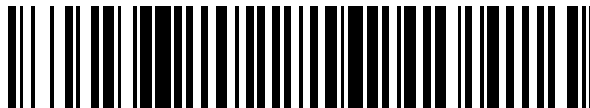


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 143**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/00** (2006.01)

**A61L 27/00** (2006.01)

**A61L 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2003 PCT/US2003/022561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2004 WO04009664**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2003 E 03765759 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1531757**

54 Título: **Copolímeros tribloque biodegradables, métodos de síntesis de los mismos, e hidrogeles y biomateriales preparados a partir de los mismos**

30 Prioridad:

**19.07.2002 US 397129 P**

**10.01.2003 US 439171 P**

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

**14.02.2017**

73 Titular/es:

**OMEROS CORPORATION (50.0%)**

**201 Elliott Avenue West**

**Seattle, WA 98119, US y**

**AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, JUN;**

**LI, XU;**

**NI, XIPING y**

**LEONG, KAM W.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 601 143 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 tribloque biodegradables, métodos de síntesis de los mismos, e hidrogeles y biomateriales preparados a partir de los mismos

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a métodos para sintetizar copolímeros anfífilos que tienen bloques de polímero de poli(hidroxialcanoato) y bloques de polímero de poli(óxido de alquileo), hidrogeles formados por tales polímeros con ciclodextrina, y biomateriales que incluyen sistemas inyectables de administración de fármacos en hidrogel, basados en tales polímeros e hidrogeles.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Muchos fármacos se preparan en combinaciones para ser administrados por medio de métodos que producen un efecto terapéutico en el organismo de un ser humano, u otro mamífero, que varía considerablemente con el tiempo. Los fármacos administrados por vías intravenosas pueden dar lugar a un pico casi instantáneo de la concentración de fármaco en el plasma sanguíneo, seguido de una disminución gradual del nivel en el plasma sanguíneo a medida que se metaboliza el fármaco. Los fármacos que se administran por vías orales o intramusculares pueden dar lugar a una concentración de fármaco en el plasma sanguíneo que aumenta lentamente durante la absorción sistémica del fármaco, seguida de una disminución desde los niveles pico de fármaco en el plasma. Puede que se necesite repetir la administración del fármaco a intervalos frecuentes, por ejemplo cada día, pero esto, a lo sumo, sólo se aproxima a un nivel terapéutico continuo o constante.

- 20 Sería beneficioso administrar muchos tipos de agentes terapéuticos con un sistema de administración que proporcione una liberación sostenida de los agentes a lo largo de un periodo prolongado de tiempo. En los últimos 20 años se han desarrollado diversos polímeros que se utilizan para la liberación y administración controladas de fármacos. La mayoría de los polímeros se conforman en implantes o microesferas inyectables. Tales polímeros son, y deben ser, biodegradables y biocompatibles. Para producir formas adecuadas de polímeros se requieren procesos de fabricación complicados que típicamente implican disolventes orgánicos. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos puede provocar la desnaturalización de algunos fármacos proteínicos, e incluso trazas de un disolvente orgánico pueden ser tóxicas.

- 30 Se han investigado hidrogeles de polímero con vistas a la administración de drogas y la liberación controlada. Por ejemplo, se han utilizado como implantes hidrogeles de polímero químicamente reticulado. Algunos sistemas inyectables para administración de fármacos forman en el cuerpo, después de la inyección, hidrogeles químicamente reticulados, que proporcionan un depósito de fármaco. Sin embargo, las reacciones químicas que se producen en el organismo debido a la presencia y/o la degradación de algunos de estos polímeros pueden provocar irritación y lesión tisular.

- 35 Los hidrogeles poliméricos físicos han sido muy estudiados en busca de aplicaciones en biomateriales. Los ejemplos incluyen hidrogeles formados por complejación de segmentos de polímeros o polipéptidos enantioméricos, e hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o al pH. Atraen una especial atención para la administración controlada de fármacos debido a las condiciones suaves y acuosas que intervienen en la captación de agentes bioactivos delicados tales como las proteínas. Por ejemplo, también se han propuesto como matrices de liberación sostenida para fármacos hidrogeles formados *in situ* a partir de copolímeros de bloque termosensibles. Presentan la ventaja de que en la formación de gel no interviene ninguna reacción química. Habitualmente, estos hidrogeles de copolímero se diseñan para fármacos macromoleculares tales como proteínas y hormonas. El inconveniente de tales hidrogeles sensibles a la temperatura es la viabilidad de administrar mediante inyección un gel semejante.

- 45 Más recientemente, los copolímeros de bloque anfífilos han atraído especial interés para la investigación fundamental, y para aplicaciones, debido a sus poco comunes arquitecturas de cadena y propiedades físicas, tanto en estado sólido como en disoluciones. Forster, S. *et al.*, *Adv. Mater.* 10:195 - 217 (1998); Alexandridis, P., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1:490-501 (1996). Han sido ampliamente estudiados como elementos constructivos en la química de polímeros supramoleculares para estructuras autoensambladas altamente ordenadas. Forster (1998), Alexandridis (1996); Vanhest, J. *et al.*, *W. Science* 268:1592 - 1595 (1995); Jenekhe, S. *et al.*, *Science* 283:372 - 375 (1999); Kukula, H. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:1658-1663 (2002). Los copolímeros de bloque anfífilos se han considerado biomateriales que aprovechan este autoensamblaje. Los estudios han dado como resultado biomateriales con nuevas propiedades macroscópicas, que se utilizan para la administración controlada de fármacos y la ingeniería tisular. Jeong, B. *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:27 - 51 (2002); Kissel, T. *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:99 - 134 (2002).

- 55 El poli(óxido de etileno) (PEO) se utiliza ampliamente como poliéter hidrófilo y biocompatible. Herold, D. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 38:73 - 76 (1989). Los copolímeros tribloque ABA anfífilos que incluyen PEO como segmento hidrófilo se han estudiado con anterioridad y se han descrito para uso como biomateriales. El término ABA se usa aquí para referirse a un polímero que incluye un segmento central de un primer polímero, denominado polímero de bloque B, y primer y segundo segmentos terminales de un segundo polímero, denominado polímero de bloque A. Como ejemplo típico, los copolímeros tribloque de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)

(PEO-PPO-PEO, Pluronic<sup>TM</sup>), comercialmente disponibles, han sido ampliamente estudiados en cuanto a su comportamiento de fases y potencial aplicación para la administración de fármacos. Alexandridis, P. *et al.*, *Colloids Surf.* 96:1-46 (1995); Bromberg, L. *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.* 31:197-221 (1998). Recientemente, se ha centrado más atención en copolímeros tribloque anfífilos ABA de PEO con poliésteres biodegradables. Se ha descrito la síntesis y caracterización de copolímeros tribloque compuestos de PEO y poliésteres tales como poli(ácido L-láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) o sus copoliésteres. Jeong, B. *et al.*, *Nature* 388:860-862 (1997); Jeong, B. *et al.*, *Macromolecules* 32:7064 - 7069 (1999); patente de EE.UU. 5,384,333; patente de EE.UU. 5,702,717; patente de EE.UU. 4,716,203; patente de EE.UU. 5,476,909. Tales copolímeros de bloque anfífilos tienden a formar micelas o incluso geles en agua, que son potencialmente útiles para sistemas inyectables de administración de fármacos.

Otro sistema de hidrogel interesante se compone de polirrotaxanos originados por polímeros lineales, tales como poli(óxido de etileno) (PEO) que penetran en la cavidad interna de ciclodextrinas (CD) para formar complejos de inclusión con una estructura supramolecular similar a un collar. Harada A. *et al.*, *Nature* 356:325 (1992); Li J. *et al.*, *Polym. J.* 26:1019 (1994). Sin embargo, sólo un PEO de alto peso molecular puede formar hidrogeles con  $\alpha$ -CD, y la disociación del hidrogel en disolución acuosa es rápida debido a la naturaleza hidrófila del PEO.

En la solicitud de patente de EE.UU. 2002/0019369 A1, titulada "Sistemas inyectables de liberación de fármaco con hidrogeles a base de ciclodextrina-polímero", a nombre de los inventores Li *et al.*, se describen sistemas inyectables para administración de fármacos que utilizan hidrogeles relacionados.

Esta solicitud describe composiciones inyectables a base de ciclodextrina y polímero, formadas a partir de CD, un polímero que es poli(etilenglicol) (PEG), un derivado de PEG, o un copolímero de PEG, y un fármaco. Se hace referencia al uso de poli(propilenglicol) u otros poli(alquilenglicoles) como polímero del sistema. Aunque los hidrogeles de polímero descritos en esta publicación proporcionan sistemas de liberación sostenida prometedoros, no se ha demostrado que proporcionen una cinética de liberación optimizada para liberación sostenida durante más de una semana.

El poli[(R)-3-hidroxi butirato] (PHB) es un poliéster biodegradable ópticamente activo sintetizado como material de almacenamiento de carbono y energía por muchos microorganismos. Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publisher, Nueva York (1990).

La patente de EE.UU. 5,702,717 de Cha *et al.* describe copolímeros biodegradables termosensibles compuestos por un bloque de polímero A hidrófobo que puede ser un poli( $\alpha$ -hidroxiácido) o un poli(carbonato de etileno), y un bloque de polímero B hidrófilo que es un poli(etilenglicol). Se describen estos polímeros para la administración de fármacos, y se caracterizan por exhibir un comportamiento de gelificación térmica inversa. Una lista descrita de ejemplos potenciales de bloques de polímero de poli( $\alpha$ -hidroxiácido) incluye el ácido hidroxibutírico; sin embargo, este es un poli( $\beta$ -hidroxialcanoato), y no entra dentro de la clase de polímero enseñada por Cha *et al.*, ni probablemente presentaría todas las características buscadas por Cha *et al.* Además, Cha *et al.* utilizan un proceso de síntesis que conlleva la polimerización por apertura de anillo de monómeros cíclicos, lo que puede originar una racemización potencialmente indeseable de los poli( $\alpha$ -hidroxiácidos).

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona un sistema para administración de fármacos que incluye un hidrogel formado a partir de ciclodextrina y un copolímero tribloque anfífilo que incluye un segmento medio de polímero de bloque B y dos segmentos terminales de polímero de bloque A, en donde el copolímero incluye un bloque de polímero A que comprende un poli(óxido de alquileo) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxialcanoato), y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico contenida íntimamente dentro del hidrogel.

La presente invención proporciona también un procedimiento para sintetizar un copolímero tribloque ABA anfífilo, que incluye poli(óxido de etileno) como polímero de bloque A y poli(3-hidroxi butirato) como polímero de bloque B. El procedimiento implica: convertir poli(3-hidroxi butirato) en poli(3-hidroxi butirato)-diol telequérico con un peso molecular inferior; producir ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico a partir de metoxi-poli(óxido de etileno); y acoplar el poli(3-hidroxi butirato)-diol con el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico utilizando 1,3-diciclohexilcarbodiimida para producir el copolímero tribloque ABA.

En el presente documento se describe un procedimiento para formar un sistema de hidrogel para administración de fármacos, mediante la combinación de ciclodextrina, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico en un fluido de base acuosa, y un copolímero anfífilo, en donde el copolímero incluye un bloque de polímero A que comprende un poli(óxido de alquileo) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxialcanoato).

En el presente documento se describe un método para tratar a un ser humano u otro mamífero que lo necesite con al menos un agente terapéutico. El método prevé administrar el al menos un agente terapéutico en un sistema para administración de fármacos, comprendiendo el sistema para administración de fármacos un hidrogel formado a partir de ciclodextrina y un copolímero anfífilo, en donde el copolímero incluye un bloque de polímero A que comprende un poli(óxido de alquileo) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxialcanoato), en donde dentro del hidrogel está contenida íntimamente una cantidad terapéuticamente eficaz del al menos un agente terapéutico.

En una realización preferida de la invención, el bloque de polímero A es poli(óxido de etileno) (PEO) y el bloque de polímero B es poli [(R)-3-hidroxibutirato] (PHB). El copolímero utilizado para formar un hidrogel con  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) en esta realización es un copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO.

5 Los copolímeros tribloque anfífilos de una realización de la presente invención, que utilizan PEO como segmentos terminales y PHB como segmento medio, poseen propiedades interesantes porque el PHB es altamente cristalino e hidrófobo. Además, el PHB tiene una tasa de degradación *in vivo* menor que el PLLA y muchos otros biopoliésteres utilizados convencionalmente. Gogolewski, S. *et al.*, *J. Biomed. Mat. Res.* 27:1135 - 1148 (1993). Por tanto, los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO pueden ser más prometedores para la implantación a largo plazo o la liberación controlada de fármacos que los polímeros desarrollados hasta ahora.

10 Además del autoensamblaje de los complejos entre  $\alpha$ -CD y bloques de PEO, la interacción hidrófobo-hidrófobo entre los bloques de segmento medio de PHB refuerza aún más la red del hidrogel. Las propiedades de los hidrogeles se pueden afinar mediante el ajuste de los pesos moleculares y la relación molar de PHB y PEO, haciéndolos potencialmente atractivos para diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo para la administración de proteínas, péptidos, genes, moléculas pequeñas, anticuerpos y fragmentos de los mismos y proteínas recombinantes humanas, antígenos, ADN, ARN o nanopartículas de ADN, y para la ingeniería tisular.

15 Los hidrogeles de PEO-PHB-PEO de la invención poseen características de liberación sostenida incrementadas en gran medida con respecto a otros hidrogeles conocidos, debido en parte a la hidrofobia incrementada de la sección media, hasta un grado sorprendente. Estos hidrogeles también presentan una estabilidad acrecentada, forman geles más rápidamente y requieren el uso de menos ciclodextrina, lo que minimiza los efectos secundarios indeseables, por ejemplo inflamación potencial, que se pueden producir si se utiliza excesiva ciclodextrina.

20 Los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO de la presente invención tienen una fuerte tendencia a formar micelas en medio acuoso. La formación de micelas por los copolímeros de la presente invención es relativamente insensible a la temperatura. Esta insensibilidad a la temperatura es inesperada cuando se compara con la relativa inestabilidad frente a la temperatura de las micelas formadas a partir de otros poli(ácidos  $\alpha$ -hidroxialcanoicos) tales como PLLA o PGA (Jeong (2002); Kissel (2002); Jeong (1997); Jeong (1999)), dado que el PHB y el PLLA tienen estructuras químicas similares. Las micelas de la presente invención son, por lo tanto, muy adecuadas para la administración de fármacos, por ejemplo en un intervalo de 15 a 45°C, por que no tienden a degradarse prematuramente a temperaturas más elevadas dentro de este intervalo, y no se agregan fácilmente para formar tamaños superiores a temperaturas más bajas dentro de este intervalo.

### 30 **Breve descripción de los dibujos**

Los aspectos precedentes y muchas de las ventajas concomitantes de la presente invención se apreciarán más fácilmente haciendo referencia a la descripción detallada que sigue, tomada juntamente con los dibujos adjuntos, en donde:

35 la Figura 1 proporciona un esquema de reacción química para la síntesis de copolímero de poli(óxido de etileno)-poli[(R)-3-hidroxibutirato]-poli(óxido de etileno) (PEO-PHB-PEO) según una realización de la invención;

la Figura 2 proporciona un cromatograma de cromatografía de permeación en gel (GPC) del copolímero de PEO-PHB-PEO producido en el Ejemplo 1 y de los prepolímeros correspondientes;

la Figura 3 proporciona un espectro de  $^1\text{H}$  NMR del copolímero de PEO-PHB-PEO producido en el Ejemplo 1 y de los prepolímeros correspondientes;

40 la Figura 4 proporciona un espectro FTIR de un copolímero de PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000) producido según el procedimiento del Ejemplo 1 y de los prepolímeros correspondientes;

la Figura 5 proporciona curvas de pérdida de peso durante el análisis termogravimétrico (TGA) de un copolímero de PEO-PHB-PEO producido según el procedimiento del Ejemplo 1 y de los prepolímeros correspondientes;

45 las Figuras 6 y 7 proporcionan termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de copolímeros de PEO-PHB-PEO con distintos pesos moleculares, producidos según el procedimiento del Ejemplo 1, y de los prepolímeros correspondientes;

las Figuras 8 y 9 proporcionan diagramas de difracción de rayos X (XRD) de ángulo amplio de copolímeros de PEO-PHB-PEO de distintos pesos moleculares, producidos según el procedimiento del Ejemplo 1, y de los prepolímeros correspondientes;

50 la Figura 10 ilustra perfiles de liberación *in vitro* del Ejemplo 2 para BSA-FITC (300 mg de hidrogel cargado con 1,0 mg de BSA-FITC) liberado de: hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO (10.000) (●) (TECNICA ANTERIOR); hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO (20.000) (◆) (TECNICA ANTERIOR); hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-2.350-5.000) (▲) según una realización de la presente invención; e hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.850-5.000) (■) según una realización de la presente invención;

la Figura 11 ilustra perfiles de liberación *in vitro* del Ejemplo 3 para dextrano-FITC (300 mg de hidrogel cargados con 1,0 mg de dextrano-FITC),  $M_n$  20.000 liberado desde: hidrogel de PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) (■); hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) (●) según una realización de la presente invención; e hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000) (▲) según una realización de la presente invención.

5 las Figuras 12 y 13 proporcionan diagramas de XRD para copolímero de PEO-PHB-PEO no complejado, en comparación con copolímeros de PEO-PHB-PEO de diversos pesos moleculares complejados con  $\alpha$ -CD (Figura 12) o bien  $\gamma$ -CD (Figura 13);

las Figuras 14 y 15 proporcionan termogramas de DSC para copolímero de PEO-PHB-PEO no complejado, en comparación con copolímeros de PEO-PHB-PEO de diversos pesos moleculares complejados con  $\alpha$ -CD (Figura 14) o bien  $\gamma$ -CD (Figura 15);

la Figura 16 proporciona espectros de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR para  $\alpha$ -CD no complejada y  $\alpha$ -CD complejada con copolímero de PEO-PEO-PHB (2.000-5.200-2.000), con flechas que señalan resonancias resueltas para C-1 y C-4 adyacentes a un único enlace glucosídico conformacionalmente tensionado;

15 la Figura 17 proporciona el espectro de  $400\text{ }^1\text{H}$  NMR de  $\alpha$ -CD complejada con copolímero de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) en DMSO- $d_6$ ;

las Figuras 18 y 19 proporcionan espectros FTIR de distinta resolución de copolímero de PEO-PEO-PHB (2.000-5.200-2.000) no acomplejado, en comparación con este copolímero acomplejado con  $\alpha$ -CD o bien  $\gamma$ -CD, y en comparación con  $\alpha$ -CD pura;

20 la Figura 20 proporciona curvas de análisis termogravimétrico (TGA) de  $\alpha$ -CD pura, copolímero de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro, y del complejo de este copolímero con  $\alpha$ -CD;

la Figura 21 proporciona un espectro de excitación de fluorescencia en estado estacionario, monitorizado a 373 nm, para una sonda de pireno ( $6,0 \times 10^{-7}$  M) en una disolución acuosa de copolímero de PEO-PHB-PEO del Ejemplo 5 a distintas concentraciones, a 23°C;

25 la Figura 22 ilustra el efecto de la concentración del copolímero de PEO-PHB-PEO del Ejemplo 5 sobre la proporción  $I_{337}/I_{334}$  de pireno en disoluciones de copolímero a 23°C;

la Figura 23 ilustra el efecto de la temperatura sobre la proporción  $I_{337}/I_{334}$  de pireno en disoluciones acuosas del copolímero de PEO-PHB-PEO del Ejemplo 5 a distintas concentraciones;

la Figura 24a proporciona una imagen (aumento original x 10) que muestra la histología de la articulación de la rodilla de un conejo una semana después de la inyección intraarticular de disolución salina tamponada con fosfato; y

30 la Figura 24b proporciona una imagen (aumento original x 10) que muestra la histología de la articulación de la rodilla de un conejo una semana después de la inyección intraarticular de un hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-2.000-5.000).

#### Descripción detallada de la realización preferida

35 La presente invención proporciona un sistema para administración de fármacos que incluye un hidrogel formado a partir de ciclodextrina y un copolímero tribloque anfífilo que incluye un segmento medio de polímero de bloque B y dos segmentos terminales de polímero de bloque A en donde el copolímero incluye un bloque de polímero A que comprende un poli(óxido de alquileo) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxialcanoato), y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico contenida íntimamente dentro del hidrogel. En una realización preferida de la invención, el bloque de polímero A es poli(óxido de etileno) (PEO) y el bloque de polímero B es poli[(R)-3-hidroxitirato] (PHB), y el copolímero es el copolímero tribloque ABA de PEO-PHB-PEO. Se describirán ahora los componentes de polímero de bloque A y B de los copolímeros de poli(óxido de alquileo)-poli(hidroxialcanoato)-poli(óxido de alquileo) de la presente invención.

Poli(óxido de alquileo)

45 En los copolímeros tribloque de la presente invención se utiliza una estructura de segmento terminal (el polímero de bloque A) de poli(óxido de alquileo) hidrófilo. El poli(óxido de alquileo) se selecciona convenientemente de poli(óxido de etileno), poli(óxido de tetrametileno) y poli(tetrahidrofurano). Un poli(óxido de alquileo) preferido para uso en la presente invención es poli(óxido de etileno) (PEO) o un derivado del mismo, y muy preferiblemente es PEO. Al PEO también se le denomina poli(etilenglicol) y, en la presente memoria, se pretende que la expresión poli(óxido de etileno) (y la abreviatura PEO) se refieran también a poli(etilenglicol) (PEG).

50 El poli(óxido de alquileo) puede tener distintas formas y distintos grupos terminales. Por ejemplo, en el caso del PEO, los derivados de PEO pueden tener distintas estructuras, por ejemplo PEO en forma de estrella, PEO parecido a un peine, etc. El poli(óxido de etileno) puede estar en forma de moléculas modificadas, por ejemplo, polisacáridos PEGilados, poli(aminoácidos) PEGilados, proteínas PEGiladas, etc. Además, se puede utilizar un derivado de

poliamina de PEO, por ejemplo poli(etilenimina) PEGilada o polilisina PEGilada.

El intervalo de masa molecular relativa ( $M_r$ ) del PEO u otro poli(óxido de alquileo) utilizado como polímero de bloque A en los copolímeros de la presente invención va, convenientemente, de 500 a 2.000, y preferiblemente va de 2.000 a 10.000.

#### 5 Poli(hidroxicanoato)

En los copolímeros tribloque de la presente invención se utiliza una estructura de sección media (polímero de bloque B) de poli(hidroxicanoato) sumamente hidrófobo. Los polímeros de poli(hidroxicanoato) adecuados son: a) relativamente hidrófobos, de manera que la interacción hidrófobo-hidrófobo entre las cadenas de polímero facilita el ensamblaje macromolecular y reduce la concentración de CD necesaria; b) biodegradables; y c) atóxicos y biocompatibles.

