

**Synthèse, Caractérisation et Réactions des
Copolymères Diblocs Dextran-poly(éthylène glycol)**

par

Oscar Suarez Hernandez

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Maîtrise en sciences (M. Sc.)

En chimie

© Oscar Suarez

Août 2006



Q1

3

US4

2007

Vol 11

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Synthèse, Caractérisation et Réactions des
Copolymères Diblocs Dextran-poly(éthylène glycol)**

Par

Oscar Suarez Hernandez

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Suzanne Giasson

Présidente du Jury

Dr. Françoise M. Winnik

Directrice de recherche

Dr. William Skene

Membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

Cette recherche a pour objectif principal l'élaboration de copolymères diblocs doublement hydrophiles par couplage de deux homopolymères hydrosolubles, d'une part, un polysaccharide naturel, le dextran et d'autre part, un polymère biocompatible, le poly(éthylène glycol) (PEG), pour aboutir à la formation éventuelle de micelles polymériques via l'interaction de la partie anionique ou cationique du copolymère dibloc avec des composés de charges opposées. Les groupements carboxyliques ou amines primaires le long d'une partie du copolymère dibloc servent de points d'ancrage aux groupements fonctionnels des particules chargées. Ils représentent ainsi des vecteurs potentiels dans un système de relargage de médicaments.

Deux types de copolymères diblocs hydrophiles ont été synthétisés. Dans une première étape, le dextran (DEX₄₀ ou DEX₆₈), après l'oxydation spécifique du groupement terminal, a été couplé avec le PEG-NH₂ (PEG₆₄-NH₂ ou PEG₁₄₀-NH₂) via la réaction d'aminolyse d'une lactone. Par la suite, la partie dextran des copolymères a été carboxyméthylée (CMD₄₀ ou CMD₆₈) pour la transformer en polyélectrolyte capable de jouer le rôle de vecteur pour des particules chargées positivement. D'autre part, la partie CMD du copolymère, 30-CMD₆₈-PEG₆₄, a été modifiée en greffant une amine primaire et ainsi obtenir un nouveau copolymère, ACMD-PEG, capable d'interagir à son tour avec des particules de charges négatives.

Les polymères synthétisés ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire, par spectre infrarouge et par chromatographie d'exclusion stérique. Le taux de carboxyméthylation a été évalué par titrage conductimétrique et le taux d'amine primaire du copolymère dibloc ACMD-PEG par RMN ^1H et par test colorimétrique.

La purification des produits a été effectuée en exploitant les propriétés de solubilité du PEG et du dextran dans l'éthanol chaud. Ainsi, en précipitant et centrifugeant les copolymères dans l'éthanol chaud, il a été possible d'obtenir des produits de haute pureté.

Mots clés : Polyéthylène glycol, dextran, carboxyméthyl-dextran, titrage conductimétrique, copolymères diblocs.

Abstract

The objective of this research is to synthesize dihydrophilic diblock copolymers by linkage of two hydrosoluble homopolymers: a natural polysaccharide, dextran, and a natural bio-compatible polymer, poly(ethylene glycol) (PEG) in order to assess the formation of polymeric micelles via interaction of the anionic or cationic diblock copolymer with opposite charged compounds. Carboxylic or primary amine groups present on diblocks serve to interact with various functional groups of charged particles and therefore they represent new potential vectors in drug delivery systems.

Two types of dihydrophilic diblock copolymers have been synthesized. First; dextran (DEX₄₀ or DEX₆₈), after selective end-group oxidation, was coupled with PEG-NH₂ (PEG₆₄-NH₂ or PEG₁₄₀-NH₂) via a lactone aminolysis reaction. The dextran block was then carboxymethylated (CMD₄₀ or CMD₆₈) to provide a polyelectrolyte able to transport positive charged particles. Then, the CMD block from 30-CMD₆₈-PEG₆₄ diblock copolymer was modified by introducing primary amino groups and generating a new diblock copolymer, ACMD-PEG, able to interact with negatively charged particles.

The polymers synthesized were characterized by nuclear magnetic resonance, infrared spectra and by steric exclusion chromatography. The degree of substitution (DS) of the carboxylate groups was determined by conductive titration and the amine content of ACMD-PEG was evaluated by ¹H NMR and by colorimetric tests.

Purifications were performed by using the difference in solubility of dextran and PEG in hot ethanol. By precipitating and centrifuging the diblocks copolymers in hot ethanol, high quality products were obtained.

Key words: Polyethyleneglycol, dextran, carboxymethyldextran, conductimetric titration, copolymer diblocks.

Table des matières

SOMMAIRE	i
MOTS CLÉS	ii
ABSTRACT	iii
KEY WORDS	iv
TABLE DE MATIERES	v
Liste des abréviations	viii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE 1	1
Introduction	2
1.1 Polymères	4
1.1.1 Poly(éthylène glycol) (PEG)	4
A- Propriétés	4
B- Réactivité	5
I – Fonctionnalisation	5

1.1.2 Dextran	6
A- Propriétés	6
B- Réactivité du dextran	8
I – Carboxyméthylation	8
II – Oxydation de l’aldéhyde terminal	10
III - Oxydation des groupements hydroxyles	12
IV – Amination réductive	13
1.2 Copolymères	15
1.3 Projet de recherche	17
1.4 Bibliographie	19
CHAPITRE 2	23
Article :	
Synthesis, Reactivity, and pH-Responsive Self-Assembly of New Double Hydrophilic Block Copolymers of Carboxymethyldextran and Poly(ethyleneglycol)	23
2.1 Abstract	24
2.2 Introduction	25
2.3 Experimental section	30
2.4 Results and Discussion	41
2.5 Conclusion	58
2.6 Acknowledgements	58
2.7 References	59

CHAPITRE 3	61
Résultats complémentaires	61
3.1 Amination Réductive	62
3.1.1. Introduction	62
3.1.2. Partie expérimentale	64
3.1.3. Résultats et discussion	66
3.2 Aminolyse des lactones	70
3.2.1. Introduction	70
3.2.2. Préparation du dextran lactones	71
3.2.3. Résultats des couplages et des carboxyméthylations	72
CHAPITRE 4	77
4.1 Conclusion	78
4.2 Travaux futurs	81
4.3 Annexes	83

Liste des abréviations

<i>t</i> -BOC	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
60-CMD ₆₈	Carboxyméthyl-dextran, DS 0.60: CMD ₆₈ dérivé du DEX ₆₈
ACMD	Méthoxy N-(2-aminoéthyle)carbamidométhyl-dextran
80-CMD ₄₀ -PEG ₆₄	Carboxyméthyl-dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc, DS 0.80:CMD ₄₀ dérivé du DEX ₄₀ ; PEG de M _n 2 800 g/mol
85-CMD ₄₀ -PEG ₁₄₀	Carboxyméthyl-dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc, DS 0.85:CMD ₄₀ dérivé du DEX ₄₀ ; PEG de M _n 6 200 g/mol
60-CMD ₆₈ -PEG ₆₄	Carboxyméthyl-dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc, DS 0.60:CMD ₆₈ dérivé du DEX ₆₈ ; PEG de M _n 2 800 g/mol
60-CMD ₆₈ -PEG ₁₄₀	Carboxyméthyl-dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc, DS 0.60 :CMD ₆₈ dérivé du DEX ₆₈ ; PEG de M _n 6 200 g/mol
ACMD-PEG	Méthoxy N-(2-aminoéthyle)carbamidométhyl-dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc
CNBr	Bromure de cyanure
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DEX ₄₀ ou DEX ₆₈	Dextran (M _n 6 400 g/mol ou M _n 11 000 g/mol)
Dex-EGF	Dextran- <i>Epidermal Growth Factor</i> copolymère dibloc
DEX ₄₀ -PEG ₆₄	Dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc : Dextran de masse molaire 6 400 g/mol et le PEG 2 800 g/mol

DEX ₄₀ -PEG ₁₄₀	Dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc: Dextran de masse molaire 6 400 g/mol et le PEG 6 200 g/mol
DEX ₆₈ -PEG ₆₄	Dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc: Dextran de masse molaire 11 000 g/mol et le PEG 2 800 g/mol
DEX ₆₈ -PEG ₁₄₀	Dextran-poly(éthylène glycol) copolymère dibloc: Dextran de masse molaire 11 000 g/mol et le PEG 6 200 g/mol
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMAP	4-N, N-(diméthyleamino) pyridine
DMF	Diméthyleformamide
DMSO	Diméthylesulfoxyde
D ₂ O	Oxyde deutérié
DS	Degré de substitution
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
K	Kilodaltons, 1 000 g/mol
KIO ₃	Iodate de potassium
KIO ₄	Periodate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
H ₂ O	Eau
MCA	Acide monochloroacétique
Me-PEG-OH	ω-Hydroxy-methoxy poly(éthylène glycol)
MHz	Mégahertz

M_n	Masse molaire moyenne en nombre
M_w	Masse molaire moyenne en poids
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NaBH_3CN	Cyanoborohydrure de sodium
NH_4Cl	Chlorure d'ammonium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaN_3	Azidure de sodium
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
$\text{PEG}_{64}\text{-NH}_2$ ou $\text{PEG}_{140}\text{-NH}_2$	ω -méthoxy-poly(éthylène glycol) (M_n 2 800 g/mol ou M_n 6 200 g/mol)
PEG-NH_2	ω -méthoxy-poly(éthylène glycol) amine
PEG-Tosylate	Poly(éthylène glycol)-Tosylate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SOBr_2	Bromure de thionyle
SOCl_2	Chlorure de thionyle
SLS	<i>Static light scattering</i>
TEMED	N, N, N, N-Tetraméthyl-Éthylènediamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TMS	Tetraméthylsilane
TNBS	Acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
UV-Vis	Ultraviolet-visible

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1	16
--------------------	----

Copolymères synthétisés à base de polysaccharides mentionnés dans la littérature.

Chapitre 2

Table 2.1	42
------------------	----

Molecular properties of the starting polymers.

Table 2.2	43
------------------	----

Experimental conditions for the carboxymethylation of DEX-PEG copolymers.

Table 2.3	44
------------------	----

Molecular properties of the diblock copolymers and reaction yield.

Table 2.4	55
------------------	----

Characteristic properties of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ micelles in aqueous 0.1 M NaCl solutions of various pH values.

Chapitre 3

Tableau 3.1	65
--------------------	----

Conditions réactionnelles des couplages par amination réductive.

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1	3
Micellisation des copolymères diblocs CMD-PEG avec une substance chargée positivement en milieu aqueux.	
Figure 1.2	4
Structure chimique du PEG.	
Figure 1.3	7
Structure chimique du dextran.	
Figure 1.4	8
Carboxyméthylation du dextran. $n - z = x$, nombre d'unités de répétition sans charge (distribuées aléatoirement le long du squelette du dextran).	
Figure 1.5	9
Formation de l'acide glycolique en compétition avec la carboxyméthylation.	
Figure 1.6	10
Réaction de l'iode sous des conditions alcalines.	
Figure 1.7	10
Oxydation du dextran.	
Figure 1.8	11
Lactonisation du dextran oxydé.	

Figure 1.9	12
Oxydation des groupements hydroxyles du dextran.	
Figure 1.10	13
Équilibre en solution du glucose.	
Figure 1.11	14
Amination du dextran.	

Chapitre 2

Figure 2.1	29
Pictorial representation of the synthetic strategy leading to dextran-poly(ethyleneglycol) (DEX-PEG), carboxymethyldextran-poly(ethyleneglycol) (CMD-PEG of high and low charge density) and acetamidodextran-poly(ethyleneglycol) (ACMD-PEG).	
Figure 2.2	37
Changes in conductivity (A) and pH (B) in water as a function of added NaOH for a solution of 85-CMD ₄₀ -PEG ₆₄ illustrating the <i>plateau</i> region of the carboxylic acid content in the sample.	
Figure 2.3	41
Synthetic route for the preparation of dextran-polyethyleneglycol copolymers.	
Figure 2.4	45
GPC traces recorded by refractive index detector.	
Figure 2.5	46
¹ H NMR spectrum of DEX ₄₀ -PEG ₆₄ (D ₂ O room temperature).	

- Figure 2.6** 48
Synthetic route for the preparation of carboxymethyl-dextran-polyethyleneglycol and N-(2-aminoethyl)carbamidomethyl-dextran-polyethylene-glycol copolymers. All polyelectrolytes have a random charge distribution.
- Figure 2.7** 50
 ^1H NMR spectra of 80-CMD₄₀-PEG₆₄ (A) and 60-CMD₆₈ (B) (D₂O, room temperature).
- Figure 2.8** 52
FTIR spectra of 30-CMD₆₈-PEG₆₄ and 30-ACMD₆₈-PEG₆₄.
- Figure 2.9** 53
 ^1H NMR spectra (D₂O solution, room temperature) of 30-CMD₆₈-PEG₆₄ and 30-ACMD₆₈-PEG₆₄.
- Figure 2.10** 54
Size distributions from aqueous solutions of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ of pH 3.0, 6.0 and 12.0 (0.1 M NaCl, 20 °C); inset: corresponding autocorrelation functions measured at a scattering angle of 90 °.
- Figure 2.11** 57
Pictorial representation of the assemblies formed in aqueous solutions of CMD-PEG block copolymers of various pH and illustration of the intra- and interchain H-bond interactions likely to occur in acidic, neutral and alkaline polymer solutions.

Chapitre 3

- Figure 3.1** 62
Formation de la base de Schiff.
- Figure 3.2** 66
Spectres RMN ^1H (D_2O , température ambiante) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans un tampon de borate. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.
- Figure 3.3** 67
Spectres RMN ^1H (D_2O , température de la pièce) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans un tampon de phosphate. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.
- Figure 3.4** 68
Spectres RMN ^1H (D_2O , température de la pièce) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans DMF/eau. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.
- Figure 3.5** 72
Spectres FTIR (KBr, 256 scans, 8cm^{-1}) du DEX_{40} , $\text{DEX}_{40}\text{-PEG}_{64}$ et $80\text{-CMD}_{40}\text{-PEG}_{64}$.
- Figure 3.6** 73
Spectres RMN ^1H du $\text{Dex}_{68}\text{-PEG}_{64}$ et $60\text{-CMD}_{68}\text{-PEG}_{64}$ (D_2O).
- Figure 3.7** 75
Graphes GPC enregistrés par un détecteur à indice de réfraction.

Remerciements

Je voudrais remercier, en premier lieu, la Professeure, Françoise Winnik, pour m'avoir accepté dans son groupe de recherche. Ses précieux conseils et sa patience m'ont permis de surmonter tous les obstacles et de bien finir ce projet en suivant un cheminement constructif et rigoureux me permettant d'approfondir mes connaissances sur la chimie des polymères.

Par ailleurs, j'aimerais également remercier les membres de mon groupe de recherche et tout particulièrement, Yali Yang qui m'a permis de développer des techniques de synthèses efficaces et essentielles en chimie de polymères et le Dr. Marcio Tiera qui grâce à son grand bagage de connaissances dans le domaine, m'a aidé à comprendre et à mettre en application des méthodologies nouvelles nécessaires à surmonter certains problèmes rencontrés tout le long de ce projet. Tous deux ont contribué grandement à la réussite de cette recherche. Un merci aussi au Dr. Vera Tiera qui, par sa gentillesse et son support moral, m'a aidé à garder toujours le sourire et la motivation nécessaire pour l'atteinte de mes objectifs. À Charbel Diab qui m'a donné des bons conseils quant à l'organisation de mon temps en recherche. Un grand merci à Ghareb Mohamed Soliman et à Sofiane pour assurer la continuité de ce projet. À Pei Lian pour ses précieux conseils et son aide inconditionnelle et à Vincent Darras pour son grand soutien informatique lors de l'étape de rédaction.

Je remercie aussi Piotr Kujawa, Sophie Nguyen, Rodolphe Obeid, Siwar Chayed, Sung-Ju Cho, Sania Mansouri, Florence Segui et Roger C.W. pour leur aide à un moment ou un autre dans ce projet ainsi que pour l'agréable atmosphère qu'ils apportent pour le bon fonctionnement du laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier le conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) pour leur soutien financier. Et évidemment, un grand merci à mes parents, Oscar et Martha, et à ma sœur Oscalina pour leur grand support tout au long de ma vie étudiante. Sans cette contribution personnelle de leur part, aucune de mes réalisations n'aurait été atteinte. UN GRAND MERCI!

*The great things are not done by impulse,
but by a series of small things brought together.*

Vincent Van Gogh, 1888

Introduction

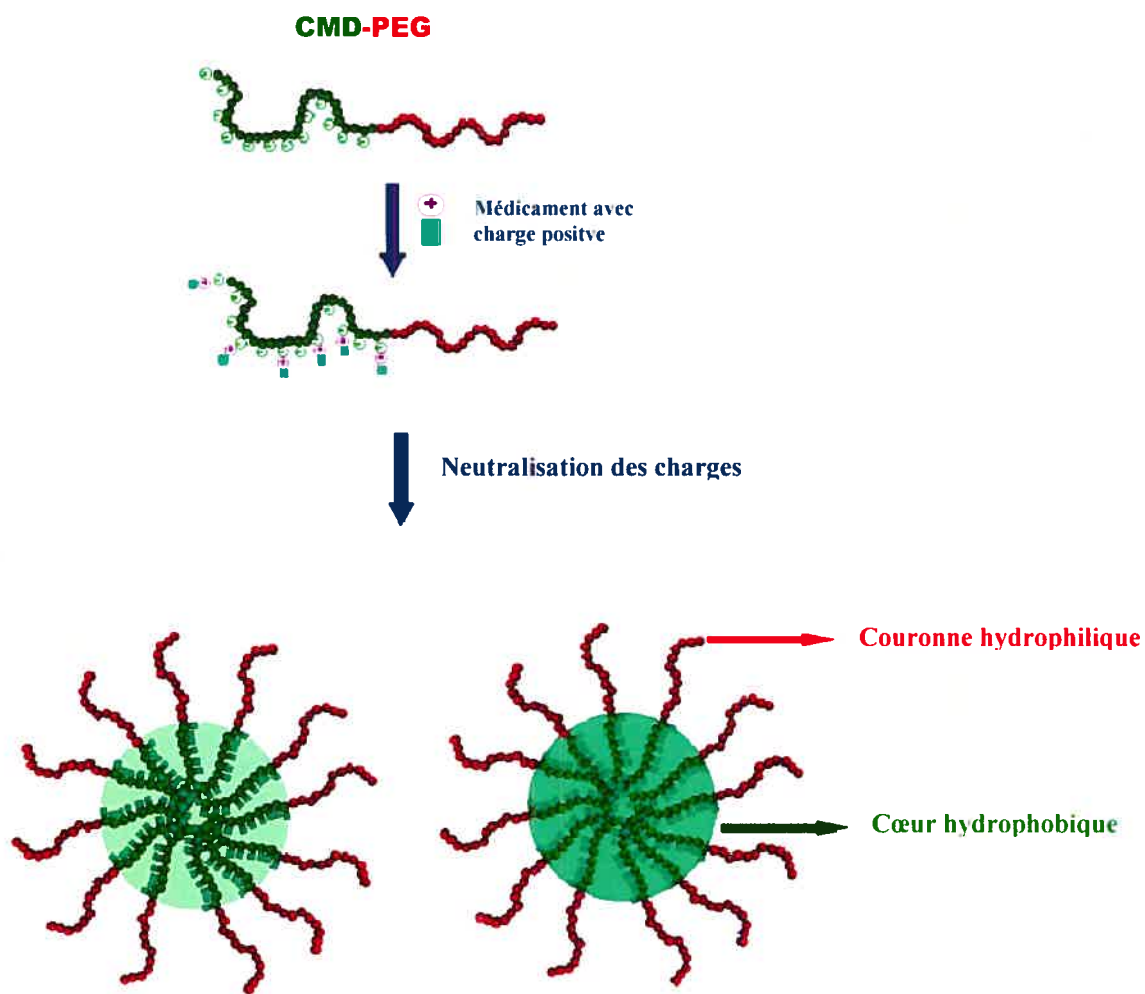
CHAPITRE I

Introduction

De nos jours, les polymères naturels et synthétiques jouent un rôle essentiel dans tous les règnes de la vie. Leurs grandes implications dans les domaines tels que l'alimentation, l'habillement, la construction, le transport, la communication et les technologies pharmaceutiques, font des polymères les candidats potentiels pour représenter notre époque. Autrement dit, le 21^e siècle pourrait bien être l'ère des polymères.

Les copolymères diblocs sont des matériaux synthétiques qui ont un intérêt particulier dans la construction de nano systèmes dû à leur capacité à former en solution, des particules stables avec une structure micellaire. Dans le cadre de ce projet, des copolymères diblocs doublement hydrophiles à base de poly(éthylène glycol) (PEG) et de dextran ont été synthétisés par la réaction d'aminolyse de lactone [1, 2, 3, 4]. Ces copolymères diblocs ont été convertis en copolymères comportant un bloc chargé, soit négativement (carboxyméthyl-dextran, CMD), soit positivement (Méthoxy N-(2-aminoéthyle)carbamidométhyl-dextran, ACMD). La figure 1.1 illustre un exemple du comportement, en solution aqueuse, des copolymères diblocs en présence d'une substance de charge opposée, en l'occurrence un médicament. Le médicament interagit avec la partie chargée du copolymère dibloc pour former un nouveau bloc de nature hydrophobe sur le copolymère dibloc de départ si le médicament a une tendance hydrophobe

après neutralisation des charges. En solution aqueuse, les blocs hydrophobiques s'associent pour former des micelles. L'intégrité de ces micelles dépend du pH et de la force ionique, car ces paramètres influencent directement l'interaction électrostatique présente dans les blocs hydrophobiques.



Micelles Polymériques

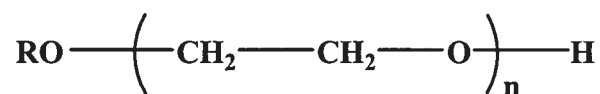
Figure 1.1 Micellisation des copolymères diblocs CMD-PEG avec une substance chargée positivement en milieu aqueux.

1.1 Polymères

1.1.1 Poly(éthylène glycol) (PEG)

A- Propriétés

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est un polyéther diol obtenu généralement par polymérisation d'ouverture de cycle de l'oxyde d'éthylène. Il est hydrosoluble, biocompatible et a été largement étudié dans la littérature pour ses applications en biomédecine (faible toxicité) [5]. Le vaste domaine d'application du PEG est associé à son profil de solubilité. Il est soluble dans l'eau et dans des solvants organiques tels que le diméthyleformamide (DMF), le dichlorométhane (DCM), le toluène, l'acétonitrile, et le méthanol, mais il est insoluble dans le diéthyle éther et l'éthanol froid. En exploitant les propriétés de solubilité du PEG (Fig. 1.2) et du dextran, il a été possible de purifier le produit final de l'excédent de PEG employé lors de la réaction de couplage.



R : H ou -CH₃

Figure 1.2 Structure chimique du PEG.

B- Réactivité

I - Fonctionnalisation

Le squelette du monométhoxy PEG est chimiquement inerte et son hydroxyle primaire terminal peut se lier directement, en une étape, à la molécule ciblée par des liaisons de type éther [6], ester [7] ou carbonate [8]. Dans la plupart des cas, le groupement hydroxyle est premièrement activé et ensuite, il réagit avec la molécule de choix. Les fonctionnalisations terminales les plus typiques du PEG sont le chlorure, le bromure et l'ester de sulfonate. Ces fonctions sont obtenues respectivement par la conversion de l'hydroxyle terminal avec le chlorure de thionyle, SOCl_2 [9], le bromure de thionyle, SOBr_2 [10] et les chlorures organiques de sulfonyle. Les dérivés d'ester sulfonate tels que le PEG-tosylate [11, 12] sont souvent utilisés comme intermédiaires dans la préparation de dérivés tels le α -amine- ω -méthoxy-PEG en employant un excès d'ammoniaque [13]. Dépendamment de l'utilisation, d'autres activations utiles du PEG ont été rapportées [14, 15, 16].

