

De la molécule aux patients

La RMN au cœur de la recherche pharmaceutique translationnelle

Frédéric Herman, Isabelle Salliot-Maire et Serge Sablé

Résumé La résonance magnétique nucléaire joue un rôle essentiel depuis plusieurs dizaines d'années dans la recherche et le développement de nouveaux médicaments et pour la revendication de la propriété intellectuelle des nouvelles molécules analysées. Au sein de Sanofi, l'expertise RMN est regroupée dans des unités spécialisées en analyse structurale. L'objectif de ces entités est de résoudre les problèmes spécifiques de la R & D tels le criblage de molécules présentant une activité biologique, l'analyse structurale de produits d'origine naturelle, ou encore l'analyse et la caractérisation des impuretés formées à chacune des étapes de la synthèse des principes actifs. Avec la réorganisation stratégique de Sanofi pour la découverte de nouveaux médicaments, les laboratoires RMN des différents centres de recherche soutiennent également l'activité des unités de production à travers le monde, notamment en participant au contrôle du processus de bonne pratique de fabrication des produits finis. La RMN accompagne ainsi le médicament tout au long de sa vie.

Mots-clés RMN, R & D, médicaments, recherche pharmaceutique, industrie.

Abstract **From molecule to patients: the NMR at the heart of pharmaceutical research**
For over ten years, nuclear magnetic resonance has played an essential role in the research and development of new medicines and for the intellectual property of the new analyzed molecules. Within Sanofi, the NMR expertise is gathered in specialized structural analysis units. The objective of these entities is to resolve specific problems of the R&D such the profiling of molecules with a biological activity, the structural analysis of natural products or the analysis and the characterization of impurities formed in each stage of the synthesis of active principles. With the strategic reorganization of Sanofi Research and Development, the NMR laboratories also support the activity of the production units all over the world with the control of good practice manufacturing of finished products. Besides medicine, NMR can be found throughout life.

Keywords NMR, R&D, drugs, pharmaceutic research, industry.

Jusqu'aux années 2000, l'organisation interne de l'industrie pharmaceutique est restée assez cloisonnée avec la recherche, le développement et les affaires industrielles, considérés comme des entités autonomes. Du point de vue analytique, chaque entité possédait ses laboratoires avec leurs propres activités. Les outils analytiques et informatiques n'étaient pas les mêmes, les intérêts professionnels différaient et peu de passerelles existaient entre les entités. La vie d'une molécule et du futur médicament au sein d'une entreprise pharmaceutique était alors segmentée. Plusieurs études analytiques identiques pouvaient être réalisées et répétées lors des différents stades de développement, de sa découverte à sa commercialisation.

Les années 2000 sont aussi des années d'interrogations pour l'industrie pharmaceutique. Les politiques de santé des pays développés évoluent : la part des génériques s'accroît fortement, avec la perte de nombreux brevets pour des médicaments majeurs, et les conditions réglementaires se durcissent. Dans le même temps, le nombre de molécules innovantes mises sur le marché diminue drastiquement malgré des budgets de recherche et développement toujours plus élevés.

Les grandes compagnies pharmaceutiques doivent réagir et se restructurent. Sanofi adhère au concept de la

« médecine translationnelle » qui place le patient au cœur du processus de recherche de nouveaux médicaments dès les phases de découverte de molécules d'intérêt thérapeutique pour accélérer leurs développements. L'un des objectifs est de capitaliser les connaissances scientifiques acquises tout au long de la vie de la molécule et du futur médicament et de partager cette information. Le but est également de rationaliser les coûts de R & D pour faire face aux enjeux économiques et réglementaires des prochaines années.

C'est dans ce contexte que les laboratoires de RMN du groupe Sanofi s'organisent en réseau d'expertise mondial de façon transversale aux organisations et filiales. Localement, les centres de recherche de Vitry-sur-Seine et de Chilly-Mazarin sont regroupés fonctionnellement et s'organisent pour répondre efficacement à tous les défis analytiques que peut nécessiter le processus de développement d'un médicament, de sa découverte à sa vie après sa mise sur le marché : vie industrielle, commerciale et médicale.

Deux laboratoires, une équipe et un parc instrumental optimisé

Les activités de recherche au sein des laboratoires industriels relèvent principalement de la recherche appliquée, et les

laboratoires de RMN de Chilly et Vitry sont des partenaires qui délivrent des services pour l'ensemble des collaborateurs du groupe, de la recherche la plus en amont jusqu'aux produits commercialisés. Les chercheurs de ces laboratoires doivent posséder des compétences pharmacologiques élargies et les qualités exigées sont la rigueur et l'efficacité industrielle, c'est-à-dire se soumettre à des notions de délai et de qualité très contraignantes pour des activités multiples, tout en respectant des obligations réglementaires strictes avec un devoir de traçabilité.

