

Projet Ra&D à l'Ecole d'Ingénieurs et d'Architectes de Fribourg

Développement d'un Nouvel Agent Anti-SIDA: NU 1320

Martine Poffet* et Jean-Marc Bourgeois

R and D Project at the School of Engineering and Architecture of Fribourg. Development of the Synthesis of a Novel anti-AIDS Drug: NU 1320

Abstract: The division of chemistry at the School of Engineering and Architecture of Fribourg is involved with the School of Engineering of Geneva in the development of a new drug for the treatment of AIDS. This recently discovered molecule, called NU 1320, has already shown a powerful antiviral activity. NU 1320 is a nonnucleoside inhibitor, which stops the formation of the retrotranscription complexe of the HIV-virus. The concentration of NU 1320 to inhibit 50% of viral replication is 10^{-6} nM: such a low concentration and the non-toxicity will prevent the occurrence of side effects for the patient. As a future potential HIV drug, the University of Applied Sciences of Western Switzerland (HES-SO) has invested in this research with the start of a project for the scale-up of this new antiviral molecule with the intention to perform *in vivo* tests.

Keywords: AIDS treatment · Nonnucleoside inhibitor · NU 1320 · Scale-up



*Correspondance: M. Poffet
Collaboratrice scientifique
Département des technologies industrielles
Filière de chimie
Ecole d'ingénieurs et d'architectes de Fribourg
Boulevard de Pérolles 80 - CP32
CH-1705 Fribourg
Tel.: +41 26 429 67 03
Fax: +41 26 429 66 00
E-Mail: martine.poffet@eif.ch, jmarc.bourgeois@eif.ch
<http://www.eif.ch>

1. Historique

En 2001, le laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Genève, dirigé par le professeur Dr J.M.J. Tronchet, a synthétisé une nouvelle molécule très active contre le virus du SIDA. Sous le nom de code NU 1320 et protégé par plusieurs brevets [1], ce composé antiviral (Fig. 1) a été testé par les laboratoires Mayoly Spindler [2] sur des cellules monocytes du sang (PBMC). Il s'est avéré que le NU 1320 était deux millions de fois plus actif que l'AZT (Fig. 2) actuellement utilisé en thérapie.

Etant donné l'efficacité de cette nouvelle substance, les laboratoires Mayoly Spindler ont signé alors un contrat avec l'Université de Genève afin d'effectuer les premiers tests *in vivo* du NU 1320. En parallèle, la HES-SO a financé un projet de développement du NU 1320 sur deux sites:

- Scale up du NU 1320 à l'Ecole d'ingénieurs et d'architectes de Fribourg
- Synthèse du NU 1320 radioactivement marqué à l'Ecole d'ingénieurs de Genève

2. Activité du NU 1320: un nouvel agent anti-viral

La tendance actuelle dans le traitement du SIDA consiste à faire appel à des polythérapies n'incluant plus les antiprotéases dont les effets secondaires sont gênants et les modalités de prise de médicament contraignantes pour le patient. Les polythérapies comportent dorénavant des inhibiteurs de la transcriptase inverse, et plus particulièrement un ou deux inhibiteurs nucléosidiques auxquels sont associés un ou deux inhibiteurs non nucléosidiques [3]. Les inhibiteurs non nucléosidiques, tel que

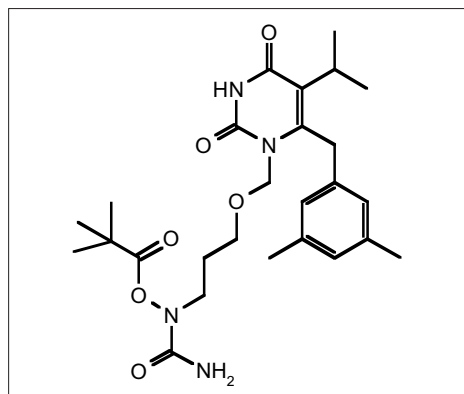


Fig. 1. Structure du NU 1320

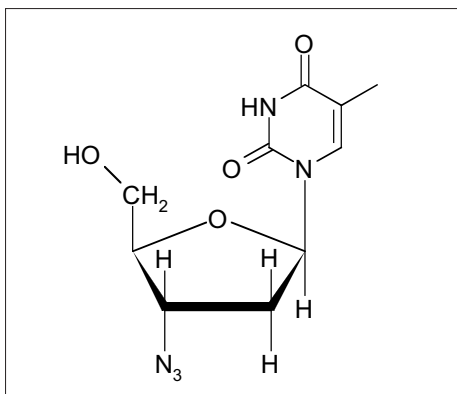


Fig. 2. AZT (Zidovudine)

