

**Université de POITIERS**

**Faculté de Médecine et de Pharmacie**

Année : 2018

Thèse n°

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement  
le 21 Septembre 2018 à POITIERS  
par Monsieur ARNAUD Romain  
né le 17 Avril 1987

**Prodrogues à base d'acides aminés, intérêts en  
thérapeutique humaine**

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur FAUCONNEAU Bernard

Membres : Mme MARIVINGT-MOUNIR Cécile, Maître de Conférences  
Monsieur CHOLLET Jean-François, Chargé de recherche CNRS

Directeur de thèse : Mme MARIVINGT-MOUNIR Cécile



## REMERCIEMENTS

A mon président de thèse, Monsieur Bernard FAUCONNEAU, Professeur à la faculté de Pharmacie de Poitiers,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A ma directrice de thèse, Madame Cécile MARIVINGT- MOUNIR, Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Poitiers,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements et surtout pour votre infinie patience pendant la rédaction de ce travail. Je vous suis sincèrement très reconnaissant.

A Monsieur Jean-François CHOLLET, Chargé de recherches CNRS,

Vous avez accepté avec beaucoup de gentillesse de participer à ce jury. Veuillez recevoir mes remerciements les plus chaleureux pour l'intérêt que vous portez au sujet de cette thèse.

Cette thèse représente l'aboutissement de mes études de pharmacie, c'est pourquoi je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours.

Tout d'abord, merci à mes parents qui m'ont fait confiance et permis d'étudier dans les meilleures conditions, ainsi qu'à mes sœurs Charlotte et Camille pour leurs encouragements précieux. C'est grâce à vous si j'ai mené à bien mes études. Je ne saurais ici oublier ma grand-mère Madeleine CAZIN, qui m'a toujours soutenu.

Merci à Anna, pour son tendre soutien, sa compréhension et la patience sans faille dont elle a fait preuve pendant ce travail.

Je tiens également à remercier mes amies et amis, ceux que je connaissais avant et que j'ai connu pendant et après mes études.

Merci à Madame DAVAL et Madame ROY, mes titulaires, ainsi que mes collègues de la Grande Pharmacie du Mail, pour leur gentillesse, leurs encouragements et auprès de qui j'ai tant appris sur mon métier de pharmacien.

# TABLE DES MATIERES

<b><u>Liste des abréviations</u></b> .....	p.6
<b><u>Introduction</u></b> .....	p.7
<b><u>I Généralités</u></b> .....	p.8
<b><u>1-Acides aminés</u></b> .....	p.8
<u>Définition</u> .....	
<b><u>2- Pharmacocinétique d'un médicament, métabolisation</u></b> .....	p.13
2-1 <u>Absorption</u> .....	p.14
2-2 <u>Distribution</u> .....	p.17
a. <u>Transport sanguin / phase plasmatique</u> .....	p.17
b. <u>Phase tissulaire</u> .....	p.19
2-3 <u>Métabolisation</u> .....	p.19
a. <u>Réactions de phase I</u> .....	p.20
b. <u>Réactions de phase II</u> .....	p.21
c. <u>Facteurs influençant la métabolisation</u> .....	p.21
2-4 <u>Elimination</u> .....	p.23
a. <u>Elimination hépatique</u> .....	p.23
b. <u>Elimination rénale</u> .....	p.23
<b><u>II Acides aminés en tant que prodrogues</u></b> .....	p.24
<b><u>1- Acides aminés en tant que vecteur</u></b> .....	p.25
1-1 Diversité structurale .....	p.26
1-2 Chimie de liaison .....	p.28

1-3	Solubilité des acides aminés et de leurs prodrogues.....	p.29
1-4	Stabilité chimique des prodrogues à base d'acides aminés.....	p.31
1-5	Stabilité enzymatique .....	p.33
<b>2-</b>	<b><u>Voies d'administration</u></b> .....	p.34
2-1	Amélioration de la biodisponibilité orale .....	p.35
2-2	Libération prolongée .....	p.40
2-3	Administration parentérale .....	p.42
2-4	Ciblage thérapeutique .....	p.46
2-5	Meilleure stabilité métabolique .....	p.48
<b>III</b>	<b><u>Intérêts pratiques, industriels</u></b> .....	p.51
<b>1-</b>	<b><u>Découverte et screening</u></b> .....	p.51
<b>2-</b>	<b><u>Synthèse</u></b> .....	p.53
<b>3-</b>	<b><u>Analyses</u></b> .....	p.53
<b>4-</b>	<b><u>Formulation et stabilité</u></b> .....	p.54
<b>5-</b>	<b><u>Sécurité et toxicologie</u></b> .....	p.56
<b>IV</b>	<b><u>Conclusion</u></b> .....	p.57
	<b><u>Bibliographie</u></b> .....	p.58

## Liste des abréviations

**UV** : Ultra-violets (rayons)

**pHi** : Potentiel hydrogène

isoélectrique

**pKa** : Constante d'acidité

**CYP** : cytochromes

**kD** : Kilo Dalton

**PEPT1** : Transporteur de peptides

**VACVase** : Valacyclovirase humaine

**μM** : Micromolaire

**VEGFR-2** : Récepteur de type 2 du

facteur de croissance de

l'endothélium vasculaire

**FGFR-1** : Récepteur de type 1 du

facteur de croissance des

fibroblastes

**NK1** : Récepteur à la neurokinine

**GABA** : Acide γ-aminobutyrique

**MCT-1** : Transporteur monocarboxylate de métabolisation, élimination

de type 1

**SMVT** : Transporteur multi-vitaminique  
sodium dépendant

**TDAH** : Trouble déficit de l'attention /  
hyperactivité

**LAT1** : Transporteur d'acides aminés de  
type L-

**ATB<sup>0+</sup>** : Transporteur d'acides aminés  
(également appelé SLC6A14)

**HCMV** : Cytomégalovirus humain

**OGG1** : 8- oxoguanine ADN glycolase

**MPG** : N-méthylpurine ADN glycolase

**LC** : Chromatographie liquide

**MS** : Spectrométrie de masse

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à  
haute performance

**CCS** : Croscarmellose sodique

**ADME** : Administration, distribution,

## Introduction

Les prodrogues sont des molécules inactives biologiquement qui nécessitent de subir une transformation *in vivo* afin de libérer le principe actif. Le développement de ce type de médicament connaît un essor important depuis quelques années. Ainsi, en 2009, environ 15 des 100 médicaments les plus vendus, à base de petites molécules, étaient classifiés en tant que prodrogues.

Ce relatif succès repose sur plusieurs arguments :

L'ajout d'un groupement clivable à un principe actif peut modifier ses propriétés physico-chimiques afin d'améliorer la solubilité ou la perméabilité.

La forme prodrogue peut également permettre de réguler la libération du médicament et ainsi créer une forme à libération prolongée.

L'industrie pharmaceutique, du fait du coût important du développement de nouveaux principes actifs, s'intéresse de près à la stratégie prodrogue qui s'avère souvent être une alternative moins onéreuse.

Après avoir exposé certaines généralités sur les acides aminés et les mécanismes impliqués dans l'absorption et la métabolisation des médicaments, nous aborderons dans ce travail l'intérêt que représentent les acides aminés en tant que vecteur dans cette approche prodrogue, ainsi que les limites et inconvénients qu'ils peuvent éventuellement présenter.

# I Généralités

## 1- Acides aminés

### - Définition :

Les acides aminés sont de petites molécules composées d'atomes de carbone, hydrogène, oxygène, azote existant sous plus de trois cents formes différentes dans la nature.

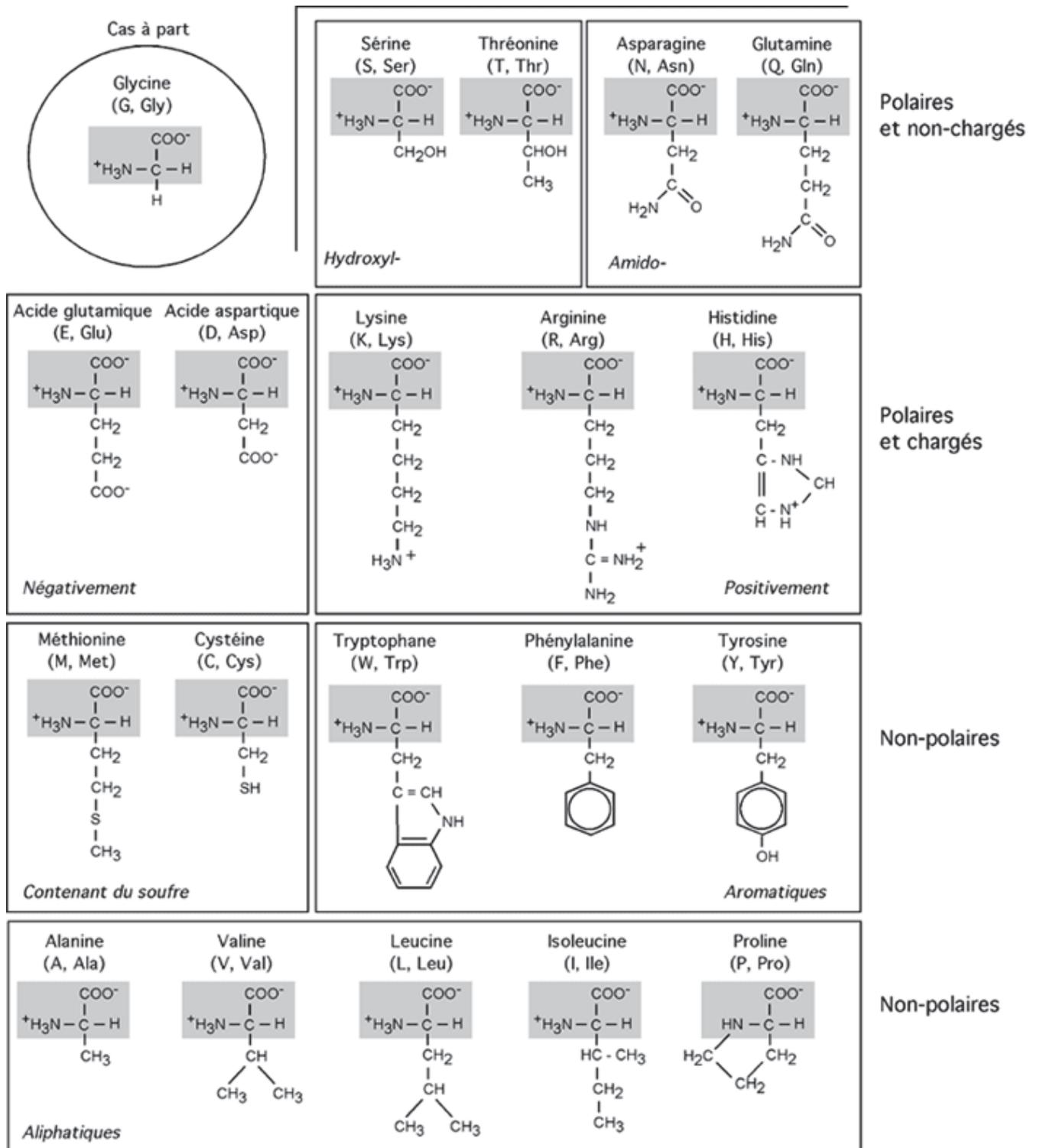
Seuls vingt-deux d'entre eux entrent dans la constitution d'unités monomériques des peptides et des protéines de l'organisme humain. La majeure partie des acides aminés participent à la formation des protéines mais certains sont aussi cétoènes (ils contribuent à la formation de corps cétoniques hépatiques), glucoformateurs (ils permettent la formation de glucose par néoglucogenèse) ou bien encore concourent à la formation d'acides gras dans le foie (lipogenèse). Ils ont, en outre, un rôle dans la formation d'énergie par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.

Ils possèdent tous une fonction acide carboxylique (-COOH) et une fonction basique avec un groupement aminé généralement (-NH<sub>2</sub>). Cette structure commune est reliée à un même carbone, qui par son asymétrie apporte une chiralité à la molécule. Seule la glycine n'a pas de carbone asymétrique et n'est donc pas chirale.

Sur cet atome de carbone commun vient se fixer une chaîne carbonée, le radical R-spécifique à chaque acide aminé.

On peut donc ainsi résumer la structure globale des acides aminés :





**Fig. 1** : Différences de structures des principaux acides aminés  
<http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/1a.html>

Ils peuvent aussi être classés en deux groupes :

- **les acides aminés essentiels**, qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme ou alors en quantité insuffisante. Leur source est donc alimentaire et on les retrouve dans les protéines animales ou végétales. Parmi ces acides aminés, on a isolé : l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane, la valine et l'histidine (lors de l'enfance et la grossesse)

- **les acides aminés non essentiels** qui sont eux directement synthétisés par l'organisme à partir du glucose en partant du pyruvate (sérine, glycine et alanine), de l'oxaloacétate (asparagine et acide aspartique) ou de l' $\alpha$ -cétoglutarate (glutamine, acide glutamique, proline et ornithine)...



Fig. 2 : liste des acides aminés indispensables

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/DGbioch/POLY.Chp.2.html>

Parmi les acides aminés protéinogènes, c'est la forme L qui domine (L-acides aminés). Les D-acides aminés existent, ils sont issus de transformations diverses au sein de l'organisme. La racémisation (formation d'un mélange à parties égales de forme L et D) est le principal mécanisme impliqué. Certaines conditions peuvent augmenter ce processus : le vieillissement d'un organisme, le stress oxydant ou les UV (1).

On les retrouve également produits naturellement par certaines bactéries. Par exemple, la pénicilline G, formée dans des cultures de *penicillium notatum*, découverte en 1928 par Alexander Fleming, contient comme élément notable la D-pénicillamine (3-mercapto-D-valine).

Il est à noter que les catalyses enzymatiques favorisent la forme L des acides aminés. Le groupement R peut être un alkyle ou un aryle, lequel peut présenter une fonction : hydroxyle, amino, mercapto, imidazolyle, sulfure carboxylique, guanidino.

Du fait de la présence conjointe de la fonction amino et carboxylique, les acides aminés se comportent à la fois comme des bases et comme des acides : ce sont des ampholytes.

En solution aqueuse, la structure d'un acide aminé dépend de la valeur du pH. Par exemple, concernant la glycine (qui possède la structure la plus simple), à pH neutre, la forme majoritaire est le zwitterion. En milieu fortement acide ( $\text{pH} < 1$ ), elle se présente essentiellement sous la forme d'un cation : l'acide carboxylique affublé d'un groupe ammonium. Tandis qu'en solution très basique ( $\text{pH} > 13$ ), c'est surtout la forme déprotonnée qui domine : l'anion 2-aminocarboxylate.

Ces différentes espèces s'interconvertissent via des équilibres acido-basiques.

Ci-dessous un tableau récapitulatif des différents acides aminés et leurs principales propriétés physico-chimiques :

Acide Aminé	Abréviation	Nb de C	Structure de R	Type de R	Radical	Catégorie	Polarité	pHi
Glycine	Gly (G)	2	Linéaire (L)		H	Neutre (n)	Apolaire (A)	5,97
<b>Groupe alkyle</b>								
Alanine	Ala (A)	3	L		$\text{CH}_3$	n	A	6,02
Valine	Val (V)	5	L ramifié		$\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$	n	A	5,97
Leucine	Leu (L)	6	L ramifié		$\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$	n	A	5,98
Isoleucine	Ile (I)	6	L ramifié		$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	n	A	6,02

Acide Aminé	Abréviation	Nb de C	Structure de R	Type de R	Radical	Catégorie	Polarité	pHi
Phénylalanine	Phe (F)	9	cyclique	benzène	CH <sub>2</sub> -noyau benzène	n	A	5,98
Proline	Pro (P)	5	Hétéro cyclique	noyau pyrrolidine	cycle saturé	n	A	6,1
<b>Avec fonction hydroxyle</b>								
Sérine	Ser (S)	3	L	alcool I	CH <sub>2</sub> -OH	n	Polaire Non Ionisable PNI	5,68
Thréonine	Thr (T)	4	L	Alcool II	CH-OH-CH <sub>3</sub>	n	PNI	5,65
Tyrosine	Tyr (Y)	9	cyclique	OH Phénolique	CH <sub>2</sub> -Benzène-OH	n	PNI	5,65
<b>Avec fonction amino</b>								
Asparagine	Asn (N)	4	L	amide	CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>	n	PNI	5,41
Glutamine	Gln (Q)	5	L	amide	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>	n	PNI	5,65
Lysine	Lys (K)	6 (2N)	L	amine	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	basique	PI	9,74
Arginine	Arg (R)	6 (4N)	L	guanidine	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-C-NH-NH <sub>2</sub>	basique	PI	10,76
Tryptophane	Trp (W)	11	cyclique	indole	CH <sub>2</sub> -indole-benzène	n	A	5,88
Histidine	His (H)	6 (3N)	hétéro-cyclique	imidazole	CH <sub>2</sub> -imidazole	basique	PI	7,58
<b>Avec fonction mercapto ou sulfure</b>								
Cystéine	Cys (C)	3	L	Thiol	CH <sub>2</sub> -SH	n	PNI	5,02
Méthionine	Met (M)	6	L ramifié		(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>	n	A	5,75

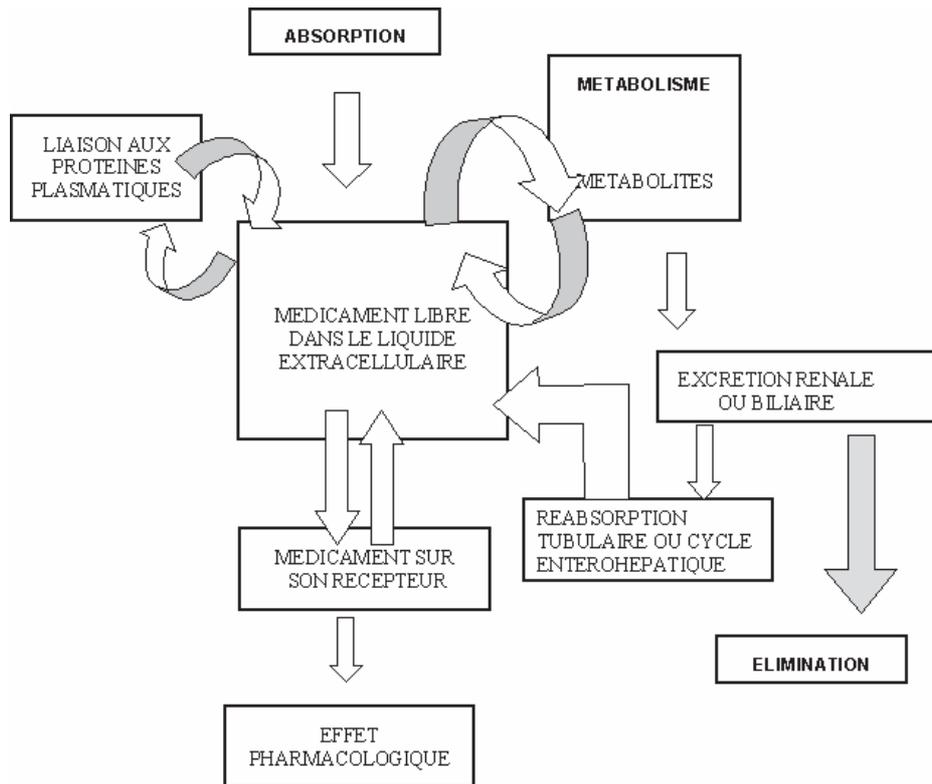
Acide Aminé	Abréviation	Nb de C	Structure de R	Type de R	Radical	Catégorie	Polarité	pHi
<b>Avec fonction carboxylique</b>								
Acide aspartique	Asp (D)	4	L	COOH	CH <sub>2</sub> -COOH	acide	Polaire ionisable	2,87
Acide glutamique	Glu (E)	5	L	COOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	acide	PI	3,22

Tab. 1 : Caractéristiques physico-chimiques des acides aminés naturels

## **2 - Pharmacocinétique d'un médicament, métabolisation**

Nous allons aborder dans cette partie quelques notions de pharmacocinétiques qui permettront de comprendre tout l'intérêt de la démarche prodrogue dans l'élaboration d'un médicament.

