

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 890 657

②① N° d'enregistrement national : **05 09444**

⑤① Int Cl⁸ : C 07 F 5/00 (2006.01)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 15.09.05.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement public à caractère industriel et commercial — FR.

⑦② Inventeur(s) : MAZZANTI MARINELLA.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 16.03.07 Bulletin 07/11.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BUREAU DUTHOIT LEGROS ET ASSOCIES.

⑤④ PROCÉDE D'OBTENTION DE COMPLEXES DE LANTHANIDES HAUTEMENT LUMINESCENTS.

⑤⑦ La présente invention concerne un Complexe de coordination d'un métal de transition de formule générale (I):

$\{[M(L)]X(H_2O)_n\}_p$ dans laquelle:

-M représente un élément appartenant au groupe des lanthanides,

-L représente un ligand chromophore décadentate

-X représente un contre-ion,

-n représente le nombre de molécules d'eau d'hydratation,

-p correspond aux nombre de monomères,

-H₂O représente les molécules d'eau d'hydratation.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un ligand par réaction entre l'ester éthylique de la 6-chlorométhylpyridine-2-carboxylate et l'éthylènediamine en milieu organique, ainsi qu'un procédé de préparation d'un complexe de coordination par réaction entre un chlorure d'un lanthanide et un ligand en milieu aqueux.

La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un tel complexe dans le domaine médical, comme marqueurs pour l'imagerie à luminescence, dans le développement des sondes luminescentes pour l'imagerie médicale et bioessais et dans le développement de nouveaux matériaux pour les nanotechnologies.

FR 2 890 657 - A1



La présente invention concerne de nouveaux complexes de coordination d'un métal de transition, notamment des lanthanides, et leurs applications dans le domaine médical.

Les propriétés électroniques uniques des ions lanthanides, telles que leur luminescence à vie longue et leur spectre d'émission bien définis, font de ces composés un outil idéal pour leur utilisation dans le domaine médical.

En effet, l'utilisation des complexes de lanthanides, permet de distinguer la fluorescence considérée comme bruit de fond et le signal visé. Ainsi lesdits complexes sont souvent utilisés, dans la conception de détecteurs, comme sondes spectroscopiques et luminescentes pour résoudre des problèmes structuraux et analytiques et en tant que systèmes imageurs à fluorescence .

Selon les règles émises par l' "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC), on entend par lanthanide la série des éléments chimiques allant du Cérium (Z=58) au Lutécium (Z=71). En Incluant le Lanthane (Z=57), ces éléments sont appelés lanthanoïdes. Le terme « terres rares » s'applique aux lanthanoïdes plus le Scandium (Z=21) et l'Yttrium (Z=39), ces derniers ayant des propriétés chimiques semblables. Dans la pratique, les appellations lanthanides, lanthanoïdes et terres rares sont utilisées pour décrire ces éléments.

En général, les lanthanides forment leurs composés les plus stables lorsqu'ils sont à l'état d'oxydation +3. La structure électronique des ions Ln^{III} est celle du Xénon pour le La^{III} et correspond ensuite au remplissage des orbitales 4f jusqu'à $[\text{Xe}]4f^{14}$ pour le Lu^{III} .

Actuellement, la plupart des études réalisées avec des complexes de lanthanides ont été orientées vers l'établissement de sondes luminescentes contenant des émetteurs de lumière visible à vie longue, notamment le Eu^{III} et le Tb^{III} , ou des émetteurs du spectre du proche infrarouge, tels que le Pr^{III} , Er^{III} , Yb^{III} ou le Nd^{III} .

Cependant, comme la transition interdite 4f-4f, dite interdiction

de Laporte, empêche l'excitation directe des lanthanides, celle-ci doit être effectuée à l'aide de certains chromophores organiques adéquats.

Au sens de l'invention un « chromophore » est une molécule capable d'absorber la lumière UV/visible et de la transférer au centre métallique, lequel, en acceptant cette énergie, devient « excité » à un état capable d'émettre la lumière (effet d'antenne). De préférence un « chromophore », dit aussi « antenne », correspond à un groupement d'atomes susceptible de participer à une séquence suffisamment longue de doubles liaisons conjuguées dans une molécule organique. Un cycle aromatique portant des électrons π délocalisables en α sera considéré comme un chromophore au sens de la présente invention.

Par ailleurs, pour des raisons pratiques dans des conditions physiologiques, les ions lanthanides doivent être incorporés dans des complexes hautement stables. En effet, l'efficacité du transfert d'énergie du ligand sur le lanthanide est décisive pour la conception de sondes hautement performantes.

En outre, afin d'obtenir un rendement quantique élevé il faut empêcher, ou tout au moins minimiser, une désexcitation non radiative de l'état excité de l'ion lanthanide en conséquence d'une interaction du métal avec les molécules d'eau environnantes.

L'incorporation des chromophores dans certains ligands polydentates étudiés à cet effet conduit à une plus grande stabilité des chélates de lanthanides en solution, permettant une plus grande protection du métal central vis-à-vis des molécules d'eau.

Cependant, la tendance des ions lanthanides à adopter un nombre de coordination élevé et leur manque de sélectivité stéréochimique fait de la conception de ces ligands un défi majeur.

Une stratégie, qui a été adoptée par différents groupes de recherche, est basée sur une structure à "tripode" d'un ligand afin d'organiser trois unités de liaison trivalents dans des complexes Ln^{III} ennéa-coordonnés.

Cette approche a conduit, dans certains cas, à une protection

efficace du métal central vis-à-vis des molécules d'eau environnantes, mais les difficultés de synthèse la rendent peu intéressante.

La préparation des ligands polydentates, permettant l'arrangement de quatre groupements bidentates autour d'un ion lanthanide, a attiré moins l'attention des chercheurs malgré les propriétés de luminescence excellentes observées pour les tétra complexes obtenus à partir des ligands chromophores bidentates, tels que les quinolines ou les tropolones.

Récemment, des ligands octadentates comprenant quatre chromophores divalents ont conduit à des complexes de lanthanides avec des émissions d'énergie dans la zone du ultra-violet (UV) ou du spectre du proche infrarouge (NIR) très efficaces.

Toutefois, la structure de ces complexes n'a pas encore été élucidée, et le fait que la partie de la structure du ligand que lie les unités bidentates entre elles soit hautement flexible, sous-entend que la protection du métal central est loin d'être optimale.

Le but de la présente invention est de proposer de nouveaux complexes de coordination d'un métal de transition, notamment des lanthanides, qui pallient les inconvénients précités, particulièrement en ce qui concerne leur stabilité en milieu aqueux et leur flexibilité.

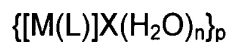
Un autre but de la présente invention est de proposer de nouveaux complexes de coordination d'un métal de transition, notamment des lanthanides, qui soient de préparation facile et qui présentent un rendement quantique de luminescence élevé.

Un autre but de la présente invention est de proposer de nouveaux complexes de coordination présentant des caractéristiques chimiques et photophysiques susceptibles d'être utilisés dans le domaine médical et biotechnologique.

D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront au cours de la description qui va suivre qui n'est donnée qu'à titre indicatif et qui n'a pas pour but de la limiter.

La présente invention concerne un complexe de coordination

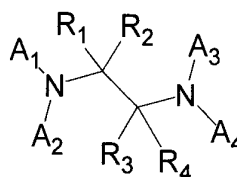
d'un métal de transition de formule générale (I) :



dans laquelle:

-M représente un élément appartenant au groupe des
5 lanthanides,

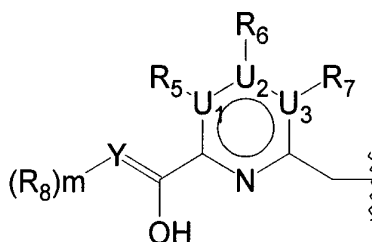
-L représente un ligand chromophore décadentate de formule
générale (II) :



Dans laquelle,

R₁, R₂, R₃ et R₄ correspondent indépendamment à un
hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

A₁, A₂, A₃ et A₄ correspondent indépendamment à une
15 structure de formule générale (III) :



Dans laquelle,

U₁, U₂ et U₃ correspondent indépendamment à un C ou un N,

R₅, R₆ et R₇ correspondent indépendamment à un hydrogène,
25 un radical alkyle ou aryle,

Y correspond à un C, O, S, P ou N,

m est un entier correspondant au nombre de valences libres de

Y,

R₈ correspond indépendamment à un hydrogène, un radical
30 alkyle ou aryle,

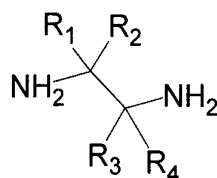
- X représente un contre-ion,
- n représente le nombre de molécules d'eau d'hydratation,
- p correspond aux nombre de monomères,
- H₂O représente les molécules d'eau d'hydratation.

