

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 069 246**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **17 56924**

⑤① Int Cl⁸ : **C 07 D 487/22** (2017.01), A 61 K 31/519, A 61 K 41/
00, A 61 P 35/04, C 07 D 475/04, C 09 K 11/06, C 12 Q 1/00,
G 01 N 21/64

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ CONJUGUES DE PYROPHEOPHORBIDE ET LEURS UTILISATIONS.

②② Date de dépôt : 21.07.17.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 25.01.19 Bulletin 19/04.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 09.08.19 Bulletin 19/32.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *INSERM (INSTITUT NATIONAL DE
LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)
Etablissement public à caractère scientifique et
technologique —FR, CENTRE HOSPITALIER
REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE, FR,
UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE FR,
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR, UNIVERSITE DE LORRAINE
FR, INSTITUT PASTEUR DE LILLE FR et
UNIVERSITE SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE
LILLE - LILLE 1 — FR.*

⑦② Inventeur(s) : AZAIS HENRI, COLLINET PIERRE,
DELHEM-FELLAHI NADIRA, MORALES OLIVIER,
MORDON SERGE, FROCHOT CELINE,
VANDERESSE REGIS et STALLIVIERI AURELIE.

⑦③ Titulaire(s) : *INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE), CENTRE HOSPITALIER
REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE, UNIVERSITE LILLE 2
DROIT ET SANTE, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, UNIVERSITE DE LORRAINE, INSTITUT PASTEUR
DE LILLE, UNIVERSITE SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE -
LILLE 1.*

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

FR 3 069 246 - B1



CONJUGUES DE PYROPHEOPHORBIDE ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne le domaine des photosensibilisateurs et, plus particulièrement, leurs utilisations dans des protocoles de thérapie photodynamique pour
5 traiter un cancer, notamment un cancer des ovaires.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

Le cancer de l'ovaire représente 4500 nouveaux cas chaque année en France. Le mauvais
10 pronostic de la maladie est lié au retard diagnostique puisque la majorité des cas sont diagnostiqués aux stades III et IV de la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO), et le taux de survie diminue avec l'avancement de la maladie. Le cancer ovarien est responsable de la majorité des décès par cancer gynécologique aux États-Unis et en Europe occidentale. Environ 3500 décès lui sont attribués chaque année
15 en France.

La maladie évolue fréquemment vers l'apparition de métastases sous la forme d'une carcinose péritonéale, ce qui correspond à la présence de nombreuses tumeurs à la surface des organes de la cavité abdomino-pelvienne. Le péritoine est une membrane séreuse
20 continue (formée par une couche simple de cellules mésothéliales) qui tapisse l'abdomen, le pelvis et les viscères, délimitant l'espace virtuel de la cavité péritonéale. On distingue le péritoine viscéral (qui tapisse l'extérieur des organes) et le péritoine pariétal (qui tapisse la face interne des parois de l'abdomen).

25 La prise en charge actuelle associe, lorsqu'elle est possible, une chirurgie à une chimiothérapie reposant sur l'utilisation de sels de platine, et dans certains cas à des thérapies ciblées. Il est admis que l'absence de lésions résiduelles après la chirurgie est le facteur principal de bon pronostic. La capacité du traitement chirurgical à éradiquer l'ensemble des implants tumoraux est donc décisive. La chimiothérapie systémique
30 adjuvante ou néo-adjuvante a permis une amélioration des taux de survie à cinq ans, surtout dans les stades précoces : 81% pour les stades I et II après trois cycles de chimiothérapie associant carboplatine et paclitaxel. Dans le cadre d'une cytoréduction

maximale et en complément d'une chirurgie de réduction tumorale macroscopiquement complète, des stratégies thérapeutiques sont envisageables telles que la chimiothérapie intrapéritonéale et la thérapie photodynamique intrapéritonéale. Malgré de nombreux essais cliniques, le bénéfice de la chimiothérapie intrapéritonéale n'est pas démontré dans
5 cette indication et cette option n'est pas recommandée en dehors d'essai clinique.

Contrairement à la chimiothérapie intrapéritonéale, avec ou sans hyperthermie, le recours à un photosensibilisateur ciblant de manière sélective les lésions précoces, et uniquement ces lésions, permettrait de réduire la toxicité du traitement, l'action de la lumière n'ayant
10 lieu qu'en présence de photosensibilisateurs au sein du tissu tumoral. Il pourrait également permettre de traiter les métastases microscopiques qui sont ignorées lors de la chirurgie. Ainsi, le recours à des photosensibilisateurs plus spécifiques ciblant des récepteurs surexprimés par les cellules tumorales ovariennes pourrait renforcer l'efficacité de la thérapie photodynamique (PDT).

15 Dans ce contexte, Schneider et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13, 2799-2808) ont synthétisé un photosensibilisateur comprenant un motif triphénylporphyrinyl conjugué avec l'acide folique (TPP-FA) présentant à la fois des propriétés fluorescentes et antiprolifératives intéressantes pour une application en thérapie photodynamique. Plus
20 particulièrement, Azaïs et al. (Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2016, 13, 130-138) ont démontré sur modèle animal que ce photosensibilisateur était notamment spécifique des métastases péritonéales des cancers épithéliaux de l'ovaire et ont ainsi suggéré son utilisation dans le développement de protocoles de thérapie photodynamique intrapéritonéale non toxiques pour le patient. Toutefois, ce photosensibilisateur présente
25 d'une part une fluorescence très faible empêchant ainsi sa détection avec les dispositifs médicaux couramment utilisés par les gynécologues et d'autre part une faible stabilité.

You et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23, 1453-1462) ont également développé des conjugués de phéophorbide-a, notamment un photosensibilisateur
30 comprenant un motif phéophorbide-a conjugué avec l'acide folique *via* un bras espaceur de type polyéthylène glycol (Pheo-PEG-FA). You et al. ont notamment montré que ce photosensibilisateur (Pheo-PEG-FA) ciblait les récepteurs aux folates, et pouvait être

ainsi utilisé dans des protocoles de thérapie photodynamique pour traiter les cancers surexprimant les récepteurs à l'acide folique au vu de ses propriétés fluorescentes. Toutefois ce photosensibilisateur présente une fluorescence relativement modérée.

- 5 Ainsi, il existe aujourd'hui un réel besoin de développer de nouveaux photosensibilisateurs pour être utilisés en thérapie photodynamique. Ces photosensibilisateurs doivent à la fois présenter une bonne efficacité thérapeutique et cibler de manière sélective les lésions pour ne pas endommager les tissus sains, et une fluorescence suffisante afin de visualiser ces lésions au moyen de dispositifs médicaux.

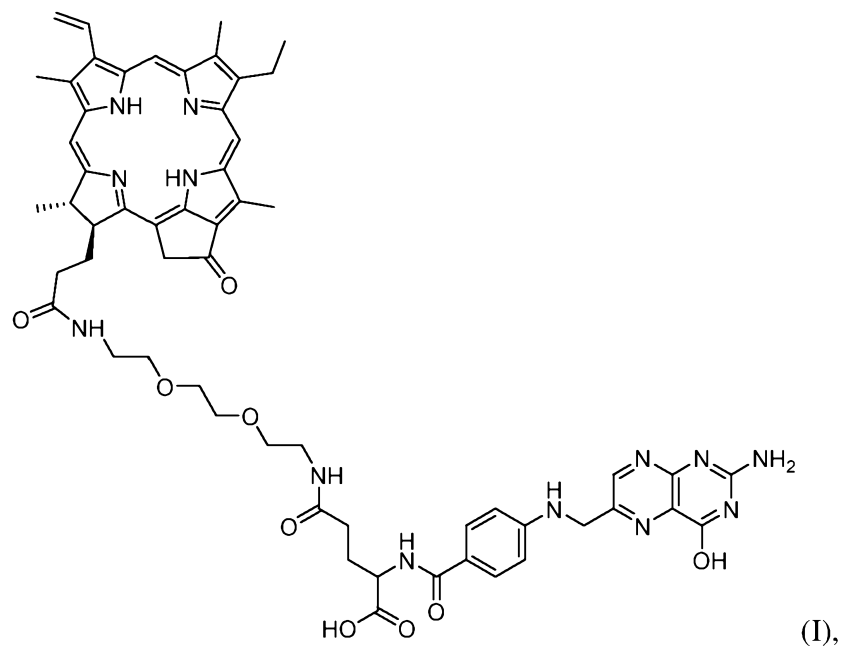
10

RESUME DE L'INVENTION

- Devant cette problématique, les inventeurs ont synthétisé à l'aide d'un procédé garantissant d'excellents rendements un nouveau photosensibilisateur comprenant un motif pyrophéophorbide-a conjugué avec l'acide folique *via* un bras espaceur de type polyéthylène glycol (Pyro-PEG-FA). L'analyse de ce photosensibilisateur a permis de mettre en évidence des propriétés physicochimiques améliorées par rapport aux conjugués proches structurellement décrits ci-dessus ainsi qu'une bonne stabilité à la lumière. Les inventeurs ont également démontré que ce nouveau photosensibilisateur permettait de cibler spécifiquement les métastases péritonéales microscopiques des cancers épithéliaux de l'ovaire sans altérer la qualité de la réponse immunitaire effectrice antitumorale.

20

La présente invention concerne donc un composé de formule (I) :



et ses sels pharmaceutiquement acceptables.

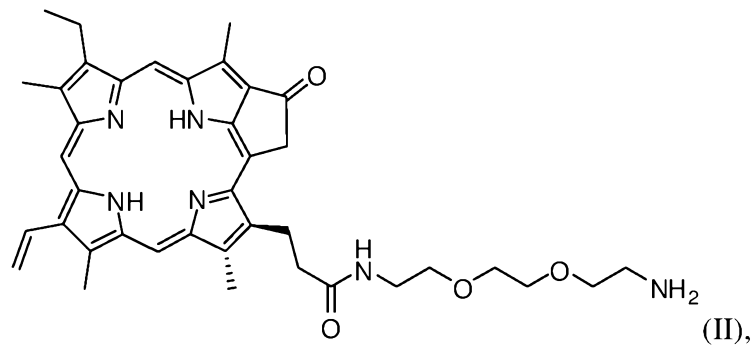
L'invention concerne également l'utilisation de ce composé de formule (I) en tant que
5 médicament.

Selon un mode particulier de l'invention, le composé de formule (I) est utilisé pour le
traitement d'un cancer, et notamment par thérapie photodynamique. Particulièrement, le
composé de formule (I) de l'invention est utilisé pour réduire le risque de développer des
10 métastases. De préférence, le composé de formule (I) est utilisé pour le traitement d'un
cancer choisi parmi un cancer des ovaires, des poumons, du rein, de l'endomètre,
colorectal, du sein, cancer du pancréas, du cerveau, gastrique, du foie, de la prostate, des
testicules, de la vessie, ou de la tête et du cou. Plus préférentiellement, le composé de
formule (I) est utilisé pour le traitement d'un cancer des ovaires.

15

Selon un autre mode particulier, le composé de formule (I) est destiné à être administré
par voie intrapéritonéale ou par voie intraveineuse.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation d'un composé de
20 formule (I) tel que représenté ci-dessus comprenant une étape de couplage entre un
composé de formule (II) :



et l'acide folique.

Un autre objet de l'invention concerne également une utilisation du composé de formule (I) tel que représenté ci-dessus en tant que marqueur fluorescent.

