

CONFÉDÉRATION SUISSE  
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 667 874 A5

**Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein**  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑤ Int. Cl.4: C 07 K 5/04  
C 07 K 5/06  
A 61 K 9/58  
A 61 F 2/00

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 5436/85

⑰ Titulaire(s):  
Battelle Memorial Institute, Carouge GE

⑳ Date de dépôt: 19.12.1985

⑱ Inventeur(s):  
Bichon, Daniel, Gaillard (FR)  
Lamy, Bernard, Carouge GE  
Borloz, William, Nyon

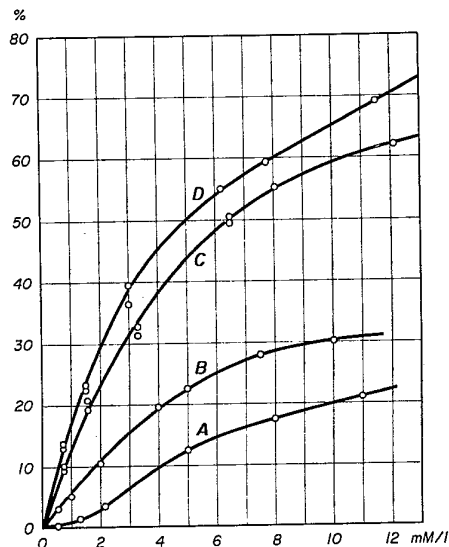
㉑ Brevet délivré le: 15.11.1988

㉒ Fascicule du brevet  
publié le: 15.11.1988

㉓ Mandataire:  
Blasco Dousse, Carouge GE

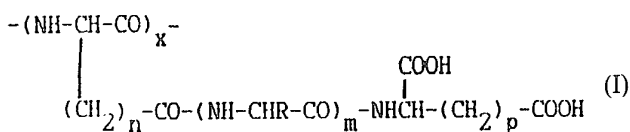
⑤④ **Polypeptide synthétique biodégradable et son utilisation pour la préparation de médicaments.**

⑤⑦ Dérivés des acides polyaspartique et/ou polyglutamique dont les chaînons latéraux comportent des groupes COOH susceptibles de former des anhydrides cycliques. Ces polyacides et anhydrides sont utilisables pour la fabrication de médicaments.

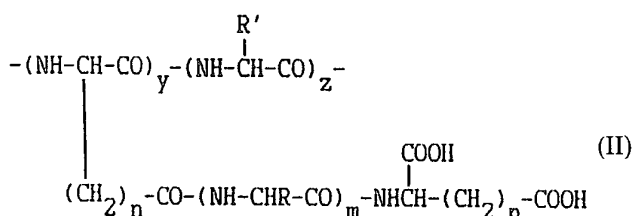


## REVENDEICATIONS

1. Polypeptide carboxylé hydrosoluble biodégradable de formule



ou de formule



où les groupes R et R', identiques ou différents, sont des restes d'acides aminés comportant, ou non, un ou plusieurs groupes COOH libres ou estérifiés; m est un nombre entier de 0 à 5. p est égal à 0, 1 ou 2, n vaut 1 ou 2 et x ou y + z sont choisis pour que la masse moléculaire du polypeptide ne soit pas inférieure à 5000 D, le polypeptide se présentant sous forme d'acide libre ou d'anhydride cyclique.

2. Polypeptide suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que R est choisi parmi les restes méthyle, éthyle, isobutyle, phényle et benzyle.

3. Polypeptide suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que, les chaînons intermédiaires d'indice m sont choisis parmi les acides aminés suivants: glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, tyrosine, sérine, cystéine, méthionine, lysine, arginine.

4. Polypeptide suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que l'ossature du composé I est choisie parmi les acides polyglutamiques et aspartiques et que l'ossature du composé II est choisie parmi les copolymères des acides glutamique et/ou aspartique avec un ou plusieurs autres acides aminés choisis parmi l'alanine, la leucine, la valine et la phénylalanine.

5. Polypeptide suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que le polymère II est choisi parmi les copolymères des polyglutamines ou aspartamines avec, comme co-monomères, respectivement, l'acide glutamique et/ou les glutamates d'alcoyles inférieurs et l'acide aspartique et/ou les aspartates d'alcoyles inférieurs.

6. Polypeptide suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que les groupes carboxyliques sont salifiés par des cations métalliques alcalins ou alcalino-terreux, par des amines primaires, secondaires ou tertiaires ou qu'il sont sous forme d'anhydrides cycliques.

7. Polypeptide suivant la revendication 1, en tant que médicaments antiviraux et antitumoraux.

8. Utilisation du polypeptide I et II suivant les revendications 1 à 6 pour préparer des médicaments à effet retard dans l'organisme, dans lequel le polypeptide joue le rôle de support.

9. Utilisation suivant la revendication 8, caractérisée par le fait qu'on mélange ledit médicament et ledit polymère de façon homogène et qu'on façonne ce mélange sous une forme pharmaceutiquement acceptable.

10. Utilisation suivant la revendication 8, caractérisée par le fait qu'on plastifie le polymère par un plastifiant, notamment un polyalcoylène glycol, qu'on y ajoute un médicament, puis qu'on moule par la chaleur le produit thermo-

plastique ainsi obtenu sous forme de granulés, bâtonnets, capsules ou autres particules aptes à être administrées par toutes voies habituelles.

11. Utilisation suivant la revendication 8, caractérisée par le fait qu'on fait réagir les polymères I et II sous leur forme d'anhydride cyclique avec une substance susceptible de réagir avec les anhydrides et, partant, de se fixer par une liaison covalente sur lesdits polymères.

12. Utilisation suivant la revendication 11, caractérisée par le fait que ladite substance réagit avec l'anhydride par l'intermédiaire d'une fonction amino, amido, hydroxy ou thiohydroxy.

13. Utilisation des polymères I et II, suivant la revendication 1, pour fabriquer des implants et prothèses biodégradables utilisables en chirurgie.

14. Utilisation suivant la revendication 13, pour la préparation d'implants ou prothèses d'os biodégradables, caractérisée par le fait qu'on constitue de telles prothèses d'hydroxyapatite liée par lesdits polymères I ou II.

15. Procédé de préparation des polymères I et II suivant la revendication 1 où m = 0, caractérisé par le fait qu'on fait réagir un polyacide de formule IV:  $\text{-(NH-CH}[(\text{CH}_2)_n\text{-COOH]}\text{-CO-)}_x$ , ou le copolyacide correspondant de formule V:  $\text{-(NH-CH}[(\text{CH}_2)_n\text{-COOH]}\text{-CO-)}_y\text{-(NH-CHR'-CO-)}_z$  où n, x, y, z et R' ont le sens précité, avec un ester d'acide aminé de formule III:  $\text{H}_2\text{N-CH}[(\text{CH}_2)_p\text{-COOY}]\text{-COOY}$  où p a le sens précité et Y désigne un alcoyle d'estérification, en présence de dicyclohexylcarbodiimide, de manière à obtenir les polymères I ou II sous forme estérifiée, puis qu'on soumet ces polymères-ester à une désalcoylation par hydrolyse ou hydrogénéolyse catalysée de façon à les convertir en acides carboxyliques libres.

