



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1011206A4

NUMERO DE DEPOT : 09700503

Classif. Internat. : C07D G01N

Date de délivrance le : 01 Juin 1999

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 11 Juin 1997 à 15H25 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : BIOCODE S.A.
rue Ernest Solvay 101/103, B-4000 LIEGE(BELGIQUE)

représenté(e)s par : de KEMMETER François, CABINET BEDE, Place de l'Alma, 3 - B
1200 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : DERIVES CHIMIOLUMINESCENTS HETEROCYCLIQUES.

INVENTEUR(S) : Ghitti Gianangelo, rue Saint-Léonard 36, B-4000 Liège (BE); Kohl Michel, rue J. Destrivaux 12, B-4000 Liège (BE); Lejeune Robert, avenue Jean Tasté 129, B-4802 Heusy (BE); Renotte Roger, Grand Route 26, B-4360 Oreye (BE); Sarlet Guy, avenue Jardon 86, B-4801 Stembert (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 01 Juin 1999
PAR DELEGATION SPECIALE :

CONSEILLER

Description

DERIVES CHIMOLUMINESCENTS HETEROCYCLIQUES.**Objet de l'invention.**

La présente invention concerne des dérivés chimoluminescents d'acridinium ainsi qu'un conjugué comprenant un de ces dérivés, lié à un composant biologique
5 spécifique.

Un autre aspect de l'invention concerne la trousse de diagnostic et/ou de dosage comprenant ce conjugué ou un de ces dérivés, et l'utilisation du conjugué ou d'un de ces dérivés chimoluminescents pour le dosage
10 et/ou la détection d'un composé biologique spécifique.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention.

La chimoluminescence est une formation de lumière obtenue par une réaction chimique. Le mécanisme général de cette réaction a été notamment décrit par
15 Schuster et al (Advances in Physical Organic Chemistry, 187-238 (1984)) par la réaction suivante :



Le composé A, par une réaction chimique, physique ou biochimique (le plus souvent par une oxydation avec un
20 peroxyde) donne un produit à un état excité ("B*") qui revient à l'état fondamental par l'émission de lumière ($h\nu$).

Ce procédé de chimoluminescence est largement utilisé en chimie analytique et en biologie clinique,
25 notamment pour les immunodosages (chemoluminescence immuno

assay ou "CLIA").

Les demandes de brevet EP-A-273115, EP-A-257541 et EP-A-263657 décrivent des composés chimioluminescents hétérocycliques dérivés d'acridinium, de phénantridinium, de quinoléinium et d'isoquinoléinium et leurs isomères, éventuellement conjugués à des antigènes, des anticorps ou des acides nucléiques pour être utilisés dans des tests de chimioluminescence.

Le pouvoir chimioluminescent de ces dérivés est calculé par l'émission de lumière engendrée au contact de l'eau oxygénée en milieu alcalin. Des études réalisées par F. McCapra (Accounts of Chemical Research (1976), 9, 6, p. 201-209) ont permis d'établir un mécanisme de chimioluminescence des composés d'acridinium. Il postule la formation d'un intermédiaire réactionnel excité (dioxétane) qui se décompose en CO₂ et en méthylacridone. Il implique également le déplacement par H₂O₂ d'un groupement partant Y. Ce déplacement serait, selon la théorie généralement admise, possible pour des dérivés présentant un groupement Y possédant un pKa inférieur à celui de l'eau oxygénée (pKa < 12).

La demande de brevet WO95/19976 décrit des dérivés hétérocycliques d'acridinium, de phénantridinium, de quinoléinium et d'isoquinoléinium ainsi que leurs isomères et dérivés quelconques obtenus par substitution, améliorés, en particulier des dérivés stables et/ou présentant une chimioluminescence élevée, notamment lorsque la valeur du pKa du groupement partant est élevée, de préférence lorsque le pKa est supérieur à 12.

30 Buts de l'invention.

La présente invention a pour but d'obtenir des dérivés d'acridinium apparentés chimiquement à ceux décrits dans la demande de brevet WO95/19976 précitée, de synthèse aisée, qui offrent en outre de nombreuses possibilités d'adaptation comportant notamment une série de modifications chimiques telles que le greffage d'un bras (spacer), le but étant entre autres d'orienter le couplage

vers des fonctions habituellement peu accessibles lors du marquage de protéines telles que les groupements phénols et thiols.

La présente invention a également pour but
5 d'obtenir des dérivés chimioluminescents caractérisés par une courbe dose - réponse permettant leur utilisation dans le dosage et/ou le diagnostic sur une large plage de concentration.

Un dernier but de la présente invention est
10 d'obtenir une trousse de diagnostic comprenant ledit dérivé chimioluminescent actif et/ou stable.

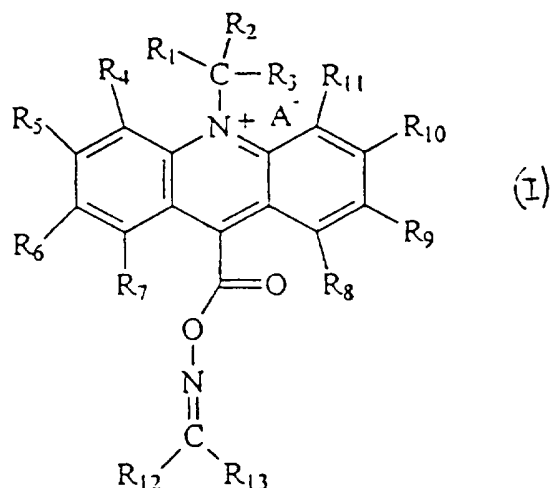
Elements caractéristiques de l'invention.

La présente invention concerne des dérivés d'acridinium chimioluminescents de formule :

15

20

25



dans laquelle R_1 à R_{13} sont des substituants n'empêchant pas l'expression de la chimioluminescence, étant entendu que l'un au moins des substituants R_{12} et R_{13} comporte, comme élément unique ou comme élément de liaison au dérivé d'acridinium, un atome autre que la carbone.

De préférence, dans les dérivés chimioluminescents selon l'invention, A est un ion complémentaire choisi parmi les ions halogéno, nitrate, sulfate, iodomercurate, trifluorométhanesulfonate, tartrate et phtalate, R_1 à R_{11} sont l'hydrogène ou des radicaux de

35

type R_{14} ou $B-R_{14}$, où B représente un groupe ou un atome de liaison et R_{14} représente un radical hydrocarboné pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes, R_{12} et R_{13} sont des substituants identiques ou différents dont la fonction
 5 porte sur la chimioluminescence et sur le couplage, l'un des substituants R_{12} et R_{13} comportant comme élément unique un atome d'halogène ou comportant comme élément de liaison au dérivé d'acridinium un atome choisi parmi les azotides et les chalcogènes, tandis que l'autre des substituants R_{12}
 10 et R_{13} est semblable aux substituants R_1 à R_{11} , à l'exception de l'hydrogène.

De préférence, dans les dérivés chimioluminescents selon l'invention, B représente dans la formule $B-R_{14}$, un groupe $-(CH_2)_n-$ où n représente un
 15 nombre entier de 1 à 5, B représente également un groupe contenant un azotide ou représente un chalcogène, de préférence un groupe azoté ou l'oxygène deux fois liés, R_{14} étant tel que défini précédemment. Et plus particulièrement, R_{14} est un radical choisi parmi le groupe
 20 constitué par alkyle, alkényle, alkynyle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle et hétéroarylkyle éventuellement substitués.

Plus particulièrement encore, dans ces dérivés chimioluminescents, R_1 et R_{11} sont l'hydrogène, l'un des
 25 substituants R_{12} et R_{13} est un substituant choisi parmi les halogènes et les groupes $B-R_{14}$, l'autre des substituants R_{12} et R_{13} étant semblable à $B-R_{14}$ ou à R_{14} , B et R_{14} étant tels que définis précédemment.

Selon une forme d'exécution préférée, de
 30 l'invention, les dérivés chimioluminescents sont les composés;

[1-éthoxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

35 {1-éthoxy-1-[4-(2-bromoéthoxy)-phényl]-1-iminométhane}-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-phényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-benzyloxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-
5 10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-chloro-1-(3-cyanophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

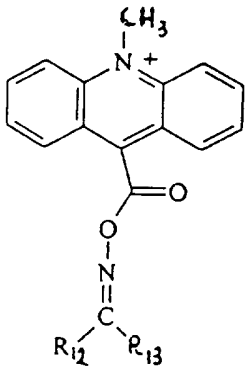
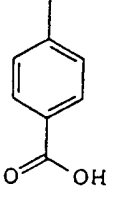
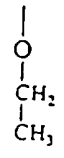
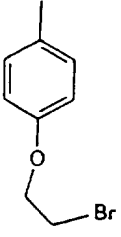
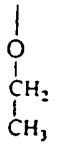
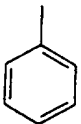
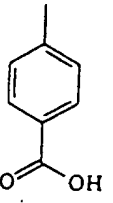
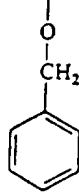
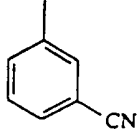
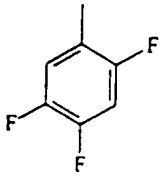
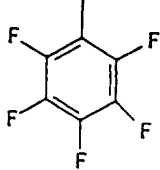
ou

10 [1-chloro-1-(2,4,5,-trifluorophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate.

15 Ces dérivés sont désignés par les références OX₁ à OX₅, respectivement et leurs formules de structure sont reprises au tableau 1 qui suit.

Tableau 1: dérivés de type OX synthétisés	Dérivé	R_{12}	R_{13}
	OX1		
	OX2		
	OX3		
	OX4		
	OX5		
	OX6		
	OX7		

Un autre aspect de l'invention concerne le conjugué comprenant un dérivé chimioluminescent selon l'invention lié à un composant biologique spécifique.

On entend par "composé biologique spécifique",
5 toute molécule biologique (lipide, saccharide, protéine, peptide, acide nucléique,...) ou ensemble de molécules biologiques, spécifiques d'une espèce (virale, bactérienne, végétale, animale ou autre), d'un individu, d'une pathologie (telle que le cancer ou causée par un agent
10 viral, bactérien ou autre), d'une activité ou d'un système biochimique (telle qu'une réaction enzymatique,...).

Ledit composant biologique est susceptible d'être détecté et/ou dosé, ou susceptible de servir au dosage et/ou à la détection d'un composant biologique spécifique.

15 De préférence, ce composé biologique spécifique est choisi parmi le groupe constitué par les anticorps, les haptènes, les antigènes, les acides nucléiques, les agonistes, les transporteurs cellulaires, les acides gras, les lipides et/ou un mélange d'entre eux.

20 La présente invention concerne également la trousse de diagnostic et/ou de dosage comprenant le conjugué ou un des dérivés chimioluminescents selon l'invention et l'utilisation du conjugué et/ou d'un dérivé chimioluminescent selon l'invention pour le dosage et/ou la
25 détection d'un composé biologique spécifique.

Brève description des Figures.

La figure 1 représente un schéma général de préparation des dérivés OX.

La figure 2 représente le schéma de synthèse du
30 dérivé OX7.

La figure 3 illustre la cinétique des Ac (anticorps) marqués par OX3, OX5, OX6 et OX7.

Les figures 4 à 6 illustrent la stabilité des Ac marqués par OX6, OX7 et OX5 respectivement.

