

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 282**

51 Int. Cl.:

**C08F 297/00** (2006.01)

**C08F 26/10** (2006.01)

**C08F 265/04** (2006.01)

**C08G 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2004 E 04802251 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **23.08.2006 EP 1692200**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de copolímeros de bloque de poli(N-vinil-2-pirrolidona) anfífilos**

30 Prioridad:

**02.12.2003 US 727083**

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

**11.02.2013**

73 Titular/es:

**LABOPHARM INC. (100.0%)  
6111 Royalmount Ave., Suite 102  
Montreal, Quebec H4P 2T4, CA**

72 Inventor/es:

**LUO, LAIBIN;  
LESSARD, DAVID;  
GORI, SANDRA;  
RANGER, MAXIME;  
WANG, YUAN;  
LAFRENIERE, JULIE;  
MEUNIER, JEAN-FRANÇOIS;  
BIBEAU, GENEVIÈVE;  
LEBRUN, FREDERIC y  
LIU, LU, WEI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 395 282 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

Procedimiento para la preparación de copolímeros de bloque de poli(N-vinil-2-pirrolidona) anfífilos

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere en general a procedimientos para la preparación de copolímeros de bloque; en particular a procedimientos para la preparación de copolímeros de bloque por una polimerización en dos etapas y lo más en particular a procedimientos para preparar copolímeros dibloque y tribloque que comprenden las etapas de: (a) realizar una polimerización de radicales de N-vinil-2-pirrolidona en presencia de un iniciador de radicales, un agente de transferencia de cadena (opcionalmente) y un disolvente alcohólico para formar poli(N-vinil-2-pirrolidona) terminada en hidroxilo y (b) realizar una polimerización iónica de monómeros o comonómeros en presencia de un catalizador o base y un macroiniciador en la que dicho macroiniciador es la poli(N-vinil-2-pirrolidona) terminada en hidroxilo formado en la etapa (a) preparando de este modo dichos copolímeros de dibloque y tribloque. La poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) tiene un peso molecular de entre 1.000 D y 700 kD y los copolímeros dibloque y tribloque tienen un peso molecular de entre 2.000 D y 700 kD.

**Antecedentes de la invención**

15 La síntesis de polímeros bien definidos con funcionalidades terminales de cadena controladas es importante para el logro de la nanotecnología. Estos polímeros han sido especialmente importantes como vehículos de liberación de fármacos potenciales. En la última década, el uso de diversas polimerizaciones controladas ha dado como resultado copolímeros bien definidos con diferentes diseños. Por ejemplo, la polimerización mediada por nitróxido, la polimerización de radicales de transferencia de cadena de fragmentación por adición reversible mediada por componente ditio y de transferencia de átomos (ATRP) son procedimientos controlados, que ofrecen un control sobre el peso molecular y la arquitectura molecular (copolímeros dibloque, de injerto o cónicos). Sin embargo, unos pocos monómeros, tales como acetato de vinilo y N-vinil-2-pirrolidona (VP) no forman radicales estabilizados por resonancia y efectos inductivos, y por lo tanto la polimerización de estos monómeros no se ha realizado aún eficazmente por polimerizaciones de radicales controladas. Matyjaszewski et al. (Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 685:258 1998 y J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 36:823-830 1998) informaron de la homopolimerización de VP usando Me<sub>4</sub>Cyclam como ligando. Las funcionalidades terminales de cadena fueron difíciles de obtener usando la vía sintética descrita por Matyjaszewski et al.

30 Los presentes inventores están interesados en una poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) funcionalizada y bien definida como sustitución para poli(etilenglicol) (PEG) en diversos sistemas de liberación de fármaco. Aunque varios copolímeros dibloque o tribloque pueden formar micelas en solución acuosa, pocos de ellos son realmente adecuados como vehículos de fármacos debido a problemas de biocompatibilidad [Alexandridis et al. Current Opinion Colloid & Interface Science 2:478-489 1997; Rapoport et al. J Pharm. Sci. 91:157-170 2002; Kabanov et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 54:223-233 2002; Nishiyama et al. Langmuir 15:377-383 1999; Kakizawa et al. Langmuir 18:4539-4543 2002; Katayose et al. Bioconjugate Chem. 8:702-707 1997; Yamamoto et al. J. Controlled Release 82:359-371 2002; Liggins et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 54:191-202 2002; Kim et al. J. Controlled Release 72:191-202 2001; Yoo et al. J. Controlled Release 70:63-70 2001; Luo et al. Bioconjugate Chem. 13:1259-1265 2002; Lim Soo et al. Langmuir 18:9996-10004 2002; Gref et al. Science 263:1600-1603 1994 y Burt et al. Colloids Surf. B 16:161-171 1999]. Muchos estudios han informado del uso de copolímeros de bloque poliéster-bloque-poli(etilenglicol) [Yamamoto et al.; Liggins et al.; Kim et al.; Yoo et al.; Luo et al.; Lim Soo et al.; Gref et al. and Burt et al. citas de revistas, supra]. El PEG se usa ampliamente como brazo hidrófilo sobre la superficie de nanopartículas [Kissel et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 99-134 2002], liposomas [Gabizon et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 24:337-344 1997] y micelas poliméricas [Jones et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 48:101-111 1999; Kataoka et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 47:113-131 2001 y Kabanov et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 54:759-779 2002]. El armazón externo a base de PEG puede evitar, de hecho, la incorporación del nanovehículo por el sistema fagocítico mononuclear por medio de efectos estéricos [Jones et al.; Kataoka et al. y Kabanov et al. citas de revistas; supra]. Esta prevención mejora sustancialmente el tiempo de circulación de las micelas poliméricas en el torrente circulatorio. En el tratamiento del cáncer, este tiempo prolongado, en general, da como resultado una acumulación selectiva en un tumor sólido debido a la permeabilidad potenciada y al efecto de retención de los endotelios vasculares en el sitio del tumor [Yokoyama et al. Cancer Res. 50:1693-1700 1990; Yokoyama et al. Cancer Res. 51:3229-3236 1991; Kwon et al. J. Controlled Release 29:17-23 1994; Yokoyama et al. J. Controlled Release 50:79-92 1998 y Yamamoto et al. J. Controlled Release 77:27-38 2001]. Sin embargo, debido a que se produce la agregación de nanopartículas con PEG como corona durante la liofilización, aparecen algunas limitaciones. Por tanto, el PEG no es adecuado idealmente para un uso eficaz en sistemas de liberación de fármaco.

55 La PVP funcionalizada y bien definida es un componente ideal para la sustitución del PEG en sistemas de liberación de fármaco. Se ha comprobado que la PVP es biocompatible [Haaf et al. Polymer J. 17:143-152 1985] y se ha usado de forma extensa en la industria farmacéutica. En particular, se puede usar la PVP como crioprotector [Doebbler et al. Cryobiology 3:2-11 1966] y lioprotector [Deluca et al. J. Parent. Sci. Technol. 42:190-199 1988]. Por tanto, la sustitución de PEG por PVP en sistemas de liberación de fármaco podría ayudar a superar algunos problemas de secado por congelación.

Torchilin et al. [J. Microencapsulation 15:1-19 1998] promoviendo el estudio de PVP como corona hidrófila de liposomas. El diseño de micelas poliméricas con armazón externo de PVP ha presentado características prometedoras para usos farmacéuticos. Así, Benahmed et al. [Pharm. Res. 18:323-328 2001] informaron de la preparación de micelas a base de PVP que consisten en copolímeros dibloque degradables. En el trabajo de Benahmed et al. , la síntesis de PVP usando 2-isopropoxietanol como agente de transferencia de cadena se inspiró a partir del trabajo previo de Ranucci et al. [Macromol. Chem. Phys. 196:763-774 1995 y Macromol. Chem. Phys. 201:1219-1225 2000]. Sin embargo, este procedimiento sintético produjo una ausencia de control sobre el peso molecular, y no proporcionó cuantitativamente PVP terminada en hidroxilo, lo que es esencial para polimerizar el DL-láctido [Benahmed et al. Pharm Res. 18:323-328 2001]. Además, resultó que la retirada de 2-isopropoxietanol del polímero era difícil debido a su alto punto de ebullición (42-44 °C a 13 mmHg) y su unión a PVP por medio de un enlace de hidrógeno [Haaf et al. Polymer J. 17:143-152 1985]. El atrapamiento de alcohol dentro del polímero podría provocar problemas para reacciones posteriores que requieren condiciones anhidras y apróticas, tales como la síntesis de poli(D,L-láctido). Sanner et al. [Proceeding of the International Symposium on Povidone, University of Kentucky: Lexington, KY, 1983, p. 20] informaron de la síntesis de oligómeros de PVP terminados en hidroxilo por medio de polimerización de radicales libres en alcohol isopropílico (IPA), usando hidroperóxido de cumeno como iniciador. Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H han mostrado que eran grupos 1,3 terminales de 2-hidroxiisopropilo por cadena. Se sugiere que se produjo la terminación significativa por combinación bimolecular, a sea entre un radical de disolvente principal y las cadenas de propagación [Liu et al. Macromolecules 35:1200-1207 2002].

La patente de los EE. UU. 6.338.859 (Leroux et al.) divulga una clase de copolímeros de poli(N-vinil-2-pirrolidona)-bloque-poliéster. Estos copolímeros de bloque de PVP representan nuevos sistemas micelares poliméricos biocompatibles y degradables que no contienen PEG, pero que presentan propiedades adecuadas como vehículos de fármaco. La PVP muestra una diversidad remarcable de interacciones hacia cosolutos no iónicos e iónicos. Antes de la divulgación por Leroux et al., sólo se había descrito un copolímero de injerto aleatorio, poli(N-vinil-2-pirrolidona)-injerto-poli(L-láctido) en la literatura [Eguiburu et al. Polymer 37:3615-3622 1996].

En la síntesis del copolímero dibloque anfífilo divulgada por Leroux et al., la PVP terminada en hidroxilo se preparó por polimerización de radicales usando 2-isopropoxietanol como agente de transferencia de cadena. Se obtuvo el copolímero de bloque por polimerización de apertura de anillo aniónica. Aunque la estrategia de Leroux et al. funciona muy bien para la preparación de los copolímeros dibloque anfífilos deseados en el laboratorio, quedan por resolver varios problemas para lograr un procedimiento escalable. El uso de éter corona y la necesidad de diálisis y ultra-centrifugación para la purificación de copolímeros no son deseables a escala industrial. Además, en el procedimiento divulgado por Leroux et al., no se evaluó el grado de funcionalización de PVP terminada en hidroxilo.