Pour répondre aux exigences industrielles, les chercheurs disposent d'un équipement optimisé. Le parc d'appareillage est composé de douze spectromètres de 200 à 600 MHz dont quatre en libre service (figure 1).



Figure 1 - Le laboratoire de RMN de Vitry-sur-Seine. Tous les spectromètres y fonctionnent soit manuellement, soit en automatique.

De l'usage de la RMN à la recherche de nouveaux médicaments

La première étape du processus de découverte d'un médicament est la recherche de molécules présentant une activité biologique (« hits ») sur des cibles préalablement validées, généralement enzymatiques, avant leur transformation en molécules d'intérêt thérapeutique (« leads »), possédant les propriétés chimiques, physico-chimiques et métaboliques nécessaires.

Cette phase d'optimisation, bien que dirigée, a longtemps gardé une composante assez aléatoire, réalisée grâce au hasard et à la perspicacité des chimistes médicinaux. Mais la recherche se complexifie et le taux d'attrition devient de plus en plus élevé. Pour 10 000 molécules testées biologiquement, une seule reçoit son autorisation de mise sur le marché (AMM). Les coûts de R & D ont progressé fortement, contraignant l'industrie pharmaceutique à rationaliser cette approche aléatoire.

La conception moléculaire rationnelle (biologie structurale)

Cette stratégie repose principalement sur l'analyse de fragments de molécules (« fragment-based drug

design »). Des petites librairies (environ 1 500 fragments de masse moléculaire 150) sont utilisées pour identifier les interactions potentiellement responsables de l'activité chimique. Le choix et la diversité des fragments constituant la librairie sont essentiels pour réussir cette identification. Les informations obtenues sont ensuite utilisées pour construire le hit chimique à partir des fragments qui présentent les interactions les plus intéressantes.

Des outils informatiques ont été développés pour tester virtuellement ces fragments de molécules et ainsi simuler les interactions potentielles avec la cible thérapeutique. Mais quelles que soient les hypothèses construites sur la base des résultats théoriques obtenus, la validation ou l'infirmité de ces résultats ne peut se faire qu'avec l'apport des résultats expérimentaux. La RMN est utilisée dans ce cas pour détecter l'existence d'interactions et donc valider les hypothèses.

Ce type d'étude a par exemple été réalisé au laboratoire pour comprendre la nature de l'interaction entre l'antithrombine et les oligosaccharides constituant de l'énoxaparine [1-2], une héparine de bas poids moléculaire. La connaissance des interactions ioniques et non ioniques responsables de la formation des complexes oligosaccharides-antithrombine permet de comprendre les différences d'affinité observées selon la nature de la séquence oligosaccharidique (figure 2).

La découverte de nouveaux produits inspirés des structures des produits naturels

La découverte de nouveaux produits inspirés des produits naturels est une autre stratégie utilisée aujourd'hui au sein de Sanofi pour découvrir de nouveaux hits. Elle repose sur le fait qu'environ 80 % de la population mondiale utilisent uniquement des plantes médicinales pour se soigner et que la moitié des prescriptions médicales aux États-Unis contient au moins un médicament d'origine naturelle. Ces deux chiffres sont

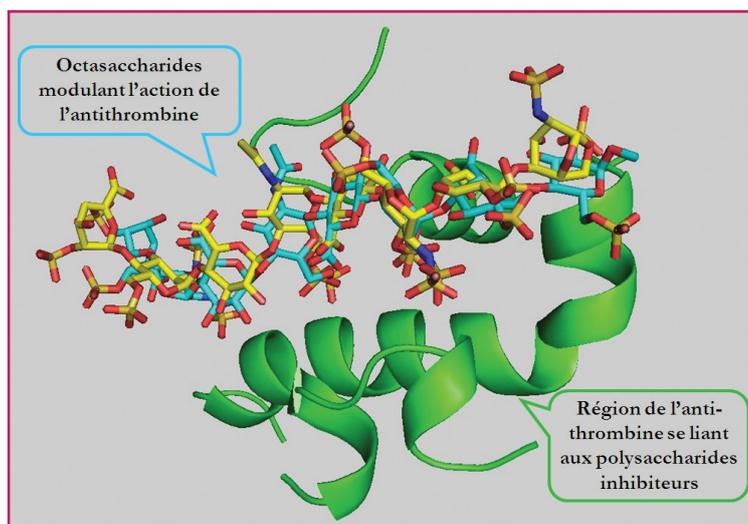


Figure 2 - Modélisation à partir des données RMN du complexe binaire antithrombine-polysaccharide.

