

Synthèse et polymérisation de polyméthacrylates porteurs de la quinine. Etude comparée de la toxicité et de l'immunogénicité des formes libres et polymériques

Christian Pinazzi*, Jean Claude Rabadeux, Alain Pleurdeau

Laboratoire de Chimie et Physicochimie Organique Macromoléculaire, Equipe de Recherche Associée au C. N. R. S. N° 311, Faculté des Sciences, Route de Laval, 72000 Le Mans, France

Pierre Nivière, Jean Pierre Paubel et Jean Pierre Benoit

Laboratoire de Chimie Organique Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, 37000 Tours, France

(Date de réception: 21 octobre, 1977)

SUMMARY:

Quinine was linked to 2-chlorocarbonyloxyethyl methacrylate (**6**) by a carbonate bound. This monomer **7** was characterized by usual spectroscopic methods and polymerized by a radical process. The resultant polymer **4** was biologically tested by toxicity and immunology studies on rabbit. Polymer **4** was analyzed by IR and NMR spectroscopy and compared with the polymer obtained by chemical modification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (**1**).

Introduction

L'introduction de molécules actives à propriétés spécifiques au sein d'une macromolécule est une méthode susceptible de conférer au polymère final les dites propriétés auxquelles viennent s'ajouter les caractéristiques propres à la nature macromoléculaire du composé. Bien souvent, les recherches, tant sur le plan de la synthèse des monomères que sur celui de la modification chimique ou de la combinaison des deux méthodes, se sont limitées à la fixation d'un groupement fonctionnel donné¹⁻³.

Dans le domaine de la pharmacologie, les recherches se sont orientées récemment vers la fixation de principes actifs sur un support polymérique par l'intermédiaire de liaisons covalentes.

Suivant les utilisations visées, c'est le polymère résultant dans son ensemble qui apportera cette propriété alors que dans d'autres cas, le polymère servira seulement de support, l'action provenant de la libération de la molécule active temporairement fixée.

Cette association entre une drogue et une substance macromoléculaire peut conduire à une modification de la pharmacologie de la molécule active.

L'une des propriétés les plus recherchées dans ce domaine semble être l'obtention d'un effet retard, dû probablement à la nature macromoléculaire du composé administré et à la libération programmée de la drogue, à la fois dans le temps et dans l'espace, suivant une cinétique d'hydrolyse lente et dans les zones d'absorption favorables. L'efficacité de cette méthode est fonction de la nature et de la liaison établie entre le support et la molécule active choisie. Les premiers résultats positifs obtenus in vivo lors de tests pharmacocinétiques, réalisés sur des animaux permet de conforter cette hypothèse⁴.

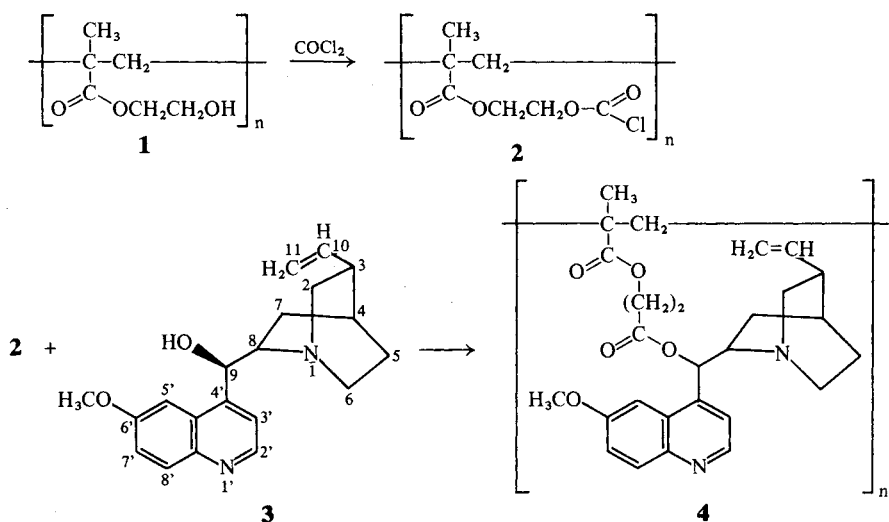
Compte tenu de ces résultats, cette technique a été appliquée à la fixation d'un alcaloïde ayant des propriétés antipaludiques bien définies: la quinine **3**. Ce composé possède une fonction hydroxyle libre. La fixation au substrat macromoléculaire est assurée par une liaison carbonate, sensible aux procédures d'hydrolyse chimique et éventuellement biochimique. Le relâchement de la drogue et l'apparition d'effet retard fait l'objet d'une étude cinétique in vivo présentement en cours.

