

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 février 2014 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/020264 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C07D 401/14 (2006.01) *C07F 15/02* (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01) *A61K 49/10* (2006.01)
C07D 409/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2013/051791

(22) Date de dépôt international :
25 juillet 2013 (25.07.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1257413 31 juillet 2012 (31.07.2012) 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 Novembre 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**; 130 rue Sully, F-69006 Lyon (FR). **MAURIN, Philippe**; 55, rue Saint-Antoine, F-69003 Lyon (FR). **TOUTI, Fayçal**; 34, avenue Debourg, F-69007 Lyon (FR).

(74) Mandataires : **SARLIN, Laure** et al.; 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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.

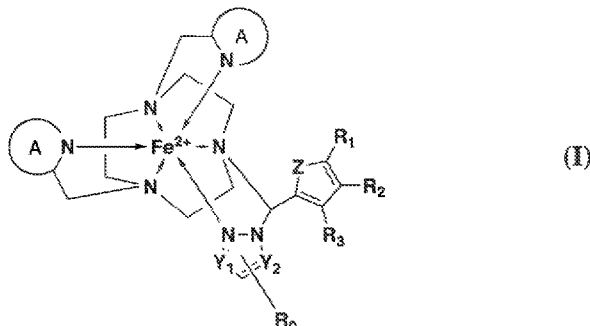
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,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

Publiée :

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

(54) Title : NOVEL IRON COMPLEXES CAPABLE OF DETECTING A NITRO-REDUCING CHEMICAL OR BIOCHEMICAL ENTITY, IN PARTICULAR BY *IN VIVO* MRI, AND *IN VITRO* DETECTION METHOD

(54) Titre : NOUVEAUX COMPLEXES DE FER ADAPTES A LA DETECTION D'UNE ENTITE CHIMIQUE OU BIOCHIMIQUE NITROREDUCTRICE, EN PARTICULIER PAR IRM *IN VIVO* ET PROCEDE DE DETECTION *IN VITRO*



(57) Abstract : The present invention concerns complexes of formula (I) as defined in claim 1, and such complexes for the *in vivo* detection by MRI of a chemical or biochemical stimulus resulting in the reduction of an -NO $\cdot$ function, and a method for the *in vitro* detection of a chemical or biochemical stimulus resulting in the reduction of an -NQ $_2$ function present in the complexes of formula (I).

(57) Abrégé : La présente invention concerne des complexes de formule (I) tels que définis à la revendication 1, ainsi que de tels complexes pour la détection *in vivo* par IRM d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction -NO $\cdot$., ainsi qu'un procédé de détection *in vitro* d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction -NQ $_2$ présente sur le complexes de formule (I).



WO 2014/020264 A1

NOUVEAUX COMPLEXES DE FER ADAPTES A LA DETECTION D'UNE ENTITE CHIMIQUE OU BIOCHIMIQUE NITROREDUCTRICE, EN PARTICULIER PAR IRM *IN VIVO* ET PROCEDE DE DETECTION *IN VITRO*

5 La présente invention concerne le domaine technique de la détection d'une enzyme nitroréductase ou d'autres entités chimiques ou biochimiques nitroréductrices. Plus précisément, l'invention concerne des complexes ferreux qui constituent les premiers exemples d'une sonde magnétogénique pour la détection de ce type d'activité, de tels complexes pour la détection *in*
10 *vivo* par IRM d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction $-NO_2$, ainsi qu'un procédé de détection *in vitro* d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction $-NO_2$.

La détection de nitroréductase a donné lieu à différents travaux. On peut notamment citer la demande WO 2011/012823 qui propose un substrat
15 pour des analyses *in vitro* permettant de mettre en évidence une activité enzymatique nitroréductase grâce à un changement de couleur ou de fluorescence. D'autres systèmes utilisant la fluorescence pour la détection de nitroréductases sont également décrits dans la demande de brevet EP1252520 (A2), dans le brevet US 7,579,140 qui décrit une sonde CytoCy5
20 fluorescente pour la détection des bactéries E. Coli exprimant la nitroréductase (E.Coli NfsB) dans des lignées cellulaires. La 6-nitroquinoline est aussi utilisée, comme sonde fluorogène, pour le même type d'applications (Singleton et al, Cancer Gene Ther. 14 (12), 2007, 953-967). On peut également citer la demande WO 2011/012823 qui propose un substrat pour
25 des analyses *in vitro* permettant de mettre en évidence une activité enzymatique nitroréductase grâce à un changement de couleur ou de fluorescence. L'utilisation de la 6-chloro-9-nitro-5-oxo-5H-benzo(a)phénoxazine (CNOB) pour la détection de l'expression de E. Coli nitroreductase NfsB (qui transforme la CNOB en aminophénoxazine
30 détectable à 625 nm) dans des tumeurs de souris exprimant E.Coli NfsB a également fait l'objet de publications (Liu et al, Cancer Res 68, 19, 2008, 7995-8003 et Lei Cui et al, Organic Letters, 13, 2011, 928-931).

Cependant, de tels substrats sont peu adaptés pour des analyses *in vivo*. En effet, la fluorescence pose des problèmes de diffusion et d'atténuation/pénétration tissulaire du signal qui aboutissent à une mauvaise résolution spatiale (de l'ordre de plusieurs millimètres). Ses applications *in vivo* sont donc très limitées, et concernent en général des tumeurs de surface sous-cutanées.

Or, la détection des nitroréductases présentent également un intérêt *in vivo*. Tout d'abord, les nitroréductases sont impliquées dans l'hypoxie. En effet, lorsque des cellules perdent brutalement leur alimentation en oxygène, elles meurent rapidement en général. Par contre, lorsque la teneur en oxygène diminue de manière progressive (cas des tumeurs hypoxiques, notamment), les cellules vont s'adapter *via* la production de protéines qui vont leur permettre de survivre en inhibant le processus d'apoptose, ou encore en favorisant la vascularisation et en diminuant l'activité des mitochondries. La meilleure façon de mesurer la présence de l'hypoxie serait d'utiliser une sonde qui rentre directement en compétition avec la fourniture de la cellule en oxygène (Krohn et al. « Molecular Imaging of Hypoxia » ; 2008, *J. Nucl. Med.* ; 49 :129S-148S). De nombreuses nitroréductases ont été trouvées dans les tissus, de sorte qu'une sonde pour une activité nitroréductase s'avère être un bon candidat. En effet, avec une telle sonde, plus il manquera d'oxygène pour accepter tous les électrons produits par la chaîne de transport électronique du système de respiration cellulaire, plus la sonde sera transformée (réduite).

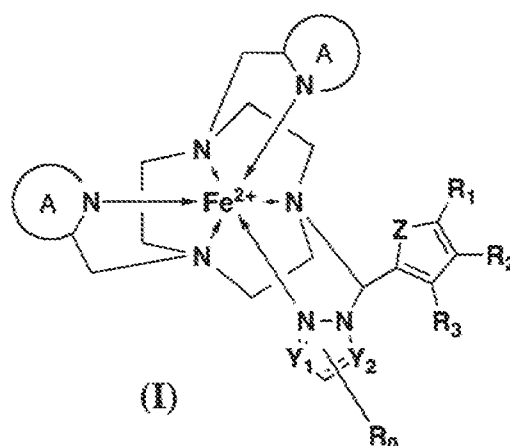
Afin d'éviter le recours à des biopsies qui ne sont pas toujours réalisables selon la localisation de la pathologie et qui ne peuvent en tout cas pas être répétées de nombreuses fois, les tumeurs hypoxiques sont repérées préférentiellement par une méthode d'imagerie non-invasive. Actuellement la seule méthode employée est celle de la Tomographie par Emission de Positrons (TEP). Des molécules traceurs qui présentent une unité nitro-hétéroaromatique et qui comportent également un atome radioactif ont été conçues. Le traceur le plus étudié est le 2-nitroimidazole marqué par du fluor 18 (EF5, FMISO...) pour cartographier les zones hypoxiques dans les tissus

(The Journal of Nuclear Medicine, 49, 6, 2008, 129S-148S). Des études dans le domaine de « virus-directed enzyme prodrug therapy » (VDEPT) utilisant la TEP ont été réalisées *via* la réduction de la 5-aziridiny-2,4-dinitrobenzamide et d'autres dérivés nitrés ont également fait l'objet d'études par TEP (Singleton et al, Cancer Gene Ther 4, 12, 2007 953-967 ; Christofferson et al, Biochem Soc Trans, 37(2), 2009, 413-418). Mais, la technique TEP présente une faible résolution (de l'ordre de plusieurs millimètres), et fait appel à des rayonnements hautement ionisants. De plus, elle nécessite la préparation sur place des radio-pharmaceutiques utilisés.

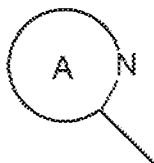
La détection de nitroréductases *in vivo* présentent également un intérêt pour la mise en évidence d'un gène spécifique dans un organisme vivant. Un gène bactérien nitroréductase (NTR) a été commercialisé, en tant que gène rapporteur (EP1252520). Sa mise-en-évidence se fait actuellement par réaction/incubation/contact avec une sonde fluorogénique (*Gene Therapy* (2012) **19**, 295–302; doi:10.1038/gt.2011.101).

Dans ce contexte, la présente invention se propose de fournir un substrat adapté à la détection d'une enzyme nitroréductase ou d'autres stimuli chimiques ou biochimiques qui présentent une activité nitroréductrice et qui utilisent d'autres techniques que la détection fluorimétrique et colorimétrique et la TEP. L'invention se propose également de fournir un substrat qui soit adapté à la détection *in vivo* et/ou en conditions physiologiques.

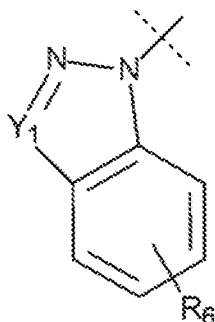
L'invention concerne les complexes de formule (I) :



dans laquelle :



- est un hétérocycle hydrocarboné insaturé azoté, substitué ou non substitué, comprenant de 5 à 6 chaînons et pouvant comprendre au moins un autre atome d'azote ou un atome d'oxygène ou de soufre, l'atome d'azote représenté de type imine présentant un doublet libre qui lui permet de se coordiner au fer,
- Y_1 est un atome d'azote ou CH ,
- Y_2 est un atome d'azote, CH ou un atome de carbone ;
- $-Z-$ représente $-CHR_4=CHR_5-$, $-O-$ ou $-S-$,
- R_0 est un atome d'hydrogène, ou un groupe $-CF_3$ ou $-NO_2$;
- ou bien lorsque $Y_2 = C$, R_0 est lié à Y_2 et à l'hétérocycle pour former un groupe :



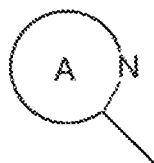
- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 représentent, chacun indépendamment, un atome d'hydrogène, de brome, chlore, fluor ou iode, ou un groupe choisi parmi les groupes $-NO_2$, les groupes alkyle substitués ou non substitués, les groupes alcoxy substitués ou non substitués, les groupes $-C(O)$ alkyle substitués ou non substitués, les groupe $-C(O)O$ alkyle substitués ou non substitués, les groupes amines primaires, secondaires ou tertiaires substitués ou non substitués ; étant entendu que R_1 et/ou R_3 représente(nt) $-NO_2$,
- ainsi que leurs sels.

Les complexes (I) selon l'invention sont des chélates de fer(II) non-magnétiques (diamagnétiques) qui se transforment en milieu aqueux sous l'influence d'une activité nitroréductase ou analogue en un complexe

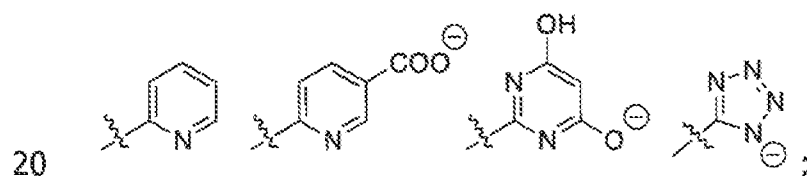
magnétique (paramagnétique) et fonctionnent donc comme des sondes selon un mode éteint-allumé. La susceptibilité magnétique croissante due à une telle réaction peut être repérée par différentes méthodes de détection telles que les spectroscopies par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et
 5 Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), ou encore les Imageries par Résonance Magnétique (IRM) et par Résonance de Spin Electronique (IRSE). La détection peut être réalisée *in vivo*, en fonction de la méthode de détection sélectionnée, ou *ex vivo* ou *in vitro* sur des échantillons biologiques ou cellulaires notamment, placés sur des supports de détection adaptés, par
 10 exemple du type microplaques multi-puits.

Les complexes selon l'invention comportent un groupement nitroaryle, qui permet une réponse relativement spécifique à un stimulus biochimique tel que l'activité de nombreuses nitroréductases, mais aussi à des stimuli purement chimiques tels que les agents réducteurs.