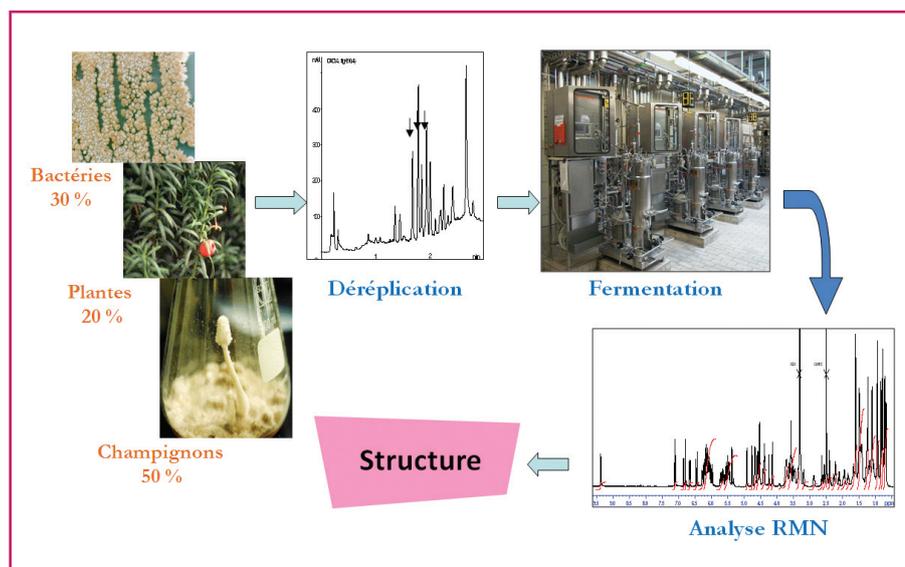


Figure 3 - Processus de découverte de nouveaux produits d'origine naturelle.

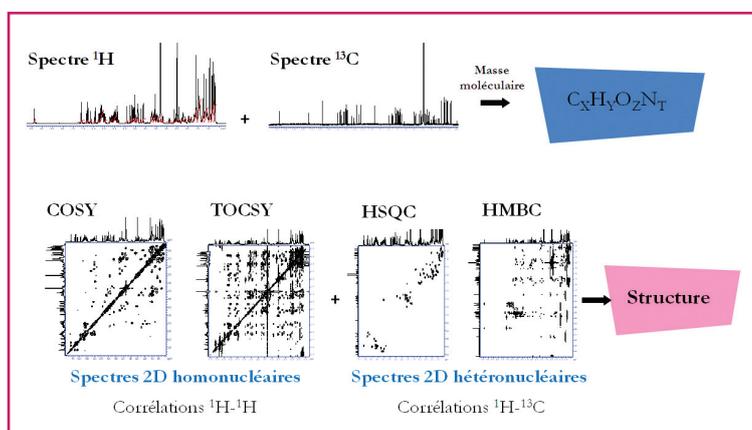


Figure 4 - Processus de détermination de structure par RMN.

significatifs de la place des produits naturels dans l'approche thérapeutique mondiale. Si on rajoute le fait qu'environ un tiers des médicaments commercialisés sont d'origine naturelle et que ce chiffre est d'environ 50 % dans le domaine de l'oncologie et des anti-infectieux, on comprend l'intérêt d'une société pharmaceutique comme Sanofi de continuer à investir dans la recherche de nouveaux produits d'origine naturelle.

La collection de Sanofi est parmi les plus importantes avec environ 100 000 espèces de bactéries et champignons et 7 000 plantes. Chaque année, plusieurs centaines de nouvelles molécules sont extraites de cette collection et les laboratoires de RMN jouent un rôle majeur dans la détermination de leur structure (figure 3). Le jeu consiste à utiliser avec rigueur et méthode les différentes expériences à deux dimensions homonucléaires (COSY, TOCSY et NOESY) et hétéronucléaires (HSQC et HMBC) pour conduire le plus rapidement possible à la structure recherchée (figure 4). La difficulté majeure a longtemps été d'obtenir le spectre ^{13}C , nécessaire pour identifier la molécule étudiée. L'investissement réalisé dans l'achat d'une crysonde spécifique ^{13}C nous permet d'acquérir désormais très rapidement les spectres 1D ^{13}C avec un excellent rapport signal sur bruit, contribuant à augmenter significativement notre productivité.