Los polímeros de poli(hidroxicanoato) son bloques de polímero B hidrófobos adecuados para el uso en la presente invención. Los ejemplos de polímeros de poli(hidroxicanoato) adecuados para el uso en la presente invención incluyen: poli[(*R*)-3-hidroxi butirato] (PHB), también denominado poli [ácido (*R*)-3-hidroxi butírico] o poli( $\beta$ -hidroxiácido); poli[(*R*)-4-hidroxi butirato] (PGHB); poli[(*R*)-3-hidroxi valerato] (PHV); poli[(*R*)-3-hidroxi butirato]-copoli[(*R*)-3-hidroxi valerato] (PHB/HV); poli[(*R*)-3-hidroxi hexanoato] (PHHx); poli[(*R*)-3-hidroxi heptanoato] (PHHp); enantiómeros (*S*) de cada uno de los enantiómeros (*R*) precedentes; mezclas racémicas de los enantiómeros (*S*) y (*R*) precedentes; y mezclas de los polímeros de poli(hidroxicanoato) precedentes. Los polímeros de poli(hidroxicanoato) preferidos son polímeros de poli( $\beta$ -hidroxicanoato), y más específicamente son polímeros de poli[(*R*)-3-hidroxi butirato] (PHB) y polímeros de poli[(*R*)-3-hidroxicanoato] relacionados. Un poli(hidroxicanoato) muy preferido para el uso en la presente invención es PHB.

El intervalo de masa molecular relativa ( $M_r$ ) del PHB u otro poli(hidroxicanoato) utilizado como polímero de bloque B en los copolímeros de la presente invención va, convenientemente, de 500 a 2.000, preferiblemente de 2.000 a 10.000, más preferiblemente de 2.500 a 7.500 y muy preferiblemente de 3.000 a 5.000.

#### Copolímero

La presente invención proporciona copolímeros anfífilos de poli(óxido de alquileo) y poli(hidroxicanoato) producidos mediante un procedimiento de síntesis exclusivo, que se describe con mayor detalle más adelante en la presente memoria. Preferiblemente, estos copolímeros son copolímeros tribloque ABA, por ejemplo de PEO-PHB-PEO. Tales copolímeros tribloque de la invención forman hidrogeles con ciclodextrina, y son útiles para la administración de fármacos con liberación sostenida y otras aplicaciones biomédicas. La presente invención también está dirigida a copolímeros de bloque AB de un poli(óxido de alquileo) y un poli(hidroxicanoato), por ejemplo PEO-PHB. Se cree que tales copolímeros de bloque AB también formarán hidrogeles útiles con ciclodextrina. Por tanto, aunque se prefieren polímeros tribloque ABA, se debe entender que todas las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria se aplican también a copolímeros de bloque AB de un poli(óxido de alquileo) y un poli(hidroxicanoato). También son posibles otras variaciones de los polímeros de la presente invención. Por ejemplo, al final de la cadena de polímero puede estar conjugado, a través de un enlace biodegradable, un grupo bloqueante voluminoso, por ejemplo, L-fenilalanina, L-triptófano, grupos nicotínico, etc.

El peso molecular de los polímeros de PEO-PHB-PEO de la presente invención se sitúa convenientemente entre 1.000 y 50.000, y preferiblemente se sitúa entre 5.000 y 35.000.

Se pueden formular los copolímeros de la presente invención para que sean bioabsorbibles, biodegradables, biocompatibles y son aptos para formar hidrogel con ciclodextrina. Bioabsorbible significa que el polímero es capaz de desaparecer de su lugar de aplicación inicial en el cuerpo, con o sin degradación de las moléculas de polímero dispersadas. Biodegradable significa que el polímero puede descomponerse o degradarse dentro del organismo, por hidrólisis o degradación enzimática. Biocompatible significa que todos los componentes son atóxicos para el organismo.

#### 45 Ciclodextrinas

En la presente invención se utiliza ciclodextrina (es decir, una ciclodextrina) como agente complejante, para formar complejo con segmentos del copolímero tribloque. El arracimamiento de estos polímeros enhebrados con ciclodextrina forma entonces un hidrogel. Las ciclodextrinas son una serie de oligosacáridos cíclicos naturales compuestos por seis, siete, ocho o más unidades de D(+)-glucopiranosas enlazadas por enlaces alfa-1,4. Las ciclodextrinas son biodegradables y biocompatibles y pueden ser sintetizadas natural o artificialmente. La ciclodextrina puede ser sintetizada naturalmente por microorganismos, por ejemplo. Se puede modificar artificialmente la ciclodextrina para manipular sus propiedades, por ejemplo mejorar su solubilidad, su capacidad de formación de complejos y su especificidad. En la presente memoria, "ciclodextrina" se refiere a todas las formas naturales y formas artificialmente modificadas. Las ciclodextrinas adecuadas incluyen  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina y sus derivados, entre ellos derivados hidrófobos, derivados hidrófilos, ciclodextrinas cargadas, y similares. La  $\alpha$ -ciclodextrina es una ciclodextrina preferida.

## Síntesis de polímeros

En el esquema de reacción de la Figura 1 se presentan los procedimientos para sintetizar los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO. Para sintetizar el copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO según la presente invención, primeramente se preparan los precursores de polímero utilizando técnicas convencionales. El PHB de fuente natural tiene un elevado peso molecular y tiene un grupo terminal hidroxilo y un grupo terminal carboxilo. El PHB de fuente natural también es puro en cuanto a actividad óptica. El PHB de fuente natural de alto peso molecular se convierte en PHB terminado con hidroxilo (PHB-diol) telequérico, de peso molecular inferior, mediante una reacción de transesterificación con etilenglicol, utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la reacción de transesterificación en diglima (éter dimetílico de dietilenglicol), con dilaurato de dibutilestano como catalizador. Se deja que la reacción de transesterificación discurra durante un tiempo de desde algunas horas hasta durante una noche, para producir PHB-diol con un peso molecular medio que varía de unos pocos centenares a unos pocos millares, determinado mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). Los prepolímeros de ácido metoxi-PEO-monocarboxílico (M-PEO-A) se preparan convenientemente por reacción de metoxi-PEO con anhídrido succínico en presencia de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y trietilamina en 1,4-dioxano, utilizando técnicas conocidas.

Se acoplan después estos precursores de polímero, es decir, prepolímeros, según un método de la presente invención, para producir el copolímero tribloque deseado. Preferiblemente, primeramente se secan los prepolímeros (PHB-dioles y M-PEO-A), ya que la reacción de acoplamiento es sensible a la humedad. Se acoplan los PHB-dioles bifuncionalizados con M-PEO-A, utilizando 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente acoplante, para producir los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO. Nuevamente, debido a la sensibilidad frente a la humedad, la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en cloruro de metileno seco, bajo una atmósfera de nitrógeno. En la reacción de acoplamiento, el M-PEO-A debe encontrarse en exceso para asegurar que todo el PHB-diol se convierta en el copolímero tribloque.

Después se aísla el copolímero tribloque objetivo y se purifica a partir de la mezcla de reacción mediante una o varias precipitaciones y fraccionamientos cuidadosos con disolventes mixtos, convenientemente metanol/éter dietílico o cloroformo/éter dietílico. Los bloques de PHB del polímero conservan una configuración racémica (*R*) bien definida.

Además de producir el copolímero tribloque utilizando el enantiómero (*R*) de PHB, también se espera que este procedimiento de síntesis sea útil para producir enantiómeros (*S*) de PHB y mezclas racémicas de enantiómeros (*S*) y (*R*) y otros polímeros de poli(3-hidroxialcanoato) relacionados y sus copolímeros.

## Ensamblaje del hidrogel

El autoensamblaje supramolecular entre los copolímeros tribloque anfífilos de la presente invención y ciclodextrina forma un hidrogel inyectable que está físicamente reticulado. El autoensamblaje supramolecular se refiere a la asociación espontánea de múltiples componentes moleculares en una fase específica que tiene organización microscópica y características macroscópicas bien definidas. En los hidrogeles de la presente invención, los segmentos de PEO (por ejemplo) se autoensamblan entre sí, mientras se producen interacciones hidrófobas entre los segmentos medios de PHB (por ejemplo). Se pueden suministrar fármacos de una manera sostenida a partir de una matriz o vehículo *in vivo* formado a partir de un hidrogel inyectable a base de ciclodextrina y polímero, de la presente invención.

La composición inyectable de hidrogel a base de ciclodextrina y polímero se puede preparar de cualquier manera adecuada. Para formar un hidrogel sin un fármaco, se combina ciclodextrina con un fluido vehiculante acuoso (por ejemplo, agua desionizada o disolución salina). Se mezcla la disolución de ciclodextrina y después se añade el componente de copolímero anfífilo (por ejemplo, PEO-PHB-PEO). Se enfría la mezcla, por lo general a una temperatura de 0°C a 25°C, y preferiblemente a una temperatura refrigerada tal como 4°C. El producto resultante es un hidrogel viscoso blanco.

Si se está preparando el hidrogel para su uso en la administración de un fármaco, convenientemente se combina inicialmente el fármaco, en disolución acuosa, con la ciclodextrina, seguido de la adición del copolímero. Como alternativa, primeramente se puede combinar la disolución de fármaco con el copolímero. La disolución acuosa en la cual está contenido inicialmente el fármaco es un líquido acuoso inyectable, farmacéuticamente aceptable. El fluido acuoso inyectable farmacéuticamente aceptable puede ser, pero sin limitación, disolución salina inyectable. Si se desea, el fluido acuoso puede también contener agentes tamponantes y/o conservantes. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, pero sin limitación, carbonatos alcalinos o alcalinotérreos, fosfatos, bicarbonatos, citratos, boratos, acetatos y succinatos. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, bisulfato de sodio, tiosulfato de sodio, ascorbato, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, borato fenilmercurio, parabenos, alcohol bencílico y feniletanol. Los conservantes y agentes tamponantes, si se utilizan, se seleccionarán basándose en parte en la compatibilidad con los agentes terapéuticos utilizados.

Preferiblemente, el polímero se encuentra en una disolución acuosa, que forma un hidrogel con ciclodextrina. Por ejemplo, soluciones de polímero acuosas adecuadas contienen de aproximadamente 1% a aproximadamente

80% de polímero, preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 40%. Los hidrogeles adecuados contienen aproximadamente de 1,0% a 20% de ciclodextrina (peso/peso) (basado en el peso de la disolución total), con preferencia aproximadamente de 5% a 15% de ciclodextrina. Como se ha señalado, el hidrogel se forma típicamente utilizando un fluido vehiculante acuoso. Por ejemplo, las disoluciones acuosas típicas contienen de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de polímero, con preferencia de aproximadamente 10% a aproximadamente 40%.

La ciclodextrina y el polímero se combinan en cantidades y proporciones relativas suficientes, según la invención, para proporcionar un hidrogel inyectable que posee una cinética de liberación (para aplicaciones de administración de fármacos) y propiedades físicas (es decir, viscosidad de sol y características de transición gel-sol), deseadas para una aplicación particular. Cuando se utiliza para sistemas inyectables de administración de fármacos, se utiliza una cantidad de ciclodextrina suficiente para producir un gel que es inyectable en forma de sol (debido a la transición inducida por la cizalladura) a través de una aguja hipodérmica. Convenientemente, la relación en peso de ciclodextrina a polímero va de 0,05:1,0 a 0,5:1,0 (es decir, la ciclodextrina está incluida en una proporción de 5%-80% del peso del polímero). Preferiblemente, la ciclodextrina está incluida en una proporción de 5% a 50% del peso del polímero.

Es deseable utilizar la cantidad mínima de ciclodextrina necesaria para conseguir la cinética de liberación (para la administración de fármacos) y las características físicas, deseadas, con el fin de evitar niveles de ciclodextrina que podrían conducir a una respuesta inflamatoria *in vivo*. Se cree que los hidrogeles de la presente invención requieren sustancialmente menos ciclodextrina para formar un gel, por ejemplo 50% menos, que hidrogeles convencionales formados por ciclodextrina y PEO homopoliméricos. Como ejemplo extremo, algunos copolímeros con ciertas combinaciones de PEO/PHB pueden formar geles sin CD. Sin embargo, con la CD, los geles proporcionan cinéticas de liberación significativamente mejoradas. Esto es importante porque se puede seleccionar la cantidad de CD para ajustar la cinética de liberación de los geles.

#### Propiedades de hidrogel y componentes adicionales

El hidrogel de la presente invención es bioabsorbible y biodegradable, y es biocompatible. Se cree que es termosensible, es tixotrópico, y experimenta reversión entre gel y sol en determinadas condiciones. La temperatura de transición gel-sol se sitúa generalmente por encima de la temperatura ambiente, lo que depende de la composición del gel y también de la estructura química y el peso molecular del copolímero. Se ha encontrado que la formación de hidrogeles a partir de polímeros tribloque ABA de la presente invención, que incluyen PEO como bloque A y PHB como bloque B, es relativamente insensible a la temperatura. A temperaturas que varían entre 10 y 45°C, la formación de geles y micelas depende principalmente de la concentración en lugar de depender de la temperatura. Los hidrogeles y micelas formados con este polímero, que es difícil de disociar a baja temperatura y difícil de agregar para dar un tamaño mayor a temperatura elevada son, pues, estables y de fácil manipulación para la administración de fármacos.

Debido a su naturaleza tixotrópica, el hidrogel se transformará en un sol cuando se le someta a suficiente fuerza de cizalladura, haciendo inyectable el hidrogel (y cualesquiera fármacos contenidos en el mismo). Por ejemplo, se puede hacer pasar el hidrogel a través de agujas tan pequeñas como 27 G.

El pH del hidrogel se sitúa generalmente en aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, que es un intervalo de nivel de pH adecuado para la inyección en el organismo. El nivel de pH se puede ajustar mediante el uso de cualquier ácido o base adecuados, por ejemplo ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

La composición de hidrogel puede contener también un polímero secundario, que puede formar complejo con el fármaco, conjugar el fármaco, o ambas cosas. Convenientemente, el polímero secundario puede ser un poliéster, poliuretano, poliamida, poliéter, polisacárido, poli(aminoácido), polipéptido o una proteína. Preferiblemente, el polímero secundario es un polímero di- o monofuncional o polímero poliónico con segmentos de poli(etilenglicol). En caso de que se conjuguen fármacos o formen complejo con los hidrogeles, entonces las formulaciones de hidrogel actúan no sólo como una matriz, sino también como un vehículo para los fármacos. Esto significa que el fármaco no solo está físicamente atrapado en el hidrogel, sino que también está complejado o conjugado con las moléculas que forman el hidrogel. El polímero secundario también se puede utilizar para modificar las propiedades, tales como la porosidad y la viscosidad, de la matriz de hidrogel. La cantidad del polímero secundario debe ser suficiente para conseguir el resultado deseado, por ejemplo una cantidad suficiente para formar complejo con el fármaco y/o conjugarlo.

Las propiedades de los hidrogeles se pueden afinar mediante el uso de distintos pesos moleculares de bloques de polímero, ajustando el contenido de ciclodextrina, y mediante el uso de polímeros secundarios. Por ejemplo, se puede ajustar el hidrogel para que sea un hidrogel más flexible o un hidrogel más rígido. Se puede adaptar a medida la estructura del hidrogel para tener una viscosidad variable y tasas de liberación de fármacos más o menos elevadas, como se discute con mayor detalle más adelante. También se puede seleccionar el grado de hidrofobicidad del poli(hidroxialcanoato) para conseguir la tasa de liberación sostenida deseada.

El hidrogel también puede portar nanoesferas de ADN. Las nanoesferas de ADN son nanopartículas sintetizadas por



coacervación compleja, inducida por sal, de ADN y policones tales como gelatina y quitosana en calidad de vehículos para administración de genes. Leong, K. *et al.*, *Journal of Controlled Release* 53:183-193 (1998). Los copolímeros de PEG con segmentos que condensan o fijan ADN pueden formar hidrogeles con ciclodextrina, donde los polímeros condensan o fijan ADN y forman nanoesferas de ADN en los hidrogeles.

## 5 Agentes terapéuticos y métodos para liberación sostenida de fármacos

El hidrogel de la presente invención es adecuado para su uso como matriz de liberación controlada y sostenida de fármacos. Cuando se acopla esta matriz de hidrogel con uno o más agentes terapéuticos contenidos íntimamente en la misma, se proporciona un sistema para administración de fármacos con liberación sostenida, biodegradable. La expresión "liberación sostenida" (o, lo que es lo mismo, liberación prolongada o liberación controlada) se utiliza en la presente memoria para referirse a un sistema o composición para administración de fármacos que se introduce en el organismo de un ser humano u otro mamífero, o que se aplica a una herida abierta, quemadura o superficie de tejido o en una cavidad corporal o espacio corporal potencial, y que libera de forma continua una corriente de uno o más agentes terapéuticos durante un período de tiempo predeterminado y a un nivel terapéutico suficiente para conseguir un efecto terapéutico deseado durante el período de tiempo predeterminado. Se pretende que la referencia a una corriente de liberación continua abarque la liberación que se produce como resultado de la biodegradación *in vivo* de la composición, o de una matriz o componente de la misma, o como resultado de la transformación metabólica o disolución del agente o agentes terapéuticos o conjugados del agente o agentes terapéuticos.

La duración de la liberación prolongada depende de los pesos moleculares de los polímeros de bloque, en particular el peso molecular de la sección de poli(hidroxialcanoato) hidrófoba (por ejemplo, PHB). La tasa de liberación se puede modificar para conseguir una duración deseada de la respuesta terapéutica, según la invención, mediante la selección de: un poli(hidroxialcanoato) particular; el estado estereoisomérico del poli(hidroxialcanoato) seleccionado; el peso molecular del poli(hidroxialcanoato) seleccionado; y la cantidad relativa de ciclodextrina utilizada en el hidrogel, para conseguir una duración y tasa deseadas de la liberación sostenida. El peso molecular y la selección del poli(óxido de alquileno) hidrófilo también afectan a la cinética de la liberación sostenida, pero en menor medida que el componente de poli(hidroxialcanoato) hidrófobo. También se pueden utilizar polímeros secundarios para modificar la cinética de liberación, como se ha discutido con detalle más arriba. Los hidrogeles de la presente invención pueden proporcionar liberación sostenida durante un periodo de uno o varios días, y convenientemente proporcionar una liberación prolongada superior a 5 días, más preferiblemente superior a una semana, aún más preferiblemente dos semanas o más, y potencialmente un mes o más, mediante el ajuste de los pesos moleculares de los polímeros de bloques y del copolímero, así como del contenido de ciclodextrina dentro del hidrogel de la presente invención y el uso potencial de polímeros secundarios.

En los hidrogeles de la presente invención se pueden suministrar diversos agentes terapéuticos, es decir, fármacos. En la presente memoria, la expresión "agentes terapéuticos" y el término "fármacos" pretenden incluir moléculas biológicamente activas, entre ellas péptidos, proteínas (por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, factores de angiogénesis, receptores solubles, anticuerpos y fragmentos de los mismos y proteínas recombinantes humanas), moléculas pequeñas, genes, antígenos (por ejemplo, vacunas), ADN, ARN y nanopartículas de ADN. En la presente memoria, el término "fármaco" y la expresión "agentes terapéuticos" pretenden incluir también no sólo compuestos o especies que inherentemente son farmacéutica o biológicamente activos, sino también materiales que incluyen uno o más de estos compuestos o especies activos, así como conjugaciones, modificaciones y fragmentos farmacológicamente activos, y derivados de anticuerpo de los mismos.

La presente invención también proporciona un método para fabricar un medicamento formado a partir de los copolímeros tribloque anfífilos descritos en la presente memoria con ciclodextrina y uno o varios agentes terapéuticos. La invención proporciona, por tanto, hidrogeles supramoleculares basados en una complejación por inclusión entre ciclodextrina y el copolímero tribloque, en los cuales pueden estar contenidos íntimamente uno o varios agentes terapéuticos. Estos hidrogeles son prometedores para la administración controlada de fármacos proteínicos o peptídicos.

Para los sistemas de administración de fármacos, convenientemente se combinan los agentes terapéuticos con una base acuosa inyectable farmacéuticamente aceptable, y el agente o agentes terapéuticos pueden ser cualquier fármaco adecuado para inyección u otro modo de administración, o combinaciones de tales fármacos. Los fármacos adecuados incluyen, pero sin limitación, analgésicos, anestésicos, fármacos antiartríticos, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), fármacos antiasmáticos, anticoagulantes, anticonvulsivos, antidepresivos, antidiabéticos, antineoplásicos, antipsicóticos, antihipertensivos, antibióticos, antihistamínicos, descongestionantes, antiinflamatorios, miorelajantes, fármacos antiparasitarios, fármacos antivíricos, agentes antireestenóticos, agentes antiespasmódicos, agentes condroprotectores, agentes antiadhesión, agentes antiinvasión de células tumorales, vasorelajantes, vasoconstrictores, inmunosupresores y otras moléculas biológicamente activas, entre ellas péptidos, proteínas (por ejemplo, citocinas, factores de crecimiento, factores de angiogénesis, receptores solubles, anticuerpos y fragmentos de los mismos, y proteínas recombinantes humanas), moléculas pequeñas, genes, antígenos (por ejemplo, vacunas), ADN, ARN y nanopartículas de ADN.

Convenientemente, el fármaco puede estar en una forma macromolecular (es decir, un fármaco que normalmente es

una macromolécula o un fármaco que es una molécula más pequeña que ha sido conjugada, PEGilada o convertida de cualquier otra manera en una macromolécula) o en una forma de bajo peso molecular. Las formas macromoleculares son muy adecuadas para la administración en los presentes hidrogeles. Así, en los hidrogeles de la invención se pueden administrar macromoléculas tales como proteínas, incluidos factores de crecimiento, citocinas, anticuerpos, enzimas, etc. Para una liberación sostenida eficaz y uniforme, convenientemente se pueden 5 conjugar los fármacos de bajo peso molecular, por ejemplo a poli(etilenglicol), para formar una macromolécula que después se incorpora en el hidrogel. Convenientemente, los fármacos que son moléculas pequeñas pueden incluirse dentro de, o unirse a, micropartículas y/o nanopartículas, por ejemplo nanoesferas de ADN, para incorporarlos en los hidrogeles de la invención. Dado que los segmentos hidrófobos de la sección media de los copolímeros tribloque de la presente invención pueden formar micelas, los hidrogeles también pueden atrapar fármacos hidrófobos, por 10 ejemplo, paclitaxel (Taxol™), entre ellos moléculas pequeñas hidrófobas.

En la patente de EE.UU. 6,420,432, concedida a Demopoulos *et al.*, titulada "Surgical Irrigation Solution and Method for Inhibition of Pain and Inflammation" (Disolución para irrigación quirúrgica y método para inhibir dolor e inflamación), y la solicitud de patente internacional PCT WO 01/07067, a nombre de Demopoulos *et al.*, titulada "Solutions and 15 Methods for Inhibition of Pain, Inflammation and Cartilage Degradation" (Disoluciones y métodos para inhibir dolor, inflamación y degradación de cartilago), se describen ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden administrar convenientemente en los hidrogeles de la presente invención.

