



(51) Classification internationale des brevets :  
*C07D 263/42* (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)  
*A61K 31/421* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)  
*A61K 49/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2013/071430

(22) Date de dépôt international :  
14 octobre 2013 (14.10.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1259941 18 octobre 2012 (18.10.2012) FR

(71) Déposants : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE DU MAINE [FR/FR]; Avenue Olivier Messiaen, F-72000 Le Mans (FR).

(72) Inventeurs : FONTAINE, Laurent; 102 Grande Rue, F-72000 Le Mans (FR). HO, The Hien; 36 rue de la Pelouse, Appt.7, F-72000 Le Mans (FR). PASCUAL, Sagrario; 11 rue de l'Ormeau, F-72000 Le Mans (FR). MONTEMBault, Véronique; 5 avenue Louis Cordelet, F-72000 Le Mans (FR).

(74) Mandataire : PONTET ALLANO & ASSOCIES; Parc Les Algorithmes, Bâtiment PLATON, CS 70003 SAINT AUBIN, F-91192 Gif sur Yvette Cedex (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

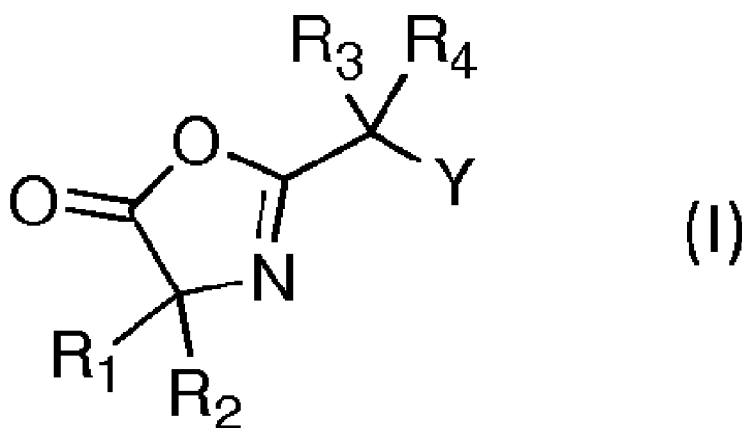
Publiée :

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

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : MULTIFUNCTIONAL COUPLING REAGENTS HAVING AN AZLACTONE FUNCTION

(54) Titre : REACTIFS DE COUPLAGE MULTIFONCTIONNELS A FONCTION AZLACTONE



(57) Abstract : The present invention relates to novel compounds, having an azlactone function, of formula (I), to be used as multi-functional coupling agents, and to a method for coupling a biomolecule and a target molecule using such a compound. The invention further relates to a diagnosis reagent, to a kit for implementing the coupling method, to a method for separating, detecting and/or characterizing at least one molecule of interest, and to a composition including a compound according to the invention.

(57) Abrégé : Réactifs de couplage multifonctionnels à fonction azlactone La présente invention concerne de nouveaux composés à fonction azlactone de formule générale (I) destinés à être utilisés comme agents de couplage multifonctionnels ainsi qu'un procédé de couplage entre une biomolécule et une molécule cible mettant en oeuvre un tel composé. Elle concerne en outre un réactif de diagnostic, un kit pour la mise en oeuvre dudit procédé de couplage, un procédé de séparation, de détection et/ou de caractérisation d'au moins une molécule d'intérêt, et une composition comprenant un composé selon l'invention.



- 
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

## Réactifs de couplage multifonctionnels à fonction azlactone

La présente invention a pour objet de nouveaux composés multifonctionnels, et leur utilisation en chimie click dans un procédé de couplage entre une biomolécule et une molécule cible.

Le domaine de l'invention est la conception et la synthèse de molécules possédant au moins deux fonctions chimiques réactives distinctes permettant de réaliser des réactions de chimie dite « click » entre des biomolécules renfermant des groupements amine primaire telles que des protéines, des acides nucléiques ou certains polysaccharides.

Il existe à l'heure actuelle une très forte demande dans le domaine de la bioconjugaison ou ligation de biomolécules avec des polymères naturels ou synthétiques, en raison des applications potentielles de tels bioconjugués en biologie, biochimie, biotechnologies et nanomédecine.

L'immense complexité et diversité de la vie représente un énorme défi pour les scientifiques tentant de découvrir sa base chimique. Le décryptage de la composition génétique de différents organismes n'est pas complètement utile si elle n'est pas accompagnée par la connaissance de la fonction des protéines encodées. La bioconjugaison qui consiste à coupler deux biomolécules par une liaison covalente est un moyen d'atteindre ce but.

En particulier, la bioconjugaison représente une approche intéressante pour comprendre la régulation et la fonction biologique de certaines protéines et certains biopolymères par la fixation de ligands. Cette approche consiste à accrocher à des molécules d'intérêt biologique de petites molécules synthétiques ou naturelles qui peuvent fonctionner comme des sondes pour suivre la fixation du ligand. De telles sondes incluent par exemple des molécules fluorescentes, la biotine et des sondes de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Cette technique offre la possibilité de tester rapidement un grand nombre de ligands potentiels. Une autre approche consiste à introduire des groupements fonctionnels synthétiques sur des biomolécules, étape suivie par leur immobilisation sur des surfaces par une réaction chimiosélective. La biomolécule immobilisée

peut être exposée ensuite à différentes molécules pour identifier ses ligands. Les puces à ADN et les puces à protéines sont des exemples courants d'une telle approche.

La bioconjugaison permet également des essais biochimiques, des applications de diagnostic par la détection qualitative et quantitative d'analytes dans des échantillons cliniques, des applications dans le domaine de l'imagerie *in vivo*, par exemple par la fixation d'agents de contraste conjugués à des anticorps, et l'utilisation d'enzymes immobilisées utilisées comme catalyseurs industriels. D'autres molécules moins courantes utilisées en bioconjugaison sont les oligosaccharides, les polymères synthétiques comme le polyéthylèneglycol (PEG), et les nanotubes de carbone.

La difficulté à contourner dans les réactions de bioconjugaison est la perte de la fonction biologique de la molécule cible à cause d'un mauvais contrôle du site où a lieu la modification. Les méthodes de bioconjugaison développées récemment sont plus spécifiques à un site et entraînent des perturbations minimales au niveau de la forme active de la biomolécule. De plus, certaines biomolécules immobilisées peuvent présenter une capacité de fixation de ligand accrue.

Les procédés de bioconjugaison chimique les plus courants reposent sur des résidus cystéine ou lysine. Des méthodes plus récentes emploient aussi des groupes fonctionnels synthétiques, comme les oléfines.

