



(43) Date de la publication internationale
30 décembre 2015 (30.12.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/197981 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 49/00 (2006.01) C07D 249/04 (2006.01)
C07D 311/04 (2006.01) A61K 47/22 (2006.01)
C07D 239/72 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/051705

(22) Date de dépôt international :
24 juin 2015 (24.06.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1456014 26 juin 2014 (26.06.2014) FR

(71) Déposants : ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE
LYON [FR/FR]; 15 Parvis Rene Descartes, BP 7000, F-
69342 Lyon Cedex 07 (FR). UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON I [FR/FR]; 43 Boulevard du 11 No-
vembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
[FR/FR]; 3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs : HASSERODT, Jens; 46 allée d'Italie, F-
69364 Lyon (FR). PROST, Maxime; 21 rue Marie-Made-
leine Fourcade, F-69007 Lyon (FR).

(74) Mandataires : SARLIN, Laure et al.; Cabinet Beau de
Loménie, 51 Avenue Jean Jaurès, BP 7073, F-69301 Lyon
Cedex 07 (FR).

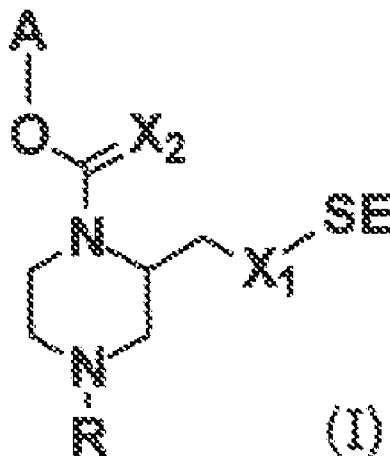
(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : WATER-SOLUBLE ACTIVATABLE MOLECULAR PROBES, INTERMEDIATES FOR THE SYNTHESIS THEREOF AND ASSOCIATED DETECTION METHODS

(54) Titre : SONDÉS MOLÉCULAIRES ACTIVABLES HYDROSOLUBLES, INTERMÉDIAIRES POUR LEUR SYNTHÈSE ET PROCÉDÉS DE DÉTECTION ASSOCIÉS



(57) Abstract : The invention relates to the probes of formula (I); in which: X₁ = NH, O or S; X₂ = O or S; SE is a labile group, which may be removed under the action of a stimulus which may in particular be the presence of an enzyme, of a chemical compound or of a physicochemical characteristic of the medium containing the probe; A is an aromatic group, which, after cleavage of the C(X₂)-O, linkage in aqueous solution, results in the release of a chromophore or a fluorophore; R is a hydrogen atom or -(L)_n-GP, in which n is equal to 0 or 1, L is a link arm, GP is a hydrosolubilizing group, and also the physiologically acceptable salts, solvates or hydrates thereof. The subject matter of the invention is also the intermediates for the synthesis thereof and the detection methods using same.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

L'invention concerne les sondes de formule (I); dans laquelle : X_1 s= NH, O ou S; X_2 = O ou S; SE est un groupe labile, qui pourra être éliminé sous l'action d'un stimulus qui peut notamment être la présence d'une enzyme, d'un composé chimique ou d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde; A est un groupe aromatique, qui après clivage en solution aqueuse de la liaison C(X_2)-O, conduit à la libération d'un chromophore ou d'un fluorophore, R représente un atome d'hydrogène ou -(L)n-GP, avec n qui est égal à 0 ou 1, L est un bras de liaison, et GP est un groupe hydrosolubilisant, ainsi que leurs sels, solvats ou hydrates, physiologiquement acceptables. L'invention a également pour objet les intermédiaires pour leur synthèse et procédés de détection les mettant en œuvre.

SONDES MOLECULAIRES ACTIVABLES HYDROSOLUBLES, INTERMEDIAIRES POUR LEUR SYNTHÈSE ET PROCÉDES DE DÉTECTION ASSOCIÉS

L'invention concerne des sondes moléculaires activables utiles dans le domaine du diagnostic, incorporant un bras espaceur, qui en réponse à un stimulus qui peut notamment être la présence d'une enzyme, d'un composé chimique ou une caractéristique physicochimique dans lequel se trouve la sonde, va s'auto-effondrer pour libérer une entité détectable du type fluorophore ou chromophore.

Dans l'analyse d'un échantillon biologique ou chimique, la détection d'une activité enzymatique peut être très utile. Les organismes entiers, les cellules ou les extraits cellulaires, les liquides biologiques ou les mélanges chimiques sont des exemples d'échantillons biologiques ou chimiques dans lesquels une activité enzymatique peut être détectée. Les enzymes constituent de nombreux biomarqueurs de diverses pathologies. Elles sont impliquées aussi dans de nombreux processus cellulaires et font donc l'objet d'études innombrables de la part des biologistes cellulaires. Ainsi, leur détection peut donner des informations concernant un état métabolique ou morbide particulier, par exemple. De ce fait, des sondes capables de détecter une activité enzymatique sont très utiles et ont fait l'objet de nombreux travaux.

On peut notamment citer les travaux de l'un des inventeurs de la présente demande de brevet correspondant aux demandes WO 2013/045854 qui concerne des substrats de peptidases et WO 2014/020285 qui concerne des substrats de glycosidases qui utilisent un espaceur auto-effondrable reliant un substrat de l'enzyme d'intérêt à un groupe aryle entraînant, après clivage du substrat, la cyclisation de l'espaceur et la libération d'un fluorophore ESIPT (fluorophore conduisant à un transfert de proton intramoléculaire dans un état excité, nommé ESIPT pour « Excited State Intramolecular Proton Transfer »).

Or, une bonne solubilité aqueuse des sondes moléculaires répondant à une activité enzymatique est un des critères essentiels pour s'assurer de la fiabilité des résultats qu'elles délivrent. En effet, l'ajout de co-solvant

organique pour dissoudre une molécule hydrophobe diminue généralement l'activité des enzymes de manière importante. De plus, alors que l'utilisation de solutions faiblement concentrées est acceptable pour certains tests *in vitro*, le passage à des incubations cellulaires ou des injections systémiques *in vivo* requiert l'utilisation de solutions à des concentrations bien plus élevées car elles vont être diluées de manière importante une fois injectées. De plus, l'utilisation d'un co-solvant *in vivo* est exclue. Enfin, une molécule trop hydrophobe risque de s'accumuler dans les tissus adipeux, et non pas dans les tissus ciblés.

10 Cette question de solubilité est donc depuis longtemps une préoccupation pour les chimistes et plusieurs solutions ont été développées. La première a été d'incorporer des groupements ayant un caractère salin en tant que substrats enzymatiques. Cette solution, telle que rencontrée dans des sondes pour phosphatase (Haugland et al. *Anal. Biochem.* **1992**, 207, 15 32) ou caspase-3 (Liu et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 17972) par exemple, fonctionne très bien mais elle limite le choix des enzymes visées puisque celles qui reconnaissent des substrats apolaires ne peuvent être ciblées. De plus, les molécules chargées négativement traversent difficilement la membrane cellulaire ce qui limite donc l'application au ciblage d'enzymes extracellulaires. Une seconde solution est le greffage de 20 groupements hydrosolubilisants sur le signalophore utilisé, souvent des groupements sulfonates (Tung et al. *Tetrahedron* **2006**, 62, 578 ; Shabat et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10960). Encore une fois, l'hydrosolubilisation apportée par ces motifs est excellente, mais cette 25 mesure est peu attractive car elle risque d'abaisser les performances du signalophore une fois relâché de la sonde initiale suite à l'activité enzymatique. De plus, une telle solution est tout simplement inenvisageable lorsque l'on veut employer des signalophores à l'état solide. Ces deux possibilités ne sont donc pas généralisables au plus grand nombre de sondes 30 moléculaires répondant à une activité enzymatique.

A ce jour, il n'existe que très peu de systèmes qui permettent l'association versatile d'une espèce hydrosolubilisante à un substrat

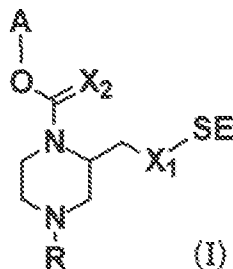
enzymatique dans le but de relarguer une molécule optiquement active. Ceux-ci sont généralement basés sur un espaceur éliminant substitué (Shabat et al. *J. am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5434) ou sur une combinaison d'un espaceur cyclisant et d'espaceurs éliminants (Shabat et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7318). Le problème est que les espaceurs éliminants substitués sont connus pour produire des intermédiaires réactionnels hautement toxiques (Rokita, *Quinone Methides*, 1^{ère} éd. **2009**, John Wiley and Sons Inc. ; Bolton et al. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 323 ; Thatcher et al. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1820). D'autre part, la combinaison cyclisation/élimination est loin d'être idéale car elle introduit une forte complexité (nécessité d'utiliser deux espaceurs en série) tout en démontrant des cinétiques d'effondrement qui sont loin d'être satisfaisantes (Wu et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3465), ou bien une instabilité face à l'hydrolyse spontanée non négligeable (Romieu et al. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1517). Certaines constructions livrent leur molécule active en plusieurs dizaines d'heures (Shabat et al. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1432), ce qui les rend difficilement utilisables pour détecter rapidement la présence ou l'absence de certains analytes dans un échantillon donné.

Il est donc souhaitable de développer une nouvelle génération d'espaceurs cyclisant permettant l'incorporation versatile de n'importe quel substrat enzymatique, qu'il soit polaire ou apolaire, et qui répondent aux exigences de solubilité. Néanmoins, cet espaceur devra garder une cinétique d'effondrement rapide et devra permettre une reconnaissance enzymatique efficace.

Dans le cadre de l'invention, les inventeurs proposent une nouvelle génération de sondes qui, d'une part, offre une solubilité dans l'eau satisfaisante et, d'autre part, sont facilement synthétisables et modulables, du fait de la présence d'un groupe pipérazine dont l'un des atomes d'azote peut porter divers groupes hydrosolubilisants. Les inventeurs ont choisi de proposer une solution qui incorpore une partie hydrosolubilisante sur une 3^{ème} composante de la sonde, à savoir dans un espaceur reliant le

signalophore et le substrat ce qui permet de choisir à volonté n'importe quel substrat enzymatique et n'importe quelle molécule rapportrice.

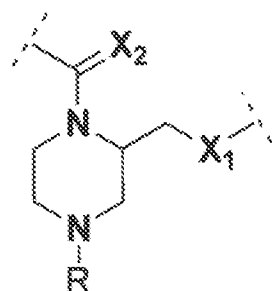
Les sondes selon l'invention répondent à la formule (I) :



5 dans laquelle :

- X_1 = NH, O ou S,
 - X_2 = O ou S,
 - SE est un groupe labile, et en particulier un substrat enzymatique,
 - A est un groupe aromatique, qui après clivage en solution aqueuse de
10 la liaison C(X_2)-O conduit à la libération d'un chromophore ou d'un fluorophore,
 - R représente un atome d'hydrogène ou $-(L)n-GP$, avec n qui est égal à 0 ou 1,
 - L est un bras de liaison,
 - 15 - GP est un groupe hydrosolubilisant,
- ainsi que leurs sels, solvats ou hydrates, physiologiquement acceptables.

La présente invention permet de détecter un analyte chimique ou enzymatique capable de cliver la liaison X_1-SE , par la détection du chromophore ou fluorophore qui va être libéré suite à la cyclisation de
20 l'espaceur du type pipérazinyle de formule :

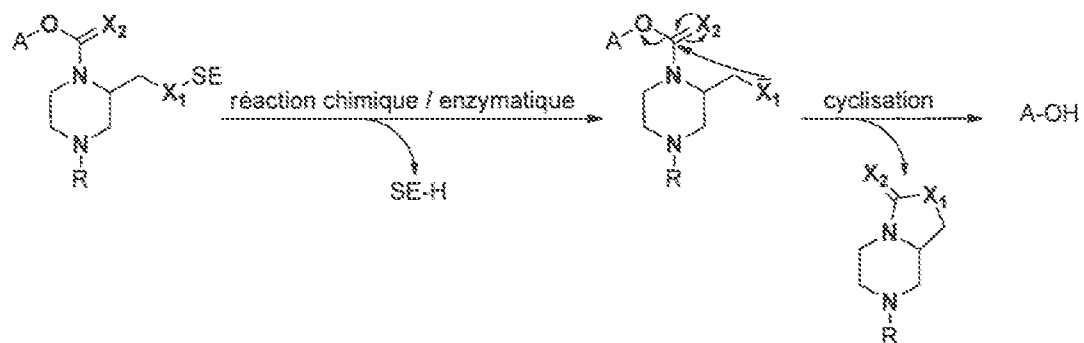


Le substrat selon l'invention agit comme une sonde moléculaire capable de révéler la présence d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé

chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde (notamment un changement de pH). Quand la sonde est modifiée chimiquement par ledit stimulus, elle se fragmente *via* une réaction en cascade pour libérer un chromophore ou fluorophore détectable. Il est possible que le groupement **A** se comporte également comme un chromophore ou un fluorophore lorsqu'il est lié au reste de la molécule dans les sondes de formule (I). Dans ce cas de sondes « ratiométriques », ses propriétés spectrales, et en particulier ses propriétés d'absorbance et/ou de fluorescence seront différentes de l'entité libérée sous l'action d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde. De manière avantageuse mais non obligatoire, le groupement **A** pourra être choisi, de manière à ce que la sonde de formule (I) ne soit pas détectable par absorption ou émission de lumière, avant de rencontrer le stimulus, sous la forme notamment d'une enzyme, d'un composé chimique ou d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, (c'est-à-dire que la sonde est dite « furtive »).

Le groupe labile **SE** est tel que son élimination, par exemple par voie enzymatique ou consécutivement à une action purement chimique (telle qu'une variation de pH ou la présence d'un agent réducteur), assure, par réarrangement intra-moléculaire de l'espaceur auto-effondrable, une libération du fluorophore ou chromophore, notamment sous la forme **A-OH** ou **A-O⁻**, ou **A'=O** (**A'=O** étant une forme obtenue après réarrangement de **A-OH**, une forme tautomérique ou polymérisée de **A-OH**). Le clivage de la liaison **SE-X₁** déclenche la libération du fluorophore ou chromophore, notamment sous **A-OH** ou **A-O⁻**, ou **A'=O** (**A'=O** étant une forme obtenue après réarrangement de **A-OH** ou **A-O⁻**, une forme tautomérique ou polymérisée de **A-OH**), par cyclisation de l'espaceur comme illustré sur le **Schéma 1** ci-dessous :

Schéma 1



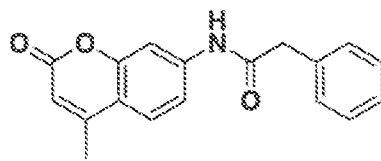
La sonde est composée de quatre composants moléculaires i) un espaceur intelligent qui porte, à une extrémité, ii) un groupe labile **SE** et, à l'autre, iii) un groupe organique **A-O** relié par un groupement carbamate ou thiocarbamate de l'espaceur qui, quand il est libéré par fragmentation du conjugué espaceur-**A-O**, pour donner le composé énolique ou énolate correspondant, conduit à la formation d'un chromophore ou fluorophore détectable, iv) un groupement hydrosolubilisant.

Dans le cadre de l'invention, la présence de l'atome d'azote porteur du groupement **R** permet de moduler les propriétés de la sonde et d'introduire une troisième fonctionnalisation, à côté du groupe labile **SE** et du groupe **A** conduisant, après élimination du groupe **SE** et à la cyclisation de l'espaceur, à la libération d'un chromophore ou fluorophore détectable.

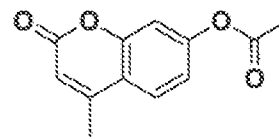
En effet, les sondes de formule (I) selon l'invention comportent un espaceur de type pipérazine multifonctionnalisable qui permet l'incorporation d'un large choix de substrats enzymatiques, et d'un groupe annexe **R** qui permettra, en fonction de sa nature, de rendre la molécule encore plus hydrosoluble. La présence de l'atome d'azote, permet à partir d'un même intermédiaire de synthèse de conduire à différentes fonctionnalisations **R** hydrosolubilisantes.

De plus, les sondes selon l'invention présentent une solubilité améliorée, par rapport à leurs homologues comprenant un espaceur du type pipéridinyle, exemplifiés dans les demandes WO 2013/045854 et WO 2014/020285 et par rapport aux réactifs commerciaux ne comprenant pas du

tout d'espaceur tels que la 4-méthyl-7-(phénylacétamido)coumarine ou l'acétate de 4-méthylumbelliferyle par exemple :



4-méthyl-7-(phenylacetamido)coumarine



4-méthylumbelliferyl acetate

Par ailleurs, comme dans le cas des demandes WO 2013/045854 et WO 2014/020285, la sonde comporte un espaceur pré-organisé pour sa cyclisation après clivage de la liaison **SE-X₁** qui accélère le processus d'auto-effondrement de l'espaceur, tout en assurant une bonne reconnaissance enzymatique. Or, il n'était nullement évident qu'avec la modification de l'espaceur opérée dans le cadre de l'invention dans laquelle des groupements sont introduits pour augmenter l'hydrosolubilité, il n'y ait pas d'impact sur l'activité rapportrice des sondes. Or, dans le cadre de l'invention, il a été démontré que l'introduction d'une charge ou l'augmentation de l'encombrement stérique au niveau du groupe **R**, et donc sur une position proche du site d'action du stimulus (ie. une enzyme, un composé chimique ou une variation d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, en fonction de la nature du groupe **SE**), ne modifiait pas la réaction obtenue sous l'action du stimulus correspondant.

La présente invention concerne donc les composés de formule (I), quelle que soit leur variante de mise en œuvre décrite dans la présente demande de brevet, pour la détection *in vivo*, chez l'homme ou l'animal, *in vitro*, *in cellulo* ou *ex vivo*, d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, dont la présence entraîne le clivage de la liaison **SE-X₁**.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé *in vitro* pour détecter, au moyen d'une sonde de formule (I) selon l'invention, la présence d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, dont la présence entraîne le clivage de la liaison **SE-X₁**. Plus précisément,

l'invention concerne un procédé pour détecter la présence d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, dont la présence entraîne le clivage de la liaison **SE-X₁**, comprenant les étapes de :

- 5 - mise en contact d'un échantillon suspecté de contenir ledit composé chimique ou ladite enzyme ou de présenter ladite caractéristique physicochimique avec une sonde de formule (I) selon l'invention ;
- l'application de conditions appropriées pour permettre le clivage de la liaison covalente entre **X₁** et **SE**, sous l'action dudit stimulus, qui est suivi
- 10 d'un clivage de la liaison C-O entre l'atome de carbone porteur de l'atome (**X₂**), et l'atome d'oxygène porteur du groupement A suite à une cyclisation de l'espaceur présent dans la sonde de formule (I), et
- analyse quantitative ou qualitative du chromophore ou fluorophore libéré.

- 15 L'échantillon pourra être tout échantillon biologique approprié. Il pourra s'agir notamment d'un prélèvement de fluide biologique, notamment un échantillon de sang total, de sérum, plasma, urine, d'un prélèvement tissulaire ou de cellules isolées, et en particulier d'un milieu cellulaire. Ce prélèvement peut être utilisé tel quel, ou bien être soumis avant mise en
- 20 présence de la sonde, à une préparation de type enrichissement ou culture, bien connue de l'homme de l'art.

- De manière avantageuse, les composés de formule (I) se comportent comme des sondes fonctionnant selon un mode éteint/allumé, c'est-à-dire qu'avant clivage par le stimulus (ie. une enzyme, un composé chimique ou
- 25 une variation d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, en fonction de la nature du groupe **SE**), la sonde est « invisible ». Il est également possible de choisir le groupement **A**, de manière à obtenir des propriétés spectrales différentes entre i) le groupement libéré après clivage de la liaison C-O entre l'atome de carbone
- 30 porteur de l'atome (**X₂**) et l'atome d'oxygène porteur du groupement A et ii) la sonde de formule (I).

En particulier, le procédé de détection selon l'invention peut être mis en œuvre dans des conditions physiologiques, notamment dans un milieu aqueux tamponné à un pH appartenant à la gamme allant de 4 à 9, et notamment à un pH de l'ordre de 7,4.

5 Dans un mode de réalisation de l'invention, un fluorophore est libéré et son analyse comprend les étapes suivantes :

- exposition du fluorophore à une source lumineuse capable de produire une lumière à une longueur d'onde d'absorption du fluorophore ; et
- détection de la fluorescence résultante.

10 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, un chromophore est libéré et son analyse comprend les étapes suivantes :

- exposition du chromophore à une source lumineuse capable de produire une lumière à une longueur d'onde d'absorption du chromophore ; et
- 15 - détection de la lumière absorbée par le chromophore.

Dans le cas où un chromophore est libéré, on détectera un changement de couleur suite à l'action du stimulus (ie. une enzyme, un composé chimique ou une variation d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, en fonction de la nature du groupe **SE**).

20 De manière préférée, mais non nécessaire, le fluorophore ou le chromophore libéré, en particulier sous la forme **A-OH** ou **A-O⁻**, ou **A'=O** (**A'=O** étant une forme obtenue après réarrangement de **A-OH** ou **A-O⁻**, une forme tautomérique ou polymérisée de **A-OH**), forme un précipité en solution aqueuse.

25 L'invention va maintenant être décrite de manière plus détaillée.

Définition des groupes labiles SE

SE est un groupe labile, éliminable en solution aqueuse sous l'action d'un stimulus qui peut notamment être la présence d'une enzyme, d'un composé chimique ou d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde. L'élimination de **SE** peut notamment se faire en milieu aqueux. A titre d'exemple d'une propriété physicochimique, on peut

30 citer une variation de pH, ou la variation du potentiel redox, la dernière

clivant les ponts disulfures présents notamment dans les cas où $X_1 = S$. De manière préférée, notamment dans les cas où $X_1 = NH$ ou O , le groupe labile **SE** est susceptible à un composé chimique (un réactif cible) ou une enzyme. Une enzyme est définie comme une protéine naturelle qui catalyse une
5 réaction chimique.

De manière préférée, le groupe labile **SE** assure la reconnaissance d'une cible (composé chimique ou enzymatique, paramètre physico-chimique du milieu), et notamment d'une enzyme, sélectivement localisée dans un tissu ou dans un type de cellules visé.

10 Les groupements **SE** ont la caractéristique de pouvoir être clivés du reste de la molécule sous l'action d'un stimulus qui peut notamment être la présence d'une enzyme, d'un composé chimique ou d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde. Dans le cas où **SE** est un substrat enzymatique, l'enzyme joue alors le rôle de catalyseur de la
15 coupure entre **SE** et l'atome X_1 auquel il est lié. Une telle coupure est la conséquence d'une hydrolyse en milieu aqueux pour laquelle l'enzyme va jouer le rôle de catalyseur. Bien que dans ce cas également, la coupure mette en jeu une hydrolyse, on parlera de clivage sous l'action d'une enzyme qui est catalytiquement active pour la réaction d'hydrolyse.

20 Le choix de X_1 sera adapté en fonction du groupe **SE**, et notamment du substrat d'enzyme sélectionné, de manière à obtenir le clivage souhaité. En particulier, X_1 sera un oxygène dans le cas où **SE** sera un substrat d'estérase, de glycosidase, de phosphatase, de sulfatase, ou de glucuronidase, X_1 sera NH dans le cas où **SE** sera un substrat de protéase,
25 notamment d'amidase, ou de transférase et X_1 sera un soufre dans le cas où X_1 -**SE** sera un pont disulfure qui sera clivé par un agent réducteur.

En particulier, l'homme du métier, en fonction de l'application visée pour les sondes selon l'invention, pourra choisir un substrat pour au moins une enzyme choisie parmi les estérases telles que les carboxylestérases ou
30 les lipases ; les alcaline-phosphatases ; les glucuronidases telles que la β -glucuronidase ; les glycosidases ; les protéases telles que les métalloprotéases; les peptidases et les amidases.

Le groupement **SE** sera, de préférence, choisi de manière à être spécifique d'une enzyme d'intérêt. En revanche, certaines enzymes ont la capacité de cliver un ensemble de groupements **SE** différents ; parmi elles, on peut citer la hexosaminidase, et les estérases.

- 5 De tels substrats d'enzyme seront notamment choisis parmi les groupes glycosyle liés par leur carbone anomérique au reste de la molécule, des acides gras liés par leur fonction acyle au reste de la molécule, les groupes peptidyle liés au reste de la molécule par une fonction acyle portée par leur carbone terminal ou par un chaînon latéral, ou un groupe sulfonyl formant
10 un sulfonamide avec **X₁** qui représente alors NH.

En particulier, **SE** peut être un substrat de glycosidase, et notamment de galactosidase et correspondre à groupement glycosyle lié par son carbone anomérique au reste de la molécule.

- Par « glycosidase », on entend une enzyme glycoside hydrolase qui a la
15 capacité de catalyser l'hydrolyse de liaisons glycosidiques, de manière à libérer au moins un composé osidique.

- Par groupe « glycosyle », on entend tout sucre, mono ou poly-saccharide lié au reste de la molécule par un lien glycosyle, c'est-à-dire *via* son carbone anomérique. Le carbone anomérique peut adopter la
20 configuration alpha ou beta. A titre d'exemple de groupe **SE**, on peut citer les groupements mono-glycosyle, c'est-à-dire formé d'une seule unité saccharidique et poly-glycosyle, c'est-à-dire formé de plusieurs unités saccharidiques identiques ou différentes. Les unités saccharidiques peuvent être notamment du type hexose ou pentose, et choisies parmi le galactose,
25 le glucose, le mannose, le gulose, l'allose, l'altrose, l'idose, le talose, le fucose, le fructose, l'arabinose, le lyxose, le ribose et le xylose, par exemple. Les unités saccharidiques peuvent être de stéréochimie L ou D. Tous les groupements glycosyle possibles constituant des substrats de glycosidase peuvent être utilisés en tant que **SE**. Les unités glycosyle peuvent être
30 fonctionnalisées ou non, notamment avec un groupement acétyl ou amino. Les N-acétylhexosamines sont des exemples de groupe glycosyle. Le plus souvent, le groupe **SE** comprendra de 1 à 50 unités saccharidiques. Dans le

cas d'un polyglycosyle, il pourra s'agir d'un homopolymère ou d'un copolymère avec une structure aléatoire, alternée ou bloc.

Des exemples de tels groupes **SE** se comportant comme des substrats de glycosidase sont donnés ci-après : les groupements mono-glycosylés choisis parmi le galactosyle, le glucosyle, le mannosyle, le gulosyle, l'allosyle, l'altrosyle, l'idosyle, le talosyle, le fucosyle, le fructosyle, l'arabinosyle, le lyxosyle, le ribosyle, le xylosyle, le glucuronyle et le N-acétyl-hexosaminye et les groupements polyglycosylés constitués de plusieurs (notamment 2 à 20, de préférence de 3 à 10, et plus particulièrement de 4 à 6) de ces groupements monoglycosylés identiques ou différents.