La pharmacocinétique représente l'étude descriptive et quantitative du devenir des médicaments dans l'organisme. Elle est typiquement divisée en plusieurs parties représentant les différentes étapes du cheminement du médicament au sein de l'organisme, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination.



**Fig. 3** : Cycle ADME d'un médicament

Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1 2005/2006  
 « Introduction à la pharmacocinétique – passages transmembranaires » - C. Loichot et M. Grima

## 2-1 Absorption

L'absorption représente l'ensemble des phénomènes régissant le transfert du principe actif depuis sa libération par la forme pharmaceutique jusqu'à son arrivée dans la circulation sanguine systémique.

En pharmacocinétique, la voie d'absorption de référence est la voie intraveineuse car elle permet à la totalité du principe actif de se retrouver dans la circulation sanguine.

En pratique, les voies dites orales restent les plus utilisées, car beaucoup moins contraignantes. La voie orale classique sera distinguée de la voie sublinguale car elle implique une déglutition et par conséquent un passage par le système digestif. (effet de 1<sup>er</sup> passage hépatique).

La voie orale est la plus commune et la plus pratique. Elle permet beaucoup de possibilités (absorption rapide ou retardée) mais elle présente certains inconvénients :

- le principe actif est soumis à l'effet de premier passage hépatique ;
- elle peut présenter une certaine toxicité locale ;
- elle n'est pas utilisable pour certains principes actifs (d'où l'intérêt de la démarche prodrogues)

Les parois cellulaires forment des compartiments ayant des compositions différentes : plasma / urine / tissu / lumière digestive. La diffusion à travers ces membranes va dépendre de plusieurs mécanismes distincts :

- la diffusion passive :

-simple, trans-cellulaire : cette diffusion libre va s'opérer dans le sens du gradient de concentration (concentration forte vers concentration faible jusqu'à équilibre). La vitesse du passage dépend de ce gradient mais aussi de la taille de l'acide aminé. Elle n'est possible que pour les molécules suffisamment liposolubles pour pouvoir traverser la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire. Ce mécanisme implique une forme non ionisée et non dissociée du médicament et une fois l'équilibre établi de part et d'autre de la membrane, il ne présente ni risque de saturation ni de compétition.

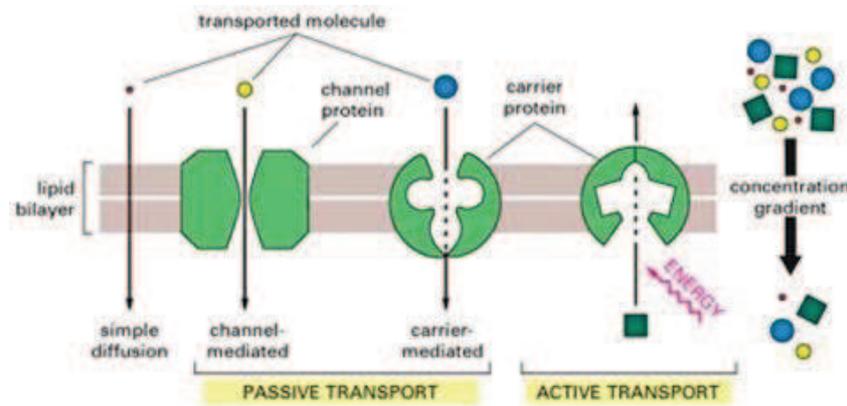
- diffusion passive facilitée : comme la diffusion libre, la diffusion facilitée va dépendre du gradient de concentration. Cependant la molécule ne traverse pas directement la membrane mais utilise une protéine transmembranaire de transport : la protéine de canal ou un transporteur (fig. 4).

De ce fait, ce mécanisme est saturable et il peut y avoir compétition entre les molécules utilisant les transporteurs.

- le transport actif :

Ce type de transport implique également des transporteurs spécifiques et peut se faire contre le gradient de concentration. Ceci implique de fournir de l'énergie, via l'hydrolyse d'ATP (transport actif primaire) ou la différence de potentiel électrochimique avec un autre élément (transport actif secondaire), on parle alors de couplage.

Comme pour la diffusion facilitée, l'utilisation de transporteur présente un risque de compétition et de saturation.



**Fig. 4** : Types de transport moléculaires possible à travers les membranes cellulaires  
Ludovic Maillard, introduction à la pharmacocinétique.

La biodisponibilité se définit comme étant la fraction de la dose de médicament administrée qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint.

L'absorption digestive proprement dite, c'est-à-dire la quantité de principe actif atteignant la circulation systémique est difficile à mesurer puisque la circulation porte est d'accès peu aisé. L'approche de cette quantité disponible au niveau systémique se fait donc de manière indirecte à partir de la quantité de médicament dans le plasma prélevé au niveau périphérique, c'est à dire après le foie.

La quantité de médicament qui atteint la circulation générale (ou systémique) est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif (et donc de la dose administrée) mais également, d'autres processus d'élimination pré-systémique :

- dégradation dans la lumière intestinale,
- métabolisme au niveau des entérocytes,
- métabolisme hépatique important au premier passage.

Lorsque le médicament a une forte affinité pour l'hépatocyte et les enzymes hépatiques, une fraction de la dose absorbée est transformée lors du premier passage, c'est à dire avant même d'atteindre la circulation générale.

La quantité de médicament retrouvée dans la circulation systémique est alors diminuée. C'est l'effet de premier passage hépatique. Parmi les voies d'administrations permettant d'éviter cet effet de premier passage hépatique, on retrouve essentiellement la voie intraveineuse (la plus efficace), la voie sublinguale, la voie transdermique, la voie inhalée et la voie nasale.

## 2- 2 Distribution

Quelle que soit la voie d'absorption, les médicaments atteignant le compartiment sanguin y seront distribués vers les différents fluides de l'organisme puis vers les tissus.

Deux phases seront alors distinguées :

- une phase plasmatique liée au transport sanguin,
- une phase tissulaire liée à la diffusion tissulaire du médicament : franchissement de la paroi capillaire (phase extra-vasculaire et extra-cellulaire) puis transport vers l'organe cible.

### a. Transport sanguin / phase plasmatique

Dans le compartiment sanguin, les médicaments peuvent :

- se dissoudre dans l'eau plasmatique s'ils sont hydrosolubles
- se lier à la membrane cellulaire ou pénétrer dans les cellules sanguines
- être partiellement métabolisés par les enzymes circulantes ou intracellulaires
- se lier aux protéines plasmatiques : albumine,  $\alpha$ -glycoprotéine P, lipoprotéines,  $\gamma$ -globulines, érythrocytes, polynucléaires, lymphocytes, plaquettes

Il se crée alors un équilibre entre la fraction libre dans le liquide plasmatique et la fraction liée (mécanisme réversible).

Mais à ce stade, il peut y avoir formation d'une proportion plus ou moins importante d'une forme inactive, d'une forme de réserve, non diffusible et par conséquent non métabolisable.

Il est important de noter que seule la forme libre est active, diffusible, métabolisable et éliminable.

Pour résumer, la forme libre constitue une forme active non saturable, diffusible, en équilibre permanent avec la concentration liée et qui peut être métabolisée et éliminée directement

Par opposition, la forme liée est saturable, non diffusible, en équilibre permanent avec la concentration libre. Elle représente une forme de réserve possible

Cette fixation aux protéines plasmatiques dépend énormément des propriétés acido-basiques du principe actif.

Schématiquement deux grands cas de figure peuvent être distingués :

	<b>Type 1</b>	<b>Type 2</b>
<b>Nature du médicament</b>	acide faible	base faible / substance non ionisable
<b>Protéine fixatrice</b>	albumine	albumine $\alpha$ -glycoprotéine acide
<b>Affinité</b>	forte	faible
<b>Nombre de sites de fixation</b>	faible	élevé
<b>Possibilité de saturation</b>	oui	non
<b>Possibilité d'interaction</b>	possible	improbable

En pratique, la fixation protéique n'est à considérer que si celle-ci est importante et si le médicament concerné a une marge thérapeutique étroite, c'est-à-dire une concentration efficace proche de la concentration toxique ou entraînant des effets indésirables.

## b. Diffusion tissulaire

Pour diffuser les médicaments doivent passer les membranes tissulaires. Or, dans certains tissus (le foie notamment), la paroi vasculaire est composée de capillaires discontinus permettant une diffusion facile du médicament. À l'inverse, dans d'autres organes (le cerveau par exemple), la paroi vasculaire est composée de capillaires continus difficilement franchissables.

Les mécanismes permettant aux médicaments de traverser les membranes tissulaires sont similaires à ceux impliqués dans l'absorption digestive. Ainsi, la diffusion tissulaire est dépendante des caractéristiques physico-chimiques du médicament (en particulier sa lipophilie), de la fixation protéique (sanguine et tissulaire), et du débit sanguin tissulaire (très important pour le foie et le rein, et au contraire très faible pour les os et la peau).

## **2-3 Métabolisme**

Après l'absorption et la distribution dans l'organisme, les médicaments peuvent être soit éliminés de manière totale ou partielle sous forme inchangée (c'est le cas des aminosides), soit subir des transformations enzymatiques qui vont permettre une élimination ultérieure.

Les reins sont les principaux organes d'élimination. La condition essentielle de passage dans les urines, milieu aqueux dépourvu de protéines, est l'hydrosolubilité. La plupart des transformations que subissent les médicaments (oxydations et conjugaisons en particulier) augmentent celle-ci et accroissent leur aptitude à être éliminés par voie urinaire.

Le métabolisme désigne la ou les réactions enzymatiques que subit un médicament pour le transformer en un ou plusieurs autres composés actifs ou non sur un plan pharmacologique (on parle de métabolites).

De nombreux organes peuvent réaliser cette transformation (les poumons, les reins, les intestins par exemple), mais le plus important site de biotransformation reste le foie. Cela s'explique par le flux sanguin très important du foie : il reçoit environ 1,5 L de sang par

minute, ainsi que par le grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des médicaments retrouvés au niveau des hépatocytes, responsables en particulier de réactions d'oxydo-réduction, d'hydroxylation, ou de rupture oxydative des liaisons N-C et N-O.

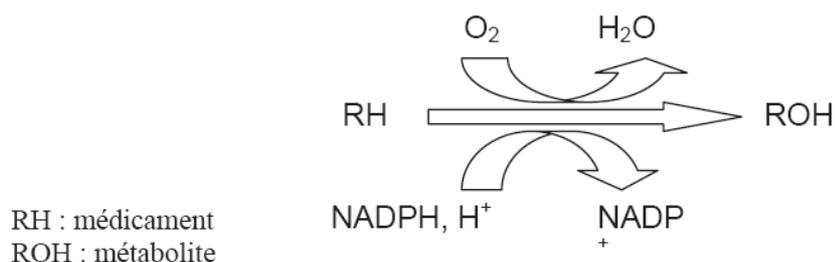
L'élément fondamental de ce système enzymatique est le cytochrome P450, qui possède de nombreuses isoenzymes : CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4. Ce dernier est responsable de 60 % des réactions d'oxydo-réduction.

Schématiquement on distingue deux différentes phases de métabolismes selon les processus de transformations impliqués par ces enzymes : les réactions de phase I et les réactions de phase II.

### a) Réactions de phase I

Sont regroupés sous le terme de métabolisme de phase I les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse aboutissant à des molécules dont les groupements fonctionnels sont le plus souvent des hydroxyles, des amines ou des acides carboxyliques.

- les réactions d'oxydation se produisent essentiellement au niveau des microsomes hépatiques via les cytochromes P450 et implique la consommation de NADPH (Fig. 5).



**Fig. 5** : Réaction catalysée par le cytochrome P450

- les réactions de réduction sont plus rares et leurs mécanismes encore mal connus. Cette réaction n'a pas lieu exclusivement dans le foie mais également au niveau intestinal par le biais de la flore bactérienne.

- l'hydrolyse est une voie métabolique commune, qui a lieu au niveau du foie, dans le plasma ainsi que dans différents organes. Les enzymes les plus souvent impliquées sont des estérases non spécifiques, ubiquitaires.

## b) Réactions de phase II

Suite aux réactions de phase I, les molécules transformées présentent des groupements fonctionnels qui permettent leur conjugaison.

Ces réactions enzymatiques de conjugaison impliquent principalement chez l'Homme : l'acide glucuronique, le glycofolle, le sulfate et l'acétyle.

La plus fréquente des conjugaisons est la glucuronoconjugaison impliquant la glucuronyltransférase et les métabolites issus de la phase I possédant des groupements hydroxyles, carboxyles ou aminés.

Les molécules conjuguées issues de ces transformations sont plus hydrosolubles que leur molécule mère ce qui favorise leur élimination ultérieure dans l'urine ou la bile (pour les molécules de masses moléculaires importantes avec groupes polaires ou lipophiles). Trois cas de figure résultent de ces phases de biotransformations :

- la formation de métabolites pharmacologiquement inactifs qui seront ensuite éliminés
- la formation de métabolite(s) actif(s) pouvant présenter une action inférieure voire supérieure à la molécule mère. Ex : le diazépam donne l'oxazépam (2)
- la formation de métabolites toxiques

## c) Facteurs influençant la métabolisation

Il est important de se rappeler qu'il n'y a rarement qu'une seule voie métabolique impliquée lors du métabolisme d'un médicament.

Les différents cytochromes P450 possèdent des affinités qui sont variables en fonction du substrat considéré et certains substrats peuvent modifier l'activité enzymatique des CYP. On parle alors d'inducteurs s'ils augmentent l'activité métabolique du cytochrome ou d'inhibiteurs s'ils la diminuent.

Ces médicaments inducteurs enzymatiques peuvent entraîner un sous dosage et une diminution de l'efficacité du traitement, tandis que les inhibiteurs enzymatiques peuvent être responsables d'un risque de surdosage.

Des exemples des différentes isoenzymes de cytochromes et leurs relations avec substrats inducteurs ou inhibiteurs sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

**Principales isoenzymes du cytochrome P450 humain impliquées dans le métabolisme des médicaments (liste de molécules et de cytochromes non exhaustive)**

	<b>CYP1A2</b>	<b>CYP2C9*</b>	<b>CYP2D6*</b>	<b>CYP3A4</b>
<b>substrat</b>	théophylline caféine	phénytoïne diclofenac warfarine	codéine captopril imipramine fluoxétine metoprolol	ciclosporine tacrolimus kétoconazole midazolam statine
<b>inhibiteur</b>	cimétidine quinolones fluvoxamine	isoniazide ritonavir	quinidine fluoxétine	macrolides naringénine (jus pamplemousse) antifongiques azolés antiprotéases
<b>inducteur</b>	rifampicine oméprazole cigarette	rifampicine		carbamazépine phénytoïne phénobarbital millepertuis (tisanes...)

\* = polymorphisme génétique avec retentissement fonctionnel

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.4.4.html>

Il existe un polymorphisme génétique des enzymes des voies métaboliques qui peut modifier leur activité. Cela contribue à une variabilité inter-individuelle vis-à-vis de la réponse à un médicament.

On peut ainsi dans certains cas distinguer les métaboliseurs lents, intermédiaires, rapides, voire ultra-rapides.

## **2-4 Élimination**

On désigne sous le terme d'élimination l'excrétion du médicament ou de son (ses) métabolite(s) à l'extérieur de l'organisme.

On distinguera plusieurs voies d'élimination : la voie rénale, majoritaire, la voie hépatique, et d'autres voies d'excrétion plus marginales telle que salivaire, pulmonaire, cutanée...

### **a) Élimination hépatique**

Les dérivés issus du métabolisme hépatique peuvent être éliminés dans la bile. Celle-ci est excrétée dans la lumière intestinale. Les substances éliminées par la bile peuvent ensuite :

- soit être éliminées dans les selles directement, c'est généralement le cas des substances les plus fortement polaires.
- soit être réabsorbées lorsqu'elles remplissent les conditions de l'absorption intestinale.

Les conjugués peuvent aussi être hydrolysés par des enzymes d'origine bactérienne lors de leur passage dans la lumière intestinale, ce qui a pour conséquence de libérer les molécules initiales, moins hydrosolubles et donc capable de franchir la barrière intestinale.

C'est le processus nommé cycle entéro-hépatique. Il a pour conséquence directe d'augmenter la durée de vie d'un médicament.

### **b) Élimination rénale**

Les reins sont les principaux organes de filtration du sang. La condition primordiale de passage des molécules dans les urines est l'hydrosolubilité.

Comme on l'a vu précédemment, la plupart des transformations que subit un médicament (oxydation, conjugaison...) permettent d'augmenter celles-ci et par conséquent de favoriser son élimination par voie urinaire.

Au niveau du néphron, les molécules d'une masse moléculaire inférieure à 64 kD passent directement dans le filtrat (filtration glomérulaire). C'est le cas de la plupart des médicaments ou de leurs métabolites. Par contre, la fraction liée aux protéines plasmatiques d'un médicament n'est pas concernée par ce mécanisme d'élimination.

Au niveau du tubule proximal, une sécrétion active s'observe également pour certaines molécules, essentiellement des anions ou cations. Ainsi, ces molécules sont sécrétées dans la lumière du tubule par transport actif, grâce au système de la glycoprotéine P et à des transporteurs d'efflux apicaux. Le tubule rénal peut également réabsorber certains médicaments par diffusion non ionique surtout, ou plus rarement par diffusion facilitée ou par transport actif (fig. 6).

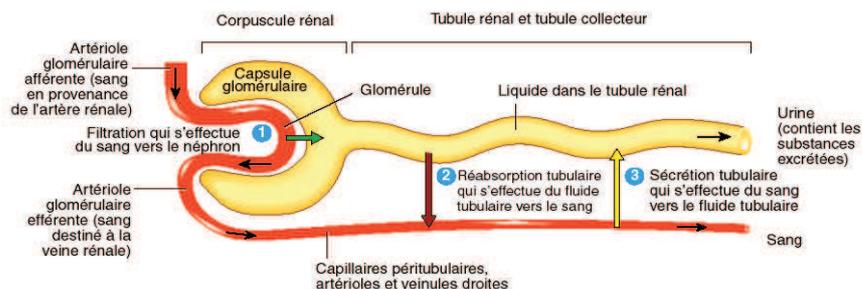


Fig. 6 : mécanismes de filtration, sécrétion, réabsorption au niveau du néphron

[https://listes.u-](https://listes.u-picardie.fr/wws/d_read/physiologie/enseignement/L3S6/2013/Cours%20La%20fonction%20rénale%202013.pdf)

[picardie.fr/wws/d\\_read/physiologie/enseignement/L3S6/2013/Cours%20La%20fonction%20rénale%202013.pdf](https://listes.u-picardie.fr/wws/d_read/physiologie/enseignement/L3S6/2013/Cours%20La%20fonction%20rénale%202013.pdf)

## II Acides aminés en tant que prodrogues

Le terme de prodrogue désigne tout composé dont l'effet thérapeutique est conditionné par une activation métabolique (transformation enzymatique ou chimique).