35 Dans les figures 3 à 6, le signal est exprimé par le rapport entre l'intensité (en RLU) mesurée au temps t et l'intensité (en RLU) mesurée au temps t=0.

La figure 7 représente l'évolution de la concentration en produit OX7 en fonction du temps dans un tampon à pH 8.

La figure 8 représente un exemple de dosage de
5 TSH avec Ac marqué par OX7.

La figure 9 représente le spectre infrarouge du pentafluorobenzaldéhyde.

La figure 10 représente le spectre infrarouge de la pentafluorobenzaldoxime.

10 La figure 11 représente le spectre infrarouge de la pentafluorobenzaldoxime chlorée.

La figure 12 représente le spectre infrarouge du produit de couplage de la pentafluorobenzaldoxime chlorée avec le chlorure de l'acide 9-acridine carboxylique, étant
15 le 9-acridine carboxylate de 1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane.

Les figures 13 à 15 représentent les spectres infrarouge des marqueurs OX7, OX5 et OX6.

Les figures 16 à 18 représentent les spectres de
20 masse des marqueurs OX5, OX6 et OX7.

Les composés OX dont les formules sont reprise au tableau 1, ont tous été préparés en suivant le schéma général de préparation décrit dans la figure 1. Leurs synthèses ont nécessité la synthèse de l'aldéhyde de départ
25 (II) lorsque celui-ci n'était pas directement disponible.

La première étape consiste à former l'oxime (III) par réaction entre l'aldéhyde (II) et de l'hydroxylamine. La réaction est réalisée dans un tampon à pH 4,5-5.

La chloroxime (IV) est préparée par barbotage de
30 chlore dans une solution d'oxime.

Les chloro-dérivés ont été obtenus directement par couplage de la chloroxime au noyau acridine. Les 3 autres dérivés ont été préalablement traités par un équivalent d'alcoolate sodique avant l'étape de couplage au
35 noyau acridine. L'alcoolate est préparé à partir de sodium et de l'alcool correspondant.

Les composés IV ou IVb sont couplés au chlorure d'acide carboxylique dans un solvant organique additionné de NET_3 .

Les produits V ou Vb sont méthylés par le couple
5 de réactifs $\text{CH}_3\text{I}/\text{HgCl}_2$ ou le triflate de méthyle.

EXEMPLES

EXEMPLE 1: MODES OPERATOIRES COMMUNS A CERTAINS DERIVES (FIG. 1).

1. Synthèse de l'aldéhyde II (pour les dérivés 10 OX6 et OX7).

Les aldéhydes employés dans la synthèse des dérivés OX6 et OX7 ont été réalisés par réduction des chlorures d'acides correspondants (chlorure d'acide 2,4,5-trifluorobenzoïque ou 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoïque). Le
15 protocole utilisé est le suivant: un équivalent de chlorure d'acide est mis en présence d'1,1 équivalents de Bu_3SnH dans du THF. Après réaction, le THF est évaporé sous vide et le résidu traité par de l'eau. Ce dernier est ensuite extrait par de l'éther de pétrole ($\text{Eb } 40^\circ \text{ C}$) puis passé sur
20 charbon. L'aldéhyde est obtenu par évaporation sous vide.

2. Formation de l'oxime III (pour tous les dérivés).

Un équivalent d'aldéhyde dissous dans le l'éthanol est additionné d'eau et de cinq équivalents de chlorhydrate d'hydroxylamine. Le pH est ajusté à une
25 valeur de 5 par ajout de NaOH à 5 %. Le solvant organique est évaporé et l'oxime formée est extraite au toluène. La solution organique est séchée sur Na_2SO_4 et passée sur charbon. Elle est ensuite concentrée sous vide et additionnée de pétroléine 40° C . Le refroidissement de la
30 solution à -20° C provoque la cristallisation de l'oxime.

3. Transformation en chloroxime IV (pour tous les dérivés).

La chloroxime est préparée par barbotage de chlore dans une solution d'oxime dans un mélange
35 CHCl_3 /dioxane préalablement refroidi à 0° C . La réaction est complète et la chloroxime (III) est directement obtenue par évaporation des solvants suivie, lorsque la chloroxime

est solide à température ambiante, d'une recristallisation par ajout de pétroléine 40° C. (la chloroxime des dérivés OX6 et OX7 est liquide).

5 4. Etape de réaction avec un alcoolate (pour dérivés OX1, OX2 et OX4).

Obtention du produit IVb.

L'alcoolate est préparé par réaction entre un équivalent de sodium et d'un équivalent d'alcool (éthanol ou phénol). La réaction est effectuée dans l'alcool
10 lorsque c'est possible (éthanol) ou dans l'acétone (phénol).

Un équivalent de chloroxime dissous dans l'acétone est directement mis en réaction avec un équivalent d'alcoolate. Le pH du milieu est ajusté à 4,5
15 par ajout de HCl concentré et le précipité formé (NaCl) est éliminé par filtration ou par centrifugation. La solution est additionnée d'eau. L'évaporation des solvants organiques provoque la cristallisation du produit.

20 5. Couplage à l'acridine (pour tous les dérivés).
Obtention du produit VIb.

L'acide acridine carboxylique est transformé en chlorure d'acide dans du chlorure de thionyle porté à reflux. Après transformation complète de l'acide, le chlorure de thionyle est évaporé sous vide.

25 Un équivalent des composés préparés aux étapes 3 (OX3, OX5, OX6 et OX7) ou 4 (OX1, OX2 et OX4) sont couplés avec un équivalent de chlorure d'acide acridine carboxylique dans du THF additionné d'un excès de pyridine. Le THF est évaporé sous vide et le résidu repris dans du
30 toluène. On lave la phase toluénique à l'eau puis on la sèche sur du sulfate sodique anhydre. Le produit formé est soit cristallisé par ajout d'éther de pétrole (Eb 40° C) à la solution (OX1, OX2, OX3, OX4 et OX5) ou chromatographié sur une colonne de silice en utilisant une phase toluène
35 /acétate d'éthyle/ acide acétique en proportions 2/1/0,01 (OX6 et OX7). Les fractions correspondant au premier produit qui sort de la colonne sont récupérées et

concentrées sous vide. L'addition d'éther de pétrole (Eb 40° C) provoque la cristallisation du produit.

6. Méthylation des composés (pour tous les dérivés).

Les produits obtenus à l'étape 5 sont méthylés par le couple de réactifs $\text{CH}_3\text{I}/\text{HgCl}_2$. La réaction est réalisée sur un mélange intime de 50 mg de produit avec 50 mg de HgCl_2 additionné de 1 ml de CH_3I . Elle se déroule dans une bombe portée à 110° C durant 2h30. Après réaction, la bombe est réfrigérée à -20° C. Après refroidissement et décantation du contenu de la bombe, le surnageant est éliminé et les cristaux de produit méthylé sont lavés successivement par du CH_3I puis par de l'éther diéthylique. Le produit méthylé peut éventuellement être recristallisé dans un mélange acétone/éther diéthylique.

15 EXEMPLE 2: SYNTHÈSE DE LA SONDE OX7 (FIG. 2) OU

(1-CHLORO-1-PERFLUOROPHENYL-1-IMINOMETHANE)-10-METHYLACRIDINIUM-9-CARBOXYLATE.

1. Préparation de la pentafluorobenzaldoxime (I).

20 g de pentafluorobenzaldéhyde sont mis en solution dans 400 ml d'éthanol. D'autre part, 25 g de chlorhydrate d'hydroxylamine sont solubilisés dans 200 ml d'eau. La solution aqueuse est ajoutée à la solution alcoolique et le pH de la solution résultante est amené à 5 par addition de NaOH 2N. Après transformation complète (CCM), on cristallise l'oxime par évaporation de l'éthanol de la solution. Le produit est isolé par filtration et lavé abondamment à l'eau. 17,8 g de pentafluorobenzaldoxime sont récupérés après séchage du précipité (rendement 82 %).

2. Préparation de la chloropentafluorobenzaldoxime

30 (II).

1 g de pentafluorobenzaldoxime est mis en solution dans 15 ml d'un mélange dioxanne-chloroforme (1:1). Cette solution est refroidie à 0° C et saturée par du chlore. Après 90 minutes de réaction, la transformation est complète (CCM). Les solvants et l'excès de chlore sont éliminés sous pression réduite et le résidu est utilisé tel quel dans l'étape suivante.

**3. Couplage de la chloropentafluorobenzaldoxime (II)
au chlorure de l'acide 9-acridine carboxylique
(III).**

1,05 g d'acide 9-acridine carboxylique est
5 transformé en chlorure d'acide par traitement au chlorure
de thionyle (10 ml) contenant une trace de N, N-
diméthylformamide pendant 90 minutes à 85° C. L'excès de
chlorure de thionyle est éliminé sous dépression. Le
chlorure d'acide (III) obtenu sous forme de chlorhydrate
10 est mis en suspension dans 20 ml de tétrahydrofurane et
neutralisé par 5 équivalents (2400 µl) de triéthylamine.
Le produit obtenu à l'étape précédente est dilué dans 10 ml
de tétrahydrofurane et additionné à la solution de chlorure
d'acide. Après 30 minutes de réaction, le solvant est
15 éliminé sous dépression et le résidu est solubilisé dans un
minimum de chloroforme. La phase organique est lavée trois
fois par 40 ml d'eau, décantée et séchée sur sulfate
sodique anhydre. Le solvant est éliminé au rotavapor et le
résidu est dilué par un minimum de toluène et abandonné à
20 la cristallisation à 0° C pendant une nuit. Le produit est
filtré, lavé par du toluène froid puis par de l'éther de
pétrole. Il est ensuite séché sous vide en présence d'un
desséchant. 1,8 g de produit (IV) sont récupérés après
séchage (rendement 85 %).

**25 4. N-méthylation du produit (IV) et obtention du
traceur chimioluminescent OX7 (V).**

50 mg du produit (IV) sont mis en solution dans
2 ml de dichlorométhane anhydre et traités par 800 µl d'une
solution à 10% de trifluorométhanesulfonate de méthyle dans
30 le dichlorométhane. Après 4h de réaction, le produit
désiré est précipité par addition modérée d'éther dans le
milieu réactionnel. Le traceur est isolé par filtration et
lavé successivement par de l'éther diéthylique puis par de
l'éther de pétrole. 50 mg de
35 produit (V) sont récupérés (rendement 73%).

Points de Fusion et données chromatographiques.

Composé N°	Point de fusion (°C)	R _f CCM	R _f CCM SIL
		SIL G/UV ₂₅₄	RP18W/UV ₂₅₄
I	131	0,87	0,70
IV	206-207	0,77	0,31
V	210-213	0,00	0,27

Phases Mobiles

10 CCM SIL G/UV₂₅₄: toluène/acétate d'éthyle/acide acétique (2: 1: 0,04).

CCM DIL RP18W/UV₂₅₄: acétonitrile/tampon phosphate 0,1 M pH=3 (60: 40 heptanesulfonate sodique: 0,1 %).

EXEMPLE 3: ESSAIS EXPERIMENTTAUX SUR LES SONDÉS OX.15 **1. Rendement de chimioluminescence**

Le rendement de chimioluminescence des dérivés OX ne peut pas être déterminé lorsque les molécules sont à l'état libre. Il est mesuré après couplage de ces produits à une protéine. A titre d'exemple, pour les dérivés OX5, 20 OX6 et OX7, le taux d'incorporation sur la protéine est mesuré par une méthode fluorescente.