Lo que falta en la técnica es un procedimiento para preparar PVP terminada en hidroxilo, y el uso de dicha PVP funcionalizada para preparar copolímeros de bloque PVP-bloque-poliéster anfífilos así como otros copolímeros dibloque o tribloque que consisten en PVP como un bloque; en el que el peso molecular, el índice de polidispersidad y la funcionalidad de la PVP se pueden controlar y en el que el procedimiento se puede llevar a cabo en una escala industrial.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de polimerización en dos etapas para preparar PVP terminada en hidroxilo y PVP-bloque-poliéster anfífilo así como otros copolímeros dibloque o tribloque que consisten en PVP como un bloque. El procedimiento permite el control del peso molecular, la polidispersidad y la funcionalidad de la PVP. Los copolímeros dibloque y tribloque de la presente invención se pueden sintetizar en una escala industrial para la utilización en sistemas de liberación de fármaco.

El procedimiento de la presente invención comprende una polimerización en dos etapas. La primera etapa comprende polimerización de radicales libres de VP en presencia de un iniciador de radicales y un disolvente alcohólico dando como resultado la síntesis de una PVP de bajo peso molecular con un grupo hidroxilo terminal (PVP-OH) en presencia de un iniciador de radicales, un agente de transferencia de cadena y un disolvente alcohólico. La PVP-OH nuevamente sintetizada se purifica por reprecipitación. El peso molecular de la PVP-OH se puede afinar y controlar eficazmente ajustando las proporciones molares del iniciador de radicales, el agente de transferencia de cadena y el alcohol con respecto a VP. Con el uso de concentraciones más altas, se favorece la recombinación de cadenas de polímeros de modo que se puede obtener selectivamente una PVP con un grupo hidroxilo en ambos extremos de cada cadena de polímeros (HO-PVP-OH). Los ejemplos ilustrativos de iniciadores de radicales son 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxietil)-propionamida (AMPAHE), 2,2'-azobis(2-metil-N-[2-(1-hidroxibutil)]-propionamida y 1,1'-azobis(ciclohexano-carbonitrilo). La AMPAHE es un iniciador de radicales particularmente preferido, del que su uso se ilustra en los ejemplos en el presente documento. Los disolventes alcohólicos se seleccionan del grupo que consiste en metanol, etanol, alcohol isopropílico, n-propanol, n-butanol, 2-butanol terc-butanol, 1-pentanol y 2-pentanol. El alcohol isopropílico (IPA) es un disolvente alcohólico particularmente preferido, del que su uso se ilustra en los ejemplos en el presente documento. Los agentes de transferencia de cadena son 2-mercaptoetanol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-propanol, 4-mercapto-1-butanol, 3-mercapto-2-butanol y 6-mercapto-1-hexanol. Un agente de transferencia de cadena particularmente preferido es 2-mercaptoetanol (MCE), del que su uso se ilustra en los ejemplos en el presente documento.

La segunda etapa del procedimiento comprende una polimerización iónica de un monómero o comonómeros usando la PVP terminada en hidroxilo seca, sintetizada en la primera etapa, como macroiniciador que resulta de la formación de copolímeros dibloque o tribloque PVP-bloque-poliéster anfífilos u otros copolímeros dibloque o tribloque que consisten en PVP como un bloque. La segunda etapa se lleva a cabo usando un catalizador o base en un disolvente aprótico inerte sin el uso de éter corona ni de otros agentes de complejación. Los copolímeros de bloque nuevamente formados se aíslan por precipitación y se purifican por disolución y re-precipitación. No es necesario diálisis para la purificación. Se puede usar tratamiento con carbón vegetal para retirar cualquier color de los copolímeros de bloque nuevamente formados. El peso molecular del copolímero de bloque y el porcentaje del contenido en poliéster se pueden controlar ajustando la proporción del macroiniciador y el/los monómero(s). Ejemplos ilustrativos de catalizadores son alcóxidos de aluminio y de estaño. Ejemplos ilustrativos de bases son hidruro de potasio y de sodio. Ejemplos ilustrativos de disolventes apróticos inertes son tetrahidrofurano, tolueno, dietil éter y terc-butil metil éter. El tetrahidrofurano es un disolvente aprótico inerte preferido, del que su uso se ilustra en los ejemplos en el presente documento.

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento de polimerización en dos etapas para preparar PVP, copolímeros PVP-bloque-poliéster anfífilos y otros copolímeros dibloque o tribloque que consisten en PVP como un bloque.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento de polimerización en dos etapas para preparar copolímeros dibloque y tribloque en el que dicho procedimiento permite el control del peso molecular, la polidispersidad y la funcionalidad de los componentes de cada una de las polimerizaciones.

Es otro objetivo más de la presente invención proporcionar un procedimiento de polimerización en dos etapas para preparar copolímeros dibloque y tribloque en el que dicho procedimiento se puede llevar a cabo en una escala industrial.

Es otro objetivo más de la invención proporcionar copolímeros (PVP)-bloque-poliéster para su uso como vehículos de fármaco.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos. Los dibujos constituyen una parte de esta memoria descriptiva e incluyen realizaciones ejemplares de la presente invención e ilustran varios objetivos y características de las mismas.

### Definiciones

La siguiente lista define términos, expresiones y abreviaturas usadas a lo largo de la presente memoria descriptiva. Aunque los términos, expresiones y abreviaturas se enumeran en tiempo singular, se pretende que las definiciones abarquen todas las formas gramaticales.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PEG" se refiere a poli(etilenglicol).

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PM" se refiere a micelas poliméricas.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "VP" se refiere a N-vinil-2-pirrolidona.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PVP" se refiere a poli(N-vinil-2-pirrolidona).

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PVP-OH" se refiere a PVP con un grupo hidroxilo en un extremo de cada cadena de polímeros.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "HO-PVP-OH" se refiere a PVP con grupos hidroxilo en ambos extremos de cada cadena de polímeros.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PDLLA" se refiere a poli(D,L-láctido).

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PVP-*b*-PDLLA" se refiere a poli(N-vinilpirrolidona)-*bloque*-poli(D,L-láctido).

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "MALDI-TOF" se refiere a espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz de tiempo de vuelo.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "MW" se refiere a peso molecular.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "M<sub>w</sub>" se refiere a peso molecular promedio en peso.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "M<sub>n</sub>" se refiere a peso molecular promedio en número.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "EA" se refiere a análisis elemental.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "SEC-LS" se refiere a cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a detección de dispersión de luz.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "IPA" se refiere a isopropanol o alcohol isopropílico.

5 Como se usa en el presente documento, la abreviatura "AMPAHE" se refiere a 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxietil)-propionamida.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "MCE" se refiere a 2-mercaptoetanol.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "TBME" se refiere a terc-butil metil éter.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "MIBK" se refiere a 4-metil-2-pentanona.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

10 Como se usa en el presente documento, la abreviatura "NaH" se refiere a hidruro de sodio.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "LA" se refiere a D,L-láctido.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "ATRP" se refiere a polimerización de radicales por transferencia atómica.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "DMF" se refiere a N,N-dimetilformamida.

15 Como se usa en el presente documento, la abreviatura "TBA" se refiere a alcohol terc-butílico.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "CAC" se refiere a concentración de asociación crítica.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "DLS" se refiere a dispersión de luz dinámica.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "TGA" se refiere a análisis termogravimétrico.

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "CTA" se refiere a agentes de transferencia de cadena.

20 Como se usa en el presente documento, la abreviatura "PI" se refiere a índice de polidispersidad.

#### Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra datos de RMN del ejemplo 1 (RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)). El producto de la etapa 1 se seca hasta que todo el pico de disolvente desaparece en la RMN.

25 La FIGURA 2 muestra datos de RMN del ejemplo 2 (RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm)). El producto de la etapa 2 se seca hasta que todo el pico de disolvente desaparece en la RMN.

La FIGURA 3 ilustra la síntesis de homopolímero de PVP-OH (primera polimerización) y de copolímero dibloque PVP-*b*-PDLLA (segunda polimerización).

La FIGURA 4 muestra un espectro que resulta de espectrometría MALDI-TOF (ejemplo 8). El análisis por MALDI-TOF es útil para la evaluación de los grupos hidroxilo de PVP-OH.

30 Las FIGURAS 5A-B muestran los datos que evidencian la influencia de las proporciones de MCE (figura 5A) y de IPA (figura 5B) con respecto a VP sobre el  $M_n$  de PVP-OH.

La FIGURA 6 muestra un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PVP-OH-2500 en  $\text{CDCl}_3$  (ejemplo 6).

Las FIGURAS 7A-B muestran los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de PVP-*b*-PDLLA (dibloque-47) en  $\text{CDCl}_3$  (figura 7A) y en  $\text{D}_2\text{O}$  (figura 7B).

35 La FIGURA 8 muestra un perfil termogravimétrico del copolímero dibloque PVP-*b*-PDLLA (dibloque-47).

La FIGURA 9 muestra la distribución de tamaño de micelas compuestas de PVP-*b*-PDLLA (dibloque-47) en agua medida por DLS.

La FIGURA 10 muestra datos para la determinación de CAC de PVP-*b*-PDLLA (dibloque-47) en agua a 25 °C.