Un autre objet de l'invention concerne aussi une méthode d'imagerie chez un sujet comprenant la visualisation de la fluorescence émise par un composé de formule (I) préalablement administré audit sujet et photoactivé par une source lumineuse.

10

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Procédé de synthèse du composé Pyro-PEG-FA de formule (I).

Figure 2 : Photodégradation de l'acide folique (FA), du composé Pyro-PEG-FA de formule (I) (Pyro-S-FA), du composé Pheo-PEG-FA (Pheo-S-FA), et du composé TPP-FA (P1-S-FA) au cours du temps (365 nm, 5mW/cm², [0,45 mM] dans le DMSO).

Figure 3 : Mesure du taux relatif d'ATP dans les cellules tumorales ovariennes SKOV-3 (A) et OVCAR-3 (B) soumises à la PDT.

Figure 4A : Photographie d'une image de coelioscopie chez un rat immunocompétent ayant développé une carcinose péritonéale après injection du composé Pyro-PEG-FA de formule (I).

Figure 4B : Photographie de la figure 4A en lumière blanche.

25

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

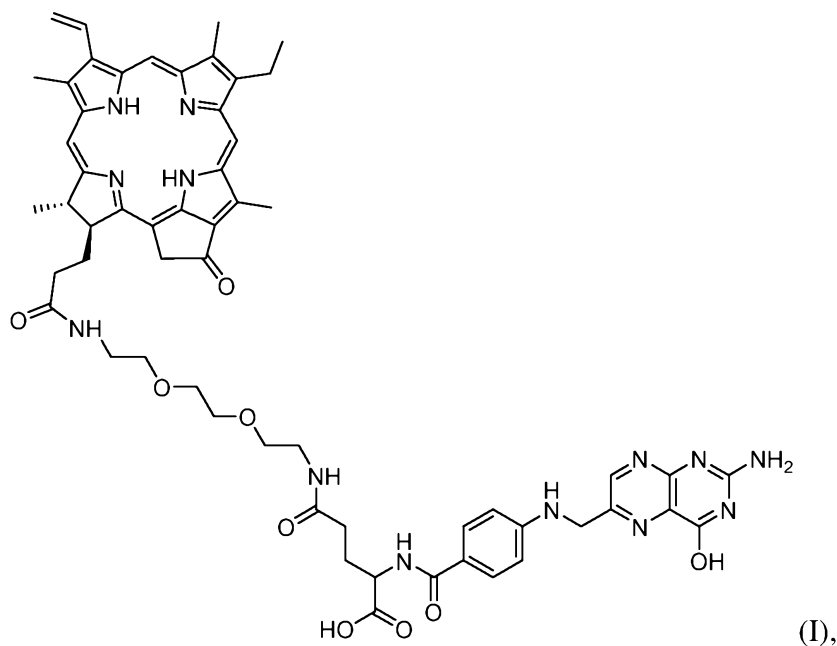
Tel qu'illustré et démontré par les inventeurs dans les exemples ci-dessous, la présente invention fournit un nouveau photosensibilisateur couplé à un folate de formule (I) :

- i) permettant de cibler spécifiquement les métastases péritonéales microscopiques des cancers épithéliaux de l'ovaire,
- ii) ayant une bonne efficacité thérapeutique,
- iii) offrant une fluorescence suffisante pour visualiser les lésions à l'aide de dispositifs médicaux conventionnels,
- iv) nécessitant peu d'étapes pour sa synthèse, et
- v) activant la prolifération des cellules immunitaires.

Composé Pyro-PEG-FA de formule (I)

10

La présente invention porte donc sur un composé de formule (I) :



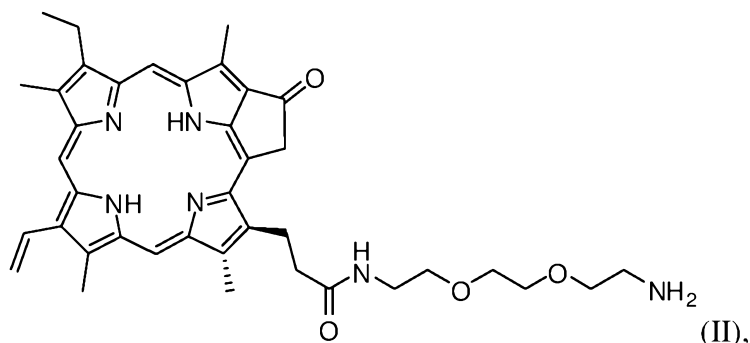
et ses sels pharmaceutiquement acceptables.

- 15 Ce composé de formule (I) est un composé conjugué comprenant un motif pyropheophorbide-a conjugué avec l'acide folique *via* un bras espaceur de type polyéthylène glycol (Pyro-PEG-FA). Le motif pyropheophorbide-a apporte au composé de formule (I) une fluorescence satisfaisante pour visualiser les lésions. Le bras espaceur de type polyéthylène glycol comprend deux monomères de polyéthylène glycol PEG₂.
- 20 motif acide folique permet de cibler spécifiquement les récepteurs de l'acide folique.

Dans la présente description, le composé de formule (I) est représenté par « Pyro-PEG-FA » ou « Pyro-PEG₂-FA ».

L'expression "sel(s) pharmaceutiquement acceptable(s)" désigne les sels du composé d'intérêt de formule (I) qui possède l'activité biologique souhaitée. Les sels pharmaceutiquement acceptables comprennent des sels de groupes acides ou basiques présents dans le composé spécifié. Les sels d'addition acide pharmaceutiquement acceptables comprennent, mais ne sont pas limités à, des sels de chlorhydrate, bromhydrate, iodhydrate, nitrate, sulfate, bisulfate, phosphate, phosphate acide, isonicotinate, acétate, lactate, salicylate, citrate, tartrate, pantothénate, bitartrate, ascorbate, succinate, maléate, gentisinate, fumarate, gluconate, glucaronate, saccharate, formate, benzoate, glutamate, méthanesulfonate, éthanesulfonate, benzènesulfonate, ptoluènesulfonate et le pamoate (c'est-à-dire, 1,1'- méthylène-bis-(2-hydroxy-3-naphtoate)). Des sels de base adaptés comprennent, mais ne sont pas limités à, des sels d'aluminium, calcium, lithium, magnésium, potassium, sodium, zinc, et diéthanolamine. Une liste de sels pharmaceutiquement acceptables est notamment publiée dans la revue de Berge et al. (J. Pharm. Sci. 1977, 66(1), 1-19).

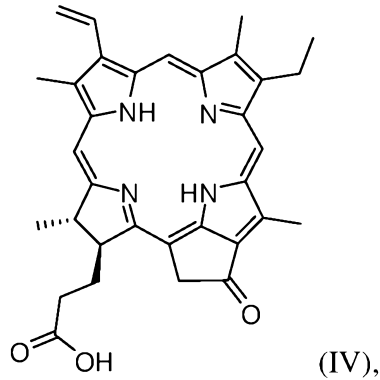
Le composé de formule (I) peut être synthétisé à l'aide d'un procédé simple comprenant une étape de couplage entre un composé de formule (II) :



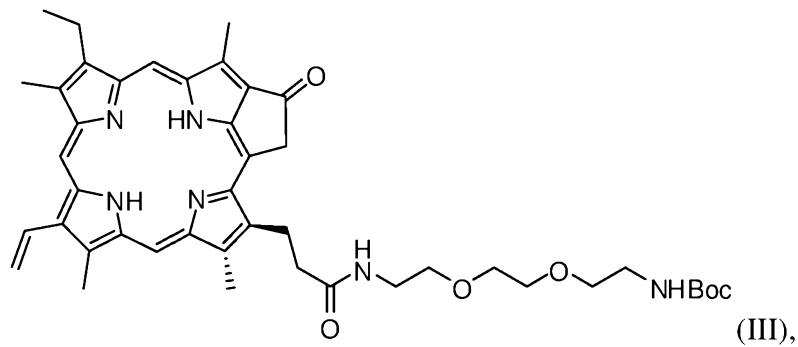
et l'acide folique.

Plus particulièrement, le composé de formule (I) peut être synthétisé à l'aide d'un procédé comprenant trois étapes à partir du pyropheophorbide-a de formule (IV) tel que commercialisé par la société Boc sciences. Selon un mode de réalisation préféré, le composé de formule (I) est préparé par un procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) une étape de couplage entre un composé de formule (IV) :

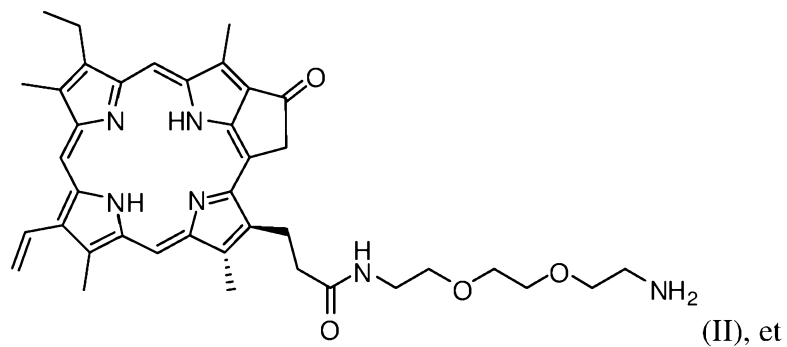


avec du N-Boc-2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine, pour obtenir un composé de formule (III) :



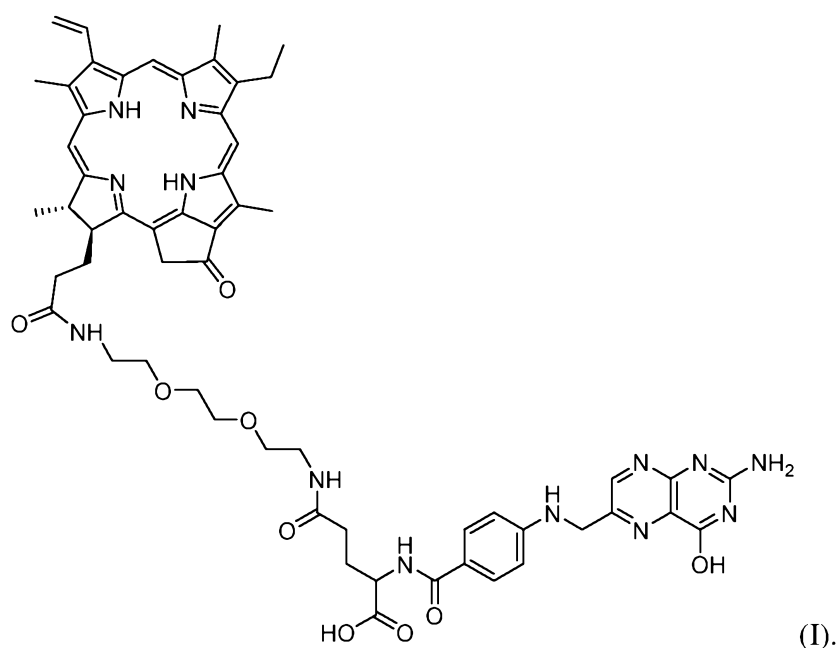
5

b) une étape de déprotection du composé de formule (III) obtenu à l'étape a) pour obtenir un composé de formule (II) :



c) une étape de couplage entre le composé de formule (II) obtenu à l'étape b) et l'acide folique pour obtenir un composé de formule (I) :

10



Ce procédé simple qui ne nécessite que trois étapes permet d'obtenir le composé de formule (I) avec des rendements très satisfaisants, qui sont notamment supérieurs par rapport aux rendements obtenus par le procédé mettant en œuvre le composé de You et al. (Pheo-PEG-FA). Ce procédé est donc plus avantageux et est en adéquation avec une application industrielle.

