

SYNTHESE DE POLYMERES A PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

INTRODUCTION DE SEQUENCES PEPTIDIQUES AU SEIN DE LA CHAÎNE MACROMOLECULAIRE

A. PLEURDEAU, J. C. RABADEUX, H. GUENIFFEY et C. LENUZ

Faculté des Sciences ERA 311, Université du Maine, Route de Laval, 72017 Le Mans Cedex, France

(Reçu le 7 janvier 1981)

Résumé—L'introduction de séquences peptidiques au sein de polymères à propriétés pharmacologiques permet d'envisager une amélioration de la biocompatibilité des prodrogues macromoléculaires. L'obtention de polypeptides de synthèse à partir d'anhydrides N-carboxyliques porteurs d'un principe actif répond à cet objectif. La L-lysine bloquée sous forme de complexe cuivrique réagit avec les chloroformates de stéroïdes (cholestérol, testostérone). Après déblocage du complexe et traitement par le phosgène, les anhydrides N-carboxyliques correspondants sont obtenus. Leur polymérisation et copolymérisation (avec l'anhydride N-carboxylique de la glycine) conduisent à des oligopeptides porteurs en chaîne latérale du squelette stéroïdique. La faible masse moléculaire des composés obtenus, leur hydro-solubilité limitée et l'obtention de produits secondaires constituent des facteurs limitatifs au développement de cette méthode. Des essais pharmacologiques visant à mettre en évidence l'effet retard lié à la libération du stéroïde et à vérifier la biocompatibilité et la biodégradabilité des prodrogues obtenues sont en cours d'étude.

INTRODUCTION

Au cours de précédentes recherches, la méthodologie d'accès à des polymères possédant des propriétés pharmacologiques a été étudiée, en particulier dans la série de polymères porteurs de squelettes stéroïdiques [1]. Les essais *in vitro* et *in vivo* réalisés sur de tels polymères ont mis en évidence les différents critères qui influencent l'expression des propriétés pharmacologiques de ces prodrogues macromoléculaires, en particulier l'apparition d'un effet retard lié à une libération progressive de la drogue temporairement fixée à un polymère support, par hydrolyse de la liaison drogue-support [2]. Afin de prendre en compte les critères d'hydrosolubilité et de biocompatibilité dans les liquides physiologiques, propriétés indispensables en vue d'une utilisation pharmaceutique, l'introduction de séquences peptidiques soit en chaîne latérale soit au sein de la chaîne macromoléculaire a été envisagée. Dans un précédent mémoire ont été reportées les synthèses de polyméthacrylates porteurs en chaîne latérale d'un principe actif stéroïdique et d'un reste acide aminé issu de la L-lysine [3]. Ces travaux ont permis d'observer que malgré la présence d'une fonction acide libre au niveau du "spacer" peptidique, l'hydrosolubilité des polymères reste faible. Dans le présent travail, l'introduction de séquences peptidiques est réalisée au niveau de la chaîne macromoléculaire elle-même. Dans ce cas, le polymère support devrait présenter une meilleure biodégradabilité et biocompatibilité comme l'indiquent les études déjà publiées.

Différentes solutions pouvaient être envisagées. Compte tenu des travaux réalisés précédemment, la synthèse d'anhydrides N-carboxyliques porteurs du squelette de la drogue et leur polymérisation ou

copolymérisation a été retenue comme première méthode d'approche.

PARTIE EXPERIMENTALE

Synthèse des anhydrides N-carboxyliques: **IIa,b**

2 g de **Ia,b** finement broyé et bien sec en suspension dans 100 ml de THF anhydre sont mis en présence d'un excès de phosgène et laissés sous agitation pendant 2 hr. Après dégazage de la solution, le mélange est filtré puis le solvant évaporé. Le composé recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle-éther de pétrole est filtré, puis séché sous vide et caractérisé par i.r., RMN [¹H] et [¹³C]; Pf = 270° (Tableaux 1 et 2).

