

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
10 mai 2001 (10.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/33224 A1

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
G01N 33/543, 33/546, C12Q 1/68  
Bordeaux (FR). MONDAIN-MONVAL, Olivier [FR/FR];  
116, rue Brach, F-33000 Bordeaux (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/03086  
(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU;  
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).
- (22) Date de dépôt international:  
6 novembre 2000 (06.11.2000)  
(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Langue de dépôt: français  
(26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité:  
99/14195 5 novembre 1999 (05.11.1999) FR  
(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US): BIO  
MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy l'Etoile (FR). CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel  
Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). PICHOT, Christian  
[FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F-69960 Corbas (FR).
- (72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ELAIS-  
SARI, Abdelhamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod,  
F-69007 Lyon (FR). BOSCH, Eric [FR/FR]; 34, chemin de  
Blanquette, F-33770 Salles (FR). MANDRAND, Bernard  
[FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).  
BIBETTE, Jérôme [FR/FR]; 16, rue Boulon, F-33000
- Publiée:  
— Avec rapport de recherche internationale.  
— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues.
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations,  
se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITE PARTICLES, DERIVED CONJUGATES AND THEIR CONJUGATES WITH BIOMOLECULES

(54) Titre: PARTICULES COMPOSITES ET LEURS CONJUGUES AVEC DES BIOMOLECULES

(57) Abstract: The invention concerns composite particles comprising a hydrophobic polymer and inorganic nanoparticles, said particles having a diameter of about 50 to 1000 nm, preferably about 100 to 500 nm, and advantageously from about 100 to 250 nm and comprising a hydrophobic polymer consisting of a polymer matrix and the inorganic nanoparticles stabilised and distributed relative homogeneously inside said matrix. The invention also concerns conjugates derived from said composite particles, their method of preparation and their uses.

(57) Abrégé: Particules composites comprenant un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, lesdites particules présentant un diamètre de l'ordre d'environ 50 à 1000 nm, de préférence d'environ 100 à 500 nm et avantageusement d'environ 100 à 250 nm et comprenant le polymère hydrophobe qui constitue une matrice polymère et les nanoparticules inorganiques stabilisées et distribuées de manière relativement homogène à l'intérieur de ladite matrice; conjugués dérivés desdites particules composites; leur procédé de préparation et leurs utilisations.

WO 01/33224 A1

## PARTICULES COMPOSITES ET LEURS CONJUGUES AVEC DES BIOMOLECULES

La présente invention a pour objet des particules composites, leur procédé de préparation et leurs utilisations.

5 Les microsphères de type polymère présentent un intérêt comme support, vecteur ou véhicule dans les domaines de l'ingénierie biologique, du diagnostic et de la pharmacie. A cet effet, elles ont été utilisées dans le diagnostic médical comme support solide pour des molécules biologiques.

10 Les particules colloïdales présentent plusieurs avantages par rapport aux supports solides traditionnels, tels que tubes, plaques, billes notamment parce qu'elles permettent de disposer d'une grande surface pour des interactions spécifiques et parce qu'elles sont facilement modifiables chimiquement pour introduire à leur surface des groupements  
15 fonctionnels susceptibles de réagir avec d'autres molécules, par exemple des molécules biologiques telles que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des protéines, des polypeptides, des polynucléotides, des acides nucléiques, des fragments d'acides nucléiques, des enzymes ou des molécules chimiques telles que des catalyseurs, des médicaments, des  
20 molécules cages, des chélatants.

Parmi les particules colloïdales, les latex magnétiques ont suscité un grand intérêt dans le domaine analytique et sont utilisés par exemple comme moyen pour séparer et/ou détecter des analytes, tels que des antigènes, des anticorps, des molécules biochimiques, des acides  
25 nucléiques et autres.

Les particules composites de type polymère/magnétique sont habituellement classées en trois catégories sur un critère de taille: les petites particules ayant un diamètre inférieur à 50 nm, les grosses particules ayant un diamètre supérieur à 2  $\mu\text{m}$  et les particules  
30 intermédiaires d'un diamètre compris entre 50 et 1000 nm.

Mais pour qu'elles puissent être considérées comme de bons candidats, en particulier pour une application diagnostique, elles doivent répondre à certains critères. D'un point de vue morphologique, il est préférable qu'elles soient relativement sphériques et que la charge magnétique soit répartie de façon relativement homogène dans la matrice polymère. Elles ne doivent pas s'agréger de manière irréversible sous l'action d'un champ magnétique, ce qui signifie qu'elles puissent être redispersées facilement, rapidement et de manière réversible. De même, elles doivent présenter une densité relativement faible pour réduire le phénomène de sédimentation. Avantageusement, elles doivent présenter une distribution granulométrique étroite. On parle encore de particules monodisperses ou isodisperses.

Ainsi, en raison de leur taille et de leur densité, les grosses particules magnétiques en suspension dans une phase liquide ont tendance à rapidement sédimenter. Par ailleurs, elles tendent à s'agréger après avoir été soumises à un champ magnétique car elles sont susceptibles d'avoir été de ce fait magnétisées de manière permanente (aimantation rémanente). Elles ne constituent donc pas un bon candidat.

A contrario, les petites particules magnétiques ont tendance à rester en suspension du fait de leur mouvement Brownien et sont difficilement attirées, voire pas du tout, par un aimant, en particulier si le champ magnétique appliqué est relativement faible. Elles ne sont donc pas bien appropriées pour les utilisations développées ci-dessus.

