

consiste à rendre les tumeurs plus immunogènes pour le système immunitaire, par exemple en déclenchant une inflammation sur le site de la tumeur, ou en fournissant aux lymphocytes *T* les molécules co-stimulantes dont ils manquent.

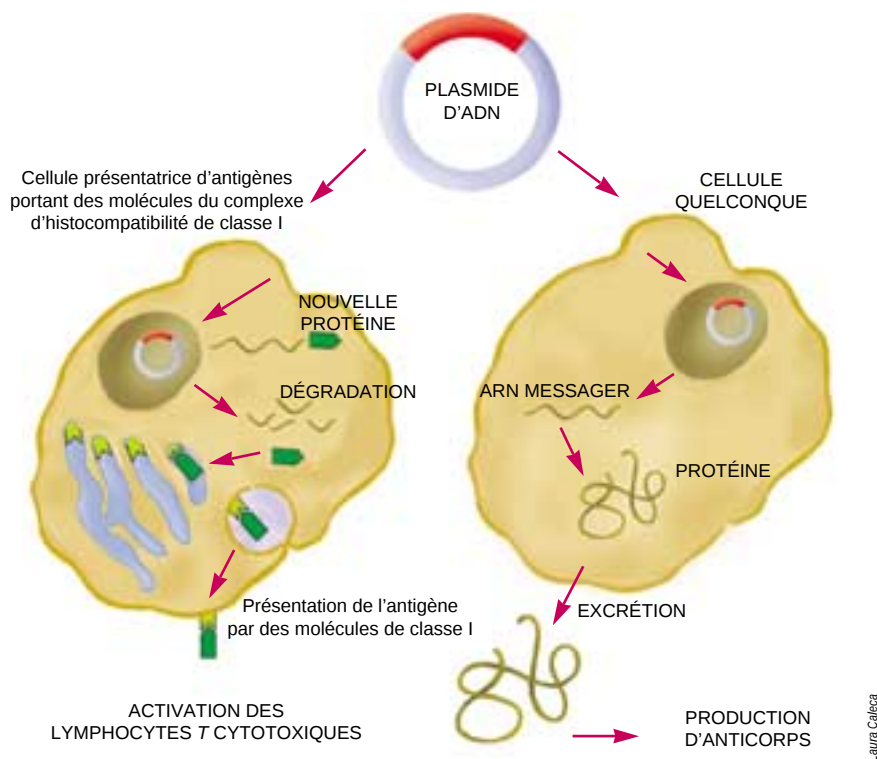
Aujourd'hui, des vaccins thérapeutiques sont en cours d'essais cliniques pour lutter contre le mélanome.

La situation est différente pour certaines infections chroniques, notamment l'hépatite *B*. Le système immunitaire est activé, mais insuffisamment pour vaincre l'infection. Pire encore, dans le cas de l'hépatite *B*, le système immunitaire, activé par le virus, est lui-même responsable de la maladie chronique, car les lymphocytes *T* qui tentent d'éliminer le virus finissent par endommager une quantité excessive de cellules hépatiques.

Un vaccin thérapeutique « apprend » au système immunitaire à réagir correctement contre l'agent infectieux. Dans le cas de l'hépatite *B*, par exemple, on cherche à déclencher la production d'anticorps neutralisants et à éviter l'activation des lymphocytes *T* cytotoxiques, responsables de la maladie hépatique.

Des vaccins thérapeutiques destinés à lutter contre diverses maladies chroniques sont en cours de mise au point : des vaccins contre l'herpès génital, le virus de l'hépatite *B* et celui de l'hépatite *C*, les papillomavirus, *Helicobacter pylori* (responsable de gastrites et d'ulcères gastriques et duodénaux) et le VIH. La plupart de ces agents infectieux participent à l'apparition de tumeurs dans les organes infectés : le virus de l'hépatite *C* est responsable de tumeurs du foie, *Helicobacter pylori*, de tumeurs de l'estomac, le papillomavirus de cancers du col et le virus herpétique HSV 2 de cancers de l'utérus. Jusqu'à présent, nous avons assimilé l'immunisation au déclenchement d'une réaction immune.