Dans la plupart des cas, les prodrogues sont de simples dérivés chimiques qui ne sont séparés de la molécule « mère » active que par une ou deux réactions chimiques, catalysées ou non par des enzymes.

Les prodrogues ont offert une nouvelle approche modulable afin d'augmenter l'utilité clinique de nombreux agents pharmaceutiques en améliorant leurs propriétés physicochimiques, leur biodisponibilité ou pharmacocinétique.

Les prodrogues médicamenteuses sont de plus en plus utilisées car elles représentent une réelle opportunité dans le développement de nouveaux médicaments.

La démarche prodrogue est en train de devenir une part intégrante du processus de découverte et de conception du médicament. Comme les prodrogues peuvent influencer la distribution tissulaire, l'efficacité ou même la toxicité de la molécule mère, ainsi que le ciblage, leur intérêt doit être considéré dès le début du développement préclinique.

Le choix du groupement « pro -» (que l'on appellera également vecteur dans le cas présent) dépend surtout de l'objectif à atteindre en utilisant cette stratégie : augmenter la solubilité par exemple.

Les prodrogues à base d'acides aminés ont démontré par le passé leur capacité à améliorer la distribution par voie orale de médicament possédant une mauvaise solubilité et perméabilité. Ajouter un acide aminé, naturel ou de synthèse, à une molécule mère augmente généralement sa solubilité aqueuse de plusieurs ordres de grandeur via un anion carboxylate ou un cation ammonium.

De plus, de nombreux transporteurs nécessaires à l'absorption des acides aminés et oligopeptides sont exprimés dans les membranes des cellules épithéliales intestinales et se révèlent jouer un rôle important dans l'absorption de plusieurs prodrogues à base d'acides aminés. Par exemple, les prodrogues de l'acyclovir et du ganciclovir qui sont des esters de valine, vont avoir une meilleure biodisponibilité orale liée à un meilleur transport intestinal via le transporteur de peptide PEPT1 (3,4).

## **1-Acides aminés en tant que vecteurs**

Une grande variété de vecteurs (sucres, acides aminés, chaînes carbonées, groupement phosphates, etc...) a été utilisée afin de surmonter les inconvénients de certains médicaments (5). La sélection de ce groupement va dépendre de plusieurs facteurs : l'objectif visé avec l'approche prodrogue, du type de groupement(s) fonctionnel(s) présent(s) sur la molécule mère, des mécanismes de conversion chimique (ou catalysé par des enzymes) possibles pour

passer de prodrogue à médicament actif, de l'innocuité du vecteur et enfin de sa facilité de synthèse.

De ce point de vue, les acides aminés en tant que vecteurs offrent de nombreux avantages, et présentent une toxicité déjà largement décrite.

## 1-1 Diversité structurelle

Comme présenté précédemment, les acides aminés possèdent un groupement amine, un groupement acide carboxylique et une chaîne qui varie en fonction de l'acide aminé considéré.

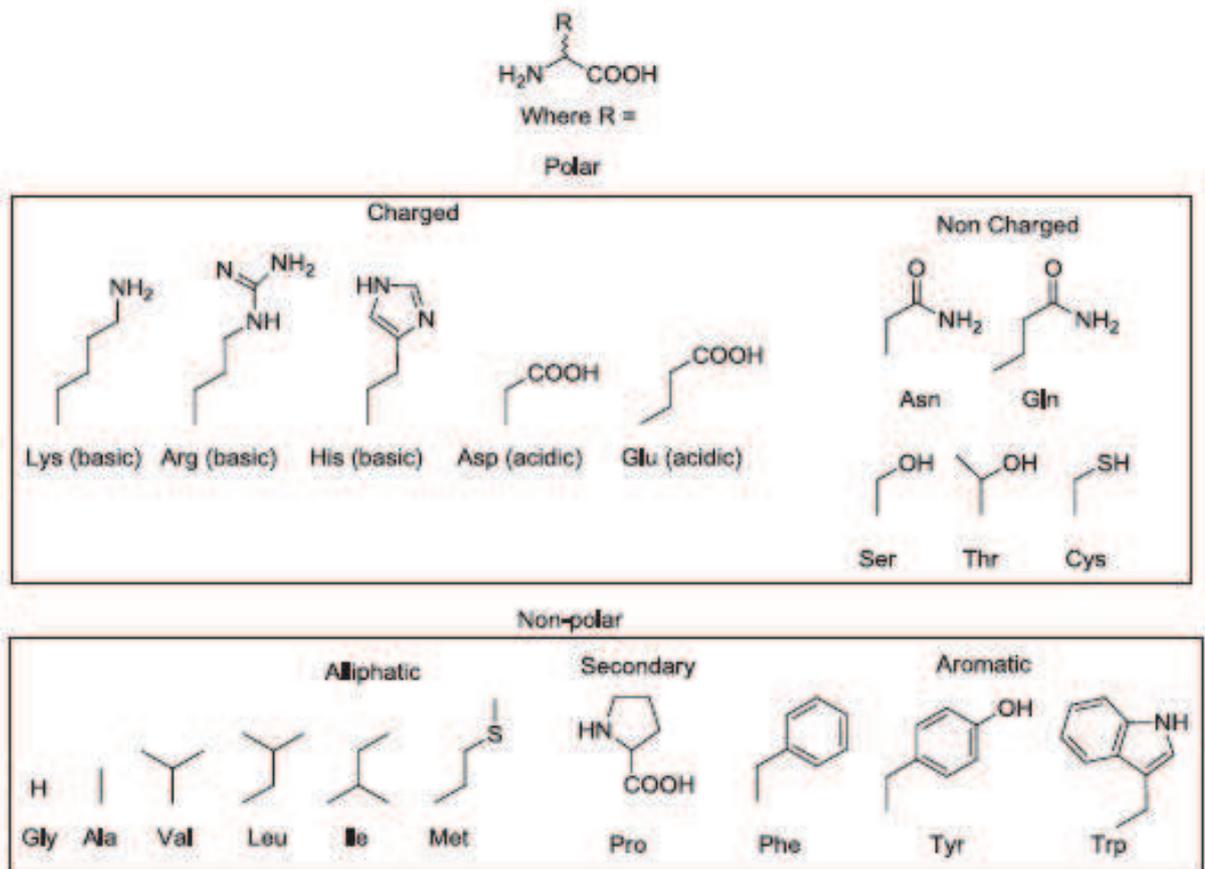
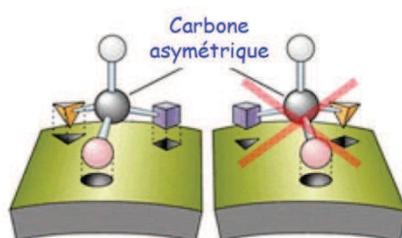


Fig. 7 : Diversité structurelle des acides aminés naturel

La nature de cette chaîne R (fig. 7) va permettre de diviser les acides aminés en 3 catégories :

- les acides aminés avec un groupement R relativement apolaire (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phénylalanine, tryptophane et méthionine).
- les acides aminés avec un groupement R polaire : sérine, thréonine, cystéine, tyrosine, asparagine, glutamine.
- les acides aminés avec un groupement R facilement ionisable : acide aspartique, acide glutamique, lysine, arginine, histidine.

Mise à part la glycine, tous les acides aminés possèdent un carbone  $\alpha$  chiral et peuvent donc exister sous deux formes isomères : L et D. Les formes L des acides aminés prédominent dans la nature et les prodrogues utilisant ces acides aminés sont généralement activées par des enzymes existant dans les milieux biologiques. Ces deux formes ont tendance à avoir les mêmes propriétés physicochimiques mais les formes D semblent être plus stables face à l'hydrolyse par des enzymes humaines (6). Cette propriété est souvent utilisée pour développer des prodrogues à base d'acides aminés qui soient stables. En effet, les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions biochimiques spécifiques. Leur site récepteur sont chiraux, et ne reconnaissent donc qu'un seul des deux énantiomères (Fig .8).

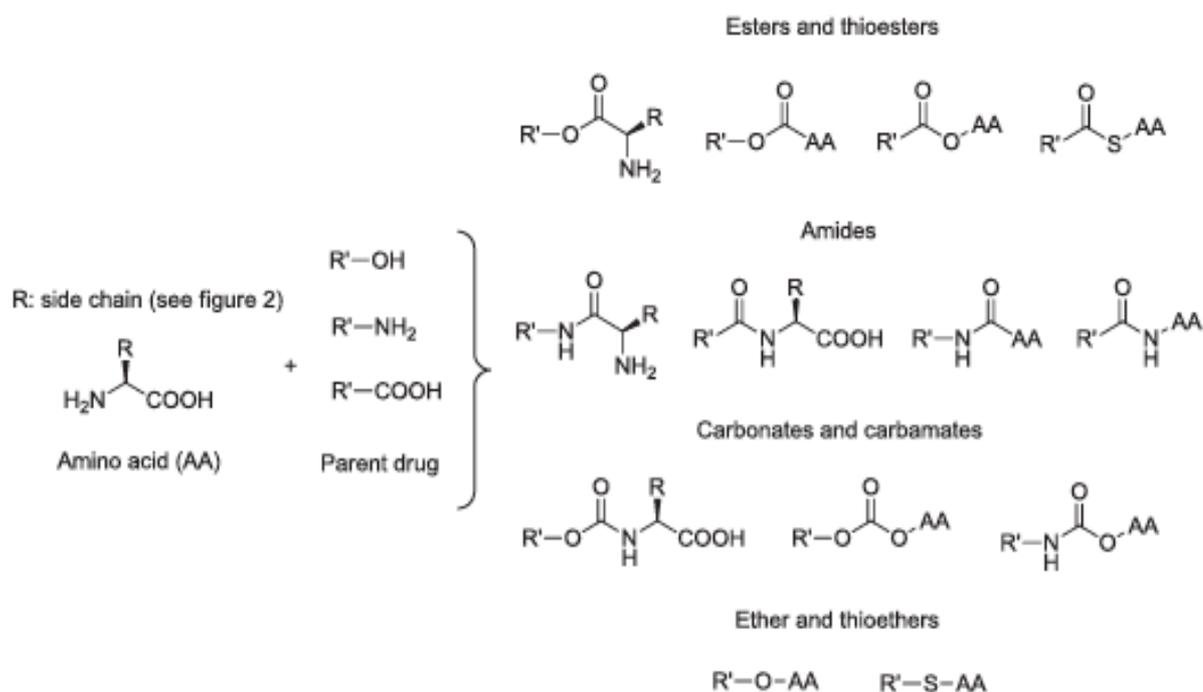


**Fig. 8** : illustration de la spécificité des sites de réaction enzymatique

En plus des acides aminés naturels L- et D-, il existe un important catalogue d'acides aminés synthétiques et de di-/tri-peptides disponibles commercialement pour les chimistes voulant synthétiser des prodrogues (7). Les acides aminés sont peut-être les vecteurs qui présentent la plus grande diversité structurelle impactant leurs propriétés physico-chimiques.

## 1-2 Chimie de liaison

La plupart des prodrogues à base d'acides aminés sont soit des esters soit des amides, dans lequel le groupement amine ou acide carboxylique est lié à la molécule mère par un groupement fonctionnel (hydroxyle, amine ou carboxyle). Ils peuvent également être rattachés à la molécule mère par une fonction carbonate ou carbamate.



**Fig. 3.** Typical links between amino acid promoieties and parent drugs.

**Fig. 9 :** principaux types de liaison retrouvés entre les acides aminés et la molécule mère

Les groupements R des acides aminés offrent une grande diversité des groupements fonctionnels utilisables (amine, acide carboxylique, alcool, thiol) et ouvrent ainsi un champ d'opportunité énorme dans la conception de prodrogues. En effet, même si dans la majorité des cas, les acides aminés sont directement conjugués à la molécule mère, des lieux bifonctionnels ont déjà été utilisés pour augmenter la diversité structurale et le type de molécules mères pouvant être rattachées à des acides aminés (8,9).

### 1-3 Solubilité des acides aminés et de leurs prodrogues

L'addition d'un acide aminé, qu'il soit naturel ou de synthèse, à une molécule mère permet généralement d'augmenter grandement sa solubilité. Par conséquent, certaines prodrogues à base d'esters d'acide aminés ont été étudiées afin d'augmenter la solubilité dans l'eau dans l'optique d'une administration par voie orale du médicament (10-13). Dans une moindre mesure, les esters (14,15), les amides (16-19) d'acides aminés ont été étudiés pour une utilisation parentérale.

Un grand nombre d'acides aminés ont un groupement  $\alpha$ -amine primaire, à l'exception de la proline (cyclique) qui a une fonction amine secondaire.

Le pKa de la fonction amine  $\alpha$  est typiquement compris entre 8,8 et 10,6 tandis que celui de la fonction acide carboxylique se situe entre 1,7 et 2,6 (tab. 1). Les constantes de dissociations du groupes  $\alpha$ -amino et de l'acide carboxylique sont affectées par l'une et l'autre et par la nature du groupement R. Le groupe  $\alpha$ -amino dans son état chargé est fortement électrophile et rend le groupe acide carboxylique plus acide, ce qui diminue son pKa. En effet le pKa typique d'un acide carboxylique reste autour de 4,5.

Au pH physiologique, la forme prédominante des acides aminés  $\alpha$  contient à la fois un groupe carboxylate chargé négativement et un groupe ammonium chargé positivement. Cet état moléculaire est désigné sous le nom de zwitterion, et possède une solubilité minimum au point isoélectrique (fig. 9).

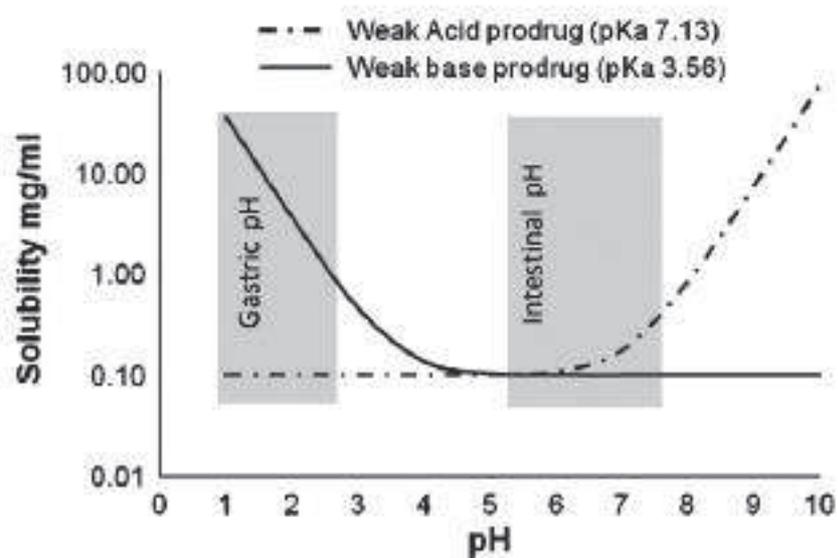
Cependant, dans la plupart des prodrogues à base d'acides aminés, on utilise soit le groupement acide carboxylique, soit le groupement amine est utilisé pour établir la liaison avec la molécule mère, ce qui aboutit à la suppression de l'état zwitterion. On notera que certains acides aminés possèdent des groupements fonctionnels additionnels sur le groupement R qui peuvent servir lors de la formation de prodrogues (*ie*, -SH de la cystéine, -OH de la tyrosine, -NH<sub>2</sub> de la lysine, -COOH de l'acide aspartique et glutamique), et qu'ils peuvent donc exister sous forme de zwitterion.

La solubilité aqueuse des acides aminés est largement dépendante de la nature polaire ou non du groupement R (tab. 1). L'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée du groupement R va ainsi diminuer la solubilité des acides aminés, comme le montre sa diminution quand on compare la glycine (R=H) avec la valine R= CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou la leucine R = CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Ainsi, dans la série de prodrogues de la dapsone (18), les acides aminés avec une chaîne hydrocarbonée plus courte ont abouti à une meilleure solubilité par rapport à ceux qui avaient une chaîne plus longue. De plus, les acides aminés avec un groupement R polaire ont généralement une meilleure solubilité que ceux ayant un groupement R non polaire. Ces données vont dans le sens de résultats obtenus lors de plusieurs études où la phénylalanine en tant qu'acide aminé vecteur a abouti à une solubilité moindre par rapport aux autres prodrogues testées (18,20).

Parmi les acides aminés avec un groupement R ionisable, la lysine apporte une relativement bonne solubilité aqueuse sur une gamme importante de pH importante grâce à son amine en position  $\epsilon$  et ce quel que soit le type de prodrogue envisagée (ester ou amide) (18,21).

L'introduction d'un acide aminé ajoute généralement une charge à la molécule. Par conséquent celle-ci va avoir une solubilité pH-dépendante. L'ionisation et donc le profil de solubilité vis-à-vis du pH va dépendre du nombre de groupe ionique et de leur pKa.



**Fig. 9 :** profil théorique de solubilité en fonction du pH d'une prodrogue à base d'acide aminé ayant un groupement amine libre (pKa = 7,13) et d'une autre ayant un groupement acide carboxylique libre (pKa = 3,56).

L'ionisation et la solubilité d'une prodrogue à base d'acide aminé sont donc fortement dépendante du pH gastrique, il paraît alors particulièrement primordial de déterminer le profil de solubilité vis-à-vis du pH de ce type de prodrogues et son impact sur la biodisponibilité de la molécule au cours de ses différents passages dans le tractus gastro-intestinal.

## 1-4 Stabilité chimique des prodrogues à base d'acides aminés

Les prodrogues à base d'acides aminés sont conçues sur le principe d'assurer à la fois une bonne stabilité chimique et une conversion (ou activation) vers la molécule mère par des enzymes. Ainsi, une haute stabilité chimique va réduire la conversion spontanée de la prodrogue en médicament actif tandis qu'une activation enzymatique permet une conversion rapide et quantifiable. Les esters et les amides d'acides aminés sont hydrolysés par les mêmes mécanismes catalysés par des acides ou des bases et par un certain nombre d'hydrolases endogènes (22) (Fig. 10).