Application

10 Le composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus peut être utilisé en tant que médicament, de préférence dans le traitement du cancer.

Au sens de la présente invention, les termes « traitement » et « traiter » désignent une amélioration, la prophylaxie ou l'inversion d'une maladie ou d'un trouble, en l'occurrence un cancer. Par « traitement d'un cancer », on entend également la réduction du nombre des métastases et/ou la réduction du risque de développer des métastases. Dans le cadre du traitement des métastases, l'objectif est notamment de diminuer le taux de récurrence ou de rechute pour le patient de développer un cancer. Par « traitement d'un cancer », on entend aussi l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses.

Sans vouloir être lié à un mécanisme d'action particulier, le composé de formule (I) permet d'activer le système immunitaire, participant ainsi à la lutte contre le cancer. Ainsi, il est proposé d'utiliser le composé de formule (I) selon l'invention dans le traitement du cancer par immunothérapie, notamment par activation du système immunitaire après traitement photodynamique.

Plus particulièrement, le composé de formule (I) est utilisé dans le traitement du cancer par thérapie photodynamique.

La thérapie photodynamique, communément désignée par l'acronyme PDT consiste à mettre en contact un tissu pathologique avec une molécule photoactivable (nommée photosensibilisateur ou agent photosensibilisant), en l'occurrence le composé de formule (I) dans le cadre de la présente invention, puis à illuminer ce tissu avec une lumière de longueur d'onde (couleur) en adéquation avec les caractéristiques d'activation du photosensibilisateur. Après activation de la molécule par la lumière et réaction avec l'oxygène du tissu, des espèces très toxiques sont produites localement pour induire in fine la destruction de la lésion cancéreuse. L'avantage majeur de la PDT est sa sélectivité. En effet, la lumière utilisée, seule n'est pas nocive, le photosensibilisateur sans lumière n'est pas toxique. Pour induire la réaction, il faut une action conjointe de la lumière, du photosensibilisateur et de l'oxygène. Ainsi, en optimisant la concentration du photosensibilisateur et la dose de lumière, il est possible de détruire sélectivement des cellules.

Ainsi, l'invention concerne aussi un composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus pour son utilisation dans le traitement du cancer, dans laquelle une dose efficace du composé de formule (I) est mise au contact des cellules cancéreuses et/ou des métastases qui sont ensuite exposées à une source lumineuse.

L'invention concerne également une méthode pour traiter un cancer comprenant les étapes de mise en contact des cellules cancéreuses avec une dose efficace du composé de formule (I) tel que décrit ci-dessus, et d'exposition des cellules cancéreuses à une source lumineuse.

Par « dose efficace », on entend une dose suffisante pour obtenir une fluorescence satisfaisante et obtenir ainsi l'effet thérapeutique désiré. L'homme du métier est capable d'adapter cette dose en fonction de la sévérité et du type de cancer à traiter. Néanmoins, une dose efficace du composé de formule (I) peut être comprise entre 0,1 mg/kg et 100 mg/kg, entre 0,1 mg/kg et 50 mg/kg, entre 0,1 mg/kg et 10 mg/kg, de préférence entre 0,1 mg/kg et 5 mg/kg, et de manière encore plus préférée entre 0,1 mg/kg et 3 mg/kg.

La photoactivation du photosensibilisateur, en l'occurrence le composé de formule (I) dans le contexte de la présente invention, peut être obtenue par toute sorte de source lumineuse connue de l'homme du métier. En particulier, la photoactivation peut être réalisée par lumière artificielle (lampes, lasers) avec des radiations telles que des radiations de type ultra-violet, infrarouge, ou par lumière visible ou naturelle. Le mode d'illumination à l'aide de dispositifs lumineux placés dans la cavité du corps humain adéquate est choisi par l'homme du métier en fonction du type de cancer à traiter. Par exemple, pour un cancer du foie, le dispositif lumineux est placé dans la cavité péritonéale. Pour un cancer des ovaires, le dispositif lumineux est placé dans la cavité pelvienne ; etc. Comme exemples non-limitatifs de dispositifs lumineux, on peut citer un ballon lumineux tel que décrit par Munck et al. (Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2016, 16, 23-26) ou un textile lumineux (LEF) tel que décrit par Guyon et al. (Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(3)).

La longueur d'onde de la lumière utilisée est choisie de manière à obtenir un effet photosensibilisateur le plus efficace. En particulier, une longueur d'onde comprise entre 300 et 800 nm, de préférence entre 400 et 700 nm, et de manière plus préférée autour de 668 nm est utilisée.

L'irradiation est généralement appliquée à une dose comprise entre 1 et 200 joules/cm², de préférence entre 1 et 150 joules/cm², et de manière encore plus préférée autour de 150 joules/cm². Sur des cellules, une dose comprise entre 1 et 10 joules/cm² est généralement appliquée.

De préférence, une source lumineuse avec une intensité lumineuse de 1 à 150 mW/cm², de 1 à 100 mW/cm², de 30 à 70 mW/cm², de préférence autour de 50 mW/cm² est utilisée. Sur des cellules, une source lumineuse avec une intensité lumineuse de 1 à 10 mW/cm², ou encore mieux d'environ 5 mW/cm² est utilisée.

5

La photoactivation du photosensibilisateur et l'exposition des cellules cancéreuses à une source lumineuse peut être réalisée pendant une période allant de 1 minute à 3 heures, 10 minutes à 2 heures, 30 minutes à 90 minutes, de préférence pendant une durée d'une heure ou 60 minutes.

10

L'invention décrite dans la présente demande est préférentiellement mise en œuvre chez les êtres humains.

Le composé de formule (I) présente un motif folate et peut donc être utilisé dans le cadre de traitement par thérapie photodynamique pour tout type de cancer exprimant des récepteurs folate. Une liste de ces cancers exprimant des récepteurs folate est décrite par Assaraf et al. (Drug resistance Updates, 2014, 17, 89-95) et inclue notamment le cancer des ovaires, des poumons, du rein, de l'endomètre, colorectal, du sein, cancer du pancréas, du cerveau, gastrique, du foie, de la prostate, des testicules, de la vessie, ou de la tête et du cou.

20

Selon un mode préféré de l'invention, le cancer est choisi parmi un cancer des ovaires, des poumons, du rein, de l'endomètre, colorectal, du sein, cancer du pancréas, du cerveau, gastrique, du foie, de la prostate, des testicules, de la vessie, ou de la tête et du cou. Selon un mode encore plus préféré, le cancer est un cancer des ovaires.

25

Le composé de formule (I) peut être administré au patient par tout type de voies connues de l'homme du métier en fonction du type de cancer à traiter. Par exemple, la voie intrapéritonéale ou la voie par intraveineuse peuvent être utilisées pour traiter le cancer des ovaires. Selon un mode préféré de l'invention, le composé de formule (I) est destiné à être administré par voie intrapéritonéale ou par voie intraveineuse, de préférence par voie intraveineuse.

30

Au vu de ses propriétés d'absorption et de fluorescence améliorées, le composé de formule (I) peut être utilisé en tant que marqueur fluorescent. Par exemple, le composé de formule (I) en tant que marqueur fluorescent peut être utilisé dans le traitement du cancer par chirurgie guidée par la fluorescence, et/ou dans des méthodes d'imagerie ou de diagnostic.

Il est ainsi décrit une méthode d'imagerie ou de diagnostic d'un cancer chez un sujet, comprenant l'administration et l'irradiation ou la photoactivation d'un composé de formule (I) audit sujet, et la visualisation de la fluorescence émise. Cette méthode permet de visualiser les récepteurs de l'acide folique qui sont surexprimés dans les cellules cancéreuses. Cette imagerie permet ainsi de délimiter la zone cancéreuse et, également, de guider un geste chirurgical de type ablation, le cas échéant.

Un objet de l'invention est donc une méthode d'imagerie chez un sujet comprenant la visualisation de la fluorescence émise par un composé de formule (I) préalablement administré audit sujet et photoactivé par une source lumineuse.

Au vu de ses mêmes propriétés, le composé de formule (I) peut aussi être utilisé en tant que photosensibilisateur dans des applications cosmétiques et dermatologiques telles que le photorajeunissement, le traitement de l'acné vulgaire ou le vieillissement cutané.

La présente invention porte donc également sur une utilisation non-thérapeutique du composé de formule (I) décrit ci-dessus en tant que photosensibilisateur.

D'autres aspects et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

EXEMPLES

Exemple 1 : Synthèse du conjugué Pyro-PEG-FA de formule (I) selon l'invention et du conjugué Pheo-PEG-FA de You et al.

5

Le procédé de synthèse du conjugué Pyro-PEG-FA comprenant trois étapes est décrit ci-dessous et est également illustré par la figure 1.

Etape a) Synthèse de Pyro-PEG-NHBoc (Formule III)

10 100 mg de pyropheophorbide a (0,19 mmol), 46,4 mg de *N*-Boc-2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine (0,19 mmol), 71,7 mg (0,38 mmol) d'EDC et 30,5 mg (0,25 mmol) de DMAP ont été solubilisés dans 30 mL de THF. Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante, sous atmosphère d'azote et dans l'obscurité pendant 24 heures. Le solvant a ensuite été évaporé. La purification du matériau brut a été réalisée

15 sur colonne chromatographique de gel de silice avec 5% d'EtOH dans CH₂Cl₂. Le composé Pyro-PEG-NHBoc est obtenu sous la forme d'un solide vert foncé avec un rendement de **92 %** (132 mg). R_f = 0.27 (CH₂Cl₂/EtOH = 95/5, v/v). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = -2.01 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.30 (s, 9H, Boc), 1.60 (t, 3H, CH₃, Pyro(a)-COOH), 1.79 (d, 3H, CH₃, Pyro(a)-COOH), 2.98 (q, 2H, CH₂), 3.15, 3.35,

20 3.59 (3 x s, 3H x 3, CH₃, Pyro(a)-COOH), 3.46 (q, 2H, CH₂), 3.60 (m, 8H, CH₂), 3.65 (m, 2H, CH₂, Pyro(a)-COOH), 4.31, 4.56 (2 x d, 1H x 2, CH, Pyro(a)-COOH), 5.16 (q, 2H, CH₂, Pyro(a)-COOH), 6.34, 6.40 (2 x d, 1H x 2, =CH₂, Pyro(a)-COOH), 6.66 (s, 1H, NH-spacer), 7.83 (t, 1H, NH-spacer), 8.19 (q, 1H, -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.88, 9.38, 9.65 (3x s, 1H x 3, CH, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI⁺): m/z calc. Pour C₄₄H₅₆N₆O₆

25 [M+H]⁺ 765.4334; trouvée 765.4304.

