



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2021/05/12
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2021/11/18
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2022/11/08
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2021/050832
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2021/229188
(30) Priorité/Priority: 2020/05/15 (FR FR2004868)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07D 209/60* (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
PROIMAGING, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
TRAN-GUYON, JOANNE, FR;
GUYON, VINCENT, FR;
SCHERNINSKI, FRANCOIS, FR
(74) Agent: LAVERY, DE BILLY, LLP

(54) Titre : NOUVEAUX COMPOSES FLUORESCENTS POUR LE MARQUAGE DE TISSU TUMORAL
(54) Title: NOVEL FLUORESCENT COMPOUNDS FOR LABELLING TUMOUR TISSUE

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention a pour objet de nouveaux composés fluorescents utilisables pour le marquage de tissu tumoral, leur procédé de préparation, ainsi que leur application comme outil de surveillance, de diagnostic ou d'aide à la chirurgie de cancers.

Date de soumission : 2022/11/08

No de la demande can. : 3178232

Abrégé:

La présente invention a pour objet de nouveaux composés fluorescents utilisables pour le marquage de tissu tumoral, leur procédé de préparation, ainsi que leur application comme outil de surveillance, de diagnostic ou d'aide à la chirurgie de cancers.

Description

Titre : Nouveaux composés fluorescents pour le marquage de tissu tumoral

[0001] La présente invention a pour objet de nouveaux composés fluorescents utilisables pour le marquage de tissu tumoral, leur procédé de préparation, ainsi que leur application comme outil de surveillance, de diagnostic ou d'aide à la chirurgie de cancers.

Domaine technique

[0002] Le marquage de tissu tumoral par des composés fluorescents présente un grand intérêt dans le domaine de l'imagerie médicale, car il permet entre autres la localisation de tumeurs.

Technique antérieure

[0003] Des composés fluorescents sont utilisés depuis plus de cinquante ans en médecine comme marqueurs dans des techniques d'imagerie non invasives pour la surveillance et/ou le diagnostic.

Problème technique

[0004] L'émergence de nouvelles technologies d'imagerie de fluorescence au service de la chirurgie, nécessitant une sensibilité et une précision améliorées conduit à la recherche de nouvelles molécules fluorescentes toujours plus performantes.

[0005] Dans le contexte de maladies telles que le cancer, il est notamment nécessaire d'avoir une distribution préférentielle des molécules fluorescentes dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, ainsi qu'une persistance suffisamment longue de la fluorescence pour permettre une meilleure spécificité de marquage et fournir une aide à l'acte chirurgical, par exemple pour délimiter des zones de tumeurs à éliminer.

[0006] Certains marqueurs fluorescents existants présentent une persistance de fluorescence limitée, ce qui oblige à opérer le patient dans la foulée de l'injection du marqueur et ne permet pas d'obtenir une délimitation satisfaisante du tissu

tumoral. Dans d'autres cas, l'accumulation du marqueur dans les tissus n'est pas suffisamment importante, ce qui entraîne un faible marquage et donc des problèmes de détection. La localisation de lésions ou de tumeurs puis leur élimination par exemple par chirurgie n'est alors pas complète.

5 **[0007]** Un autre problème présenté par les marqueurs fluorescents existants, notamment le vert d'indocyanine (ICG), qui est l'un des seuls colorants utilisés pour le marquage des tumeurs au cours de l'acte chirurgical, est la nécessité de la présence de néo-vaisseaux tumoraux pour obtenir un marquage du tissu tumoral. Par ailleurs, le vert d'indocyanine, à l'image des autres colorants existants dans
10 l'art antérieur, n'est visible dans les tissus tumoraux que jusqu'à 24h après son injection. Cette durée courte ne permet pas d'avoir une bonne élimination du colorant circulant hors des tissus tumoraux, ce qui provoque une mauvaise visualisation car le rapport signal sur bruit est faible.

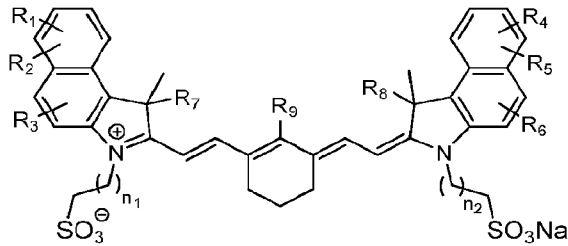
[0008] Un autre inconvénient majeur des composés existants est qu'ils ne
15 peuvent pas être utilisés directement. En effet, ils nécessitent pour être utilisés d'être couplés avec d'autres molécules de ciblage telles que des anticorps, des protéines, des molécules spécifiques du tissu tumoral, l'acide folique, ou encore des stéroïdes.

[0009] La présente invention permet de s'affranchir des problèmes de l'art
20 antérieur précédemment explicités en fournissant des molécules fluorescentes ayant une distribution préférentielle dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et une persistance suffisante pour leur utilisation dans des techniques d'imagerie pour la surveillance, le diagnostic, et/ou l'assistance à la chirurgie. Ces nouvelles molécules présentent l'avantage majeur de pouvoir être utilisées seules
25 et directement, sans couplage préalable, du fait de leur affinité spécifique pour le tissu tumoral. Elles ont par ailleurs par rapport aux molécules de l'art antérieur une rémanence dans les tissus tumoraux beaucoup plus élevée, allant jusqu'à une durée de plusieurs jours, ce qui permet une élimination plus poussée de ces molécules fluorescentes circulant hors des tissus tumoraux, et ainsi une
30 visualisation améliorée grâce à un meilleur rapport signal sur bruit.

Résumé de l'invention

[0010] La présente invention concerne un composé de formule (I)

[Chem. 1]



(I)

5 dans laquelle

n_1 et n_2 sont chacun un entier de 0 à 15,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 sont chacun indépendamment choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , SO_3R_{10} et $X-R_{11}-Y$,

R_{10} , R'_{10} , étant indépendamment H, Na ou K,

10 X , X' , X'' étant indépendamment O, S ou NH,

R_{11} , R'_{11} , R''_{11} , étant indépendamment choisis parmi alkyle en C_1 à C_{15} , aryle, hétéroaryle, (alkyl en C_1 à C_{15})aryle, (alkyl en C_1 à C_{15})hétéroaryle, aryl(alkyle en C_1 à C_{15}) et hétéroaryl(alkyle en C_1 à C_{15});

Y , Y' , Y'' étant indépendamment choisis parmi H, halogène, $COOR'_{10}$ ou amide ;

15 R_7 et R_8 étant chacun choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , alkyle en C_1 à C_{15} , et $X'-R'_{11}-Y'$;

R_9 étant choisi parmi H, OH, SH, NH_2 et $X''-R''_{11}-Y''$,

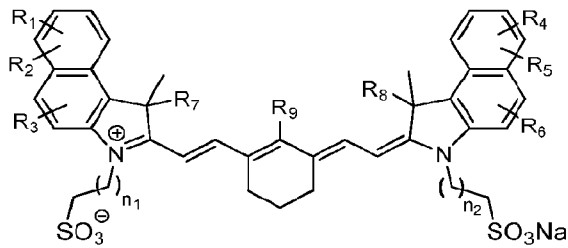
ledit composé comportant au moins un groupement $X-R_{11}-Y$, $X'-R'_{11}-Y'$ ou $X''-R''_{11}-Y''$ avec Y , Y' , et/ou Y'' qui est $COOR'_{10}$.

20 **[0011]** La présente invention concerne également le procédé de préparation des composés de formule (I) selon l'invention, ainsi que le procédé de marquage de tissu tumoral avec un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention.

