

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533530

(P2004-533530A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C08F 2/44</b>	C08F 2/44	A 4C076
<b>A61K 9/14</b>	A61K 9/14	4C086
<b>A61K 9/50</b>	A61K 9/50	4J011
<b>A61K 31/74</b>	A61K 31/74	
<b>A61K 47/48</b>	A61K 47/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-510722 (P2003-510722)	(71) 出願人	596020794 ペーイーオー・メリュー
(86) (22) 出願日	平成14年5月6日 (2002.5.6)		フランス・69280・マルスィー・レト ワル・シュマン・ドゥ・ローム (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月7日 (2003.11.7)	(71) 出願人	500174661 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・レシエ ルシュ・サイエンティフィック
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/001552		フランス・F-75794・パリ・セデッ クス・16・リュ・ミシェル・アンジュ・ 3
(87) 国際公開番号	W02003/004559	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)	(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
(31) 優先権主張番号	01/06203		
(32) 優先日	平成13年5月10日 (2001.5.10)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合体粒子、誘導されたコンジュゲート、その製造方法および用途

## (57) 【要約】

本発明は、疎水性ポリマーのコアおよび無機ナノ粒子を含む複合体粒子に関する。前記疎水性ポリマーは、内側に無機ナノ粒子が安定化されて比較的均一な状態で分布しているポリマーマトリックスを形成する。前記複合体粒子は、疎水性部分および親水性部分を含む両親媒性共重合体によって少なくとも一部分取り囲まれており、その疎水性部分が、前記ポリマーマトリックス内に少なくとも一部分固定されている。本発明は、また、その製造方法、そのような粒子およびリガンドを含むコンジュゲート、および、反応原系および治療用組成物における同一物の用途に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

疎水性ポリマーおよび無機ナノ粒子からなるコアを備え、前記疎水性ポリマーは、その内部に無機ナノ粒子が安定して均一に分布しているポリマーマトリックスを構成している複合体粒子であって、前記複合体粒子が、疎水性部分および親水性部分を含む両親媒性共重合体によって少なくとも一部分取り囲まれており、その疎水性部分が、前記ポリマーマトリックス上または内部に少なくとも一部分固定されていることを特徴とする複合体粒子。

## 【請求項2】

その粒子が、両親媒性共重合体によって完全に取り囲まれていることを特徴とする請求項1に記載の複合体粒子。

10

## 【請求項3】

両親媒性共重合体のすべての疎水性部分が、ポリマーマトリックス上または内部に固定されていることを特徴とする請求項1または2に記載の複合体粒子。

## 【請求項4】

両親媒性共重合体の疎水性部分を、ポリスチレン、ポリエチレン等のポリアルキル、または脂肪酸鎖から選択することを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の複合体粒子。

## 【請求項5】

両親媒性共重合体の親水性部分を、ポリ(アクリル酸)、ポリ硫酸塩、ポリアミン、ポリアミドまたは多糖類から選択することを特徴とする請求項1から4のいずれか一項に記載の複合体粒子。

20

## 【請求項6】

両親媒性共重合体を、ブロックポリマー、逐次ポリマー、分岐ポリマーまたは櫛形ポリマーから選択することを特徴とする請求項4および5に記載の複合体粒子。

## 【請求項7】

粒子が、その表面に、少なくとも1つのリガンドと反応することができる、カルボキシル基、アミン基、チオール基、アルデヒド基、ヒドロキシル基、トシル基またはヒドラジン基等の反応性官能基を表すことを特徴とする請求項6に記載の複合体粒子。

## 【請求項8】

ナノ粒子が、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガンまたはニッケルの金属酸化物；磁鉄鉱；赤鉄鉱；マンガンフェライト、ニッケルフェライトまたはマンガン亜鉛フェライト等のフェライト類；またはコバルト合金、ニッケル合金から選択される無機材料からなることを特徴とする請求項1に記載の複合体粒子。

30

## 【請求項9】

無機材料を、酸化鉄、磁鉄鉱、赤鉄鉱等の磁化可能な金属酸化物から選択することを特徴とする請求項8に記載の複合体粒子。

## 【請求項10】

無機材料が、前記複合体粒子の全体重量に対して、質量で、5から95%、好ましくは10から90%、より好ましくはさらに20から90%、そして有利には25から85%に相当することを特徴とする請求項8または9に記載の複合体粒子。

40

## 【請求項11】

無機ナノ粒子を、イオン性基、ポリマー鎖、表面活性剤、脂肪酸または脂肪酸誘導体等の官能性表面活性剤、および表面活性剤の混合物から選択される安定化剤によって安定化することを特徴とする請求項1に記載の複合体粒子。

## 【請求項12】

表面活性剤を、ドデシル硫酸ナトリウムおよびドデシル硫酸ナトリウムとオレイン酸の混合物から選択することを特徴とする請求項11に記載の複合体粒子。

## 【請求項13】

ポリマーマトリックスが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、t-ブチルスチレンまたはビニルトルエン等の水不溶性の芳香族ビニルモノマーのホモポリマー、およびこ

50

これらのモノマー同士の、および/または、アルキル基が3から10個の炭素原子を含むアクリル酸アルキルおよびメタクリル酸アルキル、エチレン酸が4個または5個の炭素原子を持ち、アルキル基が1から8個の炭素原子を持つエチレン酸のアルキルエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体またはジエン化合物等の他のコモノマーとの共重合体から選択される疎水性芳香族ビニルポリマータイプのマトリックスであることを特徴とする請求項1に記載の複合体粒子。

【請求項14】

ポリマーが架橋ポリマーであることを特徴とする請求項13に記載の複合体粒子。

【請求項15】

粒子が、さらに放射性トレーサを備えていることを特徴とする請求項1から14に記載の複合体粒子。

10

【請求項16】

粒子が、50から1,000nm、好ましくは約100から500nm、有利には約100から250nm程度の直径を示すことを特徴とする請求項1から15のいずれか一項に記載の複合体粒子。

【請求項17】

両親媒性共重合体の疎水性部分の少なくとも一部をポリマーマトリックス中に固定化させる、請求項1から16のいずれか一項に記載の複合体粒子を製造する方法であって、

(i) 表面活性剤を含む有機相に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなる疎水性相Aおよび相Aが分散している親水性相Bの2つの非混和性相からなる安定な等分散の出発エマルジョンを存在させる段階；

20

(ii) 疎水性モノマーおよび少なくとも1つの開始剤を相Bに添加する段階；および

(iii) 前記疎水性モノマーを相A中で重合させる段階を特徴とし、

前記方法が、段階(iii)の前に少なくとも1つの両親媒性共重合体を相B中にさらに添加することを特徴とする方法。

【請求項18】

両親媒性共重合体を段階(ii)の前または後に添加することを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】

両親媒性共重合体の疎水性部分の少なくとも一部をポリマーマトリックス上に固定化させる、

30

(i) 表面活性剤を含む有機相に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなる疎水性相Aおよび相Aが分散している親水性相Bの2つの非混和性相からなる安定な等分散の出発エマルジョンを存在させる段階；

(ii) 疎水性モノマーおよび少なくとも1つの開始剤を相Bに添加する段階；および

(iii) 前記疎水性モノマーの一部分を相A中で重合させる段階を特徴とし、

前記方法が、段階(iii)の前または段階(iii)の後に少なくとも1つの両親媒性共重合体を相B中にさらに添加し、次いで段階(iv)により、疎水性モノマーの残りの部分をポリマーマトリックスの表面で重合させることを特徴とする請求項1から16のいずれか一項に記載の複合体粒子を製造する方法。

【請求項20】

両親媒性共重合体を段階(iii)の前に添加する時、それを段階(ii)の前または後に添加することを特徴とする請求項19に記載の方法。

40

【請求項21】

両親媒性共重合体を、ブロックポリマー、逐次ポリマー、分岐ポリマーまたは櫛形ポリマーから選択することを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項22】

疎水性モノマーを、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、t-ブチルスチレン、アミノメチルスチレンまたはビニルトルエン等芳香族ビニルモノマーから、単独または混合物として、または別法では、アクリル酸アルキル、メタクリル酸アルキル、エチレン酸のアルキルエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、エチレン酸またはジエン化合物等そ

50

の他の水不溶性重合性モノマーとの混合物として選択することを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項23】

ジビニルベンゼンまたはジメタクリル酸エステルタイプ、特にジメタクリル酸ビニルである架橋モノマー等の疎水性架橋剤を、モノマーまたはモノマー混合物に加えることを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項24】

開始剤を、有機可溶性開始剤、親水性相に弱可溶性である開始剤および親水性相に可溶性である開始剤から選択することを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項25】

有機可溶性開始剤を、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス(2-シクロプロピルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、1,1'-アゾビス(シクロヘキサン-1-カルボニトリル)、1-((1-シアノ-1-メチルエチル)アゾ)ホルムアミド、2-フェニルアゾ-4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル、ジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオネート)、4,4'-アゾビス(4-シアノバレリン酸)および2,2'-アゾビス(2-(ヒドロキシメチル)プロピオニトリル)等アゾビスタイプの開始剤から選択し、そして、親水性相に弱可溶性または可溶性である開始剤を、過酸化物またはヒドロペルオキシド、特にクメンヒドロペルオキシド等の過酸化物タイプのラジカル開始剤、および過硫酸塩、特に過硫酸アンモニウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸カリウム等の過硫酸タイプの開始剤から選択することを特徴とする請求項24に記載の方法。

10

20

【請求項26】

開始剤を、疎水性モノマーの添加と同時にまたは前記モノマーの添加の前または後のいずれかに親水性相に添加することを特徴とする請求項17または19および24または25に記載の方法。

【請求項27】

重合段階(iii)および/または(iv)を、60から90、好ましくは70の温度に加熱することにより行うことを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項28】

重合段階(iii)を光化学によって行うことを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

30

【請求項29】

相Aが、5から12個の炭素原子を含む化合物、それらの異性体およびそれらの混合物から選択される脂肪族または環状炭化水素を含む相、または、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、*t*-ブチルスチレンまたはビニルトルエン等の水不溶性芳香族ビニルモノマーから選択されるラジカル経路により重合することができる有機化合物およびこれらのモノマー同士の共重合体の全部または一部を含む相であることを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項30】

炭化水素を、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカンまたはドデカンから選択し、ラジカル経路により重合することができる有機化合物を、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、*t*-ブチルスチレンまたはビニルトルエン、およびこれらのモノマー同士の共重合体から選択することを特徴とする請求項29に記載の方法。

40

【請求項31】

相Bが、水等の水性相であることを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項32】

方法が、疎水性モノマーと重合することができる弱親水性モノマーによって導入される反応性官能基が相A中に浸入することによる複合体粒子の官能化の段階をさらに含むことを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

【請求項33】

50

反応性官能基が、アクリル酸、メタクリル酸、エチレン酸またはスルホン酸モノマーから選択される弱親水性モノマー、および、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、t-ブチルスチレンまたはビニルトルエン等の水不溶性の芳香族ビニルモノマーから選択される重合性モノマー、および、これらのモノマー同士の共重合体の単独または他の疎水性モノマーとの混合物により添加される酸基であることを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記弱親水性モノマーを、疎水性モノマーの添加と同時または前記モノマーの添加の前または後のいずれかに相A中に添加することを特徴とする請求項17または19および32または33に記載の方法。

【請求項35】

方法が、重合段階(iii)の後に相Aの全部または一部を蒸発させる段階をさらに含むことを特徴とする請求項17または19に記載の方法。

10

【請求項36】

コンジュゲートであって、請求項7で定義した複合体粒子からなり、その官能基が、抗体、抗体フラグメント、蛋白質、ポリペプチド、酵素、ポリヌクレオチド、核酸フラグメントおよびビオチンから選択される少なくとも1つのリガンドと直接または間接的に相互作用していることを特徴とするコンジュゲート。

【請求項37】

試薬であって、請求項36で定義した少なくとも1つのコンジュゲートを付加的に含む試薬。

20

【請求項38】

コンジュゲートであって、請求項7で定義した複合体粒子からなり、その官能基が、かご分子、キレート化剤および触媒から選択される少なくとも1つのリガンドと直接または間接的に相互作用していることを特徴とするコンジュゲート。

【請求項39】

コンジュゲートであって、請求項7で定義した複合体粒子からなり、その官能基が、医薬物質、アンチセンスプローブ、遺伝子修復剤、または蛋白質活性を阻害または抑制する作用から選択される少なくとも1つのリガンドと直接または間接的に相互作用していることを特徴とするコンジュゲート。

【請求項40】

請求項39で定義したコンジュゲートの使用であって、治療用組成物での使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複合体粒子、その製造方法およびその用途を対象とする。

【背景技術】

【0002】

ポリマータイプのマイクロスフェアは、バイオ工学、診断および製薬の分野で保持体、担体または媒体として優位にある。この目的のために、それらは、生体分子の固体保持体として医療診断で使用されてきた。

40

【0003】

コロイド粒子は、管、薄板またはビーズ等の通常の固体保持体と比較して、特に特定の相互作用のための大きな表面積を得られるようにすることが可能であること、化学的に容易に変性して、その表面が他の化合物、例えば、抗体または抗体フラグメント、蛋白質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、核酸、核酸フラグメント、酵素等の生体分子、または、触媒、薬物、かご分子またはキレート化剤等の化学分子と反応することができる官能基を導入することができることにより、多数の利点を有する。

【0004】

コロイド粒子の中で、磁性ラテックスが分析分野で大きな興味を喚起しており、例えば、抗原、抗体、生体分子、核酸その他等の検体を分離および/または検知する手段として使

50

用される。

【0005】

ポリマー/磁性タイプの複合体粒子は、通常、大きさの基準として、50nm未満の直径を有する小粒子、2 $\mu$ mより大きい直径を有する大粒子および50nmと1000nmの間の直径を有する中粒子の3つの種類に分類される。

【0006】

しかしながら、特に診断への用途の優れた候補として認められるためには一定の基準を満たさなければならない。形態学的観点から、比較的球形であり、磁性充填材がポリマーマトリックス中に比較的均一に分布していることが望ましい。磁界の作用のもとで不可逆的に凝集してはならず、そのことは、容易に素早く可逆的に再分散することができることを意味する。同様に、沈降の現象を少なくするために比較的低密度でなければならない。有利には、単分散または等分散という用語も使用される、狭い粒径分布を示すべきである。

10

【0007】

例えば、その大きさおよび密度のために、液相に懸濁している大きな磁性粒子は、素早く沈降する傾向がある。さらにそれらは、磁界の影響下に置かれると、そのために永久に磁化(磁束密度が残留)され易いので、その後凝集する傾向がある。したがって、良好な候補にはならない。

【0008】

他方、小さい磁性粒子は、それらのブラウン運動のために懸濁したままでいる傾向があり、引き寄せるのは困難で、特に適用する磁界が比較的弱い場合は磁力によっては実際全くといっていいほど引き寄せられない。したがって、上記の大きくする用途にはあまり適切ではない。

20

【0009】

したがって、50nmと1000nmの間の中間の大きさを示し、同時に上記の不利な点を克服して上で設定した基準を満たすポリマー/磁性タイプの複合体粒子を製造することにははっきりとした利点がある。しかしながら、本発明は、以下に記述するように、磁化することのできる複合体粒子に限定されるものではない。

【0010】

欧州特許出願公開第0 390 634号は、50nmから10,000nm程度の直径を有する疎水性の架橋した芳香族ビニルポリマーであって磁化することができる複合体ミクロスフェアを開示しており、磁化することができる粒子からなる固体コアと、少なくとも1つの疎水性芳香族ビニルモノマーおよび少なくとも1つの芳香族ビニルモノマー(単数または複数)に可溶であり、前記モノマー(単数または複数)で架橋することが可能なポリエチレン系不飽和乳化性ポリマーから誘導される疎水性ポリマーからなるシェルとを含んでいる。しかしながら、大きさの要求は満たすことができるが、コア内に位置する磁性充填材が均一な分布を有していないという不都合を示す。さらに、添付されている図から明白に現われているように、粒子は大きさが均一ではない。したがって、必要な大きさの粒子のみを保持するために磁界を適用して選り分けなければならない多分散粒子の集合である。

30

【0011】

Dynal(商品名)粒子についても述べる。この粒子は、酸化鉄をポリスチレン表面にある孔に含浸することによって析出させたポリスチレンと酸化鉄の多孔性コアと、その多孔性ミクロスフェアの酸化鉄を封じ込める別のポリマーでできた外皮からなるミクロスフェアである。それらは2.8 $\mu$ mの直径(M280粒子)および4.5 $\mu$ mの直径(M450粒子)をそれぞれ示し、大きさは比較的均一である。それらはしたがって等分散粒子であると認められるが、その径が大きいために上記の不都合、主として沈降の現象、を示す。さらにそれらは、比表面積が小さい。

40

【0012】

特許文献米国特許出願第4,358,388号は、磁気充填材が均一に分布しているポリマーマトリックスからなる複合体粒子を開示している。それらは、磁性充填材を含む有機相中の水不溶性有機モノマーを重合することによって得られ、前記有機相は、表面活性剤が存在す

50

る水相中でエマルションになっている。

【0013】

その粒子は、生体内で、上記の管、薄板またはビーズのタイプと同様のものに磁界をかけることによって容易にそれらを単離することができるというさらなる利点を有する保持体を形成する。

【0014】

とは言っても、これらの粒子が官能化を示すことはないので、この分野の応用におけるそれらの用途はかなり限定されたままである。

【特許文献1】

欧州特許出願公開第0 390 634号

10

【特許文献2】

米国特許出願第4,358,388号

【非特許文献1】

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Co.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明によれば、上記の既知の粒子によって生じる問題の解決策を創出し、以下の基準：

- 等分散の球状粒子であること、
- コア中に均一に分布している無機充填材を有する粒子であること、
- 中間の大きさ、すなわち、50nmから1000nmの間の直径を有する粒子であること、
- 官能化されたまたは官能化可能な粒子であること、
- 無機充填材が磁性物質であるかまたは磁化可能であること、
- 簡単に制御可能な合成方法によって得られる粒子であること、

20

を満たす新規な複合体粒子を今や入手できる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の複合体粒子は、疎水性ポリマーおよび無機ナノ粒子からなるコアを備えており、前記疎水性ポリマーが、その内部に無機ナノ粒子が安定して均一に分布しているポリマーマトリックスを構成しており、前記複合体粒子は、疎水性部分および親水性部分を含む両親媒性共重合体によって少なくとも一部分取り囲まれており、その疎水性部分が、前記ポリマーマトリックス上または内部に少なくとも一部分固定されている。

30

【0017】

本発明の別の形態によると、粒子は、両親媒性共重合体によって完全に取り囲まれており且つ/または両親媒性共重合体のすべての疎水性部分が、ポリマーマトリックス上または内部に固定されている。

【0018】

両親媒性共重合体とは、本発明によれば、疎水性部分と親水性部分とを有する共重合体と解釈され、疎水性部分および/または親水性部分は、それぞれ疎水性および/または親水性である両親媒性共重合体の構成下位区分の組み合わせであり得ることが理解される。したがって、本発明の両親媒性共重合体は、特に、ブロック共重合体、逐次共重合体、主鎖が疎水性または親水性であり、側鎖がそれぞれ親水性または疎水性である枝分れ重合体、または主鎖が疎水性または親水性であり、櫛形側鎖がそれぞれ親水性または疎水性である櫛形ポリマーから選択する。

40

【0019】

両親媒性共重合体の親水性部分は、イオン性すなわち陰イオン性または陽イオン性、または非イオン性であることができ、それは、直接的にまたは間接的に反応性の官能基を有する。

【0020】

本発明によれば、疎水性部分は、少なくとも一部をポリマーマトリックス上または内部に

50

固定する。この疎水性部分の固定は、常に、閉じ込めのタイプが少なくとも事実上物理的、より具体的には事実上力学的であり、吸着による結合等の事実上化学的または物理的である疎水性部分の予備的な結合を補完することができる。したがって、固定化は以下の事象；

- 両親媒性共重合体の疎水性部分を、マトリックスの表面に吸着し、次いで疎水性ポリマーによってマトリックス中に恒久的に固定する、
  - 前記疎水性部分を有機相に溶解し、次いでマトリックスが形成される間に疎水性ポリマー中に閉じ込める、
  - 前記疎水性部分をポリマーマトリックスの形成の間に力学的に閉じ込める、
- からもたらすことができる。

10

**【0021】**

この固定化により、高度に安定性であって特に上記の既知粒子のそれよりはるかに優れた安定性をもたらされる。

**【0022】**

適当な両親媒性共重合体は、有利には、

- ポリスチレン、ポリエチレン等のポリアルキル、または脂肪酸鎖から選択される疎水性部分、および/または
- ポリ(アクリル酸)、ポリ硫酸塩、ポリアミン、ポリアミドまたは多糖類から選択される親水性部分を含む。

**【0023】**

ナノ粒子を構成する無機材料は、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガンまたはニッケルの酸化物等の金属酸化物から、そして特に、鉄酸化物、磁鉄鉱または赤鉄鉱等の磁化可能な金属酸化物；マンガンフェライト、ニッケルフェライトまたはマンガン亜鉛フェライト等のフェライト類；またはコバルト合金、ニッケル合金から選択する。

20

**【0024】**

無機材料は、有利には、磁化可能な金属酸化物好ましくは鉄酸化物から選択する。

**【0025】**

無機ナノ粒子は、前記複合体粒子の全体重量に関して、重量で、5から95%、好ましくは10から90%、そして有利には20から90%、好ましくは25から85%に相当する。

**【0026】**

本発明の複合体粒子内で、ナノ粒子は、イオン性または非イオン性、官能性または非官能性そして重合性または非重合性である両親媒性ポリマー鎖または表面活性剤から選択される安定化剤によって安定化される。官能性表面活性剤は、特に脂肪酸または脂肪酸誘導体、特にオレイン酸またはその誘導体、および上で定義した表面活性剤の混合物から選択する。

30

**【0027】**

マトリックスの適当な疎水性ポリマーは、すなわち、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、*t*-ブチルスチレンまたはビニルトルエン等の水不溶性の芳香族ビニルモノマーのホモポリマー、およびこれらのモノマー同士の、および/または、アルキル基が3から10個の炭素原子を含むアクリル酸アルキルおよびメタクリル酸アルキル、エチレン酸が4個または5個の炭素原子を持ち、アルキル基が1から8個の炭素原子を持つエチレン酸のアルキルエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体またはジエン化合物等、他のコモノマーとの共重合体から選択される疎水性芳香族ビニルタイプのポリマーである。好ましくは、そのポリマーは、架橋ポリマーである。これは、モノマー(単数または複数)に、ジビニルベンゼン、メタクリル酸ビニル、シアヌル酸トリアリル、モノエチレングリコールジアクリレートまたはポリエチレングリコールジアクリレート等の少なくとも2つの反応性二重結合を有する分子の少量(10重量%未満)を添加することによって得られる。

40

**【0028】**

本発明の複合体粒子は、また、放射性トレーサ等のトレーサも含むことができるが、そのトレーサは、以下の実施例1における説明で分かるように、エマルジョンを調製する途中

50



で添加する。

【0029】

本発明の粒子は、約50から1000nm、好ましくは約100から500nm、そして有利には約100から250nm程度の直径を示す。この直径は、プラスまたはマイナス約5%までと定義され、それはそれらの容積平均の直径がプラスまたはマイナス約5%以内までと定義されることを意味する。

【0030】

本発明の他の対象は、直径によって選り分ける段階を必要としないで所望の直径の等分散粒子を直接得ることを可能にする上記の複合体粒子を製造する方法である。

【0031】

本発明の第1の方法によれば、両親媒性共重合体の疎水性部分を、少なくとも一部はポリマーマトリックス中に固定化させる、複合体粒子は、以下の：

(i) 表面活性剤を含む有機相に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなる疎水性相Aおよび相Aが分散している親水性相Bの2つの非混和性相からなる安定な等分散の出発エマルションを存在させる段階；

(ii) 疎水性モノマーおよび少なくとも1つの開始剤を相Bに添加する段階；および

(iii) 前記疎水性モノマーを相A中で重合させる段階、により得、

そしてこの方法によれば、少なくとも1つの両親媒性共重合体を段階(iii)の前、すなわち、段階(ii)の前または後に相B中にさらに添加する。

【0032】

本発明の第2の方法によれば、両親媒性共重合体の疎水性部分を、少なくとも一部はポリマーマトリックス上に固定化させる、複合体粒子は、以下の：

(i) 表面活性剤を含む有機相に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなる疎水性相Aおよび相Aが分散している親水性相Bの2つの非混和性相からなる安定な等分散の出発エマルションを存在させる段階；

(ii) 疎水性モノマーおよび少なくとも1つの開始剤を相Bに添加する段階；

(iii) 前記疎水性モノマーの一部分を相A中で重合させる段階、により得、

そしてこの方法によれば、段階(iii)の前または段階(iii)の後に少なくとも1つの両親媒性共重合体を相B中にさらに添加し、次いで段階(iv)の間に、疎水性モノマーの残りの部分をポリマーマトリックスの表面で重合させる。両親媒性共重合体を段階(iii)の前に添加する時、それは、段階(ii)の前または後に添加することができる。

【0033】

本発明の方法による複合体粒子を得るために、両親媒性ポリマーは、有利には、複合体粒子の説明で上に示したのから選択する。

【0034】

採用するモノマーは、疎水性ポリマーを生成しなければならない。それらは親水性相に不溶性であり、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、t-ブチルスチレン、アミノメチルスチレンまたはビニルトルエン等の芳香族ビニルモノマーから選択する。それらは、単独または混合物として、または別法では、アクリル酸アルキル、メタクリル酸アルキル、エチレン酸のアルキルエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、エチレン酸またはジエン化合物等その他の水不溶性重合性モノマーとの混合物として使用する。

【0035】

疎水性架橋剤、例えば、ジビニルベンゼンまたはジメタクリル酸エステルタイプ特にジメタクリル酸ビニルを、モノマーまたはモノマー混合物に添加することが可能である。

【0036】

有機可溶性開始剤は、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)、2,2'-アゾビス(2-シクロプロピルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)、2,2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、1,1'-アゾビス(シクロヘキササン-1-カルボニトリル)、1-((1-シアノ-1-メチルエチル)アゾ)ホルムアミド、2-フェニルアゾ-4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル、ジメ

10

20

30

40

50

チル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオネート)、4,4'-アゾビス(4-シアノバレリン酸)および2,2'-アゾビス(2-(ヒドロキシメチル)プロピオニトリル)等アゾビスタイプの開始剤から選択する。過氧化物、ヒドロペルオキシドおよび過硫酸塩等の水溶性またはやや水溶性の開始剤を選択する場合、親水性相で開始し、疎水性相に成長する重合をもたらす。過硫酸塩、特に過硫酸アンモニウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸カリウムは、水性相に可溶性である。熱の作用のもとで、それらは分解し、陰イオンを有する硫酸塩ラジカルを発生し、それが複合体ナノ粒子の電荷に寄与する。過酸化水素は、水性相に可溶性であり、電荷を持たないヒドロキシルラジカルを発生する。ヒドロペルオキシドが分解すると、ヒドロキシルおよび酸素含有ラジカルを発生し、それは使用する過氧化物の特質によって相の1つに分布するであろう。例えば、クメンヒドロペルオキシドは、スチレンの重合の場合にモノマー粒子と水の間の界面で分解し、ヒドロキシルラジカルが水性相に入り、非極性ラジカルが粒子に向かって拡散するものと考えられる。本発明によってもたらされる粒子およびコンジュゲートの陽イオン性または陰イオン性は、開始剤の陽イオン性または陰イオン性に依存する。

10

## 【0037】

開始剤は、(a)疎水性モノマーの添加と同時に、または、(b)疎水性モノマーの添加段階の前、または、(c)前記疎水性モノマーの添加段階の後のいずれかに親水性相に添加し、疎水性相に浸入させる。

## 【0038】

好ましい実施形態において、重合段階(iii)および場合によって段階(iv)は、重合開始剤を存在させて、約60から90 までの温度、特に、70 までの温度に上げることによるか(重合条件が、選んだ開始剤の特質によって当技術分野の熟練者によって決定されるのは当然である)、または、放射線を用いる光化学、例えば、紫外線放射またはレーザービームあるいはその他のエネルギー源により行う。

20

## 【0039】

有機相は、5から12個の炭素原子を含む化合物、それらの異性体およびそれらの混合物から選択される脂肪族または環状炭化水素を含む相、または、ラジカル経路により重合することができる有機化合物の全部または一部を含む相である。好ましくは、その炭化水素は、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカンおよびドデカンから選択し、ラジカル経路により重合することができる有機化合物は、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、t-ブチルスチレンまたはビニルトルエン、およびこれらのモノマー同士の共重合体から選択する[重合条件を、選抜した炭化水素(単数または複数)の選択および選んだ開始剤の特質によって調整するのは、当技術分野の熟練者の領域であることは当然である]。特に、重合を、温度を上げて行うかあるいは温度の上昇をもたらす場合は、重合の手はずは、ペンタン等の揮発性溶媒に適切にするべきである。

30

## 【0040】

好ましくは、親水性相は、水等の水性相である。

## 【0041】

本発明の好ましい実施形態において、粒子の官能化は、反応性官能基を相Bに導入することおよび相Aに浸入させることにより完結させることができる。反応性官能基は、例えば、ポリマーマトリックスの疎水性モノマーと重合することができる弱親水性モノマーによって導入することができる。特に、反応性官能基は、アクリル酸、メタクリル酸、エチレン酸およびスルホン酸モノマーから選択される親水性モノマーの単独または混合物によって、または疎水性モノマーとの混合物によって導入される(その混合物の組成を決定するのが当技術分野の熟練者の領域であるのは当然である)。官能基は、その後の反応を可能にするほかに、その後の応用のために必要なコロイドの安定化をももたらす。官能基は、相Bに導入され、(a)段階(ii)の疎水性モノマーの浸入と同時に、または(b)段階(ii)の疎水性モノマーの浸入前、または(c)段階(ii)の疎水性モノマーの浸入の後のいずれかに、相Aの内側に浸入する。

40

## 【0042】

50

特定の実施形態においては、そして必要な場合は、段階(iii)の後に多孔性複合体粒子の生成を伴う有機相Aの一部または全部の蒸発の段階が続く。

【0043】

本発明は、かくして、両親媒性共重合体の親水性部分によって官能化され、さらに上で示したように製造工程の途中で添加される反応性官能基の存在によって官能化することができる複合体粒子を提供する。本発明の粒子は、好ましくは、カルボキシル基、アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、トシル基またはヒドラジン基から選択される基によって官能化され、それは少なくとも1つのリガンドと反応することができる。

【0044】

かくして生成した非多孔性または多孔性官能化複合体粒子は、リガンド、例えば、抗体、抗体フラグメント、蛋白質、ポリペプチド、酵素、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマーまたは核酸フラグメント等の生体分子;または、化学ポリマー、医薬物質、かご分子、キレート化剤、触媒またはビオチン等の化学分子を固定化することができる。その複合体粒子が「多孔性」と書かれるときは、それらは、有機相の全部または一部の蒸発によって所定の多孔度の度合いに達しているものと解釈される。

10

【0045】

したがって、本発明の他の対象は、本発明の複合体粒子の反応性基が、上で定義した少なくとも1つのリガンドと直接または間接的に反応したもからなるコンジュゲート、およびその用途である。

【0046】

例として、前記コンジュゲートは、免疫試験で、生体試料中の蛋白質、抗原または抗体の検知および/または定量化のため、またはプローブ技術を使用する試験で生体試料中の核酸フラグメントの検知および/または定量化のために使用する。試料中の核酸の検知および/または定量化のためにプローブを使用することは、当技術分野の熟練者には良く知られており、説明のために、サンドウィッチハイブリダイゼーション技法を挙げることができる。同様に、本発明のコンジュゲートは、例えば、それによって生体試料中の核酸の検知および/または定量化を可能にするPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)またはその他の適当な増幅技法による試料中の核酸の増幅のための反応用「プライマー担持剤」として使用することができる。

20

【0047】

本発明の他の対象は、したがって、前記コンジュゲートを付加的に含む診断用試薬および組成物、および、前記試薬の診断試験における用途である。

30

【0048】

コンジュゲートには、また、医薬物質用、欠損遺伝子修復剤用、治療におけるアンチセンスプローブ等の遺伝子の発現を阻止することができる薬剤用、または蛋白質の活性を阻止することができる薬剤用の担体または媒体としての治療分野における応用が見出され、そんな訳でそれらは治療用または予防用組成物に使用することができる。

【0049】

このように、本発明のコンジュゲートは、前記コンジュゲートを、適切であって薬剤として許容できる補助剤および/または希釈剤および/または賦形剤と組み合わせて含む治療用または予防用組成物の中の医薬物質を担持することができ、前記の医薬物質は、生体内で放出することができる。薬剤として許容できる賦形剤および補助剤の定義は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、16th Ed.、Mack Publishing Co.に記載されている。

40

【0050】

また、本発明のコンジュゲートは、少なくとも1つの対象となる蛋白質または1つの対象となる蛋白質のフラグメントに遺伝コードを指定する治療対象の遺伝子を担持することができる。ここで「蛋白質」の用語を、最も一般的に用いられるその定義内の蛋白質および抗体の両方を意味するものと解釈するのは当然である。もちろん、上記のコンジュゲートは、治療対象の前記の遺伝子の発現のために必要な成分も含んだ治療用または予防用組成物

50

の中に組み込む。

【0051】

また、本発明のコンジュゲートは、治療用または予防用組成物中に組み込めば、アンチセンスプローブまたはオリゴヌクレオチドの生体内での移動のために使用することができる。アンチセンス配列は、特に、標的中のmRNAの位置によるポリソームの生成および/または機能化を抑えることによって対象となる標的蛋白質の合成を特異的に妨げることができる。例えば、開始複合体生成の防止のためにアンチセンスオリゴヌクレオチドによる抑制の標的として翻訳開始コドンNO周囲の配列が頻々選択される。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる抑制のその他の機構としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド/mRNAハイブリッドを消化するリボヌクレアーゼHの活性化、または、その標的がmRNAスプライスサイトであるアンチセンスオリゴヌクレオチドによるスプライスサイトにおける妨害が含まれる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA配列に対して相補性であり、したがって、三重ラセンの形成、すなわち、DNA二重ラセンの主溝内の「Hoogsteen」水素結合を介したアンチセンスオリゴヌクレオチドの対合により、転写を妨害することができる。この特定の場合において、この用語はより正確には「アンチ遺伝子オリゴヌクレオチド」である。アンチセンスオリゴヌクレオチドが、それらがハイブリッド形成すべきDNAまたはRNAの標的には厳密に相補性であり得るが、しかしそれらが標的とハイブリッド形成する場合には厳密には相補性はなくともよいことが明らかに理解できる。同様に、ヌクレオチド間結合の所が修飾されていないまたは修飾されているアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。これらの概念はすべて、当業者の一般知識の一部を形成している。

10

20

【0052】

本発明は、したがって、とりわけ、上で定義したアンチセンスオリゴヌクレオチドを担持するコンジュゲートを含む治療用組成物に関する。

【0053】

最後に、このコンジュゲートは、かご分子/クリプテートまたはキレート化剤/キレート化分子タイプの複合または化学的応用で触媒用の媒体として作用する複合錯体を形成することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0054】

本発明の複合体粒子は、以下の実施例に記載したプロトコルに従うインサイチューでの乳

30

【実施例1】

【0055】

安定な等分散エマルションの調製

安定で等分散の出発エマルションを、本実施例に記載のプロトコルの1つまたは他によって調製した。

【0056】

(i)水中50重量%の濃度のドデシル硫酸ナトリウムからなる連続相に、コロイドミル(商品名: Ika)を使用してせん断をかけながら、80重量%の有機フェロフルイドを含むフラクションが得られるまで、オクタン中45重量%の酸化鉄からなる分散相を徐々に混合して、乳

40

化法を使用して最初のエマルションを調製した。上記の混合物を、PG398タイプのCouette粘度計中で予め決めたせん断速度で細かく砕いた。そのように調製した最初のエマルションは、小滴の直径の分布が幅広い特徴をもつ多分散系のエマルションであり、大きさが等分散系の出発エマルションを得るために、次いで連続磁気選別により処理する。

(ii) Tergitol NP10タイプの表面活性剤(31重量%)からなる連続相に、スパチュラを使用して、オクタンと73重量%の酸化鉄および脂肪親和性のポリリシノール酸モノグリセロールまたはポリグリセロールタイプの表面活性剤(1から10重量%)からなる分散相を素早く加えることにより、乳化法を使用して最初のエマルションを調製した。上記の混合物を、その後、PG398タイプのCouette粘度計中で予め決めたせん断速度で細かく砕く。そのように調製した最初のエマルションは、小滴の直径の分布が低い特徴をもつ比較的等分散系のエマ

50

ルションであり、大きさが等分散系の出発エマルションを得るために、その後連続磁気選別により処理する。

【実施例 2】

【0057】

「櫛形」両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

実施例1(i)に記載したプロトコルに従って調製したエマルション(50ml、Ts=5%)を、最初にトリトンX-405(2g/l)中で安定化し、ポリマー溶液(1.5g/l、pH8)で磁気分離により3回洗浄する。洗浄毎に透明な上澄み液を除去し、共重合体を含む等体積の溶液で置き換える。両親媒性共重合体は、疎水性結合(Mw=20,000g/mol)で変性したポリ(アクリル酸)である。このポリマーは、90%のアクリル酸単位と10%のアリール/メタクリル酸ポリオキシアルキレン単位(Coatex JS3879B)からなる。その共重合体は、それが水/油界面に吸着する両親媒性の特性を有する。そのエマルションを、1 $\mu$ mのナイロンフィルターでろ過した後、50mlの反応器に入れ、窒素下で穏やかに攪拌しながら(200回転/分)、2時間脱気する。続いて、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(4mg)を溶解したスチレン(0.3g)を、注射器を用いて反応器に加える。一体化した混合物を外界温度で1時間攪拌したまま(200回転/分)にする。温度を70℃まで上げると開始剤の分解が起こり、エマルションの滴の中で重合が始まる。重合を15時間続けることにより、酸化鉄の粒を含むポリスチレン粒子からなる安定なカルボキシル基をもつ磁性ラテックスを得ることが可能となる。

10

【実施例 3】

【0058】

ダイブロック両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

実施例1(i)に記載したプロトコルに従って調製したエマルション(50ml、Ts=5%)を、最初にトリトンX-405(2g/l)中で安定化し、上記の共重合体溶液(0.8g/l、pH8)で磁気分離により3回洗浄する。この共重合体は、管理されたラジカル重合法によって得た。それは約20,000g/モルの重量を有する。ポリスチレンのブロックは、ポリマー重量の約10%である。洗浄毎に透明な上澄み液を除去し、共重合体を含む等体積の溶液で置き換える。そのエマルションは、1 $\mu$ mのナイロンフィルターでろ過した後、50mlの反応器に入れ、窒素下で穏やかに攪拌しながら(200回転/分)、2時間脱気する。続いて、スチレン(0.3g)および2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(6mg)を、注射器を用いて反応器に加える。一体化した混合物を外界温度で1時間攪拌したまま(200回転/分)にする。温度を70℃まで上げると開始剤の分解が起こり、エマルションの滴の中で重合が始まる。重合を15時間続けることにより、酸化鉄の粒を含むポリスチレン粒子からなる安定なカルボキシル基をもつ磁性ラテックスを得ることが可能となる。

20

30

【実施例 4】

【0059】

ダイブロック両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

実施例1(i)に記載したプロトコルに従って調製したエマルション(50ml、Ts=5%)を、最初にトリトンX-405(2g/l)中で安定化し、上記の共重合体溶液(0.4g/l、pH8)で磁気分離により2回洗浄する。管理されたラジカル重合によりポリ(アクリル酸)ブロックが得られた。そのポリマーは、18,600g/モルの重量をもち、この重量の約2%がポリエチレンブロックである。洗浄毎に透明な上澄み液を除去し、共重合体を含む等体積の溶液で置き換える。そのエマルションは、1 $\mu$ mのナイロンフィルターでろ過した後、50mlの反応器に入れ、窒素下で穏やかに攪拌しながら(200回転/分)、2時間脱気する。続いて、スチレン(0.3g)および2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(6mg)を、注射器を用いて反応器に加える。一体化した混合物を外界温度で1時間攪拌したまま(200回転/分)にする。温度を70℃まで上げると開始剤の分解が起こり、エマルションの滴の中で重合が始まる。重合を14時間続けることにより、酸化鉄の粒を含むポリスチレン粒子からなる安定なカルボキシル基をもつ磁性ラテックスを得ることが可能となる。

40

【実施例 5】

【0060】

50

疎水性部分がポリマーマトリックス表面に固定される「櫛形」両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

(i)ラテックスの製造

実施例1(i)のプロトコルに従って調製し、オクタン中に直径10nmの酸化鉄ナノ粒子を含む直径が180nmプラスまたはマイナス5nmの小滴である相Aおよび表面活性剤混合物[ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)およびオレイン酸]を分散した水性相B[SDSの臨界ミセル濃度(CMC)の0.8倍に当たる1%濃度]の非混和性の2つの相からなる安定した等分散の出発エマルションの20mlを重合反応容器に配置する。エマルションは、窒素下で7時間に亘って脱気する。ヘキサンに溶解した重合開始剤の2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(20g/lのものを215 $\mu$ l)をエマルション中に添加する。その混合物を1時間かけて均質化し、その後80mgのスチレンモノマーを添加する。スチレンモノマーは2時間に亘って相Aの内部に拡散する。溶液を70 $^{\circ}$ Cの温度に加熱して重合を開始し、ゆっくり攪拌しながら12時間30分継続する。重合の完了後、得られた複合体粒子は、188nmの直径および1.1程度の多分散指数を示す。

10

【0061】

(ii)両親媒性共重合体の固定化

(i)で得られたポリスチレン磁性ラテックス粒子(45ml)を、Coatexポリマーの溶液(MW=20,000g/モル、0.8g/l、pH3.4)で連続磁気分離により2回洗浄する。こうして洗浄したラテックス(44ml、 $T_s=3.8\%$ )を重合反応器に導入する。反応媒体を攪拌しながら(200回転/分)、窒素で2時間脱気する。スチレン(0.3g)を添加し、200回転/分で攪拌しながら1時間に亘って膨潤を起こさせる。温度を70 $^{\circ}$ Cに上げ、次いで過硫酸カリウム(KPS)(1mlのMilliQ水6mg)を添加する。次いで70 $^{\circ}$ Cで7時間に亘り200回転/分で攪拌しながら重合を行う。

20

【実施例6】

【0062】

疎水性部分がポリマーマトリックス表面に固定されるダイブロック両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

ポリスチレン磁性ラテックス粒子(45ml、実施例5(i)による通常のスチレン/水不溶性開始剤混合物を含むエマルションのインサイチューでの重合によって得られたもの)を、ダイブロックポリマーの溶液(MW=10,000g/モル、0.8g/l、pH3.4)で連続磁気分離により2回洗浄する。こうして洗浄したラテックス(40ml、 $T_s=3.4\%$ )を重合反応器に導入する。反応媒体を攪拌しながら(200回転/分)窒素で2時間脱気する。スチレン(0.3g)を添加し、200回転/分で攪拌しながら1時間に亘って膨潤を起こさせる。温度を70 $^{\circ}$ Cに上げ、次いで過硫酸カリウム(0.2mlのMilliQ水4mg)を添加する。次いで70 $^{\circ}$ Cで16時間に亘り200回転/分で攪拌しながら重合を行う。

30

【実施例7】

【0063】

「櫛形」両親媒性共重合体を含む複合体粒子の調製

実施例1(i)で示したように調製した磁性エマルション(直径220nm、濃度4重量%/容積)を、80%のアクリル酸単位と20%のアリール/メタクリル酸ポリオキシアルキレン単位(Coatex M883)からなる疎水性結合によって変性したポリ(アクリル酸)である櫛形両親媒性共重合体を0.05%の濃度で用いて安定化し、重合反応器に入れる。AIBN(2,2'-アゾビスイソブチロニトリル)の6mg、スチレンの360mgおよびジビニルベンゼンの240mgを加え、20 $^{\circ}$ Cで1時間保持する。温度を70 $^{\circ}$ Cに上げて13時間に亘って重合させる。最終的な磁性ラテックスは、240nm程度の大きさを有する。

40

【実施例8】

【0064】

複合体粒子の調製

実施例1(i)で調製した磁性エマルションを、0.2%のトリトンX-405中で安定化し、次いで、0.05%の濃度の実施例7に記載したポリマーの溶液(Coatex M883、MW=50,000g/モル)で3回洗浄する。

50

## 【実施例 9】

## 【0065】

## ストレプトアビジンのグラフト化

リン酸塩緩衝液(10mM、pH6.8)の100 $\mu$ lを、上記の実施例7および8で得られた粒子の0.5mgに加えた。その粒子を攪拌し、次いで磁化した。その粒子をリン酸塩緩衝液の50 $\mu$ l中に入れた。ストレプトアビジン(5mg/ml)の15 $\mu$ lを水溶性のカルボジイミド(1mg/ml)の50 $\mu$ lとエッペンドルフ管の中で混合した。攪拌を300回転/分で2分間行い、続いて粒子をその管に加えた。40 $^{\circ}$ C、1,000回転/分で30分の定温放置を行い、続いて、ブロッキング緩衝液(PBS+トリトンX-405+エタノールアミン)の100 $\mu$ lを加えた。その混合物を、40 $^{\circ}$ C、1,000回転/分で30分間、定温で放置した。その粒子を次に磁化し、保存用緩衝液(PBS+トリトンX-405)の100 $\mu$ l中に入れた。この保存用緩衝液で新たな2回の洗浄操作を行った。最後の洗浄操作の間に粒子を保存用緩衝液50 $\mu$ l中に入れた。

10

## 【実施例 10】

## 【0066】

ビオチン標識オリゴヌクレオチドを粒子ストレプトアビジンコンジュゲートにグラフト化  
上記の実施例9で得たコンジュゲートの粒子(0.25mg)を磁化し、TE NaCl緩衝液(トリス10mM、EDTA 1mM、NaCl 1M、トリトンX-405 0.05%、サケのDNA)の50 $\mu$ l中に入れた。ビオチン標識オリゴヌクレオチド(ODN)のコピー $2.2 \times 10^{13}$ 個を加えた。37 $^{\circ}$ Cで1,000回転/分で30分間の定温放置を行った。粒子を磁化し、TE NaCl緩衝液の50 $\mu$ l中に入れた。

20

## 【実施例 11】

## 【0067】

## ハイブリダイゼーション、およびカップリングの立証

上記の実施例10で得たコンジュゲートの40 $\mu$ gにTE NaCl緩衝液の100 $\mu$ lを加えた。標的オリゴヌクレオチドのコピー $10.18 \times 10^{10}$ 個およびセイヨウワサビペルオキシダーゼのラベルをつけた検知用オリゴヌクレオチドのコピー $18 \times 10^{10}$ 個を加えた。37 $^{\circ}$ C、1,000回転/分30分間の定温放置を行った。TE NaCl緩衝液中で洗浄を3回行った。o-フェニレンジアミン(OPD)(Coloreia希釈剤2.5ml中OPD5mgの希釈溶液)100 $\mu$ lを加えた。定温放置を3分間行った。1NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の100 $\mu$ lを加えた後、粒子を磁化した。上澄み液100 $\mu$ lを取り出し、その492nmにおける強度を分析した。ネガティブコントロールは、標的のないコンジュゲートからなる。結果を次の表に示す。

30

## 【0068】

## 【表 1】

	ネガティブ コントロール	試験1	試験2
実施例8のコンジュゲート	0.266	0.848	0.871
実施例9のコンジュゲート	0.242	0.822	0.824

## 【国際公開パンフレット】

(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  
16 janvier 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/004559 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C08K 9/08,  
C08F 2/44**BIBETTE, Jérôme** [FR/FR]; 16, rue Boulon, F-33000  
Bordeaux (FR). **MONDAIN-MONVAL, Olivier** [FR/FR];  
116, rue Brach, F-33000 Bordeaux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/01552

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**;  
12, rue Boileau, F-69006 Lyon (FR).

(22) Date de dépôt international : 6 mai 2002 (06.05.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/06203 10 mai 2001 (10.05.2001) FR(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, 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'étoile (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel  
Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ELAIS-  
SARI, Abdelhamid** [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod,  
F-69007 Lyon (FR). **MONTAGNE, Franck** [FR/FR];  
515, domaine du Bois Saint Paul, F-69390 Charly (FR).  
**BOSC, Eric** [FR/FR]; 34, chemin de Blanquette, F-33770  
Salles (FR). **PICHOT, Christian** [FR/FR]; 5, allée Roland  
Garros, F-69960 Corbas (FR). **MANDRAND, Bernard**  
[FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, 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, PREPARATION METHOD THEREOF AND APPLI-  
CATIONS OF SAME

(54) Titre : PARTICULES COMPOSITES, CONJUGUES DERIVES, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to composite particles comprising a hydrophobic polymer core and inorganic nanoparticles. Said hydrophobic polymer forms a polymer matrix inside which the inorganic nanoparticles are stabilised and distributed in a relatively homogenous manner. Said particles are at least partially surrounded by an amphiphilic copolymer comprising a hydrophobic part and a hydrophilic part, said hydrophobic part being at least partially immobilised in the polymer matrix. The invention also relates to the preparation method thereof, the conjugates comprising such particles and a ligand and the use of same in reactants and therapeutic compositions.

(57) Abrégé : Les particules composites de l'invention comprennent un cœur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, ledit polymère hydrophobe constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière relativement homogène, lesdites particules étant au moins partiellement entourées par un copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée dans ladite matrice polymère. L'invention concerne aussi leur procédé de préparation, ainsi que les conjugués comprenant de telles particules et un ligand, et l'utilisation de ceux-ci dans des réactifs et compositions thérapeutiques.

WO 03/004559 A1



Particules composites, conjugués dérivés, procédé de préparation et applications

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

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 fonctionnels  
15 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 molécules cages, des  
20 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 nucléiques  
25 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  $\mu$ m et les particules intermédiaires d'un diamètre  
30 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.

10 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  
15 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  
20 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  
25 des particules composites magnétisables, comme décrit ci après.

La demande de brevet EP-A-0 390 634 décrit des microsphères composites magnétisables de polymère vinyloaromatique 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  
30 copolymère hydrophobe dérivé d'au moins un monomère vinyloaromatique hydrophobe et d'au moins un polymère émulsifiant polyéthyléniquement insaturé soluble dans le ou les monomères vinyloaromatiques 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.

Le document US-A-4 358 388 décrit des particules composites constituées par une matrice polymère dans laquelle une charge magnétique est répartie de manière homogène. Elles sont obtenues par polymérisation d'un monomère organique insoluble dans l'eau, dans une phase organique contenant la charge magnétique, ladite phase organique étant en émulsion dans une phase aqueuse en présence d'un agent tensioactif.

De telles particules constituent en biologie des supports similaires à ceux évoqués précédemment du type tubes, plaques ou billes, avec un atout supplémentaire résidant dans leur capacité à être isolées facilement par l'application d'un champ magnétique.

5 Néanmoins, leur utilisation dans ce domaine d'application reste assez limitée car ces particules ne présentent aucune fonctionnalisation.

Selon l'invention on dispose maintenant de nouvelles particules composites qui apportent une solution aux problèmes posés par les particules connues précédemment décrites et qui répondent aux critères suivants :

- 10 - Particules sphériques isodisperses,  
- Particules possédant une charge inorganique répartie de manière homogène dans le cœur,  
- Particules de taille intermédiaire, à savoir ayant un diamètre compris entre 50 et 1000 nm,  
15 - Particules fonctionnalisées ou fonctionnalisables,  
- La charge inorganique peut être magnétique ou magnétisable,  
- Particules obtenues par un procédé de synthèse simple et contrôlable.

20 Les particules composites de l'invention comprennent un cœur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, ledit polymère hydrophobe constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière homogène, lesdites particules étant au moins partiellement entourées par un  
25 copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée sur ou dans ladite matrice polymère.

Selon une variante de l'invention, les particules sont complètement entourées par le copolymère amphiphile et/ou la totalité de la partie  
30 hydrophobe du copolymère amphiphile est immobilisée sur ou dans la matrice polymère.

On comprend selon l'invention un copolymère amphiphile, comme un copolymère possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile, étant entendu que la partie hydrophobe et/ou la partie hydrophile peuvent être un ensemble de sous-parties respectivement hydrophobes et/ou hydrophiles  
5 constitutives du copolymère amphiphile. Ainsi, un copolymère amphiphile de l'invention est notamment choisi parmi les copolymères en blocs, les copolymères séquencés, les polymères ramifiés dont le squelette est hydrophobe ou hydrophile et les ramifications sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes, les polymères en peigne dont le squelette est hydrophobe ou  
10 hydrophile et les ramifications en peigne sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes.

La partie hydrophile du copolymère amphiphile peut être ionique, anionique ou cationique, ou non ionique ; elle comporte des groupements fonctionnels qui sont réactifs, directement ou indirectement.

15 Selon l'invention, la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée sur ou dans la matrice polymère. L'immobilisation de cette partie hydrophobe est toujours au moins de nature physique, et plus précisément mécanique, du type emprisonnement, et peut venir compléter une fixation préalable de la partie hydrophobe, de nature chimique ou physique comme  
20 une fixation par adsorption, par exemple. Ainsi, une immobilisation peut résulter des événements suivants :

- La partie hydrophobe du copolymère amphiphile est adsorbée à la surface de la matrice, puis définitivement immobilisée dans la matrice par le polymère hydrophobe ;
- 25 - Ladite partie hydrophobe est solubilisée dans la phase organique, puis emprisonnée dans le polymère hydrophobe lors de la formation de la matrice ;
- Ladite partie hydrophobe est uniquement emprisonnée mécaniquement lors de la formation de la matrice  
30 polymère.

Cette immobilisation conduit à des particules possédant une forte stabilité, et notamment bien supérieure à celle des particules connues décrites précédemment.

Un copolymère amphiphile approprié comprend avantageusement :

- 5 - Une partie hydrophobe choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras, et/ou
- Une partie hydrophile choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides, les polysaccharides.

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, de nickel, de manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, de nickel.

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

20 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%.

A l'intérieur des particules de l'invention, les nanoparticules sont stabilisées par des agents de stabilisation choisis parmi les chaînes polymère amphiphiles, les agents tensioactifs ioniques ou non ioniques, fonctionnels ou non fonctionnels, polymérisables ou non polymérisables. Les agents tensioactifs fonctionnels sont en particulier choisis parmi les acides gras ou des dérivés d'acides gras, en particulier l'acide oléique ou ses dérivés, et les mélanges d'agents tensioactifs tels que définis précédemment.

30 Les polymères hydrophobes appropriés de la matrice sont les polymères de type vinylaromatique hydrophobe, 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 co-monomères, 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 particules composites de l'invention peuvent également inclure un marqueur, tel qu'un marqueur radioactif, étant entendu que le marqueur est introduit lors de la préparation de l'émulsion telle que décrite dans l'exemple 1 qui suit.

Les particules de l'invention 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. Ce diamètre est défini à plus ou moins environ 5%, ce qui signifie que leur diamètre moyen en volume est défini à plus ou moins environ 5% près.

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 un premier procédé de l'invention, on obtient des particules composites pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée dans la matrice polymère, comme suit :

(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 tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

(iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

5 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii), c'est-à-dire avant ou après l'étape (ii).

Selon un second procédé de l'invention, on obtient des particules composites pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée sur la matrice polymère, comme suit :

(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 tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

15 (ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ;

(iii) on polymérise une fraction desdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

20 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii) ou après l'étape (iii), puis, lors d'une étape (iv), on polymérise la fraction restante des monomères hydrophobes à la surface de la matrice polymère. Quand le copolymère amphiphile est introduit avant l'étape (iii), il peut être introduit avant ou après l'étape (ii).

Pour obtenir les particules composites selon les procédés de l'invention, le polymère amphiphile est avantageusement choisi parmi ceux énoncés précédemment dans la description des particules composites.

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.

5 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  
10 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-diméthyl-valéronitrile, diméthyl 2,2'-azobis(2-  
15 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  
20 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  
25 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  
30 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'agent 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), et éventuellement l'étape (iv) de polymérisation sont effectuées 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 vinyloaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, étant 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 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 invention, la fonctionnalisation des particules peut être complétée 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 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 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 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 fournit donc des particules composites qui sont fonctionnalisées par la partie hydrophile du copolymère amphiphile, et qui peuvent au surplus l'être par la présence, de groupements fonctionnels réactifs, apportés comme indiqué ci-dessus au cours du procédé de préparation. Les particules de l'invention sont fonctionnalisées de préférence par des groupements choisis parmi les groupements carboxylique, amine, thiol, hydroxyl, tosyl hydrazine, qui seront à même 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  
5 de la phase organique.

Aussi, la présente invention a également pour objet des conjugués constitué par des particules composites de l'invention dont les groupements réactionnels ont réagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand tel que défini ci-dessus, ainsi que leurs utilisations.

10 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  
15 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  
20 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 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 diagnostique comprenant en outre lesdits conjugués et  
25 l'utilisation dudit réactif dans un essai diagnostique.

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  
30 thérapie ou d'un agent susceptible de bloquer l'activité d'une protéine 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 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.

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 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 de l'invention sont obtenues par polymérisation en émulsion *in situ* selon le protocole décrit dans les exemples qui suivent.

20

#### **Exemple 1 : préparation d'une émulsion stable et isodisperse**

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

(j) 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 polydispense 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.

5 (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 tensioactif lipophile de type monoglycérol ou polyglycérol de polyrisinoléate (1 à 10% en poids), à la phase continue formée de tensioactif de type tergitol NP10 (31% en poids) grâce à une spatule. Le mélange ainsi défini est ensuite fragmenté dans une couette  
10 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.

15

**Exemple 2 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne »**

L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ; Ts = 5%) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à  
20 trois reprises par séparation magnétique avec une solution de polymère (1,5 g/l ; pH8). A chaque lavage, le surnageant limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Le copolymère amphiphile est un polyacide acrylique modifié par des chaînons hydrophobes (Mw = 20 000 g/mol). Ce polymère est composé par 90% de motifs acide  
25 acrylique et par 10% de motifs méthacrylate de polyoxyalkylène / aryle (Coatex JS3879B). Le copolymère possède des propriétés amphiphiles qui permettent de venir s'adsorber aux interfaces eau - huile. Après avoir été filtrée sur un filtre nylon de 1 µm, l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le  
30 styrène (0,3 g) dans lequel est dissous le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (4 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble

est laissé sous agitation (200 tours/min) et à la température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 15 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 3 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc**

L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ; Ts = 5%) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à trois reprises par séparation magnétique avec la solution de copolymère précédente (0,8 g/l, pH8). Ce copolymère a été obtenu selon un procédé de polymérisation par voie radicalaire contrôlée. Il possède une masse d'environ 20 000 g/mol. Le bloc polystyrène représente environ 10% de la masse du polymère. A chaque lavage, le surageant limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Après avoir été filtré sur un filtre nylon de 1 µm, l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le styrène (0,3 g) et le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (6 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble est laissé sous agitation (200 tours/min) et à température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 15 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 4 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc**



L'émulsion préparée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1 (i) (50 ml ; Ts = 5%) initialement stabilisée dans le Triton X405 (2 g/l) est lavée à deux reprises par séparation magnétique avec la solution de copolymère précédente (0,4 g/l ; pH8). Le bloc polyacide acrylique a été obtenu par polymérisation radicalaire contrôlée. Le polymère possède une masse de 18 600 g/mol et le bloc polyéthylène représente environ 2% de cette masse. A chaque lavage, le suragent limpide est éliminé et remplacé par un volume égal de solution contenant le copolymère. Après avoir été filtré sur un filtre nylon de 1 µm, l'émulsion est introduite dans un réacteur de 50 ml et dégazée sous azote pendant 2 heures sous faible agitation (200 tours/min). Le styrène (0,3 g) et le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (6 mg) sont alors ajoutés dans le réacteur à l'aide d'une seringue. L'ensemble est laissé sous agitation (200 tours/min) et à température ambiante pendant une heure. L'élévation de la température jusqu'à 70°C provoque la décomposition de l'amorceur et initie la polymérisation dans les gouttes d'émulsion. La polymérisation dure 14 heures et permet d'obtenir un latex magnétique carboxylique stable constitué par des particules de polystyrène renfermant des grains d'oxyde de fer.

**Exemple 5 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne », dont la partie hydrophobe est immobilisée à la surface de la matrice polymère**

**(i) Obtention du latex**

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 dans de l'octane et un mélange de tensioactifs (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), 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  
5 amorcée par 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.

**(ii) Immobilisation du copolymère amphiphile**

10 Des particules de latex magnétiques polystyrène obtenus en (i) (45 ml) sont lavées deux fois avec une solution de polymère Coatex (PM = 20 000 g/mol ; 0,8 g/l ; pH3,4) par des séparations magnétiques successives. Le latex ainsi lavé est introduit (44 ml ; Ts = 3,8%) dans le réacteur de polymérisation. Le milieu réactionnel est dégazé deux heures par l'azote sous  
15 agitation (200 tours/min). On introduit le styrène (0,3 g) et on laisse gonfler pendant une heure sous agitation à 200 tours/min. On élève la température à 70°C puis on introduit du persulfate de potassium (KPS) (6 mg dans 1 ml d'eau milliQ). Puis on polymérise à 70°C pendant 7 heures sous agitation à 200 tours/min.

20

**Exemple 6 : préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile dibloc, dont la partie hydrophobe est immobilisée à la surface de la matrice polymère**

25 Des particules de latex magnétique polystyrène (45 ml obtenus par polymérisation in situ d'une émulsion avec un mélange classique styrène / amorceur non hydrosoluble, conformément à l'Exemple 5 (i)) sont lavées deux fois avec une solution de polymère dibloc (PM = 10 000 g/mol ; 0,8 g/l ; pH = 3,4) par des séparations magnétiques successives. Le latex ainsi lavé est introduit (40 ml ; Ts = 3,4%) dans le réacteur de polymérisation. Le  
30 milieu réactionnel est dégazé deux heures par l'azote sous agitation (200 tours/min). On introduit le styrène (0,3 g) et on laisse gonfler pendant une

heure sous agitation à 200 tours/min. On élève la température à 70°C puis on introduit du persulfate de potassium (KPS) (4 mg dans 0,2 ml d'eau milliQ). Puis on polymérise à 70°C pendant 16 heures sous agitation à 200 tours/min.

5           **Exemple 7 : Préparation de particules composites avec un copolymère amphiphile « en peigne »**

L'émulsion magnétique préparée comme indiqué dans l'exemple 1(i) (diamètre 220nm et de concentration 4% masse/volume) est stabilisée avec un copolymère amphiphile en peigne polyacide acrylique modifié par des  
10 chaînes hydrophobes (PM = 50000 g/mol), constitué par 80% de motifs acide acrylique et 20% de motifs méthacrylate de polyoxyalkylène/aryle (Coatex M883), à une concentration de 0,05%, et placée dans un réacteur de polymérisation. Six mg d'AIBN (2,2'-azobisisobutyronitrile), 360 mg de styrène et 240 mg de divinylbenzène sont ajoutés et incubés pendant 1 heure à 20°C.  
15 La polymérisation est engendrée par élévation de la température à 70°C pendant 13 heures. Le latex magnétique final a une taille de l'ordre de 240 nm.

**Exemple 8 : Préparation de particules composites**

L'émulsion magnétique telle que préparée dans l'exemple 1(i) est  
20 stabilisée dans le Triton X-405 à 0.2%, puis est lavée à trois reprises avec une solution du polymère tel que décrit dans l'exemple 7 (Coatex M883 ; PM = 50000 g/mol) à une concentration de 0.05%.

**Exemple 9 : Greffage de la streptavidine**

25 On a ajouté 100 µl de tampon phosphate (10 mM, pH 6.8) dans 0.5 mg des particules telles qu'obtenues dans les exemples 7 et 8 précédents. On a agité puis aimanté les particules. On a repris les particules dans 50 µl de tampon phosphate. Dans un tube Eppendorf, on a mélangé 15 µl de streptavidine (5mg/ml) avec 50 µl de carbodiimide hydrosoluble (1mg/ml). On a  
30 agité 2 minutes à 300 tour/min puis on a ajouté les particules dans le tube. On a incubé à 40°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes puis on a ajouté 100 µl

de tampon de blocage (PBS+Triton X-405+ éthanolamine). On a incubé à 40°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a alors aimanté les particules puis on les a reprises dans 100 µl de tampon de stockage (PBS+Triton X-405). On a effectué deux nouveaux lavages avec le tampon de stockage. Lors d'un  
5 dernier lavage, on a repris les particules dans 50 µl de tampon de stockage.

**Exemple 10 : Greffage d'un oligonucléotide biotinylé sur le conjugué particule-streptavidine**

On a aimanté les particules de 0.25 mg des conjugués tels qu'obtenus dans l'exemple 9 précédent et on les a reprises dans 50 µl de tampon TE NaCl (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 1M, Triton X-405 0.05%, ADN de saumon). On a ajouté  $2,2 \cdot 10^{13}$  copies d'oligonucléotide (ODN) biotinylé. On a incubé à 37°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a aimanté les particules et on les a reprises dans 50 µl de tampon TE NaCl.

15

**Exemple 11 : Hybridation et révélation du couplage**

On a ajouté 100 µl de tampon TE NaCl à 40 µg des conjugués tels qu'obtenus dans l'exemple 10 précédent. On a ajouté  $18 \cdot 10^{10}$  copies d'oligonucléotide cible et  $18 \cdot 10^{10}$  copies d'oligonucléotide de détection marqué par de la peroxydase de raifort. On a incubé à 37°C et 1000 tour/min pendant 30 minutes. On a lavé à trois reprises dans le tampon TE NaCl. On a ajouté 100 µl d'o-phénylènediamine (OPD) (dilution de 5mg d'OPD dans 2,5 ml de diluant Coloreia). On a incubé pendant 3 minutes. On a ajouter 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, puis on a aimanté les particules. On a prélevé 100 µl de surnageant et on a analysé son intensité à 492 nm. Le témoin négatif est composé de conjugués sans cible. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

25

	témoin négatif	Test-1	Test-2
Conjugués de l'exemple 8	0,266	0,848	0,871
Conjugués de l'exemple 9	0,242	0,822	0,824

## REVENDEICATIONS

1. Particules composites comprenant un cœur en un polymère hydrophobe et des nanoparticules inorganiques, ledit polymère hydrophobe  
5 constituant une matrice polymère à l'intérieur de laquelle les nanoparticules inorganiques sont stabilisées et distribuées de manière homogène, lesdites particules étant caractérisées en ce qu'elles sont au moins partiellement entourées par un copolymère amphiphile comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile et dont la partie hydrophobe est au moins partiellement  
10 immobilisée sur ou dans ladite matrice polymère.

2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont complètement entourées par un copolymère amphiphile.

3. Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que la totalité de la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est immobilisée  
15 sur ou dans la matrice polymère.

4. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras.  
20

5. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que la partie hydrophile du copolymère amphiphile est choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides les polysaccharides.