15 Selon des modes de réalisation particulier, les complexes (I) selon l'invention présentent une ou une combinaison des caractéristiques ci-dessous, voire toutes les caractéristiques ci-dessous lorsqu'elles ne s'excluent pas l'une l'autre :

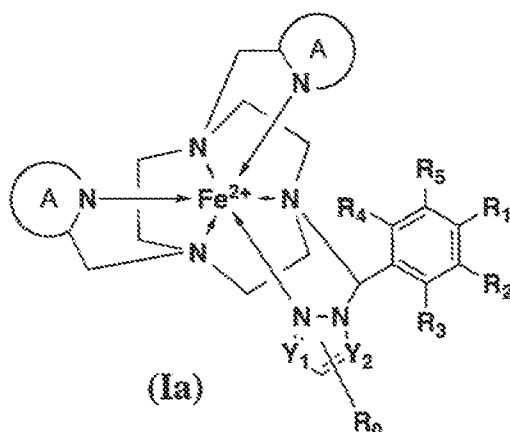


- correspond à l'une des structures suivantes :

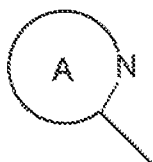


- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 représentent, chacun indépendamment, un atome d'hydrogène, de brome, chlore, fluor ou iode, ou un groupe $-NO_2$, (C_1-C_6) alkyle, (C_1-C_6) alcoxy, $-C(O)(C_1-C_6)$ alkyle, $-C(O)O(C_1-C_6)$ alkyle, $-NRaRb$ avec Ra et Rb qui représentent, chacun
 25 indépendamment, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6) alkyle ; étant entendu que R_1 et/ou R_3 représente(nt) $-NO_2$;

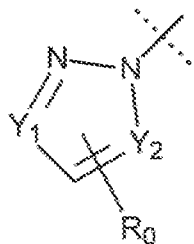
- Z est un atome d'oxygène ou un atome de soufre ou bien les complexes de formule (I) répondent à la formule (Ia) :



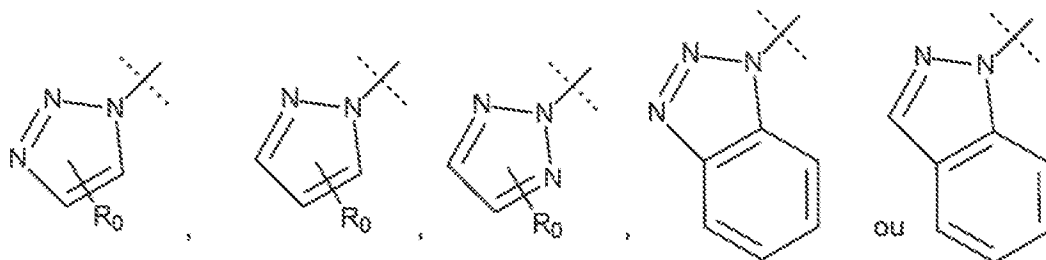
- 5 - $R_1 = \text{NO}_2$; dans ce cas, R_3 est, par exemple, un atome d'hydrogène ;
- $R_2 = \text{H}$ et/ou $R_4 = R_5 = \text{H}$ dans le cas des composés de formule (Ia) ;



- est un groupe pyridyle ;



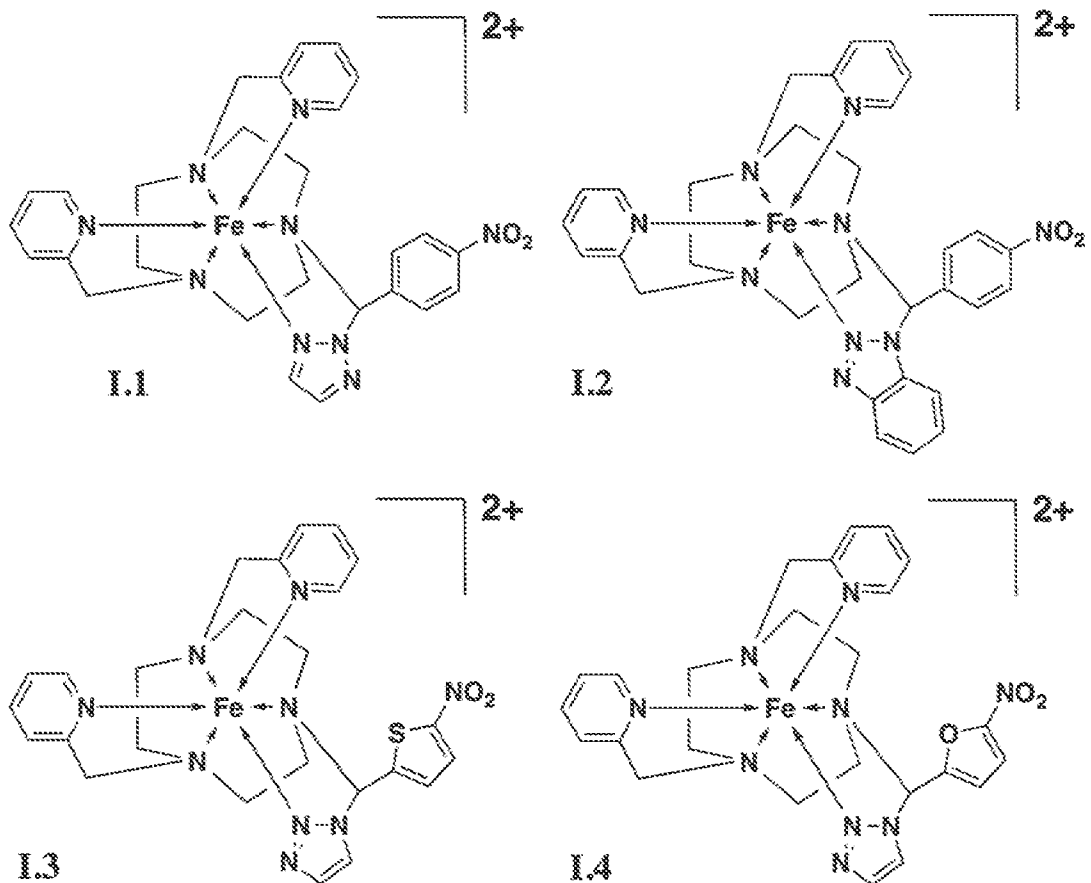
- représente un groupe :



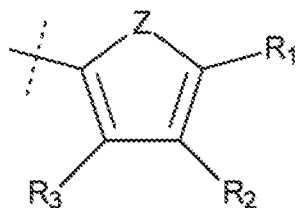
10

R₀ étant un atome d'hydrogène, ou un groupe -CF₃ ou -NO₂ et étant, de préférence, un atome d'hydrogène.

Les composés ci-dessous sont des exemples de complexes (I) selon l'invention.



- 5 La présente invention a également pour objet les complexes de formule (I) et (Ia), quelle que soit leur variante de réalisation décrite dans le cadre de la présente invention, pour la détection *in vivo* chez l'homme ou l'animal, par IRM, d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction de la fonction $-\text{NO}_2$ correspondant au substituant R_1 ou R_3 du cycle :



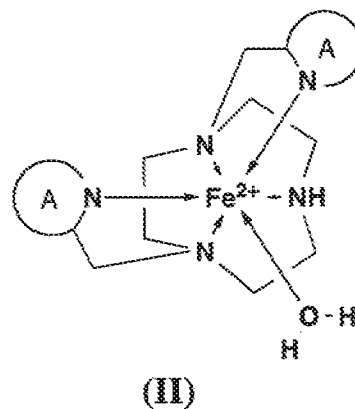
10

tel que défini pour les complexes de formule (I).

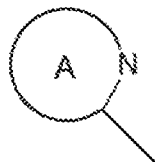
Selon un mode de réalisation préféré, le stimulus est une enzyme nitroréductase. Selon une première variante de mise en œuvre, la nitroréductase est produite par un gène rapporteur dont on souhaite assurer

le suivi. Selon une deuxième variante de mise en œuvre, le stimulus est une hypoxie de tissus cancéreux.

Les complexes obtenus à partir d'un complexe de formule (I) ou (Ia), quelle que soit sa variante de réalisation décrite dans le cadre de la présente invention, après réduction en milieu aqueux de la fonction $-\text{NO}_2$, correspondant au substituant R_1 ou R_3 , répondent à la formule (II) :



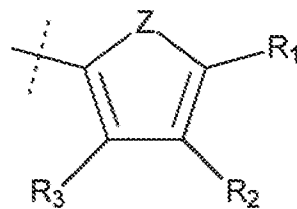
dans laquelle



est tel que défini pour les complexes de formule (I), et se trouvent éventuellement sous la forme d'un sel.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de détection *in vitro* ou *ex vivo*, dans un échantillon d'intérêt, d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction $-\text{NO}_2$, comprenant les étapes successives suivantes :

- a) La mise en présence de l'échantillon d'intérêt avec un complexe de formule (I), quelle que soit leur variante de réalisation décrite dans le cadre de la présente invention, en milieu aqueux,
- b) La détection d'un signal généré, suite à la réduction de la fonction $-\text{NO}_2$ correspondant au substituant R_1 ou R_3 du cycle :



du complexe (**I**), sous l'action du stimulus chimique ou biochimique.

Selon un mode de réalisation préféré, le stimulus chimique ou biochimique est une enzyme nitroréductase. L'échantillon pourra être un échantillon biologique de pH physiologique.

Selon des modes de réalisation préférés, la détection est réalisée à l'étape b) par RMN, IRM ou par chromatographie à haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Le signal détecté correspond, dans ce cas, le plus souvent à la concentration du complexe (**II**) précédemment défini éventuellement sous la forme d'un sel, au temps de relaxation et/ou à la relaxivité obtenue par RMN ou IRM du complexe (**II**) ou d'un de ses sels.

La description détaillée qui va suivre permet de mieux comprendre l'invention. En préliminaire, les définitions de certains termes utilisés dans le cadre de l'invention sont données.

Par groupe « alkyle », on entend une chaîne hydrocarbonée, saturée, linéaire ou ramifiée. A titre d'exemple de groupe alkyle comprenant de 1 à 6 atomes de carbone, nommés (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.

Lorsqu'il est indiqué qu'un groupe est « substitué », cela signifie qu'il est substitué par un ou plusieurs substituants, notamment choisis parmi les atomes de chlore, brome, iode ou fluor, les groupes cyano, alkyle, trifluoroalkyle, trifluorométhyle, alcényle, alcynyle, cycloalkyle, aryle, hétérocycloalkyle, amino, alkylamino, dialkylamino, hydroxy, alcoxy, aryloxy, -COOH. Les termes utilisés pour la définition de ces substituants sont ceux usuellement reconnus par l'homme du métier.

Par « nitroréductase », on entend une enzyme capable de catalyser dans un milieu aqueux la réduction d'un groupe nitro-phényle ou nitro-

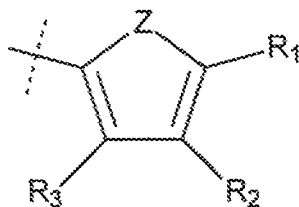
hétéroaryle partiellement, ou totalement en amino-phényle ou amino-hétéroaryle. Une telle action se produit, généralement, en présence de son 2^{ème} substrat, le réducteur naturel cellulaire NADH (ou NADPH), ou, si l'on travaille dans un contexte *ex vivo*, en présence de certains autres substrats réducteurs tel que la cystéine, ou encore le 3-acétylpyridine-ribose, le nicotineamide ribotide, le ribotide de l'acide nicotinique, et le 1-méthyl nicotinamide (R. J. Knox et al. « Virtual co-factors for an E. coli nitroreductase enzyme : relevance to reductively activated prodrugs in antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT), Biochem. Pharmacol. 1995, 49, 1641-1647).

Par « échantillon biologique », on entend tout échantillon issu d'un animal ou, de préférence, du corps humain, tel qu'un échantillon de sang, sérum, urine, salive ... ou encore un échantillon alimentaire d'eau, de boissons, d'aliments quelconque. L'échantillon peut résulter d'un prélèvement direct ou obtenu à partir d'un prélèvement direct, notamment après une opération d'isolement et/ou d'enrichissement.

Les complexes selon l'invention présentent, en fonction des substituants, une charge globale neutre ou positive de +1 ou +2, notamment lorsqu'ils se trouvent dans une solution aqueuse de pH appartenant à la gamme allant de 7 à 8. Lorsqu'ils présentent une charge positive, ils pourront se trouver sous la forme d'un sel, et en particulier d'un sel physiologiquement acceptable. Ce sel peut comprendre un contre-ion, par exemple du type chlorure, carbonate, hydroxyde, perchlorate, tétrafluoroborate, sulfate ou phosphate.

Les complexes selon l'invention présentent une structure dans laquelle :
(a) un atome de fer est complexé dans son état d'oxydation + II (« complexes ferreux ») et à état bas-spin / diamagnétique, qui conduit après activation à un complexe haut-spin / paramagnétique,
(b) l'ion ferreux est complexé par des ligands multi-dentés comportant un macrocycle et des bras coordinants, ce qui confère au complexe une très bonne stabilité, dans des applications *in vivo*, notamment,

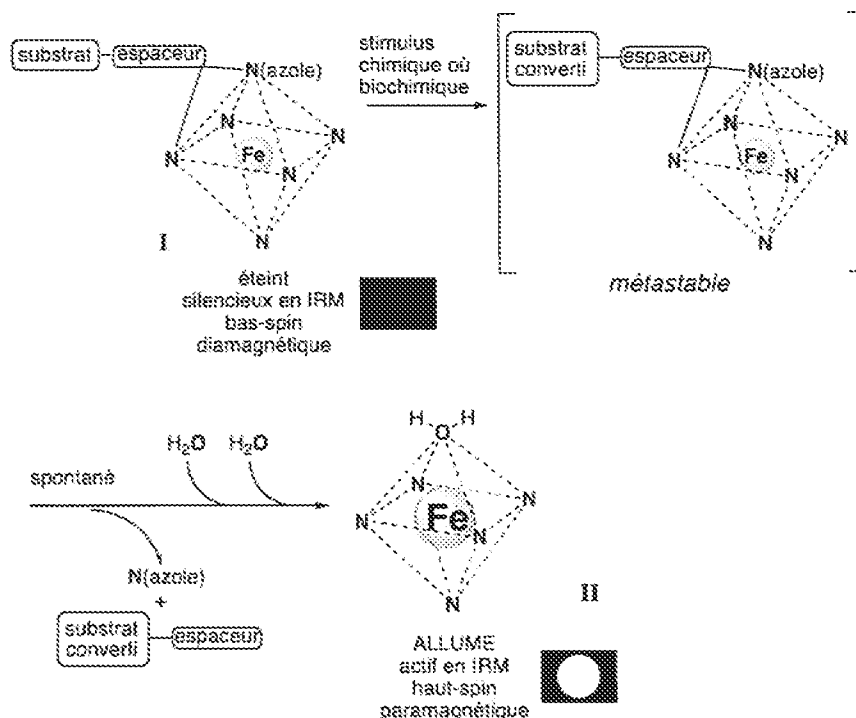
- (c) le bras qui fait partie d'une fonction aminal mixte (N,N-acétal) comporte un hétérocycle de type azole (pyrazole ; 1,2,3-triazole ; 1,2,4-triazole ; et apparentés) qui permet la coordination de cet hétérocycle au centre ferreux et place ce dernier dans un état de bas-spin avant l'action d'un stimulus
- 5 réducteur,
- (d) le bras de type aminal (N,N-acétal) comprend un cycle, du type phényle, thiophényle ou furanyle substitué par une fonction $-NO_2$ réactive vis à vis d'une activité chimique/biochimique d'intérêt, telle que celle des enzymes nitroréductases,
- 10 (e) le bras coordinant va subir une fragmentation spontanée suite à l'action d'un stimulus chimique (réactif tel que l'hydrogène en présence d'un catalyseur ou le dithionite) ou biochimique (enzyme nitroréductase) et va libérer un site de coordination sur le centre ferreux pour une molécule tierce faisant partie du milieu (préférentiellement une molécule d'eau), rendant
- 15 ainsi le complexe haut-spin et donc visible en IRM,
- (f) le choix de la partie porteuse de la fonction $-NO_2$ conduit à la génération d'un signal IRM selon un mode de fonctionnement éteint/allumé, le complexe de fer II passant d'un état de bas-spin à un état de haut-spin sous l'influence d'un stimulus réducteur.
- 20 Les complexes selon l'invention permettent de détecter/imager un stimulus chimique ou biochimique permettant la réduction d'un groupe NO_2 présent sur le cycle :



- en position R₁ et/ou R₃ du complexe, par imagerie par résonance magnétique (IRM). Les complexes selon l'invention n'émettent
- 25 un signal détectable en IRM qu'après leur rencontre avec ledit stimulus qui entraîne une transformation du complexe avec passage d'une entité de bas-spin qui est donc diamagnétique, à une entité de haut-spin qui est donc

paramagnétique. Le **Schéma 1** ci-dessous illustre le processus mis à profit dans le cadre de l'invention :

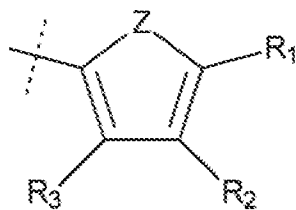
Schéma 1



5 Le complexe ferreux (I) selon l'invention est schématisé sous la forme d'une molécule cage qui entoure le centre métallique. Cette molécule cage comprend six atomes d'azote qui se coordinent au fer dans une architecture octaédrique (illustrée par des lignes pointillées).