El documento US 6,420,432 describe agentes analgésicos, antiinflamatorios, antiespasmódicos y antirreestenóticos que se administran, solos o en combinación, para inhibir el dolor, inflamación, espasmo del músculo liso o 20 reestenosis. La selección de los agentes se determina para aplicaciones determinadas, con el fin de inhibir mecanismos indeseables que tienen su origen en cualquier trauma, estado u otro motivo, entre ellos procedimientos quirúrgicos, operatorios, de intervención o de diagnóstico, tales como la administración intraarticular de agentes antiinflamatorios/analgésicos durante procedimientos artroscópicos, la administración de agentes antiinflamatorios/analgésicos y/o antiespasmódicos al tracto urogenital durante procedimientos urogenitales, la 25 administración intravascular de agentes analgésicos/antiinflamatorios, antiespasmódicos y/o antirreestenóticos durante procedimientos cardiovasculares o la administración de agentes analgésicos/antiinflamatorios a una herida durante procedimientos de cirugía general, oftalmológica, periodontal u otros procedimientos quirúrgicos generales. Los agentes antiinflamatorios/analgésicos descritos incluyen: antagonistas de receptor de serotonina; agonistas de receptor de serotonina; antagonistas de receptor de histamina; antagonistas de receptor de bradicinina; inhibidores de calicreína; antagonistas de receptor de taquicinina, entre ellos antagonistas de los subtipos de receptor<sub>1</sub> de neurocinina y receptor<sub>2</sub> de neurocinina; antagonistas de receptor de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC); antagonistas de receptor de interleucina; inhibidores de enzimas activas en la ruta sintética hacia 30 metabolitos del ácido araquidónico, entre ellos (a) inhibidores de fosfolipasa, entre ellos inhibidores de la isoforma PLA<sub>2</sub> e inhibidores de la isoforma PLC $\gamma$ , (b) inhibidores de ciclooxigenasa y (c) inhibidores de lipooxigenasa; antagonistas de receptor de prostanoïdes, entre ellos antagonistas de receptor de subtipo EP-1 y EP-4 y antagonistas de receptor de subtipo de tromboxano; antagonistas de receptor de leucotrieno, entre ellos antagonistas de receptor de subtipo B<sub>4</sub> de leucotrieno y antagonistas de receptor de subtipo D<sub>4</sub> de leucotrieno; agonistas de receptor de opioides, entre ellos agonistas de receptor de subtipo  $\mu$  de opioides, subtipo  $\delta$  de opioides y subtipo  $\kappa$  de opioides; agonistas y antagonistas de purinoceptor, entre ellos antagonistas de receptor P<sub>2X</sub> y 40 antagonistas de receptor P<sub>2Y</sub>; y abridores del canal de potasio sensibles a adenosina trifosfato (ATP). Los agentes antiespasmódicos descritos incluyen: antagonistas de receptor de serotonina; antagonistas de receptor de taquicinina; abridores del canal de potasio sensibles a ATP; antagonistas de canal de calcio; antagonistas de receptor de endotelina; antagonistas de canal de calcio y donantes de óxido nítrico (activadores de enzima). Los agentes antirreestenóticos descritos incluyen: agentes antiplaquetarios, entre ellos: (a) inhibidores y antagonistas de receptor de trombina, (b) antagonistas de receptor de adenosina difosfato (ADP) (también denominados antagonistas de receptor purinoceptor<sub>1</sub>), (c) inhibidores y antagonistas de receptor de tromboxano y (d) antagonistas de receptor de glucoproteína de membrana plaquetaria; inhibidores de moléculas de adhesión celular, entre ellos (a) inhibidores de selectina y (b) inhibidores de integrina; agentes antiquimiotácticos; antagonistas de receptor de interleucina; e inhibidores de señalización intracelular, entre ellos: (a) inhibidores de proteína cinasa C (PCK) y proteína tirosina fosfatasa, (b) moduladores de inhibidores de proteína tirosina cinasa intracelular, (c) inhibidores de dominios de homología a src<sub>2</sub> (SH2) y (d) antagonistas de canal de calcio. Cuando se administran tales composiciones durante procedimientos urológicos, de cirugía general u oncológicos, se pueden incluir también 50 agentes antiadhesión o antiinvasión/adhesión/metástasis tumoral, solos o en combinación, tales como: antagonistas de receptor CD44; antagonistas de receptor de integrina y antagonistas de receptor de selectina; inhibidores de proteinasa; inhibidores de proteína tirosina cinasa; inhibidores de proteína cinasa C; e inhibidores de proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). Cada una de estas diversas composiciones y procedimientos se puede llevar a cabo mediante la administración de los agentes terapéuticos de los hidrogeles de la presente invención, para proporcionar una liberación y duración de acción prolongadas.

El documento WO 01/07067 describe agentes condroprotectores que inhiben el catabolismo del cartilago o que 60 promueven el anabolismo del cartilago. Los agentes condroprotectores promotores del anabolismo, descritos, incluyen: agonistas de interleucina (IL); miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , entre ellos agonistas de TGF- $\beta$  y agonistas de proteínas morfogénicas óseas; factores de crecimiento similares a insulina y factores de crecimiento de fibroblastos. Los agentes condroprotectores inhibidores del catabolismo,

descritos, incluyen: antagonistas de receptor de IL-1; antagonistas de receptor de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ ; inhibidores específicos de ciclooxigenasa-2; inhibidores de cinasa MAP; inhibidores de óxido nítrico sintasa e inhibidores de factor nuclear kB; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; moléculas de adhesión celular, entre ellas agonistas de integrina y antagonistas de integrina; agentes antiquimiotácticos; inhibidores de la señalización intracelular, entre ellos inhibidores de proteína cinasa C e inhibidores de proteína tirosina cinasa; moduladores de proteína tirosina fosfatasa intracelulares e inhibidores de dominios SH2. Tales composiciones condroprotectoras se pueden administrar en los hidrogeles de la presente invención, por ejemplo mediante inyección intraarticular, para proporcionar liberación y duración de acción prolongadas.

Los sistemas para administración de fármacos con hidrogel y agente terapéutico de la presente invención se inyectan adecuadamente o se administran de cualquier otra forma (por ejemplo mediante implante, colocación en una cavidad corporal o espacio potencial, revestimiento de una superficie de tejido del organismo o revestimiento de la superficie de un dispositivo implantable) a seres humanos u otros mamíferos que padezcan un estado o proceso morboso contra el cual el o los fármacos incluidos en el sistema para administración de fármacos sean terapéuticamente eficaces. A modo de ejemplo no limitante, el sistema para administración de fármacos que incluye agente o agentes terapéuticos adecuados se puede administrar para tratar a seres humanos u otros mamíferos que padezcan de dolor traumático o crónico, artritis, esclerosis múltiple y otros trastornos autoinmunitarios, inflamación y/o dolor ocasionado por trauma o cirugía u otros procedimientos operatorios, ansiedad y/u otros trastornos neurológicos o psicológicos, enfermedades cardiovasculares o afecciones tales como trastornos de hipertensión, urológicos o ginecológicos, cánceres sometidos a tratamiento con quimioterapia, congestión, trastornos o desequilibrios hormonales, etc. El fármaco o fármacos particulares utilizados en el hidrogel son del tipo que un ser humano u otro mamífero requerirían para el tratamiento farmacológico de la afección que está sufriendo el ser humano u otro mamífero.

Se puede inyectar o implantar la composición inyectable en el cuerpo de un ser humano u otro mamífero de cualquier manera adecuada, y preferiblemente mediante inyección a través de una aguja hipodérmica. Por ejemplo, se puede administrar el hidrogel mediante inyección o por otros medios intraarticularmente, intravascularmente, en el tracto urogenital, subcutáneamente, intramuscularmente, intradérmicamente, intracranealmente, intrapericárdicamente, intrapleuralmente o en cualquier cavidad corporal o espacio potencial. Como alternativa, se puede introducir el hidrogel a través de un catéter o una jeringa en una articulación, por ejemplo durante un procedimiento artroscópico, o en el tracto urogenital, en la vasculatura, en el espacio pericárdico o pleural, o en cualquier cavidad corporal o espacio potencial dentro del cuerpo, durante procedimientos operatorios, quirúrgicos, de diagnóstico o de intervención. Se puede administrar el hidrogel en una zona o tejido confinado, para conseguir una concentración local más alta del fármaco, formando un depósito de liberación sostenida. En otras aplicaciones, se puede realizar la aplicación tópica del hidrogel a una herida quirúrgica o traumática abierta, a una quemadura, o a la piel u otra superficie de tejido.

#### Aplicaciones adicionales como biomaterial

El copolímero tribloque de la presente invención formará micelas que, dependiendo de la concentración, permanecerán en una suspensión líquida o se agregarán para formar un gel. Las micelas formadas por los copolímeros tribloque biodegradables producidos por el método de síntesis descrito más arriba en la presente memoria se pueden utilizar para encapsular fármacos, en particular fármacos hidrófobos, con vistas a la liberación controlada. También se pueden secar las micelas de copolímero tribloque para formar microesferas o nanoesferas para uso en la encapsulación de fármacos como formulación de liberación sostenida. Se cree que, a partir de técnicas conocidas utilizadas para otros polímeros, se pueden adaptar técnicas adecuadas para formar micropartículas o nanopartículas utilizando el copolímero tribloque de la presente invención. En: Song, C., *et al.*, *Journal of Controlled Release* 43:197-212 (1997); Kim, S. *et al.*, *Journal of Controlled Release* 56:197-208 (1998); Kim, I. *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 205:165-172 (2000); y Jeong, Y. *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 188:49-58 (1999) se describen ejemplos no limitantes de tales técnicas.

Por tanto, se pueden utilizar micelas de los copolímeros tribloque biodegradables (o micropartículas o nanopartículas formadas a partir de los mismos) para la administración sistémica, incluida, a modo de ejemplo no limitante, la administración a través de las vías de administración intravascular, por inhalación, oral, intramuscular y subcutánea. Los hidrogeles de la presente invención formados por los copolímeros tribloque biodegradables y ciclodextrina se pueden emplear también como medios para el cultivo y encapsulación de células, con vistas a aplicaciones de ingeniería tisular. Se puede implantar tejido sintético, formado *ex vivo* o *in vivo* en el hidrogel, en el interior de un ser humano u otro mamífero (como ocurre, por ejemplo, con el cartílago sintético), o bien se puede aplicar externamente (como ocurre, por ejemplo, con la piel sintética). Se pueden incluir agentes terapéuticos dentro del tejido sintético formado utilizando el copolímero tribloque o hidrogel de la presente invención, para ayudar al crecimiento, viabilidad o curación de tejidos.

Los hidrogeles de la presente invención también pueden tener utilidad como revestimientos para evitar la formación de adherencia durante procedimientos quirúrgicos. También pueden estar comprendidos en tales composiciones uno o más agentes terapéuticos.

Los hidrogeles de la presente invención, que incluyen uno o más agentes terapéuticos, también se pueden utilizar

para revestir dispositivos implantables, por ejemplo estents, catéteres, tubos para vías respiratorias, conductos, tornillos, placas, derivaciones, articulaciones artificiales, corazones o válvulas artificiales, otras prótesis, etc. Tales dispositivos pueden fabricarse con materiales bioabsorbibles o no bioabsorbibles. También se consideran dentro del alcance de la presente invención otras aplicaciones en biomateriales y biológicas de los hidrogeles descritos en la presente memoria.

### Ejemplos

Se entenderá mejor la presente invención a la vista de los siguientes Ejemplos, que ilustran la síntesis de polímeros tribloque e hidrogeles de la invención, y sus propiedades. Los ejemplos son meramente ilustrativos, y no son un reflejo de la invención en su conjunto.

#### Ejemplo 1

Síntesis y caracterización de copolímeros tribloque

##### a. Síntesis de copolímeros tribloque

Se prepararon prepolímeros de PHB hidroxilado (PHB-diol) telequérico, de diversos pesos moleculares, mediante un procedimiento de transesterificación a partir de PHB natural y dietilenglicol, con dilaurato de dibutilestaño como catalizador y en diglima, como se ha descrito con anterioridad. Thomas, D. *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.* 197:1609-1614 (1996). Se deja que la reacción de transesterificación discurra durante un tiempo de desde algunas horas hasta durante una noche, para producir PHB-diol con pesos moleculares medios que varían de unos pocos centenares a unos pocos millares, determinados mediante GPC. Se prepararon prepolímeros de ácido M-PEO-monocarboxílico (M-PEO-A) con  $M_n$  de 1.820 y 4.740, mediante reacción de M-PEO con anhídrido succínico en presencia de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y trietilamina en 1,4-dioxano, como se ha descrito con anterioridad. Bae, Y. *et al.*, *J. Controlled Release* 64:3-13 (2000).

Después, como ejemplo de la invención, se acoplaron estos prepolímeros de PHB-diol, bifuncionalizados, con prepolímeros de M-PEO-A ( $M_n$  ~1.820 y 4.740), utilizando 1,3-diciclohexilcarbodiimida, para proporcionar los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO. Puesto que la reacción es sensible a la humedad, se llevó a cabo en cloruro de metileno secado, bajo una atmósfera de nitrógeno. El polímero tribloque objetivo se aisló y purificó de la mezcla de reacción mediante precipitación y fraccionamiento cuidadosos en disolventes mixtos de cloroformo/éter dietílico o metanol/éter dietílico.

##### b. Caracterización molecular de los copolímeros tribloque

Se realizó análisis por cromatografía de permeación en gel (GPC) para determinar los pesos moleculares y las distribuciones de peso molecular de los copolímeros tribloque. Los cromatogramas GPC de todos los copolímeros tribloque purificados mostraban picos que eran unimodales. La Figura 2 muestra un cromatograma GPC típico de los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO junto con los prepolímeros correspondientes. El peso molecular del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO es mayor que el de sus precursores de PEO y PHB, lo que se corresponde con la estructura tribloque ABA.

Se analizaron mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$  NMR todos los copolímeros tribloque, lo que confirmó que los copolímeros tribloque contenían bloques de PEO y de PHB, y proporcionó las longitudes del bloque medio de PHB de los copolímeros. La Figura 3 muestra los espectros  $^1\text{H}$  NMR de un copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO y sus prepolímeros precursores. Dado que los dos prepolímeros de M-PEG-A utilizados en este ejemplo eran casi monodispersos (peso molecular medio/promedio en número ( $M_w/M_n$ ) = 1,03), los pesos moleculares de los bloques de PEO de los copolímeros se pueden considerar idénticos a los de sus prepolímeros de M-PEO-A. Por tanto, se puede determinar el peso molecular del bloque de PHB de los copolímeros a partir de la relación entre las integrales de los picos de los segmentos PHB y PEO.

Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR también ofrecen una fuerte evidencia de reacción cuantitativa del PHB-diol. En la Figura 3b, los protones de la unidad terminal hidroxilo de PHB aparecen claramente a 1,26 ppm (doblete) en el caso de  $c'$  y a 4,25 ppm (multiplete) en el caso de  $b'$  (Li, J. *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 70:1887 - 1893 (1997); Li, J. *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 71:1683 - 1689 (1998)), mientras que el grupo terminal de etilenglicol se puede observar a 3,84 ppm (tripleto) en el caso de  $d$  y a 4,26 ppm (tripleto) en el caso de  $e$  (Thomas, D. *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.* 197:1659 - 1614 (1996)). En la Figura 3c, todos los picos de la unidad terminal de PHB desaparecen, y los del grupo terminal de etilenglicol se transforman en un pico único a 4,32 ppm, lo que confirma la conjugación completa de M-PEO-A a PHB-diol.

La Tabla 1 presenta los pesos moleculares, las distribuciones de peso molecular y las composiciones (longitudes de bloque y contenido en peso de PHB) de todos los copolímeros tribloque sintetizados en este ejemplo. Se sintetizaron dos series de copolímeros tribloque utilizando M-PEO-A con  $M_n$  1.820 y 4.740. Cada serie de copolímeros tribloque tiene longitudes de bloque medio de PHB que van desde unos pocos centenares hasta más de 5.000. Las

propiedades de estado sólido de los copolímeros tribloque dependen de las composiciones y relaciones entre las longitudes de los bloques de PEO/PHB como se describirá más adelante en la siguiente sección.

Tabla 1

Copolímero	$M_n^a$	$M_w^a$	$M_w/M_n^a$	Longitud de bloque ( $M_n$ )		Contenido de PHB (% en peso)	
				PEO <sup>a</sup>	PHB <sup>b</sup>	NMR <sup>b</sup>	TGA <sup>c</sup>
PEO-PHB-PEO (2.000-500-2.000)	4.500	4.730	1,05	1.820	470	11,4	12,6
PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000)	7.290	8.000	1,10	1.820	3.910	51,8	52,0
PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000)	8.120	9.260	1,14	1.820	5.230	59,0	58,3
PEO-PHB-PEO (5.000-800-5.000)	10.390	11.200	1,08	4.740	780	7,6	8,4
PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000)	12.720	13.770	1,08	4.740	3.820	28,7	29,7
PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000)	13.390	16.250	1,21	4.740	5.490	36,7	38,2

(a) Determinado mediante GPC. (b) Determinado mediante combinación de resultados de <sup>1</sup>H NMR y GPC.

(c) Calculado a partir de resultados de TGA.

- 5 En la Figura 4 se muestran los espectros FTIR de PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000) y sus precursores de PEO y PHB de partida. En el espectro del copolímero tribloque aparecen todas las absorciones características de los precursores de PHB y PEO. La tensión de carbonilo se produce a  $1.723\text{ cm}^{-1}$  para el copolímero y el precursor de PHB. La tensión de éter se produce a  $1.102\text{ cm}^{-1}$  para el copolímero y el precursor de PEO. Las bandas a  $963\text{ cm}^{-1}$  y  $843\text{ cm}^{-1}$  son conocidas por ser características de la fase cristalina de PEO. Bailey, J. *et al.*, *Poly(Ethylene Oxide)*, Academic Press, Nueva York, (1976). Los dos picos aparecen en el espectro del copolímero, y sus intensidades están asociadas con el contenido de bloques de PEO y su cristalinidad. El resultado presenta buena concordancia con los de la DSC y la XRD, que se discutirán en las secciones siguientes.

#### c. Estabilidad térmica

- 15 Se evaluó la estabilidad térmica de los copolímeros tribloque utilizando análisis termogravimétrico (TGA). La Figura 5 muestra las curvas de pérdida de peso de copolímeros tribloque y de precursores de PEO y PHB. Los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO experimentan degradación térmica gradual. El bloque de PHB comienza a degradarse primeramente en torno a  $260^\circ\text{C}$ , y después se inicia la degradación del bloque de PEO en torno a  $350^\circ\text{C}$ . Hay que señalar que el bloque de PEO comienza a degradarse después de que el bloque de PHB ha completado su degradación a  $310\text{-}320^\circ\text{C}$ . Por tanto, a partir de este comportamiento de degradación en dos pasos se pueden
- 20 calcular la composición de un copolímero tribloque y el contenido de PHB, como se expone en la Tabla 1 para copolímeros de distinto peso molecular. Los resultados presentan buena concordancia con los obtenidos por <sup>1</sup>H NMR. En la Tabla 2 se exponen las temperaturas, determinadas mediante TGA, a las que se ha producido 10% de pérdida de masa para cada bloque de los copolímeros. Los resultados muestran que los copolímeros tribloque poseen mejor estabilidad térmica que sus precursores.

25

Tabla 2

Muestra de polímero	$T_m$ (°C) <sup>a</sup>		$\Delta H_m$ (J/g) <sup>b</sup>		$X_c$ <sup>c</sup>		$T_d$ (°C) <sup>d</sup>	
	PEG	PHB	PEG	PHB	PEG	PHB	PHB	PEO
M-PEO-A ( $M_n$ 1.820)	53,2		149,6		73,0			372,2
M-PEO-A ( $M_n$ 4.740)	58,8		165,5		80,7			379,4
PHB-diol ( $M_n$ 3.800)		155,2		78,2		53,3	269,1	
PEO-PHB-PEO (2.000-500-2.000)	52,0		135,4		66,0		280,6	383,3
PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000)	25,4	142,3	69,1	92,2	33,7	62,8	279,8	382,9
PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000)	23,3	153,6	58,3	97,8	28,4	66,7	278,2	378,0
PEO-PHB-PEO (5.000-800-5.000)	57,7		148,7		72,5		284,8	384,7
PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000)	54,1	140,2	119,4	97,8	58,2	66,7	283,8	391,0
PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000)	50,4	153,2	111,0	107,8	54,1	73,6	286,0	387,8

## d. Comportamiento en estado sólido

5 Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y de difracción de rayos X (XRD) de ángulo amplio para obtener información sobre la separación de microfases y la cristalización de los bloques de PEO y PHB en los copolímeros. Las Figuras 6 y 7 muestran los termogramas de DSC para los precursores de PEO y de PHB y los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO con distintas composiciones. Además, en la Tabla 3 se presentan valores numéricos correspondientes a las transiciones térmicas y la cristalinidad de cada bloque. Tanto PEO como PHB son polímeros cristalinos. Para los copolímeros de PEO-PHB-PEO (2.000-500-2.000) y PEO-PHB-PEO (5.000-800-5.000) con un bloque de PHB corto, no se observó el pico de transición de fusión de PHB, lo que indica que no se había formado fase cristalina de PHB. La temperatura de transición de fusión ( $T_m$ ) del bloque de PHB disminuyó al reducirse la longitud del bloque de PHB. La entalpía de fusión y la cristalinidad del bloque de PHB aumentaron significativamente en los copolímeros, en comparación con el PHB-diol puro, presumiblemente a causa de la existencia del bloque de PEO blando. Por el contrario, los bloques de PEO de todos los copolímeros tribloque tenían menor entalpía de fusión y menor cristalinidad en comparación con los precursores de PEO puro. Todas las temperaturas de fusión, entalpías de fusión y la cristalinidad del bloque de PEO disminuyeron al aumentar la longitud del bloque de PHB o el contenido de PHB de los copolímeros. Esto puede deberse al bloque de PHB duro, que deprimió la cristalización de los bloques de PEO en los copolímeros.

Tabla 3

Copolímero	Temp. (°C)	Concentración micelar crítica (cmc) (g/L)
PEO-PHB-PEO (2.000-500-2.000)	23	$2,0 \times 10^{-1}$
PEO-PHB-PEO (5.000-800-5.000)	23	$4,0 \times 10^{-2}$
PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000)	23	$1,3 \times 10^{-2}$

Las Figuras 8 y 9 muestran los diagramas de XRD de los precursores de PEO y de PHB y de los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO sintetizados en este trabajo. En los diagramas de copolímeros con segmentos cortos de PHB (Figuras 8c y 9c) no aparecen los picos de reflexión del bloque de PHB, lo que indica que no se formó la fase cristalina de PHB. En el caso de copolímeros con segmentos de PHB más largos, el bloque de PHB formó una fase cristalina separada, de manera similar a su PHB-diol precursor. Los picos de reflexión de bloques de PEO indican que la fase cristalina de PEO del copolímero presenta una estructura similar a la de su homopolímero. En el caso del PEO-PHB-PEO (2.000-3.800-2.000) y del PEO-PHB-PEO (2.000-5.500-2.000) no aparecieron los picos de reflexión de PEO, ya que sus temperaturas de fusión para los bloques de PEO eran aproximadamente la temperatura ambiente (véase la Tabla 2 precedente) a la que se midió la XRD. Los resultados de XRD presentan buena concordancia con las medidas de DSC.

#### e. Formación de micelas de copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO

Los copolímeros tribloque con contenidos de PHB inferiores, tales como PEO-PHB-PEO (2.000-500-2.000), PEO-PHB-PEO (5.000-800-5.000) y PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000), son solubles en agua. Pueden formar micelas en disoluciones acuosas a bajas concentraciones, lo cual ha sido confirmado mediante experimentos de solubilidad de tinte. Se cree que la fuerza impulsora de la formación de micelas la constituyen las fuertes interacciones hidrofóbicas entre los bloques de PHB. Se determinaron las concentraciones micelares críticas (cmc) de los copolímeros de bloque en disoluciones acuosas, mediante la técnica de fluorescencia utilizando pireno como sonda. La Tabla 3 expone los valores de cmc para los tres copolímeros tribloque solubles en agua, a temperatura ambiente. Se ha encontrado que la cmc depende en gran medida de la longitud de bloque de PHB de los copolímeros, es decir, los copolímeros con bloque de PHB más largo tienen una cmc mucho menor, debido a que el bloque de PHB tiende fuertemente a agregarse en disolución acuosa.