Etape b) Synthèse de Pyro-PEG-NH₂ (Formule II)

Le composé Pyro-PEG-NHBoc a été solubilisé dans 2 mL de TFA. La solution a été agitée pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité et sous azote puis

30 lyophilisée afin d'éliminer le TFA. Le résidu coloré a été solubilisé dans du CH₂Cl₂ (10 mL), et du carbonate de potassium anhydre a été ajouté jusqu'à ce que la couleur change de bleu en vert. Après filtration, la phase organique a été concentrée. La purification du

matériau brut a été réalisée sur colonne chromatographique de gel de silice avec CH₂Cl₂ / EtOH (de 90:10 à 50:50, v / v), donnant Pyro-PEG-NH₂ (103 mg, **90%**) sous la forme d'un solide vert. R_f = 0.17 (CH₂Cl₂/EtOH = 1:1, v/v). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = -1.94 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.63 (t, 3H, CH₃, Pyro(a)-COOH), 1.79 (d, 3H, CH₃, Pyro(a)-COOH), 2.87 (t, 2H, CH₂), 3.17 (q, 2H, CH₂), 3.23-3.62 (3 x s, 3H x 3, CH₃, Pyro(a)-COOH), 3.50 (s, 8H, CH₂), 3.71 (m, 2H, CH₂, Pyro(a)-COOH), 4.30, 4.58 (2 x d, 1H x 2, CH, Pyro(a)-COOH), 5.17 (q, 2H, CH₂, Pyro(a)-COOH), 6.22, 6.39 (2 x d, 1H x 2, =CH₂, Pyro(a)-COOH), 7.98 (t, 1H, NH), 8.18 (s, 2H, NH₂), 8.24 (q, 1H, -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.90, 9.45, 9.73 (3x s, 1H x 3, C20-10-5, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI⁺): m/z calc. pour C₃₉H₄₈N₆O₄ [M+H]⁺ 665.3810; trouvée 665.3801.

Etape c) Synthèse de Pyro-PEG-FA (Formule I)

De l'acide folique (0,95 éq. 63 mg) et du DCC (1 éq., 31 mg) ont été solubilisés dans un mélange de DMSO anhydre (5 mL) et de pyridine (2 mL). Le mélange a été agité pendant 15 min à température ambiante, à l'obscurité et sous azote. Pyro-PEG-NH₂ (0,9 éq.) a ensuite été ajouté et le mélange réactionnel a été agité pendant 24h à température ambiante. La solution a lentement été versée dans de l'éther diéthylique froid vigoureusement agité (45 mL). Par centrifugation, le précipité obtenu a été recueilli et lavé avec de l'éther diéthylique (50 mL). La poudre de Pyro-PEG-FA a été séchée sous vide (107 mg, **69%**). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): -1.97 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.62 (t, 3H, C8 : CH₃, Pyro(a)-COOH), 1.76 (d, 3H, C18 : CH₃, Pyro(a)-COOH), 4.32 (2H, CH+C17, FA+Pyro(a)-COOH), 4.40 (d, 2H, CH₂, FA), 4.56 (d, 1H, C18, Pyro(a)-COOH), 5.17 (q, 2H, C13 : CH₂, Pyro(a)-COOH), 6.21, 6.50 (2 x d, 1H x 2, C3 : =CH₂, Pyro(a)-COOH), 6.60 (d, 2H, CH_{arom.}, FA), 7.29 (br, 3H, NH + NH₂), 7.61 (d, 2H, CH_{arom.}, FA), 7.81 (s, 2H, NH₂), 7.92 (d, 1H, NH, FA), 8.20 (q, 1H, C3 : -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.59 (d, 1H, CH_{arom.}, FA), 8.88, 9.42, 9.68 (3x s, 1H x 3, C20-10-5, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI⁺): m/z calc. for C₅₈H₆₅N₁₃O₉ [M+Na]⁺ 1110.4920; trouvé 1110.4872.

Le conjugué de You et al. (Pheo-PEG-FA) a été synthétisé selon le même procédé de trois étapes décrit ci-dessus. Les rendements obtenus pour chacune des 3 étapes sont décrites dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 :

Composé	Prix	Rdt étape a)	Rdt étape b)	Rdt étape c)	Rdt Total
Pheo-PEG-FA (You et al.)	1240€ / 1g (Inochem)	63 %	100 %	49 %	31 %
Pyro-PEG-FA (Formule I)	1280 € / 1g (Boc Sciences)	92 %	90 %	69 %	57 %

De manière surprenante, le procédé de synthèse décrit ci-dessus a permis d'obtenir le composé de formule (I) avec un rendement total deux fois supérieur par rapport au composé de You et al. La synthèse du composé de formule (I) est donc plus avantageuse au niveau industriel que la synthèse du composé de You et al., notamment d'un point de vue économique.

Exemple 2 : Propriétés photophysiques du conjugué Pyro-PEG-FA de formule (I) selon l'invention, du conjugué Pheo-PEG-FA de You et al., et du conjugué TPP-FA de Schneider et al.

Matériel et méthode

Les spectres d'absorption ont été mesurés avec un spectrophotomètre UV-visible double faisceaux UV-3600 (SHIMADZU, MARNE LA VALLEE, France). Les spectres de fluorescence ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-222 (HORIBA Jobin Yvon, LONGJUMEAU, France) équipé d'une lampe à arc xénon de 450 W, d'un compartiment porte-cuve thermostaté (25°C), d'un photomultiplicateur UV-visible R928 (HAMAMATSU Japon) et d'un détecteur infrarouge InGaAs refroidi à l'azote liquide (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). Le faisceau d'excitation est diffracté par un monochromateur double réseaux SPEX (1200 traits/mm blasé à 330 nm). La fluorescence a été mesurée par le détecteur UV-Visible via le monochromateur d'émission double réseaux SPEX (1200 traits/mm blasé à 500 nm). La production d'oxygène singulet a été mesurée par le détecteur infrarouge via le monochromateur d'émission double réseaux SPEX (600 traits/mm blasé à 1 µm) et un filtre passe haut à 780 nm. Tous les spectres ont été mesurés en utilisant des cuves quartz à 4 faces. Tous les spectres d'émission (fluorescence et luminescence de l'oxygène

singulet) ont été rapportés à la même absorbance (inférieure à 0,2) avec les corrections de lampe et de photomultiplicateur.

Le rendement quantique en fluorescence a été déterminé par l'équation (1) :

$$\phi_f = \phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \quad (1)$$

- 5 où Φ_f et Φ_{f_0} , I_f et I_{f_0} , DO et DO_0 , n et n_0 sont les rendements quantiques, les intensités de fluorescence, les densités optiques, les indices de réfraction de l'échantillon et de la référence respectivement.

La référence utilisée pour le calcul du rendement quantique de fluorescence est la tétraphénylporphyrine dans le toluène avec un ϕ_{f_0} de 0,11.

- 10 Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est déterminé par l'équation (2) :

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO} \quad (2)$$

- où Φ_{Δ} et Φ_{Δ_0} , I et I_0 , DO et DO_0 sont les rendements quantiques de production d'oxygène singulet, les intensités de production d'oxygène singulet et les densités optiques de l'échantillon et de la référence respectivement.

La référence utilisée pour le calcul du rendement quantique de production d'oxygène singulet est le Rose de Bengale dans l'éthanol avec un ϕ_{Δ_0} de 0,68

- Les expériences de durées de vie de fluorescence ont été réalisées en utilisant pour l'excitation une diode laser pulsée émettant à 407 nm (LDH-P-C-400M, FWHM < 70 ps, 20 1 MHz) couplée à un générateur d'impulsions PDL 800-D (PicoQuant GmbH, BERLIN, Germany) et pour la détection une photodiode à avalanche SPCM-AQR-15 (EG & G, VAUDREUIL, Canada) couplée à un filtre passe haut à 650 nm.

- L'acquisition a été réalisée par un module PicoHarp 300 associé à un routeur 4 voies PHR-800 (PicoQuant GmbH, BERLIN, Germany). Les déclins de fluorescence ont été 25 enregistrés en utilisant la méthode de comptage monophotonique (Time Correlated Single Photon Counting TCSPC). Les données ont été collectées jusqu'à obtenir 1000 coups accumulés dans un canal puis analysés en utilisant le logiciel de TCSPC Fluofit

(PicoQuant GmbH, BERLIN, Germany) basé sur une reconvolution itérative utilisant un algorithme de Levensberg-Marquanddt permettant l'obtention de déclin multi-exponentiels.

5 Les mesures de durées de vie d'oxygène singulet ont été réalisées avec un spectrophotomètre TEMPRO-01 (HORIBA Jobin Yvon, LONGJUMEAU, France) composé d'une diode d'excitation pulsée SpectraLED-415 émettant à 415 nm, d'un compartiment porte-cuve, d'un monochromateur d'émission de type Seya-Namioka (600-2000 nm) et d'un tube photomultiplicateur proche infra-rouge régulé thermoélectriquement H10330-45 (HAMAMATSU, Japon). Le montage est piloté par le
10 module de comptage FluoroHub-B et les logiciels DataStation et DAS6 (HORIBA Jobin Yvon).

Les spectres d'émission et les mesures de durées de vie de phosphorescence ont été réalisés avec un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 (HORIBA Jobin Yvon, LONGJUMEAU, France) équipé d'une lampe xénon continue 450 W, d'une lampe flash
15 xénon, d'un compartiment porte-cuve thermostaté (25°C) et d'un photomultiplicateur UV-visible R928 (HAMAMATSU Japon). Le montage est piloté par le module de comptage FluoroHub-B. Le logiciel FluorEssence (HORIBA Jobin Yvon) a été utilisé pour les spectres d'émission ; les logiciels DataStation et DAS6 (HORIBA Jobin Yvon) ont été utilisés pour la mesure des durées de vie de phosphorescence.

20

Résultats

Les propriétés photophysiques dans l'éthanol sont indiquées dans le tableau 2 ci-dessous.

25

30

Tableau 2 :

Composé	$\epsilon_{\text{bande de solet}}$ ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	λ_{QI} (nm)	ϵ_{QI} ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	ϕ_{F} ($\pm 0,02$)	ϕ_{Δ} ($\pm 0,05$)	τ_{F} ($\pm 0,1$ ns)	τ_{Δ} (± 1 μs)
Pyro(a)-COOH	76 326	668	33 265	0,34	0,52	6,7	13
Pyro-PEG-FA	74 081	668	35 306	0,30	0,54	6,4	13
Pheo(a)-COOH	69 663	667	32 537	0,44	0,52	5,7	12
Pheo-PEG-FA	49 215	667	22 870	0,40	0,48	5,7	13
TPP-FA	152 245	643	3 265	0,11	0,58	9,7	15

ϵ : coefficient d'extinction molaire ; Q : bande Q ; λ_{exc} : longueur d'onde d'excitation ; ϕ_{f} : rendement quantique en fluorescence ; ϕ_{Δ} : rendement quantique de luminescence ; τ_{f} : durée de vie de fluorescence ; τ_{Δ} : durée de vie de l'oxygène singulet.

5

Le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) présente une absorption supérieure à celle du composé Pheo-PEG-FA de You et al. En particulier, le coefficient d'extinction molaire (ϵ_{QI}) à la longueur d'onde d'excitation utilisée en clinique (668 nm) est 1,5 fois supérieur.

10

Le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) présente une absorption supérieure à celle du composé TPP-FA de Schneider et al. En particulier, le composé de l'invention présente un pic d'absorption à 668 nm plus favorable à une meilleure pénétration que le composé TPP-FA (pic d'absorption à 643 nm). En outre, le rendement quantique de fluorescence (ϕ_{F}) et le coefficient d'extinction molaire (ϵ_{QI}) sont respectivement environ 3 fois et 10 fois supérieur pour le composé de l'invention.

15

En conclusion, le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) présente des propriétés photophysiques améliorées en termes d'absorption par rapport aux composés Pheo-PEG-FA de You et al. et TPP-FA de Schneider et al.