A titre d'exemples d'enzyme glycosidase qui peuvent être ciblés par les sondes selon l'invention, on peut citer la N-acétyl- β -galactosaminidase ; la N-acétyl- β -glucosaminidase ; la α -amylase ; la α -arabinofuranosidase ; la α -arabinosidase ; la β -cellobiosidase ; la β -chitobiosidase ; la α -galactosidase ; la β -galactosidase ; la α -glucosidase ; la β -glucosidase ; la β -glucuronidase ; la α -maltosidase ; la α -mannosidase ; la β -mannosidase ; la β -xylosidase ; la β -D-fucosidase ; la α -L-fucosidase ; la β -L-fucosidase ; la L-iduronidase et la cellulase (Orenga, S., James, A. L., Manafi, M., Perry, J. D., & Pincus, D. H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2), 139–155).

SE peut également être un substrat de galactosidase, et en particulier de la β -galactosidase, de l'induronidase, de la glucosidase, de la N-acétyl-D-glucosaminidase, de la N-acétyl-D-galactosaminidase, de la mannosidase, de la fucosidase ou de la glucuronidase, notamment de la β -glucuronidase.

Des exemples de tels groupes **SE** se comportant comme des substrats de galactosidase sont donnés ci-après : les groupements mono-glycosylés choisis parmi le D-glucuronyle, le L-iduronyle, le D-glucopyranosyle, le D-galactopyranosyle, le N-acétyl-D-glucosaminye, le N-acétyl-D-galactosaminye, le D-mannopyranosyle, le L-fucopyranosyle et les groupements polyglycosylés constitués de plusieurs (notamment 2 à 20, de préférence de 3 à 10, et plus particulièrement de 4 à 6) de ces groupements monoglycosylés identiques ou différents.

SE peut aussi être un substrat d'estérase, notamment de lipase. Dans ce cas, **SE** est un groupe acyle, lié par sa fonction C(O) au reste de la molécule. En particulier, **SE** peut être -C(O)R_i avec R_i qui représente, par exemple, un groupe alkyle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, alcényle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, un groupe benzyle, aryle ou hétéroaryle.

SE peut aussi être un substrat d'une protéase ou d'une peptidase, notamment un substrat de cathepsine ou de métalloprotéase, notamment de la PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen).

Dans ce cas, **SE** est un groupe peptidyle ou aminoacide lié par une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral au reste de la molécule.

Par groupe « peptidyle », on entend un enchaînement d'au moins deux acides aminés liés entre eux par une liaison peptidique. Dans le cadre de l'invention, le ou les acides aminés présents dans **SE** peuvent être des acides aminés naturels ou non, mais seront, de préférence, choisis parmi les 20 acides aminés naturels (= protéinogéniques), éventuellement sous une forme salifiée ou protégée. La fonction N-terminale de l'acide aminé terminal pourra éventuellement être salifiée ou fonctionnalisée. A titre d'exemple de forme salifiée, on peut citer la forme chlorhydrate, tosylate ou trifluoroacétate.

Tous les groupes peptidyle ou aminoacides possibles constituant des substrats de peptidases peuvent être utilisés en tant que groupe **SE**. Les aminoacides peuvent être fonctionnalisés ou non, en particulier sur l'extrémité N-terminale de **SE**. Selon des modes de réalisation particuliers, le résidu peptidyle **SE** a au plus 10 aminoacides qui peuvent être identiques ou différents. Les aminoacides du résidu peptidyle **SE** sont, de préférence, choisis parmi les aminoacides naturels. Néanmoins, l'extrémité N-terminale de l'acide aminé ou du groupe peptidyle peut être fonctionnalisée avec un groupe acyle -COR₀, R₀ étant un groupe (C₁-C₆)alkyle ou un groupe -O-(C₁-C₆)alkyle. La fonctionnalisation possible de l'extrémité N-terminale d'une sonde donnée avec un groupe acyle (R₀CO-) provient du fait que certaines

endoprotéases n'interagiront pas avec un substrat ayant un groupe amino libre à son extrémité. Aussi, cette fonctionnalisation N-terminale sera préférée dans le cas où **SE** représente un groupe peptidyle, alors que dans le cas où **SE** représente un acide aminé, sa fonction N-terminale sera libre, ou de préférence salifiée sous la forme d'un ammonium. La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) au moyen de groupes protecteurs de carbamate (qui constituent aussi des groupes "acyle" dans ce contexte) permet souvent de synthétiser plus simplement une sonde présentant un carbamate à cette extrémité N-terminale. Dans le cas des amino-peptidase, on préférera utiliser un groupe **SE** qui représente un acide aminé, alors que dans le cas des endopeptidases, on préférera utiliser un groupe **SE** qui représente un groupe peptidyle.

A titre d'exemples, les groupes peptidyle suivants peuvent être cités : Leu (pour la leucine aminopeptidase), Ser-Gln-Asn-Tyr (la partie N-terminale de la séquence de clivage préférée de la peptidase du VIH-1), Asp-Glu-Val-Asp- (pour la caspase 3), His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln (pour l'antigène spécifique à la prostate « PSA ») où l'extrémité N-terminale peut être libre ou être substituée par un groupe acyle $-COR_0$, R_0 étant un groupe (C_1-C_6) alkyle ou un groupe $-O-(C_1-C_6)$ alkyle (par exemple un groupe $-COMe$).

Le groupe peptidyle ou aminoacide est choisi pour son adéquation avec la sélectivité de séquence connue de la peptidase ciblée, qui le reconnaîtra. Le groupe peptidyle ou aminoacide peut être choisi pour l'action préférée qu'une peptidase impliquée dans certaines maladies va avoir sur ce dernier, comme présenté, notamment, dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Exemples de peptidases qui peuvent servir de biomarqueurs pour des phénomènes biologiques ou des maladies pendant l'imagerie

Peptidase	Classe	Fonction	Maladie
Leucine aminopeptidase	Zinc	Maturation post-protéasomale de peptides présentés de classe I	-
Caspase-3	Cys	Apoptose	Cancer
Peptidase de VIH-1	Asp	Réplication de VIH	SIDA
Rénine	Asp	Production d'angiotensine I	Hypertension
Thrombine	Ser	Coagulation sanguine	Infarctus du myocarde
Tryptase	Ser	Phagocytose	Asthme
Cathepsine K	Cys	Résorption osseuse	Ostéoporose
ACE	Zinc	Production d'angiotensine II	Hypertension
Plasmeptines I et II	Asp	Dégradation de l'hémoglobine	Malaria
β -Secrétase	Asp	Synthèse d'amyloïde β	Maladie d'Alzheimer
PSA (kallikrein III)	Ser	Liquification de l'éjaculat de sperme	Cancer de la prostate

SE peut aussi être un substrat d'amidase, catalyseur de l'hydrolyse de liaisons amides non peptidiques, notamment un substrat des pénicilline amidases, d'hydrolase d'amide d'acides gras, ou encore des malonamidases.

SE peut aussi être un substrat de transférase, catalyseur du transfert de groupement fonctionnel d'un substrat à un autre, notamment un substrat des transaminases, ou de la glutathione transférase ou de la gamma-glutamyl/transférase. Dans ce cas, **SE** correspond à un groupe peptidyle ou aminoacide lié par une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral ou un groupe sulfonyl formant un sulfonamide avec X_1 qui représente alors NH.

Les substrats de protéases sont bien connus et notamment décrits dans le « *Handbook of proteolytic enzymes* » (Ralings et Salvesen, **2013**, 3^{ème} édition, Elsevier Ltd) et dans la base de donnée MEROPS accessible en ligne

(<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>, Bateman et al. Nucleic acid res. **2014**, 42, D503), auquel on pourra se référer pour plus de détails.

SE peut aussi être un substrat réagissant avec un composé chimique, et notamment un groupe formant un pont disulfure avec **X₁** qui est un atome de soufre qui sera réduit/clivé par un agent réducteur, notamment par le dithiothréitol ou par la cystéine présent dans l'échantillon à analyser, ou un substrat réagissant par clivage d'une liaison labile en milieu acide lors de l'acidification de l'échantillon analysé et notamment un groupe formant une liaison acétale avec **X₁** qui est un atome d'oxygène, tels que des groupements **SE** correspondant à méthyloxyméthyle ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$), méthyloxyéthyle ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), méthyloxyphényl ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Ph}$), méthyloxyallyle ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Allyl}$).

Définition des groupes A

A est un groupement aromatique qui après clivage de la liaison **CX₂-O** permet la formation d'un chromophore ou fluorophore. Ce chromophore ou fluorophore peut correspondre directement au composé libéré **A-OH** ou à sa forme **A-O⁻** qui se forme en solution aqueuse, ou à un composé résultant d'une réaction post-clivage du composé **A-OH** ou **A-O⁻** libéré telle qu'une dimérisation ou à un composé résultant d'un réarrangement post clivage du composé **A-OH** ou **A-O⁻**, par exemple pour conduire à une forme tautomérique. Un tel composé sera nommé **A'=O**.

Par « groupe aromatique », on entend un groupe comprenant un ou plusieurs cycles aromatiques substitués ou non substitués, lesdits cycles pouvant comprendre un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et/ou un ou plusieurs atomes de carbone sous la forme d'un carbonyle $\text{C}=\text{O}$. **A** comprend, par exemple, de préférence de 4 à 40 atomes de carbone et de 0 à 10 hétéroatomes choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre. En particulier, un groupe aromatique **A** peut être un carbocycle monocyclique, un carbocycle bicyclique ou un carbocycle polycyclique avec plus de deux cycles, et comportant de préférence de 5 à 40 chaînons, et préférentiellement de 6 à

15 chaînons, et comprenant au moins un cycle aromatique, ledit carbocycle comprenant éventuellement au moins un hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, azote ou soufre intégré au sein du carbocycle et/ou un ou plusieurs atomes de carbone formant le carbocycle sous la forme d'un

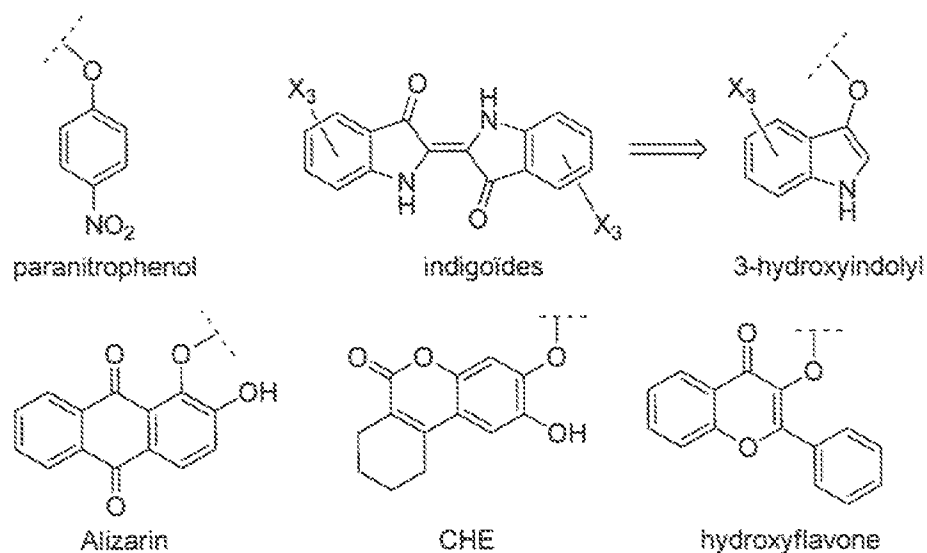
5 carbonyle C=O, un tel carbocycle pouvant être non substitué ou porteur de un ou plusieurs substituants. Les groupes aromatiques comprennent notamment les groupes aryle et hétéroaryle, non substitués ou substitués. A titre d'exemple de tels carbocycles, sous leur forme non-substituée, on peut citer les groupes phényle, naphthyle, 2-, 3- ou 4-pyridinyle, 2- ou 3-furoyle, 2-

10 ou 3-thiophényle, pyrrolyle, imidazolyle, pyrazolyle, thiazolyle, oxazolyle, isoxazolyle, pyridinyle, pyrazinyle, pyrimidinyle, tétrazolyle, thiadiazolyle, oxadiazolyle, triazolyle, pyridazinyle, indolyle, pyronyle.

Un chromophore est une molécule capable d'absorber une partie du spectre de la lumière visible. On peut citer, comme exemple de

15 chromophore, le paranitrophénol et ses dérivés, les colorants du type indigoïdes obtenus après dimérisation du dérivé énol correspondant (et correspondant donc à $A'=O$) qui forment un précipité en milieu aqueux aérobique, ou encore les composés tels que la cyclohexenoesculétine (CHE), l'alizarine ou encore l'hydroxyflavone qui forment un précipité coloré en

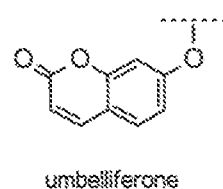
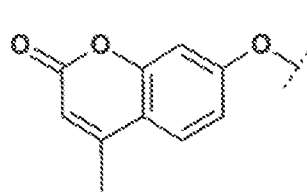
20 présence de certains métaux :



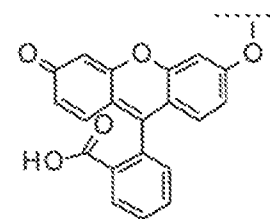
Les hydroxyindolyles peuvent être substitués par un ou plusieurs X_3 identiques ou différents choisis parmi les atomes de chlore, brome, iode ou fluor et positionné(s) sur n'importe quelle position du cycle benzénique.

Un fluorophore est une molécule capable de générer de la fluorescence, lorsqu'elle est soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde adaptée. La « fluorescence » est la propriété par laquelle une molécule qui est excitée par de la lumière d'une longueur d'onde donnée émet de la lumière à une plus grande longueur d'onde. La fluorescence est un phénomène qui résulte de l'interaction d'un fluorophore avec un photon incident. Ce processus est appelé excitation. L'absorption du photon amène un électron dans le fluorophore, à passer de son état fondamental, à un niveau d'énergie supérieur. Ensuite, l'électron revient à son niveau original en émettant un photon. Ce processus est appelé émission de fluorescence. Le fluorophore émet ensuite de la lumière à une plus grande longueur d'onde que celle du photon absorbé. Ceci est dû simplement au fait que l'énergie du photon émis est inférieure à celle du photon absorbé, du fait de la dissipation d'énergie pendant la durée de vie de l'état excité. Cette définition est donnée dans la demande de brevet WO 2004/058787.

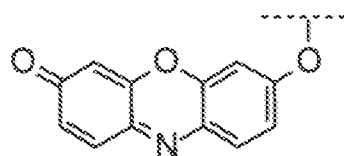
Des exemples de groupements -OA, permettant de libérer de tels fluorophores sont donnés ci-dessous :



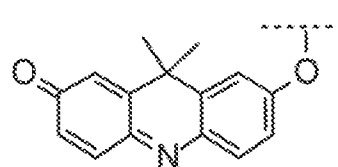
umbelliferone



fluorescéine

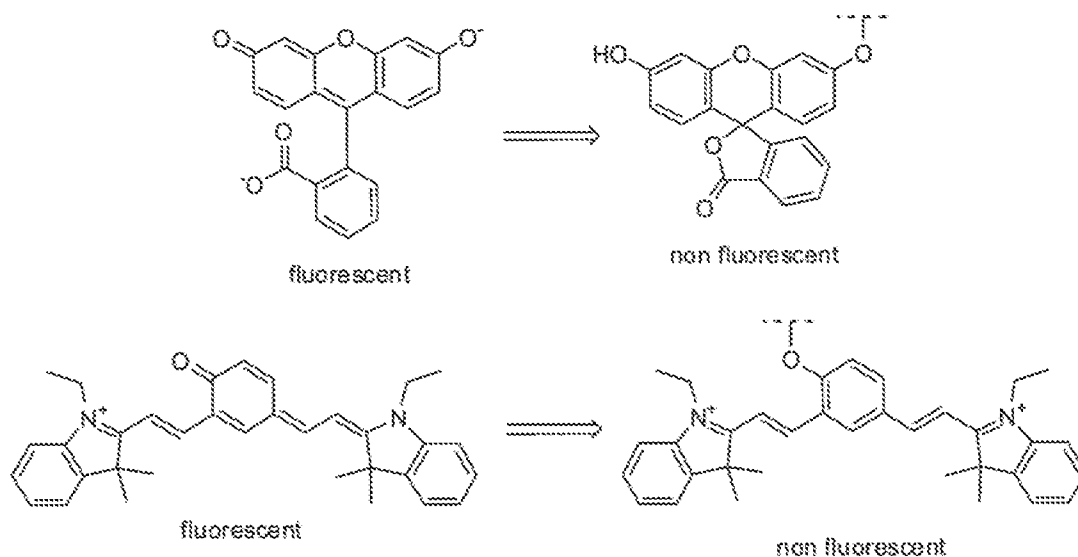


resorufin

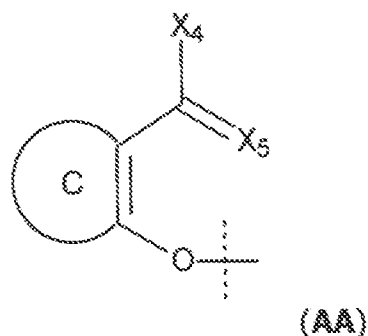


DAO

A titre d'exemple de groupe -OA permettant la libération d'un fluorophore après réarrangement de la molécule libérée **A-OH** ou **A-O⁻**, on peut citer les fluorophores suivants (le deuxième est décrit par : Shabat et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20412) :

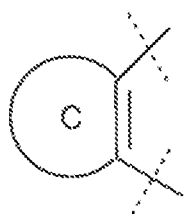


Selon des modes de réalisation particuliers, le groupe -OA est sélectionné de manière à obtenir, après clivage de la liaison C-O entre l'atome de carbone porteur de l'atome (X₂) et l'atome d'oxygène porteur du groupement A dans les composés de formule (I), un composé **AOH** qui correspond à un fluorophore ESIPT, qui peut ou non précipiter en solution aqueuse. Un fluorophore ESIPT est un composé qui comprend au moins un groupement hydroxyle qui intervient dans le transfert de proton intramoléculaire, permettant une tautomérisation de la molécule fluorophore et l'émission de fluorescence. Des exemples de tels groupements -OA répondent à la formule (**AA**):

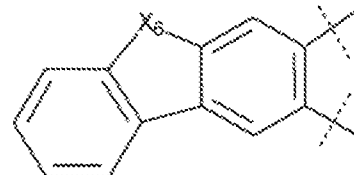
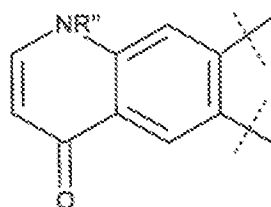
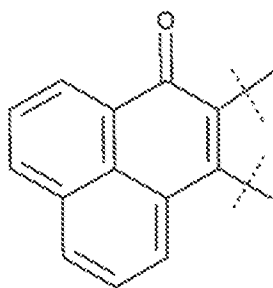


dans laquelle :

- soit X_5 est un atome d'oxygène et X_4 est un groupe $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, alkyle, aryle, $-O$ -alkyle, $-O$ -phényle, $-NH$ -alkyle, $-NH$ -phényle, $-S$ -alkyle ou $-S$ -aryle, lesdits groupes alkyle et phényle pouvant être substitués ou non substitués, soit X_5 représente un atome d'azote et est lié à X_4 qui représente alors CH, O, S, N ou NH pour former un hétéroaryle substitué ou non substitué, ledit hétéroaryle substitué ou non substitué étant de préférence choisi parmi le quinazole, l'imidazole, le benzoimidazole, le thiazole, le benzothiazole, l'oxazole, le benzooxazole, la pyridine et la quinoline,



- et représente un aryle ou un hétéroaryle, substitué ou non substitué, par exemple choisi parmi les groupes phényle, naphthyle, et :



lesdits groupes pouvant être substitués ou non substitués,

avec X_6 qui représente S, O ou NR'' , et R'' qui représente un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_4) alkyle.

- Lorsque dans un groupe $-OA$, qui représente sous forme AOH un fluorophore ESIPT, comprend plusieurs groupements hydroxyle, alors l'atome d'oxygène du groupe $-OA$ est l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle qui intervient dans le transfert de proton intramoléculaire. L'incorporation de cet hydroxyle dans le groupement carbamate des composés de formule (I) empêche la formation de la liaison hydrogène interne et la tautomérisation du fluorophore.

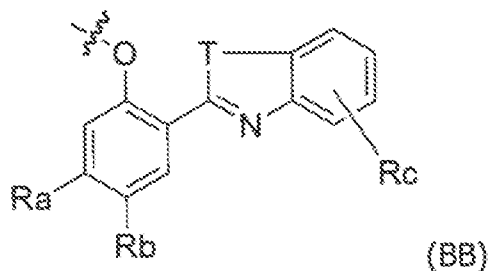
Les fluorophores ESIPT montrent un déplacement de Stokes qui dépasse les 100 nm et atteint souvent 200 nm. Tous les fluorophores ESIPT

perdent cette émission de fluorescence correspondant à un déplacement de Stokes supérieur à 100 nm, si leur groupement OH du type phénolique est alkylé, acylé ou autrement fonctionnalisé, ce qui empêche de transférer un atome d'hydrogène à l'hétéroatome X_s sur l'illustration donnée avec la formule (AA), lors de l'excitation par irradiation, et ainsi empêche l'émission de fluorescence caractéristique du processus de transfert de proton.

Le plus souvent dans un tel cas, le groupe A correspond à un groupe phényle qui est non substitué ou substitué et/ou qui est fusionné avec un ou plusieurs carbocycles insaturés comprenant éventuellement un hétéroatome tel que l'azote. Ce groupe sous sa forme phénoxy -OA, lorsqu'il n'est pas lié au substrat, correspond sous sa forme protonée à un composé phénolique HO-A qui appartient à la classe des fluorophores ESIPT.

Des groupes -OA du type phénoxy, correspondent, par exemple, aux structures préférées (BB) ou (CC) suivantes :

*



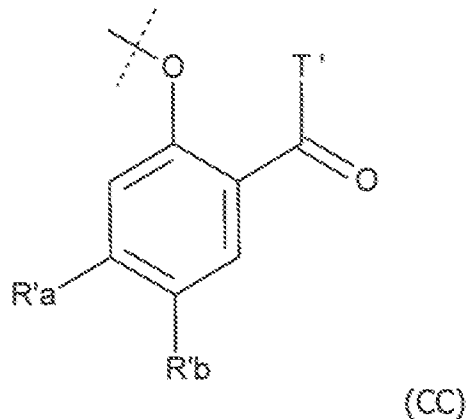
dans laquelle

- T est -NH-C(O)-, -S-, -O-, -NH, N-alkyle ou N-aryle,
- Ra est l'hydrogène ou un substituant carboné attracteur d'électrons, comme -CN ou -COORd, avec Rd qui représente un groupe (C₁-C₄)alkyle, ou bien Ra est -CONReRf, avec Re et Rf, identiques ou différents, qui représentent l'hydrogène ou un groupe (C₁-C₄)alkyle, ou bien Ra est -CF₃ ou un groupe 2-oxazolyle, 2-thiazolyle, 2-imidazolyle, 2-benzoimidazolyle, 4-pyrimidinon-2-yle ou quinazolinon-2-yle,
- Rb est l'hydrogène, un atome de chlore, brome, iode ou fluor, -OH, -NH₂, -NRgRh, -NHRg ou -ORg, avec Rg et Rh qui représentent chacun indépendamment un (C₁-C₄)alkyle,

- ou bien Ra et Rb sont liés entre eux pour former une chaîne hydrocarbonée comprenant 4 ou 5 chaînons, saturée ou insaturée, substituée ou non substituée, éventuellement interrompue par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, S et O,

5 - Rc est l'hydrogène, Br, Cl, I ou F,

*



dans laquelle :

- T' est NH₂, OH, un groupe aryle, un groupe (C₁-C₄)alkyle, SH, NHR'_c,
10 OR'_c, NR'_cR'_d ou SR'_c, avec R'_c et R'_d, identiques ou différents, qui
représentent un groupe (C₁-C₄)alkyle ou aryle,

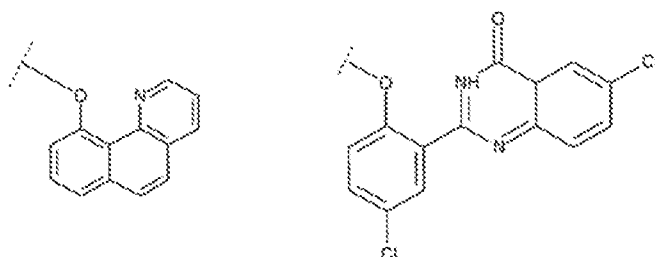
- R'a est l'hydrogène ou un substituant carboné attracteur d'électrons
comme -CN, ou -COOR'_e, avec R'_e qui représente un groupe (C₁-C₄)alkyle,
ou R'a est -CONR'_fR'_g, avec R'_f et R'_g, identiques ou différents, qui
15 représentent l'hydrogène ou un groupe (C₁-C₄)alkyle, ou bien R'a est -CF₃ ou
un 2-oxazolyle, 2-thiazolyle, 2-imidazolyle, 2-benzoimidazolyle,
4-pyrimidinon-2-yle ou quinoxalinon-2-yle,

- R'b est l'hydrogène, un atome de chlore, brome, iode ou
fluor, -OH, -NH₂, -NR'_hR'_i ou -OR'_h, avec R'_h et R'_i, identiques ou différents,
20 qui représentent un groupe (C₁-C₄)alkyle,

- ou bien R'a et R'b sont liés entre eux pour former une chaîne hydrocarbonée comprenant 4 ou 5 chaînons, saturée ou insaturée, substituée ou non substituée, éventuellement interrompue par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, S et O.

On pourra notamment se référer aux demandes WO 2013/045854 et WO 2014/020285A qui donnent des exemples de tels fluorophores ESIPT pour plus de détails.

A titre d'exemple de groupe OA, correspondant à un fluorophore de type ESIPT, on peut citer, plus particulièrement les groupements suivants :



Le très grand déplacement de Stokes de tels fluorophores (approximativement 170 nm pour la HPQ (Hydroxyphénylquinazolinone) présentée à droite ou de tout analogue de la HPQ contribuera à l'excellente sensibilité de la sonde et rendra le fluorophore libéré aisément distinguable de la fluorescence native pouvant provenir de l'échantillon biologique sur lequel l'analyse va être menée.

Définition des groupes R

R peut représenter un atome d'hydrogène ou $-(L)n-GP$, avec **n** qui est égal à 0 ou 1.

