

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 14768

(54)

Marquage de composés biologiquement intéressants par la dichlorotriazinyl-aminofluorescéine.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 D 405/12, 453/04, 473/08; C 07 H 15/22
// G 01 N 33/54.

(22)

Date de dépôt..... 29 juillet 1981.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *EUA, 30 juillet 1980, n° 173,553.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 5-2-1982.

(71)

Déposant : Société dite : ABBOTT LABORATORIES, résidant aux EUA.

(72)

Invention de : Chao-Huei Jeffrey Wang, Stephen Denham Stroupe et Michael Ernest Jolley.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

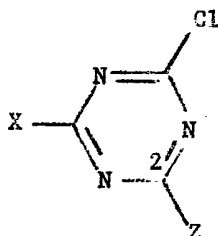
La présente invention concerne d'une manière générale des composés fluorescents qui se sont révélés particulièrement intéressants dans divers procédés d'immunofluorescence pour déceler et déterminer des quantités de petites molécules biologiquement
5 intéressantes dans les humeurs de l'organisme. Les substances de bas poids moléculaire que l'on souhaite déceler ou contrôler comprennent des médicaments administrés à des fins thérapeutiques, des médicaments ayant une capacité potentielle connue d'emploi abusif, et divers autres composés qui sont intéressants dans le diagnostic
10 des maladies ou la thérapie de contrôle.

Bien que les composés de l'invention puissent être utilisés dans diverses techniques d'immunofluorescence, ils sont particulièrement utiles dans un procédé dénommé détermination immunologique par polarisation de fluorescence. Une détermination immuno-
15 logique par polarisation de fluorescence combine la spécificité d'une détermination immunologique avec la vitesse et la commodité d'une méthode homogène. Lorsqu'un composé de conjugaison fluorescent est fixé à un anticorps, la lumière polarisée linéairement qui est utilisée pour exciter le conjugué fluorescent reste fortement pola-
20 risée par émission parce que le fluorophore est limité en rotation entre les instants d'absorption et d'émission de la lumière. D'autre part, lorsque le conjugué fluorescent n'est pas fixé par un anticorps, sa rotation est beaucoup plus rapide, les molécules sont davantage orientées de manière statistique, et la lumière émise est dépolarisée.
25 La polarisation de fluorescence fournit donc une mesure directe du conjugué fluorescent fixé et libre dans un essai de détermination immunologique par fixation compétitive. Le conjugué fluorescent tend à se fixer sur les sites de fixation de l'anticorps avec le composé intéressant dans l'échantillon du patient. Plus la concentration du
30 composé déterminé est grande, plus grande est la fraction du conjugué fluorescent non fixé par l'anticorps et, par conséquent, plus grand est le degré auquel la lumière dépolarisée est émise. La relation précise entre la concentration de l'analyte et la polarisation est établie en traçant une courbe d'étalonnage. On lit les produits d'étalon-
35 nage avec des quantités connues d'analyte et on enregistre la polarisation. Lorsqu'on lit un composé inconnu, sa concentration est estimée par interpolation entre les standards.

Les conjugués fluorescents de dérivés de composés de bas poids moléculaire ne sont pas uniques. Le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.998.943 (1976) décrit de manière spécifique la préparation d'insuline marquée fluorescente utilisant l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et de morphine marquée fluorescente utilisant le chlorhydrate de 4-amino-fluorescéine.

Les dérivés fluorescents de l'invention sont marqués avec la dichlorotriazinylamino fluorescéine, couramment dénommée DTAF. La DTAF est le produit de réaction de l'aminofluorescéine et du chlorure cyanurique. Dans un article du Journal of Immunological Methods, 13, pages 305-320 (1976), Blakeslee et col. décrivent la DTAF comme un réactif efficace pour conjuguer la fluorescéine aux immunoglobulines (IgG) ayant des poids moléculaires d'au moins 160.000.

La présente invention concerne l'utilisation de la DTAF pour conférer la fluorescence à une grande variété de composés biologiquement intéressants qui, lorsqu'ils sont marqués, peuvent être caractérisés par la formule



dans laquelle X représente un reste biologiquement intéressant ayant un poids moléculaire de moins de 2.000 et ayant au moins un substituant réactif choisi parmi les groupes amino primaires et secondaires et hydroxyle, par lequel ils se fixent à l'atome de carbone du noyau triazine; et Z est choisi parmi la 4-amino-fluorescéine et la 5-amino-fluorescéine fixées par le reste 4-amino ou 5-amino, respectivement, au carbone 2 du noyau triazine.

