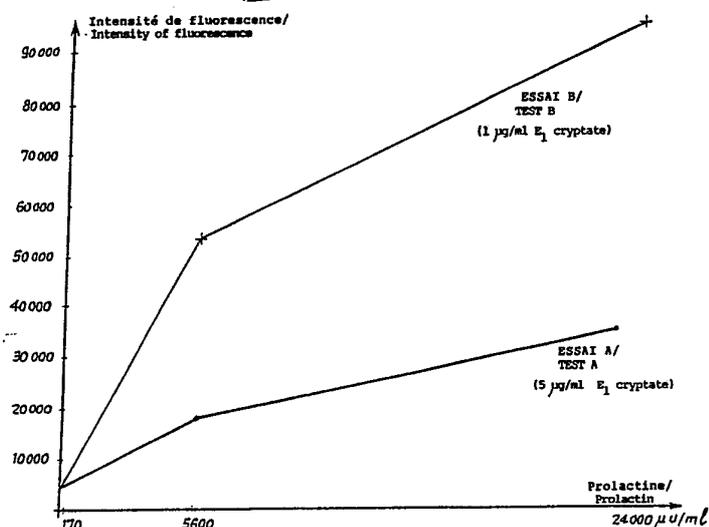
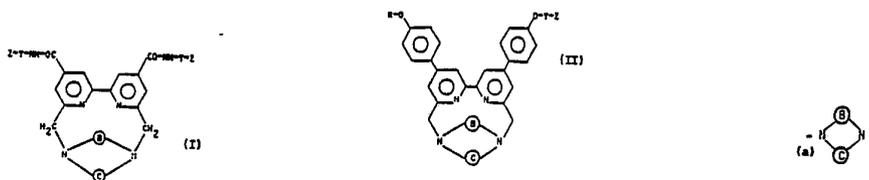


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets⁴ : C07D 498/22, 471/22 G01N 33/533 // (C07D 498:22 C07D 273:00, 273:00, 221:00 C07D 221:00) (C07D 471/22 C07D 259:00, 259:00, 221:00 C07D 221:00, 221:00, 221:00 C07D 221:00, 221:00)</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 89/ 05813</p> <p>(43) Date de publication internationale: 29 juin 1989 (29.06.89)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00620</p> <p>(22) Date de dépôt international: 16 décembre 1988 (16.12.88)</p> <p>(31) Numéro de la demande prioritaire: 87/17765</p> <p>(32) Date de priorité: 18 décembre 1987 (18.12.87)</p> <p>(33) Pays de priorité: FR</p> <p>(71) Déposant: COMPAGNIE ORIS INDUSTRIE S.A. [FR/FR]; 33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs: LEHN, Jean-Marie ; 21, rue d'Oslo, F-67000 Strasbourg (FR). MATHIS, Gérard ; 17, impasse de la Chapelle-des-Ladres, F-30200 Bagnols-sur-Cèze (FR). ALPHA, Béatrice ; 2, rue Charles-Appell,</p>	<p>F-67000 Strasbourg (FR). DESCHENAUX, Robert ; 53, rue de Zurich, F-67000 Strasbourg (FR). JOLU, Etienne, Jean-Pierre ; Les Cyprès, 2, allée du Romarin, F-30200 Bagnols-sur-Cèze (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 55, rue d'Amsterdam, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, DK, FI, JP, KR, NO, SU.</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	

(54) Title: RARE-EARTH CRYPTATES, PROCESSES FOR OBTAINING THEM, INTERMEDIATE SYNTHESIS PRODUCTS AND USE AS FLUORESCENT MARKERS

(54) Titre: CRYPTATES DE TERRES RARES, PROCÉDES D'OBTENTION, INTERMÉDIAIRES DE SYNTHÈSE ET APPLICATION À TITRE DE MARQUEURS FLUORESCENTS



(57) Abstract

The invention concerns rare earth cryptates composed of at least one rare-earth salt complexed by a macropolycyclic compound having one of the formulae (I or II) in which the cycle (a) is the N₂O₄ macrocycle, the N₂O₃ macrocycle or the bis-bipyridine macrocycle, Y is a group or a spacing arm consisting of a bivalent organic radical chosen from the C₁ to C₂₀ linear or branched alkaline groups, possibly containing one or more double bonds and/or possibly being interrupted

by one or more hetero atoms such as oxygen, nitrogen, sulphur or phosphorus or the C₅ to C₈ cycloalkaline groups or from the C₆ to C₁₄ arylene groups, said alkaline or arylene groups being possibly substituted by alkyl, aryl or sulfonate groups; Z is a functional group capable of forming a covalent bond with a biological substance; R is a methyl group or the -Y-Z- group; R' is hydrogen or a -COOR'' group in which R'' is a C₁ to C₁₀ alkyl group and preferably the methyl, ethyl or tertibutyl group or R' is a CO-NH-Y-Z group.

(57) Abrégé L'invention concerne des cryptates de terres rares constitués d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules (I ou II) dans lesquelles le cycle (a) est le macrocycle N₂O₄, le macrocycle N₂O₃ ou le macrocycle bis-bipyridine, Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁ à C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore ou parmi les groupes cycloalkylènes en C₅ à C₈ ou parmi les groupes arylène en C₆ à C₁₄, lesdits groupes alkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate; Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique; R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z-; R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C₁ à C₁₀ et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe CO-NH-Y-Z.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

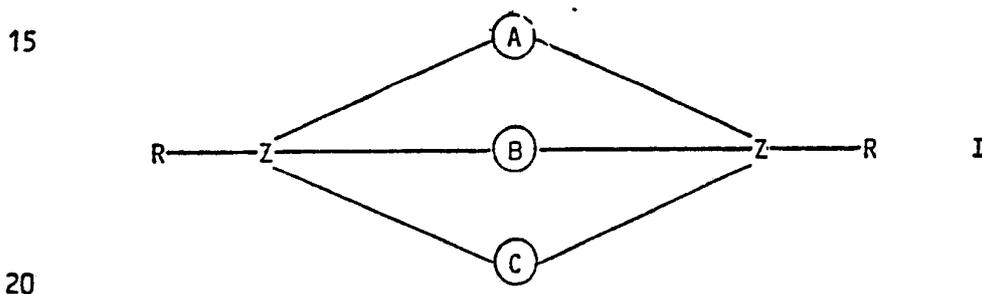
Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP'	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

Cryptates de terres rares, procédés d'obtention, intermédiaires de synthèse et application à titre de marqueurs fluorescents.

La présente invention, qui résulte des travaux effectués en collaboration avec le Professeur J. M. LEHN et son équipe de
 05 recherche de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, concerne le domaine de la fluorescence et plus particulièrement une nouvelle famille de complexes macropolycycliques de terres rares ou cryptates de terres rares, qui conviennent comme marqueurs fluorescents, notamment dans les dosages immunologiques.

10 Dans la demande de brevet FR 84 14 799 sont décrits des complexes macropolycycliques de terres rares qui sont constitués d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule générale :



dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C) sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

25

30

Ces cryptates conviennent notamment à titre de marqueurs de produits biologiques dans les méthodes de détection et de détermination immunologique par fluorescence.

Lorsque ces cryptates de terres rares sont utilisés pour marquer spécifiquement des molécules biologiques à l'aide d'une liaison covalente, ils peuvent être substitués sur l'un ou plusieurs de leurs motifs moléculaires constitutifs par un ou plusieurs substituants suffisamment accessibles et possédant un ou plusieurs motifs moléculaires permettant le couplage covalent avec la molécule biologique dans des conditions opératoires compatibles avec sa réactivité biologique.

Parmi ces motifs moléculaires, on peut citer, à titre d'exemples non limitatifs, les radicaux alkylamino, arylamino, isothiocyano, cyano, isocyano, thiocyano, carboxyle, hydroxyle, mercapto, phénol, imidazole, aldéhyde, époxyde, halogénure, thionyle, sulfonyle, nitrobenzoyle, carbonyle, triazo, succinimido, anhydride, halogénoacétate, hydrazino, dihalogénotriazinyne, etc. (Biol. Chem. 245, 3059 (1970)). La longueur du bras liant le cryptate à la molécule d'intérêt biologique peut varier par exemple de 1 à 20 atomes et contenir des atomes de carbone mais aussi des hétéroatomes tels que N, O, S, P.

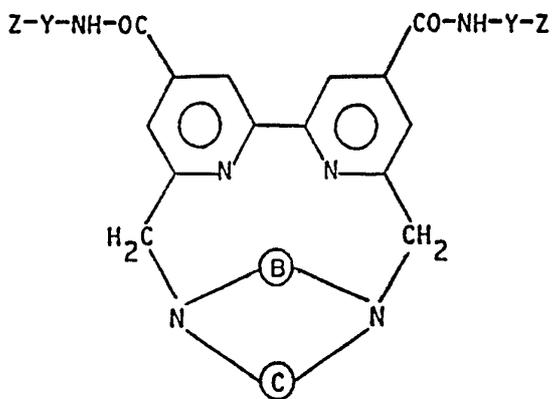
On a maintenant trouvé deux familles de cryptates de terres rares fonctionnalisés qui peuvent être utilisés comme marqueurs fluorescents de molécules biologiques.

L'invention concerne également les procédés pour l'obtention de ces cryptates ainsi que les composés intermédiaires de synthèse.

Enfin, elle concerne aussi l'application de ces cryptates de terres rares comme marqueurs fluorescents de substances biologiques.

Les cryptates de terres rares fonctionnalisés selon la présente invention sont constitués d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules I ou II ci-après :

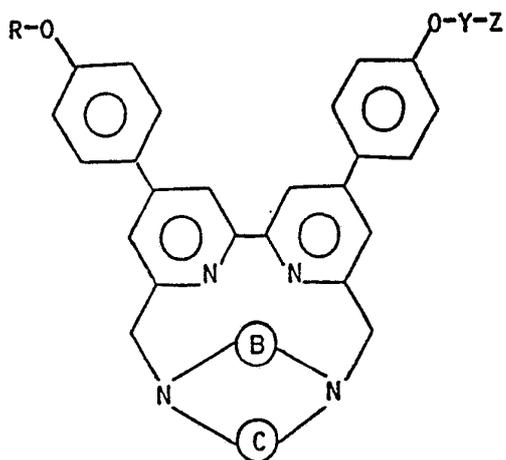
05



I

10

15



II

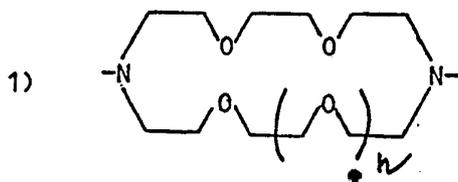
20

dans lesquels :

25

- le cycle de formule $-N-\begin{matrix} \text{B} \\ \text{C} \end{matrix}-N-$ est l'un des cycles suivants :

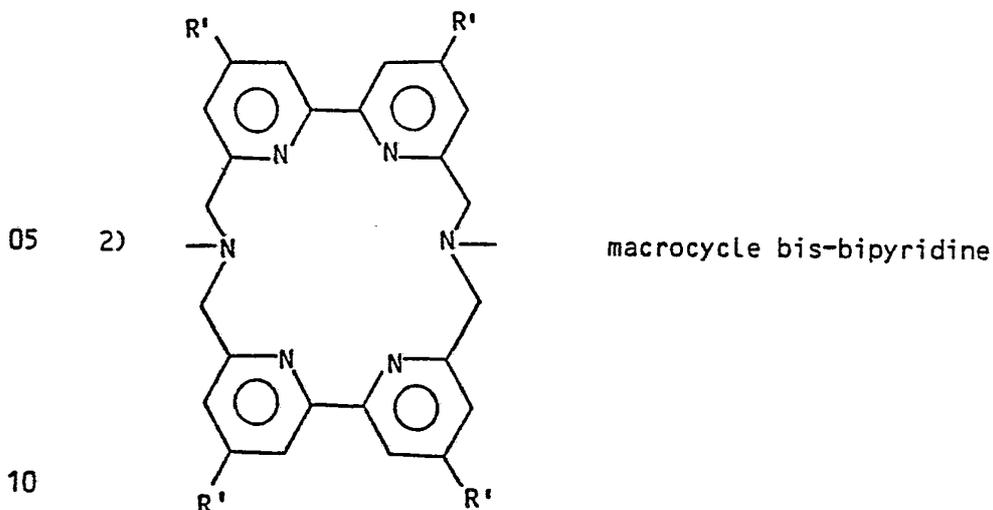
30



$n = 0$ ou 1

macrocycle $[\overline{N}_2O_4]$ ou cycle (22)

macrocycle $[\overline{N}_2O_3]$ ou cycle (21)



- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁ à C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore, parmi les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ ou parmi les groupes arylène en C₆ à C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.
- 15
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;
- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;
- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C₁ à C₁₀ et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertiobutyle ou bien R' est un groupe-CO-NH-Y-Z.
- 20
- 25

Dans la présente description, on désigne par "groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique" tout groupe fonctionnel capable de se lier par liaison covalente, directement ou après activation, avec au moins l'une des fonctions naturellement présentes ou artificiellement introduites sur ladite substance biologique. De telles fonctions sont notamment les fonctions NH₂, COOH, SH ou OH. De tels groupes ainsi que les procédés d'activation sont décrits en détail par P. TIJSSSEN dans "Practice and Theory of Enzyme immunoassays" Elsevier 1985, document incorporé dans la présente description à titre de référence.

