

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 18.06.90.

⑬ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO
MERIEUX — FR.

⑱ Inventeur(s) : Charleux Bernadette, Pichot Christian
et Mandrand Bernard.

⑳ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 20.12.91 Bulletin 91/51.

㉑ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

㉒ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

㉓ Titulaire(s) :

㉔ Mandataire : Cabinet Nony & Cie Conseils en Brevets
d'Invention.

⑥ Particules polymères, comportant une couche de surface contenant des groupements réactifs aldéhydes aromatiques, permettant de fixer par covalence des ligands biologiques aminés, leur préparation et leur utilisation.

⑦ Particules polymères ayant des dimensions inférieures à 1 micromètre, caractérisées par le fait qu'elles comprennent un cœur polymère sensiblement exempt de groupements aldéhydes, et une couche polymère de surface contenant des substituants de formule (I)



dans laquelle Z_1 et Z_2 représentent ensemble =O ou un groupement =YL, Y représentant soit un groupement =N-lié au groupement CH par sa double liaison, soit un cation iminium, et L représentant un reste d'un ligand aminé de formule schématique $\text{L}-\text{NH}_2$ ou $\text{L}=\text{NH}$, ou bien Z_1 représente $-\text{NH}-\text{L}$ et Z_2 représente $-\text{H}$, L étant le reste dudit ligand, et par le fait que lesdits substituants de formule (I) sont liés par covalence directement à un cycle aromatique présent dans des motifs répétitifs du polymère; leur préparation par polymérisation en émulsion, et leur utilisation à la fixation par covalence de ligands biologiques aminés et à la recherche de partenaires desdits ligands.

FR 2 663 337 - A1



La présente invention a pour objet des particules polymères présentant en surface des groupements réactifs permettant notamment de fixer par covalence des ligands biologiques aminés, leur préparation et leur application.

5 L'invention a en particulier pour objet des particules polymères permettant de fixer par covalence un ligand biologique aminé, ainsi que les particules obtenues après fixation dudit ligand biologique.

Il est connu de fixer des ligands biologiques sur des supports solides, notamment pour obtenir des réactifs permettant de révéler la présence ou
10 d'effectuer le dosage de molécules en solution ayant une affinité pour ledit ligand.

Par exemple, la fixation d'anticorps ou d'antigènes à la surface de particules de latex est un moyen simple et rapide pour visualiser la formation du complexe antigène-anticorps en amplifiant sa taille.
15 Généralement, les molécules d'anticorps ou d'antigène sont adsorbées physiquement sur les particules par liaisons hydrophobes. On ne peut cependant pas éviter une désorption au moins partielle au cours du temps. Il en résulte une variation de la sensibilité de tels réactifs.

Pour remédier à ces inconvénients, on a proposé de fixer par liaisons
20 covalentes les ligands biologiques sur les supports particuliers. Cela nécessite l'activation du support à l'aide d'agents activateurs ou d'agents de couplage tels que les dialdéhydes, le bromure de cyanogène, les carbodiimides, la benzoquinone, etc, ou encore par l'utilisation de dérivés diazotés, afin de créer une fonction réactive nécessaire au couplage par
25 covalence du ligand. Toutefois, les diverses solutions proposées jusqu'à présent ne semblent pas présenter d'améliorations décisives par rapport à la simple adsorption ; voir par exemple COUTURIER R. et VILLE A., Makromol. Chem. 187, 1603-1610 (1986).

On a maintenant découvert qu'il est possible de fixer par liaisons
30 covalentes des ligands sur des particules polymères sans passer par une réaction d'activation du support polymère, grâce à l'utilisation de particules de polymère avec une couche polymère de surface portant des groupements aldéhyde liés directement à des cycles aromatiques présents dans des motifs répétitifs du polymère de la couche de surface.

35 La présente invention a pour objet des particules polymères ayant des dimensions inférieures à 1 micromètre caractérisées par le fait qu'elles comprennent un coeur polymère sensiblement exempt de groupements aldéhydes, et une couche polymère de surface contenant des substituants de formule (I)



dans laquelle Z_1 et Z_2 représentent ensemble =O ou un groupement =YL, Y représentant soit un groupement =N- lié au groupement CH par sa double liaison,

soit un cation iminium $=\overset{+}{N}=$,

5 et L représentant un reste d'un ligand aminé de formule schématique $L-NH_2$ ou $L=NH$,

ou bien Z_1 représente $-NH-L$ et Z_2 représente $-H$, L étant le reste dudit ligand,

10 et par le fait que lesdits substituants de formule (I) sont liés par covalence directement à un cycle aromatique présent dans les motifs répétitifs du polymère.

Le substituant de formule I est lié directement par exemple à un cycle benzénique présent dans les motifs répétitifs du polymère de la couche de surface ; dans ce cas le polymère de la couche de surface comporte des motifs répétitifs contenant un groupement formyl benzène ou formyl phénylène.

Les particules de l'invention sont notamment celles pour lesquelles les substituants de formule (I) comprennent ou sont constitués par des substituants formyle.

