

Découverte d'une molécule active

ETAPE 2 : DECOUVERTE D'UNE MOLECULE ACTIVE

Cette étape est **concomitante de de l'étape 1** car la molécule découverte doit être capable de se lier à la cible et de moduler son activité.

I- Tête de série ou Hit

C'est la première molécule que l'on découvre, qui sert de point de départ à la conception du médicament. Cette molécule est la première d'une série d'autres molécules avec qui elle va partager certaines propriétés et différer par d'autres.

La molécule tête de série possède l'activité pharmacologique recherchée, mais elle **va devoir être optimisée** pour pouvoir être qualifiée de **candidat médicament**.

Par exemple, elle peut avoir des défauts qu'il faudra corriger :

- Manque de **sélectivité** ou spécificité
- **Activité pharmacologique insuffisante** à la dose thérapeutique qui devait être administrée
- **Instabilité** métabolique qui l'empêche d'atteindre sa cible dans son intégrité structurale
- **Instabilité** chimique qui peut lui faire perdre aussi sa structure moléculaire, nécessaire à son interaction avec la cible thérapeutique (par exemple : elle peut être instable en milieu acide, comme l'estomac)
- Haute **toxicité** qui diminuera l'intervalle de concentration auquel la molécule est efficace
- **Faible biodisponibilité** qui ne permettra pas à la molécule d'atteindre sa cible dans les meilleures conditions
- **Solubilité insatisfaisante** qui aura un impact sur le choix de la voie d'administration
- Manque d'originalité du point de vue de sa structure chimique et ou de ses propriétés thérapeutiques, ce qui aura un impact sur la protection et la valorisation du candidat médicament par un **brevet**

On essayera de corriger ces défauts durant la phase numéro 3 d'optimisation.



II- Sources

Il y a différentes sources qui permettent de **découvrir la molécule Hit**.

1) Le hasard

« Dans les champs de l'expérience, le hasard ne favorise que les esprits préparés » L. Pasteur.

Les résultats inattendus, œuvres du hasard, peuvent contribuer de manière favorable à une belle découverte s'ils ne sont pas négligés. *Vous l'avez compris, on peut découvrir une molécule par hasard (ex : la pénicilline)*

2) Le criblage ou screening

Permet de **tester un grand nombre** de structures chimiques pour les trier en fonction de leur intérêt thérapeutique.

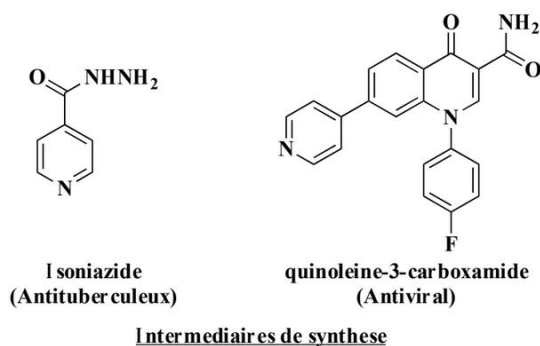
Les substances criblées peuvent provenir de :

- Substances **d'origine naturelle** : végétales, microbiologiques, marines ou animales.

Le médicament provient soit directement de l'extraction, soit après optimisation d'un composé d'origine naturelle. Ces substances sont souvent très complexes et très originales par leur structure, qu'on ne penserait jamais à synthétiser et elles peuvent être très intéressantes (le paclitaxel, un anti-cancéreux, a été développé à partir de l'écorce de l'If). Cependant, leur extraction est **onéreuse**, souvent **laborieuse et peu efficace** et leur synthèse est très difficile car les quantités de principe actif extraites sont souvent très faibles. Le médicament peut aussi venir de l'optimisation d'une molécule naturelle (hémisynthèse).

- Substances **synthétiques** : utilisation de chimiothèques = banques de composés, constituées par des chimistes. Ça peut être des molécules provenant d'industries qui n'ont rien à voir avec le médicament et le domaine de la santé. Ces **bases de données sont très larges** et le criblage permet de déceler celles qui pourraient avoir une structure intéressante.