Exposé de l'invention

25 **[0012]** Le premier objet de la présente invention concerne un composé de formule (I)

[Chem. 2]



(I)

dans laquelle

 n_1 et n_2 sont chacun un entier de 0 à 15,

5 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 sont chacun indépendamment choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , SO_3R_{10} et $\text{X-R}_{11}\text{-Y}$,

 R_{10} , R'_{10} , étant indépendamment H, Na ou K, X , X' , X'' étant indépendamment O, S ou NH, R_{11} , R'_{11} , R''_{11} , étant indépendamment choisis parmi alkyle en C_1 à C_{15} , aryle,

10 hétéroaryle, (alkyl en C_1 à C_{15})aryle, (alkyl en C_1 à C_{15})hétéroaryle, aryl(alkyle en C_1 à C_{15}) et hétéroaryl(alkyle en C_1 à C_{15});

 Y , Y' , Y'' étant indépendamment choisis parmi H, halogène, COOR'_{10} ou amide; R_7 et R_8 étant chacun choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , alkyle en C_1 à C_{15} , et $\text{X}'\text{-R}'_{11}\text{-Y}'$;

15 R_9 étant choisi parmi H, OH, SH, NH_2 et $\text{X}''\text{-R}''_{11}\text{-Y}''$,

ledit composé comportant au moins un groupement $\text{X-R}_{11}\text{-Y}$, $\text{X}'\text{-R}'_{11}\text{-Y}'$ ou $\text{X}''\text{-R}''_{11}\text{-Y}''$ avec Y , Y' , et/ou Y'' qui est COOR'_{10} .

[0013] Au sens de la présente invention, on entend par « alkyles en C_1 à C_{15} »,
 une chaîne hydrocarbonée, cyclique, linéaire ou ramifiée, contenant de 1 à 15
 20 atomes de carbone, de préférence de 2 à 6 atomes de carbone et plus
 préférentiellement encore de 4 à 6 atomes de carbone, notamment 5 atomes de
 carbone et pouvant être notamment une chaîne méthyle, éthyle, n-propyle, iso-
 propyle, n-butyle, iso-butyle, sec-butyle, tert-butyle, n-pentyle, 1-méthylbutyle, 2,2-
 diméthylbutyle, 2-méthylpentyle, 2,2-diméthylpropyle, isopentyle, néopentyle, 2-
 25 pentyle, hexyle, 2-hexyle, 3-hexyle, 3-méthylpentyle, heptyle, octyle, nonyle,
 décyle, dodécyle, palmityle.

[0014] Au sens de la présente invention, on entend par « aryles » un groupement aromatique, contenant un ou plusieurs cycles aromatiques, éventuellement substitué.

[0015] Au sens de la présente invention, on entend par « hétéroaryles » un
5 groupement aromatique, contenant un ou plusieurs cycles aromatiques, éventuellement substitué, et comportant au moins un hétéroatome différent du carbone et de l'hydrogène.

[0016] Au sens de la présente invention, on entend par « arylalkyles », un groupement aryle substitué par un ou plusieurs groupements alkyles, lesdits
10 groupements alkyles pouvant être des groupements alkyles en C₁ à C₁₅, contenant de préférence de 1 à 15 atomes de carbone.

[0017] Au sens de la présente invention, on entend par « hétéroarylalkyles », un groupement hétéroaryle substitué par un ou plusieurs groupements alkyles, lesdits groupements alkyles pouvant être des groupements alkyles en C₁ à C₁₅, contenant
15 de préférence de 1 à 15 atomes de carbone.

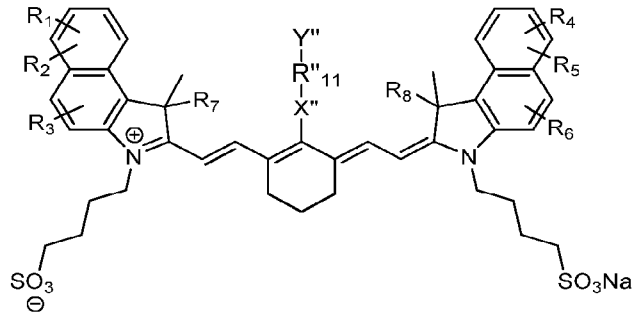
[0018] Selon un mode de réalisation particulier, dans la formule ci-dessus, n₁ ou n₂ sont indépendamment l'un de l'autre, égaux à 1, 2, 3, 4 ou 5, plus préférentiellement encore 3 ou 4.

[0019] Selon un autre mode de réalisation particulier, dans la formule ci-dessus
20 n₁=n₂ et est de préférence égal à 1, 2, 3, 4 ou 5, plus préférentiellement encore 3 ou 4.

[0020] Selon un autre mode de réalisation particulier, la molécule est symétrique. Dans ce cas, elle comprend un seul groupe X''-R''₁₁-Y'' avec Y'' qui est COOR'₁₀ qui est porté par R₉ et/ou 2 groupes X-R₁₁-Y avec Y qui est COOR'₁₀, l'un porté
25 par l'un de R₁, R₂, R₃ ou R₇, de préférence l'un de R₁, R₂ ou R₃ et l'autre porté par l'un de R₄, R₅, R₆ ou R₈, de préférence l'un de R₄, R₅ ou R₆.

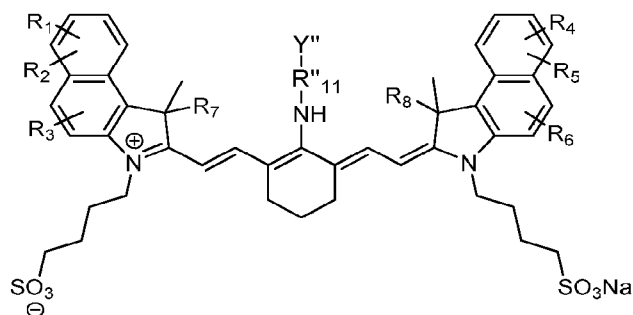
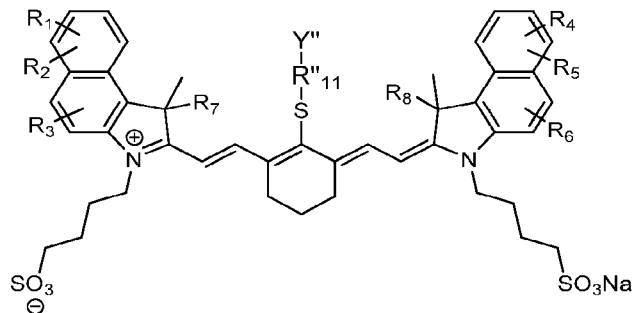
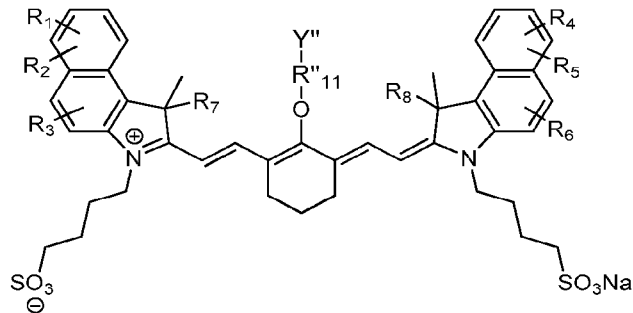
[0021] Selon un mode de réalisation particulier, dans la formule ci-dessus, R₁₀, et/ou R'₁₀, peuvent être identiques. De la même façon, X, X', et/ou X'' peuvent être identiques, Y, Y', et/ou Y'' peuvent être identiques, R₁₁, R'₁₁, et/ou R''₁₁ peuvent être
30 identiques.