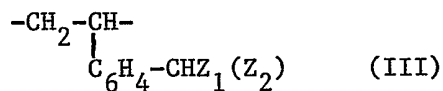
Les particules de l'invention sont également celles qui comprennent des substituants pour lesquels Z_1 représente $-NH-L$ et Z_2 représente $-H$. Comme cela sera précisé ci-après, de telles particules sont obtenues par réaction avec un ligand $L-NH_2$ ou $L=NH$ des particules dont les substituants de formule (I) sont des groupements formyle, suivies d'une réaction de réduction. Dans ce cas, il est possible de "neutraliser" les groupements formyle n'ayant pas réagi avec le ligand, en faisant agir les particules, avant l'étape de réduction, avec un amine de formule R_1NH_2 , dans laquelle R_1 est un alkyl inférieur, éventuellement hydroxylé ayant par exemple de 1 à 4 atomes de carbone. Dans ce cas, on obtient des particules pour lesquelles les substituants de formule (I) sont exclusivement des substituants tels que Z_1 représente $-NH-L$ et Z_2 représente $-H$, et tels que la couche de polymère de surface contient en outre des substituants de formule (II)



ces substituants de formule (II) étant liés par covalence directement à des motifs répétitifs du polymère de la couche de surface, sans l'intermédiaire d'un bras espaceur.

L'invention a notamment pour objet des particules telles que définies précédemment, dont la couche polymère de surface contient des motifs répétitifs de formule (III)

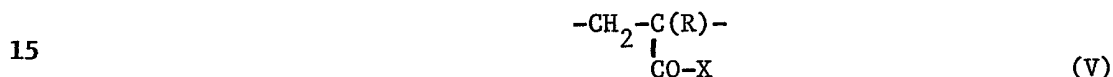
40



dérivant d'un monomère précurseur styrénique. Ces particules peuvent être en particulier obtenues par copolymérisation en surface des monomères
 5 vyniliques correspondant aux motifs de formule (III) avec du styrène, et dans ce cas la couche de polymère de surface contient en outre des motifs de formule (IV)

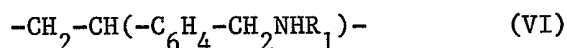


On peut également copolymériser en surface, outre les monomères
 10 correspondant aux motifs de formule (III) (et éventuellement le styrène) des monomères acryliques ou méthacryliques et dans ce cas les particules contiennent en outre dans la couche de polymère de surface des motifs répétitifs de formule (V)



dans laquelle R représente -H ou méthyle, X représente -OR' ou -NR'(R''), R' représente un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone et R'' représente -H ou un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone.

Dans le cas où les particules contenant dans la couche de surface des
 20 motifs de formule (III), et où l'on a neutralisé les groupements formyle restant par réaction avec l'amine $\text{R}_1\text{-NH}_2$, on obtient après réduction des particules dont la couche de surface contient des motifs de formule (III) qui sont exclusivement des motifs tels que Z_1 représente -NH-L et Z_2
 25 représente -H, et la couche de polymère de surface contient en outre des motifs de formule (VI)



dérivant d'un monomère précurseur styrénique,
 R_1 étant un alkyle inférieur éventuellement hydroxylé.

L'invention concerne notamment des particules dont la couche de
 30 polymère de surface dont les substituants de formule (I) sont exclusivement portés par des motifs de formule (III), et, parmi ces particules, celles dont les substituants $-\text{CHZ}_1(\text{Z}_2)$ comprennent des substituants formyle, ou sont exclusivement des substituants formyle. De préférence, dans les
 35 particules de l'invention, lesdits motifs répétitifs auxquels sont liés par covalence les substituants de formule (I) ou les substituants de formules (I) et (II) représentent de 0,1 à 20%, en particulier de 1 à 10%, en poids par rapport aux motifs répétitifs ne portant pas ces substituants, ce
 40 pourcentage étant par convention calculé pour des particules dont tous les substituants de formules (I) et (II) autres que formyle seraient remplacés par des substituants formyle.

Généralement, la proportion de monomère de formule (II) est telle que l'on obtient, sur la surface des particules, une proportion de 10^{-5} à 10^{-10} mole environ de substituants de formule (I) par m^2 .

Les particules de l'invention sont notamment celles pour lesquelles le coeur des particules est en polymère hydrophobe, notamment en polystyrène.

Les dimensions des particules de l'invention varie généralement de 0,08 à 0,8 μm .