Parmi les produits commercialisés d'origine naturelle du groupe Sanofi, on peut mentionner le premier produit du groupe, le docétaxel (Taxotère®), un anticancéreux de type taxoïde, mais également un autre taxoïde indiqué pour le cancer de la prostate, le Jevtana®, commercialisé en 2010 (figure 5).

Thérapie ciblée et RMN

L'un des axes thérapeutiques majeurs de la recherche de Sanofi est l'oncologie. Principalement basé sur le site de Vitry, l'essentiel des efforts de recherche était jusqu'à présent focalisé sur la chimiothérapie. Son développement thérapeutique montre ses limites, liées à l'activité non spécifique qui peut produire une toxicité élevée. Au début du XXI^e siècle apparaît une approche moléculaire originale qui cible très précisément l'oncogenèse en

bloquant la transmission de signaux de la division cellulaire. Pour cela, des anticorps modifiés sont utilisés pour interagir avec les récepteurs membranaires des cellules visées.

Puis récemment, on conjugue la thérapie ciblée et la chimiothérapie classique : c'est la naissance des immunoconjugués. Partenaire absent de la thérapie ciblée à ses débuts, le laboratoire de RMN joue aujourd'hui un rôle important dans le développement des immunoconjugués. La conjugaison des deux approches doit permettre d'utiliser des médicaments possédant une cytotoxicité beaucoup plus élevée. Les molécules présentant de telles propriétés sont généralement d'origine naturelle, avec une structure complexe (figure 6). Un lien direct est ainsi créé entre la recherche de hits à partir de nouveaux produits naturels et la recherche d'immunoconjugués à visée thérapeutique.

L'optimisation des hits choisis se fait par hémisynthèse et leur confirmation structurale est facilitée par une bonne connaissance préalable de la molécule utilisée, souvent découverte en interne. Actuellement, une vingtaine de chimistes travaillent sur les modifications par hémisynthèse de différentes molécules d'origine naturelle. Cette nouvelle

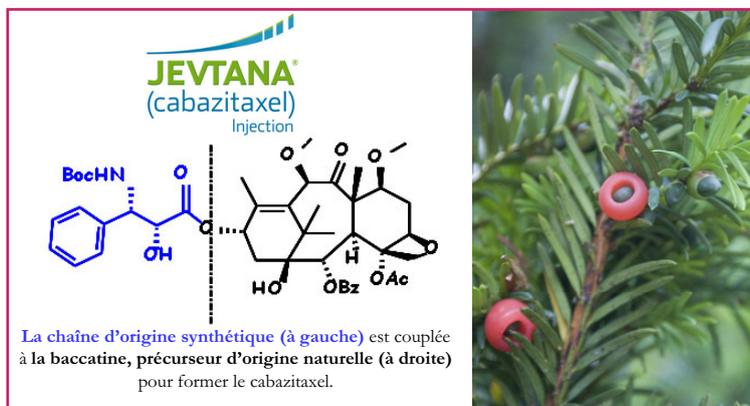


Figure 5 - Structure du Jevtana®, produit issu du département des produits naturels, fabriqué par hémisynthèse à partir d'un précurseur provenant des aiguilles d'if.

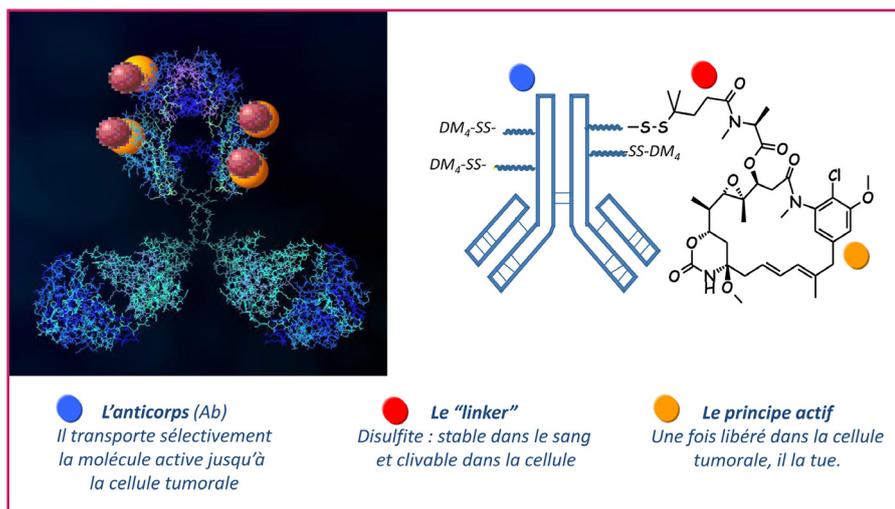


Figure 6 - Structure d'un immunoconjugué actuellement en phase de développement.

approche a modifié l'activité du laboratoire de RMN, avec un travail d'élucidation structurale plus difficile.