Exemple d'intermédiaire de synthèse : l'isoniazide qui est un antituberculeux, ou la quinoleine-3-carboxamide utilisée comme antiviral.



3) Le criblage haut débit ou High Throughput Screening (HTS)

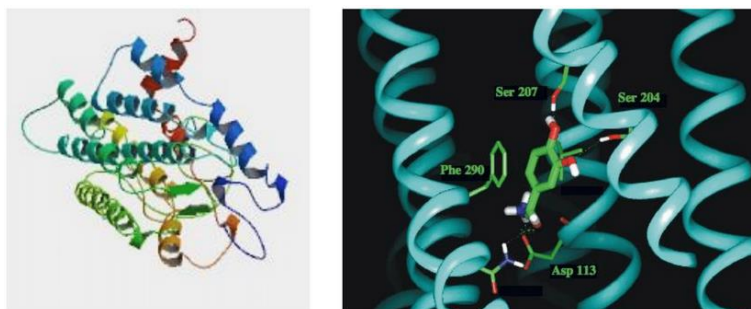
C'est la technique utilisée actuellement, elle est réalisée sur de grandes bibliothèques de molécules (chimiothèques).

- Ce procédé a pour but d'identifier les propriétés pharmacologiques des molécules testées sur une ou plusieurs cibles et leur capacité à stimuler ou inhiber la cible.
- Permet d'obtenir un maximum de renseignements pour sélectionner la molécule hit.

4) Criblage virtuel

Cette technique est réalisée à partir de modèles moléculaires de la cible visée générés par un ordinateur. Les logiciels de modélisation permettent **l'étude des interactions entre la cible et de grandes bibliothèques de composés** virtuels, ou existant. On va ensuite sélectionner des molécules d'intérêt pour les tester expérimentalement.

Exemple : La structure du récepteur B1 adrénergique à gauche, à droite un zoom sur ses domaines transmembranaires impliqués dans l'interaction du ligand endogène. On voit la structure du ligand en gras au milieu interagissant avec diverses chaînes latérales d'AA.



5) À partir de médicaments déjà existants

Le principe est d'utiliser un médicament déjà mis sur le marché comme molécule tête de série ou composé pilote.

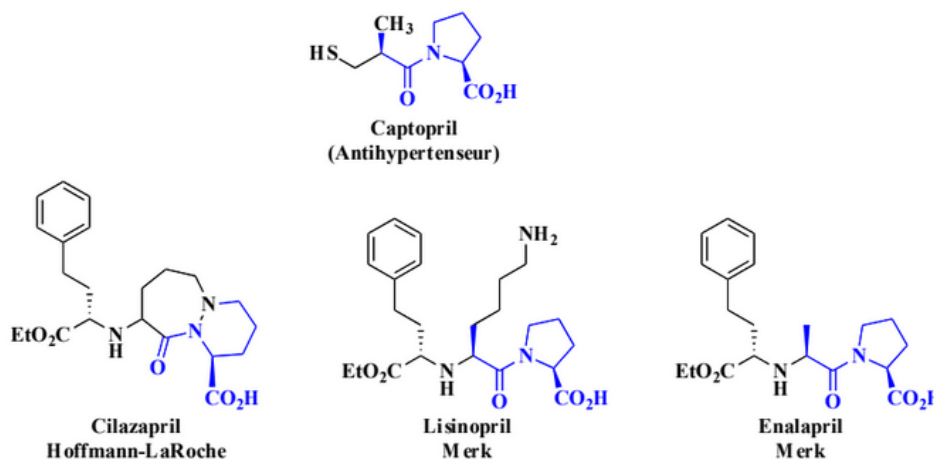
L'utilisation des connaissances sur ce médicament va permettre de développer une nouvelle molécule appelée médicament « me too ». Cette méthode représente actuellement plus de la moitié des médicaments mis sur le marché.

La structure de la nouvelle molécule développée est différente de celle du composé pilote, ce qui permet d'échapper aux restrictions des brevets.