[0022] Les composés selon l'invention peuvent en particulier être choisis parmi les composés de formule générale suivante :



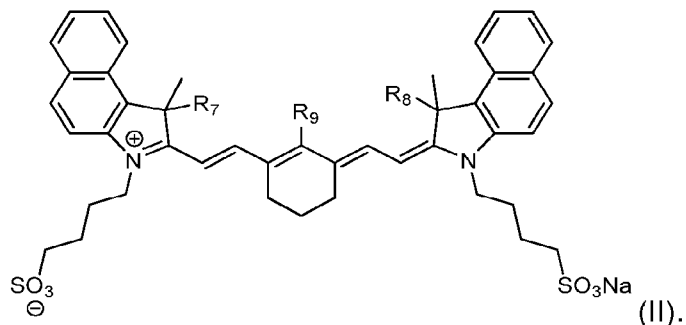
pour laquelle X'' peut être O, S ou NH, correspondant alors aux formules ci-

5 dessous :



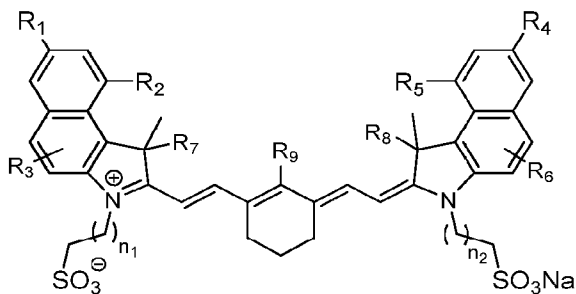
[0023] Les composés de formule (I) selon l'invention peuvent en particulier être
10 choisi parmi les composés de formule (I) pour lesquels R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ et R₆ ne

sont pas tous simultanément H, ce qui exclut dans ce cas les composés selon la formule (II) ci-dessous :

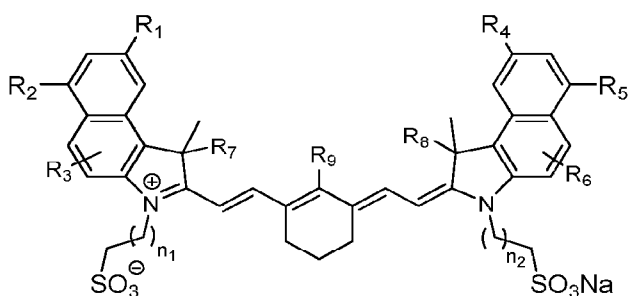


[0024] Le composé de formule (I) selon l'invention peut de préférence être choisi
5 parmi les composés de formules générales suivantes :

[Chem. 3]



[Chem. 4]



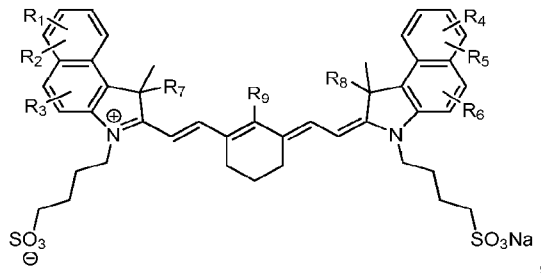
10

dans lesquelles R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ et R₉ sont tels que définis précédemment.

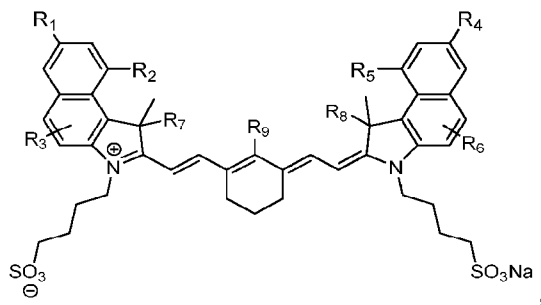
[0025] Selon un mode de réalisation particulier, les composés selon l'invention peuvent être choisis parmi les composés de formules suivantes

15 [Chem. 5]

8

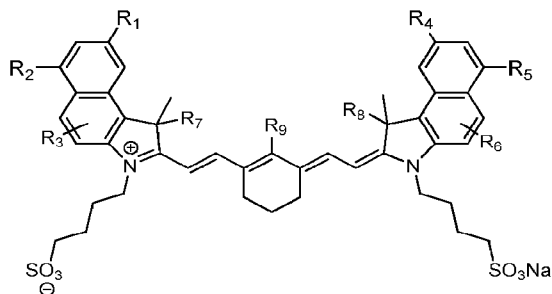


[Chem. 6]



5

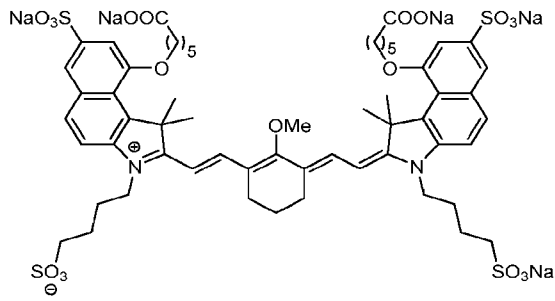
[Chem. 7]



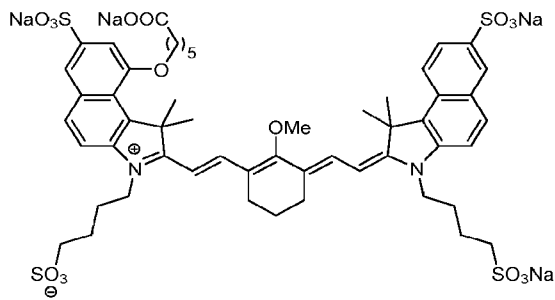
dans lesquelles R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 et R_9 sont tels que définis précédemment.

- 10 **[0026]** Selon un mode de réalisation préféré, les composés selon l'invention peuvent être choisis parmi les composés suivants :

[Chem. 8]

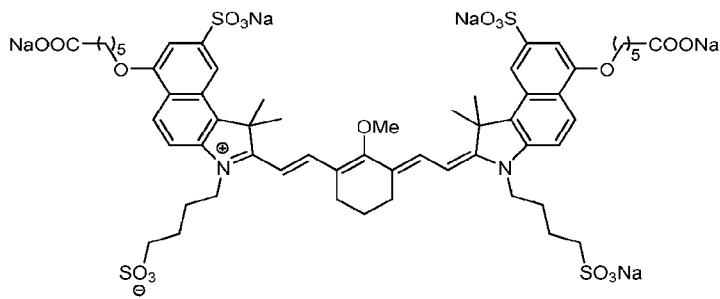


[Chem. 9]

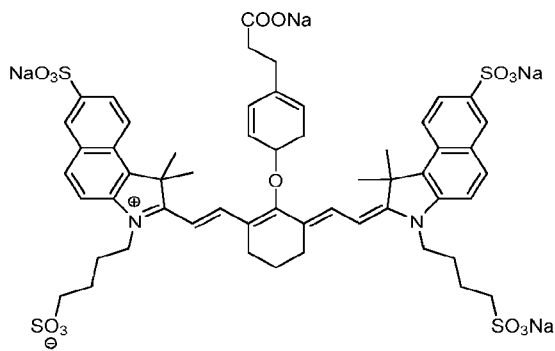


5

[Chem. 10]