#### Descripción detallada de la invención

40 La síntesis de los copolímeros dibloque y tribloque es un procedimiento de polimerización en dos etapas.

La primera etapa es una polimerización de radicales libres de VP, llevada a cabo en un disolvente alcohólico tal

como metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, 2-butanol, terc-butanol, 1-pentanol y 2-pentanol. Idealmente, el punto de ebullición del disolvente está en la proximidad de la temperatura de craqueo del iniciador de radicales. El isopropanol (IPA) es un disolvente preferido. Se requiere la presencia de un iniciador de radicales. El iniciador de radicales se selecciona del grupo de derivados de azo que comprende 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxi-etil)-propionamida) (AMPAHE), 2,2'-azobis[2-methyl-N-[2-(1-hidroxibutil)]propionamida y 1,1'-azobis(ciclohexano-carbonitrilo). Los iniciadores preferidos son los que tienen grupos terminales hidroxilo, siendo la 2,2'-azobis(2-metil-N-(2-hidroxi-etil)-propionamida) (AMPAHE) la más preferida. Se pueden usar derivados de tiol tales como 2-mercaptoetanol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-propanol, 4-mercapto-1-butanol, 3-mercapto-2-butanol y 6-mercapto-1-hexanol como agentes de transferencia de cadena. El agente de transferencia de cadena preferido es 2-mercaptoetanol (MCE). El peso molecular se puede controlar ajustando las proporciones molares de MCE, AMPAHE y de IPA con respecto a VP. El primer homopolímero de bloque de PVP resultante se puede evaluar usando técnicas tales como MALDI-TOF, SEC-LS, EA y RMN. PVP-OH se aísla por precipitación de su solución a un disolvente orgánico inerte con poca solubilidad por el polímero. El disolvente o combinación de disolventes para disolución se selecciona del grupo que comprende metanol, etanol, IPA, acetona, 2-butanona, 4-metil-2-pentanona, diclorometano y tetrahidrofurano. Preferentemente, se combinan al menos dos disolventes para dicha solución. Los disolventes preferidos para disolución son isopropanol y 4-metil-2-pentanona, de los que sus usos se ilustran en los ejemplos en el presente documento. El disolvente orgánico inerte para precipitación se selecciona del grupo que comprende dietil éter, terc-butil metil éter, derivados de hexano, derivados de heptano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, derivados de tolueno y xileno. Preferentemente, se combinan al menos dos disolventes para dicha precipitación. El disolvente preferido para precipitación es terc-butil metil éter, del que su uso se ilustra en los ejemplos en el presente documento.

Para la preparación de PVP-OH (primera etapa del procedimiento), una vez se cargan todos los reactivos y el disolvente, la mezcla de reacción se desgasifica antes del calentamiento. La temperatura de reacción varía de desde 60-140 °C dependiendo del iniciador y del disolvente elegidos. En una realización preferida de la invención, se usa una combinación de IPA como disolvente, AMPAHE como iniciador y MCE como agente de transferencia de cadena y se lleva a cabo la reacción a reflujo. El tiempo de reacción varía de desde 16 horas hasta 72 horas dependiendo del disolvente, del iniciador y del agente de transferencia de cadena. En la combinación preferida anterior, un tiempo de reacción típico está entre 30-48 horas.

Es importante garantizar el secado de la PVP-OH para lograr la polimerización de apertura de anillo aniónica en la siguiente etapa. El secado del polímero se realiza usando un horno a vacío, alcanzando la temperatura alrededor de 110 °C. En una realización preferida, dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) se seca a vacío a una temperatura final sobre 100 °C. De forma alternativa, se puede realizar opcionalmente otro secado usando destilación azeotrópica con un disolvente inerte tal como tolueno, derivados de xileno o derivados de heptano antes de la segunda polimerización.

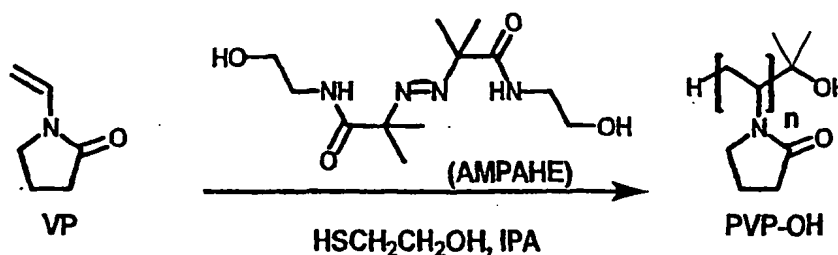
La segunda etapa se basa en una polimerización aniónica de monómeros o comonómeros; que son cíclicos o vinílicos. Dichos monómeros o comonómeros son preferentemente éster cíclico, otra lactona cíclica, metacrilato o metacrilamida. En una realización preferida, dichos monómeros son cíclicos y se seleccionan del grupo que consiste en 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2, 5-diona, ε-caprolactona y γ-caprolactona. Esta polimerización puede ser aniónica por medio de un macroiniciador o se puede catalizar por alcóxidos de aluminio o de estaño. El macroiniciador es una PVP-hidroxiolato de metal obtenido a partir de la desprotonación del grupo hidroxilo terminal con un reactivo de hidruro de metal tal como hidruro de sodio o hidruro de potasio. El segundo bloque resultante es poli(éster) en el que la unidad de repetición es un láctido, ε-caprolactona, γ-caprolactona u otro éster cíclico. Preferentemente, dicho poliéster es degradable. El segundo bloque resultante también puede ser poli(aminoácido), polimetacrilato, polimetacrilamida o sus copolímeros. Los bloques de homopolímeros se engarzan químicamente por un enlace covalente. En engarce químico entre homopolímeros de bloque es un derivado de hidroxilo que surge a partir del iniciador de radicales o del agente de transferencia de cadena o de un disolvente orgánico. Se puede usar un disolvente o combinación de disolventes apróticos anhidros inertes tales como tetrahidrofurano, tolueno, dietil éter, terc-butil metil éter para la reacción, prefiriéndose el tetrahidrofurano. La temperatura varía de desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 70 °C siendo la temperatura preferida 20-25 °C. Después de la terminación de la reacción como se evidencia por la RMN de <sup>1</sup>H (el pico de disolvente desaparece), la mezcla de reacción se filtra y el copolímero de bloque se aísla del filtrado por precipitación en un disolvente orgánico inerte que tiene poca solubilidad por el polímero. Se usan sistemas de disolventes similares para la precipitación de PVP-OH, siendo el terc-butil metil éter el disolvente más preferido. Opcionalmente, se puede retirar cualquier color de los copolímeros de bloque de PVP por tratamiento con carbón vegetal y se obtiene un polvo de blanco a blanquecino del producto.

En una realización, los copolímeros dibloque y tribloque se autoensamblan en nanopartículas estabilizadas en solución acuosa. Preferentemente, el copolímero tribloque preparado por el procedimiento de la invención es poli(D,L-láctido)-bloque-poli(N-vinilpirrolidona)-bloque-poli(D,L-láctido).

La invención se ilustra además con los siguientes ejemplos.

**Ejemplo 1** - Preparación de poli(N-vinil-2-pirrolidona) con una extremo de cadena que lleva hidroxilo (PVP-OH).

ESQUEMA 1



Se disolvieron VP (200 g, 1,8 mol), AMPAHE (5,2 g, 0,018 mol) y MCE (5,0 ml, 0,072 mol) en 3000 ml de IPA. Se desgasificó la solución por purga de nitrógeno durante 1 hora. Se llevó a cabo la polimerización de radicales a reflujo (aproximadamente a 89 °C) con agitación bajo una atmósfera de nitrógeno durante 44 horas. A continuación, después de enfriar a temperatura ambiente, se retiró la mayor parte del IPA a presión reducida y se añadieron 400 ml de MIBK. Después, se precipitó lentamente el polímero en 5000 ml de TBME. Se filtró la suspensión. Se lavó dos veces la torta de filtrado con 200 ml de TBME. Se purificó el polvo blanco así obtenido por solubilización en 400 ml de MIBK y 100 ml de IPA y reprecipitación a partir de 5000 ml de TBME. Finalmente, se secó el producto a vacío (comenzando a temperatura ambiente, después a 110 °C, 1 torr) hasta la desaparición del pico de disolvente por RMN (figura 1). Se obtuvo la PVP-OH como un polvo blanco: 122 g.  $M_n$ : 2060,  $M_w$ : 2600,  $M_w/M_n$ : 1,3.

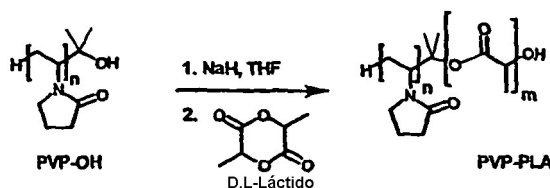
Los presentes inventores realizaron preparaciones similares de PVP-OH variando los diferentes parámetros tales como la proporción de disolvente/VP y el porcentaje molar de AMPAHE y MCE. La tabla 1 demuestra que el peso molecular ( $M_w$ ) y el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ) de PVP-OH se puede afinar eficazmente. Los resultados mostraron también que el índice de polidispersidad ( $M_w/M_n$ ) en general es menor cuando está presente MCE. Se obtienen  $M_w$  y  $M_n$  menores cuando la proporción de disolvente/VP es mayor.

Tabla 1 Caracterización de PVP-OH preparado a varias condiciones

Entrada	VP (g)	AMPAHE (% mol)	MCE (% mol)	IPA/VP (proporción en volumen)	$M_n$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$
1	5	1,0	¾	10	10290	21300	2,1
2	5	1,0	¾	15	6760	15820	2,3
3	5	1,0	¾	20	6300	12460	2,0
4	20	0,5	1,0	10	5100	11600	2,3
5	50	1,0	2,0	12	4000	6220	1,6
6	50	1,0	2,0	16	2510	3470	1,4
7	15	1,0	4,0	12	3230	4520	1,4
8	200	1,0	4,0	15	2060	2600	1,3
9	50	1,0	4,0	16	2170	3190	1,5

**Ejemplo 2** - Preparación de copolímero de dibloque poli(N-vinil-2-pirrolidona)-bloque-poli(DL-láctido) (PVP-PDLLA).

Esquema 2



Se disolvió PVP-OH (100 g, 48,5 mmol,  $M_n=2060$ ) en 600 ml de THF anhidro y se añadió hidruro de sodio al 60 % en peso en aceite mineral (3,0 g, 75 mmol). Se agitó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y

después se añadió LA (125 g, 125% p/p). Se llevó a cabo la polimerización aniónica a temperatura ambiente con agitación bajo una atmósfera de nitrógeno seco durante 26 horas. Se retiró el exceso de hidruro de sodio por filtración. Se ajustó el volumen de filtrado hasta 900 ml por adición de THF. Después, se precipitó lentamente la solución de polímero en 4500 ml de TBME. Se filtró la suspensión. Se lavó dos veces la torta de filtrado con 100 ml de TBME. Se purificó el polvo ligeramente amarillo así obtenido por solubilización en 1215 ml de THF y se añadieron 40,5 g de carbón vegetal. Se agitó la suspensión negra durante 16 horas a temperatura ambiente, después se filtró sobre celite. Se precipitó el polímero en 6000 ml de TBME. Se filtró la suspensión. Se lavó dos veces la torta de filtración con 100 ml de TBME y finalmente se secó a vacío hasta la desaparición del pico de disolvente por RMN (figura 2). Se obtuvo el producto PVP-PDLLA como un polvo de blanco a blanquecino: 62 g.  $M_n$ : 3140,  $M_w$ : 3445,  $M_w/M_n$ : 1,1.