30

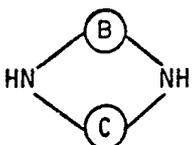
35

A titre d'exemples de groupes fonctionnels appropriés aux fins de l'invention, on peut citer notamment les groupes amino, thio, cyano, isocyano, isothiocyano, thiocyano, carboxyle, hydroxyle, maléimido, succinimido, mercapto, phénol, imidazole, aldéhyde, époxyde, halogénure, thionyle, sulfonyle, nitrobenzoyle, carbonyle, triazo, anhydride, halogénoacétate, hydrazino, acridine etc.

Les groupes particulièrement préférés sont les groupes amino, thio et carboxy qui doivent être activés avant le couplage covalent avec la substance biologique ainsi que les groupes maléimido, succinimido et isothiocyanate, lesquels peuvent se lier directement avec la substance biologique.

D'une manière générale, les cryptates selon l'invention peuvent être obtenus soit :

15

- par condensation du cycle  avec une

20

dihalogénométhyl-6,6' bipyridine-2,2' disubstituée en 4,4', substitution ultérieure par le groupe -NH-Y-Z ou le groupe -Y-Z et complexation du composé macropolycyclique obtenu par un sel de terre rare, ou

25

- par condensation d'une molécule de diaminométhyl-6,6' bipyridine 2,2' disubstituée en 4,4', avec deux molécules de dihalogénométhyl-6,6' bipyridine 2,2' disubstitué en 4,4', substitution ultérieure par le groupe -NH-Y-Z ou le groupe -Y-Z et complexation du composé macropolycyclique obtenu par un sel de terre rare.

30

On notera que dans les procédés ci-dessus, la complexation par un sel de terre rare peut avoir lieu avant l'étape de substitution. Cette complexation est réalisée de préférence avant l'étape de substitution.

Les différents procédés d'obtention des cryptates selon l'invention vont être maintenant décrits en détail.

éventuellement bloqué par des moyens classiques. On opère
avantageusement sous atmosphère d'azote et à la température
ambiante. Lorsque la réaction est terminée, l'excès d'amine est
éliminée par des moyens appropriés et le cryptate de formule 4
05 est récupéré selon des moyens classiques.

Le composé ainsi obtenu est ensuite transformé en un
cryptate de terre rare par échange d'ions en chauffant au reflux
une solution du cryptate d'ion alcalin du macrobicyclic 4 dans du
méthanol, en présence éventuellement de chloroforme, avec une
10 solution d'un halogénure de terre rare dans du méthanol.

Comme indiqué précédemment, le cryptate d'ion alcalin 3
peut être, préalablement à l'aminolyse, transformé en un cryptate
de terre rare par échange d'ions selon le mode opératoire décrit
15 ci-dessus.

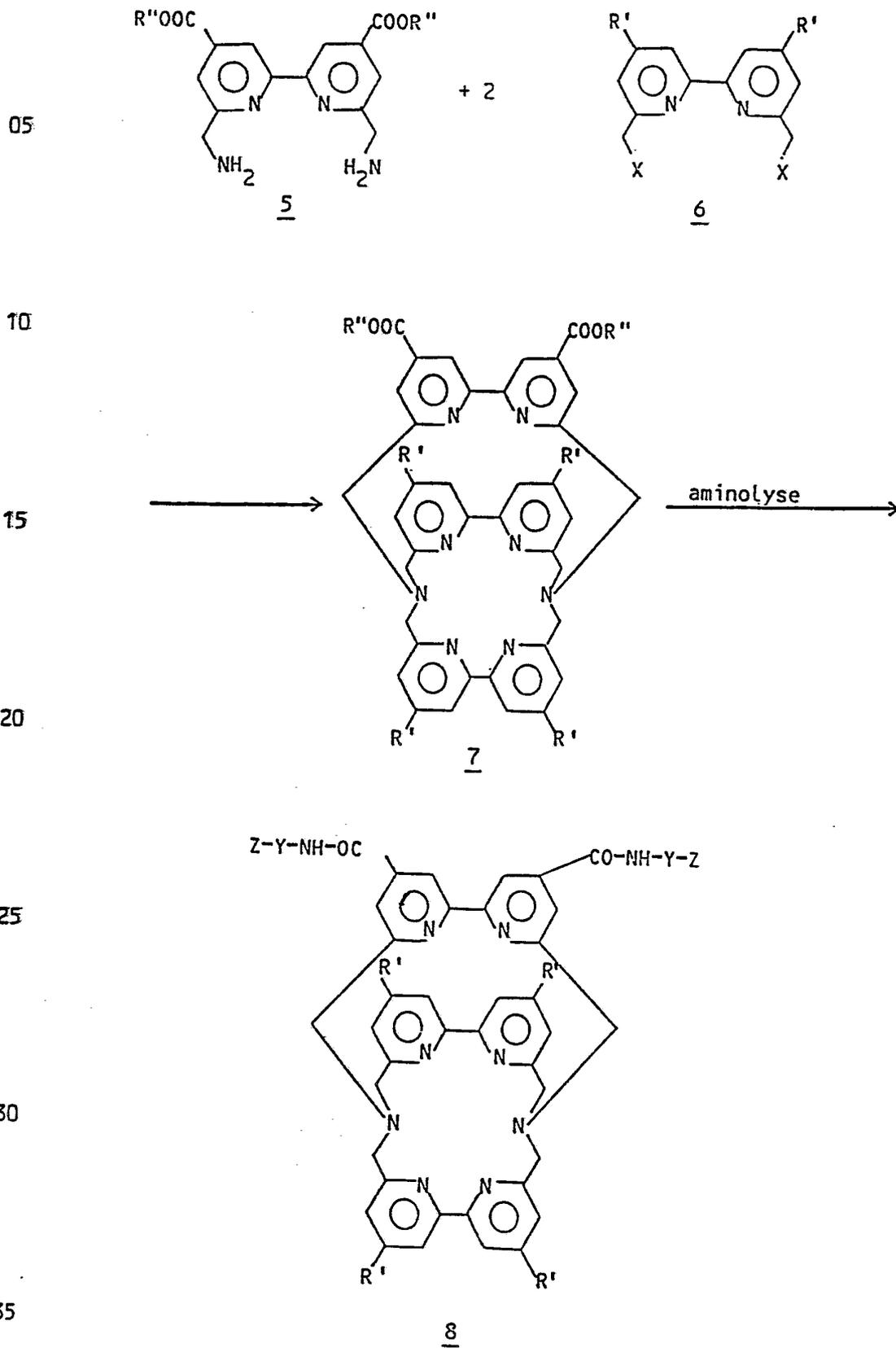
Le composé macrobicyclique 3 est un intermédiaire-clé
pour la synthèse des cryptates de l'invention. Cet intermédiaire
peut se présenter sous la forme d'un cryptate d'ion alcalin ou
d'un cryptate de terre rare. Il constitue un autre objet de
20 l'invention. Les intermédiaires particulièrement préférés aux fins
de l'invention sont les composés de formule 3 dans lesquels R_1 est
le groupe CH_3 , C_2H_5 ou $t-C_4H_9$.

Selon une variante de mise en oeuvre de ce procédé, le
cryptate d'ion alcalin peut être décomplexé en transformant d'abord
25 celui-ci en le cryptate d'argent correspondant par action d'un
excès de nitrate d'argent, puis en traitant ce dernier par H_2S
[Helvetica Chimica Acta, vol. 67 (1984) 2264-2269]. On obtient
alors le composé macropolycyclique 3 sous la forme du cryptand
libre qui constitue également un intermédiaire de synthèse, lequel
30 peut être ensuite complexé, par des moyens classiques en un
cryptate de terre rare.

On notera que les cryptates de formules (I) ou (II)
dans lesquelles Z est autre qu'un groupe amino peuvent être
obtenus à partir des cryptates de formules (I) ou (II) dans
35 lesquelles Z est le groupe amino par des procédés classiques bien
connus de l'homme de l'art.

8

PROCEDE B :



Selon ce procédé, on condense deux molécules du dérivé halogéné 6 avec une molécule du dérivé aminé 5. On opère avantageusement dans les mêmes conditions que dans la première étape du procédé A, c'est-à-dire que l'on réalise cette

05 condensation dans un solvant organique anhydre, tel que l'acétonitrile en présence d'une base telle qu'un carbonate d'ion alcalin, par exemple le carbonate de sodium ou le carbonate de lithium. On opère à la température de reflux du solvant. On obtient le composé macropolycyclique 7 qui est un

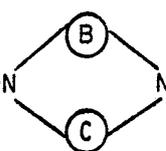
10 intermédiaire-clé pour la synthèse des cryptates selon l'invention et fait partie également du cadre de l'invention. Ce complexe macropolycyclique est sous la forme d'un cryptate d'ion alcalin qui est avantageusement transformé en un cryptate de terre rare avant l'aminolyse selon le mode opératoire défini précédemment.

15 Comme pour le procédé A, le cryptate d'ion alcalin 7 peut être, selon une variante de mise en oeuvre, décomplexé pour obtenir le composé macropolycyclique 7 correspondant ou cryptand libre, lequel est ensuite recomplexé en un cryptate de terre rare.

On procède ensuite à l'aminolyse du composé 7 selon le

20 mode opératoire défini précédemment et on obtient le complexe macropolycyclique 8, c'est-à-dire un cryptate selon l'invention de

formule I dans laquelle $\begin{array}{c} \text{---N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{---N---} \end{array}$ est le macrocycle bis-



25 bipyridine, Y, Z et R' sont tels que définis précédemment.

Le dérivé aminé 5 utilisé comme produit de départ dans le procédé B est obtenu à partir du dérivé halogéné 1 par transformation de celui-ci en le composé azido correspondant par réaction avec NaN_3 au reflux dans un solvant organique, tel que

30 le tétrahydrofurane, puis réduction du composé azido ainsi obtenu en présence d'un catalyseur de réduction, tel que le palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène à la température ambiante.

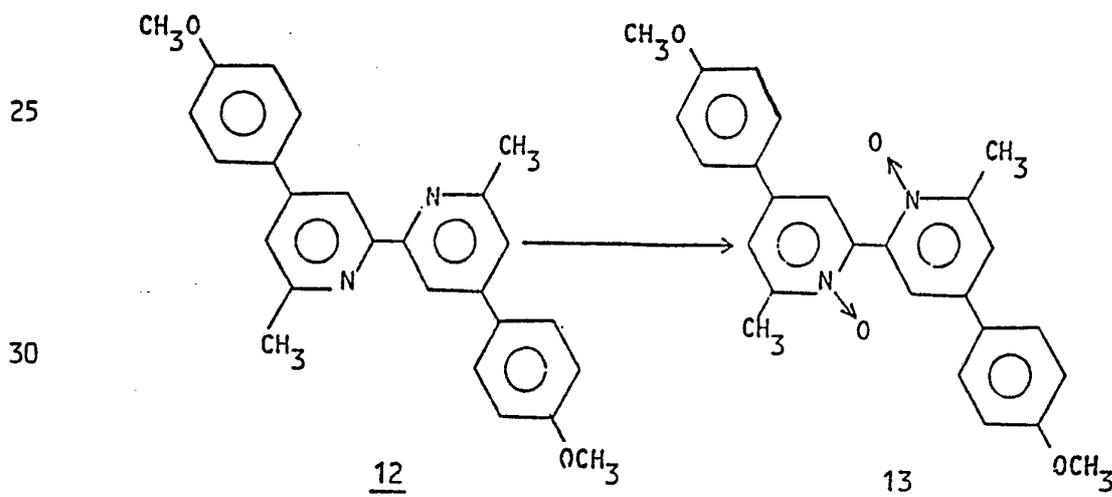
Lorsque Z est un groupe cyano, celui-ci peut être transformé en un groupe amino par réduction à l'aide d'agents classiques de réduction.

