

# La synthèse à haut débit (synthèse combinatoire), une discipline arrivée à maturité dans la recherche pharmaceutique ?

François Bellamy\* docteur

**Summary :** *High throughput synthesis (combinatorial chemistry) in the pharmaceutical industry, a technique that has reached maturity*

*Combinatorial chemistry, which should more appropriately be termed high throughput synthesis, was the necessary offspring in the early 1990's of high throughput screening. Beginning with the synthesis of large non-oriented peptide library mixtures, the discipline has now matured whereby targeted libraries respond to standard pharmaceutical prerequisites pertaining to molecular weight, lipophilicity, chemical and metabolic stability and trans-membrane transport. In most cases, syntheses are run in parallel and not as a mixture, with each product being analysed and purified, if necessary. Beginning as a technical curiosity, this approach is now a cornerstone of drug discovery.*

**Mots clés :** *Synthèse combinatoire, drug discovery.*

**Key-words :** *Combinatorial synthesis, drug discovery.*

## La synthèse combinatoire, une réponse aux nouvelles techniques de screening à haut débit

Les deux principales étapes de la découverte d'une nouvelle molécule biologiquement active sont l'identification d'une cible biologique pertinente ainsi que l'identification de composés qui interagissent spécifiquement avec cette cible.

Beaucoup d'espoirs ont été mis dans la génomique et la protéomique pour générer de nouvelles cibles biologiques associées à des pathologies aujourd'hui encore mal soignées, mais il est encore un peu trop tôt pour juger de la pertinence de ces approches.

L'avènement de la biologie moléculaire, associée au fantastique développement de l'informatique et de la robotique, a permis la mise au point de tests

de screening à haut débit, le plus souvent sur des cibles humaines. Ainsi, le screening a énormément gagné en pertinence grâce à l'utilisation de cibles humaines et son débit a augmenté de façon considérable. En l'espace d'un peu plus d'une décennie, on est passé de quelques molécules étudiées chaque jour sur un modèle animal (ou de quelques dizaines en inhibition d'enzyme ou en organes isolés) à plusieurs milliers, dizaines de milliers sur une cible bien caractérisée. Le « ultra high throughput screening » permet aujourd'hui d'atteindre 100 000 molécules/j et au-delà.

Parallèlement à ce fantastique développement du HTS, les progrès de la synthèse chimique étaient certes réels mais quantitativement sans commune mesure et, très rapidement, l'approvisionnement du screening en molécules est devenu une étape limitante du processus de drug discovery. Or, ce n'est pas le nombre de molécules potentiellement disponibles qui constitue une limitation (on estime en effet qu'il y a  $10^{180}$  nouvelles entités chimiques possibles possédant un poids moléculaire  $\leq 750$ ), mais

bien la vitesse à laquelle il est possible de les synthétiser. Les raisons de cette « lenteur » de la synthèse organique résident essentiellement dans le fait que les chimistes avaient l'habitude de faire les molécules une à une et que, par ailleurs, ils passaient en moyenne 70 % de leur temps à traiter les mélanges réactionnels, à en extraire le produit désiré puis à le purifier, et tout cela en vue d'en obtenir des quantités non négligeables (souvent plusieurs centaines de mg).

Il est donc logique que la première tentative et les premières tentatives des chimistes aient été de préparer des produits en mélange et de les faire tester tels quels, c'est-à-dire en l'absence de toute purification, éliminant ainsi les limitations mentionnées ci-dessus. La chimie qui se prêtait le mieux à ces premiers essais de haut débit était incontestablement la synthèse peptidique qui, grâce à l'optimisation des réactions de couplage entre acides aminés, permettait d'obtenir de bons rendements et qui, grâce à l'utilisation des résines de type Merrifield, permettait un traitement aisé des milieux réactionnels.

\* Laboratoires Fournier, 50, rue de Dijon, 21121 Daix.  
Tél. : 03.80.44.75.50. Fax : 03.80.44.77.23.  
E-mail : f.bellamy@fournier.fr

## La course aux grands nombres : production massive de composés en mélange

Le début des années 90 a vu un véritable emballement de la synthèse de banques de peptides avec une course spectaculaire au gigantisme. Certaines équipes ont revendiqué avoir synthétisé des librairies de plusieurs dizaines de millions de composés. L'objectif d'approvisionner le screening avec un nombre suffisant de molécules était ainsi atteint mais en ayant quelque peu perdu de vue la finalité qui a toujours été de découvrir de nouveaux médicaments, c'est-à-dire, dans la grande majorité des cas, des produits présentant une stabilité chimique et métabolique raisonnable et actifs après administration par voie orale. Or les peptides ne répondent généralement pas à ces critères.