La RMN, un outil au service des chimistes médicinaux

Quatre unités thérapeutiques (fibrose, aging, oncologie et recherche exploratoire) sont présentes sur les sites de Chilly et Vitry, et plus de 150 chimistes participent à l'effort de recherche de nouvelles molécules au sein de ces unités. Une productivité soutenue est exigée de ces chimistes et pour les accompagner dans cet objectif, les laboratoires parisiens de RMN ont le devoir d'offrir des prestations de service de qualité avec des réponses analytiques rapides (délai moyen de 2 h) et fiables pour un flux quotidien d'environ 180 échantillons.

Ces analyses consistent à vérifier la conformité de la structure correspondant à la molécule synthétisée par le chimiste. Associée à la spectrométrie de masse, la RMN reste la méthode de choix pour ce contrôle. Il s'agit par ailleurs de pouvoir disposer de la description du spectre RMN ^1H de la molécule, en prévision de la rédaction ultérieure d'un brevet d'invention.

Aujourd'hui, si les spectres 1D ^1H sont généralement enregistrés pour tous les composés synthétisés, ils ne sont pas tous interprétés par les analystes.

Vers la confirmation de structure automatisée

Avec l'apparition de nouvelles activités, comme décrites précédemment et comme nous le verrons ultérieurement, et pour faire face au flux important de besoin de confirmation de structure de petites molécules, l'introduction du libre-service au sein des laboratoires de RMN industriels s'est imposée.

L'évolution de la technologie a permis l'automatisation des spectromètres RMN et les chimistes médicinaux sont incités à confirmer eux-mêmes la structure de leurs produits de synthèse. Mais quel que soit le processus de confirmation de structure mis en œuvre, par l'utilisation d'appareils en libre-

service ou par la sollicitation d'analystes en RMN, l'étape d'interprétation des données expérimentales constitue le goulot d'étranglement face à un flux important d'échantillons. Pour améliorer cette approche de la confirmation et accroître notre productivité, nous travaillons depuis longtemps sur des projets d'automatisation de cette phase d'interprétation de la confirmation de structure. Nous développons donc des solutions pour automatiser les étapes de traitement et d'analyse du spectre RMN, ainsi que la validation de la structure proposée par le chimiste. La figure 7 illustre comment il est possible d'accélérer le traitement des données RMN avec l'aide d'un support informatique complémentaire. Les spectres sont archivés électroniquement avec leur interprétation, la structure associée, le tout accessible aux chimistes des différents centres de recherche. L'un des avantages

de ce système est de détecter automatiquement si un composé synthétisé par le chimiste a déjà été analysé dans le passé. Dans ce cas, la compatibilité de la structure avec les données spectrales peut être établie de façon automatique en réalisant une simple comparaison des données d'archives avec les données expérimentales.

Le développement d'une molécule et sa commercialisation

Lorsqu'une molécule a été sélectionnée pour entrer en phase de développement et devenir un futur médicament, le laboratoire de RMN collabore avec l'ensemble des départements impliqués. Les chercheurs du laboratoire participent notamment aux études de toxicité de la molécule en analysant des produits de sa métabolisation. Ils sont également impliqués, avec les chimistes des procédés et des affaires industrielles, pour caractériser les impuretés de synthèse pouvant être formées lors des différentes étapes de fabrication. La caractérisation structurale des produits formés, soit par