5 Un radical alkyle peut être éventuellement mono- ou polysubstitué, linéaire, ramifié ou cyclique, saturé ou insaturé, en C1-C20, préférentiellement en C1-C10, le ou les substituants pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, O, F, Cl, P, Si ou S. Parmi de tels radicaux alkyle, on peut notamment citer les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, tert-butyle et pentyle. On peut également citer
10 parmi les radicaux alkyles insaturés les éthényles, propényles, isopropényles, butényles, isobutényles, tert-butényles, pentényles et acétylényles.

Un radical aryle peut être une structure carbonée aromatique ou hétéroaromatique, mono- ou polysubstituée, constituée d'un ou plusieurs
15 cycles aromatiques ou hétéroaromatiques comportant chacun de 3 à 8 atomes, l'hétéroatome pouvant être N, O, P ou S.

Optionnellement, lorsque les radicaux alkyle ou aryle sont polysubstitués, les substituants peuvent être différents les uns des autres. Parmi les substituants des radicaux alkyle et aryle, on peut notamment citer les
20 atomes d'halogène, les groupes alkyles, haloalkyles, aryles substitués ou non, hétéroaryles substitués ou non, amino, cyano, azido, hydroxy, mercapto, céto, carboxy, étheroxy et alcoxy comme méthoxy.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un ligand tel que décrit plus haut, caractérisé en ce qu'il
25 comprend la réaction d'une diamine de formule générale (IV) :

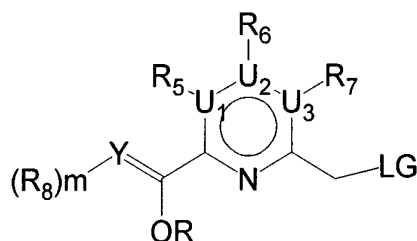


30

Dans laquelle,

R_1, R_2, R_3 et R_4 sot tels que définis ci-dessus,

Et d'au moins un composé de formule générale (V) :



Dans laquelle,

$Y, R_5, R_6, R_7, R_8, U_1, U_2$ et U_3 sont tels que définis ci-dessus,

R correspond à un alkyle ou un aryle,

LG représente un groupe partant susceptible de subir une substitution nucléophile de la part de la diamine.

La présente invention concerne en outre un procédé de préparation des complexes de coordination caractérisé en ce qu'il comprend la réaction entre un sel d'un lanthanide et un ligand en milieu aqueux, ainsi que leur utilisation dans le domaine médical, tel que dans l'imagerie diagnostique, radiothérapie, et dans la conception de capteurs de neutrons, écrans pour rayons X, des sondes pour imagerie et bio-essais, diodes, fibres optiques etc.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante, accompagnée des dessins en annexe parmi lesquels :

- la figure 1 représente un graphique de courbes de titration,
- la figure 2 représente la structure moléculaire d'un complexe

de lanthanide,

- la figure 3 représente la structure moléculaire d'un second
anthanide,

- la figure 4 représente le spectre ^1H RMN d'un complexe de lanthanide.

- la figure 5 représente le spectre ^1H RMN d'un complexe de

lanthanide à 333K,

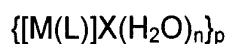
- la figure 6 représente le spectre ^1H RMN d'un complexe de

lanthanide à 298 K

- la figure 7 représente le spectre d'émission de deux complexes de lanthanides après excitation à 274 nm,

- la figure 8 représente les spectres d'émission et d'excitation d'un lanthanide.

La présente invention concerne tout d'abord un complexe de coordination d'un métal de transition de formule générale (I) :

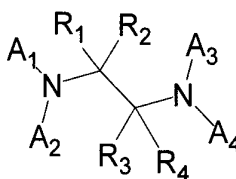


dans laquelle:

-M représente un élément appartenant au groupe des lanthanides,

-L représente un ligand chromophore décadentate de formule générale (II) :

15

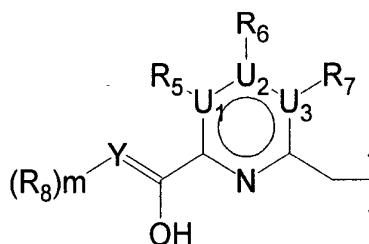


Dans laquelle,

R₁, R₂, R₃ et R₄ correspondent indépendamment à un hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

A₁, A₂, A₃ et A₄ correspondent indépendamment à une structure de formule générale (III) :

25



Dans laquelle,

U₁, U₂ et U₃ correspondent indépendamment à un C ou un N,

R₅, R₆ et R₇ correspondent indépendamment à un hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

Y correspond à un C, O, S, P ou N,

m est un entier correspondant au nombre de valences libres de

Y,

R₈ correspond indépendamment à un hydrogène, un radical

5 alkyle ou aryle,

-X représente un contre-ion,

-n représente le nombre de molécules d'eau d'hydratation,

-p correspond aux nombre de monomères,

-H₂O représente les molécules d'eau d'hydratation.

10 Selon l'état physique dans lequel il se trouve (cristallisé ou dissout par exemple), le complexe peut comprendre des molécules de solvants dites de coordination, il s'agit notamment de molécules d'eau.

Selon un mode particulier de la présente invention, l'élément appartenant au groupe des lanthanides est l'euporium (Eu), ou le cérium (Ce)
15 ou le terbium (Tb).

De manière avantageuse R₁, R₂, R₃ et R₄ seront indépendamment un hydrogène, un méthyle ou un éthyle, de préférence ils seront tous un hydrogène.

Les inventeurs considèrent qu'il est préférable que A₁, A₂, A₃ et
20 A₄ soient identiques, car ceci permet de conserver la symétrie de la molécule, augmentant ainsi l'effet d'antenne et évitant des transferts d'énergie parasites.

Il est également préférable que Y soit un soufre ou un oxygène, et dans ce cas m est égal à 0.

D'une manière générale il est préférable de choisir des
25 groupes aromatiques carbonés, les inventeurs considèrent qu'il est avantageux que U₁, U₂ et U₃ soient des carbones.

Les complexes préférés selon l'invention sont ceux pour lesquels R₅, R₆ et R₇ sont indépendamment un hydrogène ou un radical alkyle, comme le méthyle ou l'éthyle, avantageusement ils sont identiques et de
30 préférence correspondent à des hydrogènes.

L'un des avantages de ce type de complexe de coordination

réside dans leur stabilité en milieu aqueux qui permet leur utilisation dans des milieux physiologiques et biologiques et, donc, dans le domaine médical.

Le calcium, métal connu par son importance dans certains systèmes biologiques, est complexé moins fortement que les lanthanides par le
5 ligand de la présente invention. Cette sélectivité est très importante pour l'application médicale.

Selon un mode particulier de la présente invention ledit ligand comprend quatre chromophores bidentates reliés par un squelette éthylènediamine.

10 Selon un mode particulier de la présente invention, ledit ligand comprend quatre groupements pyridinecarboxylates liés par un squelette éthylènediamine.

Selon un mode particulier de la présente invention, le ligand comprenant les quatre groupements pyridinecarboxylates est la N,N,N',N'-
15 tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine.