Polymérisation des anhydrides N-carboxyliques

1 g de **IIa** en solution dans 15 ml de THF anhydre, en présence de pyridine comme amorceur est chauffé légèrement pendant 24 hr. Le mélange réactionnel est précipité dans l'éther de pétrole. Le polymère **IIIa** est filtré, lavé plusieurs fois au THF et séché sous pression réduite.

$$\bar{M}_n = 1230; I = 1,37$$

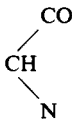
RMN [¹H]: 7,50; 7,70 · 10⁻⁶ (accumulation 64 ×) NH₂ terminaux. RMN [¹³C]: 164,96 · 10⁻⁶ C=O (amide); 156,98 · 10⁻⁶ C=O (carbamate). i.r.: 1860–1790 cm⁻¹ (C=O).

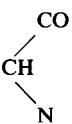
La polymérisation de **IIb** procède suivant un mode opératoire identique, cependant au cours de la précipitation dans l'éther de pétrole deux fractions peuvent être séparées. Celle correspondant à **IIIb** est caractérisée par les méthodes habituelles

$$\bar{M}_n = 1250; I = 1,6$$

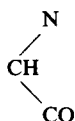
RMN [¹H]: (δ × 10⁶) 5,75 (ma) H₄; 6,0 (ma) NH₂; 4,50

Tableaux 1 et 2. Caractéristiques spectrales des anhydrides N-carboxyliques des entités L-lysine cholestérol (**IIa**) et L-Lysine testostérone (**IIb**)

RMN[¹ H] ($\delta \times 10^6$)	H ₆	H _{3α}	NH uréthane	NH cycle		RMN[¹³ C]	i.r. ν (cm ⁻¹)
IIa CCl ₄ /CF ₃ CO ₂ D	5,28	4,30	4,30	10	3,50	C ₁ 170,08	3340–1860 1790–1260
						C ₂ 156,61	
						C ₃ 152,57	

RMN[¹ H] ($\delta \times 10^6$)	H ₄	H _{17α}	NH uréthane	NH cycle		i.r.
IIb CDCl ₃ /CF ₃ CO ₂ D	5,88	4,65	4,50	10	4,20	3340–1860–1790
						1720–1675–1260

(ma) H_{17 α} , NH uréthane, NH amide et



i.r.: 3340–1730–1715–1680–1250 cm⁻¹.

Synthèse de l'anhydride N-carboxyglycine IV

Dans 3 g de glycine en suspension dans 200 ml de THF est condensé un excès de phosgène. Le milieu réactionnel est porté à 45° pendant 2 hr. La solution, après élimination du phosgène en excès, est filtrée. Le solvant est évaporé et l'anhydride IV séché sous pression réduite.

Copolymérisation de IV et **IIa,b**

On introduit 0,5 g de **IIa** et 0,068 g de IV en solution dans 15 ml de THF, dans un ballon de 50 ml muni d'un réfrigérant. La pyridine est utilisée comme amorceur. Le mélange est porté au reflux du THF pendant 24 hr. Le copolymère **Va** est précipité dans l'éther de pétrole, filtré, lavé au THF puis séché sous vide.

$$\bar{M}_n = 2000; \quad I = 1,97.$$

La copolymérisation de **IIb** et IV est réalisée dans les mêmes conditions. Cependant, lors de la précipitation dans l'éther de pétrole, deux fractions sont recueillies. La partie soluble est caractérisée par les méthodes usuelles.

Les masses moléculaires sont mesurées par GPC, le THF étant utilisé comme solvant.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les drogues ou molécules biologiques actives retenues dans cette étude sont des stéroïdes: cholestérol, testostérone. Suivant le schéma précédemment mis au point, les entités drogues-acide aminé **Ia,b** sont préparées par fixation du chloroformiate du stéroïde sur le complexe cuivrique de la L-lysine puis déblocage régénérant la fonction acide aminé libre [3].