Se crearon ecuaciones empíricas (ecuación 1) y (ecuación 2) para evaluar el porcentaje molar de contenido en PDLLA por RMN de protones y por análisis elemental, respectivamente.

Ecuación 1: Determinación del contenido en PDLLA (%mol) por RMN de protones

$$PLA (\%mol) = \frac{I_{5,2 \text{ ppm}}}{\left[ \frac{(I_{4,5-0,8 \text{ ppm}}) - 3 \times I_{5,2 \text{ ppm}}}{9 \text{ H}} \right] + I_{5,2 \text{ ppm}}} \times 100 \quad (1)$$

donde  $I_{5,2 \text{ ppm}}$  representa la integración de la señal a 5,2 ppm que corresponde al protón terciario sobre C-10.  $I_{4,5-0,8 \text{ ppm}}$  representa la integración de las señales de los protones de la PVP-OH. Se omite la contribución del engarce.

Ecuación 2: Determinación del contenido en PDLLA (%mol) por análisis elemental (EA)

$$PLA (\%mol) = \frac{7 \text{ C} - 36 \text{ N}}{7 \text{ C} - 18 \text{ N}} \times 100 \quad (2)$$

Las composiciones de bloque de PVP y PDLLA corresponden a la unidad de repetición de  $C_6H_9NO$  y  $C_3H_4O_2$ , respectivamente. Se puede determinar el contenido en PDLLA (%mol) usando la ecuación (2) y en base al contenido de los átomos de (C) y (N) determinado por EA.

La tabla 2 demuestra la reproducibilidad del porcentaje molar del contenido en PDLLA así como la polidispersidad estrecha usando el procedimiento.

Tabla 2 Preparación de copolímeros de bloque de PVP-PDLLA de acuerdo con el ejemplo 2.

Entrada	$M_n$ PVP-OH usado (g mol <sup>-1</sup> )	$M_n$ SEC (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ SEC (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w/M_n$ SEC	Contenido en PDLLA <sup>A</sup> (% mol)	Contenido en PDLLA <sup>B</sup> (% mol)
1	2060	3140	3445	1,1	38	48
2	1850	3350	3690	1,1	38	48
3	2220	3680	4050	1,1	37	48

A: de la ecuación 1, RMN de <sup>1</sup>H

B: de la ecuación 2, proporción de EA

La tabla 3 demuestra que los contenidos molares de PDLLA en el copolímero de dibloque están influenciados por la proporción en peso de láctido/PVP-OH cargados para la reacción. De forma previsible, se puede obtener un % del contenido en PDLLA deseado.



Tabla 3 Caracterización de copolímeros de dibloque de PVP-PDLLA.

Entrada	Láctido usado (% p/p)	M <sub>n</sub> PVP-OH usado (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>n</sub> SEC (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> SEC (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> SEC	Contenido en PDLLA <sup>A</sup> (% mol)	Contenido en PDLLA <sup>B</sup> (% mol)
1	90	2180	3145	4040	1,3	27	38
2	110	2165	3380	3720	1,1	35	42
3	125	2220	3680	4050	1,1	37	48

A: de la ecuación 1, RMN de <sup>1</sup>H

B: de la ecuación 2, proporción de EA

### Ejemplo 3 - Síntesis de poli(N-vinilpirrolidona) con un extremo de cadena que lleva hidroxilo (PVP-OH).

Como se muestra en la figura 3, se sintetizó la PVP-OH por polimerización de radicales libres de VP. Se disolvieron VP (30 g, 270 mmol), AMPAHE (0,7783 g, 2,7 mmol) y MCE (0,844 g, 10,8 mmol) en 540 ml de IPA. Se desgasificó la solución con argón durante 15 minutos. Se llevó a cabo la polimerización a 85 °C durante 24 horas. A continuación, se retiró la mayor parte del IPA a presión reducida. Después, se precipitó el polímero en aproximadamente 300 ml de dietil éter. Se disolvió el polímero en 60 ml de cloruro de metileno y se precipitó de nuevo en 300 ml de dietil éter. Finalmente, se transfirió el producto (polvo blanco) en un cartucho de extracción de celulosa Whatman y se purificó por extracción en Soxhlet con dietil éter durante 24 horas. Se secó el polímero a 80 °C a vacío durante la noche.

### Ejemplo 4 - Síntesis de copolímero dibloque poli(N-vinilpirrolidona)-bloque-poli(D,L-láctido)

Como se ilustra en la figura 3, se sintetizó PVP-*b*-PDLLA por polimerización aniónica de LA usando PVP-OH como macroiniciador. PVP-OH M<sub>n</sub>: 2500 (15 g, 5,77 mmol) se disolvió en 250 ml de tolueno. Usando una trampa Dean-Stark, se secaron todos los productos con tolueno como disolvente azeotrópico. Después, se retiró el tolueno por destilación a presión reducida. Se secó el polímero a vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a 150 °C durante 4 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió hidruro de potasio (KH, 0,346 mg, 8,65 mmol) en aceite mineral en el matraz bajo atmósfera de argón. Se colocó el matraz a vacío durante 30 minutos. Se añadió un volumen de 75 ml recién destilado y THF anhidro para disolver la mezcla. Después de que se disolviera el polímero, se agitó la solución durante 10 minutos. Previamente, se secaron tanto LA (30 g, 20,8 mmol) como 18-corona-6 (2,29 mg, 8,65 mmol) a vacío a 80 °C durante 4 horas, se colocaron en un matraz y después, se disolvió con un volumen de 150 ml de THF anhidro. Se transfirió la solución en solución de alcoholato bajo atmósfera de argón y se agitó. Se llevó a cabo la polimerización a 60 °C durante 18 horas. Se precipitó PVP-*b*-PDLLA en 1,2 l de dietil éter frío. Se recogió el polímero y se secó a vacío a temperatura ambiente. Se disolvió PVP-*b*-PDLLA (20 g) en 100 ml de DMF. Se añadieron 100 ml de agua desionizada a la solución de polímero para micelización. Se colocó la solución de micelas en una bolsa de diálisis (Spectrum, MW límite: 3500) y se dializó frente a agua (8 l) a 4 °C durante 24 horas. Se cambió el agua al menos 4 veces durante ese periodo. Se centrifugó la solución acuosa a 11600 g a 4 °C durante 30 minutos, y después se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se recogió la solución filtrada y se secó por congelación durante 48 horas. Se almacenó el copolímero dibloque a -80 °C para evitar la degradación.

### Ejemplo 5 - Cromatografía de exclusión por tamaño

Se llevó a cabo el análisis de SEC en un sistema Breeze Waters usando un refractómetro Waters 2410 (Milford, Massachusetts) y un detector de dispersión de luz (LS) de Precision Detectors PD2000 (Bellingham, Massachusetts). Se recogieron los datos de LS a 15 y 90°. Se realizó la SEC en DMF que contenía LiBr 10 mM. Se inyectaron 200 µl de solución (aproximadamente un 3 % p/v) a través de una serie de 3 columnas Styragel® Waters HT2, HT3 y HT4 a un caudal de 1,0 ml/min, para separar el MW que variaba de desde 10<sup>2</sup> hasta 10<sup>6</sup>. Se mantuvo la temperatura de las columnas (separación) a 40 °C, mientras que ajustó la temperatura del refractómetro/detectores de LS a 35 °C. Se calibró el instrumento con patrones de poliestireno monodisperso.

### Ejemplo 6 - Resonancia magnética nuclear.

Se registraron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C en espectrómetros Varian 300 y Bruker AMX 600 (Milton, Ontario) en CDCl<sub>3</sub> a 25 °C. Se determinó el contenido en PDLLA (%mol) usando la ecuación 1 (como se anota en el ejemplo 2). Sonde I<sub>5,2ppm</sub> representa una señal de intensidad a 5,2 ppm, y corresponde al protón terciario (posición α del grupo carbonilo). Se normalizó la señal a 1. También se realizó una RMN de <sup>1</sup>H-NMR en agua deuterada (D<sub>2</sub>O) a 25 °C para evidenciar la presencia de micelas autoensambladas.

**Ejemplo 7 - Análisis elemental**

Se llevó a cabo el EA en una atmósfera oxidativa a 1021 °C. Usando una sonda de conductividad térmica, se cuantificaron la cantidad de óxido de nitrógeno, ácido carbónico, óxido de azufre (NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y agua y se proporcionó la cantidad de átomos de nitrógeno (N), carbono (C), hidrógeno (H) y azufre (S) en la muestra. Las composiciones de bloque de PVP y PDLLA corresponden a la unidad de repetición de C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO y C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. Se determinó el contenido en PDLLA (%mol) usando la ecuación 2 (como se anota en el ejemplo 2) y en base al contenido en átomos de (C) y (N).

**Ejemplo 8 - Espectrometría de MALDI-TOF para el análisis de PVP**

Se obtuvieron espectros de masas MALDI-TOF con un espectrómetro de masas Micromass TofSpec-2E (Manchester, Reino Unido). Se hizo funcionar el instrumento en modo de reflectrón de ión positivo con un potencial de aceleración de +20 kV. Se adquirieron espectros promediando al menos 100 disparos de láser. Se usó ditranol como matriz y cloroformo como disolvente. Se disolvió yoduro de sodio en metanol y se usó como agente de ionización. Se prepararon muestras mezclando 20 µl de solución de polímero (6-8 mg/ml) con 20 µl de solución de matriz (10 mg/ml) y 10 µl de una solución de agente de ionización (2 mg/ml). Después, se depositó 1 ml de estas mezclas en una placa objetivo y se retiró el disolvente en una corriente de nitrógeno. Se realizó un calibrado multipuntual externo usando bradiginina (1060,2 g/mol), angiotensina (1265,5 g/mol), sustancia P (1347,6 g/mol), sustrato de renina tetradecapéptido (1759,0 g/mol) e insulina (5733,5 g/mol) como estándares.