1.1.2 Dextran

A- Propriétés

Le dextran, disponible commercialement, est un polysaccharide ayant des résidus glucopyranosyles liés majoritairement $\alpha(1\rightarrow6)$ avec des branchements 1-3 attachés aux unités de la chaîne principale. Le degré de branchement est d'approximativement 5% et les branches sont en moyenne séparées par 1 à 2 unités de glucose [5, 17]. Le dextran peut être obtenu à partir de la fermentation du sucrose, contenu dans un milieu de culture, par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* [17]. Ce polysaccharide est un polymère hydrosoluble, biodégradable et sa solubilité dans les solvants organiques est très faible. Toutefois, il est soluble dans certains solvants organiques très polaires tels que le diméthylesulfoxyde (DMSO). Ces propriétés de solubilité dans le DMSO et son insolubilité dans les alcools, tels le méthanol ou l'éthanol, peuvent être exploitées dans des synthèses et dans la purification de dérivés du dextran. Le dextran possède trois groupements hydroxyles secondaires par unité glucosidique (Fig. 1.3) qui peuvent être activés en des groupements fonctionnels capables de réagir avec d'autres molécules. Par exemple, l'introduction des groupements imidocarbonates via le bromure de cyanure (CNBr) [18, 19], ou formation du dialdéhyde-dextran par l'oxydation avec le périodate de potassium (KIO_4) [20, 21].

Une autre propriété chimique intéressante, qui est propre aux polysaccharides, est la présence d'un aldéhyde terminal qui peut être, soit activé spécifiquement [1, 2, 22], soit utilisé directement dans des réactions d'amination réductive pour former, par exemple, des structures polymériques de type dibloc [23, 24, 25], ou des polymères greffés [26, 27, 28].

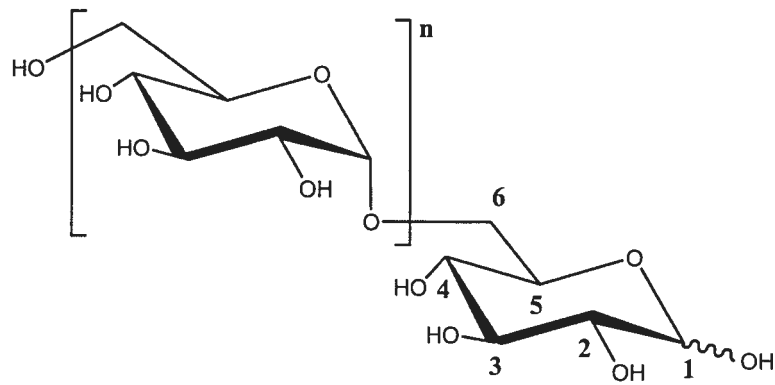


Figure 1.3 Structure chimique du dextran.

B- Réactivité du dextran

I - Carboxyméthylation

La carboxyméthylation permet d'introduire des groupes ionisables le long du squelette du polysaccharide. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature telle la carboxyméthylation en milieu basique aqueux [29, 30] et celle effectuée dans un mélange réactionnel solvant organique/solution de soude [31, 32]. L'approche retenue dans le cadre de ce projet a été celle permettant la carboxyméthylation en une étape et ayant un degré de substitution (DS) le plus près de l'unité. Autrement dit, celle réalisée par Jozefonvicz et *al* [31, 32] et illustrée par la figure 1.4. La carboxyméthylation peut s'effectuer sur l'un ou l'autre des trois groupements hydroxyles de l'unité glucosidique, mais seule celle en position C-2 est illustrée, car elle serait cinétiquement la position la plus favorable [33].

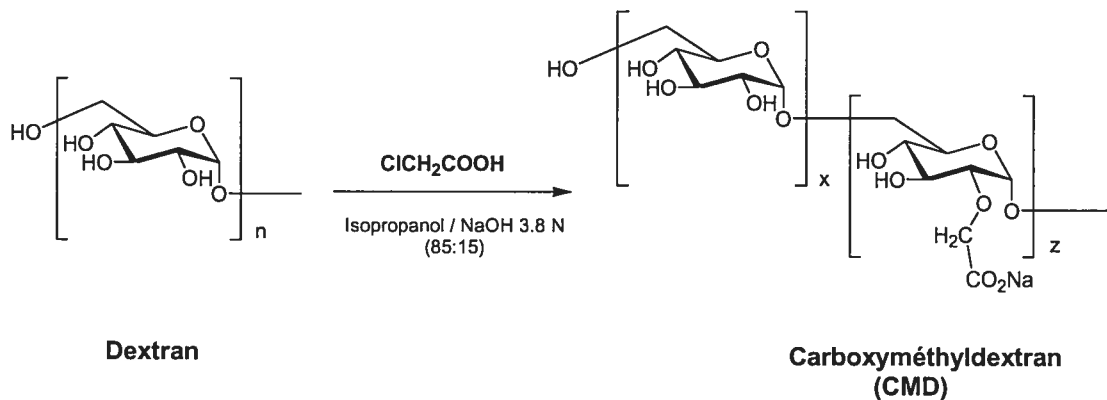


Figure 1.4 Carboxyméthylation du dextran. $n - z = x$, nombre d'unités de répétition sans charge (distribuées aléatoirement le long du squelette du dextran).

Dans les conditions proposées par Jozefonvicz, l'optimisation de la carboxyméthylation du dextran en une étape est assurée par une stoechiométrie adéquate des réactifs et un bon ratio solvant organique/milieu aqueux pour favoriser la carboxyméthylation au dépend de la réaction secondaire impliquant la formation de l'acide glycolique (Fig. 1.5).



Figure 1.5 Formation de l'acide glycolique en compétition avec la carboxyméthylation.

Le mélange isopropanol/eau à un ratio volumique 85 :15 est le milieu réactionnel utilisé pour la réaction de carboxyméthylation. La bonne miscibilité des deux solvants et leur capacité à solubiliser les réactifs font d'eux des solvants de choix pour effectuer la réaction de carboxyméthylation en une étape et avec un degré de substitution (DS) optimal. Cette étude sur la carboxyméthylation du dextran a conduit au choix des conditions réactionnelles dans le cadre de ce projet.

II – Oxydation de l'aldéhyde terminal

L'oxydation de l'aldéhyde terminal est une réaction sélective à cette fonction, car elle ne touche pas les groupements hydroxyles sur l'unité glucosidique [1]. Cette oxydation pourrait s'appliquer de façon générale à tous les polysaccharides. Cette oxydation comporte deux étapes : la première est la réaction de l'iode en milieu alcalin pour former l'iodate de potassium (KIO_3) représentant l'agent oxydant (Fig. 1.6) et la deuxième est l'oxydation du groupement terminal aldéhyde du dextran (Fig. 1.7) suivie d'une lactonisation de l'unité saccharide terminale (Fig. 1.8).



Figure 1.6 Réaction de l'iode dans des conditions alcalines

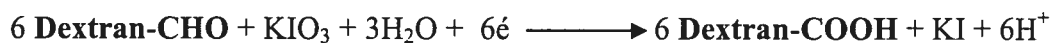


Figure 1.7 Oxydation du dextran.

L'acide aldonique de dextran (Dextran-COOH) est converti rapidement en lactone par déshydratation. Il est à noter que deux sortes de lactones peuvent être formées (Fig. 1.8) : une γ -lactone (1,4-lactone, cycle à 5) et une δ -lactone (1,5-lactone, cycle à 6). La lactonisation est un processus réversible. En présence d'eau, les lactones formées peuvent être hydrolysées et revenir à l'acide aldonique du dextran de départ, de là l'importance d'effectuer la réaction de couplage dans des conditions anhydrides [1, 2].

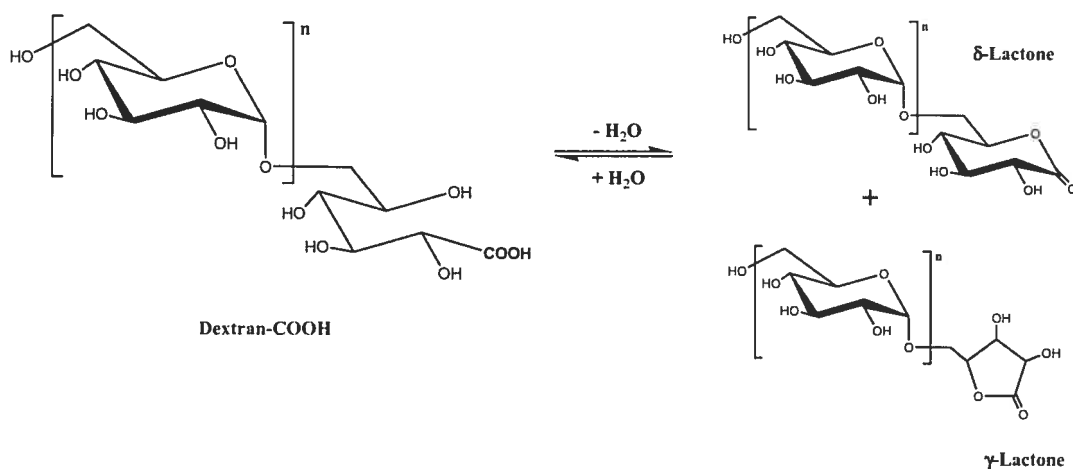


Figure 1.8 Lactonisation du dextran oxydé.

Dans la littérature, la δ -lactone démontre une plus grande réactivité que la γ -lactone [1], mais aucune proportion de la formation de ces deux lactones a été donnée. Dans le cadre de ce projet, la quantification de ces deux lactones n'a pas été nécessaire, car les deux aboutissent au produit final désiré [1]. Ces lactones en présence d'un nucléophile tel qu'une amine sont susceptibles de réagir par ouverture de cycle et former un lien covalent amide dans des conditions relativement douces, processus appelé l'aminolyse d'une lactone [3, 4]. Dans le présent projet, la réaction de couplage implique le α -amine- ω -méthoxy-PEG et le dextran avec terminaison lactone dans des conditions relativement douces (DMSO, 60° C, 5 jours).

III - Oxydation des groupements hydroxyles

Il est possible également d'oxyder le dextran par bris du lien HOC-COH de l'unité glycodextranosyl le long de la chaîne principale et d'en produire deux groupements aldéhydes par unité de glucose (Fig. 1.9). Cette oxydation se fait, par exemple, en faisant réagir le dextran avec le periodate de potassium [20, 21] ou de sodium [34].

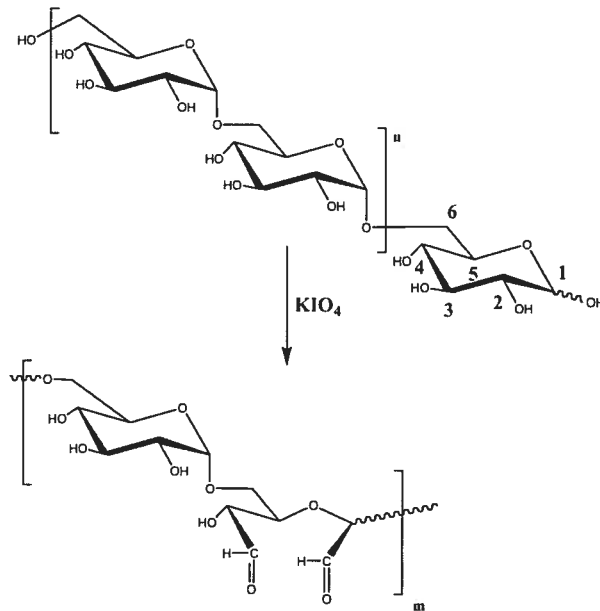


Figure 1.9 Oxydation des groupements hydroxyles du dextran.

La présence des groupements aldéhydes le long de la chaîne principale du dextran donne la possibilité d'effectuer des réactions d'amination réductive et d'obtenir des copolymères greffés du dextran [20, 21].

IV – Amination réductive

L'aldéhyde terminal des polysaccharides peut être activé sélectivement et peut aussi participer à des réactions de couplage par amination réductive avec une amine, sous des conditions favorables à la conjugaison de ces deux fonctions. Les polysaccharides ont deux isomères structuraux en équilibre [35] et la forme aldéhyde intermédiaire participe à la réaction d'amination réductive (Fig. 1.10).

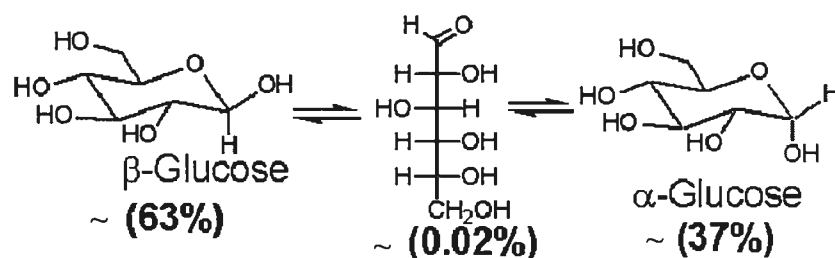


Figure 1.10 Équilibre en solution du glucose.

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature impliquant l'amination réductive du dextran (Fig. 1.11) [22]. La réaction décrite est une amination du dextran obtenue par la réduction de l'aldéhyde terminal en utilisant un excès de chlorure d'ammonium en présence de l'ion cyanoborohydrure. L'excès de chlorure d'ammonium favorise la réaction à se déplacer vers la formation des produits selon le principe de Lechâtelier.

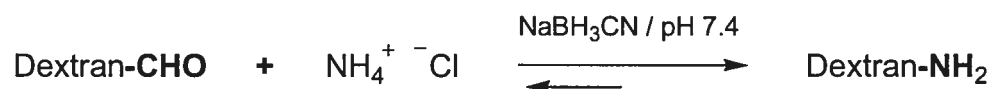


Figure 1.11 Amination du dextran.

Pour optimiser cette réaction, Borch et *al* proposent un pH du milieu réactionnel se situant entre 6-8 et un excès d'amine (5 équiv.) est nécessaire [36]. Ces conditions favorisent la réaction à se déplacer préférentiellement vers la formation de l'intermédiaire, l'ion iminium, qui sera réduit subséquemment avec l'agent réducteur NaBH₃CN.

L'amination réductive est à la base des synthèses de copolymères diblocs présentés par les groupes de Bosker [23], Zhao [24] et Yang [25]. Bosker et *al* proposent une stratégie de synthèse basée sur la réaction de couplage entre le dextran et le polystyrène amine terminale. Chaque polysaccharide contient un seul aldéhyde terminal et par conséquent, une seule chaîne de dextran réagit avec une seule chaîne de polystyrène amine terminale pour former un unique copolymère dibloc linéaire. L'équipe de Zhao propose la synthèse d'un copolymère dibloc par amination réductive entre le dextran et un facteur de croissance avec une terminaison d'amine primaire. Quant à l'équipe de Yang, elle suggère plutôt la synthèse d'un copolymère dibloc entre l'aldéhyde terminal du polysaccharide acide hyaluronique et l'amine terminale du poly (2-éthyle-2-oxazoline).

1.2 Copolymères du dextran

Dans la littérature, des exemples de couplages entre le PEG et le dextran ont déjà été présentés comme en témoignent les travaux de De Sousa Delgado [37], de Huh [38] et de Hoste [39] où ils présentent la synthèse du copolymère dextran greffé avec du PEG obtenu par la réaction entre le ω -méthoxy-PEG-amine (PEG-NH₂) et le dextran activé avec le chloroformiate. En résumé, ils obtiennent le PEG greffé au dextran en activant, en premier lieu, les groupements hydroxyles du dextran avec le chloroformiate de *p*-nitrophényl en présence de la 4-N,N-(diméthylamino)pyridine (DMAP) et en faisant finalement le couplage entre le dextran activé et le PEG-NH₂ dans le DMSO. Des exemples de copolymères diblocs (dextran-PEG) ont été synthétisés par le groupe de Spaltro et *al* [40]. Dans ces travaux, les auteurs mettent l'accent sur le caractère unique de leur invention. Ils affirment que contrairement à ce qui avait été synthétisé auparavant (dextran et PEG conjugués de façon greffée), leur nouveau produit était un copolymère dibloc linéaire où une seule chaîne de polysaccharide était liée à une seule chaîne de PEG au niveau du carbone anomérique terminal du polysaccharide. La stratégie de synthèse repose sur le couplage par glycosidation entre le monométhoxy-PEG et l'acetobromodextran suivie d'une déacétylation pour retrouver la partie dextran du copolymère dibloc. Ces travaux représentent un brevet pour une formulation de pâtes à dents où les copolymères diblocs dextran-PEG inhibent l'agrégation bactérienne.

Dans l'ensemble, les exemples de copolymères impliquant le dextran ou le PEG sont nombreux, comme ceux à base d'autres polysaccharides. Le tableau 1.1 montre quelques-uns de ces copolymères et la réaction de couplage impliquée.

Tableau 1.1 : Copolymères synthétisés à base de polysaccharides mentionnés dans la littérature.

Copolymères	Réaction de couplage
Dextran-polystyrène [23]	Amination réductive
DEX-EGF [24] (EFG :Epidermal Growth Factor)	Amination réductive
Hyaluronan-poly(2-éthyle-2-oxazoline) [25]	Amination réductive
PEG-poly(acide méthacrylique) [41]	Condensation (stratégie du NHS / DCC)
Poly(L-lysine)-g-dextran [26]	Amination réductive
Poly(DMAEMA-NVP)-PEG-galactose [42]	Condensation (stratégie du NHS / DCC)
Dextran- <i>graft</i> -poly(NIPAAm-co-DMAAm) [43]	Réaction de greffage utilisant le dextran activé par le chloroformiate de p-nitrophényl

1.3 Projet de recherche

Dans le cadre de ce projet, une approche, différente de celle proposée par le groupe de Spaltro, a été suivie pour synthétiser les copolymères diblocs dextran-PEG. La stratégie a été le couplage, par la réaction d'aminolyse de lactone, entre le ω -méthoxy-poly(éthylène glycol)-amine (PEG-NH₂) et le dextran-lactone obtenu suite à l'oxydation spécifique du groupement aldéhyde terminal. Un des avantages de cette stratégie repose essentiellement sur le fait que le copolymère dibloc est obtenu en moins d'étapes. De plus, contrairement à l'amination réductive, aucun contrôle de pH n'est nécessaire, car le couplage se fait en milieu organique (DMSO) anhydre. Autrement dit, la forme non protonnée du PEG-NH₂ est majoritairement présente et essentielle dans la réaction nucléophile d'aminolyse de lactone. On peut aussi ajouter que la concentration de la lactone terminale est plus élevée, car contrairement à l'aldéhyde terminal des polysaccharides participant dans l'amination réductive, la lactone en milieu organique ne se retrouve pas sous forme d'équilibre en solution (Fig. 1.10).

La seconde partie du projet consiste à introduire des groupements carboxyliques le long de la partie dextran du copolymère dibloc dextran-PEG. Pour y parvenir, une carboxyméthylation a été faite sur la partie dextran du copolymère dibloc en employant la méthodologie de Jozefonvicz et *al* [31, 32] qui permet d'obtenir le polyanion carboxyméthyl-dextran-poly(éthylène glycol) (CMD-PEG).

Finalement, des groupements d'amine primaire ont été liés aux carboxylates [44, 45, 46, 47] présents sur la partie carboxyméthyl-dextran (CMD) du copolymère dibloc 30-CMD₆₈-PEG₆₄ pour obtenir le polycation méthoxy N-(2-aminoéthylecarbamidométhyl-dextran-poly(éthylène glycol)) (ACMD-PEG). Ces nouveaux polyélectrolytes pourraient trouver des applications dans un système de relargage de médicaments ou de transporteurs de nanoparticules inorganiques chargées.

1.4 Bibliographie

- [1] Zhang T, Marchant RE. *Macromolecules* 1994;27:7302-7308.
- [2] Auzély-Velty R, Cristea M, Rinaudo M. *Biomacromolecules* 2002;3:998-1005.
- [3] Ikada Y, Jamshidi K, Tsuji H, Hyon S. *Macromolecules* 1987;20:906-908.
- [4] Liu W, Xu DD, Repić O, Blacklock TJ. *Tetrahedron Letters* 2001;42:2439-2441.
- [5] Monfardini C, Veronese FM. *Bioconjugate Chemistry* 1998;9:418-450.
- [6] Johansson G, Joelsson M. *Biotechnology and Bioengineering* 1985;27:621-625.
- [7] Ghedini N, Zecchi V, Tartarini A, Scapini G, Andrisano V, Ferruti P. *Journal of Controlled Release* 1986;3:185-191.
- [8] Khue NV, Galin JC. *Journal of Applied Polymer Science* 1985;30:2761-2778.
- [9] Buckmann AF, Morr M, Kula MR. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1987;9:258-268.
- [10] Buckmann A, Morr M, Johansson G. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia* 1981;182:1379-1384.
- [11] Ziegast G, Pfannemuller B. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* 1984;5:363-371.
- [12] De Vos RJ, Goethals EJ. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications* 1985;6:53-56.
- [13] Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A, Gibson D. *Bioconjugate Chemistry* 2003;14:563-574.
- [14] Kuan CT, Wang QC, Pastan IJ. *Biological Chemistry* 1994;269:7610-7616.

- [15] Morpurgo M, Veronese FM, Kachensky D, Harris JM. *Bioconjugate Chemistry* 1996;7:363-368.
- [16] Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P, Morpurgo M, Harris JM, Veronese FM. *Bioconjugate Chemistry* 1995;6:62-69.
- [17] Ioan CE, Aberle T, Burchard W. *Macromolecules* 2000;33:5730-5739.
- [18] Melton RG, Wiblin CN, Foster RL, Sherwood RF. *Biochemical Pharmacology* 1987;36:105-112.
- [19] Melton RG, Wiblin CN, Foster RL, Baskerville A, Sherwood RF. *Biochemical Pharmacology* 1987;36:113-121.
- [20] Yudovin-Farber I, Yanay C, Azzam T, Linial M, Domb AJ. *Bioconjugate Chemistry* 2005;16:1196-1203.
- [21] Azzam T, Raskin A, Makovitzki A, Brem, H, Vierling P, Linial M, Domb AJ. *Macromolecules* 2002;35:9947-9953.
- [22] Pawlowski A, Källenius G, Svenson SB. *Vaccine* 1999;17:1474-1483.
- [23] Bosker WTE, Agoston K, Cohen Stuart MA, Norde W, Timmermans JW, Slaghek TM. *Macromolecules* 2003;36:1982-1987.
- [24] Zhao Q, Gottschalk I, Carlsson J, Arvidsson L, Oscarsson S, Medin A, Ersson B, Janson J. *Bioconjugate Chemistry* 1997;8:927-934.
- [25] Yang Y, Kataoka K, Winnik FM. *Macromolecules* 2005;38:2043-2046.
- [26] Ferdous A, Watanabe H, Akaike T, Maruyama A. *Nucleic Acids Research* 1998; 26:3949-3954.
- [27] Maruyama A, Katoh M, Ishihara T, Akaike T. *Bioconjugate Chemistry* 1997;8:3-6.

- [28] Maruyama A, Watanabe H, Ferdous A, Katoh M, Ishihara T, Akaike T. *Bioconjugate Chemistry* 1998;9:292-299.
- [29] Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie E. *Bioconjugate Chemistry* 1997;8:605-610.
- [30] Sugahara S, Okuno S, Yano T, Hamana H, Inoue K. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2001;24:535-543.
- [31] Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz J. *Carbohydrate Research* 2001;332:75-83.
- [32] Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz J. *Die Makromolekular chemie* 1998;254:61-65.
- [33] Ho FFL, Klosiewicz DW. *Analytical Chemistry* 1980;52:913-916.
- [34] Wileman TE, Foster RL, Elliott PNC. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1986;38:264-271.
- [35] Maitland Jones Jr. *Organic Chemistry*, 2nd edition; W. W. Norton: New-York 2000.
- [36] Borch RF, Bernstein MD, Durst HD. *Journal of the American Chemical Society* 1971;93:2897-2904.
- [37] De Sousa Delgado A, Leonard M, Dellacherie E. *Langmuir* 2001;17:4386-4391.
- [38] Huh KM, Ooya T, Lee WK, Sasaki S, Kwon IC, Jeong SY, Yui N. *Macromolecules* 2001;34:8657-8662.
- [39] Hoste K, Bruneel D, De Marre A, De Schrijver F, Schacht E. *Macromolecular Rapid Communications* 1994;15:697.
- [40] Spaltro SM, Ananthapadmanabhan K, Aronson MP, Frushour M. (1996), Block copolymers of polysaccharides and polyalkylene oxides, U.S. Patent 5,490,978.
- [41] Holappa S, Andersson T, Kantonen L, Plattner P, Tenhu H. *Polymer* 2003;44:7907-7916.