Un des avantages des ligands selon l'invention et particulièrement ceux de type N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine, réside dans le fait qu'ils comprennent dix atomes donneurs d'électrons et un "squelette" constitué par un pont éthylènediamine
20 parfaitement adapté à la compléxation d'un lanthanide, notamment Eu, Tb et Ce, mais aussi les lanthanides avec émission dans l'infrarouge, apportant une protection hautement effective du métal central par rapport aux molécules d'eau environnantes, notamment aux molécules d'eau du solvant. En conséquence de cette protection, les complexes, notamment de Eu^{III} et de Tb^{III}
25 avec le ligand N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine, présentent une luminescence dans l'eau à longue vie, associée à une haute solubilité et à une haute stabilité.

Selon la présente invention, le contre-ion X présent dans les complexes est un élément appartenant au groupe 1A du tableau périodique
30 des éléments, et plus particulièrement le potassium. La façon dont le contre-ion K⁺ est lié aux complexes de l'euprium et du cérium, conduit à deux structures

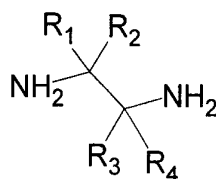
différentes, une structure monomérique dans le cas du complexe avec l'euporium et à une structure dimérique dans le cas du complexe avec le cérium.

La valeur de p varie selon le type de complexe et représente le nombre de monomères formant chacun des complexes, p est égal à un pour un complexe monomérique comme c'est le cas pour l'euporium et p est égal à 2 pour un complexe dimérique comme c'est le cas pour le cérium (voir les exemples de réalisation).

De la même manière la valeur de n est fonction du complexe considéré et des conditions d'atmosphère et de température. Typiquement ce nombre sera compris entre 0 et 20 pour un complexe non dissout.

L'invention concerne également la préparation d'un ligand chromophore décadentate tel que décrit ci-dessus, par réaction d'une diamine de formule générale (IV) :

15



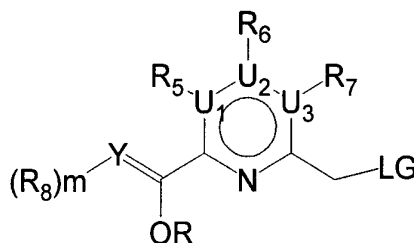
20

Dans laquelle,

R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont tels que définis ci-dessus,

Et d'au moins un composé de formule générale (V) :

25



30

Dans laquelle,

Y , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , U_1 , U_2 et U_3 sont tels que définis ci-dessus,

R correspond à un alkyle ou un aryle,

LG représente un groupe partant susceptible de subir une substitution nucléophile de la part de la diamine.

De manière avantageuse l'homme du métier choisira LG parmi les groupes partant les plus labiles et notamment ceux réagissant avec les amine. Les inventeurs considèrent que Cl, Br, I, -OTf, -OTs, CN peuvent être
5 avantageusement employés.

Le groupement R sera de préférence choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, benzyle, et parmi les hétéroalkyles notamment les radicaux employés comme groupe protecteur des
10 fonctions alcool comme le triméthylsilyl (TMS) ou tertbutyldiméthylesilyl (TBDMS).

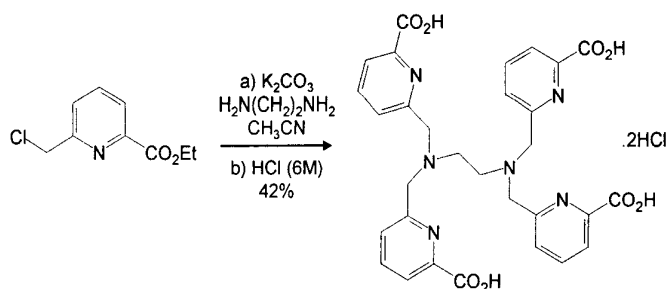
Le procédé selon l'invention peut être réalisé dans tout solvant adapté, il s'agit notamment des solvants organiques comme l'acétonitrile, le tétrahydrofurane, le chloroforme, le dichlorométhane, le tetrachlorure de
15 carbone, le toluène.

Les conditions opératoires préférées sont aisément déterminées par l'homme du métier à partir des substituants qu'il aura choisi pour ses composés, la réaction de substitution par une amine étant bien connue de l'art. Il est préférable de réaliser la réaction en présence d'une base
20 pour faciliter la réaction de l'amine, puis d'acidifier le milieu réactionnel pour régénérer l'alcool protégé par le groupe R.

Ainsi, selon le procédé, par réaction entre l'ester éthylique de la 6-chlorométhylpyridine-2-carboxylate et l'éthylènediamine, de préférence en milieu organique, le ligand décadentate N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)méthyl]-éthylènediamine, aussi désigné dans la présente invention par
25 H₄tpaen, est facilement obtenu en cinq étapes avec un rendement final de 26,0 %.

De façon schématique, la réaction peut être décrite comme suit :

30



La préparation du ligand H₄tpaen est simple, peut être utilisée
5 à grande échelle et peut être facilement modifiée pour ancrer le complexe avec
certains groupements fonctionnels capables de se lier à des biomolécules afin
de développer des marqueurs pour l'imagerie à luminescence.

Le ligand N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-
éthylènediamine peut être préparé de la façon suivante.

10 Sous une atmosphère d'argon, de l'éthylènediamine
fraîchement distillée (250 mL, 3.6 mmol) et du K₂CO₃ anhydre (2.04g, 14.8
mmol) sont successivement additionnés à une solution d'ester éthylique de la
6-chloromethylpyridine-2-carboxylate (2.95 g, 14.8 mmol) dans l'acétonitrile
anhydre (50 mL). Après filtration et évaporation du solvant une huile jaune est
15 obtenue.

Après reprise dans le dichlorométhane la solution formée est
lavée deux fois avec de l'eau (100mL) et séchée sur du Na₂SO₄ anhydre.
Après évaporation du solvant, l'huile jaune obtenue est utilisée sans aucune
autre purification.

20 Pour régénérer la fonction acide, le produit brut (2.56g) dissout
dans une solution aqueuse de HCl 6M (40 mL) est porté au reflux pendant une
nuit. Après évaporation du solvant jusqu'à 5 mL, la solution est refroidit à 5°C
durant une nuit. Le précipité est collecté par filtration, lavé avec une solution de
HCl 6M puis séché sous vide. 1.37g de H₄tpaen.6HCl.5H₂O sont ainsi obtenus
25 avec un rendement de 42%.

L'analyse élémentaire du H₄tpaen.6HCl.5H₂O est la suivante :
MM=909.33, C₃₀H₄₄N₆O₁₃Cl₆: C 39.42, H 4.88, N 9.24, trouvé C, 39.49, H 4.90,
N 9.24.

Les spectres de RMN du H₄tpaen sont les suivants :

^1H RMN (D_2O , 400 MHz, 298 K, pH = 5): δ 3.57 (s, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.36 (s, 8H, NCH_2py), 7.48 (d, 4H, CH), 7.77 (d, 4H, CH), 7.84 (t, 4H, CH).

^{13}C RMN (D_2O , 100 MHz): δ = 51.6 (CH_2); 56.4 (CH_2); 57.8
5 (CH_2); 125.8 (CHpy); 128.4 (CHpy); 142.9 (CHpy); 147.4 (Cpy); 152.0 (Cpy); 166.4 (COOH); 172.1 (COOH).

La présente invention concerne en outre un procédé de préparation d'un complexe de coordination par réaction d'un sel d'un lanthanide avec un ligand en milieu aqueux.

10 Avantageusement, le sel d'un lanthanide est le chlorure d'un lanthanide.

Le ligand sera avantageusement tel que décrit ci-dessus.

Selon un mode particulier de la présente invention le lanthanide est l'euprium (Eu), le cérium (Ce) ou le terbium (Tb),
15 avantageusement le lanthanide sera choisi parmi les lanthanides avec émission dans l'infrarouge.

Les complexes solubles dans l'eau, obtenus à partir du ligand N,N,N',N' -tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine, sont isolés avec un rendement compris entre 50 et 60% après réaction dudit ligand avec
20 un chlorure de lanthanide hexa hydraté, notamment avec le cérium ou l'euprium et après un ajustement du pH à 6.

A titre d'exemple, non limitatif, les complexes d'euprium et du cérium peuvent être préparés par réaction entre le trichlorure d'euprium ou le trichlorure de cérium et le ligand N,N,N',N' -tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine.
25

Ces complexes peuvent être préparés de la façon suivante.