16. Procédé de préparation des polymères I et II suivant la revendication 1, applicable au cas où m = 0, caractérisé par le fait qu'on fait réagir un polyacide de formule IV:  $\text{-(NH-CH}[(\text{CH}_2)_n\text{-COOH]}\text{-CO-)}_x$ , ou le copolyacide correspondant de formule V:  $\text{-(NH-CH}[(\text{CH}_2)_n\text{-COOH]}\text{-CO-)}_y\text{-(NH-CHR'-CO-)}_z$  où n, x, y, z et R' ont le sens précité avec un diester de formule VI:  $\text{H}_2\text{N-CHR-CO-(NH-CHR-CO)}_m\text{-NH-CH}[(\text{CH}_2)_p\text{-COOY}]\text{-COOY}$  où les R, identiques ou différents, ainsi que m et p ont le sens précité, et y désigne un alcoyle d'estérification, en présence de dicyclohexylcarbodiimide, de manière à obtenir les polymères I ou II sous forme estérifiée, puis qu'on soumet ces polymères-ester à une désalcoylation par hydrolyse et/ou hydrogénéolyse catalysée afin de les convertir en acides carboxyliques libres.

17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé par le fait que le diester de formule VI est obtenu par couplages successifs sur le diester III indiqué dans la revendication 15, en présence de dicyclohexylcarbodiimide, d'acides aminés dont le  $\text{NH}_2$  est temporairement désactivé par un groupe protecteur, ce groupe protecteur étant éliminé par déshydrogénation après chacun desdits couplages.

## DESCRIPTION

La présente invention a pour objet un polypeptide biodégradable hydrosoluble non toxique utilisable en biologie et pour diverses applications thérapeutiques, notamment pour servir de support à des médicaments, ceux-ci étant, ensuite, libérés progressivement dans l'organisme au fur et à mesure de la dégradation biochimique du polymère.

Depuis plusieurs années, on connaît des polymères biodégradables non-toxiques pouvant servir de réservoir de médicaments et permettant la libération progressive contrôlée de ceux-ci dans l'organisme lors de la dégradation du polymère porteur. On trouve des informations générales sur de tels produits dans l'ouvrage: «Fundamental Aspects of Bio-

compatibility» par D.F. WILLIAMS, CRC Press (1981). Voir aussi brevet US-P 4 093 709.

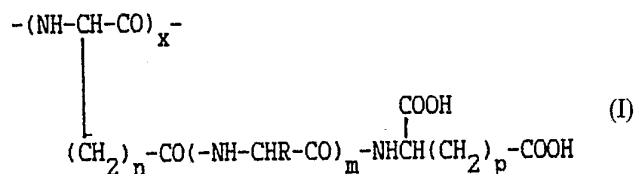
Parmi ces polymères, on cite plus particulièrement les polypeptides synthétiques (polyaminoacides) dont la structure est voisine de celle des protéines. Ces polypeptides sont biocompatibles et leurs produits de dégradation (acides aminés) sont résorbables par l'organisme. Ainsi SIDMAN ET AL (J. Membr. SCI (1980), 7 (3), 277-91) ont divulgué un copolymère d'acide glutamique et de  $\gamma$ -glutamate d'éthyle dont la vitesse de dégradation est fonction de la composition du copolymère (proportions molaires des segments estérifiés par rapport aux segments non estérifiés) et qui permet d'emmagasiner de nombreux produits, par exemple médicaments anti-malaria, anticancer et autres. De tels polymères peuvent être utilisés sous forme de baguettes contenant, en mélange, le médicament désiré ou sous forme de capsules renfermant le médicament si celui-ci n'est pas miscible avec le polymère. Cependant, les polyglutamates et polyaspartates d'alcoyle (esters simples de ces polyacides) ne sont dégradables en temps utile (d'un ordre de grandeur compatible avec leur utilisation pharmaceutique) que sous forme partiellement hydrolysée (voir par exemple ASANO et al. J. Macromol. Sci. Chem. A21 (5) (1984), 561-582). Pour obtenir de tels polymères partiellement estérifiés, il faut soumettre ces polyglutamates ou polyaspartates à une réaction d'hydrolyse ménagée dont les conditions sont très difficilement reproductibles. Par ailleurs, de très faibles différences dans le degré d'hydrolyse influent considérablement sur la vitesse de biodégradabilité ultérieure ce qui constitue un problème additionnel dans l'emploi de tels polymères pour les buts précités.

Aussi, malgré l'intérêt que présentent les produits ci-dessus, on a continué à chercher un produit de qualités améliorées et présentant notamment les propriétés suivantes:

1. Excellente solubilité dans la plupart des solvants inoffensifs courants convenant aux médicaments et même dans l'eau (en effet, les dérivés connus de polyaminoacides ne sont, en général, solubles que dans certains solvants spéciaux (DMF, pyridine,  $F_3CCOOH$ ) dont l'emploi est incommode pour les préparations pharmaceutiques) thermoplastiques.

2. Contrôle amélioré du processus de dégradation. En effet, la vitesse de dégradation des polypeptides synthétiques connus est liée de façon stricte à leur structure chimique et notamment au taux d'estérification. Ainsi, dans un cas donné (voir, SIDMAN K.R., et al., PB 81-132136 NTIS (1980), p. 42) une variation du taux d'estérification de l'ordre de 10% fait passer la vitesse de dégradation de 1 au centuple (voir également la référence: SIDMAN citée plus haut), ce qui pose des problèmes pour la préparation d'échantillons reproductibles.

Le polymère de l'invention (et ses copolymères avec d'autres acides aminés) a permis de réaliser ces objectifs et d'autres encore, non moins importants, comme on le verra par la suite. Il s'agit d'un polypeptide estérifié de formule:



dans laquelle R est un reste d'acide aminé quelconque mais, de préférence, un hydrogène (glycine), méthyle (alanine), benzyle (phénylalanine), etc. Cependant R peut également désigner des restes d'acides aminés comportant des fonctions OH, SH,  $NH_2$  (correspondant à d'autres acides aminés), ainsi que -COOH (correspondant aux acides glutamiques et aspartiques), ce groupe carboxylique pouvant être libre, par-

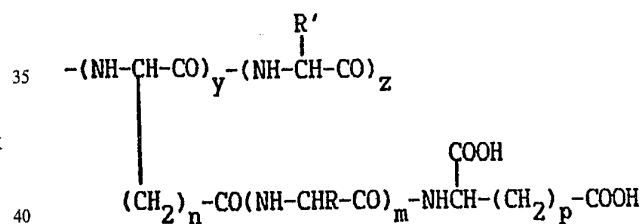
tiellement estérifié par un alcoyle inférieur ou totalement estérifié.

Dans la formule I qui précède, n vaut 1 ou 2, m est égal à 0 ou un entier de 1 à 4, p vaut zéro, 1 ou 2 et x est tel que la masse moléculaire du polymère soit d'au moins 5000 D. La liaison amide reliant le carbone latéral du polyacide et le reste de la chaîne latérale est dénommée liaison «isopeptide».

On voit, de par la formule I qui précède que, dans le cas où m égale zéro, le polymère est un dérivé de la polyglutamine et, notamment lorsque p vaut zéro, la poly- $\gamma$ -malonylglutamine. Lorsque p vaut 1, on a la poly- $\gamma$ -succinylglutamine et lorsque p vaut 2, la poly- $\gamma$ -glutarylglutamine asymétrique.

Lorsque m est différent de zéro, la molécule comporte un chaînon mono- ou oligopeptidique intercalé entre le groupe CO de la polyglutamine et le groupe amino-substitué terminal. L'existence d'un ou plusieurs groupes peptidiques dans la chaîne latérale du présent polymère correspond à la présence d'un ou plusieurs sites d'attaque hydrolytique enzymatique conduisant à la dégradation du polymère en fragments résorbables par l'organisme dans lequel le polymère est incorporé. On peut donc, en jouant sur le nombre et le type des aminoacides constituant ledit chaînon, exercer un contrôle précis sur la vitesse de dégradation du polymère dans une application donnée. Parmi les aminoacides qu'on préfère pour constituer ces chaînons, on peut citer la glycine, l'alanine, la phénylalanine, les acides aspartiques et glutamiques estérifiés ou non estérifiés, la leucine, la tyrosine, la méthionine et autres.