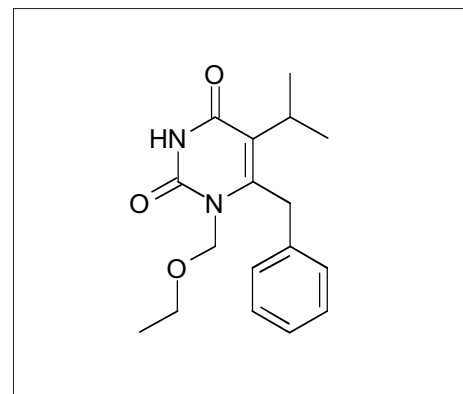


Fig. 3. Emivirine

Tableau 1. Inhibition de la réplication virale

	Cl ₅₀ [nM] (Concentration du composé permettant d'inhiber 50% de la réplication virale)
L'émivirine	2
NU 1657	10 ⁻³
NU 1320	10 ⁻⁶

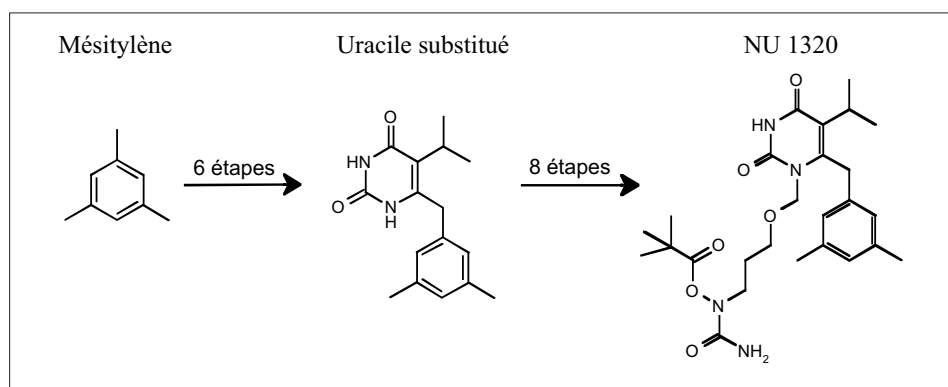


Schéma. Synthèse du NU 1320

l'émivirine (Fig. 3), sont déjà connus pour leur action à des concentrations nanomolaires (Tableau 1).

Le NU 1320 est un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse du VIH-1 et a la structure d'un acyclonucléoside pyrimidique (Fig. 1). Il est constitué d'une nucléobase à laquelle est greffée la chaîne spécifique. Les études conduites sur les modèles montrent que l'hétérocycle de NU 1320 se fixe dans le site allostérique de la transcriptase inverse. Sa chaîne latérale a une longueur idéale pour qu'une fonction terminale ressorte du site et inhibe la formation du complexe de rétrotranscription impliquant plusieurs protéines du virus.

L'activité antivirale du NU 1320 a été déterminée sur des souches VIH-1 lai, ain-

si que sur une trentaine de souches virales différentes. La capacité du NU 1320 à inhiber la réplication virale et sa cytotoxicité ont été mesurées. Lors de ces tests, le NU 1320 s'est avéré atoxique et actif sur VIH-1 à des concentrations bien plus faibles que celles atteintes jusqu'alors avec des produits analogues déjà connus, tels que l'émivirine (Tableau 1).

Si cette remarquable activité est conservée *in vivo*, des doses extrêmement faibles pourraient être administrées à un très grand nombre de malades. Par ailleurs, comme NU 1320 ne présente pas de toxicité particulière, il pourrait servir au traitement préventif des futurs nouveaux-nés de femmes séropositives. Si on réalise qu'un seul gramme de NU 1320 est aussi actif que

deux tonnes d'AZT, le prix du traitement deviendrait abordable même si la synthèse du composé reste assez complexe.

3. Projet Ra&D financé par le fond stratégique de la HES-SO

Notre laboratoire de synthèse organique de l'EIA-FR et le laboratoire des préparations isotopiques de l'EIG ont reçu un crédit de recherche de deux ans du fond stratégique HES-SO. Nos missions étaient, pour Fribourg, la préparation d'un échantillon de 10 g pour des essais sur l'animal et le développement d'une synthèse industrielle de NU 1320 et, pour Genève, la préparation d'un échantillon de NU 1320 marqué au ¹⁴C pour l'étude du métabolisme.

