las ampolletas se calentaron durante 5 días y después se enfriaron a temperatura ambiente. La muestra del polímero fue tomada para mediciones de RMN. Los polímeros fueron disueltos en cloroformo y precipitados en etanol (96%). Las películas para análisis térmico y mecánico fueron hechas a partir de los polímeros purificados. Las viscosidades intrínsecas fueron medidas a partir de los polímeros purificados.

Ejemplo de referencia 6: Preparación de guías nerviosas.

Los copolímeros preparados de acuerdo con el método del Ejemplo 4 con diferentes proporciones de ϵ -caprolactona / lactida y tanto con pre-polímeros PCL2000 y PCL3000 se han utilizado para la preparación de guías nerviosas. Para este fin, para cada copolímero una solución de polímero en cloroformo se recubrió por inmersión en mandriles con varios diámetros. Después de la inmersión, el mandril se colocó horizontalmente y el disolvente se dejó evaporar durante 5 minutos mientras rota. Este procedimiento se repite hasta que se obtuvo el espesor de pared deseado. El mandril con la capa de copolímero se colocó primero en etanol y después en agua destilada. Los tubos se remueven del mandril y se cortan en las longitudes apropiadas. Se colocaron en etanol, seguido de secado al vacío a 40 °C para remover el monómero y los residuos de bajo peso molecular y disolventes orgánicos.

Ejemplo de referencia 7: Preparación de micro-esferas

Un copolímero (1 gramo) preparado de acuerdo con el método del Ejemplo 4 que contiene 39.3% (p / p) del prepolímero PCL3000 se disuelve en 50 ml de diclorometano. Se hace una solución de alcohol polivinílico 3% (PVA Mw = 22.000) en 800 ml de agua. las soluciones se filtran. La solución de PVA se agita a una velocidad de 200-800 rpm durante todo el proceso. La solución de polímero se adiciona a la solución de PVA. Las soluciones se agitan durante 1.5 horas mientras se evapora el diclorometano a presión reducida. La agitación se detiene y las microesferas se colectan de la fase acuosa, después de lo cual estas se lavan varias veces con agua. Finalmente, las microesferas se secan al vacío o por liofilización. Según este método, se pueden obtener microesferas huecas con capa externa sólida ($d_{50} \sim 25\mu m$) . Por ligera modificación del proceso, se pueden preparar, además, partículas sólidas y porosas y partículas con un tamaño más pequeño o más grande

Tabla 1 : *Propiedades de los co-poliésteres segmentados con el pre-polímero PCL 2000*

P(CL-DLLA) (mol%)	Composición (%) p/p)		[η]	L_{Cap}	L_{Lac}	$T_{g1}(^{\circ}C)$	$T_{g2}(^{\circ}C)$	$T_{m1}(^{\circ}C)$	$T_{m2}(^{\circ}C)$	$\Delta H_1(J/g)$	$\Delta H_2(J/g)$
	Cap2000	dl-lac/cap 2000									
63.6-36.4	23.4	76.6	3.62	3.8	4.3	-23.6	-25.2	37.0	-	7.6	-
72.0-28.0	41.0	59.0	2.25	5.5	4.3	-24.4	-34.5	48.4	-	25.0	-
74.6-25.4	46.6	53.4	1.19	6.1	4.2	-23.7	-36.6	53.3	41.7	34.3	1.9
79.5-20.5	56.8	43.2	1.30	8.3	4.3	-29.5	-41.7	54.4	38.7	39.5	20.7

Tabla 2: *Propiedades de los co-poliésteres segmentados con el pre-polímero PCL 3000*

P(CL-DLLA) (mol%)	composición (%) p/p)		[η]	L_{Cap}	L_{Lac}	$T_{g1}(^{\circ}C)$	$T_{g2}(^{\circ}C)$	$T_{m1}(^{\circ}C)$	$T_{m2}(^{\circ}C)$	$\Delta H_1(J/g)$	$\Delta H_2(J/g)$
	Cap3000	dl-lac/cap 2000									
67.7-32.3	33.3	66.7	1.99	4.0	3.8	-16.8	-29.6	49.0		26.7	-
70.6-29.4	39.3	60.7	1.27	4.8	4.0	-17.1	-34.3	57.7	45.4	32.0	1.82
75.3-24.7	48.9	51.1	1.31	6.2	4.1	-20.7	-40.0	58.4	45.7	39.2	18.7
76.5-23.5	51.4	48.6	1.13	6.4	3.9	-22.1	-38.9	57.4	45.7	42.1	21.3
79.2-20.8	57.0	43.0	1.61	7.6	4.0	-24.1	-42.6	53.7	45.0	44.3	26.2
51.7-48.3	-	100	-	2.4	4.1	-13.9	-11.3	-	-	-	-
100-0*)	-	-	-	-	-	-58.1	-61.0	64.0	59.0	81.7	63.0

*) : (Mn=80000)

Tabla 3: propiedades de los poliésteres segmentados con un prepolímero de PCL 4000

P(CL-DLLA) (mol%)	composición p/p (%)		[η]	L_{Cap}	L_{Lac}	$T_{g1}(^{\circ}C)$	$T_{g2}(^{\circ}C)$	$T_{m1}(^{\circ}C)$	$T_{m2}(^{\circ}C)$	$\Delta H_1(J/g)$	$\Delta H_2(J/g)$
	Cap4000	dl-lac/cap 2000									
62.2-37.8	18.9	83.1	2.35	3.3	4.0	-20.8	-23.9	38.7	-	8.8	-
67.4-32.6	28.4	71.6	1.00	4.1	4.0	-17.7	-31.1	56.9	46.2	25.1	4.2

Tabla 4: Propiedades de los poliésteres aleatorios

	M/I	[η]	L_{Cap}	L_{Lac}	$T_{g1}(^{\circ}C)$	$T_{g2}(^{\circ}C)$	$T_{m1}(^{\circ}C)$	$T_{m2}(^{\circ}C)$	$\Delta H_1(J/g)$	$\Delta H_2(J/g)$
74.5-25.5	7200	3.12	4.0	2.9	-39.3	-38.9	42.4	-	9.0	-
77.5-22.5	8500	3.78	7.1	4.1	-37.4	-46.9	43.7	39.7	28.5	7.1
80.2-19.8	4650	2.18	5.2	2.6	-37.3	-42.7	42.0	-	20.2	-

Tabla 5: Pesos moleculares de los poliésteres segmentados de fases separadas medidos mediante GPC

P(CL-DLLA) (mol%)	PCL longitud	[η]	$M_w (\cdot 10^{-3})$	$M_N (\cdot 10^{-3})$	D
63.6-36.4	2000	3.62	234.0	117.3	2.0
74.6-25.4	2000	2.08	287.0	89.0	3.23
67.7-32.3	3000	1.99	171.9	83.3	2.07
75.3-24.7	3000	1.31	287.9	115.9	2.50

Resultados y discusión

50 Resumen:

Los co-poliésteres segmentados construidos de un segmento blando de DL-lactida- ϵ -caprolactona (con Mn 2000) y de un segmento duro PCL (con Mn 3000 o 4000 Mn), y con un contenido del segmento duro de 33-57% y 28% (w/w), respectivamente, son, elastómeros termoplásticos flexibles con buenas propiedades mecánicas y térmicas. Este tipo de material parece muy prometedor para ser utilizado para guías nerviosas capaces de superar los defectos de los nervios de más de 2 cm.

Como material de referencia, se han preparado copolímeros aleatorios de D, L-lactida y ϵ -caprolactona con composiciones de monómeros similares a los de los copolímeros segmentados. Un menor grado de separación de fases y un punto de fusión más bajo de la fase cristalina los hace menos aplicables como polímeros para dispositivos biomédicos. Estas diferencias son causadas por una distribución diferente del monómero: en un copolímero de bloque tales como copoliésteres de fase separada basados en lactida / ϵ -caprolactona, la longitud media de secuencia de los monómeros será más larga y la distribución de la secuencia de longitud será mucho menor que en un copolímero "aleatorio". La longitud media de secuencia del monómero afectará a las propiedades termo-y mecánicas del copolímero.

Resultados:

Los copoliésteres segmentados de fase separada con estructura (ab)_n que consiste en una fase dura de poli- ϵ -caprolactona y una fase blanda de poli (DL-lactida- ϵ -caprolactona) se han preparado con diversas relaciones de DL-lactida y ϵ -caprolactona. Se obtiene una distribución no aleatoria de lactida y ϵ -caprolactona: la secuencia del monómero se determina por las de los bloques de construcción individuales. Una pequeña parte del prepolímero de poli (ϵ -caprolactona) es amorfa y está presente en la fase de poli amorfo (lactida- ϵ -caprolactona); la mayor parte de la poli- ϵ -caprolactona está presente como la fase dura cristalina. El grado de mezclado de fase y las propiedades del polímero dependen de la longitud de cadena del pre-polímero y la proporción.