Il existe donc un intérêt évident à produire des particules composites de type polymère/magnétique, présentant une taille intermédiaire entre 50 et 1000 nm, qui à la fois pallient les inconvénients précités et répondent aux critères établis ci-dessus. Mais l'invention n'est pas limitée à des particules composites magnétisables, comme décrit ci après.

La demande de brevet EP 0 390 634 décrit des microsphères composites magnétisables de polymère vinylaromatique réticulé hydrophobe d'un diamètre de l'ordre de 50 à 10 000 nm et comprenant un cœur solide constitué de particules magnétisables et d'une écorce constituée d'un copolymère hydrophobe dérivé d'au moins un monomère vinylaromatique hydrophobe et d'au moins un polymère émulsifiant polyéthyléniquement insaturé soluble dans le ou les monomères vinylaromatiques et susceptible de réticuler avec le ou lesdits monomères. Toutefois, bien qu'elles puissent répondre à l'exigence de la taille, elles présentent l'inconvénient de ne pas avoir une répartition homogène de la charge magnétique qui est localisée à l'intérieur du cœur. Par ailleurs, et comme cela ressort à l'évidence des figures annexées, les particules ne sont pas homogène en taille. Il s'agit donc d'un ensemble de particules polydisperses qui devront être triées par application d'un champ magnétique pour ne retenir que les particules de taille attendue.

On peut également citer les particules Dynal (nom commercial). Ces particules sont des microsphères constituées d'un cœur poreux de polystyrène et d'oxydes de fer, les oxydes de fer ayant été déposés par imprégnation au niveau des pores disponibles à la surface du polystyrène, et d'une enveloppe en un autre polymère qui encapsule les oxydes de fer des microsphères poreuses. Elles présentent un diamètre respectivement de 2,8  $\mu\text{m}$  (particules M280) et de 4,5  $\mu\text{m}$  (particules M450) et sont relativement uniformes en taille. Elles sont donc considérées comme des particules isodisperses mais en raison de leur taille élevée présentent les inconvénients précités, principalement le phénomène de sédimentation. De plus, leur surface spécifique est faible.

Selon l'invention on dispose maintenant de nouvelles particules composites qui répondent aux critères précités.

Les particules composites de l'invention comprennent un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques et sont

caractérisées en ce qu'elles présentent un diamètre de l'ordre d'environ 50 à 1000 nm, de préférence d'environ 100 à 500 nm, et avantageusement d'environ 100 à 250 nm, en ce que le polymère hydrophobe constitue une matrice polymère et en ce que les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière relativement homogène à l'intérieur de ladite matrice. Avantageusement, les particules composites de l'invention présentent un diamètre de 100 à 250 nm plus ou moins environ 5%, ce qui signifie que leur diamètre moyen en volume est défini à plus ou moins environ 5% près.

10 Les matériaux inorganiques constituant les nanoparticules sont choisis parmi les oxydes métalliques, tels que les oxydes de fer, de titane, de chrome, de cobalt, de zinc, de cuivre, de manganèse, de nickel et en particulier parmi les oxydes métalliques magnétisables, tels que les oxydes de fer; la magnétite ; l'hématite ; les ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, nickel.

15 Avantageusement , les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques magnétisables, préférentiellement les oxydes de fer.

Les nanoparticules inorganiques représentent 5 à 95%, de préférence 10 à 90% et avantageusement 20 à 90% en masse par rapport à la masse totale de la particule composite, de préférence 25 à 85%.

Elles sont stabilisées par des agents de stabilisation choisis parmi les chaînes polymère amphiphiles, les agents tensio-actifs ioniques ou non ioniques, fonctionnels ou non fonctionnels, polymérisables ou non polymérisables. Les agents tensio-actifs fonctionnels sont en particulier choisis parmi les acides gras ou des dérivés d'acides gras, en particulier l'acide oléique ou ses dérivés, et un mélange d'agents tensio-actifs tels que définis précédemment.

Les polymères appropriés de la matrice sont les polymères de type vinylaromatiques hydrophobes, c'est à dire les homopolymères de

monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques. Préférentiellement, le polymère est un polymère réticulé. Ceci est obtenu en ajoutant dans le ou les monomères une faible quantité (inférieure à 10% en poids) de molécules ayant au moins deux doubles liaisons réactives, telles que le divinyl benzène, le méthacrylate de vinyle, le cyanurate de triallyle, le diacrylate de mono ou de polyéthylèneglycol.

Les nanoparticules composites de l'invention peuvent également inclure un marqueur, tel qu'un marqueur fluorescent, luminescent ou radioactif, étant entendu que le marqueur est introduit lors de la préparation de l'émulsion telle que décrite dans les exemples 1 et 2 qui suivent.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des particules composites précitées qui permet d'obtenir directement des particules de diamètre souhaité et isodisperses sans nécessiter d'étape de tri en fonction du diamètre.

Selon le procédé de l'invention, (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensio-actif ; ladite phase A étant dispersée dans une phase B hydrophile; (ii) on introduit dans la phase hydrophile B des monomères hydrophobes qui pénètrent à l'intérieur de la phase A; (iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A en

présence d'un agent amorceur choisi parmi les amorceurs organosolubles, insolubles ou faiblement solubles dans la phase hydrophile B et les amorceurs hydrosolubles dans des conditions prédéterminées.