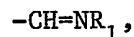
L'invention a également pour objet des compositions particulières qui contiennent un ensemble de particules telles que définies précédemment, soit sous la forme d'une poudre, soit sous la forme suspension aqueuse (latex). L'invention concerne en particulier de telles compositions particulières dans lesquelles ledit ensemble de particules est homogène en ce qui concerne la répartition des tailles de particules qui peuvent varier de $\pm 5\%$ autour de la dimension moyenne des particules. Il est même possible en pratique d'obtenir des particules dont la gamme de dimensions varie de moins de 1% autour de la valeur moyenne.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des particules ou compositions particulières telles que définies précédemment. Ce procédé est caractérisé par le fait que l'on effectue la polymérisation en émulsion aqueuse d'un premier monomère exempt de groupements aldéhyde pour obtenir des particules constituant le coeur des particules finales, puis que l'on ajoute, à une émulsion aqueuse des particules constituant le coeur, un second monomère copolymérisable avec ledit premier monomère, ledit second monomère comportant un substituant formyle lié à un cycle aromatique, de façon à former sur les particules de coeur, par polymérisation, la couche de surface contenant des substituants formyle liés à un cycle aromatique, puis que, si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec un ligand aminé de formule schématique $L-NH_2$ ou $L=NH$, pour obtenir des particules dont la couche polymère de surface contient des substituants de formule (VII)

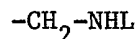


où Y' représente un groupement $=N-$ lié par sa double liaison au groupement CH , ou un groupement iminium,

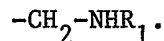
que si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec une amine primaire de formule R_1NH_2 de façon à transformer les substituants formyle n'ayant pas réagi avec le ligand en substituants de formule



et que, si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec un agent réducteur capable de réduire les groupements imine ou iminium pour obtenir des particules correspondantes contenant des substituants :



et éventuellement



Les produits de départ (monomères tels que les p- ou o-formylstyrènes)
5 sont connus ou peuvent être préparés selon des méthodes connues. Par exemple, le p-formylstyrène peut être préparé selon le procédé décrit par DALE, J. Org. Chem. 26, 2225 (1961).

Dans des modes de réalisation particuliers, le procédé de l'invention peut
10 encore présenter les caractéristiques suivantes, prises isolément ou en combinaison.

- On peut effectuer la formation de la couche de surface en deux opérations séparées ; par exemple, après avoir préparé les particules de coeur, on ajoute à une émulsion aqueuse contenant les particules de coeur une faible quantité du premier monomère et/ou d'un troisième monomère de
15 formule (VIII)



dans laquelle R et X sont définis comme précédemment, ladite faible quantité représentant par exemple de 1 à 10% en poids par rapport au poids du coeur des particules, et l'on ajoute ensuite ledit
20 second monomère (en une seule fois ou progressivement) avant la fin de la polymérisation de ladite faible quantité dudit premier et/ou troisième monomère ;

- On peut également effectuer l'étape de polymérisation du premier monomère puis l'étape de polymérisation du second monomère directement à la
25 suite l'une de l'autre, dans le même milieu réactionnel ; on peut dans ce cas ajouter le second monomère (en une seule fois ou progressivement) sous la forme d'un mélange avec le premier monomère ; on peut également ajouter le second monomère en mélange avec le monomère de formule (VIII) et éventuellement avec le premier monomère ; de préférence on effectue cette
30 addition du second monomère avant la fin de la polymérisation du premier monomère, par exemple lorsque le taux de conversion atteint 80 à 90 % ;

- On opère éventuellement en présence d'un agent tensio-actif ;

- On effectue les réactions de polymérisation en présence d'un amorceur générateur de radicaux libres ;

35 - On effectue les polymérisations généralement en milieu tamponné de façon à maintenir un pH sensiblement constant, généralement dans la gamme 3-7.

La réaction de polymérisation du monomère constituant le coeur des particules (par exemple le styrène) et la réaction consécutive de
40 polymérisation du monomère contenant les substituants de formule (I) sont

effectuées selon la technique, connue en soi, de polymérisation en émulsion. On opère en solution aqueuse, car l'utilisation de solvants organiques pose des problèmes de pollution et ne donne pas des résultats satisfaisants lorsque l'on essaie de remettre finalement en dispersion aqueuse, en vue de leur utilisation pratique, les particules obtenues.

Le principe des réactions de polymérisation en émulsion est connu en soi. Ce procédé consiste à réaliser une émulsion aqueuse du monomère choisi comme précurseur du polymère de coeur des particules. On peut éventuellement favoriser la réalisation de l'émulsion aqueuse à l'aide d'un agent tensio-actif lorsque l'on souhaite diminuer la taille des particules finales. On effectue la polymérisation par addition d'un générateur de radicaux libres lorsque la polymérisation est terminée, on obtient une dispersion de particules de polymère de coeur.

Les conditions de polymérisation en émulsion sont décrites par exemple par D.C. BLACKLEY dans "Emulsion Polymérisation", Applied Science Publishers, (1975), et par J.W. VANDERHOFF et al, J. Macromol. Sci.-Chem., A7 (3), pp. 667-670 (1973).

Les générateurs de radicaux libres permettant d'amorcer les réactions de polymérisation en émulsion sont connus. Ce sont par exemple des persels, en particulier des persulfates comme le persulfate de potassium $K_2S_2O_8$, qui sont des composés ioniques hydrosolubles, ou encore un dérivé azo hydrosoluble tel que l'acide 4,4'-azobis-4-cyanopentanoïque ou le dichlorhydrate de 2,2'-azo bis(2-amidinopropane). On peut également utiliser un générateur de radicaux libres soluble dans le monomère de départ, par exemple l'azo bis(isobutyronitrile).