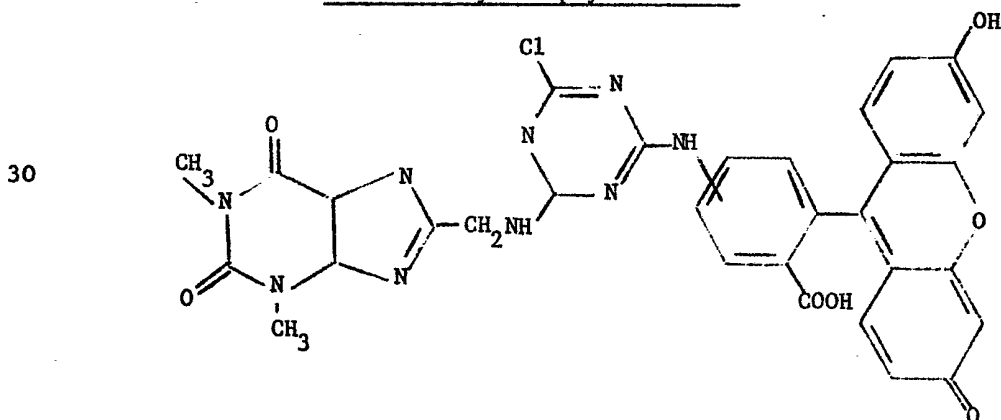
La DTAF peut être facilement préparée selon la technique adoptée par Blakeslee et col. (ci-dessus). L'isomère I de la DTAF est préparé à partir de la 5-amino-fluorescéine, l'isomère II dérive de la 4-amino-fluorescéine.

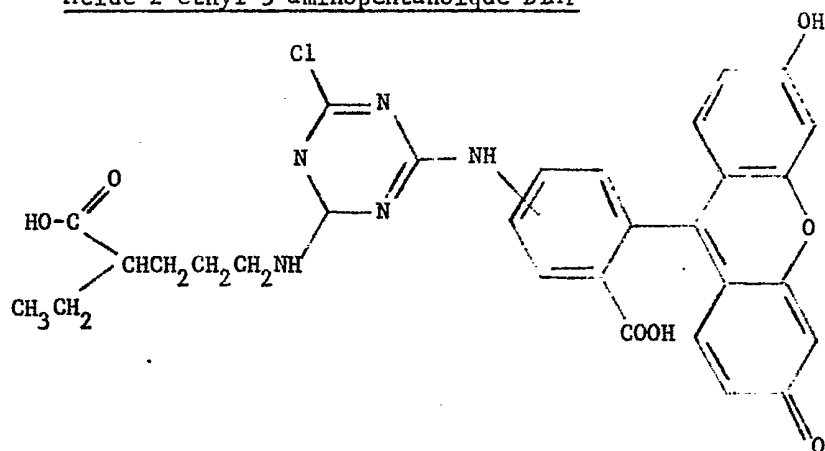
La conjugaison de l'un ou l'autre isomère de la DTAF à des composés intéressants peut être généralement effectuée en dissolvant des quantités molaires égales de DTAF et d'un composé ayant un groupe amino (primaire ou secondaire) ou hydroxyle réactif dans un solvant approprié, tel que l'eau, le méthanol, le diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde. Si l'amine réactive est un sel, on ajoute une base convenable au mélange de réaction pour former la base libre de l'amine réactive. Lorsque la réaction est terminée, on peut purifier les conjugués en utilisant la chromatographie sur couche mince ou sur colonne.

Les composés biologiquement intéressants utilisés selon l'invention doivent avoir au moins un groupe amino primaire ou secondaire ou un groupe hydroxyle par lequel ils peuvent réagir et se fixer sur un atome de carbone du noyau triazine. Le groupe réactif doit être inhérent dans les composés biologiquement actifs comme il l'est dans la quinidine, la procainamide, la thyroxine et les antibiotiques du type aminoglucosides, ou bien il peut être introduit dans le composé par formation d'un dérivé. Des exemples de composés biologiques qui nécessitent la formation de dérivés amino avant que l'on puisse préparer les conjugués de DTAF comprennent la théophylline, l'acide valproïque, le phénobarbital, la phénytoïne, la primidone, la disopyramide, la digoxine, le chloramphénicol, l'aspirine, l'acétaminophène, la carbamazépine, la désipramine et la nortriptyline.

