

III

Pistes de recherche et de développement

15

Les méthodes de criblage de molécules anti-VIH

La recherche de molécules capables de limiter la progression de la maladie a débuté dès l'identification, en 1983, de l'agent causal, le VIH. Les techniques mises en œuvre pour le criblage ne présentent aucune caractéristique particulière et utilisent les outils décrits pour tous les criblages pharmacologiques. Les molécules pharmaceutiques proviennent de deux sources principales:

- les molécules obtenues par synthèse chimique
- les molécules d'origine naturelle, microbienne, animale ou végétale.

Les molécules ainsi découvertes sont pour la plupart le fruit du hasard. Le rêve est dans tous les esprits d'être un jour capable de dessiner *ah initio* la molécule qui inhibera de façon spécifique l'enzyme ou le récepteur visé. Les outils informatiques qui le permettront commencent à apparaître, ce qui a permis à la modélisation moléculaire de contribuer de plus en plus ces dernières années à la mise au point de certains médicaments (Verlinde et Mol, 1994). Cette contribution a été particulièrement importante dans le cas des inhibiteurs de la protéase du VIH.

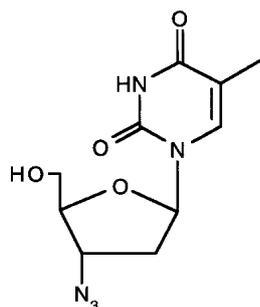
Après analyse du processus de découverte des médicaments aujourd'hui disponibles pour le traitement de l'infection par le VIH, seront définies les grandes lignes permettant la mise en place d'un test de criblage sur une nouvelle cible pour laquelle il n'existe pas d'inhibiteur connu.

Historique des molécules anti-VIH disponibles

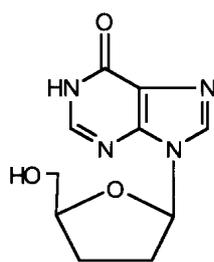
Les seules molécules commercialisées aujourd'hui comme anti-VIH appartiennent à la classe des nucléosides et inhibent la transcriptase inverse du virus. L'AZT (3'-azido-3'-didésoxythymidine, Wellcome) a été la première

molécule disponible dès 1987, suivie par la ddI (2', 3'-didésoxyinosine, Bristol-Myers Squibb) et du ddC (2', 3'-didésoxycytidine, Roche).

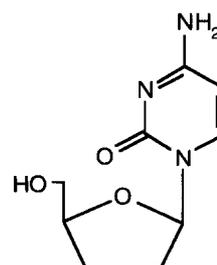
D'autres nucléosides sont sur le point d'être enregistrés il s'agit du d4T (2', 3'-didéhydro-2', 3'-didésoxythymidine, Bristol-Myers Squibb) et du 3TC (Glaxo).