05 Le composé 11 obtenu est ensuite transformé en un cryptate de terre rare par échange d'ions, par exemple selon le mode opératoire défini précédemment. Avantageusement, on dissout un halogénure de terre rare dans du méthanol et on y ajoute une solution du cryptate de l'ion alcalin dans du méthanol avec un faible volume de chloroforme si nécessaire. On chauffe le mélange
10 au reflux sous atmosphère inerte et on suit la disparition du cryptate de l'ion alcalin par chromatographie sur couche mince.

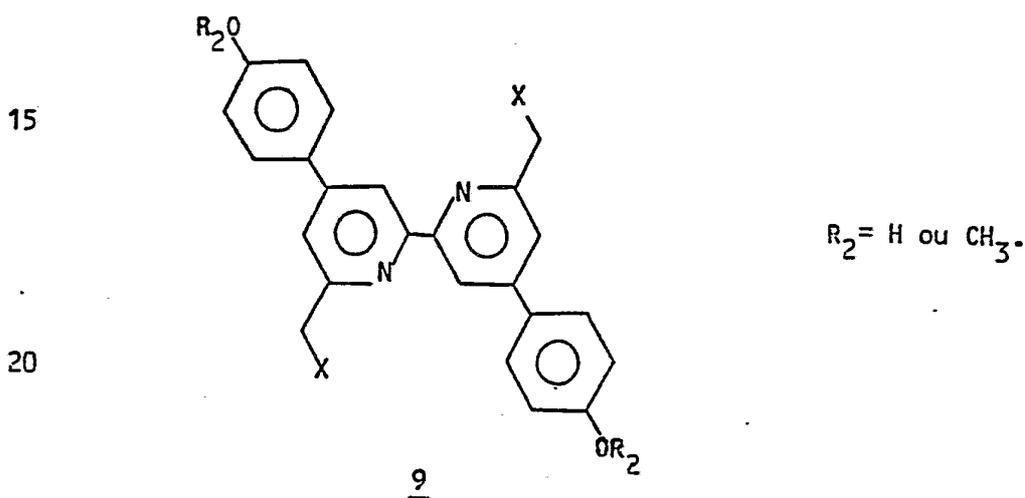
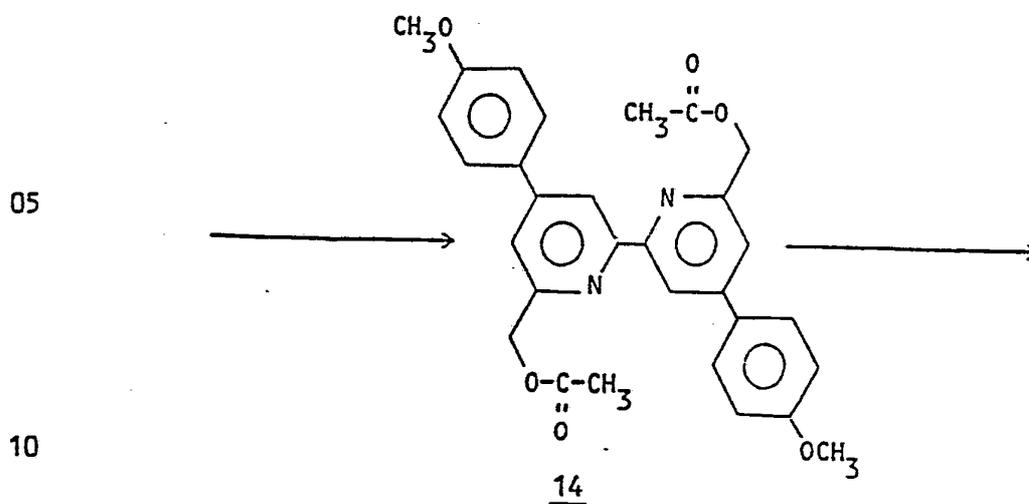
Selon une variante de mise en oeuvre, le cryptate d'ion alcalin peut être décomplexé selon le mode opératoire défini précédemment (voir procédé A) et transformé en le cryptate de terre rare souhaité.
15 rare souhaité.

Lorsque la réaction est terminée, le cryptate de terre rare est isolé du milieu réactionnel selon des procédés classiques. Il se présente sous la forme d'un solide cristallin.

20 Le dérivé halogéné de bipyridine 9 mis en oeuvre dans le mode opératoire ci-dessus peut être obtenu selon le procédé représenté par le schéma réactionnel ci-après :



12



25 Le diméthyl-6,6' di(p-méthoxyphényl)-4,4' bipyridine-2,2' de formule 12 peut être obtenu à partir du di(p-méthoxyphényl)-1,6 hexadiène-1,5 dione-3,4 selon la méthode de Kröhnke décrite dans SYNTHESIS (1976), 1.

30 Le composé 13 est obtenu par réaction du composé 12 avec de l'acide m-chloroperbenzoïque dans un solvant organique, tel que le chloroforme.

Le dérivé 14 est ensuite préparé par chauffage au reflux d'une suspension du composé 13 dans de l'anhydride acétique.

35 Par chauffage au reflux d'une solution du composé 14 avec un acide halogénohydrique en solution acétique, on obtient le composé 9 dans lequel R_2 est H ou CH_3 , au moins l'un des radicaux R_2 étant l'hydrogène.

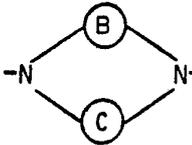
Le composé de formule 9 est un intermédiaire-clé pour l'obtention des composés de l'invention et constitue un autre objet de l'invention.

05 Les composés selon l'invention qui sont des cryptates stables de terres rares sont solubles dans l'eau et certains solvants organiques tels que le méthanol ou le DMSO.

Les composés de l'invention sont utiles comme marqueurs fluorescents des produits biologiques et conviennent donc comme réactifs de dosage dans les méthodes de détection et de détermination immunologique par fluorescence, aussi bien dans les dosages dits par compétition que ceux dits par excès.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail dans les exemples illustratifs ci-après.

15 EXEMPLE 1 - Cryptate de terre rare de [(22)(p-OCH₃ p-OCH₂CH₂NH₂ diPhbpy)]

Formule II : R = CH₃, Y = CH₂CH₂, Z = NH₂, -N  est le

macrocycle (22) (procédé C).

20 A - Diméthyl-6,6' di(p-méthoxyphényl)-4,4' bipyridine-2,2' (composé 12)

Un mélange de di(p-méthoxyphényl)-1,6 hexadiène-1,5 dione-3,4 (3,07 g, 9,5 mmol) préparé suivant la méthode de Kröhnke Synthesis (1976), 1, de chlorure de pyridinium-1 propane one-2 (3,27 g, 19,1 mmol) obtenu en mélangeant des quantités équimolaires de pyridine et de chloro-1 acétone et d'acétate d'ammonium (19 g) dans 95,5 ml de CH₃OH est chauffé à reflux 38 h sous azote. Après retour du mélange réactionnel à la température ambiante, le précipité de couleur crème formé est filtré et lavé au CH₃OH. Le produit brut est utilisé sans purification supplémentaire. Il peut être cristallisé dans CH₂Cl₂/hexane.

Rendement : 70 %

C.C.M. : R_f = 0,5 (silice, CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5)

35 S.M. : 396 (M⁺), 381 (M⁺-CH₃), 365 (M⁺-2CH₃), 353 (M⁺-CH₃-CO), 338 (M⁺-2CH₃-CO), 198 (M⁺/2).

B - Di (N-oxyde)-1,1' diméthyl-6,6' di(p-méthoxyphényl)-4,4' bipyridine-2,2' (Composé 13)

A une solution de 12 (3,45 g, 8,7 mmol) dans 800 ml de CHCl_3 , on additionne goutte à goutte, à 0°C , une solution d'acide m-chloroperbenzoïque (6 g, 34,8 mmol) dans 360 ml de CHCl_3 . On laisse une nuit sous agitation à température ambiante. Le mélange est alors lavé avec une solution saturée de NaHCO_3 jusqu'à un pH alcalin. La phase organique est séparée et concentrée. L'ajout d'hexane provoque la précipitation du composé. Le précipité est filtré puis redissous dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (90/10) et lavé avec une solution de soude 2N. La phase organique, qui contient le composé 13, est séparée et le solvant évaporé. Par ailleurs, le filtrat provenant de la précipitation est également lavé avec la solution de soude 2N, puis concentré et chromatographié sur une colonne d'alumine avec CH_2Cl_2 comme éluant.

Rendement : 80 % F > 250°C

C.C.M. : $R_f = 0,5$ (alumine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95/5)

S.M. : 429 (MH^+), 411 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$).

C - Diacétoxyméthyl-6,6' di(p-méthoxyphényl)-4,4' bipyridine-2,2' (composé 14)

Une suspension de 13 (1,21 g, 2,82 mmol) dans 18 ml d'anhydride acétique est chauffée à reflux 1 h 30. La solution obtenue est concentrée. On ajoute 5 ml de H_2O et 20 ml de CH_2Cl_2 au résidu pâteux et on basifie le milieu avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 . La phase organique est séparée, la phase aqueuse est extraite deux fois avec 30 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique résultante est séchée sur Na_2SO_4 et le solvant évaporé. Le produit brut est chromatographié sur une colonne d'alumine avec CH_2Cl_2 comme éluant.

Rendement : 90 % F = $140-141^\circ\text{C}$

C.C.M. : $R_f = 0,9$ (alumine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 95/5)

S.M. : 513 (MH^+), 469 ($\text{M}^+ - \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 453 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$), 256 ($\text{M}^+/2$).

D - Dibromométhyl-6,6' di(p-méthoxyphényl)-4,4' bipyridine-2,2' (composé 9a : $\text{R}_2 = \text{CH}_3$)

dibromométhyl-6,6' (p-méthoxyphényl-4, p-hydroxyphényl-4')
bipyridine-2,2' (composé 9b : l'un des radicaux R₂ = H, l'autre
est CH₃).

05 Une solution de 14 (0,31 g, 0,60 mmol) dans 5 ml de
 HBr/AcOH 33 % est chauffée à reflux 12 à 13 h. On ajoute 20 ml de
 H₂O et 60 ml de CHCl₃ à la solution à température ambiante. On
 lave avec une solution saturée de NaHCO₃ jusqu'à la
 neutralisation. La phase organique est séparée et la phase aqueuse
 extraite avec deux fois 20 ml de CH₂Cl₂. Le solvant est évaporé de
 10 la phase organique résultante et le résidu chromatographié sur une
 colonne d'alumine avec CH₂Cl₂, puis CH₂Cl₂/CH₃OH (95/5) comme
 éluant.

Composé 9a ; R₂ = CH₃ ; Rendement : 16 %

Décomposition : 210-215°C

15 C.C.M. : R_f > 0,9 (alumine, CH₂Cl₂/CH₃OH,
 95/5)

S.M. : 556,555,553 (MH⁺), 556,554,552 (M⁺),
 475,473 (M⁺-Br), 394 (M⁺-2Br)

Composé 9b ; l'un des R₂ = H ; Rendement : 35 %

20 C.C.M. : R_f = 0,4 (alumine,
 CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5)

S.M. : 542,540,538 (M⁺), 461,459
 (M⁺-Br), 380 (M⁺-2Br);

E - Cryptate de sodium de [(22)(p-OCH₃ p-OH diPhbpy)] (composé 10)

25 Un mélange du macrocycle (22) (0,262 g, 1 mmol) et de
 Na₂CO₃ (1,05 g, 10 mmol) dans 600 ml de CH₃CN anhydre est chauffé à
 reflux 30 min sous azote. On y ajoute alors une suspension du
 composé 9b (0,54 g, 1 mmol) dans 450 ml de CH₃CN anhydre. Le
 mélange est chauffé 20 h à reflux sous azote. La solution obtenue
 30 est filtrée à chaud et le solvant évaporé. Le produit brut est
 chromatographié sur alumine avec CH₂Cl₂/CH₃OH (95/5) comme éluant.

Rendement : 60-65 %

C.C.M. : R_f = 0,6 (alumine, CH₂Cl₂/CH₃OH, 90/10)

35 S.M. : 663 (M⁺), 640 (M⁺-Na), 625 (M⁺-Na-CH₃), 609 (M⁺-Na-OCH₃),
 595 (M⁺-Na-OCH₃-OH).

F - Cryptate de sodium de [(22)(p-OCH₃ p-OCH₂CN diPhbpy)]

(composé 11a) : Z = CN ; Y = CH₂ ; R = CH₃.