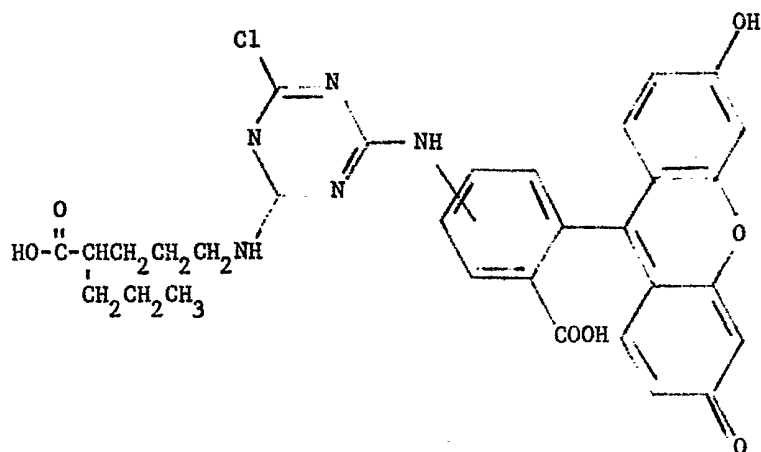
Les structures illustrant les composés préférés de l'invention comprennent les suivantes :

8-aminométhylthéophylline-DTAF



Acide 2-éthyl-5-aminopentanoïque-DTAF

et

Acide 2-propyl-5-aminopentanoïque-DTAF

Les exemples suivants illustrent la préparation de conjugués spécifiques de DTAF selon l'invention. On notera que, dans les exemples suivants, la DTAF peut être l'un ou l'autre des isomères, sauf indication spéciale.

EXEMPLE 1Gentamicine-DTAF

On dissout 200 mg de sulfate de gentamicine dans 1 ml d'eau distillée. On ajuste le pH à 9,0 par environ 0,8 ml d'hydroxyde de sodium 1,0M. On dissout 20 mg de DTAF dans 1,5 ml de méthanol, on ajoute goutte à goutte à la solution de gentamicine en agitant et on laisse réagir pendant 1 h. On ajoute le mélange de réaction à une colonne de DEAE-cellulose de granulométrie moyenne et on élue la gentamicine-DTAF résultante par le tampon au phosphate 0,1M à pH 8,0.

10

EXEMPLE 2Tobramycine-DTAF

On dissout 250 mg de tobramycine dans 2 ml de tampon au carbonate 0,1M à pH 9,0. On dissout 20 mg de DTAF dans 1 ml de méthanol et on ajoute à 1 ml de la solution de tobramycine. Après environ 5 min, on purifie le mélange de réaction par application sur une colonne de 20 ml de DEAE-cellulose et on équilibre avec le tampon au phosphate 0,1M à pH 8,0. On élue le produit de réaction avec le même tampon.

EXEMPLE 320 Amikacine-DTAF

On dissout 24 mg d'amikacine dans 0,2 ml d'eau et on met en suspension 4,5 mg de DTAF dans 0,2 ml de méthanol. On ajoute la suspension méthanolique de DTAF à la solution d'amikacine en agitant. Les petites particules de DTAF se dissolvent rapidement, de sorte que le mélange de réaction n'est pas agité. Après 30 min, on applique le mélange de réaction sur une colonne de 17 ml de DEAE-cellulose équilibrée avec le tampon au phosphate 0,1M à pH 8,1. Le produit de réaction est élué avec le même tampon.

EXEMPLE 530 Déséthyl-N-acétyl-procaïnamide-DTAF

On dissout 1,79 g d'acide para-acétamidobenzoïque et 1,15 g de N-hydroxysuccinimide dans 15 ml de pyridine. On ajoute

- ensuite 2,3 g de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et on dissout. On refroidit le mélange de réaction au réfrigérateur pendant 2 h et ensuite on filtre. On rince les cristaux avec environ 2 ml d'acétone. On ajoute 0,88 g de N-éthyléthylènediamine au filtrat combiné pyridine-
5 acétone. On agite le mélange pendant 2 h et ensuite on refroidit au réfrigérateur pendant environ 24 h. On filtre les cristaux résultants et on les rince à l'acétone. On obtient 2,0 g de cristaux que l'on dissout dans 50 ml d'eau distillée et on ajuste la solution à pH 10 par une solution d'hydroxyde de sodium 6N. On sépare par filtration
10 un précipité blanc et on sèche dans un exsiccateur. Le conjugué de DTAF est formé en dissolvant des quantités molaires égales de déséthyl-N-acétylprocaïnamide et de DTAF dans le méthanol. La réaction est terminée en environ 10 min. On effectue la purification par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant
15 un mélange chloroforme-acétone (1:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 5

N-p-Acétamidobenzoyléthylènediamine-DTAF

- On répète le mode opératoire de l'exemple 4 en utilisant 0,9 g d'éthylènediamine au lieu de N-éthyléthylènediamine. On agite
20 le mélange de réaction pendant 1 h et on le refroidit pendant 1 h 30 min. On filtre le précipité et on le rince à l'acétone. On prépare le conjugué de DTAF de la même manière qu'à l'exemple 4, mais en utilisant le méthanol comme solvant de développement.