La separación de fases se produce por encima de un cierto umbral del contenido de fase dura. El contenido al cual se forma la fase dura (cristalización) se relaciona con el peso molecular (longitud de cadena) del pre-polímero (s). Los poliésteres segmentados basados en segmentos duros de PCL (poli- ϵ -caprolactona) y segmentos blandos de lactida- ϵ -caprolactona y con Mn=2000 del segmento blando que forma el pre-polímero muestran una buena separación de fases con un contenido del pre-polímero de 40-45 % de la fase dura del segmento PCL duro con Mn=2000, 33% de un pre-polímero con Mn=3000, y 28% de un pre-polímero con Mn=4000, respectivamente. Los segmentos más largos de PCL resultan en una mejor separación de fases que comienza a menor concentración. Los efectos de la composición de los copolímeros segmentados sobre el grado de separación de fases se aclaran por las propiedades mecánicas y térmicas. Las figuras 2-6 muestran las diferencias en las propiedades térmicas y la distribución de monómero de co-poliésteres segmentados con una longitud del segmento blando del pre-polímero de 2000 y una longitud del segmento duro del pre-polímero de 2000 (cap2000), 3000 (cap3000) y 4000 (cap4000), respectivamente. Además, se muestran las propiedades del poli (DL-lactida- ϵ -caprolactona) aleatorio preparado a 120 °C durante 5 días. La temperatura de transición vítrea (T_g) del segmento blando en cap3000 y cap4000 es mayor que en cap2000 con una proporción del monómero similar (figura 2): la fase amorfa de cap3000 y cap4000 contiene menos PCL amorfa que la de cap2000, debido a una mejor separación de fases. Ambos son más altos que los valores de T_g de los copolímeros aleatorios con una composición de monómero similar. Además, cuanto mayor sea el contenido de ϵ -caprolactona dentro de un intervalo del copolímero con la misma longitud de PCL, menor será la T_g, en parte debido a la mezcla de la PCL amorfa con el segmento blando. En el caso de cap2000 y cap4000, la T_g del copolímero con un contenido bajo de PCL (23% y 19% w/w, respectivamente) es casi tan baja como la T_g medida en la segunda corrida, donde el copolímero es completamente amorfo. En general, en la segunda corrida DSC, la T_g disminuye con el contenido de ϵ -caprolactona y es independiente de la distribución del monómero (segmentado o aleatorio).

Los puntos de fusión del segmento duro (T_m) se muestran en la Figura 3. El punto de fusión (máximo del pico de fusión) aumenta con el contenido de ϵ -caprolactona y es más alto para la serie de cap3000 con un valor máximo en un contenido de ϵ -caprolactona de aproximadamente 75%. Un copolímero de cap4000 con un contenido de caprolactona de 67.4% tiene un punto de fusión mucho más alto que el copolímero de cap3000 con una composición de monómero similar. Este es el resultado de una mejor separación de fases del segmento más largo de PCL. Los puntos de fusión con el mayor contenido de ϵ -caprolactona dentro de la serie de cap3000 son algo más bajos de lo esperado, probablemente causado por la separación incompleta de fases. Las temperaturas de fusión de los copolímeros segmentados con un gran contenido de ϵ -caprolactona son sólo un poco menor que los del pre-polímero de PCL (58-60 °C) y de PCL con Mn = 80000, que tiene un punto de fusión de 63 °C. Los puntos de fusión de los copolímeros aleatorios son mucho más bajos (42-44 °C) que los de los copolímeros segmentados y son además mucho más amplios (la aparición del pico de fusión comienza a 25-30 °C). Esto demuestra que hay una mejor separación de fases en los copolímeros segmentados que en los copolímeros aleatorios. En la segunda corrida DSC, las temperaturas de fusión de los copolímeros segmentados son más bajas (40-45 °C), debido a la separación incompleta de fases. La re-cristalización no se produce a contenidos más bajos de ϵ -caprolactona: los copolímeros cap4000 comienzan a recristalizar a un contenido menor de ϵ -caprolactona que en los copolímeros cap3000 y cap2000. Por lo tanto, el tiempo de cocción debe ser lo suficientemente largo para obtener la separación completa de fases. Las temperaturas de fusión de los copolímeros aleatorios además son mucho más bajas (38-40 °C) o están ausentes en la segunda corrida. Estos resultados son comparables a los encontrados en la literatura (Lemmouchi y otros, Hiljanen-Vainio y otros)

La figura 4 muestra la entalpía de fusión (ΔH) de los tres copolímeros segmentados y del copolímero aleatorio en

comparación con el contenido de ϵ -caprolactona. Las entalpías de fusión de los copolímeros de cap3000 y cap4000 son mayores y aumentan, ambos con la misma tendencia, casi linealmente con el aumento del contenido ϵ -caprolactona. Un mayor contenido de ϵ -caprolactona conduce a una mayor entalpía de fusión y por lo tanto a un mayor grado de cristalinidad (como referencia, la entalpía de fusión de los pre-polímeros PCL es de aproximadamente 100 J/g).

5

La entalpía de fusión de los copolímeros aleatorios no depende linealmente del contenido de ϵ -caprolactona. De hecho, está relacionada linealmente con la longitud media de la secuencia del monómero de ϵ -caprolactona, L_{Cap} . La figura 5 muestra esta relación para los copolímeros aleatorios y segmentados. Claramente, los copolímeros cap3000 y cap4000 muestran mayores entalpías de fusión que el cap2000 y los copolímeros aleatorios, a una longitud media de la secuencia de ϵ -caprolactona similar. En la figura. 6 se muestra que dentro de la serie de cap2000, cap3000 y cap4000, L_{Cap} se incrementa con el contenido ϵ -caprolactona, siendo la relación independiente de la longitud de PCL. Sin embargo, este no es el caso de los copolímeros aleatorios. La distribución de monómeros se determina por las condiciones de polimerización. Todos los copolímeros aleatorios se preparan a un mismo tiempo de polimerización y temperatura, pero con diferentes concentraciones del catalizador. Una menor concentración de catalizador resulta en mayores longitudes de secuencia del monómero y por lo tanto, se produce más cristalización. Los copolímeros segmentados se preparan mediante la mezcla de dos pre-polímeros: la longitud media de la secuencia de ϵ -caprolactona se puede aumentar mediante la adición de más pre-polímero PCL. Mediante este método, la longitud media de la secuencia de la lactida no cambia y será constante dentro de una serie de copolímero (no mostrado). Esto significa que durante el corto tiempo de extensión de cadena, no se produce ninguna reacción de transesterificación y las propiedades finales del polímero sólo dependen de las propiedades del pre-polímero.

10

15

20

En cuanto a las propiedades térmicas, los copolímeros segmentados son más adecuados para aplicaciones biomédicas que los copolímeros aleatorios. Dependiendo del tipo de aplicación, la proporción de monómero se puede cambiar mientras se mantienen las mismas propiedades térmicas (y mecánicas) simplemente cambiando la longitud de los pre-polímeros.

25

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los copolímeros segmentados son dependientes del grado de separación de fases y, por tanto, del grado de cristalinidad. Como un ejemplo, se muestra en la figura 7, el comportamiento de tensión-deformación de los co-poliésteres segmentados con el pre-polímero de PCL con $M_n=3000$. La tensión en un cierto grado de elongación (por ejemplo, 400%) aumenta con el contenido de PCL, siendo este el módulo. La resistencia a la tracción, además, depende de la cantidad de cristalización inducida por deformación, que se produce cuando el PCL amorfo comienza a cristalizar como resultado de la orientación. La figura 8 presenta la relación entre el módulo inicial y el contenido de ϵ -caprolactona: el módulo de la PCL3000 que contiene al copolímero es mayor que el de la PCL2000 que contiene al copolímero con el mismo contenido ϵ -caprolactona, como resultado del mayor grado de cristalinidad (entalpía de fusión) del primero. El módulo de los copolímeros aleatorios es variable según el contenido de ϵ -caprolactona y puede ser tan alto como el de los copolímeros segmentados. De hecho, el módulo está relacionado con la longitud media de la secuencia del monómero, L_{Cap} , una propiedad que puede ser modificada mediante la variación de las condiciones de polimerización. En general, el módulo está relacionado con la longitud media de la secuencia del monómero, L_{Cap} , de la misma manera como la entalpía de fusión como se ha mostrado en la figura 5 Aunque, desde un punto de vista mecánico, los copolímeros aleatorios pueden ser tan buenos como los copolímeros segmentados, las propiedades térmicas son inferiores a las de los copolímeros segmentados.

30

35

40

El módulo de los co-poliésteres segmentados puede ser mucho mayor que el de los copolímeros amorfos, ricos en lactida (por ejemplo, poli (DL-lactida- ϵ -caprolactona) con una proporción de monómero 50:50 tiene un módulo elástico de 1-2 MPa). Por lo tanto, copolímeros segmentados, incluso con un contenido más bajo de ϵ -caprolactona, se pueden procesar en materiales con un módulo alto. Para una aplicación tal como una guía de nervio artificial para reducir las diferencias de los nervios largos, se requiere un módulo que sea lo suficientemente alto para evitar la compresión del nervio guía. Esto se puede lograr mediante el uso de co-poliésteres segmentados.

45

50

Ejemplo 8

En este ejemplo se sintetizaron diversos copolímeros multibloque biodegradables de fases separadas y se evaluaron para su procesamiento y características de liberación controlada. Los polímeros se componen de un segmento duro hidrofóbico basado en ϵ -caprolactona-cristalina con un punto de fusión (T_m) y un segmento hidrofílico basado en polietilenglicol (PEG) que tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) que estaba por debajo de la temperatura del cuerpo en condiciones fisiológicas.