Bien souvent, pour des raisons de synthèse, **n** = 1 et **L** est un bras de liaison, et notamment un bras $-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1-$ (dans le sens pipérazine -> groupe **GP**) avec :

L1 et **L'1**, identiques ou différents, qui sont choisis parmi -O-, -NH-, -N(C₁₋₆ alkyl)-, -N(phényl)-, -N(aryl)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)-O-, -NHC(O)-O-, -OC(O)-NH-, -NHC(O)-NH-, -S-, -SO₂-, -N=N-, -NHC(O)- et -CONH- ;

L2 qui est choisi parmi les groupes bivalents suivants : (C₁₋₂₀)alkyle, (C₁₋₂₀)alcényle, (C₁₋₂₀)alcynyle, (C₆₋₂₄)aryle, (C₇₋₄₄)alkylaryle, (C₇₋₄₄)alcénylaryle, (C₇₋₄₄)alcynylaryle, (C₇₋₄₄)alkylcycloalkyle, (C₇₋₄₄)alcénylcycloalkyle, (C₇₋₄₄)alcynylcycloalkyle, (C₇₋₄₄)alkylhétérocycloalkyle, (C₇₋₄₄)alcénylhétérocycloalkyle,

(C₇₋₄₄)alcynylhétérocycloalkyle; lesdits groupes pouvant être interrompus ou se terminer par un groupe triazole et pouvant être non substitués ou substitués, notamment par un ou plusieurs substituants choisis parmi les (C₁₋₁₀)alcoxy, (C₁₋₁₀)alkyle, (C₆₋₁₀)aryle, amido, imido, phosphido, nitrido,
 5 (C₁₋₁₀)alcényle, (C₁₋₁₀)alcynyle et -OH ; et

m1, **m'1** et **m2**, identiques ou différents, qui sont égaux à 0 ou 1.

Le bras **L**, lorsqu'il est présent, sera choisi pour éloigner le groupe **GP** de la pipérazine ou pour des questions de synthèse. Selon un mode de réalisation préféré, **L** représente **-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1** avec
 10 **L1** = -C(O)-, **m1** = **m2** = 1, **m'1** = 1 ou 0 et **L2** et **L'1** tels que définis précédemment, et notamment **L** représente -C(O)-(CH₂)**p**-**L3**- avec **p** qui est égal à 1, 2, 3 ou 4 et **L3** qui est un groupe triazole et notamment un groupe 1*H*-1,2,3-triazole.

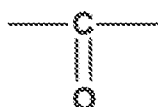
GP est un groupe hydrosolubilisant.

15 Par « groupe hydrosolubilisant », on entend un groupe hydrophile qui permet d'améliorer la solubilité de la sonde, par rapport notamment à une sonde qui n'en diffère que par le remplacement de l'atome d'azote porteur de **L-GP** par un CH₂, pour obtenir une pipéridine telle que décrite dans les demandes WO 2013/045854 et WO 2014/020285. A titre d'exemple de
 20 groupe hydrosolubilisant, on peut citer les groupes capables de former une espèce chargée en solution aqueuse. A titre d'exemple de groupe hydrosolubilisant **GP**, on peut citer les fonctions **F₁** choisies parmi les amine (primaire, secondaire, ou tertiaire), amidine, guanidine ou tétrazole ; les fonctions **F₂** choisies parmi les fonctions anioniques du type carboxylate, sulfonate ou phosphate ; les groupements comprenant une ou plusieurs de
 25 ces fonctions **F₁** et/ou **F₂** ; les polyéthyléneglycols ; les sucres ou polysaccharides tels que le glucose, le galactose et le mannose ; les groupes peptidiques tels que la poly-lysine, la poly-arginine, les TAT-peptides... A titre d'exemple de fonctions amine, on peut citer -NH₂, -NH(C₁₋₄)alkyle, et les
 30 dialkylamines dans lesquelles les groupes alkyle sont identiques ou différents et comprennent de 1 à 4 atomes de carbone. Par « groupements comprenant une ou plusieurs de ces fonctions **F₁** et/ou **F₂** », on entend un

groupement alkyle (tel que les (C₃₋₆)alkyles), un groupement aryle (tel qu'un groupement aryle comportant 6 atomes de carbone), un groupement hétéroaryle (tel qu'un hétéroaryle comportant 6 atomes de carbone) dans lequel un ou plusieurs atomes d'hydrogène de ces groupement a(ont) été
 5 substitué(s) par une ou plusieurs fonctions F₁, ou par une ou plusieurs fonctions F₂ ou bien au moins un atome d'hydrogène a été substitué par une fonction F₁ et un autre atome d'hydrogène a été substitué par une fonction F₂.

Définition des termes utilisés dans la définition des sondes

10 Par fonction acyle, on entend une fonction :



Par groupe « alkyle », à moins qu'il n'en soit spécifié autrement, on entend une chaîne hydrocarbonée, saturée, linéaire ou ramifiée. Les groupes alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone seront préférés. A titre
 15 d'exemple de groupe alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, nommés C₁₋₆ alkyle ou (C₁-C₆) alkyle, on peut citer, notamment, les groupes méthyle, éthyle, *n*-propyle, *iso*-propyle, *n*-butyle, *tert*-butyle, *sec*-butyle, *n*-pentyle, *n*-hexyle.

Par groupe « aryle », on entend un carbocycle mono-, bi- ou
 20 polycyclique, comprenant au moins un groupe aromatique, par exemple, un groupe phényle, cinnamyle ou naphtyle. Les groupes aryle comprenant de 6 à 12 atomes de carbone seront préférés. Le phényle est le groupe aryle particulièrement préféré.

Lorsqu'il est indiqué qu'un groupe est substitué, cela signifie qu'il est
 25 substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisis parmi les atomes de chlore, brome, iode ou fluor, les groupes cyano, alkyle, fluoroalkyle, trifluorométhyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalkyle, amino, alkylamino, dialkylamino, hydroxy, alcoxy, aryloxy, -COOH, nitro, les groupes acyle, les groupes aromatiques (notamment aryle et hétéroaryle),
 30 lesdits groupes alcényle, alcynyle, cycloalkyle,

hétérocycloalkyle, groupes acyle et groupes aromatiques peuvent eux-mêmes être non substitués ou substitués. Les termes utilisés pour la définition de ces substituants sont ceux usuellement reconnus par l'homme du métier.

- 5 De manière classique, le terme « alcényle » désigne une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée comprenant au moins une double liaison, et présentant de préférence de 2 à 20 atomes de carbone, et préférentiellement de 2 à 6 atomes de carbone ; le terme « alcynyle » désigne une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée comprenant au moins une triple liaison, et présentant de préférence de 2 à 12 atomes de carbone, et préférentiellement de 2 à 6 atomes de carbone ; le terme « fluoroalkyle » désigne une chaîne hydrocarbonée, saturée, linéaire ou ramifiée dans laquelle au moins un atome d'hydrogène a été remplacé par un atome de fluor, et présentant de préférence de 2 à 12 atomes de carbone, et préférentiellement de 2 à 6 atomes de carbone ; les termes « alcoxy » et « aryloxy » désignent respectivement un O-alkyle et un O-aryle.

Par « cycloalkyle », on entend un groupe hydrocarboné saturé constitué d'au moins un cycle, éventuellement ponté. Les groupes alkyle comprenant de 3 à 12 atomes de carbone seront préférés. A titre d'exemple, on peut citer les groupes cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle, cyclohexyle, cycloheptyle et adamantyle.

Par « hétérocycloalkyle », on entend un groupe cycloalkyle tel que défini ci-dessus, dans lequel au moins un atome de carbone est remplacé par un hétéroatome choisi parmi O, S ou N. A titre d'exemple d'hétérocycloalkyle, on peut citer les groupes pipéridinyle, pipérazinyle, morpholinyle, tétrahydropyranyle ...

Par groupe « hétéroaryle », on entend un carbocycle mono-, bi- ou polycyclique, comportant de préférence de 6 à 12 chaînons, et comprenant au moins un groupe aromatique et au moins un hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, azote ou soufre intégré au sein du carbocycle. A titre d'exemple de groupe hétéroaryle, on peut citer les 2-, 3- ou 4-pyridinyle, 2-

ou 3-furoyle, 2- ou 3-thiophényle, pyrrolyle, imidazolyle, pyrazolyle, thiazolyle, oxazolyle, isoxazolyle, pyridinyle, pyrazinyle, pyrimidinyle, tétrazolyle, thiadiazolyle, oxadiazolyle, triazolyle, pyridazinyle, indolyle. Les hétéroaryles comprennent également de tels groupes dans lesquels un ou
 5 plusieurs atome(s) de carbone du cycle est(sont) sous la forme d'une fonction carbonyle C=O.

Par « groupe acyle », on entend un groupe lié par le carbone d'une fonction acyle C=O, et notamment un groupe -CONH₂, -COOH, -COaryle, -CO(C₁₋₄)alkyle, -COSH, -CONHR''_a, -CONR
 10 ''_aR''_b ou -COSR''_a avec R''_a et R''_b, identiques ou différents, qui représentent un groupe (C₁-C₄) alkyle ou aryle.

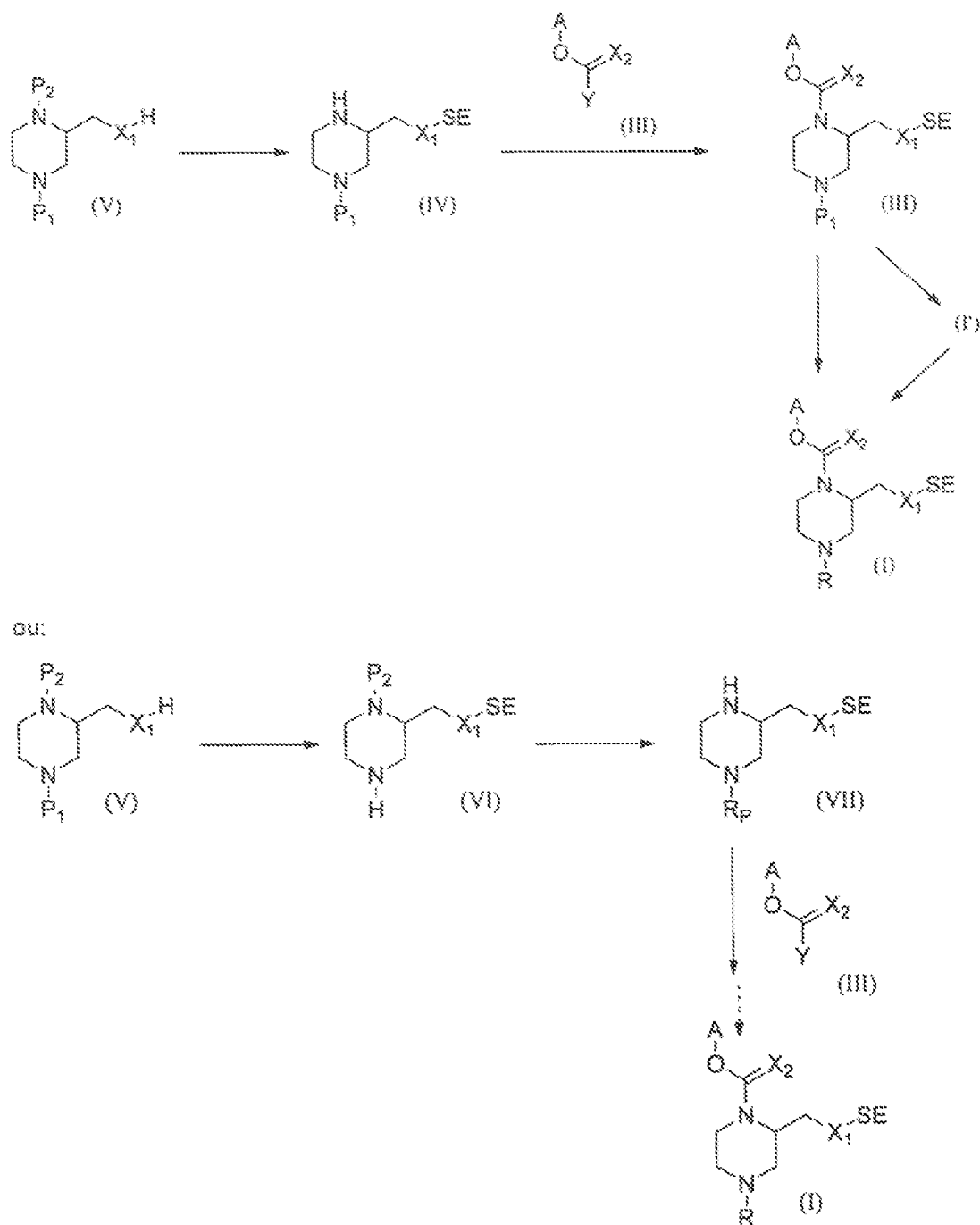
Par « (C₇₋₄₄)alkylaryle », « (C₇₋₄₄)alcénylaryle », « (C₇₋₄₄)alcynylaryle », on entend respectivement une chaîne alkyle, alcényle ou alcynyle, commençant, interrompue ou se terminant par un groupe aryle. On préférera
 15 les groupes alkylaryle, alcénylaryle et alcynylaryle comprenant de 7 à 22 et de préférence de 7 à 16 atomes de carbone.

Préparation des sondes selon l'invention

Les composés utilisés dans le cadre de l'invention sont préparés selon des techniques classiques. Ils peuvent, notamment être obtenus selon des
 20 procédés analogues à ceux utilisés dans les exemples.

Les composés selon l'invention peuvent être obtenus selon le **Schéma 2** ci-après, dans lequel **A**, **X₁**, **X₂** et **SE** sont tels que définis pour les sondes de formule (I) et **P₁** et **P₂** sont des groupes protecteurs temporaire des fonctions amine en particulier dans les conditions de réaction mises en
 25 œuvre, **Y** est un groupe partant du type Cl, para-nitrophénol, imidazole ou N-méthylimidazolium, ou N-hydroxysuccinimide, et **R_p** représente **R** ou un groupe protecteur temporaires des fonctions amine en particulier dans les conditions de réaction mise en œuvre ou **R_p** est un groupe précurseur du groupe **R**.

Schéma 2

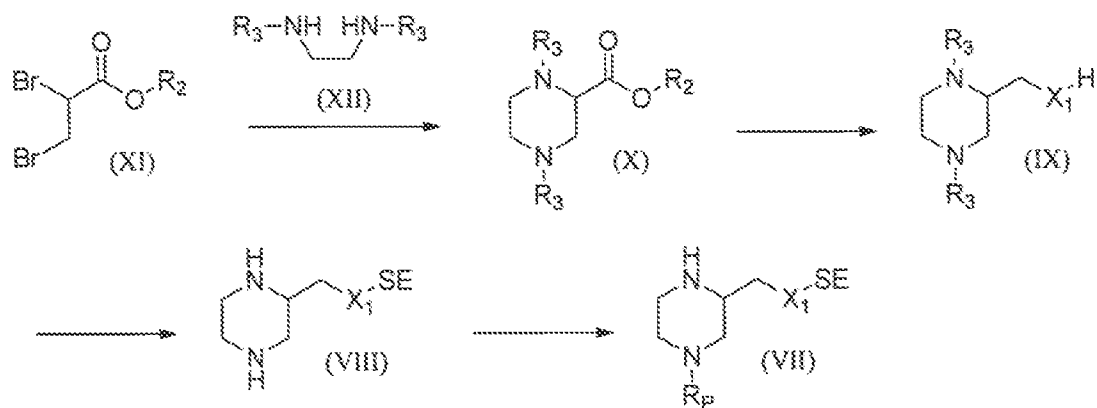
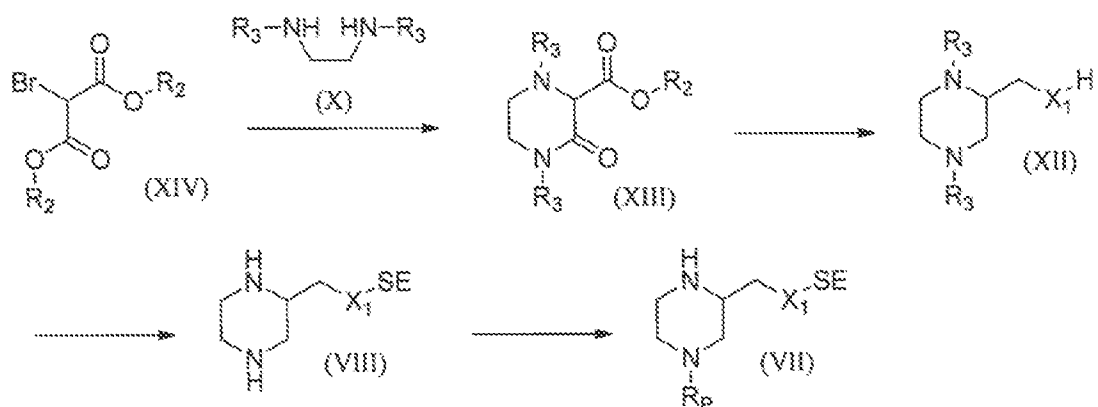


- 5 Par groupe protecteur temporaire des amines, on entend les groupes protecteurs tels que ceux décrits dans Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T.W. et Wuts P.G.M., ed John Wiley et Sons, 2006 et dans Protecting Groups, Kocienski P.J., 1994, Georg Thieme Verlag. A titre d'exemple de tels groupements, on peut citer les groupes benzyle (Bn), les
- 10 groupes $-C(O)OR'_1$ avec R'_1 qui représente un groupe alkyle ou alcényle de 1 à 12 atomes de carbone ou un groupe $-(CH_2)_{m3}R''_1$ avec R''_1 qui

représente un groupe aryle, cycloalkyle ou fluorényle et m_3 qui est égal à 0, 1, 2 ou 3, et en particulier, les groupes carbobenzyloxy (Cbz), *ter*-butyloxycarbonyl (Boc) et 9-fluorénylméthyloxycarbonyl (Fmoc), allyloxycarbonyl (Alloc).

- 5 Les composés (V) pourront notamment être obtenus à partir de la pipérazine commerciale. En suivant une procédure similaire, mais modifiée de celle décrite dans Org. Lett. **2010**, 12, 4176, on peut former le composé (V) à partir de la pipérazine bis-protégée, dont l'un des groupements est un groupement Butyloxycarbonyl (Boc), grâce à une réaction d'ortholithiation,
- 10 suivie d'une réaction avec du paraformaldéhyde pour former le composé (V) où $X_1 = O$. Le dérivé amine (V) où $X_1 = NH$ peut être ensuite obtenu par exemple grâce à une synthèse de Gabrielle, tandis que le composé (V) où $X_1 = S$ peut être obtenu par substitution nucléophile.

- Il est également possible, de manière préférée, d'utiliser les procédés
- 15 illustrés dans les **Schémas 3** et **4** qui nécessitent moins d'étapes dans les cas où $X_1 = O$ ou NH pour la préparation des composés de formule (VII). Dans les **Schémas 3** et **4**, **A**, X_1 , X_2 et **SE** sont tels que définis pour les sondes de formule (I) et R_2 est un groupe alkyle de 1 à 4 atomes de carbone, R_3 est groupe protecteur temporaire des fonctions amine en
- 20 particulier dans les conditions de réactions mise en œuvre, et **Y** est un groupe partant du type Cl ou paranitrophénol, imidazole ou N-méthylimidazolium, ou N-hydroxysuccinimide et **Rp** représente **R** ou un groupe protecteur temporaire des fonctions amine en particulier dans les conditions de réaction mises en œuvre ou **Rp** est un groupe précurseur du
- 25 groupe **R**.

Schéma 3 :**Schéma 4 :**

5 Dans la procédure décrite dans le **Schéma 3**, le cycle pipérazine est obtenu par une double substitution nucléophile d'un composé du type éthylène diamine (X) sur des dérivés du produit de départ commercial du type (XI).

Dans la procédure décrite dans le **Schéma 4**, le cycle pipérazine est
 10 obtenu par une réduction du cycle pipérazinone (XIII), lui-même synthétisé à partir d'un bromure de malonate (XIV) et d'un composé du type éthylène diamine (X).

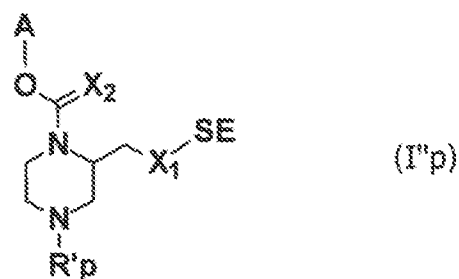
Les groupements **R** différents de H, qui correspondent à un groupe **L-GP**, peuvent être introduits grâce à des réactions du type substitution
 15 nucléophile, amination réductrice ou formation de liaison amide. La liaison entre les groupements **L** et **GP** peut être obtenue par d'innombrables voies de synthèse selon les fonctions chimiques présentes sur le bras de liaison **L**. On peut par exemple citer des réactions de ligation telles que des substitutions nucléophiles, des couplages peptidiques, des cycloadditions

telles que la cycloaddition de Huisgen ou de Diels-Alder, des couplages paladocatalysés tels que le couplage de Sonogashira ou de Heck.

- Il est possible de former intermédiairement un composé intermédiaire de formule (I') dans laquelle **R_p** est un groupe précurseur d'un groupe **R** ou
- 5 **R_p** est un groupe protecteur temporaire des amines. En particulier, font partie intégrante de l'invention, les intermédiaires de formule :



et



- 10 ainsi que leurs sels, solvats ou hydrates, dans lesquels :

- A**, **X₁**, **X₂**, **SE**, **L1**, **L'1**, **L2**, **m1**, **m'1**, et **m2** sont tels que définis pour (I), **Z** représente $C\equiv CH$, N_3 , une fonction N-oxysuccinimide ou maléimide, et
- R'p** représente un groupe protecteur des fonctions amines, de préférence
- 15 choisi parmi les groupes benzyle, les groupes $-C(O)OR'_1$ avec **R'1** qui représente un groupe alkyle ou alcényle de 1 à 12 atomes de carbone ou un groupe $-(CH_2)_{m3}R''_1$ avec **R''1** qui représente un groupe aryle, cycloalkyle ou fluorényle et **m3** qui est égal à 0, 1, 2 ou 3. A titre d'exemple de groupe **R'p**
- 20 fluorénylméthoxyloxycarbonyl, et allyloxyloxycarbonyl.

Dans certains cas, également, un composé de formule (I) pourra servir d'intermédiaire dans la préparation d'un autre composé de formule (I). C'est notamment le cas des composé de formule (I) dans lesquels **GP** = $-COOH$ ou

-NH₂ qui pourront être utilisés notamment pour former des composés dans lesquels L'1 = -CONH- ou -NHCO- et m'1 = 1.

Les réactifs de départ sont disponibles dans le commerce ou facilement accessibles. Les molécules de formule (I) sont donc d'accès chimique
5 relativement simples, et peuvent être obtenues à un relativement faible coût de préparation, pour le domaine technique considéré.

Les sels des composés selon l'invention sont préparés selon des techniques bien connues de l'homme de l'art. Les sels des composés de formule (I) selon la présente invention comprennent ceux avec des acides ou
10 des bases, en fonction des substituants présents. Ces acides ou bases peuvent être choisis parmi les acides et bases minéraux et organiques qui permettent une séparation ou une cristallisation convenable des composés de formule (I), ainsi que des sels physiologiquement acceptables, c'est-à-dire compatibles avec des applications *in vivo* et *in vitro*. En tant qu'acide
15 approprié, on peut citer : l'acide oxalique ou un acide optiquement actif, par exemple un acide tartrique, un acide dibenzoyltartrique, un acide mandélique ou un acide camphorsulfonique, et ceux qui forment des sels physiologiquement acceptables, tels que le chlorhydrate, le bromhydrate, le sulfate, l'hydrogénosulfate, le dihydrogénophosphate, le maléate, le
20 fumarate, le 2-naphtalènesulfonate, le para-toluènesulfonate, le mésylate, le bésylate, l'isotionate. En tant que base appropriée, on peut citer : la lysine, l'arginine, la méglumine, la bénythamine, la benzathine et celles qui forment des sels physiologiquement acceptables, tels que des sels de sodium, de potassium, de calcium.

25 Comme composés sous forme hydratée, on peut citer, à titre d'exemple, les semi-hydrates, monohydrates et polyhydrates.

Par solvat, on entend une forme du composé associé à une ou plusieurs molécules de solvant, notamment utilisé lors de sa synthèse ou lors de sa purification, sans pour autant être en solution dans ce dernier.

30 Les différents composés de formule (I) selon l'invention peuvent se trouver sous toutes les formes d'isomères optiques possibles, éventuellement en mélange selon toutes proportions, à moins qu'il n'en soit spécifié

autrement. Selon un mode de réalisation particulier, les composés selon l'invention comportant un carbone asymétrique se trouvent sous une forme racémique, les formes R et S se trouvant en proportions sensiblement égales. Selon un autre mode de réalisation, les composés de formule (I) de l'invention peuvent se trouver sous une forme enrichie en un diastéréoisomère ou énantiomère, avec un excès diastéréoisomérique ou énantiomérique supérieur à 80 %, voire même supérieure à 95%, voire sous une forme isomérique pure c'est-à-dire avec un excès diastéréoisomérique ou énantiomérique supérieur à 99 %.

Les composés (I) pourront être isolés sous une forme enrichie en un diastéréoisomère ou énantiomère par les techniques classiques de séparation : on pourra utiliser, par exemple des recristallisations fractionnées d'un sel du racémique avec un acide ou une base optiquement active dont le principe est bien connu ou, le plus souvent, les techniques classiques de chromatographies sur phase chirale ou non chirale.

Dans le cadre de l'invention, toutes les définitions et modes de réalisation préférés pour **A**, **R**, **X₁**, **X₂**, et **SE** pourront être combinées.

En particulier, les sondes selon l'invention présenteront l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes, voire toutes les caractéristiques suivantes :

- **X₂** = O,
- soit **X₁** = O et **SE** est un substrat de glycosidase ou glucuronidase et correspond à un groupe glycosyle lié par son carbone anomérique au reste de la molécule, ou **SE** est un substrat d'estérase et correspond à un groupe -C(O)Ri avec Ri qui représente, par exemple, un groupe alkyle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, alcényle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, un groupe benzyle, aryle ou hétéroaryle, soit **X₁** = NH et **SE** est un substrat de protéase ou peptidase et correspond à un groupe peptidyle lié par une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral,
- **R** représente **-L-GP** avec :
 - o **L** qui représente, de préférence, **-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1** avec **L1** = -C(O)-, **m1** = **m2** = 1, **m'1** = 1 ou 0 et **L2** et **L'1**

tels que définis ci-dessus, et notamment **L** représente $-C(O)-(CH_2)_p-L3-$ avec **p** qui est égal à 1, 2, 3 ou 4 et **L3** qui est un groupe triazole et notamment un groupe 1H-1,2,3-triazole, et

- o **GP** qui est, de préférence, une fonction **F₁** choisie parmi les fonctions ammonium, carboxylate, sulfonate et phosphate et les polyéthylèneglycols,

- **A** est un des groupements spécifiquement décrits dans la présente demande de brevet.