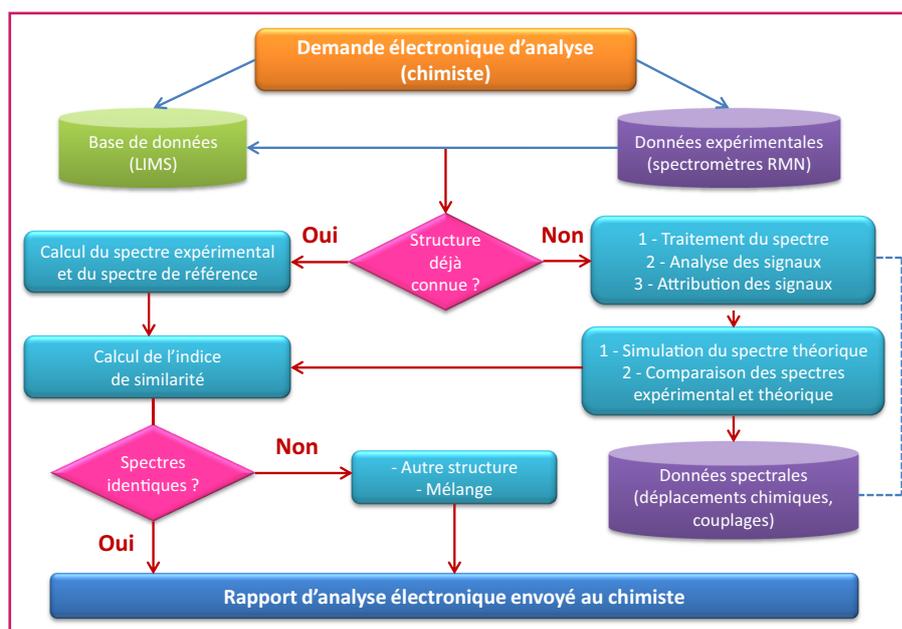


Figure 7 - Confirmation automatique de structure par RMN.

métabolisation digestive, soit résultant de la synthèse industrielle, est bien sûr primordiale pour assurer la sécurité du futur médicament et répondre aux exigences des autorités de santé.

Ces étapes de caractérisation sont souvent difficiles. Le challenge des analystes est d'autant plus important que les produits de métabolisation ou les impuretés de synthèse sont générés en très faible quantité et que leur isolement à partir de mélanges complexes s'avère très délicat. Depuis une dizaine d'années, le laboratoire a investi dans le développement du couplage chromatographique avec un spectromètre RMN.

La CL-SPE-RMN, un outil dans le développement de nouvelles molécules

L'identification par RMN des structures des molécules présentes dans des mélanges est un problème complexe. Une étape de séparation préliminaire est incontournable pour étudier les composés contenus dans ces mélanges. Deux alternatives s'offrent alors à l'analyste :

- une chromatographie préparative est réalisée pour purifier les composés d'intérêt : ainsi isolés, les produits pourront alors être analysés séparément par RMN ;
- la chromatographie liquide (CL) est couplée au spectromètre RMN : l'association d'une technique séparative à une technique d'identification structurale permet d'obtenir un ensemble d'informations structurales sur les différents composés d'un mélange sans réaliser de chromatographie préparative.

Mais une des limites de la RMN est son manque de sensibilité par rapport aux autres méthodes d'analyse structurale comme la spectrométrie de masse ou la spectrophotométrie UV. Ainsi, depuis dix ans que cette technique est utilisée au laboratoire, les efforts ont surtout porté sur l'amélioration de la sensibilité de la méthode. Plusieurs moyens sont alors mis en œuvre simultanément pour augmenter cette sensibilité :

- l'extraction sur support solide (SPE) préconcentre l'échantillon avant son transfert dans la tête de mesure RMN : c'est un moyen très efficace pour disposer d'une quantité d'échantillon suffisante et permettre ainsi l'identification structurale (figure 8) ;
- l'utilisation d'une cryosonde, qui augmente la sensibilité du spectromètre.

Dans le cas de spectromètres équipés d'une cryosonde, l'installation de la sonde à flux nécessite au moins une journée de travail, ce qui est incompatible avec le fonctionnement d'un laboratoire d'analyse en milieu industriel. L'accessoire Cryofit® développé par la société Bruker résout ce problème en transformant en quelques minutes une cryosonde classique en cryosonde à flux.

Du contrôle qualité à haute valeur ajoutée

L'implication des laboratoires s'inscrit également par une collaboration avec les affaires industrielles pour le contrôle qualité et la libération de lots de différents produits nécessitant une analyse RMN. C'est notamment le cas de l'héparine, médicament anticoagulant et antithrombotique, très largement utilisé en traitement post-opératoire. L'héparine pharmaceutique provient essentiellement de la muqueuse intestinale de porc. Jusqu'à très récemment, l'héparine était caractérisée principalement par son activité biologique. Mais