Dans les complexes selon l'invention, un des atomes d'azote se distingue des cinq autres du fait : (1) qu'il fait partie d'un hétérocycle de type azole, et (2) que cet azole fait partie d'un motif aminoré (N,N-acétal) constitué également par un atome d'azote appartenant au ligand pentadenté formant le reste de la molécule cage qui complexe l'atome de fer. L'aminoré mixte qui en résulte conduit, en présence d'un stimulus donné, à une dégradation spontanée qui libère un site de coordination sur le centre métallique et permet ainsi d'accueillir une molécule d'eau. Cette transformation change le motif de coordination de l'atome de fer qui passe de "N6" à "N5O1". Le fer, très sensible à ce changement, ne peut plus maintenir son état de bas-spin initial et passe à un état de haut-spin, ce qui le rend ainsi détectable en IRM notamment. Une telle modification, déclenchée par un stimulus

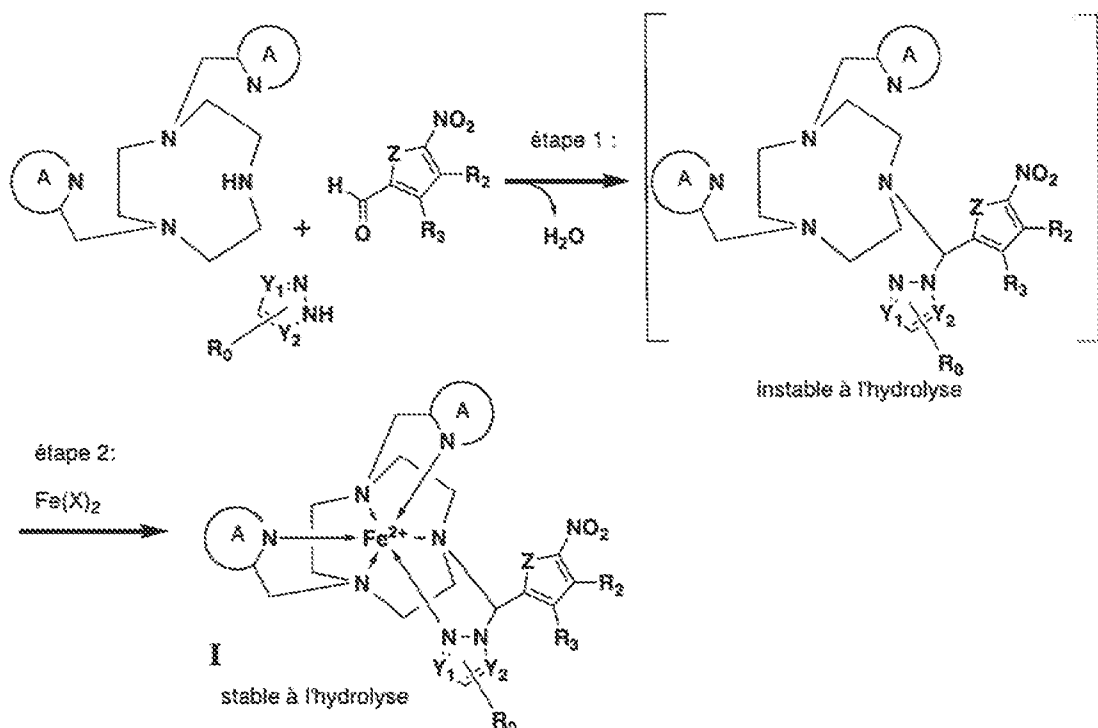
chimique/biochimique, est rendue possible grâce à la présence de l'espaceur sélectionné sous la forme du cycle :



porté par un motif aminal mixte et stabilisé par l'inclusion dans la sphère de coordination d'un centre ferreux.

- 5 Les composés selon l'invention peuvent être préparés par analogie aux techniques présentées dans les exemples et selon le **Schéma 2** suivant.

Schéma 2



- 10 On formera intermédiairement une molécule cage instable en milieu aqueux. Le complexe ferreux sera alors formé grâce à un sel ferreux du type tétrafluoroborate, par exemple.

- Les complexes selon l'invention sont adaptés à la détection par IRM de cibles biomacromoléculaires du type enzyme nitroréductase, qui sont le plus souvent présentes *in vivo* à de très faibles concentrations, ce qui était un
- 15 challenge compte-tenu de la faible sensibilité de détection de cette

technique. En effet, il n'existe actuellement pas de moyens exploités commercialement permettant à un biologiste ou un radiologue de mettre en évidence la présence d'une quelconque activité enzymatique avec la modalité IRM et l'invention propose donc une solution tout à fait intéressante.

5 Les complexes selon l'invention sont parfaitement adaptés pour réaliser de l'imagerie moléculaire *in vivo*, par imagerie par IRM. Ils présentent une bonne stabilité en milieu aqueux à 37°C notamment et, en particulier, dans des milieux physiologiques présentant un pH de l'ordre de 7,4, ou plus généralement dans des solutions aqueuses de pH appartenant à la gamme
10 allant de 7 à 8.

Notamment du fait de leur grande stabilité, ils ne produisent pas de bruit de fond et conduisent donc à une bonne sensibilité de détection. Cette absence de bruit de fond conduit à des résultats d'imagerie qui sont donc très facilement interprétables, du fait du passage d'une absence de signal à
15 la génération d'un signal IRM sous l'action du stimulus entraînant la réduction de la fonction $-NO_2$ présente sur le complexe au niveau des positions R_1 et/ou R_3 .

Les complexes (I) selon l'invention réagissent à des stimuli chimiques/biochimiques réductifs, et permettent de réaliser notamment un
20 suivi de phénomènes biochimiques impliquant des nitroréductases *in vitro* ou *in vivo*. Pour les applications *in vitro*, de manière classique, l'échantillon à étudier et le complexe (I) pourront être placés dans une solution aqueuse tamponnée. Une telle détection *in vitro* peut, par exemple, être utilisée pour la détection de bactéries présentant une activité nitroréductase telles que
25 notamment les bactéries du genre *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providentia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Candida*, *Cryptococcus* ou *Saccharomyces*.

30 Les complexes (I) selon l'invention permettent, par exemple, de détecter une enzyme nitroréductase, en tant que produit d'un gène rapporteur. Les complexes selon l'invention permettront de mettre en

évidence l'expression d'un gène spécifique au sein d'une cellule ou d'un animal génétiquement modifié, pour des applications en recherche médicale. Une transformation du génome par l'insertion d'un gène encodant pour une enzyme nitroréductase bactérienne (« NTR ») pourra être détectée dans le

5 tissu qui exprime ce gène NTR grâce aux complexes selon l'invention. Les complexes selon l'invention peuvent donc permettre de suivre l'expression de la nitroréductase (NTR) utilisée comme système gène rapporteur (système ayant une bonne biocompatibilité et n'ayant pas de toxicité rapportée dans les cellules de mammifères).

10 L'activation des complexes (I) selon l'invention et l'apparition d'un signal IRM peuvent également être causés par un milieu hypoxique, tels que des tissus cancéreux. Les complexes selon l'invention pourront donc être utilisés pour suivre l'hypoxie de tissus cancéreux.

Pour les applications *in vivo*, une solution aqueuse du complexe selon

15 l'invention pourra, par exemple, être injectée directement au niveau des tissus ou cellules cancéreux ou par voie intraveineuse ou autre.

Par ailleurs, contrairement à des sondes passives/non-activables qu'il serait nécessaire de greffer sur leur cible dans un rapport 1/1, dans le cas de l'invention, le suivi de l'enzyme nitroréductase met à profit le phénomène

20 d'amplification enzymatique, c'est à dire qu'une seule molécule d'enzyme cible peut entraîner la transformation de milliers de complexes (I) selon l'invention, ce qui permet d'abaisser considérablement le seuil de détection de l'enzyme par IRM.

De plus, les complexes selon l'invention étant à base de fer, ils peuvent

25 être utilisés en quantité suffisante pour correspondre à un niveau de détection supérieur au seuil de détection imposé par l'imagerie IRM. En effet, le fer est un ion métallique géré homéostatiquement par le corps. En effet, si l'ion métallique est accidentellement libéré de sa molécule cage formée par les ligands aminés, l'ion ferreux sera géré par le corps et, ainsi, recyclé par

30 des voies biochimiques.

Par ailleurs, les complexes selon l'invention présentent un rapport taille/poids comparable à celui d'un médicament de 600 à 900 g/mol, ce qui

ne correspond donc pas au rapport taille/poids rencontré dans les nanotechnologies. Ceci a pour conséquence que la vitesse de diffusion des complexes selon l'invention est plus importante que celle obtenue avec les nanotechnologies offrant des solutions IRM sous la forme de nanoparticules.

5 De plus, leur voie d'évacuation est différente de celle des nanoparticules.

Les complexes selon l'invention trouvent donc de nombreuses applications notamment dans des activités de recherche en sciences de la vie, en clinique dans des services de radiologie IRM, pour des applications en cancérologie, caractérisation, compréhension de maladies génétiques, ou de
10 suivi thérapeutique, ou encore dans des gels aqueux exploités pour des technologies ayant besoin d'un interrupteur moléculaire.

Les exemples ci-après, en référence aux figures annexées, permettent d'illustrer l'invention.

15 La **Figure 1** représente la structure du complexe **I.1** obtenue par diffraction des rayons X sur monocristal.

La **Figure 2** représente la structure du complexe **I.2** obtenue par diffraction des rayons X sur monocristal.

La **Figure 3** représente la structure du complexe **I.3** obtenue par
20 diffraction des rayons X sur monocristal.

La **Figure 4** présente les spectres de masse obtenus en fonction du temps mettant en évidence la transformation du complexe **I.1** en complexe **II.1** sous l'action d'une enzyme nitroréductase.

La **Figure 5** présente les spectres de masse obtenus en fonction du
25 temps mettant en évidence la transformation du complexe **I.1** en complexe **II.1** sous l'action d'hydrogène, en présence d'un catalyseur Pd/C et la **Figure 6**, les spectres de masse obtenus à t=0 et 24h, en l'absence de conditions réductrices.

La **Figure 7** présente l'évolution du temps de relaxation longitudinal T1
30 (secondes) des spins nucléaires d'hydrogène de l'eau en fonction du temps (min.), obtenu avec le complexe **I.1**, avec et sans conditions réductrices H₂-Pd/C.

La **Figure 8**, quant à elle, présente les images fantômes (IRM à 7 Tesla) de solutions d'incubation du composé **I.1** dans le cas de l'action de la nitroréductase (hydrogénation catalysée par de Pd/C (5%) dans de tampon PBS (colonne gauche) ; contrôle négatif en absence d'un stimulus réducteur (colonne centrale) ; niveau de contraste de PBS pur (colonne droite) ;

5 (colonne centrale) ; niveau de contraste de PBS pur (colonne droite) ; contrôle positif d'une solution d'un agent de contraste passif utilisé en clinique (« Dotarem » à 4 mM dans du PBS à 50 mM ; en bas).

La **Figure 9** présente le % de viabilité en fonction de la concentration en composé **I.1** concentrations en mM (chaque expérience ayant été répétée

10 six fois) de cellules HeLa (lignée cellulaire immortelle et cancéreuse issue du cancer cervical).

Les abréviations suivantes sont utilisées :

HPLC = Chromatographie en phase liquide à haute performance.

NTR = nitroréductase

15 IRM = Imagerie par Résonance Magnétique

RMN = Résonance Magnétique Nucléaire

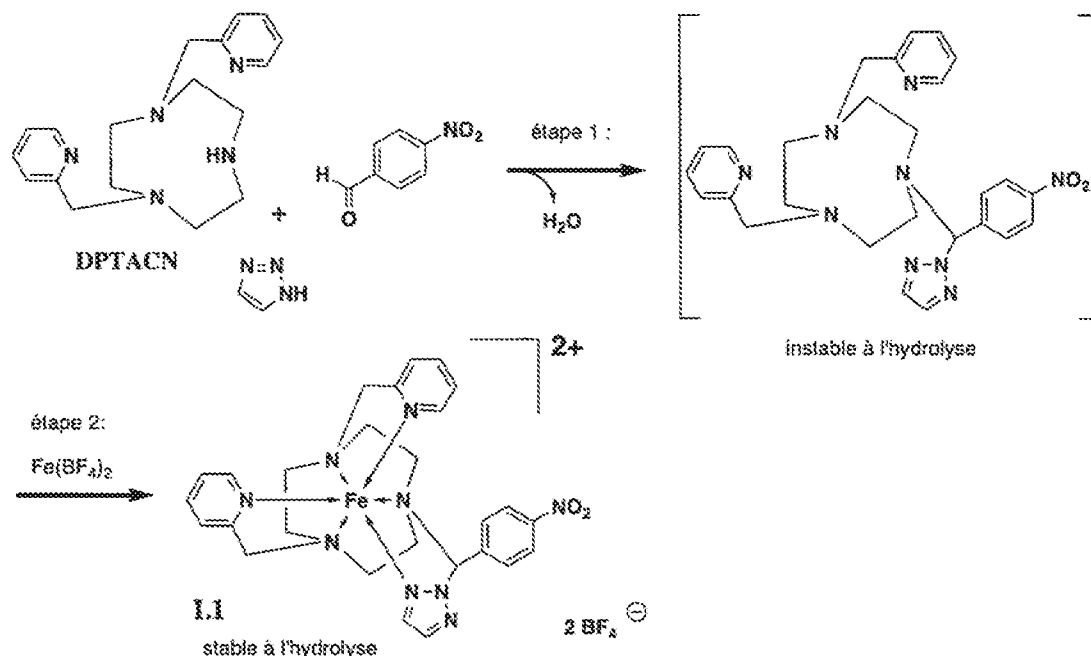
LC-MS = chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse

I. SYNTHÈSE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS

Exemple 1 : Préparation du substrat I.1 répondant à la formule (Ia)

Le substrat I.1 est préparé comme décrit sur le Schéma 3 ci-dessous.