Le polymère de l'invention peut également se présenter sous la forme de copolymère avec d'autres polyaminoacides. Dans ce cas, on aura un copolymère de formule:



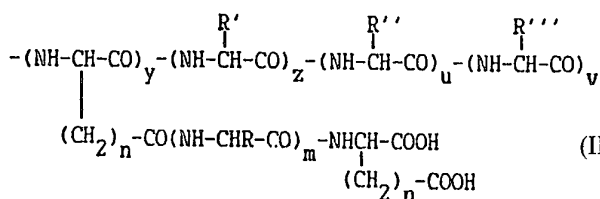
où R' est un reste d'acide aminé quelconque, non carboxylé ou carboxylé; dans ce dernier cas, les groupes COOH peuvent être libres, partiellement estérifiés ou totalement estérifiés, les groupes R' des unités -(NH-CHR'-CO) pouvant être identiques ou différents dans la chaîne du copolymère, avec  $y + z = x$ , la valeur de x étant toujours choisie pour que le copolymère ait une masse moléculaire moyenne d'au moins 5000 D. La définition de R' peut donc correspondre à celle de R. En règle générale, on préfère pour R' avoir des groupements tels que, par exemple méthyle (alanine), isopropyle (valine), isobutyle (leucine et isoleucine), benzyle (phénylalanine), etc. En principe, tous les autres acides aminés sont également possibles, quoique, pour des raisons évidentes, on n'ait pu les essayer tous. R' peut également désigner un reste d'acide glutamique ou aspartique non estérifié, ou estérifié partiellement par un alcool quelconque, par exemple MeOH ou EtOH, c'est-à-dire, par exemple,  $-(CH_2)_n\text{-COOH}$  ou  $-(CH_2)_n\text{-COOMe}$ , n valant 1 ou 2. Il est à remarquer que si R' désigne un reste d'acide glutamique ou aspartique libre, on peut représenter le polymère par la formule I, mais en admettant que le degré de substitution (amidation du carboxyle) est inférieur à 100%; bien entendu, ce cas est également représentable par la formule II avec  $R' = (CH_2)_n\text{-COOH}$  et  $y/(z+y)$  étant égal au degré de substitution.

On pourra également avoir, indifféremment, des acides aminés de la série L ou D. Les acides aminés de la série L (ou naturels) sont les plus intéressants car les polypeptides

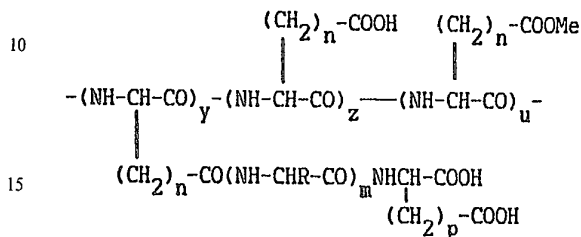
les contenant sont dégradables par les enzymes (protéases) du corps humain, alors que les polypeptides constitués d'unités D ne le sont pas. On peut mettre à profit cette différence grâce à des copolymères comprenant des aminoacides D et L, ceci afin de disposer de polymères dont la vitesse de dégradation est modifiée suivant un schéma préétabli.

Revenant à des considérations plus générales, il faut noter que la proportion molaire, dans le copolymère II, de l'autre polyaminoacide libre ou partiellement estérifié permet également dans une notable mesure de régler la vitesse de biodégradation du copolymère en fonction des agents présents dans l'organisme au site de destination du mélange de copolymère et du médicament à administrer, (c'est-à-dire dans l'organe où le médicament doit agir). Ainsi, par exemple, si le copolymère est un copolymère de polyglutamine I et de leucine, on choisira la proportion molaire relative des deux constituants en fonction de la vitesse relative de dégradation, au lieu considéré, de la polyglutamine et de la poly-leucine. En règle générale, le rapport z/y peut varier de 1 à 30, mais ces limites peuvent être dépassées si besoin est.

Bien entendu, dans le cas où le groupe R' ne désigne pas un groupe de nature unique dans la chaîne du copolymère, c'est-à-dire, par exemple lorsque l'un des R' désigne un reste d'acide aminé libre et qu'un autre R' désigne un reste d'acide aminé estérifié, on pourra, pour plus de commodité désigner les variantes de R' par les signes R'', R''' etc. La formule générale d'un tel copolymère peut alors être schématisée comme suit:



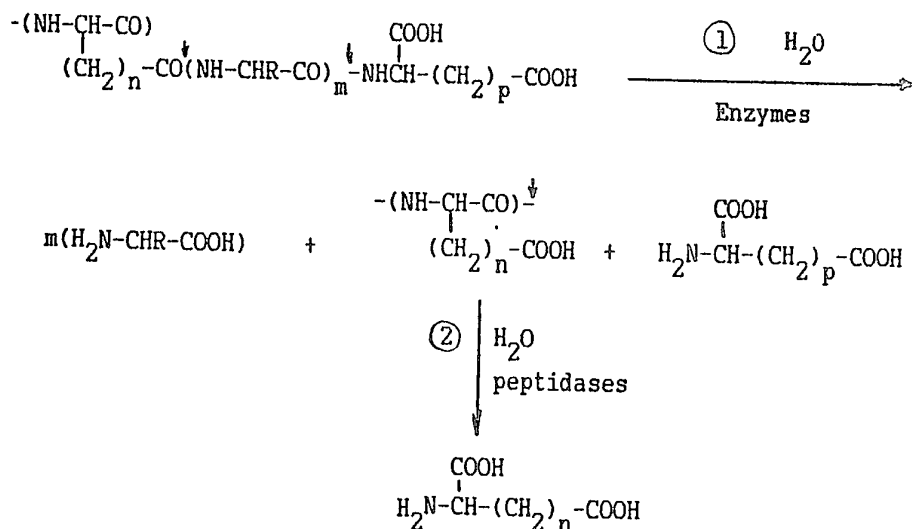
où la somme des y, z, u, v, . . . , etc est égale à x; u, v, etc. peuvent être bien entendu nuls si le reste désigné par R' est de nature unique. Un cas typique où le copolymère présente des R' et R'' distincts est celui où ces groupes désignent des restes d'acide glutamique et/ou aspartique estérifiés et non estérifiés, la formule schématique d'un tel polymère (dans le cas d'espèce, partiellement méthylé) se présentant comme suit:



Il est bien entendu que, du point de vue isomérisation optique, les polymères de l'invention peuvent comprendre des éléments de configuration L ou D ou des mélanges racémiques ou, encore, des polymères où une des configurations domine. Les propriétés biochimiques de ces divers assemblages ne sont, bien évidemment, par identiques, les polymères où dominent les formes naturelles L étant plus accessibles à la dégradation enzymatique. On peut donc, comme déjà mentionné ci-dessus, en contrôler la dégradabilité en dosant, dans le copolymère les proportions relatives de l'une et l'autre forme.