- [42] Lim DW, Yeom Y, Park TG. *Bioconjugate Chemistry* 2000;11:688-695.
- [43] Kumashiro Y, Huh KM, Ooya T, Yui N. *Biomacromolecules* 2001;2:874-879.
- [44] Yang J, Chung TW, Nagaoka M, Goto M, Cho C, Akaike T. *Biotechnology Letters* 2001;23:1385-1389.
- [45] Chung TW, Yang J, Akaike T, Cho KW, Nah JW, Kim S, Cho C. *Biomaterials* 2002;23:2827-2834.
- [46] Gestwicki JE, Cairo CW, Mann DA, Owen RM, Kiessling LL. *Analytical Biochemistry* 2002;305:149-155.
- [47] Reid RC, Abbenante G, Taylor SM, Fairlie DP. *Journal of Organic Chemistry* 2003;68:4464-4471

**Synthesis, Reactivity, and pH-Responsive Self-Assembly of
New Double Hydrophilic Block Copolymers of
Carboxymethyldextran and Poly(ethyleneglycol)**

Authors: - Oscar Suarez Hernandez
- Ghareb Mohamed Soliman
- Fraçoise M. Winnik

Submitted to: Polymer

CHAPITRE II

2.1 Abstract

Double hydrophilic block copolymers (DHBC) were prepared by end-to-end coupling of two biocompatible water-soluble homopolymers: the polysaccharide, dextran (M_w 8,300 or 14,700 g mol⁻¹), and ω -amino poly(ethyleneglycol) (PEG-NH₂, M_w 3,000 or 7,000 g mol⁻¹). The synthesis involved, first, specific oxidation of the dextran terminal aldehyde group and, second, covalent linkage of PEG-NH₂ via a lactone aminolysis reaction. The diblock dextran-PEG (DEX-PEG) copolymers were converted in high yield into the corresponding carboxymethyl dextran-PEG DHBCs with control over the degree of substitution, from 30 to 85 mol % CH₂COOH groups per glucopyranosyl units. Further modifications of a CMD-PEG block copolymer led to N-(2-aminoethyl)carbamidomethyl dextran-PEG yielding a pair of oppositely-charged DHBC of identical charge density, chain length, and neutral block/charged block ratio. The properties of CMD-PEG aqueous solutions were studied by static and dynamic light scattering as a function of solution pH providing evidence of the pH-sensitive assembly of the copolymers driven by inter- and intrachain hydrogen-bond formation.

2.2 Introduction

Double hydrophilic block copolymers (DHBC) consist of two water-soluble blocks of different chemical nature [1]. They behave like usual neutral or charged hydrophilic polymers in water with no tendency towards association. In some cases, however, a change of temperature, salinity, or pH can turn one hydrophilic block into a hydrophobic one. Micellization ensues via assembly of the newly formed hydrophobic blocks [2, 3, 4]. Addition of charged molecules to a solution of an oppositely-charged DHBC also triggers micellization, as demonstrated for example by Kataoka et al, who employed the resulting micelles as drug and gene delivery systems [5, 6]. Moreover, mixing aqueous solutions of oppositely-charged DHBC with identical neutral blocks results in the formation of polyion complex (PIC) micelles of narrow size distribution which remain stable in water for extended periods of time [7, 8]. We reported recently the preparation of DHBC composed of a natural anionic polymer, the polysaccharide hyaluronan, and a neutral synthetic polymer, poly(ethyloxazoline) [9]. The copolymers were readily soluble in water and underwent micellization in the presence of cationic drugs, such as diminazene. Polysaccharide-based DHBCs are particularly advantageous as components of drug delivery systems in view of their low toxicity and biodegradability.

We report here the preparation of new polysaccharide-based DHBCs consisting of a poly(ethyleneglycol) chain linked to carboxymethyldextran (CMD). Dextran is a bacterial polysaccharide composed of α -D-glucopyranosyl units predominantly linked by $\alpha(1\rightarrow6)$ bonds [10]. It exhibits varying degrees of branching depending on its origin [11]. It is a biocompatible and biodegradable polymer used in various medical applications, such as plasma expander and artificial blood formulations [12, 13]. It has been employed as well as a component of nanoparticles used as drug delivery vehicles [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Dextran is highly water soluble and presents no tendency to self-assemble in its native form. Consequently, one needs to modify its structure by incorporation of functionalities which, *per-se* or after further treatment, will induce association into nanoparticles or gels [21]. Most synthetic protocols reported to date involve chemical modification of the main chain hydroxyl groups, leading to polyfunctional dextrans with random distribution of functionalities along the chain. It is possible also to modify specifically one chain end by targeting the single aldehyde group located at the reducing end of dextran and subjecting it to reductive amination [22] or oxidation [23]. The aldehyde end-group can serve also as an anchoring point to prepare copolymers grafted with dextran chains [24] or to assemble diblock copolymers, having a dextran block [25, 26].

Since one of our objectives was to design DHBC for drug delivery systems, we selected poly(ethylene glycol) (PEG) the neutral block of the copolymers due to its biocompatibility and its ability to prevent non-specific uptake by the reticuloendothelial system (RES) [27]. Another motivation for the preparation of CMD-PEG DHBC was our interest in understanding the fundamental principles controlling the assembly of block copolymers in which the two blocks are able to undergo non-covalent interactions via hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. The current understanding of H-bond driven assembly of DHBC derives primarily from studies of aqueous solutions of poly(methacrylic acid)-poly(ethylene oxide) (PMAA-PEO) copolymers [28, 29, 30, 31]. In water of acidic pH, this copolymer forms complexes via interaction between PMAA and PEO blocks belonging either to two different polymer chains or to the same macromolecule. Aqueous solutions of PMAA-PEO are sensitive to pH changes, displaying up to four distinct association patterns over the 2.5 to 12 pH range [31]. Diblock copolymers of carboxymethyl dextran and poly(ethylene glycol) also possess groups able to undergo H-bonding, thus they are expected to undergo pH-dependent intra- or inter-polymeric assembly.

Moreover, the carboxymethyl-dextran block possesses not only carboxylic acid groups as H-bond active groups, but also free hydroxyl groups which may contribute to the formation, stability, and pH-responsiveness of CMD-PEG micelles as is the case for interpolymeric complexes between dextran and polycarboxylic acids [32, 33].

To achieve these objectives, we prepared a variety of dextran-based block copolymers using the strategy depicted schematically in Figure 2.1. The synthetic route involves, first, amidation with ω -amino methoxy poly(ethylene glycol) of end-lactonized dextran (DEX-lactone) leading to neutral dextran-poly(ethyleneglycol)s (DEX-PEG) and, second, carboxymethylation of the dextran block to produce carboxymethyl-dextran-poly(ethylene glycol)s (CMD-PEG) copolymers of various degree of modification. The CMD-DEX copolymers can be converted readily to aminated block copolymers, as demonstrated by the synthesis of N-(2-aminoethyl)carbamidomethyl-dextran-poly(ethylene glycol) (ACMD-PEG). All copolymers were characterized in terms of their molecular weight and composition. The aqueous solution properties of CMD-PEG block copolymers were studied as a function of solution pH by potentiometric titrations and light scattering.

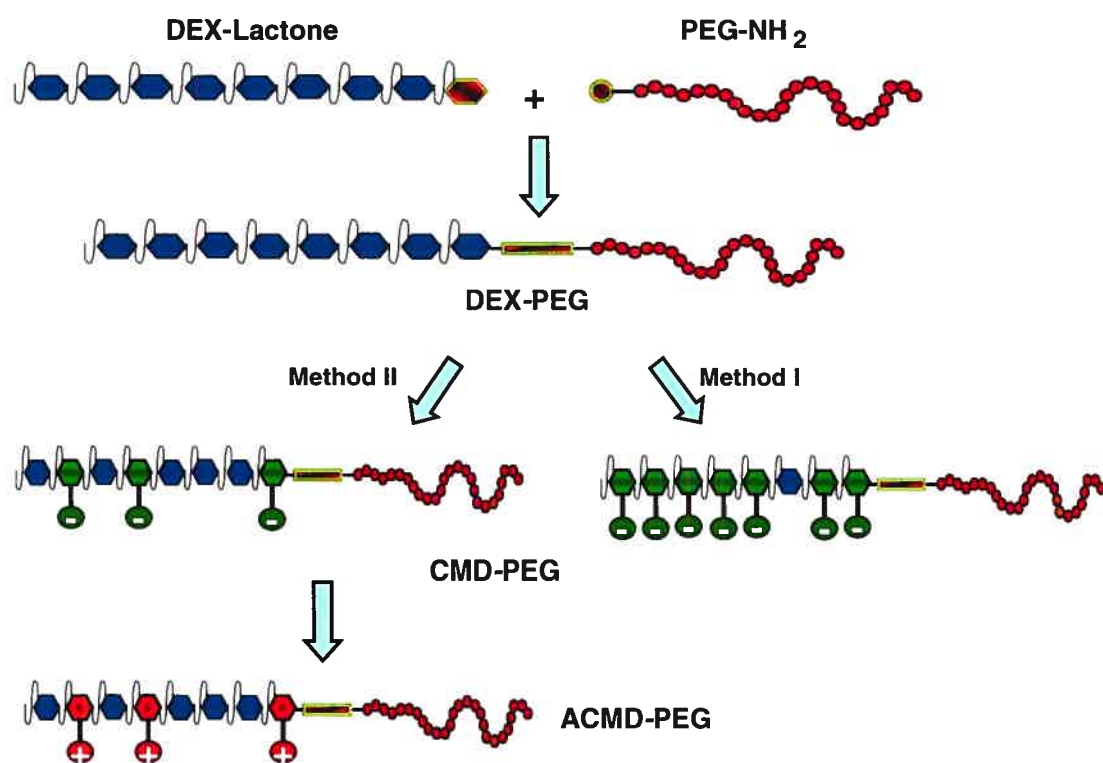


Figure 2.1. Pictorial representation of the synthetic strategy leading to dextran-poly(ethyleneglycol) (DEX-PEG), carboxymethyldextran-poly(ethyleneglycol) (CMD-PEG of high and low charge density) and acetamidodextran-poly(ethyleneglycol) (ACMD-PEG).

2.3 Experimental section

2.3.1. *Materials.*

Water was deionized with a Millipore MilliQ system. Dichloromethane (CH_2Cl_2) was anhydrous from a solvent purification system provided by GlassContour. All other solvents were reagent grade and used as received. ω -Methoxy hydroxy poly(ethylene glycols) (MeO-PEG-OH) and all chemicals were purchased from Aldrich Chemicals, unless otherwise stated. The dextran samples were purchased from Fluka, Chemical Co. and Amersham Biosciences, respectively. End group oxidation of the dextrans was carried out following a reported procedure leading to a mixture of δ - and γ -lactone-terminated dextrans [23,34]. ω -Methoxy poly(ethyleneglycol)-amine (MeO-PEG-NH₂) [35] and N-*t*-BOC-1,2-ethylenediamine [36] were prepared following reported procedures. The molecular properties of the starting polymers are listed in Table 2.1. Dialysis tubing (SpectraPore, MWCO: 1,000 g/mol unless otherwise indicated) was purchased from Fisher Scientific.

2.3.2. *Synthesis of methoxy dextran-poly(ethyleneglycol) (DEX₄₀-PEG₆₄).*

ω -Methoxy-poly(ethylene glycol)amine (PEG₆₄-NH₂, 1.17 g, 0.420 mmol, $M_n = 2,800$ g/mol) was added to a stirred solution of dextran lactone (700 mg, 0.110 mmol, $M_n = 6,400$ g/mol) in dimethylsulfoxide (14 mL). The reaction mixture was heated to 60°C and kept at this temperature for 5 days. The reaction mixture was cooled to room temperature and transferred to a dialysis tube. It was dialysed against water for 2 days. The dialysate was concentrated in vacuo and treated with hot ethanol (50 mL) to separate unreacted PEG₆₄-NH₂.

The mixture was immediately centrifuged for 5 min. at 7500 rpm. The supernatant was removed. The pellet was treated with hot ethanol (25 mL) and subjected to centrifugation. This process was repeated twice to ensure complete removal of excess PEG₆₄-NH₂. The purified product was dried under vacuum for 4 h at 40°C. It was dissolved in a minimum amount of water (10 mL) and isolated by lyophilisation. The absence of PEG-NH₂ was ascertained by a colorimetric assay and GPC analysis. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ/ppm: 4.89 (glucopyranose, anomeric proton), 3.92-3.40 (DEX C-2 to C-6 glucopyranosyl protons), 3.60 (PEG, -CH₂CH₂O-), 3.28 (PEG, -OCH₃); IR(KBr): 3400 cm⁻¹ (ν O-H), 2920 cm⁻¹ (ν C-H), 1642 cm⁻¹ (bound water), 1100 cm⁻¹ (PEG, ν C-O ether), 1010 cm⁻¹ (dextran, ν C-O acetal). The product obtained by coupling of DEX₄₀-lactone and PEG₁₄₀-NH₂ (DEX₄₀-PEG₁₄₀) could not be purified efficiently by the method described due to the partial solubility of the diblock in hot ethanol. The recovery yield of a trial purification was very poor (~ 33 %). Thus, the crude diblock copolymer was subjected directly to carboxymethylation, as described below. Purification of the carboxymethylated diblock copolymer proceeded in excellent yield (75 %).

2.3.3. Synthesis of carboxymethyl dextran (60-CMD₆₈).

A solution of DEX₆₈ (5.00 g, 31 mmol of-glucose units) in an isopropanol-water mixture (105 mL, 85:15 v:v) was treated with sodium hydroxide (6.00 g, 150 mmol) at room temperature. The reaction mixture was heated to 60°C and kept at this temperature for 30 min. Monochloroacetic acid (7.50 g, 80 mmol) was added to the mixture while stirring. The reaction mixture was kept at 60°C for 60 min.

It was cooled to room temperature, transferred in a dialysis bag and dialysed against water for 24 h. The purified copolymer was isolated by lyophilization (3.34 g). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ/ppm : 5.07 (anomeric proton on glucopyranose bearing a carboxymethyl group at C_2), 4.89 (anomeric proton on glucopyranose unsubstituted at C_2), 4.12-4.05 ($-\text{CH}_2\text{COONa}$), 3.97-3.3640 (CMD C-2 to C-6 glucopyranosyl protons).

2.3.4. Synthesis of methoxy carboxymethyl dextran-poly(ethyleneglycol) (80-CMD₄₀-PEG₆₄).

A solution of DEX₄₀-PEG₆₄ (300 mg, 1.4 mmol of-glucose units) in an isopropanol-water mixture (4.77 mL, 85:15 v:v) was treated with sodium hydroxide (270 mg, 6.8 mmol) at room temperature. The reaction mixture was heated to 60°C and kept at this temperature for 30 min. Monochloroacetic acid (380 mg, 4.0 mmol) was added to the mixture while stirring. The reaction mixture was kept at 60°C for 90 min. It was cooled to room temperature, transferred in a dialysis bag and dialysed against water for 24 h. The purified copolymer was isolated by lyophilization (400 mg). The other CMD-PEG samples, except 85-CMD₄₀-PEG₁₄₀ and 30-CMD₆₈-PEG₆₄ (see below) were prepared under identical conditions using the experimental conditions listed in Table 2.2. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz) δ/ppm : 5.07 (anomeric proton on glucopyranose bearing a carboxymethyl group at C_2), 4.89 (anomeric proton on glucopyranose unsubstituted at C_2), 4.15-4.08 ($-\text{CH}_2\text{COONa}$), 3.97-3.36 (CMD C-2 to C-6 glucopyranosyl protons), 3.61 (PEG, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.29 ($-\text{OCH}_3$). IR(KBr): 3400 cm^{-1} (ν O-H), 2920 cm^{-1} (ν C-H), 1604 cm^{-1} (ν C=O carboxylate), 1100 cm^{-1} (PEG, ν C-O ether), 1010 cm^{-1} (dextran, ν C-O acetal).

2.3.5. Synthesis of methoxy carboxymethyl dextran-poly(ethyleneglycol) (85-CMD₄₀-PEG₁₄₀).

A solution of crude DEX₄₀-PEG₁₄₀ (500 mg) in an isopropanol-water mixture (3.0 mL, 85:15 v:v) was cooled to 0 °C and treated with sodium hydroxide (170 mg, 4.25 mmol). The reaction mixture was heated to 60°C and kept at this temperature for 30 min. Monochloroacetic acid (220 mg, 2.32 mmol) was added to the mixture while stirring. The reaction mixture was kept at 60°C for 150 min. It was cooled to room temperature, transferred in a dialysis bag (MWCO 1,000 g mol⁻¹) and dialysed against water for 24 h. The dialysate was concentrated in vacuo and treated with hot ethanol (50 mL) to separate unreacted PEG₁₄₀-NH₂. The mixture was immediately centrifuged for 5 min. at 7500 rpm. The supernatant was removed. The pellet was treated with hot ethanol (25 mL) and subjected to centrifugation. This process was repeated twice to ensure complete removal of excess PEG₁₄₀-NH₂. The purified product was dried under vacuum for 4 h at 40°C. It was dissolved in a minimum amount of water (10 mL) and isolated by lyophilisation (220 mg). The absence of PEG-NH₂ was ascertained by a colorimetric assay and GPC analysis. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ/ppm: 5.07 (anomeric proton on glucopyranose bearing a carboxymethyl group at C₂), 4.89 (anomeric proton on glucopyranose unsubstituted at C₂), 4.15-4.10 (-CH₂COONa), 3.97- 3.36 (CMD C-2 to C-6 glucopyranosyl protons), 3.61 (PEG, -CH₂CH₂O-), 3.29 (-OCH₃).

2.3.6. Synthesis of methoxy carboxymethyldextran-b-poly(ethyleneglycol) (30-CMD₆₈-PEG₆₄).

Monochloroacetic acid (590 mg, 6.3 mmol) was added to a stirred solution of DEX₆₈-PEG₆₄ (300 mg, 1.80 mmol of glucose units) in aqueous NaOH (2.4 mL, 14.4 mmol, 6.0 N) cooled in an ice bath. At the end of the addition, the reaction mixture was heated to 60°C and kept at this temperature for 1 hr. It was cooled to room temperature and purified following the protocol described previously. ¹H-NMR (D₂O, 400 MHz) δ/ppm: 5.07 (anomeric proton on glucopyranose bearing a carboxymethyl group at C₂), 4.88 (anomeric proton on glucopyranose unsubstituted at C₂), 4.15-4.08 (-CH₂COONa), 3.95-3.36 (CMD C-2 to C-6 glucopyranosyl protons), 3.61 (PEG, -CH₂CH₂O-), 3.29 (-OCH₃). IR(KBr): 3380 cm⁻¹ (ν O-H), 2885 cm⁻¹ (ν C-H), 1604 cm⁻¹ (ν C=O carboxylate), 1100 cm⁻¹ (PEG, ν C-O ether), 1010 cm⁻¹ (dextran, ν C-O acetal).

2.3.7. Synthesis of methoxy N-(2-aminoethyl)carbamidomethyldextran-poly(ethyleneglycol), HCl 30-(ACMD₆₈-PEG₆₄).

N-Hydroxysuccinimide (NHS, 92 mg, 0.80 mmol) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride (EDC, 153.0 mg 0.80 mmol) were added to a solution of 30-CMD₆₈-PEG₆₄ (150 mg, 0.200 mmol of COO⁻ groups) in an aqueous N, N, N, N-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)/HCl buffer (10 mL, 10 mM, pH 4.7). The solution was kept at room temperature under nitrogen atmosphere for 24 hr. N-*t*-BOC-1,2-Ethylenediamine (130 mg, 0.80 mmol) was added portion wise to the reaction mixture. The reaction was allowed to proceed for 5 days. The reaction mixture was transferred in a dialysis bag (MWCO 3,500 g/mol) and dialysed against water.

The product was isolated by lyophilization (184 mg). Deprotection of the amine groups was achieved by treating the product (150 mg, 0.011 mmol $-NH-t$ -BOC) with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA) and H_2O (TFA: H_2O 70:30 v/v). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hr. It was transferred to a dialysis bag (MWCO 3,500 g/mol) and dialysed against water for 2 days. The product isolated by lyophilization as the trifluoroacetate salt was converted to the chloride salt by treatment with a Dowex 2X 8-400 ion exchange resin in the chloride form. The product was dialysed against water using a dialysis tube (MWCO 3,500 g/mol) and isolated by lyophilization (130 mg). The product was converted to the free amine by treatment with aqueous NaOH (0.1N). The degree of amination was determined colorimetrically. 1H -NMR (D_2O , 400 MHz) δ /ppm: 5.11 (anomeric proton on glucopyranose bearing a carboxymethyl group at C_2), 4.89 (anomeric proton on glucopyranose unsubstituted at C_2), 4.16-4.11 ($-CH_2CONHCH_2CH_2NH_2$), 3.61 (PEG, $-CH_2CH_2O-$), 4.00 - 3.36 (ACMD C-2 to C-6 glucopyranosyl protons), 3.33 ($-CH_2CONHCH_2CH_2NH_2$), 3.29 ($-OCH_3$), 2.33 ($-CH_2CONHCH_2CH_2NH_2$). IR(KBr): 3380 cm^{-1} (ν O-H), 2900 cm^{-1} (ν C-H), 1648 cm^{-1} (ν amide I), 1100 cm^{-1} (PEG, ν C-O ether), 1010 cm^{-1} (dextran ν C-O acetal).

2.3.8. General instrumentation and methods.

1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance AMX-400 (400 MHz) spectrometer. Chemical shifts are given relative to external tetramethylsilane (TMS = 0 ppm). FTIR spectra were recorded on a PerkinElmer (Spectrum One) spectrometer with a resolution of 8 cm^{-1} . Gel permeation chromatography (GPC) measurements were carried out using a GPC system with an Agilent 1100 isocratic pump, a Dawn EOS multiangle laser light scattering detector (Wyatt Corp.) and an Optilab DSP interferometric

refractometer (Wyatt Technology Corp.) using PL-aquagel-OH 40 (8 μm) and PL-aquagel-OH 30 (8 μm) columns (Polymer Laboratories) eluted with a pH 7.02 buffer composed of 0.2 M NaNO_3 , 0.01M NaH_2PO_4 , 0.08mM NaN_3 at a flow rate of 0.5 ml/min. Solutions for analysis had a polymer concentration of 10.0 mg/mL and the injection volume was set at 100 μl . For dn/dc measurements, stock solutions of each polymer (1.0 mg/mL) in the pH 7.02 buffer were diluted with the same buffer to obtain solutions of concentration ranging from 0.2 to 1.0 mg/mL. UV-vis absorption spectra were recorded on an Agilent 8452A photodiode array spectrometer. Conductivity measurements were carried out with a digital conductimeter with automatic temperature compensation and calibrated with Traceable conductivity calibration standard, both supplied by VWR Scientific Products.

2.3.9. Potentiometric titrations [37]

Solutions for titration were prepared by adding an excess of HCl (0.10 N) to a solution of polymer (CMD-PEG, ~ 30 mg) in water or acetone/water (1/1 v/v). Titration curves for all polymers were obtained by monitoring the conductivity and pH changes upon addition of standard aqueous NaOH (0.10 M, increments of 50 to 250 μ L). The carboxylate content of the polymers were determined graphically as shown in Figure 2.2. All titrations were conducted in duplicate. The molecular weight of the CMD-PEG samples and the number of glucopyranose units obtained from GPC analysis were used to determine the carboxylic acid content of the block copolymers as shown by equation 1:

$$DS = \left[\frac{\text{Number of moles } -\text{CH}_2\text{COONa (plateau region)}}{(\text{CMD-PEG titrated mass} / M_n) \cdot (\text{Number of glucopyranose units})} \right] \quad (1)$$

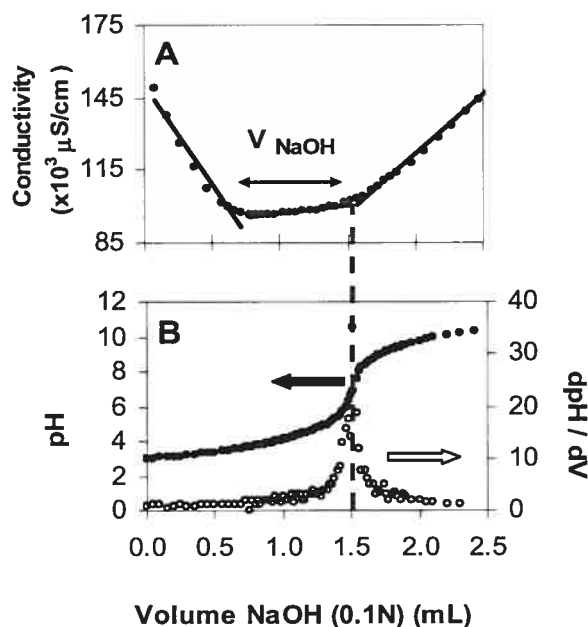


Figure 2.2. Changes in conductivity (A) and pH (B) in water as a function of added NaOH for a solution of 85-CMD₄₀-PEG₆₄ illustrating the *plateau* region of the carboxylic acid content in the sample.