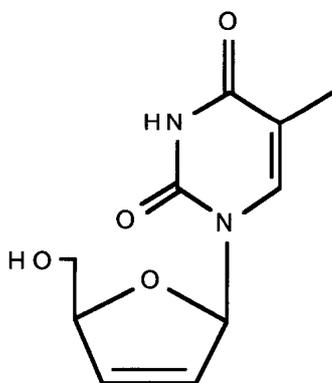
**Retrovir Zidovudine
(AZT) Wellcome**



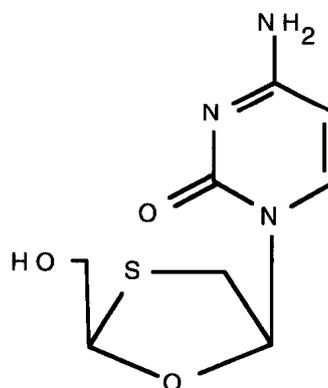
**Videx Didanosine
(ddI) BMS**



**Hivid Zalcitabine
(ddC) Roche**

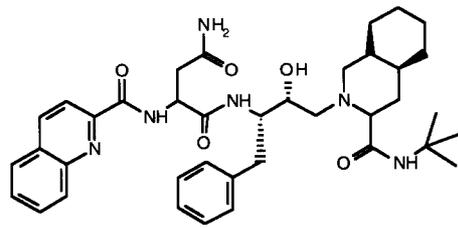


**Zerit Stavudine (d4T)
BMS**

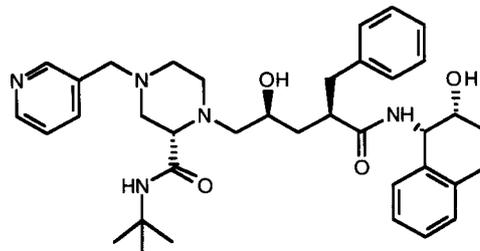


**Lamivudine (3TC)
Glaxo/Biochem**

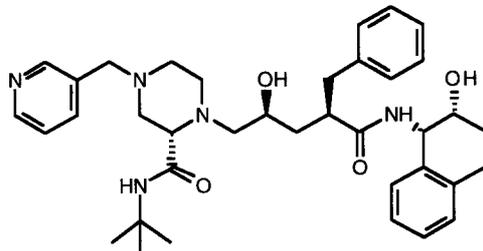
La deuxième famille de molécules à venir est celle des anti-protéases le saquinavir (Roche), l'indinavir (Merck) et le ritonavir (Abbott) sont les représentants les plus avancés dans leur développement.



Saquinavir (Roche)

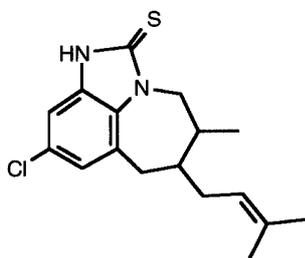


**L735, 524 (Merck)
Indinavir**

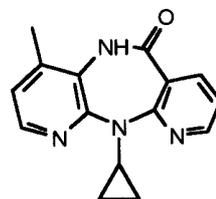


**ABT 538 (Abbott)
Ritonavir**

Enfin, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, dont il existe de nombreux représentants comme le TIBO (Janssen) et la névirapine (Boehringer Ingelheim), bien que très puissants sur l'enzyme, se heurtent à un problème majeur dû au développement extrêmement rapide de résistance et ne pourront être développés, s'ils le sont un jour, qu'en association avec d'autres molécules.



TIBO (Janssen)



**Nevirapine
(Boehringer Ingelheim)**

Comment ces molécules ont-elles été découvertes ?

Certaines molécules, comme l'AZT et les autres nucléosides, existaient et provenaient de la recherche d'anticancéreux. L'activité de ces molécules sur la transcriptase inverse des rétrovirus murins était bien connue (Ostertag et coll., 1974). C'est donc très rapidement qu'elles ont été testées sur le VIH. Ces nucléosides entrent en compétition avec les nucléosides naturels et induisent la terminaison de l'élongation de la chaîne.

Les autres inhibiteurs de la réplication du VIH, à l'exception des inhibiteurs de la protéase, sont issus d'un criblage au hasard. Dès l'identification du VIH et sa culture in vitro, des criblages sur l'infection aiguë de lymphocytes ont été entrepris dans les différents laboratoires. Ce test très global, puisqu'il mesure la production de particules virales, aurait dû permettre de détecter des molécules agissant aux différentes étapes du cycle viral. Curieusement, toutes les molécules qui ont été découvertes dans ce type d'essai n'agissent que sur des étapes très précoces du cycle. Ont ainsi été identifiés

- des inhibiteurs de la liaison du VIH à la cellule (polyanions, dextran)
- des inhibiteurs de fusion (dérivés bétuliniques, bicyclams),
- des inhibiteurs non compétitifs de la transcriptase inverse (TIBO, névirapine, a-APA).

Toutes ces molécules sont en cours d'évaluation préclinique.

La recherche des inhibiteurs de la protéase a bénéficié d'une connaissance préalable dans un domaine voisin. La protéase du VIH est une aspartyl protéase qui présente une forte analogie avec la rénine, et sa structure a rapidement été résolue après cristallisation (Wlodawer et coll., 1989). Comme les autres protéases, l'enzyme du VIH fonctionne en interagissant avec son substrat pour former un état transitionnel qui facilite le clivage du substrat pour donner les produits de réaction. La recherche sur la protéase du VIH a donc bénéficié de toute l'expérience existant dans ce domaine, et notamment des connaissances acquises par la recherche de molécules peptidomimétiques inhibitrices du système rénine-angiotensine, recherche très active au début des années 1980 dans de nombreuses firmes pharmaceutiques.