La dérivation de protéines par un groupe thiolate d'un résidu cystéine est une méthode usuelle de bioconjugaison, car les thiolates sont des nucléophiles potentiels en solution aqueuse. Des groupes fonctionnels thiol-réactifs incluent les iodoacétamides, les maléimides et les disulfures. A titre d'exemple, les iodoacétamides sont utilisés assez classiquement dans des tests de détermination de la présence de cystéines libres dans les protéines. Plus récemment, des groupes iodoacétamides ont été utilisés pour marquer des protéines avec des fluorophores, ou pour immobiliser des protéines.

Les liaisons amides ayant une grande stabilité, ce sont des cibles de choix pour la bioconjugaison. Par exemple, une protéine peut être traitée avec une petite molécule ou surface présentant une liaison ester activée pour former une liaison amide avec les groupes amines des lysines et des

extrémités N-terminales. La ligation chimique native et la ligation Staudinger sont deux approches récentes pour générer des liaisons amides à des sites spécifiques d'une protéine donnée.

Une autre cible pour la bioconjugaison est la synthèse aisée de doubles liaisons carbone-azote par condensation de bases azotées avec des aldéhydes ou des cétones dans des solutions aqueuses à pH neutre. On peut ainsi synthétiser des oximes ( $C=N-O$ ) et des hydrazones ( $C=N-N$ ) qui sont plus stables que de simples imines ( $C=N$ ). Ainsi, les glucides sont susceptibles d'être modifiés par des doubles liaisons carbone-azote puisque leurs groupes hydroxyles peuvent être oxydés facilement en aldéhydes. Alternativement, des cétones peuvent être introduites sur des sucres présents à la surface des cellules par biosynthèse. Des sucres immobilisés par des liaisons oxime ont été utilisés pour produire des puces à sucres. De nombreux exemples d'oligonucléotides conjugués par des liaisons oxime ou hydrazone sont donnés dans l'art antérieur. Comme application, on peut citer l'utilisation de puces à peptides par l'immobilisation de peptides permettant la détection d'anticorps dans des échantillons sanguins.

La réaction de cycloaddition de Huisgen en présence d'un catalyseur au cuivre  $Cu(I)$  est l'une des plus utilisées en bioconjugaison. Elle consiste en la réaction entre un alcyne terminal et un azoture générant un triazole disubstitué 1,4. Cette réaction a été utilisée pour de très nombreuses applications, notamment le marquage de protéines avec de petites molécules, l'immobilisation de protéines et de peptides, des applications en protéomique, l'immobilisation de sucres, la fonctionnalisation d'ADN, et la fixation de molécules fluorescentes sur des virus et des polymères bioactifs.

Ces dernières années, l'utilisation de polymères fonctionnalisés avec une fonction azlactone (ou oxazolone) pour la mise au point de matériaux fonctionnels s'est accrue. Du fait que les azlactones peuvent réagir par des réactions d'ouverture de cycle avec une grande diversité d'espèces nucléophiles, comme les amines primaires, les groupes hydroxyles, et les fonctions thiols, les matériaux fonctionnalisés avec une fonction azlactone peuvent servir de plateformes réactives pour l'introduction post-synthèse ou post-fabrication d'une large gamme de fonctions chimiques à des polymères

solubles, des supports insolubles et des surfaces. La réactivité de ce cycle électrophile est telle qu'une réaction d'ouverture conduit à la formation d'un lieu (linker) fonctionnel peu réactif. En effet, il est constitué soit de deux liaisons amides si le nucléophile est une amine primaire, soit d'une liaison amide et d'une liaison ester si le nucléophile est un alcool, soit d'une liaison amide et d'une liaison thioester si le nucléophile est un thiol. Elles encadrent un centre tétrasubstitué très encombré. Le site global constituant le lieu (linker) est donc peu réactif.

La dernière décennie a vu une augmentation importante à la fois du nombre et de la variété d'applications exploitant les propriétés et la réactivité de tels polymères fonctionnalisés. Diverses études ont montré l'intérêt des supports à fonction azlactone tels que des supports solubles, des films, des monolithes et des supports insolubles sous forme de billes. Les applications de ces supports, en relation avec la composition et la morphologie du support, restent toutefois limitées et se résument principalement à l'immobilisation d'enzymes, de catalyseurs, de ligands ou au piégeage d'amines.

Par exemple, concernant les monolithes, deux applications possibles, en lien avec leur structure, ont été mises en avant : les monolithes hydrophiles sont utilisés en milieu aqueux pour immobiliser des enzymes comme la trypsine ou l'albumine bovine sérique (BSA) et les monolithes hydrophobes sont utilisés pour le piégeage d'amines en milieu organique. De la même manière que pour les monolithes, les supports réticulés insolubles à fonctionnalité azlactone sous forme de billes présente deux applications majeures : l'immobilisation d'enzymes et le piégeage d'amines. Ainsi SOLA J. et al. (Angew. Chem. Int. Ed., 2010, 49, 6836-6839) divulguent des azotures qui sont utilisés pour étudier les modifications des structures en hélice d'oligomères peptidomimétiques à base d'acide aminoisobutyrique (Aib). La demande internationale WO 2004/081538 décrit des azlactones qui sont utilisées comme intermédiaires pour la synthèse d'homopolymères polyoxazolone aptes à être conjuguées avec différents agents actifs et la demande internationale WO 93/25594 décrit des groupes azlactones fixés sur des supports et utilisés pour fixer des agents actifs.

Dans la recherche thérapeutique actuelle, de nouvelles méthodologies ont été développées pour accéder plus rapidement à une grande diversité de composés. En particulier, la ligation chimique par chimie « click » a été proposée par Sharpless en 2001 (H.C. Kolb, M.G. Finn et K.B. Sharpless (2001). "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions". *Angewandte Chemie International Edition* **40** (11): 2004–2021) pour générer des structures originales différentes des pharmacophores classiques. Une réaction pourra être considérée comme « click » si elle répond aux critères suivants :

- 10           - modularité
- stéréosélectivité
- insensibilité à l'oxygène et à l'eau
- pureté et rendement élevés.

La chimie « click » permet donc de développer un ensemble de réactions univoques et modulables, pouvant être mises en œuvre dans des conditions douces, sans purification fastidieuse, sans formation de sous-produit, possédant un large spectre de substrats, physiologiquement stables et/ou compatibles avec les milieux biologiques et conduisant avec économie d'atomes à de hauts rendements. Les principales réactions « click » consistent à former des liaisons carbone-hétéroatome énergétiquement très favorables, notamment une réaction nucléophile d'ouverture de cycle ou une réaction de cycloaddition. Un type de réaction largement représentée en chimie « click » est la cycloaddition alcyne-azoture catalysée au Cu(I) mentionnée ci-dessus. Lorsque les réactions « click » sont compatibles avec les fonctions chimiques et les milieux biologiques, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ces réactions sont dites bio-orthogonales.