Les tensio-actifs éventuellement utilisés peuvent être des tensio-actifs anioniques, cationiques ou non ioniques. Pour effectuer la polymérisation du monomère constituant le coeur des particules, il est préférable d'utiliser des tensio-actifs ioniques lorsque l'on n'utilise pas d'amorceurs de radicaux libres ioniques. En effet, en pratique, la présence d'ions est nécessaire pour stabiliser les particules de l'émulsion.

Pour effectuer la deuxième phase du procédé, c'est-à-dire la copolymérisation en surface du monomère comportant les groupements aldéhydes, il n'est pas nécessaire d'utiliser un générateur de radicaux libres ionique, même dans le cas où l'on n'utilise pas de tensio-actif ionique, puisque dans ce cas les particules de coeur sont déjà durcies et stabilisées.

Les quantités d'amorceur à utiliser peuvent être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine. Généralement, on utilise une

quantité d'amorceur correspondant à environ 1% en poids par rapport au poids des monomères de départ.

De façon générale, la présence de tensio-actif n'est utile que lorsqu'on veut obtenir des particules de dimension inférieure à 0,2µm environ. Dans les autres cas, il est préférable d'opérer en l'absence de tensio-actif, car cela permet d'éviter la formation d'une population secondaire de petites particules lors de la seconde polymérisation correspondant à la formation de la couche de surface. Ce phénomène de formation d'une seconde population de petites particules est parfois observé lorsque les particules de coeur ont été préparées en présence d'un tensio-actif.

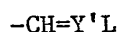
Pour ce qui concerne la fixation du ligand, on voit que dans la formule (VII) ci-dessus, L est le reste d'un ligand qui peut être représenté par la formule $L-NH_2$ (lorsque le ligand a réagi avec l'aldéhyde par un groupement amine primaire), ou bien L est le reste d'un ligand qui peut être représenté par la formule $L=NH$, dans laquelle $=NH$ est l'imine d'un groupement de type guanidine contenu dans le ligand (lorsque le ligand a réagi avec l'aldéhyde par ledit groupement de type guanidine).

Dans le cas de la réaction de l'aldéhyde sur un groupement guanidine du ligand, le cation iminium est accompagné de l'anion OH^- formé, qui est toutefois échangeable par tout autre anion désiré, par exemple un anion halogénure.

Dans le cas où, après avoir fait agir le ligand, on ne neutralise pas (par addition d'une amine R_1NH_2), les groupements aldéhydes n'ayant pas réagi, ceux-ci peuvent être transformés en groupements alcool (hydroxyméthyle) lors de l'étape ultérieure de réduction, à condition que la quantité d'agent réducteur soit suffisante (car les groupements imine sont plus réductibles que les groupements aldéhyde et sont donc réduits les premiers).

L'invention a également pour objet l'utilisation des particules ou compositions particulières telles que définies précédemment. Cette utilisation dépend de la particule considérée.

Par exemple, dans le cas où les substituants de formule (I) sont exclusivement des substituants formyle, on met en contact une émulsion contenant lesdites particules avec une solution dudit ligand aminé pour obtenir des particules dont la couche de surface comporte des substituants de formule



dans laquelle Y' et L sont définis comme précédemment,

que, si désiré, on transforme les substituants formyle restants, qui n'ont pas réagi avec le ligand, par réaction avec une amine primaire R_1NH_2 , R_1 étant défini comme précédemment, et que, si désiré, on soumet les particules ainsi obtenues à l'action d'un agent réducteur capable de réduire les groupements imine ou iminium en groupements amine correspondants pour obtenir des particules dont la couche de surface comporte des substituants $-CH_2-NHL$ et éventuellement $-CH_2-NHR_1$. Cette utilisation particulière permet de fixer un ligand biologique sur les particules de l'invention. Le groupement aldéhyde agit sur les groupements amines primaires du ligand pour former une base de Schiff que l'on réduit, si désiré, en amine secondaire à l'aide d'un agent réducteur tel qu'un borohydrure ou cyanoborohydrure de métal alcalin ou d'ammonium. Si le ligand comporte d'autres fonctions azotées telles que la fonction guanidine (ou son sel de guanidinium), la condensation avec l'aldéhyde donnera une base de Schiff comportant une fonction iminium susceptible d'être réduite en amine secondaire à l'aide des mêmes agents réducteurs ; voir par exemple KING, Biochemistry, Vol.5, 3454 (1966), et NAKAYA et al., J. BIOCHEM. Tokyo, 61, 345 (1967). Pour faire réagir le réactif avec le ligand, on opère généralement en solution aqueuse à une température pouvant aller par exemple de 4 à 60°C. La fin de la réaction de couplage avec le ligand est généralement repérable par exemple par une stabilisation du signal de lumière diffusée par les particules.