20

25

Exemple 3 : Stabilité à la lumière du conjugué Pyro-PEG-FA de formule (I) selon l'invention, du conjugué Pheo-PEG-FA de You et al., et du conjugué TPP-FA de Schneider et al.

5 **Matériel et méthode**

Une solution de PS-bras-acide folique (Pyro-PEG-FA de formule (I)) (0,45 mM) dans le DMSO (3 mL) a été irradiée ($\lambda = 365$ nm, 5 mW.cm^{-2} , Xe-Hg Lamp, Lightningcure™ LC5 Hamamatsu) pendant 2 heures. 100 μL de solution ont été prélevés toutes les 15 minutes et dilués dans 1,9 mL de méthanol. Chaque échantillon (40 μL) a été analysé par

10 chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) sur un appareil Prostar HPLC (Varian). La HPLC a été réalisée sur colonne Pursuit 5-C₁₈ (2,5 μm , 4,6 \times 150 mm, Varian) en utilisant un gradient acétonitrile/(eau+0,1 % TFA) [10% : 90%] à [0% : 100%] en 25 minutes, suivi d'un plateau isocratique d'acétonitrile durant 10 minutes, puis retour aux conditions initiales en 5 minutes. Le pourcentage de dégradation

15 a été calculé en comparant l'aire des pics correspondants au conjugué initial et au conjugué dégradé.

Résultats

Les résultats sont illustrés dans la figure 2.

- 20 Le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) est très largement plus stable que le composé Pheo-PEG-FA de You et al. et le composé TPP-FA de Schneider et al. En effet, après 2 heures d'irradiation (120 min), le composé Pyro-PEG-FA de l'invention présente 5 % de dégradation alors que les composés Pheo-PEG-FA et TPP-FA sont dégradés entre 30 et 40 %.
- 25 Au vu de sa bonne stabilité à la lumière, le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) est donc mieux adapté pour des applications en thérapie photodynamique.

Exemple 4 : Evaluation biologique in vitro

Matériel et méthode

I. Culture cellulaire

5 Les lignées tumorales ovariennes SKOV-3 et OVCAR-3 ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les SKOV-3 ont été mises en culture dans 50% DMEM (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine ; Gibco) et 50% F-12 (Ham's F-12 Nutrient Mix, Gibco), les OVCAR-3 ont été mises en culture dans du RPMI-1640
10 contenant du L-Glutamine 2 mM 1%, 0,02 mM de sodium-pyruvate, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10% de Sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco).

II. Thérapie photodynamique

15 Un million de cellules ont été déposées dans un flacon de 25 cm², après 24h, le milieu complet a été remplacé par un milieu contenant le composé de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) (PS) (1 mg pour 100 mL de milieu). Au bout de 24h, le milieu contenant le PS a été remplacé par un milieu complet après deux rinçages au PBS (GIBCO BRL, Invitrogen, GB). Finalement, les cellules ont été soumises au laser d'une longueur d'onde
20 spécifique (668 nm) durant une heure. 24h plus tard, le surnageant a été récupéré, centrifugé pour éliminer les cellules tumorales en suspension puis congelé à -20°C. 3 contrôles ont été utilisés : des cellules tumorales SKOV-3 et OVCAR-3 non traitées (NT), des cellules mises en contact avec le PS mais sans illumination (+PS), des cellules illuminées uniquement (+illu) et des cellules soumises à la PDT (PDT).

25

III. Isolement des PBMCs

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été isolées à partir de prélèvement sanguins dilué dans un volume de PBS stérile (GIBCO BRL, Invitrogen, GB) et déposées sur gradient de densité Ficoll-Paque TM Plus (Amersham Biosciences
30 AB, Suède). Après une centrifugation de 40 min à 400 g sans décélération, l'anneau de cellules mononuclées a été récupéré, lavé 2 fois dans du PBS (300 g, 10 min) puis filtré.

IV. PCR-Quantitative en Temps réel

1. Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs à partir des cellules NK, lymphocytes B, lymphocytes CD4+,
5 lymphocytes T régulateurs (Treg) et les lymphocytes CD8+ a été réalisée à partir d'un
culot sec de $2 \cdot 10^5$ de cellules avec le kit d'extraction RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN,
Hilden, Allemagne), selon les instructions du fabricant. 30 μ L d'eau sans RNase/Dnase
(UltraPure Distilled Water, Gibco BRL, Invitrogen, GB), ont été utilisés pour l'élution de
l'ARN. L'extraction des ARNs SKOV-3, OVCAR-3 et PBMCs a été réalisée à partir d'un
10 culot de 10^6 cellules dissout dans 1 mL de Trizol (Invitrogen, Nouvelle-Zelande), selon
les instructions du fabricant. Le culot a été solubilisé dans 10 μ L d'eau sans
RNase/Dnase. La quantification des ARNs a été réalisée par spectrophotométrie
(Ultraspec 3100 Pro, Amersham Biosciences, USA). L'ARN total a été conservé à -80°C .
Une électrophorèse en gel d'agarose 1% (UltraPure Agarose, Invitrogen, USA) permet
15 de vérifier l'intégrité des ARNs extraits.

2. Transcription inverse

Le kit de Transcriptase Reverse Superscript II a été utilisé pour la RT (GIBCO BRL,
Invitrogen, GB). L'ADNc a été synthétisé à partir de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'ARN total, dans un
20 volume de 15 μL d'eau. Puis, ont été ajoutés 5 μL du mélange suivant : 1 μL d'oligo dT
(Roche, France) + 0,1 μL de RNAsin 40 U/ μL (Promega, USA) + 4 μL d'eau sans
RNase/Dnase. Après 10 min à 70°C puis 5 min à TA, 10 μL d'un second mélange
contenant : 6 μL de Tampon 5X (Tris-HCl, KCl, MgCl_2 , Invitrogen, GB) + 1 μL de
DiThioThréitol (Invitrogen, GB) + 2 μL de dNTPs 10mM (Amersham Biosciences, GB)
25 + 0,1 μL de RNAsin (Promega, USA) + 1 μL de Transcriptase Reverse Superscript II
(Invitrogen, GB) ont été ajoutés. L'échantillon a été incubé 1h à 45°C puis 5 min à 95°C .
La réaction a été stoppée par l'ajout de 70 μL d'eau/ μg d'ARN initial, la concentration
finale était de 10 ng/ μL .

30 3. PCR-Quantitative

Le principe est de suivre la néosynthèse du double brin d'ADN, grâce à la mesure de
l'incorporation du SybrGreen (fluorochrome intercalant l'ADN). Cette réaction a été

réalisée à partir d'ADNc à une concentration équivalente à 10 ng d'ARN/ μ L de mélange réactionnel. Les amorces ont été conçues et synthétisés spécifiquement pour la Q-PCR (MWG-Biotech, Allemagne). Les résultats ont été normalisés par 3 gènes de ménage : 18S, GAPDH et HPRT (tableau 3 ci-dessous).

- 5 Les transcrits ont été quantifiés par le Mx3005P (Stratagène, USA) dans des plaques optiques 96 puits (Eurogentec, France). Dans chaque puits, 10 μ L d'un couple d'amorces spécifiques (10 pmol/ μ L) ont été déposés, chaque plaque contenant les 44 couples amorces et un puits contrôle contenant de l'H₂O, en double exemplaire. Les Q-PCR ont été réalisées, à partir de 1 μ L d'échantillon d'ADNc (concentration équivalente
- 10 à 10 ng d'ARN/ μ L)/puits, suivant les instructions du fabricant avec le kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, France). Après une première dénaturation de 5 minutes à 95°C, le mélange réactionnel a subi 45 cycles d'amplification consistant en une succession de passage de 15s à 95°C (Dénaturation du double brin d'ADN) puis de 1 minute à 60°C (Hybridation des amorces et élongation du brin d'ADN
- 15 néosynthétisé). L'intensité de fluorescence a été mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation et un cycle de fusion a été programmé immédiatement après la dernière amplification. L'expression simultanée des deux isoformes du récepteur aux Folate, FOLR1 et FOLR2, par les cellules tumorales SKOV-3 et OVCAR-3 a été analysée mais
- 20 aussi par différentes cellules immunitaires telles que les PBMCs, les lymphocytes Natural Killer (NK), les lymphocytes B, les lymphocytes CD4+, les lymphocytes CD8+ et les lymphocytes T régulateurs.

4. Analyse et représentation des résultats

- L'expression quantitative d'un gène a été interprétée en utilisant la méthode Δ CT.
- 25 L'expression des gènes est donnée en « CT » (Cycle Threshold) puis normalisée par la moyenne des 3 gènes de ménages = Δ CT. Les expériences ont été réalisées en duplicata.

Tableau 3 : Récapitulatif des amorces

Primer sens et anti-sens		
FOLR1	5'-AGGTGCCATCTCTCCACAGT	5'-GAGGACAAGTTGCATGAGCA
FOLR2	5'-CTGGCTCCTTGGCTGAGTTC	5'-GCCCAGCCTGGTTATCCA
18S	5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA
GAPDH	5'- GCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG	5'- GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC
HPRT	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAG	5'-ATGGCCTCCCATCTCCTT

V. Test de viabilité

5 **Sur les cellules tumorales** : 2000 cellules tumorales (SKOV-3 et OVCAR-3) ont été mises en plaque 96 puits à fond blanc (Falcon®) dans 100 µL de leur milieu correspondant (DMEM/F-12 et RPMI). Les cellules ont été activées par 1µg/mL d'anticorps (Ac) anti-CD3, préalablement appliqués sur les plaques (2h à 37°C), et 1 µg/mL d'anticorps anti-CD28. La mise en culture est réalisée selon une cinétique de 3h, 10 24h, 72h et 120h puis un test de viabilité a été réalisé pour chaque temps. Ce test permet la quantification d'ATP présente dans les cellules grâce à la réaction de luciférase pour déterminer le nombre de cellules viables en culture.

Sur les cellules immunitaires : 10⁵ PBMCs ont été mises en culture avec 50% de ML10 (50 µL) et 50% du surnageant des cellules tumorales, soumises aux différentes conditions 15 (Non traitées, PS uniquement, illumination uniquement et soumises à la PDT), préalablement recueilli (50 µL).

VI. Test de prolifération

10⁵ de PBMCs ont été cultivées en plaques 96 puits à fonds ronds (BD Falcon®), dans 20 50 µL de milieu de culture : RPMI-1640, L-Glutamine 2 mM 1%, 0,02 mM de sodium-pyruvate, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 10% de Sérum Humain AB décomplémenté (GIBCO BRL, Invitrogen, GB) et 50 µL du surnageant des cellules tumorales selon les différentes conditions (NT, PS uniquement, illumination uniquement et PDT). Les cellules ont été activées par 1 µg/mL d'anti-CD3, préalablement déposés 25 sur les plaques (2h à 37°C), et 100 ng/mL d'anti-CD28. La prolifération a été évaluée par

incorporation de 1 μCi /puits de Thymidine Tritiée ($^3\text{H-Th}$) (GE HEALTHCARE, France), 18h avant la fin de la culture. Selon une cinétique de 24h, 48h, 72h et 120h, les plaques ont été filtrées et les filtres ont été lus dans un compteur de radioactivité (1450 Trilux, Wallac, Finlande). Les expériences ont été réalisées en *triplicata* et les résultats
5 sont exprimés en coups par minute (cpm).