Les polymères I et copolymères II sont solubles dans l'eau (même à PH acide, contrairement à l'acide polyglutamique) (à moins que les groupes COOH ne soient estérifiés) et généralement solubles dans un ou plusieurs des solvants tels que le diméthylformamide, l'acide trifluoroacétique, l'acide dichloroacétique, le trifluoroéthanol

La biodégradation du polymère I peut être schématisée comme suit:



La réaction (2) est consécutive à la réaction (1) et, de ce fait, la biodégradation du polymère sera d'autant plus rapide que la vitesse d'hydrolyse de la chaîne latérale est plus grande.

Dans le schéma réactionnel ci-dessus, on a indiqué par des petites flèches les liaisons où se produisent les scissions par hydrolyse enzymatique (par exemple par la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase présente dans l'organisme); aussi, par une sélection appropriée des aminoacides constituant cette chaîne latérale, on peut, en fonction des conditions d'hydrolyse au

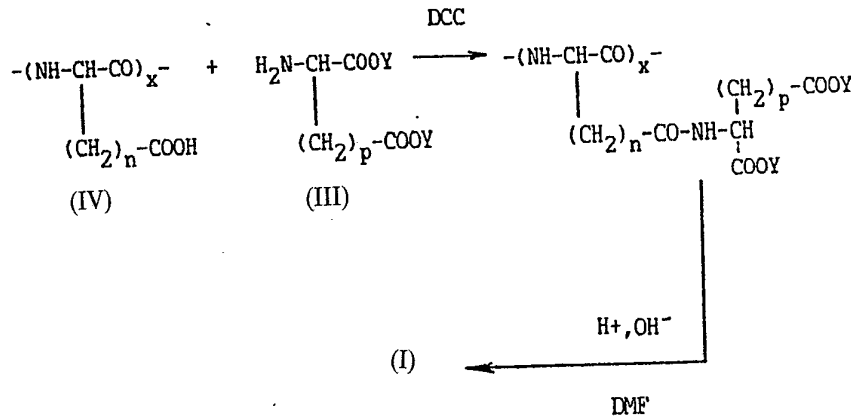
lieu d'administration au polymère, régler sa vitesse de dégradation et, partant, celle de libération des médicaments qui lui sont associés. On pourra trouver une bonne illustration des propriétés d'hydrolyse enzymatique des peptides greffés dans la référence suivante: J. KOPECEK et al., Enzymatically Degradable Bonds in Synthetic Polymers with Controlled Drug Delivery, Vol. I, basic concepts, CRC Press, page 81, (1983).

On peut préparer le polymère I et son copolymère II par diverses voies. Ainsi, par exemple dans le cas où m = 0 (ab-

sence de chaînons de pontage entre le carbonyle du polyacide et le groupe azote substitué de la glutamine) on fait réagir le polyaminoacide IV ou co-polyaminoacide correspondant désiré avec un aminomalonate, aspartate ou glutamate d'alcyle III (de tertbutyle, par exemple) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ce qui fournit l'ester correspon-

dant du polyacide I ou II, ce dernier étant ensuite hydrolysé par les moyens habituels.

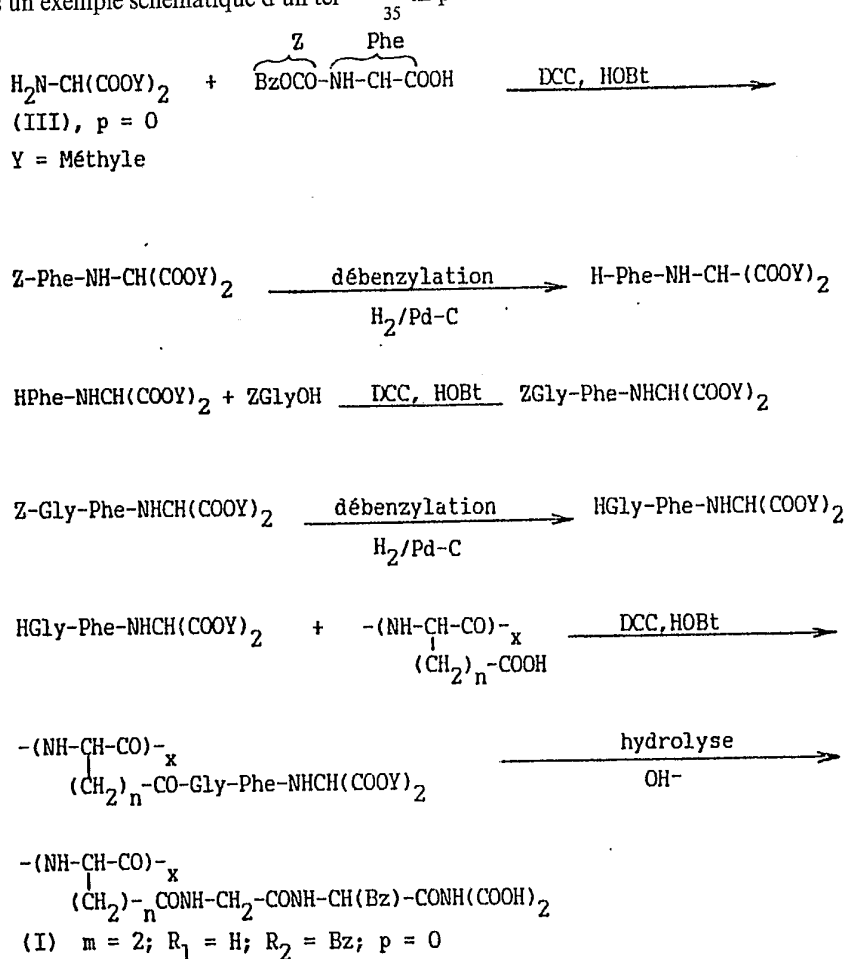
Le schéma réactionnel de cette voie de préparation figure ci-dessous. Dans ce schéma, le signe Y désigne un groupe ester, par exemple, méthyle, butyle, benzyle, etc. . .



Dans le cas où on intercale un chaînon intermédiaire de pontage dans la chaîne latérale ( $m = 0$ ), on peut, suivant une forme d'exécution, constituer d'abord cette chaîne latérale à partir du diester III, en y fixant, progressivement un ou plusieurs amino acides suivant les moyens habituels, puis relier cette chaîne au polyaminoacide comme dans le schéma ci-dessus.

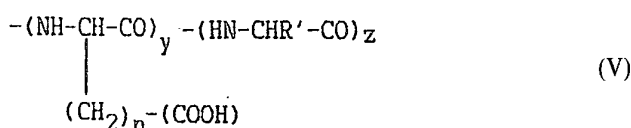
On donne ci-dessous un exemple schématique d'un tel

processus dans lequel le diester III dérive de l'acide aminomalonique et les chaînons intermédiaires dérivent, successivement, de la phénylalanine et de la glycine. On notera que pour ajouter ces chaînons intermédiaires, on protège la fonction amino de ces aminoacides par un groupe benzoxycarbonyl (Z) et on utilise, conjointement à la dicyclohexylcarbodiimide (DCC), de l'hydroxybenzotriazole (HOBt), un réactif permettant d'éviter les racémisations

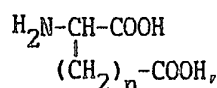


Suivant une seconde forme d'exécution, on peut procéder dans un sens inverse, c'est-à-dire, dans le cas d'exemple ci-dessus, faire réagir le polyacide de départ en présence de DCC avec la glycine (celle-ci ayant été préalablement estérifiée), éliminer le groupe ester protecteur, faire réagir le polymère ainsi obtenu avec un ester de phénylalanine, et ainsi de suite, jusqu'à obtention de la chaîne finale. Les étapes d'une telle forme d'exécution étant évidentes en soi pour l'homme de métier, notamment le spécialiste des synthèses peptidiques, il n'est pas nécessaire de les détailler plus avant ici.