L'anhydride N-carboxylique correspondant **IIa,b** est préparé selon la méthode de Fuchs–Farting par action du phosgène en excès sur les suspensions de

Ia,b en milieu THF [4]. Leur structure est caractérisée en i.r. par apparition de deux bandes d'absorption caractéristiques à 1790 et 1860 cm⁻¹. L'absence de bande d'absorption entre 2000 et 2250 cm⁻¹ indique que les produits ne comportent pas de dérivés isocyanates susceptibles de se former lors de la phosgénation. Les caractéristiques spectrales i.r. et RMN[¹H] sont rassemblées dans le tableau 1. L'analyse thermique différentielle de **IIa** montre une dégradation partielle probablement due à une décarboxylation (Fig. 1).

Une autre méthode de synthèse de **IIa,b** a été réalisée par phosgénation directe du chélate cuivrique de **Ia,b** en milieu THF [5]. Cette méthode conduit bien à l'anhydride N-carboxylique attendu mais l'élimination du chlorure cuivrique formé au sein du milieu réactionnel la rend difficile à exploiter.

La polymérisation des anhydrides N-carboxyliques **IIa,b** peut-être réalisée en masse selon la méthode de Katchalsky ou en solution dans un solvant tel que le THF [6]. Cette dernière méthode, la plus utilisée actuellement a été retenue dans la présente étude.

Le monomère **IIa** porté au reflux du THF pendant 24 hr en présence de pyridine conduit au polypeptide recherché. En RMN[¹H], la présence de pics à 7,50 et 7,70 · 10⁻⁶ (observés après accumulations successives) peut-être attribuée aux protons de la fonction —NH₂ d'extrémité de chaîne. Si l'on tient compte de cette hypothèse, la courbe d'intégration permet de calculer un degré de polymérisation de 4. En RMN[¹³C], les pics à 164,96 et 156,98 · 10⁻⁶ sont attribués respectivement au carbone de la fonction amide de la chaîne et au carbone de la fonction carbamate de la chaîne latérale. Le chromatogramme de GPC du polymère met en évidence la présence de trois composés: deux de masses moléculaires moyennes 600 et 1200 pouvant correspondre aux produits de décomposition du monomère en ses constituants initiaux et à un dimère cyclisé. Le troisième composé, plus important en poids, de masse moléculaire 2000 correspond à un oligopeptide de DP = 4.