Les particules contenant le ligand fixé par covalence peuvent être utilisées (de préférence après réduction du groupement imine ou iminium afin de stabiliser la liaison ligand-particule) pour rechercher, selon les méthodes connues en soi, la présence éventuelle du récepteur du ligand, ou d'un partenaire ayant une affinité pour ledit ligand, dans une solution ou dans un fluide biologique à examiner. Les réactifs obtenus peuvent donc être utilisés selon les méthodes connues dans le domaine de la biologie ou de la biochimie, en particulier dans le domaine du diagnostic médical fondé sur des tests sérologiques, tels que ceux utilisant la formation de complexes antigène-anticorps. Lorsque le ligand fixé est une enzyme, le réactif peut être employé comme catalyseur dans les réactions biologiques, chimiques ou biochimiques catalysées par cette enzyme.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1Préparation des particules de coeur

Dans un réacteur thermostaté de 1 litre, sont versés 950g d'eau désionisée et déoxygenée, 0,4163g d'hydrogénophosphate de potassium trihydrate et 30,4g de styrène fraîchement distillé. Le mélange, maintenu agité à 350 tpm, est porté à 80°C sous une atmosphère d'azote. Le persulfate de potassium (0,41g), amorceur hydrosoluble, est introduit en solution dans 20g d'eau.

La polymérisation est poursuivie pendant 7 heures dans les mêmes conditions, après quoi le latex obtenu est filtré sur laine de quartz et stocké à +4°C ; son pH est de 3,6. Le taux de conversion de la polymérisation est évalué à 93% par mesure de l'extrait sec. Le diamètre des particules, mesuré par microscopie électronique à transmission (MET), est de 303 nm avec un indice de polydispersité de 1,003, ce qui indique une très bonne homogénéité. Il est estimé à 340 nm par diffusion dynamique de la lumière (DDL) à 90°.

Les particules de polystyrène obtenues sont utilisées comme particules de coeur (semence) pour la fixation de la couche polymère de surface.

EXEMPLE 2Synthèse d'un latex à fonctions aldéhyde superficielles par post-polymérisation du para-formylstyrène sur semence de polystyrène

Dans un réacteur thermostaté de 250ml, 201g du latex de l'exemple 1 (5,67g de polystyrène) sont maintenus à 70°C sous agitation douce (60 tpm) et avec un bullage d'azote pendant une vingtaine d'heures, ceci afin d'éliminer toute trace de persulfate du latex semence. Un gonflement par 0,80g de styrène est ensuite réalisé pendant trois heures à 70°C, avec une agitation de 350 tpm et sous atmosphère d'azote. L'addition de 0,1090g de persulfate de potassium dissous dans 6ml d'eau marque le début de la réaction. Trente minutes après, un mélange de styrène (0,2458g) et de p-formylstyrène (0,5292g) est introduit en une seule étape dans le réacteur. La polymérisation est effectuée sur une durée totale de 4 heures, après quoi le latex est filtré sur laine de quartz et analysé. Le diamètre des particules, mesuré par MET est de 330nm avec un indice de polydispersité de 1,008 indiquant une population très homogène ; l'augmentation de diamètre par rapport à la semence est de 30 nm. La mesure du diamètre par diffusion dynamique de la lumière à 90° donne une valeur de 370 nm. Aucune population de petites particules n'est observée.

L'analyse de la surface des particules par ESCA (sur une épaisseur d'environ 5.10^{-9} m) indique que la surface est composée d'un mélange de polystyrène et de poly-para-formylstyrène.

5 Le copolymère obtenu par évaporation de l'eau du latex se présente sous la forme d'une poudre blanche relativement soluble dans le chloroforme (l'addition d'un peu d'acétone aide à la solubilisation). L'analyse RMN¹H dans le chloroforme deutérié permet également une détermination quantitative de la composition du copolymère. On trouve une composition molaire de 6% de motifs p-formylstyrène.

10 L'analyse élémentaire donne les résultats suivants :

	C%	H%	O%	
	92,11	7,71	1,57	valeurs expérimentales
		7,41	1,50	
15	91,47	7,62	0,91	valeurs calculées pour 6% de p-formylstyrène

EXEMPLE 3

Synthèse d'un latex à fonctions aldéhyde superficielles par post-polymérisation du para-formylstyrène sur semence de polystyrène

20 Dans un réacteur thermostaté de 250ml, 200g du latex de l'exemple 1 (5,64g de polystyrène) sont maintenus à 80°C sous agitation douce (60 tpm) et avec un bullage d'azote pendant une vingtaine d'heures afin d'éliminer toute trace de persulfate résiduel.

Un gonflement par 0,545g de styrène est ensuite réalisé pendant 1 heure
25 à 80°C, avec une agitation de 350 tpm sous atmosphère d'azote.

L'addition de 0,1014g de persulfate de potassium dissous dans 5ml d'eau marque le début de la réaction.

Une heure après, 660 mg de para-formylstyrène sont ajoutés à vitesse contrôlée (10µl/min).

30 La polymérisation est effectuée sur une durée totale de 8 heures, après quoi le latex est filtré sur laine de quartz et analysé. L'analyse du latex final par chromatographie en phase vapeur montre que la conversion du p-formylstyrène est proche de 100%.