Dans le cas des maladies auto-immunes ou des allergies, il s'agit au contraire d'inhiber une réaction immune nocive. On pourrait vraisemblablement renverser le cours des maladies auto-immunes en supprimant les cellules pathogènes, généralement des lymphocytes *T* CD₄⁺ auxiliaires ou des lymphocytes *T* CD₈⁺ cytotoxiques, ou en modifiant leur action. On suppose qu'en inhibant les



6. LA VACCINATION PAR L'ADN pourrait déclencher une réaction immune puissante et efficace. L'ADN des plasmides pénètre dans les cellules et le gène codant l'antigène voulu s'exprime. L'antigène emprunte alors deux voies : il peut être sécrété et déclencher directement la production d'anticorps (à droite). Il peut aussi être traité dans la cellule modifiée : les fragments antigéniques sont présentés à la surface de la cellule par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, stimulant ainsi les lymphocytes *T* cytotoxiques (à gauche).

lymphocytes auxiliaires TH₁, qui participent aux réactions cytotoxiques et à l'inflammation locale, et en activant les lymphocytes TH₂, qui stimulent notamment la production d'anticorps, on réduirait l'inflammation chronique qui accompagne les maladies auto-immunes. Inversement, dans le cas des maladies allergiques, on pourrait favoriser les cellules TH₁ au détriment des cellules TH₂ qui stimulent les mécanismes de l'allergie.

En conclusion, la vaccination n'est plus aujourd'hui seulement préventive. C'est plutôt un moyen de déclencher des réactions immunitaires, qu'elles servent à prévenir une infection ou à modifier le cours d'une maladie déjà établie.

La vaccination doit procurer une immunité protectrice contre une maladie. Tandis que les médicaments soignent les maladies infectieuses quand elles se produisent, les vaccins arment l'organisme contre les agents infectieux. Le génie génétique nous permet d'envisager la mise au point de nouveaux vaccins qui ne seront plus une étape douloureuse de l'enfance,

mais des outils utiles de prévention et de traitement, tout au long de la vie. Ils seront plus sûrs, plus efficaces, et souvent administrés au niveau des muqueuses plutôt qu'injectés. Ils devraient permettre de traiter diverses maladies infectieuses chroniques, des cancers, des maladies auto-immunes et des allergies.

Rino RAPPUOLI dirige le centre de recherche IRIS de la Société Vaccins Chiron, à Sienne. Sergio ABRIGNANI y dirige le département d'immunologie et Guido GRANDI le département de biologie moléculaire.

Cellular and Molecular Immunology, sous la direction de A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober, W.B. Saunders Company, 1994.

Bacterial Pathogenesis : A Molecular Approach, sous la direction de A.A. Salyers et D.D. Whitt, asm Press, Washington D.C., 1994.

Medical Microbiology, sous la direction de Mins, Playfair, Roitt, Wake- lin et Williams, Mosby, 1993.

Du laboratoire à l'usine

GEORG ARNOLD KREI • ERNST BUSCHMANN

Il y a loin de la découverte d'un principe actif à sa fabrication industrielle. Lors de la mise au point des méthodes industrielles, les ingénieurs chimistes ont fort à faire pour conserver une qualité du produit aussi bonne qu'en laboratoire.

Vers la fin des années 1980, George Pettit et ses collègues de l'Université de Tempe découvrent une nouvelle classe de substances anticancéreuses dans l'escargot marin *Dolabella auricularia* (voir la figure 1). Avant d'obtenir ce résultat, ils ont récolté 1,6 tonne de cet animal dans l'océan Indien et ont séparé ses composants en quelque 20 000 fractions, dont ils ont ensuite testé l'efficacité pharmacologique. Ils ont finalement trouvé des inhibiteurs de la division cellulaire qu'ils ont nommés dolastatines. Lors de tests sur des animaux de diverses espèces, ils observent enfin que la dolastatine 10 et la dolastatine 15 ont une puissante activité cytostatique.