5 Schéma 3 : synthèse chimique de l'exemple I.1

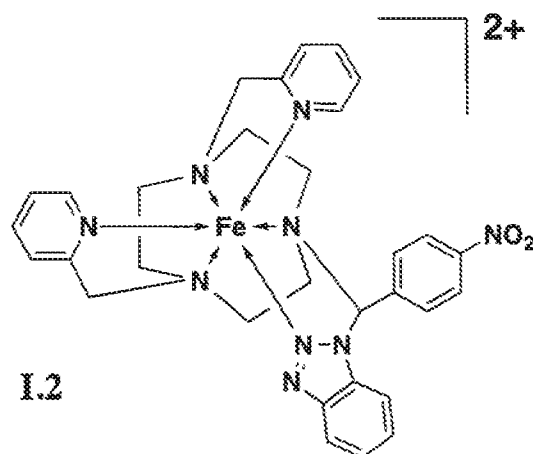


Dans un monocol de 50 mL, à une solution de 25 mL de benzène contenant 0,8 g de DPTACN (Stavila, V., Allali, M., Canaple, L., Stortz, Y., Franc, C., Maurin, P., Beuf, O., et al. (2008). Significant relaxivity gap between a low-spin and a high-spin iron(II) complex of structural similarity: an attractive off/on system for the potential design of responsive MRI probes. *New J Chem*, 32, 428–435) fraîchement synthétisé est ajouté 0,38 g (1,5 éq) de p-nitro benzaldéhyde et 0,145 mL (1,5 éq) de 1,2,3-triazole commerciaux. Un appareil de Dean-Stark avec siphon est adapté sur le ballon à monocol et un reflux de 18 heures est maintenu, au bout desquels le brut réactionnel est amené à température ambiante sous argon, avant d'y ajouter une solution de sels de Fer (II) anhydres ($[Fe(BF_4)_2 \cdot 6 MeCN]$) dans l'acétonitrile. La titration du ligand synthétisé (présenté entre crochets dans le SCHEMA de synthèse) par les sels ferreux est suivie par LC-MS et la solution est agitée pendant 15 minutes avant d'être filtrée. Les solvants sont évaporés sous pression réduite, puis repris dans un minimum de mélange eau/acétonitrile (95/5, v/v), afin d'être déposés sur une cartouche à silice phase-inverse

(C18) pré-conditionnée avec de l'acétonitrile (2 volumes de cartouche), puis par de l'eau (2 volumes de cartouche). Après élution avec 250 mL d'eau pure, un gradient progressif eau/acétonitrile (99/1 jusqu'à 90/10, v/v) est établi, au bout duquel plusieurs fractions de couleur rouge intense sont collectées. Les diverses fractions rouges sont analysées par LC-MS et rassemblées, puis l'éluant est évaporé sous pression réduite pour conduire à une résine rouge. Celle-ci est recristallisée par diffusion liquide-liquide (acétonitrile-éther) à 4°C dans des tubes en pyrex de 50 mL, conduisant après plusieurs jours à l'obtention de cristaux rouge bourgogne qui sont collectés pour fournir 0,55 g (29%) d'une poudre micro cristalline d'une pureté de 100 %.

La structure du composé **I.1** a été établie à partir d'une analyse par diffraction des rayons-X d'un monocristal et est présentée **Figure 1**. Par souci de clarté et pour faciliter l'interprétation de l'image présentée **Figure 1**, les atomes d'hydrogène ont été omis, sauf ceux du bras comprenant le triazole et le nitro-phényle.

Exemple 2 : Préparation du substrat I.2 répondant à la formule (Ia)



Le composé **I.2** a été préparé de manière analogue au composé **I.1**, en remplaçant le 1,2,3-triazole par le 1,2,3-benzotriazole.

La structure du composé **I.2** a été établie à partir d'une analyse par diffraction des rayons-X d'un monocristal et est présentée **Figure 2**. Par souci de clarté et pour faciliter l'interprétation de l'image présentée **Figure**

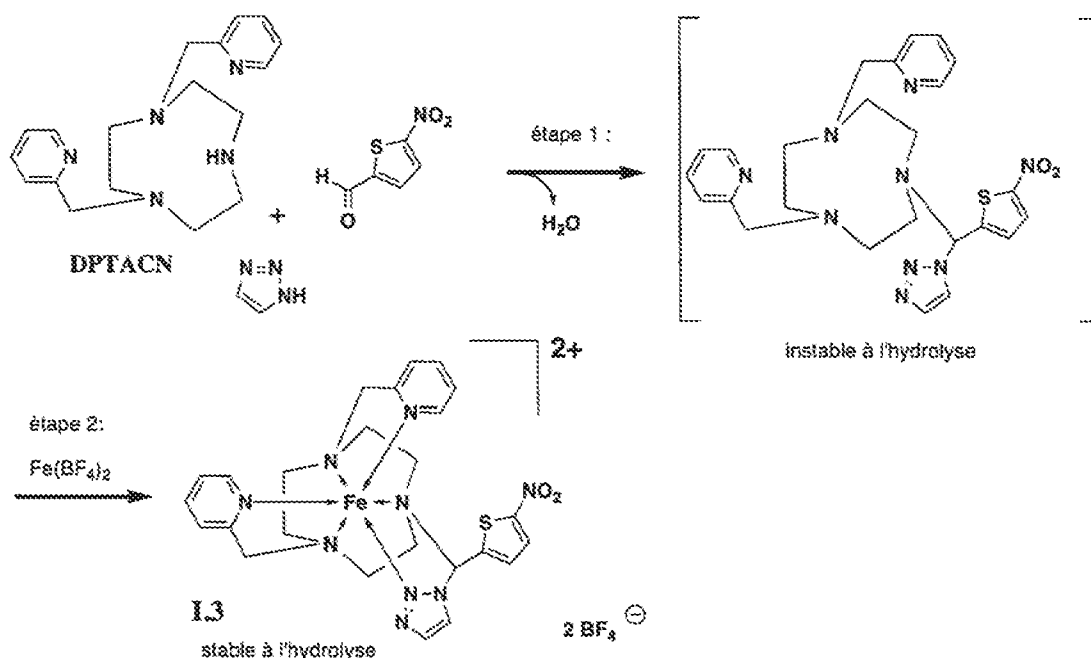
2, les atomes d'hydrogène ont été omis, sauf ceux du bras comprenant le triazole et le nitro-phényle.

Exemple 3 : Préparation du substrat I.3 répondant à la formule (I)

5 avec Z=S

Le substrat I.3 est préparé comme décrit sur le Schéma 4 ci-dessous.

Schéma 4 : synthèse chimique de l'exemple I.3



Dans un ballon à monocol de 50 mL contenant une solution de 15 mL
 10 de dichlorométhane anhydre et 0,4 g de DPTACN fraîchement synthétisé,
 sont ajoutés 2,5 g de tamis moléculaire 3 Å, 0,11 mL de triazole (1,5 éq) et
 0,3 g de 5-nitrothiophène-2-carboxaldéhyde (1,5 éq). Cette solution est
 agitée, sous atmosphère inerte pendant 15 heures à température ambiante
 avant d'être titrée par une solution de sels de Fer (II) anhydres dans
 15 l'acétonitrile et agitée pendant quelques minutes avant d'être filtrée. Les
 solvants sont évaporés sous pression réduite, puis repris dans un minimum
 de mélange eau/acétonitrile (95/5, v/v), afin d'être déposés sur une
 cartouche à silice phase-inverse (C18) pré-conditionnée. Après élution avec
 150 mL d'eau pure, un gradient progressif eau/acétonitrile (99/1 jusqu'à
 20 90/10, v/v) est établi, au bout duquel plusieurs fractions de couleur rouge
 intense sont collectées. Les diverses fractions rouges sont analysées par LC-

MS et rassemblées, puis l'éluant est évaporé sous pression réduite pour conduire à une résine rouge. Celle-ci est recristallisée par diffusion liquide-vapeur (acétonitrile-éther) à 4 °C dans des tubes à hémolyse, conduisant à des cristaux rouge bruns qui sont collectés pour fournir 0,12 g (12,5%) de produit d'une pureté de 100 %.

La structure du composé **1.3** a été établie à partir d'une analyse par diffraction des rayons-X d'un monocristal et est présentée **Figure 3**. Par souci de clarté et pour faciliter l'interprétation de l'image présentée **Figure 3**, les atomes d'hydrogène ont été omis, sauf ceux du bras comprenant le triazole et le nitro-thiophényle.

Les différentes analyses par diffraction des rayons X présentées ont été réalisées comme suit :

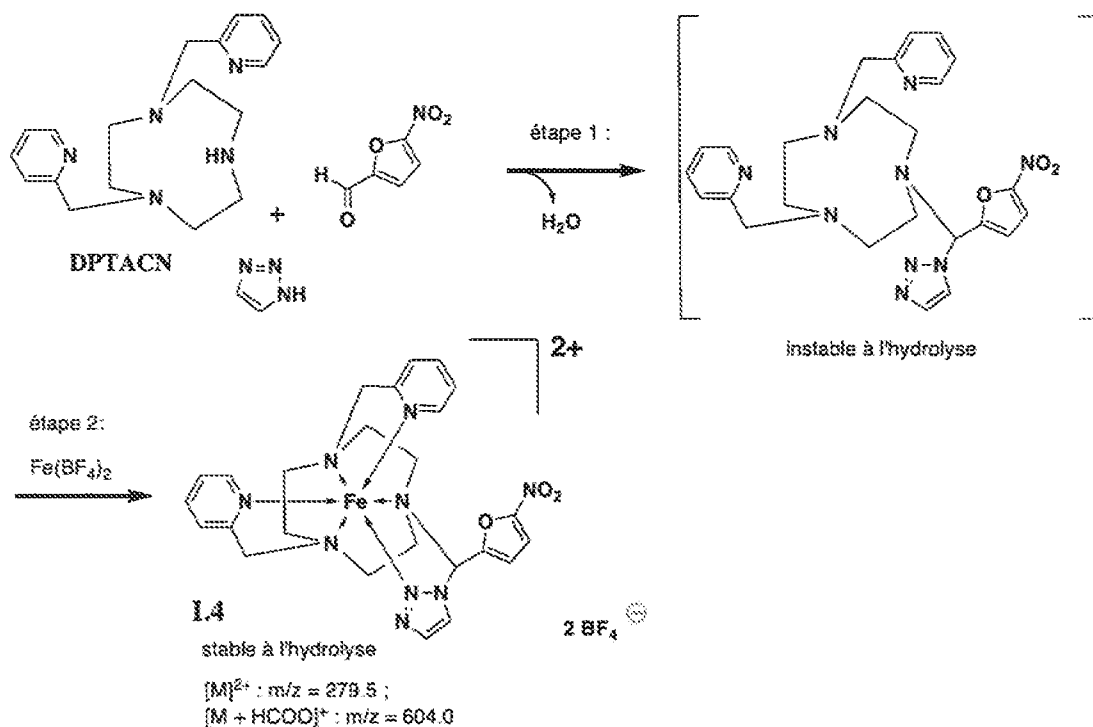
Un cristal approprié est sélectionné et monté sur un diffractomètre Gemini kappa-geometry diffractomètre (Agilent Technologies UK Ltd) équipé avec un détecteur Atlas CCD et utilisant une radiation Mo ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Les intensités sont mesurées à 100 K grâce au logiciel CrysAlisPro software (CrysAlisPro, Agilent Technologies, Version 1.171.34.49 (release 20-01-2011 CrysAlis171.NET) (compiled Jan 20 **2011**, 15:58:25), tout comme la détermination des indices de réflexion, l'affinement des paramètres par cellule unique, de la correction de Lorentz-polarisation, de l'intégration des pics et du bruit de fond. Une correction d'absorption analytique est appliquée en utilisant les faces modélisées du cristal (R.C. Clark, J.S. Reid *Acta Cryst.* **1995**, *A51*, 887-897). Les structures sont résolues par method directe avec SIR97 (A. Altomare, M.C. Burla, M. Camalli, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Grazia, G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna *J. App. Cryst.* **1999**, *32*, 115-119) et la méthode des moindres carrés sur F2 est effectuée avec le logiciel CRYSTALS (P.W. Betteridge, J.R. Carruthers, R.I. Cooper, K. Prout, D.J. Watkin *J. Appl. Cryst.* **2003**, *36*, 1487).

Tous les atomes autres que les atomes d'hydrogène sont définis anisotropiquement. Tous les atomes d'hydrogène sont localisés sur une carte différente, mais ceux attachés à un atome de carbone sont repositionnés géométriquement. Les atomes d'hydrogène sont initialement positionnés

avec de faibles contraintes sur les longueurs de liaison et les angles pour harmoniser leur géométrie (C---H dans la gamme 0.93--0.98 et N---H dans la gamme 0.86--0.89 Å) et Uiso(H) (dans la gamme 1.2-1.5 fois l'Ueq de l'atome parent), après que les positions aient été affinées avec des

5 contraintes du modèle de Riding.

Exemple 4 : Préparation du substrat I.4 répondant à la formule (I) avec Z=O



10 Le complexe **I.4** a été synthétisé selon le protocole de l'exemple 3 ci-dessus en remplaçant le 5-nitrothiophène-2-carboxaldéhyde par le 5-nitrofurane-2-carboxaldéhyde (commercial). Le spectre de masse obtenu qui présente que deux pics de forte intensité à m/z = 279,5 et à m/z = 604,0 confirme la formation du complexe attendu.