55

Materiales y métodos

Síntesis de prepolímeros para el segmento duro

5 El pre-polímero de Poli (ϵ -caprolactona) ($M_n = 4000$) se sintetizó como sigue: La ϵ -caprolactona (Acros, Bélgica) se secó sobre CaH_2 y se destiló bajo presión reducida en una atmósfera de nitrógeno. 158.58 gramos (1.39 moles) de ϵ -caprolactona destilada se introdujeron en un frasco de tres bocas, en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 3,66 gramos (42,1 mmol) de 1,4-butanodiol (Acros, destilado a partir de tamices moleculares 4Å después de secado durante 8 horas). Se añadió 54.7 mg de octoato de estaño (Sigma Corp) (relación molar de monómero / catalizador=10600). La mezcla se agitó magnéticamente y se hizo reaccionar a 140 °C durante 71 horas. La 1H -RMN mostró un 99,8% de conversión del monómero. El peso molecular calculado (M_n) a partir de los pesos fue de 3990 El peso molecular no se pudo determinar por 1H -NMR, dado que los picos de BDO se solapan con los picos de CL.

Síntesis de prepolímeros para el segmento hidrofílico

15 El pre-polímero Poli (ϵ -caprolactona-co-poli(etilenglicol 1500) ($M_n = 2000$) se sintetizó como sigue: 62.68 gramos (0.549 mol) de ϵ -caprolactona (ver el ejemplo 1 para la purificación) se introdujo en un frasco de tres bocas en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 189.70 gramos (0.126 mmoles) de poli(etilenglicol 1500 MW. El PEG se había secado el día antes de la síntesis durante 17 horas a 90 °C bajo vacío. Se añadió 23.8 mg de octoato de estaño (Sigma Corp) (relación molar de monómero/catalizador = 11500). La mezcla se agitó magnéticamente y se hizo reaccionar a 130 °C durante 164 horas. La 1H -RMN mostró un 99.5% de conversión de monómero. El peso molecular calculado (M_n) a partir de los pesos fue 2000. El análisis con 1H -RMN mostró un M_n de 1987, lo cual concuerda bien con el peso molecular a partir de los pesos. El análisis MDSC mostró una T_m de 46.3 °C, atribuida a la cadena cristalina del PEG. Nótese que la medición fue desarrollada en condiciones secas. En agua el PEG es amorfo.

25 El pre-polímero poli (DL-lactida-co-poli(etilenglicol 1500) ($M_n = 2000$) se sintetizó como sigue: 82,48 gramos (0,572 moles) de D, L-lactida se introdujo en un frasco de tres bocas bajo atmósfera de nitrógeno y se secó a 50 °C durante 16 horas bajo vacío. Se añadieron 245,45 gramos (0,164 mmoles) de poli(etilenglicol 1500 MW. El PEG se había secado el día antes de la síntesis durante 17 horas a 90 °C bajo vacío. Se añadió 24,1 mg de octoato de estaño (Sigma Corp) (relación molar de monómero / catalizador = 12.400).. La mezcla se agitó magnéticamente y se hizo reaccionar a 130 °C durante 188 horas. La 1H -RMN mostró un 94.4% de conversión del monómero. El peso molecular calculado (M_n) a partir de los pesos fue 2.000. El análisis con 1H -RMN mostró un M_n de 1.842, lo que concuerda razonablemente bien con el peso molecular teórico de 1972 basado en los pesos y en la conversión del monómero. El análisis MDSC mostró una T_m de 32,72 °C, atribuida a la cadena de PEG cristalina y una T_g de -29,7 °C, atribuido a una fase amorfa que consiste en poli (D, L-lactida) y PEG. Nótese que la medición fue desarrollada en condiciones secas. En el agua, el PEG es amorfo.

Síntesis de copolímeros multibloque

40 Los copolímeros multibloque se sintetizaron según el siguiente procedimiento general: El pre-polímero de PCL (M_n 4000) y ϵ -caprolactona-co-PEG-co-E-caprolactona o D, L-lactida-co-PEG-co-D, L-lactida pre-polímero (M_n 2000) fueron previamente calentados a 70 °C hasta que se convirtieron más líquido. Las cantidades apropiadas de los dos pre-polímeros se pesaron en una ampolla de vidrio suministrada con entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. El 1,4-dioxano (Acros, destilado sobre sodio) se añadió a una concentración del polímero de 30% en peso y el contenido de la ampolla se calentó a 80 °C para disolver los prepolímeros. Se añadió 0,990 equivalente (con respecto a los grupos hidroxilo del prepolímero) de 1,4-butanodisocianato (Bayer, destilado a presión reducida) y la mezcla de reacción se agitó mecánicamente durante 20-22 horas. El dioxano no-destilado se añadió a una concentración del polímero de 20% en peso para desactivar los grupos isocianato sin reaccionar. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con dioxano no destilado a una concentración del polímero de 10% en peso. La ampolla se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en una bandeja y se congeló a -18 °C. Posteriormente, se eliminó el dioxano mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada bajo vacío a 30 °C. El polímero se almacena en un paquete sellado a -18 °C. Una pequeña parte del lote se analizó para determinar las propiedades térmicas (MDSC), contenido de dioxano (cromatografía de gases), viscosidad intrínseca y la composición de polímero (1H -NMR).

55 30(ϵ -caprolactona-co-PEG₁₅₀₀- ϵ -caprolactona)₂₀₀₀-*b*-70(ϵ -caprolactona)₄₀₀₀ (30CLPEG15CL20-*b*-CL40) fue sintetizado como sigue: 18.91 gramos del pre-polímero de PCL (M_n 3990, 4.74 mmol) y 8.00 gramos de pre-polímero de ϵ -caprolactona -co-PEG₁₅₀₀- ϵ -caprolactona (M_n 2000, 4.00 mmol) se introducen en un frasco de tres bocas bajo atmósfera de nitrógeno. El frasco de tres bocas se suministra con una entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. Se añadieron 45 ml de 1,4-dioxano y la mezcla se calentó a 80 °C para disolver los prepolímeros. Se añadieron 1,2276 gramos (8,76 mmoles) de 1,4-butanodisocianato (1,002 equivalentes con respecto a los grupos hidroxilo del prepolímero) y 20 ml de 1,4-dioxano se

utilizaron para enjuagar la botella de 1,4-diisocianato para la adición cuantitativa del 1,4-butanodiisocianato. La concentración del polímero final fue de 30% en peso. La mezcla de reacción se agitó mecánicamente durante 20 horas. se añadieron 44 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración de polímero de 20% en peso para desactivar los grupos isocianato sin reaccionar. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con 137 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración de polímero de 10% en peso. El frasco de tres bocas se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en bandeja y se congeló primero a 4 °C y posteriormente a -18 °C. Posteriormente, el dioxano se eliminó mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada bajo vacío a 30 °C . El polímero se almacena en un paquete sellado a -18 °C. Una pequeña parte del lote se analizó para determinar las propiedades térmicas (MDSC), contenido de dioxano (cromatografía de gases) viscosidad intrínseca y la composición de polímero (¹H-RMN).

El 50(ε-caprolactona-co-PEG₁₅₀₀-ε-caprolactona)₂₀₀₀-b-50(ε-caprolactona)₄₀₀₀ (50CLPEG15CL20-b-CL40) se sintetizó como sigue: 25,33 gramos de PCL pre-polímero (Mn 3990, 6,35 mmol) y 24,50 gramos de ε-caprolactona-co-PEG1500-ε-caprolactona pre-polímero (Mn 2000, 12,3 mmol) se introdujeron en un frasco de tres bocas, en atmósfera de nitrógeno . El frasco de tres bocas se suministra con una entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. Se añadieron 95 ml de 1,4-dioxano y la mezcla se calentó a 80 °C para disolver los prepolímeros. Se añadieron 2,6052 gramos (18,59 mmol) de 1,4-butanodiisocianato (1,000 equivalentes con respecto a los grupos hidroxilo del prepolímero) y 20 ml de 1,4-dioxano se utilizaron para enjuagar el frasco de 1,4-diisocianato para la adición cuantitativa del 1,4-butanodiisocianato. La concentración final del polímero fue de 30% en peso. La mezcla de reacción se agitó mecánicamente durante 20,5 horas. se añadieron 85 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 20% en peso para desactivar los grupos isocianato sin reaccionar. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con 240 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 10% en peso El frasco de tres bocas se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en bandeja y se congeló primero a 4 °C y posteriormente a -18 °C. Posteriormente, el dioxano se eliminó mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada bajo vacío a 30°C. Posteriormente, el dioxano se eliminó mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada bajo vacío a 30 °C . El polímero se almacena en un paquete sellado a -18 °C. Una pequeña parte del lote se analizó para determinar las propiedades térmicas (MDSC), contenido de dioxano (cromatografía de gases) viscosidad intrínseca y la composición de polímero (¹H-RMN).