Une solution de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.138 mmol) dans de l'eau (0.5 mL) est ajoutée à une solution de N,N,N',N' -tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine (0.138 mmol) à un pH 5, ajusté
30 par l'addition de KOH (0.2 M), dans de l'eau (6mL). La solution ainsi obtenue est agitée à température ambiante pendant 2 heures et le pH est ajusté à 6 par

l'addition supplémentaire de KOH (0.2 M).

Après évaporation de l'eau, le solide obtenu est repris dans EtOH (5 mL) et la solution est filtrée pour éliminer les sels insolubles. Le solvant est évaporé et le résidu repris dans l'eau.

5 Une évaporation lente sur 5 jours de la solution aqueuse (1mL) du solide permet d'obtenir le complexe ([Eu(tpaen)]K) sous la forme d'un solide blanc et le complexe ([Ce(tpaen)]K) sous la forme d'un solide jaune avec un rendement compris entre 50 et 60%.

Les caractéristiques chimiques et physiques de ces complexes
10 sont les suivantes :

[Eu(tpaen)] : ^1H RMN (D_2O , 400 MHz, 298 K, pD = 6.9): δ -2.07 (s br, 2H, H_6/H_6'), -1.11 (s br, 2H, H_4'), -0.99 (s br, 2H, H_4), 3.48 (s br, 2H, H_5), 4.28 (s br, 2H, H_5'), 4.41 (d br, 2H, H_3'), 5.43 (d br, 2H, H_3), 5.65 (s br, 2H, H_1'), 5.79 (s br, 2H, H_1), 5.96 (br, 2H, H_2), 6.53 (br, 2H, H_2), 8.40 (br, 2H, H_6/H_6').

15 [Ce(tpaen)] : ^1H RMN (D_2O , 400 MHz, 298 K, pD = 5.4): δ -2.03 (s br, 2H, H_6/H_6'), 0.09 (s br, 2H, H_5), 1.18 (s br, 2H, H_6/H_6'), 3.25 (d, 2H, H_4'), 3.51 (d, 2H, H_4), 5.44 (s br, 2H, H_5), 7.97 (d, 2H, H_3), 8.10 (d, 2H, H_3'), 8.45 (d, 2H, H_1), 8.91 (t, 2H, H_2), 8.94 (d, 2H, H_1'), 9.04 (t, 2H, H_2').

Les données cristallographiques pour
20 [Eu(tpaen)]K(H_2O) $_3$.4 H_2O : $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{EuKN}_6\text{O}_{15}$, $M = 913.7$, Monoclinique, groupe spatial $\text{P}2(1)/n$, $a = 11.995(2)$ $b = 14.539(3)$, $c = 21.407(5)$ Å, $\beta = 106.186(3)$ $V = 3585.2(12)$ Å 3 , $Z = 4$, $\rho_c = 1.693$ g cm $^{-3}$, $\mu = 1.944$ mm $^{-1}$, $T = 298$ K. Des 12504 réflexions recueillies, 5133 étaient uniques ($R_{\text{int}} = 0.0192$). Traitement des données a convergé à $R_1 = 0.0296$, $wR_2 = 0.0667$. Max/min de
25 densité résiduelle 0.693 et -0.528 eÅ $^{-3}$.

Les données cristallographiques pour
[Ce(tpaen)]K(H_2O) $_3$.2.16 H_2O , $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{CeKN}_6\text{O}_{19}$, $M = 973.95$, Monoclinique, groupe spatial $\text{P}2(1)/c$, $a = 11.7615(10)$ $b = 14.5931(12)$, $c = 22.965(2)$ Å, $\beta = 101.640(1)$ $V = 3860.7(6)$ Å 3 , $Z = 4$, $\rho_c = 1.676$ g cm $^{-3}$, $\mu = 1.374$ mm $^{-1}$, $T = 193$
30 K. Des 12929 réflexions recueillies, 7459 étaient uniques ($R_{\text{int}} = 0.0310$). Traitement des données a convergé à $R_1 = 0.0430$, $wR_2 = 0.1340$. Max/min de

densité résiduelle 1.055 and -2.462 eÅ⁻³.

Par ailleurs, cinq constantes de déprotonation [$pK_{a1}=2.8$ (1), $pK_{a2}=3.2$ (1), $pK_{a3}=3.9$ (2), $pK_{a4}=5.1$ (1) et $pK_{a5}=7.8$ (1)] peuvent être déterminés pour le ligand H₆tpaen par titrage potentiométrique ainsi que les
 5 constants de stabilité des correspondants complexes de Eu^{III} et de Ca^{II} [$\log\beta_{EuL}=15.3(3)$ pour le complexe de Eu^{III} et $\log\beta_{CaL}=8.5$ (5)]. La figure 1 montre les courbes de titration pour le ligand H₆tpaen (▲), pour le complexe Eutpaen (◇) et pour le complexe Catpaen (■).

Les valeurs de $pEu=15.7$, $pGd=15.0$ et $pCa=8.5$ ($-\log[M]_{libre}$ à
 10 un pH de 7.4, $[M]_{total}=1\mu M$, et $[tpaa]_{total}=10\mu M$), lorsqu'elles sont comparées avec la valeur de $pEu=14.0$ pour l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) montrent que le ligand tpaen forme des complexes de lanthanides avec une stabilité suffisante pour leur utilisation *in vivo* et montrent également une bonne sélectivité vis-à-vis de l'euporium par rapport au calcium.

Pour la titration potentiométrique, les solutions du complexe de
 15 Eu(III) peuvent être préparées par dissolution d'une quantité déterminée de EuCl₃.6H₂O dans de l'eau. Les constantes de déprotonation de H₆tpaen sont données par $K_{ai} = [H_{6-i}L]^{2-i}/[H_{5-i}L]^{1-i}[H]^+$, et telles que déjà mentionnées précédemment, les valeurs obtenues sont $pK_{a1} = 2.8(1)$, $pK_{a2} = 3.2(1)$, $pK_{a3} =$
 20 $3.9(2)$, $pK_{a4} = 5.1(1)$ et $pK_{a5} = 7.8(1)$.

La concentration exacte de l'ion Eu³⁺ a peut être déterminée par titration colorimétrique dans un tampon d'acétate (pH=4.5), utilisant comme référence une solution de H₂Na₂edta et l'orange xylenol comme indicateur.

Les solutions de Ca(II) ont peuvent être préparées par
 25 dissolution de CaCl₂ dans de l'eau. La concentration exacte de l'ion Ca²⁺ peut être déterminée par titration colorométrique à un pH ~ 12.5 utilisant comme référence une solution de H₂Na₂edta et la calgonite comme indicateur. 20 mL d'une solution de H₄tpaen(3.10^{-4} M), acidifiée (pH~2.5) 1:1 Ln:mélange de ligands ($[L] 3.10^{-4}$ M), acidifiée (pH~2.5) 1:1 Ca:mélange de ligands ($[L] 7.10^{-5}$ M) sont titrés dans une cellule avec un thermostat (25.0°C +/- 0.1°C) sous
 30 argon après addition d'une solution de KOH 0.1 M.

La force ionique a été déterminée avec KCl ($\mu=0.1$ M). Les titrations ont été effectuées avec un potentiomètre Metrohm 751 GPD Titrino équipé avec une électrode de pH à verre. Le système d'électrode a été calibré avant chaque mesure.

5 La force électromotrice est donnée par l'équation $E=E^{\circ}+sp[H^{+}]$ dans laquelle E° et s sont déterminés par titration d'une quantité connue de HCl avec 0.1 M KOH à $\mu=0.1$ M (KCl), utilisant la zone de l'acide pour la titration. La valeur utilisée pour le produit ionique de l'eau a été $pK_w = 13.77$. Plus de 50 points de données ont été recueillis pour chaque expérience.