EXEMPLE 6

25 N-p-Acétamidobenzoyl-N'-éthyl-N'-aminoacétyléthylènediamine-DTAF

- On dissout 1,25 g de déséthyl-N-acétylprocaïnamide de l'exemple 4 et 0,8 g de chlorure de chloroacétyle dans 25 ml d'acétone et on chauffe au reflux pendant 2 h. Après reflux, on filtre le mélange et on évapore le filtrat à siccité. On dissout
30 le résidu jaune du filtrat et 0,75 g d'iodure de sodium dans 20 ml d'acétone et on chauffe au reflux pendant 1 h. On filtre la solution et on évapore le filtrat à siccité. On dissout le résidu rouge dans 20 ml de méthanol. On ajoute à la solution 20 ml d'hydroxyde d'ammo-

nium concentré et on chauffe au reflux pendant 1 h 30 min. Après refroidissement, on extrait le mélange deux fois par 20 ml de chloroforme. On sèche les extraits combinés sur sulfate de sodium, on filtre et on évapore. On prépare le conjugué de DTAF de la même
5 manière qu'à l'exemple 4 et on le purifie par chromatographie sur couche mince (chloroforme-acétone (1:1)).

EXEMPLE 7

Amino-primidone-DTAF

On dissout 1,1 g de primidone dans 10 ml d'acide
10 sulfurique concentré. On ajoute lentement au mélange de réaction sans refroidir une autre solution de 1 ml d'acide nitrique concentré et 2 ml d'acide sulfurique concentré. On agite ensuite le mélange à la température ambiante pendant 45 min et on verse le mélange de réaction sur 50 ml de glace et on filtre les cristaux de para-nitro-
15 primidone et on rince à l'eau. On obtient 1,17 g de cristaux, F. 225-228°C, que l'on dissout dans 200 ml d'éthanol chaud. On ajoute 1,5 g de poudre de fer et 100 ml d'eau. On chauffe le mélange à l'ébullition, on ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique concentré et on chauffe le mélange au reflux pendant 2 h. On filtre le mélange à chaud et
20 on évapore le filtrat à siccité. On dissout le résidu dans l'éthanol à 100% et on précipite par addition d'éther éthylique. On filtre le précipité pour obtenir 0,8 g de cristaux hygroscopiques bruns. On forme le conjugué de DTAF en dissolvant 5 mg de DTAF et 5 mg des cristaux bruns dans 0,5 ml de méthanol. La réaction est terminée
25 en 10 min et on purifie le conjugué par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant comme solvant de développement le mélange chloroforme-méthanol (3:1). La purification finale est effectuée par chromatographie sur couche mince en utilisant le mélange chloroforme-méthanol (2:1).

30

EXEMPLE 8

Acide 2-éthyl-5-aminopentanoïque-DTAF

On dissout 7,5 g de delta-5-valérolactame dans 60 ml de tétrahydrofurane sec sous atmosphère d'azote sec et on ajoute, goutte à goutte, au ballon de réaction 90 ml de n-butyllithium 1,6M

dans l'hexane et on refroidit dans un bain de neige carbonique-acétone. Après avoir ajouté tout le n-butyllithium, on agite le mélange de réaction à la température ambiante pendant 1 h, on chauffe au reflux pendant 30 min et on refroidit à la température ambiante
5 (toujours sous atmosphère d'azote sec). On ajoute lentement au ballon de réaction 8,0 g de 1-bromoéthane en refroidissant le ballon au bain de glace. On agite ensuite le mélange pendant 16 h à la température ambiante et ensuite on ajoute lentement 100 ml d'eau. On agite ce mélange à la température ambiante pendant 30 min et on
10 sépare la couche organique. On extrait la couche aqueuse par 50 ml d'éther éthylique, on combine les couches organiques et on sèche sur sulfate de sodium. On évapore le solvant pour obtenir une huile foncée qui cristallise au repos et que l'on recrystallise dans l'éther de pétrole pour obtenir 3,8 g de produit. On chauffe au
15 reflux 2,8 g de ce produit dans 25 ml d'acide chlorhydrique 6N pendant 6 h. On évapore l'eau pour obtenir une huile épaisse foncée. On forme le conjugué de DTAF en dissolvant des quantités équimolaires d'acide 2-éthyl-5-aminopentanoïque et de DTAF dans le méthanol. La réaction est terminée en environ 10 min. On purifie le produit par chromato-
20 graphie sur couche mince de gel de silice avec le mélange chloroforme-méthanol (3:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 10