L'avantage financier de ce procédé s'explique par le fait que le coût en recherche et en développement est moins élevé que pour un médicament à haute valeur ajoutée, de structure chimique et d'apport thérapeutique nouveau, vu que la molécule est déjà connue et caractérisée.

La nouvelle molécule peut maintenir et améliorer l'activité pharmacologique du composé pilote ou amplifier un effet secondaire. Dans le premier cas, l'amélioration du composé pilote justifie le caractère innovant de cette nouvelle molécule.

Exemple du captopril : ce médicament anti hypertenseur a servi de composé pilote et a permis d'obtenir de nouvelles molécules avec une structure chimique commune :



Sur ce schéma on retrouve le captopril et tous ses me-too qui ont la même structure de base (en bleu)

Dans le deuxième cas, il est possible d'utiliser un médicament déjà mis sur le marché pour développer cette nouvelle molécule en exploitant une indication médicale ou un effet indésirable dans un autre contexte dans le but d'amplifier cet effet secondaire recherché et de supprimer l'effet biologique principal pour lequel la molécule a été développée au départ.

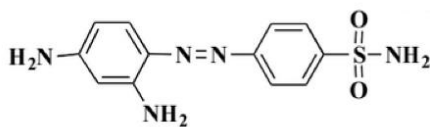
Exemple du Prontosil :

C'est le premier médicament anti bactérien, introduit 10 ans avant la pénicilline. Il ouvre l'ère des médicaments sulfamidés (=possédant le groupement fonctionnel sulfamide SO_2NH_2). Leur effet secondaire hypoglycémiant a été amplifié comme dans le tolbutamide, agent anti diabétique de première génération en associant à la fonction sulfamide une fonction urée $NHCONH$. Cela a permis le développement de médicaments contre le diabète de type 2 non insulino-dépendant.

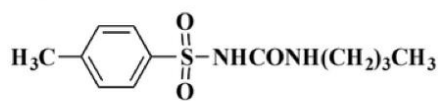
Exemple de la Prométhazine :

Antihistaminique H1 avec une structure tricyclique de base phénothiazine à chaîne latérale aliphatique, Elle se caractérise par un effet sédatif marqué aux doses usuelles d'origine histaminergique et adrénolytique centrales. Cet

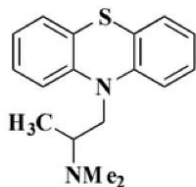
effet, au niveau du SNC a été amplifié dans la structure de Chlorpromazine, agent anti psychotique neuroleptique en substituant le tricycle phénothiazinique par un atome de Cl et en éloignant du système tricyclique le groupe fonctionnel diméthylamino en bout de chaîne latérale aliphatique



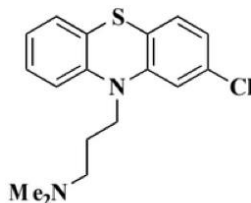
Prontosil
(Antibacterien)



Tolbutamide
(Hypoglycémiant)



Promethazine
(Antihistaminique)



Chlorpromazine
(Neuroleptique)

Ces exemples ne sont pas très importants à connaître par coeur, c'est surtout à titre d'illustration que la prof les utilise, pour bien comprendre la logique des me-too

6) À partir des connaissances médicales anciennes

L'étude des pratiques médicales des civilisations anciennes et l'ethnopharmacologie permettent d'accéder à des connaissances sur des matières d'origine végétale, animale, minérale... utilisées à des fins thérapeutiques, préventives, curatives ou diagnostiques

Par exemple, les usages empiriques des plantes ont apporté une grande partie des médicaments quotidiens inscrits dans nos pharmacopées. On va ensuite faire une évaluation pharmacologique de ces matières en laboratoire, où on va vérifier l'effet chez l'animal ou sur culture cellulaire. On va finir par rechercher le composé chimique qui donne l'effet attendu de la plante.