Les sondes selon l'invention sont attractives pour plusieurs applications à haute sensibilité dans les sciences de la vie, et notamment : (1) le criblage à haut rendement d'une activité, en particulier d'une activité enzymatique, exprimée par des colonies bactériennes sur une plaque gélosée (analyse de colonies) ; (2) la détection *in vitro* d'une activité, en particulier d'une activité enzymatique, dans des liquides biologiques (hématologie et autres) ; (3) la détection d'une activité, en particulier d'une activité enzymatique, au niveau d'une cellule unique par cytométrie de flux; (4) la visualisation d'une activité, en particulier d'une activité enzymatique, intracellulaires dans des cellules cultivées (microscopie de fluorescence et microscopie confocale) ; (5) la détection histochimique d'une enzyme (à l'échelle tissulaire) ; et également (6) l'imagerie moléculaire *in vivo*.

Ainsi, les sondes selon la présente invention ont un grand nombre d'applications potentielles. Les exemples de telles applications incluent la conception d'analyses sur colonies bactériennes. Celles-ci sont actuellement réalisées sur une plaque gélosée (boîte de Petri) où jusqu'à 3 000 colonies peuvent être distinguées sans avoir à les séparer activement dans des compartiments séparés comme les puits contenus dans une plaque à puits multiples. Il est, par exemple, possible de concevoir des tests sur échantillons cliniques permettant d'identifier parmi un ensemble de lignées bactériennes une lignée pathogène d'intérêt.

Les sondes selon l'invention peuvent servir aussi pour l'imagerie par fluorescence macroscopique, c'est-à-dire au niveau d'un organisme entier. Dans ce cas, la sonde pénétrera dans la paroi cellulaire pour atteindre

l'activité d'intérêt (un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde).

Les exemples suivants illustrent l'invention, mais n'ont aucun caractère
5 limitatif.

Abréviations utilisées

DCM : dichlorométhane	TFA : acide trifluoroacétique
Boc : tert-butyloxycarboxyl	Me : méthyl
Ac : acétyl	HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
sBu : sec-butyl	HATU : hexafluorophosphate de 1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxyde
Et : éthyl	TA : Température Ambiante
DIAD : azodicarboxylate de diisopropyle	AMC : 7-amino-4-méthylcoumarine
THF : Tétrahydrofurane	DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
DMF : N,N-diméthylformamide	iPr : isopropyl
δ : Déplacement Chimique (ppm)	RFU : Unité de fluorescence arbitraire
UA : Unité d'absorbance arbitraire	λ_{ex} : Longueur d'onde d'excitation (nm)
λ_{em} : Longueur d'onde d'émission (nm)	RMN : Résonance magnétique nucléaire
LC : Chromatographie liquide	MS : Spectroscopie de masse
ESI : Ionisation par électrospray	R_f : Rapport frontal
J : Constante de couplage H-H (Hz)	s : singulet
d : doublet	t : triplet
dd : doublet de doublet	td : triplet de doublet
m : multiplet	br : signal élargi
v : volume	

Appareillage utilisé pour les caractérisations

Les spectres RMN ont été obtenus à 297K grâce à un spectromètre Bruker AVANCE 300 (300 MHz & 75 MHz pour ^1H et ^{13}C , respectivement) ou un Bruker AVANCE 500 (500 MHz & 125 MHz pour ^1H et ^{13}C , respectivement).

Les mesures de Masse en basse résolution ont été obtenues grâce à un spectromètre de masse couplé à la chromatographie liquide AGILENT 1100 SL.

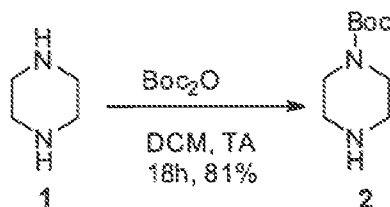
Les analyses par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel de Silice 60Å déposé sur aluminium (Aldrich).

Les mesures de Masse en haute résolution ont été obtenues grâce à un spectromètre de masse MicroTOFQ II, Bruker.

Les mesures de fluorescence ou d'absorbance ont été obtenues grâce à un fluorimètre à plaque EnSpire, Perkin-Elmer.

A - Synthèses :

I - Préparation de l'intermédiaire 8, le N-((4-benzylpiperazin-2-yl)méthyl)-2-phénylacétamide, sous la forme de sel avec l'acide trifluoacétique

a) Préparation du composé 2: N-Boc-pipérazine

A une solution de pipérazine **1** (10,0g, 100mmol, 2,0eq.) dans du DCM (300mL) est ajoutée goutte à goutte une solution de Boc_2O (8,07g, 50mmol, 1,0eq.) dans du DCM (150mL) sur une période de 3h à température ambiante (TA). A la fin de l'addition, le mélange réactionnel est agité à TA pendant 18h. Le mélange est ensuite concentré par évaporation, afin d'obtenir un volume final approximatif de 100mL. Cette solution est ensuite lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (2x100mL) et une fois

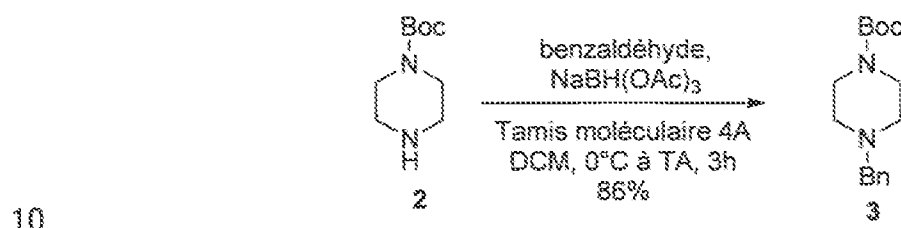
avec de la saumure (100mL). La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée pour obtenir le composé **2** sous forme d'une huile incolore qui cristallise avec le temps (7,57g, 40mmol, rendement: 81%).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.33 (t, $J=5\text{Hz}$, 4H), 2.75 (t, $J=5\text{Hz}$, 4H),
5 1.67 (s, 1H), 1.41 (s, 9H) ppm.

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 154.9, 79.5, 56.3, 46.0, 44.8, 30.4, 28.5 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 187.3, calculée 187.3

b) Préparation du composé **3**: N-Boc-N'-benzyl-pipérazine



A une solution du composé **2** (10,0g, 5,7mmol, 1,0eq.), de benzaldéhyde (5,5mL, 53,7mmol, 1,0eq.) et de tamis moléculaire 4Å dans du DCM (200mL) refroidie à 0°C est ajouté en plusieurs portions du $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (17,6g, 80,6mmol, 1,5eq.). Le milieu réaction est agité à 0°C pendant 1h puis à TA pendant 2h. A la fin de la réaction, le mélange est filtré et le filtrat est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (3x150mL). La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : d'abord pur DCM puis DCM : MeOH / 95:5 / v:v) pour obtenir le composé **3** sous forme d'une huile incolore qui cristallise avec le temps (12,8g, 46mmol, rendement: 86%).

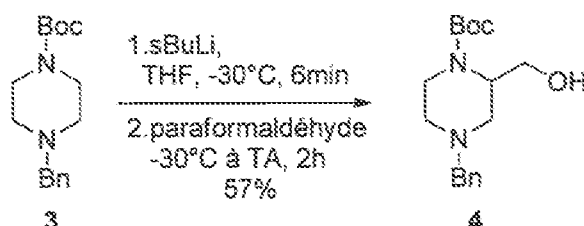
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.29 (m, 5H), 3.52 (s, 2H), 3.45 (t, $J=5\text{Hz}$, 4H), 2.40 (t, $J=5\text{Hz}$), 1.48 (s, 9H) ppm.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 154.90, 137.98, 129.25, 128.38, 127.26,
25 79.63, 63.18, 52.98, 43.61, 28.54 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 277.3, calculée 277.3

R_f = 0.32 (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 8:2 / v:v)

c) Préparation du composé 4: tert-butyl 4-benzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine-1-carboxylate



5 Dans un ballon préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'Argon est dissout le composé **3** (1,0g, 3,6mmol, 1,0eq.) dans du THF anhydre (20mL). Cette solution est refroidie à -30°C et le sBuLi (1,3M dans du Cyclohexane, 4,2mL, 1,5eq.) est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité à -30°C pendant 6 minutes avant que le

10 paraformaldéhyde (350mg, 11,6mmol, 3,2eq.) ne soit introduit rapidement en une seule portion. Cette suspension est agitée à -30°C pendant 30minutes, et 1h30 à TA avant d'être quenchée grâce à une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (20mL). La phase organique est séparée et la phase aqueuse est lavée deux fois avec Et₂O (2x20mL). Les phases

15 organiques sont combinées, séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : éther de pétrole : acétate d'éthyle / 7:3 / v:v) pour obtenir le composé **4** sous forme d'une huile jaune (625mg, 2,0mmol, rendement: 57%).

20 ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.32 (m, 5H), 4.12 (br s, 1H), 3.92 (m, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.40 (br s, 1H), 3.04 (d, J=11.6Hz, 1H), 2.86 (d, J=8.7Hz, 1H), 2.33 (dd, J=11.6Hz, 3.9Hz, 1H), 2.13 (td, J=11.6Hz, 3.9Hz, 1H), 1.49 (s, 9H) ppm.

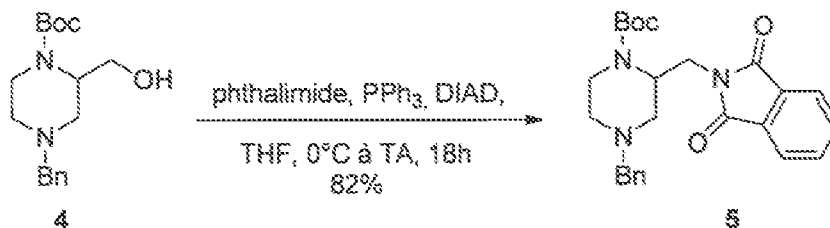
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 155.3, 137.3, 129.0, 128.6, 127.5, 80.0, 66.5, 63.1, 55.1, 52.6, 51.4, 41.7, 28.5 ppm.

25

MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 307.2, calculée 307.2

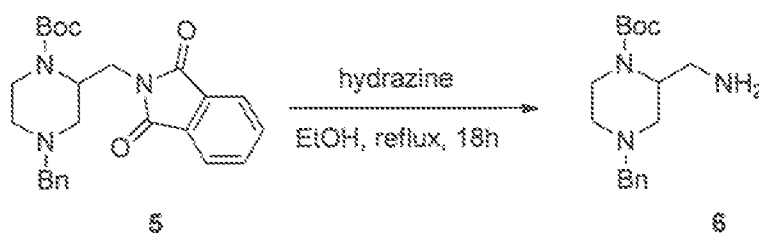
R_f = 0.28 (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 7:3 / v:v)

d) Préparation du composé 5: tert-butyl 4-benzyl-2-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



- 5 A une solution refroidie à 0°C du composé **4** (1,03g, 3,36mmol, 1,0eq.), de triphénylphosphine (1,07g, 4,03mmol, 1,2eq.) et de phthalimide (600mg, 4,03mmol, 1,2eq.) dans du THF anhydre (20mL) est ajouté goutte à goutte le DIAD (845μL, 4,03mmol, 1,2eq.). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min puis à TA pendant 18h. Les volatiles sont évaporés et l'huile
- 10 résultante est purifiée par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : éther de pétrole : acétate d'éthyle / 8:2 / v:v) pour obtenir le composé **5** sous forme de solide blanc (1,20g, 2,76mmol, rendement: 82%).
- ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.79 (m, 4H), 7.30 (m, 5H), 4.55(m, 1.5H), 4.45 (m, 0.5H), 3.98 (d, J=13Hz, 0.6H), 3.75 (d, J=12Hz, 0.4H), 3.48 (m, 4H), 2.28 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 1.08 + 1.03 (2xs, 9H) ppm.
- 15 ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 168.5, 168.2, 167.9, 155.1, 154.4, 138.2, 134.5, 134.1, 133.7, 132.8, 132.4, 129.0, 128.7, 128.5, 127.4, 123.7, 123.4, 123.3, 79.7, 62.9, 54.5, 53.3, 50.3, 48.8, 40.1, 38.6, 37.8, 28.4, 27.9 ppm.
- MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 436.3, calculée 436.2
- 20 R_f = 0.32 (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 8:2 / v:v)

e) Préparation du composé 6: tert-butyl 2-(aminométhyl)-4-benzylpipérazine-1-carboxylate



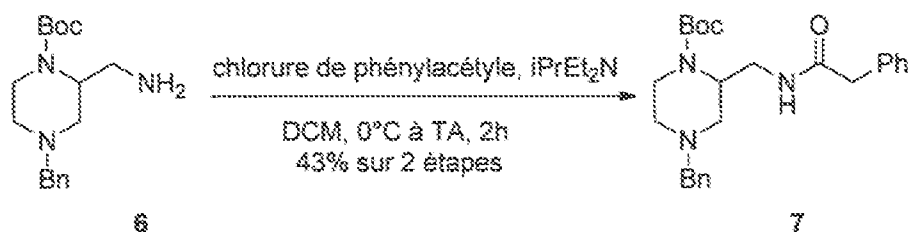
A une solution du composé **5** (1,20g, 2,76mmol, 1,0eq.) dans l'EtOH (30mL) est ajoutée l'hydrazine monohydrate (620mg, 12mmol, 4,0eq.) et le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 18h. A la fin de la réaction, la suspension est refroidie à TA et est filtrée. Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un solide qui est re-suspendu dans du DCM (50mL), filtré une fois de plus et le filtrat est lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x50mL) et une fois avec de la saumure (50mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée pour obtenir le composé **6** (610mg) sous forme d'huile. Ce produit est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.35 (m, 5H), 3.97 (br s, 2H), 3.57 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.43 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.07 (dd, J = 13.1, 7.0 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 13.1, 7.0 Hz, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.50 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 155.33, 138.36, 128.76, 128.49, 128.35, 128.13, 127.19, 79.74, 62.82, 53.55, 53.30, 53.13, 48.55, 41.64, 28.48, 21.99 ppm.

MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 306.3, calculée 306.2

f) Préparation du composé 7: tert-butyl 4-benzyl-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



A une solution refroidie à 0°C du composé **6** (600mg, 1,96mmol, 1,0eq.) et de diisopropyléthylamine (DIPEA) (530μL, 3,0mmol, 1,5eq.) dans du DCM anhydre (15mL) est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de phénylacétyle (318μL, 2,35mmol, 1,2eq.) dans du DCM anhydre (5mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min puis à TA pendant 1h30. A la fin de la réaction, le mélange est lavé trois fois avec une solution

aqueuse saturée de NaHCO_3 (3x20mL). La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : éther de pétrole : acétate d'éthyle / 55:45 / v:v) pour obtenir le composé **7** sous forme solide visqueux (500mg, 1.16mmol, rendement: 46% sur 2 étapes).

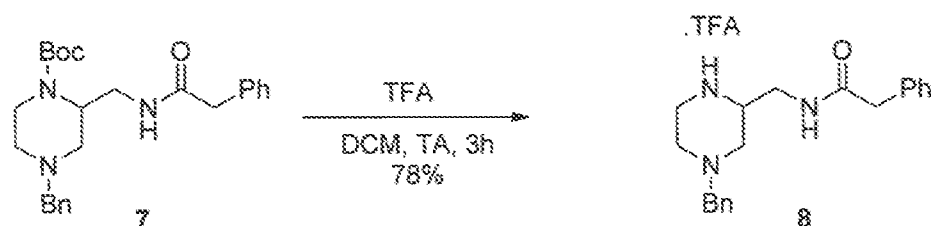
^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.27 – 7.06 (m, 10H), 6.12 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.43 – 3.36 (m, 3H), 3.21 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 2.61 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 2.57 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 1.99 (dd, J = 11.6, 3.8 Hz, 1H), 1.92 (td, J = 11.6, 3.8 Hz, 1H), 1.36 (s, 9H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ = 171.0, 137.8, 135.1, 129.4, 128.9, 128.9, 128.8, 128.4, 127.3, 127.2, 80.1, 62.8, 54.2, 53.0, 49.7, 43.9, 41.0, 40.1, 28.5 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 424.3, calculée 424.3

R_f = 0,23 (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 6:4 / v:v)

g) Préparation du composé 8: N-((4-benzylpipérazin-2-yl)méthyl)-2-phénylacétamide, sous la forme de sel avec l'acide trifluoroacétique



A une solution du composé **7** (500mg, 1.18mmol, 1.0eq.) dans du DCM (4mL) est ajouté de l'acide trifluoroacétique (TFA) (4mL) et le mélange réactionnel est agité à TA pendant 3h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite, redissout dans du DCM et évaporé une nouvelle fois. Cette opération est répétée deux autres fois. L'huile résultant est dissoute dans du MeOH et le produit est précipité dans de l' Et_2O . La suspension est filtrée et séchée à l'air pour obtenir le composé **8** sous forme d'une poudre blanche (401mg, 0,92mmol, rendement: 78%).

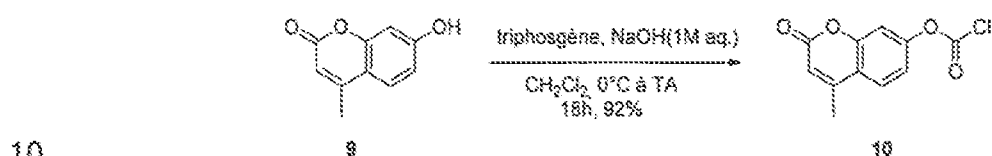
^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD): δ = 7.42 – 7.22 (m, 9H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.53 – 3.46 (m, 1H), 3.41 – 3.36 (m, 3H), 3.15 (td, J = 11.3,

3.5 Hz, 1H), 2.98 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 2.44 (t, $J = 11.3$ Hz, 1H), 2.24 (t, $J = 11.3$ Hz, 1H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 175.40, 136.40, 130.39, 130.26, 129.70, 129.62, 128.85, 128.13, 63.15, 56.87, 53.89, 50.29, 49.54, 44.80, 43.69, 40.74$ ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 324.3, calculée 324.3

II - Préparation de l'intermédiaire **10**, le : 4-méthyl-2-oxo-2H-chromèn-7-yl carbonochloridate



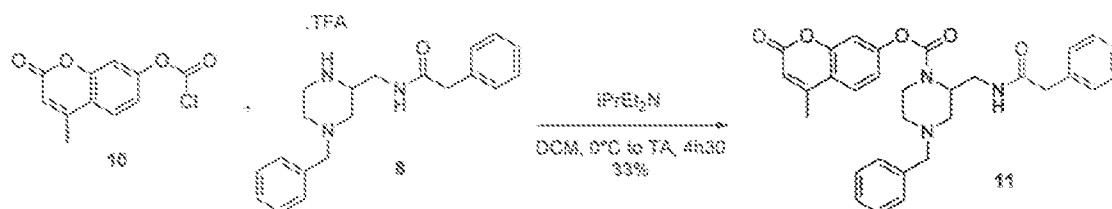
A une solution refroidie à 0°C de triphosgène (420 mg, 1,4 mmol, 0,7 eq) dans du DCM (10 mL) est ajoutée la 4-méthylumbelliférone **9** (360 mg, 2,0 mmol) en une portion. A cette suspension est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de NaOH (2M, 1,1 mL, 2,2 mmol, 1,1 eq) et le mélange réactionnel est agité à 0 °C pendant 1h puis à TA pendant 18h. La suspension est ensuite filtrée et le solide résultant est lavé deux fois avec du DCM et séché à l'air pour donner environ la moitié de la masse de composé **10** attendue (202 mg, 0,85 mmol). Le filtrat est alors lavé deux fois avec de l'eau et la phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée pour donner une autre portion de composé **10** (240 mg, 1,0 mmol) sous forme d'une poudre blanche. Le rendement global de cette réaction est de 93 %.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.69\text{-}7.62$ (m, 1H), $7.33\text{-}7.19$ (m, 2H), 6.31 (s, 1H), 2.46 (s, 3H,) ppm.

25 $R_f = 0.47$ (cyclohexane : acétate d'éthyle / 6:4 / v:v)

III - Préparation du composé **12**, l'hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((2-phénylacétamido) méthyl)pipérazine-1-carboxylate
(EXEMPLE 1)

a) Préparation du composé **11**: 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl-4-benzyl-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



A une solution refroidie à 0°C du composé **10** (230mg, 0,96mmol, 1,05eq.) dans du DCM anhydre (10mL) sous une atmosphère inerte d'argon est additionnée goutte à goutte une solution du composé **8** (400mg, 0,91mmol, 1,0eq.) et de DIPEA (480µL, 2,73mmol, 3,0eq.) dans du DCM anhydre (5mL). Le mélange réactionnel est ensuite agité à 0°C pendant 30min puis à TA pendant 4h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3x20mL) et la phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : gradient de DCM : MeOH / 99:1, 98:2, 97:3 / v:v) pour obtenir le composé **11** sous forme d'une huile incolore (160mg, 0,31mmol, rendement: 33%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.46 (2xd, J = 8.5 Hz, 1H), 7.26 – 7.06 (m, 10H), 7.02 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.25 (s, 0.5H), 6.13 (br s, 1H), 6.04 (s, 0.5H), 4.33 (s, 0.5H), 4.16 (s, 0.5H), 4.06 – 3.99 (m, 0.5H), 3.91 (t, J = 13.2 Hz, 1H), 3.70 – 3.61 (m, 0.5H), 3.50 – 3.34 (m, 4H), 3.28 (t, J = 12.6 Hz, 1H), 3.20 – 3.05 (m, 1H), 2.72 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 2.65 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.31 (d, J = 7.7 Hz, 3H), 2.13 (dd, J = 11.9, 4.0 Hz, 1H), 2.06 (t, J = 11.8 Hz, 1H) ppm.

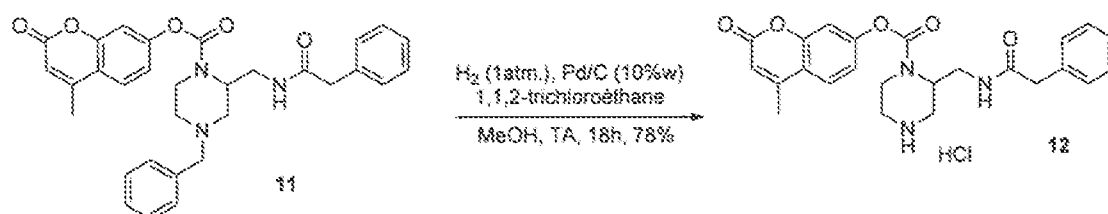
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 171.23, 160.68, 154.08, 153.82, 153.40, 152.76, 152.12, 137.53, 134.76, 129.38, 129.31, 128.90, 128.88, 128.44, 127.40, 127.24, 125.22, 118.11, 117.96, 117.37, 117.24, 114.20, 114.12,

110.29, 110.07, 62.63, 54.00, 53.85, 53.51, 52.74, 51.14, 43.79, 40.97, 40.46, 40.37, 18.72 ppm.

MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 526.3, calculée 526.3

$R_f = 0.38$ (DCM : MeOH / 97:3 / v:v)

5 **b) Préparation du 12: hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate**



10

Un ballon contenant une solution du composé **11** (120mg, 0,23mmol, 1,0eq.) et du 1,1,2-trichloroéthane (25μL, 0,25mmol, 1,1eq.) dans du MeOH (5mL) est purgée pendant 5min avec du H₂. Le Pd/C (10%, 24mg) est ajouté et le ballon est de nouveau purgé avec du H₂ pendant 5min. Le mélange réactionnel est ensuite agité à TA pendant 18h sous une atmosphère de H₂. A la fin de la réaction, le mélange est filtré sur Celite® et le filtrat est évaporé sous pression réduite jusqu'à un volume approximatif de 2mL. Et₂O est alors ajouté pour faire précipiter le produit. La suspension résultante est filtrée et séchée à l'air pour donner le composé **12** sous forme d'une poudre blanche (85mg, 0.18mmol, rendement: 78%).

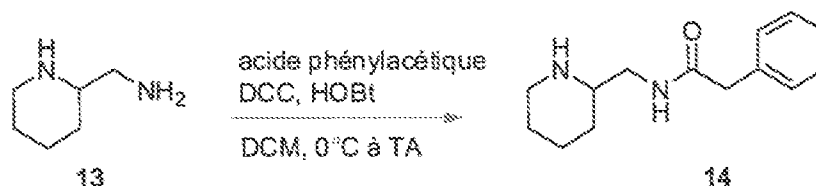
¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ = 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.35 – 7.07 (m, 7H), 6.33 (s, 1H), 4.63 (2xs, 1H), 4.33 (2xs, 1H), 3.78 – 3.66 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.45 – 3.32 (m, 3H), 3.21 (s, 1H), 2.49 (s, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ = 175.07, 162.63, 155.25, 155.00, 136.46, 130.19, 129.71, 128.09, 127.15, 119.38, 119.02, 114.83, 111.09, 50.92, 50.42, 44.39, 44.04, 43.75, 38.60, 38.32, 37.44, 37.39, 18.72 ppm.

HRMS: C₂₄H₂₆N₃O₅ $[M+H]^+$ m/z trouvée 436.1858 calculée 436.1867

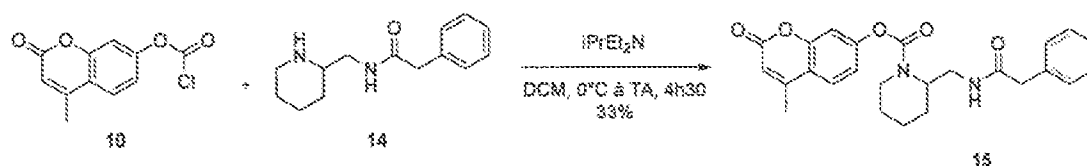
25

IV - Préparation de l'intermédiaire **14**, le 2-phényl-N-(pipéridin-2-ylméthyl)acétamide



- A une suspension d'acide phénylacétique (1,54g, 11,2mmol, 1,0eq.) et d'HOBT (1,66g, 12,3 mmol, 1,1 eq) dans du DCM (30 mL) est additionnée une solution de dicyclohexylcarbodiimide (2,56g, 12,3 mmol, 1,1 eq) dans du DCM (10 mL). Le mélange résultant est agité à TA pendant 30min avant que la 2-(aminométhyl)pipéridine **13** (1,4mL, 11,2 mmol, 1,0 eq) ne soit ajoutée. Le mélange réactionnel est ensuite agité à TA pendant 2h. La suspension résultante est filtrée et le filtrat est lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x50 mL). La phase organique est ensuite extraite plusieurs fois avec une solution aqueuse à 10% de KH₂PO₄ jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse soit stable autour de pH 3. Du DCM (150 mL) est ensuite ajouté aux phases aqueuses recombinaées et une solution aqueuse de NaOH (2M) est additionnée jusqu'à ce que le pH de la phase aqueuse atteigne pH 12. La phase organique est soutirée et la phase aqueuse basique est extraite deux fois avec du DCM (2x100 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et évaporées pour donner le composé **14** sous forme de solide blanc (2,07g, 8,9mmol, rendement: 80%).
- ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.83 (m, 5H), 5.80 (s, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.59 (m, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), 1.32 (m, 4H), 1.03 (m, 1H) ppm.
- MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 233.3, calculée 233.3

V - Préparation du composé **15**, le 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipéridine-1-carboxylate (**comparatif 1**)



- 5 A une suspension refroidie à 0°C du composé **10** (39mg, 0,16mmol, 1,05eq.) dans du DCM anhydre (5mL) sous une atmosphère inerte d'argon, est additionné le composé **14** (25mg, 0,15mmol, 1,0eq.) suivi par la DIPEA (55µL, 0,30mmol, 2,0eq.). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min et à TA pendant 4h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est
- 10 lavé trois fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3x20mL) et la phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : gradient de DCM : MeOH / 99:1, 98:2, 97:3 / v:v) pour obtenir le composé **15** sous forme d'une huile incolore (35mg, 0,31mmol, rendement:
- 15 54%).