Les monomères mis en œuvre doivent former des polymères hydrophobes. Ils sont insolubles dans la phase hydrophile et choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, amino-méthylstyrène, vinyltoluène. Ils sont utilisés seuls ou en mélange ou bien encore en mélange avec d'autres monomères polymérisables insolubles dans l'eau tels que les acrylates, les méthacrylates d'alkyle, les esters d'acides éthyléniques et d'alkyle, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les acides éthyléniques, les composés diéniques.

Il est possible d'ajouter au monomère ou au mélange de monomères un agent de réticulation hydrophobe, par exemple un monomère réticulant de type divinylbenzène, diméthacrylate, en particulier diméthacrylate de vinyle.

L'amorceur organosoluble est choisi parmi les amorceurs de type azobis, tels que les 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile), 2, 2'-azobis(2-cyclopropylpropionitrile), 2, 2'-azobis(2-méthylpropionitrile), 2, 2'-azobis(2-méthylbutyronitrile), 1, 1'-azobis(cyclohexane-1-carbonitrile), 1-((1-cyano-1-méthyléthyl)azo)formamide, 2-phénylazo-4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile, diméthyl 2, 2'-azobis(2-méthylpropionate, 4, 4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et 2, 2'-azobis(2-(hydroxyméthyl)propionitrile). Si on choisit un amorceur hydrosoluble ou faiblement hydrosoluble, tels que les peroxydes, les hydroperoxydes et les persulfates, il engendre un début de polymérisation dans la phase hydrophile qui se propage dans la phase hydrophobe. Les persulfates, en particulier le persulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium sont solubles en phase aqueuse. Sous l'action de la chaleur, ils se décomposent et génèrent des

anions à radicaux sulfate qui contribueront à charger la nanosphère composite. Le peroxyde d'hydrogène est soluble en phase aqueuse et génère des radicaux hydroxyles non chargés. La décomposition des hydroperoxydes génère un hydroxyle et un radical oxygéné qui se partageront dans une des phases en fonction de la nature du peroxyde utilisé. Ainsi, le peroxyde de cumène, dans le cas de la polymérisation du styrène, est supposé se décomposer au niveau de l'interface entre la particules de monomères et l'eau, les radicaux hydroxyles entrent dans la phase aqueuse et les radicaux non polaires diffusent vers la particule. De la nature cationique ou anionique de l'amorceur dépendra le caractère cationique ou anionique de la particule et du conjugué résultant de l'invention.

L'amorceur est introduit dans la phase hydrophile et pénètre dans la phase hydrophobe (a) soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, (b) soit préalablement à l'étape d'introduction des monomères hydrophobes, (c) soit postérieurement à l'étape d'introduction desdits monomères hydrophobes.

Dans un mode de réalisation préféré l'étape (iii) de polymérisation est effectuée par élévation de la température jusqu'à environ 60 à 90°C, en particulier à une température de 70°C en présence de l'amorceur de polymérisation, étant entendu que les conditions de la polymérisation seront déterminées par l'homme du métier en fonction de la nature de l'amorceur retenu, ou par photochimie à l'aide de rayonnements, par exemple de rayonnements ultra violets ou d'un faisceau laser ou d'autres sources d'énergie.

La phase organique est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges ou une phase comprenant tout ou partie d'un composé organique polymérisable par voie radicalaire. De préférence, l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane,



l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane et le dodécane, et le composé organique polymérisable par voie radicalaire est choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, étant  
5 entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier d'adapter les conditions de polymérisation en fonction du choix du ou des hydrocarbure(s) retenu(s) et de la nature de l'amorceur choisi. En particulier, si la polymérisation est effectuée par élévation de la température ou engendre  
10 une élévation de température, le montage réactionnel devra être adapté aux solvants volatils, tels que le pentane.

De manière préférentielle la phase hydrophile est une phase aqueuse, telle que de l'eau.

Dans des modes de réalisation préférentiels de la présente  
15 invention, les particules sont fonctionnalisées par introduction dans la phase B et pénétration dans la phase A de groupements réactifs fonctionnels. Les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par exemple par des monomères faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes de la matrice polymère. En  
20 particulier, les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par des monomères hydrophiles choisis parmi les monomères des acides acryliques, méthacryliques, éthyléniques et sulfoniques, seuls ou en mélange, ou encore en mélange avec des monomères hydrophobes ; étant  
25 entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier de déterminer la composition du mélange. Les groupements fonctionnels permettent les réactions ultérieures mais apportent également la stabilisation colloïdale nécessaire pour les applications ultérieures. Les groupements fonctionnels sont introduits dans la phase B et pénètrent à l'intérieur de la phase A (a) soit de manière simultanée à la pénétration des monomères hydrophobes  
30 de l'étape (ii), (b) soit préalablement à la pénétration des monomères

hydrophobes de l'étape (ii), (c) soit postérieurement à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii).

Dans un mode de réalisation particulier, et si souhaité, l'étape (iii) est suivie d'une étape d'évaporation partielle ou totale de la phase organique A avec formation de particules composites poreuses.

