

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 812 637

(21) N° d'enregistrement national :  
00 10165

(51) Int Cl<sup>7</sup> : C 07 D 487/22, A 61 K 31/395, A 61 P 35/00 //  
(C 07 D 487/22, 257:00, 209:00, 209:00)

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 01.08.00.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 08.02.02 Bulletin 02/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : ANULM ASSOCIATION NANTAISE  
POUR L'UTILISATION DE LA LUMIERE EN MEDECINE — FR.

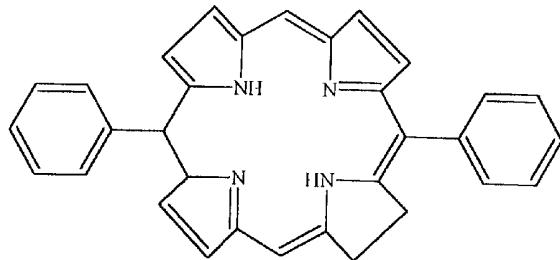
(72) Inventeur(s) : PATRICE THIERRY.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET DAWIDOWICZ.

(54) NOUVEAUX COMPOSES DERIVES DE DIHYDROPORPHYRINE ET LEURS APPLICATIONS.

(57) L'invention concerne un composé dérivé de dihydro-porphyrine répondant à la formule générale (I):



dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non; ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

Application: traitement par photochimiothérapie.

FR 2 812 637 - A1



15 Nouveaux composés dérivés de dihydroporphyrine et leurs applications

L'invention concerne de nouveaux composés dérivés de dihydroporphyrine et leurs applications, notamment dans les 20 domaines de la photochimiothérapie, en particulier pour le traitement de cancer, de l'imagerie par fluorescence et de l'optoélectronique.

Les porphyrines et leurs dérivés ont fait l'objet de 25 nombreuses études ces dernières années en raison de leur large domaine d'application potentiel. Ainsi, les brevets US-5.162.519, US-4.992.257, US-4.837.221, US-5.162.519 et US-5.703.230 illustrent de tels exemples de composés.

30 Parmi ces nombreux domaines d'application, la photochimiothérapie est apparue aujourd'hui comme l'un des domaines les plus prometteurs. La photochimiothérapie est une technique de traitement qui s'est développée il y a quelques années, en particulier pour le traitement de 35 cancers. Cette technique comprend l'administration d'un agent photosensible, à priori peu toxique, qui va être retenu avec une sélectivité relative par les tissus à index mitotique élevé, en particulier le tissu néoplasique. Cet

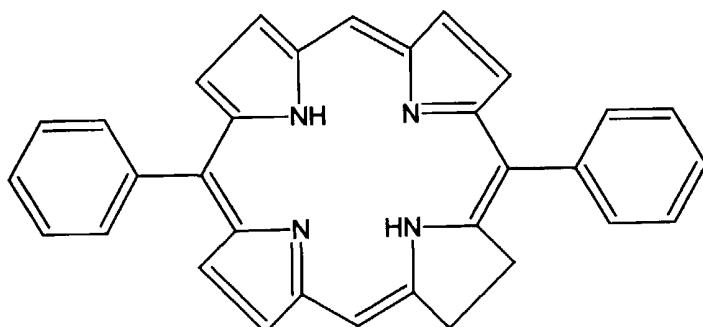
agent photosensible est alors excité par une radiation lumineuse de longueur d'onde adaptée au spectre d'absorption lumineuse du photosensibilisant. Les radiations lumineuses absorbées par la molécule 5 photosensible entraînent des réactions de type 1 (production de radicaux hydroxyles) ou de type 2 (production d'oxygène singulet) par un mécanisme de conversion intersystème. Ces espèces radiculaires entraînent des réactions d'oxydation et de peroxydation au 10 niveau des tissus qui ont fixé le photosensibilisant et par suite la mort cellulaire.

L'efficacité de la technique repose sur des propriétés déterminées de l'agent photosensible. Ainsi, pour provoquer 15 l'effet phototoxique désiré en profondeur à l'intérieur d'un tissu d'un sujet, il est nécessaire d'utiliser des photosensibilisants qui possèdent des coefficients d'absorption élevés à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm, là où les tissus corporels sont les plus 20 transparents à la lumière (voir Stenberg et al. "An Overview of Second Generation Drugs for Photodynamic Therapy including BPD-MA (Benzoporphyrin Derivative) Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, 470-4 (spinelli et al. eds. 1992).

25 De même, l'agent photosensible doit d'une part présenter une vitesse de pénétration rapide dans les cellules cibles à détruire de manière à réduire le temps nécessaire entre l'administration de l'agent photosensible et les radiations 30 lumineuses, d'autre part un temps de rétention court dans les zones saines pour réduire les effets secondaires et le temps d'hospitalisation ainsi que les risques de brûlures. On est donc constamment à la recherche de nouvelles molécules photosensibles présentant un temps de rétention 35 plus court dans les zones cibles de l'organisme d'un être vivant, cette durée de vie plus courte pouvant présenter un intérêt dans les autres domaines d'application, en particulier l'imagerie médicale et l'optoélectronique.

A cet effet, l'invention a pour objet un nouveau composé de dihydroporphyrine répondant à la formule générale (I) :

5



10

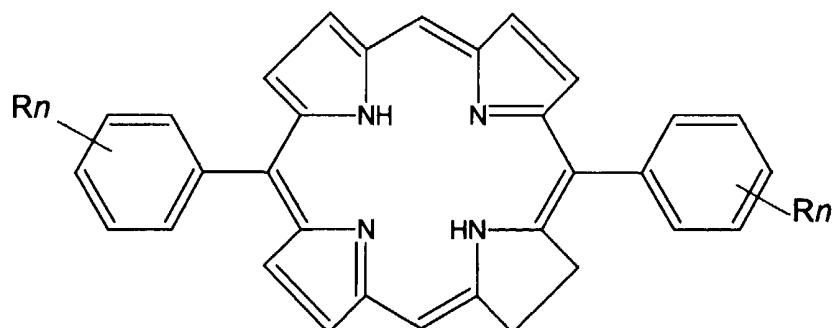
dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non ; ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

15

Les composés de l'invention peuvent exister comme mentionné ci-dessus à l'état de sel d'addition à centre acide ou basique ou à l'état de complexe métallique.