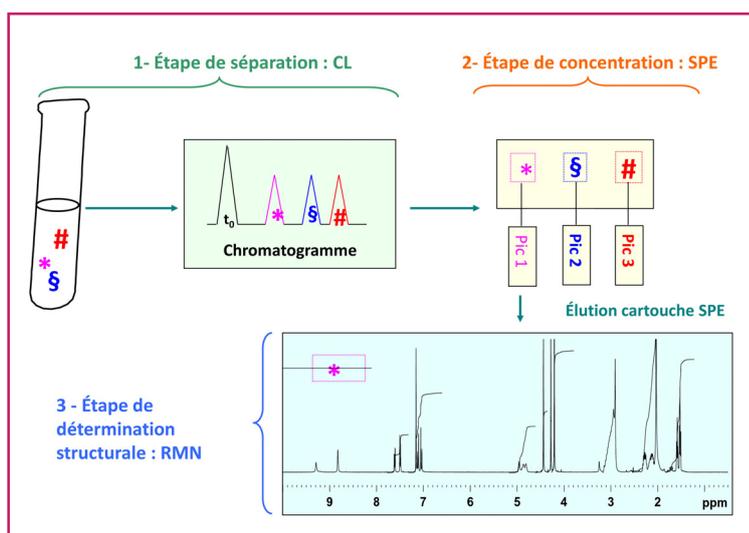


Figure 8 - Analyse structurale avec le couplage CL-SPE-RMN.

en 2007 et 2008, la contamination de l'héparine par de la chondroïtine polysulfatée (OSCS) provoque une crise de santé publique mondiale. Les autorités sanitaires imposent l'analyse RMN systématique pour le contrôle qualité de ce polysaccharide. Alors que les spectres proton de ce polysaccharide sont particulièrement complexes, la RMN 2D hétéronucléaire se révèle un outil très puissant pour identifier la présence d'impuretés et de contaminants, et pour caractériser leur structure. La figure 9 illustre comment la RMN permet la caractérisation du contaminant OSCS détecté dans un lot d'héparine commerciale. L'analyse par comparaison des spectres 2D montre l'exacte superposition des corrélations de l'OSCS (en noir) avec celle du contaminant présent avec l'héparine (en rouge).

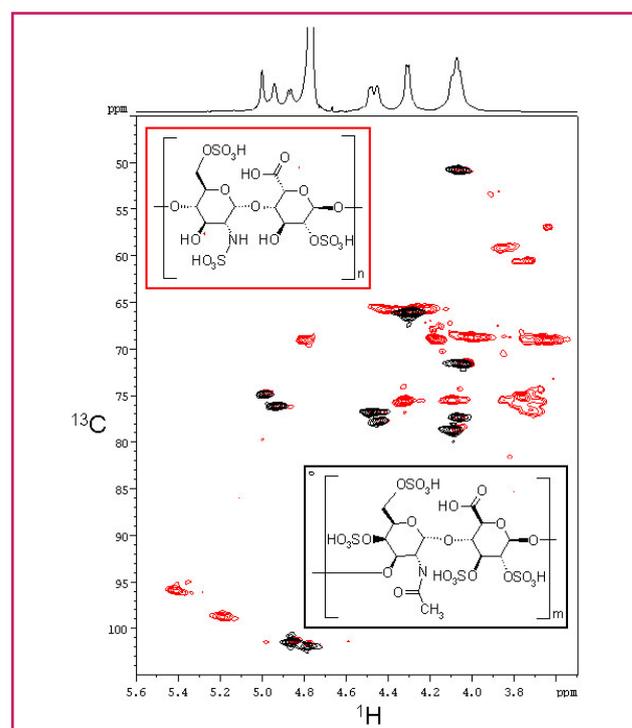


Figure 9 - Mise en évidence par RMN ^1H - ^{13}C de la contamination d'héparine de qualité pharmaceutique (en rouge) par la chondroïtine polysulfatée (en noir).

Aujourd'hui, le laboratoire assure le contrôle de plusieurs centaines de lots chaque année, en étroite collaboration avec certaines usines du groupe. Ces contrôles qualité nécessitent impérativement l'utilisation d'un spectromètre 500 MHz équipé d'une cryosonde et sont réalisés dans le respect des normes BPF (relatives aux bonnes pratiques de fabrication) comme l'exigent les autorités de santé.

Conclusion

Technique structurale de choix pour l'observation des molécules, la RMN est utilisée tout au long du processus de recherche d'un nouveau médicament. Cette spécificité offre aux chercheurs du laboratoire de RMN la chance d'être des acteurs privilégiés de la découverte et de la vie d'un médicament, mais aussi de collaborer avec de nombreux chercheurs des différents domaines de la science pharmaceutique.