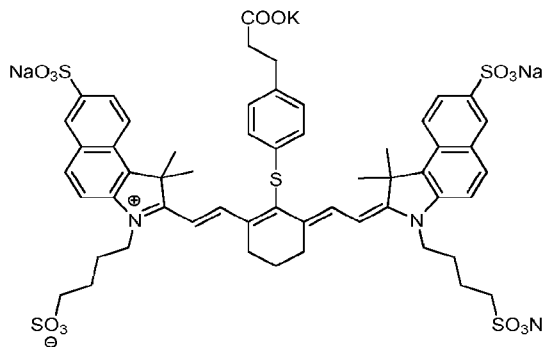


[Chem. 11]



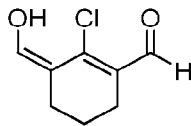
10

[Chem. 16]



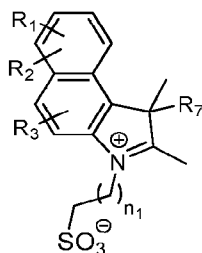
[0027] Le second objet de la présente invention concerne le procédé de
 5 préparation des composés de formule (I) selon l'invention comportant une étape
 de réaction entre :

[Chem. 17]



et

10 [Chem. 18]



[0028] Cette réaction est effectuée de préférence par chauffage au reflux en
 présence d'acétate de sodium dans un mélange d'acide acétique et d'anhydride
 acétique.

15 **[0029]** Le troisième objet de l'invention concerne le procédé de marquage de
 tissu tumoral avec un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé
 de l'invention.

[0030] Au sens de la présente invention, on entend par « tissu tumoral » le tissu
 constitué de cellules tumorales qui sont des cellules prolifératives anormales, et

d'un tissu de soutien, aussi appelé stroma tumoral ou tissu interstitiel, fait de cellules et de substance extra-cellulaire dans laquelle est située la vascularisation tumorale.

[0031] Les composés fluorescents selon l'invention ont la particularité après leur diffusion dans l'organisme d'être piégés dans le tissu tumoral, alors qu'ils sont éliminés des tissus sains. Cette particularité permet d'utiliser ces composés fluorescents directement, sans couplage préalable à une autre molécule de marquage, rendant ainsi leur utilisation plus simple, plus rapide et plus efficace que celle des composés de l'art antérieur. Il a été observé que cette élimination des tissus sains est croissante au cours du temps. En général, entre 24 et 72 heures, de préférence entre 36 et 60 heures et plus préférentiellement 48 heures après l'administration de ces composés, leur élimination des tissus sains est totale. Ils restent cependant piégés dans les tissus tumoraux. Cette propriété permet d'avoir une nette différenciation des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains et ainsi l'utilisation de ces composés dans des applications de surveillance, diagnostic et/ou d'assistance à la chirurgie dans un contexte de maladies cancéreuses. Cette différenciation perdure pendant 6 à 48 heures, de préférence 12 à 36 heures, permettant de programmer le diagnostic ou la chirurgie de manière ciblée.

[0032] Les composés selon l'invention peuvent ainsi notamment être utilisés dans le cadre de cancers, par exemple hormonodépendants, tels que le cancer du sein ou de cancers digestifs, tels que le cancer du pancréas. En effet, dans le cancer du pancréas, les tumeurs sont particulièrement difficiles à éliminer dans leur globalité par chirurgie car elles ne sont pas facilement délimitées. L'utilisation des composés selon l'invention permet d'obtenir une meilleure visualisation des contours des tumeurs grâce à la différenciation de marquage entre le tissu tumoral et le tissu sain, et ainsi une résection tumorale plus efficace par chirurgie.

[0033] L'invention porte également sur l'utilisation d'un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention dans une méthode de marquage de tissu tumoral.

[0034] Cette méthode de marquage des tissus nécessite l'administration des composés par voie intraveineuse, intra-artérielle, ou dans un autre vaisseau,

notamment un vaisseau lymphatique, soit en injection locale, soit en application locale, préférentiellement par voie intraveineuse.

[0035] Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention et au moins un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.

[0036] L'invention porte également sur l'un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention ou une composition comprenant un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention pour son utilisation dans une méthode de marquage et/ou de détection de tissu tumoral, et/ou dans le traitement chirurgical de tumeurs.

[0037] L'invention concerne également une méthode de détection de tissu tumoral comprenant une étape de marquage de tissu tumoral avec un des composés selon l'invention ou préparé selon le procédé de l'invention, et une étape de détection par imagerie médicale en fluorescence ou spectrométrie de fluorescence.

Figures

Fig. 1

[0038] [Fig. 1] montre les valeurs médianes et écarts-types des rapports d'intensité tumeur/abdomen en fonction des temps post-injection du composé 2 (CJ215) et de l'ICG.

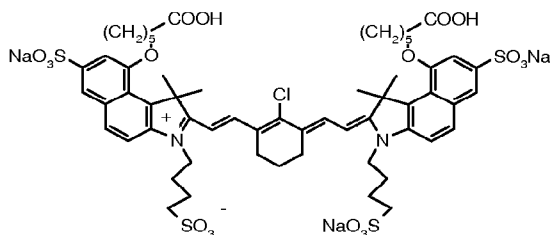
Fig. 2

[0039] [Fig. 2] montre les résultats d'imagerie *ex vivo* de tumeurs pancréatiques après injection de deux composés selon l'invention et d'un agent fluorescent de l'art antérieur (ICG).

Exemples

[0040] Exemple 1 :

[Chem. 19]

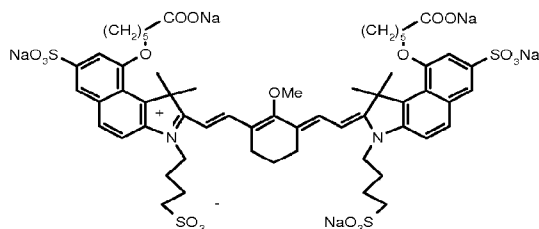


Composé (1)

Un mélange de 4-[(5-carboxypentyl)oxy]-6-sulfo-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-triméthyl-
 5 benz(e)indolium (sel interne et de disodium) (9 g ; 15 mmol), 2-chloro-1-formyl-3-
 (hydroxyméthylène)-1-cyclohexène (1,30 g ; 7,50 mmol), et acétate de sodium
 (3g ; 36,6 mmol) dans un mélange acide acétique et anhydride acétique 60/30 est
 chauffé au reflux pendant 10 minutes. Le milieu réactionnel est refroidi à
 température ambiante et le précipité est séparé par filtration et lavé avec de l'éther
 diéthylique pour fournir 4,33 g (rendement : 43,9 %) d'un solide vert. Le produit
 10 brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice
 C18, acétonitrile 0-25% / eau).

[0041] Exemple 2 :

[Chem. 20]

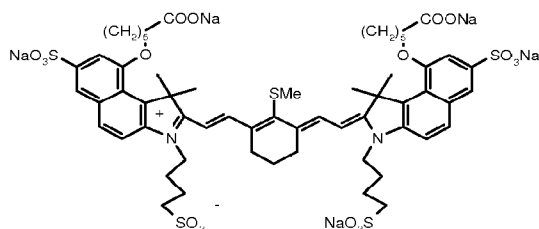


15 Composé (2)

Au composé (1) (1 g ; 0,76 mmol) en solution dans 500 mL de méthanol, est
 ajouté du méthylate de sodium (440 mg; 7,6 mmol) . Le milieu réactionnel est
 chauffé au reflux pendant 16 h et concentré sous vide, puis filtré. Le résidu obtenu
 est lavé avec du méthanol froid et de l'acétone et séché sous vide pour fournir 450
 20 mg d'un solide vert (rendement : 45%). Le produit brut est purifié par
 chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-
 25% / eau).