Pour OX7, on peut aussi quantifier la fluorescence émise par un dérivé de dégradation: l'acridone. Le rendement quantique de la molécule de OX7 conjuguée à un anticorps 25 anti-hCG a été évalué à $1,10^{19}$ RLU/mole.

2. Cinétique d'émission

Toutes les cinétiques d'émission enregistrées avec des dérivés OX sont très rapides. Plus de 95 % du signal est émis dans la seconde suivant l'injection du 30 réactif déclenchant la réaction chimioluminescente. Même couplés, les dérivés de chloroximes conservent cette cinétique particulièrement rapide. A titre d'exemple, la figure 3 reprend les cinétiques observées sur des anticorps (Ac) marqués par les chloro-dérivés.

35 **3. Etude de stabilité**

De tous les oximes synthétisés, les chloroximes apparaissent de loin les plus stables en présence de

- protéines. Des mesures réalisées par spectrométrie de masse sur OX7 ne montrent aucune variation significative du spectre de la molécule après une incubation de 45 minutes dans un mélange acétonitrile/eau (proportions 50/50).
- 5 Cette stabilité chimique permet d'envisager le couplage de la sonde aux protéines via la fonction halogénée de la molécule. Toutes les mesures de stabilité effectuées montrent que les oximes OX5, OX6 et OX7 augmentent fortement leur stabilité en milieu aqueux après couplage
- 10 aux protéines. Les premiers résultats d'une étude de stabilité sur des anticorps marqués par ces sondes sont donnés dans les figures 4, 5 et 6. Cette étude est réalisée à 25° C dans des tampons (0,1 M phosphate, 0,15 M NaCl, 0,1 % NaN₃, 0,1 % BSA) à pH 5, 6 et 7.
- 15 Dans les conditions expérimentales décrits ci-après, les premiers résultats montrent que la stabilité des traceurs diminue avec la basicité du milieu, ce qui est lié à la nature des sondes. Ils montrent également que le traceur OX5 est nettement moins stable que les traceurs OX6
- 20 et OX7. Les cassures observées entre t=470 et t=560 heures sur les courbes des figures 4 et 5 à pH 5 et 6 permettent difficilement de conclure sur la stabilité exacte des traceurs OX6 et OX7 à pH 5 et 6. Toutefois, le traceur OX7 apparaît comme étant le plus stable des trois, et ce
- 25 plus particulièrement à pH 5. Cette importante stabilité à pH 5 permet d'envisager une longue conservation du traceur à 4° C. D'un autre côté, la stabilité de celui-ci à pH 7 permet d'envisager tous les immunodosages possible à ce pH.
- 30 La stabilité de la sonde OX7 est très sensible au pH. En milieu acide (pH 5) la stabilité du composé est nettement plus élevée qu'en milieu basique (pH 8). Lorsque la sonde est fixée à une protéine, sa stabilité augmente fortement et ce quelque soit le pH testé.
- 35 **3.1 STABILITE DE LA SONDE OX7 NON COUPLEE A PH 8.**
- La stabilité de la sonde libre a été testée à 25° C dans un milieu identique à celui employé dans les

réactions de marquage (pH du milieu: 8). La dégradation du produit a été suivie par analyse HPLC en utilisant comme support chromatographique une colonne (4x125 mm) des Lichrosphères RP-18 (5 µm) et comme phase mobile un mélange
 5 acétonitrile/eau additionné d'acide décanoïque sulfonique, d'hydroxyde de tétraméthyle ammonium et d'acide trifluoroacétique (pH final: 2,5).

La figure 7 présente l'évolution de la concentration en produit OX7 en fonction du temps dans un
 10 tampon à pH 8.

L'ajustement paramétrique des données présentées par une fonction de type:

$Y = A \cdot \exp(-B \cdot X) + C$ a conduit aux résultats suivants:

Paramètre	Valeur	Approx. SE	95% intervalle de confiance
A	633	constant	0,036 à 0,046
B	0,0415	1,96 E-03	
C	0	constant	

$R^2 = 0,992$; $Sy.x = 18,42$

20 Le temps de demi-vie de la sonde libre obtenu en utilisant l'ajustement paramétrique est de 17 minutes.

3.2 STABILITE DE LA SONDE OX7 COUPLEE A UN ANTICORPS.

La stabilité de la sonde OX7 couplée à un anticorps a été testée à pH 5, 6 et 7. Elle a été évaluée
 25 par mesure de l'activité chimioluminescente d'échantillons de protéine marquée vieillis dans des tampons phosphate/NaCl additionnés de protéines. L'ajustement paramétrique des données recueillies à pH 6 et 7 conduit à des temps de demi-vie de l'ordre de 600 et 375 heures. Par
 30 contre à pH 5, le temps de demi-vie est nettement plus important (les faibles variations de signal enregistrées sur une période d'environ 2 mois ne permettent pas un ajustement paramétrique valable).

4.1 MARQUAGE D'ANTICORPS ANTI-TSH PAR LA SONDE OX7

35 25 µg d'anticorps en solution dans 100 µl de tampon de marquage (solution 0,1 M phosphate de sodium, 0,15 M NaCl ajustée à pH 8,0) sont additionnés de 10 µl

d'une solution de OX7-méthyltriflate dans l'acétonitrile (solution 0,5 mg/ml). Après homogénéisation, le mélange réactionnel est incubé durant 15 minutes à température ambiante. L'excès de sonde OX7 est neutralisé par ajout de 5 100 μ l d'une solution de lysine dans le tampon de marquage (solution 1,5 mg/ml). Après une nouvelle incubation de 5 minutes à température ambiante, le milieu est chromatographié sur une colonne (50x1 cm) de séphadex G25. La colonne chromatographique est équilibrée et éluée avec 10 un tampon 0,1 M phosphate, 0,15 M NaCl. 0,1 % NaN₃, contenant de la BSA (1g/l) et ajusté à p 5,0. Les fractions chromatographiques sont lues par mesure de chimioluminescence. Les fractions correspondant au pic d'anticorps sont rassemblées et conservés dans le tampon de 15 purification à une température de 4° C.

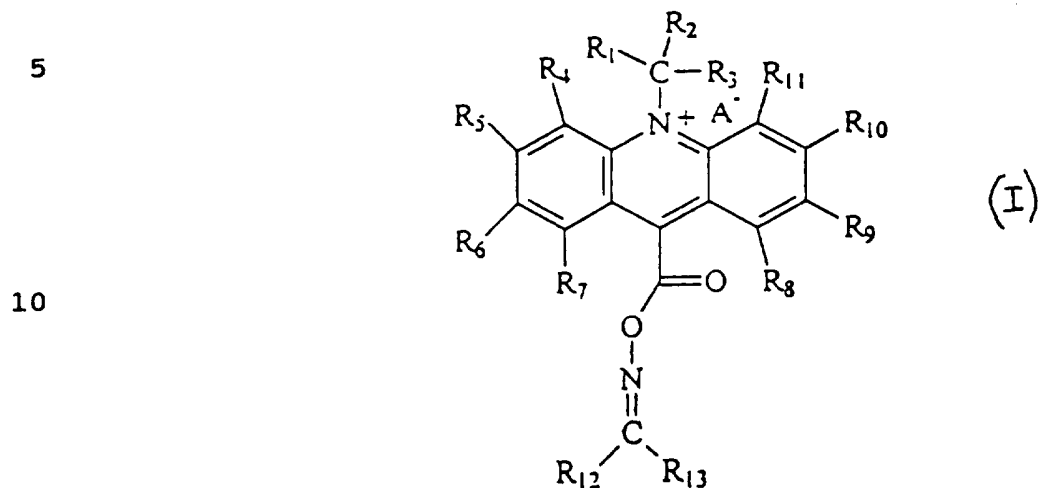
4.2 DOSAGE DE TSH AVEC LES ANTICORPS MARQUES PAR OX7.

- Un dosage non optimisé de la TSH a été réalisé en suivant un protocole identique à un dosage IRMA commercial avec des anticorps anti-TSH marqués par la sonde OX7. Le 20 protocole utilisé comporte les étapes suivantes:
- préparation du traceur par dilution du pic d'anticorps marqués dans un tampon traceur à pH 7,0 (dilution 50x);
 - remplissage des différents tubes coatés avec 200 μ l de standards (0, 0,15, 0,5, 1.5, 4, 15, 50 et 85 μ l/ml);
 - 25 • agitation durant 2h à température ambiante;
 - aspiration du contenu de chaque tube;
 - rinçage des tubes avec un tampon de lavage (opération réalisée 2 fois) et élimination de la phase liquide par aspiration;
 - 30 • lecture de la chimioluminescence des différents tubes.

La courbe de calibration obtenue (Fig. 8) montre que des anticorps marqués par la sonde OX7 peuvent parfaitement convenir comme traceur chimioluminescent dans le cadre d'un dosage nécessitant une grande sensibilité.

REVENDEICATIONS

1. Dérivés d'acridinium chimioluminescents de formule:



15

dans laquelle R_1 à R_{11} sont des substituants n'empêchant pas l'expression de la chimioluminescence, étant entendu que l'un au moins des substituants R_{12} et R_{13} comporte, comme élément unique ou comme élément de liaison au dérivé d'acridinium, un atome autre que le carbone.

2. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 1, caractérisés en ce que:

A est un ion complémentaire choisi parmi les ions halogéno, nitrate, sulfate, sulfonate, iodomercurate, trifluorométhane sulfonate, tartrate et phtalate,

R_1 à R_{11} sont l'hydrogène ou des radicaux de type R_{14} ou $B-R_{14}$, où B représente un groupe ou un atome de liaison et R_{14} représente un radical hydrocarboné pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes,

R_{12} et R_{13} sont des substituants identiques ou différents dont la fonction porte sur la chimioluminescence et sur le couplage,

l'un des substituants R_{12} et R_{13} comportant comme élément unique un atome d'halogène ou comportant comme élément de liaison au dérivé d'acridinium un atome choisi parmi les azotides et les chalcogènes, tandis que l'autre des substituants R_{12} et R_{13} est semblable aux substituants R_1

à R_{11} , à l'exception de l'hydrogène.

3. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 2, caractérisés en ce que, dans la formule B- R_{14} ,

5 B représente un groupe $-(CH_2)_n-$, où n représente un nombre entier de 1 à 5, B représente également un groupe contenant un azotide ou représente un chalcogène de préférence un groupe azoté ou l'oxygène deux fois liés, R_{14} étant tel que défini précédemment.

10 4. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 3, caractérisés en ce que:

R_{14} est un radical choisi parmi le groupe constitué par alkyle, alkényle, aryle, arylalkyle, hétéroaryle et hétéroarylkyle éventuellement substitués.

15 5. Dérivés chimioluminescents suivant les revendications 3 et 4, caractérisés en ce que:

R_1 à R_{11} sont l'hydrogène,

l'un des substituants R_{12} et R_{13} est un substituant choisi parmi les halogènes et les groupes B- R_{14} ,

20 l'autre des substituants R_{12} et R_{13} étant semblable à B- R_{14} ou à R_{14} , B et R_{14} étant tels que définis précédemment.