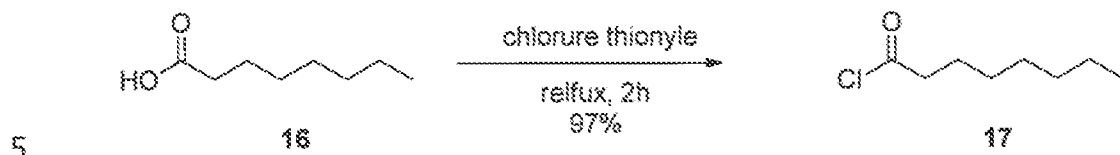
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.49 (s, 1H), 7.30 – 7.04 (m, 5H), 7.04 – 6.88 (m, 2H), 6.16 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.48 – 4.23 (m, 1H), 4.03 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.64 – 3.27 (m, 3H), 3.12 (s, 1H), 2.35 (s, 3H), 1.77 – 1.36 (m, 6H) ppm.

- 20 ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 171.42, 160.73, 154.14, 153.99, 153.83, 152.12, 134.62, 129.75, 129.36, 129.00, 128.38, 127.35, 126.76, 125.19, 118.10, 117.32, 114.20, 110.34, 53.51, 51.09, 50.93, 46.72, 43.69, 41.28, 40.83, 40.64, 39.53, 38.94, 31.69, 26.53, 25.28, 24.39, 23.04, 19.09, 18.76 ppm.

- 25 HRMS: C₂₅H₂₈N₂NaO₅ [M+Na]⁺ m/z trouvée 457.1734 calculée 457.1734
R_f = 0.27 (DCM : MeOH / 98:2 / v:v)

VI - Préparation de l'intermédiaire **19**, le(4-benzylpipérazin-2-yl)méthyl octanoate sous la forme de sel avec l'acide trifluoroacétique

a) Préparation du composé **17** : chlorure d'octanoyle

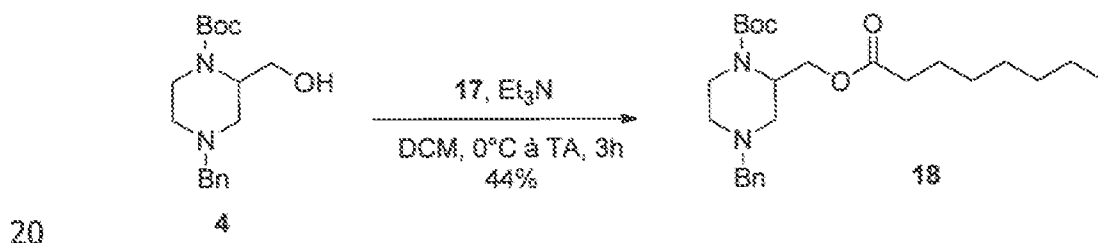


A de l'acide octanoïque **16** (10,0g, 69mmol, 1,0eq.) est additionné goutte à goutte du chlorure de thionyle (30mL, 410mmol, 6,0eq.). Ce mélange réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 2h, puis refroidi à TA et les volatiles sont évaporés sous pression réduite. L'huile résultante est reprise dans du DCM et la solution est à nouveau évaporée. Cette procédure est répétée deux fois supplémentaires pour obtenir le composé **17** sous forme d'un liquide jaune très odorant (11,0g, 66,7mmol, rendement: 97%).

¹H-RNM (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.87 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.70 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.42 – 1.22 (m, 8H), 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 3H) ppm.

15 ¹³C-RNM (75 MHz, CDCl₃) δ = 173.89, 47.23, 31.64, 28.85, 28.51, 25.20, 22.65, 14.11 ppm.

b) Préparation du composé **18** : tert-butyl 4-benzyl-2-((octanoyloxy)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



A une solution refroidie à 0°C du composé **4** (800mg, 3,72mmol, 1,0eq.) et de triéthylamine (780μL, 5,6mmol, 1,5eq.) dans du DCM anhydre (10mL) est additionnée goutte à goutte une solution du composé **17** (667mg; 4,1mmol, 1,1eq.) dans du DCM anhydre (5mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min puis à TA pendant 2h30. Il est ensuite dilué avec du DCM (35mL) et lavé une fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃.

(50mL), une fois avec de l'eau (50mL), une fois avec une solution aqueuse d'HCl (1M - 50mL) et une fois avec de la saumure (50mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (DCM pur, puis
 5 DCM : acétate d'éthyle / 90:10) pour obtenir **18** sous forme d'une huile jaune (710mg, 1.64mmol, rendement : 44%).

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ = 7.34 – 7.16 (m, 5H), 4.39 – 4.18 (m, 3H), 3.88 (s, 1H), 3.53 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.37 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.09 (t, J = 11.3 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.20 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.14 –
 10 1.95 (m, 2H), 1.60 – 1.49 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.25 (s, 8H), 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ = 173.72, 154.91, 138.16, 128.93, 128.42, 127.29, 79.97, 62.83, 61.56, 53.10, 52.82, 34.36, 31.80, 29.25, 29.04, 28.52, 24.95, 22.73, 14.20 ppm.

15 MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 433.3, calculée 433.3

c) Préparation du composé 19: (4-benzylpipérazin-2-yl)méthyl octanoate sous la forme de sel avec l'acide trifluoroacétique



20 La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **8**, mais en utilisant le composé **18** (700mg, 1.62mmol, 1.0eq.) dans du DCM (5mL) et du TFA (5mL) pour donner le composé **19** sous forme d'une poudre blanche (775mg, rendement: quantitatif).

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ = 7.41 – 7.27 (m, 5H), 4.30 (dd, J = 12.5, 3.9
 25 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 12.5, 6.4 Hz, 1H), 3.70 – 3.63 (m, 1H), 3.46 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.28 – 3.12 (m, 3H), 2.71 (td, J = 12.2, 12.2, 2.6 Hz, 1H), 2.61 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.66 – 1.52 (m, 2H), 1.30 (s, 8H), 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3H) ppm.

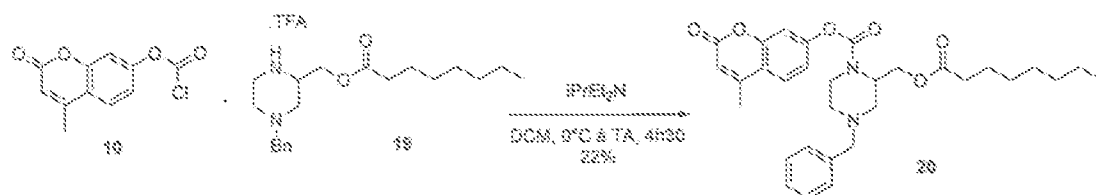
^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD): δ = 174.57, 162.06, 161.77, 135.40, 130.95, 129.86, 129.62, 118.70, 116.40, 62.75, 62.55, 54.98, 52.20, 49.86, 43.97, 34.47, 32.84, 30.13, 30.07, 25.72, 23.65, 14.38 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 333.3, calculée 333.2

5

VII- Préparation du composé **21**, l'hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((octanoyloxy)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (**EXEMPLE 2**)

10 a) Préparation du composé **20**: 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 4-benzyl-2-((octanoyloxy)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **11**, avec le composé **10** (400mg, 1,67mmol, 1,0eq.), le composé **19** (750mg, 1,67mmol, 1,0eq.) et la DIPEA (880 μL , 5,02mmol, 3,0eq.) dans du DCM anhydre (20mL). Après chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 7:3 / v:v), on obtient le composé **20** sous forme d'un solide incolore (190mg, 0,36mmol, rendement: 22%).

20 ^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD): δ = 7.52 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.24 – 7.16 (m, 1H), 7.11 – 7.00 (m, 2H), 6.18 (s, 1H), 4.57 – 4.38 (m, 2H), 4.27 (s, 1H), 4.09 – 3.95 (m, 1H), 3.54 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.39 (d, J = 13.0 Hz, 1H), 3.23 (t, J = 11.9 Hz, 0.5H), 2.82 (d, J = 11.3 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.21 – 2.10 (m, 3H), 1.55 – 1.43 (m, 2H), 1.26 – 1.12 (m, 8H), 0.87 – 0.75 (m, 3H) ppm.

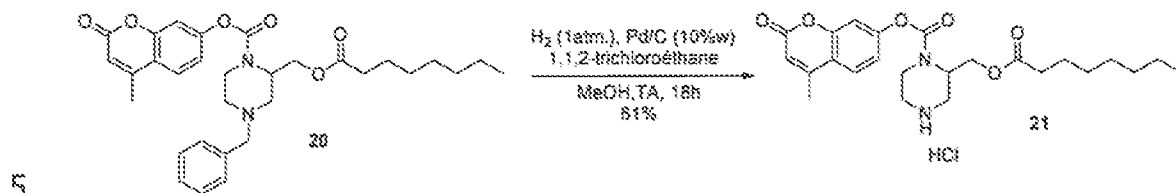
25

^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD): δ = 173.46, 160.56, 154.10, 153.82, 152.88, 152.00, 137.65, 128.76, 128.35, 127.29, 125.17, 118.11, 117.90, 117.29, 114.14, 110.25, 110.05, 62.57, 61.57, 61.28, 52.75, 52.62, 51.16, 50.57, 41.02, 40.21, 34.13, 31.58, 29.03, 28.86, 24.76, 22.54, 18.65, 14.03 ppm.

MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 535.3, calculée 535.3

$R_f = 0.26$ (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 7:3 / v:v)

b) Préparation du composé 21: hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((octanoyloxy)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



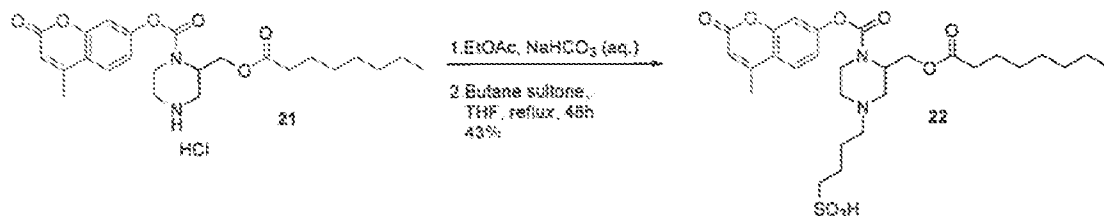
La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **12**, avec le composé **20** (180mg, 0,33mmol, 1,0eq.), du 1,1,2-trichloroéthane (37 μ L, 0,39mmol, 1,1eq.), du Pd/C (38mg, 20%w) dans du MeOH (5mL) pour obtenir le composé **21** sous forme d'une poudre blanche (95mg, 0,20mmol, rendement: 61%).

^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.82$ (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.32 – 7.13 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.43 – 4.22 (m, 2H), 3.53 (d, $J = 13.4$ Hz, 2H), 3.45 (d, $J = 11.7$ Hz, 3H), 3.26 (s, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.35 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.26 (dd, $J = 28.7, 21.9$ Hz, 9H), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 174.84, 162.51, 155.27, 154.96, 154.90, 154.05, 127.20, 119.25, 119.06, 114.87, 111.01, 61.14, 43.94, 43.50, 34.83, 32.80, 30.17, 30.07, 25.89, 23.63, 18.67, 14.36$ ppm.

HRMS: $C_{24}H_{33}N_2O_6$ $[M+H]^+$ m/z trouvée 445.2318 calculée 445.2333

VIII - Préparation du composé **22**, l'acide 4-(4-(((4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)carbonyl)-3-((octanoyloxy)méthyl)pipérazin-1-yl)butane-1-sulfonique (**EXEMPLE 3**)



5

A une suspension du composé **21** (25mg, 0,052mmol, 1,0eq.) dans l'acétate d'éthyle (10mL) est ajoutée une solution aqueuse de NaHCO (1M, 10mL). La phase organique est soutirée et la phase aqueuse est lavée trois fois avec de l'acétate d'éthyle (3x10mL). Les phases organiques combinées sont séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et évaporées pour donner une huile incolore. Cette huile est dissoute dans du THF anhydre (2,5mL), et de la butane sulfone est ajoutée (2 gouttes) et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 48h. A la fin de la réaction, il est dilué avec du THF (2,5mL) et de l'Et₂O (5mL) et de l'eau est ajoutée (10mL). La phase aqueuse est séparée et lyophilisée pour donner le composé **22** sous forme d'un solide blanc très hygroscopique (13mg, 0,022mmol, rendement: 43%).

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD): δ = 7.72 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.21 – 7.03 (m, 2H), 6.23 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.38 – 4.12 (m, 2H), 3.62 – 3.24 (m, 4H), 3.12 – 2.83 (m, 3H), 2.80 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.42 – 2.35 (m, 3H), 2.29 – 2.17 (m, 2H), 1.91 – 1.73 (m, 4H), 1.47 (s, 2H), 1.25 – 0.98 (m, 10H), 0.74 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ppm.

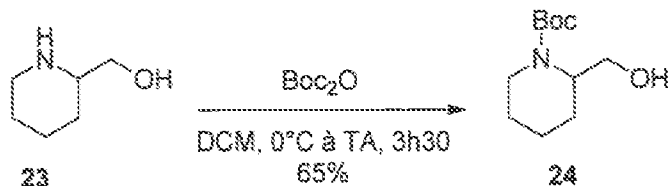
¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD): δ = 162.54, 155.30, 155.02, 154.93, 127.23, 119.30, 118.88, 114.88, 34.89, 32.83, 30.21, 30.10, 25.92, 23.67, 23.24, 18.71, 14.40 ppm.

HRMS: C₂₈H₄₀N₂NaO₉S [M+Na]⁺ m/z trouvée 603.2339 calculée 603.2347

25

IX - Préparation du composé **27**, le 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((octanoyloxy)méthyl)pipéridine-1-carboxylate (**comparatif 2**)

a) Préparation du composé 24: N-Boc-2-(hydroxyméthyl)pipéridine

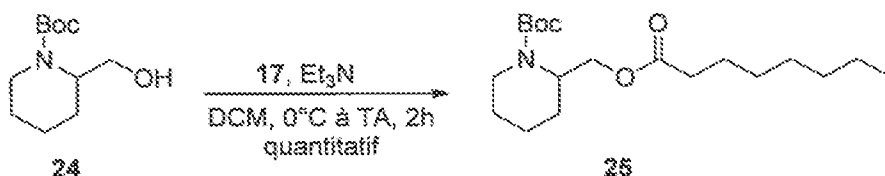


5 A une solution refroidie à 0°C du composé **23** (5g, 43mmol, 1,0eq.) dans du DCM (20mL) est ajoutée goutte à goutte une solution de Boc₂O (6,6g, 47mmol, 1,1eq.) dans du DCM (10mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min, puis à TA pendant 3h. Il est ensuite dilué avec du DCM (30mL) et lavé une fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3x60mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée pour obtenir le composé **24** (6,02g, 28mmol, rendement: 65%) sous forme d'un solide jaune.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 4.36 – 4.22 (m, 1H), 3.94 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.88 – 3.75 (m, 1H), 3.67 – 3.53 (m, 1H), 2.87 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H), 2.01 (br s, 1H), 1.73 – 1.52 (m, 4H), 1.52 – 1.38 (m, 11H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 156.43, 79.92, 61.86, 52.68, 40.14, 28.57, 25.39, 25.35, 19.76 ppm.

b) Préparation du composé 25: N-Boc-2-((octanoyloxy)méthyl)pipéridine



20

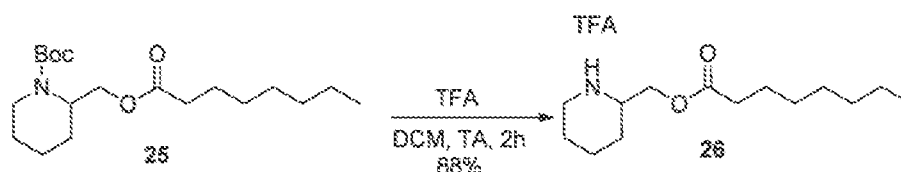
A une solution refroidie à 0°C du composé **17** (6,0g, 27,8mmol, 1,0eq.) et de triéthylamine (6mL, 42mmol, 1,5eq.) dans du DCM sec (40mL) est ajoutée goutte à goutte une solution du composé **24** (5,0g, 30,6mmol, 1,1eq.) dans du DCM sec (20mL). Le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min et à TA pendant 3h. Il est ensuite dilué avec du DCM (40mL) et lavé une fois avec de l'HCl 1M (100mL), une fois avec de l'eau (50mL), une fois avec NaOH 1M (100mL), et une fois avec de la saumure (100mL). La phase

organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée à sec pour donner le composé **25** (9,82g, rendement quantitatif) sous la forme d'un liquide jaune utilisé sans autre purification.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 4.40 (s, 0.6H), 4.26 – 4.11 (m, 0.9H), 4.10 – 3.99 (m, 1.3H), 3.99 – 3.80 (m, 0.8H), 3.76 – 3.64 (m, 0.2H), 3.59 – 3.47 (m, 0.2H), 2.86 – 2.65 (m, 0.8H), 2.48 (s, 0.2H), 2.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 0.2H), 2.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.68 – 1.43 (m, 6H), 1.43 – 1.30 (m, 9H), 1.30 – 1.08 (m, 10H), 0.80 (t, *J* = 5.9 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 173.77, 155.15, 79.54, 61.71, 34.38, 31.75, 29.21, 28.99, 28.52, 25.50, 25.35, 24.98, 22.67, 19.42, 14.13 ppm.

c) Préparation du composé 26: pipéridine-2-ylméthyl octanoate sous la forme de sel avec l'acide trifluoroacétique



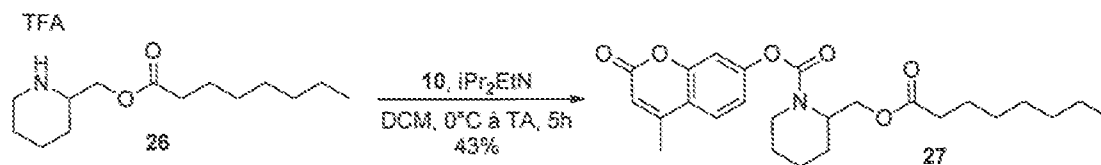
15 La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **8**, mais en utilisant le composé **25** (700mg, 1,62mmol, 1,0eq.) dans du DCM (3mL) et du TFA (3mL) pour donner le composé **26** sous forme d'une poudre blanche (910mg, 2,56mmol, rendement : 88%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 8.93 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 4.54 (d, *J* = 5.4 Hz, 0.1H), 4.32 (d, *J* = 3.4 Hz, 0.3H), 4.28 (d, *J* = 3.4 Hz, 0.6H), 4.23 – 4.07 (m, 1H), 3.50 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.43 – 3.26 (m, 1H), 3.03 – 2.83 (m, 1H), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.06 – 1.46 (m, 8H), 1.39 – 1.17 (m, 9H), 0.87 (t, *J* = 5.7 Hz, 3H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 173.81, 161.67, 117.60, 63.67, 56.40, 45.11, 33.69, 31.71, 29.06, 28.95, 25.16, 24.67, 22.66, 22.06, 21.97, 14.10 ppm.

MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 241.2, calculée 241.2

d) Préparation du composé 27: 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((octanoyloxy)méthyl)pipéridine-1-carboxylate



5 La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **11**, avec le composé **10** (190mg, 0,79mmol, 1,0eq.) le composé **26** (285mg, 0,79mmol, 1,0eq.) et la DIPEA (700μL, 3,95mmol, 4,0eq.) dans du DCM anhydre (10mL). Après chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 75:25 / v:v), on obtient le composé **27** sous

10 forme d'une huile incolore (150mg, 0,34mol, rendement 43%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.57 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.16 – 7.05 (m, 2H), 6.24 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.41 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 4.22 – 4.10 (m, 2H), 3.13 (br s, 0.5H), 2.98 (br s, 0.5H), 2.42 (s, 3H), 2.28 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.85 – 1.66 (m, 4H), 1.65 – 1.50 (m, 4H), 1.24 (br s, 8H), 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 3H)

15 ppm.

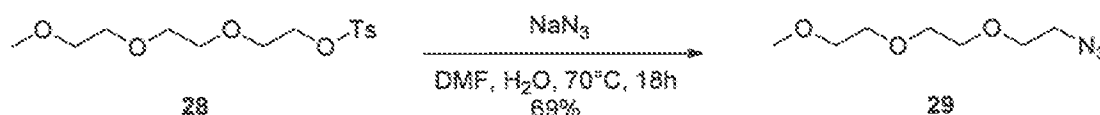
¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ = 173.77, 160.82, 154.33, 154.20, 153.29, 152.12, 125.22, 118.25, 117.39, 114.31, 110.39, 61.67, 50.35, 50.00, 40.89, 40.09, 34.37, 31.75, 29.22, 29.03, 25.81, 25.12, 24.99, 22.70, 19.32, 18.85, 14.17 ppm.

20 HRMS: C₂₅H₃₃NNaO₆ [M+Na]⁺ m/z trouvée: 466.2179 calculée 466.200

R_f = 0.34 (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 75:25 / v:v)

X - Préparation du composé **31**, le 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phenylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (EXEMPLE 4)

25 **a) Préparation du composé 29, 1-azido-2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthane**



A une solution du composé **28** (2,0g, 6,28mmol, 1,0eq.) dans un mélange DMF (15mL) et eau (8mL) est additionné le NaN₃ (2,04g, 31,40mmol, 5,0eq.) en une portion. Ce mélange réactionnel est ensuite chauffé à 70°C pendant 18h. Les volatiles sont ensuite évaporés et le solide résultant est repris dans l'acétate d'éthyle (50mL). La suspension est filtrée et le filtrat est lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x50mL), puis une fois avec de la saumure (50mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée pour donner le composé **29** sous forme d'une huile incolore (820mg, 4,33mmol, rendement : 69%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 3.68 – 3.57 (m, 8H), 3.55 – 3.48 (m, 2H), 3.38 – 3.32 (m, 5H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 71.94, 70.71, 70.68, 70.63, 70.05, 59.04, 50.69 ppm.

R_f = 0.56 (éther de pétrole : acétate d'éthyle/ 1:1 / v:v)

b) Préparation du composé 30, 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 4-(pent-4-ynoyle)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



A une suspension du composé **12** (50mg, 0,106mmol, 1,0eq.), d'acide pentynoïque (12mg, 0,117mmol, 1,1eq.) et de HATU (46mg, 0,117mmol, 1,1eq.) dans du DCM anhydre (5mL) sous atmosphère inerte d'argon, est additionnée la DIPEA (42μL, 0,240mmol, 2,2eq.) et le mélange réactionnel est agité à TA pendant 2h30. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est dilué avec du DCM (20mL) et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x20mL) et une fois avec de la saumure (20mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur alumine neutre

(Ether de pétrole : Acétate d'éthyle / 1:9 / v:v) pour obtenir le composé **30** sous forme d'une huile incolore (60mg, rendement: quantitatif).

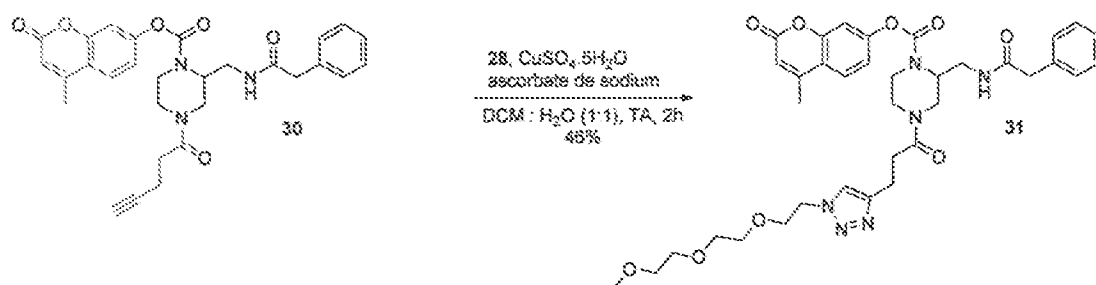
^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ = 7.59 (dd, J = 14.8, 8.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 7.21 – 7.02 (m, 2H), 6.73 – 6.45 (m, 1H),
 5 6.32 – 6.04 (m, 1H), 4.67 – 4.25 (m, 2H), 4.17 – 3.69 (m, 3H), 3.66 – 3.47 (m, 3H), 3.45 – 3.18 (m, 2H), 3.18 – 2.89 (m, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.74 – 2.63 (m, 1H), 2.60 – 2.47 (m, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.20 (s, 1H), 2.13 – 1.96 (m, 1H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ = 171.52, 171.36, 170.69, 170.37, 170.27,
 10 165.73, 160.62, 154.03, 153.52, 153.23, 152.78, 152.16, 134.78, 134.65, 129.23, 128.97, 128.88, 127.33, 127.21, 125.35, 117.97, 117.58, 117.45, 114.33, 114.22, 110.28, 110.16, 83.32, 83.05, 69.34, 69.03, 53.52, 51.33, 45.59, 45.20, 45.03, 43.62, 42.37, 42.19, 41.21, 40.48, 40.19, 39.98, 38.62, 38.05, 37.50, 31.77, 18.74, 14.66, 14.36 ppm.