15

II. PROCESSUS D'ACTIVATION DES SONDAS ET SUIVI PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Protocole d'activation par la nitroréductase (NTR) :

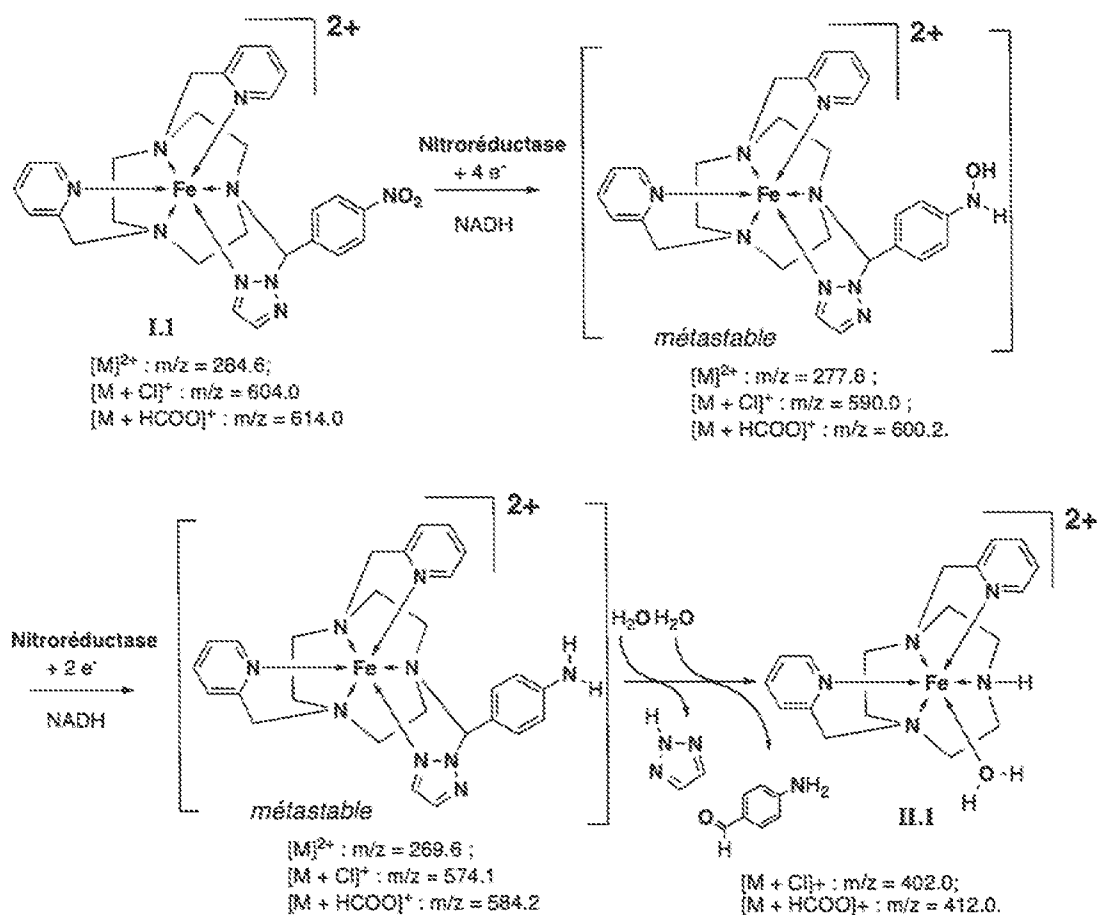
3,0 mg du complexe **I.1** sont dissous dans 1 mL (4 mM) de tampon phosphate salin (50 mM PBS), auxquels on ajoute 1 mg d'enzyme

20

nitroréductase et 35 mg (12,5 éq) de NADH (commercial). On laisse évoluer à 37 °C la solution pendant plusieurs heures et la réaction est suivie par LC-MS à intervalle régulier.

L'attribution des pics de masse apparaissant sur les spectres de masse et correspondant au déclenchement du processus engagé par l'action de la nitroréductase sont présentés sur le **Schéma 5** ci-après.

Schéma 5



Les spectres de masse obtenus à t=0, 30mn, 2h et 4h sont présentés

10 **Figure 4.**

Protocole d'activation par H₂, Pd/C (Images IRM) :

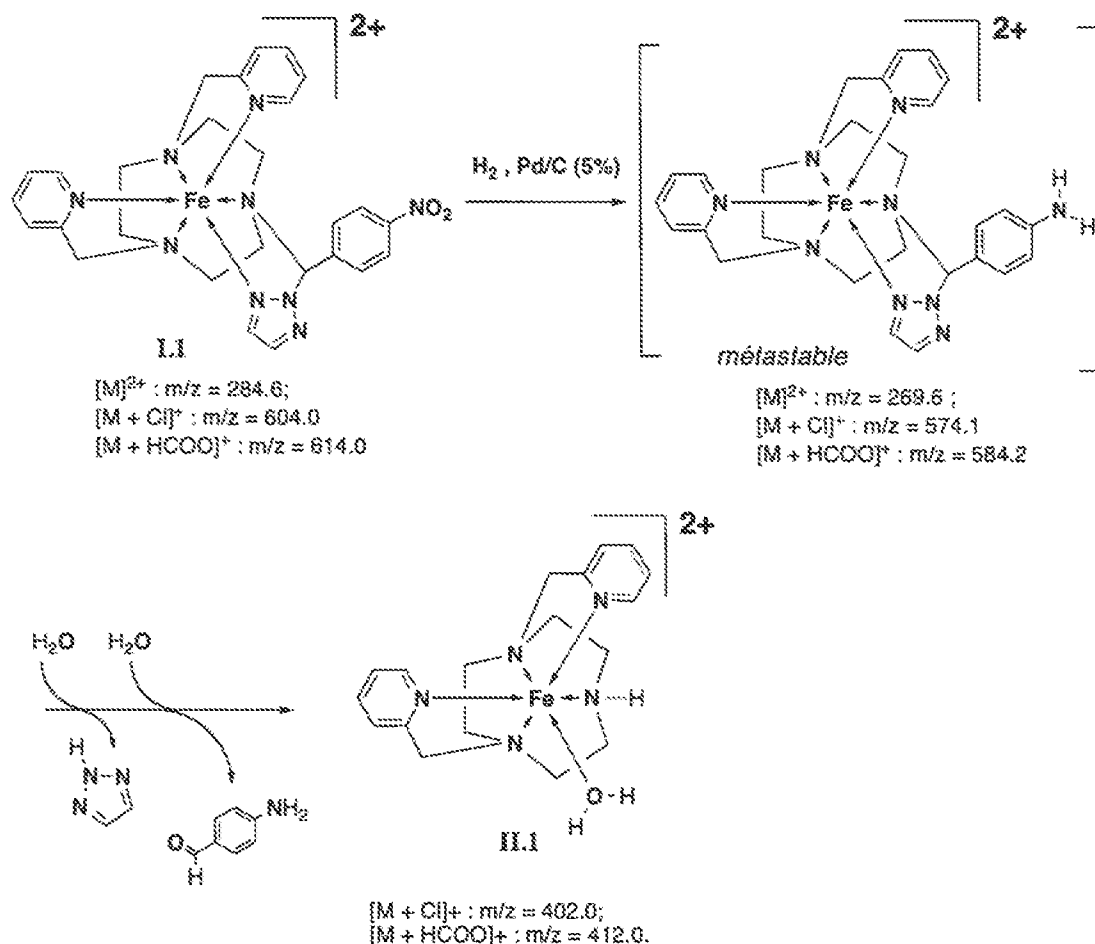
3,0 mg du complexe **I.1** sont dissous dans 1 mL (4 mM) de tampon phosphate salin (50 mM PBS), auxquels on ajoute 10 mg de Pd/C (5% w/w).
 15 On fait buller pendant 10 minutes de l'hydrogène avec une aiguille, puis on vérifie au LC-MS que la totalité du complexe de départ a bien été réduite. La solution est ensuite filtrée et après vérification du pH, on laisse ensuite

évoluer la solution pendant plusieurs heures à 37 °C, et on prend une image (ou on mesure les temps de relaxation, ou on effectue une injection au LC-MS) du tube à intervalle régulier.

- 5 L'attribution des pics de masse apparaissant sur les spectres de masse et correspondant au déclenchement du processus engendrée par l'hydrogénation catalytique qui mime l'action de la nitroréductase sont présentés sur le **Schéma 6** ci-après.

Schéma 6

10



Les spectres de masse obtenus à $t=0$, 10mn, 80mn et 120mn sont présentés **Figure 5**. Cela confirme donc que bien que les étapes intermédiaires soient différentes, l'hydrogénation catalytique conduit au même complexe final que l'action de la nitroréductase.

15

La **Figure 6**, quant à elle, présente les spectres de masse obtenus à $t=0$ et 24h dans les mêmes conditions, mais en l'absence de conditions réductrices (ni hydrogénation, ni NTR/NADH) et joue donc le rôle de contrôle.

5 Les différentes analyses par spectrométrie de masse présentées ont été réalisées comme suit :

Un échantillon issu directement de l'incubation de la sonde avec le stimulus chimique/biochimique est injecté dans un spectromètre de masse de type Agilent MSD 1100. Les spectres affichés ont été mesurés selon le mode
10 « scan » et par ionisation positive dans une source de type electrospray.

III. MISE EN EVIDENCE DU PASSAGE D'UN SIGNAL IRM ETEINT/ALLUME

L'hydrogénation catalytique conduisant au même complexe final que
15 l'action de la nitroréductase, ces essais ont été réalisés, pour des raisons pratiques, en utilisant l'hydrogénation catalytique (conformément au protocole précédemment décrit), à la place d'un stimulus dû à l'action de la nitroréductase. Ces essais réalisés avec le composé **I.1** sont, cependant, tout à fait représentatifs du signal IRM obtenu par action de la nitroréductase.

20 La **Figure 7** met en évidence l'évolution du temps de relaxation longitudinal T1 (secondes) des spins nucléaires d'hydrogène de l'eau en fonction du temps (min.), dans le cas d'une hydrogénation catalytique par du Pd/C à 5 % w/w à 37 °C) (courbe losange), en l'absence de stimulus réducteur (courbe carré). Le niveau de T1 du PBS à 50 mM est également
25 présenté (tirets).

La **Figure 8**, quant à elle, présente les images fantômes (IRM à 7 Tesla) de solutions d'incubation dans le cas de l'action de la nitroréductase (hydrogénation catalysée par de Pd/C (5%) dans de tampon PBS (colonne gauche) ; contrôle négatif en absence d'un stimulus réducteur (colonne
30 centrale) ; niveau de contraste de PBS pur (colonne droite) ; contrôle positif d'une solution d'un agent de contraste passif utilisé en clinique (« Dotarem » à 4 mM dans du PBS à 50 mM ; en bas).

Les résultats présentés **Figure 8** montrent que le complexe **I.1** répond à un stimulus réducteur via une activation du signal en IRM, i.e. un hypersignal qui atteint un niveau de gris clair. Ce niveau de gris est d'intensité approchant celui du Dotarem, agent de contraste clinique passif
5 utilisé dans le domaine du diagnostic anatomique.

Les différentes analyses par IRM présentées ont été réalisées comme suit :

L'acquisition IRM est menée sur des échantillons de différentes concentrations en complexe **I.1**, en utilisant un système 7 T Biospec system
10 (Bruker, Ettlingen, Allemagne) associé à une spire de 32 mm de diameter interne (Rapid Biomedical, Würzburg, Allemagne). Le temps de relaxation longitudinal T1 theist mesuré avec la séquence IR-FISP (de l'anglais « Inversion-Recovery Fast Imaging with Steady-State Precession »). Les paramètres d'imagerie sont : TR/TE = 4.2/2.1 ms, temps d'inversion
15 TI = (68 + i x 50) ms avec i = 0, 1, ..., 32. Les paramètres géométriques sont : 40 x 40 mm² FOV, lame d'épaisseur 5 mm et taille de matrice 256 x 192 . Les valeurs de T1 sont obtenues avec des images multiples TI en appliquant une fonction mono-exponentielle aux données.

20 **IV-TEST DE VIABILITE CELLULAIRE EN PRESENCE DU COMPOSE I.1**

Des cellules HeLa (lignée cellulaire immortelle et cancéreuse issue du cancer cervical, no. 93021013 SIGMA-Aldrich), à raison de 10.000 cellules HeLa par puit, ont été incubées pendant 24 h dans un milieu DMEM avec 10 % sérum FCS, avec ajout de différentes concentrations (de 4mM à 0,25 mM)
25 de composé **I.1**. La **Figure 9** présente dans chaque colonne le taux de survie obtenue en fonction des concentrations en mM (chaque expérience ayant été répétée six fois).

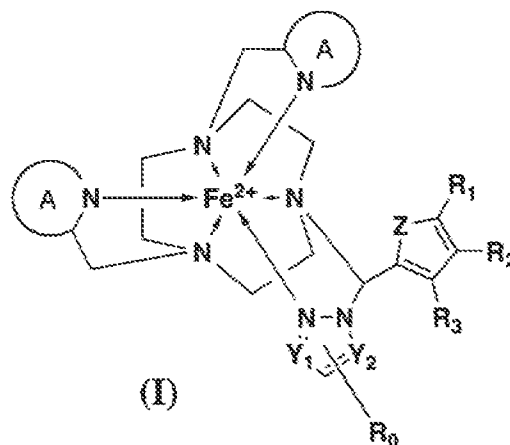
Il ressort de ces résultats que le composé **I.1** ne montre pas de toxicité sur les cellules, même à une concentration élevée de 4 mM.

30 En conclusion, les résultats présentés avec le complexe **I.1** et qui peuvent être généralisés à l'ensemble des complexes revendiqués mettent en évidence une séquence reconnaissance/activation sélective et rapide par la

nitroréductase (activité qui peut être mimée par des réducteurs chimiques tels que l'hydrogène en présence d'un catalyseur tel que le palladium sur charbon). L'activation peut être réalisée à pH physiologique, compte-tenu de la stabilité constatée en solution aqueuse. En l'absence de stimuli réducteur, 5 une absence d'augmentation de relaxivité (en IRM ou RMN) ou d'apparition de produits de dégradation (suivi par HPLC couplée à la spectrométrie de masse) a été constatée, validant le mode d'action OFF/ON.