[0042] Exemple 3 :

[Chem. 21]



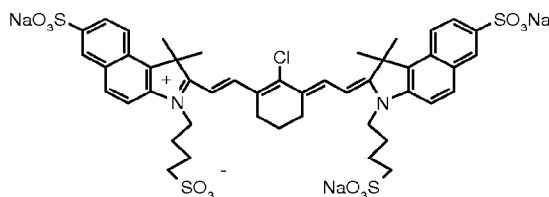
Composé (3)

Au composé (1) (400 mg; 0,30 mmol) en solution dans 20 mL d'un mélange 50/50 méthanol/ NMP (N-méthyl-2-pyrrolidone) est ajouté MeSNa (106 mg; 1,5 mmol).

- 5 Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 4 h, puis du diéthyléther (20 mL) est additionné au mélange. Le précipité est filtré et lavé avec le même solvant pour fournir 254 mg de produit brut (rendement : 61% ; odeur de soufre). Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-25% / eau).

10 [0043] Exemple 4 :

[Chem. 22]

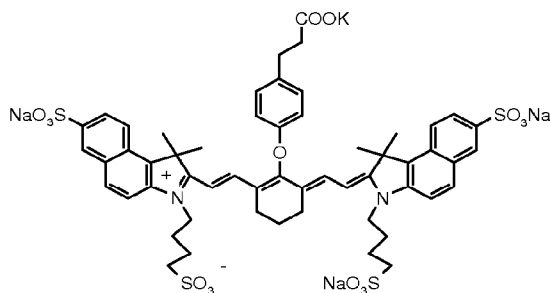


Composé (4)

Un mélange de 6-sulfo-1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-triméthylbenz(e)indolium (sel interne et de DCHA) (2 g ; 4,7 mmol), 2-chloro-1-formyl-3-(hydroxyméthylène)-1-cyclohexène (0,40 g ; 2,35 mmol), et acétate de sodium (0,9 g ; 11 mmol) dans un mélange acide acétique et anhydride acétique 50/20 est chauffé au reflux pendant 15 minutes. Le précipité est séparé par filtration, lavé avec de l'éthanol et de l'acétone et séché sous vide pour fournir 1,6 g (rendement : 63,8 %) d'une poudre de couleur brique. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-25% / eau).

[0044] Exemple 5 :

[Chem. 23]

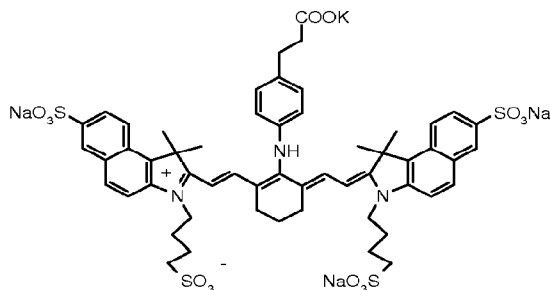


Composé (5)

A de l'acide 3-(4-hydroxyphényl)propionique (660 mg ; 4 mmol) sont ajoutés 8 mL of KOH 1M méthanolique, 16 mL de DMSO et le composé (4) (500 mg ; 0,25
 5 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 8h, puis 150 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés goutte-à-goutte. Le précipité est séparé par filtration, lavé avec de l'éthanol et de l'acétone et séché sous vide pour fournir 260 mg (rendement : 45 %) d'une poudre verte. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-
 10 25% / eau).

[0045] Exemple 6 :

[Chem. 24]

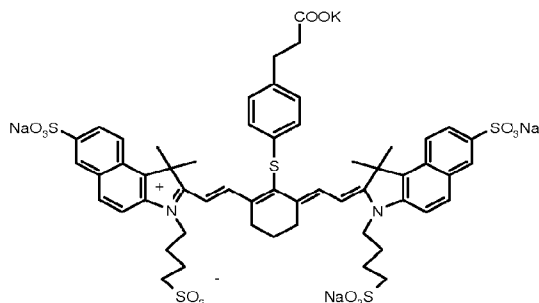


Composé (6)

15 Au composé (4) (520 g ; 0,49 mmol) sont ajoutés de l'acide 4-aminohydrocinnamique (816 mg ; 4,9 mmol), 25 mL de DMSO et de la triéthylamine (500 mg ; 4,9 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 8h, puis 200 mL d'acétone sont ajoutés goutte-à-goutte. Le précipité est séparé par filtration, lavé avec de l'acétone et séché sous vide pour
 20 fournir 430 mg (rendement : 74%) d'une poudre rouge. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-25% / eau).

[0046] Exemple 7 :

[Chem. 25]

**Composé (7)**

- 5 A de l'acide 4-mercaptohydrocinnamique (91mg ; 0,5 mmol) sont ajoutés 1 mL of KOH 1M méthanolique, 16 mL de DMSO et le composé (4) (500 mg ; 0,25 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 30 minutes, puis 50 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés goutte-à-goutte. Le précipité est séparé par filtration, lavé avec de l'éthanol et de l'acétone et séché sous vide pour fournir 310
- 10 mg (rendement : 54 %) d'une poudre verte. Le produit brut est purifié par chromatographie flash sur colonne (phase inverse gel de silice C18, acétonitrile 0-25% / eau).

[0047] Exemple 8 : Comparaison d'un composé selon l'invention et d'un agent fluorescent de l'art antérieur (ICG) pour l'imagerie *in vivo* des tumeurs mammaires

- 15 L'ICG (ou vert d'indocyanine / Infracyanine) est un agent fluorescent de l'art antérieur, déjà approuvé pour l'utilisation chez l'homme pour l'évaluation des fonctions cardiaques et hépatiques, ainsi qu'en ophtalmologie, pour les pathologies rétinienne. Il est également en évaluation dans de nombreux essais cliniques à travers le monde pour le guidage du geste chirurgical lors des
- 20 exérèses tumorales, ou la cartographie des ganglions drainant les tumeurs, par imagerie proche infra-rouge.

L'ICG a été comparé au composé (2) selon l'invention dont la synthèse est décrite à l'exemple 2 précédent, ce composé est dénommé CJ215 dans cette étude.

- L'étude a inclus 30 souris au total réparties en trois groupes. Les greffes
- 25 tumorales ont toutes été réalisées avec 50 000 cellules 4T1-Dendra2 /20 µl injectées dans 2 glandes mammaires en contralatéral pour chacune des souris.

[0048] Les injections des biomarqueurs (composé **2** dénommé CJ215 dans cette étude et ICG) ont été réalisées à J9 post-greffe tumorale (afin de limiter l'apparition de nécrose dans les tumeurs).

L'évolution de l'intensité des signaux de fluorescence relevée pour chacun des biomarqueurs au cours du temps a été évaluée par image microscopique. La
5 capacité des deux marqueurs à produire un signal spécifiquement localisé à la tumeur a été appréciée quantitativement par le calcul du rapport du signal spécifique lié à la tumeur au signal non spécifique dans les tissus environnants.