La toxicité et l'immunogénicité de ces nouveaux composés ont été étudiées et les résultats des tests effectués sur animaux sont rapportés. Le poly[(hydroxy-2 éthyl) méthacrylate]^{*)} (1) sert de polymère initial à cette étude.

*Synthèse de polymères fonctionnels du type poly[(chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate] (2)**)*

La synthèse organique associée aux procédures de polymérisation permet d'accéder à un grand nombre de polymères fonctionnels susceptibles d'être utilisés comme supports lors de la fixation de principes actifs. En se référant aux études récemment effectuées dans ce domaine^{5,6)}, la réalisation de nouvelles structures polymériques renfermant des molécules pharmacologiquement actives a été envisagée selon diverses méthodes.

La polymérisation radicalaire de l'[(hydroxy-2 éthyl) méthacrylate] (5) est réalisée en solution dans la butanone-2. Ce type de solvant permet un fractionnement du polymère dont la seule partie soluble sera utilisée. La masse moléculaire du polymère ainsi isolé, mesurée par GPC est voisine de 2000, l'indice de polydispersité étant égal à 1,2. La modification chimique effectuée sur ce polymère support est montrée dans la Figure suivante 1:



L'action du phosgène en excès sur le polymère 1 en solution, conduit, sans aucune réaction de couplage entre les fonctions chloroformate déjà formées et les fonctions alcool n'ayant pas encore réagi, au poly[(chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate] (2) dont toutes les fonctions alcool primitives ont été transformées en fonctions chloroformate. La masse moléculaire ainsi que la polydispersité du polymère confirment que cette réaction ne s'accompagne d'aucune réticulation ou dégradation.

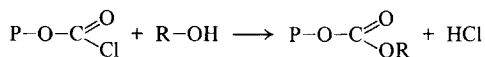
^{*)} Nom systématique: poly[(hydroxy-2 éthyl)oxycarbonyl-1 méthyl-1 éthylène].

^{**)} Nom systématique: poly[(chlorocarbonyloxy-2 éthyl)oxycarbonyl-1 méthyl-1 éthylène].

Les caractéristiques spectrales sont résumées en partie expérimentale. Une autre voie d'accès au polymère **2** consiste à polymériser le (chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate (**6**) par voie radicalaire.

Les caractéristiques de ce polymère sont identiques à celle du polymère obtenu par modification chimique. Toutefois, dans ce cas, la masse moléculaire et l'indice de polydispersité sont plus élevés du fait de l'absence de fractionnement. Les facteurs de solubilité dans les solvants organiques sont pratiquement identiques.

La réactivité des fonctions chloroformiate portées par ce polymère est mise à profit pour créer des liaisons carbonate par réaction avec l'hydroxyle de la quinine, selon le schéma suivant:



P: résidu polymérique

La liaison carbonate est mise en évidence par l'apparition sur le spectre IR des bandes d'absorption à $\nu(\text{C=O})$ 1740 cm^{-1} et $\nu(\text{C-O-C})$ 1255 cm^{-1} . Les bandes caractéristiques du squelette de la quinine sont également observées.

Sur le spectre de NMR, les protons méthyléniques en position α des fonctions chloroformiate résiduelles sont mis en évidence par un signal à 4,45 ppm.

Ces fonctions sont hydrolysées en groupes hydroxyles lors de la purification du polymère et pourront éventuellement assurer une meilleure solubilité et biocompatibilité du composé dans les liquides vecteurs de l'organisme.

Il a été possible de constater que la double liaison vinylique portée par la quinine n'est pas affectée par cette réaction. Les unités monomères actives possèdent donc, outre le squelette de la quinine, une liaison connue pour être aisément hydrolysable et un groupement $-(\text{CH}_2)_2-$ s'insérant entre la drogue et la chaîne macromoléculaire limitant les interactions entre ces deux éléments.