El 70(ε-caprolactona-co-PEG₁₅₀₀-ε-caprolactona)₂₀₀₀-b-30(ε-caprolactona)₄₀₀₀ (70CLPEG15CL20-b-CL40) se sintetizó como sigue: 13,93 gramos del pre-polímero : PCL (Mn 3990, 3.49 mmol) y 32.74 gramos del pre-polímero ε-caprolactona -co-PEG₁₅₀₀-ε-caprolactone (Mn 2000, 16.37 mmol) se introdujeron en un frasco de tres bocas, en atmósfera de nitrógeno. El frasco de tres bocas se suministra con una entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. Se añadieron 92 ml de 1,4-dioxano y la mezcla se calentó a 80 °C para disolver los prepolímeros. Se añadieron 2,6298 gramos (18,77 mmol) de 1,4-butanodiisocianato (0,946 equivalentes con respecto a los grupos hidroxilo del prepolímero) y 20 ml de 1,4-dioxano se utilizaron para enjuagar la botella de 1,4-diisocianato para la adición cuantitativa del 1,4-butanodiisocianato. La concentración final del polímero fue de 30% en peso. La mezcla de reacción se agitó mecánicamente durante 20 horas. Se añadieron 79 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 20% en peso para desactivar los grupos isocianato sin reaccionar. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con 240 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 10% en peso. El frasco de tres bocas se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en bandeja y se congeló primero a 4 °C y posteriormente a -18 °C. Posteriormente, el dioxano se eliminó mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada bajo vacío a 30 °C. El polímero se almacena en un paquete sellado a -18 °C. Una pequeña parte del lote se analizó para determinar las propiedades térmicas (MDSC), contenido de dioxano (cromatografía de gases) viscosidad intrínseca y la composición de polímero (¹H-RMN).

El 50(D,L-lactida-co-PEG₁₅₀₀-D,L-lactida)₂₀₀₀-b-50(ε-caprolactona)₄₀₀₀ (50LAPEG15LA20-b-CL40) se sintetizó como sigue: 23,49 gramos del pre-polímero PCL (Mn 4000, 5.87 mmol) y 23,37 gramos de pre-polímero D, L-lactida-co-PEG1500-D, L-lactida G₁₅₀₀-D,L- (Mn 2000, 11.7 mmol) se introdujeron en un frasco de tres bocas bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron 117 ml de 1,4-dioxano para obtener una concentración del polímero de 28% en peso y el contenido del frasco de tres bocas se calentó a 80 °C para disolver los prepolímeros. El frasco de tres bocas se suministra con una entrada de nitrógeno y un agitador mecánico. Se añadieron 2,4325 gramos (17,4 mmoles) de 1,4-butanodiisocianato (0,989 equivalentes con respecto a los grupos hidroxilo del prepolímero) y luego se agitó mecánicamente durante 21 horas. Se añadieron 85 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 18% en peso para desactivar los grupos isocianato sin reaccionar. La mezcla de reacción se diluyó adicionalmente con 227 ml de dioxano no destilado para obtener una concentración del polímero de 9,6% en peso. La ampolla se enfrió a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en bandeja y se congela primero a 4 °C y posteriormente a -18 °C. Posteriormente, el dioxano se eliminó mediante la colocación de la mezcla de reacción congelada al vacío a 30 °C. El polímero se almacena en un paquete sellado a -18 °C. Una pequeña parte del lote se analizó para determinar las propiedades térmicas (MDSC), contenido de dioxano (cromatografía de gases) viscosidad intrínseca y la composición de polímero (¹H-RMN).

Caracterización de copolímeros multi bloque

5 *Calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC):* 5-15 mg de muestra se pesó en una bandeja de DSC. Las mediciones se realizaron en un Q1000 DSC (TA Instruments) usando un programa de temperatura modulada. La amplitud se establece en 1 °C, el período de modulación a 60 s, y la velocidad de calentamiento de 5 °C / min. Las muestras se calentaron de -80 °C a 200 °C. Las muestras se realizaron una vez o por duplicado. En caso de mediciones duplicadas, se registraron los resultados promedio

10 ¹*Resonancia Magnética Nuclear-H:* La ¹H-RMN se realizó en una máquina Unidad VXR Plus RMN (Varian) que opera a 300 MHz (Varian). El tiempo de espera d_1 se establece en 20 segundos, y el número de barridos fue 16-32. Los espectros se registraron de 0 a 14 ppm. Las muestras ¹H-NMR se prepararon disolviendo 10 mg del polímero en 1 ml de cloroformo deuterado.

15 *Viscosidad intrínseca (IV):* La viscosidad intrínseca se midió usando un Viscosímetro Ubbelohde (DIN), tipo 0C, 0a o I, Schott Geräte suministrado con un Viscosímetro Schott AVS-450 incluyendo un baño de agua. Las mediciones se realizaron en cloroformo a temperatura ambiente. La concentración de polímero en cloroformo fue tal que la viscosidad relativa estaba en el rango de 1,2 a 2,0..

20 *Contenido de Dioxano:* El contenido de dioxano se determinó usando un método GC-FID de espacio de cabeza. Las mediciones se realizaron en un muestreador GC-FID Combi proporcionado con una columna Agilent, DB-624/30 m / 0,53 mm. Las muestras se prepararon en DMSO. El contenido de dioxano se determinó usando patrones de calibración de dioxano.

25 *Prueba de hinchamiento:* Las películas poliméricas se hicieron vertiendo una solución del polímero al 13% peso en diclorometano (DCM) (aprox. 300 mg del polímero con 1,5 ml de DCM), en una placa de vidrio y difundiendo la solución del polímero con un cuchillo de moldeo. El DCM se deja evaporar lentamente durante la noche y el DCM residual se remueve por secado al vacío a 20 °C. Las películas resultantes tenían un espesor de 100-200 µm. Para las pruebas de hinchamiento, 15-40 mg de películas circulares con un diámetro de aproximadamente 25 mm, se pesaron y se sumergieron en un matraz que contenía 10 ml de tampón fosfato pH 7,4 (ISO-15814). Las muestras se almacenaron en un horno a 37 °C. Para cada punto de muestreo iniciando desde t = 0, las películas se sacaron de la solución tampón. La solución tampón en la superficie de película se eliminó y la película se pesó en una balanza de 4 cifras. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Extrusión de copolímeros multibloque

35 *Implantes de pequeño diámetro del copolímero multibloque* CLPEG15CL20-b-CL40 se prepararon por extrusión de pequeñas cantidades del copolímero a temperaturas que varían desde 40 a 100 °C utilizando un extrusor Haake Minilab (Thermo Electron). Se registraron la velocidad de rotación del husillo, el torque y la temperatura. Los filamentos extrudidos se cortaron con un dispositivo de corte, se examinaron visualmente y analizados por sus características térmicas y viscosidad intrínseca

40 *Preparación de formulaciones depositarias con cargas de proteína*

45 *Para preparar películas cargadas de proteína,* 200 µl de una solución acuosa (200 mg/mL en agua) de una proteína (BSA o lisozima) se emulsiona en una solución del co-polímero multibloque en diclorometano (1,5 ml, concentración de polímero 13 % en peso) utilizando un mezclador Ultraturrax (30 s a 16 k rpm). Las películas del polímero se prepararon por procedimientos de colada con disolvente y secado al vacío como se usa para la preparación de películas para la prueba de hinchamiento.

50 *Para la preparación de microesferas,* se utilizaron dos métodos, un método estándar de evaporación de disolvente y un método de evaporación del disolvente a base de emulsificación de membrana. La preparación de microesferas utilizando la evaporación estándar de disolvente se preparó usando los procedimientos descritos por Kissel y otros, J. Controlled Release 39 (1996) p. 315-326 y Meinel y otros, J. Controlled Release 70 (2001) p. 193-202. Los copolímeros multibloque se disolvieron en diclorometano a concentraciones de típicamente 15% p / v..

55 *Para la preparación de microesferas cargadas de proteína,* se preparó primero una emulsión de agua-en-aceite.. La proteína (BSA o lisozima) se disolvió en agua a una concentración de aproximadamente 150 mg / ml, y 0,15 ml de la solución de proteína se añadió a una solución de aproximadamente 0,5 g del polímero en 2 ml de diclorometano. Esta mezcla se homogeneizó durante 60 segundos utilizando un Ultraturrax de IKA T18 funcionando a 20.000 rpm produciendo una emulsión agua-en-aceite (W / O). La emulsión W / O se añadió posteriormente a 60 ml de una solución acuosa que contiene

4% p/ v de PVA y se emulsionó durante 30 segundos utilizando un Ultraturax de IKA T18 operado a 14.000 rpm produciendo una emulsión agua-en aceite-en agua (W / O / W). La emulsión obtenida W / O / W se agitó suave mecánicamente. Debido a la evaporación del diclorometano, el polímero precipita de la solución para producir microesferas. Después de 3 horas (el tiempo necesario para alcanzar la evaporación casi completa del diclorometano) las microesferas formadas se recogieron por centrifugación, se lavó con agua (3 veces) y finalmente se liofilizaron.

Para la preparación de microesferas monodispersas por el método de evaporación de disolvente a base de emulsificación de membrana fueron utilizados métodos similares con la diferencia de que ahora la emulsión de agua-en-aceite de la proteína y el polímero se colocó en un recipiente que contiene una membrana con poros de tamaño idéntico de aprox. 11 micrómetros. La emulsión W / O se forzó a través de la membrana por aplicación de presión y se introduce en una solución acuosa agitada que contiene 4% p / v de PVA. Después de 3 horas se colectaron las microesferas monodispersas formadas y se trataron adicionalmente como se describe anteriormente.

Para la preparación de los implantes cargados de proteína, una mezcla de 1 a 20% p / p proteínas y 80-99% p/p del copolímero multibloque CLPEG15CL20-b-CL40 se suministraron a la extrusora y se extrude a temperaturas que varían de 40 a 100 °C, como se ha descrito anteriormente. Las hebras extruidas se cortaron con un dispositivo de corte.