Six mois plus tard, les chimistes des Laboratoires BASF parviennent à synthétiser des molécules de structure apparentée, encore plus actives, tel le pentapeptide LU 103793, composé par l'enchaînement de cinq acides aminés. Dès la demande de brevet déposée, les ingénieurs chimistes cherchent à fabriquer le produit, car la société ne disposera que de 20 années de fabrication de la molécule sans concurrence ; la perte financière qui résulterait d'un seul mois de retard pourrait atteindre 50 millions de francs.

Réactifs et réactions

La mise au point d'une fabrication industrielle d'un médicament commence par des études de chimie : les chimistes doivent synthétiser des quantités suffisantes du composé, purifié, pour que les médecins et pharmaciens effectuent leurs études toxicologiques, pharmacologiques et galéniques. Généralement on doit synthétiser une dizaine de kilogrammes de substance

pour couvrir les besoins jusqu'à la première phase clinique.

Les méthodes de synthèse de laboratoire ne procurent pas de telles quantités : ceux qui cherchent à identifier les substances actives se contentent de quelques milligrammes, réalisés à partir d'une palette de quelque 50 000 réactifs, dont certains sont parfois très chers ou disponibles en quantités de l'ordre du gramme. Ils se satisfont de rendements de 40 à 60 pour cent et ne se préoccupent pas de savoir si les réactions sont possibles dans de gros réacteurs.

Aussi les ingénieurs chargés de l'industrialisation doivent souvent mettre au point des procédés complètement différents, qui doivent se rapprocher le plus possible de ceux qui seront mis en œuvre lors de la fabrication industrielle : toute modification apportée ultérieurement risque d'engendrer de nouvelles impuretés, qui devraient ensuite être soumises à une nouvelle analyse toxicologique, longue et coûteuse.

La disponibilité des réactifs doit être envisagée d'emblée : moins de 5 000 réactifs sont disponibles en quantités de l'ordre du kilogramme. Des banques de données spécialisées, telles que le Répertoire des produits chimiques disponibles de la Société MDL Information Systems ou le Répertoire mondial des fabricants de produits chimiques de la Société Chemical Information Services, sont utiles pour ce choix, mais, parfois, les ingénieurs doivent prévoir la synthèse de certains des réactifs qui seront utilisés lors de la production.

La déshydroproline, un acide aminé non naturel, est un de ces réactifs qui interviennent lors de la synthèse du LU 103793 et dont on n'a pu produire de quantités suffisantes, parce que sa synthèse dégage deux gaz toxiques.

Nous avons alors utilisé des programmes d'ordinateur comme REACCS (Système d'Accès aux Réactions) et CASP (Planification de Synthèse Assistée par Ordinateur) afin de mettre au point d'autres synthèses. Plus de 400 possibilités ont été proposées, mais toutes ont été éliminées après des expériences de laboratoire, et nous avons dû reprendre une technique décrite par des chimistes, qui obtiennent les acides aminés désirés par kilogrammes à partir d'un dérivé rare du sélénium.

Dans quel ordre devons-nous assembler les cinq acides aminés du LU 103793 ? Parmi les 14 possibilités de synthèse (voir la figure 2), huit sont des synthèses linéaires : on ajoute les acides aminés les uns à la suite des autres. Plus complexes, les méthodes convergentes sont souvent plus économiques : on synthétise des blocs de deux ou trois acides aminés, que l'on combine ensuite pour former la molécule entière ; le rendement global est supérieur.

La troisième étape du procédé de laboratoire, qui a permis la synthèse des premiers grammes de la substance, était une condensation des deux dipeptides valine-valine et méthylvaline-proline, mais le rendement était mauvais, et la réaction conduisait à une racémisation partielle (une transformation moléculaire analogue à la conversion d'un groupe de mains gauches en un mélange de mains gauches et de mains droites) ; comme on devait, en outre, utiliser un réactif coûteux, qui n'était alors pas disponible en quantités de l'ordre du kilogramme, la voie fut abandonnée. Nous n'avions pas le temps d'explorer systématiquement les 13 autres voies possibles, et l'ordinateur ne pouvait nous

aider ; l'expérience et l'intuition furent mises à contribution.

Nous avons préféré une voie de synthèse linéaire passant par le tétra-peptide diméthylvaline-valine-méthylvaline-proline, car ce composé semblait intéressant pour la synthèse d'autres composés anticancéreux. Ultérieurement, toutefois, il apparut qu'une autre séquence de réactions à partir d'un composé initial différent – la prolinebenzylamide – était plus efficace.