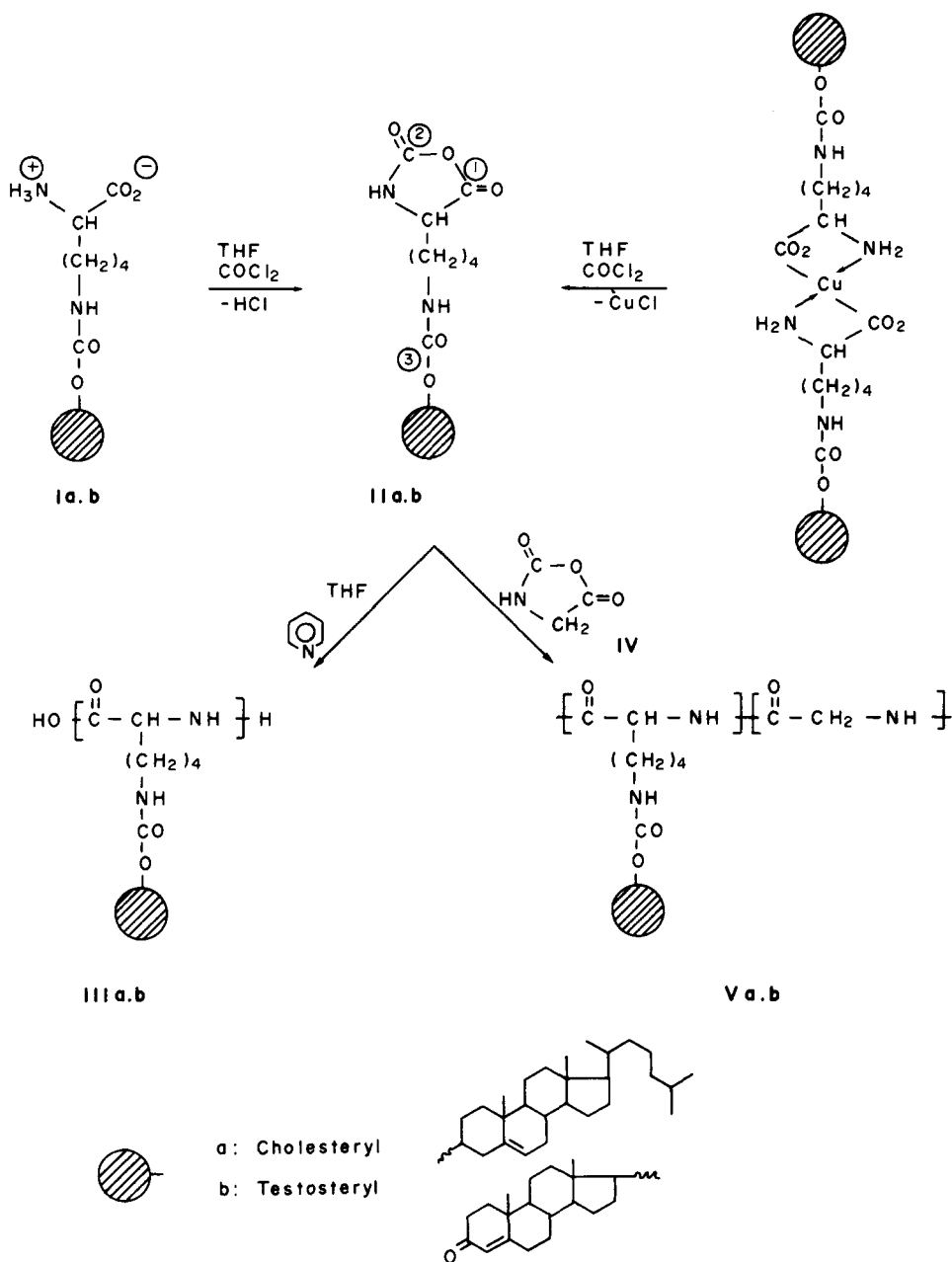


Fig. 1.

Dans le cas de la polymérisation de **IIb**, l'analyse RMN ^1H du polymère obtenu fait apparaître un massif situé entre 4 et 5 $\cdot 10^{-6}$ dont l'intégration correspond à 4 protons attribués à H 17 α de la testostérone, H tertiaire de la lysine, H des fonctions carbamate et amide. La présence d'un pic à 6 $\cdot 10^{-6}$ observé après accumulations successives peut-être attribué aux protons de la fonction amine d'extrémité de chaîne. La courbe d'intégration en RMN permet de calculer un degré de polymérisation moyen de 4, en accord avec celui obtenu à partir du chromatogramme GPC. Il convient de signaler qu'une partie soluble dans les solvants organiques, est isolée parallèlement. Différentes hypothèses ont été formulées

concernant la structure de ce composé mais les analyses réalisées n'ont pas permis de les vérifier. Il semblerait qu'il s'agisse de composés de faibles masses moléculaires.

Ainsi les réactions d'homopolymérisation des anhydrides N-carboxyliques **IIa,b** conduisent à des oligopeptides dont le degré de polymérisation est trop faible pour présenter un intérêt dans l'optique d'applications thérapeutiques. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ce bilan limitatif, notamment:

l'encombrement stérique créé par le squelette de la drogue (cholestérol, testostérone);

la complexité du mécanisme de polymérisation des anhydrides N-carboxyliques.