20

L'invention a encore pour objet un composé dérivé de dihydroporphyrine du type précité répondant à la formule générale (II) :



25

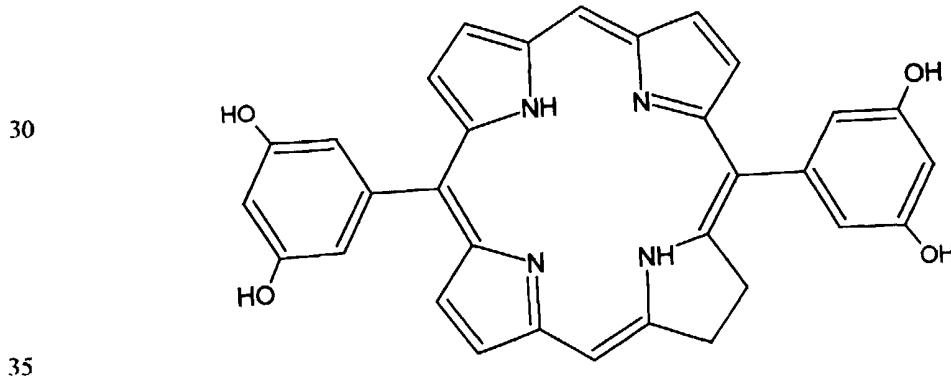
dans laquelle le groupe phényle est substitué, n est égal de 1 à 3 et chaque substituant R, qui peut être identique ou différent, et dans des positions identiques ou différentes sur son groupe phényle substitué est un groupe

hydroxy ou un groupe phosphonate ( $\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PO}_3\text{Na}_2$ ) ou un groupe éthylphosphonate ( $\text{PO}_3\text{Et}_2$ ) ou un groupe sulfonate ou un groupe aromatique ou un groupe aliphatique.

- 5 Par groupe aliphatique ci-dessus, on entend en particulier un ou plusieurs acides aminés ne comprenant pas de cycle, à savoir, par exemple, la serine ou une chaîne polyéthylène glycol (PEG) ou tout autre substituant.
- 10 Par groupe aromatique mentionné ci-dessus, on entend en particulier un ou plusieurs acides aminés comprenant au moins un cycle aromatique par exemple Phe ou Tyr ou tout autre groupement aromatique carboné ou non.
- 15 A nouveau, les composés décrits ci-dessus peuvent être sous la forme de dérivés tels que des sels d'addition à centre acide ou basique, des complexes métalliques, par exemple Zn, Ga, Pa, ou des hydrates ou d'autres solvates, en particulier avec des alcools aliphatiques inférieurs en  $\text{C}_1$ -  
20  $\text{C}_6$ .

L'exemple qui suit illustre la préparation d'un composé préféré de l'invention.

- 25 La synthèse de ce composé, répondant à la formule générale (III),



et qui sera appelé par la suite pour simplifier SIMO1 comporte les étapes suivantes.

**Etape 1 : dipyrrylméthane**

Du dipyrrylméthane a été préparé comme précédemment mentionné dans Wang et Bruce, Synlett, 1267, 1995.

5 **Etape 2 : 5,15-Bis(3,5-diméthoxy-1-phényl)porphyrine**

Du di-méthoxy-3,5-benzaldéhyde (341 mg, 2,05 mmole), du dipyrrylméthane (300 mg, 2,05 mmole) ont été ajoutés dans 205 ml de dichlorométhane distillé dans un flacon à fond circulaire. La solution a été soumise aux ultrasons dans un flux d'azote pendant 20 minutes. Ensuite, de l'acide trifluoroacétique (47 ml, 615 mmole) a été injecté et le mélange a été agité à température ambiante toute la nuit.

Une solution de DDQ (0,931 g dans 10 ml de toluène) a été ajoutée et le mélange de réaction a été mis sous reflux pendant 30 minutes avec un bain d'huile préchauffé à 60°C.

La purification de la porphyrine a été accomplie par chromatographie flash éluée avec de l'hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 5/5 et a fourni 253 mg de la porphyrine désirée (36 %).

RMN 1H (CF<sub>3</sub>COOD) ppm : 11:13 (H meso), 9,7 et 9,3 (2H, d, J = 6Hz, pyrrole), 7,9 (o-H, phényl), 7,4 (p-phényl), 4,2 (méthoxy)

25

UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), max (nm) : 407, 502, 536, 574, 629.

FAB-MS : calculé pour C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> : 582,2 trouvé : 583 (M+H<sup>+</sup>).

30

**Etape 3 : 5,15-Bis(3,5-dihydroxy-1-phényl)porphyrine**

Le composé de l'étape 2 (90 mg, 0,15 mmole) a été dissous dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec (10 cm<sup>3</sup>) à -20°C, suivi par l'addition de BBr<sub>3</sub> (0,12 cm<sup>3</sup>, 1,24 mmole). La solution verte résultante a été agitée pendant 12 heures puis placée dans de l'eau glacée. Du méthanol (20 cm<sup>3</sup>) et ensuite de l'acétate d'éthyle (10 cm<sup>3</sup>) ont été ajoutés à la suspension et le mélange a été neutralisé avec du NaHCO<sub>3</sub>. La couche

organique a été séparée, lavée d'abord avec une solution de NH<sub>4</sub>Cl puis deux fois avec de l'eau et séchée sur du sulfate de sodium anhydre. La solution résultante a été évaporée sur un évaporateur rotatif et le résidu redissous dans de l'acétone. Après addition de pentane, une précipitation a fourni le composé de l'étape 3 avec un rendement de 52 %.

RMN 1H (acétone d6) : 10.55 (H meso), 9,6 et 9,3 (2H, d, J = 6Hz, pyrrole), 7,3 (o-H, phényl), 6,9 (p-phényl), -3,1 (NH).

UV-Vis (acétone), max (nm) : 402, 532, 572, 628.