#### Ejemplo 2

#### 25 Cinética de complejación y liberación de copolímero tribloque y ciclodextrina

##### a. Formación de complejos de inclusión

Nuevamente se siguió el esquema de reacción de la Figura 1 para sintetizar copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO. En resumen, primeramente se convirtió PHB de alto peso molecular en PHB-dioles de pesos moleculares inferiores. A continuación se acoplaron los PHB-dioles con ácido PEO-monocarboxílico ( $M_r$  5.000) para producir los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO. Se prepararon y se caracterizaron mediante NMR, GPC, FI-IR y DSC dos copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO (5.000-2.300-5.000) y PEO-PHB-PEO (5.000-3.850-5.000). Ambos copolímeros son solubles en agua a temperatura ambiente. Forman micelas en disoluciones acuosas a concentraciones bajas, lo cual fue confirmado mediante experimentos de solubilidad de tinte, utilizando 1,3,5-difenilhexatrieno y pireno. Se cree que la fuerza impulsora de la formación de micelas la constituyen las fuertes interacciones hidrofóbicas entre los bloques de PHB.

A pesar de la formación de micelas, disoluciones al 10% en peso en agua de ambos polímeros permanecieron transparentes, con buena fluidez. Al añadir 9,7% en peso de  $\alpha$ -CD a la disolución de cualquiera de los polímeros, se produjo gelificación a temperatura ambiente. En comparación con otros homo-PEO, con este copolímero se pudo inducir la gelificación a concentraciones más bajas. Aunque no se desea quedar limitado por la teoría, se postula que los complejos de inclusión formados por  $\alpha$ -CD y bloques de PEO de copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO se agregan en microcristales, que actúan como reticulaciones físicas e inducen la formación de una red polimérica supramolecular que, en consecuencia, conduce a la formación de un hidrogel. Se cree que la micelización del bloque

de PHB desempeña un papel importante en la gelificación de las disoluciones de copolímero y  $\alpha$ -CD. Las interacciones hidrófobas entre los bloques de PHB facilitan la formación de la red polimérica. Por tanto, se cree que la fuerza impulsora para la gelificación de copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO y  $\alpha$ -CD en disoluciones acuosas la constituyen una combinación de la complejación por inclusión entre  $\alpha$ -CD y bloques de PEO y la micelización del bloque de PHB de los copolímeros tribloque.

La formación de complejo de inclusión entre bloques de PEO de los copolímeros de PEO-PHB-PEO y  $\alpha$ -CD en los hidrogeles se confirmó mediante estudios de difracción de rayos X de ángulo amplio de los hidrogeles. Los difractogramas de los hidrogeles muestran el patrón del complejo  $\alpha$ -CD-PEO, con varias reflexiones agudas y una primaria a  $2\theta = 19,4^\circ$  ( $d = 4,57 \text{ \AA}$ ), que representa la estructura de tipo canal del complejo cristalino a modo de collar de  $\alpha$ -CD y PEO. Li J., *et al.*, *Macromolecules* 34:7236 (2001); Li J. *et al.*, *Macromolecules* 34:8829 (2001). Este patrón sugiere la existencia del complejo de inclusión de  $\alpha$ -CD y los bloques de PEO. El patrón de PEO-PHB-PEG sólido muestra dos reflexiones agudas a  $13,7^\circ$  ( $d = 6,46 \text{ \AA}$ ) y  $17,2^\circ$  ( $d = 5,16 \text{ \AA}$ ), que provienen de la fase cristalina de PHB. Curiosamente, en el diagrama del hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.850-5.000) también aparece el patrón de la fase cristalina de PHB, aunque es débil. Hay que señalar que el difractograma de rayos X de una disolución acuosa al 10% en peso de PEO-PHB-PEO (5.000-3.850-5.000) no muestra picos de reflexión agudos. Los resultados sugieren que el sistema supramolecular se ha hecho más altamente ordenado, y el auto-ensamblaje de complejos de  $\alpha$ -CD con bloques de PEO ha mejorado la agregación de los bloques de PHB.

#### b. Cinética de liberación

Para demostrar las características de estabilidad y de administración de estos hidrogeles, se estudió la liberación *in vitro* de albúmina sérica de bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC, peso molecular 67.000) como fármaco proteínico modelo (Figura 10). Se compararon las características de liberación del hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO de la presente invención con las de hidrogeles de  $\alpha$ -CD-homopolímero de PEO conocidos (de la técnica anterior). El hidrogel de  $\alpha$ -CD-homopolímero de PEO, incluso con un  $M_r$  de PEO de 20.000, se disolvió en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en el plazo de dos días. Por el contrario, los hidrogeles de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO pudieron mostrar una cinética de liberación sostenida para BSA-FITC. Curiosamente, una pequeña diferencia en el peso molecular, tan solo 1.500  $M_r$ , en el bloque de PHB provocó una notable disminución en la tasa de liberación. El  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-2.350-5.000) sostuvo la liberación durante 4 días, mientras que el  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.850-5.000) sostuvo la liberación durante un período de tiempo más largo, superior a 5 días. No se produjo liberación significativa de BSA-FITC al cabo de dos semanas. Estos resultados indican que con distintos copolímeros se pueden afinar las propiedades de los hidrogeles supramoleculares de la presente invención, lo que abre una amplia gama de aplicaciones. También pueden constituir el componente activo algunos fármacos proteínicos PEGilados, y las cadenas de PEO pueden estar implicadas en la complejación con  $\alpha$ -CD, lo que podría mejorar adicionalmente las propiedades de liberación controlada de las formulaciones. Un estudio adicional de las propiedades reológicas de los hidrogeles muestra que los geles son tixotrópicos, es decir, la viscosidad de los hidrogeles disminuye cuando se les somete a cizalladura, lo que hace posible inyectar las formulaciones de liberación controlada a través de una aguja.

#### Ejemplo 3

##### Cinética de liberación desde hidrogel para fármaco modelo alternativo

###### a. Preparación de hidrogeles de $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO

Se preparó una disolución de copolímero o gel añadiendo primeramente 0,090 gramos de PBS a 0,060 gramos del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO, sintetizado según los procedimientos del Ejemplo 1, en una cubeta de 0,6 mL. A continuación se añadieron, a la mezcla de PBS y copolímero de la cubeta, 0,30 gramos de disolución de PBS que contenía 14,5% de  $\alpha$ -CD y 0,5% de dextrano-FITC (peso molecular 20.000). Se mezclaron a conciencia las disoluciones, y después se las dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla formó un hidrogel en la cubeta, y después se estudió su cinética de liberación *in vitro* tal como se describirá con mayor detalle más adelante. Este procedimiento se llevó a cabo una vez utilizando copolímero de PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) y una vez utilizando copolímero de PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000).

###### b. Preparación de hidrogeles de PEO-PHB-PEO puro

Se preparó una disolución de copolímero o gel añadiendo primeramente 0,090 gramos de PBS a 0,060 gramos del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO, sintetizado según los procedimientos del Ejemplo 1, en una cubeta de 0,6 mL. A continuación se añadieron, a la mezcla de PBS y copolímero de la cubeta, 0,30 gramos de disolución de PBS que contenía 0,5% de dextrano-FITC (peso molecular 20.000). Se mezclaron a conciencia las disoluciones, y después se las dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla formó un hidrogel en la cubeta, y después se estudió su cinética de liberación *in vitro* tal como se describirá con mayor detalle más adelante. Este procedimiento se llevó a cabo una vez utilizando copolímero de PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) y una vez utilizando copolímero de PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000).

###### c. Cinética de liberación



Para los estudios de cinética de liberación *in vitro*, se colocó cada cubeta que contenía el hidrogel respectivo que incluía dextrano-FITC, boca abajo, en un tubo de ensayo con 12 mL de PBS, y se incubó en un baño de agua a 37°C. Se cambió la PBS a intervalos de tiempo predeterminados. Utilizando un lector de fluorescencia de microplacas se analizó la concentración de dextrano-FITC liberado en cada intervalo.

- 5 Siguiendo los procedimientos antes indicados, se encontró que el PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) formó un hidrogel tanto con  $\alpha$ -CD como sin la misma. El PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000) formó un hidrogel solo con  $\alpha$ -CD, y la disolución de PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000) sin  $\alpha$ -CD siguió siendo una disolución transparente que se cree inadecuada para la liberación sostenida de fármacos. La Figura 11 muestra los perfiles de liberación *in vitro* de dextrano-FITC de los hidrogeles. Tanto el hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) como el hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000) demostraron liberación sostenida de dextrano-FITC durante algunas semanas, mientras que el hidrogel de PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) puro liberó dextrano-FITC durante menos de una semana. Los resultados indican que la  $\alpha$ -CD no sólo ayuda a la gelificación de los copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO, sino que también forma hidrogeles más estables con los copolímeros tribloque para liberar de forma sostenida fármacos durante un tiempo de hasta varias semanas. El hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-5.500-5.000) mostró una velocidad de liberación más lenta que el hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (5.000-3.800-5.000), lo que indica que las propiedades de los hidrogeles supramoleculares se pueden afinar, según la presente invención, mediante el uso de diferentes longitudes de PHB.

#### Ejemplo 4

##### Formación de complejos de inclusión utilizando $\alpha$ - y $\gamma$ -ciclodextrinas

- 20 Como se ha indicado más arriba, las ciclodextrinas (CD) son moléculas cíclicas que constan de seis a ocho unidades de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4-glucosídicos, y se denominan  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CD, respectivamente. Las CD tienen geometrías en forma de rosquilla, que definen cavidades hidrófobas. Aunque la profundidad de las cavidades hidrófobas de las CD es la misma (aproximadamente 7,0 Å), los diámetros internos de las cavidades son distintos, siendo aproximadamente 4,5 Å para la  $\alpha$ -CD, aproximadamente 7,0 Å para la  $\beta$ -CD y aproximadamente 8,5 Å para la  $\gamma$ -CD. Bender, M. *et al.*, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag: Berlín (1978). Se ha encontrado que la correlación entre las áreas de sección transversal de las cadenas de polímero y los tamaños de cavidad de las CD desempeña un papel importante en la formación de CI. Véase, por ejemplo, Harada, A. *et al.*, *Nature* 370:126 (1994). En los experimentos descritos a continuación en el presente documento, se prepararon complejos de inclusión (CI) entre copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO y  $\alpha$ -CD o  $\gamma$ -CD, y se caracterizaron para demostrar su utilidad en la formación de los hidrogeles de la presente invención. Estos experimentos demuestran que tanto la  $\alpha$ -CD como la  $\gamma$ -CD incluyen preferiblemente el bloque de PEO, mientras que el bloque central de PHB queda cubierto solamente de manera parcial por moléculas de CD.

##### a. Preparación de complejos de inclusión

- 35 Se preparó copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO utilizando el procedimiento del Ejemplo 1 precedente. En la Tabla 4 se ofrecen las características moleculares de los copolímeros tribloque preparados para este experimento. Se empapó polímero tribloque de PEO-PHB-PEO (20 mg) con 0,06 mL de H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente durante una noche. Después se añadieron 3,0 mL de una disolución acuosa saturada de, o bien  $\alpha$ -CD o bien  $\gamma$ -CD, y cada mezcla se sometió a ultrasonidos en un baño de agua durante 10 minutos, seguido de reposo durante 2 días a temperatura ambiente. Se recogió mediante centrifugación el producto precipitado, y después se lavó alternadamente con agua y acetona. Por último, se secó el producto en vacío, a 70°C, durante 2 semanas.

Tabla 4

Copolímero	$M_n^a$	$M_w^a$	$M_w/M_n^a$	Longitud de bloque ( $M_n$ )		$T_m$ (°C) <sup>c</sup>	
				PEO <sup>a</sup>	PHB <sup>b</sup>	PEO	PHB
PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000)	7.290	8.000	1,10	1.820	3.910	25,4	142,3
PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000)	8.120	9.260	1,14	1.820	5.230	23,3	153,6
PEO-PHB-PEO (2.000-6.800-2.000)	9.690	11.770	1,21	1.820	6.840	25,3	155,2

Copolímero	$M_n^a$	$M_w^a$	$M_w/M_n^a$	Longitud de bloque ( $M_n$ )		$T_m$ (°C) <sup>c</sup>	
				PEO <sup>a</sup>	PHB <sup>b</sup>	PEO	PHB

(a) Determinado mediante GPC. (b) Determinado mediante los resultados de <sup>1</sup>H NMR y GPC. (c) Determinado en la segunda rampa de calentamiento de DSC.

#### b. Mediciones

5 Las medidas de difracción de rayos X (XRD) se llevaron a cabo empleando un difractómetro Siemens D5005 y radiación Cu K<sub>α</sub> (1,540 51 Å) (40 kV, 40 mA) filtrada con Ni. Se montaron las muestras de polvo en un soporte para muestras y se escanearon en pasos de 0.01° desde 5° hasta 35° (en 2θ) con 1 segundo por paso.

10 Las medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron empleando un calorímetro diferencial de barrido TA Instruments 2920 equipado con un accesorio de autorrefrigeración y calibrado mediante indio. Para cada muestra se utilizó el siguiente protocolo: calentamiento desde temperatura ambiente hasta 200°C a razón de 20°C minuto<sup>-1</sup>, mantenimiento a 200°C durante 2 minutos, enfriamiento desde 200°C hasta -30°C a razón de 5°C minuto<sup>-1</sup> y, finalmente, recalentamiento desde -30°C hasta 200°C a razón de 5°C minuto<sup>-1</sup>. Se recogieron datos durante la segunda rampa de calentamiento. Las temperaturas de transición se tomaron como máximos de pico. Los análisis termogravimétricos (TGA) se realizaron empleando un aparato TA Instruments SDT 2960. Se calentaron las muestras a razón de 20°C minuto<sup>-1</sup> desde la temperatura ambiente hasta 800°C, en una atmósfera dinámica de nitrógeno (caudal = 70 ml minuto<sup>-1</sup>).

15 Los espectros de <sup>1</sup>H NMR de los complejos se registraron a 400 MHz en un espectrómetro Bruker DPX-400 NMR. Los desplazamientos químicos de los complejos se referencian a δ = 2,50 ppm para el DMSO. Los espectros de <sup>13</sup>C CP/MAS NMR se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DPX-400 NMR con una velocidad de giro de la muestra de 8,0 kHz, a temperatura ambiente. Los espectros se obtuvieron adquiridos con un pulso de protón a 90° de 2,75 μs, un tiempo de contacto de 3 milisegundos, y un tiempo de repetición de 3 segundos.

20 Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se registraron en un espectrofotómetro Bio-Rad 165 FTIR; se promediaron en señal 64 exploraciones, con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>, a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon dispersando los complejos en KBr y comprimiendo las mezclas para formar discos.

#### c. Resultados y discusión

25 Cuando se añadió una disolución acuosa de α-CD o γ-CD al copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO empapado con agua y sometido a ultrasonidos durante 10 minutos, se formaron complejos en forma de precipitados cristalinos. La aparición de precipitados era una indicación de la formación de complejos de inclusión (CI) cristalinos entre los copolímeros y las CD. Harada, A. *et al.*, *Macromolecules*, 26:5698 (1993). En comparación, no se formó precipitado en la mezcla de β-CD y la disolución de copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO incluso después de permanecer en reposo durante 2 semanas. Esta observación indica que los polímeros tribloque de PEO-PHB-PEO pueden formar CI con α-CD y γ-CD, pero pueden no hacerlo con β-CD. En la Tabla 5 se muestran los rendimientos de la formación de CI.

Tabla 5

Copolímero	Rendimiento (mg)		CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O/CD	
	α	γ	α	γ
PEO-PHB-PEO (2.000-3.900-2.000)	75,0	60,6	1,2	2,1
PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000)	67,9	56,3	1,4	2,6
PEO-PHB-PEO (2.000-6.800-2.000)	65,8	60,0	1,1	2,3

Los estudios de difracción de rayos X (XRD) dieron gran apoyo a la formación de CI de CD-PEO-PHB-PEO. La Figura 12 muestra los patrones de XRD de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro y de CI con  $\alpha$ -CD de los tres copolímeros tribloque de PEO-PHB-PEO, en comparación con CI formados por  $\alpha$ -CD y PEO ( $M_n$  2.000). En la Figura 12e, varias reflexiones agudas con dos picos prominentes a  $2\theta = 19,4^\circ$  y  $22,1^\circ$  representan la estructura de tipo canal de un complejo cristalino de  $\alpha$ -CD y PEO, similar a un collar. Véase, por ejemplo, Takeo, K. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 34:1787 (1970). La observación de patrones de difracción similares de CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (Figuras 12b-d) indica que los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO adoptan una estructura de tipo canal similar a la del CI de  $\alpha$ -CD-PEO. Cuando se comparan con el CI de  $\alpha$ -CD-PEO, en los patrones de CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO aparecen dos pequeños picos adicionales a  $2\theta = 13,6^\circ$  y  $17,0^\circ$ . La intensidad relativa de los dos picos aumenta al crecer la proporción de PHB a PEO en PEO-PHB-PEO. Con PEO-PHB-PEO puro, como se muestra en la Figura 12a, los picos a  $13,6^\circ$  y  $17,0^\circ$  son característicos de PHB cristalino. Por lo tanto, se cree que la presencia de los dos picos indica que partes del bloque de PHB se agregan para formar una fase cristalina, que coexiste con los cristales de CI.

En la Figura 13 se muestran los patrones de XRD de varios CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO, comparados con los de PEO-PHB-PEO puro y el CI de  $\gamma$ -CD-PEO. Aunque las intensidades relativas de cada pico son distintas, los patrones de XRD de los CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO son muy similares entre sí y también son similares al del CI de  $\gamma$ -CD-PEO, en la que se ha determinado una estructura de tipo canal. Además, se observa el pico característico a  $7,6^\circ$ , que es el aspecto clave que sirve como huella dactilar de la estructura de tipo canal de los CI de  $\gamma$ -CD-polímero. Véase, por ejemplo, Harada, A. *et al.*, *Macromolecules*, 29:5611 (1996). Por tanto, se cree que los CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO adoptan una estructura de tipo canal. También se observan en los patrones de XRD de los CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO, así como en los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO, los dos picos a  $2\theta = 13,6^\circ$  y  $17,0^\circ$ , atribuidos al bloque de PHB cristalino. El ensanchamiento de los patrones de XRD de los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO y de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO, en comparación con los CI estequiométricos de  $\alpha$ -CD-PEO y  $\gamma$ -CD-PPO (Figura 12e y Figura 13e), se debe a la menor cristalinidad de los CI, causada muy probablemente por los segmentos de PHB no cubiertos que "rompen" y acortan los canales de los CI.

En la Figura 14 se muestran las curvas de DSC de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro y de CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO. Como se muestra en la Figura 14a, hay dos picos endotérmicos a  $23,3^\circ\text{C}$  y  $153,6^\circ\text{C}$  en la curva de DSC de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro, que corresponden a la fusión de cristal de los bloques de PEO y PHB, respectivamente. Tras formar los CI, el pico endotérmico correspondiente al bloque de PEO está ausente en las Figuras 14b-14d. Esto se debe a que el bloque de PEO se incluye por separado en los canales de la red matriz de  $\alpha$ -CD, y entonces no puede agregarse para formar la fase cristalina. Sin embargo, todavía se puede observar el pico endotérmico correspondiente al bloque de PHB (Figuras 14b-14d). Pero las temperaturas de fusión se desplazan a un intervalo inferior, y los cambios de entalpía dan como resultado una disminución dramática de los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO. Los resultados indican que cada bloque de PHB está cubierto parcialmente por  $\alpha$ -CD, y muy probablemente la parte central del bloque de PHB no está complejada por  $\alpha$ -CD. Los descensos de la temperatura de fusión y el cambio de entalpía son debidos a la perturbación de la cristalización resultante de la inclusión parcial del bloque de PHB. Shuai, X. *et al.* (*Macromolecules*, 35:3778 (2002)) han descrito la formación de CI entre poli[(R)-3-hidroxitbutirato] y  $\alpha$ -CD en DMSO. Sus resultados han demostrado que la  $\alpha$ -CD había incluido solo de manera parcial una cadena de PHB. Para el sistema de la presente invención, el enhebrado de  $\alpha$ -CD sobre el bloque de PHB continúa siendo frustrado por la hidrofobicidad del PHB, aunque la CD que se enhebra sobre el bloque de PEO puede deslizarse adicionalmente sobre el bloque central de PHB. En los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO, tanto la temperatura de fusión como el cambio de entalpía tienden a aumentar cuando crece la longitud de cadena del bloque medio de PHB. Esto se debe a que los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO con bloque de PHB más largo tienen partes no complejadas de la cadena de PHB más largas.

La Figura 15 muestra las curvas de DSC de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro y de CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO. Se pueden obtener resultados similares a los de la Figura 14. Todos los resultados de DSC para los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO y también los CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO indican que el bloque de PEO está totalmente cubierto por CD, mientras que el bloque central de PHB está parcialmente cubierto, lo que es coherente con los resultados de XRD.

La Figura 16 muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR de  $\alpha$ -CD y del CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000). El espectro de  $\alpha$ -CD en el estado no complejado muestra múltiples resonancias resueltas para  $C_1$  y  $C_4$ . En el espectro se observan especialmente las resonancias para  $C_1$  y  $C_4$  adyacentes a un único enlace glucosídico conformacionalmente tenso. Los resultados indican que la  $\alpha$ -CD asume una conformación menos simétrica en el estado cristalino no complejado. Por el contrario, para el CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000), todos los  $C_1$ - $C_6$  de la CD muestran una única resonancia sin resolver, lo que indica que la  $\alpha$ -CD adopta una conformación más simétrica y cada unidad de glucosa de la  $\alpha$ -CD está en un ambiente similar en el CI.

La cobertura parcial del bloque central de PHB por  $\alpha$ -CD o  $\gamma$ -CD también se demostró mediante los espectros de  $^1\text{H}$  NMR de los CI de CD-PEO-PHB-PEO. La Figura 17 muestra el espectro de  $^1\text{H}$  NMR de  $\alpha$ -CD complejada con copolímero de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) en DMSO- $d_6$ ; Como se muestra en la Figura 17, se confirman todas las señales de protones pertenecientes a  $\alpha$ -CD y también a PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000). La proporción de los ingredientes en el CI cristalino se puede determinar mediante la comparación de las integrales

de los picos. Como se ha descrito con anterioridad, el PEO puede formar complejos de inclusión con  $\alpha$ -CD y con  $\gamma$ -CD, siendo la relación de unidades repetidas de PEO con respecto a CD 2 y 4, respectivamente. Véase, por ejemplo, Harada *et al.* (1994). Sin embargo, la relación de unidades repetidas de PEO con respecto a  $\alpha$ -CD obtenida a partir de la Figura 17 para el CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) es 1,4, lo que indica que en el CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) están contenidas más moléculas de  $\alpha$ -CD que las que forman un complejo estequiométrico de  $\alpha$ -CD y bloques de PEO. Por otra parte, las mediciones de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR en estado sólido muestran que toda la  $\alpha$ -CD del CI se ha enhebrado sobre la cadena polimérica y se adapta a una estructura de canal. Por lo tanto, se cree que algo de  $\alpha$ -CD se desliza sobre el bloque medio de PHB. En la Tabla 5 se resumen las relaciones de unidades repetidas de PEO con respecto a CD para todos los CI de CD-PEO-PHB-PEO ensayados. En los casos de los CI con  $\gamma$ -CD, las relaciones se sitúan entre 2,1 y 2,6, lo que indica que algunas moléculas de  $\gamma$ -CD también se deslizan sobre el bloque central de PHB. Estos resultados apoyan adicionalmente la hipótesis de que en los CI de CD-PEO-PHB-PEO el bloque de PEO está totalmente cubierto por  $\alpha$ -CD o por  $\gamma$ -CD, mientras que el bloque central de PHB está cubierto parcialmente.