**Ejemplo 9 - Determinación del peso molecular promedio en viscosidad (M<sub>v</sub>) de PVP.**

Se determinó el número de viscosidad limitante "valor K" (o valor K de Fikentscher) de homopolímero PVP-OH de acuerdo con el protocolo de BASF (Farmacopea de los EE. UU.) usando un viscosímetro Ubbelohde tipo Ia. Con el valor de K, se obtiene directamente M<sub>v</sub> a partir de la siguiente ecuación:  $M_v = 22,22 (K + 0,075K^2)^{1,69}$

**Ejemplo 10 - Concentración de asociación crítica (CAC).**

Se midió la CAC por el procedimiento de fluorescencia con pireno en estado estacionario (Benahmed et al. Pharm. Res. 18:323-328 2001). El procedimiento se describe brevemente como sigue. Se prepararon varias soluciones poliméricas en agua que contenía 10<sup>-7</sup> M de pireno y se agitó durante la noche en la oscuridad a 4 °C. Se midieron los espectros fluorescentes de estado estacionario (λ<sub>ex</sub> = 390 nm) después de 5 minutos en agitación a 20 °C usando un fluorímetro Aminco Bowman Series 2 (Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY). Los experimentos se realizaron por duplicado.

**Ejemplo 11 - Dispersión de luz dinámica (DLS).**

Se usó la DLS para la determinación del tamaño de partícula en agua. Para este análisis, se preparó una serie de soluciones acuosas de PVP-b-PDLLA con concentraciones de 0,5, 1 y 2 mg/ml disolviendo el polímero directamente en agua. Se analizaron las soluciones con un instrumento Malvern Autosizer 4700 (Mississauga, Ontario). Se llevó a cabo cada medida por triplicado a 25 °C en un ángulo de 90 °C. Se registraron la distribución del tamaño de las partículas y el tamaño medio de intensidad.

**Ejemplo 12 - Análisis termogravimétrico (TGA).**

Se recogieron medidas de TGA en un instrumento de TA analizador termogravimétrico Hi-Res TGA 2950 (New Castle, Delaware).

Se usó aproximadamente 1 mg de polímero para los experimentos. El aumento de temperatura fue de 20 °C/minutos entre la temperatura ambiente y 700 °C. Se cuantificó la cantidad residual de agua después del secado por congelación. También se analizaron los contenidos en PDLLA y PVP (% p/p) en copolímero dibloque.

**Resultados experimentales a partir de los ejemplos**

Los compuestos de mercapto son agentes de transferencia de cadena buenos que pueden funcionalizar los extremos de la cadena y controlar indirectamente el peso molecular del polímero (Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 196:763-774 1995; Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 201:1219-1225 2000; Sanner et al. Proceedings of the International Symposium on Povidone; University of Kentucky: Lexington, KY, página 20, 1983). Se puede introducir un grupo hidroxilo en el extremo de cadenas de polímero usando MCE como CTA en polimerización de radicales libres de monómeros de vinilo. Sin embargo, se informó de que cuando la VP se polimeriza radicalmente en presencia de derivados de mercapto, sólo se obtuvo una pequeña fracción de oligómeros cortos funcionalizados. Además, se encontró en el producto una gran cantidad de polímeros de alto MW sin funcionalidad terminal. Esto se debió a la alta constante de transferencia de tiol con respecto a VP (Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 196:763-774 1995; Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 201:1219-1225 2000). En la polimerización de radicales libres de VP, los radicales se pueden transferir al disolvente y posiblemente a un monómero. Por tanto, se ha sintetizado PVP funcionalizado usando disolventes particulares (es decir, isopropoxietanol). Sin embargo, la funcionalidad de PVP no estaba cuantitativamente bajo control (Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 196:763-774 1995; Ranucci et al.

Macromol. Chem. Phys. 201:1219-1225 2000). Para obtener homopolímeros de PVO hidroxilo terminales cuantitativos y también para controlar su perfil de peso molecular, se han combinado IPA, MCE y un iniciador azo que lleva hidroxilo (AMPAHE) en la presente invención para la polimerización de radicales de VP (véase la 3).

5 Como se muestra en la figura 4, la espectrometría de MALDI-TOF mostró que la mayor parte de las cadenas de PVP (>95%) llevaban un grupo hidroxilo en un extremo de la cadena de PVP. La figura 4 muestra un espectro de MALDI-TOF de PVP-OH-2500. La mayor parte de las cadenas mostraban un grupo 2-hidroxiisopropilo en el extremo, lo que significa que el disolvente fue la principal especie que inició el crecimiento del polímero. Usando condiciones diluidas de polimerización, los datos de MALDI-TOF sugieren que no se produjo una terminación significativa por combinación bimolecular durante la reacción, porque la masa del extremo de la cadena sólo fue el del IPA más el ión de sodio ( $59_{\text{IPA}} + 23_{\text{NA}^+} = 82$ , con  $n$  igual a 0 en la ecuación lineal). También se observaron otras dos distribuciones, que se atribuyeron a PVP que lleva MCE y VP como extremo de la cadena, respectivamente. Estas distribuciones sólo eran significativas a valores bajos de  $m/z$  ( $<1000 \text{ g mol}^{-1}$ ) y representaban menos de un 5% del espectro, con relación a cadenas terminadas en MCE y VP. Puesto que el MCE es más eficaz como agente de transferencia de cadena que el IPA, todos los MCE se consumieron pronto en la reacción. Las síntesis previas de PVP en THF (en lugar de IPA) usando MCE han mostrado que los radicales también se pueden transferir directamente a monómeros (Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 196:763-774 1995; Ranucci et al. Macromol. Chem. Phys. 201:1219-1225 2000). En consecuencia, combinando MCE e IPA como CTA, se pudo lograr la síntesis de PVP de bajo MW con la inserción cuantitativa de un grupo hidroxilo en un extremo de la cadena.

20 Se determinaron los pesos moleculares de PVP-OH por SEC y viscosimetría (tabla 4). Los índices de polidispersidad (PI) de aproximadamente 1,5 indicaron que las transferencias radiales prevalecieron sobre la combinación bimolecular, lo que es consistente con los datos de MALDI-TOF. Los resultados de SEC y viscosimetría estaban en concordancia. El  $M_v$  podría estar ligeramente sobreestimado porque la ecuación universal establecida por BASF se refiere a un amplio intervalo de MW de PVP (de  $10^3$  a  $10^6$ ). Las constantes de Mark-Houwink ( $K$  y  $\alpha$ ) de polímeros de bajo MW difieren de los que tiene muy alto MW, lo que podría explicar esta sobreestimación. El análisis de PVP-OH por EA reveló que las proporciones en peso de los átomos N/C en todas las PVP-OH fueron similares al número teórico (0,194).

Tabla 4. Caracterización de homopolímeros de PVP terminados en hidroxilo.

Polímeros	$M_n$ SEC ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_w$ SEC ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$M_w/14_n$ SEC	$M_v$ Viscómetro ( $\text{g mol}^{-1}$ )	N/C EA
PVP-OH-2300	2300	3600	1,56	5400	0,192
PVP-OH-2500	2500	4000	1,60	5500	0,190
PVP-OH-4000	4000	7400	1,85	9000	0,193
PVP-OH-6100	6100	9600	1,57	11100	0,197

30 Se controló el perfil de peso molecular de PVP-OH cambiando las proporciones tanto de MCE (el CTA) como de IPA, con respecto al monómero de VP. Como se esperaba, los pesos moleculares de PVP-OH disminuyeron cuando las proporciones de CTA/VP o bien IPA/VP se incrementaron (figuras 5A-B). En la figura 5A, las proporciones de IPA/VP se fijan a (■) 18 ml/g y (•) 15ml/g. En la figura 5B, la proporción de MCE/VP se fija a (▲) 2,5%.

35 El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PVP-OH-2500 en  $\text{CDCl}_3$  se muestra en la figura 6. Los desplazamientos químicos de los grupos de metileno de MCE son 2,7 y 3,8 ppm. Cuando se introdujo el MCE en el extremo de las cadenas de PVP-OH formando un enlace S-C en lugar de un enlace S-H, los picos de un grupo metileno aparecen a 2,7 y 2,75 ppm en lugar de a 2,7 ppm, y la señal situada alrededor de 3,8 ppm se superpone con los picos de PVP-OH en el espectro. Se asignan las señales entre 1,1 y 1,3 ppm a los protones de metilo del grupo 2-hidroxiisopropilo (fragmento de IPA). Estos resultados sugieren que los radicales de PVP se transfieren tanto a MCE como IPA, y esto está en concordancia con los resultados obtenidos a partir de la espectrometría de MALDI-TOF.

40 Los derivados de hidroxilato de potasio se usan ampliamente para la polimerización de apertura de anillo aniónica de LA (Nagasaki et al. Macromolecules 31:1473-1479 1998; Iijima et al. Macromolecules 32:1140-1146 1999; Yasugi et al. Macromolecules 32:8024-8032 1999). En la presente invención, la reacción entre el grupo OH en el extremo de la cadena de PVP-OH y el hidruro de potasio produjo PVP-hidroxilato de potasio como macroiniciador para la polimerización de LA. Las moléculas de agua y de alcohol en el sistema de reacción pueden iniciar la formación del homopolímero de PDLLA libre. Puesto que existen enlaces de hidrógeno fuertes entre PVP y agua, así como alcohol, los residuos de estos disolventes próticos, que interaccionan con el polímero son difíciles de retirar (Haaf et al. Polymer J. 17:143-152 1985). En el presente caso, se sintetizaron PVP-OH de bajo MW en IPA. Por lo tanto, en el polímero podrían estar contenidas trazas de IPA y moléculas de agua. Se requieren dos etapas de secado para la retirada del disolvente. Brevemente, en primer lugar, se disolvió PVP-OH en tolueno y después, se realizó una destilación azeotrópica. Después, se secó el polímero a vacío a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  durante 4 horas. En realidad, el polímero se fundió bajo estas condiciones y dio como resultado un material altamente seco.

Se determinaron el peso molecular y el PI de PVP-*b*-PDLLA por SEC usando dispersión de luz y un refractómetro diferencial como detectores (tabla 5). Como se esperaba, los MW de PVP-*b*-PDLLA fueron más grandes que los del correspondiente PVP-OH, mientras que el PI disminuyó. La polimerización aniónica conduce a un PI muy pequeño (Nagasaki et al. *Macromolecules* 31:1473-1479 1998; Iijima et al. *Macromolecules* 32:1140-1146 1999; Yasugi et al. *Macromolecules* 32:8024-8032 1999). Por lo tanto, la segunda etapa de polimerización podría disminuir el PI del copolímero dibloque, lo que sugiere que los materiales resultantes eran copolímeros dibloque y no una mezcla de homopolímeros. Otra explicación plausible del menor PI fue que se retiraron los PVP-*b*-PDLLA que tienen las cadenas de PVP más cortas por la precipitación en dietil éter.