VII. Cytométrie en Flux

Les anticorps monoclonaux anti-humains utilisés ont été couplés à des fluorochromes (Voir tableau 4 ci-après). Pour le contrôle, un isotype des différents anticorps
10 monoclonaux a été utilisé en tant que contrôle. 10^5 cellules ont été reprises dans un volume de 100 μL de PBS stérile et incubées avec 5 μL de chaque Ac (10 min à T° ambiante (TA) et à l'obscurité). Les cellules marquées ont été lavées par ajout de 200 μL de PBS puis centrifugation 5 minutes à 600 g, le surnageant a ensuite été jeté. Les cellules ont ensuite été reprises dans 200 μL de PBS et enfin analysées par cytométrie de flux (BD
15 FACSCanto -II).

Tableau 4 : Représentation des différents anticorps monoclonaux anti-humains utilisés pour la cytométrie en flux.

Panel	Anticorps	Isotypes
Type cellulaire	CD4 (VIT4)-VioBlue	IgG2a (de souris)-VioBlue
	CD8-VioGreen	IgG2a (de souris)-VioGreen
	CD19-VioBright FITC	IgG1 (de souris)-VioBright FITC
	CD14-PE	IgG2a (de souris)-PE
	CD3-PE-Vio770	IgG2a (de souris)-PE-Vio770
	CD335 (NKp46)-APC	IgG1 (de souris)-APC
	CD11C-APC-Vio770	IgG2b (de souris)-APC-Vio770
Activation	CD4 (VIT4)-VioBlue	IgG2a (de souris)-VioBlue
	CD30-APC-Vio770	IgG1 (de souris)-APC-Vio770
	CD69-PE-Vio770	IgG1 (de souris)-PE-Vio770
	Anti-HLA-DR-PerCP-Vio700	IgG2a (de souris)-PerCP-Vio700
	CD152-APC	IgG2a (de souris)-APC
	CD197	REA Contrôle (S)-PE
	CD25-VioBright FITC	IgG2b (de souris)-VioBright FITC
	CD8-VioGreen	IgG2a (de souris)-VioGreen
Treg naturels	CD4 (VIT4)-VioBlue	IgG2a (de souris)-VioBlue
	CD25-VioBright FITC	IgG2b (de souris)-VioBright FITC
	CD127-PE-Vio770	IgG2a (de souris)-PE-Vio770
Treg induits	CD4 (VIT4)-VioBlue	IgG2a (de souris)-VioBlue
	CD18-FITC	IgG1 (de souris)-FITC
	CD223-PE	REA Contrôle (S)-PE
	CD49b-PE-Vio770	REA Contrôle (S)-PE-Vio 770
	CD152-APC	IgG2a (de souris)-APC

Résultats

L'analyse transcriptomique a montré que les lignées de cellules tumorales ovariennes étudiées (SKOV-3 et OVCAR-3) exprimaient préférentiellement l'isoforme FOLR1 montrant ainsi leur potentielle sensibilité vis-à-vis du nouveau photosensibilisateur de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) et donc leur sensibilité à la mort induite par la thérapie photodynamique (PDT).

A l'issue de la PDT, l'analyse morphologique in vitro des cellules tumorales ovariennes SKOV-3 et OVCAR-3 a montré qu'elles étaient sensibles à la PDT avec un effet visible dès 1 heure post-illumination (cellules non adhérentes, aspect de lyse cellulaire). Ces résultats ont été confortés par un test de viabilité (MTT) sur les cellules tumorales ovariennes soumises in vitro à la thérapie photodynamique. En effet, il a été observé que les cellules tumorales ovariennes SKOV-3 et les OVCAR-3 soumises à la PDT présentaient une diminution importante de leur viabilité cellulaire au cours du temps. Par contre, il a été observé qu'il n'y avait pas de modification notable de la viabilité des cellules tumorales non traitées ou soumises uniquement au PS ou à l'illumination. Ainsi, ces résultats valident l'efficacité du PS de l'invention Pyro-PEG-FA de formule (I) et montrent que la PDT est bien capable d'induire la mort des cellules tumorales ovariennes avec un effet très rapide, puisque 90% des cellules tumorales sont mortes après seulement 1 heure d'illumination (figure 3).

L'impact du sécrétome des cellules tumorales ovariennes soumises à la PDT sur les cellules mononuclées du sang périphérique humaines (PBMC) a été étudié. Les PBMC, mis en culture avec du surnageant de OVCAR-3 ou de SKOV-3 soumises à la PDT, ont montré une augmentation de leur viabilité après seulement 3 heures de mise en culture. Cette augmentation du métabolisme mitochondrial a été obtenue dans 3 expériences indépendantes et est statistiquement significative (à 48 h et 120 h). Ces résultats illustrent donc que la PDT utilisant ce nouveau photosensibilisateur Pyro-PEG-FA de formule (I) peut modifier le sécrétome des cellules tumorales en faveur d'un sécrétome activant la prolifération des cellules immunitaires humaines.

L'effet du sécrétome des cellules tumorales SKOV-3 soumises à la PDT sur le phénotype des populations immunitaires a été analysé. Pour cela, l'expression des marqueurs des différentes populations immunitaires a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus ont montré que le sécrétome des cellules tumorales SKOV-3 n'induisait pas de modification du pourcentage des lymphocytes T CD4+ et T CD8+, des monocytes, des lymphocytes B ou des NK dans les PBMC, quel que soit les conditions de cultures. Par ailleurs, les marqueurs d'activation précoces et tardifs ont été spécifiquement analysés dans les T CD4+, et les résultats ont montré que le sécrétome des cellules tumorales ovariennes soumises aux différents traitements n'induisait pas non plus de modification de l'activation des T CD4+. Ainsi, contrairement à la radiothérapie ou la chimiothérapie, l'ensemble des résultats obtenu a montré que la PDT utilisant le nouveau photosensibilisateur Pyro-PEG-FA de formule (I) n'altérait pas la qualité de réponse immunitaire effectrice anti-tumorale.

L'impact du sécrétome des cellules SKOV-3 soumises à la PDT sur les populations de lymphocytes T régulateurs naturels et induits (Tr1) a également été étudié. L'analyse des résultats obtenus (en analysant les Tr1 sur la base des triples marquages CD4+CD18+CD49b ou CD4+CD49b+LAG3+) a montré que le sécrétome des cellules SKOV-3 non traitées induit des populations de type Tr1. De manière surprenante, il a été observé que les différents traitements (Illumination+, PS+ ou PDT) ne favorisent pas cette induction de Tr1. Ainsi, contrairement à la radiothérapie classique, la PDT utilisant ce nouveau photosensibilisateur Pyro-PEG-FA de formule (I) ne modifie pas le sécrétome des cellules tumorales en faveur d'un environnement encore plus immunosuppresseur qui serait favorable à l'échappement de la tumeur au système immunitaire et donc à la progression tumorale.

Exemple 5 : Etude In vivo

I. Carcinome ovarien de rat : Lignée cellulaire NuTu-19

La lignée cellulaire NuTu-19 était une lignée d'adénocarcinome ovarien syngénique de rat permettant le développement de tumeur ovarienne chez un rat immunocompétent (Rose et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 1996, 175(3 Pt 1), 593-9). Les cellules ont été

conservées dans l'azote liquide (5.10^6 cellules par cryotube) puis cultivées dans du DMEM (*Gibco - Life Technologies*TM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, et 1% de mélange pénicilline / streptomycine et 1% de Glutamax. Les cellules ont été incubées dans des conditions standardisées (CO₂ 5%, humidité 100%,
5 37°C). Lorsque les cellules ont été à confluence, elles ont été trypsinisées afin de lever l'adhérence et permettre leur recueil (solution trypsine 0,25%, *Gibco - Life Technologies*TM), lavées au PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, *Gibco - Life Technologies*TM) et comptées après test d'exclusion au bleu trypan pour évaluer la viabilité. Les cellules ont été injectées sous forme de suspension cellulaire dans du PBS
10 par voie intrapéritonéale aux différents rats afin d'obtenir un modèle de carcinose péritonéale.

II. Modèle animal de carcinose péritonéale

Nous avons utilisé un modèle validé de carcinose péritonéale (Rose et al., Am. J. Obstet. Gynecol. 1996, 175(3 Pt 1), 593-9). Les rats femelles Fisher F344 ont été obtenues auprès
15 du fournisseur *Harlan*[®]. Les animaux hébergés à l'animalerie du Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE - Université de médecine Pôle Recherche - CHRU de Lille). L'alimentation (*SAFE*TM) et l'eau ont été fournies *ad libitum*.

20 Le modèle de carcinose a été obtenu par inoculation intrapéritonéale d'une suspension cellulaire de NuTu-19 dans du PBS (20.10^6 cellules par rat). Les rats ont été surveillés régulièrement jusqu'au développement d'une ascite témoignant de l'évolution tumorale, ou jusqu'à la réalisation d'une cœlioscopie exploratrice destinée à confirmer la présence de lésions de carcinose péritonéale.

25 L'expression du récepteur au folate par la lignée cellulaire NuTu-19 et les lésions de carcinose a été confirmée par Azaïs et al. (Int J Gynecol Cancer 2015).

Les mesures de fluorescence *in vivo* ont été réalisées 4 heures après l'administration du photosensibilisateur à la dose de 4 mg/Kg par voie intrapéritonéale. Le protocole de
30 détection a été mis en œuvre immédiatement après une anesthésie à l'isoflurane par voie coelioscopique pour visualiser la fluorescence émise par les lésions de carcinose (photodiagnostic).

III. Photodiagnostic

Le composé Pyro-PEG-FA de formule (I) a été détecté en fluorescence avec le dispositif médical de cœlioscopie Olympus® (EVIS EXERA II), présentant une fonction PDD (photodiagnostic). L'optique de cœlioscopie utilisée était un cystoscope Olympus® de 4 mm présentant un angle de vue de 30°.

La fonction PDD a été élaborée par Olympus® pour le diagnostic de tumeurs de vessie non visibles en lumière blanche (carcinomes *in situ*, dysplasies, petites tumeurs focales). L'administration d'un précurseur de la protoporphyrine IX (PpIX), l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et plus récemment l'hexyl-aminolévulinate (HAL, Hexvix®), a permis de visualiser de façon spécifique les lésions vésicales qui apparaissent fluorescentes (rouge) en lumière bleue.

La source lumineuse était une source Xénon. Un premier système de filtre a permis une excitation lumineuse bleue entre 380 et 440 nm. Un second filtre jaune a permis d'accentuer le contraste entre la lumière bleue et la fluorescence rouge émise entre 625 et 655 nm, sachant que ce filtre permettait l'observation optimale d'une fluorescence émise autour de 640 nm. La fluorescence rouge émise par la PpIX étant trop faible par rapport à la lumière bleue, ce filtre jaune a été mis en place au niveau de la caméra afin d'accentuer le contraste entre le bleu et le rouge et de permettre une bonne visualisation des lésions.