6. Dérivés chimioluminescents suivant la revendication 5, de formule:

25 [1-éthoxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

{1-éthoxy-1-[4-(2-bromoéthoxy)-phényl]-1-iminométhane}-10-méthylacridinium-9-carboxylate

30 ou

(1-chloro-1-phényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

35 [1-benzyloxy-1-(4-carboxyphényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-chloro-1-(3-cyanophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

[1-chloro-1-(2,4,5-trifluorophényl)-1-iminométhane]-10-méthylacridinium-9-carboxylate

ou

(1-chloro-1-perfluorophényl-1-iminométhane)-10-méthylacridinium-9-carboxylate.

7. Conjugué comprenant un dérivé
chimiluminescent selon l'une quelconque des revendications
1 à 6 lié éventuellement par l'intermédiaire d'un bras à un
composant biologique spécifique choisi parmi le groupe
constitué par les anticorps, les haptènes, les antigènes,
les acides nucléiques, les agonistes, les transporteurs
cellulaires, les acides gras, les lipides et/ou un mélange
d'entre eux.

8. Trousse de diagnostic et/ou de dosage
comprenant le conjugué selon la revendication 7 ou un
dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9. Utilisation du conjugué selon la revendication
7 ou d'un dérivé selon l'une quelconque des revendications
1 à 6, pour le marquage de protéines, le dosage et/ou la
détection d'un composant biologique spécifique choisi parmi
le groupe constitué par les anticorps, les haptènes, les
antigènes, les acides gras, les lipides et/ou un mélange
d'entre eux.

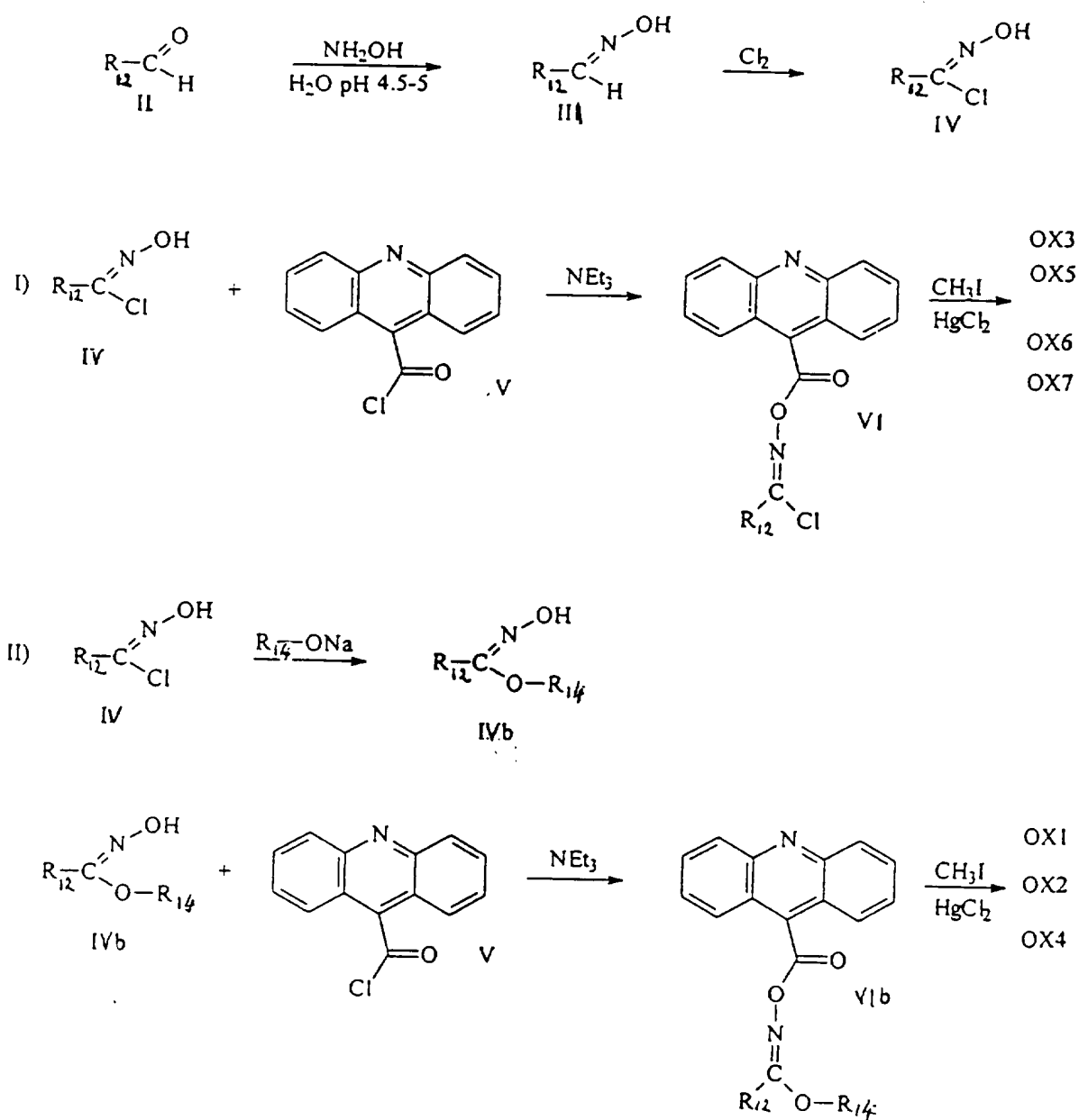
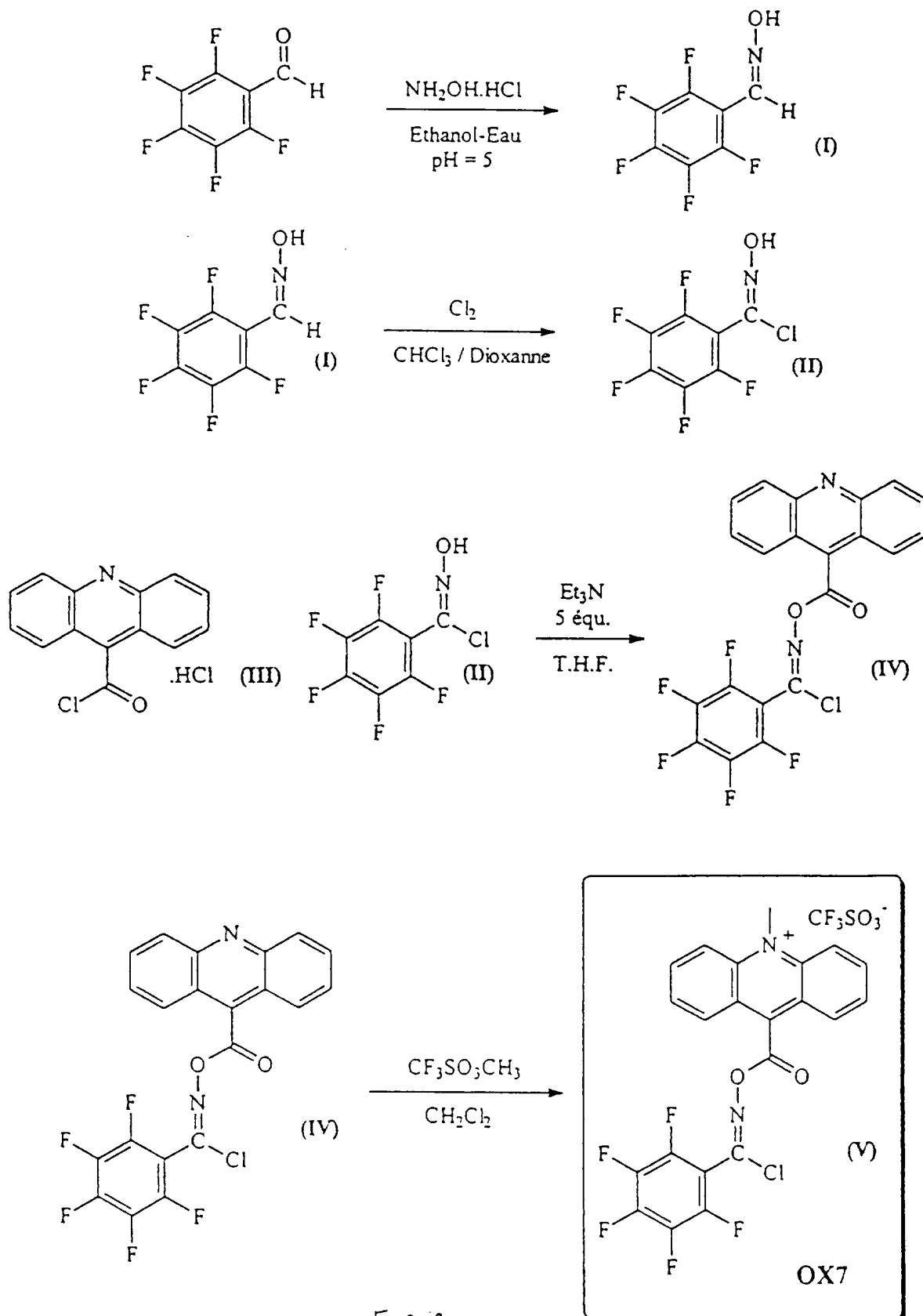
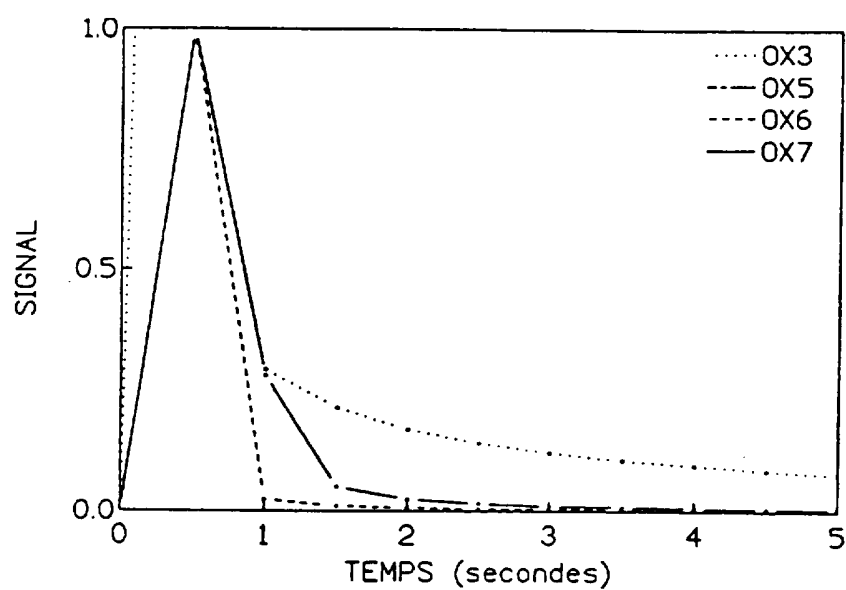
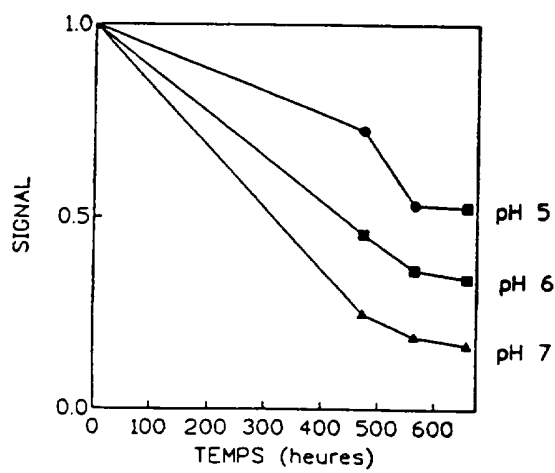
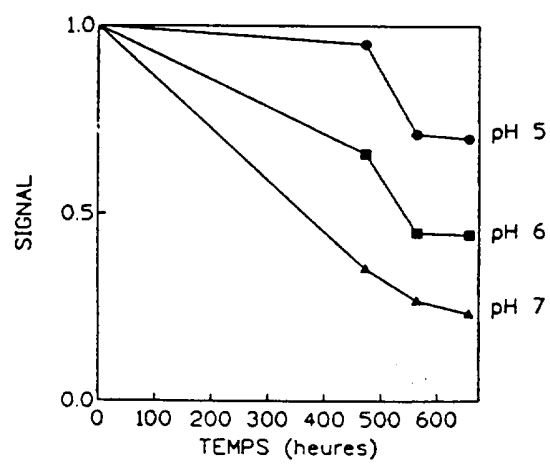