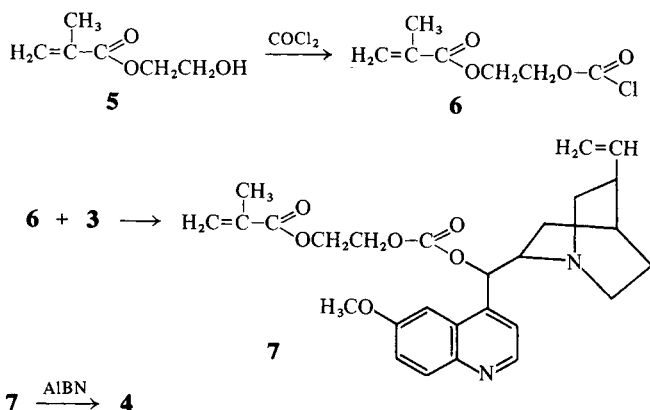
Le taux de modification de cette réaction de fixation de la quinine n'est jamais supérieur à 40%; ceci s'explique par l'encombrement stérique important de l'alkaloïde utilisé, empêchant une modification totale des fonctions chloroformiates préexistantes.

Les caractéristiques de ce polymère **4** sont répertoriées dans le Tab. 1 partie expérimentale. La masse moléculaire du polymère final est fonction de celle du polymère synthétisé initialement et du taux de modification. Dans les essais réalisés elle varie entre 2000 et 50000. Eventuellement, afin de favoriser la solubilité aqueuse du polymère actif, la quinine fixée peut être transformée en dichlorhydrate par addition d'acide chlorhydrique dilué.

Fonctionnalisation de la quinine et polymérisation du monomère résultant

La fixation de la substance active sur un support macromoléculaire du type **1** est statistique et reste limitée par l'encombrement stérique de la molécule active. Une autre voie d'accès à de telles structures polymériques consiste à transformer la drogue en un monomère puis à envisager sa polymérisation ou copolymérisation avec des comonomères convenablement choisis.

Dans le cas présent, la quinine est transformée en composé méthacrylique par l'intermédiaire de l'(hydroxy-2 éthyl) méthacrylate (**5**), selon le schéma réactionnel suivant:



L'action du phosgène en excès sur le méthacrylate **5** conduit au (chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate (**6**), exempt du carbonate mixte correspondant à la réaction de deux molécules d'alcool⁷). Ce composé préparé selon la méthode décrite en partie expérimentale présente en spectroscopie de NMR des résonances à 5,56 et 6,06 ppm attribuées respectivement aux protons *cis* et *trans* de la double liaison méthacrylique ainsi qu'un multiplet centré à 4,45 ppm attribué aux groupes de protons méthyléniques situés en positions α et β de la fonction chloroformiate. Cette dernière est mise en évidence en spectroscopie IR par l'apparition des bandes de vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})$ à 1770 cm^{-1} (différentes de celles du groupement ester méthacrylique ($\nu(\text{C}=\text{O})$ 1710 cm^{-1}), $\nu(\text{C}-\text{O})$ 1140 cm^{-1} et par une bande $\nu(\text{C}-\text{Cl})$ à 680 cm^{-1} . La double liaison méthacrylique vibre à 1640 cm^{-1} .

Le monomère méthacrylique actif, porteur du squelette de la quinine est obtenu par action de la drogue en quantité stoechiométrique sur le méthacrylate **6**. Après traitement du monomère brut par une solution aqueuse bicarbonatée, le monomère **7** est isolé et caractérisé par les méthodes spectroscopiques habituelles (partie expérimentale).

En spectroscopie de NMR les protons méthacryliques de **7** résonnent à 5,40 ppm (proton *cis*) et 5,98 ppm (proton *trans*) et les protons vinyliques de la quinine entre 4,8 et 5,1 ppm. La formation d'une liaison carbonate est confirmée par apparition en spectroscopie IR des bandes de vibrations à 1730 et 1250 cm^{-1} .

L'homopolymérisation radicalaire de **7** conduit au polymère actif recherché **4**, dans lequel toutes les unités monomères possèdent le squelette de la quinine; la masse moléculaire est faible de l'ordre de 1500, ceci étant dû à l'encombrement stérique du monomère initial; l'indice de polydispersité mesuré par GPC est supérieur à 3,5.