Bien qu'il existe de nombreux réactifs aptes à être utilisés dans ces réactions de chimie click, il existe un besoin de nouveaux réactifs permettant des réactions efficaces et rapides en milieu aqueux, sans formation de sous-produits difficiles à éliminer et/ou toxiques.

Un but de l'invention est donc de proposer une famille de nouveaux agents réactifs de couplage multifonctionnels utilisables pour l'association par liaisons covalentes de biomolécules telles que des protéines, des

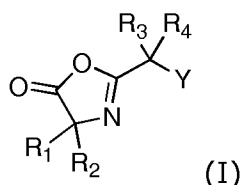
peptides, de l'ADN, certains polysaccharides, avec une ou plusieurs autre(s) biomolécule(s), un polymère naturel ou synthétique, ou une surface réactive. Ces nouveaux composés présentent un intérêt tout particulier pour la chimie « click » appliquée à la biologie et la synthèse chimique.

5 Un autre but de l'invention est également de pallier les inconvénients de l'état de la technique en proposant de nouveaux réactifs de couplage :

- permettant des associations par des processus bio-orthogonaux, à la fois *in vitro* et *in vivo*,
- 10 - dont les fonctionnalités réactives sont également orthogonales entre elles,
- dont la réactivité élevée est compatible avec les milieux biologiques,
- présentant une résistance à l'hydrolyse en milieu aqueux,
- sans formation de sous-produit toxique ou difficile à éliminer,
- applicables à une large gamme de macromolécules biologiques ou
- 15 synthétiques,
- conduisant à des liaisons chimiques robustes et compatibles avec une vaste gamme de fonctionnalités chimiques ainsi qu'avec les milieux biologiques et les organismes vivants, *in vitro* et *in vivo*.

Certains composés répondant à la formule générale (I)

20



dans laquelle

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)cycloalkyle, un groupe aryle, un
- 25 groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, et
- Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans
- 30 le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués,

sont connus en tant que tels mais ne sont pas décrits comme des agents réactifs de couplage multifonctionnels (voir SOLA J. cité précédemment).

Selon la présente invention, le terme « (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle » représente un  
5 groupe hydrocarboné saturé, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 10 atomes de carbone, avantageusement de 1 à 5 atomes de carbone. A titre d'exemple, on peut citer les groupes méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, sec-butyle, tertibutyle, pentyle, néopentyle, isopentyle, tert-pentyle, hexyle, isohexyle, heptyle, octyle, nonyle et décyle.

10 Le terme « aryle » représente un groupe hydrocarboné aromatique mono- ou bicyclique comprenant de 6 à 10 atomes de carbone. A titre d'exemple on peut citer les groupes phényle et naphtyle.

Par le terme « aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle », on entend un groupe alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone, avantageusement de 1 à 5 atomes de  
15 carbone tel que défini précédemment et contenant un groupe aryle tel que défini ci-dessus.

Le terme « groupe hétérocyclique » représente tout hétérocycle saturé ou insaturé, comprenant de 3 à 7 atomes de carbones et contenant un à 3 hétéroatomes choisis dans le groupe constitué par l'oxygène, l'azote  
20 ou le soufre. On peut citer par exemple les groupes pipéridinyle, pyrrolidinyle, pipérazinyle, pyridyle, piridinyle, imidazolyle, furyle, morpholinyle, oxétanyle, tétrahydrofuranyle, tétrahydropyranyle, tétrahydrothiényl, et thiazolyle.

Le terme « azotures » représente les sels de l'acide  
25 azothydrique HN<sub>3</sub>, ainsi que les azotures organiques dans lesquels un des atomes d'azote est lié de façon covalente avec un atome de carbone d'un composé organique. On peut citer comme exemples l'azoture de méthyle et l'azoture de phényle.

Le terme « alcynes » représente les hydrocarbures possédant une  
30 insaturation caractérisée par la présence d'une triple liaison carbone-carbone. On peut citer comme exemples l'éthyne, le propyne, le but-1-yne, et le but-2-yne.

On entend par « cycloalcynes » tout cycle d'atomes de carbone contenant une ou plusieurs triples liaisons, comme le cyclooctyne.

Le terme « diènes conjugués » représente des hydrocarbures possédant deux doubles liaisons séparées par une seule liaison simple. A titre d'exemple, on peut citer le butadiène, l'isoprène, le 2,3-diméthyl-1,3-butadiène, le 1,3-pentadiène, le 2-phényl-1,3-butadiène et le furane.

5

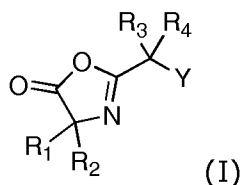
La première fonction chimique commune aux composés répondant à la formule (I) utilisés selon l'invention est de type azlactone (2-oxazolin-5-one). Ce groupement est connu pour réagir par ouverture de cycle avec les fonctions amine primaire sans nécessiter de catalyseur et avec formation  
10 d'un lien amide robuste dans des conditions douces, notamment en solution aqueuse, donc compatibles avec les milieux biologiques. L'intérêt majeur de cette fonction chimique comparée aux systèmes déjà décrits réside, outre sa réactivité intrinsèque conduisant à une réaction rapide et efficace en milieu aqueux grâce à sa résistance à l'hydrolyse, dans le fait que la  
15 réaction avec une amine n'entraîne pas la formation de sous-produit de réaction éventuellement toxique et difficile à éliminer du milieu réactionnel. Les fonctions amines primaires sont très répandues dans la plupart des molécules biologiques (protéines, acides nucléiques notamment) et des molécules d'intérêt biologique, ce qui assure un champ d'application très  
20 large aux réactifs de cette invention. En termes de coût, l'absence de sous-produit généré par réaction du groupe azlactone conduit de plus à une économie d'atomes. De plus, la possibilité de travailler en milieu aqueux est un atout en matière d'environnement.

L'autre fonction commune présente dans les composés répondant à la  
25 formule (I) utilisés selon l'invention correspond à un groupement apte à participer à une réaction de cycloaddition, en particulier les groupes azoture, alcyne, cycloalcyne et diène conjugué. Les réactions de cycloaddition constituent les exemples les plus répandus de chimie click, notamment la réaction de Huisgen citée précédemment, la cycloaddition  
30 [4+2] (réaction de Diels-Alder), et l'hétérocycloaddition. Ces réactions sont bio-orthogonales, c'est-à-dire qu'elles sont compatibles avec les espèces présentes dans les milieux biologiques. Elles mettent en effet en œuvre des groupements fonctionnels qui ne sont en général ni présents, ni susceptibles de réagir avec les groupes existant au sein des biomolécules.