Para la medición de la liberación de proteína a partir de las formulaciones depósito, 15-25 mg de muestras cargadas de proteínas (películas, microesferas o implantes) se pesaron y se sumergieron en un matraz que contenía 5 ml de tampón fosfato pH 7,4 (ISO-15814). Las muestras se conservaron en un horno a 37 °C. En cada punto de muestreo se toma 1 ml de sobrenadante y se refresca mediante 1 ml del tampón fosfato. El contenido de proteína en las muestras se determinó con un ensayo de BCA usando un lector de placas de 96 pocillos Easys de Expert.

Resultados

Caracterización de los copolímeros multibloques

Los copolímeros multibloque sintetizados fueron analizados para su composición química, peso molecular y contenido de dioxano residual. La Tabla 6 muestra los resultados de los análisis colectados para copolímeros de múltiples bloques 30CLPEG15CL20-b-CL40, 50CLPEG15CL20-b-CL40, 70CLPEG15CL20-b-CL40 y 50LAPEG15LA20-b-CL40. La composición real de los copolímeros, como se determina por ¹H RMN a partir de la proporción de CL/PEG se parece a la composición objetivo. Todos los polímeros tienen una viscosidad intrínseca entre 0.4 and 1.5. Los contenidos de dioxano fueron inferiores a 1000 ppm que indican una remoción efectiva de dioxano mediante secado al vacío.

Tabla 6: Resultados colectados con respecto a la composición química, la viscosidad intrínseca y el contenido de dioxano residual de copolímeros multibloque 30CLPEG15CL20-*b*-CL40, 50CLPEG15CL20-*b*-CL40, 70CLPEG15CL20-*b*-CL40 y 50LAPEG15LA20-*b*-CL40.

	30CLPEG15CL20-<i>b</i>-CL40	50CLPEG15CL20-<i>b</i>-CL40	70CLPEG15CL20-<i>b</i>-CL40	50LAPEG15LA20-<i>b</i>-CL40
Relación molar LA/PEG en-pesos	N.A.	N.A.	N.A.	7.0
Relación molar LA/PEG ¹ H-NMR	N.A.	N.A.	N.A.	6.2
Relación molar CL/PEG en-pesos	47.0	22.1	11.7	17.2
Relación molar CL/PEG ¹ H-NMR	43.4	20.8	11.9	17.2
Viscosidad Intrínseca (dL/g)	0.69	0.74	1.45	0.43
Contenido de dioxano (ppm)	< 1000	< 200	< 200	< 200

Se analizaron los copolímeros multibloque sintetizados por sus propiedades térmicas para confirmar su morfología de fases separadas. La figura 9 muestra termogramas DSC típicos de 50CLPEG15CL20-*b*-CL40 y copolímeros multibloque 50LAPEG15LA20-*b*-CL40. Todos los copolímeros multibloque exhibieron dos temperaturas de fusión (T_m) distintas. Los copolímeros exhiben una T_m de aproximadamente 52 a 56 °C, que representa la temperatura de fusión de la poli (ϵ -caprolactona) y una T_m significativamente menor entre 10 y 30 °C que representa el segmento cristalino de polietilenglicol del prepolímero (A). Como era de esperar, la entalpía de fusión de la poli (ϵ -caprolactona) cristalina aumenta con el aumento de la cantidad del segmento de poli (ϵ -caprolactona), mientras que la entalpía de fusión del segmento de polietilenglicol cristalino del prepolímero (A) disminuyó linealmente con el aumento de la cantidad del segmento de poli (ϵ -caprolactona). Los datos muestran claramente la morfología de las fases separadas de los copolímeros. Para todos los copolímeros multi- bloques se encontró una temperatura de transición vítrea (T_g) de alrededor de -50 a -60 °C.

Tabla 7: Características térmicas de los copolímeros multibloque 30CLPEG15CL20-*b*-CL40, 50CLPEG15CL20-*b*-CL40, 70CLPEG15CL20-*b*-CL40 y 50LAPEG15LA20-*b*-CL40.

	30CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	50CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	70CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	50LAPEG15LA20- <i>b</i> -CL40
T_g (°C)	-58.5	-57.8	-57.2	-52.5
T_m (°C)	11.4/55.1	22.8/54.3	25.5/52.4	21.2/55.8
ΔH_m (J/g)	11.7/68.5	30.0/56.7	47.4/28.2	35.1/39.9

La Tabla 8 muestra el grado de hinchamiento de los copolímeros multibloques. Se encontró que el grado de hinchamiento se incrementa gradualmente con el contenido de polietilenglicol de los copolímeros.

Tabla 8: Composición e hinchamiento de copolímeros multibloque 30CLPEG15CL20-*b*-CL40, 50CLPEG15CL20-*b*-CL40 y 50LAPEG15LA20-*b*-CL40.

	% en peso Segmento A	% en peso Segmento B	MW PEG	% en peso PEG	Grado de hinchamiento (-)
30CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	30	70	1500	22.5	1.20
50CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	49	51	1500	37.5	1.45
70CLPEG15CL20- <i>b</i> -CL40	70	30	1500	52.5	1.80

Extrusión de copolímeros multibloque

Se prepararon implantes de pequeño diámetro de copolímeros multibloque CLPEG15CL20-*b*-CL40 CLPEG15CL20-*b*-CL40. Sorprendentemente, a pesar del carácter cristalino de los polímeros, su temperatura de fusión de 50-55 °C, y su relativamente alta viscosidad intrínseca, los polímeros pueden ser extruidos fácilmente a través de una pequeña matriz con diámetro de aproximadamente 0.5 mm a una temperatura tan baja como 40 °C y a un torque y velocidad de rotación aceptables. La hebra obtenida, la cual forma una hebra transparente e incolora a la salida de la matriz se vuelve opaca después de unos segundos, que ilustra una cristalización inducida por enfriamiento del polímero fundido. Debido a su flexibilidad, la hebra puede ser fácilmente cortada con un dispositivo de corte sin formación de desechos, lo cual es típicamente encontrado cuando se cortan hebras poliméricas rígidas tales como hebras extruidas compuestas de PLGA. La capacidad de extrusión de los polímeros a temperaturas tan bajas hace que estos polímeros sean especialmente adecuados para la incorporación de compuestos activos termosensibles y lábiles, tales como péptidos y proteínas biológicamente

activas Por otra parte, la formación de una matriz polimérica semi-cristalina con una T_m de 50-55 °C ofrece suficiente estabilidad del producto durante el almacenamiento.

Liberación de polipéptidos de las películas

5 Las Figuras 10 y11 muestran la liberación de lisozima y BSA, respectivamente, a partir de copolímeros multibloque 30CLPEG15CL20-b-CL40, 50CLPEG15CL20-b-CL40, 70CLPEG15CL20-b-CL40s. Los resultados muestran claramente que la velocidad a la que los polipéptidos se liberan de las matrices de polímero aumenta con el aumento del contenido de PEG y el grado de hinchamiento. Sorprendentemente, la liberación de BSA a partir de copolímeros multibloque 50CLPEG15CL20-b-CL40 y 70CLPEG15CL20-b-CL40 fue completamente lineal durante largos períodos de tiempo de hasta 10 más de 200 días para 50CLPEG15CL20-b-CL40.

Ejemplo 9

15 Este ejemplo describe la preparación de implantes de pequeño diámetro que contienen lisozima mediante extrusión por fusión en caliente de mezclas de polvo de lisozima ya sea con 30CLP15CL20-b-C40 o poli (DL-lactida-co-glicolida) estándar con IV 0,4 dl/g, y el ensayo de la cinética de liberación *in vitro* de lisozima a partir de los productos extruidos.

Métodos

20 La lisozima liofilizada y 30CLP15CL20-b-C40 o PLGA5004 (relación proteína: polímero de 1: 9 p/p) fueron físicamente mezclados en un mortero utilizando una mano de mortero y se extrude a 55-60 °C. (30CLP15CL20-b-C40) o 95 °C. (PLGA5004) a través de un troquel de 0,5 mm usando una extrusora Haake MinilabII extrusora de doble tornillo (Rheomex CTW5, Thermo Scientific) que funciona a una velocidad de husillo de 10 a 15 rpm. El diámetro de la hebra se controló a 350 µm, usando un LaserMike en línea. Las hebras extruidas se colectan y se cortan en trozos uniformes de 10 mm longitud.

25 Para el contenido y el análisis de uniformidad del contenido, los productos extruidos se colectaron aleatoriamente en varios puntos de tiempo durante la ejecución de la extrusión y se extrajo la lisozima a partir de implantes individuales por disolución en acetato de etilo, seguido de la disolución del precipitado en PBS y el análisis de la lisozima por HPLC. Para la liberación *in vitro*, los implantes fueron incubados en 1,2 ml de PBS 100 mM, pH 7,4 a 37 °C en un baño de agua con agitación. En cada punto de muestreo, se remueve 1 mL de PBS y se refresca con PBS y el contenido de lisozima se determinó con 30 HPLC.

Resultados

35 Extruidos lisos con un diámetro de 350 µm se obtuvieron de la mezcla física de 30CLP15CL20-b-C40 y lisozima cuando se extrude como se describe anteriormente. La microscopía electrónica de barrido mostró sólo alguna rugosidad menor de la superficie (datos no mostrados).