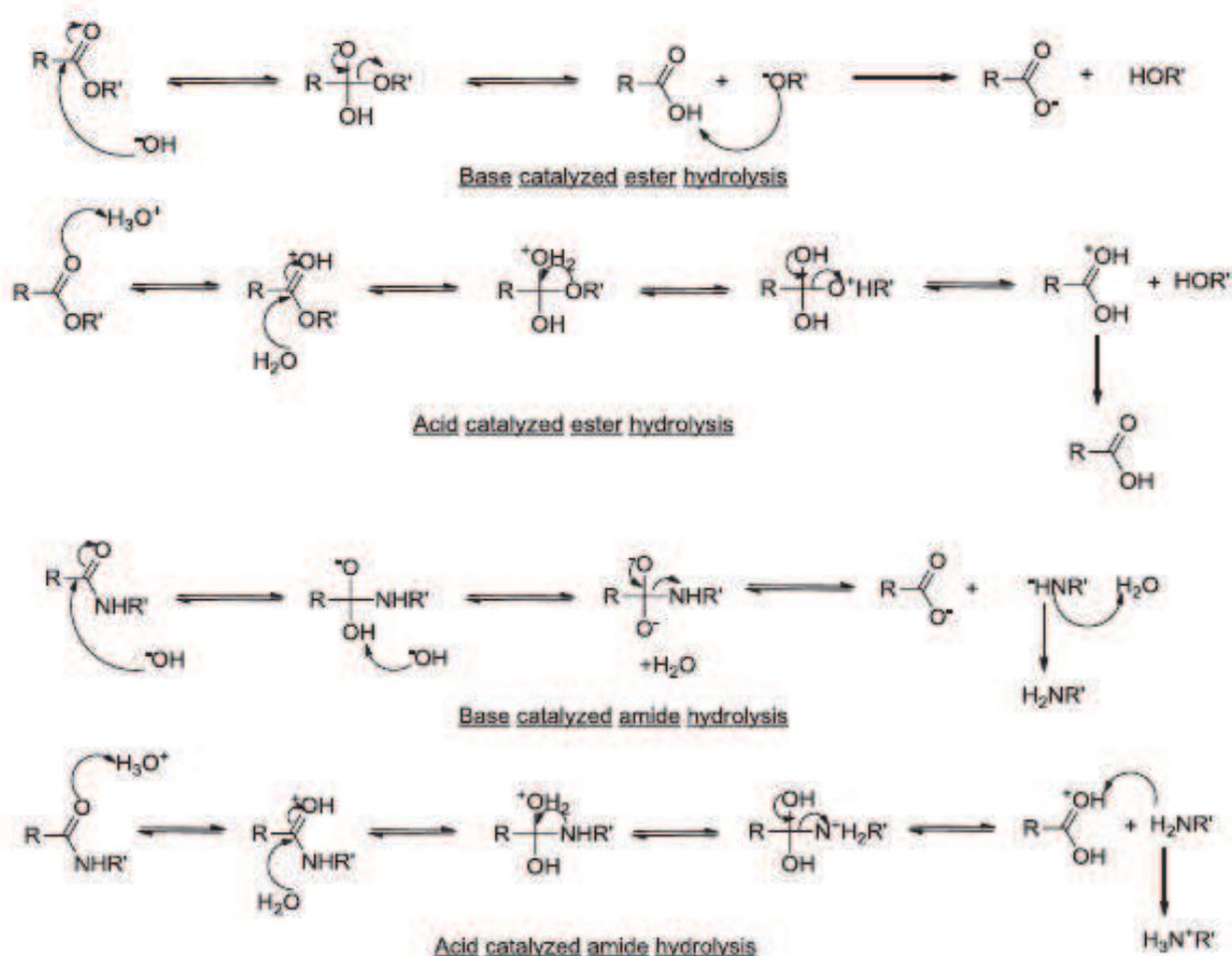


Fig. 10 : principales réactions d'hydrolyses de prodrogue à liaison ester ou amide

Cependant, d'une manière générale, la liaison amide est plus stable que la liaison ester vis-à-vis d'une hydrolyse chimique ou catalysée par des enzymes. Le plus souvent les prodrogues à liaison ester ou amide sont le moins stable aux extrémités de l'échelle des pH (très bas ou très élevé) (Fig. 9) (23).

En effet, certaines prodrogues à base d'acides aminés font preuve d'une mauvaise stabilité chimique en solution aqueuse, comme le montre les esters de métronidazole (14,24), d'acyclovir (25) et de paracétamol (26). La raison de cette faible stabilité est en partie due au groupe amine voisin qui peut participer à une catalyse intramoléculaire, et en partie due au fort pouvoir électro-attracteur du groupe amine protoné qui active la liaison ester (24,27). Ce pouvoir facilitant du groupe amine sur l'hydrolyse de la liaison ester peut être diminué en éloignant le groupe amine de cette liaison ester (28,29).

Par exemple, les esters aminométhylbenzoate de métronidazole (29), d'hydrocortisone, prednisolone et méthylprednisolone (30) ont montré une importante stabilité chimique tout en gardant une vitesse rapide d'hydrolyse enzymatique de l'ester. La meilleure stabilité de ces prodrogues est potentiellement due au groupement R chargé négativement, qui générerait l'hydrolyse de la liaison ester par des ions hydroxydes (31).

La liaison amide est moins polarisée que la liaison ester, car l'azote a une électronégativité moindre que l'oxygène, ce qui rend la liaison amide plus résistante à une hydrolyse chimique que la liaison ester. Ceci est illustré par les amides à base d'acides aminés, de la dapsonne qui, quel que soit le précurseur (glycine, alanine, leucine, phénylalanine, lysine) ont une durée de vie estimée supérieure à 2 ans à pH 4 (18).

Les acides aminés en tant que vecteurs influencent de manière majeure la stabilité chimique des prodrogues. En général, les acides aminés à petite chaîne aliphatique (glycine, alanine) et la proline donnent lieu à des prodrogues esters ou amides qui subissent des hydrolyses chimiques en milieu aqueux plus rapidement que les prodrogues à base d'acides aminés ayant des chaînes aliphatiques ramifiées (valine, isoleucine), ou d'acides aminés aromatiques (phénylalanine). Les facteurs possibles contribuant à ces différences sont à la fois de petites variations dans les valeurs du  $pK_a$  du groupe  $\alpha$ -amino et l'encombrement stérique au niveau du site actif.

Par exemple, la présence dans la portion acyle d'une prodrogue ester, d'un groupe  $\alpha$ -amino très ionisé au sein de la proline ( $pK_a$  10,60) induit une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la liaison ester, faisant ainsi des proylesters les esters d'acides aminés les moins stables chimiquement (31-33). Cependant une demi-vie courte peut être recherchée,

comme c'est le cas avec les esters de proline pour des prodrogues de paracétamol à visée sublinguale. Ceux-ci ont une demi-vie extrêmement courte (environ 4 min) à pH 7,4 et vont donc être convertis rapidement en paracétamol après avoir été avalés (26).

L'influence du facteur stérique sur l'hydrolyse chimique est bien démontrée par les amides de dapsonne. Les taux d'hydrolyse de ses prodrogues diminuent dans l'ordre glycine > alanine > phénylalanine > lysine > leucine, ce qui est mieux expliqué par les facteurs stériques au niveau de la liaison amide que par des différences entre les pK<sub>a</sub> (18). Ces facteurs stériques expliquent aussi qu'en incorporant la L-valine, qui possède une chaîne carbonée ramifiée, il ait été développé deux prodrogues maintenant commercialisées ainsi que d'autres prodrogues à base de L-valine, qui montrent toutes une relativement bonne stabilité chimique aux différents pH physiologiques. Nous pouvons citer parmi celles-ci le valacyclovir qui présente une stabilité maximale pour un pH inférieur à 4 et seulement 2 % de la prodrogue étaient hydrolysés après une période de 24h (34).

Enfin la stéréochimie des acides aminés ne semble avoir peu voire pas d'influence sur la stabilité chimique de leur prodrogue (32,33, 35). Bien qu'il y ait quelques règles générales concernant la stabilité chimique des prodrogues à base d'acides aminés, il est surtout important de définir le profil de stabilité de la prodrogue en fonction du pH et de déterminer le pH permettant la meilleure stabilité, ce afin de faciliter les choix de formulation ou d'anticiper les problèmes de stabilité.

## 1-5 Stabilité enzymatique

L'hydrolyse catalysée par diverses hydrolases (*ie*, estérases et/ou peptidases) des esters et amides d'acides aminés se révèle bien plus efficace que l'hydrolyse chimique. La demi-vie des prodrogues est généralement beaucoup plus courte dans le sang ou les homogénats de tissus que dans des solutions aqueuses (36). L'enzyme responsable de l'activation de la prodrogue reste souvent non identifiée.

Cependant, il a été suggéré que la protéine biphénylhydrolase-like, valacyclovirase humaine (VACVase) est responsable au moins en partie de l'hydrolyse des prodrogues de valacyclovir et valganciclovir et serait impliquée dans l'activation d'autres prodrogues à base d'acides aminés (37-39). Comme la spécificité de cette enzyme réside principalement dans le groupement acyle de l'acide aminé et dans une moindre mesure dans la fonction alcool de la molécule mère, et que le groupe  $\alpha$  amine du substrat est important pour son activité, cette

enzyme pourrait être qualifiée d'enzyme activatrice de prodrogues ester d'acides aminés (39-40). La VACVase est plus efficace sur les groupements R courts, hydrophobes (valine, proline) ou aromatiques (phénylalanine) plutôt que les acides aminés chargés (lysine, acide aspartique). Elle a montré une stéréosélectivité claire envers les prodrogues à base de L-valine plutôt que celles basées sur la D-valine, quelle que soit la molécule mère tout en faisant preuve d'une activité hydrolytique comparable pour les esters de D-phénylalanine et L-phénylalanine (38).

Les amides d'acides aminés sont de très mauvais substrats de la VACVase. Cette caractéristique est due à la fois à une faible affinité pour l'enzyme et à une liaison amide beaucoup plus stable. De fait, les prodrogues amides nécessitent un autre mécanisme d'activation hydrolytique. Par exemple plusieurs prodrogues amides de la dapsone se sont avérées être substrats pour la leucine aminopeptidase.

Les prodrogues à base d'acides aminés  $\alpha$  ont également été étudiées afin de cibler spécifiquement des enzymes surexprimées par certains cancers. Ainsi la prodrogue L-propylamide de l'anticancéreux melphalan est un bon substrat de la prolidase, une enzyme surexprimée dans les cas de mélanomes (17).

## **2- Voies d'administration**

L'approche prodrogue est une stratégie fréquemment utilisée pour augmenter la dissolution et la solubilité d'un médicament autrement peu soluble (solubilité  $< 10 \mu\text{M}$ ) et ayant donc une absorption orale limitée et une solubilité insuffisante pour un usage parentérale. Comme vu précédemment, les acides aminés sont d'excellents groupements « pro » pour augmenter la solubilité aqueuse d'une molécule mère. Afin d'accroître la dissolution, les prodrogues d'acides aminés peuvent être transformés sous leur forme sel.

Dans cette partie nous envisagerons des exemples où les prodrogues d'acides aminés ont été pensées afin d'améliorer la biodisponibilité orale, de rendre possible une libération prolongée, une administration parentérale, de cibler un site d'action particulier, ou d'améliorer la stabilité enzymatique.

## 2-1 Amélioration de la biodisponibilité orale

Il existe deux méthodes distinctes afin d'améliorer la biodisponibilité orale : soit par augmentation de la solubilité aqueuse d'un médicament autrement peu soluble, soit par l'augmentation de son absorption, au niveau intestinal notamment :

- amélioration de la solubilité aqueuse.

Nous allons présenter trois situations différentes illustrant cette approche :

L'alaninate de brivanib (BMS-5822664) est une prodrogue ester du brivanib (BSM-540215) en cours d'étude. Le brivanib est un inhibiteur du récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2) et du récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR-1), également étudié comme traitement du carcinome hépatocellulaire et du cancer colorectal (41). Il a une très faible solubilité aqueuse ( $< 1 \mu\text{g/mL}$  à pH 6,5), ce qui rend sa biodisponibilité orale limitée, particulièrement pour des doses importantes.

Par contre l'ester de L-alanine du brivanib présente quant à lui une très bonne solubilité aqueuse ( $73 \text{ mg/mL}$  à pH 5,8) ce qui conduit à une nette amélioration de la biodisponibilité par voie orale du brivanib (52-97 % chez plusieurs modèles animaux). L'alaninate de brivanib est rapidement et complètement converti en brivanib par différentes estérases, très probablement pendant l'absorption et offre donc un excellent moyen d'administrer le brivanib par voie orale (42) (Fig. 11).

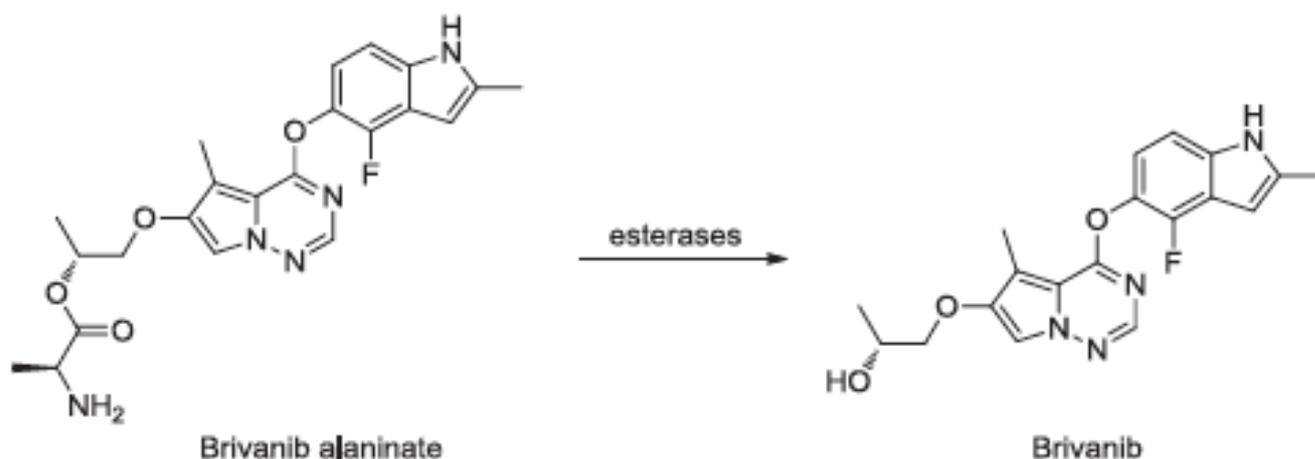
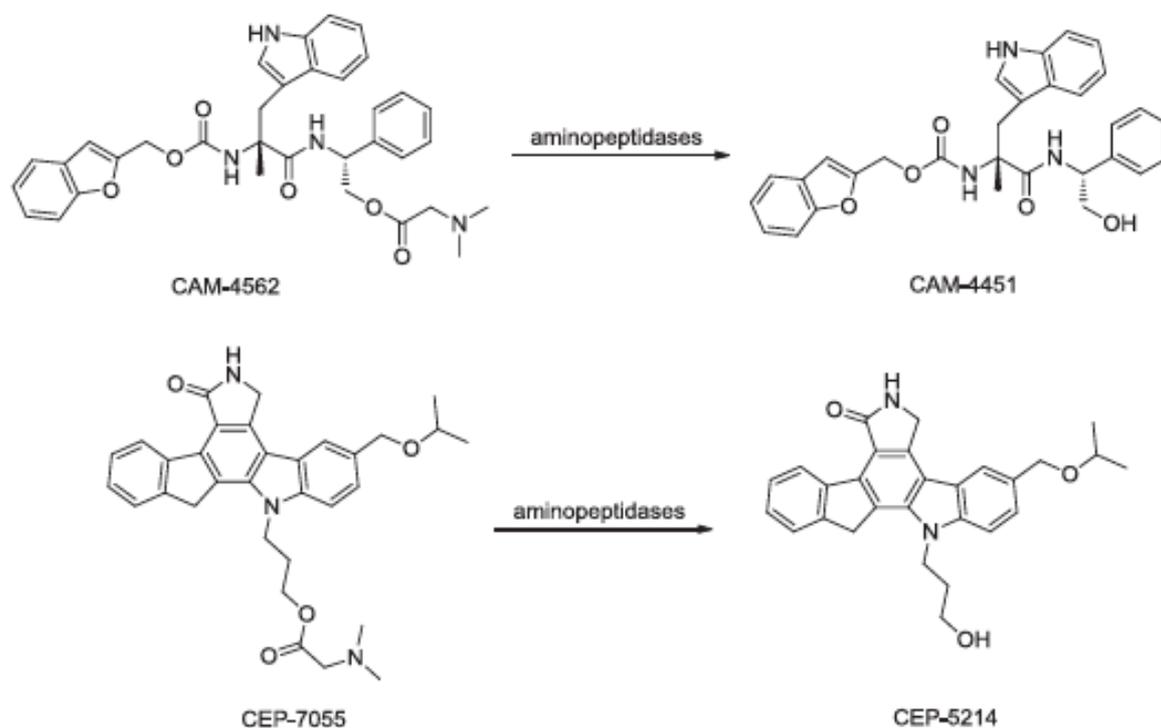


Fig. 11 : Bioconversion de l'alaninate de brivanib vers le brivanib par des estérases

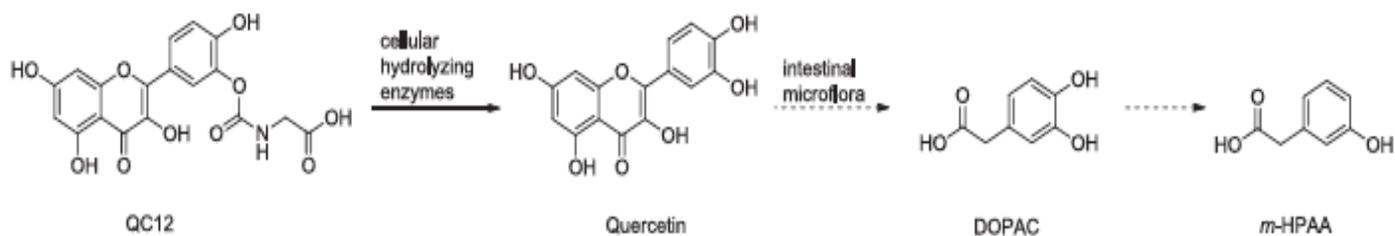
Plusieurs études concernent des molécules à structures pluri-cycliques dont la caractéristique est d'être peu hydrosoluble. L'une d'elle, le CAM-4562 est un ester diméthyle glycine de CAM-4451, un antagoniste spécifique non peptidique du récepteur à la neurokinine NK1, utilisé comme antidépresseur, antiémétique et anxiolytique (10). Celui-ci a une très faible solubilité aqueuse (<2 µg/mL) et par conséquent une mauvaise biodisponibilité par voie orale (10,12). Bien que la leucine augmente un peu la solubilité (0,1 mg/mL), la prodrogue à base de diméthyl glycine, CAM-5562, a une solubilité 1500 fois supérieure (3 mg/mL) et une biodisponibilité orale environ 3 fois plus importante (39 %) que celle de la molécule mère (10).

De plus CAM-5562 a montré une hydrolyse plus sélective vers la molécule mère par des aminopeptidases au niveau de la bordure en brosse du tractus gastro-intestinal, alors que l'ester de leucine s'est montré plus susceptible à l'hydrolyse avant d'atteindre cette bordure, ce qui peut causer des potentiels problèmes de précipitation avant l'absorption (Fig. 12).