15 MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 515.3, calculée 515.2

R_f = 0.20 (ether de pétrole : acétate d'éthyle/ 1:9 / v:v)

c) Préparation du composé 31, 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phenylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



A une solution du composé **30** (30mg, 0,058mmol, 1,0eq.) et du composé **28** (24mg, 0,128mmol, 2,2eq.) dans un mélange DCM (1mL) et eau (1mL)
 25 sont additionnés le $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9mg, 0,04mmol, 0,6eq.) et l'ascorbate de sodium (16mg, 0,08mmol, 1,2eq.) en une portion. Ce mélange réactionnel est ensuite agité à TA pendant 2h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est dilué avec du DCM (10mL) et de l'eau (10mL). La phase

organique est soutirée et la phase aqueuse est lavée trois fois avec du DCM (3x10mL). Les phases organiques combinées sont séchées avec du Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éluant : gradient de DCM : MeOH / 100 : 0, 99:1, 98:2, 97:3, 96 : 4, 95 : 5 / v:v) pour donner le composé **31** sous forme d'une poudre blanche (19mg, 0,027mmol, rendement : 46%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ = 7.96 (s, 0.25H), 7.47 (m 1.5H), 7.32 – 6.94 (m, 7H), 6.61 (s, 0.2H), 6.21 (m, , 1H), 5.86 (s, 0.2H), 4.73 (s, 0.25H), 4.55 – 4.17 (m, 3H), 4.01 – 3.69 (m, 4.5H), 3.65 – 3.61 (m, 1.5H), 3.59 – 3.50 (m, 6.5H), 3.50 – 3.38 (m, 3H), 3.31 (d, J = 5.4 Hz, 2.5H), 3.26 – 2.55 (m, 6.5H), 2.36 (s, 3H), 1.74 (s, 1H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ = 172.66, 171.54, 170.71, 160.77, 154.23, 153.64, 152.93, 152.10, 135.49, 134.96, 134.70, 129.42, 129.03, 128.85, 127.35, 127.14, 125.36, 122.96, 118.17, 117.60, 114.42, 110.45, 72.04, 70.64, 69.56, 67.21, 59.18, 51.27, 50.71, 50.21, 45.48, 45.21, 44.77, 44.02, 43.86, 42.43, 42.22, 41.15, 40.55, 40.24, 40.00, 39.36, 38.12, 37.72, 37.42, 32.04, 31.66, 29.81, 28.81, 21.34, 20.57, 18.86 ppm.

MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 704.5, calculée 704.3

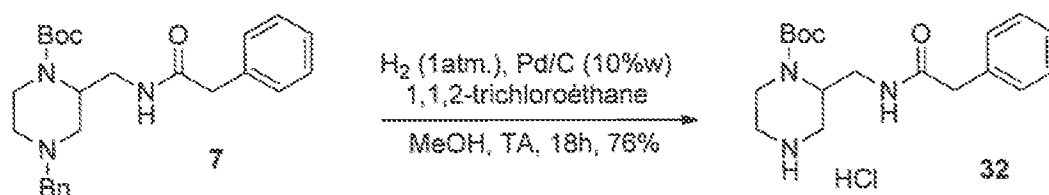
R_f = 0.30 (DCM : MeOH/ 95:5 / v:v)

20

XI - Préparation de l'intermédiaire **34**, N-((4-(pent-4-ynoyl)pipérazin-2-yl)méthyl)-2-phénylacétamide sous forme de sel avec l'acide trifluoroacétique

a) Préparation du composé **32, tert-butyl 2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate sel d'hydrochlorure**

25



La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **12**, avec le composé **7** (605mg, 1,53mmol, 1,0eq.), du 1,1,2-

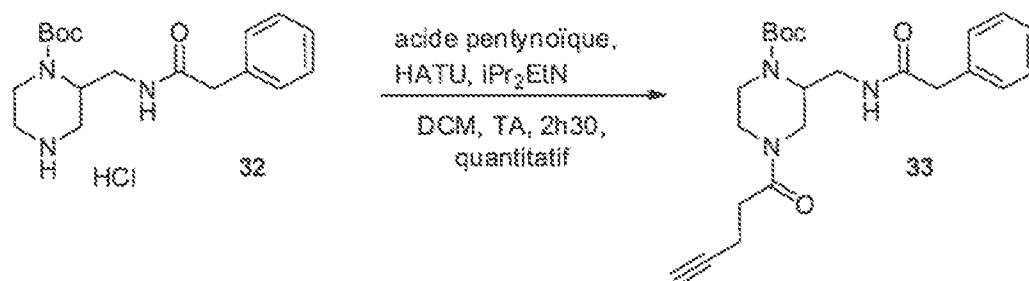
trichloroéthane (161μL, 1,70mmol, 1,1eq.), du Pd/C (121mg, 20%massique) dans du MeOH (30mL) pour obtenir le composé **32** sous forme d'une poudre blanche (430mg, 1,16mmol, rendement: 76%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ = 7.43 – 7.15 (m, 5H), 6.25 (s, 1H), 4.47 – 4.15 (m, 2H), 4.00 – 3.57 (m, 2.7H), 3.52 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 3.33 (m, 0.7H), 3.28 – 2.85 (m, 2.8H), 2.68 – 2.29 (m, 4.5H), 2.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H) ppm.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ = 171.53, 171.33, 170.51, 170.26, 165.70, 154.91, 134.84, 129.22, 128.92, 128.78, 127.26, 127.09, 83.36, 83.06, 80.81, 69.19, 68.90, 53.49, 49.97, 45.37, 43.60, 42.10, 41.32, 31.77, 31.69, 28.29, 14.55, 14.29 ppm.

MS: ESI: [M+H]⁺ m/z trouvée 333.2, calculée 333.2

b) Préparation du composé 33, tert-butyl 4-(pent-4-ynoyle)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



15

A une suspension refroidie à 0°C du composé **32** (410mg, 1,11mmol, 1,0eq.), d'acide pentynoïque (122mg, 1,22mmol, 1,1eq.) et de HATU (473mg, 1,22mmol, 1,1eq.) dans du DCM anhydre (30mL) sous atmosphère inerte d'argon, est additionnée la DIPEA (395μL, 2 ;25mmol, 2 ;2eq.) et le mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 15min, puis à TA pendant 2h15. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est dilué avec du DCM (20mL) et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x50mL) et une fois avec de la saumure (50mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur alumine neutre (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 15:85 / v:v) pour obtenir le composé **33** sous forme d'un solide légèrement jaune (552mg, rendement: quantitatif).

25

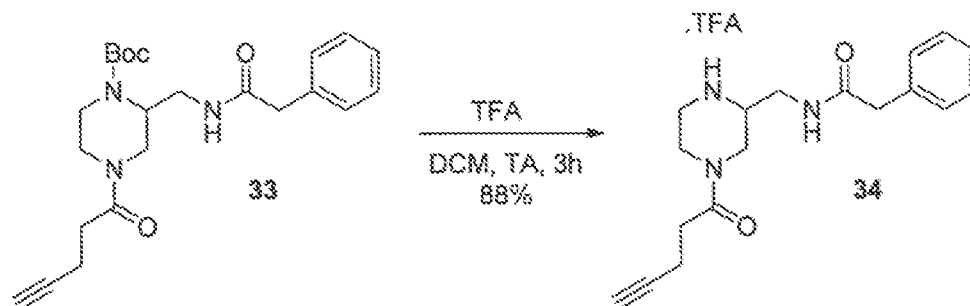
^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.43 – 7.15 (m, 5H), 6.25 (s, 1H), 4.47 – 4.15 (m, 2H), 4.00 – 3.57 (m, 2.7H), 3.52 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 3.33 (m, 0.7H), 3.28 – 2.85 (m, 2.8H), 2.68 – 2.29 (m, 4.5H), 2.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H) ppm.

5 ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ = 171.53, 171.33, 170.51, 170.26, 165.70, 154.91, 134.84, 129.22, 128.92, 128.78, 127.26, 127.09, 83.36, 83.06, 80.81, 69.19, 68.90, 53.49, 49.97, 45.37, 43.60, 42.10, 41.32, 31.77, 31.69, 28.29, 14.55, 14.29 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 413.3, calculée 413.2

10 R_f = 0.29 (éther de pétrole : acétate d'éthyle/ 2:8 / v:v)

c) Préparation du composé 34, N-((4-(pent-4-ynoyl)pipérazin-2-yl)méthyl)-2-phénylacétamide sous forme de sel avec l'acide trifluoroacétique



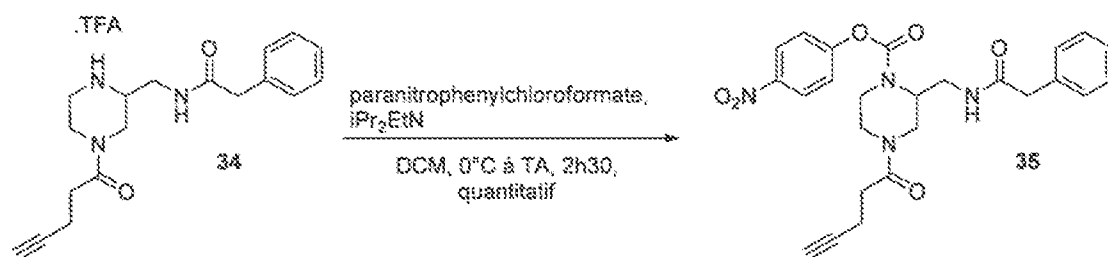
15 La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **8**, mais en utilisant le composé **33** (550mg, 1,33mmol, 1,0eq.) dans du DCM (5mL) et du TFA (5mL) pour donner le composé **34** sous forme d'une poudre blanche (500mg, 1,17mmol rendement: 88%).

^1H -RMN (500 MHz, MeOD) δ = 7.33 – 7.22 (m, 4H), 7.22 – 7.15 (m, 1H), 4.45 (t, J = 13.4 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 13.4 Hz, 1H), 3.45 – 3.11 (m, 6.5H), 3.06 (t, J = 10.6 Hz, 0.5H), 3.01 – 2.81 (m, 2H), 2.67 – 2.46 (m, 2H), 2.42 (m, 2H), 2.24 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 1.34 – 1.26 (m, 1H) ppm.

20 ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOD) δ = 175.33, 172.22, 172.09, 163.50, 163.23, 162.96, 162.68, 136.48, 136.39, 130.30, 130.27, 130.17, 129.70, 129.65, 128.09, 128.03, 83.85, 70.32, 70.26, 56.37, 56.22, 55.75, 54.81, 46.53, 44.58, 44.48, 43.72, 43.66, 43.55, 43.26, 42.64, 40.34, 40.19, 40.08, 39.63, 39.42, 32.73, 32.59, 18.65, 15.11, 13.09 ppm.

MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 313.2, calculée 313.2

- XII - Préparation du composé **36**, 4-nitrophényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (**EXEMPLE 5**)
- a) Préparation du composé **35**, 4-nitrophényl 4-(pent-4-ynoïl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



- A une solution refroidie à $0^\circ C$ et sous atmosphère inerte d'argon du composé **34** (50mg, 0,117mmol, 1,0eq.) et de DIPEA (55 μ L, 0,30mmol, 2,5eq.) dans du DCM anhydre (2mL) est ajouté le paranitrophénolchloroformiate (28mg, 0,130mmol, 1,1eq.) en une fois. Le mélange réactionnel est agité à $0^\circ C$ pendant 30min puis à TA pendant 2h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est dilué avec du DCM (20mL) et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$ (2x25mL) et une fois avec de la saumure (25mL). La phase organique est séchée avec du Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 2:8 / v:v) pour obtenir le composé **35** sous forme d'un solide incolore (60mg, rendement: quantitatif).

^1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.15 (t, J = 9.8 Hz, 2H), 7.33 – 7.01 (m, 7H), 6.23 (s, 0.4H), 6.08 – 5.82 (m, 0.6H), 4.60 – 4.36 (m, 1.5H), 4.32 – 4.17 (m, 0.5H), 4.05 – 3.88 (m, 1.4H), 3.84 (m, 0.8H), 3.77 – 3.62 (m, 0.8H), 3.62 – 3.16 (m, 4.5H), 3.12 (t, J = 12.0 Hz, 0.5H), 2.96 – 2.65 (m, 1.8H), 2.65 – 2.26 (m, 4.2H), 2.08 – 1.86 (m, 1.5H), 1.29 – 1.13 (m, 0.5H) ppm.

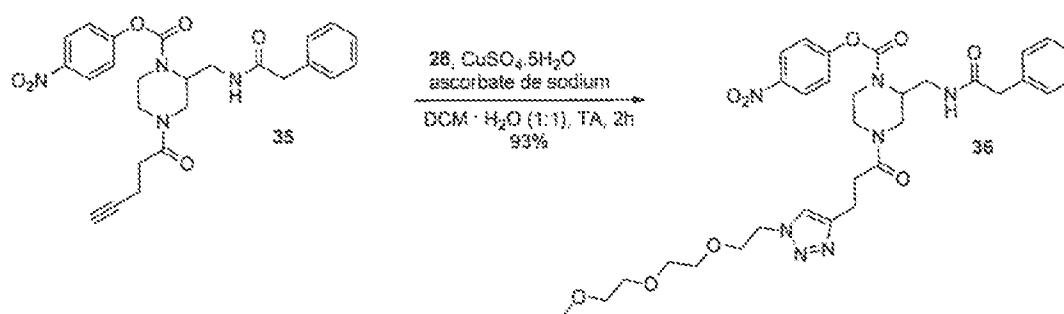
^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.59, 171.35, 170.80, 170.40, 170.28, 155.85, 152.84, 152.40, 145.05, 144.94, 134.69, 134.48, 129.35, 129.25,

129.08, 128.96, 127.50, 127.33, 125.17, 122.27, 122.13, 121.85, 83.28, 83.03, 69.37, 69.10, 53.54, 51.50, 51.25, 45.58, 45.23, 45.03, 43.68, 42.43, 42.09, 41.20, 40.59, 40.18, 38.70, 38.10, 37.48, 31.86, 31.75, 14.71, 14.40 ppm.

5 MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 478.3, calculée 478.3

R_f = 0.32 (éther de pétrole : acétate d'éthyle/ 2:8 / v:v)

b) Préparation du composé 36, 4-nitrophényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



10

La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **31**, avec le composé **35** (30mg, 0,063mmol, 1,0eq.), le composé **28** (26mg, 0,138mmol, 2,2eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (9mg, 0,04mmol, 0,6eq.) et l'ascorbate de sodium (16mg, 0,08mmol, 1,2eq.) dans un mélange DCM (1mL) et eau (1mL). Après purification, on obtient le composé **36** sous forme d'une huile légèrement jaune (39mg, 0,058mmol, rendement : 93%).

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ = 8.29 – 8.01 (m, 2H), 7.54 – 7.01 (m, 7H), 4.56 – 4.24 (m, 5H), 4.05 – 3.66 (m, 5H), 3.66 – 3.37 (m, 12H), 3.31 (d, J = 4.7 Hz, 3H), 3.25 – 2.55 (m, 7H), 2.18 – 1.84 (m, 1H) ppm.

20 ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ = 172.78, 171.62, 156.11, 155.95, 152.46, 145.10, 144.97, 135.45, 134.92, 129.38, 128.97, 128.80, 127.31, 127.10, 125.18, 122.21, 72.00, 70.64, 70.60, 69.43, 59.14, 51.47, 51.26, 50.69, 50.44, 50.18, 45.45, 45.20, 44.63, 44.03, 43.80, 42.40, 42.09, 41.06, 40.63, 40.25, 40.10, 39.39, 38.05, 37.72, 37.48, 31.85, 31.39, 30.40, 29.77, 29.51, 28.59, 26.99, 21.36, 20.53 ppm.

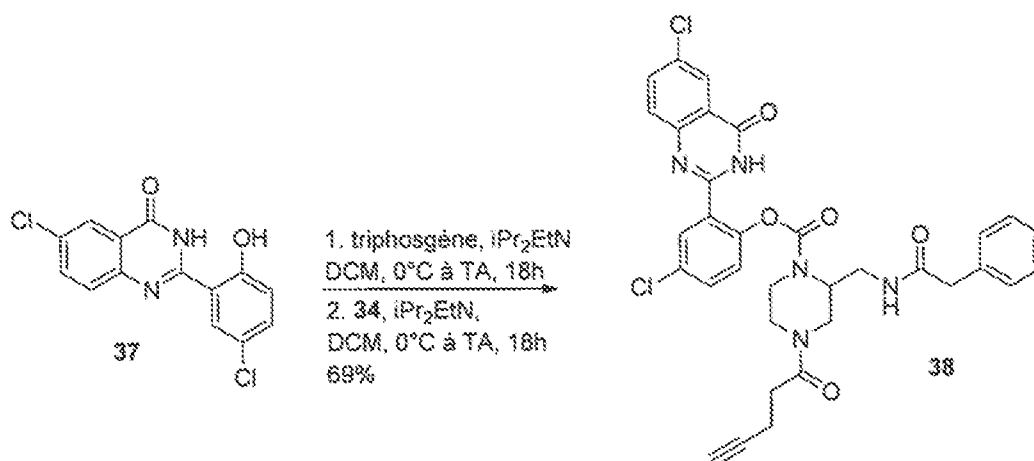
MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 667.3, calculée 667.3

R_f = 0.31 (DCM : MeOH/ 95:5 / v:v)

25

XIII - Préparation du composé **39**, 4-chloro-2-(6-chloro-4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)phényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (**EXEMPLE 6**)

- 5 a) Préparation du composé **38**, 4-chloro-2-(6-chloro-4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)phényl 4-(pent-4-ynoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



- A une suspension refroidie à 0°C et sous une atmosphère inerte d'argon du composé **37** (40mg, 0,13mmol, 1,1eq) dans du DCM anhydre (5mL) est ajoutée une solution de triphosgène (130mg, 0,43mmol, 3,3eq.) dans du DCM anhydre (2mL) suivie par l'ajout de DIPEA (80µL, 0,43mmol, 3,3eq.). Ce mélange réactionnel est agité à 0°C pendant 30min puis à TA pendant 18h. Les volatiles sont alors enlevés par évaporation sous pression réduite et le solide résultant est repris dans du DCM anhydre (5mL). A cette nouvelle suspension est ajoutée une solution du composé **34** (50mg, 0,117mmol, 1,0eq.) dans du DCM anhydre (2mL), suivi par de la DIPEA (85µL, 0,47mmol, 4,0eq.), et ce mélange réactionnel est agité à TA pendant 18h. A la fin de la réaction, le mélange réactionnel est dilué avec du DCM (20mL) et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (2x25mL) et une fois avec de la saumure (25mL). La phase organique est séchée avec du Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est purifié par deux colonnes de chromatographie sur gel de silice successives (éther de pétrole : acétate d'éthyle / 2:8 / v:v ; et gradient DCM : MeOH / 99:1, 98:2, 97:3 / v:v) pour

obtenir le composé **38** sous forme d'un solide blanc (52mg, 0,080mmol, rendement: 69%).

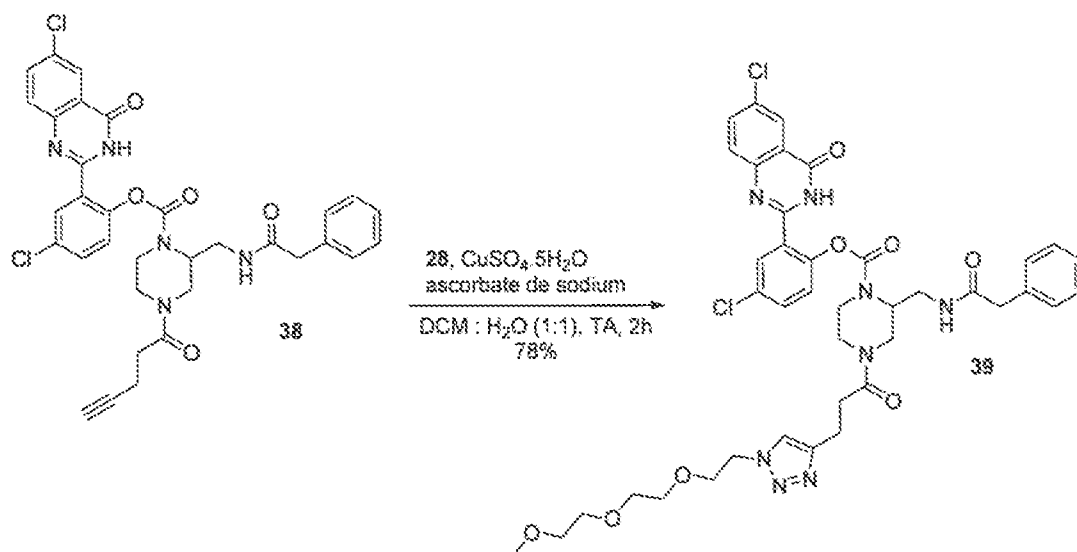
^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ = 11.12 – 10.16 (m, 0.8H), 8.14 (s, 0.7H), 8.01 – 7.70 (m, 0.9H), 7.64 (s, 1.5H), 7.41 (s, 0.9H), 7.30 – 6.88 (m, 5.3H), 6.82 – 6.46 (m, 0.9H), 6.10 (s, 0.3H), 4.56 – 4.01 (m, 2H), 4.05 – 2.99 (m, 7.1H), 2.99 – 2.60 (m, 1.8H), 2.60 – 2.15 (m, 3.6H), 2.10 – 1.59 (m, 1.6H), 1.23 (m, 1.3H) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) δ = 173.05, 171.80, 170.88, 170.50, 170.31, 161.41, 153.40, 153.05, 152.46, 149.57, 149.45, 147.43, 147.20, 147.09, 135.64, 135.41, 135.19, 134.83, 134.72, 134.55, 133.55, 133.39, 133.14, 132.11, 131.72, 130.88, 130.52, 130.29, 129.61, 129.43, 129.27, 129.20, 129.05, 128.85, 127.99, 127.66, 127.45, 127.20, 127.16, 125.96, 125.80, 124.81, 124.35, 124.16, 122.27, 122.06, 121.85, 83.37, 83.08, 82.95, 69.53, 69.39, 69.06, 68.97, 51.86, 51.67, 45.26, 45.09, 44.96, 43.58, 43.38, 42.44, 41.78, 41.11, 40.58, 40.37, 39.74, 39.33, 38.86, 38.41, 38.02, 31.76, 29.72, 14.68, 14.33 ppm.

MS: ESI: $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z trouvée 645.3, calculée 645.2

R_f = 0.19 (DCM : MeOH/ 97:3 / v:v)

b) Préparation du composé 39, 4-chloro-2-(6-chloro-4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)phényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate



5

La procédure utilisée est la même que celle décrite pour la synthèse du composé **31**, avec le composé **38** (50mg, 0,077mmol, 1,0eq.), le composé **28** (31mg, 0,170mmol, 2,2eq.), CuSO₄.5H₂O (12mg, 0,05mmol, 0,6eq.) et l'ascorbate de sodium (20mg, 0,10mmol, 1,2eq.) dans un mélange DCM
10 (2mL) et eau (2mL). Après purification, on obtient le composé **39** sous forme d'une huile légèrement jaune (50mg, 0,060mmol, rendement : 78%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ = 11.12 (s, 0.4H), 10.89 (s, 0.2H), 10.14 – 9.90 (m, 0.2H), 8.33 – 7.94 (m, 2H), 7.91 – 7.71 (m, 2H), 7.70 – 7.48 (m, 1.5H), 7.43 – 7.32 (m, 2H), 7.30 – 7.12 (m, 3.5H), 4.54 (m, 4H), 3.93 (m, 4H), 3.77
15 – 3.50 (m, 10H), 3.45 – 2.72 (m, 10H), 2.39 (s, 0.5H), 1.66 (s, 3H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) δ = 174.00, 173.14, 172.10, 171.24, 161.27, 152.45, 152.24, 149.84, 149.71, 147.59, 147.54, 147.30, 147.19, 135.53, 135.30, 135.16, 135.11, 134.89, 133.08, 133.02, 132.14, 132.09, 131.98, 131.67, 131.54, 131.04, 129.79, 129.44, 129.35, 128.84, 128.78, 128.68,
20 127.64, 127.19, 126.97, 126.04, 125.83, 125.11, 124.32, 124.22, 122.54, 72.01, 70.64, 70.59, 70.43, 69.27, 59.15, 52.06, 51.86, 51.50, 50.90, 50.58, 45.62, 45.47, 45.38, 45.17, 44.54, 44.01, 43.88, 43.72, 43.53, 41.87, 41.17,

40.84, 40.42, 40.00, 39.20, 39.11, 38.30, 38.28, 30.34, 29.70, 29.43, 21.39, 20.64 ppm.

MS: ESI: $[M+H]^+$ m/z trouvée 834.5, calculée 834.3

$R_f = 0.13$ (DCM : MeOH/ 96:4 / v:v)

5

B - Evaluation de l'hydrosolubilité des composés :

L'hydrosolubilité des composés a été évaluée en fonction de la présence ou de l'absence de précipité dans des solutions tamponnées des composés en question à différentes concentrations. Ces solutions ont été préparées
10 comme suit :

Une quantité connue de produit est dissoute dans un volume de DMSO approprié afin d'obtenir une solution mère limpide à 100mM dans le DMSO (sauf dans le cas de l'AMC-Leucine commerciale (notée AMC-Leu) qui a donné une solution trouble dans ces conditions et la concentration de la
15 solution mère dans le DMSO a dû être abaissée à 50mM). Ces solution mères sont ensuite diluées dans un tampon PBS commercial afin d'obtenir un éventail de concentrations finales comprises entre 1mM et 50μM. Un composé est déclaré insoluble si un précipité apparaît et persiste après dilution.

20 Le **Tableau 2** ci-dessous présente les résultats de ces tests de solubilité.

Tableau 2

Concentrations Produit	1mM	500µM	250µM	100µM	50µM
12 - Ex 1	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
15 comparatif 1	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
31 - Ex 4	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
36 – Ex 5	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
39 – Ex 6	insoluble	insoluble	soluble	soluble	soluble
AMC-Leu	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
21 – Ex 2	insoluble	insoluble	soluble	soluble	soluble
22 – Ex 3	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
27 comparatif 2	insoluble	insoluble	insoluble	soluble	soluble

Conclusions : Dans tous les cas présentés, les composés selon l'invention présentent une meilleure solubilité en solution aqueuse, par rapport à un substrat commercial sans bras espaceur, ou par rapport à un substrat incorporant un bras espaceur décrit dans les demandes WO 2013/045854 et WO 2014/020285.

Activation enzymatique :

Certains des composés ont été testés pour évaluer la fluorescence détectée sous activité enzymatique.

A une solution de sonde selon l'invention dans du PBS dans une plaque 96-puits (noire pour la fluorescence ou transparente pour l'absorbance) est ajoutée une solution de PGA (Penicillin G Amidase de *Escherichia Coli*, Waterstone Tech.) dans du tampon PBS ou une solution de Lipase (Lipase de *Candida Rugosa*, Sigma-Aldrich) dans du tampon PBS.

Concentration finale de sonde: comprise entre 10µM et 50µM

Concentration finale de PGA: 5U

Ou concentration finale de lipase : 4U

La plaque est ensuite incubée à 37 °C et la fluorescence ou l'absorbance est enregistrée au cours du temps avec un lecteur de plaque multi-puits (EnSpire, Perkin Elmer). Les courbes résultantes sont le résultat de triplicats.

Pour la 4-méthylumbélliférone (composés **12**, **15**, **31**, **21** et **27**) :
Fluorescence : $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$.