D-Thyroxine-DTAF

On dissout 5 mg de DTAF dans 0,5 ml de méthanol. On
25 ajoute 5 mg de D-thyroxine et ensuite on ajoute goutte à goutte du diméthylsulfoxyde jusqu'à ce qu'il se forme une solution transparente. On ajoute deux gouttes de triéthylamine et un conjugué se forme après environ 16 h. On purifie le produit par chromatographie sur gel de silice en utilisant le mélange chloroforme-méthanol (3:1)
30 comme solvant de développement.

EXEMPLE 11

L-Thyroxine-DTAF

On prépare ce conjugué en suivant le mode opératoire de l'exemple 10, mais en utilisant la L-thyroxine.

EXEMPLE 123,3',5-Triiodo-L-thyronine-DTAF

On prépare ce conjugué en suivant le mode opératoire de l'exemple 10, mais en utilisant la 3,3',5-triiodo-L-thyronine.

EXEMPLE 135 5-Amino-dibenzocycloheptane-DTAF

On dissout les ingrédients suivants dans 50 ml de méthanol : 8,00 g d'acétate d'ammonium, 630 mg de cyanoborohydrure de sodium et 2,10 g de 10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptène-5-one. On chauffe la solution au reflux pendant 24 h et ensuite on évapore à siccité. Il reste un résidu marron que l'on dissout dans 25 ml d'acide chlorhydrique 2N et on extrait deux fois par 25 ml de dichlorométhane. On ajoute à la phase aqueuse de l'hydroxyde de sodium 6N jusqu'à ce que le pH atteigne 14. Il commence à se former une huile brune et on refroidit la solution au congélateur pendant 15 16 h. On évapore toute l'eau et on reprend le résidu dans le méthanol et on filtre. On évapore le filtrat pour obtenir un résidu blanc. On forme le conjugué de DTAF en dissolvant des quantités équimolaires de DTAF et du résidu blanc dans le méthanol. On purifie le produit par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant 20 le mélange chloroforme-acétone (1:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 14Dibenzosubéronehydrazone-DTAF

On chauffe au reflux 10 g de 10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cycloheptène-5-one et 18 g de diméthylhydrazine pendant 24 h 25 dans l'éthanol à 100%. On ajoute 100 ml d'eau distillée et on extrait la solution jaune par l'éther éthylique jusqu'à ce que les extraits soient incolores. On lave les extraits éthérés combinés avec 25 ml d'acide chlorhydrique 2N. On sèche ensuite la phase organique sur sulfate de sodium et on l'évapore. Le résidu est une 30 huile orangée épaisse, la dibenzosubéronediméthylhydrazone. On chauffe au reflux 2,0 g de ce produit pendant 12 h avec 3 g d'hydrazine dans 10 ml d'éthanol à 100%. On verse le mélange de réaction sur 10 ml d'eau glacée, puis on extrait deux fois par 25 ml

d'éther éthylique. On sèche les extraits étherés combinés sur sulfate de sodium et on évapore à siccité pour obtenir une huile jaune, la dibenzosubéronehydrazone. On prépare le conjugué de DTAF de la même manière qu'à l'exemple 13, mais en utilisant le mélange
5 chloroforme-méthanol (3:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 15

5-(γ -Aminopropylidène)-5H-dibenzo[a,d]-10,11-dihydro-cycloheptène-DTAF

On prépare le 5-(γ -bromopropylidène)-5H-dibenzo[a,d]-10,11-dihydro-cycloheptène et son précurseur, le 5-cyclopropyl-5-
10 hydroxy-5H-dibenzo[a,d]dihydrocycloheptène, par le mode opératoire décrit dans Journal Organic Chemistry, volume 27, pages 4134-4137 (1962) par R.D. Hoffsoner, D. Taub, et N.L. Wendler. On suit le mode opératoire (b) pour la préparation du produit final, le
15 5-(γ -bromopropylidène)-5H-dibenzo[a,d]-10,11-dihydrocycloheptène, en remplaçant le composé chloropropylidène par le composé bromopropylidène. On forme le conjugué de DTAF en dissolvant des quantités équimolaires de DTAF et de l'amine dans le méthanol. On ajoute un excès de triéthylamine et la réaction est terminée en 30 min. On purifie le produit de réaction par chromatographie sur couche mince
20 de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme-méthanol (2:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 16