Le diamètre des particules, mesuré par microscopie électronique à
35 transmission est de 330nm avec un indice de polydispersité de 1,002 indiquant une population très homogène ; l'augmentation du diamètre par rapport à la semence est de 30nm. La mesure du diamètre par diffusion dynamique de la lumière à 90° donne une valeur de 375nm. Aucune population de petites particules n'est observée.

Le copolymère, obtenu par évaporation de l'eau du latex se présente sous la forme d'une poudre blanche soluble dans un mélange de chloroforme et d'acétone de composition 1 : 1.

5 L'analyse RMN¹H permet de déterminer la composition molaire globale en p-formylstyrène : elle est évaluée à 8%.

EXEMPLE 4

Synthèse d'un latex à fonctions aldéhyde superficielles par post-polymérisation du para-formylstyrène sur semence de polystyrène

10 Dans un réacteur thermostaté de 250ml, 200g du latex de l'exemple 1 (5,64g de polystyrène) sont maintenus à 70°C sous agitation douce (60 tpm) et avec un bullage d'azote pendant une vingtaine d'heures afin d'éliminer toute trace de persulfate résiduel.

15 Un gonflement par 0,207g de styrène est ensuite réalisé pendant 1 heure à 70°C, avec une agitation de 350 tpm et sous atmosphère d'azote. L'addition de 0,064g d'AIBN, amorceur organosoluble, en solution dans 0,822g de styrène, marque le début de la polymérisation.

Une heure après, 813mg de para-formylstyrène sont ajoutés à vitesse contrôlée (10µl/min).

20 La polymérisation est effectuée dans les mêmes conditions pendant 8 heures, puis l'agitation est diminuée à 150 tpm. La durée totale de la réaction est de 23 heures. Le latex est filtré sur laine de quartz.

Le diamètre des particules, mesuré par MET est de 330 nm avec un indice de polydispersité de 1,001, indiquant une population très homogène ;
25 l'augmentation du diamètre par rapport à la semence est d'environ 30nm.

La mesure du diamètre par diffusion dynamique de la lumière à 90° donne une valeur de 370nm. Le copolymère obtenu par évaporation de l'eau du latex est soluble dans un mélange de chloroforme deutérié et de DMSO deutérié de composition 1 : 1 dans lequel l'analyse RMN¹H a été effectuée : elle
30 permet de déterminer la proportion molaire en motifs para-formylstyrène, comprise entre 8 et 10%.

EXEMPLE 5

Synthèse d'un latex à fonctions aldéhyde superficielles par addition différée en une étape du para-formylstyrène durant une réaction de polymérisation en émulsion du styrène

Dans un réacteur thermostaté de 250ml, on verse 194g d'eau désionisée et désoxygénée, 0,082g d'hydrogénophosphate de potassium trihydrate et 30g de styrène fraîchement distillé.

40

Le mélange, agité mécaniquement à 340tpm, est porté à 80°C et maintenu sous atmosphère d'azote. L'introduction de 0,082g de persulfate en solution dans un minimum d'eau marque le début de la polymérisation.

Après 4 heures, 0,575g de p-formylstyrène sont versés en une étape dans le réacteur. La réaction est poursuivie pendant encore 12 heures puis le latex est filtré sur laine de quartz et conservé à 4°C.

L'analyse du latex final par chromatographie en phase vapeur indique que la quantité de monomère p-formylstyrène résiduel est inférieure à 0,1%, soit pratiquement un taux de conversion de 100%.

Le diamètre des particules est estimé à 300nm par MET et à 330nm par diffusion dynamique de la lumière à 90°.

L'analyse RMN¹H du latex séché permet de déterminer la proportion molaire des particules en motifs para-formylstyrène : elle est de 9,5%.

15 EXEMPLE 6

Essais de fixation d'anticorps pour l'agglutination

Les latex des exemples 2 et 3 ont été utilisés comme supports d'anticorps de chèvre (anti-protéine C réactive = anti-CRP), puis ont été testés pour l'agglutination avec des solutions de CRP à différentes concentrations.

La fixation des anticorps (solution à 4,4 g/l) est effectuée en milieu tampon phosphate à pH = 7,5 sur les latex dilués à 1% ; la quantité d'anticorps utilisée est de 50 mg par gramme de particules de polymère (poids sec) et l'agitation à température ambiante est maintenue pendant une vingtaine d'heures.

Particules de l'exemple	Extrait sec	Latex (μl)	Solution (μl) d'anticorps	Tampon (μl)
2	3,21%	312	114	574
3	3,15%	317	114	569

Les milieux réactionnels sont ensuite centrifugés (15000tpm pendant 15 min), le surnageant est éliminé pour analyse et les culots sont repris par 1ml de tampon glycine/NaCl à pH = 8,2 contenant 10g/l de sérum albumine bovine. Après agitation pour redisperser les particules, les latex obtenus sont prêts à être testés en agglutination.

Les tests d'agglutination sont effectués par agitation, sur plaque, de 25μl de latex avec 25μl de solution de CRP ; la lecture est faite après 2 minutes.