En résumé, on utilise depuis longtemps une plante pour soigner une pathologie, sans savoir exactement pourquoi ça marche => on étudie la plante en question, on détermine quelle molécule produite par cette plante est responsable de l'activité pharmacologique

Exemple de l'étude des archives de Médecine Chinoise : (miam la pharmacognosie, on adore !)

Dans les années 50-60, il y avait une croissance importante du paludisme : le plasmodium falciparum devenait résistant aux antipaludiques sur le marché. L'armée chinoise a lancé une grande campagne pour essayer de trouver de nouvelles molécules. A partir des archives sur le traitement des symptômes du paludisme, ils ont trouvé 200 substances naturelles utilisées, et à partir de ces 200 substances, ils ont lancé un programme de recherche pour trouver une nouvelle molécule efficace sur le plasmodium falciparum résistant. En 1972, il a été déterminé que les feuilles de l'Artémisia annua contiennent de l'artémisine, qui fonctionne comme traitement antipaludique.

7) À partir du ligand ou du modulateur naturel de la cible

On peut développer un nouveau médicament en partant de la structure chimique du ligand endogène ou d'un modulateur naturel de la cible visée. À partir de là, 2 types de médicaments vont être développés :

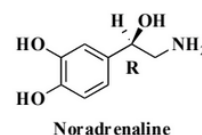
- Les **agonistes** qui donnent la même réponse pharmacologique sur la cible que le ligand naturel mais ont une structure chimique différente du ligand naturel.
- Les **antagonistes** qui bloquent l'activité du ligand naturel en l'empêchant de se lier à la cible.

Exemple : médicaments ciblant les récepteurs adrénergiques

Des agonistes et des antagonistes adrénergiques ont été développés à partir des ligands endogènes des récepteurs adrénergiques que sont l'adrénaline et noradrénaline. La base structurale se conserve dans les exemples d'agonistes et d'antagonistes. Seuls quelques fragments moléculaires montrent comment la structure de base a été optimisée pour développer les molécules médicamenteuses recherchées.



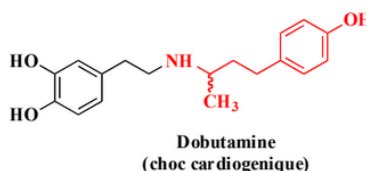
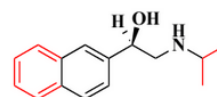
Adrenaline



Noradrenaline

o Agonistes obtenus : Dobutamine et Salbutamol

o Antagoniste obtenu : Pronethalol

AGONISTESDobutamine
(choc cardiogénique)Salbutamol
bronchodilatation
asthme**ANTAGONISTE**Pronethalol
b-bloquant
angine de poitrine, arythmies, hypertension**8) Conception assistée par ordinateur**

Les logiciels de modélisation permettent de créer des modèles moléculaires de cibles et de ligands pour faire une étude théorique de la nature et de la forme de la cible visée, et plus particulièrement du site de fixation du ligand, qui sera ensuite vérifiée expérimentalement.

- ➔ Si la structure 3D de la protéine a été **déterminée** par diffraction des RX ou cristallographie, les coordonnées obtenues peuvent être transformées en image grâce à un logiciel de modélisation moléculaire qui permet d'étudier de manière théorique la nature et la forme de la cible visée et plus particulièrement celle du site de fixation du ligand pour sélectionner ou concevoir une molécule après un criblage virtuel.

L'analyse de la simulation du ligand dans le site de liaison de la cible s'appelle le Docking.

- ➔ Si la structure 3D de la cible protéique n'est pas connue, il est possible de réaliser un Docking à partir de la structure 3D d'une protéine analogue ayant une homologie de séquence d'AA > 90%. Dans ce cas le logiciel de modélisation moléculaire permet de modifier la nature des AA différents afin de générer un modèle de cible optimisé qui soit le plus représentatif de la cible étudiée.
- ➔ À partir de **données expérimentales** : par exemple, au début de la recherche d'une molécule active, la structure de la cible visée ou d'une cible analogue n'est pas connue. Mais il est possible de comparer par modélisation moléculaire les structures chimiques de molécules criblées expérimentalement en fonction de leur activité pharmacologique. Cette comparaison se fait en superposant les structures chimiques des molécules criblées afin d'identifier les caractères structuraux communs reliés à leurs propriétés pharmacologiques évaluées. Cela s'appelle le Matching.