Les deux fonctions chimiques présentes dans les composés selon l'invention sont de plus orthogonales entre elles, c'est-à-dire qu'elles réagissent dans des conditions différentes, indépendamment les unes des autres. Il est ainsi possible de déclencher la réaction de l'un de ces deux

5 groupements sans que l'autre ne soit transformé, permettant ainsi des réactions successives chimiosélectives.

La présente invention a pour objet des composés de formule (I)



dans laquelle

- 10 -  $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe
- 15 aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
- Y représente :
- (i) un groupe  $N_3$ , ou
- (ii) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou
- 20 (iv) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (v) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vii) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou
- (viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10,
- 25 notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5,
- avec  $R_5$  représentant
- (a) soit un atome d'hydrogène,
- (b) soit un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle,
- (c) soit un groupe aryle,
- 30 (d) soit un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle,
- tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle,

(e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.

Dans les définitions (i) à (viii), les termes (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, aryle et aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle renvoient aux définitions données précédemment.

5 Comme exemples de groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, aryle ou aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle, on peut citer notamment le 1,3-butadiènyle, le cyclopentadiènyle, le pyrrolyle et le furyle.

Tous les groupements cités possèdent en commun l'aptitude à donner  
10 une réaction de cycloaddition dipolaire [3+2] ou de cycloaddition ou hétérocycloaddition [4+2].

Les groupes protecteurs de la triple liaison sont bien connus de l'homme du métier. Comme exemples, on peut citer les trialksilyles, notamment le triméthylsilyle, le triéthylsilyle, le tert-butyldiméthylsilyle et  
15 le benzyldiméthylsilyle.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les composés de formule (I) sont ceux pour lesquels R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent chacun un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, R<sub>4</sub>  
20 représente un groupe méthyle, et Y représente soit un groupe N<sub>3</sub>, soit un groupe -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C≡CH.

Avantageusement, les groupes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> représentent chacun un groupe méthyle, R<sub>3</sub> un atome d'hydrogène et Y un groupe N<sub>3</sub>.

25

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>4</sub> désignent chacun un groupe méthyle, R<sub>3</sub> un atome d'hydrogène et Y un groupe -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C≡CH.

30 Un autre objet de l'invention est un procédé de couplage entre une biomolécule et une molécule cible choisie dans le groupe comprenant une molécule d'intérêt biologique, un polymère naturel ou synthétique, et une surface réactive, ledit procédé mettant en œuvre un composé de formule (I) dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
  - $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
  - Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués,
- et comprenant les étapes suivantes :
- mise en contact dudit composé de formule (I) avec une biomolécule,
  - mise en contact dudit composé de formule (I) lié avec la biomolécule avec la molécule cible et si nécessaire,
  - isolement du produit de couplage.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé de couplage met en œuvre un composé formule (I) dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et

Y représente :

- (i) un groupe  $N_3$ , ou
- (ii) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou
- (iv) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (v) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vii) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou
- (viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10, notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5, avec  $R_5$  représentant

- (a) soit un atome d'hydrogène,
  - (b) soit un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle,
  - (c) soit un groupe aryle,
  - (d) soit un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle,
- 5        tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle,
- (e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.

10        Par « surface réactive », on entend un matériau organique ou inorganique possédant à sa surface des fonctions chimiques aptes à réagir avec les molécules de la présente invention. On peut citer par exemple, une surface (film, tissu, ...) de polypropylène ou polyéthylène possédant des fonctions amine en surface.

15        Selon un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, la/les biomolécules mise(s) en jeu dans ledit procédé de couplage sont choisies dans le groupe comprenant des protéines, des peptides, de l'ADN, des marqueurs biologiques, des hormones, des vitamines, des anticorps, des polyamines, des monosaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides, et des molécules d'intérêt  
20        biologique du type médicament comme des anticancéreux, des anti-viraux, ou marqueur comme les marqueurs fluorescents ou radioactifs.

Un autre objet de l'invention est un réactif de diagnostic mettant en œuvre  
25        au moins un composé de formule (I), notamment un composé pour lequel

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome  
30        d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, et

Y représente :

- (i) un groupe N<sub>3</sub>, ou
- (ii) un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyl-N<sub>3</sub>, ou

- (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou  
(iv) un groupe aryl( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyl- $N_3$ , ou  
(v) un groupe ( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou  
(vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou  
5 (vii) un groupe aryl( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou  
(viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10, notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5, avec  $R_5$  représentant
- (a) soit un atome d'hydrogène,  
10 (b) soit un groupe ( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle,  
(c) soit un groupe aryle,  
(d) soit un groupe aryl( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle,  
tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle,  
15 (e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.

L'invention a également pour objet l'utilisation des composés de formule (I) dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe ( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle, un groupe ( $C_2$ - $C_6$ )cycloalkyle, un groupe aryle, un  
20 groupe aryl( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
  - $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe ( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl( $C_1$ - $C_{10}$ )alkyle, et
  - Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans  
25 le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués,
- comme réactif de diagnostic et une méthode de diagnostic mettant en œuvre l'ensemble des composés de formule (I).

En effet, les agents de couplage présentent une utilité dans le  
30 domaine du diagnostic, notamment dans la détection de réactions du type ligand-anti-ligand tel que antigène-anticorps ou protéine-protéine, car ils permettent de coupler directement une molécule d'intérêt biologique, telle qu'un antigène, à une molécule dite de révélation, telle qu'une enzyme. La liaison de la molécule biologique d'intérêt à une autre molécule, telle qu'un

anticorps, est mise en évidence grâce à la molécule de révélation. Il peut être également utile de coupler une sonde fluorescente à une molécule d'intérêt biologique pour sa détection par imagerie fonctionnelle.

- 5 Un autre objet de l'invention est un kit pour la mise en œuvre d'un procédé de couplage et de bioconjugaison comprenant au moins un composé de formule (I), notamment ceux pour lesquels
- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un
  - 10 groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
  - $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
- Y représente :
- 15 (i) un groupe  $N_3$ , ou
  - (ii) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
  - (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou
  - (iv) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
  - (v) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou
  - 20 (vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou
  - (vii) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou
  - (viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10, notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5, avec  $R_5$  représentant
- 25 (a) soit un atome d'hydrogène,
  - (b) soit un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle,
  - (c) soit un groupe aryle,
  - (d) soit un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle,
- tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons
- 30 conjuguées, éventuellement dans un cycle,
  - (e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.
- .

Un autre objet de l'invention est un procédé de séparation, de détection et/ou de caractérisation d'au moins une molécule d'intérêt susceptible d'être présente dans un milieu, comprenant au moins une étape de mise en œuvre d'un kit selon l'invention ou d'au moins un composé de

5 formule (I) dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome
- 10 d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
- Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués,

15 Un autre objet de l'invention est une composition comprenant un composé de formule (I) dans lequel

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- 20 -  $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et

Y représente :

- (i) un groupe  $N_3$ , ou
- 25 (ii) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou
- (iv) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (v) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- 30 (vii) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou
- (viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10, notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5, avec  $R_5$  représentant

(a) soit un atome d'hydrogène,

(b) soit un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle,

(c) soit un groupe aryle,

(d) soit un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle,

tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle,

(e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.

en association avec un milieu aqueux ou organique.