**Fig. 12 :** Bioconversion des prodrogues CAM-4562 et CEP-7055 vers leur molécules mères, CAM-4451 et CEP-5214, par des aminopeptidases

Un autre molécule également étudiée est la QC12, qui est une prodrogue de la quercétine (3',4',3,5,7-tetra-hydroxyflavone), où l'un des groupes phénols de la molécule mère est rattaché à une glycine via une liaison carbamate (13,43). La quercétine est un flavonoïde d'origine naturelle possédant de nombreuses activités biologiques, notamment l'inhibition de tyrosine kinases (44). Cependant, elle est insoluble en milieu aqueux, ce qui a nécessité la dissolution de cet agent anti-tumoral dans du diméthylsulphoxide (DMSO) *in vivo*. Le QC12 a une solubilité aqueuse bien plus importante que la quercétine. Il est activé par des hydrolases cellulaires, très probablement avant ou pendant l'absorption (Fig. 13).



**Fig. 13 :** Bioconversion de la prodrogue à liaison carbamate de la quercétine, QC12, par hydrolyse enzymatique cellulaire, et les formations de ses métabolites, DOPAC et m-HPAA par la flore intestinale.

- utilisation des transporteurs intestinaux :

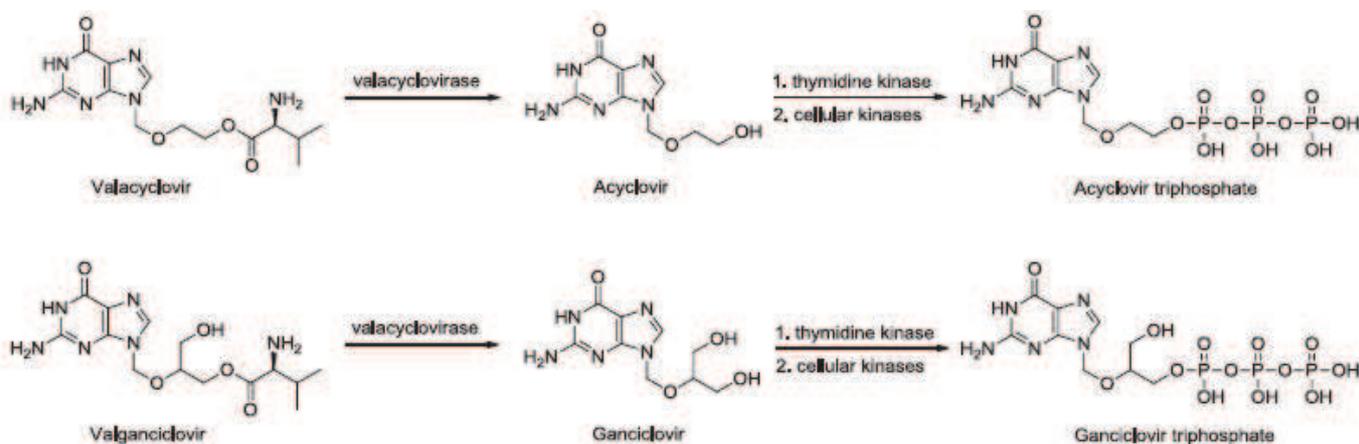
Les acides aminés étant chargés au pH des fluides physiologiques, ils ont une faible perméabilité membranaire et sont donc spécifiquement transportés à travers la bicouche lipidique par des transporteurs actifs (énergie dépendants) d'acides aminés et peptides. Les prodrogues utilisant les acides aminés développées pour être prises en charge par ces transporteurs doivent donc imiter les propriétés structurales des substrats naturels de ces transporteurs (45,46).

La muqueuse intestinale exprime plusieurs transporteurs d'acides aminés et de peptides, parmi les plus abondants on retrouve le transporteur de peptide couplé au proton PepT1 appelé SLC15A1 et le transporteur d'acides aminés neutre  $\text{Na}^+$  dépendant  $\text{ATB}^{0,+}$  nommé SLC6A14. Ces deux transporteurs sont exprimés de manière relativement importante au niveau de la surface apicale des entérocytes et ont une grande capacité, ce qui assure un passage rapide de leur substrat. Comme ils reconnaissent tous deux une grande variété de

substrats, ils s'avèrent être des transporteurs idéaux pour faire traverser la muqueuse intestinale aux prodrogues à base d'acides aminés ou de peptides (45,47).

Ainsi, l'ester de L-valyle est certainement le premier exemple commercial d'une prodrogue à base d'acides aminés utilisant les transporteurs intestinaux pour augmenter la perméabilité et donc améliorer la biodisponibilité orale de leur molécule mère. A ce titre, le valacyclovir fut le pionnier des prodrogues d'ester de L-valyle, permettant une biodisponibilité orale 3 à 5 fois plus importante (> 60 %) que celle de sa molécule mère, l'acyclovir (10-20 %) (48). Le valacyclovir est absorbé par les transporteurs PepT1 et ATB<sup>0,+</sup>, puis ensuite hydrolysé rapidement par la valacyclovirase qui est une enzyme biphenylhydrolase-like (3) (49) (37). L'acyclovir est en fait, comme tous les nucléosides, une pré-prodrogue ou double prodrogue, puisqu'après l'hydrolyse du groupement valine, l'acyclovir est phosphorylé en monophosphate par des enzymes virales spécifiques, des thymidines kinases et enfin converti en di- et triphosphates par les kinases cellulaires (Fig. 14) (50,51). L'acyclovir triphosphate agit comme agent antiviral en inhibant la réplication de l'ADN viral.

Peu après la découverte du valacyclovir, fut conçu le valganciclovir (Rovalcyte<sup>®</sup>). Il est lui aussi absorbé par les transporteurs PepT1 et ATB<sup>0,+</sup>, puis activé par la valacyclovirase (Fig. 14) (4) (37). Sa biodisponibilité orale est d'environ 60 %, ce qui est 10 fois plus élevé que la biodisponibilité orale du ganciclovir (6-8 %) (52,53). Le succès de ces deux médicaments a prouvé l'intérêt que présentait la L-valine en tant que prodrogue pour améliorer la biodisponibilité orale et l'utilisation des transporteurs d'acides aminés. C'est pourquoi, d'autres prodrogues ester de L-valyle sont en cours d'évaluation clinique, notamment la valopicitabine, valtorcitabine (54).

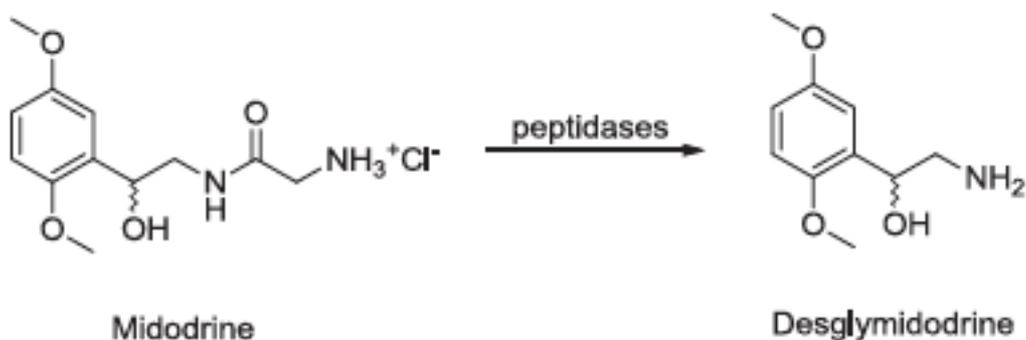


**Fig. 14** : Bioconversion du valacyclovir et valganciclovir vers leur molécules mère par la valacyclovirase et phosphorylation par des kinases.

Pour autant, il existe d'autres exemples de prodrogues d'acides aminés conçues pour être absorbées par des récepteurs intestinaux.

L'une d'elle est la midodrine (Gutron<sup>®</sup>), une prodrogue du desglymidodrine (DMAE) utilisant la glycine. Celle-ci est rattachée à un groupement amine du DMAE par une liaison amide (Fig. 15). La biodisponibilité orale de la midodrine est de 93 %. Ce qui est deux fois plus important que pour le DMAE. Cette prodrogue est principalement absorbée par le transporteur PepT1 et convertie par des peptidases encore non identifiées au niveau du foie et de la circulation générale (55,56). La libération du DMAE agit ensuite au niveau périphérique en tant qu'agoniste sélectif des récepteurs  $\alpha_1$ .

La midodrine est utilisée avec succès pour traiter les cas d'hypotension orthostatique et les hypotensions dans le cadre de dialyse.



**Fig. 15** : Bioconversion de la prodrogue à liaison amide de la midodrine par des peptidases

Le baclofène et la gabapentine ont des analogues structuraux du GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) utilisé dans le traitement de diverses pathologies neurologiques. Ils possèdent tous les deux des caractéristiques de structures similaires aux acides aminés, et sont absorbés dans la partie haute du petit intestin, probablement par un transporteur de L-acides aminés. XP13512 et XP19986 sont respectivement des prodrogues de la gabapentine et du baclofène, dont le but est de dépasser les limites pharmacocinétiques de leur molécule mère (Fig. 16) (57,58). Le transport de ces prodrogues est réalisé par un transporteur monocarboxylate de type 1 (MCT-1) et le transporteur multi-vitaminique sodium dépendant (SMVT) (57,58).

Ces prodrogues démontrent un peu plus l'intérêt de prodrogues acides aminés qui ciblent des transporteurs autres que ceux des oligopeptides exprimés dans le tube digestif.

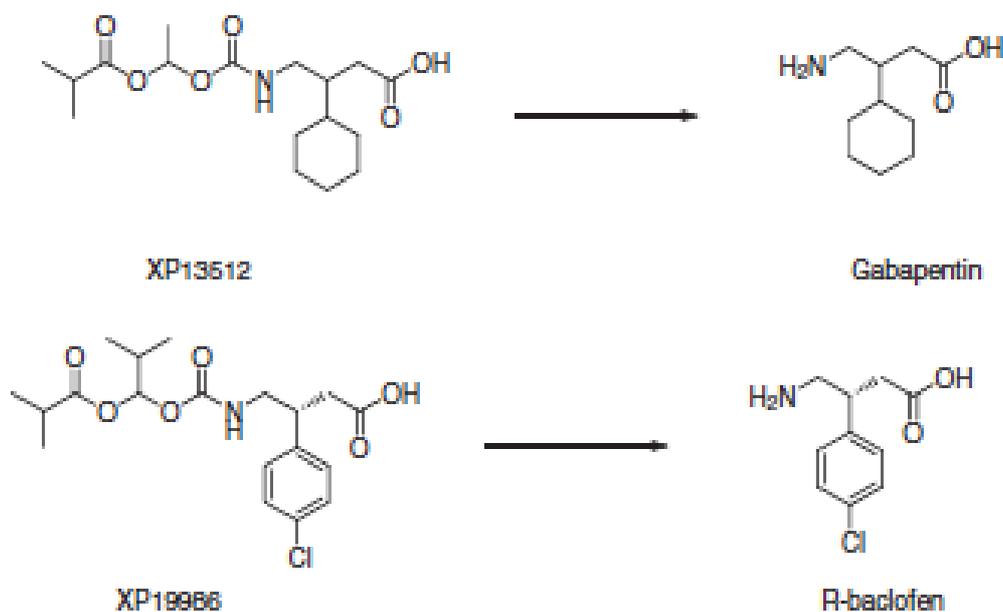


Fig. 16 : Bioconversion de XP13512 et XP19986 par des hydrolases cellulaires

## 2-2 Libération prolongée

L'un des champs les plus étudiés dans le développement de médicaments est la recherche de principes actifs ayant une longue durée d'action. On parle de libération prolongée lorsque la libération, et donc l'absorption du médicament, se fait de manière régulière et contrôlée dans le temps, et ce dans le but de maximiser l'effet thérapeutique ou bien de diminuer les éventuels effets secondaires.

Contrairement aux libérations prolongées liée à la formulation galénique qui implique des liposomes, des microsphères ou encore des hydrogels, la libération prolongée obtenue par les prodrogues résulte des réactions de bioactivation du médicament. En fonction de l'approche choisie, la bioactivation peut avoir lieu au niveau des entérocytes, dans la circulation générale, ou dans des cellules spécifiques. De plus la constance des vitesses d'hydrolyse, donc de libération, rend ces prodrogues moins sensibles aux variations liées à l'absorption comparées aux systèmes de libération prolongée basés sur la formulation. En conséquence, les amides d'acides aminés offrent une bonne opportunité de produire des prodrogues à libération prolongée étant donné que les liaisons amides sont généralement plus résistantes aux hydrolyses que les liaisons esters. De la même manière les D-acides aminés

seront privilégiés par rapport aux L-acides aminés, car plus résistants aux hydrolyses enzymatiques.

Ce phénomène peut être illustré par la prodrogue dimésylate de lisdexamfétamine (LDX, Vyvanse®) qui est une prodrogue amide de L-lysine et de D-amphétamine, utilisé comme psychostimulant pour les troubles, déficits de l'attention/hyperactivité (TDAH) chez les enfants de 6-12 ans ainsi que les adultes (59). Le LDX est absorbé sous forme intacte principalement par ce qui semble être le PepT1 et/ou d'autres transporteurs d'acides aminés, et libère la molécule mère, l'amphétamine, essentiellement dans les hématies (Fig. 17) (60).

La libération prolongée, et la longue durée d'action qui en découle permettent une administration unique du produit. Le principal atout de ce médicament réside dans le fait qu'étant une prodrogue à libération prolongée, les risques potentiels d'abus que les autres amphétamines présentent si injectée ou inhalée en sont réduits (61).

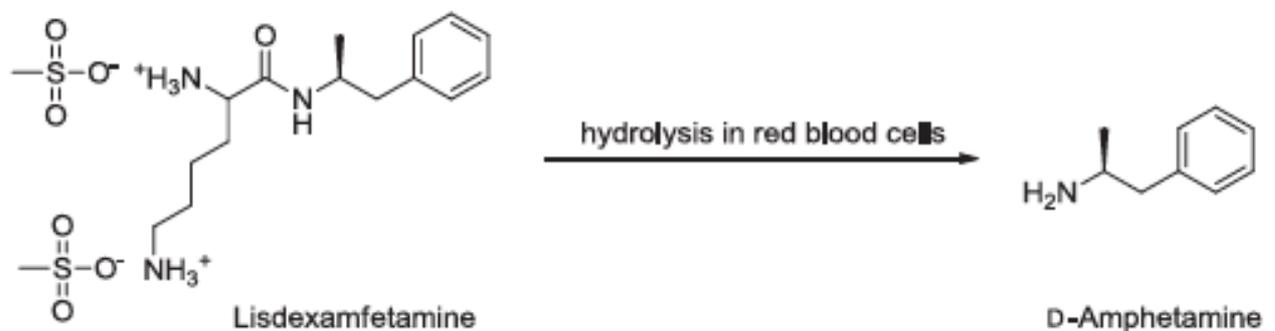


Fig. 17 : Libération prolongée d'amphétamine à partir de sa prodrogue, la lisdexamfétamine dans les hématies

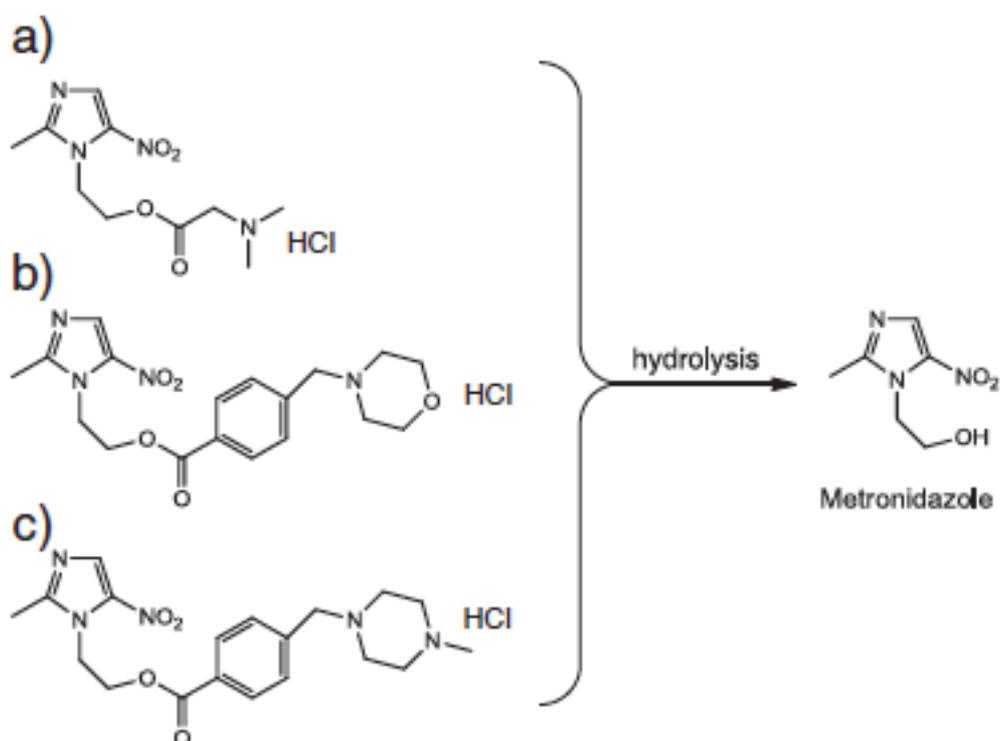
## 2-3 Administration parentérale

Les médicaments sous forme injectables permettent de délivrer la dose complète rapidement dans la circulation sanguine. Cependant, par rapport à la voie orale, les critères assurant leur innocuité sont plus stricts. Notamment en ce qui concerne la stabilité, la stérilité, et l'absence de particules dans la solution, qui pourraient créer embolies pulmonaires ou thromboses veineuses. Une bonne solubilité aqueuse est donc requise pour les médicaments destinés à cette voie. Pour celles n'ayant pas une solubilité suffisante, souvent des solvants organiques, solubilisants, ou surfactants sont utilisés afin d'améliorer la solubilité du médicament dans la solution.

Lorsque l'approche galénique s'est montrée insuffisante, voire toxique, la stratégie des prodrogues a été utilisée afin d'augmenter la solubilité aqueuse. Parmi celles-ci, les prodrogues à base d'acides aminés se sont révélées intéressantes et nous allons en étudier quatre exemples révélateurs.

Bundgaard et al. ont synthétisé différentes prodrogues d'un médicament peu soluble, le métronidazole, en utilisant des esters d'acides aminés, pour une utilisation parentérale (14). Le métronidazole, est un médicament antibiotique et antiparasitaire souvent utilisé par voie orale. Cependant, une administration intraveineuse est parfois nécessaire pour sa rapidité d'action.

Le chlorhydrate de métronidazole N,N-diméthylglycinate (Fig. 18a) est très soluble (> 0,5 g/mL) et s'est avéré être le candidat le plus prometteur pour une administration parentérale. Cette prodrogue libère le métronidazole rapidement et en quantité (80 %) dans le plasma et la circulation générale avec une demi-vie de 12 min et 9,5 min respectivement. De plus, on a observé une conversion rapide vers le métronidazole après une administration intraveineuse sur les modèles animaux (24). Malheureusement, la mauvaise stabilité du N,N-diméthylglycinate de métronidazole limite sa formulation à des solutions à utiliser extemporanément. Dans le but d'augmenter cette stabilité, un groupement phényle a été incorporé entre le groupement ester et le groupement électroattracteur aminé (27,29). Les esters aminométhylbenzoate de métronidazole (Fig. 18b et c) ont une solubilité importante (> 0,1 g/mL) et une bonne stabilité chimique en solution aqueuse. Ils permettent une libération de 80 % de métronidazole dans le plasma et la circulation générale avec une demi-vie de 0,4 min et 0,6 min respectivement.