Se determinó el contenido en PDLLA (%mol) en los copolímeros dibloque por RMN de <sup>1</sup>H, EA y SEC. En la figura 7A se muestra un espectro de <sup>1</sup>H del copolímero PVP-*b*-PDLLA (dibloque-47) en CDCl<sub>3</sub>. El pico a 5,2 ppm corresponde al grupo -CH- de PDLLA. Se asignaron las señales de desde 0,8 ppm hasta 4,5 ppm a todos los protones asociados al segmento de PVP, que se superponían al pico del grupo metilo de PDLLA (1,4 ppm). Se calculó el contenido en PDLLA usando la ecuación 1, y los resultados se presentan en la tabla 5. Puesto que las trazas en los copolímeros de PVP-*b*-PDLLA sobreestimaron ligeramente la integración de las señales de PVP, se realizó un EA y se usaron las cantidades de los átomos de nitrógeno y carbono para el cálculo del contenido en PDLLA usando la ecuación 2. Como se muestra en la ecuación 2, los átomos de hidrógeno de humedad, incluso del polímero, no se tienen en cuenta en el cálculo del contenido en PDLLA por el EA. Al contrario que el en análisis de la RMN de <sup>1</sup>H, los resultados del EA fueron bastante constantes y reproducibles a pesar del contenido en humedad. El análisis EA resultó ser adecuado para la cuantificación del contenido en PDLLA en el PVP-*b*-PDLLA. En realidad, el contenido en PDLLA a partir de los datos de RMN normalmente era de un 6 a un 8% menos que el determinado por el EA. Aunque la SEC dio como resultado contenidos en PDLLA mayores (aproximadamente un 5%) que EA, la consistencia entre EA, SEC y RMN eran bastante buenas (tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de copolímeros de dibloque de PVP-*b*-PDLLA.

PVP - <i>b</i> - PDLLA <sup>A</sup>	PVP-OH usado	M <sub>n</sub> SEC (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>v</sub> SEC (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> SEC	PDLLA RMN <sup>B</sup> %mol	PDLLA EA <sup>C</sup> %mol	PDLLA SEC <sup>b</sup> %mol
Dibloque-47	PVP-OH-2500	4380	5000	1,14	38	47	54
Dibloque-35	PVP-OH-2500	3840	5030	1,30	27	35	45
Dibloque-37	PVP-OH-6100	8290	10360	1,39	32	37	36
Dibloque-39	PVP-OH-4000	6070	8960	1,48	34	39	44
Dibloque-45	PVP-OH-2300	3770	4860	1,29	37	45	50

A: marcado en base al contenido en PDLLA en los copolímeros de dibloque de PVP-*b*-PDLLA, obtenido del EA.

B: de la ecuación 1

C: de la ecuación 2

D: del M<sub>n</sub> de PVP-OH y su correspondiente PVP-*b*-PDLLA

La termogravimetría (TGA) también fue un procedimiento bueno para caracterizar el copolímero dibloque (Liggins et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:191-202 2002). Como se muestra en la figura 8, se retiró la traza de disolventes (menos de un 4%) en el polímero dibloque por debajo de 100 °C. La figura 8 muestra un perfil termogravimétrico de copolímeros dibloque de PVP-*b*-PDLLA (Dibloque-47). Después se degradó el PDLLA en el copolímero dibloque entre 200 a 350 °C, seguido de la degradación de PVP desde 350 a 480 °C. Por tanto, también se pudo determinar el contenido en PDLLA por TGA. Por ejemplo, el TGA de dibloque-45 reveló un contenido en PDLLA de un 48%mol, lo que estaba en concordancia con los resultados del EA.

Debido a sus propiedades anfífilas, los copolímeros dibloque de PVP-*b*-PDLLA bien definidos se pueden autoensamblar en solución acuosa para formar micelas. Se midió el tamaño de las micelas por DLS a diferentes concentraciones. Como se muestra en la figura 9, las micelas compuestas de PVP-*b*-PDLLA (Dibloque-47) en agua a una concentración de 2 mg/ml muestran una distribución de tamaño individual de aproximadamente 40 nm. La figura 9 muestra una distribución de tamaño de micelas compuesto de PVP-*b*-PDLLA (Dibloque-47) en agua medida por DLS. Después de la dilución a 0,5 mg/ml, no se observó ningún cambio en el tamaño de las micelas. Los resultados indican que no hay agregación de micelas en las soluciones. En contraste, Benahmed et al. (*C. Pharm. Res.* 18: 323-328 2001) informó de distribuciones de tamaños bimodales para micelas de PVP-*b*-PDLLA. Se ha sugerido que la mayor población refleja la agregación de pequeñas micelas individuales, regidas por un orden secundario de agregación. La explicación plausible de la diferencia es que los pesos moleculares, los contenidos en PDLLA y los índices de polidispersidad informados en Benahmed et al. fueron mayores que los polímeros descritos en la presente solicitud.

La fluorescencia en estado estacionario, usando pireno como sonda de fluorescencia hidrófoba, es bien usada como técnica para mostrar la formación de micelas (Zhao et al. *Macromolecules* 30:7143-7150 1997; Kabanov et al. *Macromolecules* 28:2303-2314 1995; Wilhelm et al. *Macromolecules* 24:1033-1040 1991). La polaridad del entorno

que rodea las moléculas de la sonda afecta a algunas bandas vibracionales en el espectro de emisión de fluorescencia. Los cambios en la intensidad relativa de la primera y la tercera bandas vibracionales ( $I_{338}/I_{333}$ ), que se debe al desplazamiento de la banda (0,0) desde 333 hasta 338 nm en el espectro de emisión se han sugerido para examinar la polaridad del microentorno. La CAC de las micelas se puede determinar por este procedimiento.

- 5 Después de la formación micelar, el pireno se divide en la fase micelar y la fase acuosa. Puesto que el núcleo de la micela es hidrófobo, se cambia la proporción de intensidad de  $I_{338}/I_{333}$ . La extrapolación de la tangente del cambio principal en la curva de la proporción de intensidad de fluorescencia conduce a la CAC. Como se ilustra en la figura 10, los copolímeros de PVP-*b*-PDLLA presentaron una CAC de aproximadamente 6 mg/l. La figura 10 muestra la determinación de la CAC de PVP-*b*-PDLLA (Dibloque-47) en agua a 25 °C.
- 10 También se puede evaluar la micelización de PVP-*b*-PDLLA por RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  (Benahmed et al. C. Pharma. Res. 18:323-328 2001; Yamamoto et al. J. Controlled Release 82:359-371 2002; Heald et al. Langmuir 18:3669-3675 2002). La figura 7B muestra un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PVP-*b*-PDLLA (Dibloque-47) en  $\text{D}_2\text{O}$ . Como se muestra en la figura 7B, los picos de los protones de metilo ( $-\text{CH}_3$ ) y el protón del metino ( $\text{CH}-$ ) de PDLLA están altamente suprimidos mientras que los picos de PVP aún aparecen en el espectro, lo que proporciona evidencias de la
- 15 formación de estructuras de núcleo-armazón. La movilidad de las cadenas de PDLLA en el núcleo está altamente restringida, lo que da como resultado en enmascaramiento de las señales de PDLLA. Por otro lado, aún se observan cadenas de PVP por RMN de  $^1\text{H}$  debido a su alta movilidad como armazón externo de micelas.

- Combinando MCE e IPA como agentes de transferencia de cadena, la PVP que lleva un grupo hidroxilo terminal sobre una extremidad se sintetizó exitosamente por la primera etapa de polimerización del procedimiento de la presente invención. Los MW de la PVP se controlaron eficazmente cambiando las proporciones de MCE o bien IPA, con respecto a VP. Se usaron PVP de bajo MW terminalmente funcionalizadas para sintetizar eficazmente el copolímero dibloque de PVP-*b*-PDLLA por polimerización de apertura de anillo aniónica de D,L- láctido en la segunda etapa de polimerización del procedimiento de la presente invención. El PVP-*b*-PDLLA se autoensambló en micelas en agua. Estos copolímero de formación de micelas presentaron una CAC muy baja de unos pocos mg/l, lo
- 20 que conduce a la formación de micelas poliméricas de 40 nm. Estos autoensamblajes poliméricos a base de bloques de PVP de bajo peso molecular son útiles como vehículo de fármacos para la administración parenteral.
- 25

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar copolímeros dibloque y tribloque que comprende las etapas de:
  - (a) realizar una polimerización de radicales de N-vinil-2-pirrolidona en presencia de un iniciador de radicales, un agente de transferencia de cadena y un disolvente alcohólico para formar poli(N-vinilpirrolidona) terminada en hidroxilo y
  - (b) realizar una polimerización iónica de monómeros y comonómeros en presencia de (1) un catalizador o base y (2) un macroiniciador en el que dicho macroiniciador es la poli(N-vinilpirrolidona) terminada en hidroxilo formada en la etapa (a) preparando de este modo dichos copolímeros dibloque y tribloque,

en el que dicho disolvente alcohólico se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, alcohol isopropílico, n-propanol, n-butanol, 2-butanol, terc-butanol, 1-pentanol y 2-pentanol, y dicho agente de transferencia de cadena es un derivado de tiol seleccionado del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-propanol, 4-mercapto-1-butanol, 3-mercapto-2-butanol y 6-mercapto-1-hexanol.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos monómeros o comonómeros son cíclicos o vinílicos.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos monómeros son cíclicos y se seleccionan del grupo que consiste en 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona,  $\epsilon$ -caprolactona y  $\gamma$ -caprolactona.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos monómeros o comonómeros son poliéster.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho poliéster es degradable.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho poliéster se selecciona del grupo que consiste en poli(D,L-láctido), poli(D-láctido), poli(L-láctido), poli( $\epsilon$ -caprolactona) y poli( $\gamma$ -caprolactona).
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho iniciador de radicales es un derivado de azo seleccionado del grupo que consiste en 2,2'-azobis (2-metil-N-(2-hidroxietil)-propionamida); 2,2'-azobis (2-metil-N-[2-(1-hidroxibutil)]propionamida y 1,1'-azobis(ciclohexano-carbonitrilo).
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (b) se realiza en presencia de un catalizador y dicho catalizador es alcóxidos de aluminio o de estaño.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa (b) se realiza en presencia de una base y dicha base es hidruro de potasio o de sodio.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) comprende un grupo hidroxilo en al menos un extremo de la cadena.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) se aísla por disolución y precipitación.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el disolvente para dicha disolución se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, acetona, 2-butanona, 4-metil-2-pentanona, diclorometano y tetrahidrofurano.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que al menos dos disolventes se combinan para dicha disolución.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el disolvente para dicha precipitación se selecciona del grupo que consiste en dietil éter, terc-butil metil éter, derivados de hexano, derivados de heptano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, tolueno y derivados de xileno.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que al menos dos disolventes se combinan para dicha precipitación.
16. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) se seca a vacío a una temperatura final sobre 100 °C.
17. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) se seca por destilación azeotrópica usando un disolvente orgánico inerte.