La synthèse de tels monomères est intéressante parce qu'elle autorise la copolymérisation avec des comonomères du type vinylpyrrolidone, dérivés vinyliques des bases puriques et pyrimidiques. Cette étude est actuellement en cours.

Etude de quelques propriétés biologiques du polymère 4 porteur de la quinine

On a déterminé la toxicité du polymère **4** afin de la comparer à celle de la quinine; on a recherché d'autre part les réactions immunologiques pouvant être éventuellement provoquées par l'administration d'un composé macromoléculaire^{8,9}).

Détermination de la toxicité

La DL50^{*)} de la quinine et du polymère **4** a été déterminée sur la souris. Les conditions de préparation des solutions injectées étaient les mêmes pour les deux composés. La voie d'administration et le volume injecté étaient identiques.

Les valeurs obtenues (Tab. 2 partie expérimentale) indiquent que les toxicités du polymère **4** et de la quinine sont pratiquement identiques. On peut en conclure que la forme polymérique de la quinine n'est pas plus toxique que l'alcaloïde seul.

Recherche de l'activité antigénique

Un lot de lapins a été soumis à des injections répétées de polymère **4** pour rechercher une sensibilisation éventuelle lors d'une administration par voie intraveineuse, susceptible de provoquer des accidents de type allergique. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus sur des lots témoins.

L'étude du protéinogramme des animaux devrait permettre de diagnostiquer l'apparition possible d'un syndrome inflammatoire consécutif à l'administration du polymère **4**, ou d'une modification quantitative des γ -globulines, traduisant la production d'anticorps dirigés contre le polymère.

Les animaux ont été mis en observation pendant les deux mois qui ont suivi l'expérimentation; aucun accident n'a été observé. La croissance pondérale est identique pour tous les animaux, aussi bien pendant la période d'expérimentation que pendant les deux mois suivants.

La recherche de protéinurie a toujours été négative, ce qui est en faveur d'une absence de néphrotoxicité du polymère **4** qui pourrait être consécutive à une atteinte glomérulaire.

Le sérum des animaux traités et des animaux témoins a été étudié par immunoélectrophorèse¹⁰⁾ et par électrophorèse sur acétate de cellulose¹¹⁾.

Le protéinogramme et l'aspect des immunoélectrophorégrammes des animaux traités sont identiques à ceux qui ont été obtenus à partir du sérum des animaux témoins.

On n'observe pas de modification quantitative ou qualitative des différentes classes de protéines.

L'aspect normal des α 1-macroglobulines, des α 2-macroglobulines et l'absence de modifications au niveau des γ -globulines laisse penser que le polymère **4** ne provoque pas de réaction inflammatoire et n'induit pas de réaction immunologique.

Conclusion

La poursuite de cette recherche est envisagée sur le plan chimique par l'introduction d'un groupe «spacer» du type peptidique entre la drogue et la chaîne macromoléculaire, tant au niveau de la synthèse du monomère qu'à celle de la modification chimique des supports polymériques envisagés. La méthode d'approche qui semble la plus accessible consiste dans la synthèse de composés «drogue-peptide», l'ensemble étant ensuite condensé sur un monomère fonctionnel adapté ou le polymère correspondant. Un tel groupe «spacer» se libérant avec la drogue au sein de l'organisme faciliterait l'absorption sélective du principe actif.

^{*)} La dose léthale pour 50% des animaux.

Compte tenu des mécanismes connus ou supposés de l'action pharmacologique des drogues chimiquement définies, ces recherches devraient conduire à de nouvelles associations drogue-substrat pour lesquelles des changements de comportement de chaque drogue envisagée devraient être escomptés. A titre d'exemple, nous pouvons citer:

- efficacité de la drogue, c'est à dire possibilité d'utilisation de plus faibles dosages, ce qui diminuerait les phénomènes de toxicité et les effets secondaires.
- étalement dans le temps et l'espace de l'activité de la drogue, par apparition d'effets «retard»
- augmentation ou modification de l'activité thérapeutique en liaison avec les mécanismes d'action, propres à chaque drogue.