Les deux latex présentent un comportement similaire, avec un seuil de sensibilité de l'ordre de 1 mg/l de CRP.

L'analyse des surnageants, obtenus lors de la centrifugation, donne pour les latex testés des rendements de fixation de l'ordre de 82-85%. La réduction par le cyanoborohydrure selon les méthodes connues stabilise la liaison de fixation des anticorps sur les particules.

5

10

15

20

25

30

35

40

REVENDEICATIONS

1. Particules polymères ayant des dimensions inférieures à 1
micromètre, caractérisées par le fait qu'elles comprennent un coeur polymère
5 sensiblement exempt de groupements aldéhydes, et une couche polymère de
surface contenant des substituants de formule (I)



dans laquelle Z_1 et Z_2 représentent ensemble =O ou un groupement =YL, Y
représentant soit un groupement =N- lié au groupement CH par sa double
10 liaison, soit un cation iminium,
et L représentant un reste d'un ligand aminé de formule schématique $\text{L}-\text{NH}_2$
ou $\text{L}=\text{NH}$,
ou bien Z_1 représente $-\text{NH}-\text{L}$ et Z_2 représente $-\text{H}$, L étant le reste dudit
ligand,
15 et par le fait que lesdits substituants de formule (I) sont liés par
covalence directement à un cycle aromatique présent dans des motifs
répétitifs du polymère de la couche de surface.

2. Particules selon la revendication 1, caractérisées par le fait que
lesdits substituants comprennent des substituants formyle.

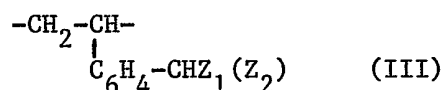
20 3. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisées par le fait que lesdits substituants comprennent des
substituants pour lesquels Z_1 représentent $-\text{NH}-\text{L}$ et Z_2 représente $-\text{H}$.

4. Particules selon la revendication précédente, caractérisées par le
fait que lesdits substituants de formule (I) sont exclusivement des
25 substituants tels que Z_1 représente $-\text{NH}-\text{L}$ et Z_2 représente $-\text{H}$,
et que la couche de polymère de surface contient en outre des substituants
de formule (II)



dans laquelle R_1 est un alkyle inférieur éventuellement hydroxylé,
30 et que lesdits substituants de formule (II) sont liés par covalence
directement à des motifs répétitifs dudit polymère de la couche de surface,
sans l'intermédiaire d'un bras espaceur.

5. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisées par le fait que ladite couche de polymère de surface contient
35 des motifs répétitifs de formule (III)



dérivant d'un monomère précurseur styrénique.

6. Particules selon la revendication précédente, caractérisées par le fait que ladite couche de polymère de surface contient en outre des motifs de formule (IV)

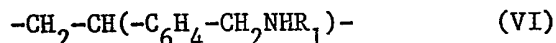


5 7. Particules selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisées par le fait que ladite couche de polymère de surface contient en outre des motifs répétitifs de formule (V)



10 dans laquelle R représente -H ou méthyle, X représente -OR' ou -NR'(R''), R' représente un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone et R'' représente -H ou un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone.

8. Particules selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisées par le fait que lesdits motifs de formule (III) sont
15 exclusivement des groupements tels que Z_1 représente -NH-L et Z_2 représente -H, et que la couche de polymères de surface contient en outre des motifs de formule (VI)



20 dérivant d'un monomère précurseur styrénique, R_1 étant un alkyle inférieur éventuellement hydroxylé.

9. Particules selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisées par le fait que lesdits substituants $-\text{CHZ}_1(\text{Z}_2)$ comprennent des substituants formyle.

25 10. Particules selon la revendication précédente, caractérisées par le fait que lesdits substituants $-\text{CHZ}_1(\text{Z}_2)$ sont des substituants formyle.

11. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que lesdits motifs répétitifs auxquels sont liés par covalence les substituants de formule (I) ou les substituants de
30 formules (I) et (II) représentent de 0,1 à 20%, et en particulier de 1 à 10%, en poids par rapport aux motifs répétitifs ne portant pas ces substituants, ce pourcentage étant par convention calculé pour des particules dont tous les substituants de formules (I) et (II) autres que formyle seraient remplacés par des substituants formyle.

35 12. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ledit coeur est en polymère hydrophobe.

13. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait que ledit coeur polymère est en polystyrène.

14. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées par le fait qu'elles ont des dimensions pouvant aller de 0,08 à 0,8 μ m.

5 15. Compositions particulières, caractérisées par le fait qu'elles contiennent un ensemble de particules telles que définies dans l'une quelconque des revendications précédentes.

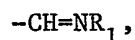
16. Compositions particulières selon la revendication 15, caractérisées par le fait que ledit ensemble est homogène en ce qui concerne la répartition des tailles de particules qui peuvent varier de $\pm$ 5% autour de
10 la taille moyenne des particules.