2.3.10. Colorimetric assay for the quantitative analysis of primary amines [38].

A solution of PEG-NH₂ or ACMD-PEG (35 mg) in aqueous NaHCO₃ (2.0 mL, 2 g/L) was heated to 37 °C and kept at this temperature for 10 min. An aqueous solution of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, 147 μL, 50 g/L) was added quickly to the solution and the reaction mixture was kept at 37 °C under stirring for 4 hrs. The warm solution was treated with aqueous HCl (3 mL, 25 wt.-% HCl, 8.2 N). The solution was diluted with water (1:40 v:v). The UV absorbance of this solution at 346 nm was recorded and the NH₂ concentration of the solution was calculated using a calibration curve established by carrying out the same protocol with *n*-butylamine.

2.3.11. Light scattering studies.

Static (SLS) and dynamic (DLS) light scattering experiments were performed on a CGS-3 goniometer (ALV GmbH) equipped with a ALV/LSE-5003 multiple- τ digital correlator (ALV GmbH), a He-Ne laser ($\lambda = 632$ nm), and a C25P circulating water bath (Thermo Haake). The temperature was set at 20 °C. A solution of the diblock copolymer 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ (1 g/L) in 0.1 M NaCl was brought to pH 12.0. Aliquots of this solution were adjusted to various pH values by addition of 1 N HCl. Solutions were kept at room temperature for at least 2 hr after preparation. Prior to the measurements, the solutions were filtered directly into the light scattering cells through 0.45 μm and 0.22 μm Millex Millipore PVDF membranes.

SLS experiments yield the weight-average molar mass (M_w) and the z-average root-mean square radius of gyration (R_G) of scattering objects in dilute solution, based on the angular dependence of the excess absolute scattering intensity, known as the excess Rayleigh ratio $R(q,c)$ given by equation 2:

$$\frac{K(c - c_{mic})}{R(q,c)} \cong \frac{1}{M_w P(\Theta)} + 2A_2(c - c_{mic}) \quad (2)$$

where c is the polymer concentration, c_{mic} the concentration of micellization onset, q is the scattering vector ($q = (4\pi n / \lambda) \sin(\Theta / 2)$), A_2 is the second virial coefficient, n is the refractive index of the solvent, λ is the wavelength of the light in vacuum, and Θ is the scattering angle (30° - 150°). The scattering constant is $K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$, where dn/dc is the refractive index increment and N_A is Avogadro's number. The dn/dc of CMD-PEG in aqueous 0.1 M NaCl water was 0.1328. Data were analyzed according to the Zimm method, assuming that the macromolecules are in a swollen conformation. In this case, the particle scattering function is $P(\Theta) = 1 - (q^2 R_G^2) / 3$, where R_G is the radius of gyration. Since $(q^2 R_G^2) / 3 \ll 1$, it may be assumed that $1 / [1 - (q^2 R_G^2) / 3] \cong 1 + (q^2 R_G^2) / 3$. Thus, equation 1 becomes:

$$\frac{K(c - c_{mic})}{R(q,c)} \cong \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{R_G^2}{3} q^2 \right) + 2A_2(c - c_{mic}) \quad (3)$$

The apparent mass of the polymer ($M_{w,app}$) in solution of concentration c was obtained by extrapolation of the scattered intensity $R(q,c)/(c - c_{mic})$ to $q = 0$. The apparent radius of gyration was obtained by a mean-square linear fit of the inverse of the scattered intensity versus q^2 (see eq. 3).

In DLS experiments, one measures the normalized time autocorrelation function of the scattered intensity, which can be expressed in terms of the autocorrelation function of the concentration fluctuations. In our experiments, the relaxations had always a diffusive character with a characteristic time (τ) inversely proportional to q^2 . A cumulant analysis was applied to obtain the diffusion coefficient (D) of the scattering objects in solution. Extrapolation of the first reduced cumulant $(\tau q^2)^{-1}$ to $q = 0$ yields the value of D , which is related to the average hydrodynamic radius R_H of the scattering objects by equation 4:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s R_H} \quad (4)$$

where η_s the viscosity of the solvent, k_B is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature.

2.4 Results and discussion

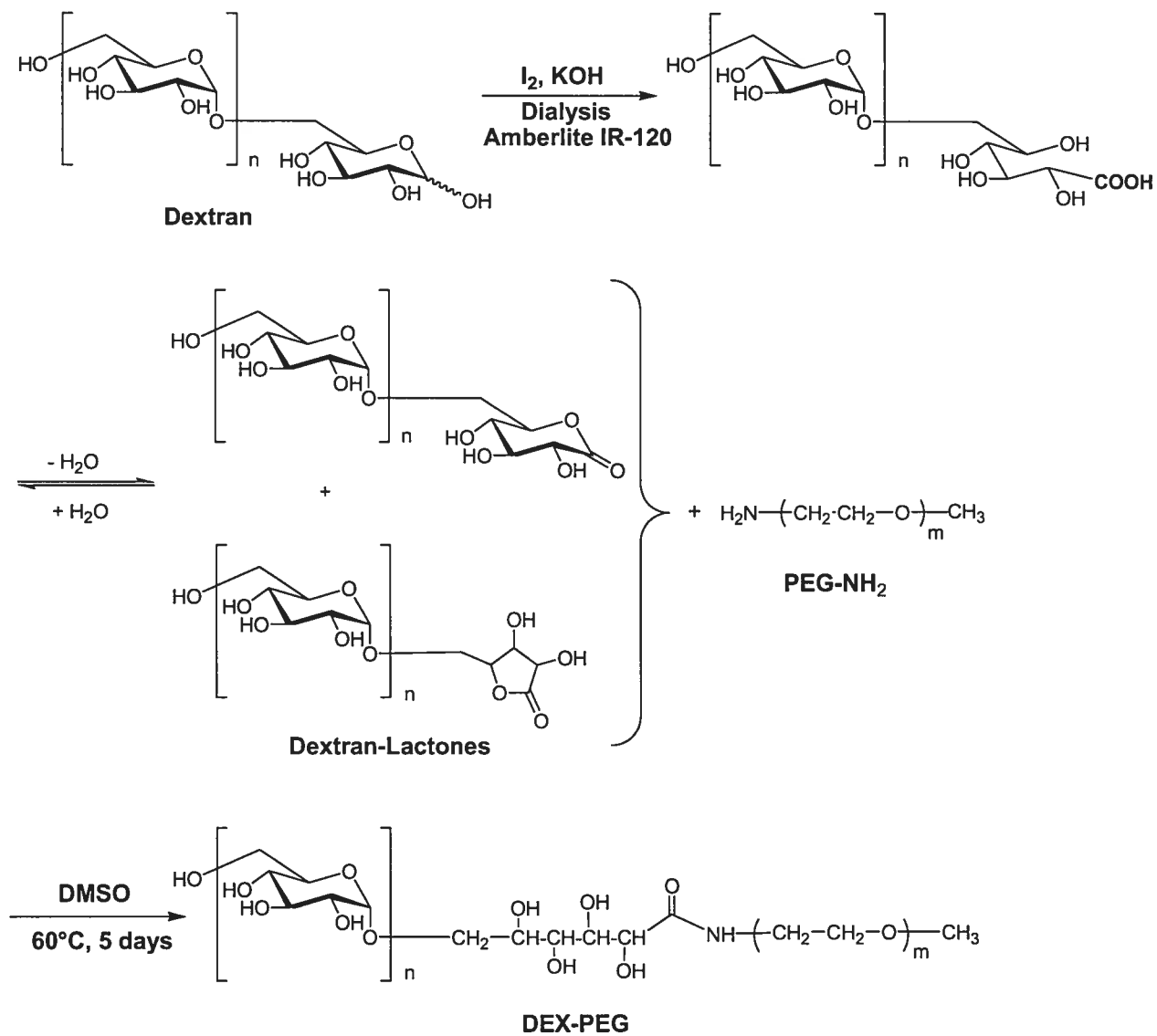


Figure 2.3. Synthetic route for the preparation of dextran-polyethyleneglycol copolymers.

2.4.1 Synthesis of dextran-poly(ethyleneglycol) block copolymers.

The neutral dextran-poly(ethylene glycol) block copolymers were obtained by amidation of dextran-lactone with methoxy ω -amino- poly(ethyleneglycol) (PEG-NH₂) (Figure 2.3), a reaction previously employed to prepare various dextran conjugates. The dextran-lactones were obtained by specific end-modification of dextran [34], while the PEG-NH₂ samples were either commercial products or obtained by amination of ω -methoxy hydroxy poly(ethylene glycol) [35]. Analysis by GPC confirmed that the end group oxidation did not affect the molecular weight of the polymers. The molecular characteristics of the starting polymers obtained by MALLS-GPC are listed in Table 2.1.

Table 2.1: Molecular properties of the starting polymers

Polymers ^a	dn/dc ^b mL/mg (± 0.0010)	M _w ^c (g mol ⁻¹)	M _n ^c (g mol ⁻¹)
PEG ₆₄ -NH ₂	0.1295	3,000	2,800
PEG ₁₄₀ -NH ₂	0.1344	7,000	6,200
DEX ₄₀ (lactones)	0.1481	8,300	6,400
DEX ₆₈ (lactones)	0.1209	14,700	11,000

^a The subscript designates the average number of -CH₂-CH₂-O- and glucopyranosyl repeat units of the PEG and dextran samples, respectively.

^b Values recorded for polymer solutions in aqueous NaNO₃ (0.2 M)/NaH₂PO₄ (0.01M)/ NaN₃(0.8 mM); pH 7.01.

^c From GPC measurements

Table 2.2: Experimental conditions for the carboxymethylation of DEX-PEG copolymers

Polymer	DEX _n -PEG _m		NaOH (mmol)	MCA ^c (mmol)	Volume isopropanol / Water (mL)
	mg	mmol glu			
80 ^a -CMD ₄₀ -PEG ₆₄	300	1.5	6.8	4.0	4.00 / 0.77
85 ^a -CMD ₄₀ -PEG ₁₄₀ ^b	500	--	4.3	2.3	2.63 / 0.47
60 ^a -CMD ₆₈ -PEG ₆₄	270	1.6	7.5	4.0	4.53 / 0.80
60 ^a -CMD ₆₈ -PEG ₁₄₀	400	2.2	10.3	5.5	6.20 / 1.1
30 ^a -CMD ₆₈ -PEG ₆₄	500	3.0	24.0	14.0	0.00 / 4.00

^a the prefix denotes the degree of carboxymethylation of the dextran block (calculated by equation 1)

^b prepared from DEX₄₀-PEG₁₄₀ containing PEG-NH₂ (see experimental section);

^c MCA: monochloroacetic acid

The coupling reaction was carried out in dimethylsulfoxide, a good solvent for dextran-lactone, PEG-NH₂, and the diblock copolymers. In all cases, a large excess of PEG-NH₂ (1/ 5 molar ratio of lactone to amine) and long reaction times were needed to drive the amidation to completion. The reaction progress was followed by FTIR spectroscopy using the disappearance of the band at 1740 cm⁻¹, characteristic of the lactone group of dextran-lactone [34]. The crude reaction product consisted of a mixture of the desired diblock copolymer and a large amount of PEG-NH₂, which was removed effectively by treatment of the mixture with hot ethanol. The absence of unreacted PEG-NH₂ in the purified diblock copolymers was assessed by a colorimetric test for primary amines [38]. It was confirmed by GPC analysis, as exemplified in Figure 2.4, where we present elution profiles of PEG₆₄-NH₂, DEX₄₀-lactone and the resulting diblock copolymer, which eluted with a slightly shorter retention time, compared to DEX₄₀-lactone, indicative of an increase in molar mass. The exact mass of the copolymers were determined by MALLS, using the dn/dc values listed in Table 2.3.

Table 2.3: Molecular properties of the diblock copolymers and reaction yield

Polymer	dn/dc ^a mL/mg	M _w ^b (g mol ⁻¹)	M _n ^b (g mol ⁻¹)	DS ^c	Yield ^d
DEX ₄₀ -PEG ₆₄	0.1380	9,300	7,800	---	75 %
DEX ₄₀ -PEG ₁₄₀	nd ^e	nd ^e	nd ^e	---	nd ^e
DEX ₆₈ -PEG ₆₄	0.1428	13,200	11,300	---	92 %
DEX ₆₈ -PEG ₁₄₀	0.1341	15,900	12,200	---	45 %
80-CMD ₄₀ -PEG ₆₄	0.1328	12,200	10,200	0.76 ± 0.08	99% ^f
85-CMD ₄₀ -PEG ₁₄₀	0.1328	14,800	10,800	0.86 ± 0.09	98% ^f
60-CMD ₆₈ -PEG ₁₄₀	0.1328	16,700	12,900	0.61 ± 0.6	95% ^f
60-CMD ₆₈ -PEG ₆₄	0.1418	16,800	13,400	0.62 ± 0.06	99% ^f
30-CMD ₆₈ -PEG ₆₄	0.1378	15,900	12,000	0.31 ± 0.03	95% ^f

^aValues recorded for polymer solutions in aqueous NaNO₃ (0.2 M)/NaH₂PO₄ (0.01M)/NaN₃(0.8 mM); pH 7.01.

^bFrom GPC measurements

^cDegree of substitution: mol % of glucopyranose units carrying a -COONa group (CMD-PEG)

$$^d \text{ yield} = \frac{\text{mass recovered}}{\text{mol DEX(lactone)} \cdot M_n(\text{DEX-PEG})} \cdot 100\%$$

^e crude product converted directly to CMD-PEG derivative (see text)

$$^f \frac{\text{Mass recovered}}{\text{Mass (DEXn-PEGm)} + (\text{DS} \cdot \text{mmol glu} \cdot 82 \text{ g/mol})} \cdot 100\%$$

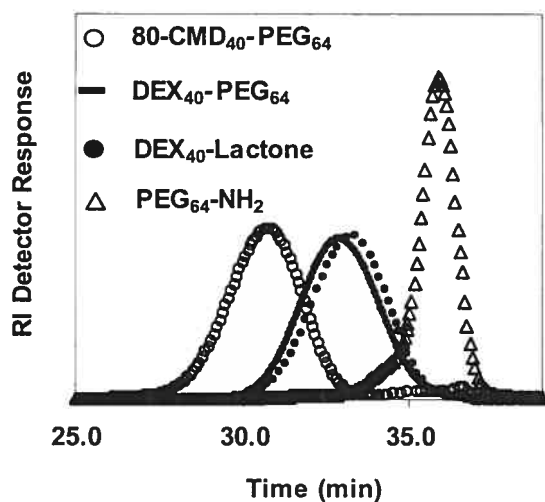


Figure 2.4. GPC traces recorded by refractive index detector.

The success of the coupling was confirmed by analysis of the ^1H NMR spectrum of the diblock copolymers (Figure 2.5) which exhibits two signals characteristic of the methoxy poly(ethyleneglycol) chain, namely a strong signal at δ 3.60 ppm and a weak singlet at δ 3.28 ppm due, respectively, to the methylene and methoxy protons, as well as signals characteristic of dextran. The ^1H NMR spectrum of each diblock copolymer was compared to that of a mixture of the starting polymers in amounts such that the lactone/ NH_2 molar ratio was 1. The ratio of the area of the doublet at δ 4.89 ppm, due to the resonance of the anomeric protons, to that of the signal at δ 3.28 ppm, due resonance of the methoxy protons, was taken as a gauge of the success of the coupling reaction. In all cases the ratios recorded for the DEX-lactone/PEG- NH_2 mixtures and for the diblock copolymers were identical within $\pm 2\%$, the uncertainty of the measurement.

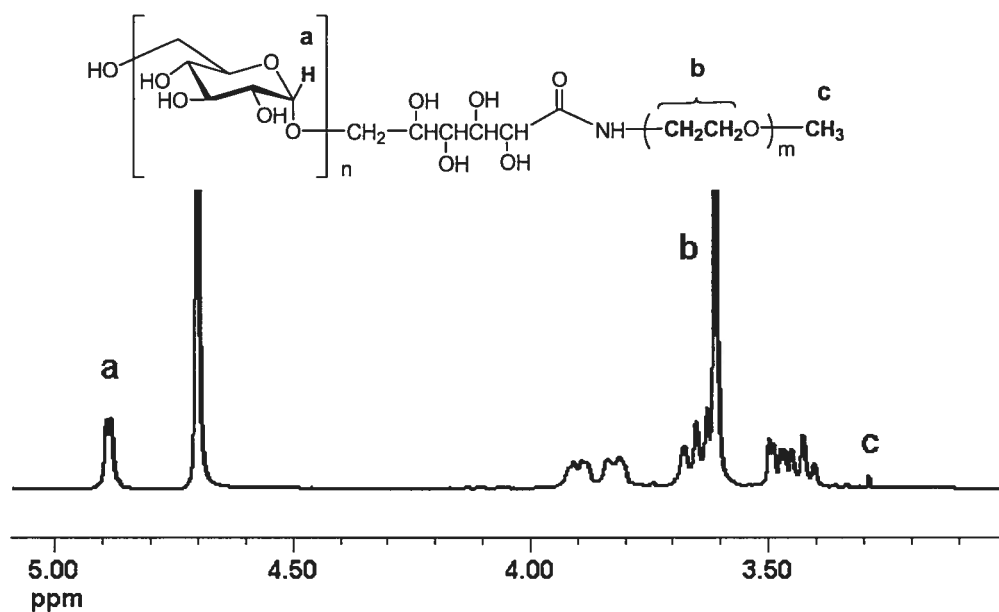


Figure 2.5. ¹H-NMR spectrum of DEX₄₀-PEG₆₄ (D₂O room temperature).

It turned out that the recovery after purification of one diblock copolymer (DEX₄₀-PEG₁₄₀) was very low (~ 30 %, based on starting DEX₄₀-lactone) as a result of partial solubility of this diblock copolymer in hot ethanol. In this case, it was found advantageous to carry out the carboxymethylation on the crude product and to separate excess PEG-NH₂ from the resulting carboxymethylated copolymer (see section 2.3.5).

2.4.2. *Synthesis of carboxymethyl-dextran-poly(ethyleneglycol) copolymers.*

Conversion of the neutral diblock copolymers into polyanions was achieved by carboxymethylation of the dextran block (Figure 2.6). This reaction, routinely employed in polysaccharide chemistry, involves the reaction of monochloroacetic acid (MCA) with dextran under strongly alkaline conditions. The degree of substitution (DS), defined here as the molar % of glucopyranose rings bearing a $-\text{CH}_2\text{COOH}$ group, varies depending on the reaction conditions [39, 40]. To obtain a high substitution level, solutions of DEX-PEG in a 85/15 v/v isopropanol/water mixture were treated with aqueous NaOH (9.0 M) at 60 °C [41]. To achieve moderate carboxymethylation yields, we followed the procedure of Rebizak et al [42], according to which the reaction was performed in aqueous solution.

The successful incorporation of carboxylate groups onto the dextran block was confirmed by the appearance of a band at 1604 cm^{-1} in the FTIR spectrum of CMD-PEG. It was ascertained further by analysis of the ^1H NMR spectrum of the CMD-PEG samples (see Figure 2.7 for the ^1H NMR spectrum of 80-CMD₄₀-PEG₆₄), which exhibits two signals in the spectral region characteristic of the anomeric proton signals: a doublet at δ 4.89 ppm ascribed, by comparison to the spectrum of DEX-PEG, to the resonance of the anomeric proton on glucopyranose rings unsubstituted at C₂, and a doublet at δ 5.07 ppm ascribed to the anomeric proton of glucopyranose rings bearing a carboxymethyl group at C₂. It has been shown previously that carboxymethylation of the C₂ hydroxyl group induces a substantial downfield shift on the signal due to the C₁ proton [43]. The ^1H NMR spectrum of CMD-PEG samples also presents a series of signals between δ 4.08 and 4.15 ppm, due to the methylene protons α to the carboxylate group.

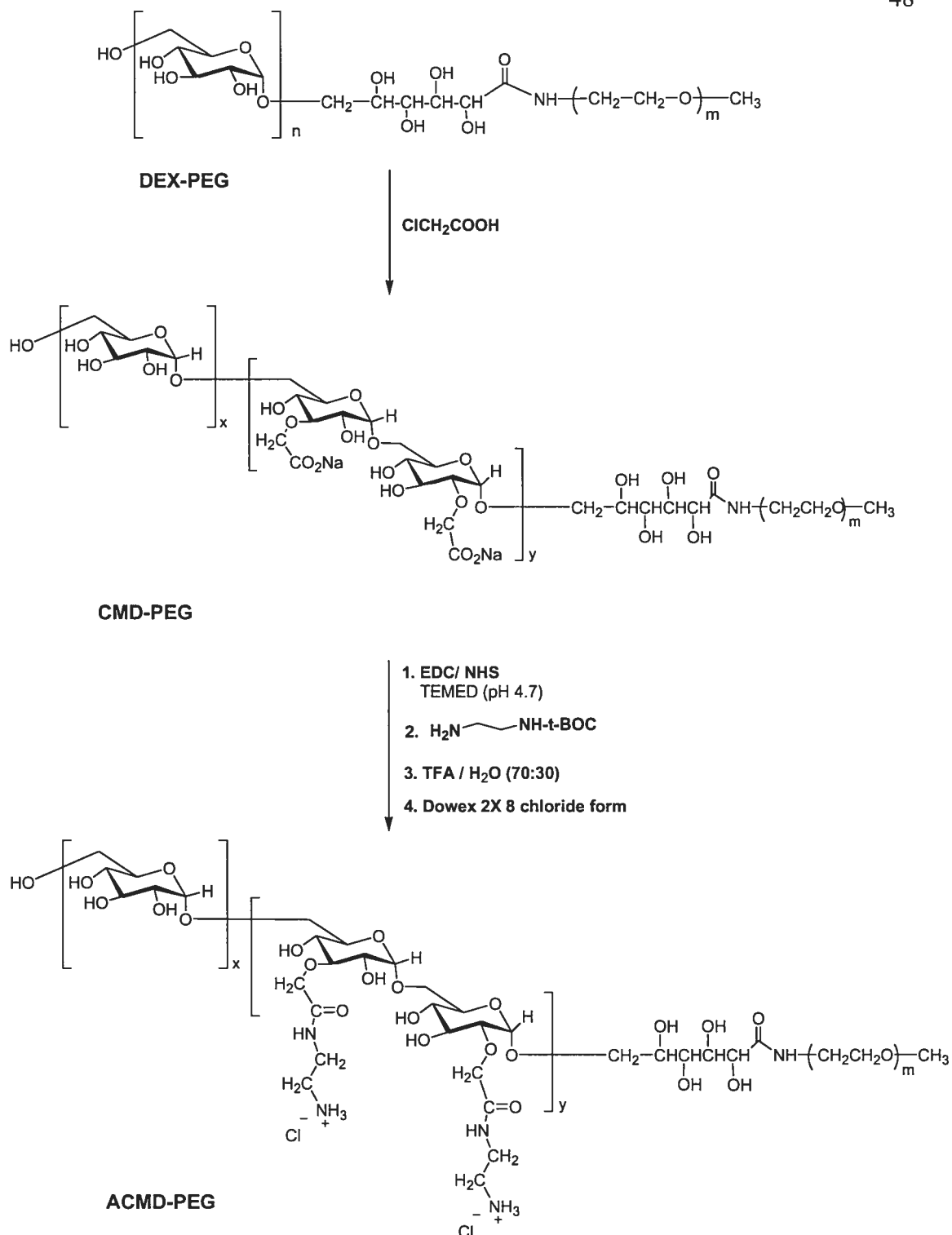


Figure 2.6. Synthetic route for the preparation of carboxymethyldextran-polyethyleneglycol and N-(2-aminoethyl)carbamidomethyldextran-polyethyleneglycol copolymers. All polyelectrolytes have a random charge distribution.