40 El contenido de lisozima de los productos extruidos 30CLP15CL20-b-C40 según lo determinado por la extracción fue de 11,2 en peso, lo cual fue ligeramente superior a la carga objetivo (10,0 % peso). La baja desviación estándar indica que la mezcla de polvo se mezcló bien en la extrusora, que conduce a la uniformidad aceptable del contenido.

45 Las pruebas de liberación de lisozima *in vitro* a partir de los materiales extruidos muestran una liberación en ráfaga de aproximadamente 8% para ambos polímeros. Los Implantes basados en PLGA mostraron un patrón de liberación bifásica típico con un valor meseta casi sin lisozima liberada hasta 3 semanas. A las tres semanas la velocidad de liberación de lisozima aumentó debido a la degradación de la matriz de PLGA. Para 30CLP15CL20-b-C40 se obtuvo un perfil de liberación lenta pero continua produciendo una liberación acumulativa de alrededor del 50% a las 4 semanas (ver Fig. 12). Basándose en esta cinética de liberación y en base a la baja velocidad de degradación de 30CLP15CL20-b-C40, se puede lograr una liberación lenta pero continua de la lisozima que dura alrededor de 3-4 meses.

50

Referencias:

1. Solicitud de patente europea núm. 02075481.8 : Copolímeros de DL-lactida- ϵ -caprolactona.
- 5 2. C.G. Pitt, M.M. Gratzl, G.L. Kimmel, J. Surles y A. Schindler, The degradation of poly(D,L-lactide), poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers in vitro. *Biomaterials* 2 (1981) 215-220.
3. M. Malin, M. Hiljainen-Vainio, T. Karjalainen, J. Seppala, Biodegradable lactone copolymers II. Hydrolytic study of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 59 (1996) 1289-1298.
4. M. Hiljainen-Vainio, T. Karjalainen, J. Seppala, Biodegradable lactone copolymers.I. Characterisation and mechanical behaviour of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 59 (1996) 1281-1288.
- 10 5. Y. Lemmouchi, E. Schacht, P. Kageruka, R. De Deken, B. Diarra, O. Dially and S. Geerts, Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 19 (1998) 1827-1837.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición para la liberación controlada de al menos un polipéptido biológicamente activo que tiene un peso molecular igual o mayor que 10,000 en el hospedero, que comprende al menos un polipéptido biológicamente activo encapsulado en una matriz que comprende al menos un copolímero multibloque biodegradable, termoplástico y de fases separadas, donde el copolímero se caracteriza porque :
- 10 (i) comprende al menos dos segmentos hidrolizables seleccionados de un prepolímero (A) y un prepolímero (B), el prepolímero (A) tiene una Tg menor que 37°C y el prepolímero (B) tiene una Tm de 40°C - 100°C en condiciones del cuerpo humano;
- 15 (ii) el copolímero de fases separadas tiene al menos dos transiciones de fase, cada una de las cuales está relacionada con los valores correspondientes de Tg o Tm de los prepolímeros que están comprendidos en el copolímero;
- 20 (iii) el prepolímero (A) comprende productos de reacción de monómeros cíclicos seleccionados de glicolida, lactida, ε-caprolactona, δ-valerolactona, trimetilen carbonato, tetrametilencarbonato, 1,5-dioxepan-2-ona, 1,4-dioxan-2-ona (para-dioxanona) y/o anhídridos cíclicos tales como oxepan-2,7- diona; y en donde el prepolímero (A) contiene un segmento que se deriva de un polímero soluble en agua, preferentemente en donde dicho polímero soluble en agua se deriva de un diol, diamina o diácido;
- 25 (iv) un prepolímero (B) que comprende poli(ε-caprolactona) con un Mn de más de 3000;
- (v) segmentos que están enlazados mediante un extensor de cadena de diisocianato;
- (vi) los segmentos están aleatoriamente distribuidos a lo largo de la cadena polimérica; y
- (vii) dicho copolímero contiene poli(etilenglicol), como segmento del pre polímero (A) y/o como prepolímero adicional, y en donde dicho poli(etilenglicol)
- 30 a) tiene un peso molecular de 600 a 5000 g/mol, y
- b) está presente en una cantidad de 5 % en peso a 70 % en peso.
- 35 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho copolímero contiene poli(etilenglicol) como un segmento de prepolímero (A).
- 40 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de 1000 a 3000 g/mol.
- 45 4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el poli(etilenglicol) está presente en una cantidad de 10 % en peso a 50 % en peso.
- 50 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polímero soluble en agua es poli(etilenglicol) y está presente como un prepolímero adicional.
- 55 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en poliéteres tales como polietilenglicol (PEG), politetrametileno (PTMO) y polipropilenglicol (PPG); alcohol polivinílico (PVA) polivinilpirrolidona (PVP), polivinilcaprolactama, poli(hidroximetilmetacrilato) (poli-(HEMA)), polifosfacenos, poliortoésteres, poliortoésteramidas o copolímeros de los polímeros anteriores, preferentemente en donde dicho polímero soluble en agua se deriva de PEG con un peso molecular de 150-5000.
7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pre-polímero (A) comprende productos de reacción de lactida o ε-caprolactona.
8. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido biológicamente activo es un péptido biológicamente activo o una proteína biológicamente activa, preferentemente seleccionada de un grupo que consiste en fármacos proteína/péptido, enzimas, ligandos de receptores, neurotransmisores, péptidos inhibidores, péptidos reguladores, péptidos activantes, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos monoclonales, péptidos anti-tumorales , antibióticos, antígenos, vacunas y hormonas.
9. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha matriz se procesa en forma de microesferas, micropartículas, implante, recubrimiento, gel, film, lámina, hoja, varilla, o membrana, preferentemente en donde dicho procesamiento incluye extrusión o moldeo por inyección.

- 5
- 10
- 15
- 20
10. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha matriz se procesa mediante extrusión o moldeo por inyección a una temperatura de 20°C a 80°C, preferentemente entre 30°C y 60°C.
 11. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, en forma de un recubrimiento y en donde dicho recubrimiento se aplica como un recubrimiento de elución del fármaco en un implante médico, tal como una endoprótesis vascular o urinaria, una prótesis ortopédica o un implante ocular.
 12. Composición de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en forma de implante, preferentemente como implante inyectable.
 13. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en un método de suministro de polipéptido biológicamente activo de interés a un sujeto necesitado de este, el método comprende administrar una dosis efectiva de la composición a dicho sujeto.
 14. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha administración comprende administración parenteral, intra-arterial, intra-articular, intra-venal, intra-ocular, epidural, intratecal, intra-muscular o subcutánea de dicha composición, preferentemente donde dicha administración es intra-ocular, intra-muscular o subcutánea.
 15. Composición para usar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición esta en forma de microesferas, implante inyectable o gel formado *in situ*.