Bien entendu, les techniques utilisées pour la préparation du polymère I conviennent identiquement dans le cas des copolymères II, la différence concernant simplement le choix du polyacide de départ, c'est-à-dire le remplacement du polyacide IV par un copolyacide correspondant, par exemple



Le polyaminoacide IV ou co-polyaminoacide V utilisé comme produit de départ pour la préparation du polymère I ou du copolymère II s'obtient facilement par les moyens habituels comprenant l'estérification par un alcool inférieur du carboxyle latéral d'un acide de formule



la transformation de l'ester en N-carboxyanhydride correspondant (NCA) par le phosgène en milieu dioxanne ou THF, la polymérisation du NCA en polyaminoacide estérifié et l'hydrolyse du groupe ester protecteur en milieu alcalin ou par l'acide trifluoroacétique. De telles méthodes sont connues en soi (voir par exemple Encyclopedia of Polymer Science and Technology; N-carboxyanhydride, vol II, page 837). Lorsqu'on désire parvenir à un copolymère ou R' désigne un carboxyle latéral partiellement estérifié (R' = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH et R'' = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOAlk) on prendra soin que l'hydrolyse du groupe ester protecteur ne soit que partielle. Ainsi, par exemple, le produit de départ (V) qu'on mettra en jeu sera un copolymère d'acide H<sub>2</sub>N-CH[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH]-COOH et d'ester HN<sub>2</sub>-CH[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOAlk]-COOH.

En raison de la présence, le long de la chaîne, de deux groupes carboxyliques, les polymères I et II peuvent fixer certains ions métalliques, tels le Ca + 2, plus fermement que les acides monocarboxyliques.

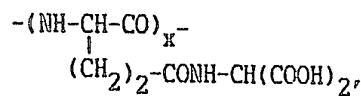
Une telle propriété se rencontre auprès de certains polypeptides naturels présents dans l'organisme, tels la prothrombine, le facteur Xa du sang, l'ostéocalcine des os et des cartilages; ces composés présentent des restes γ-carboxyglutamiques (Gla) susceptibles de lier le Ca + 2 (voir J.P. BURNIER et al., Molecular and Cellular Biology 39 (1981), 191-199). En particulier, l'ostéocalcine présente une grande affinité pour l'hydroxyapatite et, quoique son rôle physiologique soit encore mal connu, elle joue probablement un rôle important dans le contrôle de la croissance osseuse.

En ce qui concerne la prothrombine, celle-ci présente, dans sa molécule, dix restes Gla permettant à la prothrombine de se fixer, en présence de calcium, aux phospholipides constituants des membranes cellulaires. Dans de telles conditions, la prothrombine présente la propriété de se convertir, en présence du facteur Xa, en thrombine laquelle provoque la coagulation du sang en catalysant la transformation de fi-

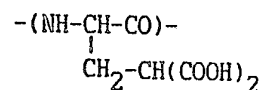
6

brimogène en fibrine. En l'absence des restes Gla la prothrombine perd toute activité.

Or, certains composés de l'invention, et notamment l'acide poly-(γ-malonylglutamique)



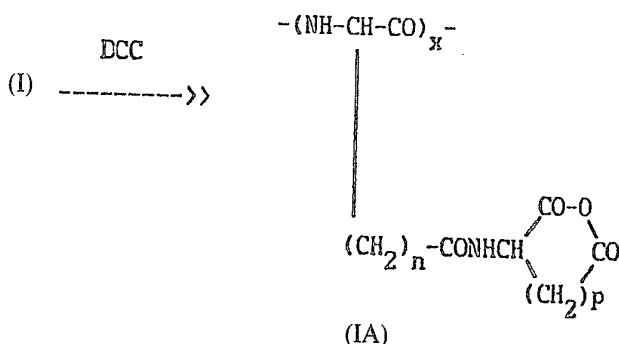
10 présentent une structure très similaire à celle des restes Gla



15 et des propriétés analogues.

Ainsi, ils sont utilisables pour la fabrication de prothèses d'os et de cartilages intégralement biocompatibles et biodégradables sans formation de résidus toxiques. On peut réaliser de telles prothèses par moulage de mélanges d'hydroxyapatite en poudre avec, comme liants, les polymères de l'invention, en tout ou en mélanges avec d'autres polymères biodégradables. On préfère utiliser, pour un tel but, des polymères I ou II dans lesquels p = 0. De telles prothèses sont mécaniquement très rigides, mais se résorbent progressivement au fur et à mesure de la régénération de l'os consolidé. Ainsi, l'intervention finale habituelle destinée à éliminer la prothèse après la guérison peut-elle être évitée.

Les présents polypeptides carboxyliques sont utilisables 20 pour fournir des anhydrides cycliques, lorsque p est égal à 1 ou 2, par exemple par traitement des polyacides I ou II avec un carbodiimide tel que le DCC, comme indiqué ci-dessous:



Cette transformation a pour effet de fournir des polymères insolubles dans l'eau, mais solubles dans les nombreux solvants organiques usuels, tels que acétone, méthyléthyl cétone, THF, dioxanne, éthyl acétate, monoglyme et autres, ce qui permet leur transformation aisée en billes, bâtonnets, fibres, filaments, microcapsules etc. . . par les procédés d'extrusion, de coulage, d'évaporation etc. Par hydrolyse, les polymères IA, ainsi que leurs homologues IIA obtenus identiquement à partir de II, redonnent les polyacides I et II.

Les polymères et copolymères IA et IIA sont biodégradables et biocompatibles lors de leur utilisation pour le relargage lent et contrôlé de médicaments par exemple à partir de films minces préparés par coulée d'une solution de polymère et de médicament sur un support suivie d'un séchage par évaporation des solvants de la solution. De telles techniques sont décrites dans «Controlled Release of Macromolecules from Polymers par R. LANGER et al., Biomedical Polymers, Ed. GOLDBERG et NAKAJIMA, Academic Press, 1980). Après séchage du film, le médicament peut se trouver à l'état dissous ou sous forme de suspension de particules.

Le polymère IA et le copolymère IIA sont utilisables comme réservoir de médicaments de diverses manières. Ain-

si, par exemple, on peut employer les présents polymères IA et copolymères IIA pour fabriquer des microcapsules contenant un médicament. De telles microcapsules comprennent une membrane polymérique et contiennent une solution aqueuse ou huileuse dans laquelle le médicament est en suspension, ou en solution. On peut également fabriquer des microsphères, c'est-à-dire des particules solides ou billes contenant le médicament à l'état dispersé ou à l'état de solution solide dans la matrice de polymère. On peut également fabriquer des produits microporeux dénommés microéponges. En général, on pourra mettre en œuvre, au moyen des présents polymères, toutes les techniques de fabrication de médicaments retard, c'est-à-dire ayant la propriété de relâcher (relarguer) le médicament de manière prolongée au fur et à mesure de la dégradation du support. On trouvera une description de ces techniques dans les ouvrages suivants: «Biodegradable and Delivery Systems for Contraception», E.S.E. HAFEZ, MTP Press limited (1980); «Controlled Release Technologies = Methods, Theory and Applications» Vol. I et II, A.F. KYDONIEUS, CRC Press (1980) et «Microencapsulation - New Techniques and Applications» par Tamotsu KONDO, Techno Inc. (1979) Japan. La solubilité des présents polymères dans de nombreux solvants, miscibles ou non à l'eau, est un avantage pour leur application selon les techniques décrites dans ces références. Il est également possible de préparer des fils constitués de ces polymères en extrudant une solution de ceux-ci dans une filière et en précipitant le fil, soit par évaporation, soit par un bain de non-solvant, selon les techniques habituelles de filage. Des filaments préparés ainsi peuvent être tricotés, noués ou tissés pour former des sutures, des ligatures ou des structures tubulaires pouvant servir d'artères artificielles, de veines, de conduits ou d'organes internes à fonctionnement temporaire. Les polymères de l'invention peuvent également servir, soit directement, soit en mélange avec un plastifiant, à la fabrication de films ou de prothèses chirurgicales servant, par exemple, à la consolidation d'os fracturés, comme des agrafes, des aiguilles, des vis, des plaques de renforcement, des tampons etc. . . ces matériaux pouvant être réalisés par coulage ou moulage de solution, thermoformage ou par usinage de blocs de polymère solides. De telles prothèses étant résorbables, elles sont progressivement éliminées dans l'organisme et il n'est alors

plus nécessaire de prévoir, comme on le fait actuellement, une nouvelle opération pour enlever le matériau de renforcement et de consolidation.