FIG 1



FIG 3FIG 4FIG 5

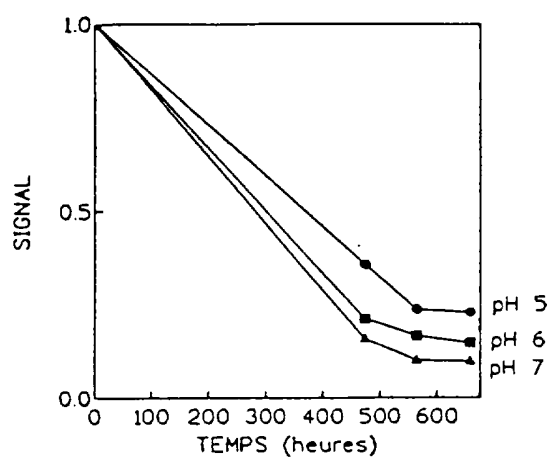


FIG 6

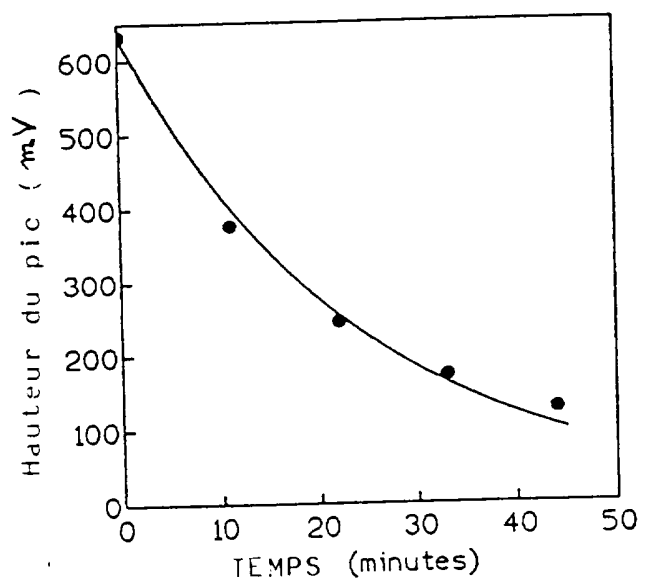


FIG.7

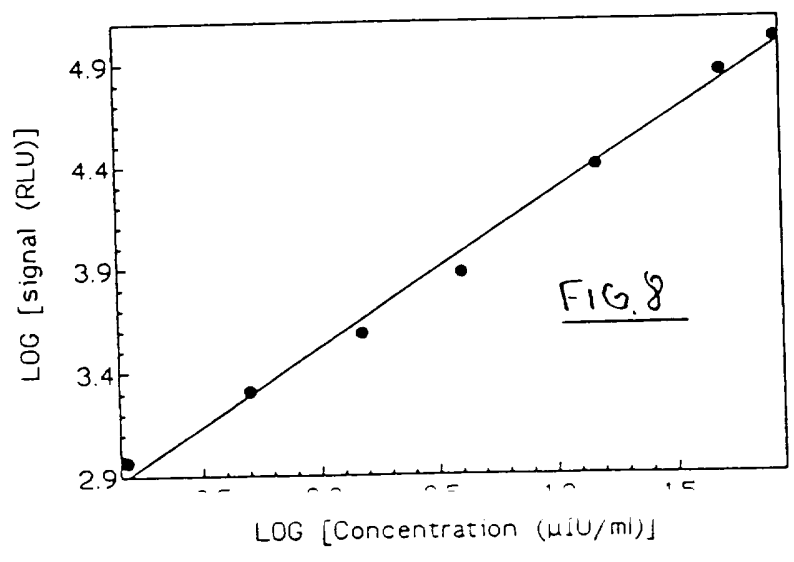
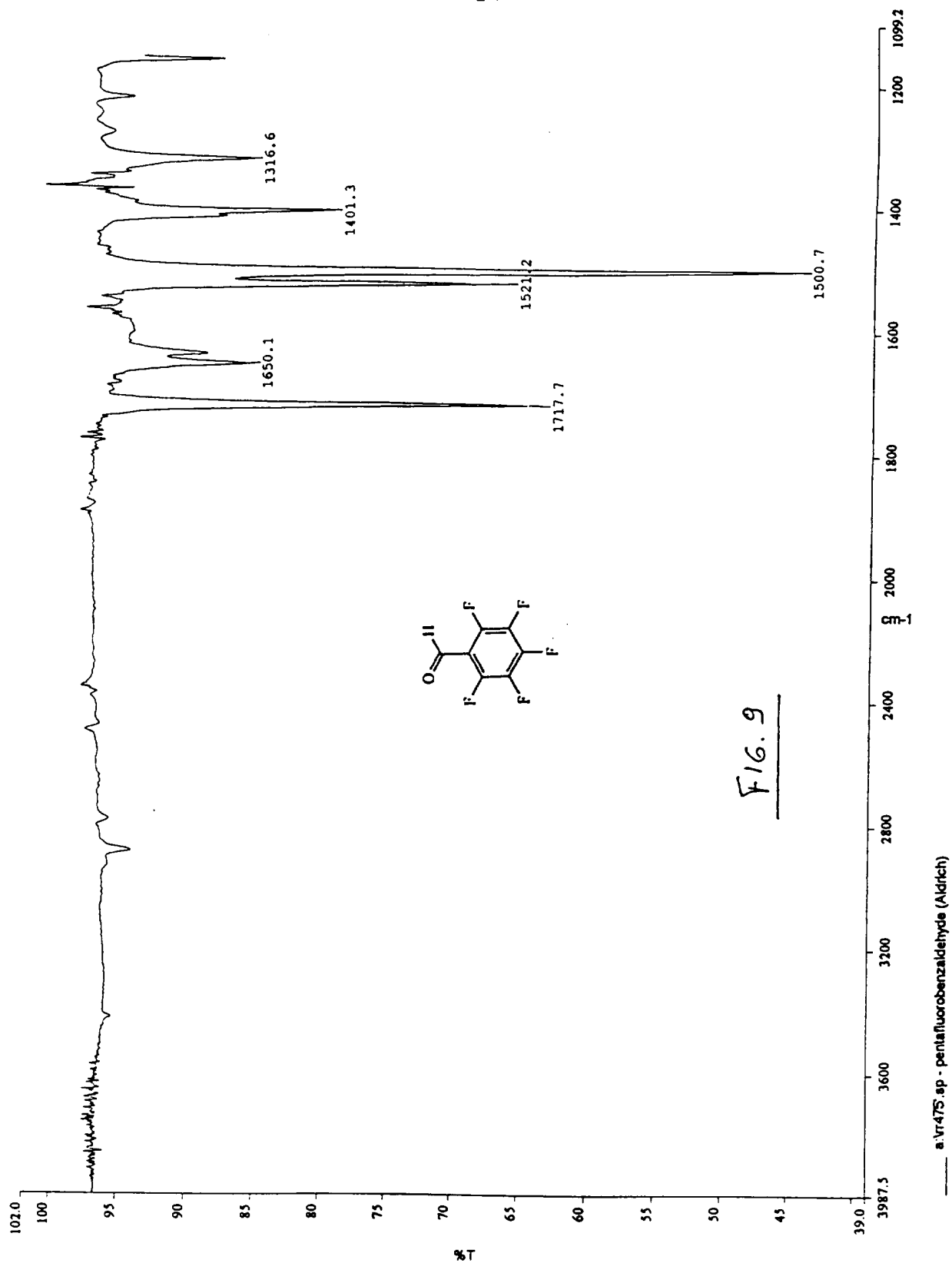
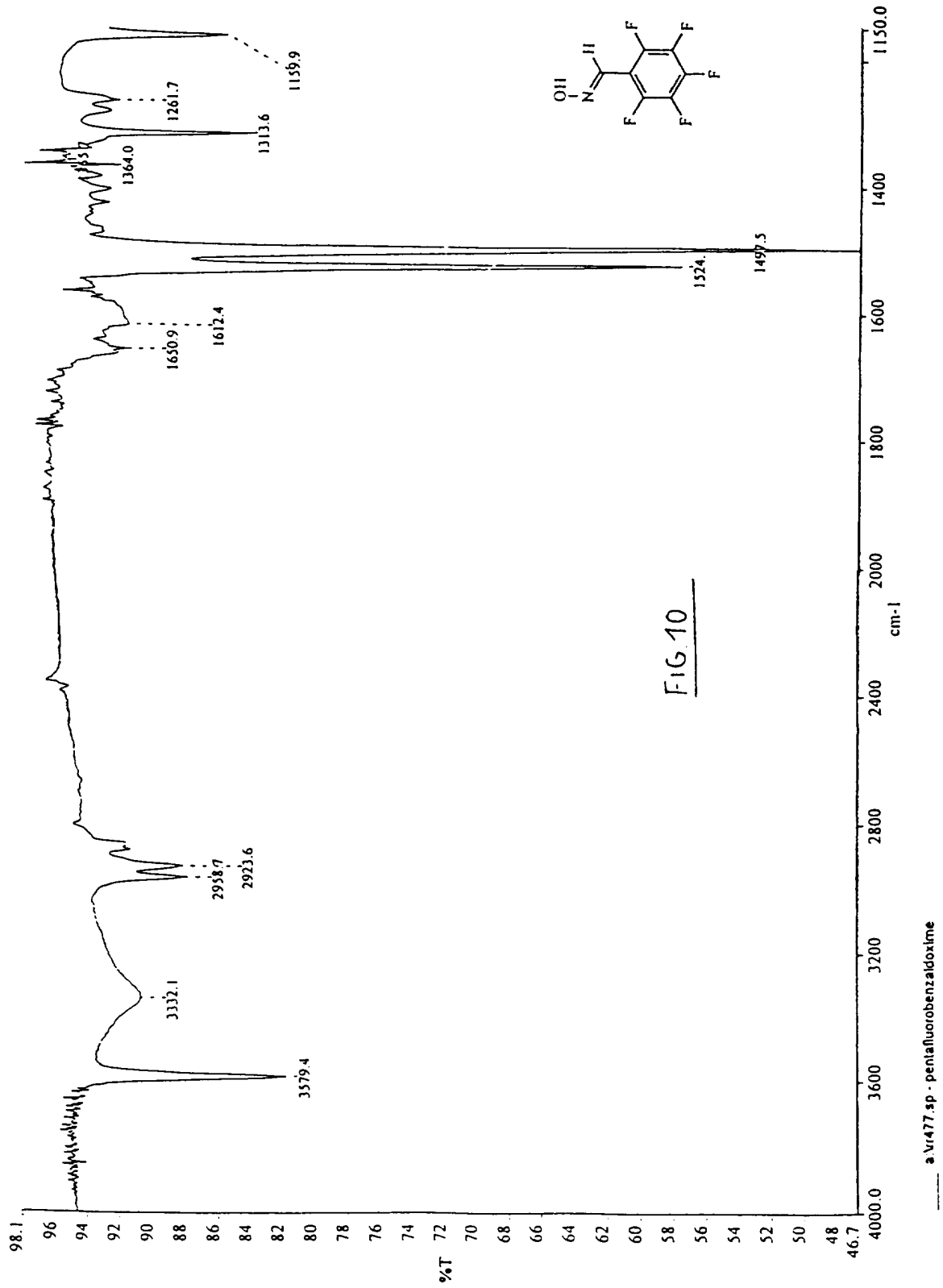
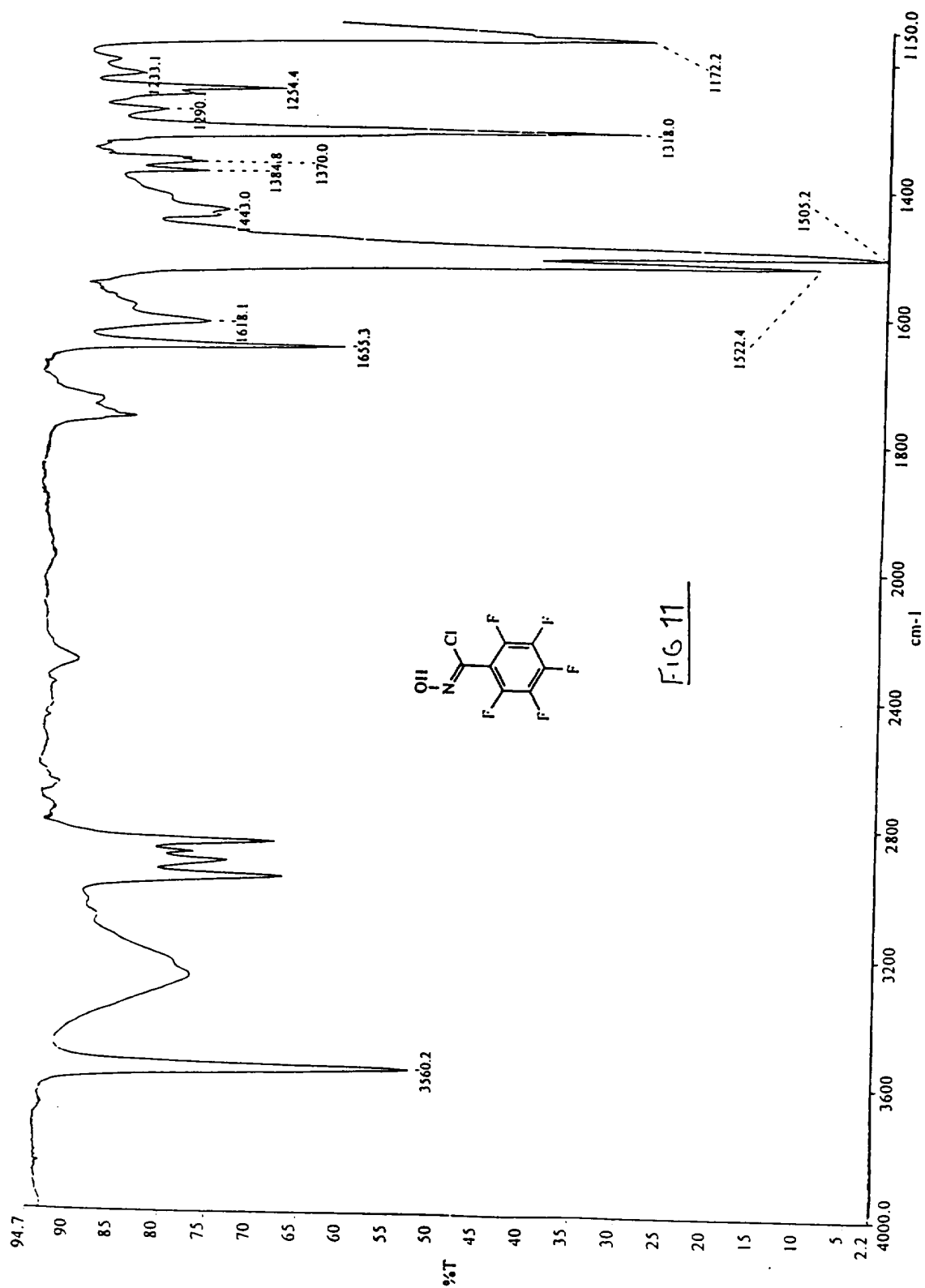