Comme milieu organique, on peut citer par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO) compatible avec les cultures cellulaires.

L'invention est illustrée par les exemples 1 à 6 et la figure 1 qui suivent.

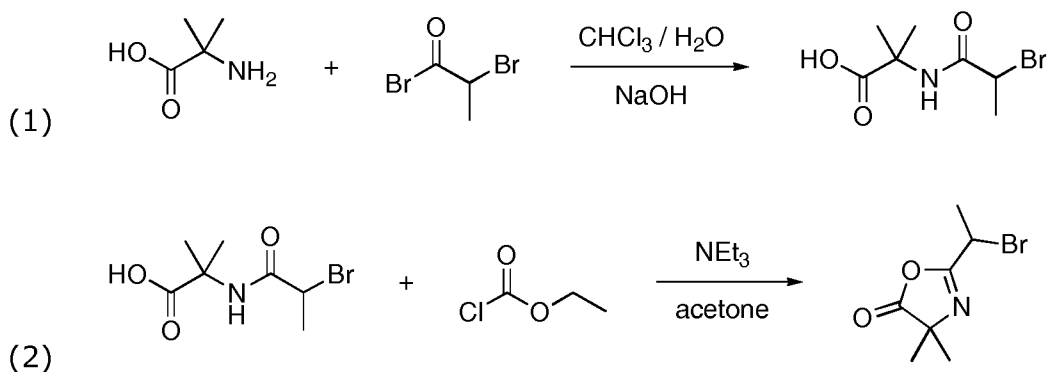
Les exemples 1, 2 et 4, 5 illustrent la synthèse de composés selon l'invention et les exemples 3 et 6 le procédé de couplage entre un composé de l'invention et une biomolécule : le lysosyme.

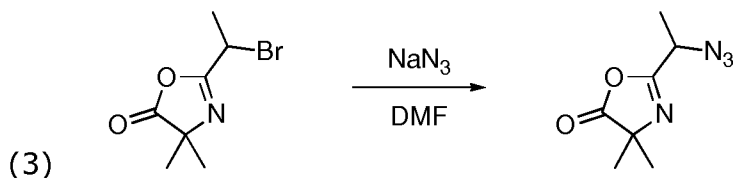
La figure 1 représente le spectre d'analyse MALDI-TOF du conjugué lysozyme-2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one obtenu selon le procédé de couplage décrit dans l'exemple 3.

### **Exemple 1 : 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one**

La 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one est préparée selon le schéma 1 ci-dessous.

Schéma 1





#### 1.1. 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one :

Cet intermédiaire de synthèse est préparé selon la procédure décrite par K.M. Lewandowski *et al.* dans le brevet US 6 762 257 B1 (étapes 1 et 2 du schéma 1)

#### 1.2. 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one.

La 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one est ensuite obtenue (étape 3) selon le protocole ci-dessous.

Dans un ballon d'une contenance de 25 mL muni d'un barreau aimanté, on prépare sous atmosphère d'argon une solution de 0,65 g (0,01 mol) d'azoture de sodium dans 4 mL de diméthylformamide (DMF) anhydre que l'on refroidit à l'aide d'un bain de glace. On verse goutte-à-goutte sur ce mélange une solution comprenant 2,20 g, (0,01 mol) de 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one, préparée à l'étape 1.1., dans 2 mL de DMF anhydre et on laisse sous agitation pendant 2 h à 0°C. On laisse revenir à température ambiante sous agitation pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par l'acétate d'éthyle puis la solution est filtrée pour éliminer le bromure de sodium. Le filtrat est versé dans une ampoule à décanter et la solution est lavée avec HCl dilué (5%) puis NaHCO<sub>3</sub> aqueuse saturée. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée sous vide. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice avec successivement le n-hexane puis un mélange n-hexane : acétate d'éthyle 8:2 v/v pour fournir une huile (0,57 g, 31%) qui cristallise au froid.

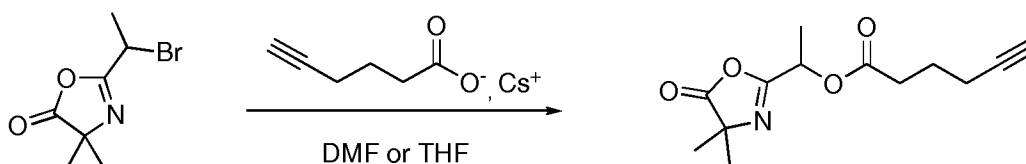
La 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one est caractérisée par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN <sup>1</sup>H) et par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,46 ppm (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,56 ppm (d, 3H, -CH(CH<sub>3</sub>)N<sub>3</sub>), 4,27 ppm (t, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)N<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 16,32 ppm ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24,46 ppm ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 53,76 ppm ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 65,59 ppm ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 161,56 ppm ( $\text{C}=\text{N}$ ), 180,11 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ).

5 **Exemple 2 : 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate**

Le 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate est préparé selon le schéma 2 ci-dessous.



10 La 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-5(4H)-one est préparée selon l'exemple 1.1.

2.2 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate

2.2.1. Sel de césium de l'acide 5-hexynoïque.

Le sel de césium de l'acide 5-hexynoïque est préparé par réaction du  
 15 carbonate de césium (4,10 g, 0,0126 mol) sur l'acide 5-hexynoïque (4,6 g, 0,0411 mol) en solution dans le DMF (6,0 mL) pendant 16 h à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré, le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu repris par l'éther diéthylique. Après filtration, le sel de césium de l'acide 5-hexynoïque (4,82 g, rendement 78%) est séché  
 20 sous vide à 40°C.

2.2.2. 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate.

A une solution de sel de césium de l'acide 5-hexynoïque (0,490 g, 2 mmol) dans le DMF anhydre (3 mL) placée dans un ballon refroidi par un  
 25 bain de glace est ajoutée goutte-à-goutte une solution de 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-5(4H)-one (0,448g, 2,03 mmol) dans le DMF (2 mL). En fin d'addition, le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 2 h puis on laisse revenir à température ambiante pendant 24 h. Le solvant est éliminé sous pression réduite puis le résidu est  
 30 repris par l'acétate d'éthyle, filtré et concentré sous vide. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice pour fournir

0,310 g (61%) de 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)ethyl hex-5-ynoate.