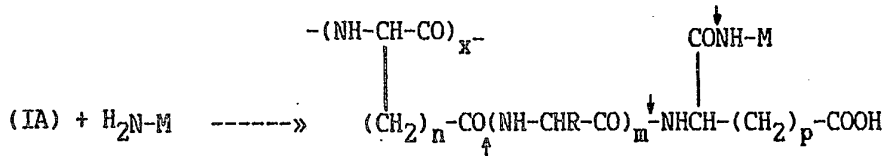
Les polymères et copolymères de l'invention sont également utilisables pour la préparation de pansements chirurgicaux biodégradables. De tels pansements sont constitués par une ou plusieurs couches successivement obtenues à partir de solutions de ces polymères dans un solvant déposées sur un support et solidifiées par évaporation ou séchage.

On peut par exemple constituer de tels pansements par coulées des solutions sur un support (ces solutions contenant, ou non, un ou plusieurs médicaments, par exemple un désinfectant) dans des conditions stériles, en éliminant le solvant, par exemple par la chaleur ou sous vide, puis en détachant ensuite le film insolubilisé du support et le séchant encore éventuellement avant emploi (ou en l'emballant de manière stérile si son utilisation immédiate n'est pas prévue).

De tels pansements sont constitués par une ou plusieurs couches successives obtenues à partir de solutions de ces polymères dans un solvant hydrocompatible déposées sur un support et solidifiées par extraction à l'eau du solvant en question. Une telle extraction peut se faire par mise en contact avec de l'eau, par exemple par lavage ou immersion.

On peut constituer de tels pansements par coulées des solutions sur un support (ces solutions contenant, ou non, un ou plusieurs médicaments, par exemple un désinfectant) dans des conditions stériles, en traitant le tout à l'eau puis en détachant ensuite le film insolubilisé du support et le séchant éventuellement avant emploi (ou en l'emballant de manière stérile si son utilisation immédiate n'est pas prévue). L'avantage intrinsèque des polypeptides IA et IIA sur les polyalkylglutamates ou aspartates de l'art antérieur réside dans le caractère instable des fonctions anhydrides, ce qui permet d'assurer la dissolution/biodégradation du polymère sous sa forme hydrophobe d'anhydride.

Les composés anhydrides IA et IIA sont également utiles en tant que «vecteur de médicament» (drug vector) pour fixer, de manière covalente, des médicaments présentant une fonction réactive avec ce cycle (celle d'une enzyme, d'une protéine ou d'un polypeptide), par exemple une fonction amino, comme indiqué ci-dessous où M désigne la molécule d'un médicament à fixer sur le présent polymère:



Le polymère ainsi modifié par liaison avec le médicament M peut être en général manipulé comme décrit précédemment et administré de même, de façon qu'il agisse à son lieu de destination dans l'organisme. Une telle action pharmacologique pourra, dans certains cas être due au polymère ainsi modifié lui-même, mais, le plus souvent le médicament ne sera actif qu'après avoir été séparé, par exemple par hydrolyse, de son support. Dans le schéma ci-dessus, les flèches indiquent les liaisons susceptibles de se scinder par hydrolyse.

En ce qui concerne l'état de la technique dans ce domaine, on notera que le greffage de molécules pharmacologiquement actives sur des supports macromoléculaires solubles est connu; on trouve en particulier de nombreuses références sur les techniques de greffage mises en œuvre et les avantages des produits qu'on en obtient, ceux-ci étant généralement appelés «polymères pharmacologiquement actifs». On peut citer, par exemple, les ouvrages suivants traitant de tels sujets:

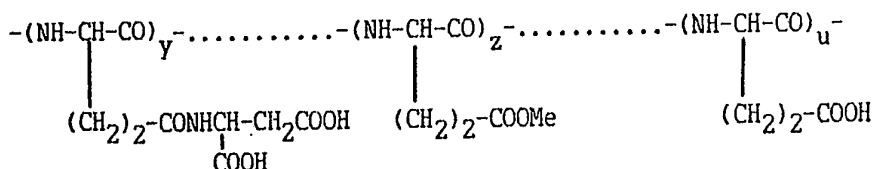
- Polymers in medicine Advances Polym. Science, No 57, Springer Ed. 1984,

- Polymeric Drugs, Ed. DONARUMA et VOGI, Academic Press, 1978).

Ainsi, ont été décrits des polymères pharmacologiquement actifs de type vinylique (acrylique) qui présentent le défaut majeur de ne pas être biodégradables. Par contre, on a greffé des substances pharmacologiquement actives sur des polysaccharides dégradables (Dextrane, par exemple) (voir, par exemple, HASHIDA et al; Drug Metab. Dispos. 12 (1984), 492-499).

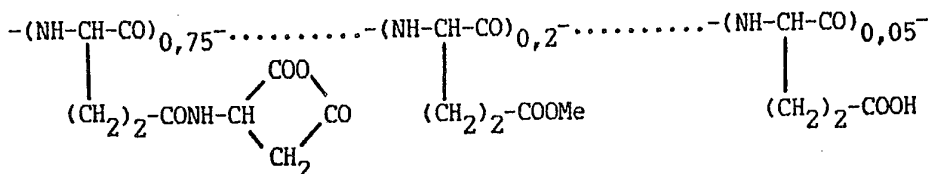
On a également utilisé des polyaminoacides comme supports de médicaments, notamment en cancérothérapie. Ainsi, la poly L-lysine, a été utilisée comme support de médicaments anticancéreux (SHEN and RYSER, Molecul. Pharmacol. 16, (1979), 614-622). L'acide polyaspartique a également été employé (ZUNINO et al, Int. J. Cancer 30, (1982) 465-470) pour fixer de la daunorubicine. Par ailleurs, on a signalé l'utilisation de l'acide polyglutamique comme support de la noréthindrone (produit anticonceptionnel) (ZUPON et al, J. Pharmac. Science 72, (1983), 1323-1326) de





Un échantillon de polymère est hydrolysé 12 h dans HCl 6N à 120 °C. Par analyse de la composition en acides aminés de la solution, on constate la présence de 3 moles d'acide aspartique pour 4 moles d'acide glutamique, ce qui permet d'attribuer les valeurs suivantes aux indices moléculaires:  $y = 0,75$ ,  $z = 0,2$ ,  $u = 0,05$ . Par ailleurs, le spectre RMN du polymère en solution TFA correspond bien à la structure proposée. Le produit ainsi obtenu est très hygroscopique et doit être conservé au dessiccateur.