N-Aminoacétyliminostilbène-DTAF

On dissout 6,0 g d'iminodibenzyle dans 30 ml de chloro-
25 forme. On ajoute 6 ml de chlorure de chloroacétyle et on chauffe le mélange au reflux pendant 45 min. On ajoute 60 ml d'eau et on agite le mélange pendant 30 min à la température ambiante. On sépare la couche chloroformique et on sèche sur sulfate de sodium et on évapore à siccité. On dissout le résidu dans 25 ml d'acétone et on ajoute
30 une solution de 4,5 g d'iodure de sodium dans 25 ml d'acétone. On chauffe ce mélange au reflux pendant 30 min, on ajoute 100 ml d'eau, et on extrait le produit de réaction deux fois par 50 ml de chloroforme et on évapore à siccité. On dissout le résidu dans 40 ml de méthanol. On ajoute 60 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré et on

chauffe le mélange au reflux pendant 1 h. On évapore la solution à siccité et on reprend le résidu dans 100 ml de chloroforme et on lave deux fois par 30 ml d'acide chlorhydrique 2N. On sèche la phase organique sur sulfate de sodium et on évapore à siccité. On prépare le conjugué de DTAF en dissolvant 5 mg de DTAF et 5 mg de l'amine dans 0,5 ml de méthanol. Le conjugué se forme en 10 min et on le purifie de la même manière qu'à l'exemple 13.

EXEMPLE 17

N-Aminoacétyldésipramine-DTAF

On dissout 1,33 g de chlorhydrate de désipramine et 0,80 g de chlorure de chloroacétyle dans 25 ml de chloroforme. On chauffe au reflux pendant 2 h, ensuite on évapore le chloroforme. On dissout le résidu dans 25 ml d'acétone. On ajoute 0,75 g d'iodure de sodium et on chauffe la solution au reflux pendant 30 min. On filtre la solution et on rince le sel précipité à l'acétone. On évapore le filtrat acétonique et on reprend le résidu dans 20 ml de méthanol. On ajoute 20 ml d'hydroxyde d'ammonium concentré et on chauffe la solution au reflux pendant 1 h. On extrait le mélange de réaction trois fois par 25 ml de chloroforme et on sèche les extraits combinés sur sulfate de sodium, on filtre et on évapore. On prépare le conjugué en dissolvant 5 mg de DTAF et 5 mg de l'amine dans 0,5 ml de méthanol. On ajoute environ cinq gouttes de diméthylsulfoxyde pour dissoudre le précipité. La réaction est terminée en 10 min et on purifie le produit en utilisant le mode opératoire de l'exemple 13 avec le mélange chloroforme-méthanol (3:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 18

8-Aminométhyl-théophylline-DTAF

On dissout 10 mg de DTAF et 5 mg de 8-aminométhyl-théophylline dans 0,5 ml de diméthylsulfoxyde. Après 5 min, la réaction est terminée et on purifie le conjugué par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme-acétone (1:1) comme solvant de développement.

EXEMPLE 198-Aminoéthyl-théophylline-DTAF

On utilise le même mode opératoire qu'à l'exemple 18 en remplaçant le dérivé méthylé par la 8-aminoéthyl-théophylline.

5

EXEMPLE 20Quinidine-DTAF

On dissout 5 mg de DTAF et 5 mg de quinidine anhydre dans 0,5 ml de diméthylformamide. Après 16 h, la réaction est terminée et on purifie le conjugué par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme-méthanol (3:1) comme solvant de développement.

Comme mentionné ci-dessus, on peut utiliser les traceurs marqués fluorescents préparés selon l'invention dans divers modes opératoires de détermination immunologique. Les déterminations suivantes illustrent le caractère approprié de l'échantillonnage représentatif de ces traceurs dans les déterminations par polarisation de fluorescence.

Dans tous les exemples, on suit le même mode opératoire de base :

20

1) on introduit dans un tube à essais un faible volume de sérum standard ou d'essai et on dilue par le tampon;

2) on ajoute ensuite dans chaque tube un faible volume du traceur fluorescent concentré contenant un tensio-actif;

3) on ajoute enfin un volume d'antisérum dilué; et

25

4) on fait incuber le mélange de réaction à la température ambiante.