It is expected that carboxymethylation of the dextran block will lead to a mixture of O-substituted isomers. In the case of carboxymethylcellulose, modification was shown to occur at all the hydroxyl groups of the glucose ring, although modification of the C₂ hydroxyl was found to be favored kinetically [43]. The complexity of the pattern in the δ 4.08 to 4.15 ppm region of the ¹H NMR spectrum of CMD-PEG reflects this heterogeneity in carboxymethylation sites. It has been shown in previous studies that the ratio of the area of the CH₂ signals around 4.0 to 4.2 ppm to those of the anomeric protons signals can be used to determine quantitatively the degree of carboxymethylation of cellulose and dextran [43]. In our case, we found that the method was not reliable due to significant spectral broadening. We carried out a potentiometric titration of the samples dissolved in water or a 1/1 v/v water/acetone mixture (Figure 2.2, experimental section). The degree of carboxymethylation of the CMD-PEG diblocks listed in Table 2.3 fall into two categories: from ~60 % to ~ 80 %, for four samples prepared under conditions favoring high substitution, and ~ 30 % for the sample 30-CMD₆₈-PEG₆₄ obtained via the route recommended to attain low substitution levels.

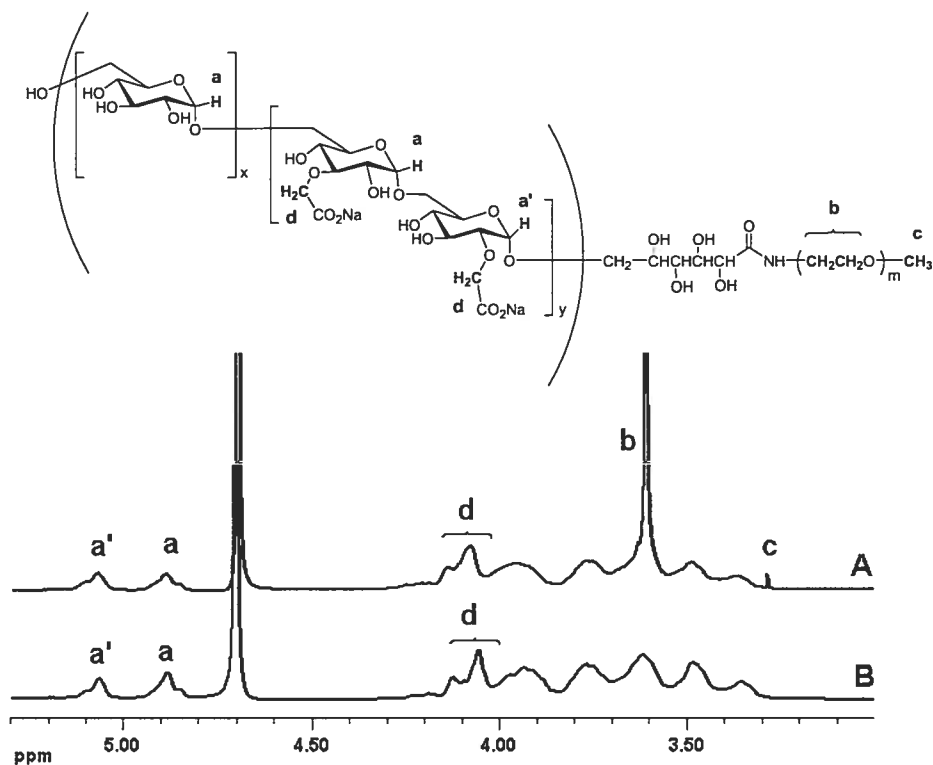


Figure 2.7. $^1\text{H-NMR}$ spectra of 80-CMD₄₀-PEG₆₄ (A) and 60-CMD₆₈ (B) (D_2O , room temperature).

It was important to confirm that the amide linkage between the PEG and the dextran withstood the carboxymethylation conditions. One indication that the diblock structure was preserved is provided by the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of CMD-PEG which displays the pair of signals characteristic of the PEG block: a singlet at δ 3.28 ppm due to the methoxy end group of the PEG block and a broad signal at δ 3.60 ppm due to the CH_2 groups. Further proof of the integrity of the diblock structure was gathered from GPC analysis of the CMD-PEG samples, which eluted at shorter times, compared to their DEX-PEG precursor, as shown in Figure 2.4 for the sample 80-CMD₄₀-PEG₆₄.

The average molar mass of the CMD-PEG diblock copolymers, listed in Table 3.3, is higher than that of their DEX-PEG precursor as a result of the coupling of carboxymethyl groups. Note that the polydispersity of the mass distribution has not been affected by the transformation.

2.4.3. *Synthesis of N-(2-aminoethyl)carbamidomethyl-dextran-poly(ethyleneglycol) copolymers.*

Primary amine groups were grafted on the DEX-PEG diblocks by a two-step procedure involving (1) reaction of *N-t*-BOC-1,2-ethylenediamine with the EDC/NHS-activated carboxylic acid groups of CMD-PEG and (2) cleavage of the *N-t*-BOC protecting groups under acidic conditions (Figure 2.6). This two-step procedure was favoured over the treatment of CMD-PEG with an excess of 1,2-ethylenediamine, reported previously in the case of CMD [42], in order to prevent possible crosslinking reactions. The ^1H NMR spectrum of the intermediate *N-t*-BOC protected diblock copolymer presented a singlet at δ 1.35 ppm, characteristic of the resonance of the *t*-butyl methyl protons. From the ratio of the areas of this signal to those of the anomeric protons, and knowing the DS of the starting CMD-PEG, we estimated that the conversion yield was > 90 %. Deprotection of the polymer with trifluoroacetic acid followed by chloride ion exchange yielded the desired ACMD-PEG diblock copolymer. The FTIR spectrum of this polymer (Figure 2.8) presents bands at 1648 cm^{-1} and 1590 cm^{-1} attributed to the amide I and amide II vibration bands, respectively. Analysis of the ^1H NMR spectrum of ACMD-PEG confirmed the successful grafting of 1,2-ethylenediamine (Figure 2.9). Most significant is the appearance of multiplets at δ 3.33 ppm (signal e in Figure 2.9) and 2.33 ppm (signal f in Figure 2.9), due to the resonances of the methylene protons α and β to the amide linkage, respectively.

In addition, by comparing the signals in the δ 4.08 to 4.16 ppm range, we note significant differences between the spectra of CMD-PEG and ACMD-PEG, which reflect the changes in the environment of the methylene protons α to the carboxy group (protons d, Figures 2.7 and 2.9) upon amidation of the carboxylate groups. The degree of amidation was determined (1) from the ratio of the areas of the anomeric protons signals to that of the signal at δ 2.33 ppm and (2) by a colorimetric assay of the amine content. Both methods indicate that the amine content was 27 ± 1 %, confirming that the high conversion yield calculated from the ^1H NMR spectrum of the *N*-*t*-BOC protected precursor. Thus, the synthetic scheme deployed here allowed us to transform CMD-DEX into an oppositely charged DHBC of identical chain length and charge density.

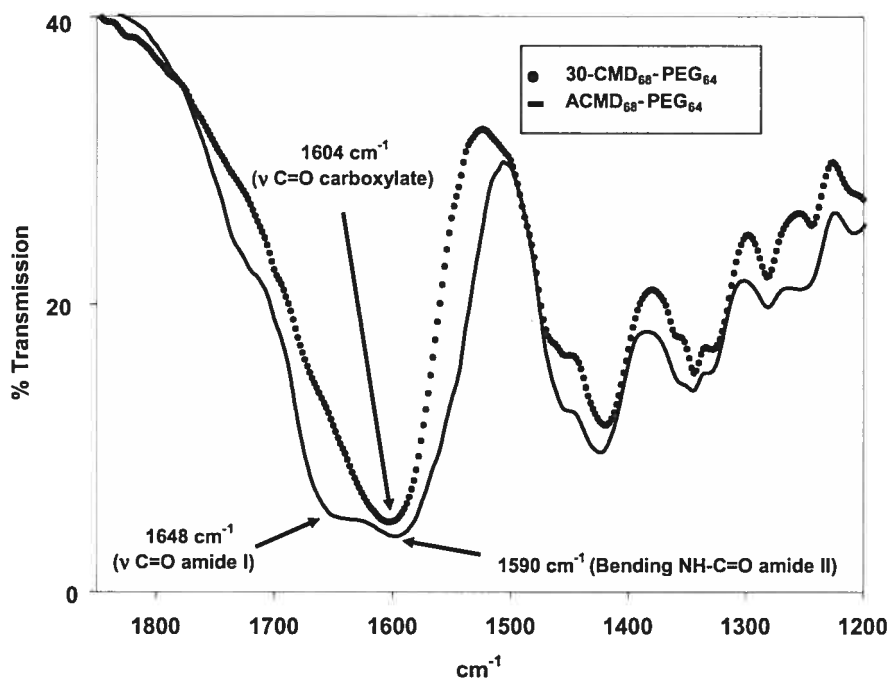


Figure 2.8. FTIR spectra of 30-CMD₆₈-PEG₆₄ and 30-ACMD₆₈-PEG₆₄.

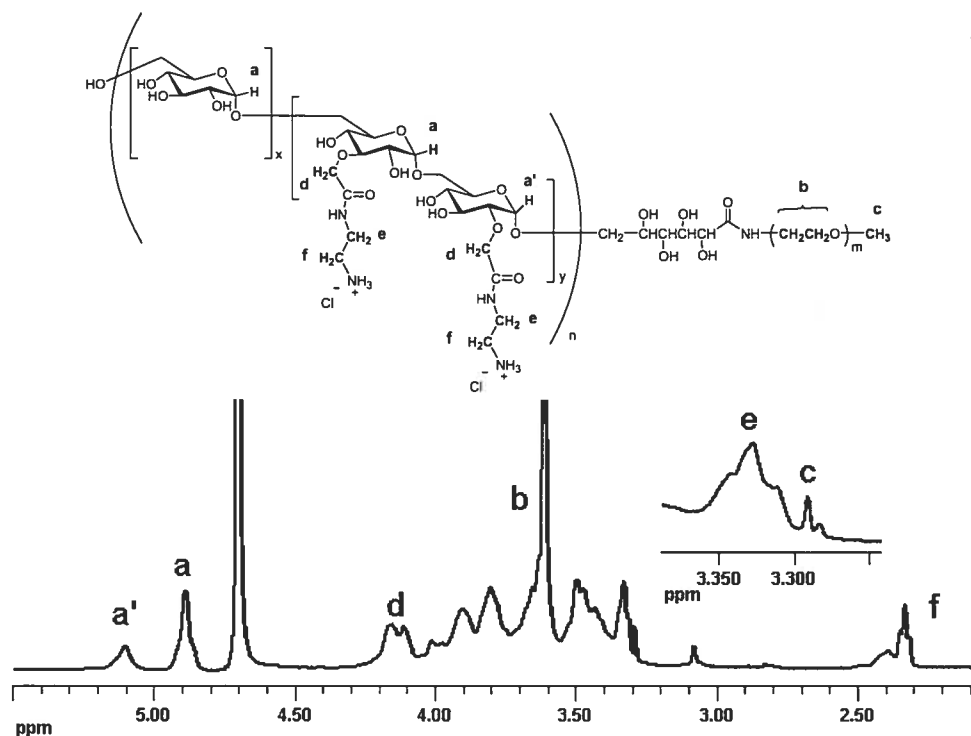


Figure 2.9. ^1H NMR spectra (D_2O solution, room temperature) of 30-CMD₆₈-PEG₆₄ and 30-ACMD₆₈-PEG₆₄.

2.4.3. Investigation by light scattering of the pH-dependent properties of aqueous CMD-PEG solutions.

To gain insight on the association of CMD-PEG in water and to demonstrate the impact of the CMD block pH-sensitivity on micellization, we carried out a set of light scattering experiments with aqueous solutions of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ (pK_a of CMD block around 3.8). This specific copolymer was chosen, since it has an intermediate level of carboxymethylation (60 mol %) and has a long PEG block, two factors likely to promote H-bond formation not only between PEG and COOH but also between the CMD hydroxyl groups and PEG. Dynamic light scattering, which detects the presence of nanoparticles and readily provides their hydrodynamic radii (R_h), is the most direct experimental approach to assess the formation of micelles and their disruption in response to a change in pH.

Solutions investigated were prepared in aqueous 0.1 M NaCl, to minimize pH-induced changes in the solutions ionic strength, a factor known to affect the interpolymeric complexation between dextran and poly(carboxylic acids) [44]. Dynamic light scattering (DLS) confirmed the presence of nanoparticles in solutions of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ of pH 2 containing 0.1 M NaCl, with a R_h of 100 nm and a unimodal size distribution. Increasing the pH of the solution induced a decrease in R_h , which reached a value of ~ 50 nm in solutions of pH > 5 . The increase in solution pH also changes the size distributions, which are monomodal for solutions of pH < 5 ($\mu^2/\Gamma^2 < 0.1$), but above this pH value, the size distributions are bimodal presenting a contribution from small objects ($R_h \sim 3 - 5$ nm) to the overall correlation function. This contribution increases with increasing solution pH, as depicted in Figure 2.10, where we present size distribution profiles recorded for 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ solutions of pH 3, 6 and 12, together with the corresponding autocorrelation functions measured at a scattering angle of 90° (Figure 2.10, inset).

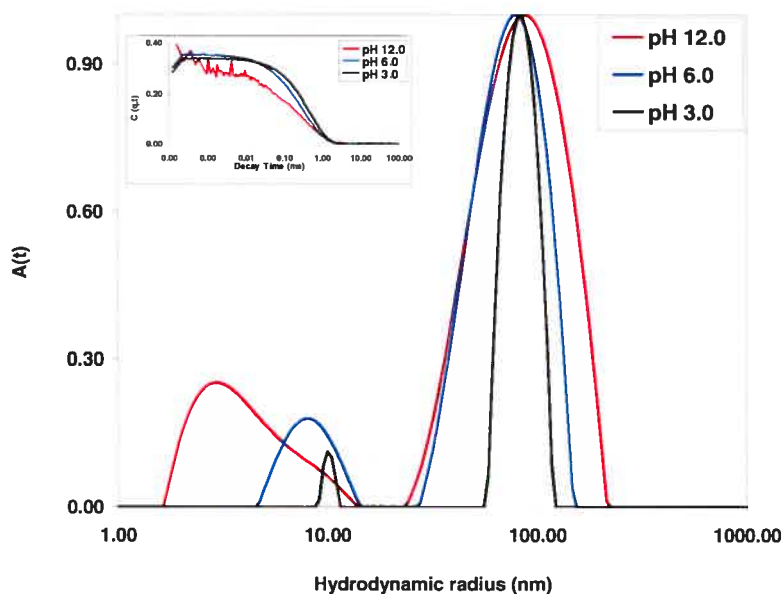


Figure 2.10. Size distributions from aqueous solutions of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ of pH 3.0, 6.0 and 12.0 (0.1 M NaCl, 20 °C); inset: corresponding autocorrelation functions measured at a scattering angle of 90° .

The radii of gyration (R_G) of the micelles, obtained from static light scattering (SLS) measurements, decrease with increasing pH, ranging from ~ 200 nm in acidic solutions to ~ 120 nm in alkaline solutions (Table 2.4). From the apparent molecular weight of the polymers recorded by SLS, one can estimate the aggregation number, N_{agg} , of the micelles, expressed here in terms of number of polymer chains per micelles (Table 2.4). We note that in acidic and neutral solutions, the diblock copolymer 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ forms micelles consisting of 30 to 40 chains, while in basic conditions, when the charged segment of the chain is fully ionized paucichain assembly form, containing on average 3 chains. The formation of such loose aggregates in alkaline solutions of DHBC containing a PMMA block has been reported previously [45] and attributed to the presence of a small number of un-ionized repeat units.

Table 2.4: Characteristic properties of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ micelles in aqueous 0.1 M NaCl solutions of various pH values

pH	M_w (g mol ⁻¹) ^a ($\pm 10,000$)	N(aggregation) ^b	R_g (nm) ^c (± 6)	R_h (nm) ^d	R_g/R_h
4.0	640,000	39	125	87 \pm 4	1.43
5.0	830,000	50	162	64 \pm 4	2.55
6.0	700,000	42	144	64 \pm 4	2.24
7.5	500,000	30	146	60 \pm 2	2.42
11.0	63,000	3	144	95 \pm 12	1.51
12.0	59,000	3	120	70 \pm 20	1.75

^a: from SLS measurements, applying the Berry plot;

^b: approximate number of polymer chains per micelles estimated from the SLS derived M_w and the molecular weight of the copolymer obtained by GPC (Table 2.3);

^c: radius of gyration of the micelles from SLS measurement;

^d: hydrodynamic radius, average of six measurements.

In the case of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ such assemblies may be attributed for instance to the occurrence of intra and interchain H-bonds between the CMD glucopyranosyl hydroxyl protons and the ether oxygen of the PEG fragments, as depicted in Figure 2.11 (right panel). The loose aggregates formed at pH > 9 may indicate that the copolymer exists primarily as isolated chains in alkaline solutions, because the electrostatic repulsion between chains. In solutions of intermediate pH, the assembly of 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ may be driven by the formation of interchain H-bonds between the PEG ether oxygen and both un-ionized carboxylic acid functions and glucopyranosyl hydroxyl groups, leading to loose associates (Figure 2.11 center panel). In acidic solution, protonation of the CMD carboxylic acids groups provides additional sites for H-bonding, leading to the formation of tighter objects held together via intra and interchain interactions (Figure 2.11, left panel). This interpretation based solely on LS data needs to be confirmed by direct visualization techniques, such as AFM and SEM and by analyses of CMD-PEG samples of different sizes and degrees of carboxymethylation. This study is in progress in our laboratory.

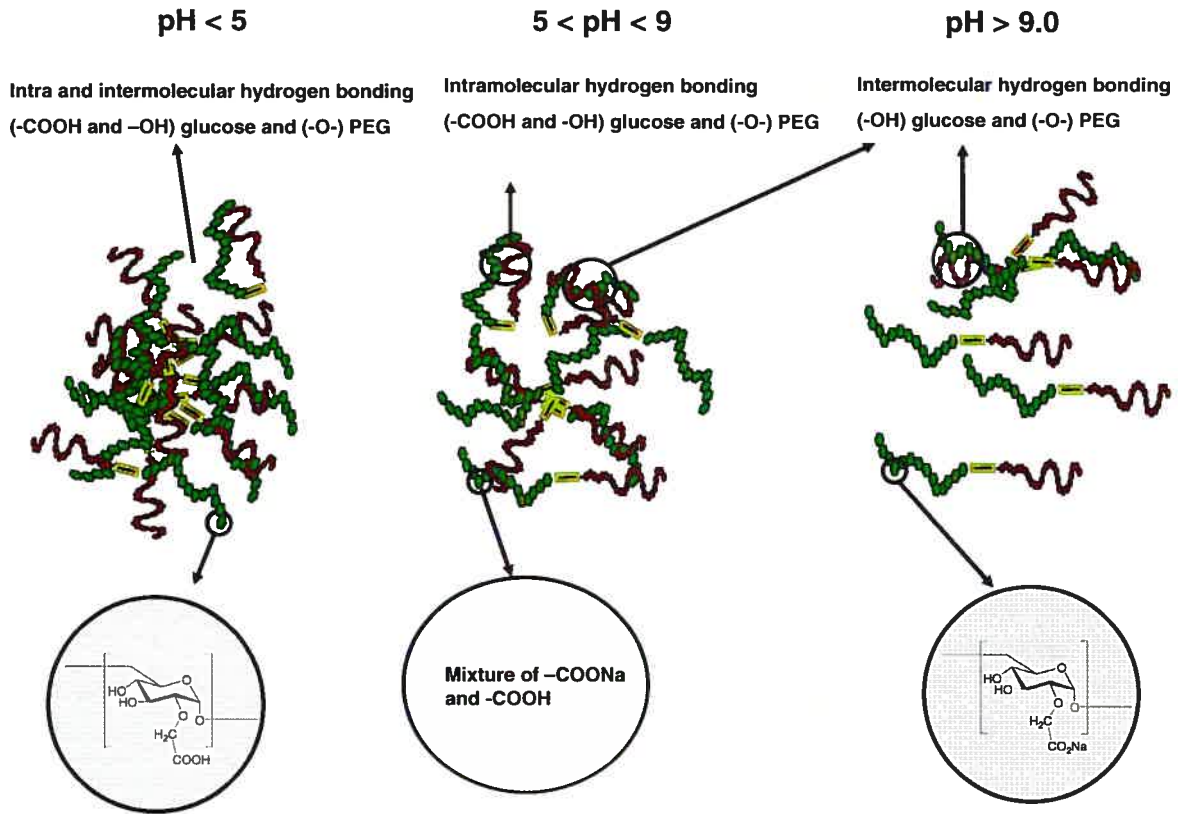


Figure 2.11. Pictorial representation of the assemblies formed in aqueous solutions of CMD-PEG block copolymers of various pH and illustration of the intra- and interchain H-bond interactions likely to occur in acidic, neutral and alkaline polymer solutions.

2.5 Conclusion

A synthetic strategy towards a new family of polysaccharide-based DHBCs has been presented starting from readily available biocompatible homopolymers. The reactions involved are simple, occur in moderate to high yields and do not require elaborate purification of work-up procedures. Neutral, cationic and anionic DHBC were obtained and more specifically pairs of oppositely-charged DHBC of identical neutral block length/charged block length ratio and charge level. A preliminary light scattering study of a CMD-PEG sample in water confirmed that CMD-PEG solutions exhibit a rich pH-responsiveness driven by a combination of H-bond interactions between the polymer functionalities. The diblock copolymers obtained can be “mix-and-matched” to create, via electrostatic and/or hydrogen bonding interactions, polymeric micelles responsive to changes in pH and/or in ionic strength.

2.6 Acknowledgments

The work was supported by a grant from the Natural Science and Engineering Council of Canada (Discovery grant). GMS thanks the Ministry of Higher Education, Egypt for granting him a scholarship.