On dissout 0,927 g du poly[Glu(OMe)Glu(OH)Glu



### Exemple 2

Synthèse de la poly[ $\gamma$ -L-glutamyl-glutamine] et de son anhydride.

On dissout 2,5 g d'acide poly-L-glutamique (0,0192 moles COOH) dans 50 ml de DMF et on ajoute dans l'ordre 2,85 g d'hydroxybenzo-triazole 3,63 g de tributylamine 0,7 g de chlorhydrate de dibenzyl glutamate et 3,95 g de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). On laisse 24 heures sous agitation à température ambiante. On filtre la dicyclohexylurée formée et on évapore le filtrat (40 °C/1 Torr). Le précipité est redissous dans du chloroforme (50 ml) et lavé successivement avec NaHCO<sub>3</sub> 0,1 N, H<sub>2</sub>O, HCl 1% et H<sub>2</sub>O saturée de sel (100 ml). On centrifuge à chaque lavage pour séparer les phases organiques et aqueuses. On sèche finalement la phase organique sur MgSO<sub>4</sub>, on filtre et on fait précipiter la solution par adjonction d'un excès d'éther. Le polymère est redissous dans du MeOH (20 ml), on ajoute de l'acide acétique (30 ml) et 5 ml d'H<sub>2</sub>O; on ajoute 2 g de palladium sur charbon actif et on fait barboter de l'hydrogène 15 heures dans cette solution. Après filtration du charbon actif, on dialyse la solution 3 jours dans l'eau distillée, puis on effectue une lyophilisation ce qui fournit 3,5 g de poly ( $\gamma$ -L-glutamyl-glutamine].

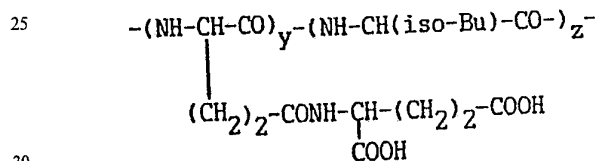
Le polymère peut être stocké sous sa forme diacide carboxylique ou on peut le cycliser de la manière suivante:

On dissout 1,44 g de ce polymère dans 200 ml de DMF et on ajoute 2,3 g de DCC. On laisse le tout 24 h en agitation; à 70 °C on filtre la dicyclohexylurée (DCU) et on ajoute de l'éther ce qui fait précipiter le polymère. Le spectre IR d'un film mince de ce polymère, obtenu par dépôt d'une couche de sa solution dans le CHCl<sub>3</sub> sur une plaque de verre, montre la présence de la fonction anhydride (1 pic à 1830 cm<sup>-1</sup>).

En procédant comme dans l'exemple 1 qui précède, mais en remplaçant l'acide polyglutamique par l'acide polyaspartique correspondant, on obtient la poly[ $\gamma$ -L-aspartyl-L-aspartamine]. Celle-ci peut être cyclisée en anhydride correspondant par les moyens sus-indiqués.

De même, en utilisant comme polyacide de départ un copolymère 50/50 d'acide glutamique et de leucine, on obtient tout d'abord un copolymère de formule

(Asp)] ci-dessus dans 10 ml de DMF et on ajoute 3 mmole de DCC. Après 20 heures sous agitation, on filtre et on ajoute au filtrat 30 ml d'éther. On verse ensuite ce liquide dans 350 ml d'éther et on ajoute au mélange 200 ml d'éther de pétrole ce qui occasionne la séparation d'un solide. On centrifuge et on sèche le culot ainsi obtenu ce qui fournit 0,73 g d'un polymère insoluble dans l'eau mais soluble dans le CHCl<sub>3</sub>. Le spectre IR de ce polymère confirme la présence de 15 fonctions anhydrides ( $\delta = 1800 \text{ cm}^{-1}$ ) et sa formule est donc



où  $y = z = 0,5$  avec  $x = 1$ , puis l'anhydride correspondant par les moyens sus-indiqués.

### Exemple 3

Fixation de composés aminés sur les polyglutamine-anhydrides.

Les réactions suivantes ont été effectuées avec des polyacides de l'invention sous la forme d'anhydrides et certains acides aminés: On a ajouté goutte à goutte à des solutions des polypeptides dans le DMF des solutions aqueuses (ou DMF) des acides aminés. On a laissé sous agitation pendant 14 heures, après quoi on a salifié le polymère obtenu par NaHCO<sub>3</sub> N/10 et on a procédé à 24 h de dialyse dans H<sub>2</sub>O suivie d'une lyophilisation. On a analysé des échantillons des produits obtenus (après hydrolyse dans HCl 6 N) pour déterminer le taux de fixation des acides aminés. Les résultats figurent au tableau ci-dessous. On peut remarquer d'après ces résultats que le taux de fixation dépend en partie de la solubilité des produits de départ dans le milieu réactionnel.

Polypeptide anhydride	Composé aminé	milieu réactionnel	taux de fixation %
poly(Glu-glutamine)-anhydride	glycine methyl-ester	DMF (bonne solubilité)	75%
poly(Glu-glutamine)-anhydride	Alanine	DMF + H <sub>2</sub> O	20%
poly(Asp(anh)glutamine)	Glycine	DMF + H <sub>2</sub> O (solubilité moyenne)	50%

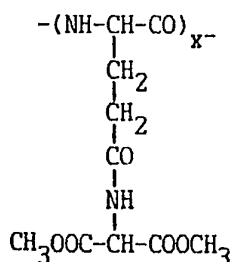
En général, il faut choisir comme milieu réactionnel un solvant où mélange de solvant tel que la réaction du groupe -NH<sub>2</sub> de la substance à fixer soit favorisée par rapport à celle du l'hydrolyse du cycle anhydride.

## Exemple 4

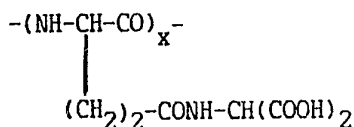
Poly[ $\gamma$ -2-(dicarboxy-1,3-propyl)glutamine]

Il s'agit du polyglutamide de l'acide 2-aminomalonique dont le nom, suivant la nomenclature IUPAC est poly[imino[1-oxo-2(1', 3'-dicarboxy-2'-iminocarbonyléthylène)-éthylène]].

On dissout 5 g d'acide polyglutamique (PGA) dans 100 ml de DMF; on ajoute ensuite 7,16 g de tributylamine, 7,10 g de chlorhydrate d'aminomalonate diméthylque (0,0387 moles) et, 5,23 g d'HOBt. On refroidit vers 0 °C et on ajoute 7,97 g de DCC dissous dans 20 ml de DMF. Après 24 heures on filtre et on précipite le polymère par adjonction d'H<sub>2</sub>O. On redissout le solide dans de l'acétone et on reprécipite par l'eau. On redissout dans CHCl<sub>3</sub> et on sèche la solution sur MgSO<sub>4</sub>. On filtre sur gooch en verre fritté et on précipite par l'éther. On obtient 5,8 g de polymère estérifié ayant la formule suivante:



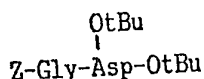
Le spectre RMN du polymère en solution dans l'acide trifluoroacétique correspond à la formule ci-dessus. ( $\delta = 3,15$  ppm, OCH<sub>3</sub>). On ajoute le polymère (3 g) à 30 ml de KOH N/10 dans le MeOH. On ajoute ensuite 25 ml d'H<sub>2</sub>O. Le polymère se dissout peu à peu. Après 17 heures, le pH est ramené à 7 et la solution est dialysée 1 jour dans H<sub>2</sub>O puis HCl à 1%. On lyophilise le tout et on obtient ainsi 2,45 g du polymère de formule:



On mesure la proportion des amino-acides d'un échantillon après hydrolyse totale de celui-ci dans une solution HCl 6N (24 h) d'où on déduit que le taux de fixation du radical malonylamido est de 85%. L'analyse consiste à doser la glycine qui se forme, lors de l'hydrolyse, par décarboxylation du reste aminomalonique.