EXEMPLE 21Détermination de l'acide valproïque, conjugué acide 2-éthyl-5-amino-pentanoïque-DTAF30 Matériel nécessaire :

1) Tampon : phosphate 0,1M, pH 7,5, contenant 0,01% (poids/volume) d'azide de sodium et 0,01% (poids/volume) de γ -globuline de boeuf (BGG).

- 2) Traceur : conjugué acide 2-éthyl-5-aminopentanoïque-DTAF 50×10^{-9} M dans le tampon chlorhydrate de tris 0,1M, pH 7,8, contenant 0,1% (poids/volume) de dodécylsulfate de sodium, 0,01% (poids/volume) de γ -globuline de boeuf et 0,01% (poids/volume) d'azide de sodium.
- 3) Anticorps : antisérum de mouton anti-acide valproïque dilué dans le tampon dans le rapport 1:3,75.
- 4) Echantillons standards ou inconnus : sérum humain (ou autre humeur biologique) contenant de l'acide valproïque dans la gamme de concentrations de 0 à 150 μ g/ml.
- 5) Polarimètre de fluorescence : instrument capable de lire la polarisation de fluorescence d'une solution de fluorescéine 1×10^{-9} M à $\pm 0,001$ unité de polarisation.

Mode opératoire :

- 1) On place 0,75 μ l de l'échantillon standard ou inconnu dans un tube de culture à jeter de 12 x 75 mm. A cet effet, on pipette 20 μ l de l'échantillon standard ou inconnu dans un récipient de pré-dilution, puis 500 μ l de tampon. Ensuite, on pipette 20 μ l d'échantillon dilué dans le tube de culture de 12 x 75, puis 400 μ l de tampon.
- 2) On ajoute dans la cuvette 40 μ l de traceur et 800 μ l de tampon.
- 3) On ajoute dans la cuvette 40 μ l d'antisérum et 800 μ l de tampon. On mélange le contenu de la cuvette et on fait incubé pendant environ 15 min à la température ambiante.
- 4) On lit la polarisation de fluorescence. Le tableau I ci-dessous donne des résultats caractéristiques.

TABLEAU I

	<u>Concentration de l'acide valproïque (μg/ml)</u>	<u>Polarisation</u>
	0	0,217
30	12,5	0,186
	25	0,165
	100	0,099
	150	0,081

La polarisation varie de manière régulière avec la concentration de l'acide valproïque, ce qui permet de tracer une courbe d'étalonnage. Les échantillons inconnus sont traités de manière identique; à partir de la polarisation de fluorescence de l'échantillon inconnu, on peut déterminer la concentration de l'acide valproïque dans l'échantillon inconnu en se reportant à la courbe d'étalonnage.

EXEMPLE 22

Détermination de la gentamicine

10 Matériel :

- 1) Tampon : (voir détermination de l'acide valproïque).
- 2) Traceur : conjugué gentamicine-DTAF 100 nM dans un tampon au chlorhydrate de tris, pH 7,5, contenant 0,125% de dodécylsulfate de sodium, 0,01% d'azide de sodium et 0,01% de γ -globuline de boeuf.
- 3) Anticorps : antisérums de lapin ou de mouton anti-gentamicine dilués de manière convenable dans le tampon.
- 4) Échantillons standards ou inconnus : sérum humain (ou autre humeur biologique) contenant de la gentamicine.
- 5) Polarimètre de fluorescence : (voir détermination de l'acide valproïque).

Mode opératoire :

- 1) On place 1,8 μ l de l'échantillon standard ou inconnu dans un tube de culture à jeter de 12 x 75 mm (cuvette). A cet effet, on pipette 20 μ l de l'échantillon, puis 200 μ l de tampon. On pipette ensuite 20 μ l de l'échantillon dilué dans la cuvette, puis 200 μ l de tampon.
- 2) On ajoute dans la cuvette 40 μ l de traceur et 1000 μ l de tampon.
- 3) On ajoute 40 μ l de l'anticorps et 1000 μ l de tampon, on mélange le contenu de la cuvette et on la fait incubé pendant environ 15 min à la température ambiante.
- 4) On lit la polarisation de fluorescence après l'incubation. Le tableau II ci-dessous donne des résultats caractéristiques obtenus.

TABLEAU II

	<u>Concentration de la gentamine ($\mu\text{g/ml}$)</u>	<u>Polarisation</u>
	0	0,178
	0,5	0,158
5	1,0	0,140
	2,0	0,115
	4,0	0,090
	8,0	0,074

La polarisation varie de manière régulière, ce qui permet de tracer une courbe d'étalonnage. Les échantillons inconnus sont traités de manière identique et on détermine la teneur en gentamicine en se reportant à la courbe d'étalonnage. Le présent exemple illustre l'intérêt du traceur gentamicine-DTAF pour déterminer la concentration de gentamicine dans des échantillons biologiques.