Ici nous avons deux exemples d'analyse assistée par ordinateur. À gauche une analyse par Docking avec l'ADN méthyltransférase, la molécule cible visée dans cet exemple, où se trouve dans le site actif de l'enzyme inhibiteur RG108.

À droite, une analyse par matching où nous voyons 4 molécules dont les fragments moléculaires se superposent en différents points en fonction de leur activité inhibitrice sur la transcriptase inverse HIV-1.

9) Conception par RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

C'est une méthode de **détermination de la structure** chimique des molécules **par spectroscopie**.

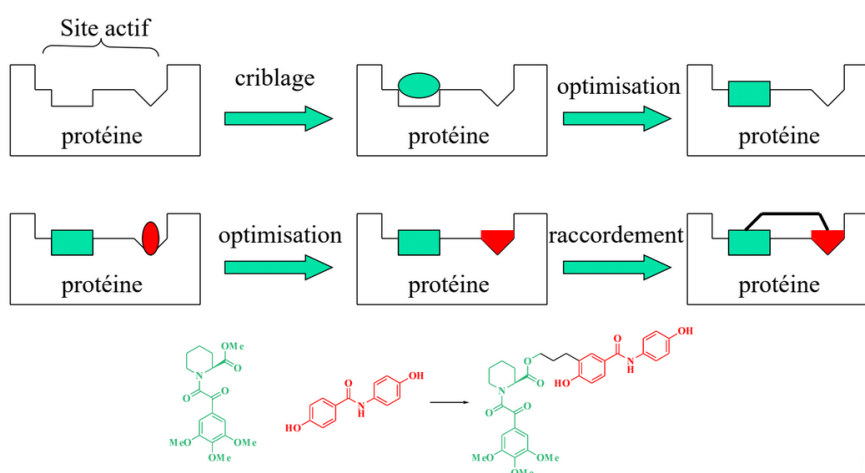
Ce phénomène exploite les propriétés mécaniques du noyau de certains atomes lorsqu'ils sont soumis à des RMN pour déterminer la position des atomes les uns par rapport aux autres.

Elle peut aussi être utilisée pour concevoir des molécules qui puissent interagir avec la cible visée.

On commence par faire un **marquage** à l'azote 15 de la protéine au niveau de ses liaisons peptidiques. Puis, une analyse croisée des spectres RMN de 2 types d'atomes différents (15N et 1H) nous permet d'obtenir un spectre RMN bidimensionnel (2D), nécessaire pour l'analyse des molécules de structure complexe comme les protéines.

Si cette cible est mise en présence d'un ligand, les spectres RMN seront modifiés et il sera possible **d'identifier la zone d'interaction ligand-cible**.

Tout ça permet d'identifier le site actif de la cible.



Le site actif a été identifié au préalable grâce à l'analyse spectroscopique RMN 2D de la protéine.

Étapes :

- 1- Par criblage, **un petit fragment moléculaire (= épitope)** est mis en présence de la protéine afin d'analyser la zone spectrale qui a été modifiée par son interaction avec la cible et donc d'identifier les AA qui interagissent avec lui ou qui sont dans son environnement proche.
- 2- **Optimisation** de la structure du fragment moléculaire, en fonction des données spectroscopiques précédentes afin d'améliorer ses interactions avec la cible.
- 3- **Répétition des étapes** : l'épitope est optimisé en fonction des données spectroscopiques obtenues et ainsi de suite jusqu'à ce que l'ensemble du site actif de la cible ait été analysé.

Remarque sur les épitopes : ils n'interagissent qu'avec une toute petite partie du site actif et ne peuvent donc pas avoir d'activité pharmacologique par eux seuls.