Par ailleurs, le screening de mélanges contenant un grand nombre de molécules différentes a vite montré ses limites :

- La nécessité de déconvoluer les mélanges trouvés actifs sur un test biologique, c'est-à-dire d'identifier le (ou les) molécule(s) active(s) contenues dans le mélange. Cette phase de déconvolution, souvent longue et fastidieuse, faisait perdre une grande partie du temps gagné auparavant.

- Il est bien connu que le fait de tester des mélanges (qu'ils soient issus de la synthèse combinatoire ou d'extraction de plantes ou de tissus/organes) conduit à de nombreux « faux positifs » : d'un mélange trouvé actif en screening, on ne peut identifier aucun composant actif, d'où une perte sèche de temps (et d'argent).

Des parades à ces divers inconvénients ont été imaginées puis mises en œuvre par différents groupes : les techniques de déconvolution se sont multipliées, simplifiées, ont gagné en rapidité mais cette étape reste quelque peu frustrante pour les chercheurs qui sont toujours avides de connaître la structure des « hits » (produits trouvés actifs sur un test de screening primaire) le plus rapidement possible.

Parallèlement, on a vu apparaître des procédés « d'étiquetage » des molécules à l'aide de différentes techniques,

telle que celle développée par C. Still ou l'utilisation d'une puce émettant une radiofréquence incluse dans la bille de support solide.

## Synthèse en parallèle et diversité moléculaire

D'autre part, la meilleure façon d'éviter la déconvolution et/ou l'étiquetage étant de tester les molécules une par une, il paraissait logique de les synthétiser également une par une, mais en tirant profit de l'expérience récemment acquise avec les mélanges, à savoir la miniaturisation, la robotisation et la synthèse sur phase solide qui facilite le traitement des expériences et permet une purification grossière.

En même temps, ce type de synthèse a été appliqué à des molécules de moins en moins peptidiques, voire « totalement organiques » afin de s'affranchir des inconvénients inhérents aux structures peptidiques. Ce changement de chimie requerrait, dans de nombreux cas, une synthèse en phase liquide et non plus en phase solide. L'ère de la synthèse en parallèle était née mais la course aux grands nombres toujours d'actualité. Toutefois, les chimistes médicaux ont commencé à se poser des questions quant à l'utilité de tester des banques contenant de nombreux produits structurellement très proches (le bien connu méthyle, éthyle, butyle, futile !). De là est née la polémique relative à la diversité moléculaire, polémique car d'un côté, il peut paraître peu efficace, mais par contre coûteux, de tester des molécules très proches en vue d'identifier un hit actif à  $10^{-5}$ M sur une cible donnée alors que l'espace chimique potentiel est si vaste ; d'un autre côté, chaque chimiste médical connaît au moins un cas où, dans une série chimique donnée, en remplaçant tel méthyle (ou tout autre groupe) par « autre chose », on perd toute l'activité biologique.

Alors, diversité ou pas diversité ? Tout dépend à quoi va servir la librairie en question : Hit Generation, Lead optimization... ? Diverses ou pas, les librairies se sont multipliées aussi bien au sein de l'industrie pharmaceutique que dans une multitude de « start up » qui se sont créées à travers le monde (mais principalement aux États-Unis et en

Angleterre) et qui proposent, soit des librairies, soit leurs compétences en chimie à haut débit. Des millions de produits ont été testés sur des centaines de cibles générant des milliers de hits. Mais, même en tenant compte de la lenteur des processus de recherche et développement dans l'industrie pharmaceutique, il a fallu reconnaître que peu de ces hits ont conduit à des produits entrant en développement clinique. Ces merveilleuses techniques de screening à haut débit et de synthèse combinatoire n'auraient-elles abouti qu'à augmenter proportionnellement la taille de la meule de foin et la vitesse à laquelle on y cherche l'aiguille ? L'efficacité globale du processus de drug discovery n'en aurait pas été augmentée ?

## Objectif : synthétiser des molécules devant devenir des médicaments (drug like)

De cette réflexion est né un changement de philosophie et donc de stratégie en privilégiant la « qualité » aux dépens de la « quantité ».

Progressivement, les brochures de présentation des sociétés de service en chimie combinatoire se sont mises à vanter le fait que les molécules de leurs librairies sont toutes « drug like », c'est-à-dire qu'elles possèdent un certain nombre de propriétés physico-chimiques, communément regroupées sous le nom de « règles de Lipinsky » du nom d'un chimiste médical de chez Pfizer qui a observé que la plupart des médicaments actifs par voie orale ont :

- un poids moléculaire  $\leq 500$ ,
- un  $\log P \leq 5$ ,
- moins de 5 possibilités de donner une liaison hydrogène,
- moins de 5 possibilités d'accepter une liaison hydrogène,
- moins de 5 liaisons à libre rotation.