**Fig. 18** : Structures chimiques des prodrogues de métronidazole développées pour une libération prolongée.

Un autre exemple de principe actif étudié en vue d'une administration parentérale est la rapamycine (ou Sirolimus<sup>®</sup>) qui est un immunodépresseur utilisé pour prévenir les rejets de greffes d'organes, notamment rénales. Elle présente une faible solubilité aqueuse et une mauvaise biodisponibilité par voie orale. Le rapamycin-28-N,N-diméthylglycinate, est une prodrogue à base de glycine et à liaison ester. Celle-ci présente une bonne solubilité (> 50 mg/mL) qui permet une utilisation parentérale de la molécule (Fig. 19) (62).

Cependant, la mauvaise stabilité ne permet pas la préparation de formule prête à l'usage. Lors des essais précliniques chez la souris, des doses intraveineuses de 10 à 100 mg/kg ont montré des concentrations de rapamycine détectables dans le plasma jusqu'à 5-12 h après l'administration. Ceci pourrait permettre une délivrance prolongée de la molécule mère (63).

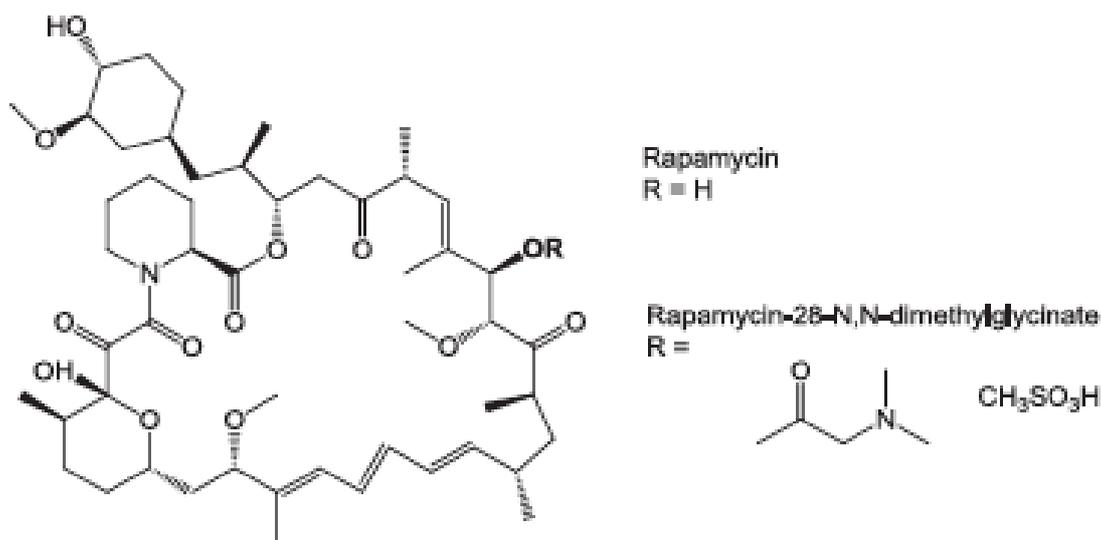


Fig. 19 : Structures chimiques de la rapamycine et sa prodrogue à base de 28-N,N-diméthylglycinate.

Pour la carbamazépine qui est une molécule pluri-cyclique, par conséquent présentant une faible solubilité aqueuse (0,12 mg/mL) et largement utilisé comme antiépileptique par voie orale, il n'existe pas de forme injectable. L'absence d'une telle formulation a conduit à la synthèse d'une prodrogue N-glycyle de la carbamazépine (Fig. 20). La glycine est reliée à la molécule mère via l'azote du groupement urée formant une fonction peptide-like acyl-urée (64).

La solubilité aqueuse la N-glycyle carbamazépine s'est révélée être de 4,4 mg/mL et l'extrapolation de ces résultats pouvait permettre d'envisager une solubilité à 50 mg/mL à pH 4. La prodrogue a démontré une conversion rapide et complète vers la carbamazépine ( $T_{1/2}$  d'environ 1min) après administration intraveineuse chez le rat (65), mais du fait de son instabilité chimique en solution ( $T_{90\%} = 5,9$  jours à pH 4, 25°C), la préparation d'une forme parentérale est limitée à une forme lyophilisée à reconstituer extemporanément.

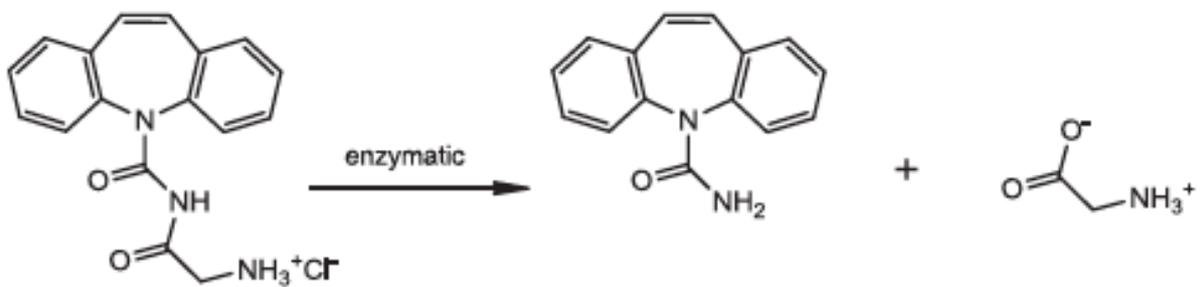


Fig. 20 : Conversion de la N-glycyl carbamazépine vers la carbamazépine *in vivo*

Enfin, une autre prodrogue de la carbamazépine, la N-cystéamine carbamazépine a aussi été développée pour une utilisation intraveineuse (66). La solubilité aqueuse des dérivés de N-cystéamine dépasse 100 mg/mL à pH 2,6 et la durée de conservation ( $T_{90\%}$ ) était de 320 jours à pH 4 à 25°C. Après administration par intraveineuse d'une dose de prodrogue de N-cystéamide chez le rat, la carbamazépine a été immédiatement retrouvée dans le plasma alors qu'aucune trace de prodrogue intacte n'a été observée, suggérant que la conversion vers la molécule mère s'opère de manière très rapide et probablement via une réaction avec le glutathion (66) (fig 21).

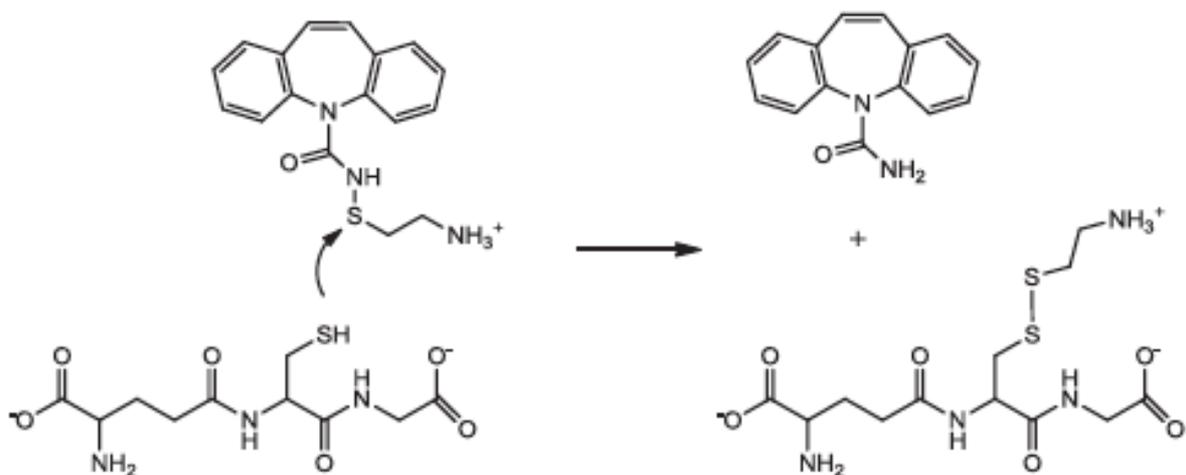


Fig. 21 : mécanisme supposé pour la conversion de la N-cystéamine carbamazépine vers la carbamazépine, impliquant une attaque nucléophile par le glutathion.

## 2-4 Ciblage thérapeutique

La capacité d'un nouveau médicament à ne pouvoir cibler que les cellules malades sans affecter les cellules saines a toujours été un enjeu majeur lors du développement de médicament dont la fenêtre thérapeutique est étroite. Ce besoin de sélectivité s'est accru avec la recrudescence des cas de cancers ces dernières décennies étant donné la potentielle toxicité intrinsèque des traitements anticancéreux classiques.

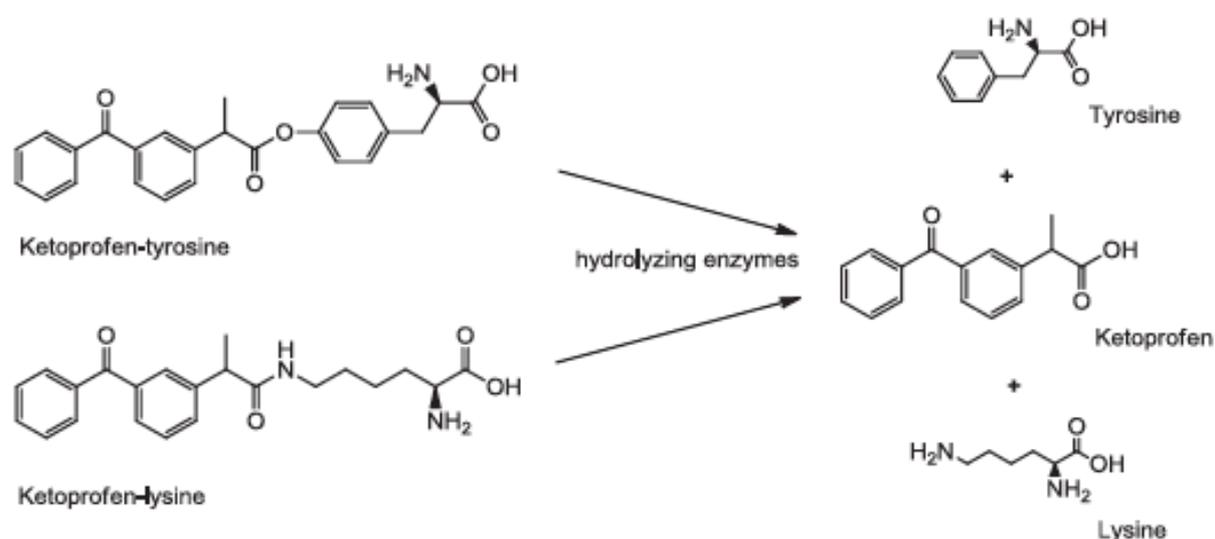
Lors du développement d'un médicament prodrogue, le ciblage thérapeutique peut être obtenu soit par un transport sélectif du médicament au site d'action soit par une activation de la prodrogue sélective au site d'action. La libération d'un médicament sur un site d'action particulier est un objectif parfois compliqué à atteindre à cause des nombreuses et complexes barrières retrouvées dans le corps humain. Néanmoins, les prodrogues à base d'acides aminés ont démontré un certain succès dans le ciblage de médicaments pour les organes comme les yeux, le cerveau, ou plus généralement dans le ciblage de médicament anticancéreux.

Une des stratégies utilisées pour améliorer la libération d'une prodrogue d'acides aminés sur un site d'action particulier, consiste à tirer profit de la surexpression de certains transporteurs de nutriments par certains organes. Comme vu précédemment, l'absorption orale de certaines molécules est améliorée par un ciblage du transporteur PepT1 exprimé au niveau du tractus gastro-intestinal.

Ainsi, PepT1 est impliqué dans l'augmentation de la biodisponibilité au niveau oculaire de différentes prodrogues à base de dipeptides, tel que l'acyclovir ou le ganciclovir (67,68). La plus grande expression des récepteurs PepT1 dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines a également permis une accumulation sélective de la prodrogue à base d'acides aminés à liaison ester de la fluxoridine, un anticancéreux, au niveau de ces cellules (31).

D'autres transporteurs ont été mis en évidence pour leurs rôles dans une meilleure accumulation de prodrogues à base d'acides aminés au sein de cellules cancéreuses. Ainsi, les transporteurs ATB<sup>0,+</sup>, ATA1, ATA2 et ASCT2 ont permis une pénétration 5 fois plus importante de la prodrogue d'ester de valine de SN-38, un métabolite actif de l'irinotécan utilisé comme anticancéreux, au sein la lignée cellulaire du cancer du sein MCF7 (69).

De la même manière, l'expression plus importante du transporteur LAT1 au niveau de la barrière hémato-encéphalique a été utilisée pour faciliter le passage de prodrogues de kétoprofène et d'acide valproïque jusqu'au cerveau (70-72). Les prodrogues L-tyrosine et L-lysine de kétoprofène ont démontré une absorption au niveau du cerveau, dose dépendante, mais saturable lors d'expériences d'injections *in situ* chez le rat. Cette absorption a été inhibée par l'administration d'acide 2-aminobicyclo(2,2,1)heptane-2-carboxylique (BCH), un inhibiteur avéré du récepteur LAT1, suggérant que ces prodrogues sont acheminées au cerveau par son intermédiaire (Fig. 22). De plus, après des injections bolus de la prodrogue chez le rat, ont été détectés à la fois la prodrogue et le kétoprofène au niveau du cerveau.



**Fig. 22** : Structures chimiques et activation de prodrogues de kétoprofène développées pour être prise en charge par le transporteur LAT1.

Il est à noter que la présence d'enzymes spécifiques d'un tissu, ou exprimées de manière plus importante, par rapport au reste de l'organisme, est une propriété qui peut être exploitée pour une conversion sélective d'une prodrogue, permettant ainsi un ciblage. Par exemple, certaines tumeurs ont montré une activité accrue de leur prolidase par rapport aux tissus sains, ce qui pourrait être utilisé dans le développement d'une prodrogue destinée à être activée par cette enzyme.

Ainsi des prodrogues à base de proline du melphalan et du méthotrexate ont été développées pour être substrat d'une imidodipeptidase : la prolidase, cytosolique spécifique (73-74). Ces deux prodrogues ont montré une plus grande cytotoxicité pour les cellules de cancers du sein de la lignée cellulaire MDA-MB-231 par rapport à leur molécule mère.

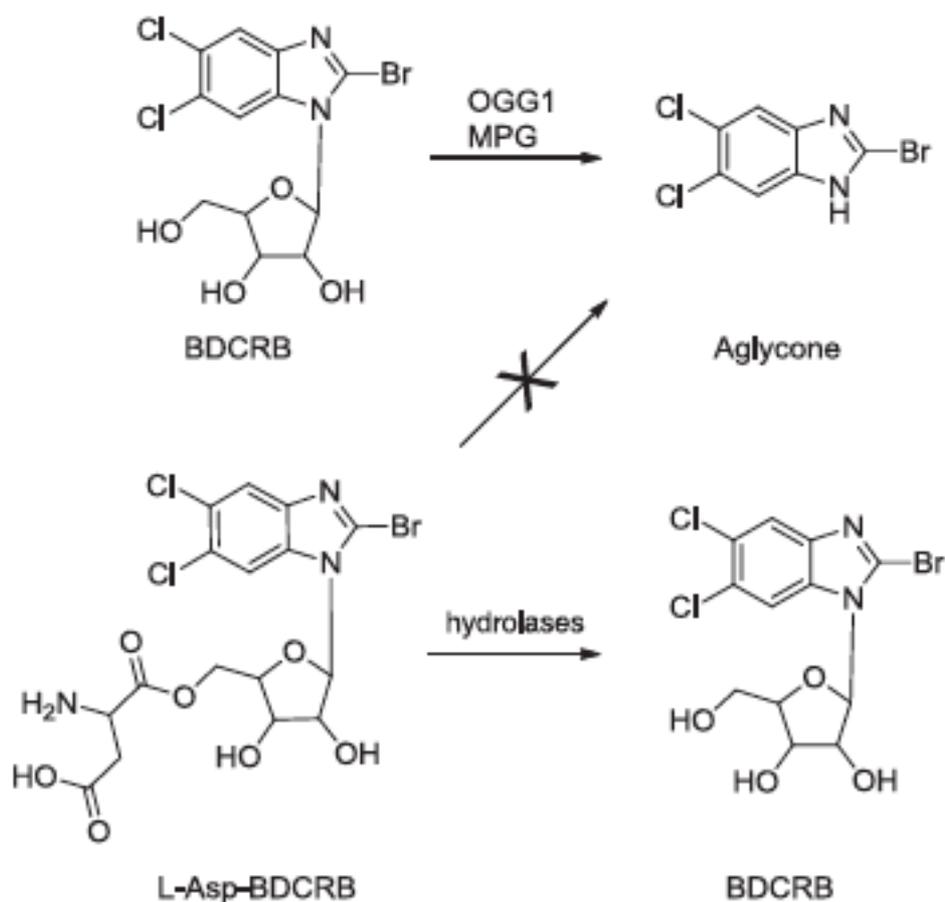
Ceci peut s'expliquer par deux mécanismes : tout d'abord une meilleure distribution de ces prodrogues dans les cellules MDA-MB-231 probablement grâce à des mécanismes de transporteurs, et également par une activité prolidase plus importante au niveau de cette lignée cellulaire par rapport aux cellules saines.

## 2-5 Meilleure stabilité métabolique

L'approche des prodrogues à base d'acides aminés a été utilisée avec succès pour améliorer la stabilité vis-à-vis du métabolisme de certains médicaments à structure nucléosidique.

Par exemple, le 2-bromo-5,6-dichloro-1( $\beta$ -D-ribofuranosyl)benzimidazole (BDCRB) est un inhibiteur puissant et sélectif du cytomegalovirus humain (HCMV), mais il ne fait l'objet d'aucune utilisation thérapeutique car son métabolisme *in vivo* est trop rapide. La liaison N-glycosidic du BDCRB est clivée par deux enzymes, la 8-oxoguanine ADN glycolase (OGG1) et la N-méthylpurine ADN glycolase (MPG), rendant la molécule inactive (Fig. 23) (75). Des prodrogues de type ester d'acides aminés du BDCRB ont été synthétisées afin d'augmenter l'efficacité *in vitro* et *in vivo* (76).

C'est ainsi que le L-Asp-BDCRB a montré une activité antivirale puissante et sélective en plus d'une meilleure stabilité par rapport au BDCRB (Fig. 23). Il est rapidement absorbé après administration orale chez la souris et montre une demi-vie 5 fois supérieure à celle du BDCRB (76).