4- **Raccordement chimique des fragments** moléculaires identifiées (les carrés et triangles du schéma), de sorte que leur interaction avec la cible ne soient pas modifiées.

5- Évaluation expérimentale de l'activité pharmacologiques

En gros la RMN c'est une sorte de puzzle : on regarde quels fragments interagissent avec la cible, et ensuite on les relie entre eux au fur et à mesure pour déterminer la structure finale

III- Isolement et purification d'une molécule tête de série

Cette étape est **indispensable si la molécule est mélangée à d'autres composés**. Par exemple, pour les molécules provenant d'une source naturelle ou d'une synthèse combinatoire.

La technique de choix utilisée est la chromatographie. ++++

Les facteurs influant sur la facilité d'isolement sont :

- La **structure** du composé
- La **stabilité** du composé
- La **qualité** du composé

IV- Établissement de la structure d'un composé

La caractérisation structurale de la molécule tête de série est une étape importante pour que la molécule découverte puisse être un médicament candidat.

| Cristallographie par diffraction aux rayons X | Spectroscopie par RMN | Spectrométrie de masse | Synthèse totale |
|--|---|---|---|
| Technique très précise, qui nécessite la forme cristalline de la molécule, et une grande quantité de produit | Elle nécessite une faible quantité de produit, on peut travailler avec tous types d'échantillons : solide, liquide, huileux | Elle est utilisée quand on doit travailler avec des quantités très faibles. On effectue une analyse par fragmentation de la molécule, puis on sépare ces fragments par chromatographie en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse/charge. | Elle est utilisée si on a un doute sur la structure obtenue par les autres techniques Elle va comparer les propriétés physico-chimiques de la molécule obtenue avec celles de la molécule originale. En cas de différence : les molécules ont une structure chimique différente. Sinon la structure préalablement identifiée est validée |

ÉTAPE 3 : OPTIMISATION DE LA MOLÉCULE ACTIVE

On a identifié et validé la cible, on a trouvé notre petite molécule, il est temps de l'optimiser pour remédier à certains inconvénients, pour pouvoir la qualifier de candidat médicament.

Les objectifs de cette étape sont divers :

- **Augmenter l'activité** pharmacologique sur la cible / son affinité
- **Minimiser les effets secondaires** indésirables en réduisant les interactions avec d'autres cibles de l'organisme
- **Diminuer la toxicité** : améliore l'index thérapeutique
- **Améliorer les propriétés** pharmacologiques **ADME** : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion (=Élimination)

I- Modifications chimiques de la molécule active par la méthodologie « Hit to lead »

1) Méthodologie

1- **Simplification** de la molécule hit et synthèse de **dérivés proches**. On va la rendre plus facilement modifiable en changeant certains de ses groupements tout en conservant les groupements qui lui confèrent les propriétés pour lesquelles elle a été sélectionnée. À partir de cette nouvelle structure simplifiée on va synthétiser des dérivés proches, tout cela permettra de faciliter la synthèse organique.

2- **Évaluation de l'activité pharmacologique** et des propriétés pharmacocinétiques, afin de quantifier l'impact de chaque modification structurale réalisée.

3- **Étude des relations structure-activité (RSA)** : Pour comprendre quelles propriétés structurales et physicochimiques ont permis d'obtenir le résultat attendu. Cette étape est indispensable avant d'engager de nouvelles modifications.

2) Objectifs

On va vouloir **définir les pharmacophores** ou groupements pharmacophoriques. C'est-à-dire les fonctions chimiques de la molécule **responsables de son activité pharmacologique** (intrinsèque) et des propriétés **pharmacocinétiques**.

Les RSA sont établies séparément pour intervenir dans l'optimisation de l'activité pharmacologique. Ce sont les groupements qui interagissent avec la cible.