Et demain ? Le secteur de l'industrie pharmaceutique s'interroge sur sa R & D et sur son évolution industrielle. Les récentes acquisitions de Sanofi augurent de nouveaux défis analytiques pour notre laboratoire. L'effort de formation pluridisciplinaire des « RMNistes » doit être poursuivi pour répondre à ces défis avec le plus haut niveau de prestation.

Du point de vue de l'appareillage, notre spectromètre de plus haut champ est et restera très certainement un 600 MHz. Notre besoin de très haut champ est ponctuel mais il est essentiel. Nous avons choisi de mettre en place un partenariat avec le Laboratoire de chimie et de biologie structurales de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN/CNRS, Gif-sur-Yvette), dirigé par le professeur Éric Guittet, en signant un contrat de prêt pour l'accès aux spectromètres 800 et 950 MHz.

Notre priorité doit se focaliser sur l'amélioration de la sensibilité des expériences de RMN. Le développement de la technologie cryosonde nous a permis d'augmenter notre productivité, mais nous a surtout ouvert de nouveaux horizons analytiques en répondant à des besoins de déterminations structurales jusque là inaccessibles. C'est dans ce sens que devraient être poursuivis nos efforts.

Les auteurs remercient vivement l'ensemble des collaborateurs des deux laboratoires de Chilly-Mazarin et Vitry-sur-Seine qui contribuent quotidiennement à leur réussite : Gilles Barbalat, Valérie Bassin, Valérie Bernard, Adeline Broguy, Caroline Granier, Florine Grolet, Sylvie Guilleret, Marie-Line Monteiro, Hélène Olivan et Julien Thomas.

Références

- [1] Guerrini M., Guglieri S., Casu B., Torri G., Mourier P., Boudier C., Lorenz M., Viskov C., Antithrombin-binding octasaccharides and role of extensions of the active pentasaccharide sequence in the specificity and strength of interaction, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 39, p. 26662.
- [2] Guerrini M., Elli S., Gaudesi D., Torri G., Casu B., Mourier P., Herman F., Boudier C., Lorenz M., Viskov C., Effects on molecular conformation and anticoagulant activities of 1,6-anhydrosugars at the reducing terminal of antithrombin-binding octasaccharides isolated from low-molecular-weight heparin Enoxaparin, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, p. 8030.



F. Herman



I. Salliot-Maire



S. Sablé

Frédéric Herman

est responsable du laboratoire de RMN du centre de recherche de Vitry/Alfortville, Sanofi.

Isabelle Salliot-Maire

est responsable du laboratoire de RMN du centre de recherche de Chilly-Mazarin, Sanofi.

Serge Sablé (auteur correspondant)

est responsable du Service d'analyse structurale des centres de recherche de Paris de Sanofi*.

* Centre de recherche de Vitry-Alfortville, Bâtiment Lavoisier, 13 quai Jules Guesde, F-94403 Vitry-sur-Seine Cedex. Courriel : serge.sable@sanofi.com



CNRS Formation Entreprises

Le CNRS | Annuaire | Mots-Clefs CNRS | Autres sites

du 8 au 11 octobre 2012 **Initiation à la RMN du solide haute résolution**
au MANS (72)

du 8 au 12 octobre 2012 **ICP-MS : niveau 1 (du 8 au 10/10) et/ou niveau 2 (du 11 au 12/10)**
à LYON (69)

le 15 octobre 2012 **Le nouvel étiquetage des produits chimiques dangereux**
à GIF SUR YVETTE (91)

du 19 au 23 novembre 2012 **Cryogénie : niveau ingénieur**
à GRENOBLE (38)

du 19 au 23 novembre 2012 **Assemblages formés par les lipides et les tensioactifs : outils de caractérisation et diagrammes de phase**
à CHATENAY MALABRY (92)

le 23 novembre 2012 **La fiche de données de sécurité : outil de prévention**
à GIF SUR YVETTE (91)

du 26 au 28 novembre 2012 **Adsorption : application en caractérisation des matériaux et séparation / stockage des gaz**
à MARSEILLE (13)

Stage à la carte. **Initiation à la pratique d'analyses thermiques :**
Nous consulter. - analyse calorimétrique différentielle (DSC)
à VILLEURBANNE (69) - analyse thermogravimétrique (ATG)

Centre de ressources en formation
Un besoin de formation particulier ?
Contactez-nous au 01.69.82.44.96

Catalogue, programmes et inscriptions : 01 69 82 44 55 - <http://cnrsformation.cnrs-gif.fr>