La Figura 18 muestra los espectros de FTIR de los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO, en comparación con el PEO-PHB-PEO (20-52-20) puro y  $\alpha$ -CD. El espectro de  $\alpha$ -CD muestra una banda ancha a  $3.360\text{ cm}^{-1}$ , debida al modo de tensión de O-H simétrico y antisimétrico. Una vez formados los CI, en los espectros de los CI (Figuras 18b y c) la banda ancha de hidroxilo se desplaza a una frecuencia mayor, a  $3.390\text{ cm}^{-1}$ , debido muy probablemente a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las CD en la estructura de canal. El espectro FTIR de PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro se caracteriza por una banda de tensión de carbonilo intensa a  $1.723\text{ cm}^{-1}$  (Figura 18a), que se asigna a la parte de PHB del PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000). La banda de tensión de carbonilo se resuelve en una banda intensa a  $1.723\text{ cm}^{-1}$  y un hombro débil a  $1.736\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden, respectivamente, a la banda de tensión de carbonilo de la fase cristalina de PHB y de las regiones amorfas de PHB. Ikejima, T., *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.*, 200:413 (1999).

La Figura 19 muestra la ampliación de la región de tensión de carbonilo de estos espectros FTIR. En comparación con el PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro, el pico a  $1.723\text{ cm}^{-1}$  disminuye bruscamente, mientras que el hombro a  $1.736\text{ cm}^{-1}$  crece de manera aguda en los espectros de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) y  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000). Cuando se forman los CI, algunos de los segmentos de PHB se encuentran situados individualmente en los canales de los CI, y por lo tanto no son capaces de agregarse para formar cristales de PHB. La existencia del pico a  $1.723\text{ cm}^{-1}$  indica que solamente una parte de los bloques de PHB han sido cubiertos por CD, y los segmentos de PHB restantes todavía pueden agregarse para formar una fase cristalina. Esto está de acuerdo con los resultados de XRD y de DSC discutidos más arriba.

La Figura 20 muestra los resultados de los barridos de análisis termogravimétrico (TGA) para  $\alpha$ -CD, PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro y su IC, hasta  $450^\circ\text{C}$ . Como se muestra en la Figura 20, la  $\alpha$ -CD empieza a descomponerse a  $279,2^\circ\text{C}$ . Al calentarlo, el PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) puro muestra una pérdida inicial de peso de 58,7% y una segunda pérdida de peso de 39,3%, con inicio de la descomposición térmica a  $222,4^\circ\text{C}$  y  $243,8^\circ\text{C}$ , respectivamente. Se cree que la primera pérdida de peso se debe a la descomposición del bloque de PHB y la segunda pérdida de peso al bloque de PEO. Sin embargo, los inicios de la descomposición del bloque de PHB, del bloque de PEO y de  $\alpha$ -CD en el CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO se observan a  $247,2^\circ\text{C}$ ,  $309,3^\circ\text{C}$  y  $365,8^\circ\text{C}$ , respectivamente. Todos ellos son más altos que los de los bloques de PHB y PEO en PEO-PHB-PEO (2.000-5.200-2.000) y la  $\alpha$ -CD pura, respectivamente. Se cree que las temperaturas de descomposición más altas de los CI de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO se deben a la contribución de la formación de complejos a la estabilidad térmica de la  $\alpha$ -CD y también del PEO-PHB-PEO. También se han observado resultados similares para los CI de  $\gamma$ -CD-PEO-PHB-PEO.

#### Ejemplo 5

#### 45 Caracterización de micelas de copolímero de PEO-PHB-PEO

En medio acuoso, se formaron micelas de copolímero de PEO-PHB-PEO producido según el procedimiento general del Ejemplo 1, y después se caracterizaron de la manera siguiente:

## a. Materiales

Se adquirió de Aldrich poli[(R)-3-hidroxi-butirato] (PHB) de fuente natural. Antes de su uso, se purificó la muestra de PHB por disolución en cloroformo, seguida de filtración y precipitación en éter de petróleo. El  $M_n$  y el  $M_w$  del PHB purificado eran  $8,7 \times 10^4$  y  $2,3 \times 10^5$ , respectivamente. Se adquirió de Shearwater Polymers, Inc., EE.UU., ácido metoxi-poli(óxido de etileno)monopropiónico (M-PEO-A) con un peso molecular de aproximadamente 5.000. Se encontró que el  $M_n$  y el  $M_w$  del M-PEO-A eran 4.740 y 4.880, respectivamente. Se obtuvieron de Aldrich bis(2-metoxietil)éter (diglima, de 99%), etilenglicol (de 99%), dilaurato de dibutilestano (de 95%), 1,3-*N,N'*-diciohexilcarbodiimida (DCC, de 99%), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, de 99%), anhídrido succínico (de 97%) y trietilamina (de 99%). Antes de su uso, se secó la diglima con un tamiz molecular, y se destiló el cloruro de metileno sobre  $\text{CaH}_2$ .

## b. Preparación de hidrogeles de PEO-PHB-PEO puro

Se preparó el prepolímero DE PHB hidroxilado (PHB-diol) telequérico, de bajo peso molecular, por transesterificación A PARTIR del PHB natural y dietilenglicol con dilaurato de dibutilestano como catalizador, en diglima (rendimiento 80%). Se secaron el PHB-diol (0,38 g,  $1,2 \times 10^{-4}$  moles,  $M_n = 3.220$ ), el M-PEO-A (1,42 g,  $3,0 \times 10^{-4}$  moles,  $M_n = 4.740$ ) y la DMAP (12 mg,  $9,8 \times 10^{-5}$  moles) en un matraz de 50 mL con dos bocas, bajo vacío y a  $60^\circ\text{C}$  (baño de aceite) durante una noche. Se añadió al matraz cloruro de metileno anhidro (25 - 30 ml), y después se eliminó por destilación (baño de aceite,  $75^\circ\text{C}$ ), para eliminar del sistema cualquier traza de agua. Cuando se hubo enfriado el matraz, se añadió DCC (0,098 g,  $4,7 \times 10^{-4}$  moles) disuelta en 4 ml de cloruro de metileno anhidro, y se agitó la mezcla durante una noche a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno. Se eliminó por filtración la diciohexilurea (DCU) precipitada. Se precipitó dos veces el polímero en el seno de éter dietílico. Se purificó adicionalmente por fraccionamiento el producto de copolímero tribloque deseado, rediseñado en metanol o cloroformo. Rendimiento: 0,75 g, 56%. GPC (THF):  $M_n = 12.720$ ,  $M_n$  (bloque de PHB) = 3.820,  $M_n$  (bloque de PEO) = 4.740,  $M_w = 13.770$ ,  $M_w/M_n = 1,08$ .  $T_m = 54^\circ\text{C}$  (para el bloque de PEO) y  $140^\circ\text{C}$  (para el bloque de PHB).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5,29 (m, H de metino del bloque de PHB), 4,32 (s,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ ), 3,68 (s,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  del bloque de PEO), 3,42 (s, grupo terminal  $-\text{OCH}_3$ ), 2,48 - 2,67 (m, H de metileno del bloque de PHB), 1,31 (d, H de metilo del bloque de PHB). IR(KBr): 2.886, 1.723, 1.456, 1.380, 1.280, 1.111, 1.061, 962, 842, 516  $\text{cm}^{-1}$ .

## c. Caracterización de polímeros

El análisis mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) se llevó a cabo con un sistema Shimadzu SCL-10A y LC-8A equipado con dos columnas Phenogel 5 $\mu$  de 50 y 1000 Å (tamaño: 300 x 4,6 mm) en serie, y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Se utilizó THF como eluyente, a un caudal de 0,30 mL/minuto, a  $40^\circ\text{C}$ . Se utilizaron patrones de poli(etilenglicol) monodisperso, para obtener una curva de calibración. Los espectros de  $^1\text{H NMR}$  se registraron en un espectrómetro Bruker AV-400 NMR, a 400 MHz y temperatura ambiente. Las medidas de  $^1\text{H NMR}$  se llevaron a cabo con un tiempo de adquisición de 3,2 segundos, un tiempo de repetición de pulso de 2,0 segundos, una anchura de pulso de  $30^\circ$ , anchura espectral de 5.208 Hz, y 32 K puntos de datos. El desplazamiento químico se refirió a los picos del disolvente ( $\delta = 7,3$  ppm para  $\text{CHCl}_3$ ).

## d. Espectroscopia de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario se registraron en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5301PC. Se monitorizaron a 373 nm los espectros de excitación. Se mantuvieron en 1,5 nm las anchuras de rendija, tanto para el lado de excitación como para el lado de emisión. Se prepararon disoluciones de muestra disolviendo una cantidad predeterminada de copolímero de bloque en una disolución acuosa de pireno de concentración conocida, y se dejaron las disoluciones en reposo durante 1 día para que se equilibrasen.

## e. Resultados y discusión

Se estudió, utilizando una técnica de absorción de colorante, la formación de micelas del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO. El valor de la concentración micelar crítica (cmc) del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO en disolución acuosa se determinó utilizando espectros de excitación de fluorescencia de pireno en calidad de sonda. Wilhelm, M., *et al.*, *Macromolecules* 24:1033-1040 (1991); Noda, T., *et al.*, *Macromolecules* 33:3694-3704 (2000). Este método se basa en el desplazamiento de los máximos de absorción 0-0 de pireno en agua, desde 334 nm hasta 337 nm, cuando se solubiliza pireno en una fase micelar.

La Figura 21 muestra los espectros de excitación para pireno en agua a diversas concentraciones de copolímero de PEO-PHB-PEO. Al aumentar la concentración de copolímero, se observó un desplazamiento hacia el rojo de la banda de absorción 0-0, desde 334 hasta 337 nm. La Figura 22 muestra la relación de intensidades  $I_{337}/I_{334}$  de espectros de excitación de pireno como una función del logaritmo de las concentraciones de copolímero. La representación de  $I_{337}/I_{334}$  frente a  $\log C$  presenta una curva sigmoideal. En el intervalo de baja concentración se observó un cambio insignificante en la relación de intensidades  $I_{337}/I_{334}$ . Al aumentar la concentración de copolímero, la relación de intensidades presentó un incremento sustancial a una concentración determinada, reflejando la incorporación de pireno en la región de núcleo hidrófobo de las micelas. Por lo tanto, el valor de cmc se determinó a partir del punto de cruce en el intervalo de baja concentración de la Figura 22. El valor de cmc muy bajo ( $1,4 \times 10^{-5}$  g/mL) indica una fuerte tendencia del copolímero tribloque hacia la formación de micelas en entorno

acuoso.

Se encontró, inesperadamente, que la formación de micelas es relativamente insensible a la temperatura. Como se muestra en la Figura 23, a temperaturas que abarcan de 15 a 45°C, la relación  $I_{337}/I_{334}$  depende principalmente de la concentración de copolímero, antes que de la temperatura. Por lo tanto, la formación de micelas del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO es relativamente insensible a la temperatura. Esto difiere bastante de los copolímeros tribloque que tienen un poli(ácido  $\alpha$ -hidroxialcanoico) central y bloques de PEO flanqueadores consistentes en PLLA o PGA, que suelen ser termosensibles. Jeong (2002); Kissel (2002); Jeong (1997); Jeong (1999)). Aunque no desean estar limitados por la teoría, los inventores creen que el PHB tiene mayor cristalinidad e hidrofobicidad que los poli(ácidos alfa-hidroxialcanoicos), por lo que la tendencia al autoensamblaje de los segmentos de PHB de los copolímeros de bloque es mucho más fuerte y no depende de la variación de temperatura.

En resumen, se ha demostrado la formación de micelas, insensible a la temperatura, de un nuevo copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO anfifilo biodegradable. Aunque el PHB tiene una estructura química relacionada con la del PLLA, el comportamiento de micelas del copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO es bastante diferente del copolímero tribloque de PEO-PLLA-PEO. Por tanto, las micelas formadas con el copolímero tribloque de PEO-PHB-PEO, que es difícil de disociar a baja temperatura, y tampoco es fácil de agregar para dar un tamaño mayor, a temperatura elevada, son más estables y se manejan fácilmente.

#### Ejemplo 6

##### Biocompatibilidad tisular *in vivo* de hidrogeles de $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO

Se inyectó intraarticularmente en las articulaciones de rodilla de tres conejos, hidrogel formado a partir de  $\alpha$ -CD y PEO-PHB-PEO (5.000-2.000-5.000) según el procedimiento del Ejemplo 2. Se empleó como testigo negativo disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se sacrificaron los animales a los 7 días de la inyección. Se extrajeron las articulaciones y se examinaron histológicamente. Las muestras se evaluaron de forma ciega.

En las Figuras 24a (testigo de PBS) y 24b (hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO) se muestran los resultados representativos de ensayos de biocompatibilidad *in vivo* del hidrogel en articulaciones de rodilla de conejos. Aunque había fibrosis leve en la sinovia expuesta al hidrogel de  $\alpha$ -CD-PEO-PHB-PEO, mostrada en la imagen de la Figura 24b, no existían diferencias significativas entre estas dos muestras. El análisis global mostró que no había infiltrado obviamente inflamatorio en la sinovia de la articulación después de la inyección del hidrogel. Los resultados demostraron la biocompatibilidad del hidrogel en la articulación de la rodilla de conejos. No hubo diferencias histológicamente y morfológicamente significativas entre las rodillas inyectadas con hidrogel y con PBS.

30

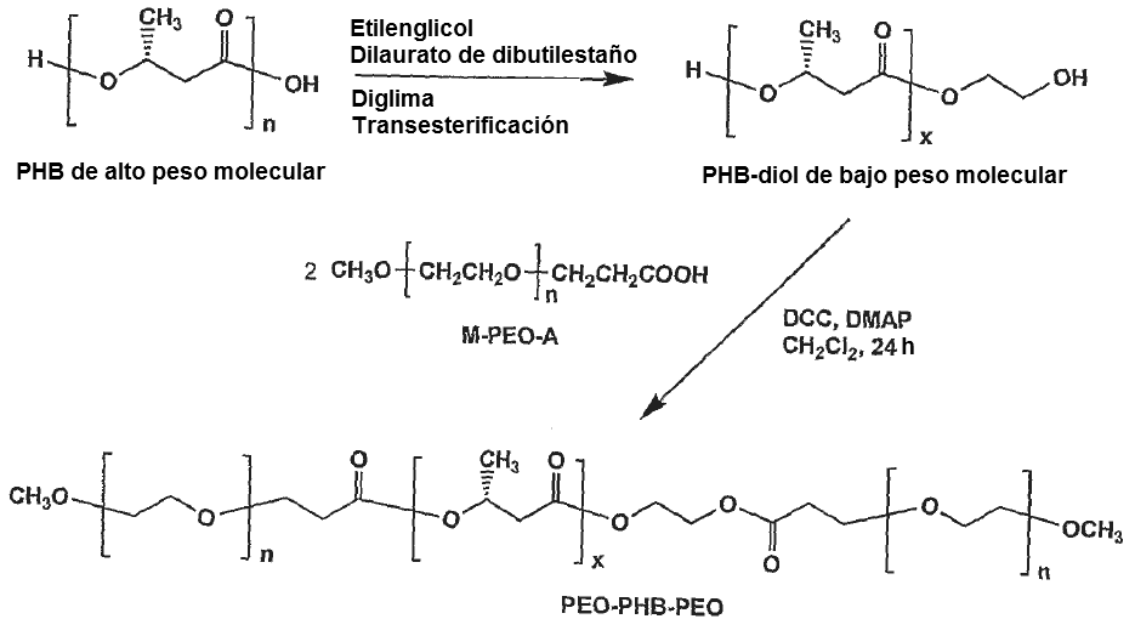
## REIVINDICACIONES

1. Un sistema para administración de fármacos, que comprende:
  - 5 un hidrogel formado a partir de ciclodextrina y un copolímero tribloque anfifílico que incluye un segmento medio de polímero de bloque B y dos segmentos terminales de polímero de bloque A, en donde el copolímero incluye un bloque de polímero A que comprende un poli(óxido de alquileno) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxialcanoato), y
    - una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico contenida íntimamente dentro del hidrogel;
    - 10 se selecciona el polímero de bloque B de poli(hidroxialcanoato) del grupo consistente en: poli[(R)-3-hidroxibutirato]; poli[(R)-4-hidroxibutirato]; poli[(R)-3-hidroxi valerato]; poli[(R)-3-hidroxibutirato]-co-poli[(R)-3-hidroxi valerato]; poli[(R)-3-hidroxihexanoato]; poli[(R)-3-hidroxiheptanoato]; enantiómeros (S) de cada uno de dichos enantiómeros (R); mezclas racémicas de dichos enantiómeros (S) y (R); y mezclas.
2. El sistema según la reivindicación 1, en donde se selecciona el polímero de bloque A de poli(óxido de alquileno) del grupo consistente en poli(óxido de etileno), poli(óxido de tetrametileno) y poli(tetrahydrofurano).
3. El sistema según la reivindicación 1, que comprende además una base acuosa farmacéuticamente aceptable.
4. El sistema según la reivindicación 1, en donde el sistema para administración de fármacos es inyectable y preferiblemente en donde el hidrogel es tixotrópico.
5. El sistema según la reivindicación 1, en donde el sistema proporciona liberación sostenida del al menos un agente terapéutico durante un período de al menos una semana después del inicio de la liberación del fármaco y preferiblemente de al menos dos semanas después del inicio de la liberación del fármaco.
6. El sistema según la reivindicación 1, en donde se selecciona el poli(hidroxialcanoato) del grupo consistente en: poli[(R)-3-hidroxibutirato]; poli[(R)-4-hidroxibutirato]; enantiómeros (S) de cada uno de dichos enantiómeros (R); mezclas racémicas de dichos enantiómeros (S) y (R); y sus mezclas; y muy preferiblemente el sistema según la reivindicación 1, en donde el poli(hidroxialcanoato) comprende poli[(R)-3-hidroxibutirato].
7. El sistema según la reivindicación 1, en donde el polímero de bloque A de poli(óxido de alquileno) es poli(óxido de etileno).
8. El sistema según la reivindicación 1, en donde el polímero de bloque A de poli(óxido de alquileno) y el polímero de bloque B de poli(hidroxialcanoato) tienen cada uno un peso molecular de 500 a 20.000; preferiblemente en donde el polímero de bloque A de poli(óxido de alquileno) y el polímero de bloque B de poli(hidroxialcanoato) tienen cada uno un peso molecular de 2.000 a 10.000; y más preferiblemente en donde el polímero de bloque B de poli(hidroxialcanoato) tiene un peso molecular de 3.000 a 2.500.
9. El sistema según la reivindicación 1, en donde la ciclodextrina está incluida a un nivel de 5% a 80% del peso del copolímero; preferiblemente en donde la ciclodextrina está incluida a un nivel de 5% a 50% del peso del copolímero.
10. El sistema según la reivindicación 1, en donde el hidrogel comprende una disolución acuosa que contiene el copolímero a un nivel de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% en peso; preferiblemente en donde el hidrogel comprende una disolución acuosa que contiene el copolímero a un nivel de aproximadamente 10% a aproximadamente 40% en peso.
11. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un polímero secundario que forma complejo con el agente terapéutico y/o lo conjuga.
12. El sistema según la reivindicación 11, en donde el polímero secundario es un polímero seleccionado del grupo consistente en poliésteres, poliuretanos, poliamidas, poliéteres, polisacáridos, poli(aminoácidos), polipéptidos y proteínas; preferiblemente en donde el polímero secundario es un polímero di- o monofuncional con segmentos de poli(etilenglicol).
13. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además nanoesferas de ADN.
14. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el copolímero tiene un peso molecular de entre 1.000 y 50.000, preferiblemente entre 5.000 y 35.000.
15. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde se selecciona el al menos un agente terapéutico del grupo consistente en péptidos, proteínas, moléculas pequeñas, genes, antígenos, anticuerpos y fragmentos de los mismos y proteínas recombinantes humanas, ADN, ARN y nanopartículas de ADN, preferiblemente en donde el al menos un agente terapéutico está en una forma macromolecular.