Pour la 6-chloro-2-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)quinazolin-4(3H)-one (composé **39**): Fluorescence : $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$.

Pour la paranitrophénolate (composé **36**): Absorbance : $\lambda_{\text{abs}} = 405 \text{ nm}$.

Les résultats sont présentés sur les **FIGURES 1 à 8** annexées.

L'évolution de la fluorescence suite à l'activation du composé **12** par la PGA est présentée **FIGURE 1**.

L'évolution de la fluorescence suite à l'activation du composé **15** par la PGA est présentée **FIGURE 2**.

L'évolution de la fluorescence suite à l'activation du composé **31** par la PGA est présentée **FIGURE 3**.

La comparaison des vitesses de réponse des composés **12** et **31** selon l'invention, et du composé **15** utilisé en tant que comparatif, suite à leur activation par la PGA est présentée en **FIGURE 4**.

L'évolution de l'absorbance suite à l'activation du composé **36** par la PGA est présentée **FIGURE 5**.

L'évolution de la fluorescence suite à l'activation du composé **39** par la PGA est présentée **FIGURE 6**.

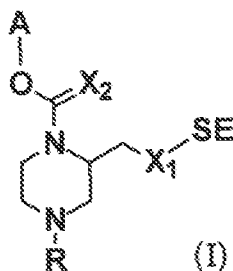
L'évolution de la fluorescence suite à l'activation du composé **21** par la lipase est présentée **FIGURE 7**.

La comparaison des vitesses de réponse du composé **21** selon l'invention, et du composé **27** utilisé en tant que comparatif, suite à leur
5 activation par la Lipase est présentée en **FIGURE 8**.

Conclusions : les composés selon l'invention permettent effectivement de détecter la présence d'une activité enzymatique grâce à des mesures de fluorescence ou d'absorbance. La reconnaissance enzymatique est toujours
10 bonne malgré l'incorporation d'une charge ou d'un groupement relativement encombrant d'un point de vue stérique sur le bras espaceur.

REVENDEICATIONS

1 - Sondes de formule (I) :



dans laquelle :

- 5 - $X_1 = \text{NH, O ou S,}$
- $X_2 = \text{O ou S,}$
- **SE** est un groupe labile, qui pourra être éliminé en solution aqueuse sous l'action d'un stimulus qui peut notamment être la présence d'une enzyme, d'un composé chimique ou d'une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde,
- 10 - **A** est un groupe aromatique, qui après clivage en solution aqueuse de la liaison $\text{C}(X_2)\text{-O}$, conduit à la libération d'un chromophore ou d'un fluorophore,
- **R** représente un atome d'hydrogène ou -(L)n-GP , avec **n** qui est égal
- 15 à 0 ou 1,
- **L** est un bras de liaison,
- **GP** est un groupe hydrosolubilisant,

ainsi que leurs sels, solvats ou hydrates, physiologiquement acceptables.

2 - Sondes selon la revendication 1 caractérisées en ce que le groupe labile **SE** est un substrat enzymatique.

3 - Sondes selon la revendication 1 caractérisées en ce que :

- soit X_1 est un oxygène et **SE** est un substrat d'estérase, glycosidase, phosphatase, sulfatase, ou glucuronidase ou $X_1\text{-SE}$ forment une liaison acétale qui est clivable en milieu acide,
- 25 - soit X_1 représente NH et **SE** est un substrat de protéase ou transférase,
- soit X_1 est un soufre et $X_1\text{-SE}$ est un pont disulfure qui est clivable par un agent réducteur.

4 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisées en ce que le groupe labile **SE** est un substrat pour au moins une enzyme choisie parmi les estérases telles que les carboxylestérases ou les lipases ; les alkaline-phosphatases ; les glucuronidases telles que la β -glucuronidase ;
5 les glycosidases ; les protéases telles que les métalloprotéases ; les peptidases et les amidases.

5 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisées en ce que **SE** est choisi parmi les groupes glycosyle liés par leur carbone anomérique au reste de la molécule et les groupes peptidyle liés au reste de
10 la molécule par une fonction acyle portée par leur carbone terminal ou par un chaînon latéral.

6 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que **SE** est un substrat de glycosidase, par exemple de la N-acétyl- β -galactosaminidase ; la N-acétyl- β -glucosaminidase ; la α -amylase ; la α -arabinofuranosidase ; la α -arabinosidase ; la β -cellobiosidase ; la β -chitobiosidase ; la α -galactosidase ; la β -galactosidase ; la α -glucosidase ; la β -glucosidase ; la β -glucuronidase ; la α -maltosidase ; la α -mannosidase ; la β -mannosidase ; la β -xylosidase ; la β -D-fucosidase ; la α -L-fucosidase ; la β -L-fucosidase ; la L-iduronidase ou de la cellulase ; et correspond à
15 groupement glycosyle lié par son carbone anomérique au reste de la molécule, et notamment, **SE** est un groupement mono-glycosylé choisi parmi le galactosyle, le glucosyle, le mannosyle, le gulosyle, l'allosyle, l'altrosyle, l'idosyle, le talosyle, le fucosyle, le fructosyle, l'arabinosyle, le lyxosyle, le ribosyle, le xylosyle, le glucuronyle et le N-acétyl-hexosaminyle ou un
20 groupement polyglycosylé constitué de plusieurs, par exemple de 2 à 20, de préférence de 3 à 10, et plus particulièrement de 4 à 6, de ces groupements monoglycosylés identiques ou différents.

7 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que **SE** est un substrat de de galactosidase, par exemple de la β -galactosidase, de l'induronidase, de la glucosidase, de la N-acétyl-D-glucosaminidase, de la N-acétyl-D-galactosaminidase, de la mannosidase, de
30

la fucosidase ou de la glucuronidase, notamment de la β -glucuronidase ; et correspond à groupement glycosyle lié par son carbone anomérique au reste de la molécule, et notamment, **SE** est un groupement mono-glycosylé choisi parmi le D-glucuronyle, le L-iduronyl, le D-glucopyranosyle, le D-galactopyranosyle, le N-acétyl-D-glucosaminyle, le N-acétyl-D-galactosaminyle, le D-mannopyranosyle, le L-fucopyranosyle ou un groupement polyglycosylé constitué de plusieurs, par exemple de 2 à 20, de préférence de 3 à 10, et plus particulièrement de 4 à 6, de ces groupements monoglycosylés identiques ou différents.

10 **8** - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que **SE** est :

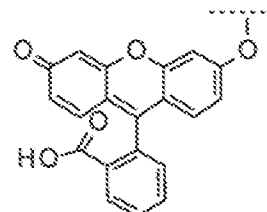
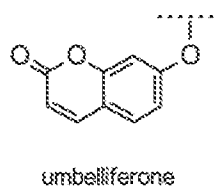
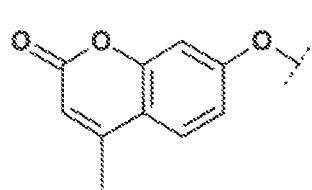
- soit un substrat d'une protéase ou d'une peptidase, notamment un substrat de cathepsine ou de métalloprotéase, notamment de la PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) ; et **SE** correspond à un groupe peptidyle ou aminoacide lié au reste de la molécule par une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral ;

15 - soit un substrat d'une transférase, notamment un substrat de la glutathione transférase ou de la gamma-glutamyl transférase, et **SE** correspond à un groupe peptidyle ou aminoacide lié au reste de la molécule par une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral ou **SE** correspond à un groupe sulfonyl formant une sulfonamide avec **X₁** qui représente alors NH.

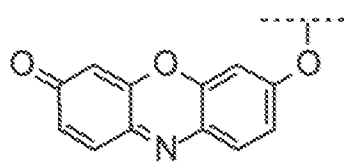
20 **9** - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisées en ce que **A** est un composé aromatique comprenant un ou plusieurs cycles aromatiques substitués ou non substitués, lesdits cycles pouvant comprendre un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et/ou un ou plusieurs atomes de carbone sous la forme d'un carbonyle C=O.

25 **10** - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisées en ce que **A** est un composé aromatique conduisant à la libération d'un chromophore choisi parmi le paranitrophénol et ses dérivés, les indigoides, la cyclohexenoesculetine, l'alizarin et l'hydroxyflavone.

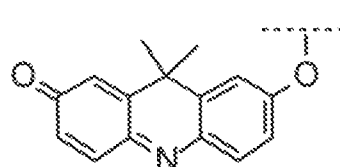
11 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisées en ce que **A** est un composé aromatique avec -OA choisi parmi :



fluorescéine



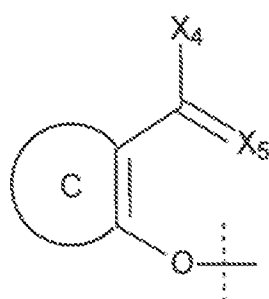
resorufin



DAO

5

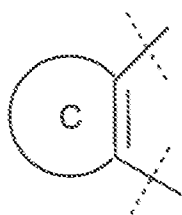
12 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisées en ce que **A** est un composé aromatique avec -OA qui répond à la formule (**AA**):

(**AA**)

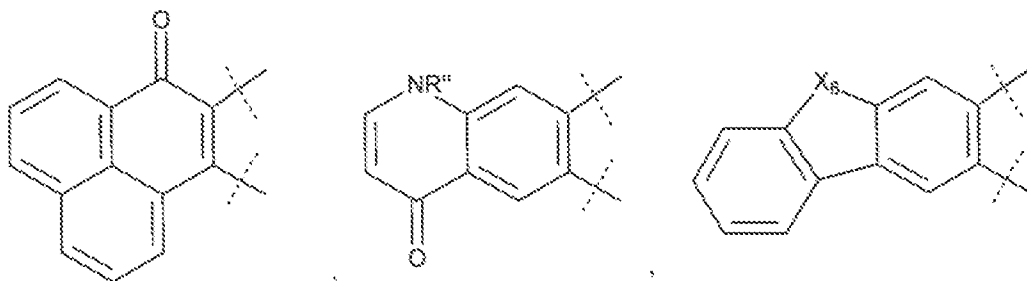
10 dans laquelle :

soit **X₅** est un atome d'oxygène et **X₄** est un groupe -NH₂, -OH, -SH, alkyle, aryle, -O-alkyle, -O-phényle, -NH-alkyle, -NH-phényle, -S-alkyle ou -S-aryle, lesdits groupes alkyle et phényle pouvant être substitués ou non substitués, soit **X₅** représente un atome d'azote et est lié à **X₄** qui représente alors CH,

15 O, S, N ou NH pour former un hétéroaryle substitué ou non substitué,



et C représente un aryle ou un hétéroaryle, substitué ou non substitué, par exemple choisi parmi les groupes phényle, naphthyle, et :

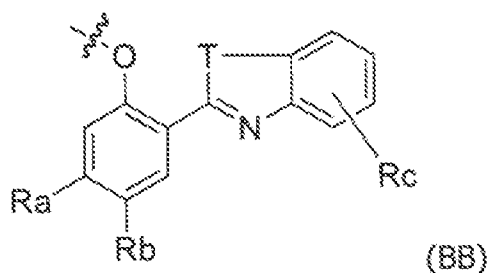


lesdits groupes pouvant être substitués ou non substitués,

5 avec X_6 qui représente S, O ou NR'' , et R'' qui représente un atome d'hydrogène ou un groupe $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkyle ;

de préférence, -OA est du type phénoxy, et correspond, aux structures préférées (BB) ou (CC) suivantes :

*



10

dans laquelle

- T est $-\text{NH-C(O)}-$, $-\text{S}-$, $-\text{O}-$, $-\text{NH}$, N-alkyle ou N-aryle,

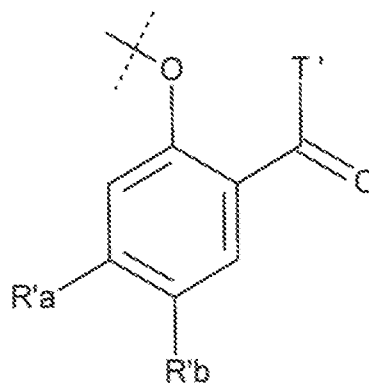
- Ra est l'hydrogène ou un substituant carboné attracteur d'électrons, comme $-\text{CN}$ ou $-\text{COORd}$, avec Rd qui représente un groupe $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkyle, ou
 15 bien Ra est $-\text{CONReRf}$, avec Re et Rf, identiques ou différents, qui représentent l'hydrogène ou un groupe $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alkyle, ou bien Ra est $-\text{CF}_3$ ou un groupe 2-oxazolyle, 2-thiazolyle, 2-imidazolyle, 2-benzoimidazolyle, 4-pyrimidinon-2-yle ou quinazolinon-2-yle,

- Rb est l'hydrogène, un atome de chlore, brome, iode ou fluor, -OH, -NH₂, -NR_gR_h, -NHR_g ou -OR_g, avec R_g et R_h qui représentent chacun indépendamment un (C₁-C₄)alkyle,

- ou bien Ra et Rb sont liés entre eux pour former une chaîne hydrocarbonée comprenant 4 ou 5 chaînons, saturée ou insaturée, substituée ou non substituée, éventuellement interrompue par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, S et O,

- Rc est l'hydrogène, Br, Cl, I ou F,

*



(CC)

dans laquelle :

- T' est NH₂, OH, un groupe aryle, un groupe (C₁-C₄)alkyle, SH, NHR'_c, OR'_c, NR'_cR'_d ou SR'_c, avec R'_c et R'_d, identiques ou différents, qui représentent un groupe (C₁-C₄)alkyle ou aryle,

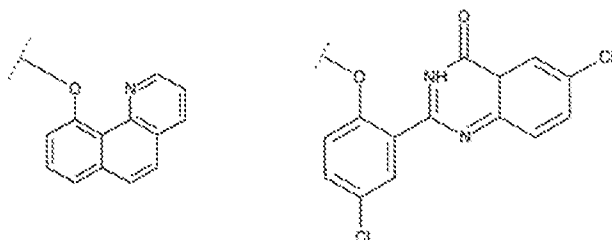
- R'a est l'hydrogène ou un substituant carboné attracteur d'électrons comme -CN, ou -COOR'_e, avec R'_e qui représente un groupe (C₁-C₄)alkyle, ou R'a est -CONR'_fR'_g, avec R'_f et R'_g, identiques ou différents, qui représentent l'hydrogène ou un groupe (C₁-C₄)alkyle, ou bien R'a est -CF₃ ou un 2-oxazolyle, 2-thiazolyle, 2-imidazolyle, 2-benzoimidazolyle, 4-pyrimidinon-2-yle ou quinoxalinon-2-yle,

- R'b est l'hydrogène, un atome de chlore, brome, iode ou fluor, -OH, -NH₂, -NR'_hR'_i ou -OR'_h, avec R'_h et R'_i, identiques ou différents, qui représentent un groupe (C₁-C₄)alkyle,

- ou bien R'a et R'b sont liés entre eux pour former une chaîne hydrocarbonée comprenant 4 ou 5 chaînons, saturée ou insaturée,

substituée ou non substituée, éventuellement interrompue par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi N, S et O.

13 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisées en ce que **A** est un composé aromatique avec $-OA$ qui répond
5 à l'une des formules suivantes :



14 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 caractérisées en ce que **R** représente $-(L)n-GP$ avec $n = 1$ et **L** est un bras de liaison, et notamment un bras $-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1-$, défini dans
10 le sens pipérazine $\rightarrow$ groupe **GP** avec :

- **L1** et **L'1**, identiques ou différents, qui sont choisis parmi $-O-$, $-NH-$, $-N(C_{1-6} \text{ alkyl})-$, $-N(\text{phényl})-$, $-N(\text{aryl})-$, $C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-OC(O)-O-$, $-NHC(O)-O-$, $-OC(O)-NH-$, $-NHC(O)-NH-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-N=N-$, $-NHC(O)-$ et $-CONH-$;
- 15 - **L2** qui est choisi parmi les groupes bivalents suivants : (C_{1-20}) alkyle, (C_{1-20}) alcényle, (C_{1-20}) alcynyle, (C_{6-24}) aryle, (C_{7-44}) alkylaryle, (C_{7-44}) alcénylaryle, (C_{7-44}) alcynylaryle, (C_{7-44}) alkylcycloalkyle, (C_{7-44}) alcénylcycloalkyle, (C_{7-44}) alcynylcycloalkyle, (C_{7-44}) alkylhétérocycloalkyle, (C_{7-44}) alcénylhétérocycloalkyle, (C_{7-44}) alcynylhétérocycloalkyle ; lesdits groupes pouvant être interrompus ou se terminer par un groupe triazole et pouvant être non substitués ou substitués, notamment par un ou plusieurs substituants choisis parmi les (C_{1-10}) alcoxy, (C_{1-10}) alkyle, (C_{6-10}) aryle, amido, imido, phosphido, nitrido, (C_{1-10}) alcényle, (C_{1-10}) alcynyle et $-OH$;
- 20 - **m1**, **m'1** et **m2**, identiques ou différents, qui sont égaux à 0 ou 1 et
- **GP** étant tel que défini à la revendication 1.

15 - Sondes selon la revendication 14 caractérisées en ce que **L** représente $-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1$ avec **L1** = $-C(O)-$, **m1** = **m2** = 1,

$m'1 = 1$ ou 0 et **L2** et **L'1** tels que définis à la revendication 14, et notamment **L** représente $-C(O)-(CH_2)_p-L3-$ avec **p** qui est égal à 1, 2, 3 ou 4 et **L3** qui est un groupe triazole et notamment un groupe 1H-1,2,3-triazole.

5 **16** - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 caractérisées en ce que **R** représente $-(L)_n-GP$ avec **n** et **L** définis à l'une quelconque des revendications 1 à 15 et **GP** est un groupe hydrosolubilisant capable de former une espèce chargée en solution aqueuse.

17 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 caractérisées en ce que **R** représente $-(L)_n-GP$ avec **n** et **L** définis à l'une
10 quelconque des revendications 1 à 15 et **GP** est une fonction **F₁** choisie parmi les amines primaires, tertiaires et secondaires, amidine, la guanidine, le tétrazole ; une fonction **F₂** anionique du type, carboxylate, sulfonate ou phosphate ; un groupement comprenant une ou plusieurs de ces fonctions **F₁** et/ou **F₂** ; un polyéthylèneglycol ; un sucre ou polysaccharide tel
15 que le glucose, le galactose et le mannose ; un groupe peptidique tel que la poly-lysine, la poly-arginine et les TAT-peptides.

18 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisées en ce que **X₂** est un atome d'oxygène.

19 - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 18
20 caractérisées en ce que :

- **X₂** est un atome d'oxygène,
- soit **X₁** est un atome d'oxygène et **SE** est un substrat de glycosidase ou glucuronidase et correspond à un groupe glycosyle lié par son carbone anomérique au reste de la molécule ou **SE** est un substrat
25 d'estérase et correspond à un groupe $-C(O)R_i$ avec **R_i** qui représente, par exemple, un groupe alkyle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, un groupe alcényle de préférence de 1 à 20 atomes de carbone, un groupe benzyle, aryle ou hétéroaryle,
- soit **X₁** représente **NH** et **SE** est un substrat de protéase ou peptidase
30 et correspond à un groupe peptidyle lié au reste de la molécule par

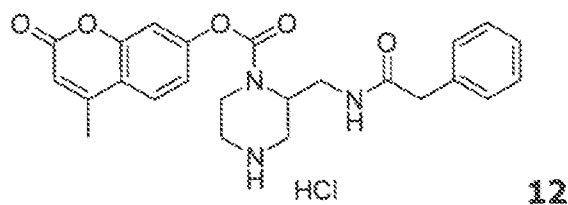
une fonction acyle portée par son carbone terminal ou par un chaînon latéral; et

- **R** représente **-L-GP** avec :

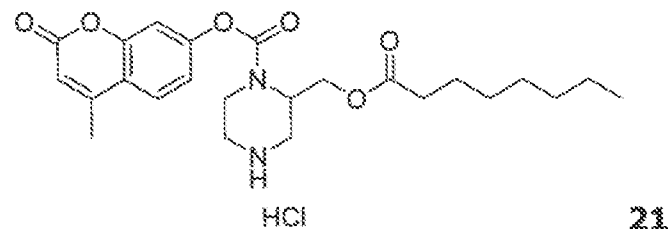
- **L** qui représente **-(L1)m1-(L2)m2-(L'1)m'1** avec **L1** = -C(O)-, **m1** = **m2** = 1, **m'1** = 1 ou 0 et **L2** et **L'1** tels que définis à la revendication 14, et notamment **L** représente **-C(O)-(CH2)p-L3-** avec **p** qui est égal à 1, 2, 3 ou 4 et **L3** qui est un groupe triazole et notamment un groupe 1*H*-1,2,3-triazole, et
- **GP** qui est tel que défini à la revendication 1, 16 ou 17 et qui représente, de préférence, une fonction **F₁** choisie parmi les fonctions ammonium, carboxylate, sulfonate et phosphate et les polyéthylèneglycols.

20 - Sondes selon la revendication 1 choisies parmi :

- 15 hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (Composé **12**) :

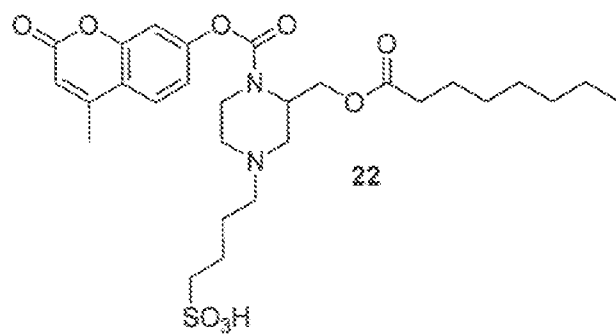


- hydrochlorure de 4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl 2-((octanoyloxy)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (Composé **21**)



- acide 4-(4-(((4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)carbonyl)-3-((octanoyloxy)méthyl)pipérazin-1-yl)butane-1-sulfonique (Composé **22**)

78

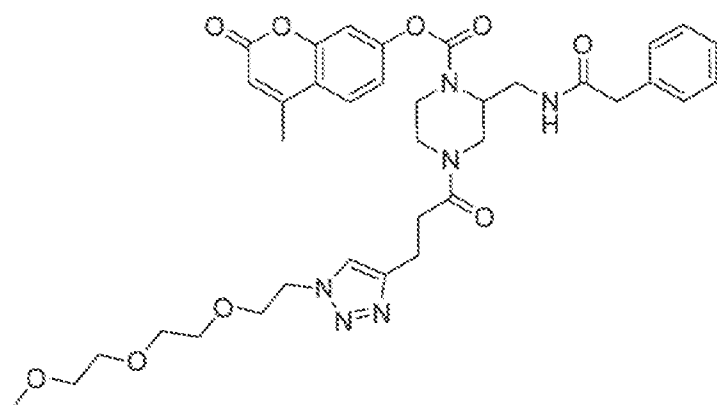
**22**

4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl

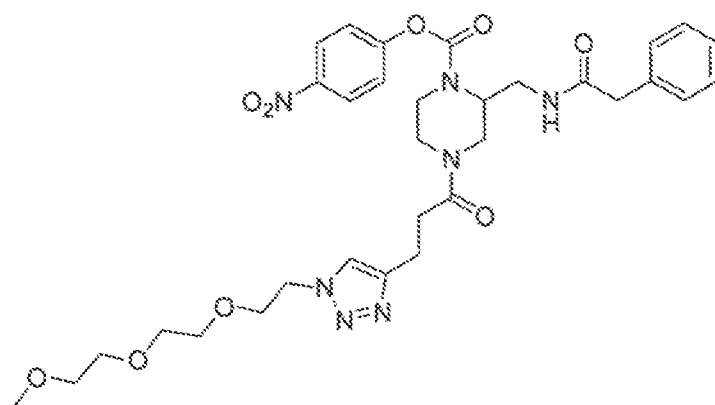
4-(3-(1-(2-(2-(2-

méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phenylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (Composé **31**)

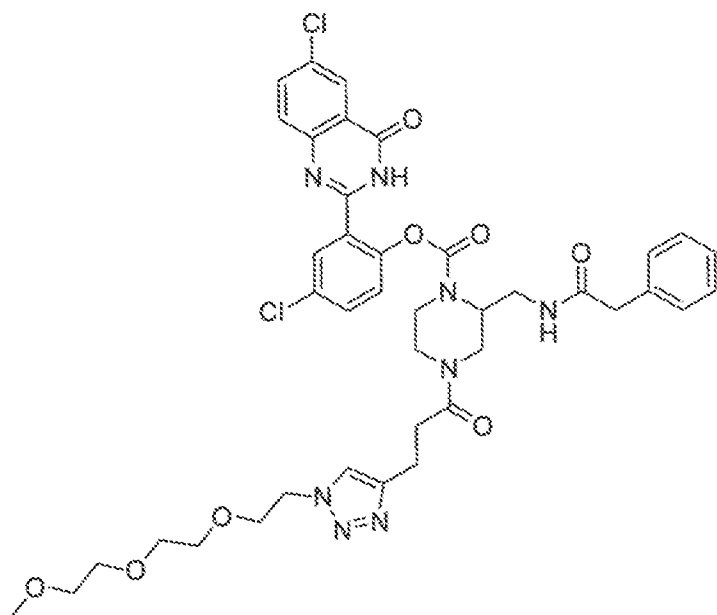
5

**31**

4-nitrophényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate

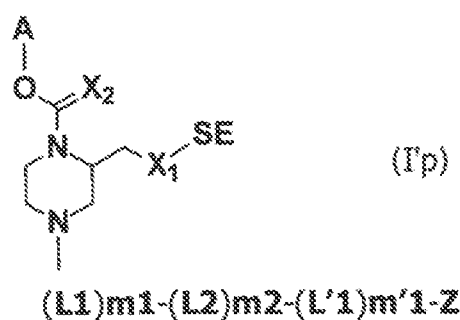
10 (Composé **36**)**36**

4-chloro-2-(6-chloro-4-oxo-3,4-dihydroquinazolin-2-yl)phényl 4-(3-(1-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoyl)-2-((2-phénylacétamido)méthyl)pipérazine-1-carboxylate (Composé **39**)

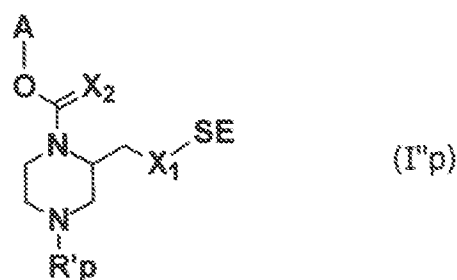
**39**

5

21 - Intermédiaires de formule :



et



10 dans lesquelles :

A, **X₁**, **X₂**, **SE**, **L1**, **L'1**, **L2**, **m1**, **m'1**, et **m2** sont tels que définis pour (I) aux revendications 1 à 15 et 18 et 19,

Z représente $C\equiv CH$, N_3 , une fonction N-oxy succinimide ou maléimide, et **R'_p** représente un groupe protecteur des fonctions amines, de préférence choisi parmi les groupes benzyle, les groupes $-C(O)OR'_1$ avec R'_1 qui représente un groupe alkyle ou alcényle de 1 à 12 atomes de carbone ou un

5 groupe $-(CH_2)_{m3}R''_1$ avec R''_1 qui représente un groupe aryle, cycloalkyle ou fluorényle et $m3$ qui est égal à 0, 1, 2 ou 3, tel que les groupes carbobenzyloxy, *ter*-butyloxycarbonyl, 9-fluorénylméthoxyloxycarbonyl, et allyloxycarbonyl,

ainsi que leurs sels, solvats ou hydrates.