L'invention a aussi pour objet des particules composites fonctionnalisées qui présentent à leur surface des groupements fonctionnels réactifs, tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, hydroxyl, tosyl hydrazine, susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

Les particules composites fonctionnalisées, non poreuses ou poreuses, ainsi formées seront susceptibles d'immobiliser un ligand, par exemple une molécule biologique, telle qu'un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, une sonde, une amorce, un fragment d'acide nucléique ; des molécules chimiques, telles que des polymères chimiques, des substances médicamenteuses, des molécules cages, des agents chélatants, des catalyseurs, la biotine ; étant entendu que lorsque les particules composites sont dites « poreuses », elles ont atteints un degré de porosité déterminé par évaporation totale ou partielle de la phase organique.

Aussi, la présente invention a également pour objet des conjugués dérivés des particules composites couplés à au moins un ligand tel que défini ci-dessus et leurs utilisations.

A titre d'exemple, lesdits conjugués sont utilisés dans des tests immunologiques pour la détection et/ou la quantification de protéines, d'antigènes, d'anticorps dans un échantillon biologique ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la quantification d'un fragment d'acide nucléique dans un échantillon biologique. L'utilisation de sondes pour la détection et/ou la quantification d'un acide nucléique dans un échantillon est bien connue de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration la technique d'hybridation sandwich. De

même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés comme « agents porteurs d'amorces » pour une réaction d'amplification d'acides nucléiques dans un échantillon, par exemple par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou toute autre technique d'amplification appropriée, permettant ainsi la  
5 détection et/ou la quantification d'acides nucléiques dans l'échantillon biologique.

La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostiques comprenant en outre lesdits conjugués et l'utilisation dudit réactif dans un essai diagnostique.

10 Les conjugués trouvent également une application dans le domaine thérapeutique comme véhicule ou vecteur d'une substance médicamenteuse, d'un agent réparateur de gènes défectueux, d'un agent susceptible de bloquer l'expression d'un gène, tel qu'une sonde anti-sens en thérapie ou d'un agent susceptible de bloquer l'activité d'une protéine  
15 et de ce fait ils peuvent être utilisés dans une composition thérapeutique ou prophylactique.

Ainsi, les conjugués de l'invention sont susceptibles de véhiculer une substance médicamenteuse dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend ledit conjugué en  
20 association avec un adjuvant et/ou diluant et/ou excipient approprié et pharmaceutiquement acceptable, ladite substance médicamenteuse étant capable d'être relarguée *in vivo*. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co.

25 Les conjugués de l'invention sont également susceptibles de véhiculer un gène d'intérêt thérapeutique codant pour au moins une protéine d'intérêt ou un fragment d'une protéine d'intérêt, étant entendu que par protéine on entend à la fois une protéine dans sa définition la plus généralement utilisée et un anticorps. Bien entendu, un tel conjugué est  
30 incorporé dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui

comprend également les éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique.

Les conjugués de l'invention sont également utilisables, quand incorporés dans une composition thérapeutique ou prophylactique, pour le transfert *in vivo* de sondes ou oligonucléotides anti-sens. Les anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement du polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par des oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotide anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Dans ce cas particulier, on parle plus précisément d'oligonucléotides antigènes. Il est bien entendu que les oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un conjugué vecteur d'un oligonucléotide anti-sens tel que définis ci-dessus.

Enfin, les conjugués sont susceptibles de former des complexes du type molécule cage/cryptate, chélatant/molécule chélatée ou de servir de véhicule pour des catalyseurs dans une application chimique.

Les particules composites et les conjugués de l'invention sont obtenus par polymérisation en émulsion *in situ* selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent.

Exemple 1 :

Une émulsion de départ stable et isodisperse a été préparée conformément à l'un ou l'autre des protocoles décrits dans cet exemple.

(i) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé d'émulsification en incorporant progressivement, tout en cisillant à l'aide d'un moulin colloïdal (Ika : nom commercial), la phase dispersée, formée de 45% en poids d'oxydes de fer dans de l'octane, à la phase continue formée de dodécyl sulfate de sodium à une concentration de 50% en poids dans l'eau jusqu'à l'obtention de fractions comprenant de 80% en poids de ferrofluide organique. Le mélange ainsi défini a été fragmenté dans une couette de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement déterminé. L'émulsion primaire ainsi préparée est une émulsion polydisperse caractérisée par une distribution large du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

(ii) L'émulsion primaire a été préparée à l'aide d'un procédé d'émulsification en ajoutant rapidement la phase dispersée, formée d'octane, de 73% en poids d'oxydes de fer et d'un agent tensio-actif lipophile de type monoglycérol ou polyglycérol de polyrisinoléate (1 à 10% en poids), à la phase continue formée de tensio-actif de type tergitol NP10 (31% en poids) grâce à une spatule. Le mélange ainsi défini est ensuite fragmenté dans une couette de type PG398 à un taux de cisaillement préalablement défini. L'émulsion primaire ainsi préparée est une émulsion

relativement isodisperse caractérisée par une distribution faible du diamètre des gouttelettes qui est ensuite traitée par des tris magnétiques successifs pour l'obtention de l'émulsion de départ isodisperse en taille.

5 Exemple 2 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole de l'exemple 1(i) et constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 180 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm  
10 dans de l'octane et un mélange de tensio-actifs (dodécyl sulfate de sodium (SDS) et acide oléique), dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 1%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 7 heures à l'azote. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile),  
15 comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'hexane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans l'émulsion. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant une heure et 80 mg de monomères de styrène sont ensuite introduits. Les monomères de styrène diffusent à l'intérieur de la phase A pendant deux heures. La polymérisation est amorcée par  
20 chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures trente minutes, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 188 nm et un indice de polydispersité de l'ordre de 1,1.