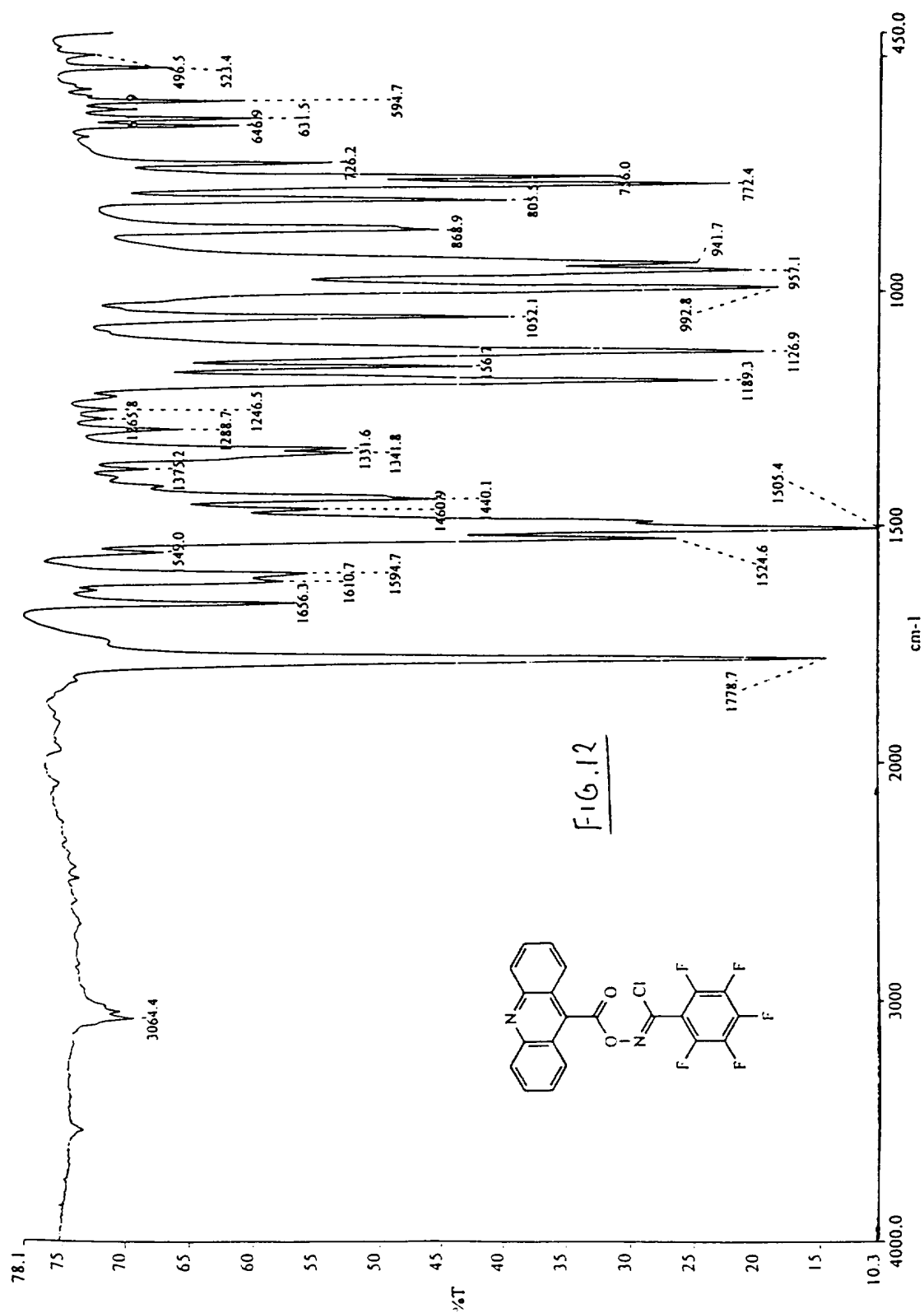
FIG.8



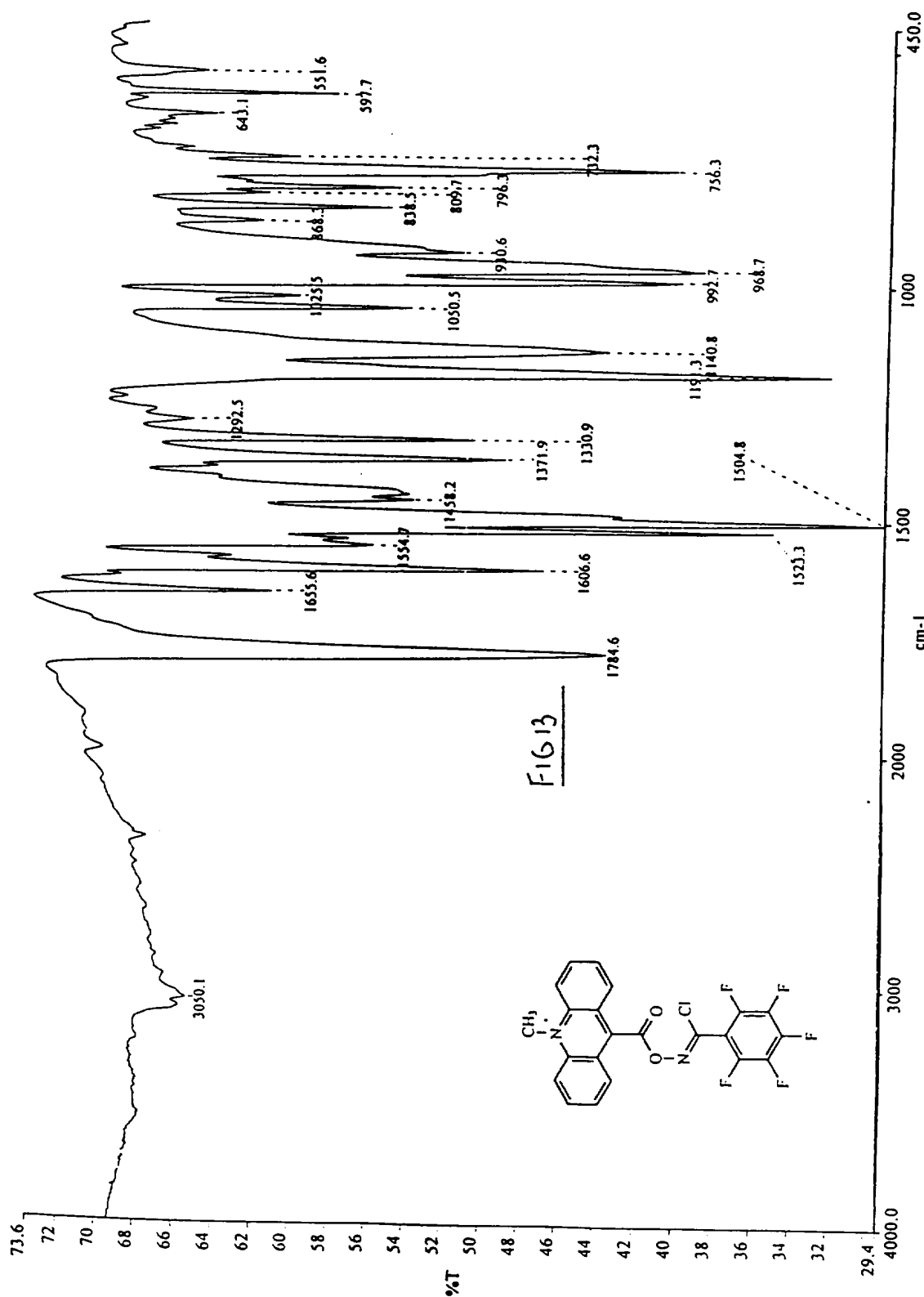




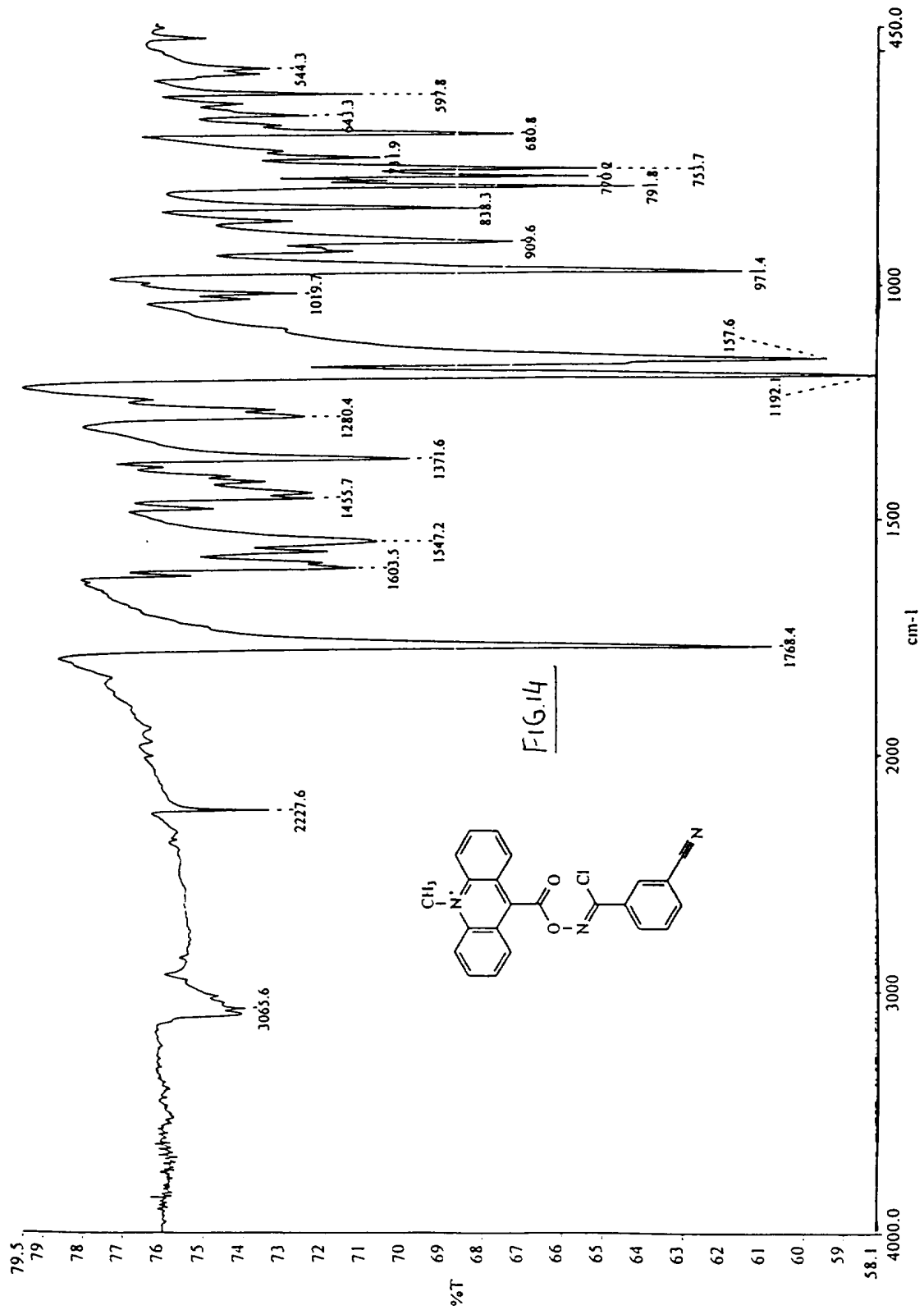
o-trifluoromethyl-*p*-chlorophenyl isocyanide