REVENDICATIONS

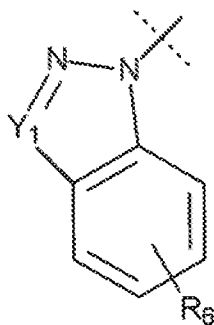
1 - Complexes de formule (I) :



5 dans laquelle :



- est un hétérocycle hydrocarboné insaturé, substitué ou non substitué, azoté comprenant de 5 à 6 chaînons et pouvant comprendre au moins un autre atome d'azote ou un atome d'oxygène ou de soufre, l'atome d'azote représenté de type imine présentant un doublet libre qui lui permet
- 10 de se coordiner au fer,
- Y_1 est un atome d'azote ou CH,
- Y_2 est un atome d'azote, CH, ou un atome de carbone,
- -Z- représente $-CHR_4=CHR_5-$, $-O-$ ou $-S-$,
- R_0 est un atome d'hydrogène, ou un groupe $-CF_3$ ou $-NO_2$; ou bien lorsque
- 15 $Y_2 = C$, R_0 est lié à Y_2 et à l'hétérocycle pour former un groupe :



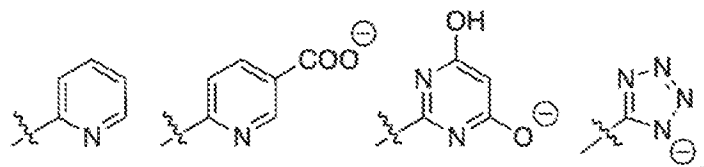
- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 représentent, chacun indépendamment, un atome d'hydrogène, de brome, chlore, fluor ou iode, ou un groupe choisi parmi les groupes $-\text{NO}_2$, les groupes alkyle substitués ou non substitués, les groupes alcoxy substitués ou non substitués, les groupes $-\text{C}(\text{O})$ alkyle substitués ou non substitués, les groupe $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ alkyle substitués ou non substitués, les groupes amines primaires, secondaires ou tertiaires substitués ou non substitués ; étant entendu que R_1 et/ou R_3 représente(nt) $-\text{NO}_2$, ainsi que leurs sels.

2 - Complexes (I) selon la revendication 1 caractérisés en ce que



10

correspond à l'une des structures suivantes :

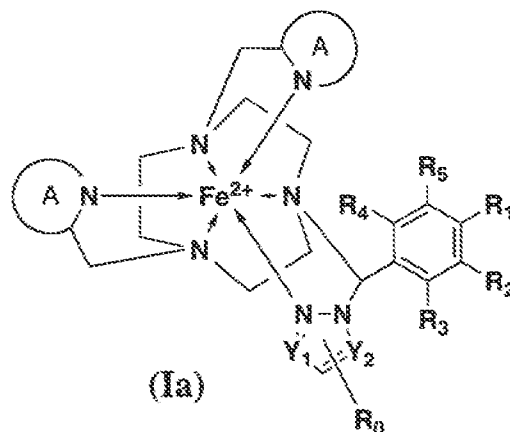


- 3 - Complexes (I)** selon la revendication 1 ou 2 caractérisés en ce que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 représentent, chacun indépendamment, un atome d'hydrogène, de brome, chlore, fluor ou iode, ou un groupe $-\text{NO}_2$, (C_1-C_6) alkyle, (C_1-C_6) alcoxy, $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6)$ alkyle, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_6)$ alkyle, $-\text{NRaRb}$ avec Ra et Rb qui représentent, chacun indépendamment, un atome d'hydrogène ou un groupe (C_1-C_6) alkyle ; étant entendu que R_1 et/ou R_3 représente(nt) $-\text{NO}_2$.

- 4 - Complexes (I)** selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule (Ia) :

20

30



5 - Complexes selon la revendication 4 caractérisé en ce que $R_4=R_5=H$.

6 - Complexes (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisés en ce que Z est un atome d'oxygène ou un atome de soufre.

7 - Complexes (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 6



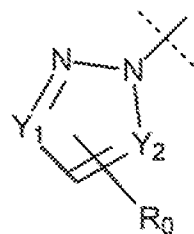
caractérisés en ce que est un groupe pyridyle.

8 - Complexes (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisés en ce que $R_1=NO_2$.

9 - Complexes selon la revendication 8 caractérisé en ce que $R_3=H$.

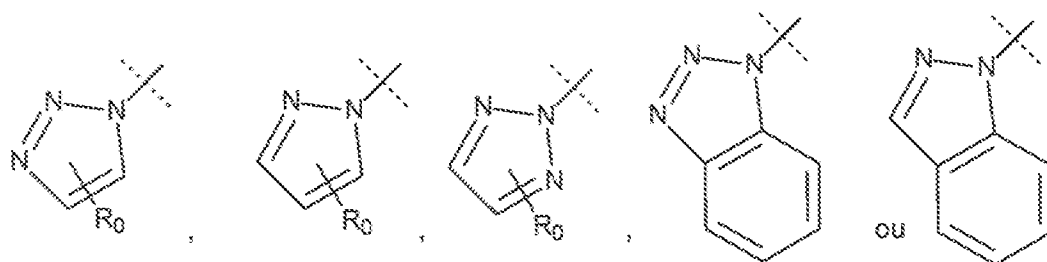
10 **10** - Complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisés en ce que $R_2=H$.

11 - Complexes (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisés en ce que :



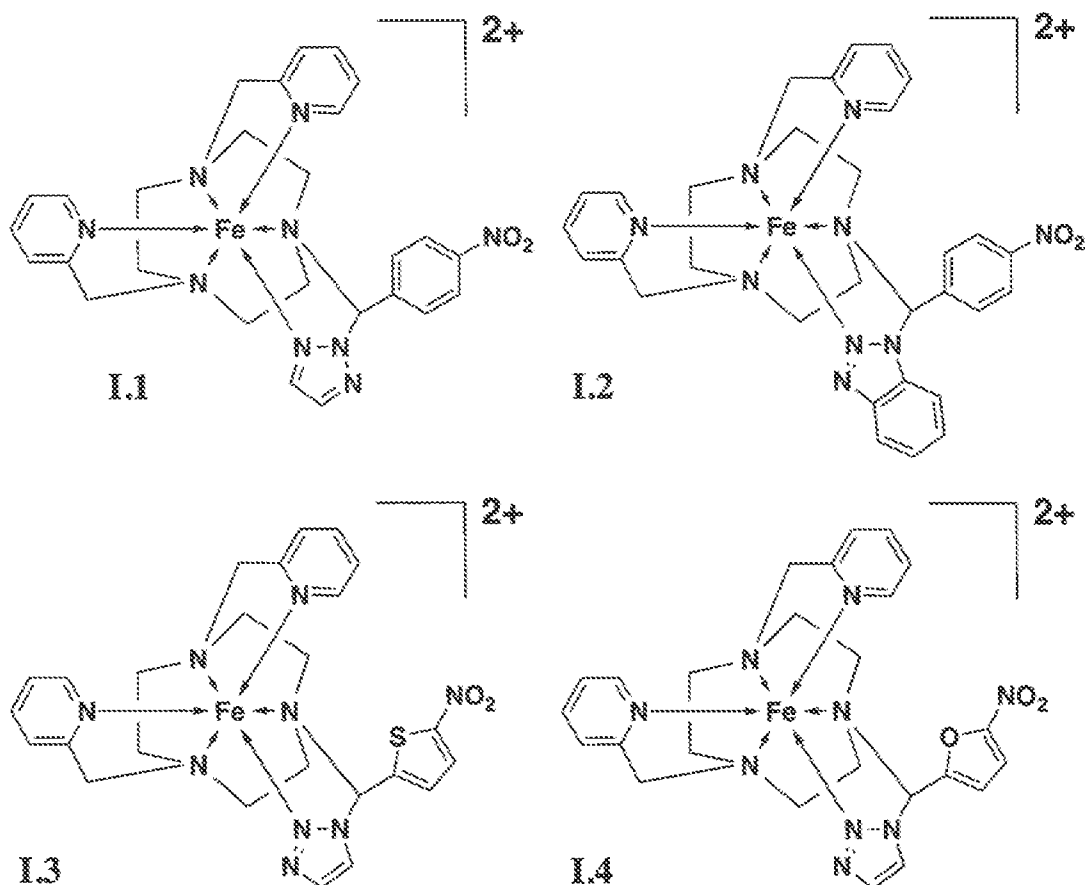
-

représente un groupe :

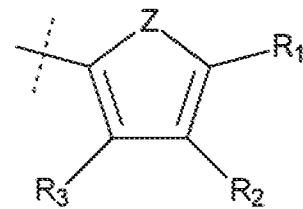


R_0 étant un atome d'hydrogène, ou un groupe $-CF_3$ ou $-NO_2$ et étant, de préférence, un atome d'hydrogène.

- 5 **12** - Complexes (**I**) selon l'une des revendications précédentes caractérisés en ce qu'il est choisi parmi :



- 10 **13** - Complexes (**I**) selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la détection *in vivo* chez l'homme ou l'animal, par IRM, d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction de la fonction $-NO_2$



correspondant au substituant R_1 ou R_3 du cycle :

tel

que défini dans les revendications 1 à 9.

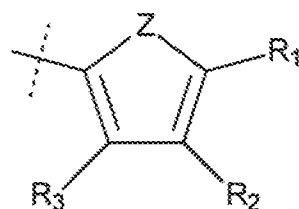
14 - Complexes (**I**) selon la revendication 13 caractérisés en ce que le stimulus est une enzyme nitroréductase.

- 5 **15** - Complexes (**I**) selon la revendication 14 caractérisés en ce que la nitroréductase est produite par un gène rapporteur dont on souhaite assurer le suivi.

16 - Complexes (**I**) selon la revendication 13 caractérisé en ce que le stimulus est une hypoxie de tissus cancéreux.

- 10 **17** - Procédé de détection *in vitro* ou *ex vivo* d'un stimulus chimique ou biochimique entraînant la réduction d'une fonction $-NO_2$ dans un échantillon d'intérêt comprenant les étapes successives suivantes :

- a) La mise en présence de l'échantillon d'intérêt avec un complexe selon l'une des revendications 1 à 12, en milieu aqueux,
- 15 b) La détection d'un signal généré, suite à la réduction de la fonction $-NO_2$ correspondant au substituant R_1 ou R_3 du cycle :



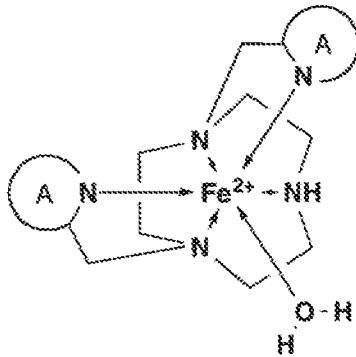
du complexe (**I**), tel que défini dans les revendications 1 à 12, sous l'action du stimulus chimique ou biochimique.

- 20 **18** - Procédé selon la revendication 17 caractérisé en ce que le stimulus chimique ou biochimique est une enzyme nitroréductase.

19 - Procédé selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon biologique de pH physiologique.

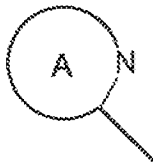
20 - Procédé selon l'une des revendications 17 à 19 caractérisé en ce que la détection est réalisée à l'étape b) par RMN, IRM ou par chromatographie à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

21 - Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que le signal
5 détecté correspond à la concentration du complexe **(II)** :



(II)

, ou d'un de ses sels,



étant tel que défini à la revendication 1, 2 ou 7;

ou bien au temps de relaxation et/ou à la relaxivité obtenue par RMN ou IRM

10 dudit complexe **(II)**, ou d'un de ses sels.