10 En outre, comme montrée aux figures 2 et 3, la structure cristalline respectivement des complexes $[Eu(tpaen)]K(H_2O)_3 \cdot 4H_2O$, et $\{[Ce(tpaen)]K(H_2O)_3\}_2 \cdot 16H_2O$ est analysée par diffraction des Rayons X. Dans les deux complexes, l'ion Ln^{III} est déca-coordiné par les quatre atomes d'oxygène (la valeur moyenne pour les distances Métal-O est 2.42 (1) Å pour l'euporium et 2.50 (4) Å pour le cérium) et par les six atomes d'azote (la valeur moyenne pour les distances Métal-N-pyridine est 2.65 (4) Å pour l'euporium et 2.72 (1) Å pour le cérium et la valeur moyenne pour les distances Métal-N-amine est 2.91 (1) Å pour l'euporium et 2.91 (4) Å pour le cérium.

20 Le nombre de molécules d'eau coordonnées présentes en solution, q , a été déterminé à partir des mesures du temps de vie utilisant l'équation de Parker ($q = A_{Ln}(1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O} - \alpha_{Ln})$) dans laquelle $A_{Tb} = 5$ ms, $A_{Eu} = 1.2$ ms, $\alpha_{Tb} = 0.06$ ms⁻¹ et $\alpha_{Eu} = 0.25$ ms⁻¹). Le rendement quantique Q a été calculé utilisant l'équation $Q_x/Q_r = A_r(\nu) \cdot n_x^2 \cdot D_x / A_x(\nu) \cdot n_r^2 \cdot D_r$, dans laquelle x est l'échantillon, r la référence; A l'absorbance, ν le nombre d'ondes d'excitation utilisé, n l'indice de refraction, et D l'intégral de l'intensité émise.

25 Les complexes de tris(dipicolinate) $[Eu(dpa)_3]^{3-}$ ($\Phi = 13.5\%$, 7.5×10^{-5} M in tampon Tris 0.1M) et $[Tb(dpa)_3]^{3-}$ ($\Phi = 26.5\%$, 6.5×10^{-5} M in tampon Tris 0.1M) sont utilisés comme références respectivement pour la détermination des rendements quantiques des échantillons de Eu- and Tb. La consistance des données a été vérifiée mesurant le rendement quantique des complexes des tris(dipicolinate) par rapport à la rhodamine 101 ($Q_{abs} = 100\%$

en éthanol) et violet de cresyl ($Q_{abs} = 54\%$ en méthanol).

Les analyses chimiques et physiques des complexes selon la présente invention, montrent que les "bras" du groupement pyridinecarboxylate du ligand N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-éthylènediamine entourent le métal central dans un arrangement pseudo symétrique C_2 et hélicoïdal.

Les deux complexes cristallisent en un mélange racémique d'énantiomères Λ et Δ .

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des complexes d'euporium et du cérium, tels que montrés à la figure 4 pour le cas du complexe d'euporium avec le ligand tpaen à 298 K, montrent que leur structure est compatible avec une symétrie rigide C_2 dans laquelle les quatre « bras » du ligand restent coordonnés avec le métal pendant le temps d'obtention du spectre de RMN (*EtoH).

La symétrie observée est en concordance avec une structure chirale en double hélice en solution, similaire à celle rencontrée dans l'état solide.

Les complexes gardent leur structure rigide dans une plage de température entre 298-363K, telle que montrée par les 1H RMN des figures 5 (* DSS ; # impureté) et 6 (* ligand libre), effectués respectivement à une température de 333 et de 298 K pour le cas particulier du complexe $[Ce(tpaen)]$ en D_2O .

La présence d'une symétrie rigide C_2 semblable à celle décrite ci-dessus a été également observée pour la même plage de températures pour les complexes de La et Tb préparés *in situ* dans de l'eau deutérée à un pH de 7.7. La forte rigidité de ces complexes en solution, très rarement observée pour les complexes de lanthanides avec un ligand à denticité élevée, indique que l'arrangement des dix atomes donneurs assurés par la simple chaîne éthylènediamine est bien adapté à la formation de complexes de lanthanides apportant une haute et effective protection au métal central vis-à-vis des molécules des solvants.

Comme résultats de cette protection, les complexes d' Eu^{III} et de Tb^{III} avec le ligand tpaen présentent une forte luminescence à vie longue dans de l'eau et dans de l'eau deutérée. Les temps de vie des niveaux $\text{Eu}(^5\text{D}_0)$ et $\text{Tb}(^5\text{D}_4)$ pour le $[\text{Eu}(\text{tpaen})]^-$ et $[\text{Tb}(\text{tpaen})]^-$ sont en concordance avec la
5 présence de $0,04 \pm 0,2$ et $0,03 \pm 0,2$ molécules d'eau coordonnées respectivement dans les complexes Eu et Tb.

Les propriétés luminescentes des ions lanthanides, notamment Eu et Tb, sont donc largement améliorées par le ligand tpaen. La figure 7 montre le spectre d'émission de $[\text{Eu}(\text{tpaen})]^-$ (ligne pleine) et $[\text{Tb}(\text{tpaen})]^-$ (ligne
10 pointillée) après excitation du ligand à 274 nm.

Un transfert d'énergie efficace du ligand sur le métal est mis en avant par la ressemblance entre les spectres d'excitation et d'absorption des complexes d'euprium et de terbium. La figure 8 montre le spectre d'absorption (ligne pointillée) et le spectre d'excitation (ligne pleine) du complexe de
15 $[\text{Tb}(\text{tpaen})]^-$ dans une solution tampon de Tris.

Le rendement quantique pour le complexe de $[\text{Tb}(\text{tpaen})]^-$ ($\Phi=45\%$) mesuré par rapport au complexe de $[\text{Tb}(\text{dpa})_3]^{3-}$ dans une solution tampon de Tris aérée de concentration 0.1 M, avec une erreur expérimentale de 15%, est une des valeurs la plus élevée qui a été mentionnée jusqu'à nos
20 jours. Le chromophore tpaen sensibilise également d'une façon efficace l'ion euprium dont la valeur pour le rendement quantique est de 7%. Cette valeur, tout en étant plus basse que celle obtenue pour le complexe de Tb^{III} , reste toutefois plus élevée que le rendement quantique des complexes de lanthanides utilisés actuellement dans les sondes luminescentes
25 commercialisées.

Telle que montrée dans le tableau suivant, l'intense luminescence de ces ions résulte d'un transfert efficace d'énergie du ligand sur le métal et d'une protection du métal central vis-à-vis d'une désactivation non radiative par les molécules d'eau environnantes.

compound	$\lambda_{\text{exc}}(\text{nm})$	$\varepsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}(\text{ms})$	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}(\text{ms})$	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}}$
tpaen	270	15800			
Eu(tpaen)	274	21600	1.70(2)	3.30(1)	0.07
Tb(tpaen)	274	21632	3.0(1)	3.75(1)	0,45

Le temps de vie de la luminescence observée dans le complexe de terbium dans de l'eau, à la connaissance des inventeurs un de plus longs observé jusqu'à aujourd'hui, exclut la présence d'un processus de désexcitation comprenant le retour d'énergie du métal vers le ligand. Cette
 5 valeur pour le temps de vie est tout à fait compatible avec un niveau d'énergie de l'état triplet du complexe [Tb(tpaen)] similaire à celle récemment divulguée, (22988 cm^{-1} ,) pour le complexe d'un ligand octavalent contenant deux groupements pyridinecarboxylate. Le rendement quantique élevé pour le complexe de terbium concorde bien avec cette valeur.

10 Les complexes de coordination selon la présente invention présentent plusieurs avantages. D'une part, cette approche directe pour agencer quatre chromophores divalents dans un ligand décadentate produit des complexes de lanthanides hautement solubles et stables à un pH physiologique. D'autre part, l'architecture du ligand conduit à une structure
 15 rigide dans laquelle le métal central est effectivement protégé des interactions avec les molécules du solvant.

En outre, cette approche ouvre une large variété de perspectives pour le développement des sondes stables et luminescentes dans la zone de l'ultraviolet-visible, infrarouge et proche infrarouge, utilisant ces
 20 composés, élaborés de préférence à partir de chromophores émettant une luminescence dans la zone de l'ultraviolet ou du proche infrarouge pour une utilisation dans l'imagerie médicale et dans les bioessais. Plus généralement le domaine médical, particulièrement celui des analyses médicales paraît pouvoir

bénéficier de l'invention. Par ailleurs, les composés tels que décrits dans la présente demande peuvent être ancrés avec certains groupements fonctionnels capables de se lier à des biomolécules afin de développer des marqueurs pour l'imagerie à luminescence. Les complexes peuvent incorporer
5 des fonctions de reconnaissance comme des dendrimères ou également être lié à des peptides, oligonucleotides, polymères, nanotubes.