Les premières molécules ont donc été des molécules peptidomimétiques capables de mimer l'état de transition et d'entrer en compétition avec les protéines endogènes. Ces molécules très actives in vitro mais assez complexes sont souvent peu biodisponibles et/ou difficiles à synthétiser à une échelle industrielle. Pour certains de ces inhibiteurs, l'activité in vivo peut considérablement diminuer du fait de l'interférence d'une glycoprotéine sérique, l' α -1 glycoprotéine acide (Sommadossi et al, communication Washington). On trouve dans cette catégorie le Saquinavir de Roche, qui devrait être prochainement commercialisé.

Derrière le Saquinavir, deux autres molécules ont partiellement résolu les problèmes de biodisponibilité, l'indinavir de Merck et surtout le ritonavir d'Abbott, qui est probablement la molécule la plus prometteuse de cette première génération d'anti-protéases.

De nouvelles molécules, beaucoup plus innovantes, sont en cours d'évaluation - phases cliniques précoces - comme celles de Vertex et d'Upjohn.

Toutes ces molécules ont été optimisées à l'aide de la modélisation moléculaire, souvent en co-cristallisant l'enzyme en présence d'un premier inhibiteur et en analysant les points d'interactions.

Stratégie de recherche de nouvelles molécules

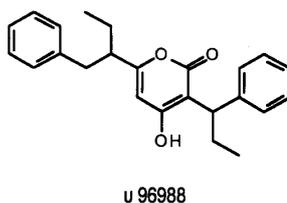
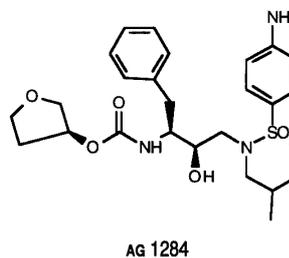
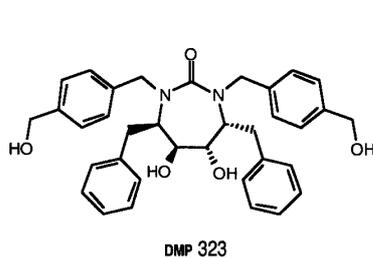
Malgré le nombre croissant de molécules anti-VIH, cela ne concerne que peu de cibles pharmacologiques - transcriptase inverse et protéase. De plus, l'apparition rapide de virus résistant à ces molécules plaide en faveur d'une polychimiothérapie associant des molécules agissant à différents stades du cycle viral. Il existe donc un besoin urgent de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la réplication agissant sur de nouvelles cibles.

La première étape dans la recherche d'un médicament consiste à définir la cible (enzyme, récepteur ou autre protéine...) et à valider son intérêt thérapeutique potentiel. Quand il n'existe pas d'inhibiteur connu, on a souvent recours à des méthodes génétiques - mutagenèse, antisens.

Une fois la cible identifiée et validée, deux grand types de stratégies peuvent s'appliquer

- En théorie, si l'on dispose d'informations structurales suffisantes sur le récepteur ou le site catalytique de l'enzyme visée, on peut analyser les interactions possibles avec la protéine et tenter de dessiner et de synthétiser un certain nombre de molécules qui interagiront avec la cible choisie. Certains logiciels comme GRIB (Goodford et coll., 1985), ALLADIN (Van Drie et coll., 1989), DOCK (Kuntz et coll., 1982) et LUDI (Bohm et coll., 1992) permettent ce type d'étude. Ces outils ont permis de dessiner les nouvelles molécules anti-protéases qui ne sont plus des analogues peptidiques, comme le DMP 323 de Du Pont-Merck, le AG 1284 de Vertex et le u 96988 de Upjohn.

- Plus classiquement, on met en place un test de criblage, dont il importe de définir le principe. Ce criblage doit permettre d'identifier des représentants de familles chimiques qui pourront être améliorés par la suite. Il ne nécessite pas de connaissances structurales. La limitation du criblage systématique repose sur le nombre et la diversité des molécules que l'on est capable de passer dans le test. Toutes les grandes sociétés pharmaceutiques ont de grandes collections de molécules, souvent restreintes dans leur diversité par le fait qu'elles sont le reflet de l'histoire de la recherche thérapeutique de la société (collection de benzodiazépines chez Roche et de benzothiazines chez Rhône-Poulenc Rorer, par exemple).



Le criblage de molécules d'origine naturelle est un moyen d'avoir accès à des structures chimiques difficilement synthétisables au laboratoire.