A peu près en même temps, on s'aperçoit que le fait de tester des bruts réactionnels, des produits non purifiés, coûtait cher car générait de nombreux faux positifs. Aussi, actuellement, la grande majorité des librairies qu'elles soient commerciales ou faites « in house » ne contiennent que des produits dont la pureté est supérieure ou égale à 80 %. Pour obtenir une telle pureté, dif-

férentes approches doivent être mises en œuvre :

- la chimie utilisée se doit d'être efficace en termes de sélectivité et de rendements,

- utilisation, à chaque étape ou presque, de techniques grossières de purification. Fréquemment, on élimine l'excès de réactif (qui permet d'augmenter le rendement) à l'aide de résines « scavengers » (par exemple, lors de la formation d'une liaison amide par réaction d'une amine sur un chlorure d'acide, on va piéger l'excès de chlorure d'acide à l'aide d'une résine basique) ;

- analyse des produits de la librairie finale, le plus souvent par LC-MS. Les produits ne présentant pas une pureté suffisante sont soit jetés à la poubelle, soit purifiés.

### La synthèse à haut débit s'intègre dans le processus de drug discovery

Ce critère de pureté a donc deux conséquences importantes, d'une part la

nécessité d'une analyse des produits finals et, d'autre part, la mise en place d'un système de purification à haut débit. On voit ainsi qu'il ne s'agit plus seulement de synthèse à haut débit pour répondre aux besoins du screening à haut débit, mais de tout un processus et donc de toute une organisation qui se met en place pour tenter d'augmenter l'efficacité du drug discovery et pour réduire les délais entre l'identification d'une nouvelle cible biologique et la première administration d'un produit à l'homme (phase I). En effet, il serait vain d'augmenter le débit d'une étape sans augmenter proportionnellement le débit des étapes en amont et en aval de celle-ci. En fait, la chimie combinatoire ou plus exactement la synthèse à haut débit n'est plus une « bête de cirque », mais constitue une discipline qui, tout en modifiant les habitudes des chimistes, mais aussi celles des analystes, s'intègre dans le processus plus global du drug discovery.

Cette intégration est d'ailleurs facilitée par le fait que les réactions chimiques utilisables à haut débit se

multiplient, puisqu'il est maintenant possible de travailler sous vide, sous pression, sous atmosphère contrôlée, à basse comme à haute température, etc., autorisant l'accès à des structures finales de plus en plus complexes. Aussi, la synthèse à haut débit est maintenant utilisée aux différents stades du drug discovery, à savoir identification de hits, passage de hit à lead, optimisation de lead, etc.

C'est en cela que l'on peut dire qu'elle a atteint un degré de maturité qui en fait un des outils indispensables du drug discovery.

### Perspectives

Le débit a augmenté tout au long du processus entraînant une augmentation des coûts, notamment au niveau du screening et plus particulièrement pour le poste « radioactivité », sachant que de nombreux tests biologiques font appel à des réactifs radiomarqués. D'où le retour, prôné par certains, au screening de produits en mélange. Il ne s'agit plus, cette fois, de screener des mélanges de milliers de produits analogues, mais plutôt de screener des mélanges de quelques (quelques dizaines) de produits, obtenus par synthèse parallèle, purs à plus de 80 % et sélectionnés pour être chimiquement très différents, ceci afin d'éviter, autant que faire se peut, les problèmes de faux positifs.

Une autre façon de baisser les coûts du screening est d'en pousser encore plus la miniaturisation. Toutefois, on atteint assez vite la limite de sensibilité des techniques de détection de la radioactivité, ce qui explique l'émergence des techniques de fluorescence. On parle maintenant de nanotechnologies. Un des systèmes de screening les plus puissants utilise des plaques à 3456 puits avec 1 à 2  $\mu\text{L}$  de solution de produit à tester dans chaque puits. Les chimistes vont-ils pouvoir suivre dans cette course à l'infiniment petit ? Le « lab on a chip » est-il une utopie ou une réalité de demain ? Si la synthèse combinatoire a plus été une révolution culturelle que technique, la « lab on a chip » ne pourra que résulter d'une vraie révolution technique sur laquelle plusieurs groupes travaillent déjà.

Mais d'ici là, la synthèse à haut débit devrait avoir fait ses preuves en ayant contribué à la mise en évaluation clinique de nombreux candidats médicaments et ce, dans des délais nettement plus courts que ceux auxquels nous avons été habitués, prouvant ainsi qu'elle a atteint sa pleine maturité.