**Etape 4 : 2,3-dihydro-5,15-Bis(3,5-dihydroxy-1-phényl)-15 prophyrine (SIM01)**

Le composé de l'étape 3 (42 mg, 0,08 mmole), du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre (0,32 g) et de la pyridine anhydre (5 cm<sup>3</sup>) ont été chauffés (120°C) pendant 5 minutes. Ensuite, de faibles quantités (0,25 cm<sup>3</sup>) d'un mélange de p-toluenesulfonylhydrazide (0,44 g) dans de la pyridine (2,5 cm<sup>3</sup>) ont été ajoutés toutes les 15 mn pendant 2,5 heures. Après refroidissement, la solution de pyridine a été évaporée sous vide. La poudre résultante a été redissoute dans un mélange 1/1 d'acétone/acétate d'éthyle, puis lavée deux fois avec de l'eau et ensuite saturée avec une solution de bicarbonate. De l'o-chloranil a été ajouté en portions à la solution organique à température ambiante jusqu'à ce que le pic d'absorption à 735 nm ait disparu. La solution a été lavée deux fois avec NaHSO<sub>4</sub> (5 %), de l'eau distillée, NaOH (0,1 M) et du bicarbonate saturé. Après séchage sur MgSO<sub>4</sub>, le solvant a été évaporé sur un évaporateur rotatif. Le résidu a été cristallisé à partir d'acétone/pentane pour fournir 31 mg du composé de l'étape 4 (rendement 74 %) qui sera appelé ci-après SIM01.

RMN 1H (acétone, d6) ppm : 10,1 et 9,2 (2H-meso), 9,35-8,6 (6H, m, pyrrole), 7,2 et 6,95 (4H, d, o-phényl), 6,85 et

6,75 (2H, t, p-phényl), 4,65 et 4,45 (4H, m, pyrrolidine), -1,4 et -1,9 (2H, s, NH).

UV-Vis (acétone), max (nm) : 395, 405, 500, 645.

5

Les composés de l'invention ont fait l'objet d'essais qui ont mis en évidence leurs propriétés thérapeutiques.

A cet effet, les composés de l'invention peuvent être 10 présentés sous forme de médicaments caractérisés en ce qu'ils consistent en un des composés précités ou sous forme de composition pharmaceutique contenant un composé du type précité associé à un excipient.

15 Les composés de l'invention peuvent être présentés sous toute forme de composition administrable au corps humain ou animal et appropriée à l'administration entérale, parentérale ou transdermique, tel que comprimé, dragée, gélule, capsule, suspension ou solution buvable ou 20 injectable, tel que sirop ou ampoule, timbre transdermique, etc. associés à des excipients convenables et dosés pour permettre une ou plusieurs cures comprenant une ou plusieurs administrations journalières pendant un jour ou plusieurs jours à raison d'une dose comprise par exemple 25 entre 0,1 et 20 mg/kg de poids.

Les formes administrables préférées sont les formes injectables, en particulier sous forme d'une injection intramusculaire ou intraveineuse ou sous forme 30 d'application transcutanée.

Les essais décrits ci-dessus portent sur l'activité de la molécule SIMO1. L'activité de cette nouvelle molécule SIMO1 a été testée in vitro avec des essais de toxicité et de 35 phototoxicité et in vivo par une étude de phototoxicité par évaluation des retards de croissance de tumeurs par rapport à des animaux non traités.

La pharmaco cinétique de SIMO1 a également été étudiée pour déterminer le retard pour une incorporation maximale de SIMO1 comparé au retard d'incorporation de la m-THPC (molécule classique largement utilisée dans le domaine de la photo-chimiothérapie).

La SIMO1 est un dérivé de porphyrine de poids moléculaire 524. La SIMO1 montre, dans une solution isotonique saline, 3 spectres principaux d'absorption à 428, 513 et 652 nm. La solution saline a été obtenue comme suit : un milligramme de SIMO1 a été dissous dans 1 ml de solvant (50 % d'eau, 30 % de PEG et 20 % d'éthanol pur à 99 %). D'autres concentrations ont été obtenues successivement par addition d'une solution isotonique saline.

15

Pour étudier la toxicité et la phototoxicité de la molécule SIMO1, il a été procédé comme suit :

Des cellules C6 ont été mises en culture dans des flacons falcon de 25 cm<sup>3</sup> (Polylabo, Strasbourg, France) dans un milieu RPMI supplémenté avec 10 % (V/V) de sérum de veau foetal (FCS), 100 unités de pénicilline mL<sup>-1</sup>, 100 mg de streptomycine et 2 mM de glutamine.

25 Les cellules ont été repiquées en culture par dispersion avec 0,025 % de trypsine dans 0,02 % d'acide éthylène-diaminetétraacétique (EDTA) pendant un temps de contact de 2 minutes et remises à adhérer suivant une dilution 1:3, ce qui a maintenu les cellules dans la phase exponentielle de 30 croissance. Les cellules ont été vérifiées sur une base régulière par contamination des mycoplasmes.

Les cellules ainsi cultivées ont été soumises à un traitement photodynamique. Des aliquotes (11 µl) de la solution photosensibilisante SIMO1 ont été ajoutées à des cellules C6 adhérées dans des puits de plaques à 96 puits après trypsinisation comme décrit ci-dessus. La concentration cellulaire était de 5.10<sup>4</sup> cellules/ml<sup>-1</sup> (100 ml par puits).

La concentration finale des solutions de SIMO1 était comprise dans la plage de 0,5 à 50 µg/ml. Immédiatement après addition du photosensibilisant SIMO1, les plaques de cellules ont été maintenues dans une obscurité complète 5 jusqu'au temps de comptage à l'exception d'une irradiation laser des cellules traitées au PDT. Des milieux frais contenant du FCS mais exempt de photosensibilisant ont été préparés avant irradiation laser. Un laser à diode à 650 nm a été utilisé. La sortie de puissance de l'extrémité de la 10 fibre a été réglée, en utilisant un dispositif de mesure de puissance (Coherent, France), à 500 mW. La lumière a été transmise à la cible par une fibre optique à une distance de 20 mm afin d'irradier des cellules dans un puits de 6 mm de diamètre à l'intérieur d'un champ unique fournissant une 15 illumination de la totalité de la zone. Le temps d'exposition a été de 13 secondes par puits à 650 nm fournissant une densité d'énergie de 20 J/cm<sup>2</sup>.

Les cellules ont été incubées avec SIMO1 pendant 5 ou 20 20 heures. Pour les essais de phototoxicité, les cellules ont été lavées et le milieu a été remplacé immédiatement avant irradiation laser.