Partie expérimentale

Spectres: Les spectres IR sont réalisés sur des appareils Perkin-Elmer 157, 257 et 237. Les spectres de NMR sont enregistrés sur des appareils JEOL MHZ100 et VARIAN A60: les déplacements chimiques sont exprimés dans l'échelle δ . Le TMS est utilisé comme référence interne et les solvants sont précisés lors de l'étude spectrale des composés. Les spectres sont enregistrés à température ambiante. Les abréviations suivantes sont utilisées: s=singulet, m=multiplet. Les spectres de GPC sont réalisés en solution de THF sur un appareil WATERS ASSOCIATE.

(Chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate (6): Ce monomère préparé par action du phosgène liquide en excès sur l'(hydroxy-2 éthyl) méthacrylate (5) à température ambiante est purifié par distillation sous vide; p_e 42,44°C ($2 \cdot 10^{-4}$ mbar); d_4^{19} 1,2182; n_D^{19} 1,4484. Rdt. 75%.

IR (sans solvant): 1770 ($\text{O}=\text{C}<\text{Cl}$), 1710 ($\text{O}=\text{C}<\text{O}^-$), 1640 ($>\text{C}=\text{C}<$), 1140 ($>\text{C}-\text{O}-\text{C}<$) et 680 cm^{-1} ($>\text{C}-\text{Cl}$).

NMR (CDCl_3): δ = 1,92 (s), 4,45 (m), 5,56 et 6,06.

Poly[(chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate] (2)

1ère Méthode: Le polymère est préparé à partir du poly[(hydroxy-2 éthyl) méthacrylate] (1) selon la méthode décrite dans la littérature¹².

2ème Méthode: La polymérisation radicalaire du monomère 6 s'effectue au reflux du benzène en présence de 0,1% en poids d'azo-2,2' isobutyronitrile. Après 3 h, le polymère est précipité dans l'éther de pétrole, séché sous vide et analysé⁵.

IR (KBr): 2950 ($>\text{CH}_2$), 1780 ($\text{O}=\text{C}<\text{Cl}$), 1715 ($\text{O}=\text{C}<\text{O}^-$), 1150 ($>\text{C}-\text{O}-\text{C}<$) et 680 cm^{-1} ($>\text{C}-\text{Cl}$).

NMR (CDCl_3): δ = 1,02, 1,75-2,25, 4,30 et 4,50.

Modification chimique du polymère 2 par la quinine. Préparation du polymère 4: Le poly[(chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate] (2) en solution dans le chloroforme est additionné lentement à une solution chloroformique de quinine. Après 24 h d'agitation magnétique, le polymère est précipité dans l'éther de pétrole, séché sous vide poussé et analysé: les caractéristiques sont résumées dans le Tab. 1.

Monomère méthacrylique 7 portant la quinine: 4,00 g de quinine en solution dans le chloroforme sont additionnés à 2,38 g de (chlorocarbonyloxy-2 éthyl) méthacrylate (6) en solution chloroformique. L'agitation est maintenue pendant 12 h à 0°C. Après filtration, le solvant est évaporé et le monomère 7 analysé.

IR (KBr): 1730 ($\text{C}=\text{O}$), 1250 ($\text{C}-\text{O}$), 1620 ($\text{C}=\text{C}$) et 1585 cm^{-1} (arom.).

NMR (CDCl_3): δ = 1,82 (CH_3), 5,40 (m; *cis*-vinyl), 5,38 (*trans*-vinyl), 4,30 (OCH_2), 3,80 (H^9), 8,70 (H^2), 4,8-5,1 (H^{11}), 5,55-5,80 (H^{10}), 7,33 (m; H^7 , H^5 , H^3), 7,90 (m; H^8 , $\text{H}^{10'}$).

Polymérisation du monomère méthacrylique 7: La polymérisation radicalaire de 7 se déroule au reflux du chloroforme pendant 5 h. Le polymère récupéré par précipitation dans l'éther de pétrole est séché sous vide et analysé. Les caractéristiques sont mentionnées dans le Tab. 1.