L'invention concerne ainsi également une biomolécule ancrée sur un complexe selon l'invention, notamment pour servir comme sonde luminescente. Les complexes selon l'invention, de part leur propriétés, peuvent
10 être employé dans l'industrie nanotechnologique et notamment dans des dispositifs nanotechnologiques comme des diodes ou des fibres optiques.

Naturellement, d'autres modes de mise en œuvre, à la portée de l'homme de l'art, peuvent être envisagés sans pour autant sortir du cadre de l'invention.

REVENDICATIONS

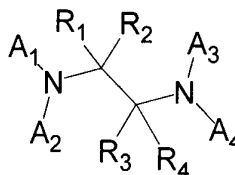
1. Complexe de coordination d'un métal de transition de formule générale (I) :



dans laquelle:

-M représente un élément appartenant au groupe des lanthanides,

10 -L représente un ligand chromophore décadentate de formule générale (II) :

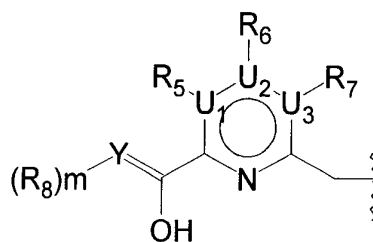


15 Dans laquelle,

R₁, R₂, R₃ et R₄ correspondent indépendamment à un hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

A₁, A₂, A₃ et A₄ correspondent indépendamment à une structure de formule générale (III) :

20



25

Dans laquelle,

U₁, U₂ et U₃ correspondent indépendamment à un C ou un N,

R₅, R₆ et R₇ correspondent indépendamment à un hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

30 Y correspond à un C, O, S, P ou N,

m est un entier correspondant au nombre de valences libres de

Y,

R_8 correspond indépendamment à un hydrogène, un radical alkyle ou aryle,

-X représente un contre-ion,

-n représente le nombre de molécules d'eau d'hydratation,

5 -p correspond aux nombre de monomères,

-H₂O représente les molécules d'eau d'hydratation.

2. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'élément appartenant au groupe des lanthanides est l'Europium.

3. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que
10 l'élément appartenant au groupe des lanthanides est le Cerium.

4. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'élément appartenant au groupe des lanthanides est le Terbium.

5. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont indépendamment un hydrogène, un
15 méthyle ou un éthyle.

6. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que A_1 , A_2 , A_3 et A_4 sont identiques.

7. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que Y est un soufre ou un oxygène, et en ce que m est égal à
20 0.

8. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que U_1 , U_2 et U_3 sont des carbones.

9. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que R_5 , R_6 et R_7 sont des hydrogènes.

25 10. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ligand comprend quatre groupements chromophores bidentates lié par un squelette éthylènediammine.

11. Complexe selon la revendication 1 ou 10, caractérisé en ce que le ligand comprend quatre groupements pyridinecarboxylates liés par
30 un squelette éthylènediammine.

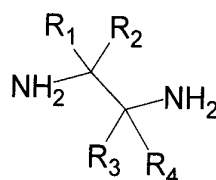
12. Complexe selon les revendications 1 à 11, caractérisé en

ce que le ligand est la N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)methyl]-
éthylènediamine.

13. Complexe selon les revendications 1 à 12, caractérisé en
ce que le contre-ion est un élément appartenant au groupe 1A du tableau
5 périodique des éléments.

14. Complexe selon les revendications 1 à 13, caractérisé en
ce que le contre-ion est le potassium.

15. Procédé de préparation d'un ligand selon les
revendications 1 ou 14, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction d'une
10 diamine de formule générale (IV) :



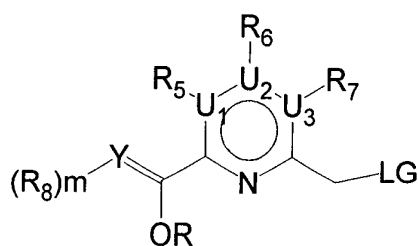
15

Dans laquelle,

R₁, R₂, R₃ et R₄ sont tels que définis ci-dessus,

Et d'au moins un composé de formule générale (V) :

20



25

Dans laquelle,

Y, R₅, R₆, R₇, R₈, U₁, U₂ et U₃ sont tels que définis ci-dessus,

R correspond à un alkyle ou un aryle,

LG représente un groupe partant susceptible de subir une
substitution nucléophile de la part de la diamine.

30

16. Procédé de préparation d'un ligand selon la revendication
15, caractérisé en ce que LG est choisi parmi Cl, Br, I, -OTf, -OTs, CN.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que R est choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, benzyle, triméthylsilyle (TMS) ou terbutyldiméthylesilyle (TBDMS).

18. Procédé de préparation d'un ligand selon les
5 revendications 15 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction entre l'ester éthylique de la 6-chlorométhylpyridine-2-carboxylate et l'éthylènediamine en milieu organique.

19. Procédé de préparation d'un complexe de coordination selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il
10 comprend la réaction entre un sel d'un lanthanide et un ligand en milieu aqueux.

20. Procédé de préparation d'un complexe de coordination selon la revendication 19, caractérisé en ce que le sel d'un lanthanide est le chlorure de lanthanide.

15 21. Procédé de préparation d'un complexe de coordination selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction entre le trichlorure d'euporium et la N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)méthyl]-éthylènediamine.

22. Procédé de préparation d'un complexe de coordination
20 selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction entre le trichlorure de cérium et la N,N,N',N'-tétrakis[(6-carboxypyridine-2-yl)méthyl]-éthylènediamine.

23. Utilisation d'un complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 dans le domaine médical.

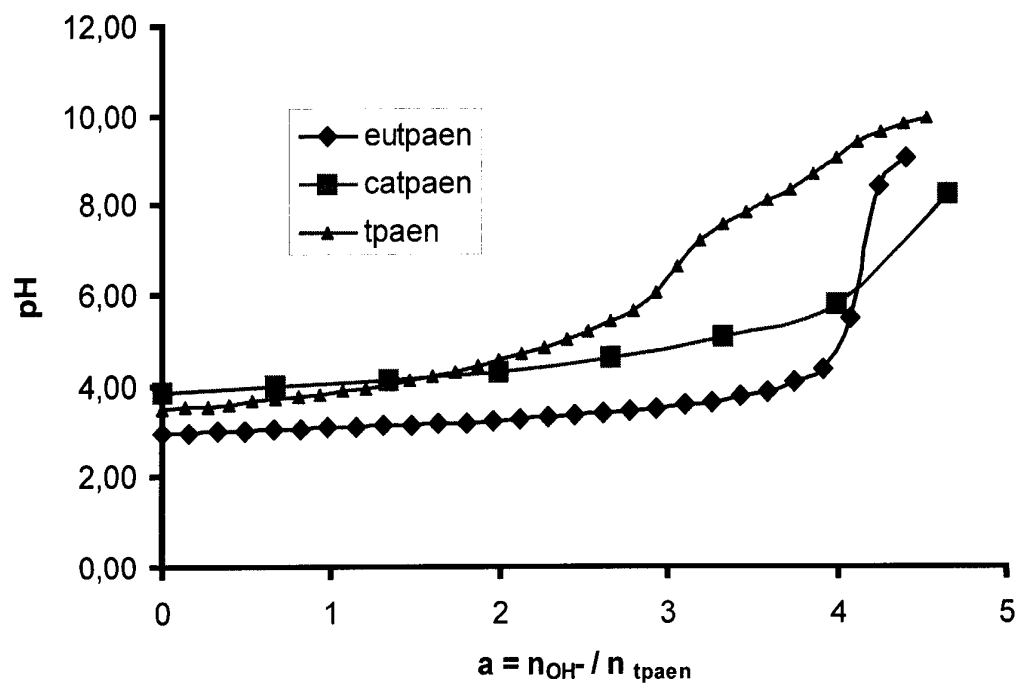
25 24. Biomolécule ancrée sur un complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

25. Utilisation des complexes selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 dans des sondes luminescentes pour l'imagerie médicale ou des bioessais.