Le 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)ethyl hex-5-ynoate  
5 est caractérisé par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 1,46 ppm (s, 6H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,56 ppm (d, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCO}$ ), 1,85 ppm (quintet, 2H,  $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ ),  
10 2,00 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-$ ), 2,29 ppm (triplet-douplet,  $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ ), 2,54 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ ), 5,57 ppm (quadruplet, 1H,  $-\text{CH}_2-\text{COOCH}(\text{CH}_3)-$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) : 17,01 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{COOCH}(\text{CH}_3)$ ), 17,75 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ ), 23,50 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 24,42 ppm ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ),  
15 32,62 ppm ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 65,04 ppm ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 65,45 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ ), 69,50 ppm ( $-\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ), 83,24 ppm ( $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ ), 162,06 ppm ( $\text{C}=\text{N}$ ), 172,26 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ), 180,52 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>cycle</sub>.

### 20 **Exemple 3 : Procédé de couplage de la 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one avec le lysozyme**

Le couplage d'une protéine modèle, le lysozyme, avec la 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one est décrit ci-après :



#### 25 3.1. Mode opératoire

Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique, une solution de lysozyme (114,2 mg,  $8,0 \times 10^{-6}$  mol) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO, 10,00 mL) est préparée à laquelle on ajoute de la triméthylamine (TEA, 0,20 mL,  $1,49 \times 10^{-3}$  mol). Après 15 mn d'agitation à température ambiante, une  
30 solution de 2-(1-azidoéthyl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one préparée selon l'exemple 1 (0,252 g,  $1,38 \times 10^{-3}$  mol) dans le DMSO (1,00 mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est abandonné à température ambiante pendant

24h sous agitation. Après 24 h, une solution aqueuse d'HCl (HCl, 37%, 1,0 mL pour 30,0 mL de solution) est ajoutée puis la solution est dialysée avec une membrane de dialyse (seuil de coupure = MWCO = 3500) contre une solution aqueuse de méthanol (eau : méthanol = 8:2 en volumes) pendant 24 h. Le produit est ensuite récupéré par lyophilisation. Le produit final (0,012 g) est dissous dans le DMSO (0,10 mL) pour analyse par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF). Une analyse par spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOF MS) est également réalisée.

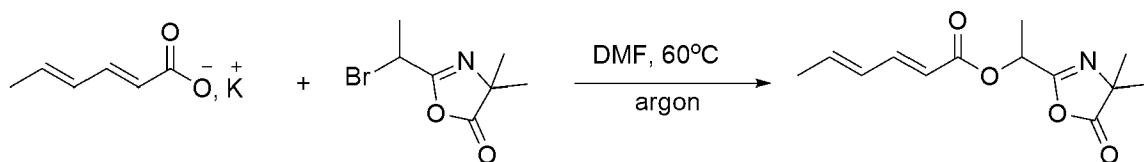
### 3.2. Résultats

Le spectre IRTF de l'échantillon montre la présence d'une nouvelle bande d'absorption à  $2110\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique du groupe azoture introduit sur la protéine.

La réaction est également attestée par l'analyse en spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOF MS) qui montre qu'après réaction le pic du lysozyme de départ à  $m/z = 14357$  a disparu au profit d'un nouveau signal centré à  $m/z = 15812$  (figure 1).

### Exemple 4 : Synthèse du 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydro oxazol-2-yl)éthyl hexa-2,4-dienoate

Le 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthylhexa-2,4-dienoate est préparé selon le schéma ci-dessous :



#### 4.1. 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthyloxazol-5(4H)-one

Elle est préparée selon la procédure décrite par K.M. Lewandowski *et al.* dans le brevet US 6 762 257 B1 (2004).

#### 4.2. 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthylhexa-2,4-dienoate

Dans un ballon muni d'un barreau aimanté sont introduits le sorbate de potassium (1,12 g,  $7,5 \times 10^{-3}$  mol), le 2-(1-bromoéthyl)-4,4-diméthyloxazol-5(4H)-one (1,68 g,  $7,6 \times 10^{-3}$  mol) et le DMF anhydre (20,0

mL). Ensuite, le mélange réactionnel est agité et chauffé à 60°C sous argon pendant 17 h. Le solvant (DMF) est éliminé sous pression réduite. Le résidu est repris par l'acétone puis filtré sur fritté. Le filtrat obtenu est concentré sous vide. Le produit final est obtenu sous forme d'une huile jaune foncée avec un rendement de 95% (1,90 g) qui cristallise au froid.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, acétone D<sub>6</sub>, δ ppm) : 1,40 ppm (6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,59 ppm (d, 3H, -COOCH(CH<sub>3</sub>)), 1,90 ppm (d, 3H, H<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>-), 5,63 ppm (q, 1H, -CH(CH<sub>3</sub>)OCO), 5,91 (d, 1H, CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 6,34 ppm (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 7,34 ppm (1H, CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-).

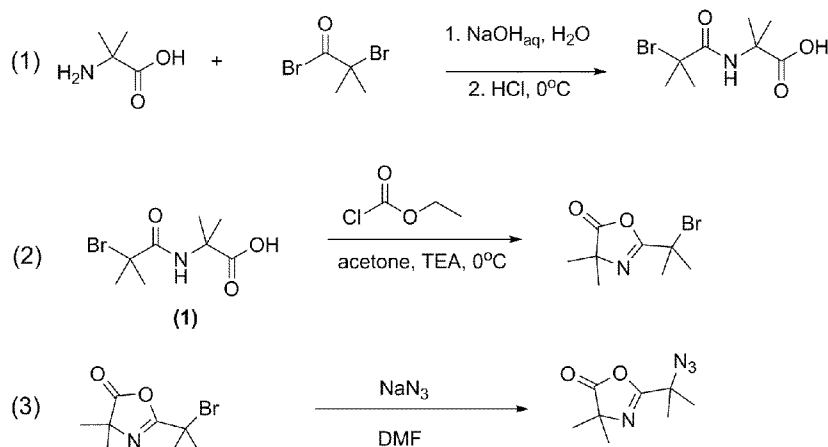
RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, acétone D<sub>6</sub>, δ ppm) : 17,01 ppm (-COOCH(CH<sub>3</sub>)-), 18,51 ppm (H<sub>3</sub>C-CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>-), 24,21 ppm et 24,31 ppm (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 65,04 ppm (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 65,85 ppm (-COO-CH(CH<sub>3</sub>)-), 118,47 (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 130,31 (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 141,03 ppm (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 146,88 ppm (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-), 162,21 ppm (C=N), 165,92 ppm (-COO-CH(CH<sub>3</sub>)-), 181,16 ppm (C=O)<sub>cycle</sub>.

HR-MS : C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> m/z = [M+H]<sub>exp</sub> = 252,1239 ([M+H]<sub>cal</sub> = 252,1236).