2.7 References

- [1] Cölfren H. *Macromol. Rapid Commun.* 2001;22:219-252.
- [2] Lee AS, Gast AP, Butun V, Armes SP. *Macromolecules* 1999;32:4302-4310.
- [3] Liu SY, Armes SP. *Langmuir* 2003 ;19:4432-4438.
- [4] Andre X, Zhang M, Muller AHE, *Macromol. Rapid Commun.* 2005 ;26 :558-563.
- [5] Harada A, Kataoka K. *Macromolecules* 1998;31:288-294.
- [6] Nishiyama N, Kataoka K. *Adv. Polym. Sci.* 2006;193 :67-101.
- [7] Harada A, Kataoka K. *Macromolecules* 1995;28:5294-5299.
- [8] Kabanov AV, Bronich TK, Yu K, Eisenberg A. *Macromolecules* 1996;29:6797-6802.
- [9] Yang Y, Kataoka K, Winnik FM. *Macromolecules* 2005;38:2043-2046.
- [10] Kenne L, Lindberg B. *Bacterial Polysaccharides. In The Polysaccharides.* New York: Academic Press; 1983. p. 346.
- [11] Ionan CE, Aberle T, Burchard W. *Macromolecules* 2000;33:5730-5739.
- [12] Clagett CP, Anderson FAJ, Geerts W, Helt JA, Knudson M, Lieberman JR, Merli GJ, Wheeler HB. *Chest* 1998;114:531S-560S.
- [13] DeBelder AN. *Dextran* 2nd ed. Uppsala, Sweden: Pharmacia Print; 1990.
- [14] Francis MF, Cristea M, Winnik FM. *Pure App. Chem.* 2004;76:1321-1335.
- [15] Douglas SJ, Illum LJ. *Colloid Interface Sci.* 1985;103:154-164.
- [16] Berthoom I, Lesieur S, Labarre D, Besnard M, Vauthier C. *Macromolecules* 2006;39:3559-3567.
- [17] Tang M, Dou H, Sun K. *Polymer* 2006;47:728-734.
- [18] Francis MF, Lavoie L, Winnik FM, Leroux JF. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003;56:337-346.
- [19] Francis MF, Cristea M, Yang Y, Winnik FM. *Pharm. Res.*2005 ;22:209-219.
- [20] Thermes F, Grove J, Rozier A, Plazonnet B, Constancis A, Bunel C, Vairon JP. *Pharm. Res.* 1992;9:1563-1567
- [21] Zhang R, Tang M, Bowyer A, Eisenthal R, Hubble J. *Biomaterials* 2005;26:4677-4683.
- [22] Yalpani M, Brooks DE. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1985;23:1395-1405.
- [23] Hashimoto K, Imanishi SI, Okada M, Sumimoto H. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1991;29:1271-1279.
- [24] Maruyama A, Katoh M, Ishihara T, Akaike T. *Bioconjugate Chem.* 1997;8:3-6.
- [25] Bosker WTE, Agoston K, Cohen Stuart MA, Norde W, Timmermans JW, Slaghek TM. *Macromolecules* 2003;36:1982-1987.
- [26] US Patent 5,490,978, 1996.
- [27] Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1343-1355.
- [28] Gohy JF, Varshney SK, Jérôme R. *Macromolecules* 2001;34:3361-3366.
- [29] Holappa S, Karesoja M, Shan J, Tenhu H. *Macromolecules* 2002;35:4733-4738.
- [30] Khoussakoun E, Gohy JF, Jérôme R. *Polymer* 2004;45:8303-8310.
- [31] Holappa S, Kantonen L, Winnik FM, Tenhu H. *Macromolecules* 2004 ;37:7008-7018.

- [32] Nurkeeva ZS, Mun GA, Khutoryanskiy VV. *Macromol. Biosci.* 2003;3:283-295.
- [33] Dou H, Tang M, Sun K. *Macromol. Chem. Phys.* 2005;206:2177-2181.
- [34] Zhang T, Marchant RE. *Macromolecules* 1994;27:7302-7308.
- [35] Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A, Gibson D. *Bioconjugate Chem.* 2003;14:563-574.
- [36] Yudovin-Farber I, Yanay C, Azzam T, Linial M, Domb AJ. *Bioconjugate Chem.* 2005;16:1196-1203.
- [37] Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz JJ. *Makromol. Chem.* 1998;254:61-65.
- [38] Tiller JC, Bonner G, Pan L-C, Klibanov AM. *Biotechnol. Bioeng.* 2001;73:246-252.
- [39] Mauzac M, Jozefonvicz J. *Biomaterials* 1984;5:301-304.
- [40] Bouttemy M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1960:1750.
- [41] Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz J. *Carbohydrate Research* 2001;332:75-83.
- [42] Rebizak R, Schaefer M, Dellacherie E. *Bioconjugate Chem.* 1997;8:605-610.
- [43] Ho FFL, Kloslewicz DW. *Anal. Chem.* 1980;52:913-916.
- [44] Khutoryanskiy VV, Mun GA, Nurkeeva ZS, Dubolazov AV. *Polym. Int.* 2004;53:1382-1387.
- [45] Mountrichas G, Pispas, S. *Macromolecules* 2006;39:4767-4774.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

CHAPITRE III

3.1 Amination réductive

3.1.1. Introduction

Dans le cadre de ce projet, des tentatives de couplage par amination réductive entre le ω -methoxy-poly(éthylèneglycol)-amine (PEG-NH₂) et le dextran ont aussi été effectuées. L'amination réductive est une réaction d'addition nucléophile où l'aldéhyde terminal du dextran fournit le groupement carbonyle à l'agent nucléophile, autrement dit, à l'amine terminale du PEG-NH₂. Deux réactions consécutives sont impliquées dans la réaction d'amination réductive. Premièrement, le groupement amine terminal du PEG-NH₂ réagit avec l'aldéhyde terminal du dextran pour former une base de Schiff telle qu'illustrée à la figure 3.1. Toutefois, cette base de Schiff se retrouve en équilibre en milieu aqueux, ce qui entraîne un retour vers les réactifs de départ à pH acide.

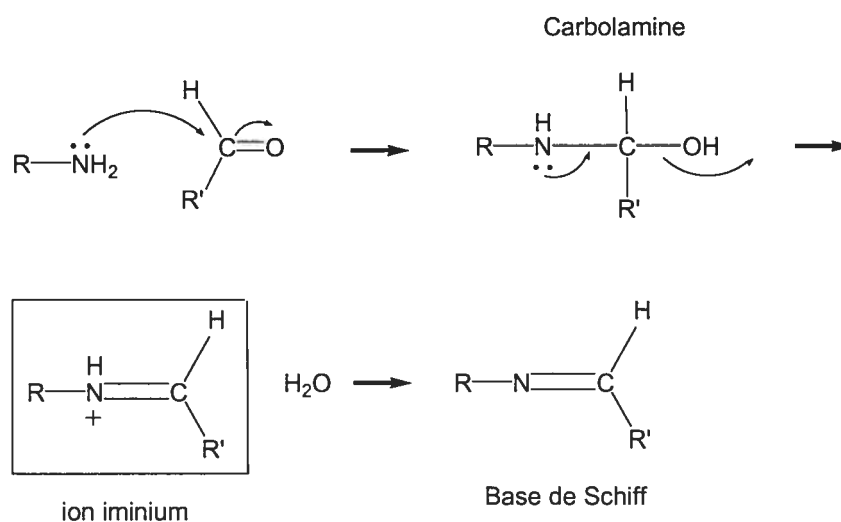


Figure 3.1. Formation de la base de Schiff

Deuxièmement, Le cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3) est alors ajouté au milieu réactionnel pour transformer la base de Schiff en une amine secondaire stable. Tel que déjà mentionné au chapitre I, dans des conditions d'équilibre, la concentration d'aldéhyde dans le glucose n'est que d'environ 0.02% en masse. La situation pour l'aldéhyde terminal du dextran est probablement la même. Par conséquent, seulement quelques traces de base de Schiff seraient formées en absence de cyanoborohydrure de sodium. Au moment où une forme acétal du glucose terminal s'ouvre, une fonction aldéhyde s'expose, réagit avec l'amine et la base de Schiff est immédiatement transformée dans le processus de réduction du cyanoborohydrure de sodium, donnant ainsi un produit final stable. Dans le cadre de ce projet, trois conditions expérimentales, résumées au tableau 3.1, ont été employées pour faire le couplage, par amination réductive, entre le dextran et PEG-NH₂.

3.1.2. Partie expérimentale

Les réactions de couplage par amination réductive ont été faites, de façon générale, en suivant les conditions suivantes : 132.5 mg (2.1 mmol) de l'agent réducteur cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3) ont été introduits au mélange de PEG-NH₂ et de dextran dissous dans le solvant approprié. Les conditions exactes sont résumées dans le tableau 3.1. Le mélange réactionnel est gardé sous agitation pendant 5 jours à 60°C et du NaCNBH_3 (20 mg) est ajouté à chaque jour. À la fin de la réaction, le produit est purifié par dialyse pendant 2 jours (MWCO 1,000) dans l'eau et éventuellement concentré sous vide, puis traité avec du méthanol (50 mL) pour vérifier la présence, s'il y a lieu, du PEG-NH₂ n'ayant pas réagit. Le mélange est centrifugé pendant 5 min. à 7500 rpm. Le surnageant est enlevé et le solide est retraité avec une autre portion de méthanol (25 mL) puis centrifugé à nouveau. Ce processus est répété une autre fois afin de s'assurer que la totalité du PEG-NH₂ n'ayant pas réagit se retrouve dans le surnageant. Des spectres RMN ¹H de tous les produits récupérés (produit dans le surnageant et produit dans la phase solide après rinçage au méthanol et centrifugation) ont été faits et détaillés dans la section *Résultats et discussion* de cette section.

Tableau 3.1 : Conditions réactionnelles des couplages par amination réductive

Réaction	polysaccharide	PEG-NH ₂	Conditions réactionnelles
Amination ¹ réductive dans un tampon borate	Dextran (M _w : 10 K)	PEG-NH₂ (M _w : 2 K) (78% NH ₂)	-100 mg PEG-NH₂ (0.05 mmol) -5.0 g Dextran (0.50 mmol) -132.5 mg NaCNBH ₃ (2.1 mmol) -(20.0 mg de NaCNBH ₃ ajouté chaque jour) Tampon : 50 mL borate de sodium 0.1 M (pH 8.5, 0.4M NaCl) 60°C, 5 jours
Amination ² réductive dans un tampon phosphate	Dextran (M _w : 10 K)	PEG-NH₂ (M _w : 2 K) (78% NH ₂)	-100 mg PEG-NH₂ (0.05 mmol) -5.0 g Dextran (0.50 mmol) -132.5 mg NaCNBH ₃ (2.1 mmol) -(20.0 mg de NaCNBH ₃ ajouté chaque jour) Tampon : 50 mL tampon phosphate (pH 8.0, 0.05M) 60°C, 5 jours
Amination ³ réductive dans le DMF/H₂O	Dextran (M _w : 6 K)	PEG-NH₂ (M _w : 5 K) (95% NH ₂)	-200 mg PEG-NH₂ (0.04 mmol) -4.8 g Dextran (0.8 mmol) -132.5 mg NaCNBH ₃ (2.1 mmol) -(20.0 mg de NaCNBH ₃ ajouté chaque jour) DMF : 245 mL H₂O : 35 mL 60°C, 5 jours

1. **Tampon borate** (Yang, Y.; Kataoka, K.; Winnik, F. M., *Macromolecules* **2005**, 38,2043-2046)
2. **Tampon phosphate** (Zhao, Q.; Gottschalk, I.; Carlsson, J.; Arvidsson, L.; Oscarsson, S.; Medin, A.; Ersson, B.; Janson, J., *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 927-934)
3. **DMF/H₂O** (Bosker, W. T. E.; Agoston, K.; Cohen Stuart, M. A.; Norde, W.; Timmermans, J. W.; Slaghek, T. M., *Macromolecules* **2003**, 36, 1982- 1987)

3.1.3. Résultats et discussion

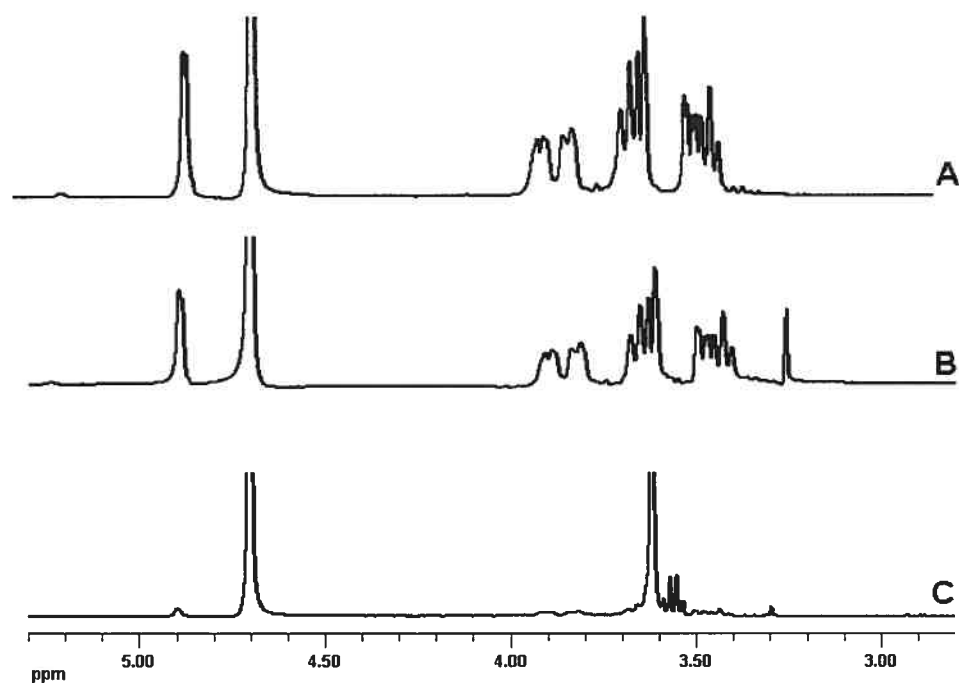


Figure 3.2 : Spectres RMN ^1H (D_2O , température ambiante) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans un tampon de borate. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.

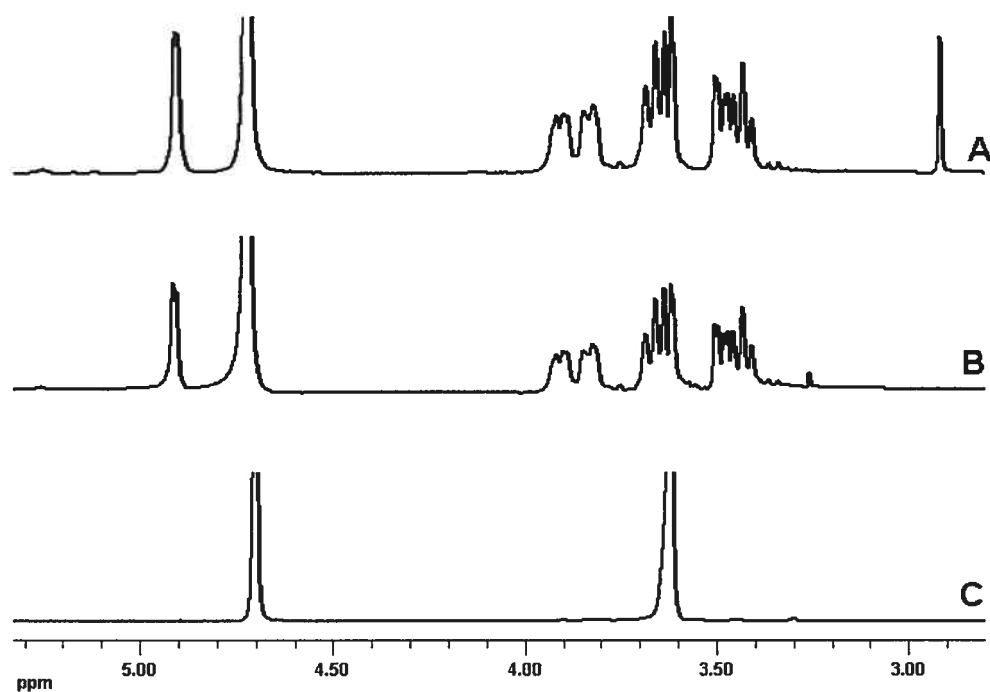


Figure 3.3 : Spectres RMN ^1H (D_2O , température de la pièce) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans un tampon de phosphate. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.

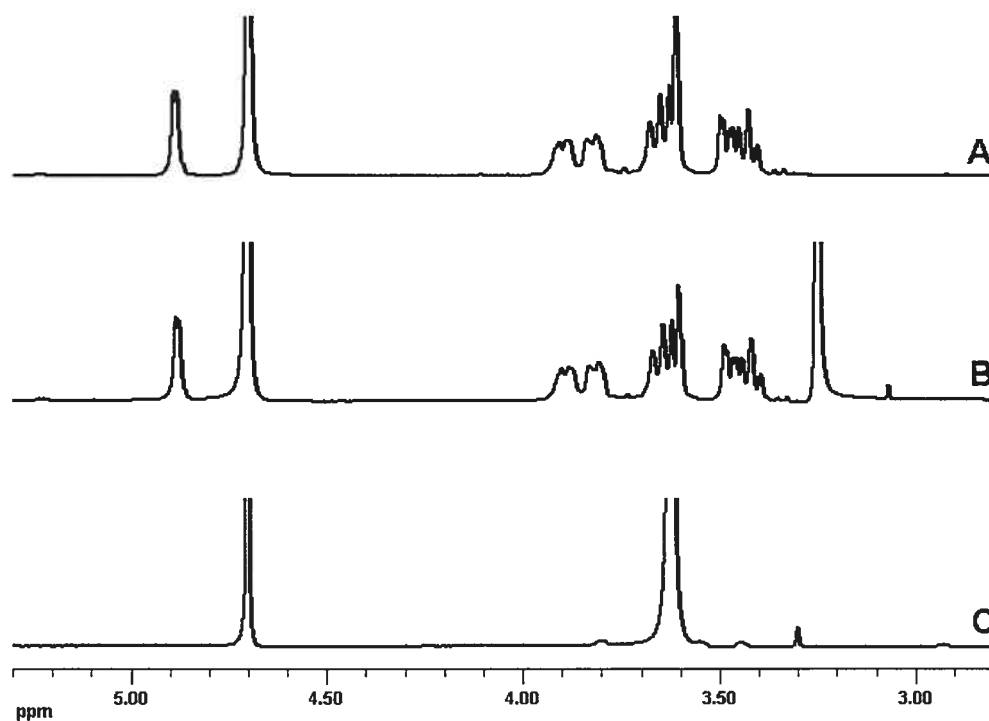


Figure 3.4 : Spectres RMN ^1H (D_2O , température de la pièce) des produits impliqués dans la réaction de couplage effectuée dans DMF/eau. (A) mélange réactionnel de départ, (B) solide après rinçage au méthanol et centrifugation. (C) surnageant après rinçage au méthanol et centrifugation.

Les figures 3.2 à 3.4 montrent les spectres RMN ^1H des produits avant (A) et après rinçage au méthanol (B, C) pour les trois conditions expérimentales d'amination réductive utilisées. Dans les trois cas, les spectres en (B) ne présentent aucune indication de la présence du PEG dans le produit désiré et ressemblent au spectre typique du dextran dans D_2O (Voir annexe I). Quant aux trois spectres en (C), ils confirment la présence du PEG- NH_2 (3.60 ppm) n'ayant pas réagit (Voir Annexe II).

Dans les trois cas, le PEG-NH₂ est utilisé comme limitant dans les réactions effectuées et sa présence dans le surnageant (phase de méthanol) vient confirmer l'inefficacité ou le faible rendement des couplages via l'amination réductive. Une explication à ces résultats viendrait du fait que la forme aldéhyde, dans les polysaccharides, est très faible en solution (0.02%) et que 5 jours de réaction sont insuffisants pour avoir une conversion complète. Une plus longue durée réactionnelle et l'emploi du PEG-NH₂ en excès plutôt que le dextran seraient les alternatives proposées, car on augmenterait ainsi les chances de couplage et une récupération efficace du produit dans la phase solide, après rinçages au méthanol ou à l'éthanol chaud. Suite à ces résultats négatifs, d'autres méthodologies de couplage ont été envisagées dont celle impliquant le dextran fonctionnalisé en lactone de façon spécifique sur l'unité terminale et le PEG-NH₂. La lactone terminale du dextran a comme avantage que cette dernière ne se retrouve pas en équilibre en milieu organique et qu'aucune activation au préalable n'est nécessaire. Cette stratégie a été mise de l'avant dans le cadre de ce projet et a été décrite au chapitre II. D'autres résultats complémentaires à ceux donnés au chapitre II sont présentés dans les pages suivantes.

3.2 Aminolyse des lactones

3.2.1. Introduction

L'aminolyse de lactone est une réaction par ouverture de cycle entre la lactone et un nucléophile tel qu'une amine. Tel que déjà mentionné au chapitre I (Oxydation de l'aldéhyde terminal) et illustré au chapitre II (*Results and discussion, figure 2.3*), la réaction de lactonisation de l'acide aldonique du dextran est réversible en milieu aqueux. La réaction de couplage doit donc s'effectuer dans des conditions anhydrides en vue d'augmenter le rendement de couplage entre le ω -méthoxy-poly(éthylène glycol)-amine (PEG-NH₂) et le dextran-lactone obtenu suite à l'oxydation spécifique du groupement aldéhyde terminal. L'avantage de cette stratégie est que le copolymère dibloc est obtenu en peu d'étapes et contrairement à l'amination réductive, aucun contrôle de pH n'est nécessaire, puisque le couplage se fait en milieu organique (DMSO). Les conditions de couplages des différents copolymères diblocs ont été décrites au chapitre II (Experimental section) et des résultats des autres copolymères diblocs seront mentionnés dans les prochaines pages.

3.2.2. Préparation du dextran lactone

L'oxydation spécifique de l'aldéhyde terminal du dextran a été faite selon la procédure décrite dans la littérature¹. Une suspension d'iode (0.5 g, 2.0 mmol) dans l'eau (20 mL), mélangée avec une solution de KOH (0.45 g, 8.0 mmol), est ajoutée lentement à une solution de dextran (5.0 g, M_w 6 000 g/mol) dans l'eau (16 mL). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante. Le produit est purifié par dialyse pendant 2 jours (MWCO 1,000) dans l'eau. Par la suite, la solution est traitée avec l'Amberlite IR-120 (1.0 g) pendant 3 h. La résine est enlevée par filtration et le filtrat est concentré sous vide. Le polymère (Dex-Lac) est isolé par lyophilisation (4.2 g, 84% rendement molaire). Données spectroscopiques : RMN ^1H (D_2O , ppm): 3.20-4.00 (protons glucosidiques de C-2 à C-6), 4.87 (protons anomériques). IR (KBr): 1010 cm^{-1} (élongation ν C-O, acétal), 1740 cm^{-1} (élongation ν C=O, δ -lactone), 2900 cm^{-1} (élongation ν C-H), 3370 cm^{-1} (élongation ν O-H) et la bande d'association avec l'eau (1642 cm^{-1}). La même procédure a été effectuée pour préparer le Dex-Lac (10 000 g/mol) à partir du dextran de $M_w = 10\ 000\text{ g/mol}$. Les réactions de couplages entre le Dex-lac et le PEG-NH₂, ainsi que la réaction de carboxyméthylation ont été faites selon la procédure décrite au chapitre II.

¹ Zhang T, Marchant RE. *Macromolecules* 1994;27:7302.

3.2.3. Résultats des couplages et des carboxyméthylations

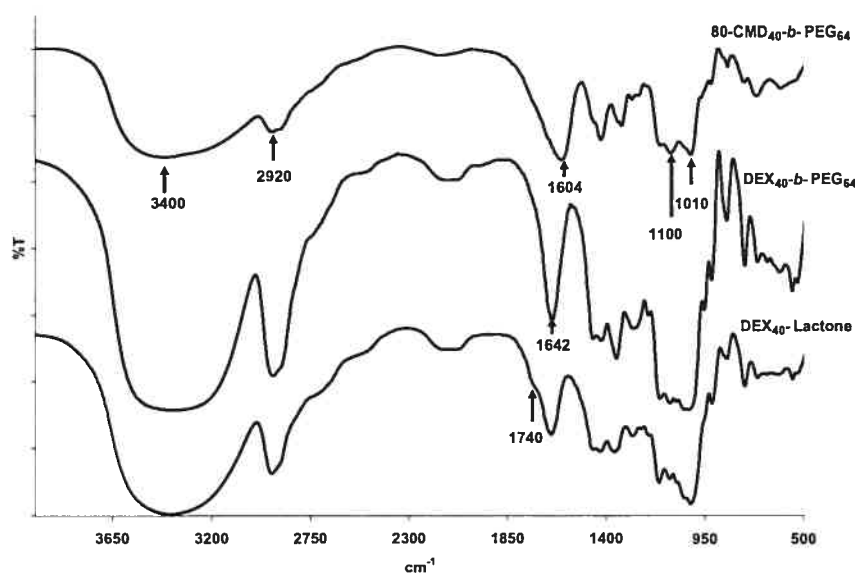


Figure 3.5: Spectres FTIR (KBr, 256 scans, 8cm^{-1}) du DEX_{40} , $\text{DEX}_{40}\text{-PEG}_{64}$ et $80\text{-CMD}_{40}\text{-PEG}_{64}$.