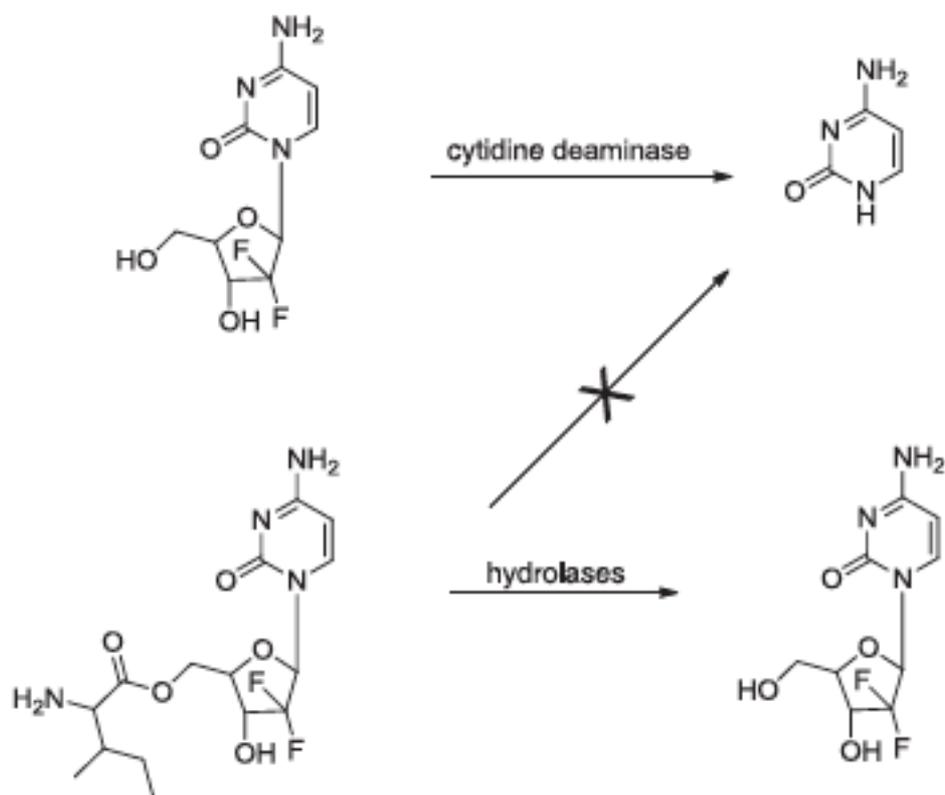


**Fig. 23** : Clivage de la liaison N-glycosidique du BDCRB par la 8-oxoguanine ADN glycolase (OGG1) et la N-méthylpurine ADN glycolase (MPG) et résistance de la prodrogue L-Asp-BDCRB vis à vis de ces enzymes.

Par ailleurs nous pouvons citer aussi la gemcitabine qui est un médicament anticancéreux polaire à faible perméabilité membranaire dont l'administration se fait par voie intraveineuse. Dans l'organisme le groupement cytidine subit un clivage de la liaison glycosidique par des cytidine-désaminases, ce qui rend la molécule inactive (Fig. 24).

De nombreuses prodrogues à base d'esters d'acides aminés ont été synthétisées afin d'améliorer la biodisponibilité orale via des transporteurs d'oligopeptides et d'augmenter la stabilité enzymatique vis-à-vis des cytidine-désaminases (35). La prodrogue 5'-L-isoleucyl-gemcitabine a permis un meilleur transport dans les cellules exprimant hPEPT1. Contrairement à la val-gemcitabine, elle a montré une bioconversion plus lente dans les homogénats de cellules Caco-2 et dans le plasma humain ainsi qu'une résistance remarquable à l'activité des cytidine-désaminases (Fig. 24).

Ces propriétés pourraient aboutir à une demi-vie plus longue dans la circulation systémique et faciliter le ciblage de cellules suréxprimant le transporteur hPEPT1 (35).



**Fig. 24** : Clivage de la liaison N-glycosidique de la gemcitabine par une cytidine désaminase et augmentation de sa stabilité lors de sa conversion vers la prodrogue L-Ile-gemcitabine.

### III Intérêts pratiques et industriels

Le développement de prodrogues à base d'acides aminés, comme tout médicament, peut poser un certain nombre de problèmes qu'il convient de considérer tout au long des différentes étapes de développement. Ces défis sont généralement associés à de nombreuses phases que nous pouvons décliner ainsi : les étapes de synthèse, les étapes de screening *in vitro* et *in vivo*, les méthodes d'analyses, les étapes de formulations galéniques, les évaluations du métabolisme et de la pharmacocinétique, les évaluations de sécurité et toxicologie et enfin les considérations réglementaires.

#### 1- Découverte et screening

Le développement d'une prodrogue est un processus itératif qui implique la synthèse de différentes prodrogues suivie d'évaluations *in vitro* et *in vivo* permettant de déterminer si le profil voulu (physicochimique, pharmacocinétique et/ou pharmacodynamique) est atteint. Les chercheurs ont à leur disposition un certain nombre d'outils afin d'établir les caractéristiques physico-chimiques et pharmaceutiques des prodrogues. Il est important de s'assurer que les tests *in vitro* et *in vivo* utilisés pour vérifier l'intérêt de cette approche (*ie* : une amélioration de la solubilité, stabilité, *etc*) sont transposables chez l'Homme afin d'éviter les déconvenues lors des essais cliniques. La caractérisation d'une prodrogue *per os* destinée à être convertie vers la molécule mère avant d'atteindre la circulation systémique nécessite une évaluation systématique de la prodrogue (solubilité, perméabilité, stabilité chimique, bioconversion, pharmacocinétique, *etc.*) et aussi de sa molécule mère (liaison aux protéines, stabilité dans le sérum, métabolisme, pharmacocinétique, *etc.*).

La détermination de la solubilité, qui est une étude habituellement simple et banale (77), peut poser certains problèmes lorsqu'il s'agit des prodrogues. En effet, la complexité de cette étude est liée à l'instabilité des prodrogues lors de l'évaluation de la solubilité à l'équilibre. Une conversion non négligeable (> 10 %) de la prodrogue (très soluble) vers la molécule mère (peu soluble) peut compliquer la lecture des résultats de solubilité.

Dans ces conditions, il est possible d'utiliser la solubilité apparente (solubilité à un moment donné où la dégradation de la prodrogue est négligeable). De la même manière la détermination de la perméabilité peut s'avérer compliquée pour les prodrogues (78). La lignée

cellulaire Caco-2 est la plus utilisée pour déterminer la perméabilité d'un médicament, mais elle exprime un certain nombre d'estérases et d'enzymes qui peuvent convertir la prodrogue vers la molécule mère soit du côté apical soit dans le cytosol. De ce fait, il peut être nécessaire d'évaluer la perméabilité de la prodrogue et de la molécule mère (11).

Cependant, le modèle de perméabilité Caco-2 peut être utilisé pour mieux comprendre la vitesse et l'étendue de la conversion de la prodrogue. Pour les prodrogues destinées à utiliser un transporteur spécifique, des modèles cellulaires exprimant ce ou ces transporteur(s) d'intérêt doivent être étudiés. L'importance de ces études *in vitro* a été démontrée lors de l'évaluation du ciblage des transporteurs intestinaux humains hPEPT1 et LAT1 par les prodrogues à base d'acides aminés (3, 4, 72).

L'un des principaux problèmes que posent les prodrogues réside dans la difficulté de prévoir les taux de bioconversion de celles-ci *in vivo* (79). La stabilité chimique et les mécanismes d'hydrolyse des prodrogues peuvent être déterminés en utilisant des principes de cinétique chimique bien connus. Malheureusement, prédire le taux de bioconversion *in vivo* en se basant sur des outils *in vitro* et des modèles animaux reste difficile. La grande diversité d'hydrolases et les différences inter-espèces rendent l'extrapolation à l'Homme compliquée. Il est donc important de sélectionner des modèles animaux qui se rapprochent le plus possible de l'Homme. De plus, les prodrogues peuvent montrer des variabilités inter-individuelles de la vitesse de bioconversion, dues à des facteurs comme l'âge, le genre, les éventuelles pathologies ou états physiologiques différents.

Les acides aminés introduisant un cation ( $pK_a$  d'un groupement  $\alpha$ -amino est autour de 6,8-7,9) ou un anion ( $pK_a$  d'un groupement acide carboxylique est autour de 3,5-4,3) sur la molécule mère, cela peut entraîner une solubilité dépendant du pH (Fig. 9) et potentiellement influencer l'absorption, ou mener à des interactions avec des médicaments modifiant le pH gastrique.

## 2- Synthèse

Tout comme les autres types de prodrogues, celles à base d'acides aminés peuvent poser un certain nombre de difficultés relatives à leur synthèse. La chimie des liaisons entre les acides aminés et la molécule mère est bien documentée, et les principales difficultés vont plutôt dépendre du nombre et du type de groupements protecteurs requis pour masquer les groupements actifs de l'acide aminé et de la molécule mère. L'ajout d'un acide aminé à la molécule mère va généralement générer 2 étapes de synthèse supplémentaires. L'ajout de ces étapes de synthèse et la protection des groupements fonctionnels peut aboutir à une augmentation du nombre total d'impuretés et donc une purification plus difficile. Ces étapes supplémentaires entraînent inévitablement une diminution du rendement de production du principe actif.

De plus, tous les acides aminés, sauf la glycine, introduisent un stéréocentre à la prodrogue. Cette dernière peut déjà présenter un ou plusieurs stéréocentres, conduisant  $2^n$  stéréoisomères potentiels, où  $n$  est le nombre de stéréocentres. De la même manière qu'avec les autres prodrogues, l'ajout d'un acide aminé à la molécule mère augmente la masse moléculaire de celle-ci. Par exemple, la forme chlorhydrate de valine via une liaison ester, augmente la masse moléculaire de manière non négligeable, pouvant rendre moins facile le franchissement des membranes.

Il faut donc garder à l'esprit la potentielle augmentation de la dose induite par la part « non active » de la prodrogue, par rapport à l'augmentation de biodisponibilité qu'elle apporte. En effet, l'amélioration de la biodisponibilité du principe actif ne doit pas se faire au prix d'un comprimé qui deviendrait trop imposant pour être pris par voie orale. La notion de compromis entre le bénéfice apporté par la prodrogue et les contraintes pratiques qu'elle implique reste donc essentielle.

## 3- Analyses

Les prodrogues à base d'acides aminés présentent une variété de challenges quant à la démarche analytique, notamment lors de l'analyse quantitative de la prodrogue, de la molécule mère, des produits de dégradations et métabolites, que ce soit à partir d'un extrait pur de principe actif, ou d'échantillons issus de sang, d'urines, ou d'autres sources *in vitro* (80).

Il est attendu que la prodrogue et sa molécule mère possèdent des propriétés physico-chimiques bien différentes. Par conséquent, les conditions optimales de chromatographie liquide (LC) ou de spectrographie de masse (MS) peuvent varier de manière importante en fonction du produit dosé. Les chimistes analytiques doivent faire la balance entre le choix d'une méthode utilisant une seule LC/MS potentiellement suboptimale, et des méthodes d'analyses séparées, plus chronophages.

Du fait de la présence d'un ou plusieurs stéréocentre(s) au sein des prodrogues à base d'acides aminés, l'analyse d'un diastéréoisomère peut être délicate et nécessite dans la plupart des cas l'usage d'HPLC (chromatographie liquide à haute performance) chirale, plus onéreuse.

De plus, il est important de déterminer la stabilité des prodrogues dans les différentes matrices utilisées pour l'analyse, et des protocoles nécessaires doivent être établis afin de s'assurer que les prodrogues ne se dégradent pas dans les échantillons et durant l'analyse. Il est d'autant plus indispensable de déterminer de façon précise la quantité de prodrogue et de molécule mère, dans la mesure où ces données peuvent influencer les résultats analytiques et les modélisations pharmacocinétiques.

#### **4- Formulation et stabilité**

Les problématiques de stabilité que posent les prodrogues à base d'acides aminés sont les mêmes que pour les autres types de prodrogues et sont essentiellement dépendantes de la stabilité chimique de la liaison entre la molécule mère et le groupement « pro ». Les prodrogues doivent avoir une balance positive entre une bonne stabilité chimique nécessaire à une durée de conservation du médicament satisfaisante, et une conversion rapide vers la molécule active *in vivo*.

De ce fait, les prodrogues développées doivent porter une liaison résultant d'un compromis entre la stabilité pour franchir la membrane et sa rupture permettant de libérer le principe actif. La plupart des solutions de prodrogues ne sont pas assez stables chimiquement pour permettre un développement de solutions prêtes à l'emploi pour un usage parentéral ou oral (par exemple les formes pédiatriques).

Par conséquent, la plupart des prodrogues destinées à une administration parentérale sont formulées sous forme de lyophilisats et les formes orales sont formulées sous formes solides (comprimés ou gélules par exemple).

Concernant ces dernières, la stabilité des prodrogues peut limiter les choix de formulation. Ainsi, la granulation humide est généralement évitée pour les molécules hydrolysables. Cependant, une évaluation minutieuse du meilleur procédé à adopter est nécessaire.

Par exemple, dans le cas de la prodrogue DMP 754, une prodrogue à liaison ester d'un antagoniste aux récepteurs aux glycoprotéines IIb/IIIa, les comprimés et capsules fabriqués par granulation humide étaient plus stables que ceux obtenus par granulation sèche (81). Les auteurs ont attribué cela à une meilleure distribution de l'agent tampon, le disodium citrate, utilisé pour maintenir un pH optimal pour la stabilité de la prodrogue (81).

Les prodrogues à base d'ester d'acides aminés introduisent une fonction amine dans la molécule. Les amines primaires ou secondaires peuvent subir une réaction de Maillard avec certains excipients comme le lactose. Les produits de dégradation suite à la réaction de Maillard peuvent se réarranger selon la réaction d'Amadori et former une grande diversité de produits. La réaction de Maillard est catalysée par des bases et ainsi peut être accéléré si des agents lubrifiants alcalins sont utilisés.

De ce fait, les excipients tels que le lactose doivent être évités ou utilisés avec précautions dans la formulation de prodrogue ester d'acides aminés. Les esters d'acides aminés qui sont basiques de nature et substantiellement ionisés et soluble au même pH que des excipients insolubles et de charges opposées peuvent interagir entre eux. Cette interaction peut influencer la dissolution du médicament *in vitro*, mais n'a pas forcément d'impact sur la biodisponibilité *in vivo*.

Cela a été démontré pour l'alaninate de brivanib, qui s'est avéré interagir avec le croscarmellose sodique (CCS), un agent désintégrant, résultant en une dissolution incomplète à pH 4,5 (82). Ce phénomène n'a pas été observé avec la crospovidone, un agent désintégrant non ionique. Bien qu'interagissant *in vitro* avec le CCS, la biodisponibilité de l'alaninate de brivanib n'a pas été modifiée *in vivo* (82).

La majorité des prodrogues à base d'acides aminés sont de simples esters ou amides, et par conséquent ne génèrent pas d'impuretés réactionnelles telles que le formaldéhyde suite à une dégradation lors du stockage.

Par contre les prodrogues à base d'acides aminés contenant une liaison carbamate peuvent relarguer du formaldéhyde suite à une hydrolyse, lui-même toxique et qui peut participer à la formation de produits de dégradations secondaires. Ceux-ci peuvent nécessiter des études de toxicologie. De plus le formaldéhyde est susceptible d'interagir avec les gélules par des réactions de réticulation, ce qui risque d'affecter irréversiblement la dissolution de ces formes (83).

## **5- Sécurité et toxicologie**

L'un des défis majeurs lié à l'approche prodrogue, réside dans la toxicité potentielle de la prodrogue et du vecteur par rapport à la molécule mère (84). Les acides aminés étant les « blocs de construction » des protéines, ils sont généralement considérés comme sûrs (85). Cependant, il est important de considérer certains cas particuliers d'acides aminés, comme par exemple la tyrosine, la phénylalanine, ainsi que les acides aminés synthétiques, surtout pour des médicaments à fortes doses ou destinés à un usage chronique. De la même manière, les acides aminés non naturels doivent être étudiés afin de vérifier leur innocuité (86).

## IV Conclusion

Comme nous l'avons vu, les prodrogues à base d'acides aminés ont démontré à de nombreuses reprises leur intérêt en thérapeutique humaine, notamment par leur capacité à améliorer la solubilité et la perméabilité de médicaments en vue d'une administration orale. Plus récemment, elles ont été utilisées avec succès pour obtenir des formes à libération prolongée, à usage parentérale ou encore présentant une meilleure stabilité métabolique. L'un des aspects les plus prometteurs reste sans doute la possibilité d'amélioration du ciblage thérapeutique de cette démarche.

En effet, avec une incidence des cancers en forte augmentation ces dernières décennies, l'amélioration du ciblage thérapeutique par les prodrogues à base d'acides aminés présente un intérêt tout particulier. Non seulement cela permet une meilleure efficacité des traitements, mais également en ciblant mieux les cellules cancéreuses, l'on tend à diminuer les risques d'effets indésirables.

Cependant, le développement de ces prodrogues n'est pas exempt de problèmes à résoudre, tant du point de vue de la synthèse, de l'analyse et de la formulation que de la sécurité clinique. Mais si ces difficultés sont levées, alors cette démarche offre un potentiel en thérapeutique humaine formidable.