Les comptages de cellules ont été réalisés 24 heures après 25 la fin des expériences afin d'éviter des sous-estimations des cellules survivantes en écartant des cellules altérées mais vivantes. Au moment du comptage, 15 µl de solution saline tampon au phosphate (solution PBS-MTT, 5 mg/ml<sup>-1</sup>) ont été ajoutés aux puits. Après 4 heures, 150 µl 30 d'isopropanol-HCl 0,04N ont été ajoutés conformément à la méthode décrite par Mosmann (T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods, 65, 55-63, 1985).

35

Les microplaques ont ensuite été lues à des densités optiques de 570 nm au moyen d'un Uniskan Titerteck (Flow Laboratories, Puteaux, France). Un appareil standard

10

contenant du RPMI sans rouge de phénol et avec 15 µl d'une solution MTT a été utilisé pour déterminer les blancs pour les mesures d'absorbance.

- 5 Les résultats sont fournis aux figures 1 et 2 dans lesquelles la figure 1 représente la toxicité et la phototoxicité de SIMO1 sur des cellules C6 laissées à incuber pendant 5 heures avec SIMO1 non irradiées ou irradiées avec un laser à diode à 52 nm à 20 jour/cm<sup>2</sup> puis  
10 traitées au MTT.

La figure 2 se distingue de la figure 1 par le temps d'incubation des cellules C6 avec SIMO1 fixé à 20 heures.

- 15 Au travers de ces figures, la molécule SIMO1 montre une activité importante in vitro avec une bonne efficacité à de faibles concentrations. Pour le traitement phototoxique, après un temps d'incubation de 5 heures, la DL<sub>50</sub> était de 1,75 µg/ml et après 20 heures d'incubation de 0,45 µg/ml.  
20 Concernant la toxicité de SIMO1, aucune toxicité n'a été détectée après 5 heures d'incubation et après 20 heures d'incubation, la DL<sub>50</sub> était de 29 µg/ml. Ces tests montrent clairement l'innocuité de SIMO1 en l'absence d'irradiation lumineuse en deçà d'une concentration proche de 20 µg/ml  
25 et, à l'inverse, sa toxicité certaine dès irradiation.

Afin de confirmer l'utilisation potentielle des composés précités pour la fabrication d'une composition photosensible administrable à un être vivant et utile comme agent apte à engendrer, sous l'effet d'une irradiation, une cytolysé ou une nécrose au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal, il a été procédé à une visualisation de la localisation in vitro de la molécule SIMO1 par imagerie par fluorescence afin de confirmer que les composés précités étaient aptes à pénétrer dans les cellules. Ainsi, des cellules C6 ont été ensemencées à 10<sup>5</sup> cellules/ml sur des lames de verre circulaire C6 après trypsinisation. Après 24 heures, des

## II

cellules ont été incubées avec SIMO1 (10 µg/ml) à 37°C pendant 3 heures et ensuite lavées dans du PBS (pH 7,2). L'analyse de la fluorescence de SIMO1 (émettant à 650 nm) a été réalisée après excitation de 450 nm à 480 nm par une lampe Xénon 150 W en utilisant une caméra vidéo noir et blanc à détection de photons très sensible (Kappa CF 8/4; Fischer Scientific S. A., France) reliée à un microscope optique (Olympus BX 40, France) équipé avec un objectif à immersion d'huile grossissant 100 fois.

10

L'intensité de fluorescence la plus forte a été localisée principalement dans le cytoplasme des cellules C6. Les images produites immédiatement après incubation pendant 3 heures avec SIMO1 démontrent clairement que les composés sont aptes à pénétrer dans les cellules.

Les tests toxiques *in vivo* ont été suivis d'essais toxiques et phototoxiques *in vivo* afin de démontrer l'intérêt des composés précités notamment sous forme de composition utile à des fins de diagnostic ou de traitement en démontrant que ces compositions, qui comprennent au moins un agent photosensible, sont aptes à induire *in vivo* lorsqu'elles sont soumises à une irradiation lumineuse et à une longueur d'onde déterminée une nécrose ou une cytolysé au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal, cette nécrose ou cytolysé étant mesurée notamment en terme de retard de croissance d'une tumeur par rapport à une tumeur témoin. Ces essais ont permis de déterminer d'une part la période de temps optimale devant être laissée entre l'injection et l'irradiation au laser, d'autre part l'efficacité de la molécule SIMO1 par comparaison avec des molécules connues, en particulier le *m*-THPC qui est un agent photosensible dérivé d'une chlorine.

Pour permettre ces conclusions, il a été procédé tel que suit : des souris Nude/Nude suisses mâles âgées de 7 à 9 semaines (plage de poids 25-35 g) ont été obtenues à partir de Iffa-Credo (L'arbresle, France).

La méthode de test est celle de la tumeur cellulaire HT29 obtenue initialement à partir d'adénocarcinome colorectal humain.

5

Des greffons de tumeur ont été obtenus comme suit : des tissus de tumeurs solides (diamètre 2 cm) ont été enlevés immédiatement après mort de la souris donneuse et ensuite mécaniquement broyés dans 1 ml d'une solution saline à 0,9 10 %. Cette solution (0,2 ml) a été injectée de manière subcutanée dans la patte arrière de chaque souris. Cette tumeur a été utilisée une semaine plus tard, quand son diamètre était de 18-20 mm. SIMO1 a été injecté intrapérinéalement dans une solution saline et 12 heures 15 plus tard la souris a été anesthésiée et la tumeur exposée à une lumière de  $300 \text{ J/cm}^{-2}$ . La longueur d'onde pour l'éclairage a été choisie entre 652-653 nm.

La source lumineuse était un laser à diode à 652 nm.

20

La densité lumineuse a été maintenue au-dessus de 0,3  $\text{W.cm}^{-2}$ , là où les effets thermiques sont indétectables. Une irradiation unique a été réalisée et le temps d'exposition a été calculé en tant que fonction du diamètre de la tumeur 25 pour obtenir une densité d'énergie de  $300 \text{ J/cm}^{-2}$  à une densité lumineuse déterminée constante.

Chaque 4-5 jours, un indice de croissance de tumeur a été mesuré en utilisant des calipers, les diamètres orthogonaux 30 principaux étant ajoutés et divisés par un facteur de 2.