[0049] Le protocole d'imagerie a été réalisé aux temps 2h, 24h, 48h, 4 et 6 jours
10 post-injection pour toutes les souris. Toutes les images réalisées à chaque temps d'acquisition, ont été acquises sur imageur IVIS Spectrum (Perkin Elmer) avec les paramètres suivants :

Pour la détection de la forme GFP de la Dendra2 (détection de la tumeur) :

- Excitation à 465 nm
- 15 - Emission entre 520 et 580 nm

Pour la détection des biomarqueurs :

- Excitation à 745 nm
- Emission entre 800 et 840 nm

Les mesures quantitatives ont été réalisées sur les images brutes non
20 déconvoluées. Pour les deux fluorophores, la durée d'acquisition a été paramétrée en mode automatique. Dans ce mode, le système détermine le temps d'acquisition nécessaire pour atteindre la valeur cible imposée (6 000 counts) dans le temps imparti (fixé à 2 min).

[0050] La Figure 1 rapporte les valeurs médianes et écarts-types des rapports
25 d'intensité tumeur/abdomen en fonction des temps post-injection du CJ215 et de l'ICG.

La mesure du ratio des intensités tumeur/abdomen illustrée sur cette figure permet de montrer que :

- les rapports d'intensité sont significativement plus élevés pour le composé **2**
30 (CJ215) comparativement à l'ICG, quel que soit le temps post-injection (de 1,5 fois

à 2h à plus de 3 fois à J+6) ce qui traduit une capacité à identifier un signal spécifique dans les tumeurs de façon plus précoce et plus spécifique avec le composé **2** (CJ215). Ces résultats indiquent également la possibilité d'améliorer très significativement la spécificité du signal à la tumeur en augmentant le délai
5 entre l'injection du composé **2** (CJ215) et l'imagerie ;

- le rapport signal sur bruit augmente continuellement pour le composé **2** (CJ215) jusqu'à 6 jours post-injection, dernier jour d'examen considéré dans ce protocole. A ce stade, l'ICG n'est plus observable dans les tumeurs (ceci dès 48h). La grande stabilité du signal intratumoral du composé **2** (CJ215), comparativement
10 aux tissus environnants qui éliminent le produit, offre ainsi une meilleure capacité à identifier les tumeurs et contribue ainsi à améliorer significativement la délimitation fine des marges tumorales, qui reste problématique avec l'ICG.

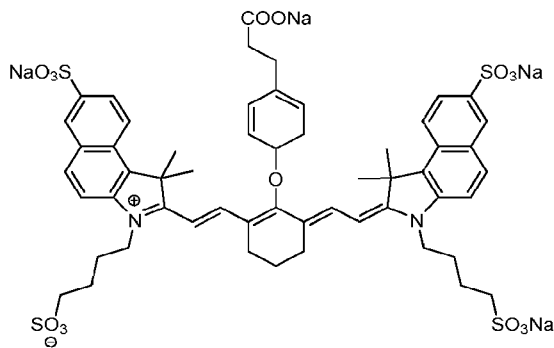
[0051] Exemple 9 : Comparaison de deux composés selon l'invention et d'un agent fluorescent de l'art antérieur (ICG) en imagerie *ex vivo* de tumeurs
15 pancréatiques.

Un modèle d'adénocarcinome pancréatique orthotopique chez la souris a été développé. Les cellules tumorales ont été amplifiées par voie sous-cutanée chez des souris SCID et les fragments résultants ont ensuite été implantés chirurgicalement dans le pancréas de souris nues BALB/c irradiées.

20 Le développement de la tumeur a été suivi *in vivo* par IRM (4.7T, PharmaScan, Bruker Biospin) à trois moments, D14, 28 et 36. Les animaux ont été soumis à une faible fluorescence afin de minimiser l'autofluorescence. L'imagerie fluorescente a été réalisée avec une caméra à dispositif à couplage de charge (CCD) (PhotonRT, BiospaceLab) avec une excitation à 700 nm et un filtre d'émission à 770 nm.

25 À l'issue de séances d'imagerie *in vivo* réalisées à 2h, 48h et 164h, des images fluorescentes *ex vivo* ont été acquises. Les composés fluorescents selon l'invention **2** (CJ215) et CJ319 (dont la structure est détaillée ci-dessous) ont été injectés par voie intraveineuse à 2 mg/kg, 39 jours après l'implantation des fragments de tumeur, alors que les volumes moyens des tumeurs étaient d'environ
30 70 mm³. Le vert d'indocyanine (ICG), un colorant largement utilisé dans l'imagerie per-opératoire des tumeurs, a été inclus comme témoin.

[Chem. 26]



(CJ319)

[0052] L'imagerie de fluorescence *ex vivo* décrite sur la Figure 2 a montré que 2 heures après l'injection, les deux composés fluorescents selon l'invention étaient
5 présents dans le pancréas et la tumeur en quantités à peu près équivalentes. Cependant, 48 heures après l'injection, une distribution préférentielle claire a été observée pour la tumeur, les deux composés produisant un signal fluorescent environ quatre fois plus élevé dans la tumeur que dans le tissu pancréatique environnant. Cet effet a persisté six jours après l'injection, bien que le signal ait
10 diminué au fil du temps. En comparaison, le vert d'indocyanine n'a montré aucune accumulation spécifique dans le pancréas ou la tumeur.

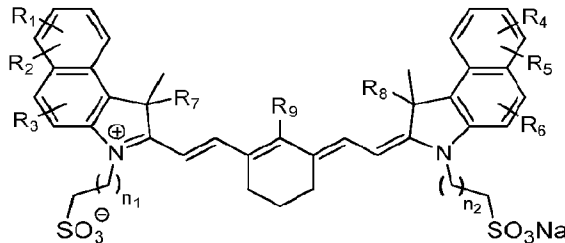
Ces résultats montrent la supériorité des composés de l'invention par rapport à un agent fluorescent de l'art antérieur au niveau de leur distribution spécifique dans un tissu tumoral.

15

Revendications

[Revendication 1] Composé de formule (I)

[Chem. 27]



5 (I)

dans laquelle

n_1 et n_2 sont chacun un entier de 0 à 15,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 sont chacun indépendamment choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , SO_3R_{10} et X- R_{11} -Y,

10 R_{10} et R'_{10} étant indépendamment H, Na ou K,

X, X' et X'' étant indépendamment O, S ou NH,

R_{11} , R'_{11} et R''_{11} étant indépendamment choisis parmi alkyle en C_1 à C_{15} , aryle, hétéroaryle, (alkyl en C_1 à C_{15})aryle, (alkyl en C_1 à C_{15})hétéroaryle, aryl(alkyle en C_1 à C_{15}) et hétéroaryl(alkyle en C_1 à C_{15});

15 Y, Y' et Y'' étant indépendamment choisis parmi H, halogène, COOR'_{10} ou amide;

R_7 et R_8 étant chacun indépendamment choisis parmi H, OH, SH, NH_2 , alkyle en C_1 à C_{15} , et X'- R'_{11} -Y'';

R_9 étant choisi parmi H, OH, SH, NH_2 et X''- R''_{11} -Y'',

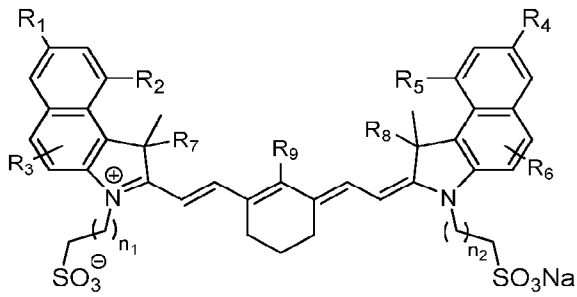
ledit composé comportant au moins un groupement X- R_{11} -Y, X'- R'_{11} -Y' ou X''- R''_{11} -

20 Y'' avec Y, Y' et/ou Y'' qui est COOR'_{10} .

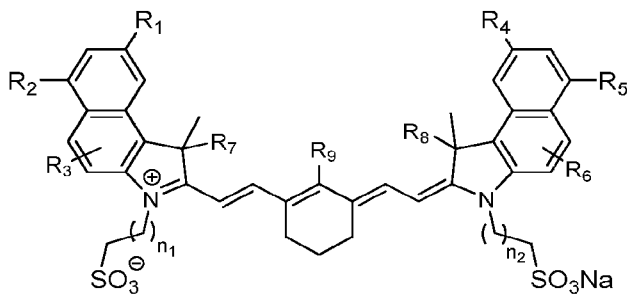
[Revendication 2] Composé selon la revendication 1 pour lequel R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 et R_6 ne sont pas tous simultanément H.