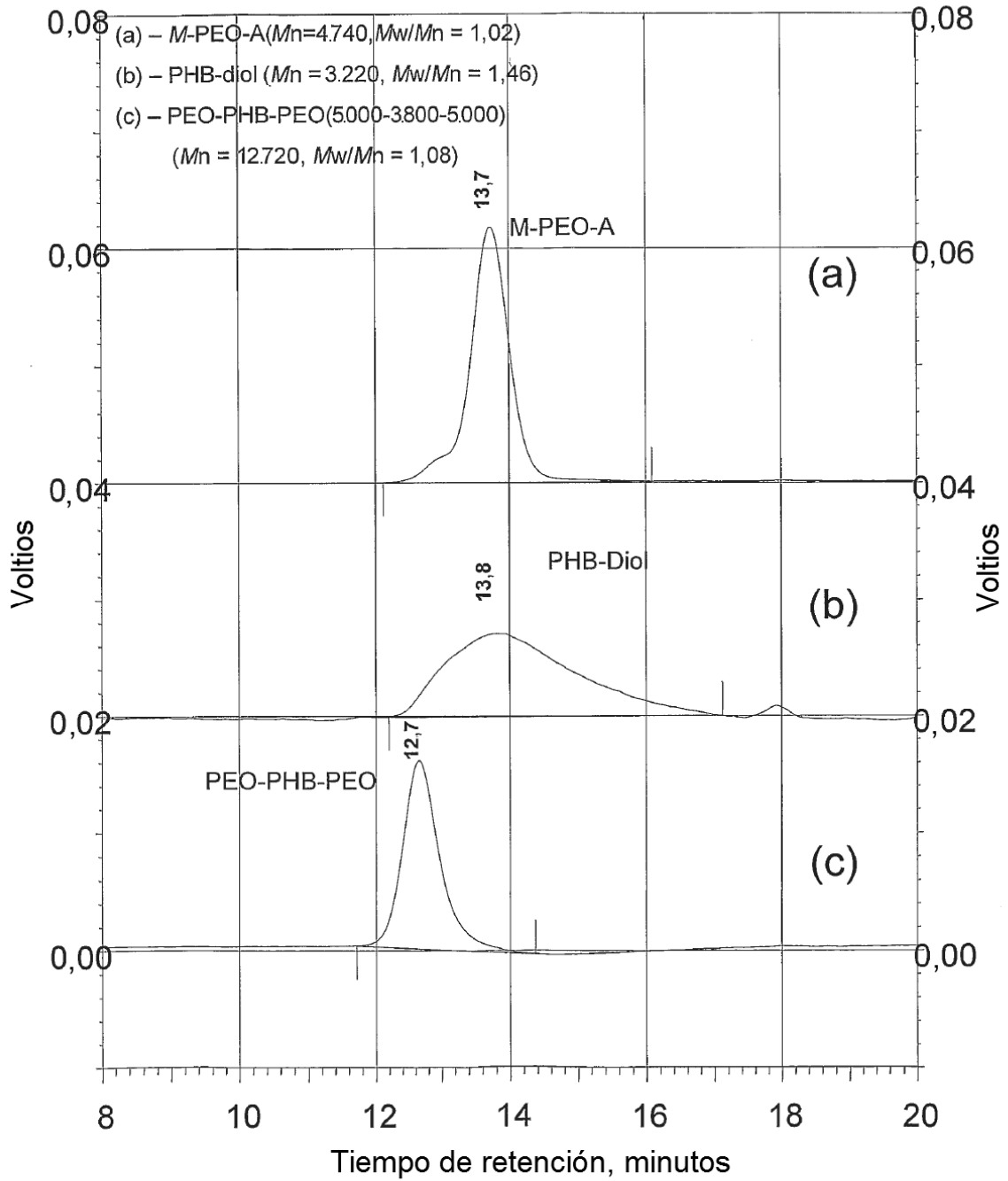
16. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde se selecciona el al menos un agente terapéutico del grupo consistente en analgésicos, anestésicos, fármacos antiartríticos, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, fármacos contra el asma, anticoagulantes, anticonvulsivos, antidepresivos, antidiabéticos, antineoplásicos, antipsicóticos, antihipertensivos, antibióticos, antihistamínicos, descongestionantes, antiinflamatorios, miorelajantes, fármacos antiparasitarios, fármacos antivíricos, agentes antireestenóticos, agentes antiespasmódicos, agentes condroprotectores, agentes antiadhesión, agentes anti-invasión por células tumorales, vasorrelajantes, vasoconstrictores e inmunosupresores, o en donde se selecciona el al menos un agente terapéutico del grupo consistente en péptidos, proteínas que incluyen citocinas, factores de crecimiento, factores de angiogénesis, receptores solubles, anticuerpos y fragmentos de los mismos y proteínas recombinantes humanas, moléculas pequeñas, genes, antígenos, incluidas vacunas, ADN, ARN y nanopartículas de ADN.
17. El sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde se aplica el hidrogel a un dispositivo implantable; preferiblemente en donde se selecciona el dispositivo implantable del grupo consistente en estents, catéteres, tubos para vías respiratorias, conductos, tornillos, placas, derivaciones, articulaciones artificiales, corazones artificiales, válvulas artificiales y otras prótesis.
18. El sistema para administración de fármacos según la reivindicación 1, en donde el poli(óxido de alquileo) comprende poli(óxido de etileno) y el poli(hidroxiálcanoato) comprende poli(hidroxi-butilato).
19. Un procedimiento para sintetizar un copolímero tribloque ABA anfífilo, que incluye poli(óxido de etileno) como polímero de bloque A y poli(3-hidroxiálcanoato) como polímero de bloque B, comprendiendo el procedimiento:
- convertir poli(3-hidroxiálcanoato) en poli(3-hidroxiálcanoato)-diol telequérico con un peso molecular de 500 a 20.000;
- producir ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico a partir de metoxi-poli(óxido de etileno); y
- acoplar el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol con el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico utilizando 1,3-diciclohexilcarbodiimida para producir el copolímero tribloque ABA.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en donde el poli(3-hidroxiálcanoato) es poli(3-hidroxi-butilato) y el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol es poli(3-hidroxi-butilato)-diol; o en donde se convierte el poli(3-hidroxiálcanoato) en poli(3-hidroxiálcanoato)-diol telequérico mediante una reacción de transesterificación con etilenglicol; o en donde se produce el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico haciendo reaccionar metoxi-poli(óxido de etileno) con anhídrido succínico en presencia de 4-(dimetilamino)piridina y trietilamina en 1,4-dioxano; o en donde se secan el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol y el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico antes del acoplamiento; o en donde se acoplan en cloruro de metileno seco el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol y el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico; o en donde se acoplan en cloruro de metileno seco, bajo una atmósfera de nitrógeno, el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol y el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico; o en donde se acoplan el poli(3-hidroxiálcanoato)-diol y el ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico con un exceso del ácido metoxi-poli(óxido de etileno)-monocarboxílico.
21. El procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además aislar el copolímero tribloque ABA utilizando disolventes mixtos seleccionados del grupo consistente en metanol/éter dietílico y cloroformo/éter dietílico.
22. Un sistema para administración de fármacos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende:
- micelas formadas a partir de un copolímero ABA anfífilo, en donde el copolímero incluye bloques de polímero A que comprenden un poli(óxido de alquileo) y un bloque de polímero B que comprende un poli(hidroxiálcanoato) seleccionado del grupo consistente en poli[(R)-3-hidroxi-butilato], poli[(R)-4-hidroxi-butilato], enantiómeros (S) de cada uno de dichos enantiómeros (R), mezclas racémicas de dichos enantiómeros (S) y (R), y sus mezclas; y
- una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico contenida íntimamente dentro de las micelas.
23. El sistema según la reivindicación 22, en donde las micelas son sustancialmente estables dentro de un intervalo de temperatura de 15°C a 45°C.



**Figura 1**



**Figura 2**



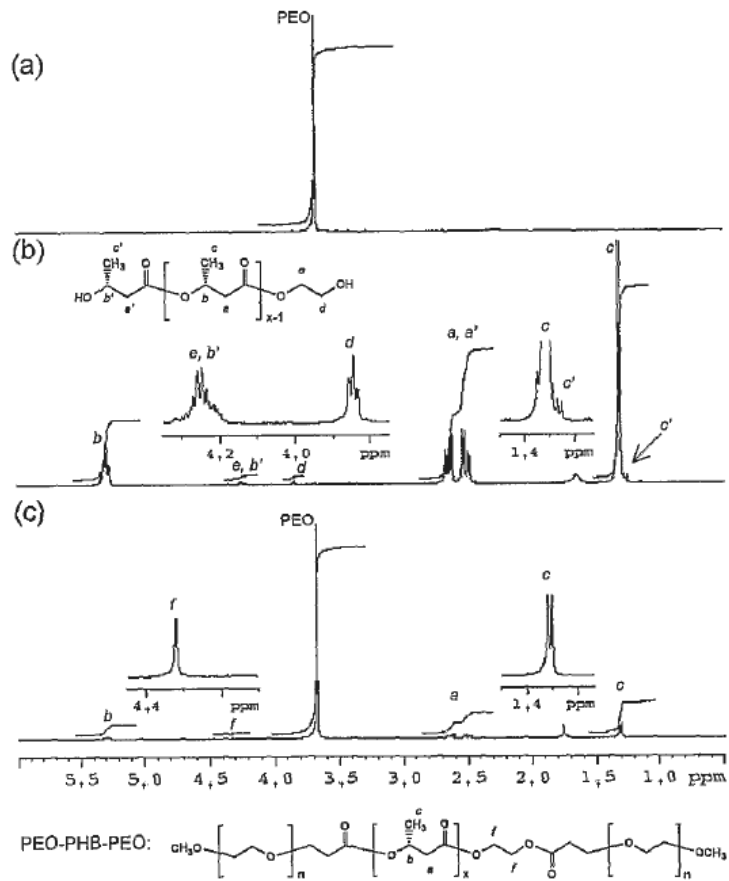
### Figura 3

(a) – M-PEO-A ( $M_n$  4.740)

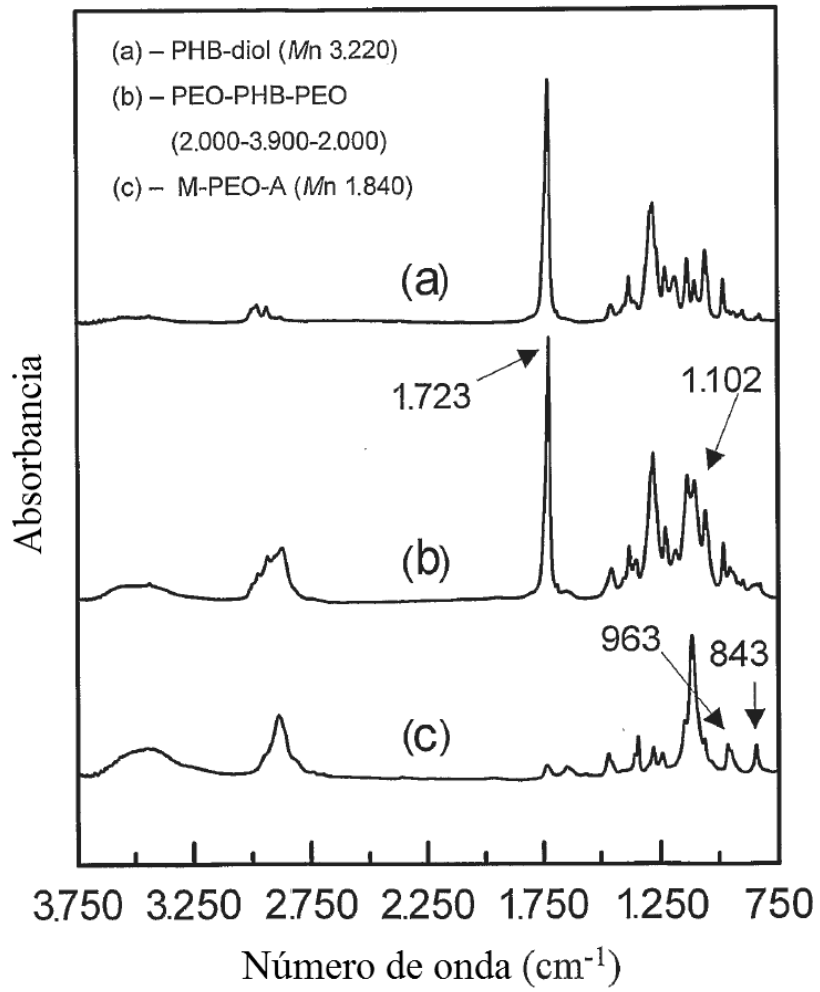
(b) – PHB-diol ( $M_n$  3.220)

(c) – PEO-PHB-PEO

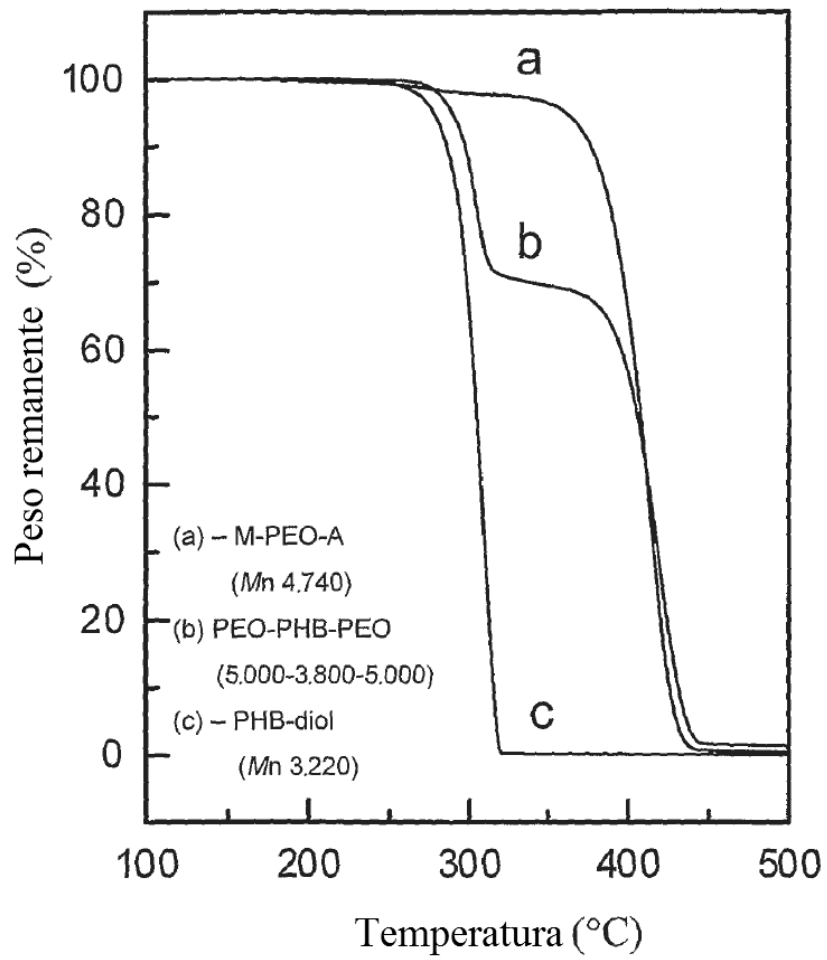
(5.000-3.800-5.000)