25 Exemple 3 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole décrit dans l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de  
30 10 nm dans de l'octane et un mélange d'agents tensio-actifs (SDS et acide

oléique), dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 9 heures à l'azote. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans l'émulsion. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant 30 minutes et 223 mg de monomère de styrène sont ensuite introduits. La diffusion des monomère de styrène dans la phase A s'effectue pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 238 nm plus ou moins 10 nm.

Exemple 4 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole de l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et un mélange de SDS et d'acide oléique, dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 14 heures à l'azote. 223 mg de monomères de styrène, puis 374  $\mu$ l à 57,5 g/l d'amino-méthyl styrène sont introduits dans le mélange réactionnel. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant 5 minutes. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 10 minutes. Le styrène et le dérivé styrénique diffusent dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et

poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 203 nm plus ou moins 5 nm.

5 Exemple 5 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole de l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et un mélange de SDS et d'acide oléique, dispersée dans la phase aqueuse  
10 B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 14 heures à l'azote. 240 mg de monomères de styrène sont ajoutés au mélange réactionnel qui subit  
15 ensuite une étape d'homogénéisation pendant 5 minutes. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 10 minutes. La pénétration des monomères de styrène dans la phase A s'effectue pendant 9 heures. La  
20 polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 206 nm plus ou moins 5 nm.

25 Exemple 6 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole de l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm plus ou moins  
5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10  
30 dans de l'octane et un mélange de SDS et d'acide oléique, dispersée dans



la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 9 heures à l'azote. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 30 minutes. 223 mg de monomères de styrène, sont introduits dans le mélange réactionnel et on laisse diffuser les monomères de styrène dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 206 nm plus ou moins 5 nm.

Exemple 7 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée comme décrit dans l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes contenant de 206 nm plus ou moins 5 nm de diamètre des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et un mélange de SDS et d'acide oléique, dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 14 heures à l'azote. 223 mg de monomères de styrène et 374  $\mu$ l à 57,5 g/l d' amino-méthyl styrène sont introduits simultanément dans le mélange réactionnel. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant 5 minutes. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 10 minutes. Le styrène et le dérivé styrénique diffusent dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et

poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 206 nm plus ou moins 5 nm.

5 Exemple 8 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse obtenue selon le protocole décrit dans l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de  
10 10 nm, de l'octane et un mélange de SDS et d'acide oléique, dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 14 heures à l'azote. On introduit 240 mg de monomères de styrène puis on laisse le mélange  
15 s'homogénéiser pendant 5 minutes. Le (2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile)) solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est ensuite ajouté et le mélange subit une homogénéisation pendant 10 minutes. On laisse le styrène diffuser dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est ensuite amorcée par élévation de la température à 70°C et suivie pendant  
20 12 heures, sous agitation lente. Les particules composites obtenues présentent un diamètre de 206 nm plus ou moins 5 nm.

Exemple 9 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée  
25 selon le protocole de l'exemple 1 (ii), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 206 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et du SDS, dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC)  
30 du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est

dégazée pendant 14 heures à l'azote. 200 mg de monomères de styrène, puis 22 mg d'acide méthacrylique sont introduits dans le mélange réactionnel. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant 5 minutes. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 20 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 10 minutes. Le styrène et l'acide méthacrylique diffusent dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures, sous agitation lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 238 nm plus ou moins 10 nm.

#### Exemple 10 :

20 ml de l'émulsion de départ stable et isodisperse préparée selon le protocole décrit dans l'exemple 1 (i), constituée de deux phases non miscibles : la phase A constituée de gouttelettes de 164 nm plus ou moins 5 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxydes de fer de 10 nm dans de l'octane et du SDS, dispersée dans la phase aqueuse B (concentration 3,3%, à 0,8 fois la concentration micellaire critique (CMC) du SDS) sont placés dans un réacteur de polymérisation. L'émulsion est dégazée pendant 14 heures à l'azote. 79 mg de monomères de styrène, puis 22 mg d'acide méthacrylique sont introduits dans le mélange réactionnel. Le mélange est soumis à homogénéisation pendant 5 minutes. Du 2,2'-azobis(2,4-diméthyl valéronitrile), comme amorceur de la polymérisation, solubilisé dans l'heptane (215  $\mu$ l à 10 g/l) est introduit dans le mélange qui est ensuite homogénéisé pendant 10 minutes. Le styrène et l'acide méthacrylique diffusent dans la phase A pendant 9 heures. La polymérisation est amorcée par chauffage de la solution à une température de 70°C et poursuivie pendant 12 heures, sous agitation

lente. Après achèvement de la polymérisation, les particules composites obtenues présentent un diamètre de 160 nm plus ou moins 5 nm.

Exemple 11 :

5 A 240  $\mu$ l d'un latex magnétique à 3%, obtenu comme décrit précédemment dans l'exemples 9, sont ajoutés successivement, 60  $\mu$ l de Tween 20 (1%), 636  $\mu$ l de tampon phosphate (10 mM à pH 6,9), 60  $\mu$ l de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimidedihydrochlorure (25 mg/ml), 156  $\mu$ l de N-hydroxysulfosuccinimide (25 mg/ml) et de la  
10 streptavidine (48  $\mu$ l à 1 mg/ml).