[Revendication 3] Composé selon la revendication 1 ou 2 choisi parmi les composés de formules suivantes :

25 [Chem. 28]



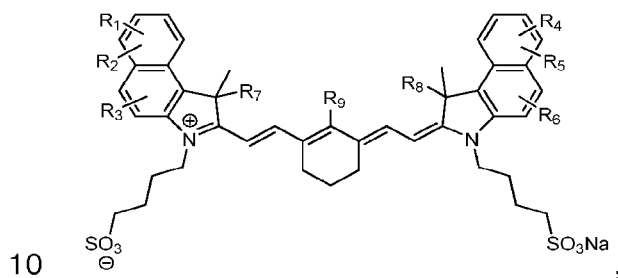
[Chem. 29]



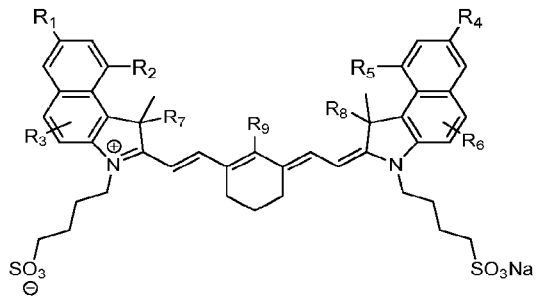
5 dans lesquelles R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ et R₉ sont tels que définis à la revendication 1.

[Revendication 4] Composé selon l'une des revendications précédentes choisi parmi les composés de formules suivantes

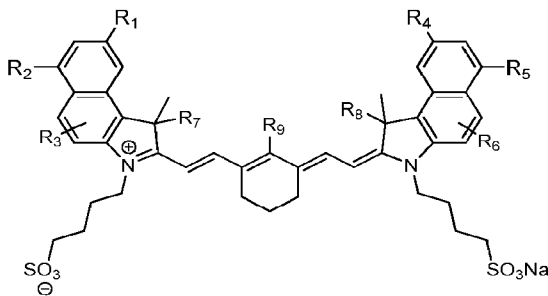
[Chem. 30]



[Chem. 31]



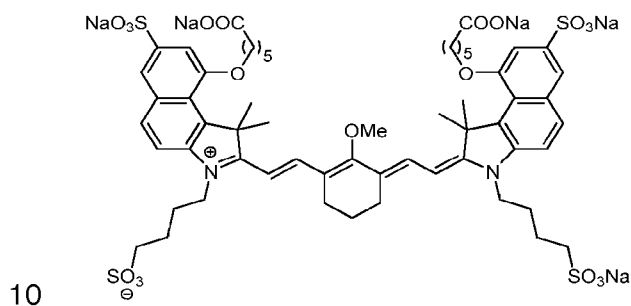
[Chem. 32]



5 dans lesquelles R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈ et R₉ sont tels que définis à la revendication 1.

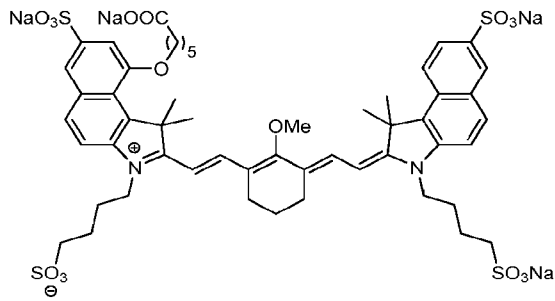
[Revendication 5] Composé selon l'une des revendications précédentes choisi parmi les composés de formules suivantes

[Chem. 33]

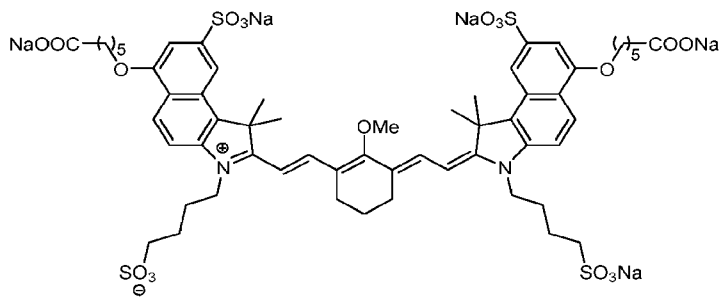


10

[Chem. 34]

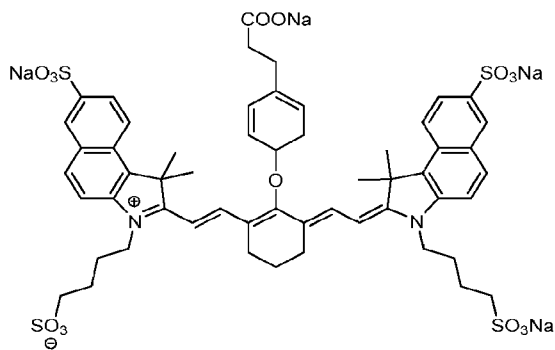


[Chem. 35]

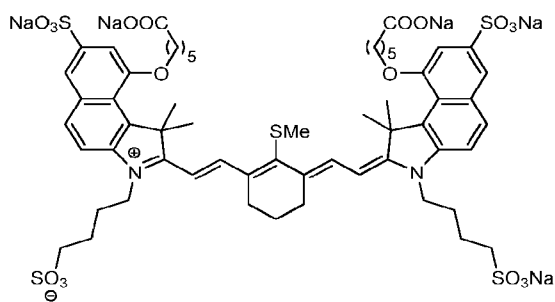


5

[Chem. 36]

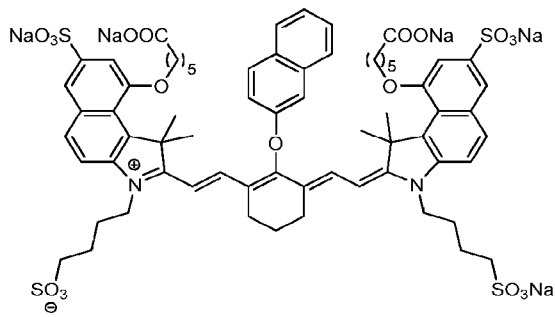


[Chem. 37]