A une solution de cryptate de sodium du composé 10 (0,042 g, 0,066 mmol) dans un volume minimum de CH₃CN, on ajoute un
 05 excès de NaH (en poudre) sous azote. On chauffe à reflux sous azote pendant 1 h. La solution est ramenée à température ambiante, avant l'addition de bromoacétonitrile (1,2 équivalent). Le mélange est agité à température ambiante, sous azote, toute la nuit. On ajoute
 10 20 ml de H₂O et 10 ml de CH₂Cl₂. On neutralise le milieu par une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique est séparée et la phase aqueuse extraite deux fois avec 20 ml de CH₂Cl₂. La phase organique résultante est séchée sur Na₂SO₄, puis les solvants sont évaporés. Le produit brut est chromatographié sur une colonne d'alumine avec CH₂Cl₂/CH₃OH (96/4) comme éluant.

15 Rendement : 75 %

C.C.M. : R_f = 0,5 (tache bleu-violet), (alumine, CH₂Cl₂/CH₃OH, 92,5/7,5)

S.M. : 702 (M⁺), 679 (M⁺-Na), 663 (M⁺-Na-H-CH₃), 654 (MH⁺-Na-CN), 640 (MH⁺-Na-CH₂CN).

20 G - Cryptate de sodium de [(22)(p-OCH₃ p-OCH₂CH₂NH₂ diPhbpy)]

(composé 11b : Z = NH₂ ; Y = -CH₂-CH₂) ; R = CH₃)

A une suspension du 11a (0,078 g, 0,1 mmol) dans 8 ml de THF anhydre, on ajoute 2 ml de B₂H₆ (1M dans THF) et 5 ml de THF supplémentaire. On laisse sous agitation et à température ambiante
 25 pendant une nuit. On ajoute 10 ml de CH₃OH et on agite 20 à 30 min. On évapore les solvants. On ajoute au résidu 20 ml d'un mélange H₂O/HCl concentré (1/1). On observe un précipité jaune et un dégagement gazeux. La dissolution a lieu peu à peu. On évapore les solvants et on traite le résidu obtenu par une solution
 30 aqueuse de NaOH (6N). L'amine 11b est extraite par 25 ml de CH₂Cl₂. Rendement quantitatif. La formation du composé est mise en évidence par ¹H-RMN.

H - Réaction de complexation : Echange du sodium par un ion Ln³⁺ (Eu, Tb)

35 On dissout LnCl₃.xH₂O (0,1 mmol) dans 25 ml de CH₃OH, et on y ajoute une solution de cryptate de sodium obtenu

précédemment (0,06 mmol) dans 4-8 ml de CHCl_3 (volume minimum). On chauffe le mélange à reflux sous atmosphère d'azote (6 heures à 4 jours selon le cryptate de sodium considéré). On suit la disparition du cryptate de sodium par C.C.M. (alumine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 90/10). Lorsque la réaction est terminée, on filtre le mélange réactionnel si nécessaire et on évapore les solvants. On redissout le résidu dans 15-20 ml de CH_3OH et on ajoute de l'éther jusqu'à persistance d'un trouble (5 ml à 25-30 ml). Le cryptate de terre rare formé cristallise ou précipite très rapidement ou après plusieurs heures selon la nature du cryptate. La formation du cryptate est mise en évidence par $^1\text{H-RMN}$ et spectroscopie U.V. visible.

En suivant ce mode opératoire, on a obtenu respectivement le cryptate d'euporium et le cryptate de terbium de formule 11, lesquels présentent les caractéristiques spectroscopiques ci-après :

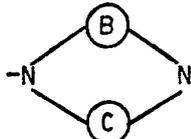
Cryptate d'euporium : UV/visible dans CH_3OH

280 nm maximum ; 292 nm épaulement ; 320 nm maximum.

Cryptate de terbium : UV/visible dans H_2O

282 nm ; 310 nm épaulement.

EXEMPLE 2 : Cryptate de terre rare de [bpy.bpy.(p-OCH₃p-OCH₂CH₂NH₂ diPhbpy)]

R = CH_3 ; Y = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; Z = NH_2 ; R' = H ;  est le

macrocycle bis-bipyridine (Procédé C).

A - Cryptate de sodium de [bpy.bpy.(p-OCH₃p-OH diPhbpy)]
(composé 10)

Un mélange de macrocycle bis-bipyridine (0,48 g, 1,21 mmol) et de Na_2CO_3 (1,16 g, 11 mmol) dans 480 ml de CH_3CN anhydre est chauffé à reflux 30 min sous azote. On y ajoute une suspension de dibromométhyl-6,6' (p-méthoxyphényl-4, p-hydroxyphényl-4') bipyridine-2,2' préparé précédemment (voir exemple 1 point D) (0,65 g, 1,20 mmol) dans 340 ml de CH_3CN . La solution résultante est chauffée 24 h à reflux, sous azote. Après

retour à la température ambiante, le mélange réactionnel est filtré et le solvant évaporé. Le produit brut est alors chromatographié sur une colonne d'alumine avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (98/2) comme éluant.

Rendement : 45 %

05 C.C.M. : $R_f = 0,4$ (alumine, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 90/10)
tache violette (254 nm), verte (366 nm)

S. M. : a) IC (NH_3) : 795 (M^+), 773 (MH^+-Na)

b) FAB^+ (thioglycérol) : 875 (MBr^+), 795 (M^+).

10 Le cryptate de sodium obtenu a été transformé en le cryptate de terbium en suivant le mode opératoire décrit à l'exemple 1H. Ce cryptate présente les caractéristiques spectroscopiques ci-après :

. UV/visible dans H_2O :

244 nm (maximum) ; 303 nm (maximum)

15 . UV/visible dans CH_3OH ;

244 nm (maximum) ; 301 nm (maximum) ; 318 nm (épaulement).

B - Cryptate de sodium de [bpy.bpy.(p-OCH₃ p-OCH₂CN diPhbpy)]

A une solution de cryptate de sodium de 10 (0,21 g, 0,24 mmol) dans 12 ml de CH_2Cl_2 et 12 ml de CH_3OH , on ajoute une solution de NaOH dans CH_3OH (1,5 équivalent dans 2 ml). Le mélange est chauffé 1 h 30 sous azote, à reflux. Puis, après retour à la température ambiante, le solvant est évaporé ; l'eau formée au cours de la réaction est éliminée par distillation azéotropique avec du toluène. Le produit ainsi obtenu est séché toute une nuit à la pompe à palette. Le composé orange vif obtenu est mis en solution dans 35 ml de THF (la solution est trouble). Dès l'ajout de bromoacétonitrile (30 μl , 1,8 équivalent), la solution devient limpide. On laisse réagir à température ambiante en agitant sous azote toute la nuit. On ajoute 20 ml de H_2O et environ 10 ml de CH_2Cl_2 . On neutralise le milieu par une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique est séparée et la phase aqueuse extraite deux fois avec 20 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique résultante est séchée sur Na_2SO_4 , puis les solvants sont évaporés. Le produit brut est chromatographié sur une colonne d'alumine avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (95/5) comme éluant.

Rendement : 92 %

S.M. : FAB⁺ 834 (M⁺).

Le cryptate de sodium obtenu a été transformé en le
cryptate de terbium correspondant selon le mode opératoire décrit à
l'exemple 1. Ce cryptate présente les caractéristiques
spectroscopiques ci-après :

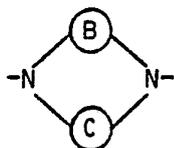
. UV/visible dans CH₃OH : 300 nm (maximum) ; 314 nm (épaulement).

C - Cryptate de terre rare de [bpy.bpy.(p-OCH₃ p-OCH₂CH₂NH₂
diPhbpy)]

En opérant selon le mode opératoire décrit au point G de
l'exemple 1, on obtient le cryptate de terre rare du composé
ci-dessus.

EXEMPLE 3 - Préparation du cryptate d'euporium de [(bis-bpy) bpy-
di(amidoéthylénamine)] (Procédé A)

Composé de formule I : Z = NH₂ ; Y = -CH₂-CH₂- ;



est le macrocycle bipyridine et R' est

l'hydrogène.

A - Préparation du cryptate de sodium de [(bis-bpy) bpy diester]

Composé de formule 1 dans laquelle R₁ = CH₃.

Un mélange de 0,300 g (7,61.10⁻⁴ mole) du macrocycle bis-
bipyridine et de 1,10 g (10,4.10⁻³ mole) de Na₂CO₃ est chauffé au
reflux pendant 30 min. dans 450 ml de CH₃CN. Une solution de
0,350 g (7,64.10⁻⁴ mole) de dibromométhyl-6,6' (p-diméthoxycarbo-
nyl-4,4') bipyridine 2,2' (composé 1 ; X = Br) dans 375 ml de
CH₃CN est ensuite ajoutée sous forte agitation en 60 min. Le
mélange réactionnel est encore agité 18 heures à reflux puis
refroidi à température ambiante et filtré. Le solvant est éliminé
sous vide à l'évaporateur rotatif. Le solide obtenu est dissous
dans CHCl₃ et chromatographié sur colonne d'alumine (avec un peu
de silice au sommet) par élution avec CHCl₃/CH₃OH (98/2). Les
solvants sont éliminés sous vide et 0,230 g (38 %) du complexe
attendu sont obtenus. Celui-ci présente les caractéristiques
physico-chimiques ci-après :

Fusion > 240°C

¹H-RMN (CD₃OD) : 3,89 (s, 8H, CH₂-bpy), 3,98 (s, 4H, CH₂-bpy diE) ;
4,03 (s, 6H, COOCH₃) ; 7,42 (d, J = 7,4 Hz, 4H-bpy) ; 7,92 (t-J =
7,4 Hz, 4H-bpy) ; 7,96 (d, J = 1,2 Hz, 2H-bpy diE) ; 8,10 (d,
05 J = 7,4 Hz, 4H-bpy) ; 8,60 (d, J = 1,2 Hz, 2H-bpy diE) (diE =
diester)

¹³C-RMN(CDCl₃) : 52,9, 59,5, 119,7, 120,4, 123,4, 124,1, 138,2,
139,7, 155,2, 155,7, 158,3, 160,4, 164,9

C₄₀H₃₄N₈O₄NaBr 4H₂O (865,71) ;

10 Calculé (%) : C 55,49 ; H 4,89 ; N 12,94 ;

Trouvé (%) : C 55,44 ; H 4,33 ; N 13,10.

B - Aminolyse du cryptate ci-dessus

Le cryptate obtenu ci-dessus (0,100 g ; 1,26.10⁻⁴ mole)
est soumis à une aminolyse en l'ajoutant par portion à 4 ml
15 d'éthylène diamine distillée sur KOH préalablement chauffée à 90°C.
Le mélange réactionnel obtenu est encore agité pendant 1 heure puis
refroidi à la température ambiante. L'éthylène diamine en excès est
ensuite éliminée sous vide et on obtient une huile. Cette dernière
est reprise dans 2 ml d'un mélange de CHCl₃/CH₃OH (2/1) qui est à
20 son tour éliminé sous vide. La purification est répétée 5 fois et
on obtient alors le complexe attendu avec un rendement de 89 %.

C - Transformation du cryptate ci-dessus en le cryptate d'europium
correspondant

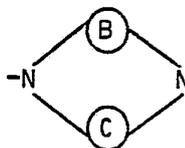
En opérant selon le mode opératoire décrit au point H de
25 l'exemple 1, on a obtenu le cryptate d'europium de
[(bis-bpy)(bpy-di(amidoéthylèneamine))] qui présente les caracté-
ristiques spectroscopiques ci-après :

UV/visible dans H₂O

240 nm ; 303 nm (maxima)

30 EXEMPLE 4 - Préparation du cryptate d'europium de [(bis-bpy) (bpy-
di(amidoéthylèneamine))] (Procédé A)

Composé de formule I : Z = NH₂ ; Y = -CH₂-CH₂- ; R' = H



est le macrocycle bipyridine

A - Préparation du cryptate d'euporium de [(bis-bpy) (bpy diester)]

Le cryptate de sodium obtenu au point A de l'exemple précédent (0,10 mmole) est dissous dans 8 ml de CHCl_3 et ajouté à une solution de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,15 mmole) dans 40 ml de CH_3OH . La solution est agitée au reflux, sous azote, jusqu'à la disparition du cryptate de sodium (CCM, oxyde d'aluminium, éluant ; CH_2Cl_2 , CH_3OH (90/10)). Le temps de réaction est de l'ordre de 48 heures. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et filtré s'il présente un trouble. Les solvants sont éliminés à l'évaporateur rotatif et le résidu est redissous dans 20-25 ml de CH_3OH . De l'éther éthylique est ajouté goutte-à-goutte jusqu'à la persistance d'un très léger trouble. Le cryptate d'euporium cristallise ainsi à température ambiante. On élimine les solvants à la pipette et le cryptate est séché. Rendement : environ 40 % (première cristallisation). Le filtrat est concentré à sec et l'opération est répétée.