Le mélange est incubé pendant une heure à température ambiante et les particules sont ensuite concentrées par application d'un champ magnétique, puis redispersées dans le tampon contenant du tensio-actif (phosphate 10 mM, pH 6,9 + Tween 20 0,05 %).

15 9,9  $\mu$ l d'un oligonucléotide biotinylé (ODN) de 17 mers présentant une masse de 5753 g/mole à une concentration de 338 nmoles/ml) sont ajoutés à 400  $\mu$ l de particules recouvertes de streptavidine synthétisées précédemment pour constituer le témoin positif. 20  $\mu$ l d'un oligonucléotide non biotinylé et non aminé de 17 mers (masse : 6452  
20 g/mole à une concentration de 167 nmoles/ml) sont ajoutés à 400  $\mu$ l de particules recouvertes de streptavidine synthétisées précédemment pour constituer le témoin négatif.

Les deux témoins sont incubés 30 minutes à température ambiante, séparés trois fois et redispersés la première fois avec un tampon  
25 basique (phosphate 10 mM, pH 9,9 + SDS, 5 fois la concentration micellaire critique, la seconde fois avec un tampon à pH neutre (phosphate 10 mM, pH 6,9 + Tween 20 0,05%) et la troisième fois dans 280  $\mu$ l de PEG contenant de l'ADN de sperme de saumon.

Dans les deux cas 20  $\mu$ l d'ODN complémentaire à l'ODN du témoin positif marqués à la peroxydase de raifort (17 mers, concentration 9 nmoles/ml) sont ajoutés.

Les deux témoins sont à nouveau incubés une heure à température ambiante et sont encore séparés pour être dispersés de nouveau dans 400  $\mu$ l de PEG contenant de l'ADN de sperme de saumon.

50  $\mu$ l d'ortho-phénylènediamine sont ajoutés à 50  $\mu$ l de particules. La réaction enzymatique est effectuée pendant 5 minutes et arrêtée par l'addition de 50  $\mu$ l d'acide sulfurique (1M).

Les particules sont séparés du surnageant et ce dernier est dosé par méthode colorimétrique sur un appareil Axia Microreader (nom commercial, bioMérieux) à 492 et 630 nm.

Le témoin positif donne une densité optique de 2 000 unités de D.O, alors que le témoin négatif donne une densité de 1 000 unités de D.O.

Dans les exemples ci-dessus, la taille a été mesurée par diffusion de la lumière. La fluctuation de la taille observée, avant et après polymérisation, est attribuée à la combinaison des deux phénomènes suivants : a) une éventuelle évaporation d'une partie de la phase organique et b) la conversion de la polymérisation d'un exemple à l'autre. Le taux d'oxyde de fer après polymérisation est relativement du même ordre de grandeur que dans l'émulsion utilisée avant la polymérisation.

## REVENDEICATIONS

1. Particules composites comprenant un polymère hydrophobe  
5 et des nanoparticules inorganiques, caractérisées en ce qu'elles présentent  
un diamètre de l'ordre d'environ 50 à 1000 nm, de préférence d'environ  
100 à 500 nm et avantageusement d'environ 100 à 250 nm, en ce que le  
polymère hydrophobe constitue une matrice polymère et en ce que les  
nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière  
10 relativement homogène à l'intérieur de ladite matrice.

2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce  
qu'elles présentent une taille moyenne comprise entre 100 et 250 nm plus  
ou moins environ 5%.

3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce  
15 que les nanoparticules sont constituées de matériaux inorganiques choisis  
parmi les oxydes métalliques de fer, de titane, de cobalt, de zinc, de  
cuivre, de manganèse, de nickel ; la magnétite ; l'hématite, les  
ferrites telles que les ferrites de manganèse, nickel, manganèse-zinc; les  
alliages de cobalt, nickel.

20 4. Particules selon la revendication 3, caractérisées en ce que  
les matériaux organiques sont choisis parmi les oxydes métalliques  
magnétisables, tels que l'oxyde de fer, la magnétite et l'hématite.

5. Particules selon la revendication 3 ou 4, caractérisées en ce  
que les matériaux inorganiques représentent de 5 à 95%, de préférence de  
25 10 à 90%, de manière encore plus préférée de 20 à 90% et  
avantageusement de 25 à 85% en masse par rapport à la masse totale  
desdites particules.

6. Particules selon l'une des revendications précédentes,  
caractérisées en ce que les nanoparticules inorganiques sont stabilisées  
30 par des agents de stabilisation choisis parmi les groupements ioniques , les

chaînes polymère, les agents tensio-actifs, les agents tensio-actifs fonctionnels, tels que les acides gras ou les dérivés d'acides gras, et les mélanges d'agents tensio-actifs.

7. Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce que  
5 les agents tensio-actifs sont le dodécyl sulfate de sodium ou un mélange de dodécyl sulfate de sodium et d'acide oléique.

8. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que la matrice polymère est une matrice de type polymère vinylaromatique hydrophobe choisie parmi les homopolymères de monomères  
10 vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le  
groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters  
15 d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés diéniques.

9. Particules selon la revendication 7, caractérisées en ce que le polymère est un polymère réticulé.

20 10. Particules selon les revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent de plus un marqueur choisi parmi les marqueurs fluorescent, luminescent ou radioactif.