30 26. Utilisation d'un complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 dans un dispositif nanotechnologique.

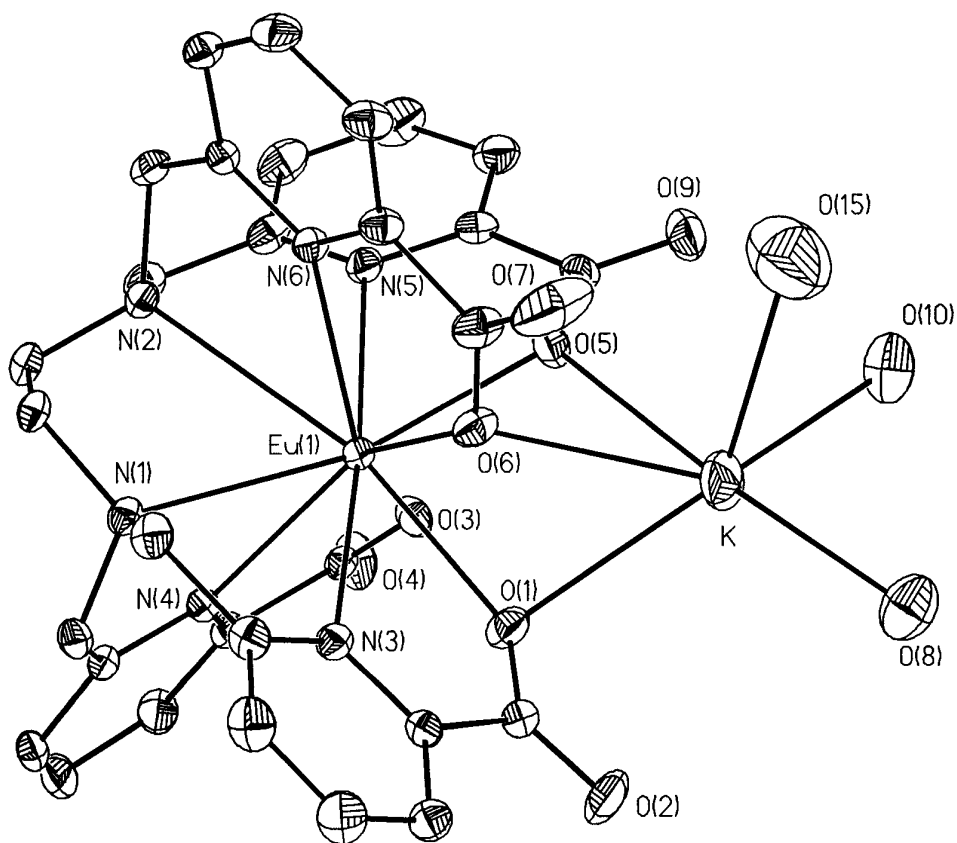
1/8

FIGURE 1



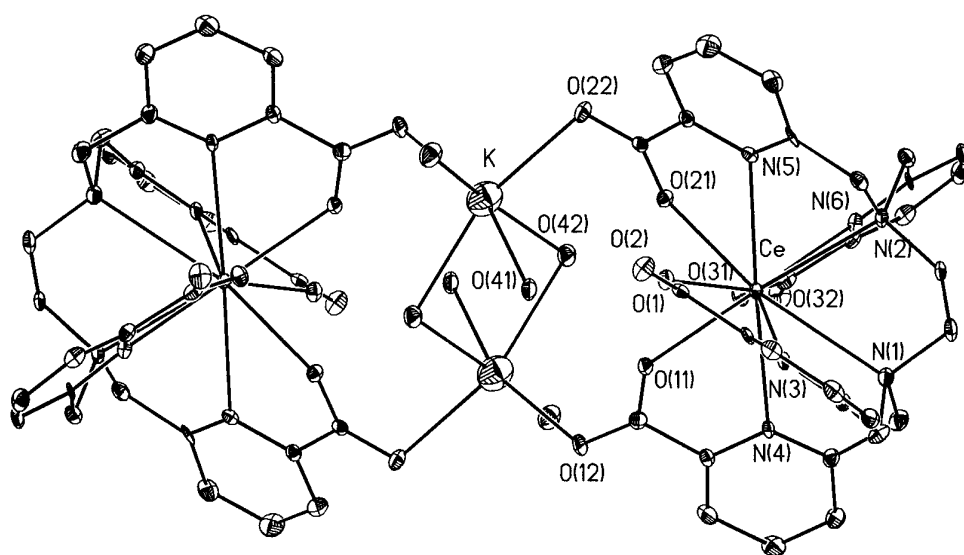
2/8

FIGURE 2



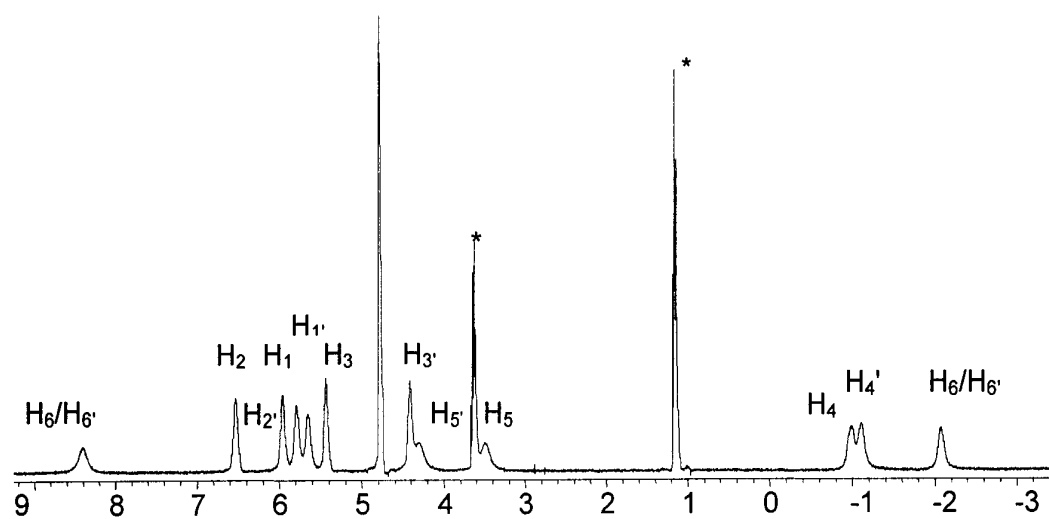
3/8

FIGURE 3



4/8

FIGURE 4



5/8

FIGURE 5

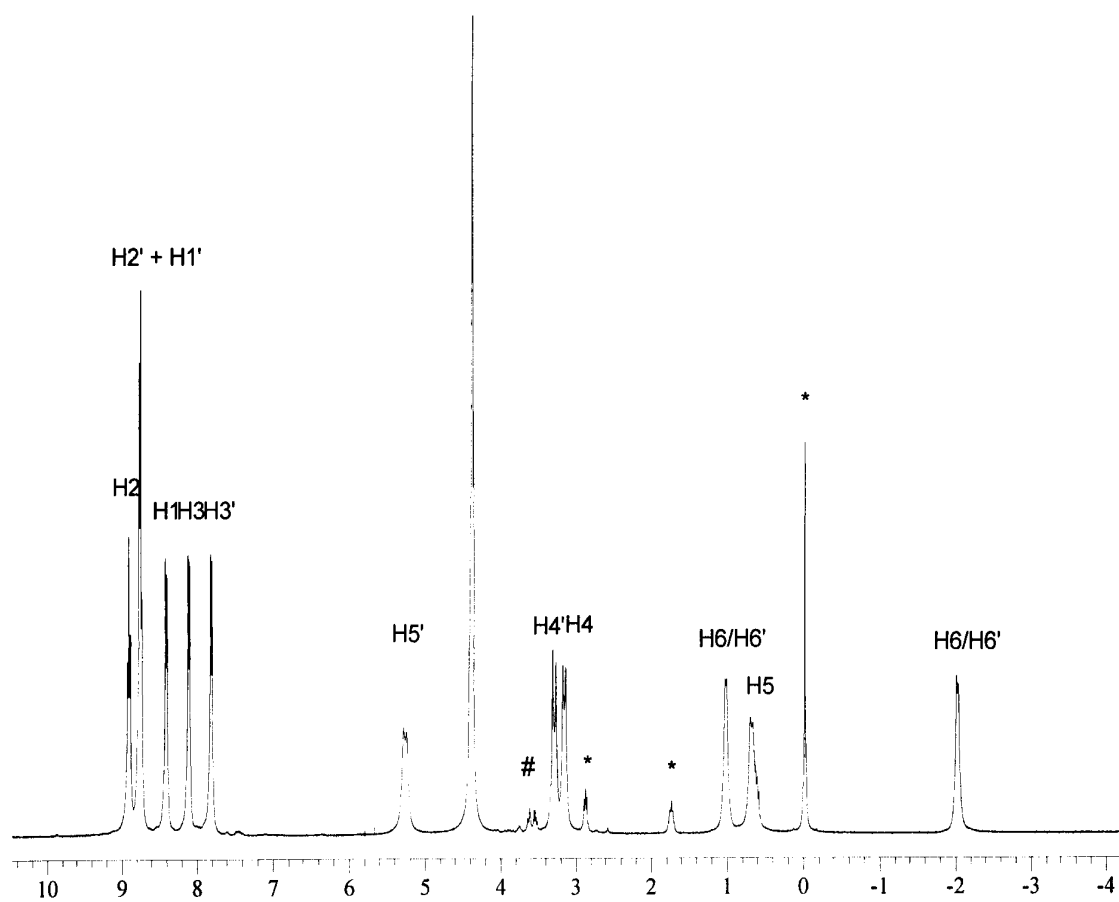
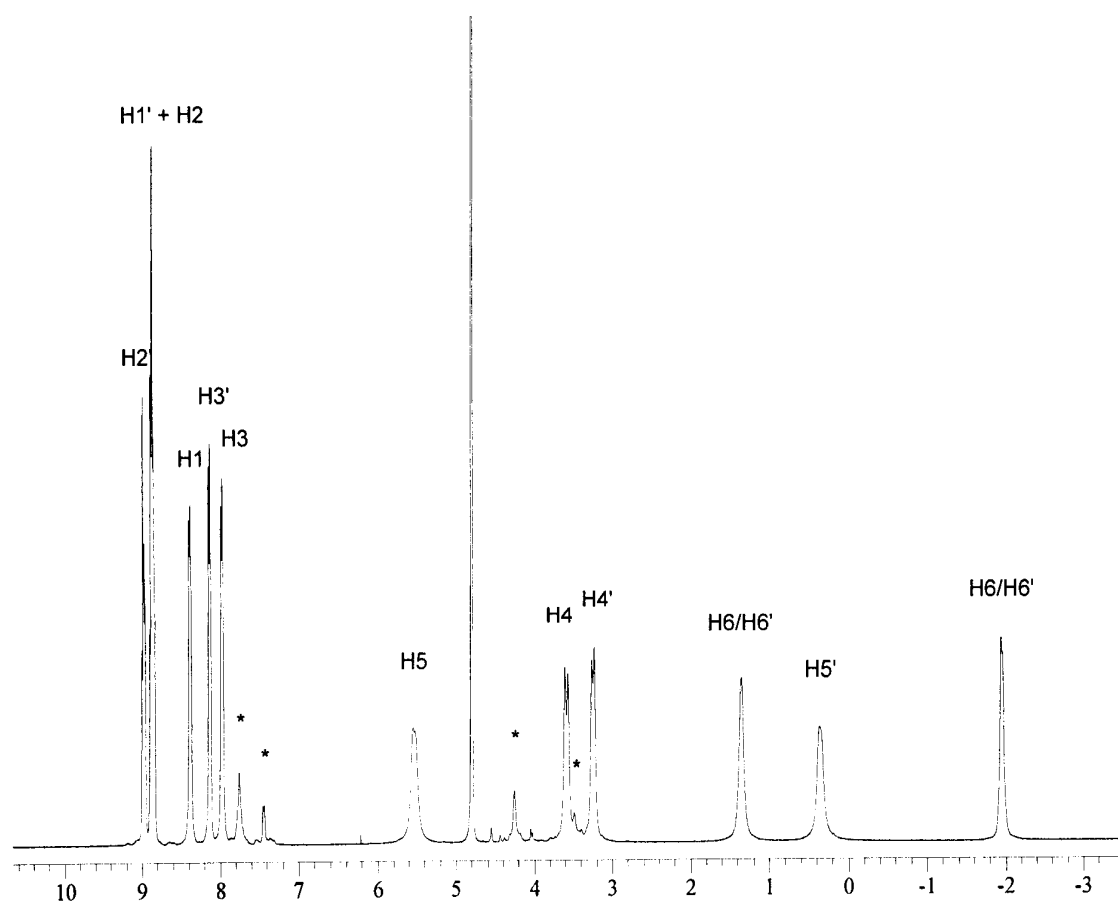
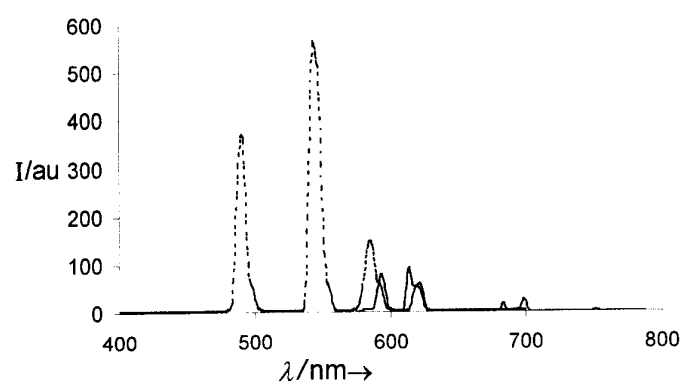


FIGURE 6



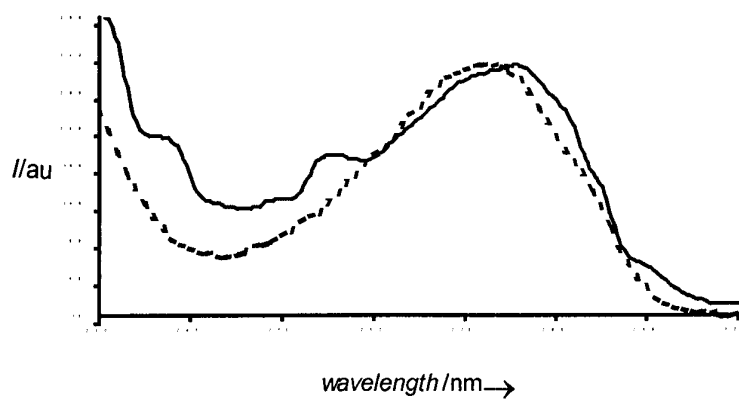
7/8

FIGURE 7



8/8

FIGURE 8





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 679341
FR 0509444

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	PLATAS-IGLESIAS C., MATO-IGLESIAS M., DJANASHVILI K., MULLER R. N., VANDER ELST L., PETERS J. A., DE BLAS A., RODRÍGUEZ-BLAS T.: "Lanthanide Chelates Containing Pyridine Units with Potential Application as Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging" CHEMISTRY- A EUROPEAN JOURNAL, 2004, pages 3579-3590, XP002397229 * page 3579 * * page 3580 * * page 3583; tableau 2 * -----	1-26	C07F5/00
A	CHATTERTON N., GATEAU C., MAZZANTI M., PÉCAUT J., BOREL A., HELM L., MERBACH A.: "The effect of pyridinecarboxylate chelating groups on the stability and electronic relaxation of gadolinium complexes" DALTON TRANSACTIONS, 2005, pages 1129-1135, XP002397230 * page 1133 * * page 1134 * -----	1-26	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C07F
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
1 septembre 2006		Jeanjean, F	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			