EXEMPLE 23Détermination du N-acétyl-procaïnamideMatériel nécessaire :

- 1) Tampon : (voir détermination de l'acide valproïque).
- 20 2) Traceur : conjugué déséthyl-N-acétyl-procaïnamide-DTAF à une concentration de $50 \times 10^{-9} \text{ M}$ dans une solution à 5,75% (poids/volume) de toluènesulfonate de sodium.
- 3) Antisérum : antisérum de lapin anti-N-acétyl-procaïnamide dilué dans le tampon dans le rapport 1:6.
- 25 4) Echantillons standards ou inconnus : sérum humain (ou autre humeur biologique).
- 5) Polarimètre de fluorescence : (voir détermination de l'acide valproïque).

Mode opératoire :

- 30 1) On place 0,48 μl d'échantillon standard ou inconnu dans une cuvette en pipettant 10 μl de l'échantillon dans un récipient de prédilution et en mélangeant avec 200 μl de tampon. On pipette

ensuite 10,ul de l'échantillon dilué dans la cuvette puis 200,ul de tampon.

2) On ajoute dans la cuvette 40,ul de traceur et 1000,ul de tampon.

5 3) On ajoute ensuite dans la cuvette 40,ul d'antisérum et 1000,ul de tampon. On mélange le contenu de la cuvette et on fait incuber à la température ambiante pendant environ 15 min.

3) On lit la polarisation de fluorescence après la période d'incubation de 15 min. Le tableau III ci-dessous illustre
10 des résultats caractéristiques pour le N-acétyl-procaïnamide.

TABLEAU III

	<u>N-Acétyl-procaïnamide</u> (,ug/ml)	<u>Polarisation</u>
	0	0,239
	1	0,218
15	2	0,209
	4	0,190
	8	0,173
	16	0,158

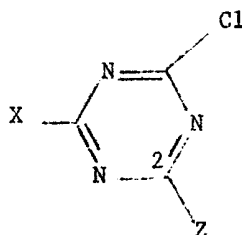
On peut tracer une courbe d'étalonnage à partir des
20 données du tableau III ci-dessus. Les échantillons inconnus sont traités de manière identique aux échantillons standards et on peut les quantifier en se reportant à la courbe d'étalonnage, ce qui illustre l'intérêt du conjugué déséthyl-N-acétyl-procaïnamide-DTAF pour la détermination du N-acétyl-procaïnamide dans les humeurs
25 biologiques.

Il est entendu que l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation préférés décrits ci-dessus à titre d'illustration et que l'homme de l'art pourra y apporter des modifications sans sortir du cadre de l'invention.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Composé biologiquement intéressant rendu fluorescent par marquage par la dichlorotriazinyl-aminofluorescéine, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale

5



10 dans laquelle X représente un reste biologiquement intéressant ayant un poids moléculaire de moins de 2.000 et au moins un substituant réactif choisi parmi les groupes amino primaires et secondaires et hydroxyle, par lequel il se fixe à l'atome de carbone 2 du noyau triazine; et Z est choisi parmi la 4-aminofluorescéine et la 5-amino-
15 fluorescéine fixées par le reste 4-amino ou 5-amino, respectivement, au carbone 2 du noyau triazine.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est un antibiotique du type aminoglycoside.

3. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce
20 que l'aminoglycoside est la gentamicine.

4. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'aminoglycoside est la tobramycine.

5. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'aminoglycoside est l'amikacine.

25 6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est l'amino-phénobarbital.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est le déséthyl-N-acétylprocaïnamide.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
30 que X est la N-para-acétamidobenzoyléthylènediamine.

9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la N-acétamidobenzoyl-N'-éthyl-N'-aminoacétyléthylènediamine.
10. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la para-aminoprимidone.
- 5 11. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est l'acide 2-éthyl-5-aminopentanoïque.
12. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la D-thyroxine.
13. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
10 que X est la L-thyroxine.
14. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est l'acide 2-propyl-5-aminopentanoïque.
15. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la 3,3',5-triiodo-L-thyronine.
- 15 16. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la 2-(2-aminoéthyl)-5,5-diphénylhydantoïne.
17. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la 8-aminométhyl-théophylline.
18. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
20 que X est la 8-(2-aminoéthyl)-théophylline.
19. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est la quinidine.