Une comparaison statistique de l'indice de croissance entre les souris traitées et les souris de contrôle (sans lumière ou SIMO1) a été faite en utilisant le test de Student.

35

Toutes les conditions de traitement testées ont induit une réduction de la croissance de la tumeur comparé au groupe de contrôle non traité. Les effets les plus marquants ont

été observés pour un traitement incluant un retard de 12 heures entre une injection intrapéritonéale et une irradiation laser. 12 jours après le traitement, la croissance de la tumeur avait ralenti de 40 %. Ces résultats sont illustrés à la figure 3 dans laquelle la croissance d'une tumeur induite par HT-29 est mesurée après irradiation à  $300 \text{ J/cm}^2$  avec un laser à diode 652 nm 2 heures, 6 heures, 12 heures, 24 heures et 48 heures après injection intrapéritonéale de 5 mg/kg de SIMO1. Un groupe de contrôle n'ayant reçu aucune exposition à la lumière ou aucun agent photosensible a été constitué.

La figure 4 illustre les mêmes expériences que la figure 3 réalisées pour des groupes de souris traitées soit avec SIMO1, soit avec m-THPC et soumises à une irradiation 6 heures et 12 heures après injection intrapéritonéale de 2 mg/kg de SIMO1 ou de m-THPC. On note une activité comparable entre les deux molécules.

De nouveaux tests ont été effectués pour déterminer la période à laquelle on note une incorporation maximale des composés dans les tissus en fonction de la nature des tissus et le temps de rétention du composé par lesdits tissus. Ces essais ont été faits de manière comparative entre la molécule SIMO1 et la molécule m-THPC.

Pour ces essais, il a été procédé comme suit : des mesures fluorométriques ont été réalisées sur des souris greffées avec HT-29 à différents intervalles de temps après injection de  $2 \text{ mg/kg}^{-1}$  de m-THPC ou SIMO1. Les temps testés ont été de 1, 3, 6, 24 et 48 heures sur des souris. Les résultats sont fournis en figure 5.

Les niveaux de fluorescence ont été enregistrés dans différents tissus, à savoir le muscle, la peau et la tumeur. Les mesures ont été déterminées en utilisant une fibre optique placée directement en contact avec les tissus. Au moins quatre spectres par tissu et par souris

ont été enregistrés (au moins cinq souris ont été utilisées pour chaque condition expérimentale). Muscle, peau et tumeur ont été successivement étudiés.

- 5 Le pic de fluorescence a été observé à 650 nm. Les spectres d'émission de fluorescence de tissus de souris non traités ont été enregistrés à trois occasions séparées afin d'estimer des variations intersouris. Les valeurs d'intensité de fluorescence mentionnées à la figure 5  
10 correspondent pour chaque organe au résultat de la différence entre la valeur de fluorescence obtenue chez une souris traitée et la valeur de fluorescence enregistrée dans le groupe de contrôle. Les résultats de mesure spectrofluorométrique *in vivo* ont été exprimés en coup par  
15 seconde (unité arbitraire).

Les résultats sont fournis à la figure 5. La molécule SIMO1 montre des temps de rétention plus courts dans tous les tissus comparés à la molécule *m*-THPC. Le maximum 20 d'incorporation pour SIMO1 est noté à 6 heures après injection alors que le maximum pour *m*-THPC est atteint à 48 heures. Pour SIMO1, aucun agent photosensible n'a été détecté après 48 heures alors que pour le *m*-THPC, l'agent photosensible était encore détectable 144 heures après 25 injection. La molécule SIMO1 montre donc clairement un temps d'incorporation et un temps de rétention plus courts que les agents photosensibles connus à ce jour. Ce temps de rétention plus court permet de réduire le temps d'hospitalisation des patients, de limiter les effets 30 secondaires de tels traitements lourds chez ces derniers et d'éviter des traitements contre les radiations lumineuses puisque le médicament est éliminé rapidement de l'organisme.

- 35 Les propriétés spécifiques des composés mentionnés ci-dessus en terme de temps de rétention et de temps d'incorporation dans les tissus à traiter peuvent permettre de supposer l'intérêt desdits composés dans d'autres

applications, en particulier en tant que marqueurs pour des dispositifs d'imagerie médicale, ces marqueurs étant caractérisés en ce qu'ils contiennent comme agent de marquage fluorescent au moins l'un des composés précités.

5

Les composés précités pourront encore être retenus dans le cadre d'application à la fabrication de photopile, au moins l'une des couches constitutives de la photopile étant un composé du type précité.

10

Bien évidemment, comme il a été mentionné ci-dessus, une composition incorporant de tels composés pourra, dans le cas d'une application à des fins thérapeutiques ou de diagnostics, se présenter sous diverses formes, en particulier sous forme de comprimés, de pilules, de capsules, de granules et de poudres de solution, etc. administrables oralement. Elle pourra également se présenter sous forme d'une préparation injectable pour être administrée parentéralement ou encore sous forme de suppositoires. Elle pourra encore être préparée sous forme d'une préparation topique pouvant se présenter sous forme d'une crème, d'une poudre, d'un liquide ou autre applicable localement sur ladite zone à traiter.

25

Les doses de cet agent photosensible dépendront des symptômes, de l'âge et du sexe du patient et éventuellement d'autres facteurs, en particulier du type d'agent photosensible utilisé dans le cadre du traitement par photochimiothérapie et de la source de lumière utilisée.

30

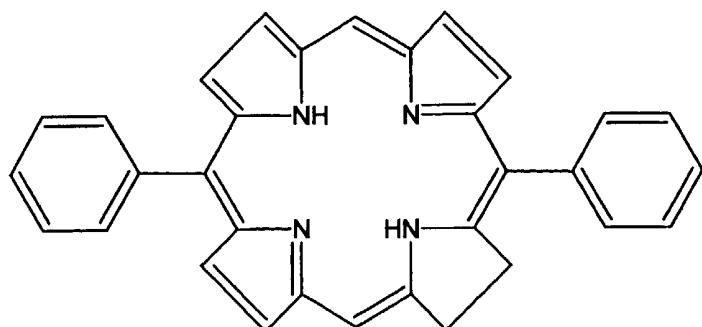
En conclusion, ces composés, qui répondent clairement aujourd'hui aux besoins exprimés dans le domaine de la photochimiothérapie, devraient à l'avenir trouver d'autres applications, notamment dans le domaine de l'imagerie médicale et celui de l'optoélectronique.