10 **22** - Sondes selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, pour la détection *in vivo*, chez l'homme ou l'animal, d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, dont la présence entraîne le clivage de la liaison **SE-X₁**.

15 **23** - Procédé *in vitro* pour détecter, au moyen d'une sonde selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, la présence d'un stimulus tel qu'une enzyme, un composé chimique ou une caractéristique physicochimique du milieu dans lequel se trouve la sonde, dont la présence entraîne le clivage de la liaison **SE-X₁**.

20 **24** - Procédé selon la revendication 23 comprenant les étapes successives suivantes :

- la mise en contact d'un échantillon, suspecté de contenir ledit stimulus, avec une sonde selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 ;
- l'application de conditions appropriées pour permettre le clivage de la
- 25 liaison covalente entre **X₁** et **SE**, sous l'action du stimulus, qui est suivi d'un clivage de la liaison entre le C(**X₂**) et le groupe **-OA** suite à une cyclisation de l'espaceur présent dans la sonde de formule (I), et
- l'analyse quantitative ou qualitative du chromophore ou fluorophore libéré.

30 **25** - Procédé selon la revendication 23 ou 24 caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans des conditions physiologiques, notamment dans un milieu aqueux, de préférence tamponné à un pH appartenant à la gamme allant de 4 à 9, et par exemple à un pH de l'ordre de 7,4.

26 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 caractérisé en ce qu'un fluorophore est libéré et son analyse comprend les étapes suivantes :

- exposition du fluorophore à une source lumineuse capable de produire une lumière à une longueur d'onde d'absorption du fluorophore ; et
- détection de la fluorescence résultante.

27 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 à 25 caractérisé en ce qu'un chromophore est libéré et son analyse comprend les étapes suivantes :

- exposition du chromophore à une source lumineuse capable de produire une lumière à une longueur d'onde d'absorption du chromophore ; et
- détection de la lumière absorbée par le chromophore, correspondant à un changement de couleur.

28 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 23 à 27 caractérisé en ce que le fluorophore ou le chromophore libéré, en particulier sous la forme d'un composé **A-OH**, **A-O⁻** ou d'une forme obtenue après réarrangement, ou d'une forme tautomérique ou polymérisée de **A-OH** ou **A-O⁻**, forme un précipité en solution aqueuse.

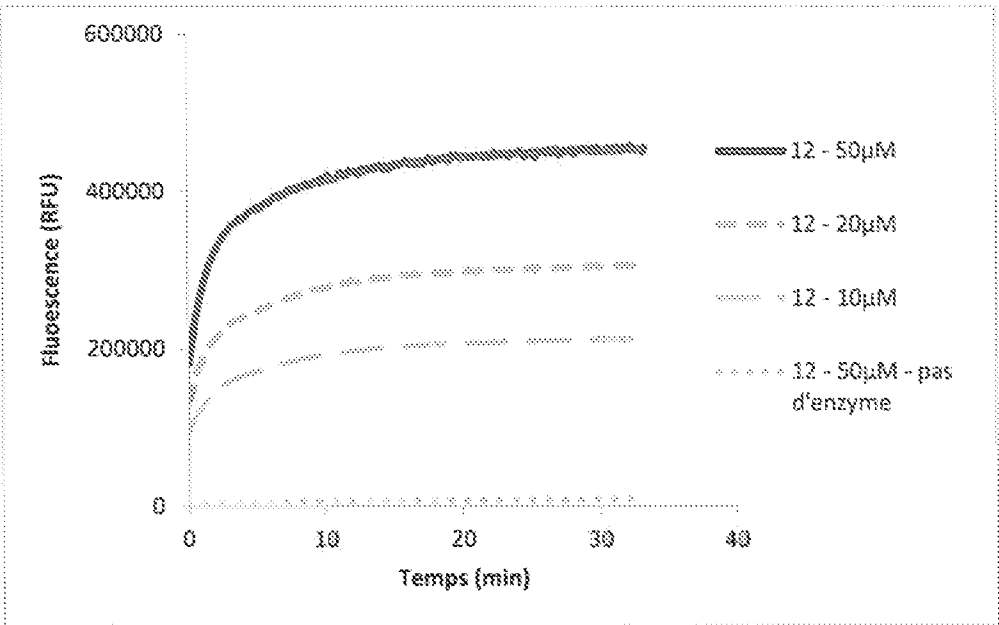


FIGURE 1

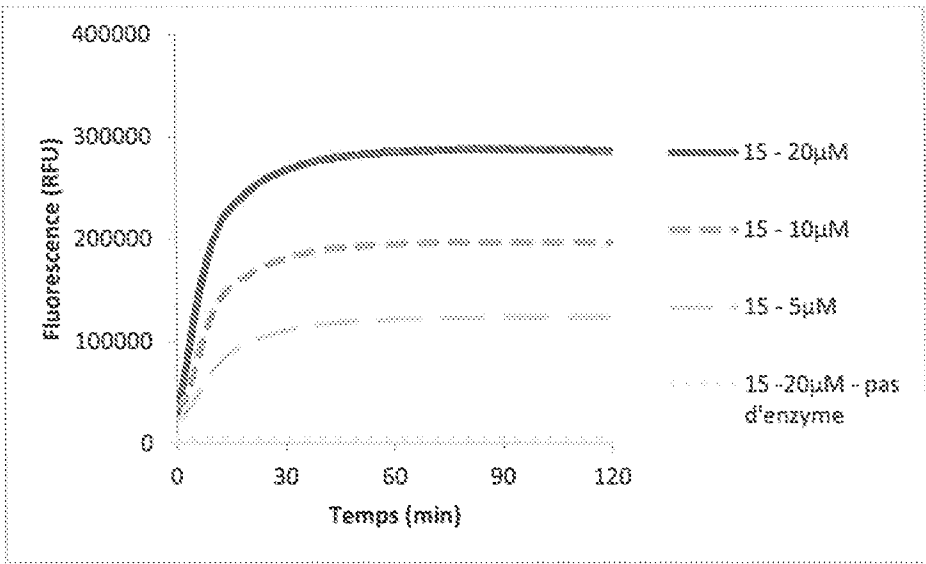


FIGURE 2

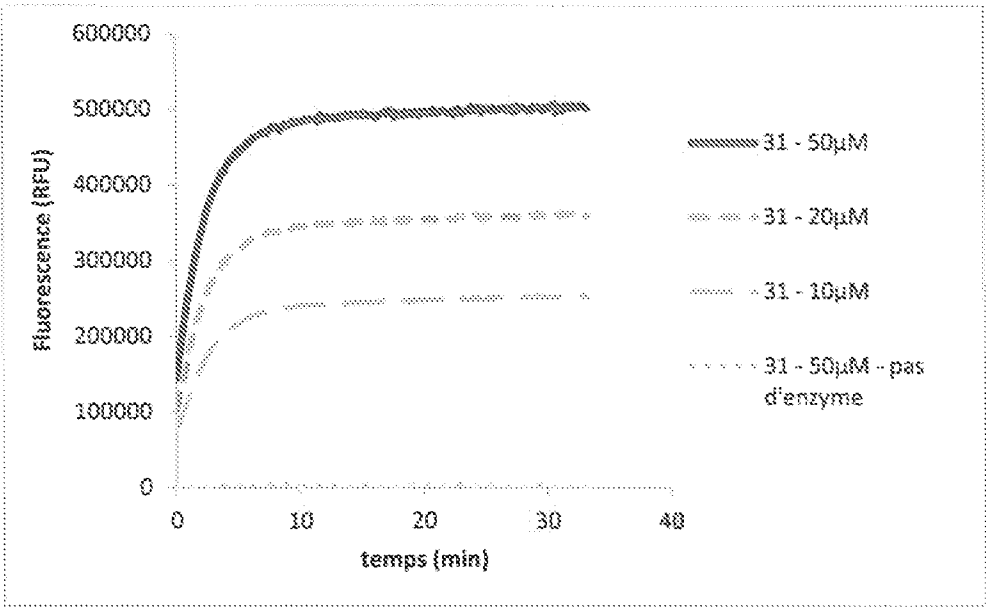


FIGURE 3

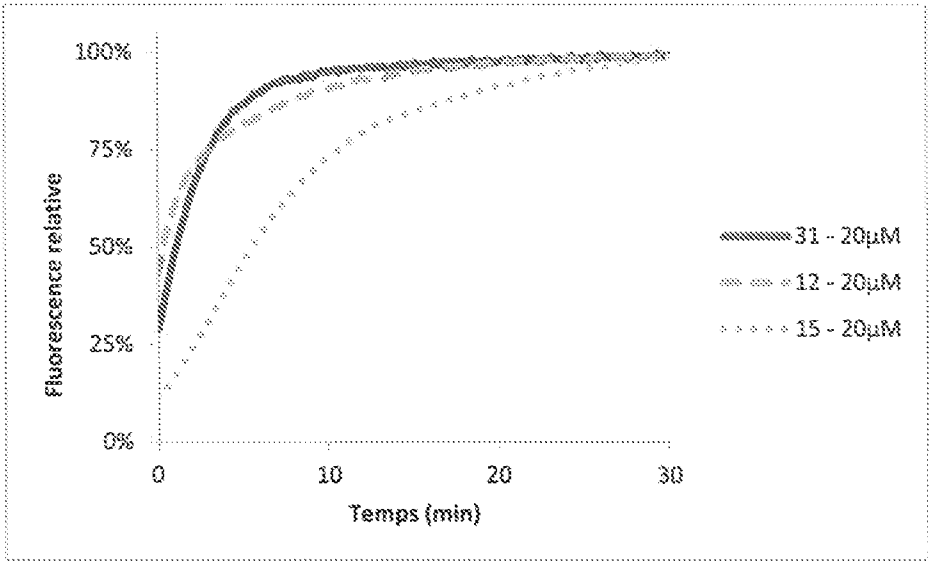


FIGURE 4

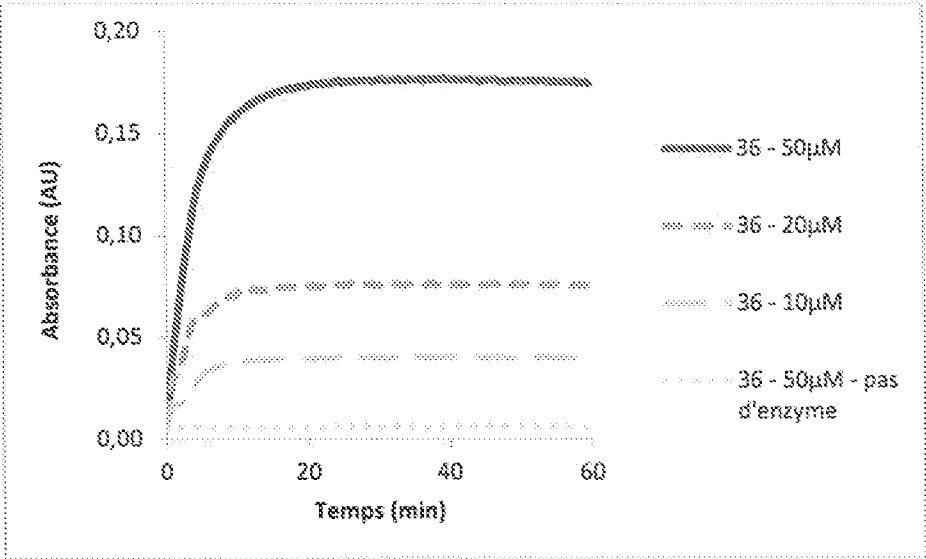


FIGURE 5

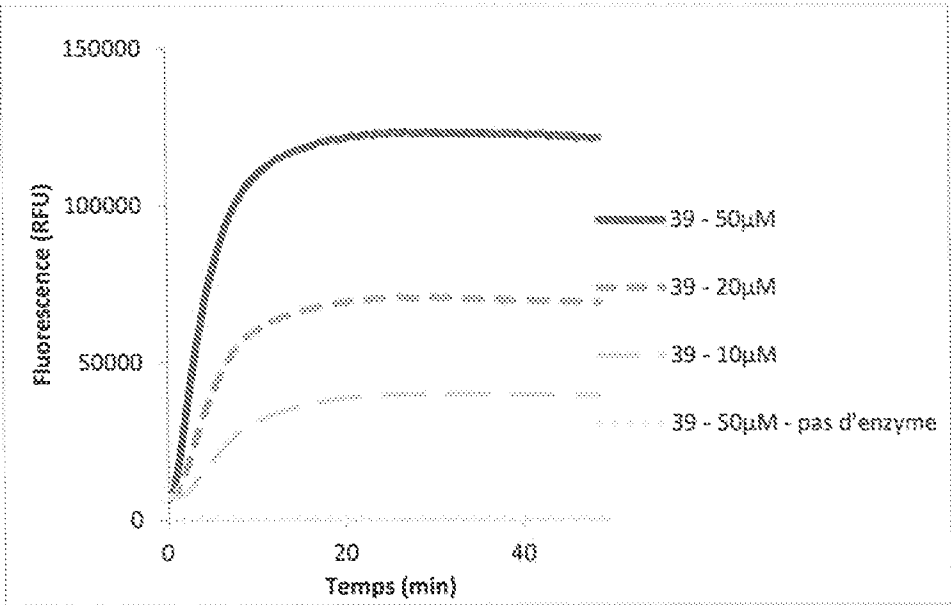


FIGURE 6 -

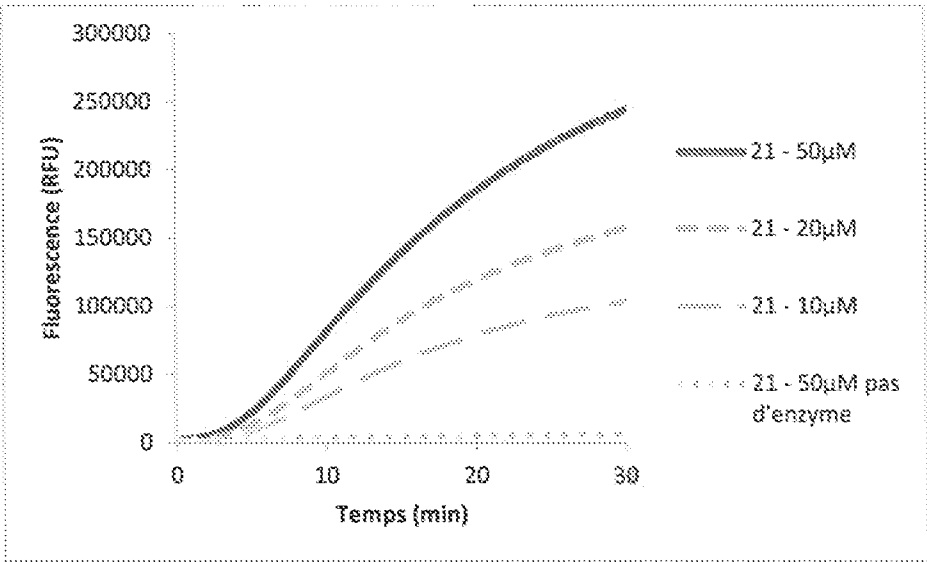


FIGURE 7

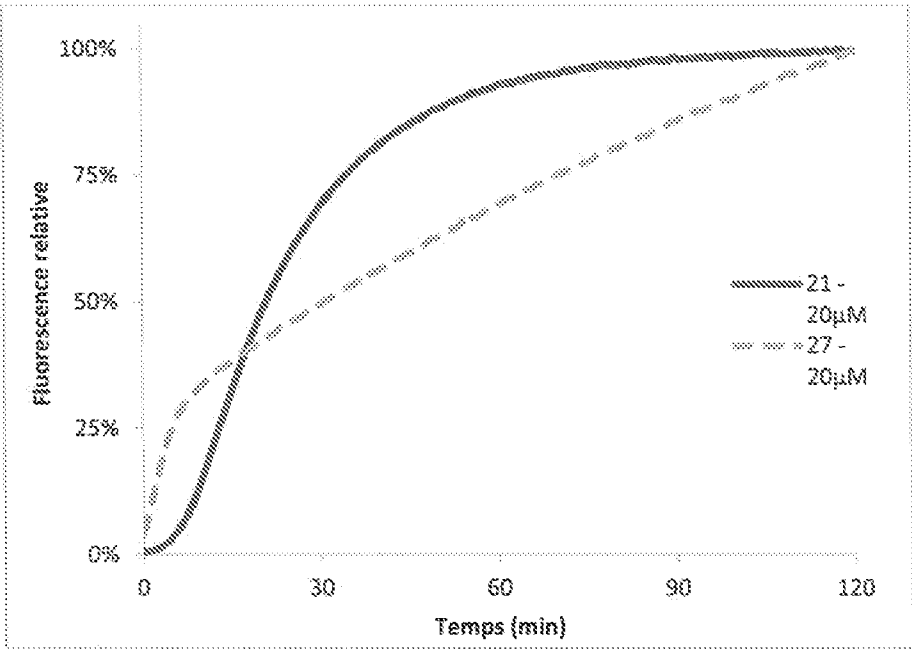


FIGURE 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/051705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K49/00 C07D311/04 C07D239/72 C07D249/04 A61K47/22 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/146066 A2 (CRITICAL THERAPEUTICS INC [US]; CLARK ROGER B [US]; ELBAUM DANIEL [US]) 21 December 2007 (2007-12-21) pages 181-182; table 24; compounds 216-223 page 185; compound 229 -----	1-4,9, 14, 16-18,21
X	WO 2012/122420 A2 (PHARMACOFOR INC [US]; JENKINS THOMAS E [US]; HUSFELD CRAIG O [US] SIG) 13 September 2012 (2012-09-13) pages 41-42; compounds KC42-45 -----	1-5,8,9, 14, 16-18,21
X	WO 00/59510 A1 (PFIZER PROD INC [US]; CHU MOYER MARGARET YUHUA [US]; MURRY JERRY ANTHO) 12 October 2000 (2000-10-12) page 207; compound 172 ----- -/-	1-4,9, 14,16,18
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 November 2015		Date of mailing of the international search report 18/11/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Renard, Delphine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/051705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/045854 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 4 April 2013 (2013-04-04) claims 1-14 compounds I-1 à I-6 -----	1-5, 8-18, 21-28
X	WO 2014/020285 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE) 6 February 2014 (2014-02-06) claims 1-14 compounds I-1; I-4 -----	1-19, 21-28
T	Maxime Prost: "Sondes moléculaires comprenant des espaceurs auto-effondrables multifonctionnels pour la détection d'activités enzymatiques - Ecole Normale Supérieure de Lyon", 3 July 2014 (2014-07-03), XP055164724, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ens-lyon.eu/recherche/sondes-moleculaires-comprenant-des-espaceurs-auto-effondrables-multifonctionnels-pour-la-detection-d-activites-enzymatiques-232636.kjsp?RH=THESE_SOUT [retrieved on 2015-01-26] the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/051705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007146066	A2	21-12-2007	CA 2659512 A1 21-12-2007 EP 2044038 A2 08-04-2009 ES 2498043 T3 24-09-2014 JP 5363315 B2 11-12-2013 JP 2009539848 A 19-11-2009 JP 2013199489 A 03-10-2013 WO 2007146066 A2 21-12-2007
WO 2012122420	A2	13-09-2012	US 2012295834 A1 22-11-2012 US 2014206597 A1 24-07-2014 WO 2012122420 A2 13-09-2012
WO 0059510	A1	12-10-2000	AR 020562 A1 15-05-2002 AU 768720 B2 08-01-2004 AU 3184500 A 23-10-2000 BG 106038 A 28-06-2002 BR 0009433 A 15-01-2002 CA 2366858 A1 12-10-2000 CN 1351497 A 29-05-2002 CR 6471 A 25-11-2003 CZ 20013465 A3 16-10-2002 DZ 3037 A1 27-03-2004 EE 200100509 A 16-12-2002 EP 1185275 A1 13-03-2002 GT 2000000038 A 22-09-2001 HN 20000000040 A 02-02-2001 HR P20010716 A2 31-12-2002 HU 0201011 A2 28-08-2002 ID 30489 A 13-12-2001 IS 6076 A 18-09-2001 JP 3581103 B2 27-10-2004 JP 2002541109 A 03-12-2002 MA 26727 A1 20-12-2004 MX PA01009871 A 24-04-2002 MY 136039 A 29-08-2008 NO 20014642 A 28-11-2001 NZ 514144 A 28-09-2001 OA 11856 A 03-03-2006 PA 8493201 A1 30-07-2002 PE 16012000 A1 25-01-2001 PL 350884 A1 10-02-2003 SK 13532001 A3 04-02-2003 TN SN00065 A1 03-04-2003 TR 200102810 T2 21-01-2002 UA 71951 C2 17-01-2005 US 6414149 B1 02-07-2002 US 6660740 B1 09-12-2003 US 2003065179 A1 03-04-2003 US 2004077671 A1 22-04-2004 US 2005020578 A1 27-01-2005 UY 26089 A1 31-10-2000 WO 0059510 A1 12-10-2000 YU 71101 A 15-07-2004 ZA 200108039 A 22-07-2003
WO 2013045854	A1	04-04-2013	EP 2760844 A1 06-08-2014 JP 2014530210 A 17-11-2014 US 2014234887 A1 21-08-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/051705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2013045854 A1	04-04-2013

WO 2014020285	A1	06-02-2014	EP 2880045 A1 10-06-2015
			FR 2994180 A1 07-02-2014
			US 2015299762 A1 22-10-2015
			WO 2014020285 A1 06-02-2014

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/051705

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K49/00 C07D311/04 C07D239/72 C07D249/04 A61K47/22 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K C07D		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2007/146066 A2 (CRITICAL THERAPEUTICS INC [US]; CLARK ROGER B [US]; ELBAUM DANIEL [US]) 21 décembre 2007 (2007-12-21) pages 181-182; tableau 24; composés 216-223 page 185; composé 229 -----	1-4,9, 14, 16-18,21
X	WO 2012/122420 A2 (PHARMACOFOR INC [US]; JENKINS THOMAS E [US]; HUSFELD CRAIG O [US] SIG) 13 septembre 2012 (2012-09-13) pages 41-42; composés KC42-45 -----	1-5,8,9, 14, 16-18,21
X	WO 00/59510 A1 (PFIZER PROD INC [US]; CHU MOYER MARGARET YUHUA [US]; MURRY JERRY ANTHO) 12 octobre 2000 (2000-10-12) page 207; composé 172 ----- -/-	1-4,9, 14,16,18
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 10 novembre 2015		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18/11/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Renard, Delphine

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2013/045854 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 4 avril 2013 (2013-04-04) revendications 1-14 composés I-1 à I-6 -----	1-5, 8-18, 21-28
X	WO 2014/020285 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]; CENTRE) 6 février 2014 (2014-02-06) revendications 1-14 composés I-1; I-4 -----	1-19, 21-28
T	Maxime Prost: "Sondes moléculaires comprenant des espaceurs auto-effondrables multifonctionnels pour la détection d'activités enzymatiques - Ecole Normale Supérieure de Lyon", 3 juillet 2014 (2014-07-03), XP055164724, Extrait de l'Internet: URL: http://www.ens-lyon.eu/recherche/sonde-s-moleculaires-comprenant-des-espaceurs-auto-effondrables-multifonctionnels-pour-la-detection-d-activites-enzymatiques-232636.kjsp?RH=THESE_SOUT [extrait le 2015-01-26] le document en entier -----	1-28

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/051705

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2007146066	A2	21-12-2007	CA 2659512 A1	21-12-2007
			EP 2044038 A2	08-04-2009
			ES 2498043 T3	24-09-2014
			JP 5363315 B2	11-12-2013
			JP 2009539848 A	19-11-2009
			JP 2013199489 A	03-10-2013
			WO 2007146066 A2	21-12-2007
WO 2012122420	A2	13-09-2012	US 2012295834 A1	22-11-2012
			US 2014206597 A1	24-07-2014
			WO 2012122420 A2	13-09-2012
WO 0059510	A1	12-10-2000	AR 020562 A1	15-05-2002
			AU 768720 B2	08-01-2004
			AU 3184500 A	23-10-2000
			BG 106038 A	28-06-2002
			BR 0009433 A	15-01-2002
			CA 2366858 A1	12-10-2000
			CN 1351497 A	29-05-2002
			CR 6471 A	25-11-2003
			CZ 20013465 A3	16-10-2002
			DZ 3037 A1	27-03-2004
			EE 200100509 A	16-12-2002
			EP 1185275 A1	13-03-2002
			GT 2000000038 A	22-09-2001
			HN 2000000040 A	02-02-2001
			HR P20010716 A2	31-12-2002
			HU 0201011 A2	28-08-2002
			ID 30489 A	13-12-2001
			IS 6076 A	18-09-2001
			JP 3581103 B2	27-10-2004
			JP 2002541109 A	03-12-2002
			MA 26727 A1	20-12-2004
			MX PA01009871 A	24-04-2002
			MY 136039 A	29-08-2008
			NO 20014642 A	28-11-2001
			NZ 514144 A	28-09-2001
			OA 11856 A	03-03-2006
			PA 8493201 A1	30-07-2002
			PE 16012000 A1	25-01-2001
			PL 350884 A1	10-02-2003
			SK 13532001 A3	04-02-2003
			TN SN00065 A1	03-04-2003
			TR 200102810 T2	21-01-2002
			UA 71951 C2	17-01-2005
			US 6414149 B1	02-07-2002
			US 6660740 B1	09-12-2003
			US 2003065179 A1	03-04-2003
			US 2004077671 A1	22-04-2004
			US 2005020578 A1	27-01-2005
			UY 26089 A1	31-10-2000
			WO 0059510 A1	12-10-2000
			YU 71101 A	15-07-2004
			ZA 200108039 A	22-07-2003
WO 2013045854	A1	04-04-2013	EP 2760844 A1	06-08-2014
			JP 2014530210 A	17-11-2014
			US 2014234887 A1	21-08-2014

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/051705

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		WO 2013045854 A1	04-04-2013

WO 2014020285	A1	06-02-2014	EP 2880045 A1 10-06-2015
			FR 2994180 A1 07-02-2014
			US 2015299762 A1 22-10-2015
			WO 2014020285 A1 06-02-2014