1/7

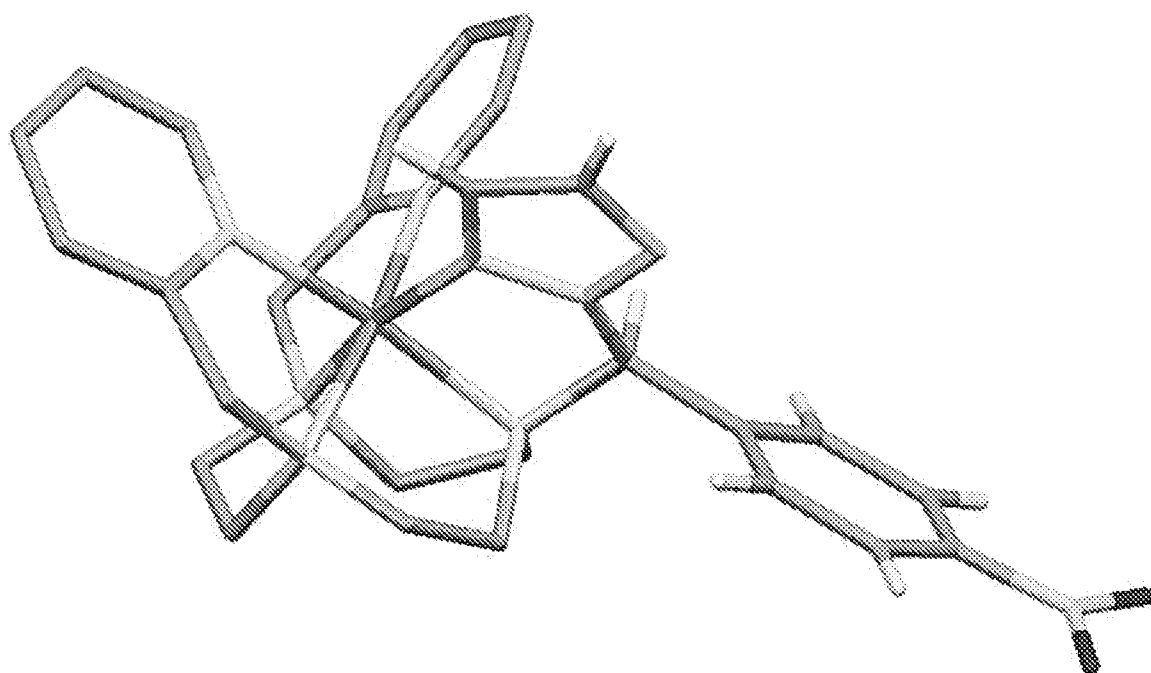


FIG.1

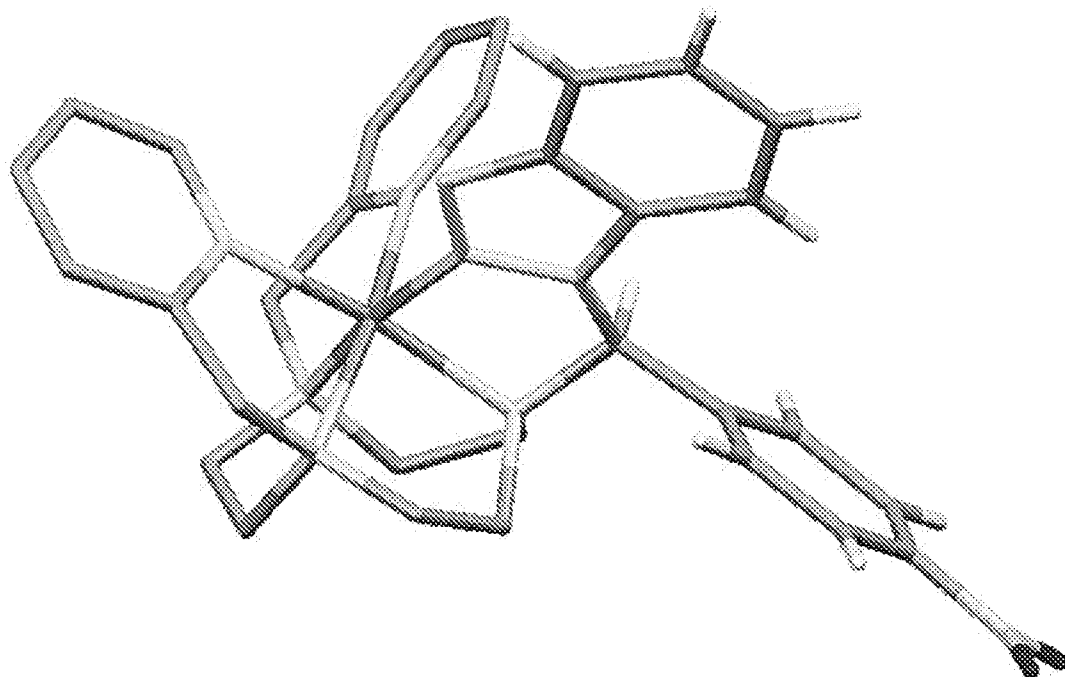


FIG.2

2/7

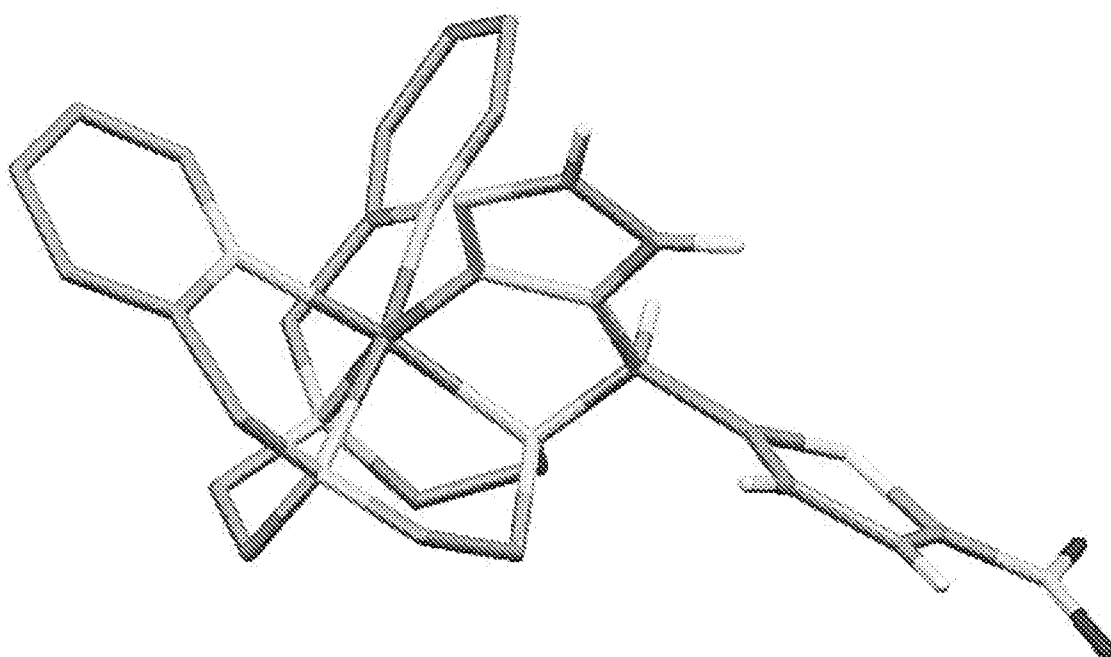
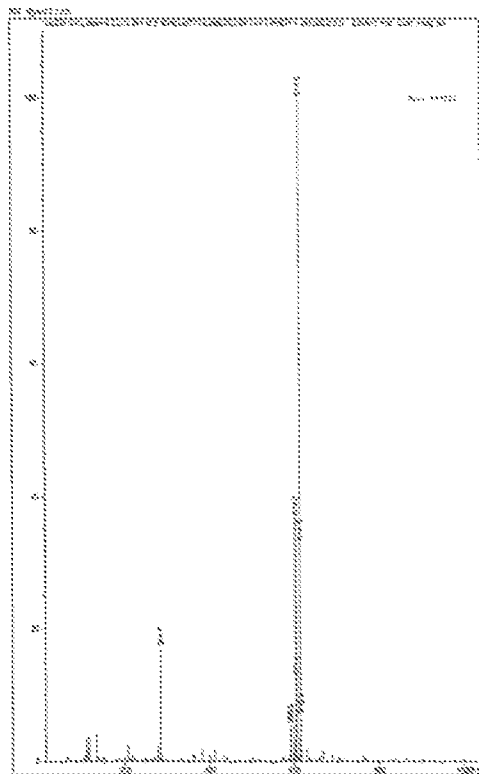


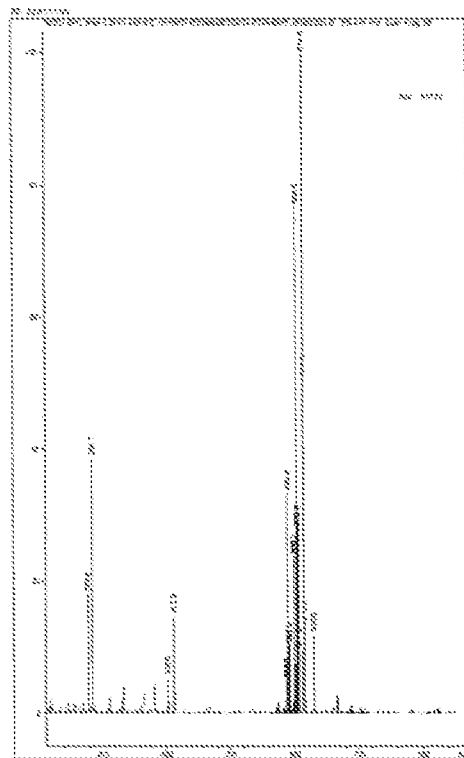
FIG.3

3/7

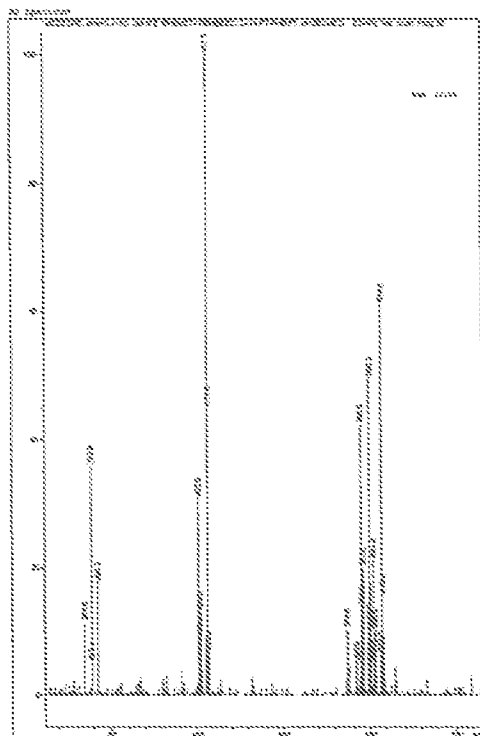
t = 0min



t = 30min.



t = 2h



t = 4h

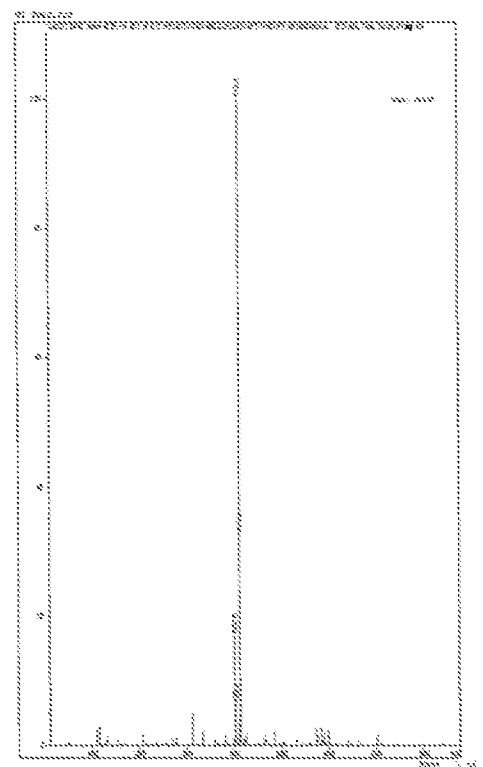
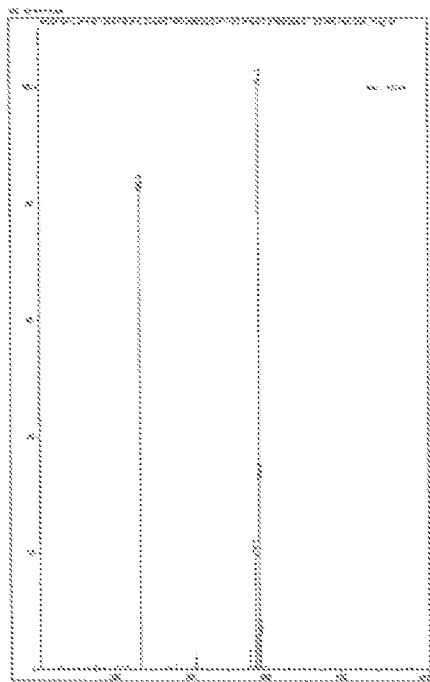


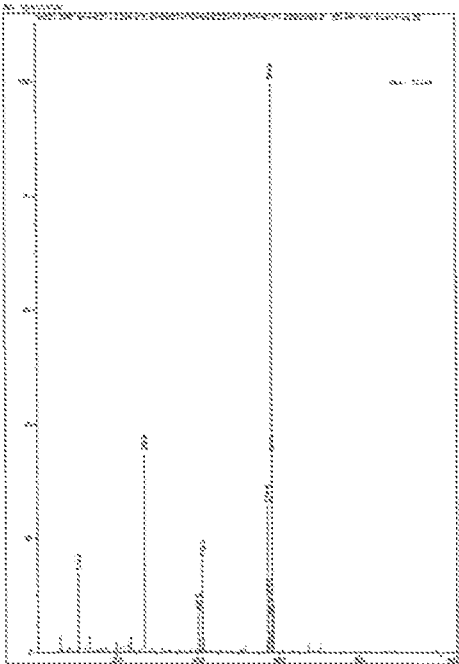
FIG.4

4/7

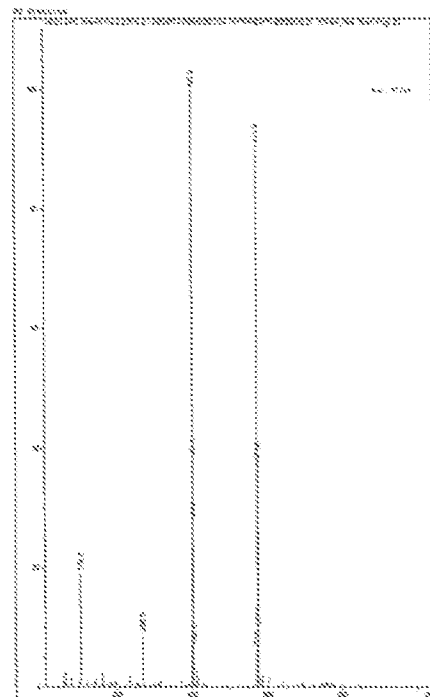
t = 0min



t = 10min.



t = 80min.



t = 120min.