Le produit obtenu présente les caractéristiques physico-chimiques ci-après :

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O réf = t-BuOH) : 10,51 (2H, s, CH(bpy diE)), 8,66 (2H, s, CH-bpy diE), 8,06 (4H, t, CH-bpy), 7,08 (4H, d, CH-bpy), 6,74 (4H, d, CH-bpy), 4,66 (6H, s, OCH_3), 0,9 (8H, s, CH_2 -bpy), -0,78 (4H, s, CH_2 -bpy diE)

$\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_4 \cdot \text{EuCl}_3 \cdot \text{NaCl} \cdot 9/2 \text{H}_2\text{O}$ (1088,58)

% calculé : C 44,13 ; H 3,98 ; N 10,29

% trouvé : C 43,93 ; H 3,79 ; N 9,88

C 44,06 ; H 3,70 ; N 10,03

B - Aminolyse du cryptate d'Euporium

Le cryptate d'euporium obtenu ci-dessus (40 mg) est ajouté par portion à 40 ml d'éthylène diamine préalablement distillé sur KOH. La solution limpide est agitée 3 heures sous azote à température ambiante. L'éthylène diamine est éliminée sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans quelques millilitres de CH_2Cl_2 / MeOH (2/1) et les solvants sont éliminés sous vide. L'opération est répétée 5 fois pour obtenir un composé parfaitement solide. Le cryptate obtenu est séché 24 heures sous

Le vide d'une pompe à palette.

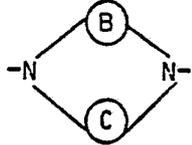
Fusion = 168-170°C

Ce cryptate d'euporium présente les mêmes caractéristiques que le cryptate d'euporium obtenu à l'exemple précédent. Ces deux exemples montrent donc que l'on peut effectuer la complexation du cryptate de l'ion alcalin par un ion de terre rare avant ou après la substitution.

EXEMPLE 5 - Préparation du cryptate d'euporium ou de terbium de

[(22) bpy di(amidoéthylénamine)]

10

Composé de formule I =  est le macrocycle

(22) ; Z = NH₂ ; Y = -CH₂-CH₂-

A - Préparation du cryptate de sodium de [(22) bpy diester]

15

Un mélange de 0,114 g ($4,37 \cdot 10^{-4}$ mole) du macrocycle (22) et de 0,460 g ($4,34 \cdot 10^{-3}$ mole) de Na₂CO₃ est chauffé 30 min. au reflux dans 130 ml de CH₃CN. Une solution de 0,200 g ($4,37 \cdot 10^{-4}$ mole) du composé 1 dans 220 ml de CH₃CN est ensuite ajoutée, sous forte agitation, en 60 min. Le mélange réactionnel est encore agité 15 heures au reflux puis refroidi à température ambiante et filtré. Le solvant est éliminé sous vide à l'évaporateur rotatif. Le solide obtenu est dissous dans du CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie sur colonne (d'alumine avec un peu de silice à son sommet). Une impureté est d'abord éluee au CH₂Cl₂. Le macrobicycle formé est ensuite élué par CH₂Cl₂/CH₃OH (98/2). Les solvants sont éliminés sous vide et 0,135 g (61 %) du macrobicycle sont obtenus.

20

25

B - Préparation du cryptate d'euporium ou de terbium du [(22) bpy diester]

30

En procédant selon le mode opératoire décrit à l'exemple 1H, on a obtenu respectivement les cryptates d'euporium et de terbium de [(22) bpy diester], lesquels présentent les caractéristiques spectroscopiques ci-après :

- cryptate d'euporium : UV/visible dans CH₃OH

242 nm et 324 nm (maxima)

35

- cryptate de terbium : UV/visible dans CH₃OH

242 nm et 325 nm (maxima)

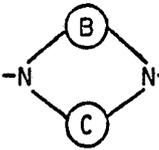
C - Préparation du cryptate d'europium du [(22) bpy di(amidoéthylèneamine)]

Le cryptate d'europium obtenu ci-dessus (0,100 g, $1,43 \cdot 10^{-4}$ mole) est ajouté par portion à 5 ml d'éthylène diamine, distillée sur KOH, préalablement chauffée à 90°C. Le mélange réactionnel est encore agité 1 heure, puis refroidi à température ambiante. L'éthylène diamine en excès est éliminée sous vide. Une huile est obtenue. Cette dernière est reprise dans 2 ml de CHCl_3 qui est à son tour éliminé sous vide. La purification est répétée 3 fois et 93 mg (90 %) du cryptate d'europium sont obtenus. Ce cryptate présente les caractéristiques spectroscopiques ci-après : UV/visible dans H_2O .

240 et 315 nm (maxima)

De la même façon, on peut soumettre à aminolyse le cryptate de terbium obtenu au point B.

EXEMPLE 6 - Préparation du cryptate de sodium de [(bpy dicarbométhoxy)₃] (Procédé B)

Formule 7 $\text{R}' = \text{R}'' = \text{OCH}_3$;  est le macrocycle bis-

bipyridine

A - Synthèse du dicarbométhoxy-4,4' diazidométhyl-6,6' bipyridine 2,2'

Un mélange de dicarbométhoxy-4,4' dibromométhyl-6,6' bipyridine-2,2' (0,50 g, $1,10 \cdot 10^{-3}$ mole) et de NaN_3 (1,0 g, $15,4 \cdot 10^{-3}$ mole) est chauffé à reflux pendant 36 heures dans 15 ml de THF. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante filtré sur célite et concentré à sec. Le résidu est dissous dans du CHCl_3 et chromatographié sur colonne de silice par élution avec du CHCl_3 .

L'évaporation du solvant conduit à 0,40 g (95 %) du composé attendu qui présente les caractéristiques physico-chimiques ci-après :

F = 168-170°C

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) : 4,02 (s, 6H, COOCH_3) ; 4,63 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-H}_3$) ; 7,94 (d, $J = 1,3$ Hz, 2H) ; 8,96 (d, $J = 1,3$ Hz, 2H) ;

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) : 52,7, 55,1 ; 120,0 ; 121,5 ; 139,7 ; 156,0, 156,8 ; 165,3 ;

05 IR (KBr) : 1715 cm^{-1} (ester), 2090 cm^{-1} (azide)

MS 383 ($(\text{MH})^+$)

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_8\text{O}_4$ (382,34)

% calculé : C 50,27 ; H 3,69 ; N 29,31

% trouvé : C 50,37 ; H 3,51 ; N 27,69.

10 B - Synthèse du dicarbométhoxy-4,4' diaminométhyl-6,6' bipyridine 2,2' (composé 5)

Un mélange du composé obtenu selon A (0,126 g, $3,30 \cdot 10^{-4}$ mole) et de 12,6 mg de 10 % de Pd/C dans 38 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1) est agité à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène pendant 12 heures.

Le mélange réactionnel est filtré sur célite et l'évaporation des solvants conduit à 0,100 g (92 %) du composé attendu qui est utilisé sans purification dans l'étape ci-après.

20 C - Synthèse du cryptate de sodium du [bpy-dicarbométhoxy] $_3$ (composé 7)

Un mélange de 6 ($\text{R}' = \text{OCH}_3$; $\text{X} = \text{Br}$) (0,280 g, $6,11 \cdot 10^{-4}$ mole) et de Na_2CO_3 (0,65 g, $6,13 \cdot 10^{-3}$ mole) est chauffé à reflux dans 500 ml de CH_3CN . Puis, 0,100 g ($3,03 \cdot 10^{-4}$ mole) de 5 sont ajoutés et le mélange réactionnel est encore agité à reflux

25 pendant 48 heures. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et filtré. Le solvant est éliminé sous vide. Le résidu est repris dans CHCl_3 et chromatographié sur colonne d'alumine (avec un peu de silice au sommet) en éluant avec $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98/2). L'évaporation des solvants conduit à 0,132 g (40 %) du macrobicyclic 7 ($\text{R}'' = \text{R}' = \text{OCH}_3$).

30 F. > 250°C

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) : 4,02 (s, 18H, COOCH_3) ; 4,08 (s, 12H, CH_2) ; 7,96 (d, $J = 1,2$ Hz, 6H) ; 8,49 (d, $J = 1,2$ Hz, 6H) ;

35 $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3) : 53,2 ; 59,2 ; 120,0 ; 123,8 ; 139,9 ; 155,6 ; 159,9 ; 164,8.

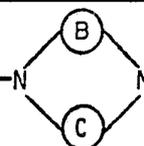
$C_{48}H_{42}N_8O_{12}$, NaBr, $3H_2O$ (1079,84)

% calculé : C 53,39 ; H 4,48 ; N 10,38

% trouvé : C 53,40 ; H 4,40 ; N 9,75.

05 Le cryptate obtenu ci-dessus peut être soumis à une aminolyse avec de l'éthylène diamine selon le mode opératoire décrit dans les exemples précédents. On obtient généralement un mélange de cryptates mono-, di- à hexa-substitués par le groupe $CO-NH-CH_2-CH_2-NH_2$; Ces composés peuvent être séparés par des moyens classiques.

10 EXEMPLE 7 : Préparation du cryptate d'euporium du [bis(bpy dicarboxybutoxy), bpy-diamidoéthylène amine]

Formule I = Y = $-CH_2-CH_2-$; Z = NH_2 ;  est le macrocycle

15 bis-bipyridine ; R' = t-Bu (tertiobutyle ou Bu^t)

A - Préparation du cryptate de sodium du [bis(bpy dicarboxybutoxy), bpy dicarboxyméthoxy]

En opérant selon le mode opératoire décrit à l'exemple 6 et en utilisant le composé 5 obtenu au point B de cet exemple et le composé 6 (R' = $COO(t-C_4H_9)$; X = Br), on a obtenu le cryptate de sodium de formule 7 (R' = $COO(t-C_4H_9)$; R'' = $COOCH_3$) qui présente les caractéristiques physico-chimiques ci-après :

F. > $220^\circ C$

1H-RMN ($CDCl_3$) : 1,60 (s, 36H, $COOBu^t$) ; 3,99 ; 4,02 ; 4,06 ; (3s, 18H, CH_2 -bpy di $COO Me$ + CH_2 -bpy di $COO Bu^t$, + $-COOCH_3$) ; 7,81 (s, 4H, bpy di $COO Bu^t$) ; 7,95 (s, 2H, bpy di $COO Me$) ; 8,36 (s, 4H, bpy di $COO Bu^t$) ; 8,45 (s, 2H, bpy di $COO Me$)

^{13}C -RMN ($CDCl_3$) : 28,0 ; 53,1 ; 59,1 ; 83,4 ; 119,8 ; 119,9 ; 123,4 ; 123,7 ; 139,8 ; 141,7 ;

30 $C_{60}H_{66}N_8O_{12}$, NaBr, $3H_2O$ (1248,18)

% calculé : C 57,73 ; H 5,81 ; N 8,98

% trouvé : C 57,99 ; H 5,31 ; N 9,03.

Ce cryptate de sodium a été ensuite transformé en le cryptate d'euporium correspondant selon le mode opératoire décrit précédemment.

35

Celui-ci a été ensuite soumis à aminolyse avec de l'éthylènediamine.

05 Selon une variante, on peut d'abord soumettre à aminolyse le composé 7 ci-dessus puis transformer le cryptate de sodium obtenu en le cryptate d'euporium correspondant en suivant les modes opératoires décrits précédemment.

APPLICATION DES COMPOSES A TITRE DE MARQUEURS FLUORESCENTS

10 Comme indiqué précédemment, les composés de l'invention conviennent comme agents pour le marquage de substances biologiques qui est réalisé par couplage du composé de l'invention par liaison covalente avec la substance biologique à doser ou à détecter. Ce couplage peut être réalisé selon les procédés classiques de couplage utilisés dans ce domaine, tels que par exemple les procédés au SMCC/SPDP ou au carbodiimide (voir l'ouvrage Laboratory
15 Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Practise and Theory on Enzym- and Immunoassays P. TIJSEN, Elsevier 1 ed. 1985).