## REVENDICATIONS

1. Composé dérivé de dihydroporphyrine répondant à la formule générale (I) :

5

10



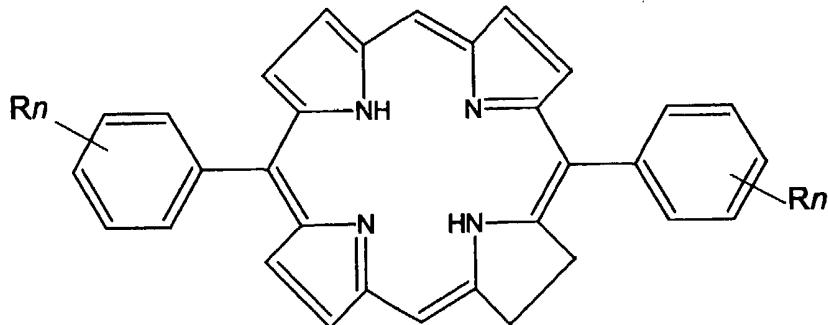
dans laquelle les groupes phényles sont substitués ou non ;  
15 ou l'un de ses sels, ou l'un de ses complexes métalliques.

2. Composé dérivé de dihydroporphyrine selon la revendication 1 répondant à la formule générale (II) :

20

dans laquelle les groupes phényles sont substitués, n est égal de 1 à 3 et chaque substituant R, qui peut être identique ou différent, et dans des positions identiques ou différentes sur son groupe phényle substitué, est un groupe hydroxy ou un groupe phosphonate ( $\text{PO}_3\text{H}_2, \text{PO}_3\text{Na}_2$ ) ou un groupe éthylphosphonate ( $\text{PO}_3\text{Et}_2$ ) ou un groupe sulfonate ou un groupe aromatique ou un groupe aliphatique.

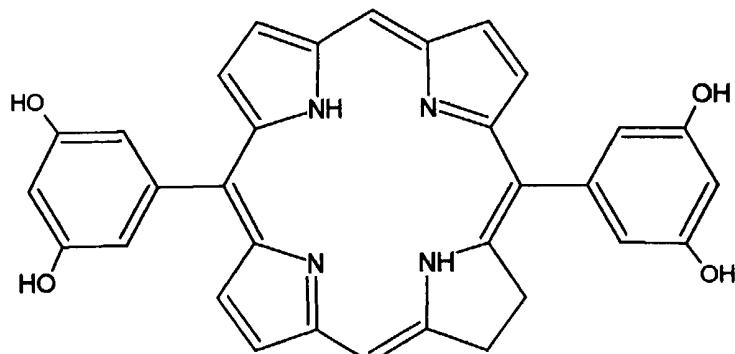
3. Composé dérivé de dihydroporphyrine selon l'une des



revendications 1 et 2,

caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (III):

5



10

4. Médicament,

caractérisé en ce qu'il consiste en un composé selon l'une des revendications 1 à 3.

15

5. Composition pharmaceutique,

caractérisée en ce qu'elle contient un composé selon l'une des revendications 1 à 3 associé à un excipient.

20 6. Composition utile à des fins de diagnostic ou de traitement du type comprenant au moins un agent photosensible apte à induire *in vitro* ou *in vivo* lorsqu'il est soumis à une irradiation lumineuse à une longueur d'onde déterminée, la nécrose ou la cytolysé au moins partielle d'au moins une zone cible du corps humain ou animal,  
25 caractérisée en ce que ledit agent photosensible est un composé selon l'une des revendications 1 à 3.

30 7. Composition selon la revendication 6,  
caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme administrable au corps humain ou animal par voie digestive ou parentérale, en particulier par injection intramusculaire ou intraveineuse ou par application transcutanée.

8. Composition selon l'une des revendications 6 et 7,

caractérisée en ce qu'elle est administrée à une dose

comprise dans la plage [0,1 mg/kg-20 mg/kg].

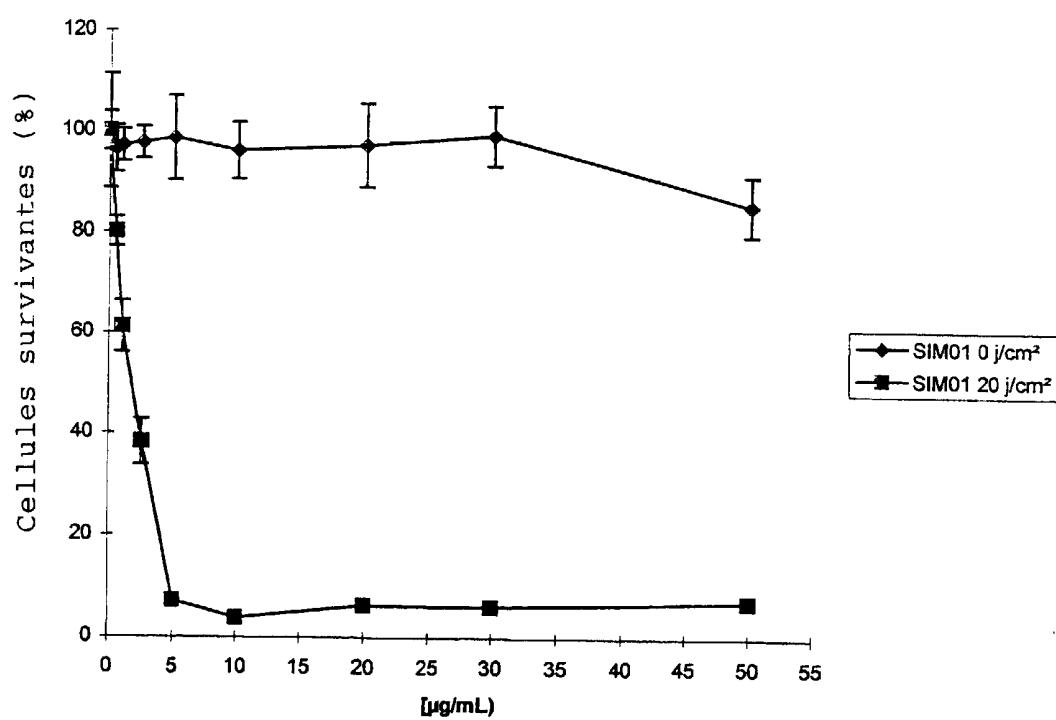
9. Marqueur pour dispositif d'imagerie médicale,  
caractérisé en ce qu'il contient comme agent de marquage  
5 fluorescent au moins un composé conforme à l'une des  
revendications 1 à 3.