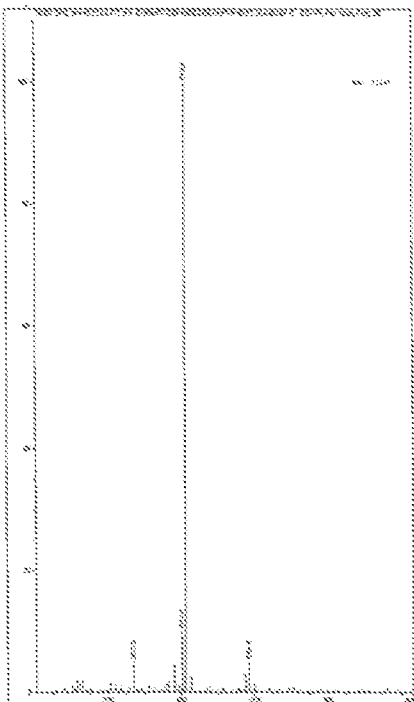


FIG.5

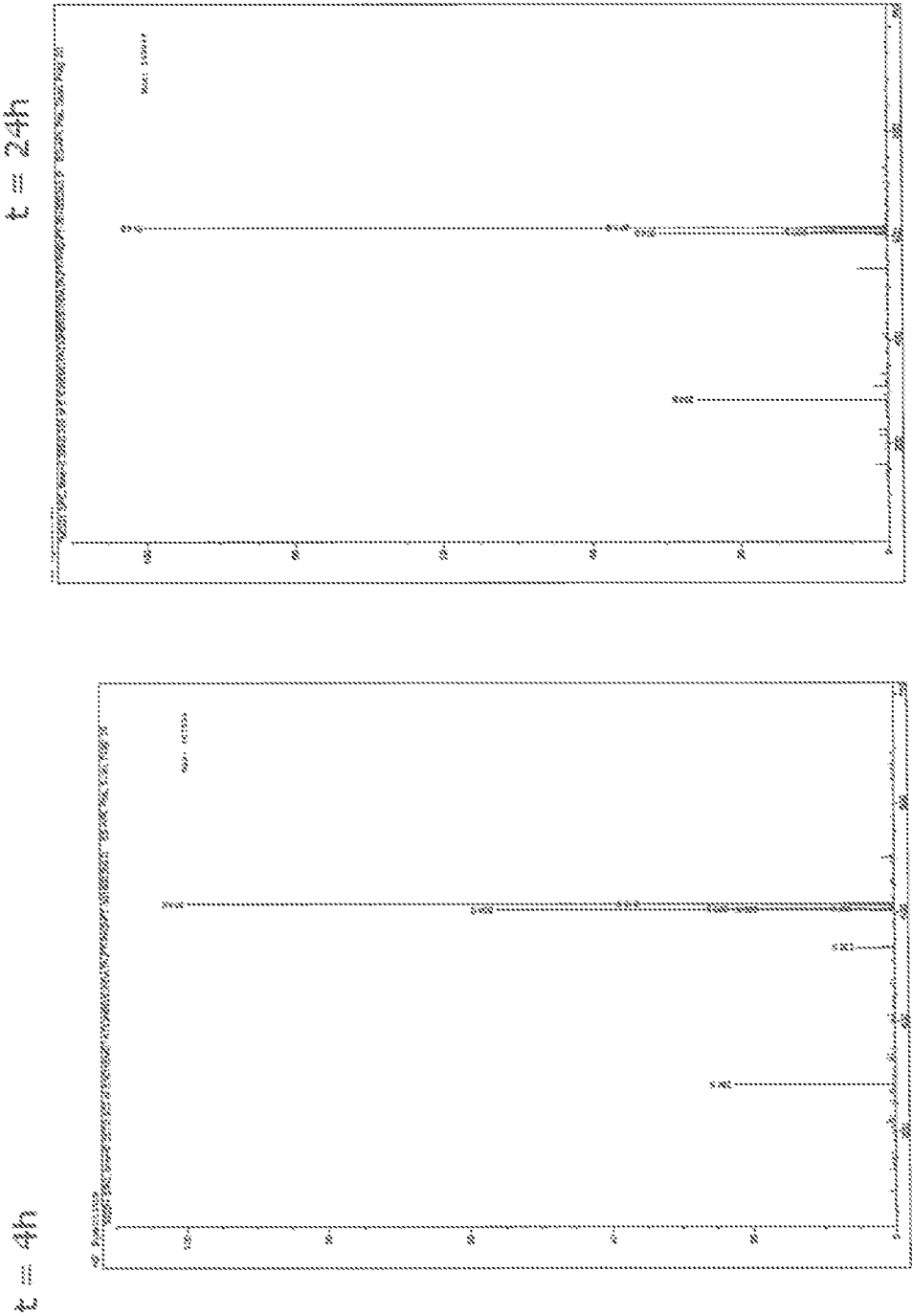


FIG.6

6/7

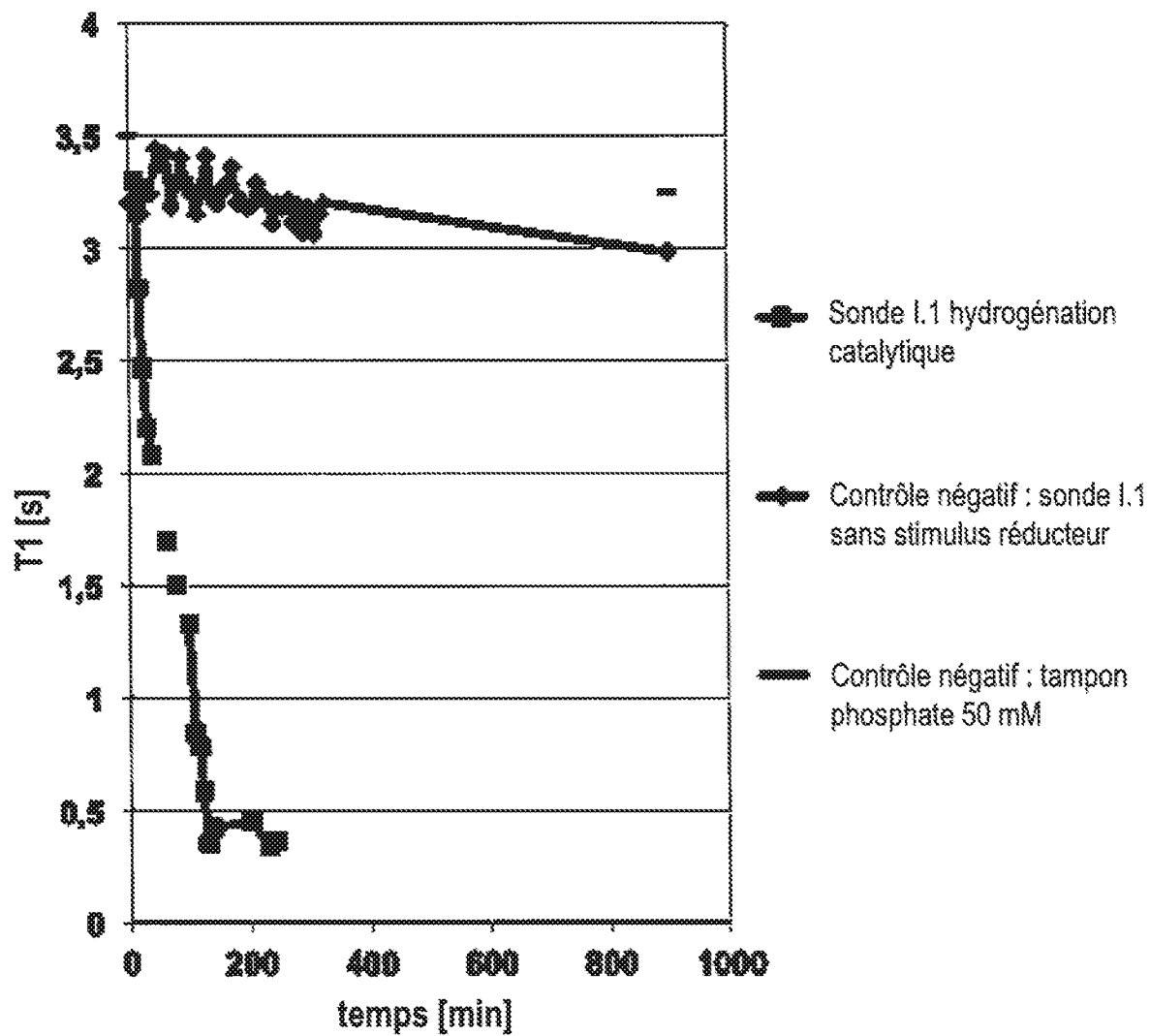


FIG.7

7/7

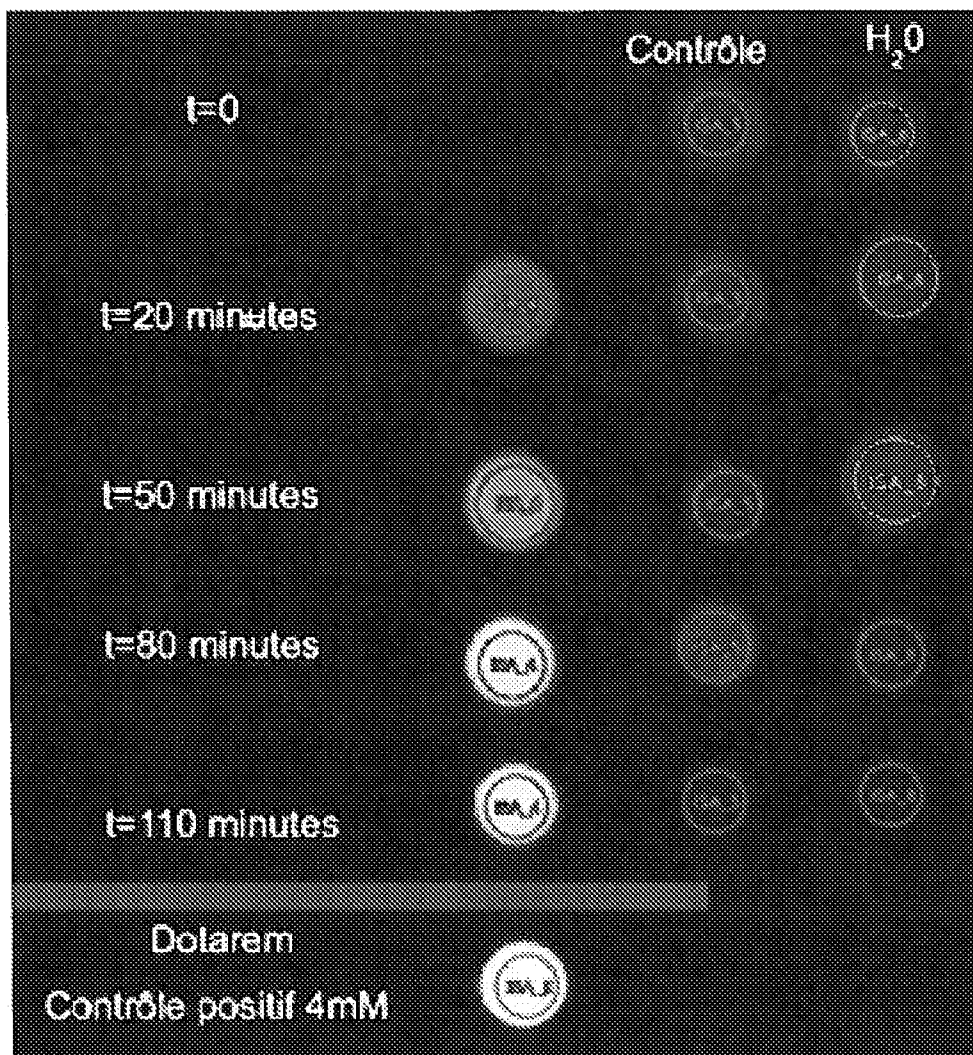


FIG.8

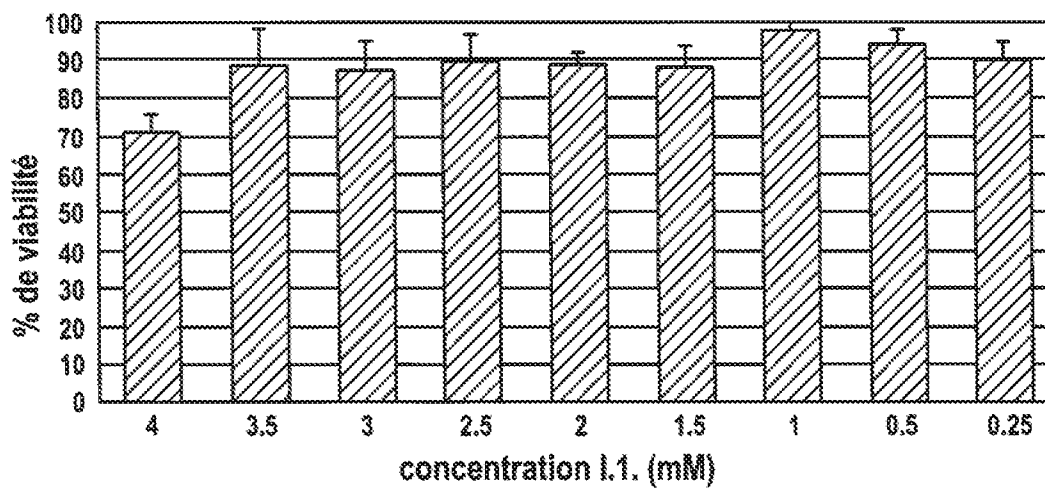


FIG.9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/051791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D401/14 C07D405/14 C07D409/14 C07F15/02 A61K49/10
A61P35/00

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)

C07D C07F A61K A61P

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/094903 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; HASSEROD) 13 October 2005 (2005-10-13) page 13	1-21
A	----- TOUTI FAYCAL ET AL: "An Electroneutral Macrocyclic Iron(II) Complex That Enhances MRI Contrast in Vivo", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 54, no. 12, June 2011 (2011-06), pages 4274-4278, XP002694184, ISSN: 0022-2623 page 4275; compounds 1,2 ----- -/-	1-21



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

1 October 2013

Date of mailing of the international search report

11/10/2013

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

Duval, Eric

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/051791

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/012823 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; JAMES ARTHUR [GB]; ORENGA SYLVAIN [FR]; PERRY JOHN) 3 February 2011 (2011-02-03) cited in the application claim 1	1-21
A	----- GAERTNER F C ET AL: "Imaging of hypoxia using PET and MRI", CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 2012 BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS B.V. NLD, vol. 13, no. 4, March 2012 (2012-03), pages 552-570, XP008160904, ISSN: 1389-2010 the whole document -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2013/051791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005094903	A2	13-10-2005	AT 443529 T 15-10-2009
		EP 1729818 A2	13-12-2006
		ES 2334242 T3	08-03-2010
		FR 2868320 A1	07-10-2005
		JP 2007530646 A	01-11-2007
		US 2007218010 A1	20-09-2007
		WO 2005094903 A2	13-10-2005

WO 2011012823	A2	03-02-2011	CN 102482705 A 30-05-2012
		EP 2459736 A2	06-06-2012
		FR 2948682 A1	04-02-2011
		JP 2013500038 A	07-01-2013
		US 2012129205 A1	24-05-2012
		WO 2011012823 A2	03-02-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/051791

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C07D401/14 C07D405/14 C07D409/14 C07F15/02 A61K49/10 A61P35/00 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) C07D C07F A61K A61P		
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, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2005/094903 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; HASSEROD) 13 octobre 2005 (2005-10-13) page 13	1-21
A	----- TOUTI FAYCAL ET AL: "An Electroneutral Macrocyclic Iron(II) Complex That Enhances MRI Contrast in Vivo", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 54, no. 12, juin 2011 (2011-06), pages 4274-4278, XP002694184, ISSN: 0022-2623 page 4275; composés 1,2 ----- -/--	1-21
☒ 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 1 octobre 2013		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 11/10/2013
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 Duval, Eric

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2011/012823 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; JAMES ARTHUR [GB]; ORENGA SYLVAIN [FR]; PERRY JOHN) 3 février 2011 (2011-02-03) cité dans la demande revendication 1 -----	1-21
A	GAERTNER F C ET AL: "Imaging of hypoxia using PET and MRI", CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 2012 BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS B.V. NLD, vol. 13, no. 4, mars 2012 (2012-03), pages 552-570, XP008160904, ISSN: 1389-2010 le document en entier -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2013/051791

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005094903 A2	13-10-2005	AT 443529 T EP 1729818 A2 ES 2334242 T3 FR 2868320 A1 JP 2007530646 A US 2007218010 A1 WO 2005094903 A2	15-10-2009 13-12-2006 08-03-2010 07-10-2005 01-11-2007 20-09-2007 13-10-2005
WO 2011012823 A2	03-02-2011	CN 102482705 A EP 2459736 A2 FR 2948682 A1 JP 2013500038 A US 2012129205 A1 WO 2011012823 A2	30-05-2012 06-06-2012 04-02-2011 07-01-2013 24-05-2012 03-02-2011