Les cryptates selon l'invention conviennent comme marqueurs fluorescents dans tous les types de procédés de détermination ou de détection de substances biologiques et
20 notamment dans les méthodes de dosage dites par compétition ou par excès, en phase homogène ou en phase hétérogène, bien connus de l'homme de l'art et décrits notamment par LANDON, Ann. Clin. Biochem. 1981, 18, p. 253 et SOINI Clin. Chemi. 25, 353, 1979. Ils peuvent être également utilisés dans le procédé homogène de
25 détection et/ou de détermination par luminescence décrit dans la demande internationale WO 87/00927.

Les substances biologiques à détecter ou à déterminer peuvent être par exemple les anticorps, les antigènes, les toxines, les enzymes, les protéines, les hormones, les récepteurs
30 d'hormones, les stéroïdes, l'avidine, la biotine, la streptavidine, les microorganismes, les haptènes, les acides nucléiques, les fragments d'ADN et d'ARN, les lipides, les glucides, etc. Des exemples de telles substances sont cités dans la description de la demande de brevet EP 17 908 incorporée dans la
35 présente description à titre de référence.

L'utilisation des composés de l'invention comme marqueurs

fluorescents est illustrée par les cinq essais ci-après :

Dans les essais A, D et E ci-après, on a utilisé les réactifs SPDP, et sulfo-SMCC qui sont respectivement : "N-succinimidyl 3-(2-pyridylthio) propionate" et "sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimido méthyl) cyclohexane-1-carboxylate".

ESSAI A : formation d'un conjugué anticorps-cryptate par SMCC/SPDP

1) Activation du cryptate d'euporium obtenu selon l'exemple 3

A 500 μ l d'une solution de ce cryptate à 1,5 mg/ml dans un tampon phosphate 20 mM pH 7, on ajoute 50 μ l de sulfo SMCC 13,1 mg/ml dans le même tampon.

On incube ensuite pendant 30 min. à température ambiante et on agite au vortex pendant 5 min. On centrifuge la solution pour éliminer le précipité. On purifie par passage sur une colonne échangeuse d'ions Pharmacia Mono Q en formant un gradient entre :

Tampon A : phosphate 20 mM pH 7 + 10 % DMF

Tampon B : phosphate 20 mM pH 7 + 10 % DMF + 1 molaire NaCl

Le cryptate est détecté par mesure de son absorption à 307 nm ($\mathcal{E} = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 307 nm).

- le cryptate activé sort dans le volume mort
- l'excès de sulfo SMCC est élué dans le gradient.

2) Activation de l'anticorps

L'anticorps monoclonal E_1 utilisé est l'anticorps anti-prolactine contenu dans les trousse pour les dosages immunoradiométriques de la prolactine fabriquées par la compagnie ORIS INDUSTRIE et connues sous la dénomination "ELSA PROL".

A 1,2 ml d'une solution d'anticorps E_1 à 14,8 mg/ml dans un tampon phosphate 50 mM, 150 mM NaCl pH 7,1, on ajoute 30 μ l d'une solution de SPDP 30 mM dans l'éthanol absolu.

On incube 30 min à température ambiante en agitant.

La solution est passée sur une colonne de gel G25 pharmacia équilibrée avec le même tampon phosphate ($\mathcal{E} = 210\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 280 nm).

On récupère la fraction éluée dans le volume mort.

On ajoute 60 μ l d'une solution à 400 mM de DTT (dithiothréitol) dans le tampon phosphate.

On incube 15 min à température ambiante sous agitation et on récupère la fraction sortant dans le volume mort après passage sur une colonne G25 équilibrée dans le tampon phosphate.

3) Couplage entre l'anticorps activé et le cryptate activé

05 A 60 μ l d'anticorps activé à 2,6 mg/ml dans un tampon phosphate, on ajoute 50 μ l de cryptate à 200 μ mole/l.

On incube 12 heures à température ambiante et on centrifuge. Le surnageant est dialysé contre un tampon phosphate 50mM pH 7,4.

10 ESSAI B : Formation d'un conjugué anticorps-cryptate par carbodiimide

1) Succinilation de l'anticorps

On ajoute en trois fois 83 μ l d'une solution à 50 mg/ml d'anhydride succinique dans 1/3 DMSO 2/3 borate 100 mM pH 9 à 15 440 μ l d'anticorps E₁ à 9,4 mg/ml dans du borate 100 mM pH 9 plongée dans la glace fondante.

Le pH est maintenu à 9 par la soude. On laisse réagir 30 min à 0°C.

2) Purification

20 Elle est réalisée par chromatographie haute pression sur colonne de gel filtration TSK 3000 SW, l'éluant étant un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Débit 1 ml/min.

On récupère l'anticorps succinilé sur 3 ml. On concentre pour obtenir 370 μ l.

25 3) Couplage anticorps succinilé/cryptate

Solution 1 : on mélange 25,5 mg de carbodiimide dans 1335 μ l de tampon phosphate 50 mM pH 7,4

Solution 2 : 50 mg/ml de sulfo N-hydroxy succinimide dans le même tampon (14,7 mg dans 222,7 μ l)

30 Solution 3 : 0,96 mg/ml de cryptate selon l'exemple 3 dans le même tampon.

On fait réagir 1 heure à température ambiante :

- 175 μ l de solution d'anticorps succinilé

- 480 μ l solution 3

35 - 72,5 μ l solution 1

- 10 μ l solution 2

Après dialyse exhaustive contre tampon phosphate 50 mM pH 7,4, le produit est concentré sur cône Amicon. On obtient un conjugué à 0,86 mg/ml.

05 Le produit est congelé dans le tampon avec 1 mg/ml de serum albumine humaine (HSA).

RESULTATS : DOSAGE DE LA PROLACTINE

On utilise les réactifs de la trousse de dosage de prolactine ELSA-PROL.

10 Dans chaque tube contenant la phase solide ELSA, on ajoute :

- 100 µl de standard

- 300 µl de conjugué E₁-cryptate obtenu selon les essais A ou B en tampon phosphate 50 mM pH 7,4 et HSA 1 mg/ml.

On incube 3 heures à 37°C.

15 On lave la phase solide avec 2 fois 3 ml d'H₂O.

On ajoute 400 µl de tampon contenant 5 mMolaire en sodium dodecyl sulfate (SDS).

On transfère 300 µl de cette solution pour la mesure de la fluorescence sur un appareil ARCUS LKB.

20 Les résultats obtenus sont portés sur la figure 1 annexée. Sur cette figure, on a porté en ordonnées l'intensité de la fluorescence et en abscisses, la quantité de prolactine en µU/ml.

25 Ces résultats montrent que les cryptates selon l'invention conviennent comme marqueurs fluorescents dans un dosage immunologique.

Dans l'essai C ci-après, on illustre l'utilisation des cryptates selon l'invention dans le procédé homogène selon la demande internationale WO 87/00927.

ESSAI C : Dosage de la prolactine

30 I - Dosage homogène de la prolactine

A - Fixation d'iode sur l'anticorps

On marque l'anticorps monoclonal anti-prolactine G₂ avec le réactif de Wood [décrit dans synthèse Anal. Biochem. 69, 339-349 (1975)].

35 2,93 mg du réactif de Wood sont dissous dans 40 µl de soude 0,5 N.

On ajoute 400 μ l de tampon carbonate 200 mM, pH 9,3.

On ajoute à cette solution 200 μ l d'anticorps G₂ à 10 mg/ml dans un tampon carbonate 100 mM, pH 9,3 et on incube pendant 17 heures à 30°C.

05 On purifie sur une colonne Pharmacia PD10 avec un tampon carbonate 100 mM, pH 9,3.

Les fractions éluées dans le volume mort sont recueillies ; Le conjugué est caractérisé par un rapport de densité optique à 320 et 280 nm

10

$$\frac{Do_{320}}{Do_{280}} \approx 1,4 \text{ à } 1,5$$

Sa concentration est estimée en admettant que 90 % des anticorps sont récupérés. Le conjugué est aliquoté et conservé à - 20°C.

B - Dosage de la prolactine (courbe A)

15 On utilise des standards prolactine à 0,15, 30, 60 et 150 ng/ml. Le dosage s'effectue dans des barettes de 12 puits EFLAB. n° catalogue 96 02 107.

On ajoute successivement :

- 100 μ l de standard
- 20 - 100 μ l d'anticorps G₂ Wood à 5 μ g/ml
- 100 μ l de conjugué E₁ de l'essai A à 0,375 μ g/ml ;
- on incube 15 minutes à température ambiante,
- on effectue la lecture sur l'appareil ARCUS,
- on trace une courbe standard en portant la valeur ΔF en
- 25 fonction de la valeur des standards (figure 2) avec $\Delta F =$

$$\frac{\text{Fluorescence du standard mesuré} - \text{Fluorescence du standard 0}}{\text{Fluorescence du standard 0}}$$

I - Dosage de la prolactine par radioimmunométrie (courbe B)

On utilise la trousse ELSA-PRL (Compagnie ORIS).

- 30 - dans le tube ELSA, on ajoute :
 - 300 μ l du traceur radioactif,
 - 100 μ l de standard,
- après agitation, on incube 3 heures à 37°C,
- les tubes sont lavés 2 fois à l'eau,
- 35 - les tubes sont comptés sur un compteur ,

- on porte la valeur B/T pour chaque standard (figure 2) avec

B = radioactivité comptée sur le standard

T = radioactivité comptée pour 300 μ l du traceur radioactif.

05 Les résultats obtenus (voir figure 2) montrent que les
cryptates selon l'invention conviennent comme marqueurs dans le
procédé homogène selon la demande internationale WO 87/00927.
D'autre part, on peut noter que grâce aux cryptates selon
l'invention, ce procédé homogène est particulièrement avantageux
par rapport au procédé de dosage utilisant un élément radioactif,
10 lequel nécessite un temps d'incubation beaucoup plus long, des
étapes de lavage et la manipulation d'éléments radioactifs.

ESSAI D - Formation d'un conjugué ADN-cryptate par SMCC/SPDP

1/ Fonctionnalisation de l'ADN en ADN-NH₂

15 Un nucléotide modifié, le 5-amino(12)dUTP (produit
commercialisé par CALBIOCHEM) est introduit dans un ADN donné par
nick translation selon le mode opératoire préconisé par CALBIOCHEM.
L'ADN aminé est ensuite purifié par trois lavages successifs sur un
filtre "Centricon" (commercialisé par AMICON) avec du tampon
phosphate 10mM pH 7,4.

20 2/ Couplage de l'ADN-NH₂ avec du SPDP

55 μ l d'une solution contenant 9 μ g d'ADN-NH₂ (mesuré par
UV) dans du tampon borate 0.1 M pH 9,0 sont ajoutés à 5 μ l d'une
solution de SPDP 20 mM. La réaction dure 4 heures à 45°C. Le SPDP
n'ayant pas réagi est éliminé par trois lavages sur "Centricon"
25 avec un tampon phosphate 50 mM pH 7,0.

3/ Déprotection de l'ADN-SPDP et couplage au cryptate

90 μ l d'une solution de 6 μ g (estimé par densité optique)
d'ADN-SPDP dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,0 sont traités juste
avant couplage par 10 μ l d'une solution 10 mM de DTT dans le même
30 tampon. La déprotection dure 20 minutes à température ambiante. Le
DTT inhibiteur du couplage suivant est éliminé par trois lavages
sur "Centricon" avec le tampon phosphate précédent. La solution
d'ADN-SH est concentrée sur "Centricon" jusqu'à un volume final de 90
 μ l.

35 90 μ l d'une solution d'ADN-SH sont mis en présence de 50

μ l du cryptate d'euporium de l'exemple 3 activé au SMCC selon le point 1 de l'essai A (14 mM) dans du tampon phosphate 20 mM pH 7,0 contenant 10 % de DMF. Le couplage se fait à 30°C pendant 1 heure. Le conjugué ADN-cryptate est purifié par trois précipitations successives à l'éthanol. Le taux de couplage est évalué par mesure de l'absorption à 260 nm et de la fluorescence à 620 nm.

4/ Une sonde ADN ainsi couplée à un cryptate peut être utilisée pour la détection et le dosage d'une séquence d'acide nucléique complémentaire selon une des stratégies décrites dans la revue de J. MATTHEWS et al. dans *Analytical Biochemistry* 169, 1-25(1988) intitulée "Analytical strategies for the use of DNA probes".