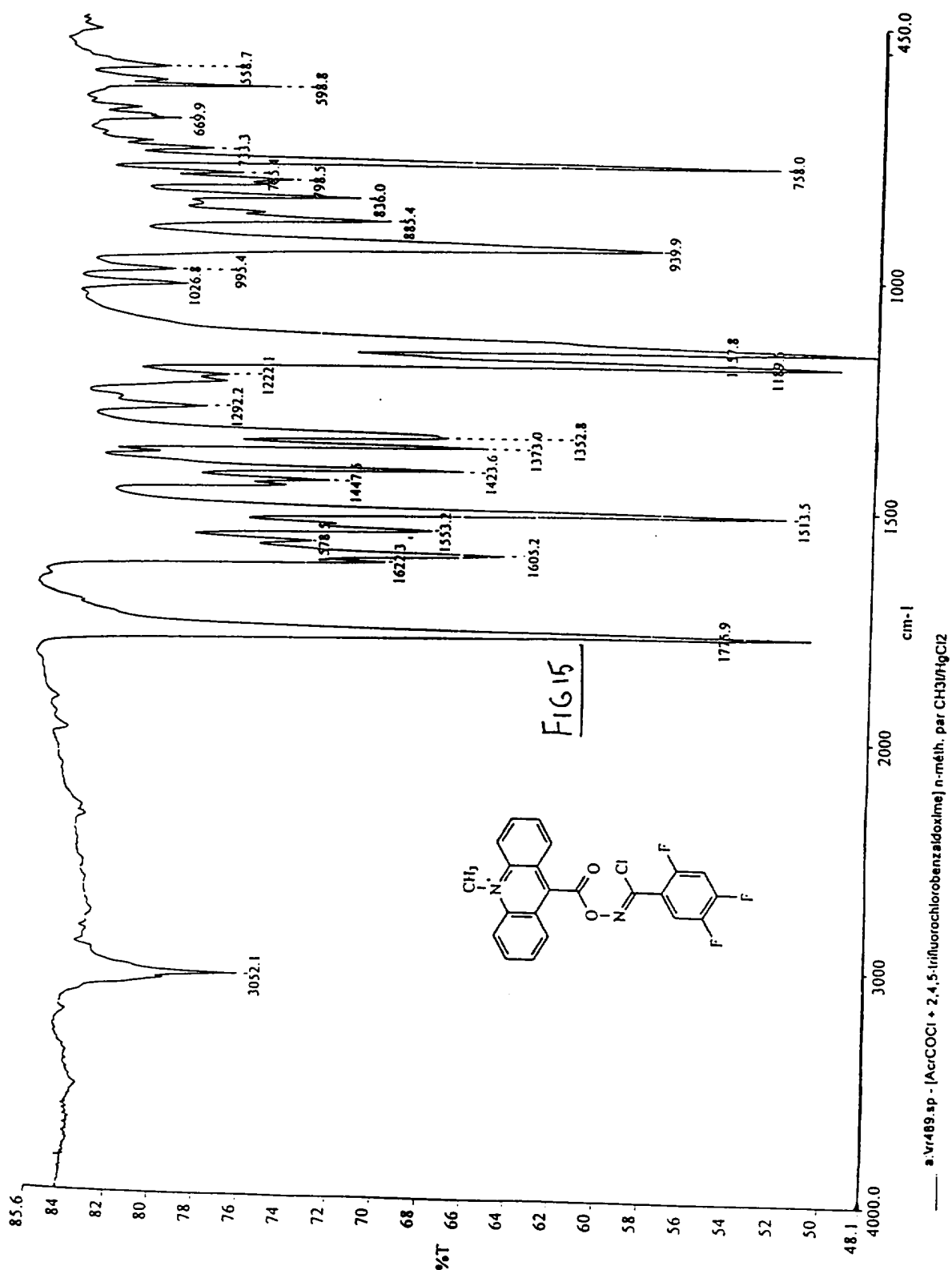


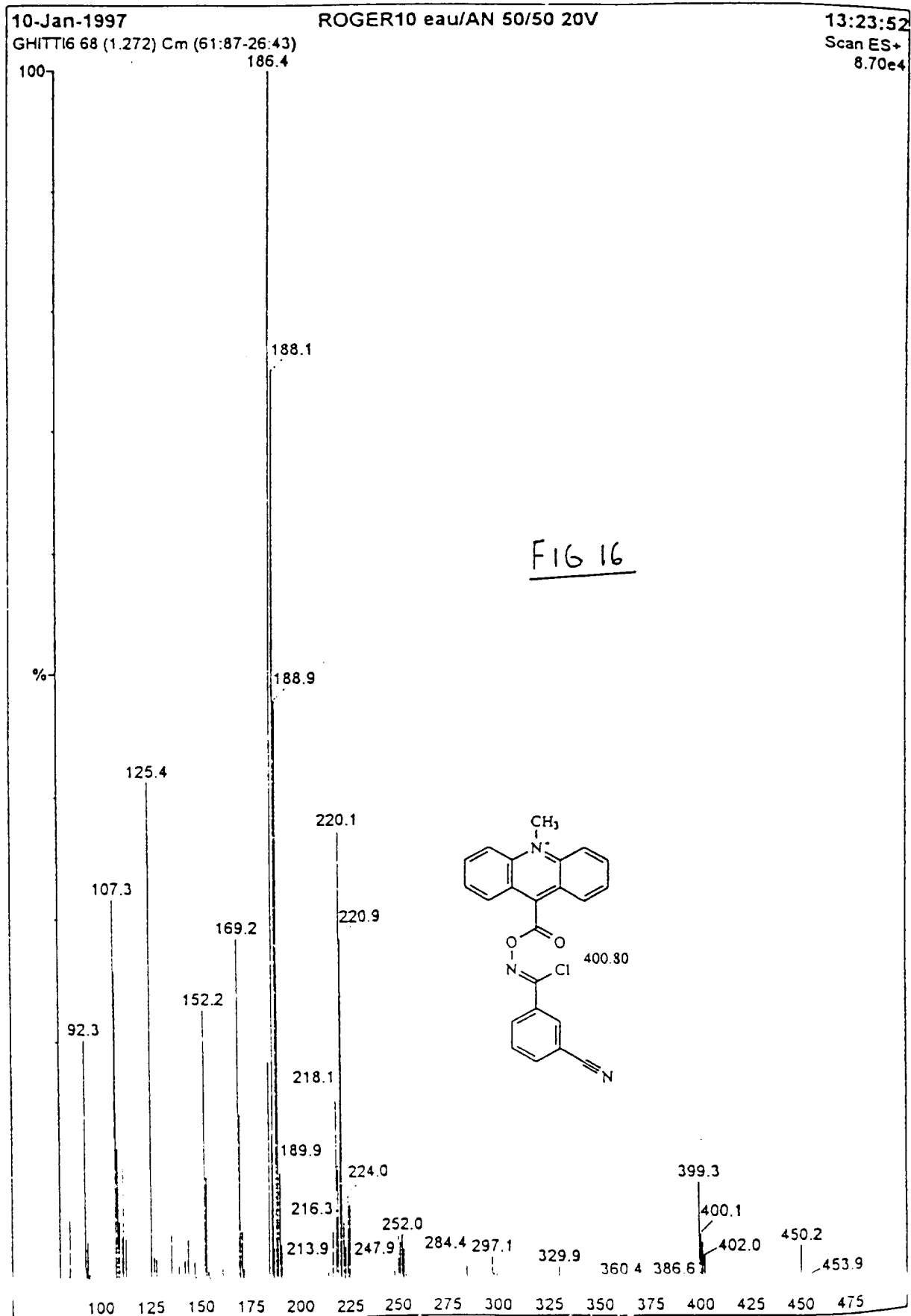
..... a. Vr488 sp - AcrcOCI + Chloroxime de la pentafluorobenzaldéhyde