17. Procédé de préparation de particules ou de compositions particulières telles que définies dans l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on effectue la polymérisation en émulsion aqueuse d'un premier monomère exempt de groupements aldéhyde pour
15 obtenir des particules constituant le coeur des particules finales, puis que l'on ajoute, à une émulsion aqueuse des particules constituant le coeur, un second monomère copolymérisable avec ledit premier monomère, ledit second monomère comportant un substituant formyle lié à un cycle aromatique, de façon à former sur les particules de coeur, par polymérisation, la couche de
20 surface contenant des substituants formyle liés à un cycle aromatique, puis que, si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec un ligand aminé de formule schématique $L-NH_2$ ou $L=NH$, pour obtenir des particules dont la couche polymère de surface contient des substituants de formule (VII)

25
$$-CH=Y'L \quad (VII)$$

où Y' représente un groupement $=N-$ lié par sa double liaison au groupement CH, ou un cation iminium,

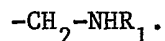
que, si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec une amine primaire de formule R_1NH_2 de façon à transformer les substituants
30 formyle n'ayant pas réagi avec le ligand en substituants de formule



et que, si désiré, on fait réagir les particules ainsi obtenues avec un agent réducteur capable de réduire les groupements imine ou iminium pour
obtenir des particules correspondantes contenant des substituants :

35
$$-CH_2-NHL$$

et éventuellement



18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait que l'on effectue la polymérisation du premier monomère et la polymérisation du
40 second monomère en deux opérations séparées.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé par le fait qu'avant d'effectuer la deuxième opération consistant en la polymérisation du second monomère sur les particules de coeur, on ajoute à une émulsion aqueuse contenant le coeur des particules une faible quantité du premier monomère
 5 et/ou d'un troisième monomère copolymérisable de formule (VIII)



dans laquelle R représente -H ou méthyle, X représente -OR' ou -NR'(R''), R' représentant un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone et R'' représentant -H ou un alkyle ayant de 1 à 4 atomes de carbone, ladite faible quantité
 10 représentant de 1 à 10% en poids par rapport au poids du coeur des particules, et que l'on ajoute ensuite ledit second monomère avant la fin de la polymérisation de ladite faible quantité dudit premier et/ou troisième monomère.

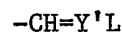
20. Procédé selon la revendication 17, caractérisé par le fait que l'on effectue l'étape de polymérisation du premier monomère puis l'étape de copolymérisation du second monomère directement à la suite l'une de l'autre, dans le même milieu réactionnel.

21. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on ajoute ledit second monomère sous la forme d'un mélange avec le
 20 premier monomère.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé par le fait que l'on ajoute ledit second monomère en mélange avec un monomère de formule (VIII), et éventuellement avec le premier monomère.

23. Utilisation des particules ou compositions particulières telles que définies dans les revendications 1 à 16, caractérisée par le fait que :

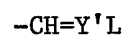
a) dans le cas où les substituants de formule (I) sont exclusivement des substituants formyle, on met en contact une émulsion contenant lesdites particules avec une solution dudit ligand aminé pour obtenir des particules
 30 dont la couche de surface comporte des substituants de formule



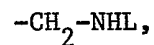
dans laquelle Y' et L sont définis comme dans la revendication 17, que, si désiré, on transforme les substituants formyle restants, qui n'ont pas réagi avec le ligand, par réaction avec une amine primaire R_1NH_2 ,
 35 R_1 étant défini comme dans la revendication 17, et que, si désiré, on soumet les particules ainsi obtenues à l'action d'un agent réducteur capable de réduire les groupements imine ou iminium en groupements amine correspondants pour obtenir des particules dont la couche de surface comporte des substituants $-\text{CH}_2-\text{NHL}$ et éventuellement $-\text{CH}_2-\text{NHR}_1$;

40

et/ou b) à l'aide des particules contenant des substituants



ou



5 on recherche, selon les méthodes connues en soi, la présence éventuelle du récepteur ou d'un partenaire dudit ligand dans une solution ou dans un fluide biologique à examiner ;

10 ou c) lorsque le ligand fixé sur les particules est une enzyme, on utilise lesdites particules comme catalyseurs dans des réactions biologiques, chimiques ou biochimiques catalysées par ladite enzyme.

15

20

25

30

35

40

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**RAPPORT DE RECHERCHE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9007591
FA 446977

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 360 452 (EASTMAN KODAK CO.) * Revendications 2-8; page 5, lignes 23-29; page 5, lignes 1-2; page 5, lignes 43-58; page 3, lignes 16-19 * ---	1-2,5-7 ,10-11, 14,23
X	EP-A-0 350 407 (BIO MERIEUX) * Revendications 1-2,10-12,15-16,21; page 3, lignes 16-19; page 6, lignes 53-61; revendication 18 * ---	1-3,12- 14,23
A	---	17
A	GB-A-1 172 768 (ICI OF AUSTRALIA AND NEW ZEALAND) * Revendications 1,8,22; page 2, lignes 7-13; page 5, lignes 25-31 * -----	1-3,23
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C 08 F C 12 N G 01 N
Date d'achèvement de la recherche 19-03-1991		Examinateur PERSSON E.K.C.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		