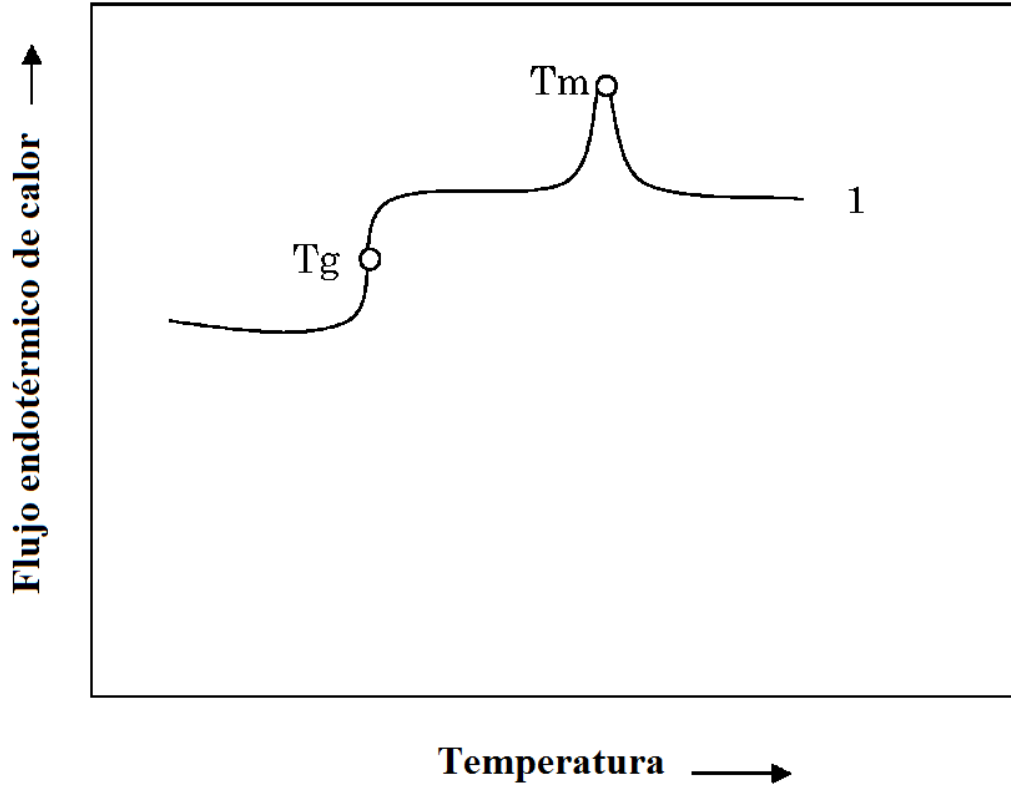


Fig. 1

Figura 2: Temperatura de transición vítrea contra contenido de caprolactona

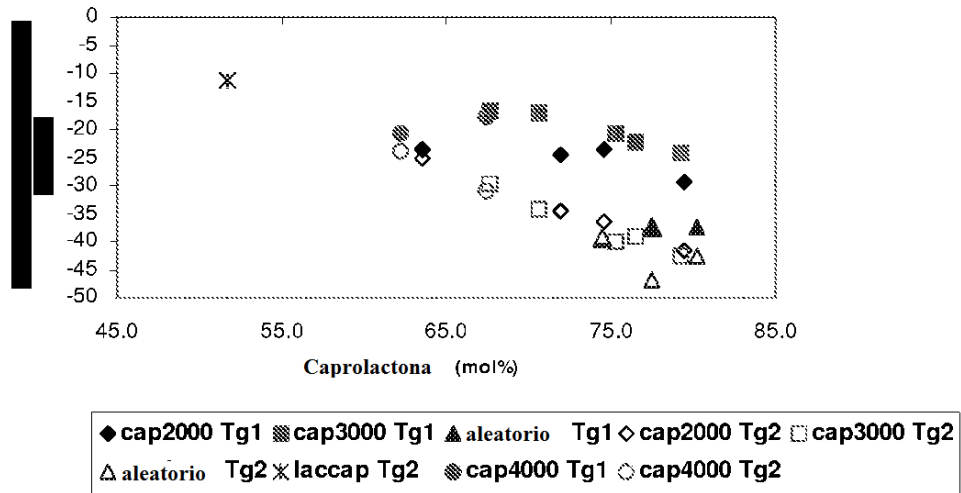


Figura 3: Temperatura de fusión contra contenido de caprolactona

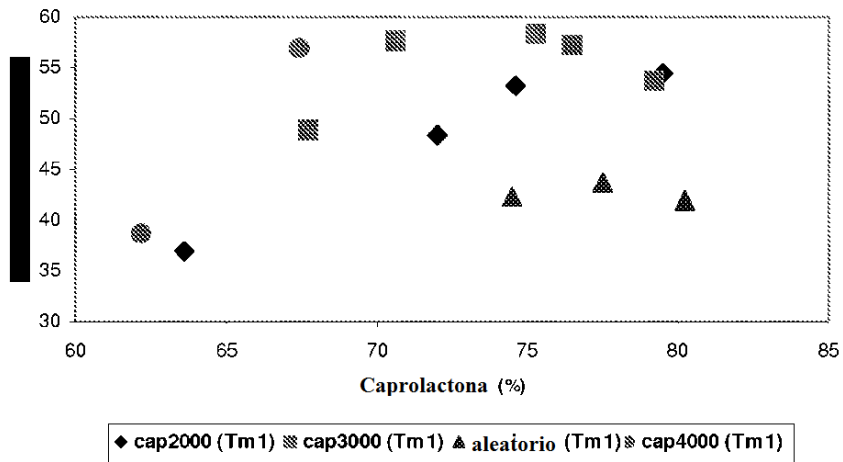


Figura 4: Entalpía de fusión contra caprolactona

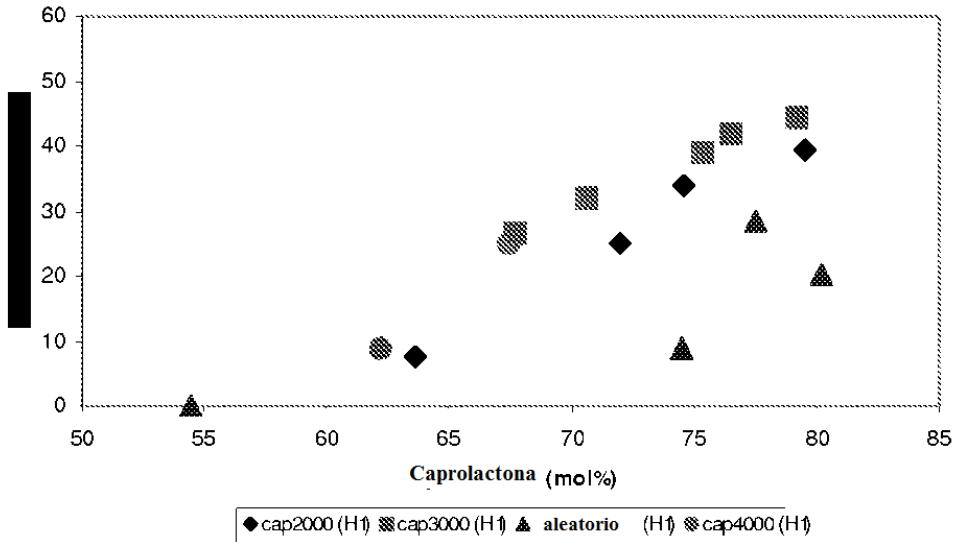


Figura 5: Entalpía de fusión contra longitud media de la secuencia

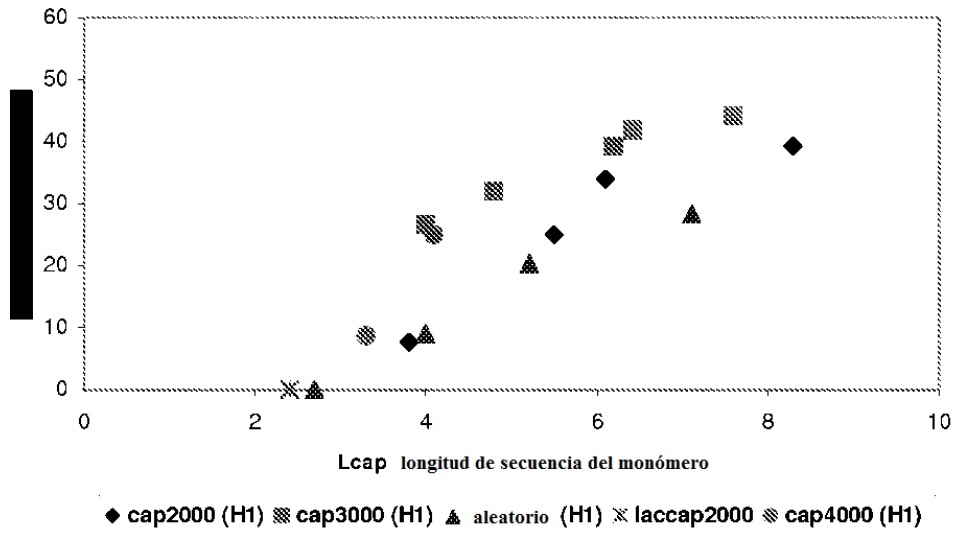


Figura 6: Longitud de fusión contra longitud media de la secuencia

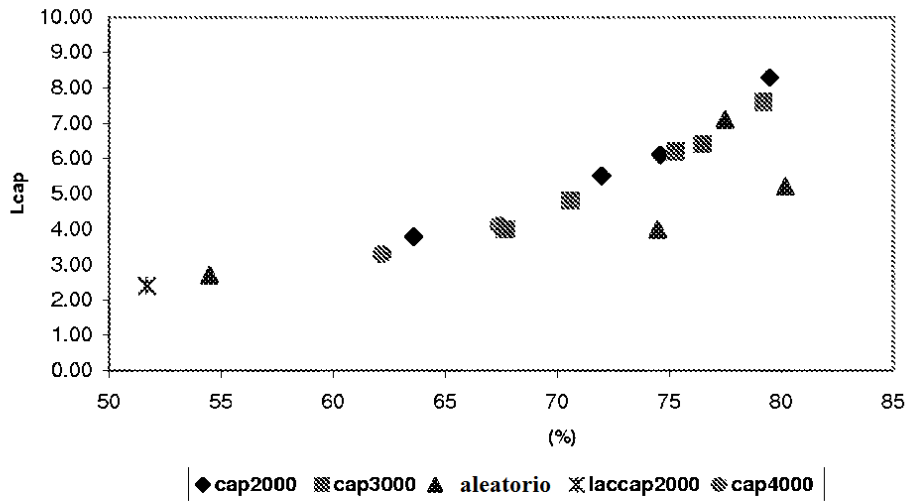


Figura 7: Tensión contra formación de copoliésteres con cap 3000 pre-polimero

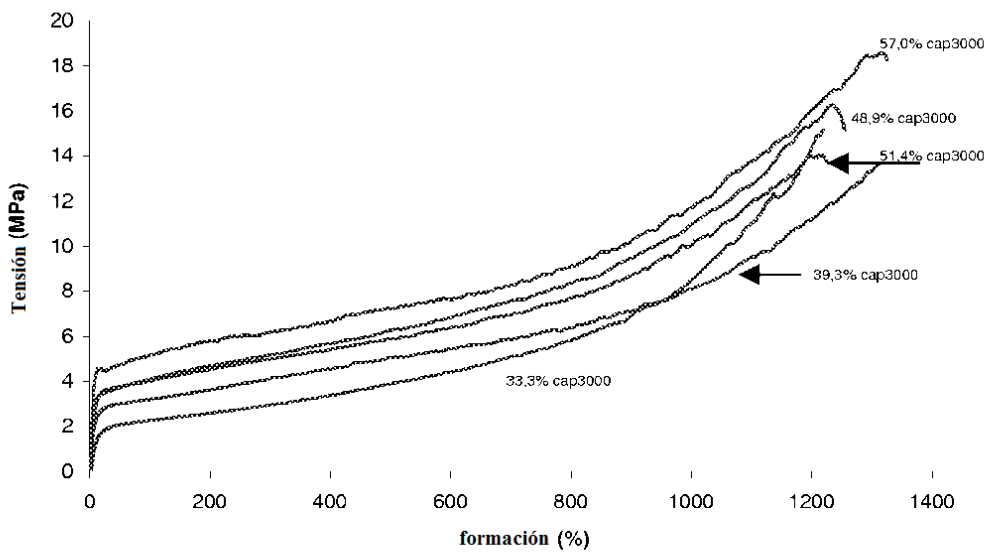


Figura 8: Módulo contra contenido de caprolactona