FT-IR: ν(CH) = 2985-2939, ν(C=O)<sub>azlactone</sub> = 1826 cm<sup>-1</sup>, ν(C=O)<sub>ester</sub> = 1720 cm<sup>-1</sup>, ν(C=N) = 1683 cm<sup>-1</sup>.

### Exemple 5 : Synthèse de la 2-(2-azidopropan-2-yl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one

La 2-(2-azidopropan-2-yl)-4,4-diméthylloxazol-5(4H)-one est synthétisée selon le schéma ci-dessous :



## 5.1. 2-(2-bromopropan-2-yl)-4,4-diméthyloxazol-5(4H)-one

Cet intermédiaire est préparé selon la procédure décrite par K.M. Lewandowski *et al.* dans le brevet US 6 894 133 (étapes 1 et 2)

## 5 5.2. 2-(2-azidopropan-2-yl)-4,4-diméthyloxazol-5(4H)-one

Elle est obtenue (étape 3) selon la procédure suivante :

Dans un ballon 25 mL muni d'un barreau aimanté, on prépare sous atmosphère d'argon une solution de 0,65 g (0,01 mol) d'azoture de sodium dans 5 mL de DMF anhydre que l'on refroidit à l'aide d'un bain de glace. On verse goutte-à-goutte sur ce mélange une solution comprenant 2,34 g, (0,01 mol) de 2-(2-bromopropan-2-yl)-4,4-diméthyloxazol-5(4H)-one dans 2 mL de DMF anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 0 °C puis à température ambiante pendant 16 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris par l'acétate d'éthyle puis la solution est filtrée pour éliminer le bromure de sodium. Le filtrat obtenu est concentré sous vide. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de silice avec successivement le *n*-hexane puis un mélange *n*-hexane : acétate d'éthyle 6:4 v/v pour fournir une huile incolore (0,84 g, 43 %).

20 RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 1,44 ppm (s, 6H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,56 ppm (s, 6H, N<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) : 24,01 ppm (N<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24,58 ppm (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 59,26 ppm (N<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 65,83 ppm (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 163,88 ppm (C=N), 180,41 ppm (C=O).

25

**Exemple 6 : Procédé de couplage du 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate avec le lysozyme**

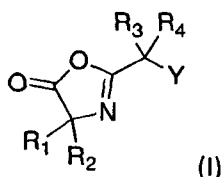
Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique est préparée une solution de lysozyme (228,4 mg, 16,0x10<sup>-6</sup> mol) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO, 20,00 mL) à laquelle on ajoute de la triéthylamine (TEA, 0,30 g, 3,0x10<sup>-3</sup> mol). Après 30 min d'agitation à température ambiante, une solution de 1-(4,4-diméthyl-5-oxo-4,5-dihydrooxazol-2-yl)éthyl hex-5-ynoate (0,695 g, 3,0x10<sup>-3</sup> mol) dans le DMSO (4,00 mL) est ajoutée et le

mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Après 24 h, un mélange d'HCl concentré (37%, 2 mL) et de 90 mL d'eau pure est ajouté, puis la solution est dialysée avec une membrane de dialyse (seuil de coupure = MWCO = 3500) contre une solution aqueuse de méthanol (eau :  
5 méthanol = 8 : 2 en volumes) pendant 24 h. Le produit est ensuite récupéré par la lyophilisation.

Le produit final est analysé par spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOF MS). Le résultat d'analyse de MALDI-TOF montre qu'après la réaction le pic du lysozyme de départ à  $m/z = 14357$  a disparu au profit  
10 d'un nouveau signal centré à  $m/z = 17819$ .

## REVENDICATIONS

### 1. Composé répondant à la formule générale (I)



dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
- Y représente :

- (i) un groupe  $N_3$ , ou
- (ii) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (iii) un groupe aryl- $N_3$ , ou
- (iv) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl- $N_3$ , ou
- (v) un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vi) un groupe aryl- $C\equiv C-R_5$ , ou
- (vii) un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyl-  $C\equiv C-R_5$ , ou
- (viii) un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CR_5$ , avec n entier compris entre 1 et 10, notamment un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_n-C\equiv CH$ , avec n compris entre 1 et 5,

avec  $R_5$  représentant

- (a) soit un atome d'hydrogène,
- (b) soit un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle,
- (c) soit un groupe aryle,
- (d) soit un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle,

tous ces groupes pouvant renfermer deux doubles liaisons conjuguées, éventuellement dans un cycle,

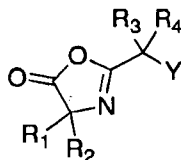
(e) soit un groupe protecteur de la triple liaison.

2. Composé selon la revendication 1 dans lequel  $R_1$  et  $R_2$  représentent chacun un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle,  $R_3$  représente un atome d'hydrogène,  $R_4$  représente un groupe méthyle, et Y représente soit un groupe  $N_3$ , soit un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_3-C\equiv CH$ .

3. Composé selon la revendication 2 dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_4$  représentent chacun un groupe méthyle,  $R_3$  un atome d'hydrogène et Y un groupe  $N_3$ .

4. Composé selon la revendication 2 dans lequel  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_4$  désignent chacun un groupe méthyle,  $R_3$  un atome d'hydrogène et Y un groupe  $-O-C(O)-(CH_2)_3-C\equiv CH$ .

5. Procédé de couplage entre une biomolécule et une molécule cible choisie dans le groupe comprenant une molécule d'intérêt biologique, un polymère naturel ou synthétique, et une surface réactive, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un composé de formule (I)

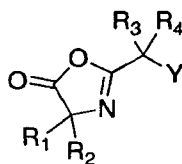


dans laquelle

- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl( $C_1-C_{10}$ )alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl( $C_1-C_{10}$ )alkyle, et
- Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués, en particulier un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - mise en contact dudit composé avec une biomolécule,

- mise en contact dudit composé lié avec la biomolécule avec la molécule cible et si nécessaire,
  - isolement du produit de couplage.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la/les biomolécules mise(s) en jeu dans ledit procédé de couplage sont choisies dans le groupe comprenant des protéines, des peptides, de l'ADN, des marqueurs biologiques, des hormones, des vitamines, des anticorps, des polyamines, des monosaccharides, des oligosaccharides et des polysaccharides, et des molécules d'intérêt biologique du type médicament ou marqueur.
7. Réactif de diagnostic caractérisé en ce qu'il met en œuvre au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
8. Utilisation d'un composé de formule (I) dans laquelle
- $R_1$  et  $R_2$  représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe  $(C_2-C_6)$ cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
  - $R_3$  et  $R_4$  représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe  $(C_1-C_{10})$ alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl $(C_1-C_{10})$ alkyle, et
  - Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués,
- comme réactif de diagnostic.
9. Kit pour la mise en œuvre d'un procédé de couplage et de bioconjugaison selon l'une quelconque des revendications 5 et 6 caractérisé en ce qu'il comprend au moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
10. Procédé de séparation, de détection et/ou de caractérisation d'au moins une molécule d'intérêt susceptible d'être présente dans un milieu, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de mise en œuvre d'un