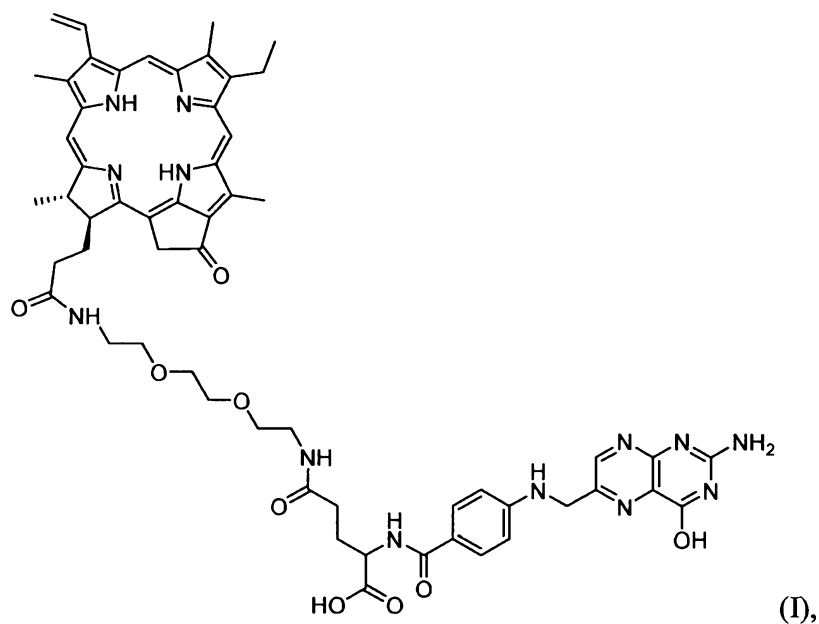
Quatre heures après l'injection intra-péritonéale, une anesthésie générale a été réalisée par inhalation continue d'Isoflurane (concentration variant de 1,5 à 3%). Une open cœlioscopie a été réalisée sur la ligne médiane permettant l'introduction d'un trocart de 5 mm. Une bourse a été réalisée au Vicryl® 2.0 afin de maintenir l'étanchéité autour du trocart. L'insufflation a été mise en place sur le robinet de ce trocart avec un débit de 0,2 L/min de CO₂ permettant d'obtenir un pneumopéritoine constant de 3 mmHg. L'introduction d'un cœlioscope de 5 mm à travers ce trocart a permis d'explorer la cavité péritonéale, d'abord en lumière blanche puis en lumière bleue.

La procédure a été réalisée sur 3 rats après administration du PS par voie intrapéritonéale à la dose de 4 mg/Kg.

La figure 4A représente l'image de cœlioscopie obtenue chez un rat immunocompétent ayant développé une carcinose péritonéale après injection IP de cellules NuTu-19 (lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien syngénique de rat). La lésion de carcinose apparaît en blanc. La figure 4B correspond à la figure 4A en lumière blanche.

REVENDEICATIONS

1. Composé de formule (I) :



5 et ses sels pharmaceutiquement acceptables.

2. Composé selon la revendication 1, pour son utilisation en tant que médicament.

3. Composé selon la revendication 1, pour son utilisation dans le traitement du cancer.

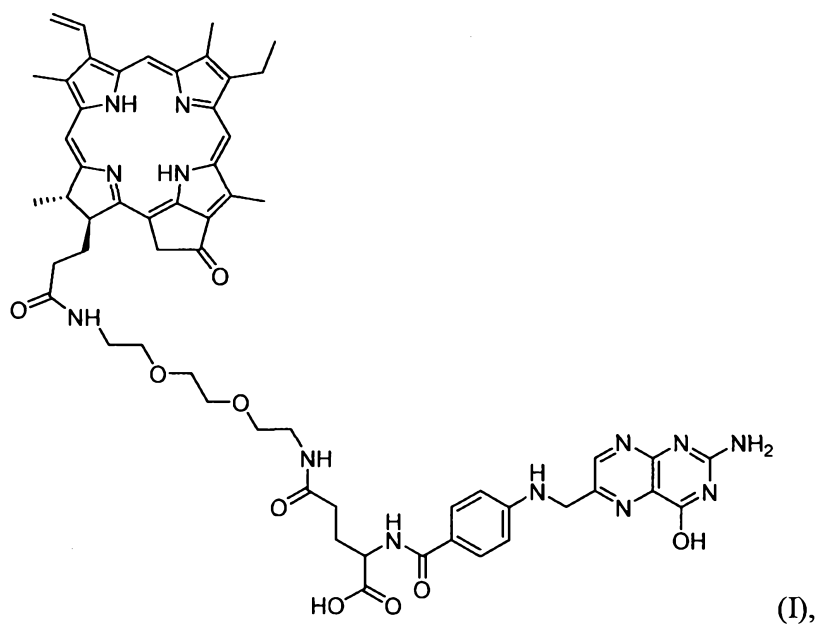
10

4. Composé pour son utilisation selon la revendication 3, dans le traitement du cancer par thérapie photodynamique.

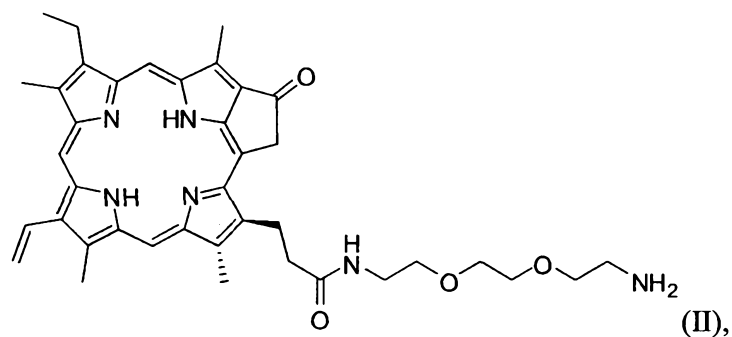
5. Composé pour son utilisation selon les revendications 3 ou 4, dans la réduction du
15 risque de développer des métastases.

6. Composé pour son utilisation selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle le cancer est
choisi parmi un cancer des ovaires, des poumons, du rein, de l'endomètre, colorectal, du
sein, cancer du pancréas, du cerveau, gastrique, du foie, de la prostate, des testicules, de
20 la vessie, ou de la tête et du cou.

7. Composé pour son utilisation selon la revendication 6, dans laquelle le cancer est un cancer des ovaires.
8. Composé pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, dans laquelle ledit composé est destiné à être administré par voie intrapéritonéale ou par voie intraveineuse.
9. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) :



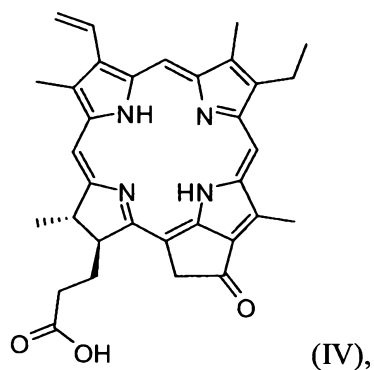
- 10 caractérisé en ce que le procédé comprend une étape de couplage entre un composé de formule (II) :



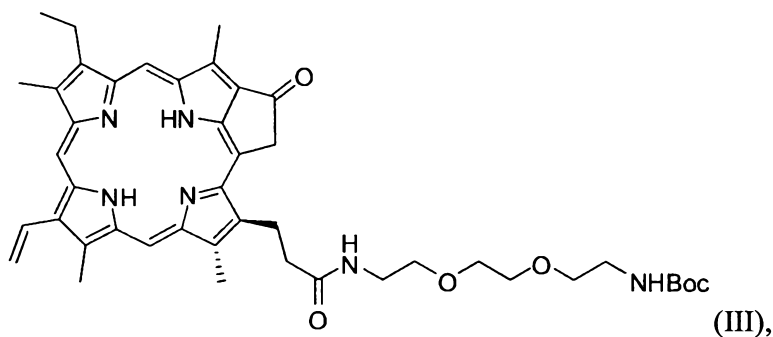
et l'acide folique.

10. Procédé de préparation d'un composé de formule (I) selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

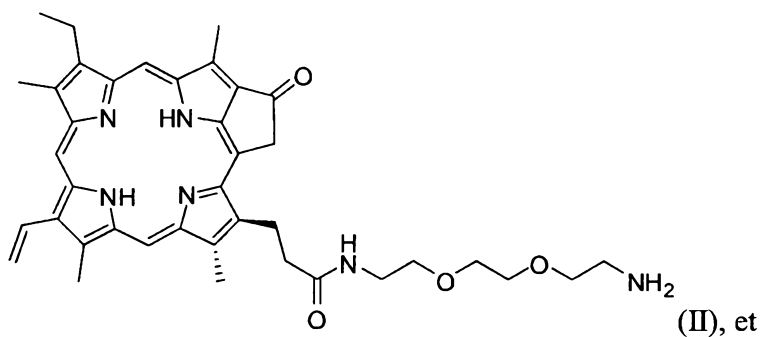
(a) une étape de couplage entre un composé de formule (IV) :



5 avec du N-Boc-2,2'-(éthylènedioxy)diéthylamine, pour obtenir un composé de formule (III) :

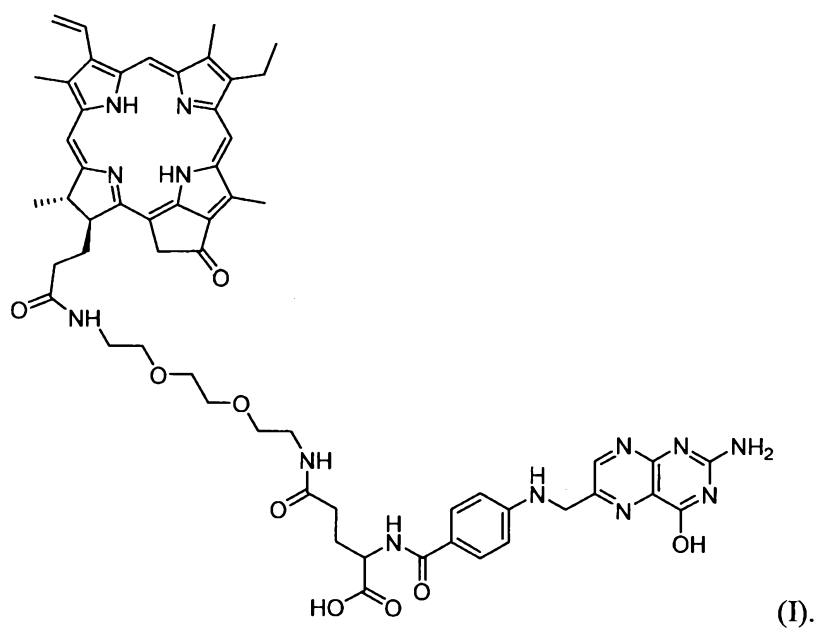


b) une étape de déprotection du composé de formule (III) obtenu à l'étape a) pour obtenir un composé de formule (II) :



10

c) une étape de couplage entre le composé de formule (II) obtenu à l'étape b) et l'acide folique pour obtenir un composé de formule (I) :