Tab. 1. Caractéristiques spectrales des polymères 4, porteurs de la quinine

Poly- mère	Déplacement chimique dans le spectre NMR (en CDCl_3) ^{a)}							Taux de modi- fication en %	$\bar{M}_n$	PD ^{b)}	Absorptions principales dans le spectre IR en cm^{-1}
	CH ₃	O—CH ₂	OH	H _g	H _{2'}	H ₁₁	H ₁₀	H _{7,5,3'}	H _{8,10'}		
4 ^{c)}	1,30	4,28	6,3	3,96 (s)	8,80 (d)	5	5,5–5,8	7,44 (m)	8,04 (m)	40%	(CH ₂) 2900; (ar.) 1850; (C=O ²) 1740; (C—O) 1250; (C=C) 1610; (OH) 3330 (Cl ₂) 2900; (ar.) 1850; (C=O) 1730; (C—O) 1255; (C=C) 1610
4 ^{d)}	1,22	4,20	—	3,90 (s)	8,66 (d)	5,02	5,6–6,10	7,38 (m)	7,95 (m)	100%	3,6

^{a)} Voir numérotation de la Fig. 1.^{b)} Indice de polydispersité.^{c)} Préparé par substitution du polymère 2 avec la quinine.^{d)} Préparé par polymérisation du monomère 7, porteur de la quinine.

Essais biologiques

Détermination de la toxicité: Le polymère **4** et la quinine ont été dissous dans de l'eau distillée stérile additionnée de la quantité minimale d'acide chlorhydrique (1 M) pour obtenir un chlorhydrate soluble (pH 2). On injecte 0,5 ml de solution à chaque animal par voie intrapéritonéale. Les tests ont été réalisés pour chaque concentration sur des lots de 30 souris de souche swiss (Carworth Farms).

Tab. 2. Toxicité comparée de la quinine libre et de la quinine fixée sur polyméthacrylate (polymère **4**)

	Dose en mg/kg	Taux de mortalité en %
Quinine libre	200	0
	300	30
	400	100
Quinine fixée sur polyméthacrylate (polymère 4)	200	0
	300	27,6
	400	100

Recherche de l'activité antigénique: Les solutions de polymère **4** et de quinine (à 15 mg/ml exprimées en quinine) sont préparées comme précédemment. Les lapins (souche Fauve de Bourgogne) ont été répartis en 4 lots de 10 animaux: Chaque animal du premier lot a reçu une injection hebdomadaire de 30 mg/kg, de polymère **4** (exprimée en quinine) pendant 1 mois. Chaque animal du deuxième lot a reçu une injection hebdomadaire de 30 mg/kg, de quinine. Chaque animal du troisième lot a reçu une injection hebdomadaire du soluté seul. Les animaux du dernier lot n'ont reçu aucun traitement.

Les solutions sont injectées dans la veine marginale de l'oreille du lapin (3,5 ml de solution à 15 mg/ml en quinine, de façon à administrer une dose de 30 mg de quinine par kg de poids).

Le sang est prélevé sur anticoagulant (mélange de Wintrobe) par ponction dans la veine marginale de l'oreille.

Après centrifugation (10 min à 1500 r. p. m.) le sérum surnageant est prélevé pour analyse.

- ¹⁾ J. M. Ketteringham, Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs **19**, 61 (1973)
- ²⁾ L. G. Donaruma, J. Pazzano, J. Med. Chem. **14** (3), 244 (1971)
- ³⁾ T. Seita, K. Yamauchi, M. Kinoshita, M. Imoto, Bull. Chem. Soc. Jpn. **45**, 926 (1972)
- ⁴⁾ C. Pinazzi, A. Menil, J. C. Rabadeux, A. Pleurdeau, travaux non publiés
- ⁵⁾ C. Pinazzi, A. Menil, J. C. Rabadeux, A. Pleurdeau, J. Polym. Sci., Polym. Symp. **52**, 1 (1975)
- ⁶⁾ J. Minezaki, T. Nakaya, M. Imoto, Makromol. Chem. **175**, 3017 (1974)
- ⁷⁾ C. Pinazzi, J. C. Rabadeux, A. Pleurdeau, Bull. Soc. Chim. Fr. **3-4**, 501 (1976)
- ⁸⁾ P. Labrode, C. Vigneron, Lyon Pharm. **26**, 629 (1975)
- ⁹⁾ W. J. Stern, Nature **238**, 151 (1972)
- ¹⁰⁾ O. Smithies, Biochem. J. **61**, 629 (1965)
- ¹¹⁾ J. J. Scheidegger, Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. **7**, 103 (1955)
- ¹²⁾ C. Pinazzi, J. C. Rabadeux, A. Pleurdeau, Eur. Polym. J., à paraître