3) Conditions

L'évaluation de l'activité est définie au niveau :

- De **l'organisme entier** : Le pharmacochimiste aura de nombreuses informations significatives du point de vue pharmacocinétique alors que les résultats seront peu significatifs vis-à-vis de l'activité intrinsèque car la mesure sur l'organisme entier est trop éloignée de la cible visée.
- De **l'organe** : La mesure fera abstraction de l'accès de la molécule à ce niveau mais sera plus spécifique du point de vue pharmacologique.
- De **la cible** (in vitro) : La mesure de l'activité intrinsèque sera hautement significative vis-à-vis de la cible visée, mais le pharmacochimiste n'aura aucune information sur l'aptitude de la molécule à l'atteindre.

4) Outils

On va **établir les RSA** pour **définir les pharmacophores** à partir de l'étude topographique 3D de la cible, si elle est connue.

Attention, il est **impossible de comparer** les interactions **ligand-cible** avec les propriétés pharmacologiques mesurées expérimentalement. Sinon on va faire une comparaison au niveau structural et physico-chimique des molécules évaluées par criblage.

II- Pharmacophores / Activité intrinsèque

Les RSA **ne peuvent pas être établies** pour les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques **en même temps** car les propriétés physico chimiques et structurales qui les caractérisent ne sont pas toujours identiques. +++

Les RSA qui relient la notion de pharmacophores à l'activité intrinsèque permettent à ce dernier de se lier à la cible par des liaisons faibles ou électrostatiques. On retrouve (+++) :

- ✓ La **nature** des fonctions chimiques
- ✓ Les **chaînes** aliphatiques et/ou cycles
- ✓ La **géométrie** et position par rapport à d'autres groupements fonctionnels
- ✓ La **répartition électronique**

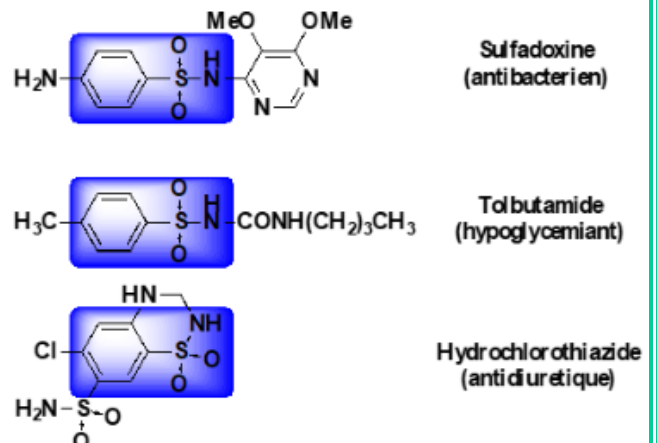
Toute modification des pharmacophores modifie l'activité pharmacologique, et toute modification externe au pharmacophore module l'activité.

Cas particulier : Quand une même fonction chimique se trouve associée à des fragments moléculaires divers il faut alors procéder à une **hiérarchisation**.

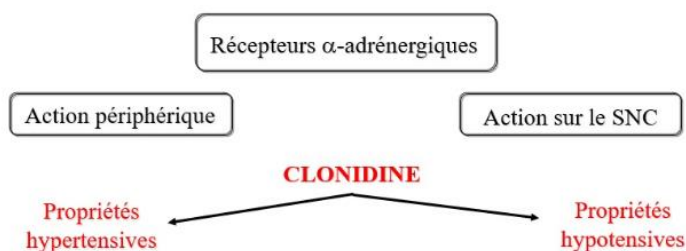
Ici, les trois molécules sont des **dérivées de sulfamides**, mais cette fonction chimique n'a pas le même **environnement chimique** dans le sulfadoxine, le tolbutamide, l'hydrochlorothiazide.

L'impact de ce groupement chimique est donc différent en fonction des propriétés pharmacologiques de ces trois molécules car le pharmacophore sulfamide n'a pas le même impact par rapport aux autres sur ses propriétés.

Il est également plus difficile d'établir les RSA quand un même groupe pharmacophorique provoque des effets différents sur un type de récepteur appartenant à des systèmes physiologiques fonctionnellement différents.



Par exemple ici, les récepteurs alpha adrénergiques se localisent au niveau périphérique mais aussi au niveau du SNC.