Les économies de l'orientation

Lors de la planification des synthèses, l'ingénieur chimiste doit tenir le plus grand compte de la chiralité des molécules. La plupart des molécules bioactives (environ 80 pour cent) ont un ou plusieurs atomes chiraux : ces atomes et les groupes qu'ils portent ne sont pas superposables à leur image dans un miroir, tout comme une main gauche n'est pas superposable à une main droite. Or la structure tridimensionnelle d'une molécule détermine son affinité pour un récepteur, une enzyme ou des membranes biologiques. Aussi, l'activité biologique, mais aussi la toxicité, la disponibilité biologique et la dégradation par l'organisme des divers énantiomères (les formes main gauche et main droite) d'un même produit chiral sont parfois fort différentes : les chimistes médicaux s'attachent à ne synthétiser les principes actifs que sous leur forme d'énantiomère pur.

Pour parvenir à un tel résultat, on peut utiliser des réactifs initiaux dotés de la bonne chiralité et synthétiser d'emblée le produit de configuration spatiale correcte, mais, en pratique, on commence généralement par fabriquer un mélange d'énantiomères (ou mélange racémique) que l'on fractionne ensuite. Quand on ne trouve pas de méthode pour retransformer les énantiomères inutiles en la forme voulue, cette stratégie gâche au moins la moitié des réactifs, de sorte qu'il faut ensuite mettre au point des méthodes de récupération des précieux intermédiaires de réaction. La synthèse énantiosélective, quand elle existe, est bien préférable. C'est la raison pour laquelle les méthodes de génie génétique, où des enzymes et des micro-organismes procurent directement des

molécules asymétriques, s'imposent progressivement.

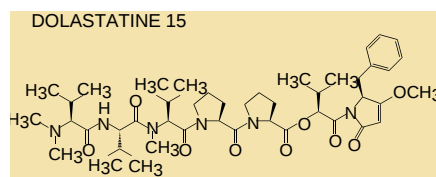
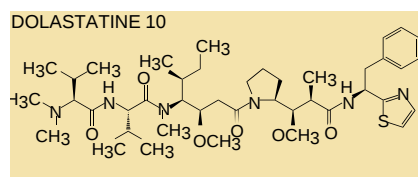
Enfin les chimistes industriels savent que la plupart des principes actifs ne sont produits que par quelques tonnes par an, de sorte qu'il n'est pas rentable de construire une installation de production spécialisée pour chacun d'eux. Dans les installations polyvalentes, on trouve le plus souvent des cuves mélangeuses (*voir la figure 3, à droite*). Dans certains cas cependant, on doit employer des équipements spéciaux, tels des systèmes à photoactivation (où des rayonnements lumineux déclenchent les réactions), des cuves à électrolyse ou des enceintes de pyrolyse.

Du petit au gros

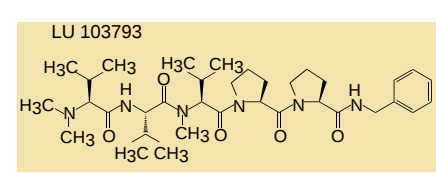
Finalement la synthèse industrielle de la dolostatine *LU 103793* a nécessité plus d'une dizaine d'étapes. Nous avons mis six mois à analyser et à optimiser les diverses étapes d'une future production industrielle, à mettre au point des méthodes nécessaires au traitement de tous les produits intermédiaires et secondaires, ainsi que des résidus, à réaliser une installation capable de produire une dizaine de kilogrammes du composé, afin que le département de pharmacologie puisse décider lequel des trois candidats serait sélectionné pour la poursuite des études.



Laborsynthese zum Produktionsverfahren



1. L'ESCARGOT DE MER *Dolabella auricularia* (en haut) est une source précieuse de plusieurs peptides à activité antitumorale. Parmi ceux-ci figurent les dolastatines 10 et 15, à partir desquelles on a conçu une substance encore plus active, nommée provisoirement LU 103793.



George Pettit, Arizona State University