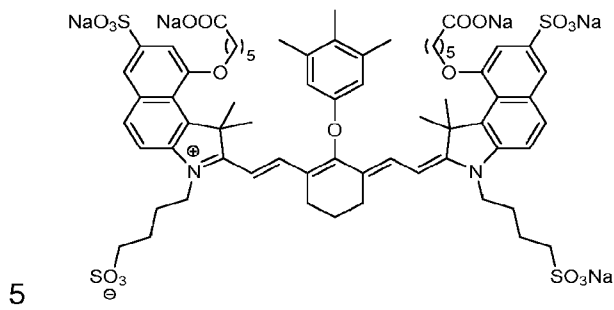


10

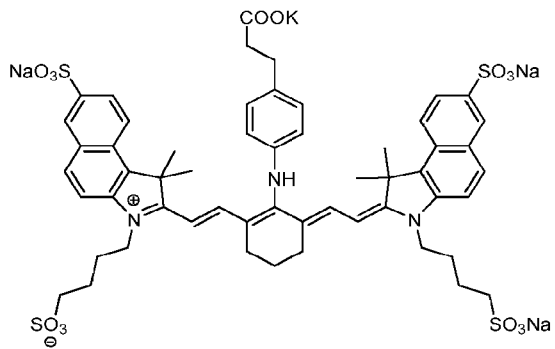
[Chem. 38]



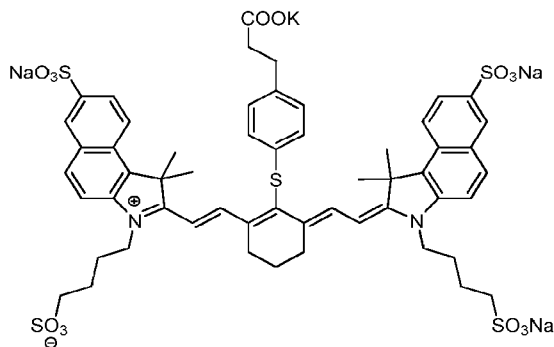
[Chem. 39]



[Chem. 40]

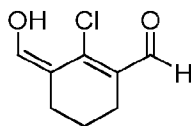


[Chem. 41]



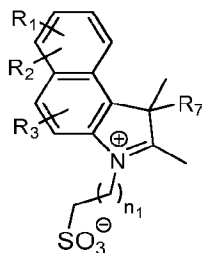
[Revendication 6] Procédé de préparation des composés selon l'une des revendications 1 à 5 comportant une étape de réaction entre :

5 [Chem. 42]



et

[Chem. 43]



10 **[Revendication 7]** Procédé de marquage de tissu tumoral avec un des composés selon l'une des revendications 1 à 5 ou préparé selon la revendication 6.

[Revendication 8] Utilisation d'un des composés selon l'une des revendications 1 à 5 ou préparé selon la revendication 6 dans une méthode de marquage de tissu tumoral.

15 **[Revendication 9]** Composé selon l'une des revendications 1 à 5 ou préparé selon la revendication 6 ou composition comprenant un composé selon l'une des revendications 1 à 5 ou préparé selon la revendication 6 pour son utilisation dans une méthode de marquage et/ou de détection de tissu tumoral, et/ou dans le traitement chirurgical de tumeurs.

[Revendication 10] Méthode de détection de tissu tumoral comprenant une étape de marquage de tissu tumoral avec un des composés selon l'une des revendications 1 à 5 ou préparé selon la revendication 6, et une étape de détection par imagerie médicale en fluorescence ou spectrométrie de fluorescence.

5 .

1/1

[Fig. 1]

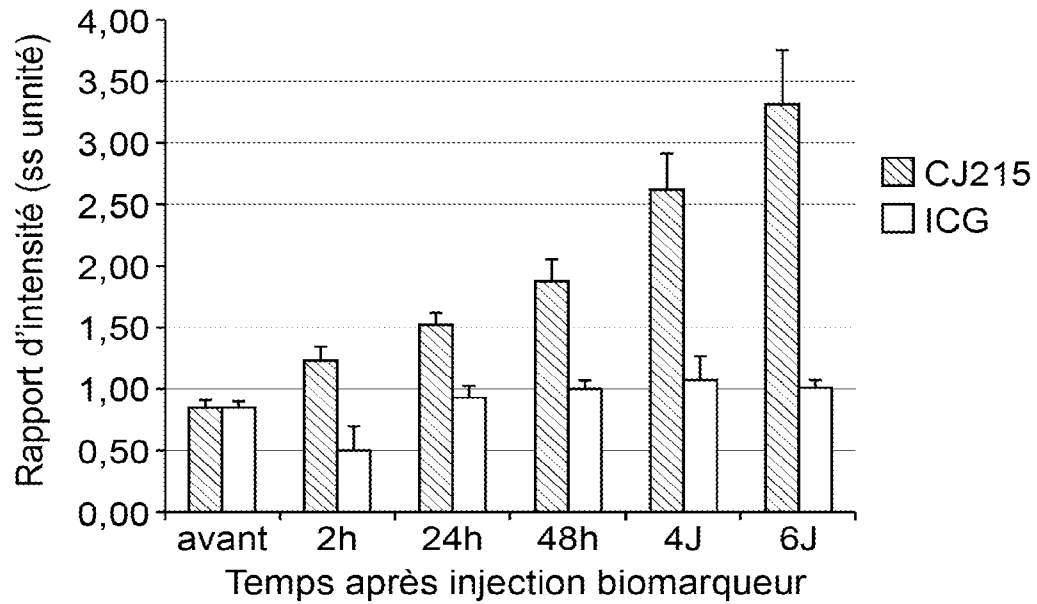


FIG. 1

[Fig. 2]

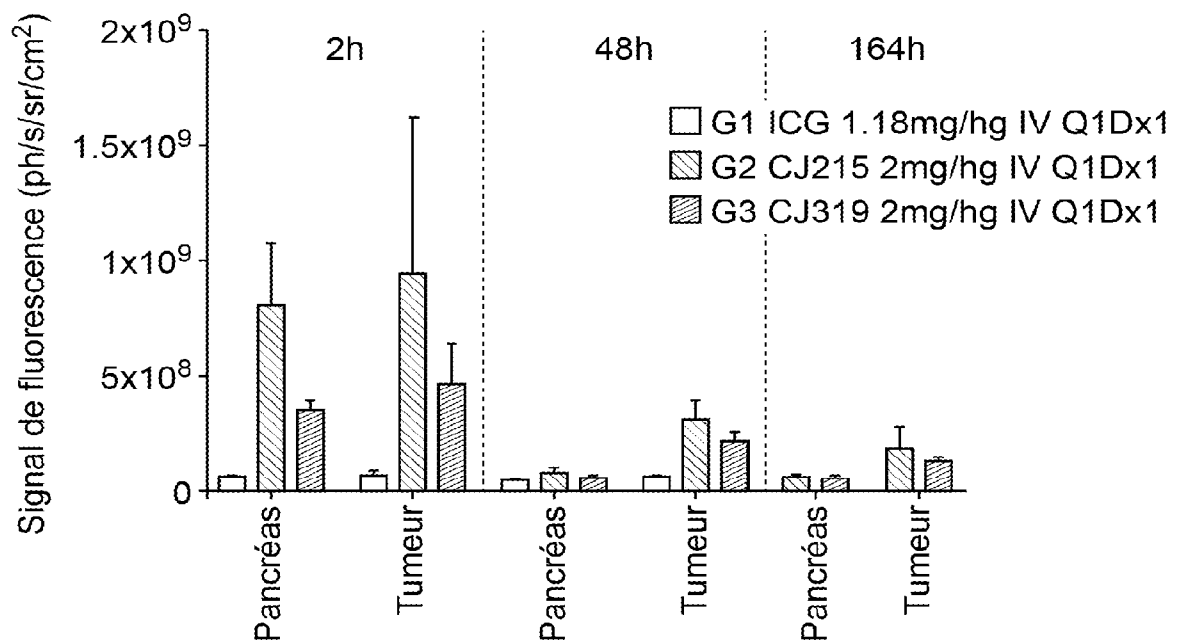


FIG. 2