— a. Vr490.sp - [Ac₂COCl + Chloroxime de la pentafluorobenzaldéhyde] N-méth. par CH₃IRHCl₂

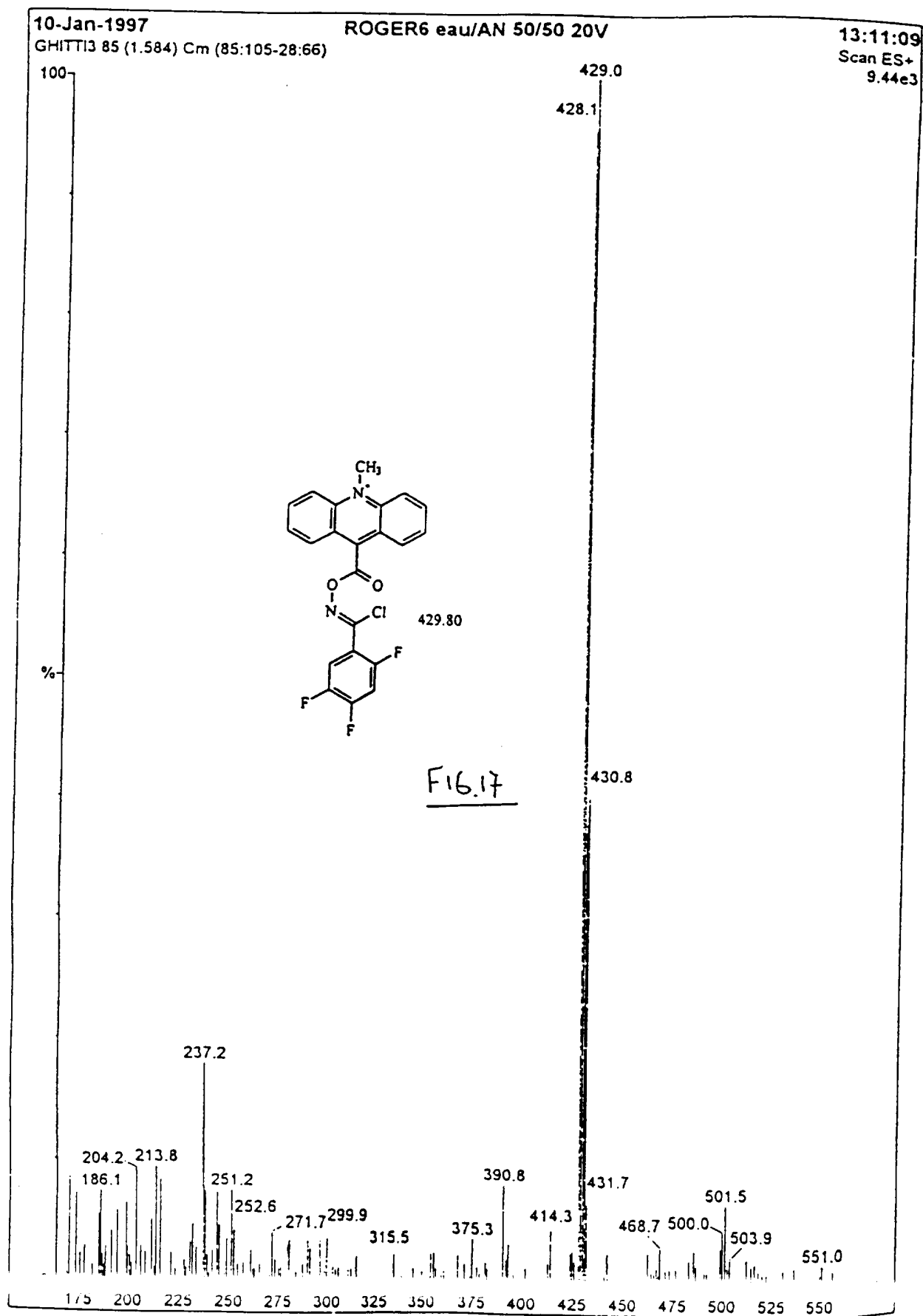






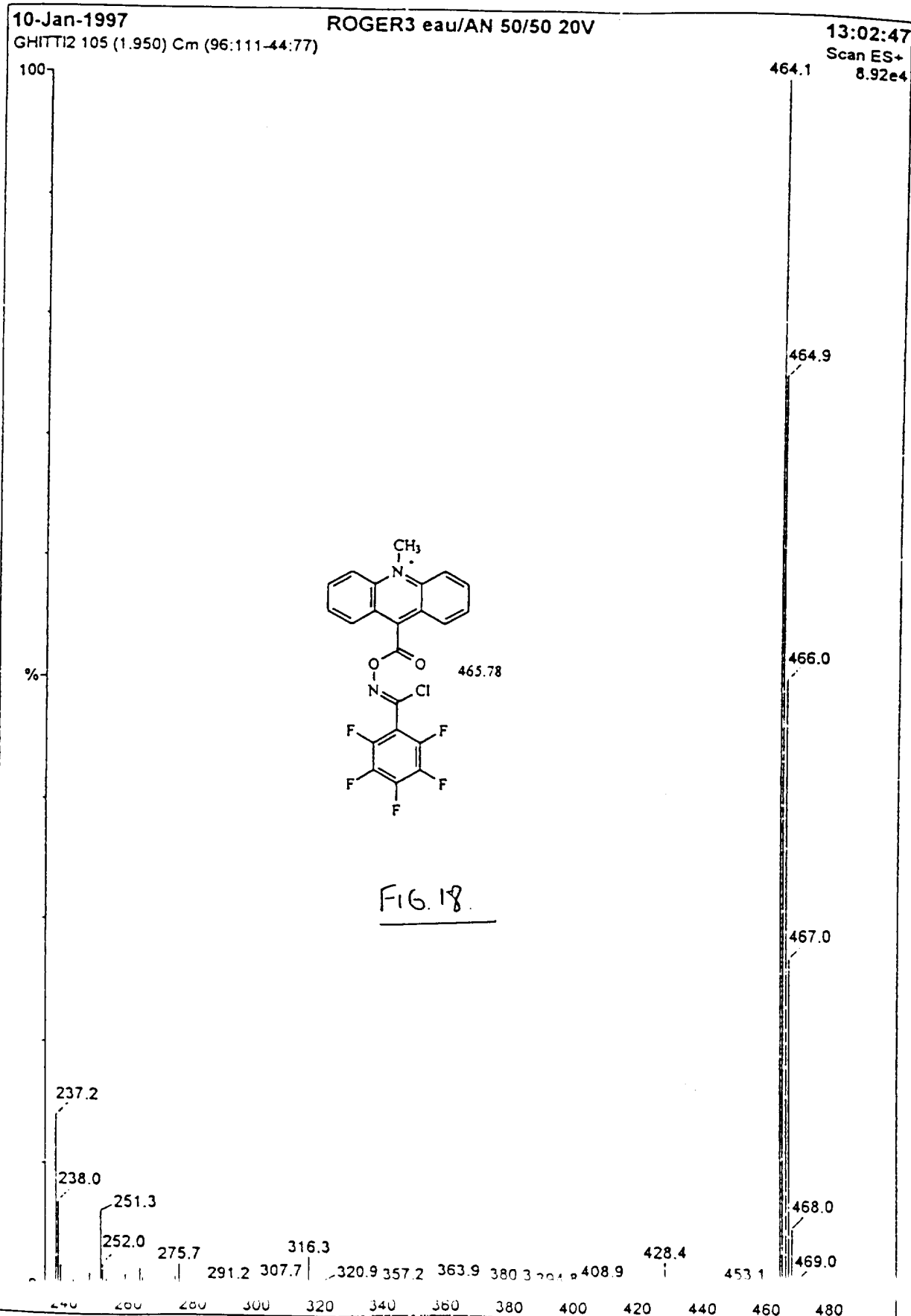
09700503

32



09700503

33





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

B0 6637
BE 9700503

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
D,X	WO 95 19976 A (BIOCODE SA) * page 22, ligne 10 - page 25, ligne 30; revendications; exemples 9,10 * ---	1-5,7-9	C07D219/04 G01N33/533
A,D	EP 0 263 657 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) * revendications * ---	1,7-9	
D,A	EP 0 257 541 A (HOECHST AG) * revendications * -----	1,7-9	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
			C07D G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 janvier 1998		Henry, J	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1

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

BO 6637
BE 9700503

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

29-01-1998

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9519976 A	27-07-95	BE 1008216 A	20-02-96
		AU 1529295 A	08-08-95
		EP 0741720 A	13-11-96

EP 0263657 A	13-04-88	US 4745181 A	17-05-88
		AU 595644 B	05-04-90
		AU 7910087 A	14-04-88
		DE 3779040 A	17-06-92
		JP 1989775 C	08-11-95
		JP 7002716 B	18-01-95
		JP 63101368 A	06-05-88
		US 4918192 A	17-04-90
		US 5110932 A	05-05-92

EP 0257541 A	02-03-88	DE 3628573 A	25-02-88
		AT 132490 T	15-01-96
		DE 3645292 C	11-12-97
		DE 3751659 D	15-02-96
		DK 68492 A	25-05-92
		DK 171437 B	28-10-96
		EP 0647628 A	12-04-95
		ES 2083949 T	01-05-96
		JP 7179428 A	18-07-95
		JP 1966835 C	18-09-95
		JP 6099401 B	07-12-94
		JP 63057572 A	12-03-88
		NO 177639 B	17-07-95