18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho disolvente orgánico inerte se selecciona del grupo que consiste en tolueno, derivados de xileno y derivados de heptano.
19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos copolímeros dibloque y tribloque se aíslan por precipitación usando un disolvente orgánico inerte.
- 5 20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicho disolvente orgánico inerte se selecciona del grupo que consiste en dietil éter, terc-butil metil éter, derivados de hexano, derivados de heptano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, tolueno y derivados de xileno.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que al menos dos disolventes orgánicos inertes se combinan para dicha precipitación.
- 10 22. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos copolímeros dibloque y tribloque se purifican por tratamiento con carbón vegetal.
23. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha poli(N-vinilpirrolidona) formada en la etapa (a) tiene un peso molecular de entre 1.000 D y 700 kD.
- 15 24. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos copolímeros dibloque y tribloque tienen un peso molecular de entre 2.000 D y 700 kD.
25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos copolímeros dibloque y tribloque se autoensamblan en micelas poliméricas en solución acuosa.
26. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos copolímeros dibloque y tribloque se autoensamblan en nanopartículas estabilizadas en solución acuosa.
- 20 27. El copolímero dibloque preparado por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
28. El copolímero dibloque de la reivindicación 27, en el que dicho copolímero dibloque es poli(N-vinilpirrolidona)-*bloque*-poli(D,L-láctido).
29. El copolímero tribloque preparado por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
- 25 30. El copolímero tribloque de la reivindicación 29, en el que dicho copolímero tribloque es poli(D,L-láctido)-*bloque*-poli(N-vinilpirrolidona)-*bloque*-poli(D,L-láctido).