ESSAI E - Formation d'un conjugué covalent streptavidine-cryptate

1/ Couplage streptavidine - SPDP

20 μ l d'une solution 20 mM de SPDP dans un tampon carbonate 0,5 M pH 9,5 sont ajoutés à 180 μ l d'une solution contenant 1 mg de streptavidine dans le même tampon.

La réaction dure une heure à température ambiante. Le SPDP en excès est éliminé par quatre lavages successifs sur "Centricon" avec du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

2/ Déprotection de la streptavidine-SPDP et couplage au cryptate

A 360 μ l d'une solution de streptavidine - SPDP (\approx 1 mg) dans du phosphate 0,1 M pH 7,4 on rajoute 40 μ l de DTT 100 mM dans le même tampon.

La réaction dure 15 minutes à température ambiante sous agitation puis le mélange réactionnel est lavé trois fois sur "Centricon" avec le tampon précédent.

La streptavidine-SH (\approx 1 mg) dans 625 μ l de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 est couplée à 43 μ g du cryptate d'euporium de l'exemple 3 activé au SMCC selon le point 1 de l'essai A dans 175 μ l de tampon phosphate 20 mM pH 7 avec 10 % de DMF. Le couplage dure 2 h 30 à température ambiante. Le cryptate-SMCC n'ayant pas réagi est éliminé par quatre lavages sur "Centricon" avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

Le taux de couplage est estimé par mesure de l'absorption à 280 nm et de la fluorescence à 620 nm.

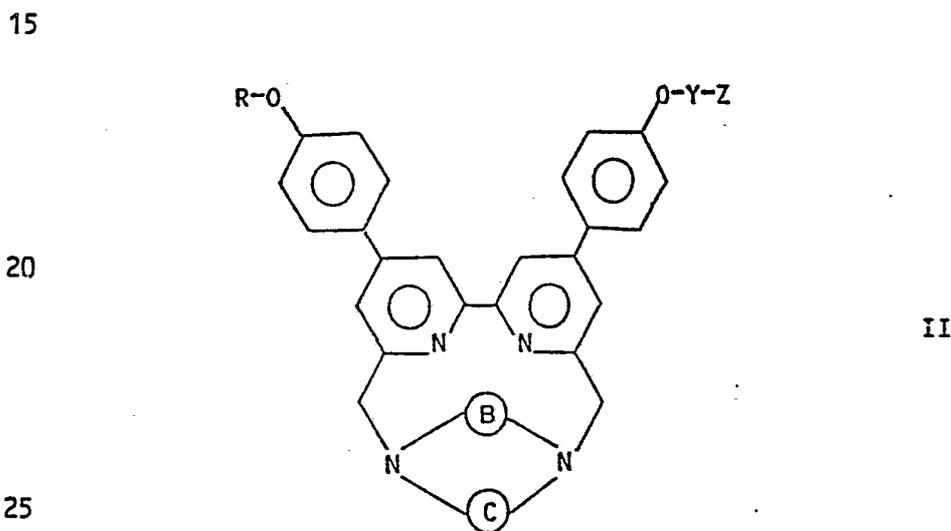
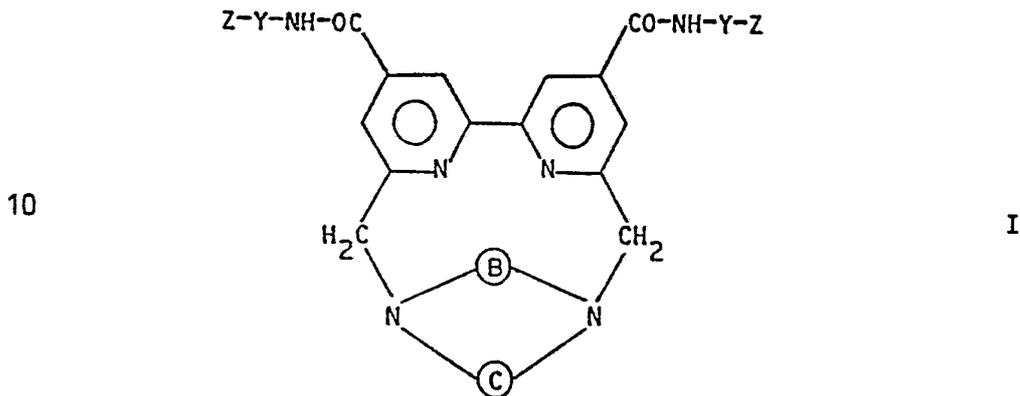
Le conjugué obtenu est purifié par gelfiltration sur

colonne TSKG3000 SW avec un tampon NaCl 1 M, TFA 0,1 %. La détection se fait par mesure de l'absorption à 280 nm et de la fluorescence à 620 nm.

05 3/ un tel conjugué streptavidine-cryptate peut être utilisé comme marqueur fluorescent de molécules biotinylées (acides nucléiques, oligonucléotides, anticorps, antigènes, haptènes ou autres substances biologiques) reconnaissant elles-mêmes des biomolécules pour lesquelles elles ont une grande affinité dans un mélange selon un procédé de dosage ou de détection classique.

REVENDICATIONS

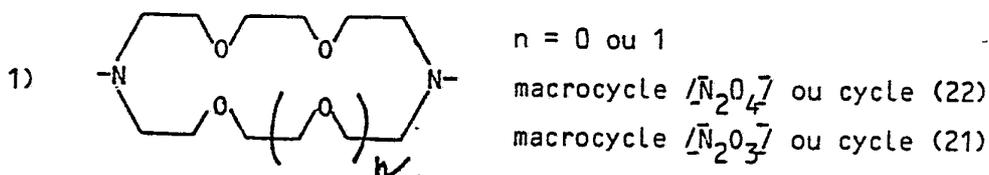
1. Cryptates de terres rares, caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules I ou II ci-après :

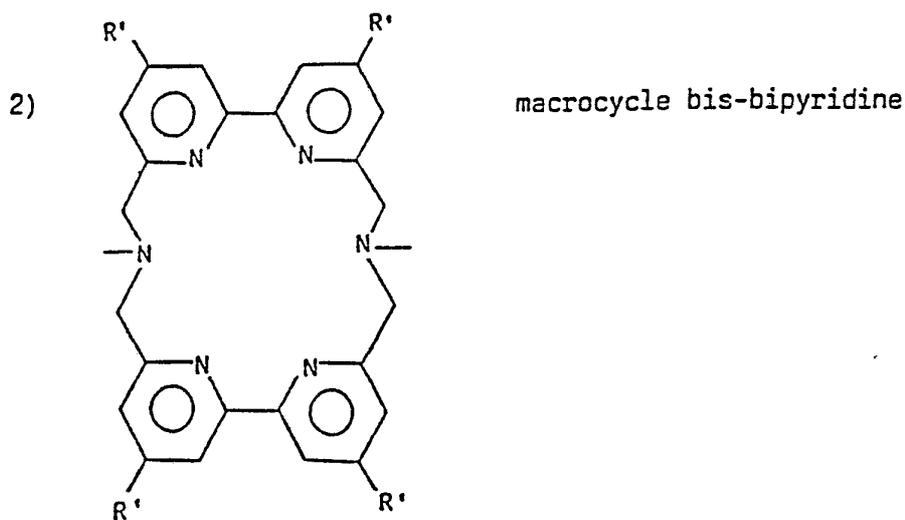


dans lesquels :

- le cycle de formule $-N \begin{matrix} \text{B} \\ \text{C} \end{matrix} N-$ est l'un des cycles suivants :

30





05

10

- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 à C_{20} , contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore, parmi les groupes cycloalkylène en C_5 à C_8 ou parmi les groupes arylène en C_6 à C_{14} , lesdits groupes alkylène cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate;

20

- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

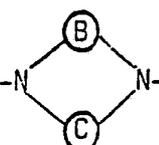
25

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C_1 à C_{10} et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertiobutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

2. Cryptates selon la revendication 1 répondant à la formule I, caractérisés en ce que Y est $-CH_2-CH_2-$ et Z est $-NH_2-$

3. Cryptates selon l'une des revendications 1 ou 2,

30

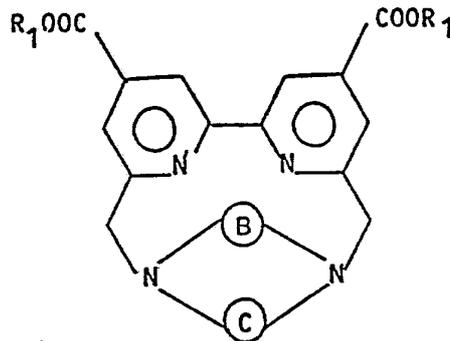
caractérisés en ce que  est le macrocycle bis-bipyridine

4. Cryptates selon la revendication 1, répondant à la formule II, caractérisés en ce que Y est $-CH_2-$, Z est CN et R est le groupe méthyle.

35

5. Cryptates selon la revendication 1, répondant à la formule II, caractérisés en ce que Y est $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, Z est NH et R est le groupe méthyle.

6. Procédé pour l'obtention des cryptates de formule I selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre le composé de formule :



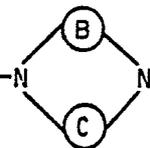
15

3

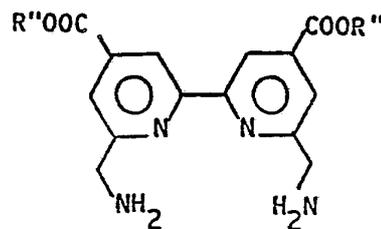
dans laquelle R_1 est un groupe alkylène en C_1-C_{10} , à une aminolyse par réaction avec l'amine de formule $\text{NH}_2-\text{Y}-\text{Z}$ dans laquelle Y et Z sont tels que définis dans la revendication 1, la réaction étant effectuée sous atmosphère d'azote à la température ambiante, et à transformer le composé obtenu en un cryptate de terre rare par échange d'ions.

7. Procédé selon la revendication 6, pour l'obtention des

composés de formule I dans laquelle $-\text{N} \begin{array}{c} \text{B} \\ \text{C} \end{array} \text{N}-$ est le macrocycle



bis-bipyridine, caractérisé en ce que le composé de formule 3 est obtenu par réaction d'une molécule de



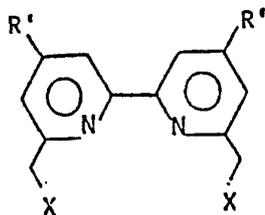
5.

dans laquelle R'' est tel que défini dans la revendication 1 avec deux molécules du composé de formule

35

37

05

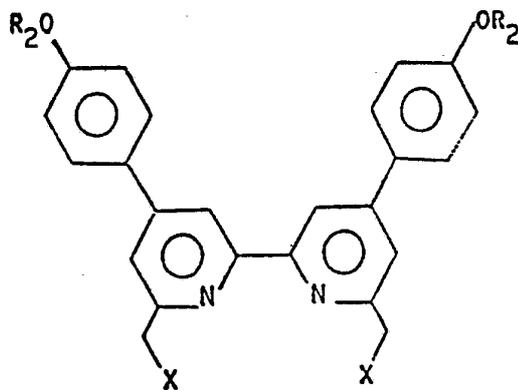
6

10

dans laquelle R' est tel que défini dans la revendication 1 et X est un ion halogénure, la réaction étant réalisée dans un solvant organique anhydre à la température de reflux du solvant.

8. Procédé pour l'obtention des cryptates de formule II, selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir en solution dans un solvant organique anhydre et à la température de reflux dudit solvant, le composé halogéné 9

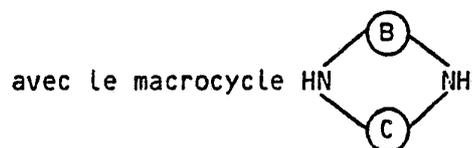
15



20

R₂ = H ou CH₃9

25

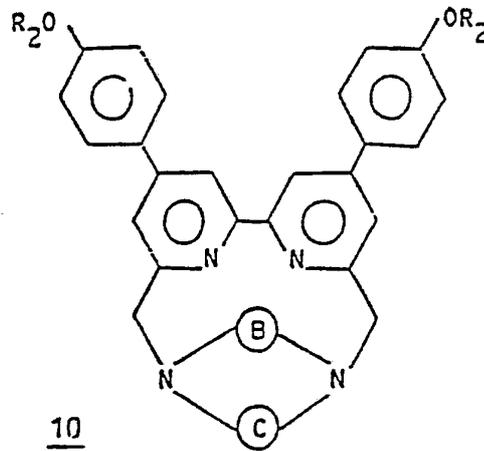


pour former le complexe macropolycyclique 10

38

05

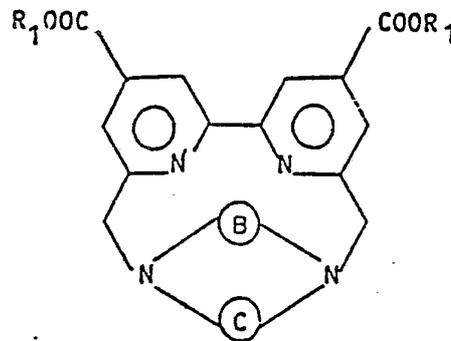
10



qui est ensuite traité avec le composé halogéné de formule XYZ, dans laquelle Y et Z sont tels que définis dans la revendication 1 et X est un ion halogénure.