11. Procédé de préparation de particules composites selon les revendications précédentes, caractérisé en ce que

25 (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensio-actif ; ladite phase A étant dispersée dans une phase B hydrophile ;

(ii) on introduit dans la phase hydrophile B des monomères hydrophobes qui pénètrent à l'intérieur de la phase A ; et

(iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A en présence d'un agent amorceur choisi parmi les amorceurs organosolubles ou faiblement solubles dans la phase hydrophile et les amorceurs solubles dans la phase hydrophile dans des conditions prédéterminées.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les monomères hydrophobes sont choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butylstyrène, amino-méthylstyrène, vinyltoluène, seuls ou en mélange, ou bien encore en mélange avec d'autres monomères polymérisables insolubles dans l'eau tels que les acrylates, les méthacrylates d'alkyle, les esters d'acides éthyléniques et d'alkyle, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les acides éthyléniques, les composés diéniques.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que on ajoute au monomère ou au mélange de monomères un agent de réticulation hydrophobe, tel qu'un monomère réticulant de type divinylbenzène, diméthacrylate, en particulier diméthacrylate de vinyle.

14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'agent amorceur organosoluble est choisi parmi amorceurs de type azobis, tels que les 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile), 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile), 2, 2'-azobis(2-cyclopropylpropionitrile), 2, 2'-azobis(2-méthylpropionitrile), 2, 2'-azobis(2-méthylbutyronitrile), 1, 1'-azobis(cyclohexane-1-carbonitrile), 1-((1-cyano-1-méthyléthyl)azo)formamide, 2-phénylazo-4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile, diméthyl 2, 2'-azobis(2-méthylpropionate, 4, 4'-azobis(4-acide cyanovalérique) et 2, 2'-azobis(2-(hydroxyméthyl)propionitrile) et l'amorceur faiblement soluble ou soluble dans la phase hydrophile est choisi parmi les amorceurs radicalaires de type peroxyde, tels que les



peroxydes, les hydroperoxydes, en particulier l'hydroperoxyde de cumène, et les amorceurs de type persel, tels que les persulfates, en particulier le perulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium.

5                   15. Procédé selon les revendications 11 et 14, caractérisé en ce que l'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes décrite dans l'étape (ii), soit préalablement à l'étape (ii), soit postérieurement à l'étape (ii).

10                   16. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) est effectuée par chauffage jusqu'à une température de 60 à 90°C, de préférence de 70°C.

                    17. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) est effectuée par photochimie.

15                   18. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la phase organique hydrophobe A est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges ou une phase comprenant tout ou partie d'un composé  
20                   organique polymérisable par voie radicalaire choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux.

                    19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que  
25                   l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, le décane, le undécane, le dodécane, et le composé organique polymérisable par voie radicalaire est choisi parmi les .

                    20. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la phase B est une phase aqueuse, telle que de l'eau.

21. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend de plus une étape de fonctionnalisation des particules composites par pénétration dans la phase organique A de groupements réactifs fonctionnels apportés par des monomères faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes.

22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les groupements réactifs fonctionnels sont des groupements acide apportés par des monomères faiblement hydrophiles choisis parmi les monomères des acides acryliques, méthacryliques, éthyléniques, sulfoniques et les monomères polymérisables choisis parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, seuls ou en mélange avec d'autres monomères hydrophobes.

23. Procédé selon les revendications 11, 21 et 22, caractérisé en ce que lesdits monomères faiblement hydrophiles sont apportés dans la phase organique A, soit simultanément à l'étape (ii), soit préalablement à l'étape, ou postérieurement à l'étape (ii).

24. Procédé selon les revendications 11 et 21, caractérisé en ce qu'il comprend de plus après l'étape de polymérisation (iii), une étape d'évaporation totale ou partielle de la phase organique A.

25. Particules composites telles que définies selon les revendications 1 à 10, caractérisées en ce qu'elles présentent de plus des groupements fonctionnels réactifs à leur surface, tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

26. Conjugués dérivés de particules composites telles que définies dans la revendication 25, caractérisés par le fait qu'ils sont couplés à au moins un ligand choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique et la biotine.

27. Réactif, comprenant en outre au moins un conjugué tel que défini dans la revendication 26.

28. Composition diagnostique comprenant en outre un réactif tel que défini dans la revendication 27.

5 29. Utilisation d'un réactif tel que défini dans la revendication 27 dans un test de diagnostic.

30. Conjugués dérivés de particules composites telles que définies dans la revendication 22, caractérisés par le fait qu'ils sont couplés à au moins un ligand choisi parmi les substances  
10 médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant une activité protéique.