La figure 3.5 montre les spectres FTIR des copolymères diblocs $\text{DEX}_{40}\text{-PEG}_{60}$ et $80\text{-CMD}_{40}\text{-PEG}_{60}$ ainsi que celui du $\text{DEX}_{40}\text{-Lactone}$. Le spectre FTIR du $\text{DEX}_{40}\text{-lactone}$ présente non seulement les bandes caractéristiques du dextran² à 1010 cm^{-1} (élongation ν C-O, acétal), 1642 cm^{-1} (ponts hydrogène avec l'eau), 2900 cm^{-1} (élongation ν C-H) et 3370 cm^{-1} (élongation ν O-H), mais aussi la bande caractéristique du groupement lactone à 1740 cm^{-1} (élongation ν C=O, δ -lactone).

² Huynh, R.; Chaubet, F.; Jozefonvicz, J., *Carbohydrate Research* **2001**, 332,75-83

Ces mêmes bandes se retrouvent dans le copolymère DEX₄₀-PEG₆₄ à l'exception de la bande du groupement lactone à 1740 cm⁻¹, confirmant la réussite du couplage. La bande vers 1100 cm⁻¹ montre aussi la présence du PEG dans le copolymère dibloc (voir annexe III). Pour le copolymère 80-CMD₄₀-PEG₆₄, une nouvelle bande apparaît à 1604 cm⁻¹ correspondant à la vibration d'élongation du groupement carboxylate.

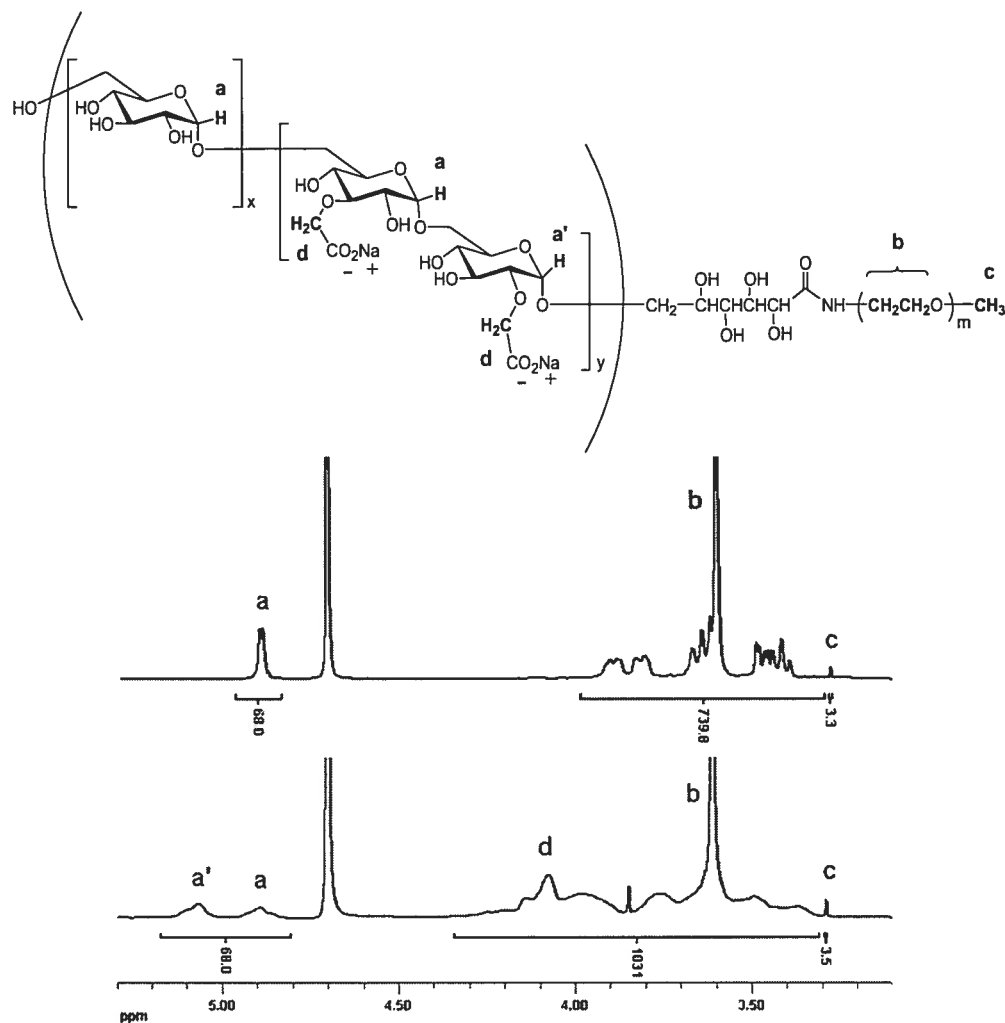


Figure 3.6: Spectres RMN ¹H du Dex₆₈-PEG₆₄ et 60-CMD₆₈-PEG₆₄ (D₂O).

La réussite du couplage a été confirmée, tout comme pour le copolymère dibloc DEX₄₀-PEG₆₄ (voir chapitre II), par l'analyse du spectre RMN ¹H du copolymère dibloc DEX₆₈-PEG₆₄ (Figure 3.6, haut) sur lequel les deux signaux caractéristiques du méthoxy poly(éthylène glycol) apparaissent aussi : un fort signal à δ 3.60 ppm pour les protons méthylènes et un signal plus faible à δ 3.28 ppm pour les protons du groupement terminal méthoxy. Les signaux caractéristiques du dextran s'y trouvent également. Les spectres RMN ¹H de tous les copolymères diblocs (voir Annexes IV et V) ont été comparés aux spectres RMN ¹H respectifs des polymères de départ (PEG-NH₂ et dextran) mélangés physiquement dans un ratio molaire de 1 (voir Annexes VI, VII, VIII et IX). Le ratio des aires des signaux dus aux protons anomériques (δ 4.89 ppm) et du signal dû aux protons méthoxy (δ 3.28 ppm) a été pris comme référence pour indiquer le succès des toutes les réactions de couplage. Dans tous les cas, les ratios DEX-Lactone/PEG-NH₂ des mélanges physiques et ceux des copolymères diblocs se rapprochent à \pm 2 %. La figure 3.6 (bas) montre aussi le spectre RMN ¹H du polyélectrolyte anionique CMD-PEG et pour les autres copolymères diblocs (voir Annexes V et VI, figures du bas). Par comparaison du spectre DEX-PEG correspondant, on remarque la présence d'un signal dans la région caractéristique des protons anomériques : en plus du doublet à δ 4.89 ppm attribué à la résonance des

protons anomériques sur les unités de glucose non substituées en C₂, on reconnaît un autre doublet à δ 5.07 ppm attribué à la résonance des protons anomériques sur les unités de glucoses porteurs d'un groupement carboxyméthyl en C₂. Les spectres RMN ¹H des copolymères diblocs CMD-PEG montrent aussi la série de signaux entre δ 4.08 and 4.15 ppm. Ces signaux sont attribués à la résonance des protons méthylènes en α du groupement carboxylate. Par comparaison à la figure 2.4 (*Results and discussion*, Chapitre II), on remarque dans la figure 3.7 un léger déplacement vers la gauche des graphes du DEX₆₈-Lactone par rapport au DEX₄₀-Lactone dû à la masse molaire inférieure de ce dernier. Il en va de même pour le copolymère dibloc DEX₆₈-PEG₆₄ comparé au DEX₄₀-PEG₆₄ et pour les dérivés subséquents.

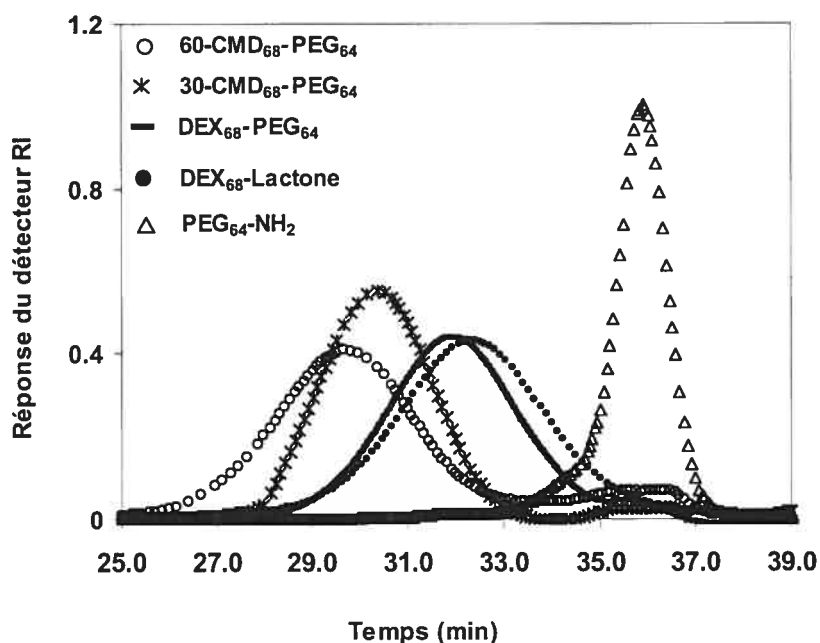


Figure 3.7: Graphes GPC enregistrés par un détecteur à indice de réfraction.

La figure 3.7 donne les profils d'élution du PEG₆₄-NH₂, du DEX₄₀-lactone et du copolymère dibloc DEX₆₈-PEG₆₄. Celui-ci présente un temps d'élution légèrement plus court que celui du DEX₆₈-lactone confirmant ainsi une masse molaire supérieure pour le copolymère dibloc. Il en va de même pour les autres dérivés du DEX₆₈-PEG₆₄ tels que le 30-CMD₆₈-PEG₆₄ et 60-CMD₆₈-PEG₆₄ qui éluent à des temps respectivement plus courts que leur précurseur étant donné l'ajout, à différent degré de substitution, des groupements carboxyméthyl sur ces polyanions. L'Annexe X montre aussi un autre exemple de graphes GPC pour un autre copolymère dibloc DEX-PEG synthétisé et sur lesquels on peut constater les mêmes tendances mentionnées précédemment et au chapitre II.

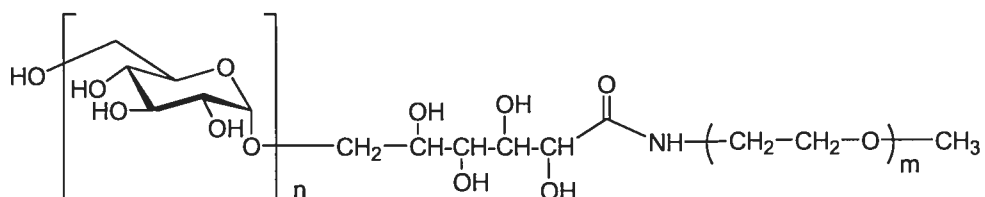
CONCLUSION

CHAPITRE IV

4.1 Conclusion

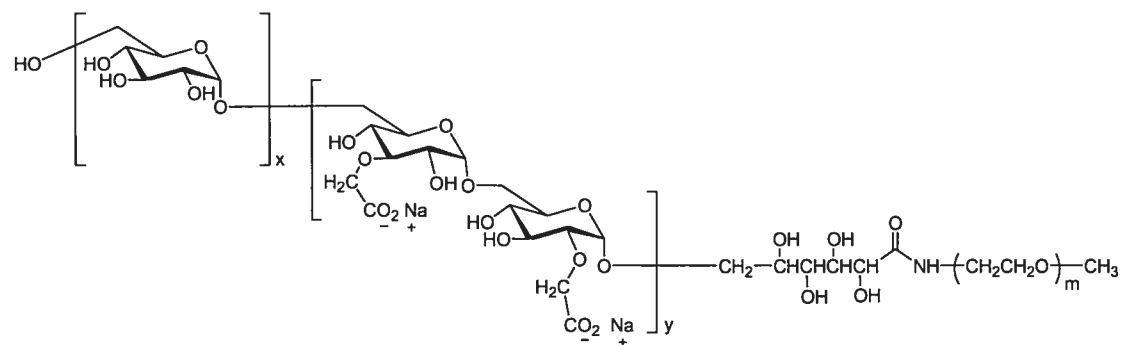
Dans le cadre de ce projet de maîtrise, des copolymères diblocs neutres et polyélectrolytes à base de dextran et de PEG ont été synthétisés et caractérisés: les polymères de départ sont tous deux biocompatibles, hydrosolubles et ont un éventail d'applications en biomédecine.

Copolymère dibloc neutre



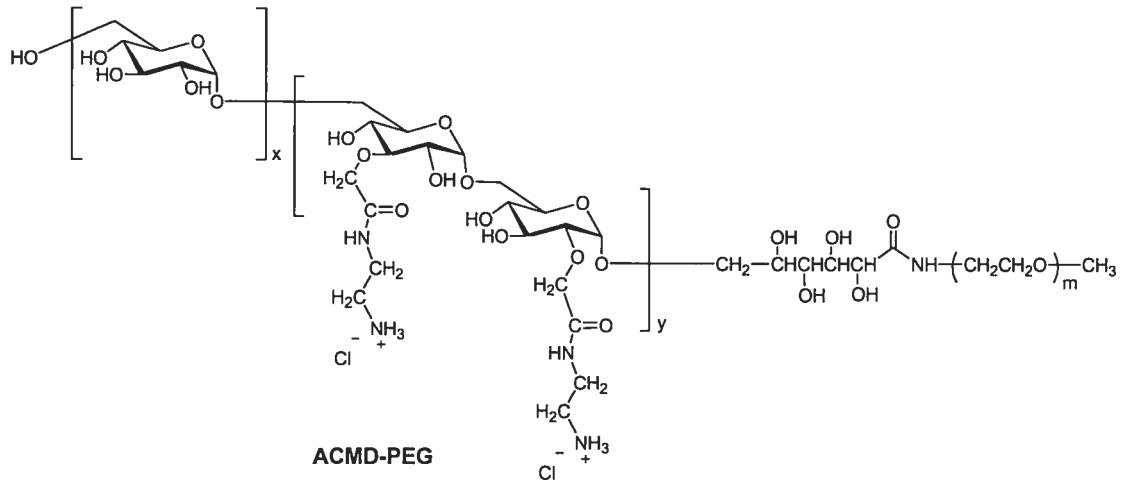
Dextran-PEG

Copolymère dibloc chargé négativement



CMD-PEG

Copolymère dibloc chargé positivement



Dans un premier temps, le copolymère neutre (Dextran-PEG) a été obtenu suite à une réaction d'aminolyse de lactone entre le PEG avec terminaison amine et le dextran avec terminaison lactone. La réaction de couplage est réalisée dans des conditions relativement douces (5 jours, 60°C) et dans un milieu organique (DMSO) qui a été sélectionné plutôt que le milieu aqueux vu la réversibilité de la réaction de la lactone terminale en milieu aqueux. La purification du produit a été une étape clé pour la réussite de ce projet. En exploitant la différence de solubilité du dextran et du PEG dans l'éthanol, il a été possible d'obtenir un produit de grande pureté si l'on se base sur les résultats des analyses de RMN ^1H et de GPC effectuées pour chaque copolymère dibloc synthétisé.

Une autre étape du projet consistait à introduire des groupements carboxylates en vue d'avoir un polyélectrolyte négatif capable d'interagir avec des particules ou molécules de charge opposée. Pour y parvenir, une carboxyméthylation a été effectuée sur le copolymère dibloc DEX-PEG selon la stratégie de Jozefonvicz. Les conditions réactionnelles optimisées pour obtenir le degré de substitution (DS) désiré. La caractérisation de tous les dérivés obtenus a été faite par RMN ^1H et GPC soulignant la réussite de la carboxyméthylation et la pureté de tous les copolymères diblocs CMD-PEG synthétisés.

La dernière étape du projet était d'introduire des groupements amines primaires le long de la partie carboxyméthyl-dextran (CMD) du CMD-PEG en utilisant la stratégie EDC/NHS. Cette stratégie consiste à activer, en milieu aqueux et à pH acide (4.7), les groupements carboxylates et, par une réaction $\text{S}_{\text{N}}2$, introduire les groupements amines primaires via le produit *t*-BOC-1,2-éthylènediamine, synthétisé au préalable. Le produit obtenu suite au clivage en milieu acide des groupements *t*-BOC, le copolymère méthoxy N-(2-aminoéthyle)carbamidométhyl-dextran-poly(éthylène glycol) (ACMD-PEG), a été caractérisé par RMN ^1H et FTIR.

La caractérisation par RMN ^1H et par test colorimétrique a pu démontrer une incorporation des groupements amines primaires à un taux de 26% et 28% respectivement par rapport au nombre d'unités glucose, ce qui représente, en tenant compte de l'erreur sur la valeur du DS, 100% de la quantité maximale des groupements carboxylates présents sur le copolymère dibloc 30-CMD₆₈-PEG₆₄ (DS 30% \pm 3%).

Une étude préliminaire en diffusion de la lumière a aussi été effectuée sur le copolymère dibloc 60-CMD₆₈-PEG₁₄₀ pour vérifier l'influence du pH sur les diverses auto-interactions de ces copolymères en solution. Néanmoins, d'autres études mettant en jeu des techniques de visualisation telles que l'AFM et la SEM devront être effectuées pour vérifier la forme obtenue par ces auto-assemblages.

4.2 Travaux futurs

En guise de travaux futurs, il serait intéressant d'étudier le comportement des polyélectrolytes ACMD-PEG en fonction du pH et de la force ionique. Cette étude démontrerait la capacité de ces matériaux à former des nanoparticules par auto-assemblage. À bas pH, on s'attend à qu'ils se comportent comme un simple polyélectrolyte.

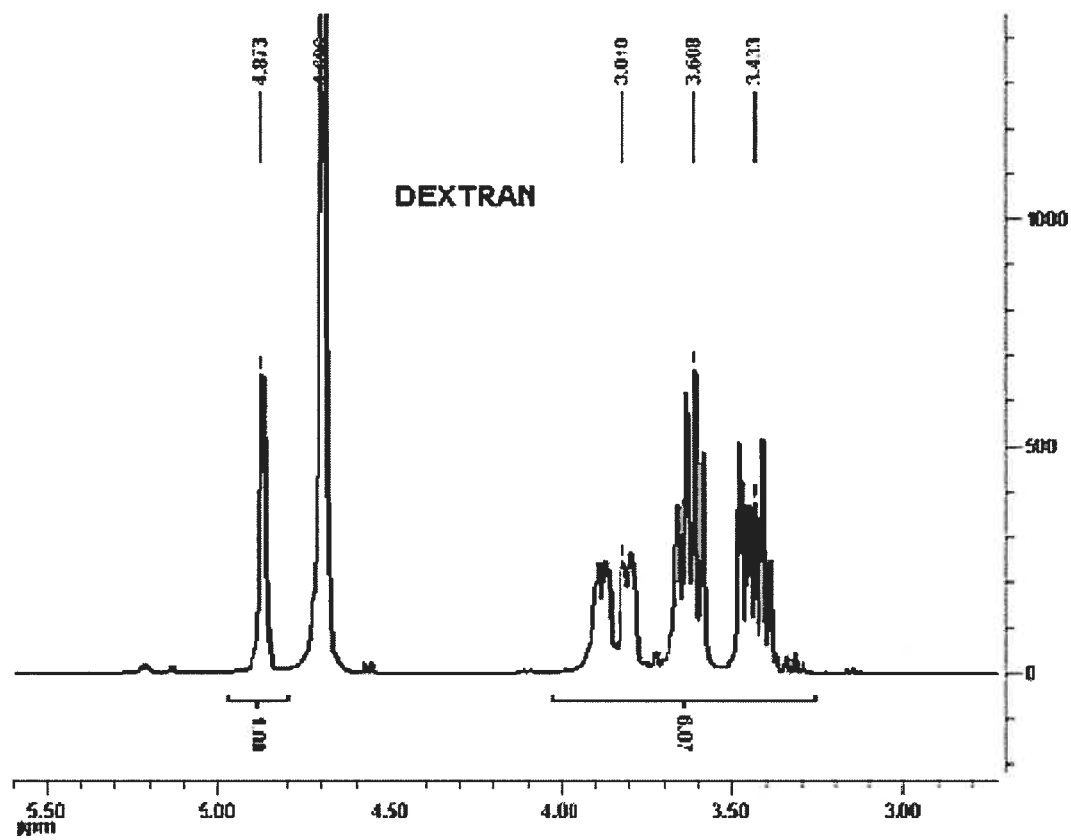
En d'autres mots, en présence d'un polyanion ou d'une molécule chargée négativement, il y aurait formation d'un complexe polyélectrolyte colloïdal stabilisé par le bloc PEG. À haut pH, on pourrait former des complexes par auto-assemblage où l'intégrité du cœur serait assurée entre autres par des ponts hydrogène intermoléculaires, soit entre le PEG et les unités amine de la partie ACMD, soit entre le PEG et les unités de glucose, ou soit entre les mêmes unités d'amine du bloc ACMD.

Une autre étude pertinente serait d'examiner le comportement des copolymères diblocs CMD-PEG et ACMD-PEG, d'une part, lorsque ceux-ci interagissent en solution aqueuse et, d'autre part, en présence d'une particule ou d'un médicament de charge opposée. Ces études pourraient être suivies par des nombreuses techniques, notamment l'UV-VIS, la RMN ^1H , la fluorescence, la diffusion de la lumière, la titration calorimétrique isotherme (ITC), la microscopie à transmission électronique (TEM) et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

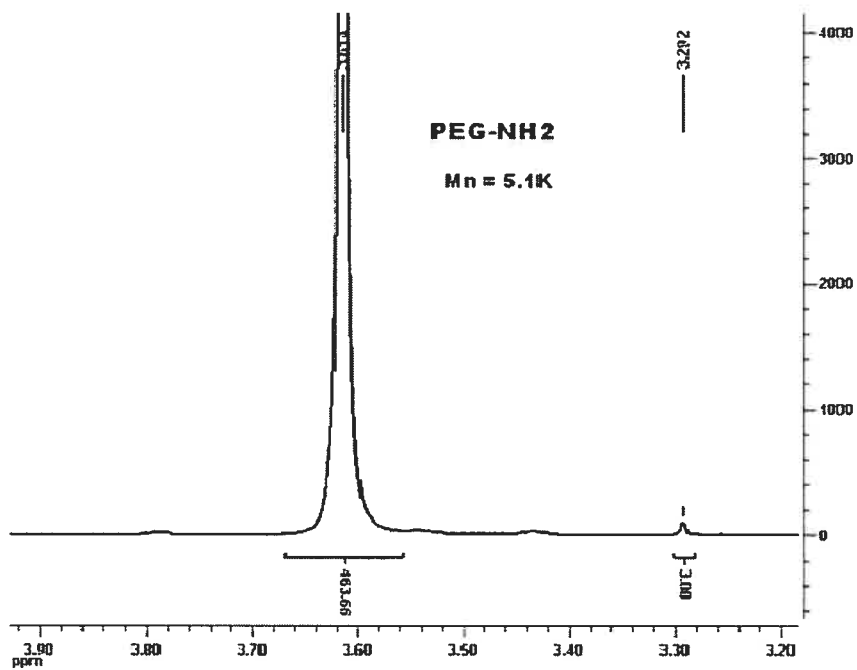
L'objectif de ces études serait d'analyser la formation des micelles polymériques par ces polymères, en milieu aqueux, par des interactions électrostatiques avec des particules ayant des charges opposées ou avec des copolymères ayant un bloc de même nature et un autre de charge opposée.