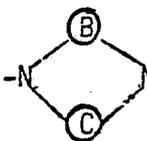
15 9. A titre d'intermédiaires de synthèse, les complexes macropolycycliques de formule

20



25

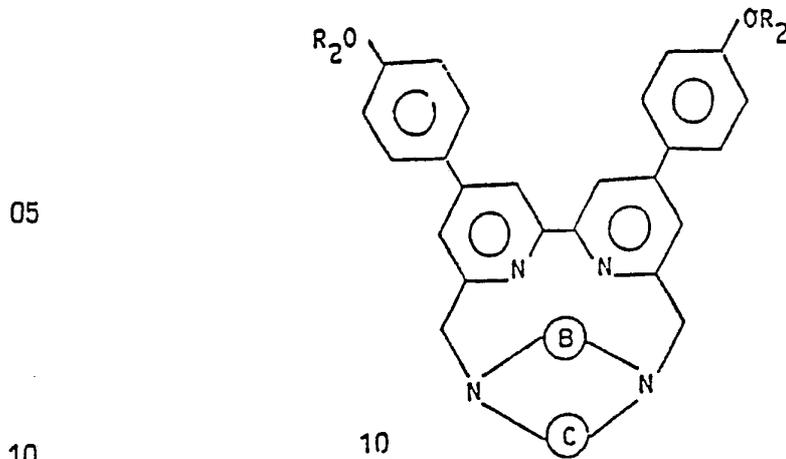
dans laquelle R₁ et -N- sont respectivement tels que définis

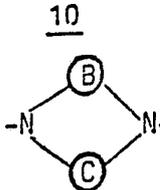


dans les revendications 1 et 6.

30 10. A titre d'intermédiaires de synthèse, les composés de formule :

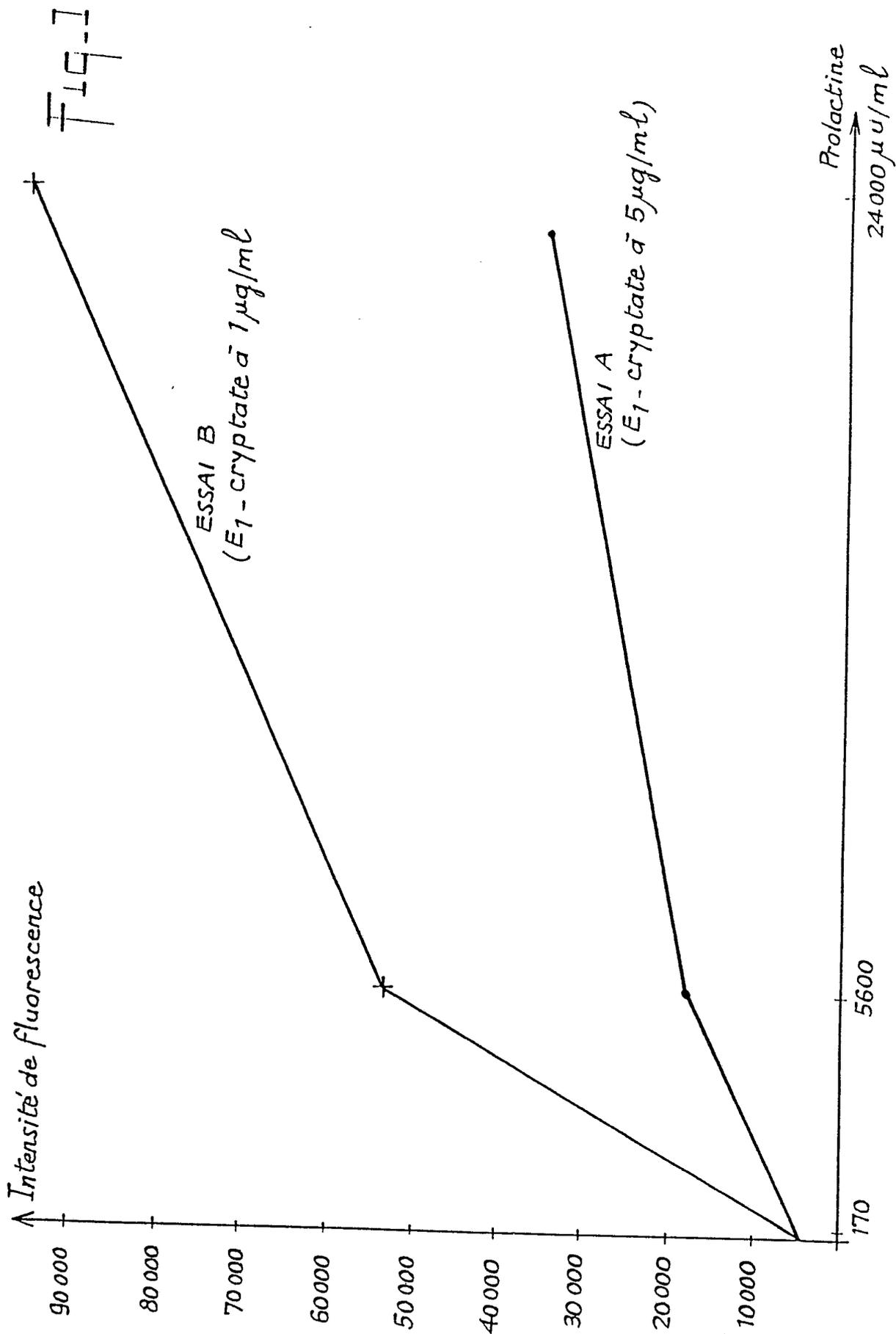
35



dans laquelle  est tel que défini dans la revendication

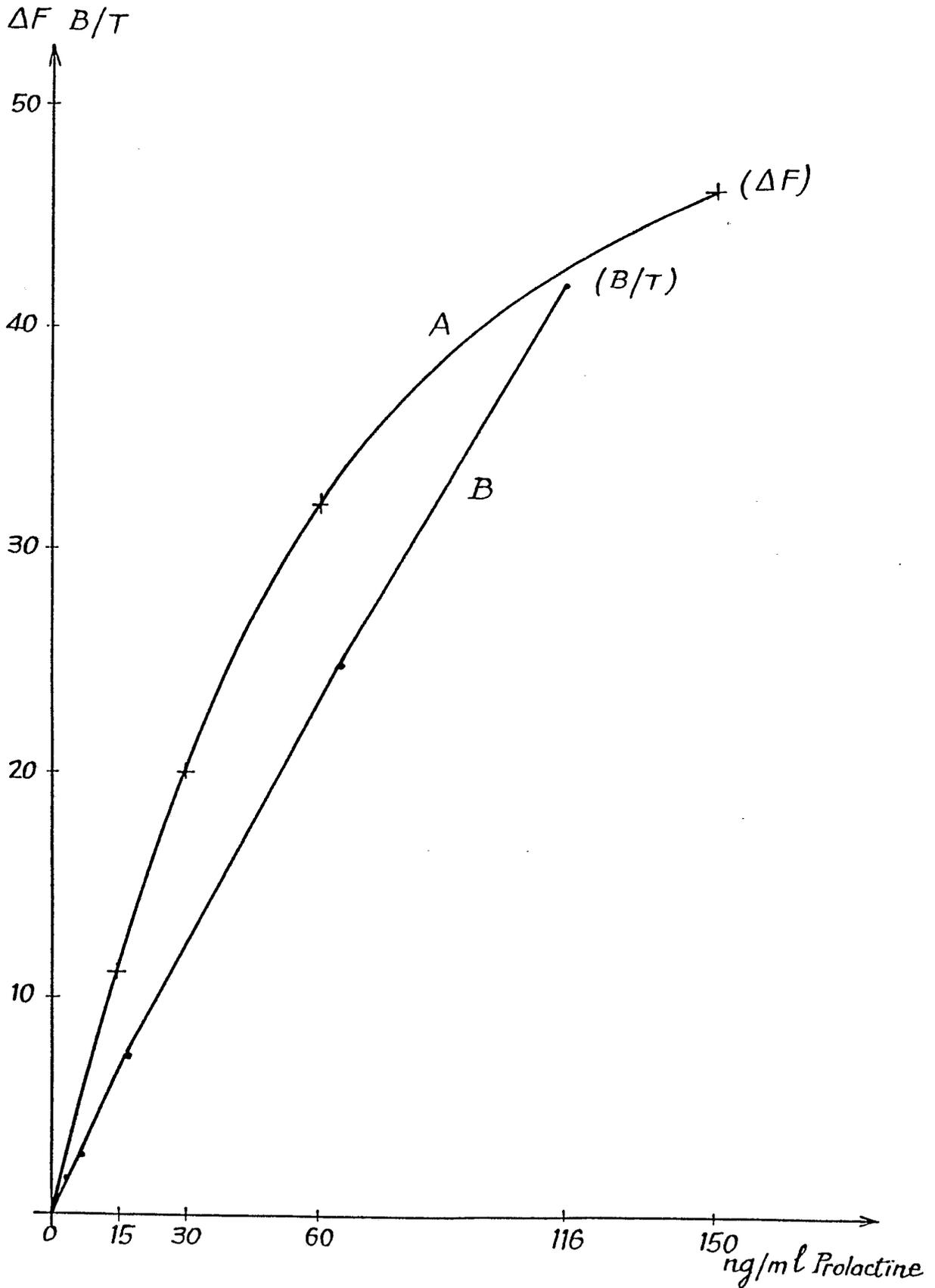
1 et R_2 est H ou CH_3 .

- 15 11. Intermédiaires selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisés en ce qu'ils sont sous la forme de cryptants libres.
12. Intermédiaires selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisés en ce qu'ils sont sous la forme de cryptates d'ion alcalin ou de cryptate de terre rare.
- 20 13. Application des cryptates selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, à titre de marqueurs fluorescents.
14. Application des cryptates selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, à titre de marqueurs fluorescents dans les procédés de détection et/ou de détermination de substances
- 25 biologiques et notamment dans les procédés homogènes par luminescence.



2/2

Fig-2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00620

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁴ C 07 D 498/22; C 471/22; G 01 N 33/533// (C 07 D 498/22, 273:00, 273:00, 221:00, 221:00) (C 07 D 471/22, 259:00, ./.)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	C 07 D 498/00; C 07 D 471/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0180492 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 7 May 1986, see claim 1 & FR, A, 2570703 cited in the application -----	1,13
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
20 March 1989 (20.03.89)	10 April 1989 (10.04.89)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00620

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ⁴ 259:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl ⁴		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 8800620

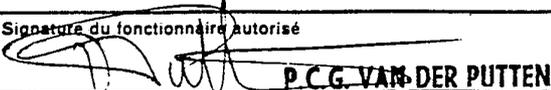
SA 26106

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/04/89
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0180492	07-05-86	FR-A,B 2570703	28-03-86
		JP-A- 61087680	06-05-86

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00620

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB ⁴ C 07 D 498/22; C 471/22; G 01 N 33/533// (C 07 D 498/22, CIB ⁴ : 273:00, 273:00, 221:00, 221:00) (C 07 D 471/22, 259:00, ./.		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 07 D 498/00; C 07 D 471/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	EP, A, 0180492 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 7 mai 1986, voir revendication 1 & FR, A, 2570703 (cité dans la demande) -----	1, 13
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« 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)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« 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.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 mars 1989	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 10 APR 1989	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé  P.C.G. VAN DER PUTTEN	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00620 -2-

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : 259:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00, 221:00)		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
<p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« 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)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à 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</p> <p>« X » document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« 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.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 8800620
SA 26106

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 05/04/89

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0180492	07-05-86	FR-A, B 2570703	28-03-86
		JP-A- 61087680	06-05-86