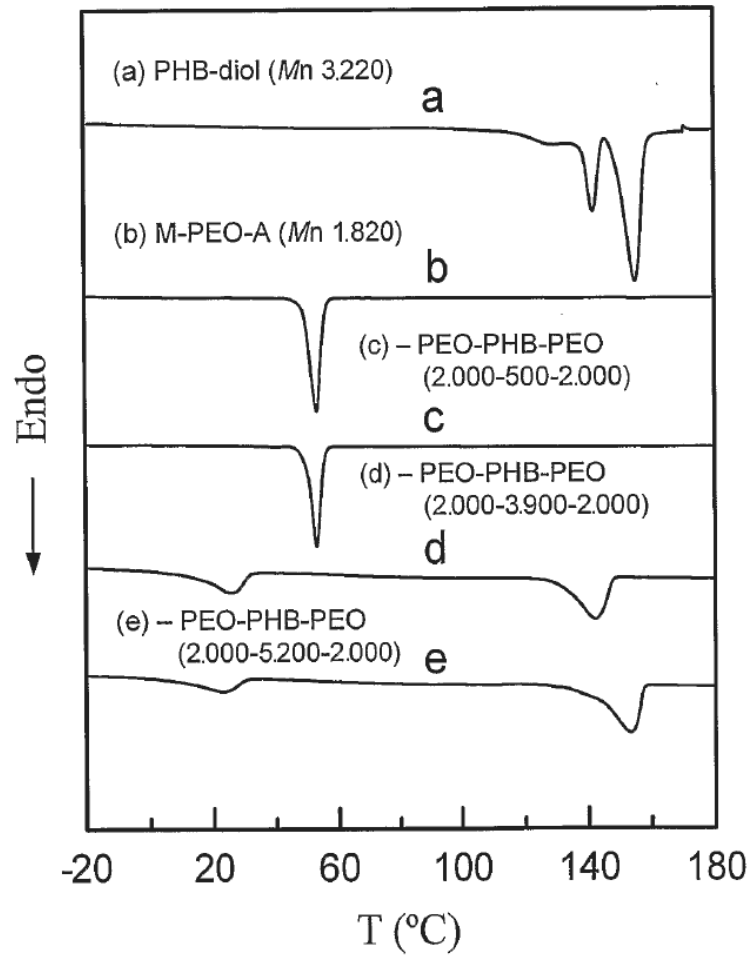
**Figura 4**



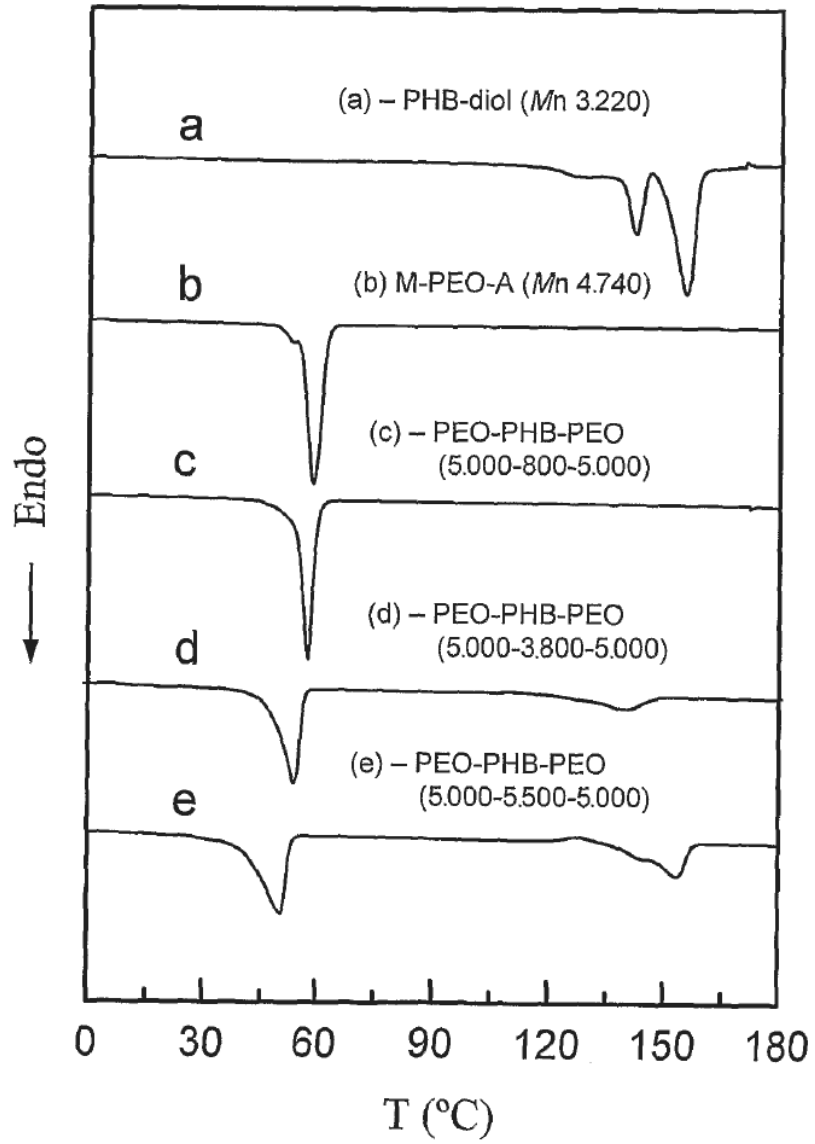
**Figura 5**



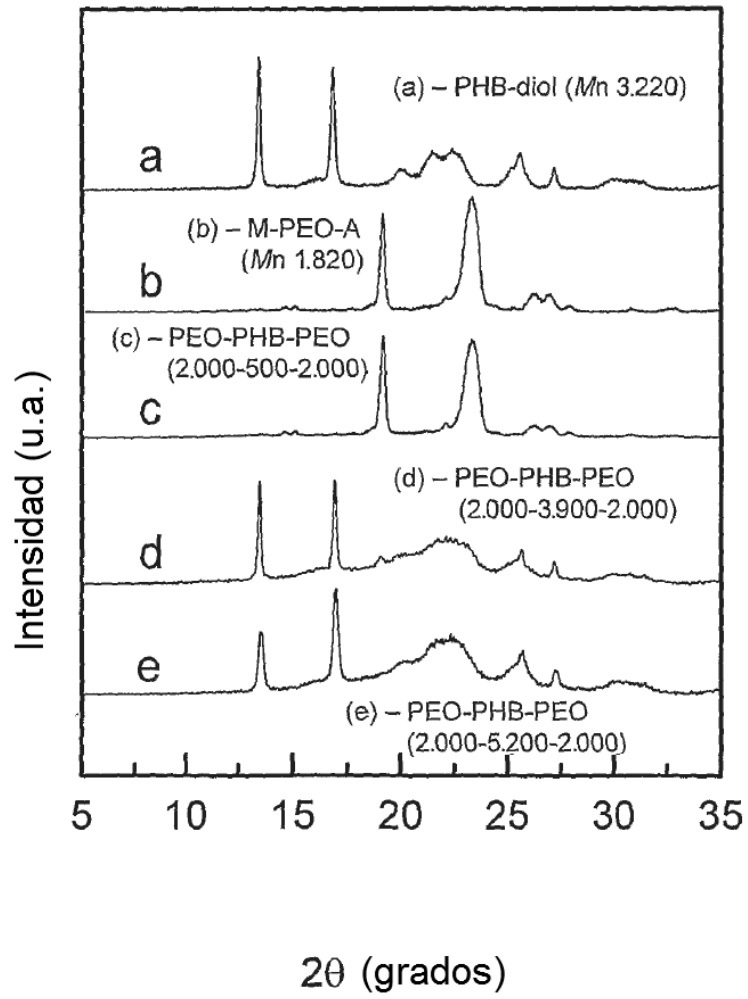
**Figura 6**



**Figura 7**

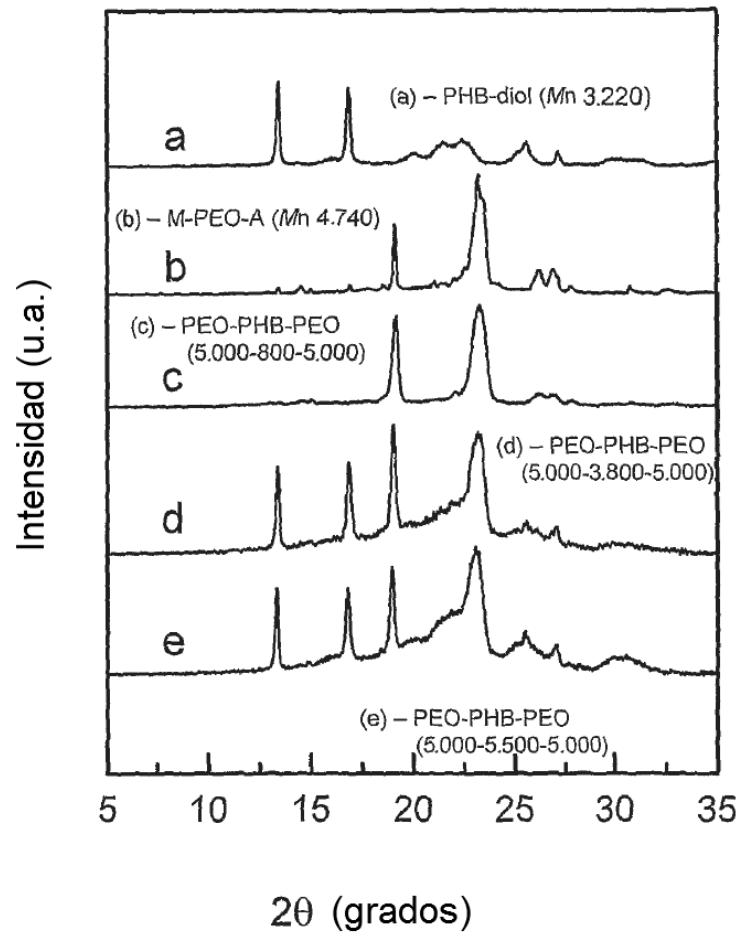


**Figura 8**

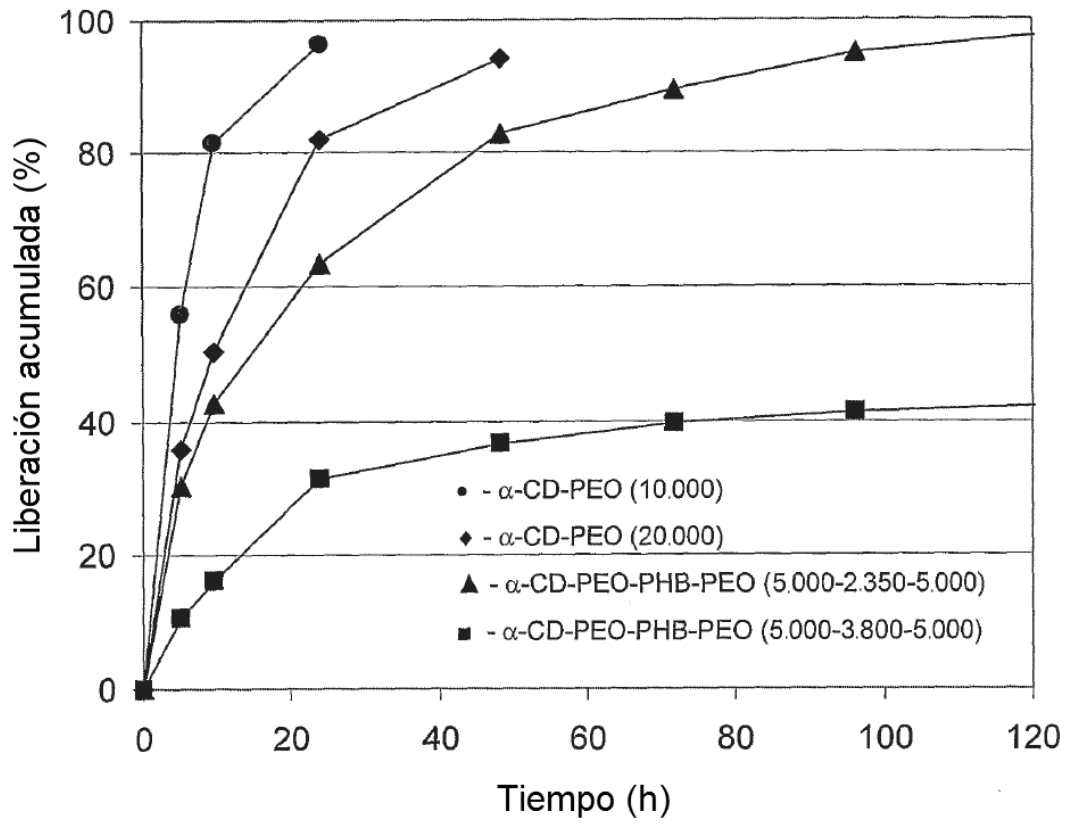




**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

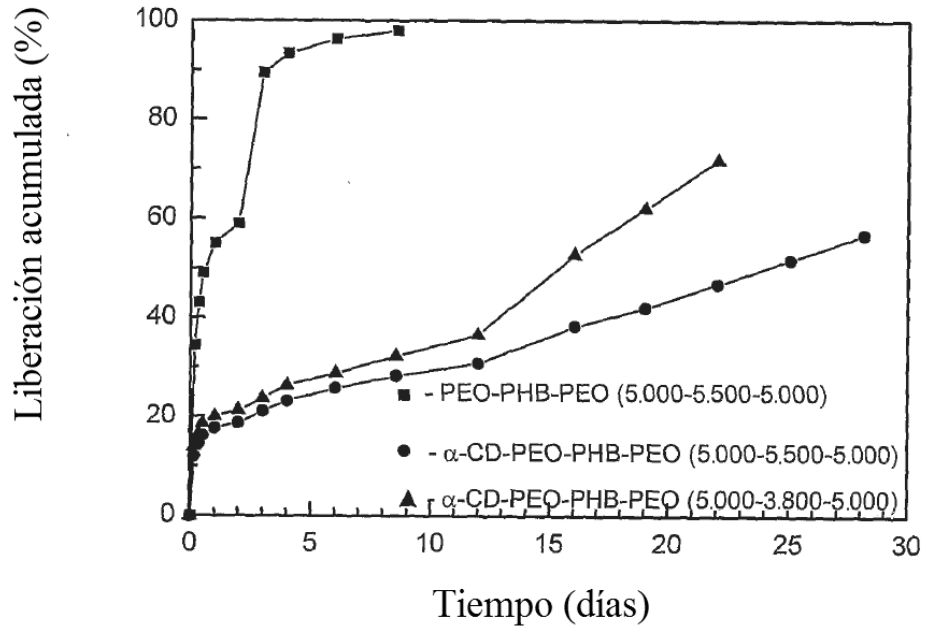
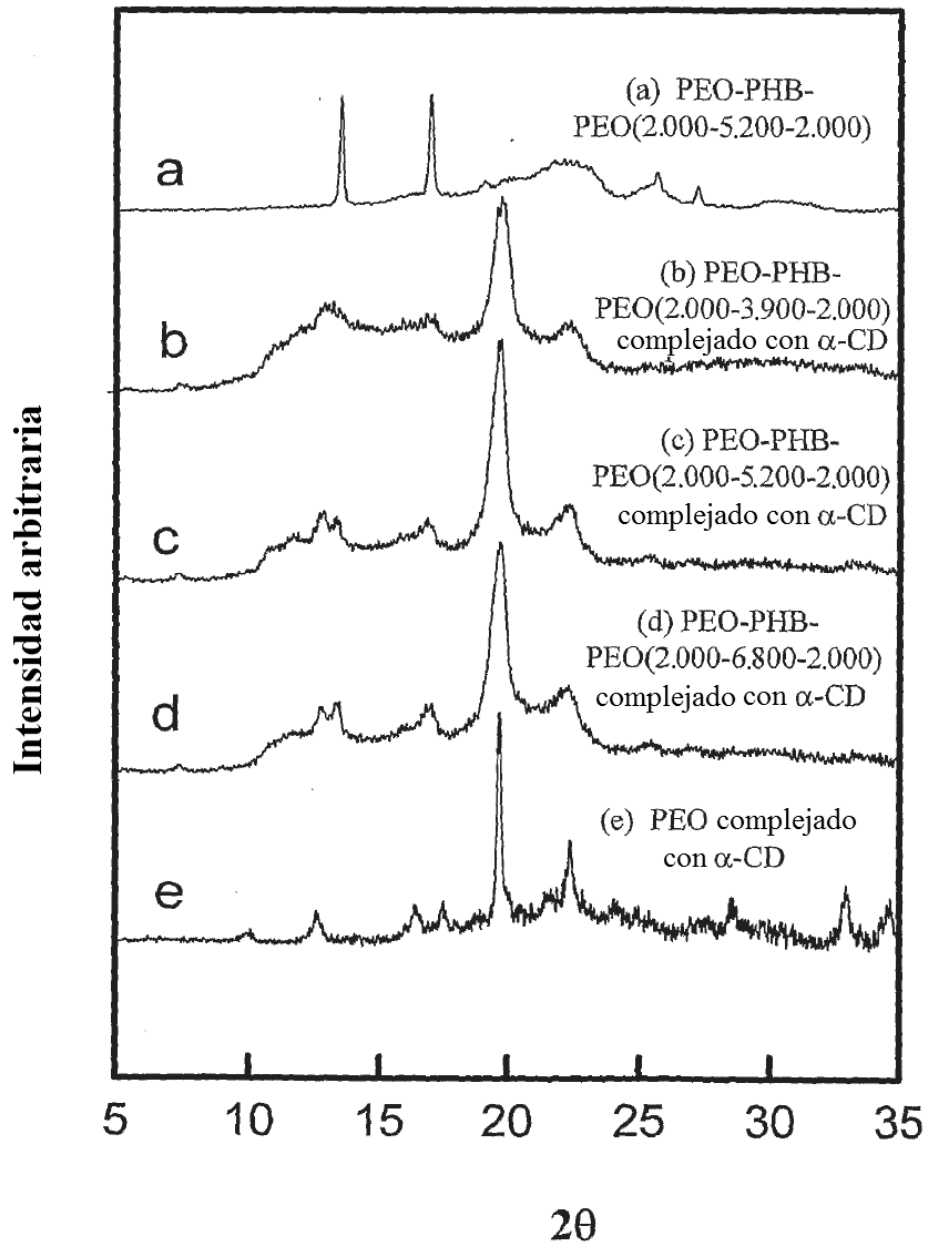
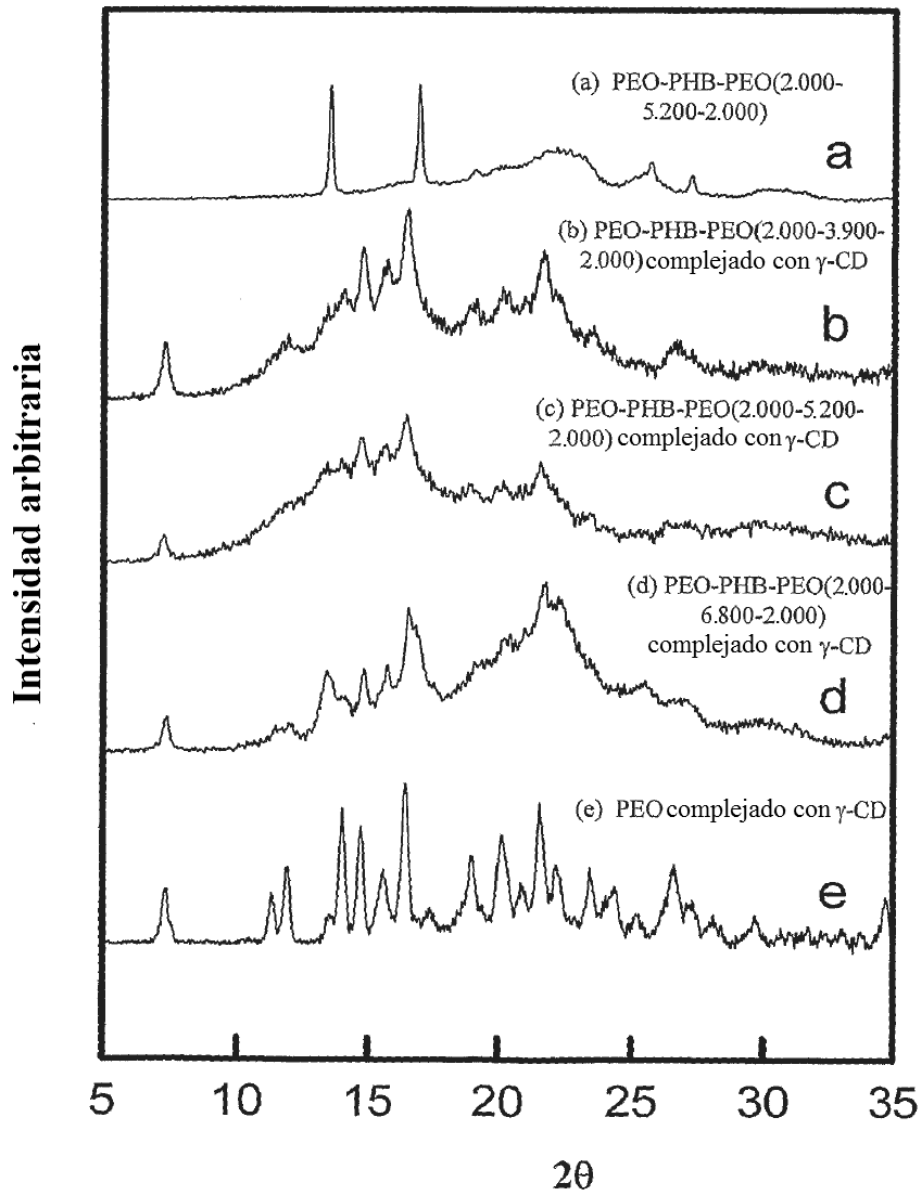