10. Photopile,  
caractérisée en ce qu'au moins l'une des couches  
10 constitutives de la photopile est un composé selon l'une  
des revendications 1 à 3.

11. Utilisation des composés selon l'une des revendications  
1 à 3 pour la fabrication d'une composition photosensible  
15 administrable à un être vivant et utile comme agent apte à  
engendrer, sous l'effet d'une irradiation lumineuse, une  
cytolyse ou une nécrose au moins partielle d'au moins une  
zone cible du corps humain ou animal.

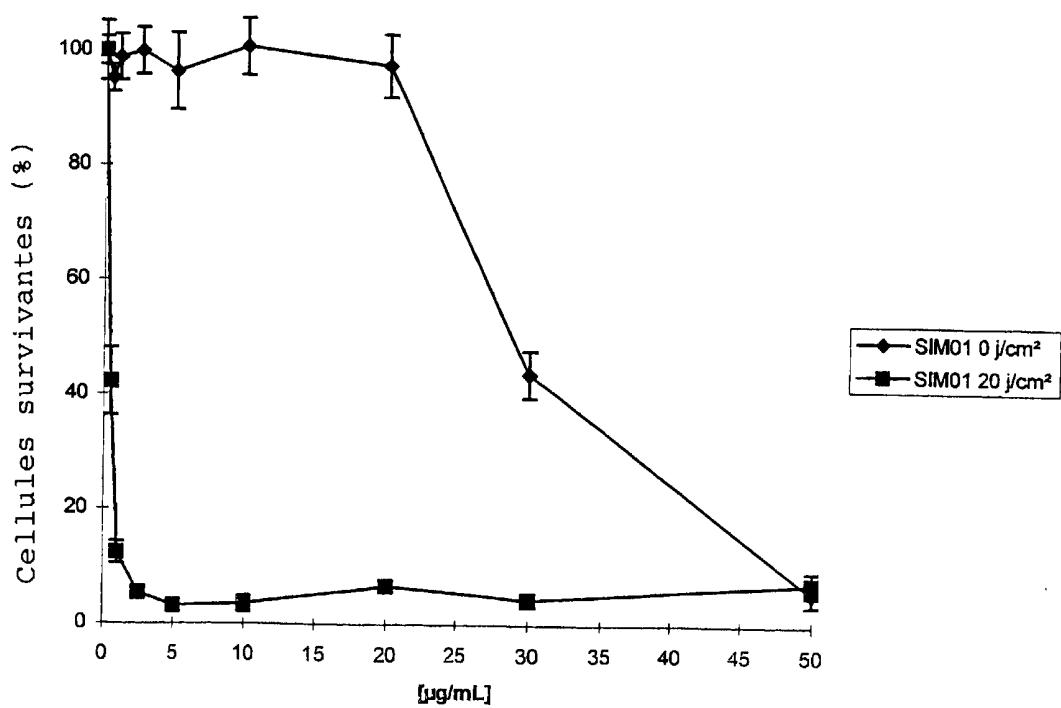
1/5

FIGURE 1



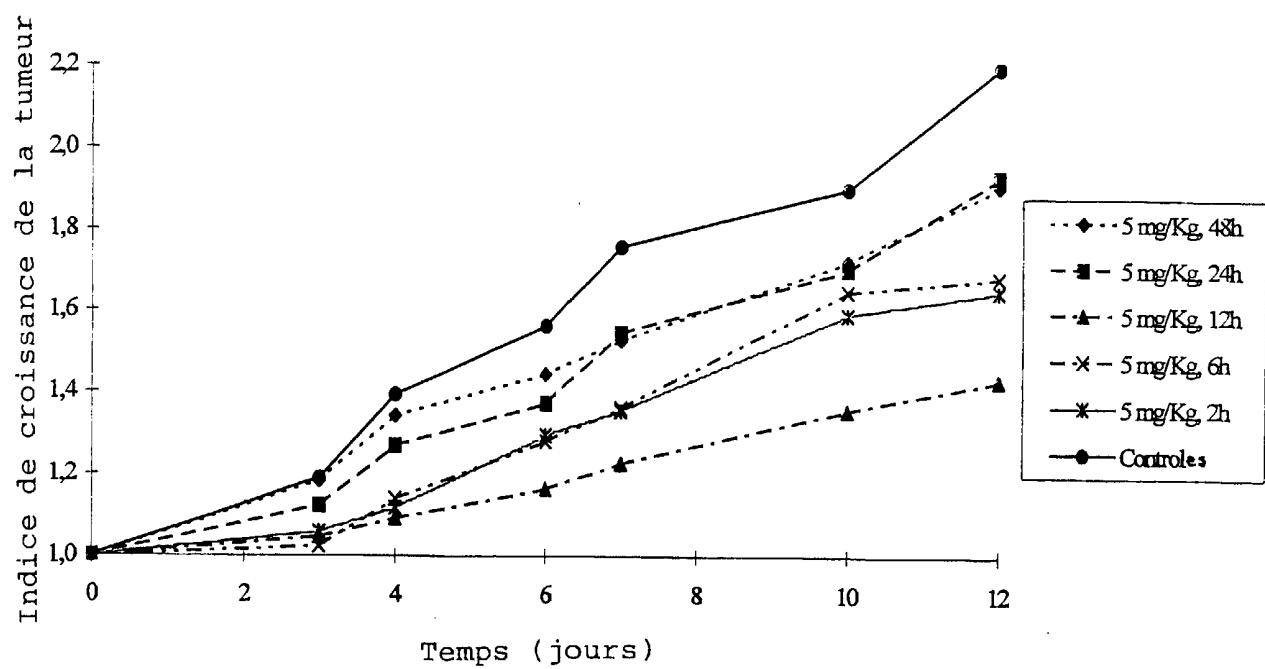
2/5

FIGURE 2



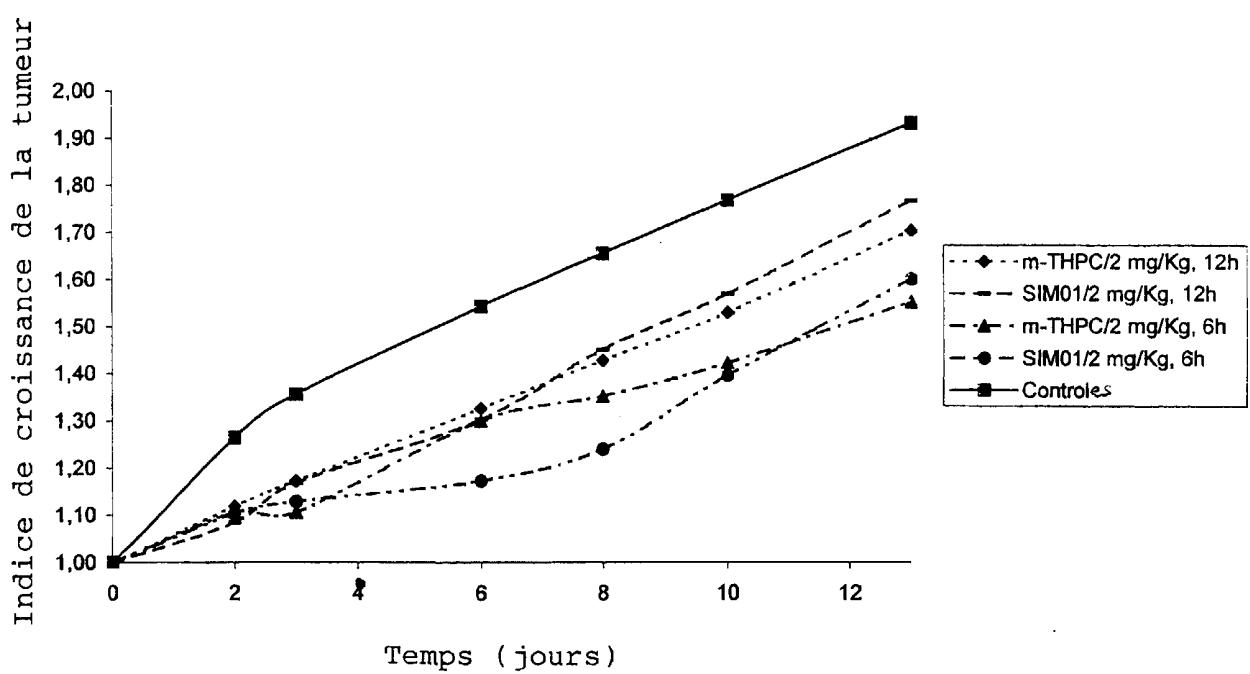
3/5

FIGURE 3



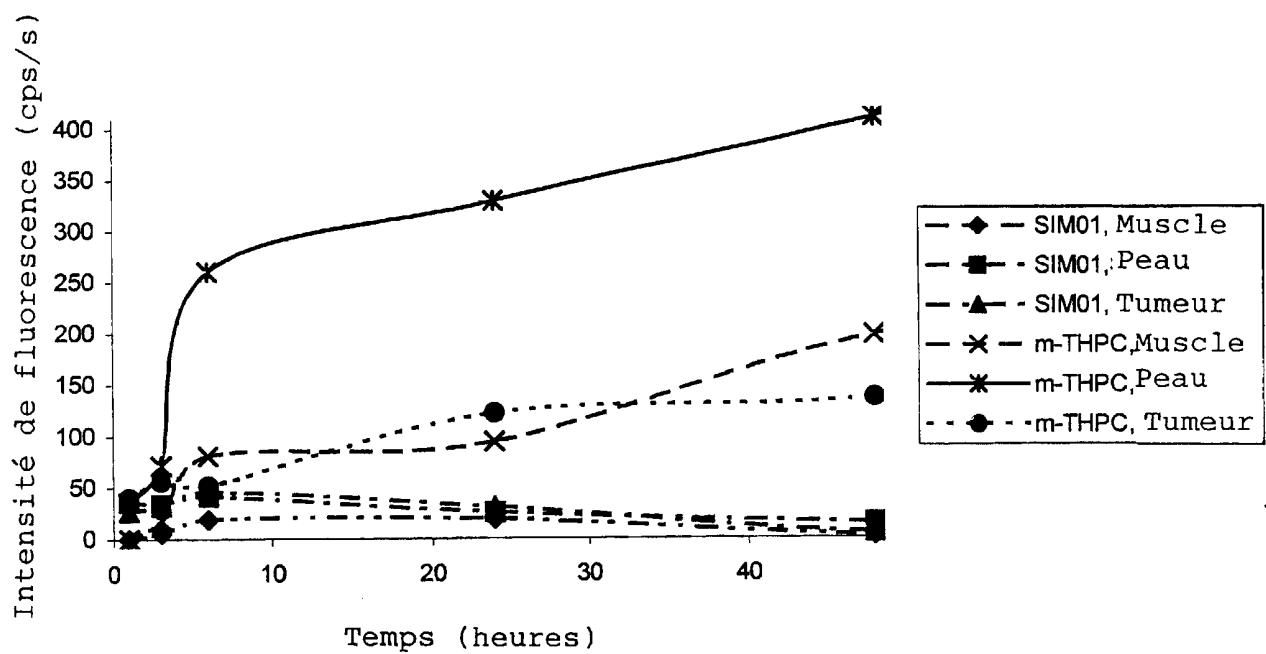
4/5

FIGURE 4



5/5

FIGURE 5



**RAPPORT DE RECHERCHE**  
**PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

<b>DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b>		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>MEHTA, GOVERDHAN ET AL:          "Cholate-interspersed          porphyrin-anthraquinone conjugates:          Photonuclease activity of large sized,          'tweezer-like' molecules"          J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1 (1999),          (15), 2177-2181 ,          XP002164715          * colonne 1, formule 1 *</p> <p>-----</p>	1,6	<p>C07D487/22          A61K31/395          A61P35/00</p> <p><b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.Cl.7)</b></p> <p>C07D          A61K          A61P</p>
1		Date d'achèvement de la recherche  4 avril 2001	Examinateur  Alfaro Faus, I
<b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	