31. Utilisation des conjugués tels que définis dans la revendication 27 dans une composition thérapeutique.

32. Conjugués dérivés de particules composites telles que  
15 définies dans la revendication 25, caractérisés par le fait qu'ils sont couplés à au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No

PCT/FR 00/03086

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 G01N33/543 G01N33/546 C12Q1/68

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)

IPC 7 G01N A61K C12Q

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 358 388 A (DANIEL JEAN-CLAUDE ET AL) 9 November 1982 (1982-11-09) example 1	1, 3-32
X	WO 99 19000 A (UNIV NEW YORK) 22 April 1999 (1999-04-22)  examples 1-6	1-6, 8-10, 25-32
X	EP 0 180 384 A (TECHNICON INSTR) 7 May 1986 (1986-05-07)  page 2, line 13 - line 35 page 7, line 23 - line 36 page 1	1, 3-6, 8-10, 25-32
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in 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 document 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

16 March 2001

Date of mailing of the international search report

26/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/03086

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 October 1990 (1990-10-03) cited in the application example 1	1,6,7,11
A	----- DE 195 28 029 A (MUELLER SCHULTE DETLEF DR) 6 February 1997 (1997-02-06) claim 1; example 1 -----	1,6,7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03086

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4358388	A	09-11-1982	FR 2480764 A	23-10-1981
			AT 9587 T	15-10-1984
			AU 539397 B	27-09-1984
			AU 6961881 A	22-10-1981
			BR 8102333 A	15-12-1981
			CA 1159247 A	27-12-1983
			DE 3166260 D	31-10-1984
			DK 171881 A	19-10-1981
			EP 0038730 A	28-10-1981
			ES 501397 D	16-02-1982
			ES 8203097 A	01-06-1982
			IE 51322 B	10-12-1986
			IL 62649 A	31-10-1984
			JP 1726739 C	19-01-1993
			JP 4003088 B	22-01-1992
JP 56164503 A	17-12-1981			
-----				
WO 9919000	A	22-04-1999	AU 9691298 A	03-05-1999
-----				
EP 0180384	A	07-05-1986	AU 595165 B	29-03-1990
			AU 4902985 A	08-05-1986
			CA 1314769 A	23-03-1993
			DE 3582649 D	29-05-1991
			JP 2554250 B	13-11-1996
			JP 61181967 A	14-08-1986
			US 5206159 A	27-04-1993
-----				
EP 0390634	A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
			AT 122704 T	15-06-1995
			AU 5239690 A	04-10-1990
			CA 2013459 A	30-09-1990
			DE 69019411 D	22-06-1995
			DE 69019411 T	09-11-1995
			ES 2072996 T	01-08-1995
			JP 2286729 A	26-11-1990
			JP 2623358 B	25-06-1997
			NO 178376 B	04-12-1995
			US 5356713 A	18-10-1994
			-----	
DE 19528029	A	06-02-1997	AU 717433 B	23-03-2000
			AU 6124396 A	26-02-1997
			CN 1198104 A	04-11-1998
			WO 9704862 A	13-02-1997
			EP 0843591 A	27-05-1998
			JP 11510836 T	21-09-1999
-----				

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/03086

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
 CIB 7 G01N33/543 G01N33/546 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N A61K C12Q

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 358 388 A (DANIEL JEAN-CLAUDE ET AL) 9 novembre 1982 (1982-11-09) exemple 1 ---	1, 3-32
X	WO 99 19000 A (UNIV NEW YORK) 22 avril 1999 (1999-04-22) exemples 1-6 ---	1-6, 8-10, 25-32
X	EP 0 180 384 A (TECHNICON INSTR) 7 mai 1986 (1986-05-07) page 2, ligne 13 - ligne 35 page 7, ligne 23 - ligne 36 page 1 --- -/--	1, 3-6, 8-10, 25-32

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*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)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*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

\*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

\*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

\*&amp;\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/03/2001

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, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No

PCT/FR 00/03086

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 390 634 A (RHONE POULENC CHIMIE) 3 octobre 1990 (1990-10-03) cité dans la demande exemple 1 -----	1,6,7,11
A	DE 195 28 029 A (MUELLER SCHULTE DETLEF DR) 6 février 1997 (1997-02-06) revendication 1; exemple 1 -----	1,6,7



**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 00/03086

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4358388	A	09-11-1982	FR 2480764 A	23-10-1981
			AT 9587 T	15-10-1984
			AU 539397 B	27-09-1984
			AU 6961881 A	22-10-1981
			BR 8102333 A	15-12-1981
			CA 1159247 A	27-12-1983
			DE 3166260 D	31-10-1984
			DK 171881 A	19-10-1981
			EP 0038730 A	28-10-1981
			ES 501397 D	16-02-1982
			ES 8203097 A	01-06-1982
			IE 51322 B	10-12-1986
			IL 62649 A	31-10-1984
			JP 1726739 C	19-01-1993
			JP 4003088 B	22-01-1992
			JP 56164503 A	17-12-1981
-----				
WO 9919000	A	22-04-1999	AU 9691298 A	03-05-1999
-----				
EP 0180384	A	07-05-1986	AU 595165 B	29-03-1990
			AU 4902985 A	08-05-1986
			CA 1314769 A	23-03-1993
			DE 3582649 D	29-05-1991
			JP 2554250 B	13-11-1996
			JP 61181967 A	14-08-1986
			US 5206159 A	27-04-1993
-----				
EP 0390634	A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
			AT 122704 T	15-06-1995
			AU 5239690 A	04-10-1990
			CA 2013459 A	30-09-1990
			DE 69019411 D	22-06-1995
			DE 69019411 T	09-11-1995
			ES 2072996 T	01-08-1995
			JP 2286729 A	26-11-1990
			JP 2623358 B	25-06-1997
			NO 178376 B	04-12-1995
			US 5356713 A	18-10-1994
-----				
DE 19528029	A	06-02-1997	AU 717433 B	23-03-2000
			AU 6124396 A	26-02-1997
			CN 1198104 A	04-11-1998
			WO 9704862 A	13-02-1997
			EP 0843591 A	27-05-1998
			JP 11510836 T	21-09-1999
-----				