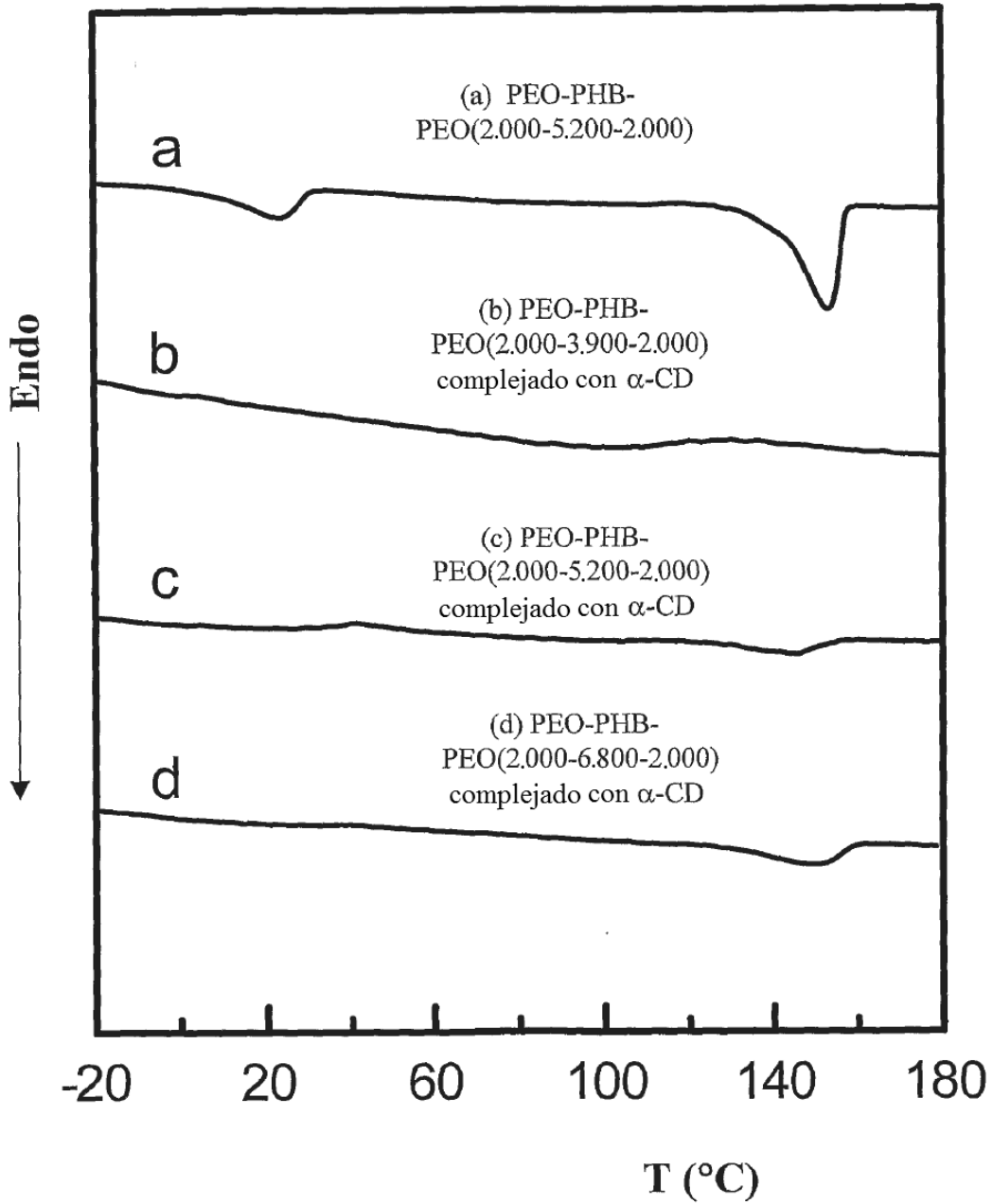
Figura 12



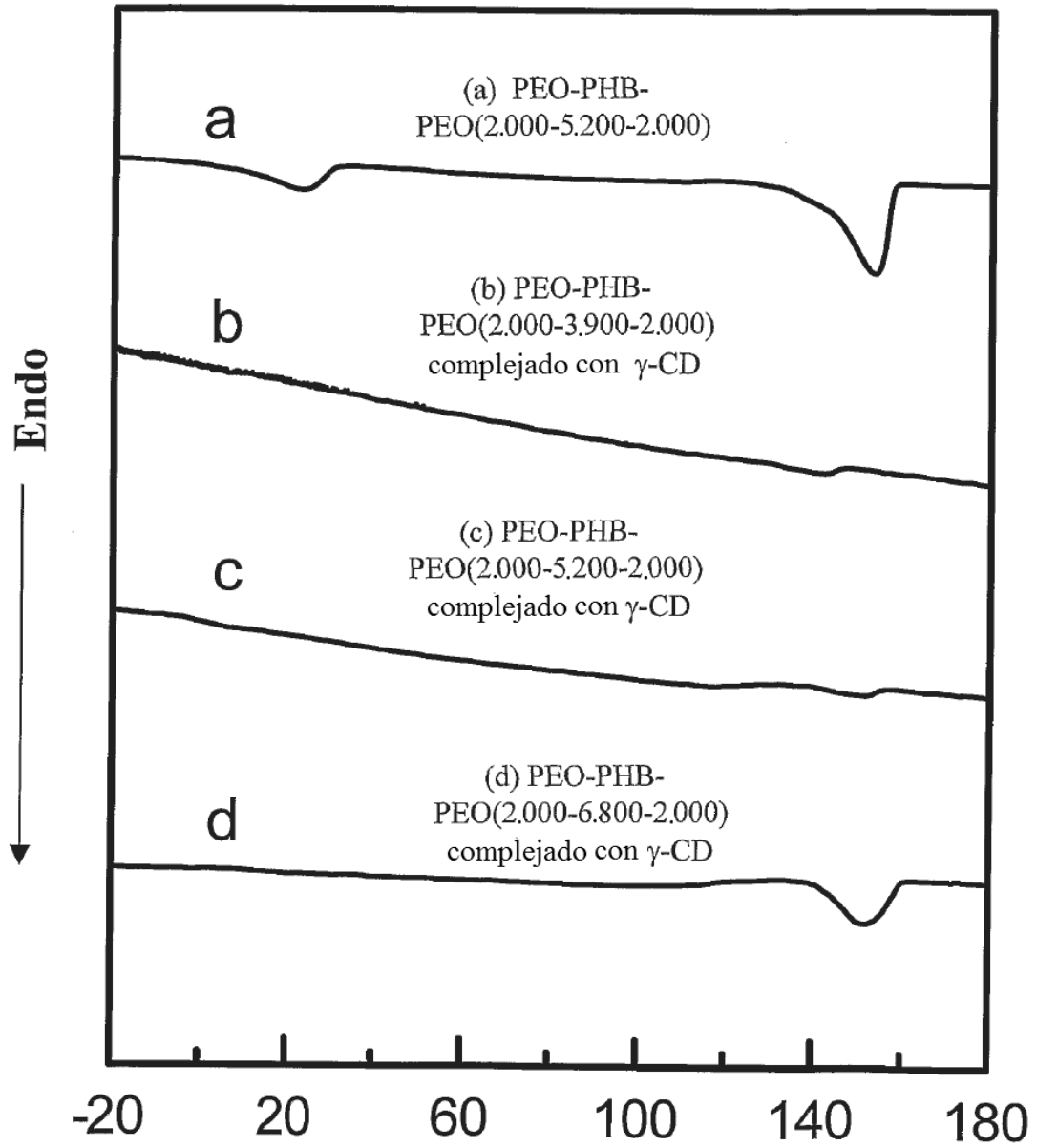
**Figura 13**



**Figura 14**



**Figura 15**



**Figura 16**

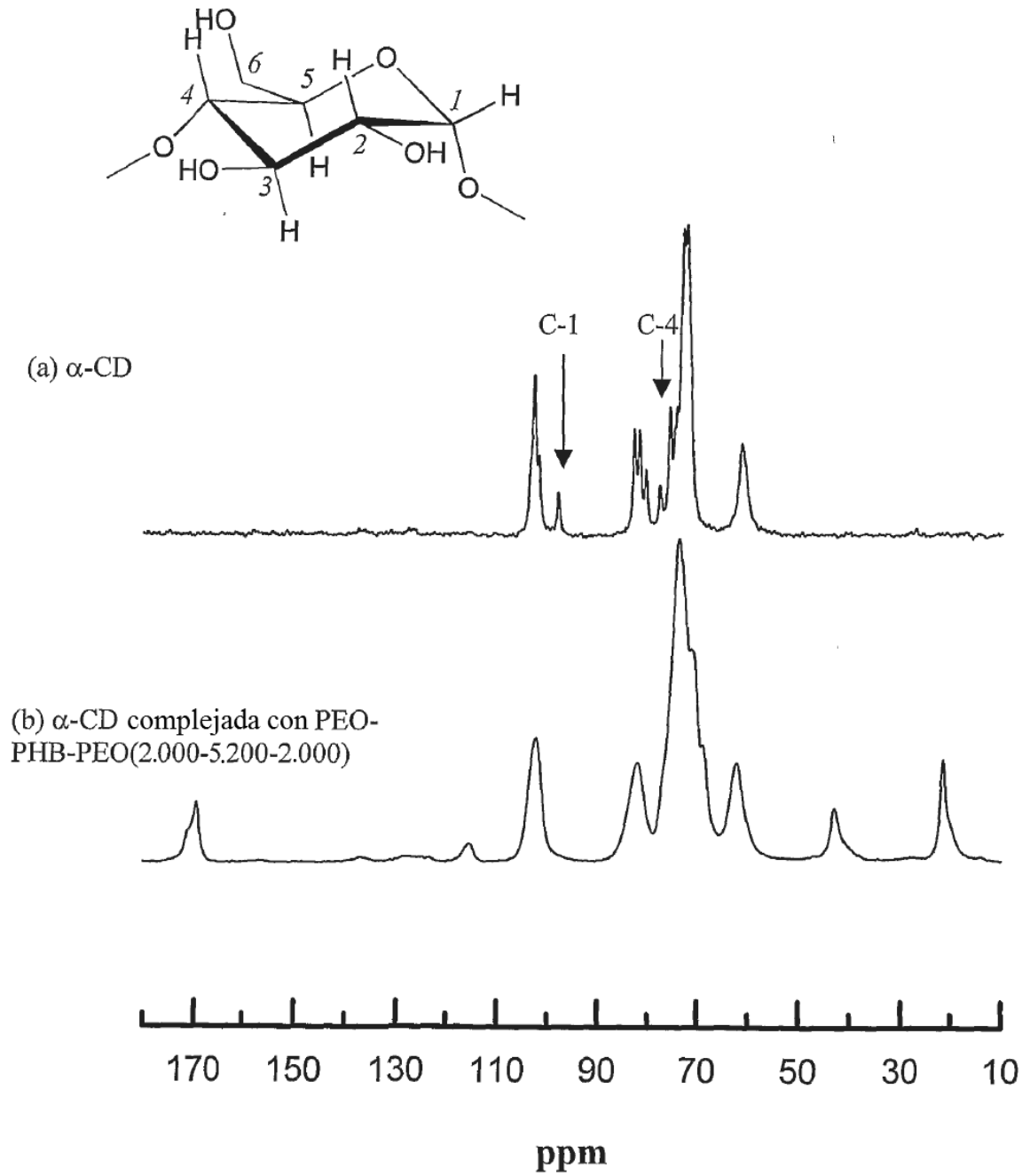
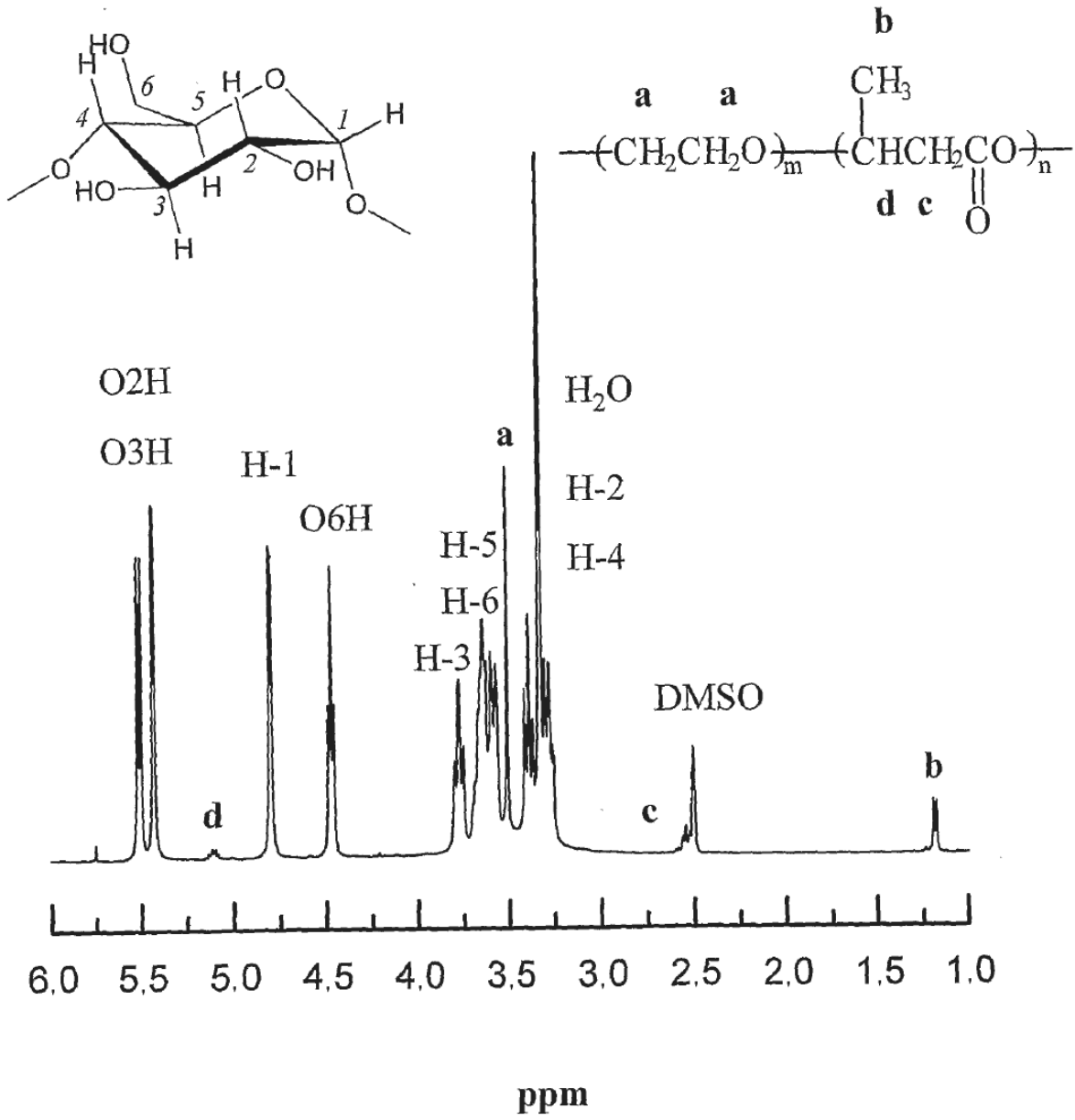
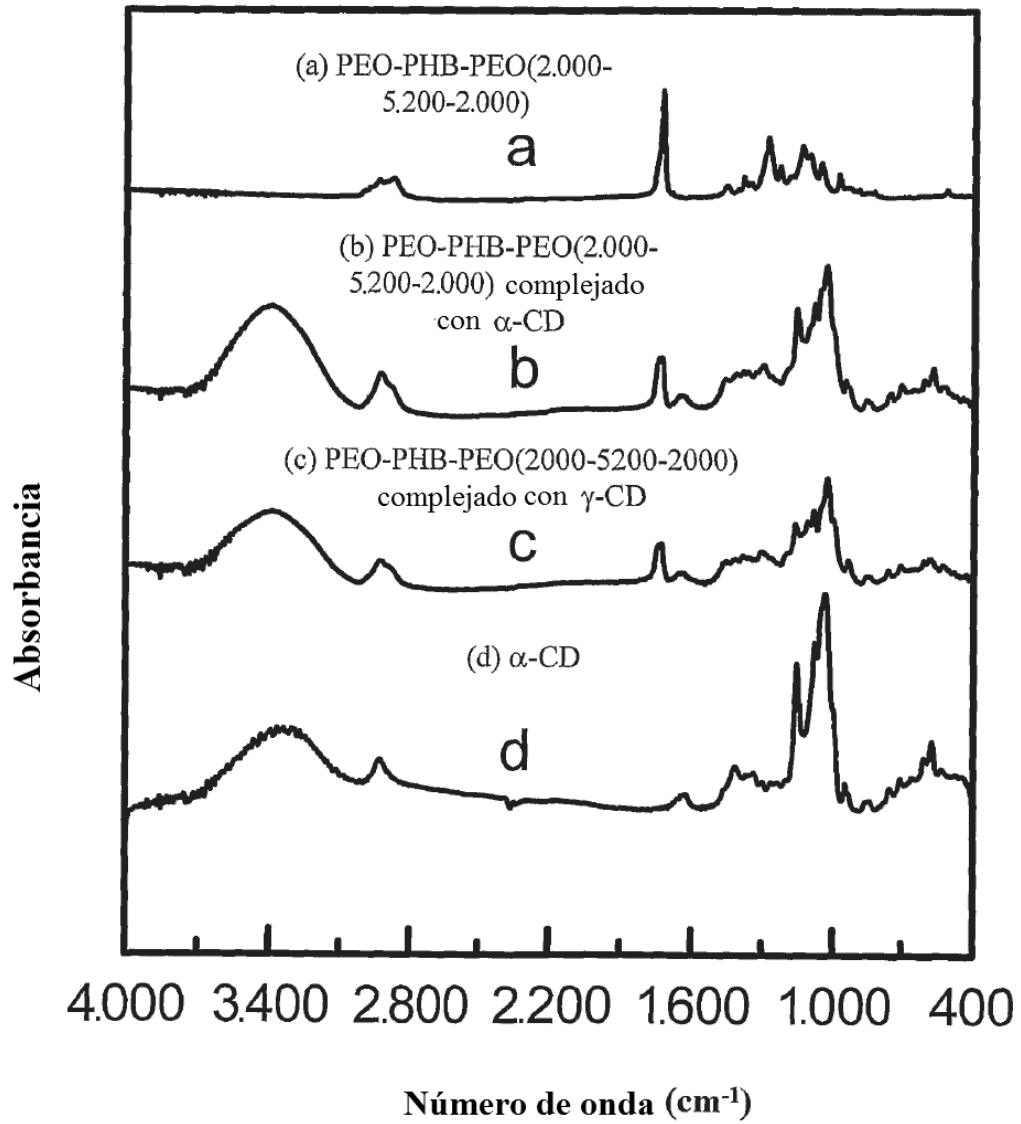




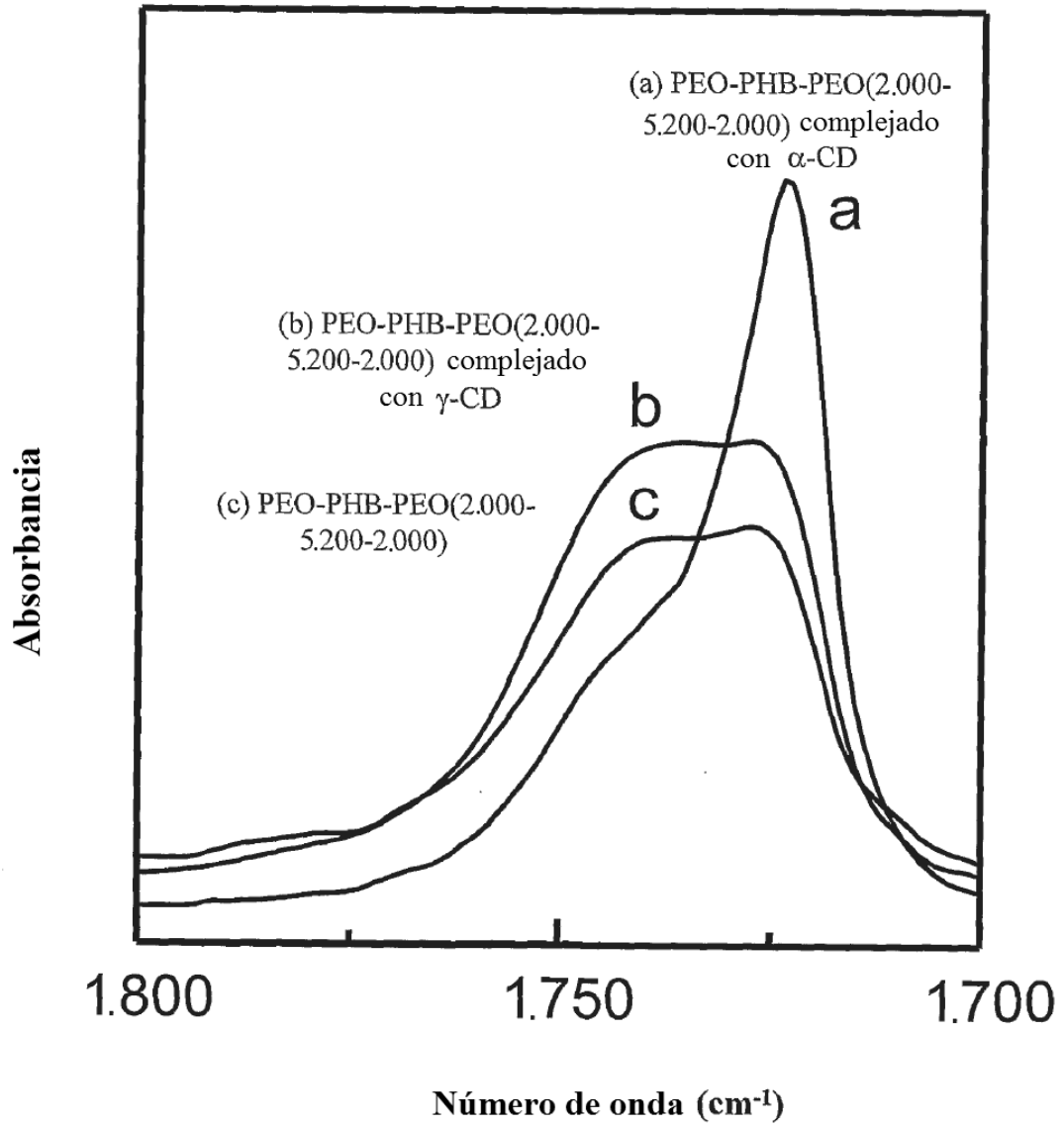
Figura 17



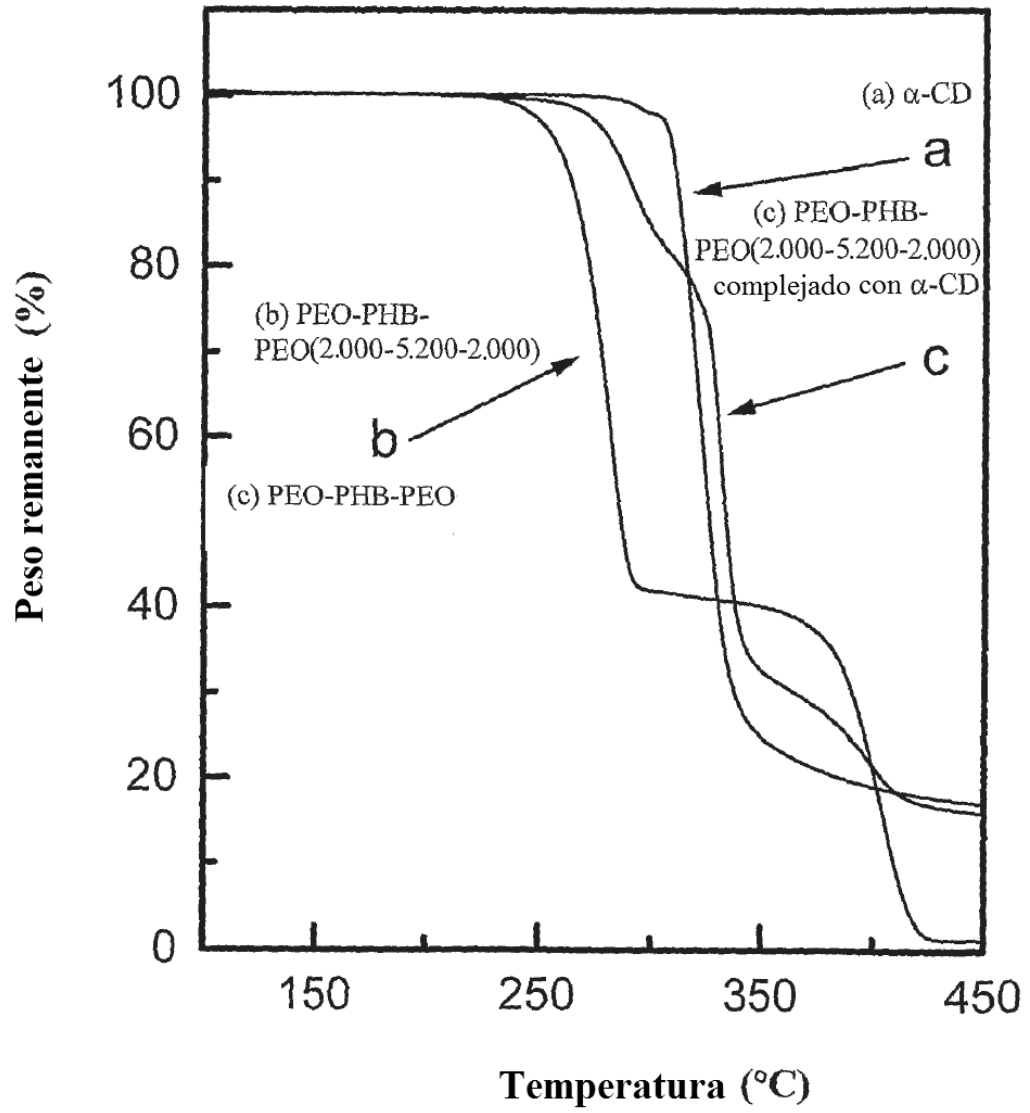
**Figura 18**



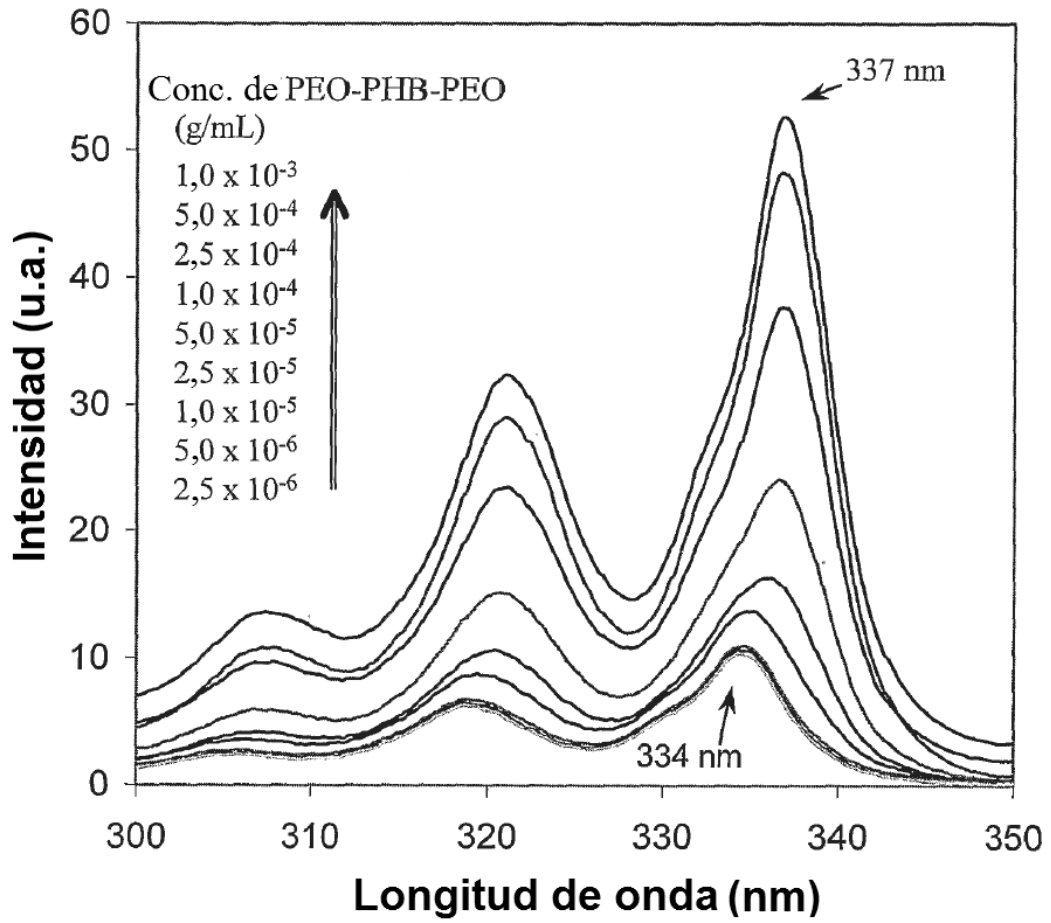
**Figura 19**



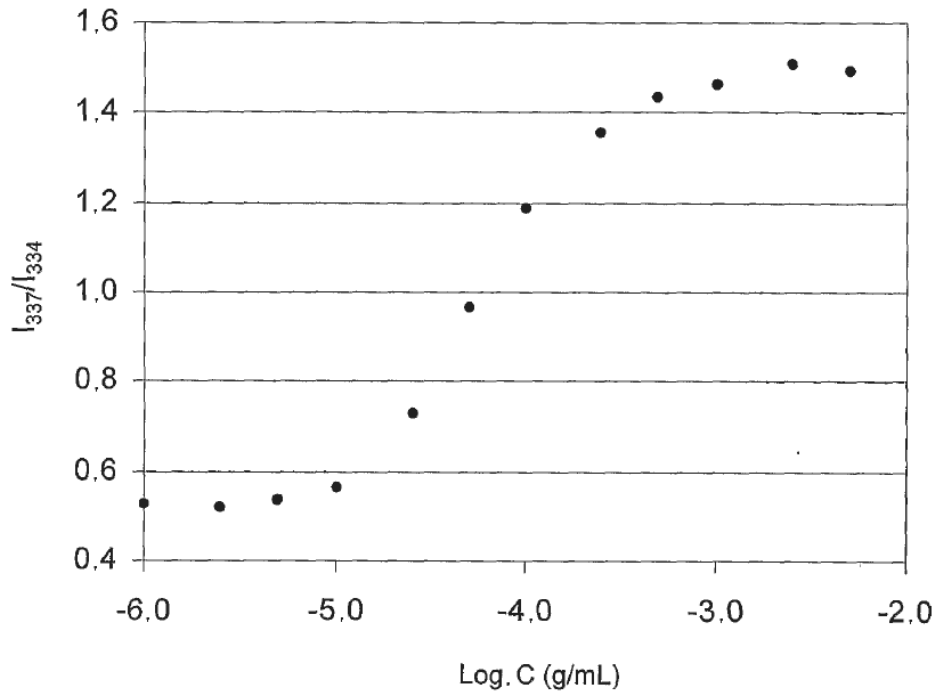
**Figura 20**



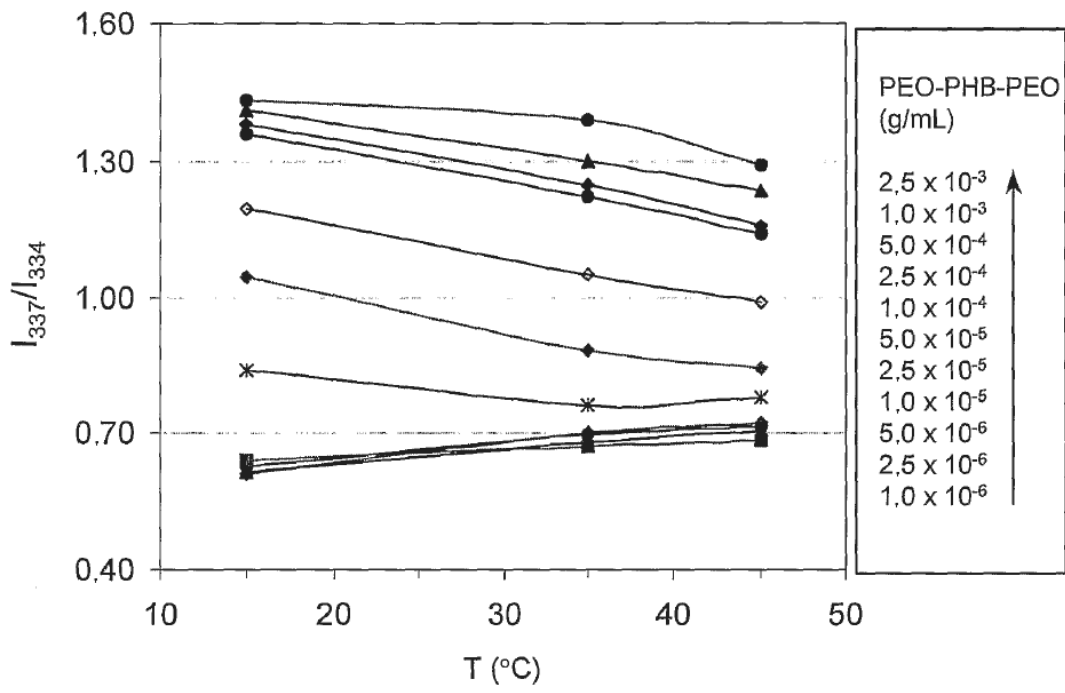
**Figura 21**



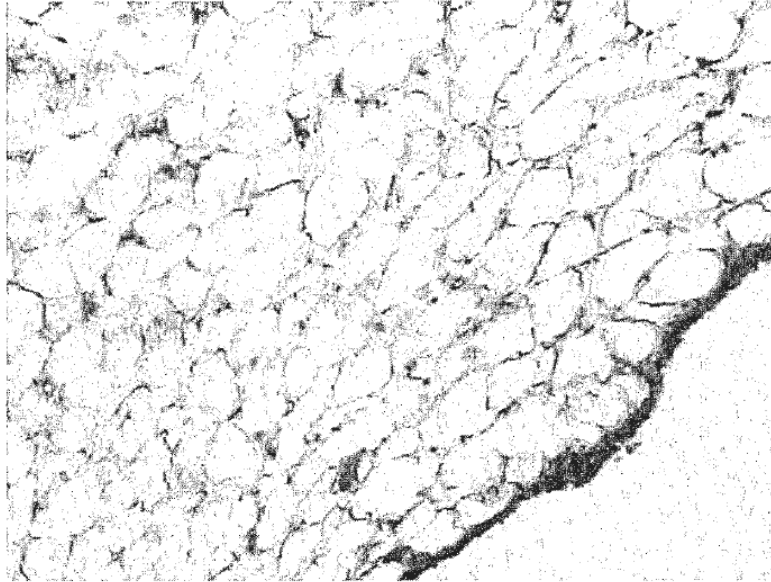
**Figura 22**



**Figura 23**



**Figura 24a**



**Figura 24b**