Tableau 3. Caractéristiques spectrales du copolypeptide glycine-lysine cholestérol

RMN[¹ H] ($\delta \times 10^6$)							$\begin{array}{c} \text{CO} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{N} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{N} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{glyc.} \end{array}$		i.r. ν (cm ⁻¹)
	H ₁₈	H ₂₁	H ₂₆₋₂₇	H ₁₉	H ₆	H _{3α} ,NH,CH ₂							
CDCl ₃ Va	0,68 (s)	0,83 (s)	0,88 (s)	1,00 (ma)	5,40 (ma)	Massif centré à 4,35	3,60 (ma)	3,20 (ma)	6,98 (s)	8,35 (ma)	3320-1720 1705-1690 1255		

Tableau 4. Caractéristiques du copolypeptide glycine-lysine testostérone

RMN[¹ H] ($\delta \times 10^6$)				$\begin{array}{c} \text{N} \\ \\ \text{H}_{17\alpha}, \text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{CO} \quad \text{glycine} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CO} \quad \text{CO} \end{array}$			$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{N} \\ \text{Lysine} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \text{Glycine} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \text{Lysine} \end{array}$		i.r. ν (cm ⁻¹)
	H ₁₈	H ₁₉	H ₄										
CDCl ₃ Vb	0,82 (ma)	1,20 (ma)	5,79 (ma)	Massif de 3,40 à 4,8			3,20 (ma)	6,99 (s)	6,20 (ma)	3340-1730 1715-1695 1680-1265			

Cependant, il semble que ces oligopeptides possèdent un domaine de solubilité plus étendu que celui des entités drogue-acide aminé. En fonction de ces observations, les recherches se sont orientées vers des solutions susceptibles de réduire l'influence des facteurs limitants évoqués ci-dessus. L'une de ces solutions consiste à réaliser la synthèse de copolypeptides:

Le comonomère retenu pour cette étude est l'anhydride N-carboxylique issu de la glycine. Ce composé, d'après les données de la littérature, possède une réactivité supérieure à celle des anhydrides N-carboxyliques issus d'autres acides aminés (valine, leucine...). Il est obtenu par action du phosgène en excès sur une suspension de glycine dans le THF. Après évaporation du solvant, le monomère **IV** est recristallisé et caractérisé par i.r. et RMN[¹H].

Les monomères **IIa** et **IV**, en quantités équimolaires sont copolymérisés dans le THF en présence de pyridine. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 24 hr et conduit au polymère **Va**. Les caractéristiques spectrales sont rassemblées dans le Tableau 3. En i.r., on constate la disparition des bandes d'absorption caractéristiques des monomères. En RMN[¹H], on note un pic à $6,98 \cdot 10^{-6}$ attribué au proton amide des unités glycine. La courbe d'intégration permet de calculer la composition du copo-

lymère **Va**: 30% de motifs glycine, 70% de motifs porteurs de cholestérol.

La masse moléculaire du copolymère est déterminée à partir du chromatogramme GPC: $\bar{M}_n = 2000$; $I = 1,97$. Un examen plus précis du chromatogramme permet d'identifier quatre massifs (\bar{M}_n 1 = 17000; \bar{M}_n 2 = 3400; \bar{M}_n 3 = 1400; \bar{M}_n 4 = 900). Seule la première zone pourrait correspondre au copolymère, les autres pouvant être assimilées à des homopolymères de **IIa**.

La synthèse de **Vb** est identique. Lors de la précipitation du polymère dans l'éther de pétrole, deux fractions sont récupérées. L'une totalement insoluble dans le précipitant, recueillie par filtration, l'autre soluble recueillie après évaporation du solvant. Seule la partie soluble a pu être caractérisée en i.r., RMN[¹H] et GPC (Tableau 4).