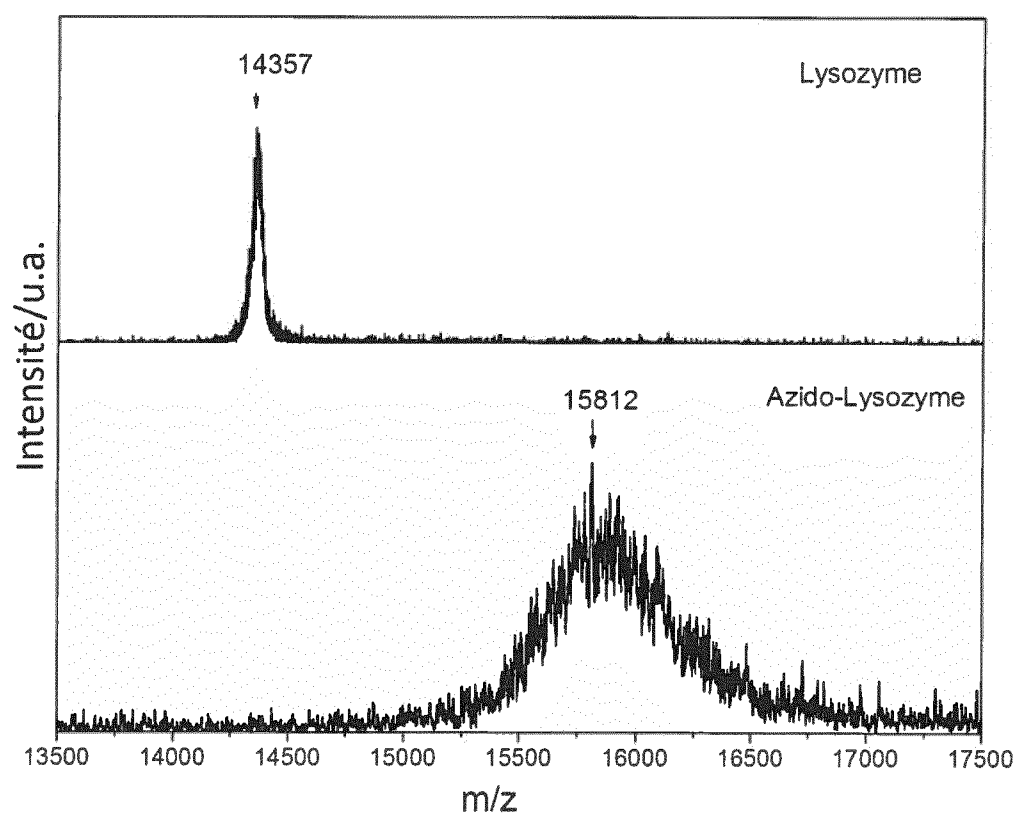
kit selon la revendication 9 ou au moins une étape de mise en œuvre d'un composé de formule (I)



dans laquelle

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)cycloalkyle, un groupe aryle, un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, ou un groupe hétérocyclique,
- R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupe (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, un groupe aryle ou un groupe aryl(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkyle, et
- Y représente une fonction réactive activable par chimie click, choisie dans le groupe comprenant les azotures, les alcynes, les cycloalcynes et les diènes conjugués.

11. Composition comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 en association avec un milieu aqueux ou organique.

**Figure 1**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/071430

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D263/42 A61K31/421 A61K49/00 C12Q1/00 G01N33/53  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D A61K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JORDI SOLÀ ET AL: "Nanometer-Range Communication of Stereochemical Information by Reversible Switching of Molecular Helicity", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 49, no. 38, 4 August 2010 (2010-08-04), pages 6836-6839, XP055063212, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201001130 cited in the application figure 2; compounds 3,10	1,7,9,11
A	WO 2004/081538 A2 (IRM LLC; TULLY DAVID [US]) 23 September 2004 (2004-09-23) cited in the application figures 1,3 claims 1,2,19 ----- -/-	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2014

Date of mailing of the international search report

26/02/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seitner, Irmgard

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/071430

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93/25594 A1 (MINNESOTA MINING & MFG [US]) 23 December 1993 (1993-12-23) cited in the application claims 1,5,6 pages 1,2 -----	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/071430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004081538 A2	23-09-2004	US 2004242840 A1	02-12-2004
		WO 2004081538 A2	23-09-2004
-----			
WO 9325594 A1	23-12-1993	CA 2136004 A1	23-12-1993
		DE 69312294 D1	21-08-1997
		DE 69312294 T2	26-02-1998
		DK 0644904 T3	23-02-1998
		EP 0644904 A1	29-03-1995
		IL 105848 A	18-02-1997
		JP H07507587 A	24-08-1995
		US 5344701 A	06-09-1994
		US 5451453 A	19-09-1995
		WO 9325594 A1	23-12-1993
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2013/071430

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. C07D263/42 A61K31/421 A61K49/00 C12Q1/00 G01N33/53 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07D A61K C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JORDI SOLÀ ET AL: "Nanometer-Range Communication of Stereochemical Information by Reversible Switching of Molecular Helicity", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 49, no. 38, 4 août 2010 (2010-08-04), pages 6836-6839, XP055063212, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201001130 cité dans la demande figure 2; composés 3,10	1,7,9,11
A	WO 2004/081538 A2 (IRM LLC; TULLY DAVID [US]) 23 septembre 2004 (2004-09-23) cité dans la demande figures 1,3 revendications 1,2,19 ----- -/-	1-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe         </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <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> </div> <div> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</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>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  18 février 2014		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  26/02/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Seitner, Irmgard

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 93/25594 A1 (MINNESOTA MINING &amp; MFG [US]) 23 décembre 1993 (1993-12-23)  cité dans la demande  revendications 1,5,6  pages 1,2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-11

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2013/071430

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004081538 A2	23-09-2004	US 2004242840 A1	02-12-2004
		WO 2004081538 A2	23-09-2004
-----			
WO 9325594 A1	23-12-1993	CA 2136004 A1	23-12-1993
		DE 69312294 D1	21-08-1997
		DE 69312294 T2	26-02-1998
		DK 0644904 T3	23-02-1998
		EP 0644904 A1	29-03-1995
		IL 105848 A	18-02-1997
		JP H07507587 A	24-08-1995
		US 5344701 A	06-09-1994
		US 5451453 A	19-09-1995
		WO 9325594 A1	23-12-1993
-----			