## **Bibliographie**

1. Y. Mori, K. Aki et al., UV B-irradiation enhances the racemization and isomerization of aspartyl residues and production of N-carboxymethyl lysine (CML) in keratin. *Journal of chromatography B*, (2011) vol 879, n°29, p. 3303-3309
2. M. Serfaty, G. Masterton, Fatal poisonings attributed to benzodiazepines in Britain during the 1980s. *Br J Psychiatry*. 163 (3) (1993) 386-93.
3. P.V. Balimane, I. Tamai, A. Guo, T. Nakanishi, H. Kitada, F.H. Leibach, A. Tsuji, P.J. Sinko, Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 246-251.
4. M. Sugawara, W. Huang, Y.J. Fei, F.H. Leibach, V.Ganapathy, M.E. Ganapathy, Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 781-789.
5. J. Rautio, K.H., T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 255–270.
6. B.S. Vig, P.J. Lorenzi, S. Mittal, C.P. Landowski, H.C. Shin, H.I. Mosberg, J.M. Hilfinger, G.L. Amidon, Amino acid ester prodrugs of floxuridine: synthesis and effects of structure, stereochemistry, and site of esterification on the rate of hydrolysis, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1381–1388.
7. J. Ma, Unnatural amino acids in drug discovery, *Chim. Oggi* (June 2003) 65–68.
8. F. Cao, J. Jia, Z. Yin, Y. Gao, L. Sha, Y. Lai, Q. Ping, Y. Zhang, Ethylene glycol-linked amino acid diester prodrugs of oleanolic acid for pept1-mediated transport: synthesis, intestinal permeability and pharmacokinetics, *Mol. Pharm.* 9 (8) (2012) 2127–2135.
9. D. Gupta, S.V. Gupta, K.D. Lee, G.L. Amidon, Chemical and enzymatic stability of amino acid prodrugs containing methoxy, ethoxy and propylene glycol linkers, *Mol. Pharm.* 6 (2009) 1604–1611.
10. O.H. Chan, H.L. Schmid, L.A. Stilgenbauer, W. Howson, D.C. Horwell, B.H. Stewart, Evaluation of a targeted prodrug strategy of enhance oral absorption of poorly water-soluble compounds, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1012–1018.
11. P.H. Marathe, A.V. Kamath, Y. Zhang, C. D'Arienzo, R. Bhide, J. Fagnoli, Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of brivanib (BMS-540215), a

- potent VEGFR2 inhibitor and its alanine ester prodrug brivanib alaninate, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65 (2009) 55–66.
12. D.E. Gingrich, D.R. Reddy, M.A. Iqbal, J. Singh, L.D. Aimone, T.S. Angeles, M. Albom, S. Yang, M.A. Ator, S.L. Meyer, C. Robinson, B.A. Ruggeri, C.A. Dionne, J.L. Vaught, J.P. Mallamo, R.L. Hudkins, A new class of potent vascular endothelial growth factor re-ceptor tyrosine kinase inhibitors: structure–activity relationships for a series of 9-alkoxymethyl-12-(3-hydroxypropyl)indeno[2,1-a]pyrrolo[3,4-c] carbazole-5-ones and the identification of CEP-5214 and its dimethylglycine ester prodrug clinical candidate CEP-7055, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 5375–5388.
  13. P.J. Mulholland, D.R. Ferry, D. Anderson, S.A. Hussain, A.M. Young, J.E. Cook, E. Hodgkin, L.W. Seymour, D.J. Kerr, Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin, *Ann. Oncol.* 12 (2001) 245–248.
  14. H. Bundgaard, C. Larsen, P. Thorbek, Prodrugs as drug delivery systems XXVI. Preparation and enzymatic hydrolysis of various water-soluble amino acid esters of metronidazole. *Int. J. Pharm.* 18 (1984) 67–77.
  15. E. Trivellato, L. Malesani, C. Concilio, Some new esters of chloramphenicol. IV. Pharmacological research on chloramphenicol glycinate, *Farmaco Ed. Sci., Pavia* 13 (1958) 399–405.
  16. T.D. Bradshaw, M.C. Bibby, J.A. Double, I. Fichtner, P.A. Cooper, M.C. Alley, S. Donohue, S.F. Stinson, J.E. Tomaszewski, E.A. Sausville, M.F. Stevens, Preclinical evaluation of amino acid prodrugs of novel antitumor 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazoles, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 239–246.
  17. S. Mittal, X. Song, B.S. Vig, G.L. Amidon, Proline prodrug of melphalan targeted to prolidase, a prodrug activating enzyme overexpressed in melanoma, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1290–1298.
  18. N.L. Pochopin, W.N. Charman, V.J. Stella, Amino acid derivatives of dapsone as water-soluble prodrugs, *Int. J. Pharm.* 121 (1995) 157–167.
  19. A. Rasheed, C.K. Kumar, A. Mishra, Synthesis, hydrolysis studies and pharmacodynamic profiles of amide prodrugs of dexibuprofen with amino acids, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 26 (2011) 688–695.
  20. J. Rautio, T. Nevalainen, H. Taipale, J. Vepsäläinen, J. Gynther, T. Pedersen, T. Jarvinen, Synthesis and in vitro evaluation of aminoacyloxyalkyl esters of 2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionic acid as novel naproxen prodrugs for der-mal drug delivery, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1172–1178.

21. N.H. Nam, Y. Kim, Y.J. You, D.H. Hong, H.M. Kim, B.Z. Ahn, Water soluble prodrugs of the antitumor agent 3-[(3-amino-4-methoxy)phenyl]-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) cyclopent-2-ene-1-one, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 1021–1029.
22. J.P. Amend, H.C. Helgeson, Solubilities of the common L- $\alpha$ -amino acids as a function of temperature and solution pH, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 935–942.
23. J.J. Fort, A.K. Mitra, Solubility and stability characteristics of a series of methotrexate dialkyl esters, *Int. J. Pharm.* 59 (1990) 271–279.
24. H. Bundgaard, C. Larsen, E. Arnold, Prodrugs as drug delivery systems XXVII. Chemical stability and bioavailability of a water-soluble prodrug of metronidazole for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* 18 (1984) 79–87.
25. L. Colla, E. De Clercq, R. Busson, H. Vanderhaeghe, Synthesis and antiviral activity of water-soluble esters of acyclovir [9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine], *J. Med. Chem.* 26 (1983) 602–604.
26. Z. Wu, A. Patel, R. Dave, X. Yuan, Development of acetaminophen proline prodrug, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3851–3854.
27. E. Jensen, H. Bundgaard, E. Falch, Design of a water-soluble, solution-stable and biolabile prodrug of metronidazole for parenteral administration: N-substituted aminomethylbenzoate esters, *Int. J. Pharm.* 58 (1990) 143–153.
28. B.D. Anderson, R.A. Conradi, K.E. Knuth, Strategies in the design of solution-stable, water-soluble prodrugs I: a physical-organic approach to pro-moiety selection for 21-esters of corticosteroids, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 365–374.
29. H. Bundgaard, E. Falch, E. Jensen, A novel solution-stable, water-soluble prodrug type for drugs containing a hydroxyl or an NH-acidic group, *J. Med. Chem.* 32 (1989) 2503–2507.
30. E. Jensen, H. Bundgaard, N-substituted (aminomethyl)benzoate 21-esters of corticosteroids as water-soluble, solution-stable and biolabile prodrugs, *Acta Pharm. Nord.* 4 (1992) 35–42.
31. C.P. Landowski, B.S. Vig, X. Song, G.L. Amidon, Targeted delivery to PEPT1-overexpressing cells: acidic, basic, and secondary floxuridine amino acid ester prodrugs, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 659–667.
32. B.S. Vig, P.J. Lorenzi, S. Mittal, C.P. Landowski, H.C. Shin, H.I. Mosberg, J.M. Hilfinger, G.L. Amidon, Amino acid ester prodrugs of floxuridine: synthesis and

- effects of structure, stereochemistry, and site of esterification on the rate of hydrolysis, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1381–1388.
33. Y. Liang, A. Sharon, J.P. Grier, K.L. Rapp, R.F. Schinazi, C.K. Chu, 5'-O-Aliphatic and amino acid ester prodrugs of (-)-beta-D-(2R,4R)-dioxolane-thymine (DOT): synthesis, anti-HIV activity, cytotoxicity and stability studies, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 1404–1409.
  34. G.E. Granero, G.L. Amidon, Stability of valacyclovir: implications for its oral bioavailability, *Int. J. Pharm.* 317 (2006) 14–18.
  35. X. Song, P.L. Lorenzi, C.P. Landowski, B.S. Vig, J.M. Hilfinger, G.L. Amidon, Amino acid ester prodrugs of the anticancer agent gemcitabine: synthesis, bioconversion, metabolic bioevasion, and hPEPT1-mediated transport, *Mol. Pharm.* 2 (2005) 157–167.
  36. B. Testa, J.M. Mayer, *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
  37. I. Kim, X.Y. Chu, S. Kim, C.J. Provoda, K.D. Lee, G.L. Amidon, Identification of a human valacyclovirase: biphenyl hydrolase-like protein as valacyclovir hydro-lase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25348–25356.
  38. I. Kim, X. Song, B.S. Vig, S. Mittal, H.C. Shin, P.J. Lorenzi, G.L. Amidon, A novel nucleoside prodrug-activating enzyme: substrate specificity of biphenyl hydrolase-like protein, *Mol. Pharm.* 1 (2004) 117–127.
  39. L. Lai, Z. Xu, J. Zhou, K.D. Lee, G.L. Amidon, Molecular basis of prodrug activation by human valacyclovirase, an alpha-amino acid ester hydrolase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9318–9327.
  40. T.C. Burnette, J.A. Harrington, J.E. Reardon, B.M. Merrill, P. de Miranda, Purification and characterization of a rat liver enzyme that hydrolyzes valaciclovir, the L-valyl ester prodrug of acyclovir, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 15827–15831.
  41. I. Diaz-Padilla, L.L. Siu, Brivanib alaninate for cancer, *Expert Opin. Investig. Drugs* 20 (2011) 577–586.
  42. J. Gong, J. Gan, J. Caceres-Cortes, L.J. Christopher, V. Arora, E. Masson, D. Williams, J. Pursley, A. Allentoff, M. Lago, S.B. Tran, R.A. Iyer, Metabolism and disposition of [<sup>14</sup>C]brivanib alaninate after oral administration to rats, monkeys, and humans, *Drug Metab. Dispos.* 39 (2011) 891–903.

43. M.K. Kim, Y.M. Oh, K.-s. Park, Y. Chong, A novel prodrug of quercetin, 3-N,N-dimethyl carbamoyl quercetin (DCQ), with improved stability against hydrolysis in cell culture medium, *Bull. Korean Chem. Soc.* 30 (2009) 2114–2116.
44. D.R. Ferry, A. Smith, J. Malkhandi, D.W. Fyfe, P.G. deTakats, D. Anderson, J. Baker, D.J. Kerr, Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition, *Clin. Cancer Res.* 2 (1996) 659–668.
45. M. Brandsch, I. Knutter, E. Bosse-Doenecke, Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters, *J. Pharm. Pharmacol.* 60 (2008) 543–585.
46. C. Yang, G.S. Tirucheraï, A.K. Mitra, Prodrug based optimal drug delivery via membrane transporter/receptor, *Expert Opin. Biol. Ther.* 1 (2001) 159–175.
47. S. Broer, Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 249–286.
48. J. Soul-Lawton, E. Seaber, N. On, R. Wootton, P. Rolan, J. Posner, Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2759–2764.
49. T. Hatanaka, M. Haramura, Y.J. Fei, S. Miyauchi, C.C. Bridges, P.S. Ganapathy, S.B. Smith, V. Ganapathy, M.E. Ganapathy, Transport of amino acid-based prodrugs by the Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>(-)</sup>-coupled amino acid transporter ATB(0,+)<sup>-</sup> and expression of the transporter in tissues amenable for drug delivery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 1138–1147.
50. G.B. Elion, P.A. Furman, J.A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, H.J. Schaeffer, Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (1977) 5716–5720.
51. W.H. Miller, R.L. Miller, Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7204–7207.
52. R.D. Anderson, K.G. Griffy, D. Jung, A. Dorr, J.D. Hulse, R.B. Smith, Ganciclovir absolute bioavailability and steady-state pharmacokinetics after oral administration of two 3000-mg/d dosing regimens in human immunodeficiency virus- and cytomegalovirus-seropositive patients, *Clin. Ther.* 17 (1995) 425–432.
53. D. Jung, A. Dorr, Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects, *J. Clin. Pharmacol.* 39 (1999) 800–804.

54. M.S. Warren, J. Rautio, Prodrugs designed to target transporters for oral drug delivery, in: J. Rautio (Ed.), *Prodrugs and Targeted Delivery — Towards Better ADME Properties*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, 2011, pp. 133–151.
55. M. Tsuda, T. Terada, M. Irie, T. Katsura, A. Niida, K. Tomita, N. Fujii, K. Inui, Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318 (2006) 455–460.
56. D.N. Cruz, Midodrine: a selective alpha-adrenergic agonist for orthostatic hypotension and dialysis hypotension, *Expert Opin. Pharmacother.* 1 (2000) 835–840.
57. K.C. Cundy, R. Branch, T. Chernov-Rogan, T. Dias, T. Estrada, K. Hold, K. Koller, X. Liu, A. Mann, M. Panuwat, S.P. Raillard, S. Upadhyay, Q.Q. Wu, J.N. Xiang, H. Yan, N. Zerangue, C.X. Zhou, R.W. Barrett, M.A. Gallop, XP13512 [(+/-)-1-([(alpha)-isobutanoyloxyethoxy)carbonyl] aminomethyl)-1-cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: I. Design, synthesis, enzymatic conversion to gabapentin, and transport by intestinal solute transporters, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (2004) 315–323.
58. R. Lal, J. Sukbuntherng, E.H. Tai, S. Upadhyay, F. Yao, M.S. Warren, W. Luo, L. Bu, S. Nguyen, J. Zamora, G. Peng, T. Dias, Y. Bao, M. Ludwikow, T. Phan, R.A. Scheuerman, H. Yan, M. Gao, Q.Q. Wu, T. Annamalai, S.P. Raillard, K. Koller, M.A. Gallop, K.C. Cundy, Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330 (2009) 911–921.
59. D.W. Goodman, Lisdexamfetamine dimesylate (vyvanse), a prodrug stimulant for attention-deficit/hyperactivity disorder, *Pharm. Ther.* 35 (2010) 273–287.
60. M. Pennick, Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to D-amphetamine, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 6 (2010) 317–327.
61. J. Elia, C. Easley, P. Kirkpatrick, Lisdexamfetamine dimesylate, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 343–344.
62. V.J. Stella, P.E. Kennedy, *Water-Soluble Rapamycin Prodrugs*, in: 1987.
63. J.G. Supko, L. Malspeis, Dose-dependent pharmacokinetics of rapamycin-28-N, N-dimethylglycinate in the mouse, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 33 (1994) 325–330.
64. J.N. Hemenway, P. Jarho, J.T. Henri, S.K. Nair, D. VanderVelde, G.I. Georg, V.J. Stella, Preparation and physicochemical characterization of a novel water-soluble prodrug of carbamazepine, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1810–1825.

65. J.N. Hemenway, V.J. Stella, In vitro and in vivo evaluation of a novel water-soluble N-glycyl prodrug (N-GLY-CBZ) of carbamazepine, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 4565–4575.
66. J.N. Hemenway, K. Nti-Addae, V.R. Guarino, V.J. Stella, Preparation, characterization and in vivo conversion of new water-soluble sulfenamide prodrugs of carbamazepine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 6629–6632.
67. K. Patel, S. Trivedi, S. Luo, X. Zhu, D. Pal, E.R. Kern, A.K. Mitra, Synthesis, physico-chemical properties and antiviral activities of ester prodrugs of ganciclovir, *Int. J. Pharm.* 305 (2005) 75–89.
68. S. Majumdar, Y.E. Nashed, K. Patel, R. Jain, M. Itahashi, D.M. Neumann, J.M. Hill, A.K. Mitra, Dipeptide monoester ganciclovir prodrugs for treating HSV-1-induced cor-neal epithelial and stromal keratitis: in vitro and in vivo evaluations, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 21 (2005) 463–474.
69. E.Y. Kwak, W.S. Shim, J.E. Chang, S. Chong, D.D. Kim, S.J. Chung, C.K. Shim, Enhanced intracellular accumulation of a non-nucleoside anti-cancer agent via increased uptake of its valine ester prodrug through amino acid transporters, *Xenobiotica* (2012).
70. M. Gynther, A. Jalkanen, M. Lehtonen, M. Forsberg, K. Laine, J. Ropponen, J. Leppanen, J. Knuuti, J. Rautio, Brain uptake of ketoprofen-lysine prodrug in rats, *Int. J. Pharm.* 399 (2010) 121–128.
71. M. Gynther, K. Laine, J. Ropponen, J. Leppanen, A. Mannila, T. Nevalainen, J. Savolainen, T. Jarvinen, J. Rautio, Large neutral amino acid transporter enables brain drug delivery via prodrugs, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 932–936.
72. L. Peura, K. Malmioja, K. Laine, J. Leppanen, M. Gynther, A. Isotalo, J. Rautio, Large amino acid transporter 1 (LAT1) prodrugs of valproic acid: new prodrug design ideas for central nervous system delivery, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1857–1866.
73. K. Chrzanowski, A. Bielawska, J. Palka, Proline analogue of melphalan as a prodrug susceptible to the action of prolidase in breast cancer MDA-MB 231 cells, *Farmaco* 58 (2003) 1113–1119.
74. Z. Wu, A. Shah, N. Patel, X. Yuan, Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5108–5112.
75. P.L. Lorenzi, C.P. Landowski, A. Brancale, X. Song, L.B. Townsend, J.C. Drach, G.L. Amidon, N-methylpurine DNA glycosylase and 8-oxoguanine dna glycosylase

- me-tabolize the antiviral nucleoside 2-bromo-5,6-dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl) benzimidazole, *Drug Metab. Dispos.* 34 (2006) 1070–1077.
76. P.L. Lorenzi, C.P. Landowski, X. Song, K.Z. Borysko, J.M. Breitenbach, J.S. Kim, J.M. Hilfinger, L.B. Townsend, J.C. Drach, G.L. Amidon, Amino acid ester prodrugs of 2-bromo-5,6-dichloro-1-(beta-D-ribofuranosyl)benzimidazole enhance metabolic stability in vitro and in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314 (2005) 883–890.
77. J. Alsenz, M. Kansy, High throughput solubility measurement in drug discovery and development, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 546–567.
78. P.V. Balimane, S. Chong, R.A. Morrison, Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44 (2000) 301–312.
79. B.M. Liederer, R.T. Borchardt, Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 1177–1195.
80. M.R. Browning, D.M. Drexler, T.V. Olah, D.G. Morgan, Simultaneous bioanalysis of a phosphate prodrug and its parent compound using a multiplexed LC–MS method, *Bioanalysis* 2 (2010) 745–753.
81. S.I. Badawy, R.C. Williams, D.L. Gilbert, Chemical stability of an ester prodrug of a glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist in solid dosage forms, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 428–433.
82. A.S. Narang, A.P. Yamniuk, L. Zhang, S.N. Comezoglu, D.S. Bindra, S. Varia, M.L. Doyle, S. Badawy, Reversible and pH-dependent weak drug-excipient binding does not affect oral bioavailability of high dose drugs, *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (2012) 553–565.
83. H. Fyfe, Y. Shi, L. Zhang, Hydrolysis and Crosslinking Investigation on the Dissolution of a Pro-drug Capsule Formulation, in: *AAPS Annual Meeting*, 2007.
84. K.M. Wu, J.G. Farrelly, Regulatory perspectives of type II prodrug development and time-dependent toxicity management: nonclinical Pharm/Tox analysis and the role of comparative toxicology, *Toxicology* 236 (2007) 1–6.
85. D.M. Bier, V.R. Young, A kinetic approach to assessment of amino acid and protein replacement needs of individual sick patients, *JPEN: J. Parenter. Enteral. Nutr.* 11 (1987) 95S–97S.
86. D.K. Gulati, C.L. Chambers, G.L. Rosenthal, P.S. Sabharwal, Comparative toxicity of some naturally occurring and synthetic non-protein aminoacids, *Environ. Exp. Bot.* 21 (1981) 225–230

## **Résumé :**

Les prodrogues sont des médicaments inactifs qui suite à une transformation *in vivo* libèrent une molécule active pouvant ainsi jouer son rôle thérapeutique. Cette approche est de plus en plus utilisée pour améliorer les propriétés physico-chimiques ou pharmacologiques de principes actifs.

Cependant, elle peut également modifier la distribution tissulaire, l'efficacité ou la toxicité du principe actif, et à ce titre, cette approche doit être considérée relativement tôt dans le développement du médicament. De ce point de vue, les acides aminés d'origine naturelle ou de synthèse offre une grande diversité de structures et de propriétés physico-chimiques.

Ce travail a pour objectif de faire un point sur les applications déjà étudiées des acides aminés en tant que vecteurs de prodrogues. Le but de cette stratégie étant d'améliorer la solubilité, la perméabilité, de développer une libération prolongée, une administration parentérale, et de permettre un meilleur ciblage thérapeutique ainsi qu'une meilleure stabilité métabolique.

Sont abordés également les aspects techniques et pratiques que cette démarche soulève.

## ***Mots clés :***

Prodrogues, acides aminés, vecteurs, solubilité, stabilité, libération prolongée, ciblage, administration parentérale, formulation.