Pour remédier au manque de diversité, de grands efforts sont entrepris depuis quelques années dans différents laboratoires pharmaceutiques pour réaliser des banques de produits résultant de la chimie combinatoire sur des répartiteurs. Ces banques sont réalisées sur le même principe que les banques de peptides et permettent de générer des millions de nouvelles structures.

En ce qui concerne le test de criblage proprement dit, deux grands types de tests peuvent être envisagés

- Un test biochimique qui a, en général, l'avantage d'être rapide et très spécifique, et d'avoir une très grande capacité, plusieurs milliers de produits/semaine pouvant être testés dans ce type de crible. En revanche, il faut disposer d'une enzyme de qualité suffisante, recombinante ou non, et en grande quantité. Bien sûr, seuls des produits agissant sur l'interaction de l'enzyme (ou protéine) avec son substrat pourront être identifiés dans ce type de tests. Le test biochimique s'affranchit des problèmes d'accessibilité de la cible pour la molécule étudiée, et notamment du problème de pénétration cellulaire, qui pourront être résolus dans un deuxième temps par des modifications chimiques.

- Un test cellulaire, qui sera un test fonctionnel dans le contexte cellulaire et qui devra donc intégrer les partenaires cellulaires de la protéine ciblée. C'est le type de test développé pour la recherche d'inhibiteurs de *tat* ou de *rev*. Ces tests, comparés aux premiers, ont une capacité souvent limitée, même si certaines automatisations sont possibles. En revanche, ils doivent permettre l'identification de molécules inhibant les partenaires cellulaires impliqués, ce qui dans le cas du VIH pourrait être un moyen de trouver des molécules moins susceptibles d'induire des résistances.

Dans un deuxième temps, et quelle que soit la stratégie retenue, il faudra mettre en place les tests secondaires, qui permettront de trier, parmi les molécules détectées dans le criblage, les molécules inhibant réellement la cible visée. Le choix des tests à réaliser à cette étape est capital. En effet, tous les tests de criblage présentent des biais méthodologiques. Ces tests secondaires doivent donc permettre d'éliminer tous les produits interférant avec le test de criblage et ne relevant pas du mécanisme recherché. Ce n'est que lorsque la molécule aura franchi ces différentes étapes qu'une synthèse chimique et une analyse de la relation structure-fonction pourront être envisagées.

C'est à cette phase que la connaissance des données structurales, et si possible la co-cristallisation avec l'inhibiteur potentiel, peut aider le chimiste à dessiner la molécule idéale.

BIBLIOGRAPHIE

- BÖHM HJ. The computer program LUDI = a new method for de novo design of enzyme inhibitor. *J Comput Aided Mol Des* 1992, **6**: 61-78
- DE CLERCQ E. Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infection. *J Med Chem* 1995, **38**: 2491-2517
- GOODFORD PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985, **28**: 849-857
- GOODY RS. Rational drug design and HIV: hopes and limitations. *Nature Medicine* 1995, **1**: 519-520
- LEVY JA. HIV research: a need to focus on the right target. *Lancet* 1995, **345**: 1619-1621
- KALISH V, KALDOR S. SHETTY B. TATLOCK J. DAVIES J. HAMMOND M, DRESSMAN B. FRITZ J. APPELT K. REICH S. MUSICK L, WU B QW, SU K. Iterative protein structure-based drug design and synthesis of H~V protease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1995, **30**: 201S-214S
- KUNTZ ID, BLANEY JM, OATLEY SJ, LANGRIDGE R and FERRIN TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* 1982, **161**: 269-288
- MARUENDA H. JOHNSON F. Design and synthesis of novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* 1995, **38**: 2145-2151

- OSTERTAG W, ROESLER G, KRIE CJ et coll. Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell culture transformed by friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974, **71**: 4980-4985
- VAN DRIE JH, WEININGER D, MARTIN YC. ALADIN: an integrated tool for computer-assisted molecular design and pharmacophore recognition from geometric, steric, and substructure searching of three-dimensional molecular structures. *J Comput Aided Mol Des* 1989, **3**: 225-251
- VERLINDE C, HOL W. Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure* 1994, **2**: 577-587
- WAINBERG MA, GU Z. Targeting HIV reverse transcriptase in novel ways. *Nature Medicine* 1995, **1**: 628-629
- WLODAWER A, MILLER M, JASKOLSKI M et coll. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* 1989, **245**: 616-621.