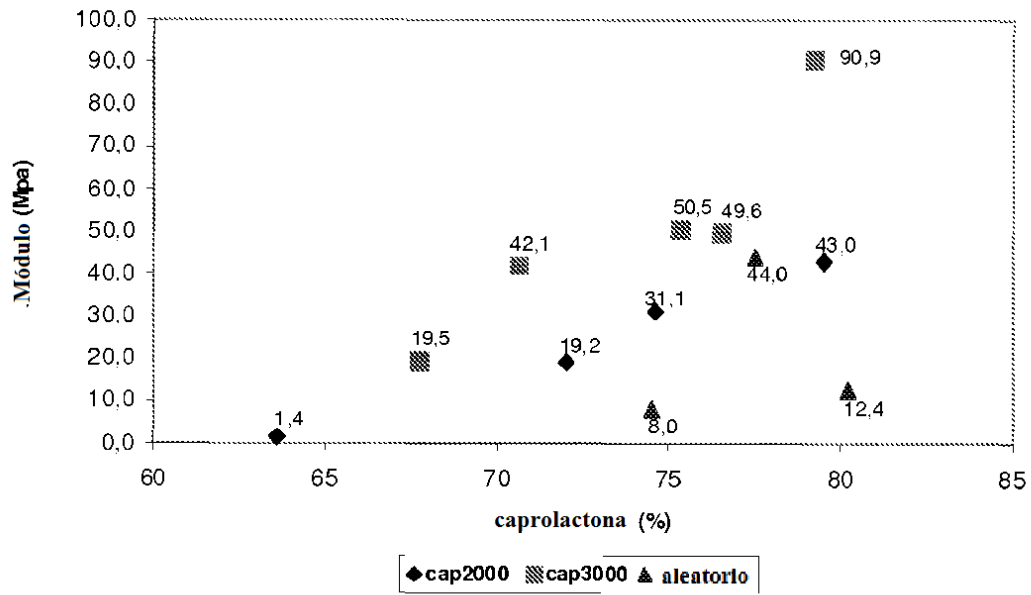


Figura 9: Termogramas típicos DSC de 50CLPEG 15CL20-b-CL40 (A) y 50LAPEG 15LA20-b-CL40 (B). Se muestra el flujo reverso de calor

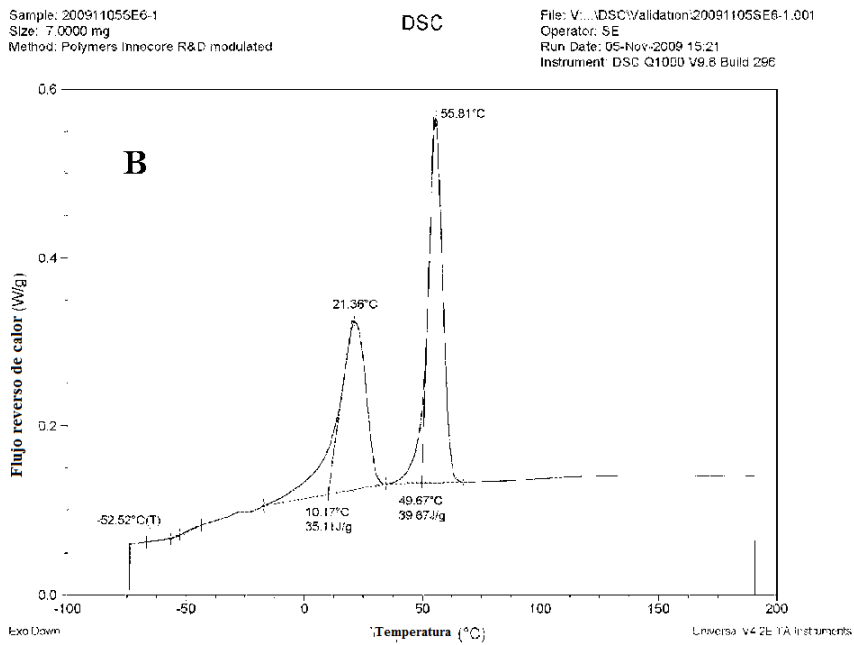
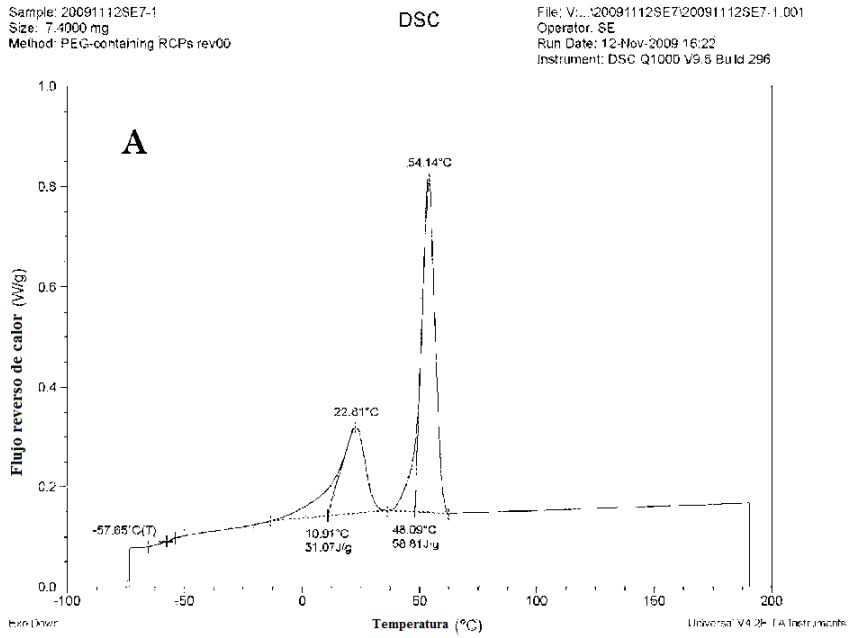


Figura 10: Liberación de lisozina a partir de 30 CLPEG 15 CL20-b-CL40, 50 CLPEG 15 CL20-b-CL40 y 70 CLPEG 15 CL20-b-CL40 copolímeros multibloque.

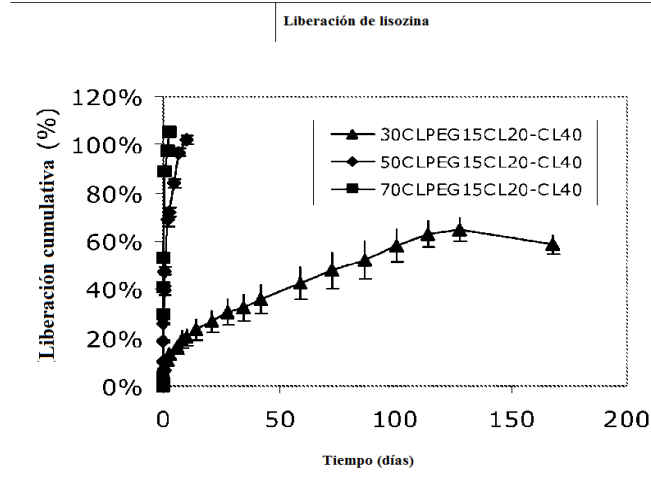


Figura 11: Liberación BSA a partir de los copolímeros multibloque 50 CLPEG 15 CL20-b-CL40 y 70 CLPEG 15 CL20-b-CL40

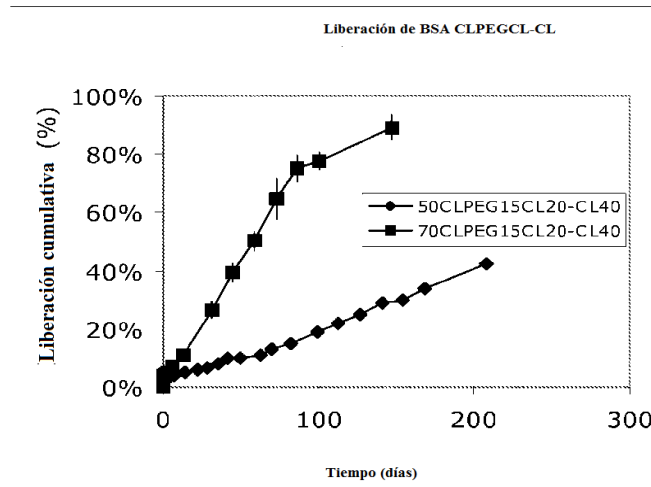


Figura 12: Liberación in vitro de lisozina a partir de los extrudidos PLGA y 30CLP10CL20-b-CL40 a 10 % p de carga de lisozina en PBS, pH 7.4 a 37°C