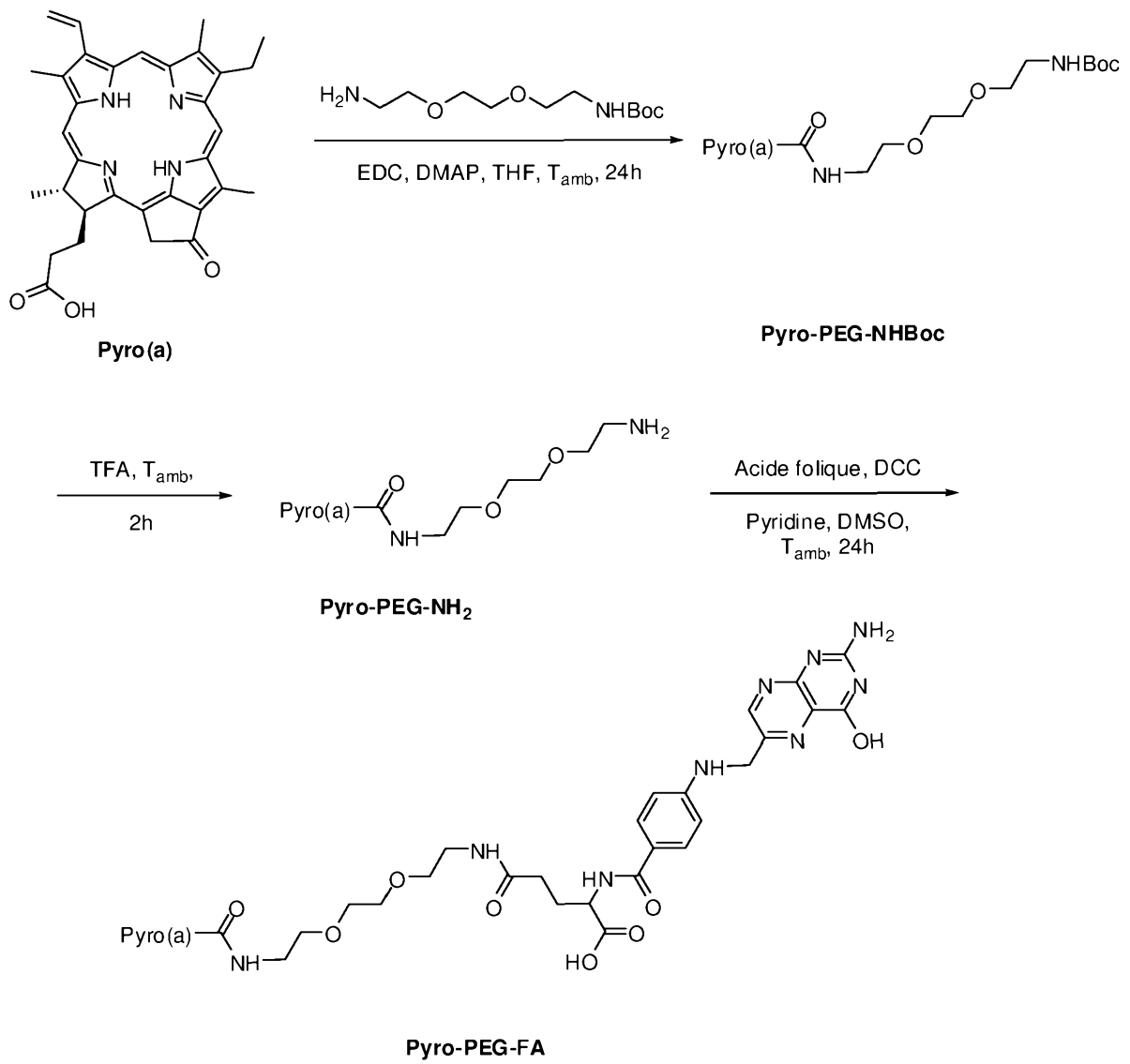


FIGURE 1

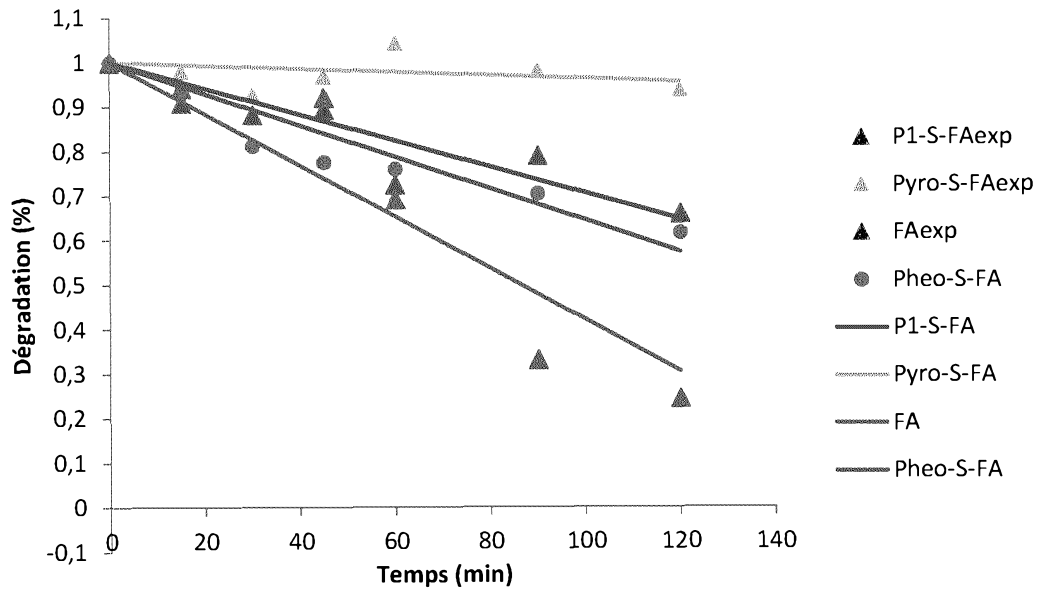


FIGURE 2

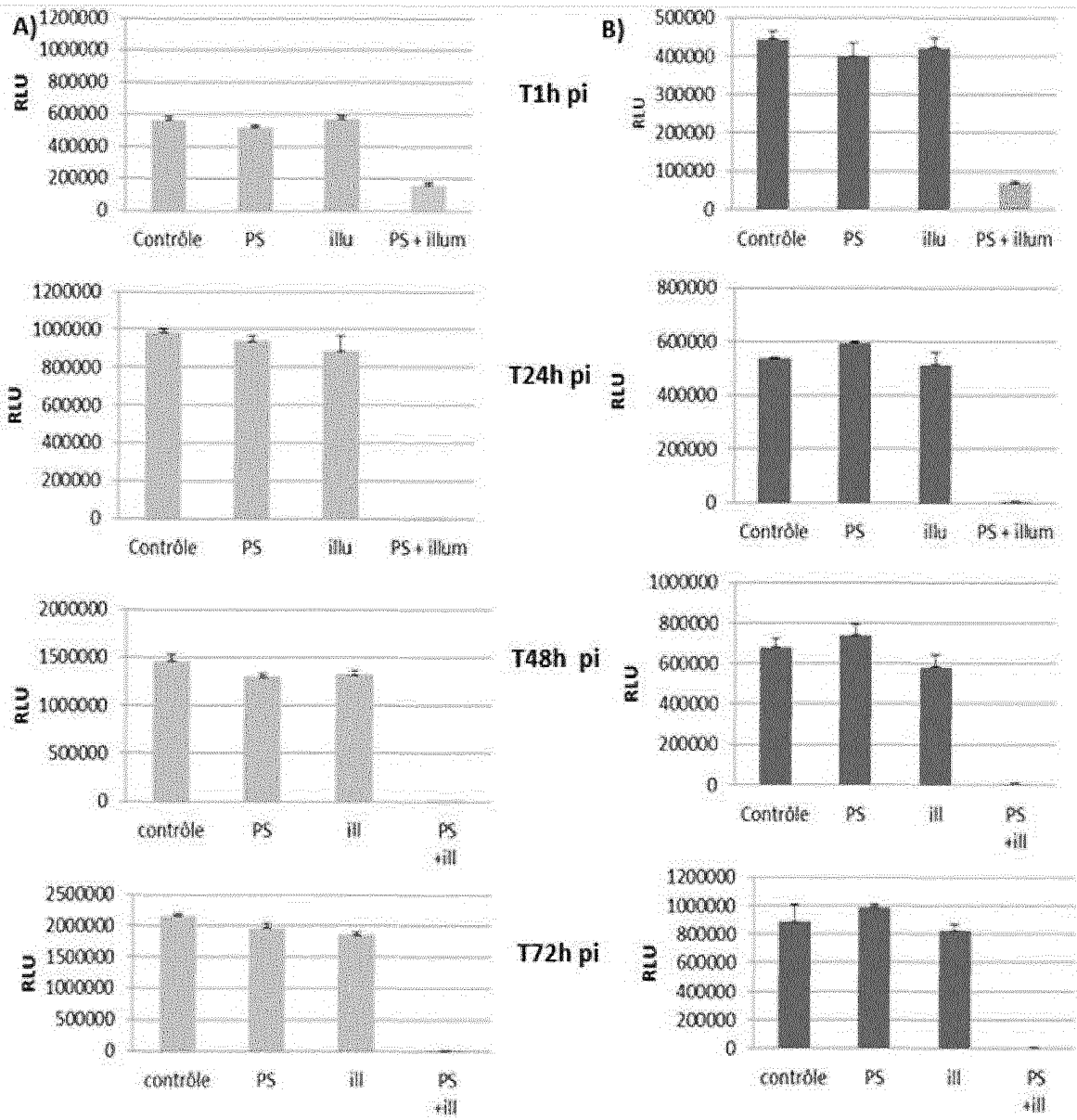


FIGURE 3

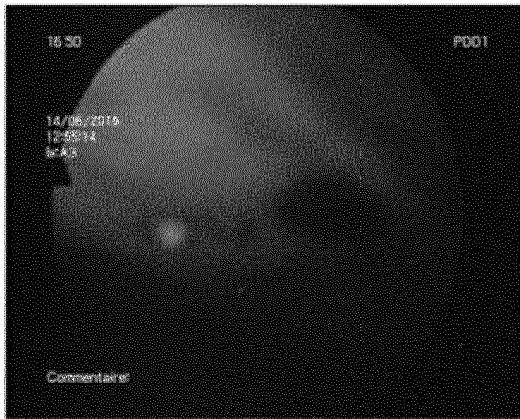


FIGURE 4A



FIGURE 4B

B2549FR00 Seq List_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Prodynov
<120> Conjugués de pyropheophorbide et leurs utilisations
<130> PR
<160> 10
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FOLR1 forward
<400> 1
aggtgccatc tctccacagt 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FOLR1 reverse
<400> 2
gaggacaagt tgcatgagca 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> FOLR2 forward
<400> 3
ctggctcctt ggctgagttc 20

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FOLR2 reverse
<400> 4
gcccagcctg gttatcca 18

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 18S forward
<400> 5

	B2549FR00 Seq List_ST25.txt	
tcaagaacga aagtcggagg		20
<210> 6		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> 18S reverse		
<400> 6		
ggacatctaa gggcatcaca		20
<210> 7		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> GAPDH forward		
<400> 7		
gccaaagtca tccatgacaa ctttgg		26
<210> 8		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> GAPDH reverse		
<400> 8		
gcctgcttca ccaccttctt gatgtc		26
<210> 9		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> HPRT forward		
<400> 9		
ccctggcgtc gtgattag		18
<210> 10		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> HPRT reverse		
<400> 10		
atggcctccc atctcctt		18

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

EP 2 431 366 A1 (DIATECH KOREA CO LTD [KR]) 21 mars 2012 (2012-03-21)

YOU HYUN ET AL: "Pheophorbide-aconjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 23, no. 7, 16 février 2015 (2015-02-16), pages 1453-1462, XP029204983, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/J.BMC.2015.02.014

SCHNEIDER R ET AL: "Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 13, no. 8, 15 avril 2005 (2005-04-15) , pages 2799-2808, XP027637588, ISSN: 0968-0896 [extrait le 2005-04-15]

WO 2004/005289 A2 (HEALTH RESEARCH INC [US]; LIGHT SCIENCES CORP [US]; PANDEY RAVINDRA K) 15 janvier 2004 (2004-01-15)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT