(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
5 avril 2012 (05.04.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/041995 A4

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 9/107 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/067056

(22) Date de dépôt international :
29 septembre 2011 (29.09.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1057855 29 septembre 2010 (29.09.2010) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **TOUSCH, Didier** [FR/FR]; 383 rue Pioch de Boutonnet, Résidence La Traversière Bât. A, F-34090 Montpellier (FR). **THOMAS, Olivier** [FR/FR]; 46 rue Michelet, F-42000 Saint-Etienne (FR). **TALY, Fabrice** [FR/FR]; 229 rue Del Miejour, F-34070 Montpellier (FR). **THIERRY, Alain** [FR/FR]; 153 rue des Quatres Vents, F-34090 Montpellier (FR).

(74) Mandataire : **FAIVRE PETIT, Frédérique**; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

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

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

Publiée :

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

— *avec revendications modifiées (art. 19.1))*

Date de publication des revendications modifiées :
21 juin 2012

WO 2012/041995 A4

(54) Title : PROCESS FOR PREPARING A CHEMICAL STRUCTURE HAVING A PHASE PARTITION, CAPABLE OF GENERATING A SPECIFIC FLUORESCENCE SPECTRUM AND USES THEREOF

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UNE STRUCTURE CHIMIQUE PRÉSENTANT UNE PARTITION DE PHASES, APTE À GÉNÉRER UN SPECTRE DE FLUORESCENCE SPÉCIFIQUE ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract : The subject matter of the invention is a process for preparing an assembled chemical structure or a mixture of such structures, this structure having a phase partition, wherein the phases are in particular of hydrophobic and hydrophilic nature, such as a composite/synthetic particle or a liposome, and being capable of generating an original fluorescence spectrum. The subject matter of the invention is also said assembled structures and mixture thereof and also the compositions or kit comprising same. The invention also relates to the use of these assembled structures and mixture thereof, in particular for medical imaging *in vivo* or for *in vitro* diagnosis of a pathological condition, but also for labelling a sample, an object or a composition that is liquid, or for authentification thereof. The invention also comprises the objects or liquids labelled with the assembled structures, a mixture thereof or with the compositions according to the invention.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un procédé de préparation d'une structure chimique assemblée ou un mélange de telles structures, cette structure présentant une partition de phases, notamment de nature hydrophobe et hydrophile, comme une particule composite/synthétique ou un liposome, et étant apte à générer un spectre de fluorescence original. L'invention a également pour objet lesdites structures assemblées et leur mélange ainsi que les compositions ou kit les comprenant. L'invention concerne aussi l'utilisation de ces structures assemblées et leur mélange, notamment pour l'imagerie médicale in vivo ou pour diagnostic in vitro de pathologie, mais également pour le marquage d'un échantillon, d'un objet ou d'une composition liquide ou pour leur authentification. L'invention comprend également les objets ou liquides marqués par les structures assemblées, leur mélange ou par les compositions selon l'invention.

REVENDICATIONS MODIFIÉES
reçues par le Bureau international le 26 avril 2012 (26.04.2012)

REVENDICATIONS

1. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules, aptes à générer un signal spécifique en fluorescence différent entre chacune desdites particules, caractérisé en ce que chacune desdites particules comprend :

- une paroi rigide ou fluide délimitant au moins un espace intra-particulaire, ladite paroi étant de nature hydrophobe et ledit espace intra-particulaire étant occupé par une solution aqueuse, ou, inversement ladite paroi étant de nature hydrophile et ledit espace intra-particulaire étant occupé par une solution de nature hydrophobe ;

- i) lorsque ladite paroi rigide ou fluide est de nature hydrophobe et ledit espace intra-particulaire est de nature hydrophile, ladite paroi comprend au moins un composé fluorescent hydrophobe et ledit espace intra-particulaire comprend au moins un composé fluorescent hydrophile,

- ii) lorsque ladite paroi rigide ou fluide est de nature hydrophile et ledit espace intra-particulaire est de nature hydrophobe, ladite paroi comprend au moins un composé fluorescent hydrophile et ledit espace intra-particulaire comprend au moins un composé fluorescent hydrophobe ; et en ce que :

- pour chacune de ces n microparticules ou nanoparticules, l'un au moins des composés fluorescents hydrophobe ou hydrophile contenu dans ladite paroi rigide ou fluide et/ou dans ledit espace intra-particulaire est différent entre ces n particules, et

- n étant supérieur ou égal à 2.

2. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites particules sont choisies parmi les particules composites/synthétiques.

3. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdites particules sont des particules dont ladite paroi rigide ou fluide est de nature hydrophobe et ledit espace intra-particulaire est de nature hydrophile.

4. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites particules sont des particules synthétiques dont la paroi est constituée essentiellement de polymères choisis parmi le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polycaprolactone, le polystyrène le latex, la

cellulose, le chitosan, la viscose.

5. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que

- ladite composition comprenant au moins un composé miscible dans la première phase apte à générer une fluorescence ou ladite composition comprenant au moins un composé miscible dans la deuxième phase apte à générer une fluorescence ; ou

- ladite composition comprenant au moins un composé hydrophobe apte à générer une fluorescence ou ladite composition comprenant au moins un composé hydrophile apte à générer une fluorescence,

est choisie parmi le groupe constitué par un extrait synthétique ou naturel, végétal ou animal, ou un mélange d'extraits synthétiques naturels, un composé isolé ou purifié hydrophobe ou hydrophile apte à générer une fluorescence, ou encore un mélange de ces composés isolés ou purifiés.

6. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite composition comprenant au moins un composé hydrophobe apte à générer une fluorescence est constituée essentiellement de la partie hydrophobe d'un extrait végétal ou animal, ou un de leur mélange, et en ce que ladite composition comprenant au moins un composé hydrophile apte à générer une fluorescence est constitué essentiellement de que la partie hydrophile d'un extrait végétal ou animal, ou un de leur mélange.

7. Mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite partie hydrophobe et ladite partie hydrophile au sein d'une même particule sont tirées du même extrait ou de deux extraits distincts.

8. Procédé de préparation d'un mélange d'au moins deux microparticules ou nanoparticules aptes à générer un signal spécifique en fluorescence significativement différent (capable d'être distingué l'un de l'autre), chacune des deux microparticules ou nanoparticules présentant une compartimentation apte à générer un signal spécifique en fluorescence en partition de phases, ladite partition de phases délimitant un premier compartiment et un deuxième compartiment, ledit premier compartiment et ledit deuxième compartiment n'étant pas miscible entre eux, ledit procédé étant caractérisé

en ce que chacune desdites microparticules ou nanoparticules est obtenue par un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la préparation de la première phase et de la deuxième phase non miscibles; et

b) la formation de ladite structure chimique assemblée présentant comme résultant de la partition de phases un premier compartiment et un deuxième compartiment non miscibles entre eux, et

caractérisé en ce que ledit premier compartiment contient une composition comprenant au moins un composé miscible dans cette première phase apte à générer une fluorescence et le deuxième compartiment contient une composition comprenant au moins un composé miscible dans cette deuxième phase apte à générer une fluorescence ; et

caractérisé en ce que l'un au moins des composés apte à générer une fluorescence et miscibles dans la première phase, et l'un au moins des composés aptes à générer une fluorescence et miscibles dans la deuxième phase contenu dans ladite microparticule ou nanoparticule est différent entre ces deux microparticules ou nanoparticules.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite partition de phases délimite un premier compartiment de nature hydrophobe et un deuxième compartiment de nature hydrophile, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la préparation de la phase de nature hydrophobe non miscible à l'eau et de la phase de nature hydrophile, et

b) la formation de ladite structure chimique assemblée présentant comme résultant de la partition de phases un compartiment hydrophobe et un compartiment hydrophile,

caractérisé en ce que :

- ladite phase hydrophobe contient une composition comprenant au moins un composé hydrophobe apte à générer une fluorescence (dénommée composé fluorescent hydrophobe) et la phase hydrophile contient une composition comprenant au moins un composé hydrophile apte à générer une fluorescence (dénommée composé fluorescent hydrophile) ; ou

- lesdites phases hydrophobe et hydrophile sont mélangées à une troisième amphiphile contenant une composition comprenant au moins un composé fluorescent hydrophobe et au moins un composé fluorescent hydrophile

10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que chacune desdites particules comprend :

- une paroi rigide ou fluide délimitant au moins un espace intra-particulaire, ladite paroi étant de nature hydrophobe et ledit espace intra-particulaire étant occupé par une solution aqueuse, ou, inversement ladite paroi étant de nature hydrophile et ledit espace intra-particulaire étant occupé par une solution de nature hydrophobe ;

- i) lorsque ladite paroi rigide ou fluide est de nature hydrophobe et ledit espace intra-particulaire est de nature hydrophile, ladite paroi comprend au moins un composé fluorescent hydrophobe et ledit espace intra-particulaire comprend au moins un composé fluorescent hydrophile,

- ii) lorsque ladite paroi rigide ou fluide est de nature hydrophile et ledit espace intra-particulaire est de nature hydrophobe, ladite paroi comprend au moins un composé fluorescent hydrophile et ledit espace intra-particulaire comprend au moins un composé fluorescent hydrophobe ; et en ce que :

- pour chacune de ces 2 microparticules ou nanoparticules, l'un au moins des composés fluorescents hydrophobe ou hydrophile contenu dans ladite paroi rigide ou fluide et/ou dans ledit espace intra-particulaire est différent entre ces 2 particules.

11. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

a) la préparation d'une solution organique non miscible à l'eau (nommée solution hydrophobe) et d'une solution aqueuse ;

b) la mise en contact de la solution hydrophobe avec la solution aqueuse ; et

c) la formation desdites particules,

caractérisé en ce que :

- ladite solution hydrophobe contient une composition comprenant au moins un composé hydrophobe apte à générer une fluorescence (dénommé composé fluorescent hydrophobe) et la solution hydrophile contient une composition comprenant au moins un composé hydrophile apte à générer une fluorescence (dénommé composé fluorescent hydrophile) ; ou

- lesdites solutions hydrophobe et hydrophile sont mélangées à une troisième contenant une composition comprenant au moins un composé fluorescent hydrophobe et

au moins un composé fluorescent hydrophile

12. Procédé selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que les microparticules ou nanoparticules sont des particules composites/synthétiques et en ce que le procédé mis en œuvre pour la préparation de ces microparticules ou nanoparticules est choisi parmi le procédé de double émulsion-évaporation de solvant permettant l'encapsulation dans ces particules dudit au moins composé fluorescent hydrophile et hydrophobes, et le procédé d'émulsion simple-évaporation de solvant permettant l'encapsulation dans ces particules dudit au moins composé fluorescent hydrophobe.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce le procédé mis en œuvre pour la préparation de microparticules ou nanoparticules est le procédé de double émulsion-évaporation de solvant.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce ladite solution hydrophobe est constituée d'une solution choisi parmi :

- une solution de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) dissout dans du dichlorométhane ;
- le polycaprolactone dissout dans de l'acétone; ou
- le polystyrène dissout dans du limonène ou chloroforme.

15. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le procédé mis en œuvre pour leur préparation met en œuvre comme solution hydrophobe un concentré de phospholipides.

16. Procédé selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé en ce que :

- ladite composition comprenant au moins un composé miscible dans la première phase apte à générer une fluorescence et ladite composition comprenant au moins un composé miscible dans la deuxième phase apte à générer une fluorescence ; ou

- ladite composition comprenant au moins un composé hydrophobe apte à générer une fluorescence et ladite composition comprend au moins un composé hydrophile apte à générer une fluorescence,

est choisie parmi le groupe constitué par un extrait synthétique ou naturel, végétal ou animal, un mélange d'extraits synthétiques et/ou naturels, un composé isolé ou purifié hydrophobe ou hydrophile apte à générer une fluorescence, et un mélange de ces

composés isolés ou purifiés.

17. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite composition comprenant au moins un composé fluorescent hydrophobe est constituée essentiellement de la partie hydrophobe d'un extrait végétal ou animal, ou un de leur mélange, et en ce que ladite composition comprenant au moins un composé fluorescent hydrophile est constituée essentiellement de la partie hydrophile d'un extrait végétal ou animal, ou un de leur mélange.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite partie hydrophobe et ladite partie hydrophile sont tirées du même extrait ou de deux extraits distincts.

19. Procédé selon l'une des revendications 8 à 18, caractérisé en ce qu'il met en œuvre pour chacune de ces particules une composition en composés apte à générer une fluorescence différente pour chacune de particules , et en ce que n est supérieur ou égal à 2.

20. Composition pour le diagnostic *in vivo* ou pour l'imagerie médicale *in vivo*, caractérisée en ce qu'en comprend un mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que la paroi externe de ladite particule est marquée à l'aide d'un marqueur spécifique du tissu biologique ou de la cellule, ou l'un de leur élément que l'on cherche à observer ou à mettre en évidence, chacune des n particules étant marquée à l'aide d'un marqueur différent entre chacune des particules.

22. Kit pour le diagnostic *in vitro*, caractérisé en ce que le kit comprend un mélange d'au moins n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19, chacune des particules étant de préférence marquée par un marqueur différent.

23. Composition selon la revendication 21 ou kit selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit marqueur est un par un marqueur biologique capable de se fixer spécifiquement sur l'élément que l'on souhaite mettre en évidence ou observer, en particulier un anticorps dirigé spécifiquement contre cet élément.

24. Procédé de marquage d'un échantillon ou d'un objet caractérisé en ce que

l'on met en contact ledit échantillon ou objet avec un de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19..

25. Procédé de marquage d'un échantillon ou d'un objet selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'objet est compris dans le groupe d'objet constitué d'une œuvre d'art, de pièces techniques de haute valeur ajoutée, d'objets manufacturés.

26. Procédé de marquage d'une composition liquide caractérisé en ce que l'on incorpore dans ladite composition un mélange de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19, en particulier ladite composition étant choisie parmi une encre, un liquide injectable ou une solution nutritive.

27. Procédé de diagnostic, notamment de pathologie ou d'un stade d'avancement ou de régression d'une pathologie, à partir d'un échantillon biologique échantillon, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une étape dans laquelle on met en contact un mélange de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19, avec ledit échantillon, et en ce que l'on observe ou analyse le spectre de fluorescence émis par l'échantillon ainsi marqué, en particulier au niveau de certains éléments de l'échantillon, de préférence à partir d'une biopsie.

28. Procédé d'authentification d'un échantillon ou d'un objet susceptible d'avoir été marqué par un mélange ou combinaison particulière de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19,, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- l'observation ou analyse du spectre de fluorescence émis par l'échantillon ou l'objet susceptible d'être ainsi marqué ; et
- la comparaison du spectre ainsi obtenu avec le spectre de fluorescence spécifique associé à ce mélange ou combinaison,
- l'échantillon ou l'objet étant déterminé comme authentique si les deux spectres ainsi comparés sont identiques.

29. Objet ou liquide caractérisé en ce qu'il est marqué par un mélange ou combinaison spécifique de n structures assemblées ou n microparticules ou

nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19.

30. Utilisation d'un mélange ou combinaison spécifique de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19, comme biomarqueur, pour l'analyse protéomique, l'analyse génomique, diagnostic en chimie de synthèse, le diagnostic environnemental, la traçabilité ou l'authentification d'objet, ou pour la lutte contre la contrefaçon.

31. Procédé d'analyse ou de détection de la présence d'au moins un mélange de n microparticules ou nanoparticules selon l'une des revendications 1 à 8 ou obtenu par un procédé selon l'une des revendications 8 à 19, caractérisé en ce qu'il met en œuvre une lecture du spectre de fluorescence résultant de la séparation de la phase hydrophobe et hydrophile de la particule par microscopie confocale laser afin de permettre l'identification de chaque composante spectrale de ces deux phases, ces spectres de fluorescence de chacune des composantes étant spécifique de la particule analysée.