FIGURA 1

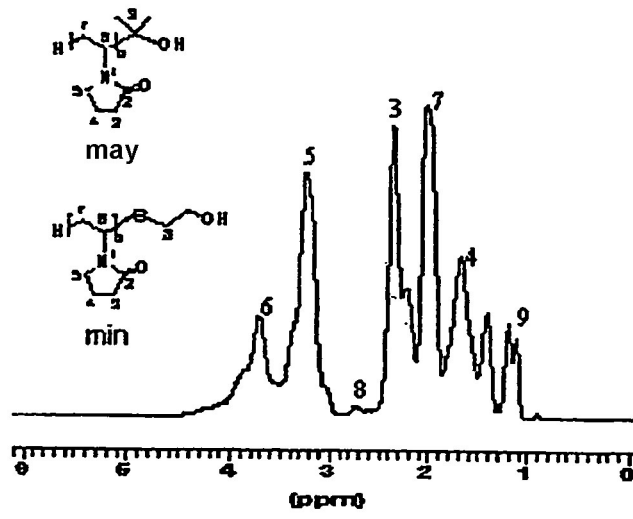




FIGURA 2

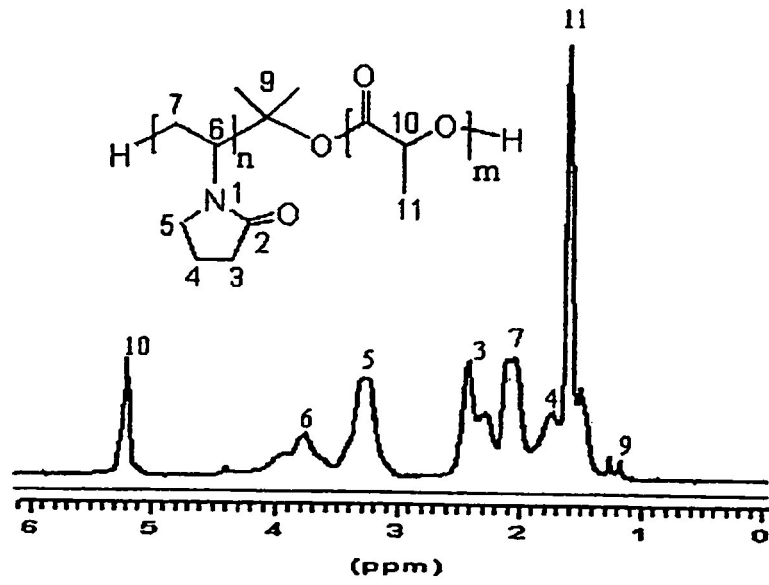


FIGURA 3

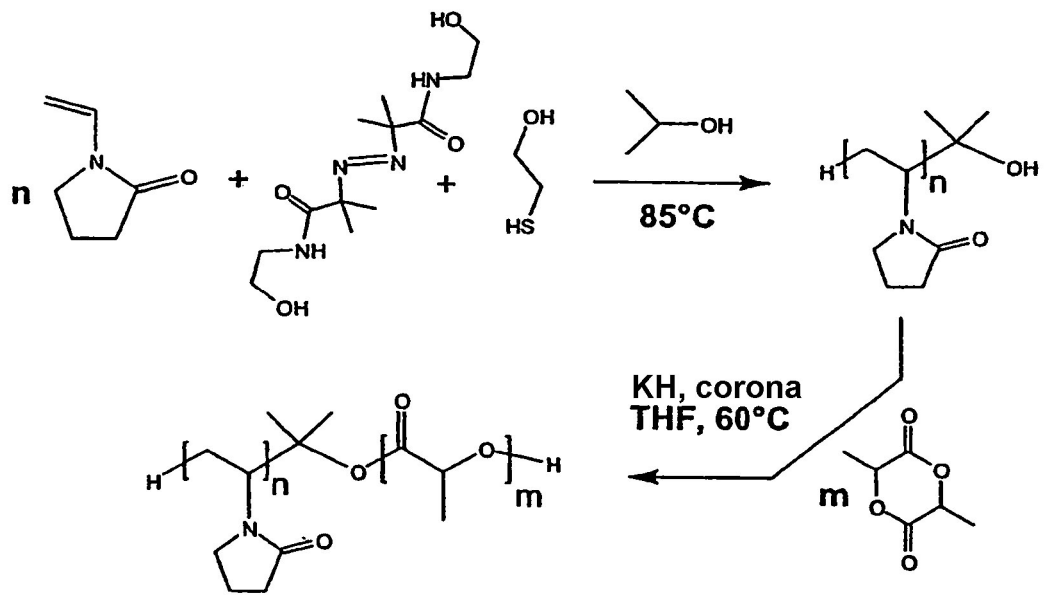


FIGURA 4

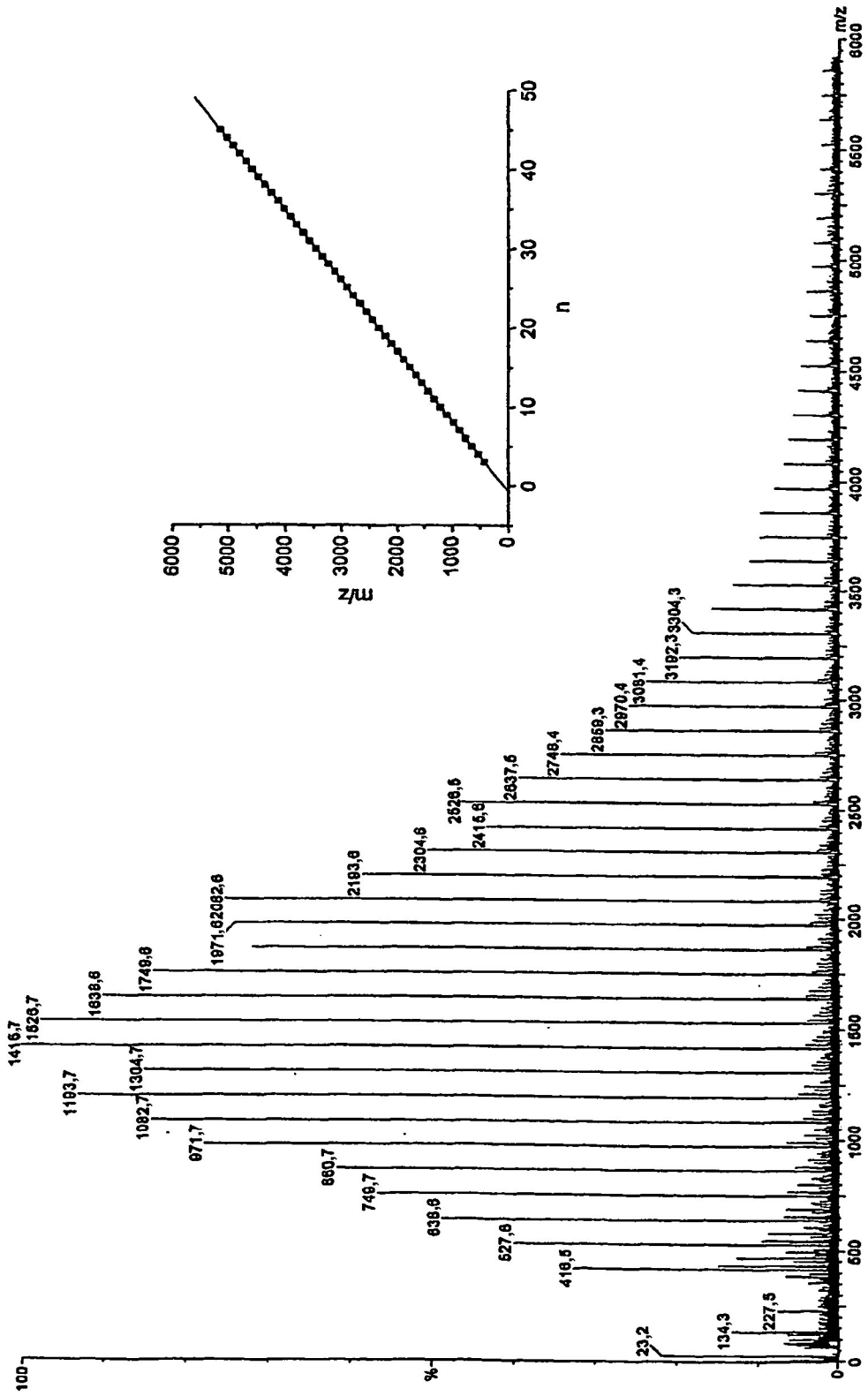


Figura 5A

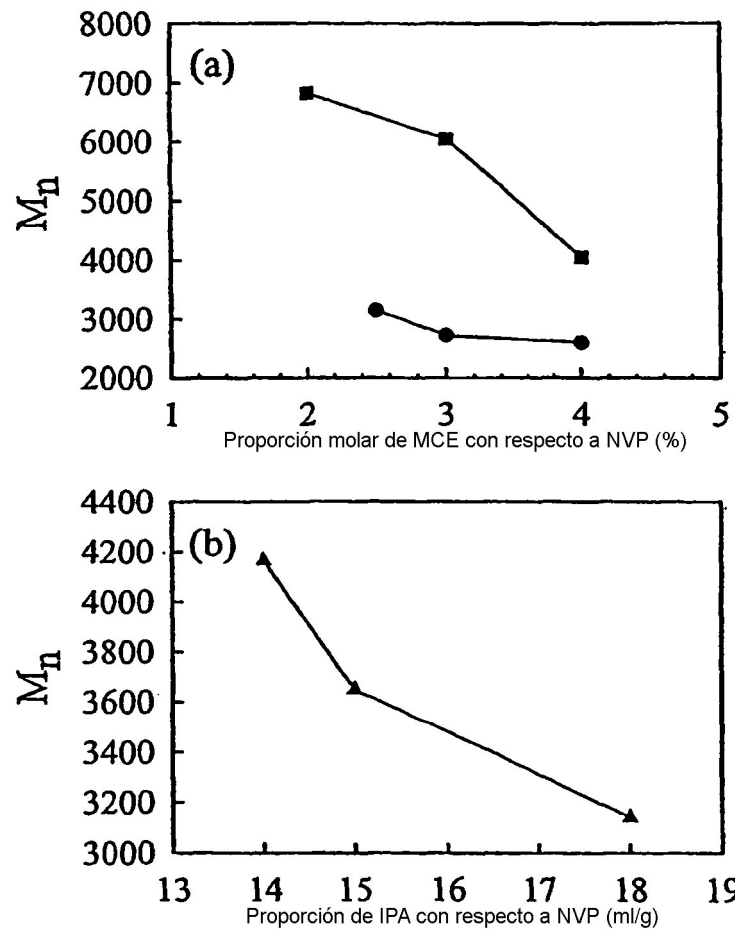


Figura 5B

FIGURA 6

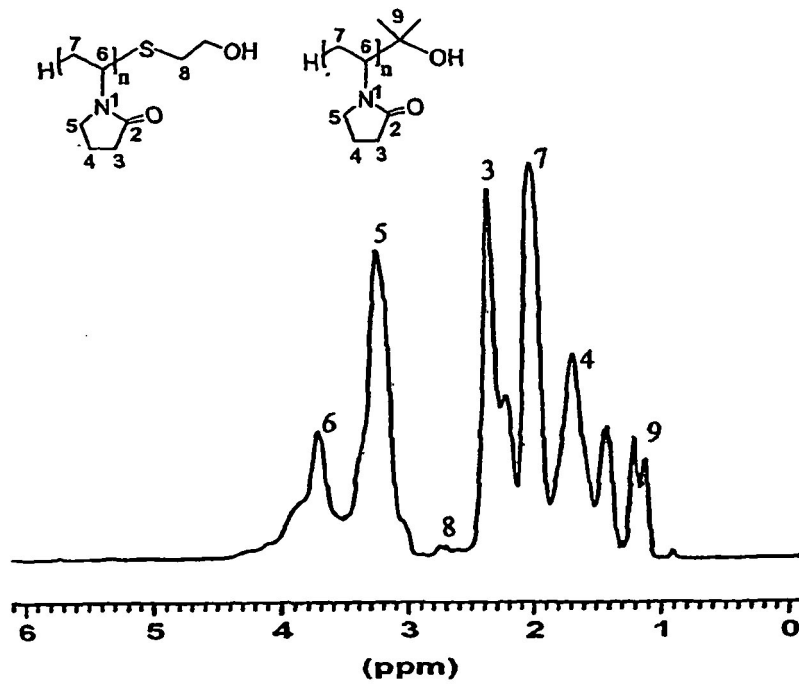


Figura 7A

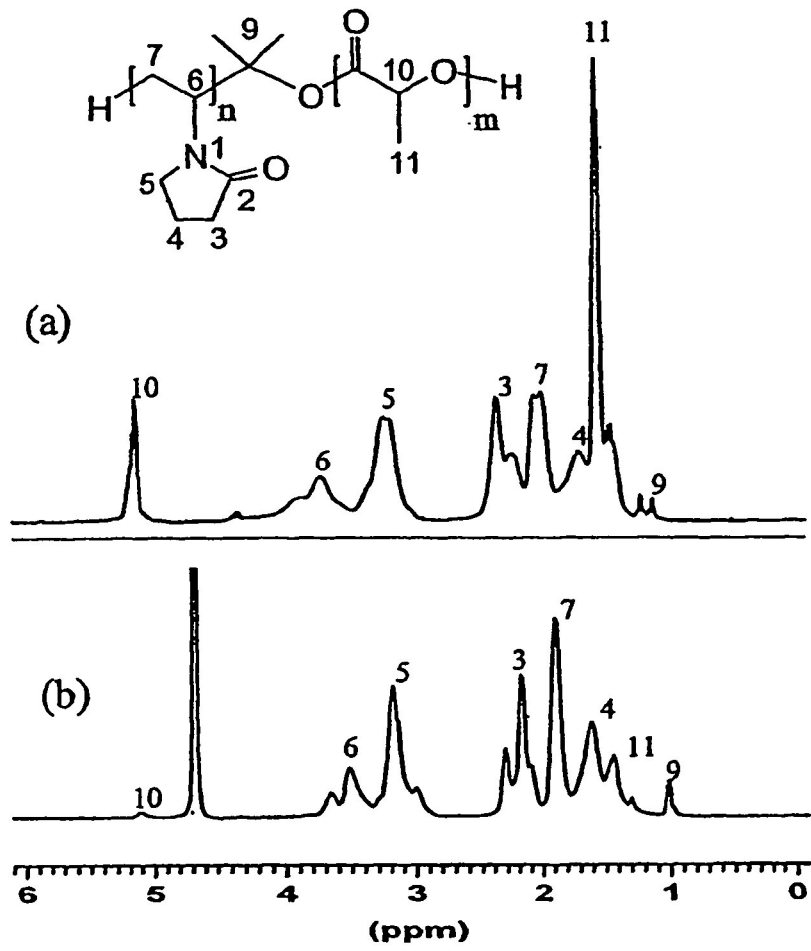


Figura 7B

FIGURA 8

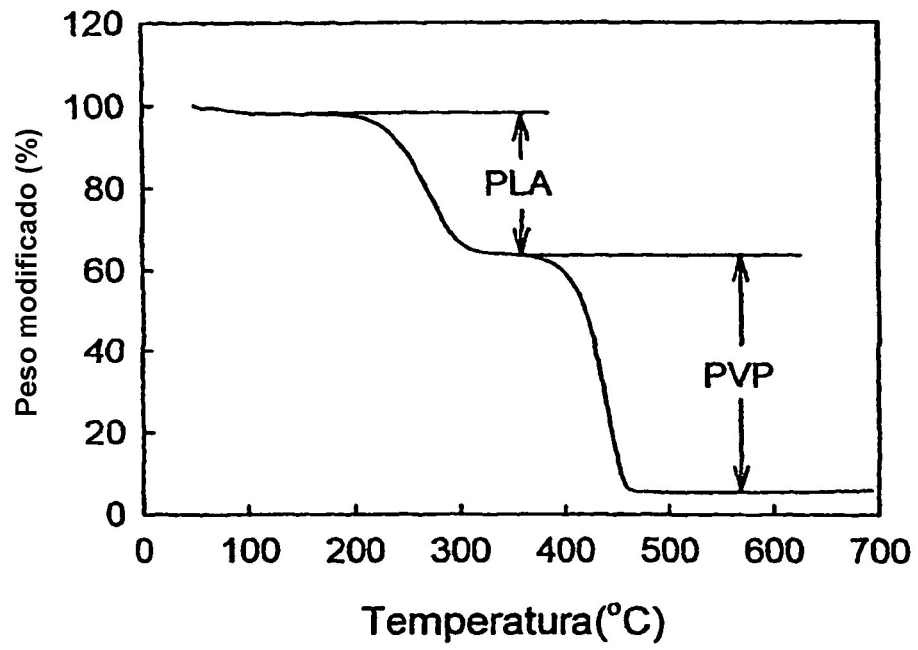


FIGURA 9

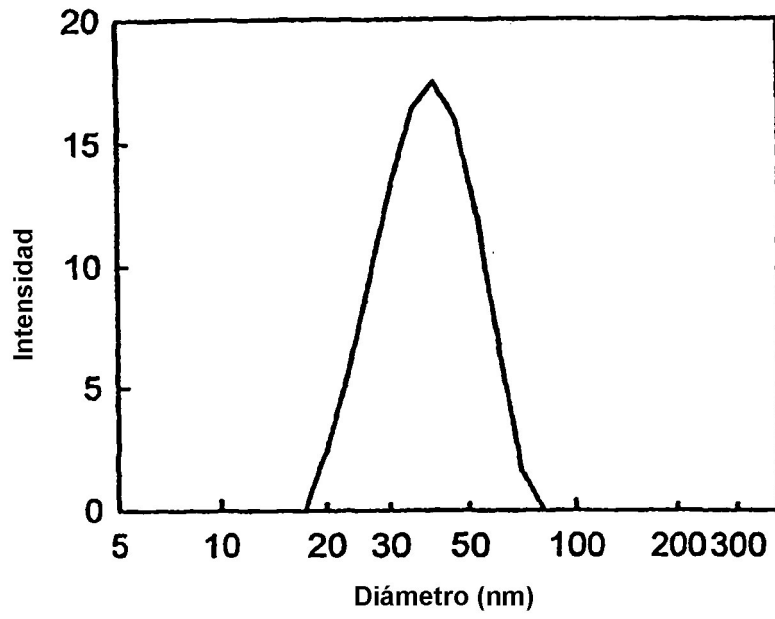




FIGURA 10