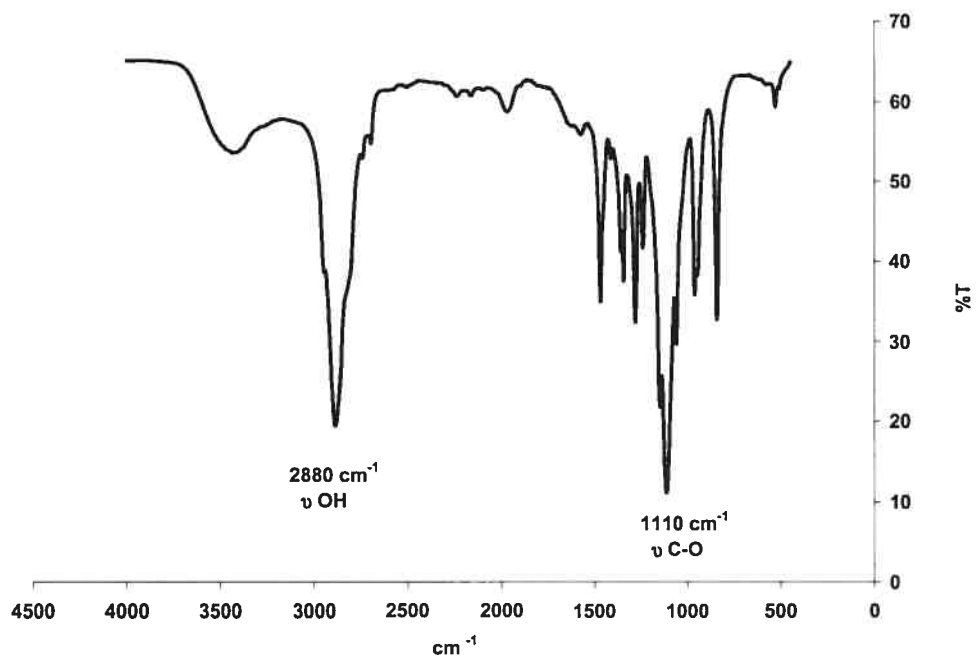
4.3 Annexes

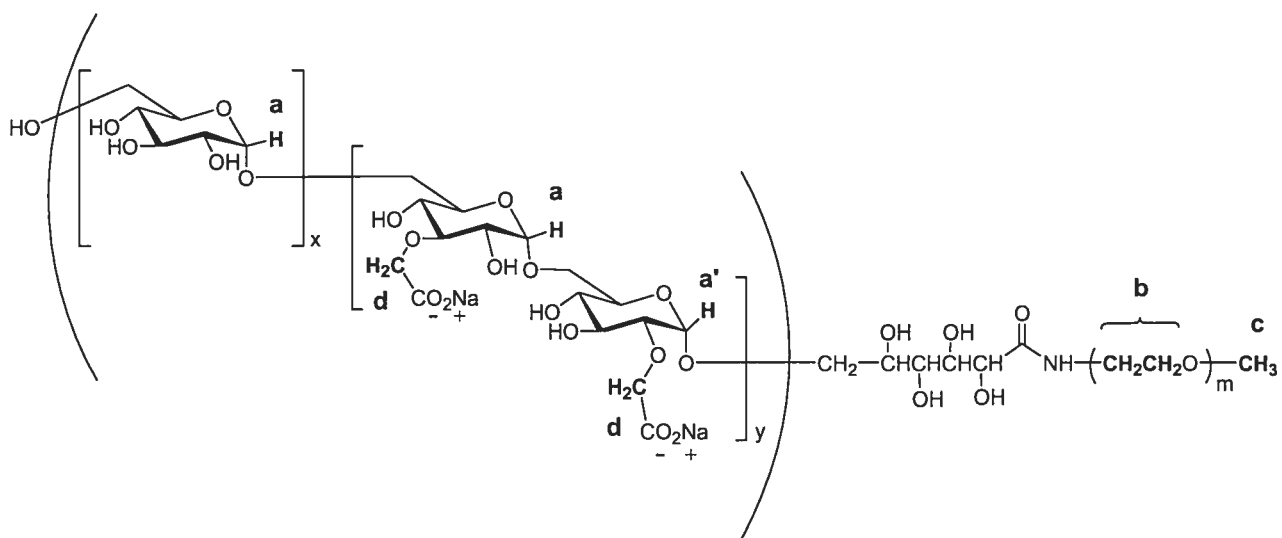
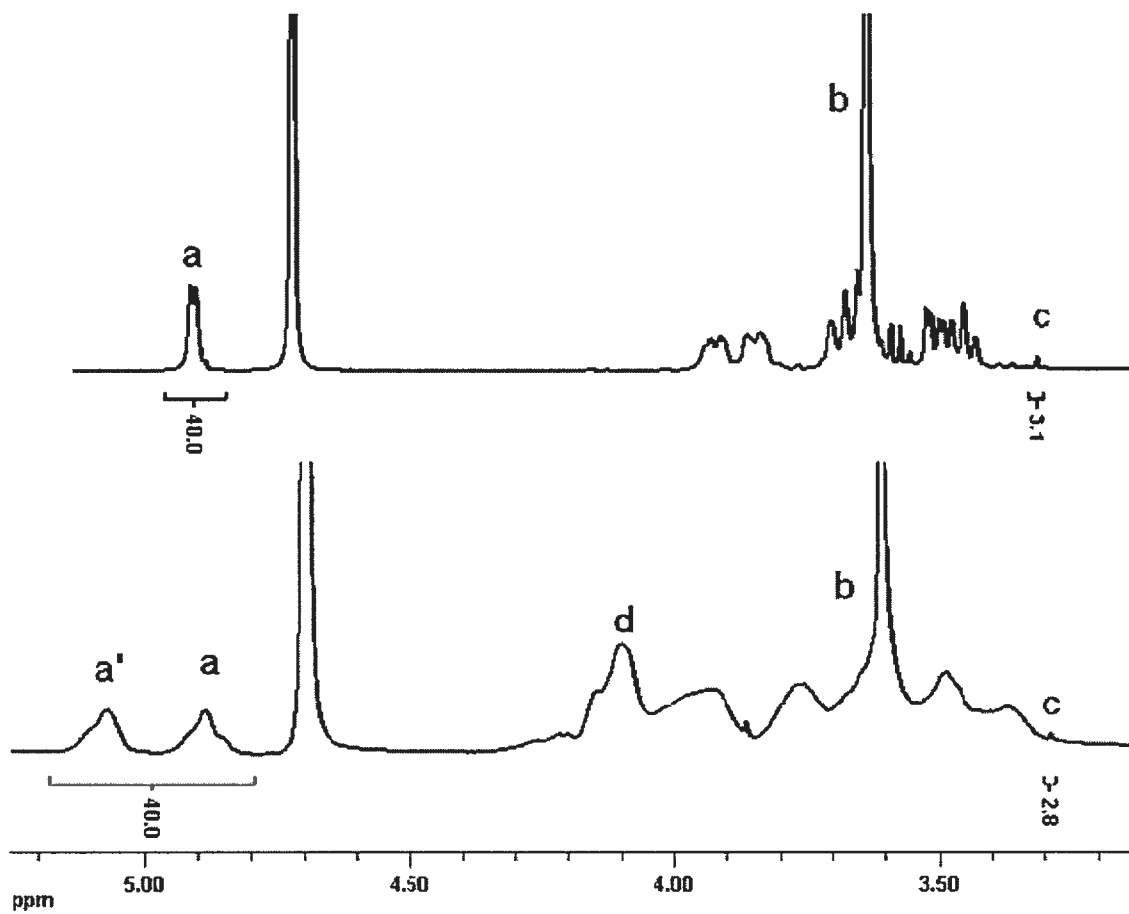
Annexe I : Spectre RMN ^1H du dextran (DEX₄₀) dans D₂O.

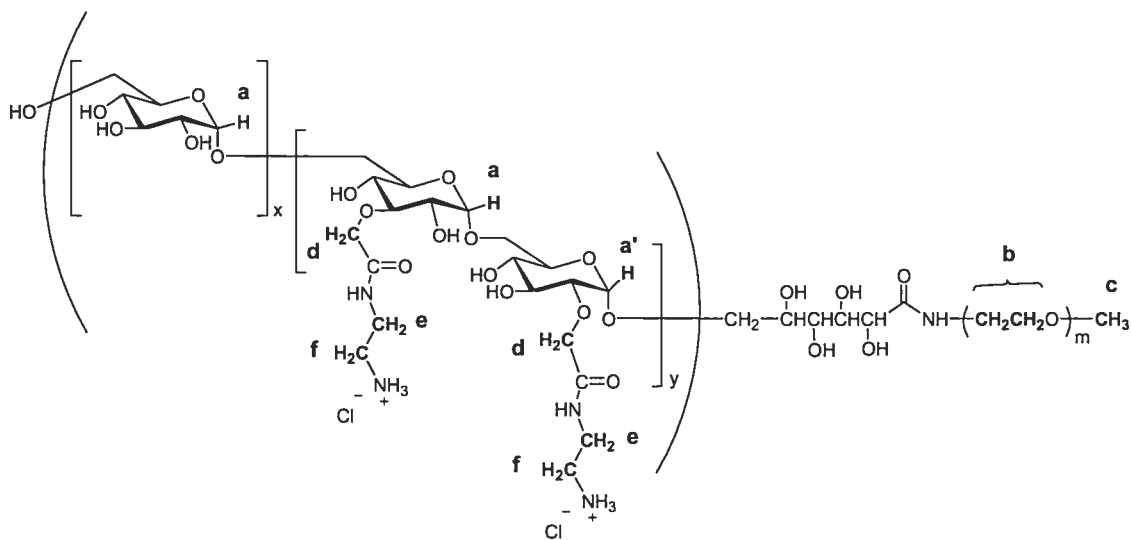
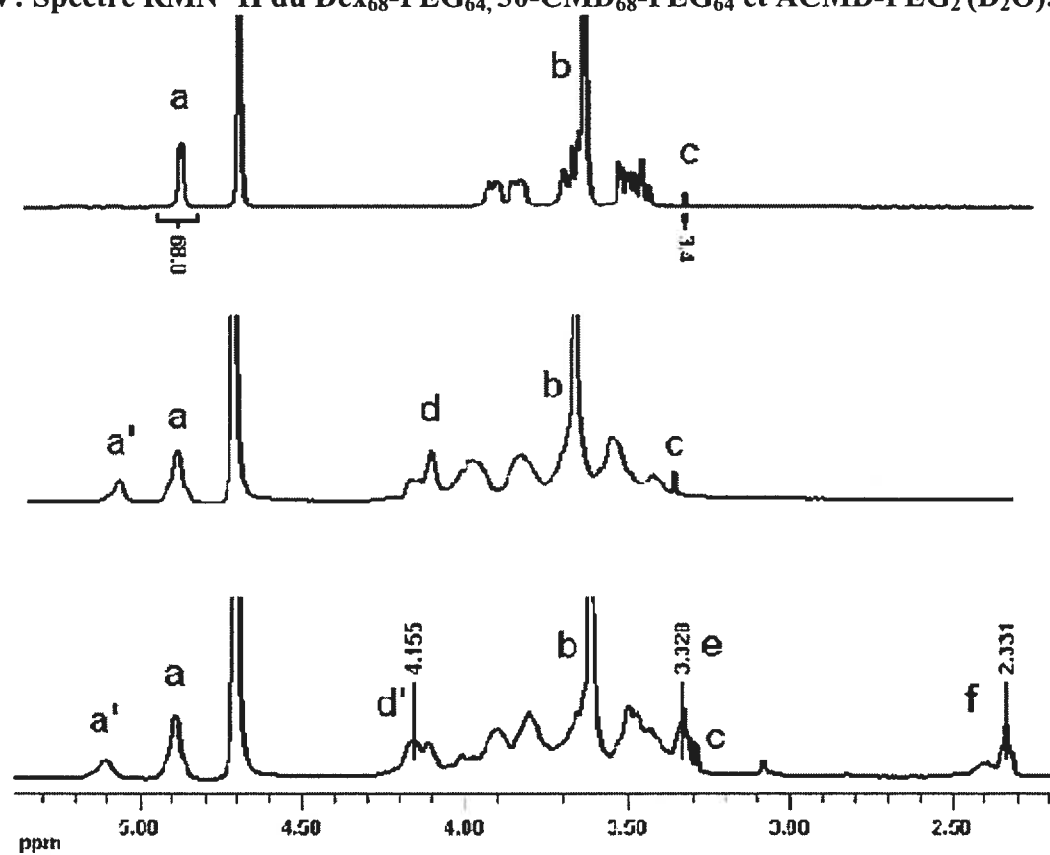


Annexe II : Spectre RMN ^1H du poly(éthylène glycol) (PEG₁₄₀) dans D₂O.

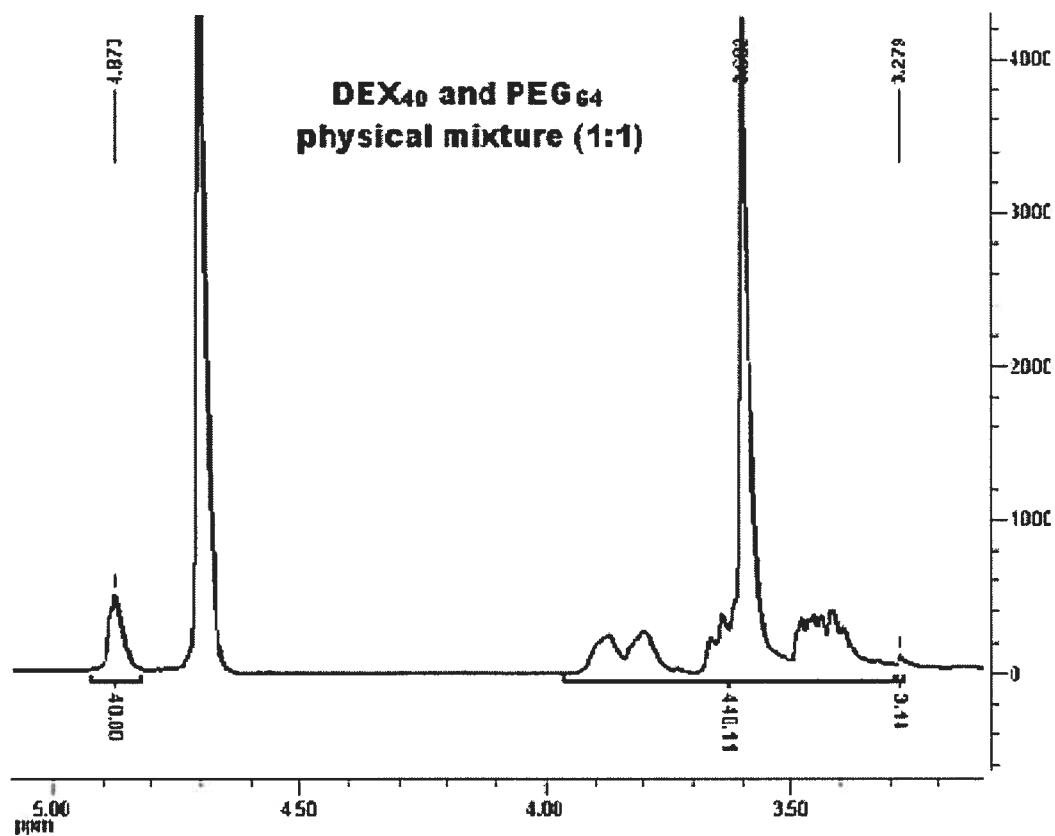


Annexe III: Spectre FTIR (KBr, 256 scans, 8cm^{-1}) du PEG₆₄.

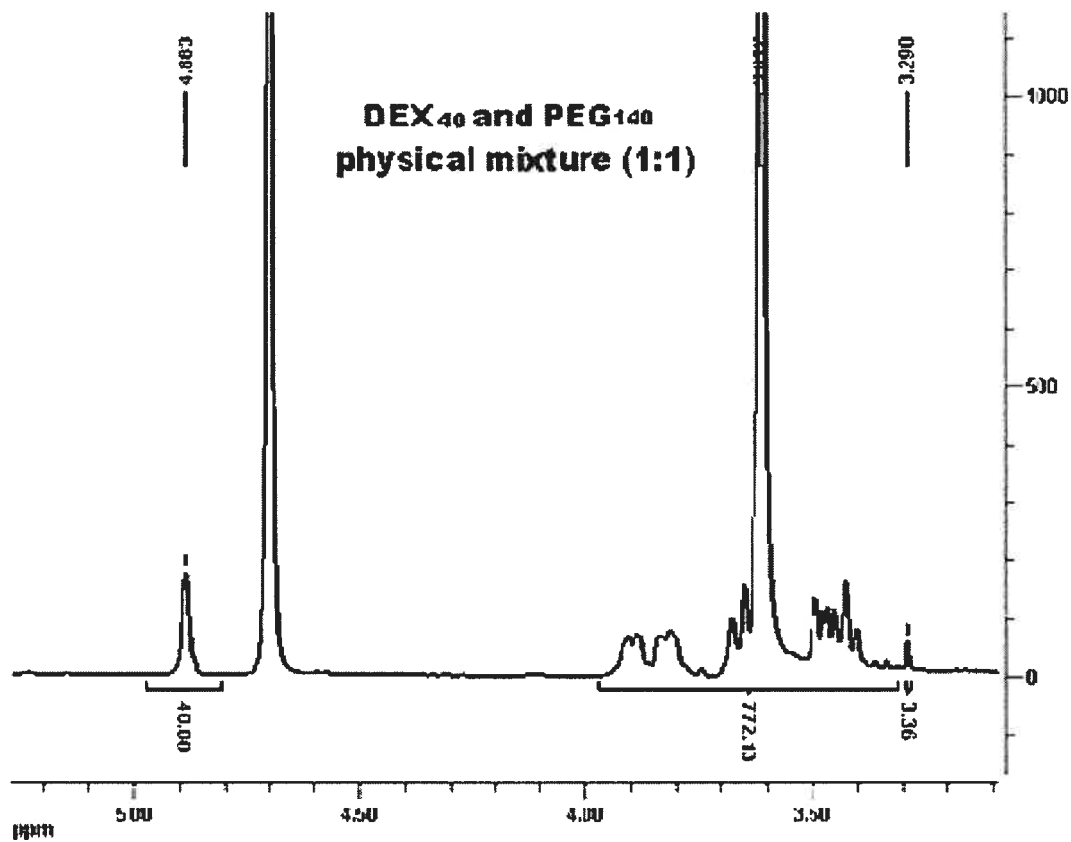
Annexe IV: Spectre RMN ^1H du Dex₄₀-PEG₁₄₀ et 85-CMD₄₀-PEG₁₄₀ (D_2O).

Annexe V: Spectre RMN ^1H du Dex₆₈-PEG₆₄, 30-CMD₆₈-PEG₆₄ et ACMD-PEG₂ (D₂O).

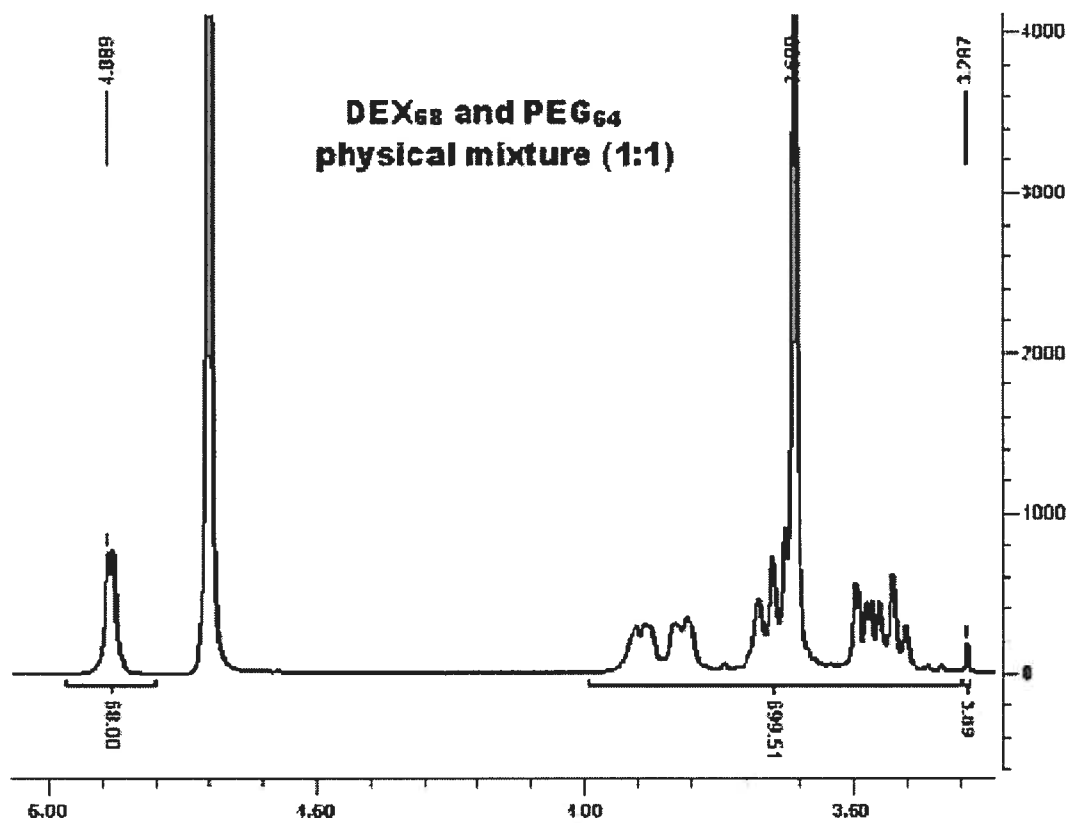
Annexe VI: Spectre RMN ^1H (D_2O) du mélange physique DEX₄₀ / PEG₆₄
(ratio molaire 1 :1).



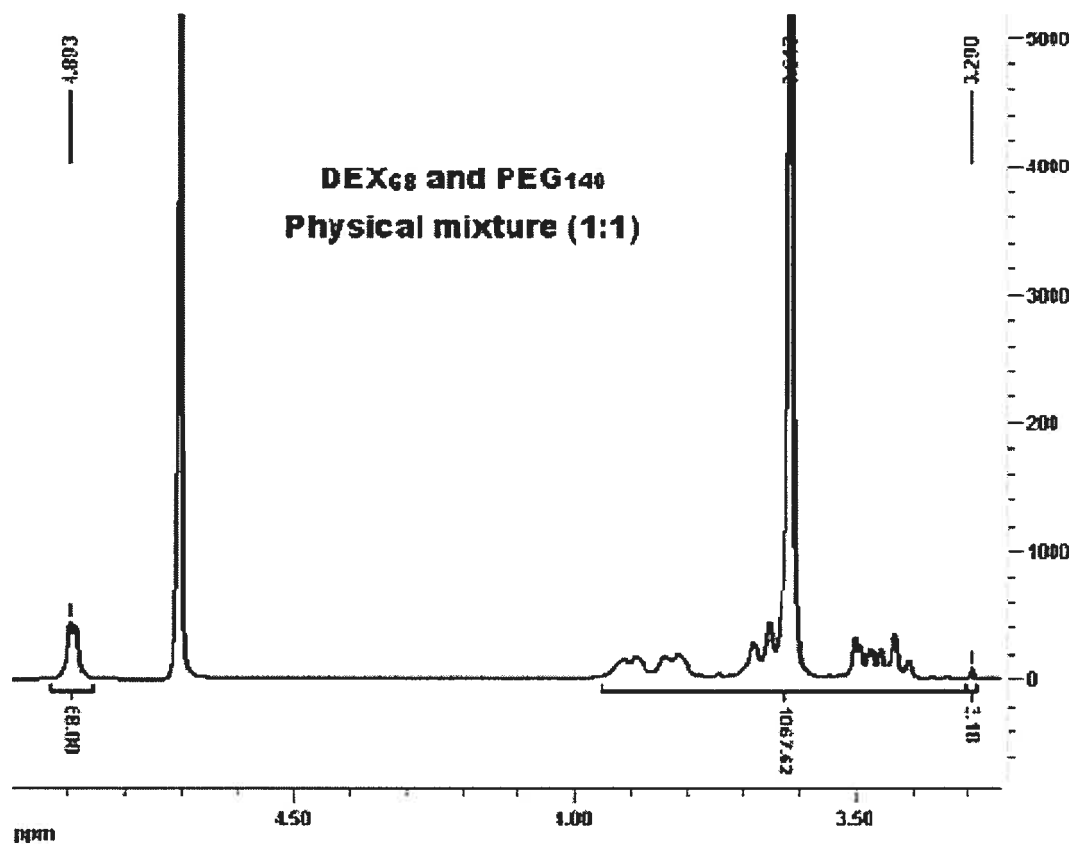
Annexe VII: Spectre RMN ^1H (D_2O) du mélange physique DEX₄₀ / PEG₁₄₀ (ratio molaire 1 :1).



Annexe VIII: Spectre RMN ^1H (D_2O) du mélange physique DEX_{68} / PEG_{64} (ratio molaire 1 :1).



Annexe IX: Spectre RMN ^1H (D_2O) du mélange physique DEX₆₈ / PEG₁₄₀ (ratio molaire 1 :1).



Annexe X: Graphes GPC enregistrés par un détecteur à indice de réfraction.