6. Particules selon les revendications 4 et 5, caractérisées en ce que le copolymère amphiphile est choisi parmi les polymères en bloc, les polymères séquencés, les polymères ramifiés, les polymères en peigne.  
25

7. Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles présentent des groupements fonctionnels réactifs à leur surface, tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine,  
30 susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

8. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce 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  
5 ferrites de manganèse, de nickel, de manganèse-zinc ; les alliages de cobalt, de nickel.

9. Particules selon la revendication 8, caractérisées en ce que les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques magnétisables, tels que l'oxyde de fer, la magnétite et l'hématite.

10 10. Particules selon la revendication 8 ou 9, caractérisées en ce que les matériaux inorganiques représentent de 5 à 95%, de préférence de 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.

11. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les  
15 nanoparticules inorganiques sont stabilisées par des agents de stabilisation choisis parmi les groupements ioniques, les chaînes polymère, les agents tensioactifs, les agents tensioactifs fonctionnels, tels que les acides gras ou les dérivés d'acides gras, et les mélanges d'agents tensioactifs.

12. Particules selon la revendication 11, caractérisées en ce que  
20 les agents tensioactifs sont choisis parmi le dodécyl sulfate de sodium et les mélanges de dodécyl sulfate de sodium et d'acide oléique.

13. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que la matrice polymère est une matrice de type polymère vinyloaromatique hydrophobe choisie parmi les homopolymères de monomères  
25 vinyloaromatiques 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 d'acides  
30 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.

14. Particules selon la revendication 13, caractérisées en ce que le polymère est un polymère réticulé.
15. Particules selon les revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent de plus un marqueur radioactif.
- 5 16. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisées en ce qu'elles présentent un diamètre de l'ordre de 50 à 1000 nm, de préférence d'environ 100 à 500 nm et avantageusement d'environ 100 à 250 nm.
- 10 17. Procédé de préparation de particules composites selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et pour laquelle la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée dans la matrice polymère, caractérisé en ce que
- (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée
- 15 de gouttelettes contenant des nanoparticules inorganiques dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;
- (ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et
- 20 (iii) on polymérise lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,
- ledit procédé étant caractérisé en ce que, avant l'étape (iii), on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile.
- 25 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on introduit le copolymère amphiphile avant ou après l'étape (ii).
19. Procédé de préparation de particules composites selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et pour laquelle la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée sur la matrice polymère, caractérisé en ce que
- 30 (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 tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

5 (iii) on polymérise une fraction desdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

ledit procédé étant caractérisé en ce que, avant l'étape (iii) ou après l'étape (iii), on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, puis, selon une étape (iv), on polymérise la fraction 10 restante des monomères hydrophobes à la surface de la matrice polymère.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que lorsqu'on introduit le copolymère amphiphile avant l'étape (iii), on l'introduit avant ou après l'étape (ii).

21. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que 15 le copolymère amphiphile est choisi parmi les polymères en bloc, les polymères séquencés, les polymères ramifiés, les polymères en peigne.

22. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que les monomères hydrophobes sont choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl- 20 styrène, 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.

23. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que 25 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.

24. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que 30 l'agent amorceur est choisi parmi les amorceurs organosolubles ou faiblement solubles dans la phase hydrophile, et les amorceurs solubles dans la phase hydrophile.



25. Procédé selon la revendication 24, 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-diméthyl-valéronitrile, 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 persulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium.

15 26. Procédé selon les revendications 17 ou 19 et 24 ou 25, caractérisé en ce que l'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, soit avant, soit après l'introduction desdits monomères.

27. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) et/ou (iv) est effectuée par chauffage jusqu'à une température de 60 à 90°C, de préférence de 70°C.

28. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la polymérisation (iii) est effectuée par photochimie.

29. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la phase 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 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.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que 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 le styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux.

31. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que la phase B est une phase aqueuse, telle que de l'eau.

32. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend de plus une étape de fonctionnalisation des particules composites par pénétration dans la phase A de groupements réactifs fonctionnels apportés par des monomères faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que les groupements réactifs fonctionnels sont des groupements acides 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.

34. Procédé selon les revendications 17 ou 19 et 32 ou 33, caractérisé en ce que lesdits monomères faiblement hydrophiles sont apportés dans la phase A, soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes, soit avant, soit après l'introduction desdits monomères.

35. Procédé selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend de plus après l'étape de polymérisation (iii), une étape d'évaporation totale ou partielle de la phase A.

36. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec 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.

37. Réactif comprenant en outre au moins un conjugué tel que défini dans la revendication 36.

5 38. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs.

10 39. Conjugués caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des particules composites telles que définies à la revendication 7, dont les groupements fonctionnels ont interagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand choisi parmi les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant  
15 une activité protéique.

40. Utilisation des conjugués tels que définis dans la revendication 39 dans une composition thérapeutique.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 02/01552		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C08K9/08 C08F2/44				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08K C08F				
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				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	US 5 814 687 A (HAN KAKUN ET AL) 29 September 1998 (1998-09-29) column 17 -column 18; tables 2,3 claims 1-10 ---	1-40		
A	FR 2 503 728 A (DART IND INC) 15 October 1982 (1982-10-15) claims 1-10 ---	1-40		
A	EP 0 857 764 A (BAYER AG) 12 August 1998 (1998-08-12) claims 1-13 -----	1-40		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           *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         </td> <td style="vertical-align: top;">           *I* 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            ** 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.            *S* document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			*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	*I* 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 ** 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. *S* document member of the same patent family
*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	*I* 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 ** 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. *S* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search:		Date of mailing of the international search report		
22 August 2002		30/08/2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2220 HH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Siemens, T		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 02/01552
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5814687	A	29-09-1998 JP 9208788 A	12-08-1997
FR 2503728	A	15-10-1982 US 4375520 A BE 892789 A1 DE 3211295 A1 FR 2503728 A1 GB 2096620 A , B	01-03-1983 02-08-1982 04-11-1982 15-10-1982 20-10-1982
EP 0857764	A	12-08-1998 DE 19704943 A1 AU 743076 B2 AU 5294498 A BR 9800587 A CA 2229086 A1 CN 1195006 A EP 0857764 A2 JP 10231367 A NZ 329710 A US 6132505 A	13-08-1998 17-01-2002 13-08-1998 20-07-1999 10-08-1998 07-10-1998 12-08-1998 02-09-1998 29-06-1999 17-10-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Internationale No PCT/FR 02/01552
<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C08K9/08 C08F2/44		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C08K C08F		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 814 687 A (HAN KAKUN ET AL) 29 septembre 1998 (1998-09-29) colonne 17 -colonne 18; tableaux 2,3 revendications 1-10 ---	1-40
A	FR 2 503 728 A (DART IND INC) 15 octobre 1982 (1982-10-15) revendications 1-10 ---	1-40
A	EP 0 857 764 A (BAYER AG) 12 août 1998 (1998-08-12) revendications 1-13 -----	1-40
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: ** 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 ** document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date ** 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 (elle qu'indiquée) ** document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens ** document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée ** 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 ** document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré seulement ** 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 ** document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 22 août 2002		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 30/08/2002
Nom et adresse postale de l'Administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Siemens, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE				Internationale No PCT/FR 02/01552	
Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 5814687	A	29-09-1998	JP 9208788 A		12-08-1997
FR 2503728	A	15-10-1982	US 4375520 A		01-03-1983
			BE 892789 A1		02-08-1982
			DE 3211295 A1		04-11-1982
			FR 2503728 A1		15-10-1982
			GB 2096620 A , B		20-10-1982
EP 0857764	A	12-08-1998	DE 19704943 A1		13-08-1998
			AU 743076 B2		17-01-2002
			AU 5294498 A		13-08-1998
			BR 9800587 A		20-07-1999
			CA 2229086 A1		10-08-1998
			CN 1195006 A		07-10-1998
			EP 0857764 A2		12-08-1998
			JP 10231367 A		02-09-1998
			NZ 329710 A		29-06-1999
			US 6132505 A		17-10-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 2 5 C
G 0 1 N 33/545	G 0 1 N 33/543	5 2 5 G
G 0 1 N 33/553	G 0 1 N 33/543	5 2 5 U
	G 0 1 N 33/543	5 2 5 W
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
	G 0 1 N 33/545	Z
	G 0 1 N 33/553	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74) 代理人 100101465

弁理士 青山 正和

(74) 代理人 100094400

弁理士 鈴木 三義

(74) 代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 アブデルハミド・エレサリ

フランス・F - 6 9 0 0 7・リヨン・リュ・ジャック・モノ・7

(72) 発明者 フランク・モンターニュ

フランス・F - 6 9 3 9 0・シャリー・ドメーヌ・デュ・ボワ・サン・ポール・5 1 5

(72) 発明者 エリック・ボスク

フランス・F - 3 3 7 7 0・サル・シュマン・ドゥ・ブランケット・3 4

(72) 発明者 クリスチャン・ピシヨ

フランス・F - 6 9 9 6 0・コルバ・アレ・ローラン・ガロ・5

(72) 発明者 ベルナル・マンドラン

フランス・F - 6 9 1 0 0・ヴィルバンヌ・リュ・ドゥ・ラ・ドゥア・2 1

(72) 発明者 ジェローム・ビベット

フランス・F - 3 3 0 0 0・ボルドー・リュ・ブロン・1 6

(72) 発明者 オリヴィエ・モンダン - モンヴァル

フランス・F - 3 3 0 0 0・ボルドー・リュ・ブラック・1 1 6

Fターム(参考) 4C076 AA31 AA63 CC41 EE59 FF21

4C086 AA01 FA06 MA05 MA38 MA41 NA03 NA13 ZC02

4J011 PA07 PA65 PA69 PB08 PB27 PC02 PC06