## Exemple 5

Poly-( $\gamma$ -aspartyl-anhydride-glycine-glutamine)  
On prépare tout d'abord le dipeptide de formule



par couplage classique à la dicyclohexylcarbodiimide de Z-Gly(OH) et de H<sub>2</sub>N-Asp(OtBu)<sub>2</sub>. Ce dipeptide est ensuite soumis à une debenzoylation catalytique par l'hydrogène/palladium pour donner H-Gly-Asp(OtBu)<sub>2</sub>. Ce peptide est cristallisé sous forme de sel de dibenzylsulfimide (HN(SO<sub>2</sub>-Bz)<sub>2</sub> dans l'éther. On le couple ensuite à l'acide polyglutamique comme décrit dans les exemples précédents. On filtre la DCU formée, on précipite le polymère dans NAHCO<sub>3</sub> 0,1N, on le lave avec H<sub>2</sub>O et on le dissout dans du dioxanne saturé d'HCl (4 N). Après 20 minutes, le polymère précipite. On

10

évapore à sec et on dissout le produit dans un tampon carbonate pH 7. On filtre pour éliminer les parties insolubles et on dialyse le polymère contre H<sub>2</sub>O pendant 24 heures, puis contre HCl 1% 24 heures. On lyophilise la solution et on obtient un polymère ayant la formule suivante:



10 Ce polymère est repris dans le DMF et, à la solution, on ajoute 1,5 équivalent de DCC. Après 24 heures de réaction, on filtre la DCU, on évapore le DMF et on redissout le polymère dans un minimum de chloroforme. On filtre à nouveau pour éliminer les traces restantes de DCU, on précipite le polymère dans un mélange 50/50 éther/éther de pétrole et on sèche sous vide. Le spectre IR d'un film de ce polymère obtenu à partir d'une solution dans l'acide trifluoroacétique montre la présence de groupements anhydride ( $\lambda = 1830$  cm.)

20 L'analyse des acides aminés résultant de l'hydrolyse totale du polymère montre que le taux de greffage est de 78%.

## Exemple 6

Le but de cet exemple est de mettre en évidence le pouvoir complexant de divers polymères suivant l'invention vis-à-vis des ions calcium.

On a introduit dans une série d'enveloppes de dialyse (boxaux) des portions de 1 ml de solution aqueuse contenant du Ca<sup>+2</sup> radioactif, 100  $\mu$ l de 45Ca 10<sup>-3</sup>M, et des quantités variables de divers polymères suivant l'invention (ainsi qu'un contrôle). Les polymères étudiés étaient: acide polyglutamique (contrôle A); poly-(malonyl-glutamine) B; poly-(aspartylglutamine) C; poly-(glutaryl-glutamine) D.

On a placé ces enveloppes dans 7 ml de tampon phosphate à pH 7,5 et on a laissé la dialyse s'effectuer jusqu'à l'équilibre (24 h); on a mesuré au moyen d'un compteur à scintillation les concentrations de calcium dans le tampon de dialyse, à l'extérieur de la membrane, et dans la solution dialysée à l'intérieur de la membrane. On a ensuite déterminé le rapport (%) entre le calcium lié au polymère par rapport au calcium total. Les résultats sont rassemblés au graphique annexé en fonction (abscisse) de la quantité de polymère exprimée en mMoles/l de restes porteurs de groupes carboxyliques et montrent que l'acide polyglutamique n'a qu'un pouvoir de fixation du calcium très limité par rapport aux polypeptides dicarboxyliques de l'invention.

## Exemple 7

Cet exemple est destiné à montrer que le dérivé poly( $\gamma$ -malonylglutamine) se lie en présence de Ca<sup>+2</sup>, aux surfaces lipidiques comme le fait la prothrombine - (voir par exemple S.P. BAJAJ et al., Journal of Biol. Chemistry, 250(6), 2150-2156 (1975)).

On a opéré de la manière suivante:

55 On a préparé tout d'abord une suspension de liposomes en dissolvant 250 mg de lécithine dans 36 ml de CHCl<sub>3</sub>, en ajoutant 10 ml de tampon (20 mM Tris, HCl + 40 mMol NaCl, pH 7,5) et en soumettant ce mélange aux ultrasons à 50 °C. Après évaporation du CHCl<sub>3</sub>, on a rajouté 30 ml de tampon, on a ajusté le volume total à 40 ml et on a centrifugé 1/2 heure à 60 000 rpm. On a repris le culot dans 41,6 ml de tampon ce qui a fourni une suspension de liposomes à 6 mg/ml.

On a introduit ensuite dans une série de tubes à essai des solutions aqueuses 10 mM en ions Ca contenant chacune 2 mg/ml de liposomes et des quantités croissantes (de 0,025 à 1 mg/ml) de poly( $\gamma$ -malonylglutamine) marquée au <sup>14</sup>C. (Pour marquer la poly( $\gamma$ -malonylglutamine), on a fait réagir

celle-ci avec du glycinat de méthyle radioactif  $^{14}\text{C}$  en présence de EEDQ, (2-éthoxy-1-éthoxy-carbonyl-1,2-dihydroquinoléine) de manière à substituer environ 1% des restes maloniques par le glycinat et obtenir ainsi une activité spécifique de 37 000 dpm/mg (désintégrat/min) de polymère.

Après 30 minutes, on a centrifugé les liposomes et on a mesuré ensuite la radioactivité présente dans le surnageant, cette quantité caractérisant le pourcentage de poly( $\gamma$ -malonylglutamine) non fixé par les liposomes.

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus:

No tube	polymère (mg/ml)	$\text{Ca}^{++}$ (mM)	liposomes (mg/ml)	% polymère non fixé
1	1	10	0	95,7
2	0,025	0	2	92,0
3	0,025	10	2	5,0
4	0,05	10	2	21,8
5	0,1	10	2	48,2
6	0,25	10	2	76,3

7 0,5 10 2 84,4  
 8 0,75 10 2 90,0  
 9 1 10 2 92,2  
 5 Ces résultats montrent que 1 mg de liposomes fixe 0,5 mg de poly( $\gamma$ -malonyl glutamine) en présence de calcium. On voit aussi (essai No 2, qu'en l'absence de  $\text{Ca}^{+2}$ , il n'y a pas de fixation du polymère sur les liposomes. Le comportement de ce polymère, dans les conditions susmentionnées, est donc  
 10 analogue à celui, naturel, d'une protéine du sang.

#### Exemple 8

Les polymères suivants: poly( $\gamma$ -glutamylglutamine); poly( $\gamma$ -aspartylglutamine); poly( $\gamma$ -malonylglutamine) ont  
 15 été dissous dans une solution NaCl isotonique à pH 7,4 (0,01 M phosphate) à une concentration de 100 mg/ml.

Les solutions ont été injectées i.p. à des souris blanches (25-30 g) jusqu'à une dose de 2000 mg/kg (5 tests par dose).  
 20 Après une période d'observation de 4 semaines, on n'a constaté effet létal sur les animaux d'expérience, et ceci jusqu'à la dose de 2000 mg/kg.