Compte tenu des masses moléculaires obtenues, les copolypeptides **Va,b** semblent mieux répondre à l'objectif visé, à savoir l'obtention de polymères à propriétés pharmacologiques. Cependant l'hydrosolubilité de ces polymères reste faible et il conviendrait d'entreprendre des copolymérisations de **IIa,b** avec des comonomères issus d'acides aminés porteurs d'une fonction hydrosolubilisante en chaîne latérale. Une autre méthode consiste à envisager la modification chimique d'homopolypeptides issus par exemple

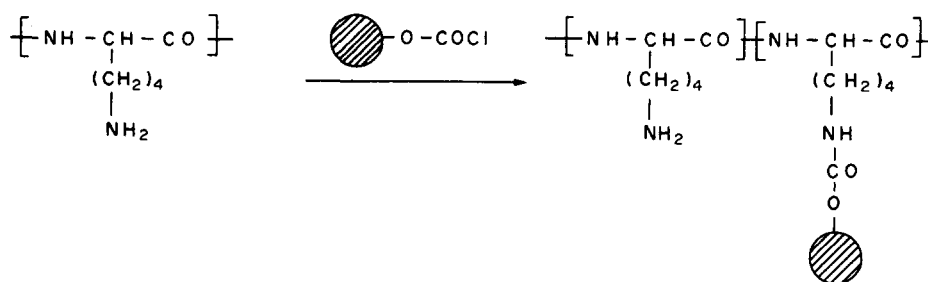


Fig. 2.

de l'anhydride N-carboxylique de la lysine par action de la drogue, de son dérivé chloroformiate ou de l'entité drogue-acide aminé selon le schéma réactionnel présenté en Fig. 2.

CONCLUSION

La synthèse de polymères à propriétés pharmacologiques possédant un squelette polypeptidique a été réalisée à partir d'acides N-carboxyliques issus de l'entité drogue L-lysine. Les homopolypeptides et copolypeptides ainsi obtenus sont dans la plupart des cas des oligomères de très faible masse moléculaire et leur étude structurale a mis en évidence des facteurs limitatifs en fonction du but recherché.

Encombrement stérique des drogues retenues.

Complexité du mécanisme de polymérisation des anhydrides N-carboxyliques dans le cas d'un amorçage par une amine tertiaire, entraînant la formation de composés secondaires difficiles à éliminer (dimère cyclisé, décomposition...).

Hydrosolubilité relativement faible.

D'autres méthodes sont actuellement en cours de réalisation pour améliorer ces résultats. Cependant, ces polymères porteurs d'un principe actif fixé temporairement sur un squelette peptidique constituent un modèle intéressant et les essais pharmacologiques en cours devraient permettre la mise en évidence d'une biocompatibilité et biodégradabilité supérieures à celles observées avec les polymères précédemment mis au point, dans lesquels la chaîne support était de nature hydrocarbonée.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. C. Rabadeux, Thèse de Doctorat d'Etat, Le Mans (1979).
2. C. Pinazzi *et al.*, *Thérapie* **34**, 95 (1979).
3. A. Pleurdeau, J. C. Rabadeux, H. Gueniffey et C. Lenuz, *Eur. Polym. J.* A paraître.
4. *Synthetic Polypeptides*. Academic Press, New York (1965).
5. A. Pleurdeau, H. Gueniffey, J. C. Rabadeux et L. C. Tang, Travaux non publiés.
6. E. Katchalski, I. Grossfeld et M. Frankel, *J. Am. chem. Soc.* **70**, 2094 (1948).

Abstract—The introduction of peptidic sequences into polymers with pharmacological properties may increase the biocompatibility of the macromolecular prodrug. The synthesis of polypeptides from N-carboxyanhydrides bearing the active principles defines this objective. The L-lysine blocked as copper complex reacts with steroidal chloroformates (cholesterol-testosterone). After deblocking of the complex and treatment by phosgene, the corresponding N-carboxyanhydrides are obtained. Polymerization and copolymerization (with glycine N-carboxyanhydride) give oligopeptides bearing steroidal backbone as side-group. The low molecular weight of the synthesized compounds, the limited water solubility and the presence of secondary products limit the development of the method. Pharmacological tests are being undertaken to study delayed effects due to slow release of the steroid, to compare the biocompatibility of such prodrugs.