La Clonidine est un médicament agoniste des récepteurs alpha adrénergiques qui diminue l'activation du SN sympathique avec des propriétés hypotensives via un rétrocontrôle négatif central. Mais des propriétés hypertensives de la Clonidine se retrouvent au niveau périphérique.

III-Pharmacophores / Pharmacocinétique

Comme évoqué précédemment, les RSA ne peuvent pas être établies pour les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques en même temps car **les propriétés physico chimiques et structurales qui les caractérisent ne sont pas toujours identiques**. +++

En effet les RSA qui relient la notion de pharmacophore aux propriétés pharmacocinétiques sont de nature physicochimiques.

Les caractéristiques physico chimiques ayant le plus d'impact sur l'aptitude d'une molécule à atteindre sa cible ou à traverser les membranes cellulaires ou encore à être absorbé/distribué/métabolisé/éliminé de l'organisme sont :

- Le balance **hydrophilie / hydrophobie**
- Le caractère **acido-basique / l'amphotarité** (=le caractère amphotère)

Ils sont **évalués pour la globalité de la structure** moléculaire. Les groupements chimiques qui la constituent vont les moduler.

Par exemple : les groupement CF_3 , F, Cl, CH_3 , qui ont un caractère hydrophobe vont augmenter globalement l'hydrophobicité d'une molécule, alors que les groupements OH, CO_2 augmentent l'hydrophile de la molécule.

IV- Les modulations chimiques

Méthodologie :

- Synthèse de dérivés proches de molécules actives, naturelles ou synthétiques
- Évaluation de l'activité pharmacologique, des propriétés PK et/ou de la toxicité à chaque modification
- Étude des RSA

- Limitées pour conserver l'essentiel de la structure moléculaire d'origine
- Simplification de la molécule active
- Association à des éléments divers

Exemple de pharmaco-modulation : la morphine pour illustrer la notion de pharmacophore, de modification chimique et de RSA



On voit sur la structure du milieu les différents dérivés de la morphine : codéine et héroïne en fonction de la nature des groupements chimiques R et R'.

À gauche, le pharmacophore commun à ces trois molécules et à deux autres dérivés : la phénazocine et la pentazocine qui diffèrent par la substitution R de l'atome d'azote.

La morphine est un analgésique puissant qui induit une **dépendance physique** : pour diminuer cette dépendance, on envisage une optimisation de la molécule pour minimiser le risque de toxicomanie

On aboutit à la Buprénorphine, qui possède le même pharmacophore que les dérivés morphiniques (structure en bleu sur le schéma) sur lequel on a rajouté des groupement fonctionnels variés qui rigidifient la structure : pontage d'un cycle, ce qui augment **l'encombrement stérique** de la molécule (substituants volumineux)

La Buprénorphine est un agoniste/antagoniste morphinique qui se fixe au niveau des récepteurs cérébraux mu : son activité dans le **traitement de substitution des opioïdes** est attribuée à sa liaison lentement réversible aux récepteurs mu dû à la structure rigide et à l'encombrement stérique des substituants précédemment cités qui minimisent de façon prolongée le besoin des toxicomanes en stupéfiants.

Petit moment récap/rappel de la part du prof :

- La recherche et le développement de médicaments c'est :
 - ➔ Tester l'affinité de la cible
 - ➔ Tester la sélectivité
 - ➔ Tester la biodisponibilité
 - ➔ Tester la toxicité du produit et de ses métabolites
 - ➔ Mettre au point la synthèse industrielle
- Le temps de développement : 10-15ans

Petit instant dédis/pas dédis parce que j'en peux plus de cette semaine :

- Dédis à ma super cotut qui m'a encouragée pour finir cette fiche
- Dédis à votre patience parce que je vous la sors un peu tard par rapport à l'EB
- Pas dédis à la virose que je me tape, surtout que j'enchaîne deux virus différents en une semaine
- Dédis à mon coma de 14h, je suis toujours fatiguée
- Dédis à ma bouillotte et les infusions au thym