4. Synthèse du NU 1320

La synthèse du NU 1320 se fait en quatorze étapes dont dix successives. A partir des réactifs de départ, six stades sont nécessaires avant d'obtenir un intermédiaire-clé: l'uracile substitué d'un groupe isopropyle et d'un groupe 3,5-diméthylbenzyle (Schéma). Après la formation du cycle pyrimidine correctement substitué, une chaîne hydroxypropoxyméthyle est greffée en position N(1), puis le groupe hydroxy est ensuite transformé en la fonction spécifique réactive. Cela représente encore huit étapes supplémentaires. La synthèse du NU 1320 est donc complexe et délicate.

Comme le NU 1320 ne comporte aucun centre asymétrique, nous n'avons pas eu à nous préoccuper de résolution d'énantiomères et de synthèse stéréosélective.

Le panel très varié des réactions en jeu nous a entraînés dans de nombreux domaines de la chimie organique tels que:

- halogénéation radicalaire
- chimie des organométalliques
- formation d'hétérocycles
- protection et déprotection de sites réactifs à l'aide de dérivés silylés

Tableau 2. Nombre de réactions chimiques

	Synthèse de la nucléobase	Synthèse du NU 1320	Synthèse du NU 1657
Nombre total d'étapes	6	14	9

- réaction de Mitsunobu
- chimie des hydroxylamines
- alkylations et acylations diverses

5. Développement du NU 1320

La première année du projet, la synthèse d'une dizaine de grammes de NU 1320 selon le brevet nous a permis d'étudier les différentes voies de synthèses, ainsi que les intermédiaires-clés, ceci en vue du scale up futur. La deuxième année du projet fut consacrée à l'amélioration des voies de synthèses.

Le scale up du NU 1320 à 100 g est basé sur l'étude des:

- Méthodes de purification
- Rendements des synthèses
- Voies de synthèses différentes

Après plusieurs essais, certaines synthèses à partir de produits bruts ont montré la même réactivité que celles conduites sur les produits purifiés et donnent des rendements comparables. Certaines purifications ont donc pu être supprimées.

Nous avons pu améliorer la synthèse du cycle pyrimidine de manière spectaculaire. Par contre, d'importantes difficultés sont apparues lors de la fixation de la chaîne et de ses modifications ultérieures. Des purifications par chromatographie sur colonne restent obligatoires.

Le rendement des synthèses successives du NU 1320, donné par le brevet, est de 5.1%. Après nos modifications, ce même rendement est passé à 21.6%!

Le désavantage de la voie de synthèse donné par le brevet du NU 1320 est son manque de convergence. En effet, une grande quantité de nucléobase est perdue lors de la fixation de la chaîne et de sa modification. Plusieurs essais ont été faits dans l'idée d'effectuer les modifications sur la chaîne avant de la greffer sur le cycle pyrimidine. Malgré les efforts investis, nous n'avons pas obtenu de résultats concluants.

6. Nouvelles perspectives

Parallèlement au NU 1320, un grand nombre d'analogues ont aussi été synthétisés par le groupe du professeur Dr J.M.J. Tronchet, puis testés par les laboratoires Mayoly Spindler. La valeur IC_{50} de ces composés anti-viraux n'excède en général

pas 1nM, sauf celle de NU 1657 qui présente une activité prometteuse de 10^{-3} nM.

Malgré sa plus faible activité (Tableau 1), ce produit reste intéressant car il est plus facile d'accès et sa structure est a priori plus résistante à l'action métabolique du foie. Dans ce cas, le travail synthétique sur la chaîne est grandement simplifié, trois étapes seulement séparent la nucléobase substituée du produit fini (Tableau 2)!

7. Conclusion

Nous remercions vivement le fond stratégique HES-SO pour son généreux crédit qui nous a permis de mener à bien ce projet ambitieux. Les buts fixés au départ sont presque tous atteints, nous disposons d'importantes quantités de réactifs de départ et de produits intermédiaires à haute valeur ajoutée, des échantillons purs de NU 1320 et de NU 1657 sont prêts à l'emploi.

Malheureusement, notre partenaire industriel a changé ses priorités au vu de l'évolution économique de ces deux dernières années et a renoncé à poursuivre son activité dans le domaine. Nous cherchons donc un repreneur pour ce projet et des contacts ont été pris dans ce sens. Dans la situation actuelle de développement de la maladie estimée à 42 millions de personnes infectées dans le monde [4], il nous semble irresponsable d'abandonner des molécules riches de promesses dans un tiroir de laboratoire.

Received: January 8, 2004

- [1] Les brevets français d'invention FR 01 01165 et FR 01 08052; Le brevet international d'invention WO 02/060880.
- [2] Laboratoires Mayoly-Spindler, 6 Avenue de l'Europe, BP 51, 78 401 Chatou, France.
- [3] G.J. Moyle, *Infect. Med.* **2000**, *17*(6), 442–455.
- [4] Estimation d'ONU SIDA.